

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ТКАНЕЙ ЗУБА

© 2016 г. **Е. В. Тимченко***, канд. физ.-мат. наук; **П. Е. Тимченко***, канд. физ.-мат. наук;
Л. А. Жердева*, магистрант; **Л. Т. Волова****, доктор мед. наук; **А. Г. Бурда*****, канд. мед. наук

*Самарский государственный аэрокосмический университет им. академика С.П. Королева
(национальный исследовательский университет), Самара

**Самарский государственный медицинский университет, Самара

***Медицинский университет "Реавиз", Самара

E-mail: laser-optics.timchenko@mail.ru, timpavel@mail.ru, csrl.sam@mail.ru

С использованием экспериментального стенда, позволяющего бесконтактно и неинвазивно исследовать поверхность зубов и кариозных полостей, получены спектры комбинационного рассеяния образцов зубных эмали, дентина и цемента, а также кальцификатов пульпы зуба. На основе анализа спектров исследовано распределение минеральных и органических компонентов здоровых твердых тканей зуба и при поражении их кариесом, а также исследованы кальцификаты пульпы зуба. Введены критерии идентификации данных типов патологий. Соотношение интенсивностей в твердых тканях на волновых числах 1069 и 870 см⁻¹ остается постоянным даже при образовании кариеса, в то же время кальцификаты зуба с дегенерацией пульпы характеризуются ростом соотношения на этих волновых числах, что может быть использовано в диагностике фиброзного пульпита. Для эмали характерно усиление замещения гидроксильной группы на анион (CO₃)²⁻ в апатите при уменьшения замещения аниона (PO₄)³⁻ на (CO₃)²⁻. При патологических процессах, таких как кариес и кальцификация, наблюдается обратный процесс.

Ключевые слова: спектроскопия, комбинационное рассеяние, растровая электронная микроскопия, зуб, кариес, кальцификаты пульпы зуба.

Коды OCIS: 170.5660, 170.4580

Поступила в редакцию 25.01.2016

Введение

Для успешной профилактики и эффективного лечения заболеваний полости рта важным моментом является оперативность в установлении диагноза. Современная стоматология опирается на философию минимально-инвазивной интервенции, подразумевающей бережное и щадящее отношение к биологическим структурам зуба, а также раннюю диагностику поражения. Для воплощения этих целей в арсенале диагностических приемов врача-стоматолога помимо основных методов исследования есть специальные дополнительные оптические и электрометрические методы (лазерная флуоресценция, количественная световая флуоресценция, электрометрический метод) [1–3].

Выявление кариозных поражений на ранних стадиях позволяет использовать консервативные методы лечения либо максимально экономно по отношению к твердым тканям зуба проводить оперативно-восстановительное

лечение кариеса с применением специальных инструментов минимального размера, дополнительных способов препарирования (лазерное, ультразвуковое, воздушно-абразивное) и пломбировочных материалов.

Для эффективного и своевременного установления правильного диагноза полное стоматологическое обследование должно включать в себя исследование твердых тканей зуба с возможностью бесконтактного и неструктурного метода диагностики.

Благодаря оперативности и неинвазивности спектроскопическое исследование комбинационного рассеяния (КР) [4] является одним из возможных методов ранней диагностики заболеваний твердых тканей зубов [5, 6]. Кроме того, с его помощью можно получить представление о степени минерализации обызвествленных структур пульпы зуба (дентиклей), что является важным моментом в выборе тактики эндодонтического лечения облитерированных каналов [7].

Материалы и методы исследований

Экспериментальная установка и объекты исследования

В качестве объектов исследования были использованы образцы больших и малых коренных зубов пациентов с диагнозом “Кариес” и образцы кальцификатов пульпы зубов с диагнозом “Дегенерация пульпы”. Для исследования морфологии дентина и пульпы зуба проводилась послойная резка образцов зубов вдоль длины зуба с толщиной слоев 2–3 мм (рис. 1). Размер образцов кальцификатов составил 2–4 мм.

Спектроскопические исследования КР выполнялись с использованием экспериментального стенда для оценки биологических трансплантатов (рис. 2), ранее описанного в работе [8], включающего в себя высокоразрешающий цифровой спектрометр *Shamrock sr-303i* со встроенной фотокамерой DV420A-OE, волоконно-оптический зонд для спектроскопии КР RPB-785, совмещенный с лазерным модулем *LuxxMaster LML-785 RB-04* (мощность до 500 мВт, длина волны 785 нм).

Зонд КР 2 фокусирует лазерное излучение на объект 1 (на расстоянии 7,5 мм от выходного окна с диаметром фокусного пятна менее 0,2 мм) и собирает излучение автофлуоресцен-

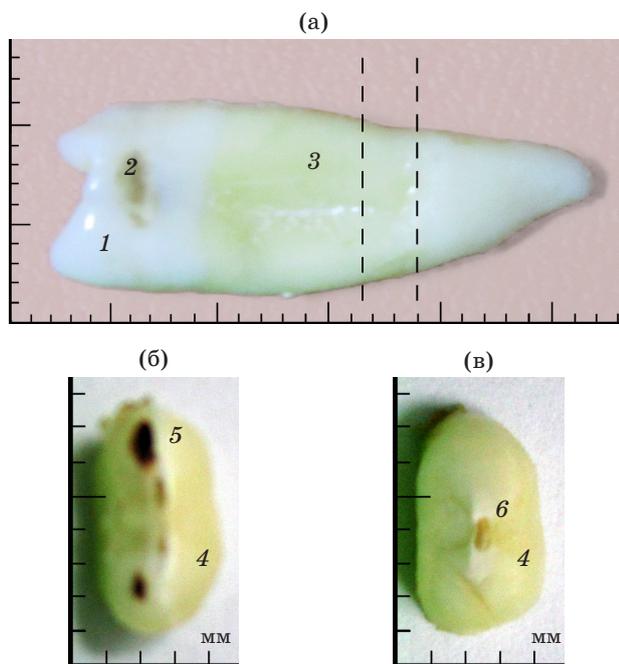


Рис. 1. Морфология образца кариозного зуба (а). Поверхность зуба – эмаль (1), очаги кариеса эмали (2) и цемента зуба (3). Поперечные срезы зуба – дентин (4) и очаги кариеса дентина (5) (б) и с дентином (4) и пульпой (6) (в).

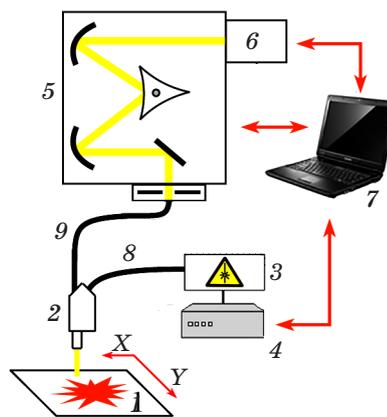


Рис. 2. Стенд спектроскопии КР. 1 – исследуемый объект, 2 – пробник КР RPB785, 3 – лазерный модуль *LuxxMaster Raman Box*, 4 – источник питания лазерного модуля, 5 – спектрометр *Shamrock sr-303i*, 6 – встроенная фотокамера DV420A-OE, 7 – компьютер, 8 – оптоволокну, подводящее излучение, 9 – приемное оптоволокну.

ции и излучение КР, благодаря чему позволяет бесконтактно и неинвазивно исследовать поверхность зубов и кариозных полостей. Встроенный широкополосный фильтр зонда предназначен для выделения излучения в спектральном диапазоне 790–1200 нм, которое затем направляется по оптоволокну на спектрометр 5 со встроенной цифровой фотокамерой 6 (спектральное разрешение 0,15 нм (порядка 1 см^{-1})). Для снижения уровня шумов фотоприемник камеры 6 охлаждается до $-60 \text{ }^\circ\text{C}$. Транспортёр с шаговым двигателем позволяет пространственно сканировать образец.

Обработка спектров комбинационного рассеяния

Для подавления фона флуоресценции и выделения спектров КР был использован метод полиномиальной аппроксимации [9]. Особенность алгоритма заключается в последовательном итерационном подборе параметров полинома и сравнении исходного спектра с полиномиальной аппроксимацией автофлуоресцентной составляющей. Обработка спектров и составление двумерных зависимостей распределения минеральных и органических компонентов в очагах поражения и в здоровых тканях зуба выполнена с помощью программной среды MATLAB’7.

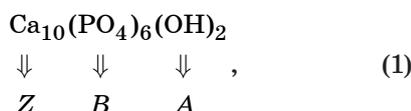
В ходе исследований первоначально проводилась серия тестовых экспериментов по исследованию неинвазивности воздействия и подбору

оптимальных параметров установки. В экспериментах мощность лазера составляла от 50 до 300 мВт. Изменение высоты расположения зонда над объектом в интервале 6–8 мм оказывало незначительное влияние на значения относительной интенсивности линий КР (погрешность не превышала 3%).

Результаты исследований

В результате экспериментов были получены спектры КР кальцификатов пульпы зуба с диагнозом “Дегенерация пульпы” и твердых тканей (эмаль и дентин) зуба с диагнозом “Кариес”. На рис. 3 представлены спектры КР (усредненные по 10 экспериментальным спектрам) здорового дентина и кариозного образца с характерными для всех спектров различными тканями зуба линиями КР на волновых числах 852, 870, 1004 см⁻¹, отвечающих за валентное колебание С-С в пролине, гидроксипролине и фенилаланине [10] соответственно.

Минеральная составляющая зуба представлена различными апатитами



в которых возможны замещения соответствующих позиций следующими ионами: $Z = \text{Ca}^{2+}$, Na^+ , Mg^{2+} , $B = \text{PO}_4^{3-}$, CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , $A = \text{OH}^-$, CO_3^{2-} , F^- , Cl^- .

Минеральная составляющая зуба характеризуется модами колебания ν_1 , ν_3 и ν_4 иона $(\text{PO}_4)^{3-}$ в молекуле гидроксиапатита, линии КР которых были зарегистрированы на волновых числах 956, 1030–1045 и 580 см⁻¹ [4, 10, 11], а также модами колебания ν_1 иона $(\text{CO}_3)^{2-}$, за-

мещениями B -типа, когда $(\text{PO}_4)^{3-}$ замещен ионом $(\text{CO}_3)^{2-}$, и A -типа [12], когда OH^- замещен ионом $(\text{CO}_3)^{2-}$, на волновых числах 1069 и 1098 см⁻¹ соответственно. Коллагеновая составляющая помимо линий КР пролина и гидроксипролина представлена группами амида III (в области 1238–1270 см⁻¹) [4, 12], амида II (в области 1520–1580 см⁻¹) [4] и амида I (в области 1630–1680 см⁻¹) [4, 12].

Анализ рис. 3б показывает, что в области с кариесом наблюдается изменение спектра КР практически во всем спектральном диапазоне. У образцов с начальной стадией кариеса и ослабленной минеральной составляющей спектры являются переходными. Начальные изменения в спектре связаны, прежде всего, как с реминерализацией твердых тканей зуба, так и с изменением структуры минеральной составляющей за счет замещения более устойчивых компонентов менее устойчивыми.

Для диагностики процесса развития кариеса и ослабления твердых тканей зуба (эмаль, дентин, цемент, пульпа) были введены следующие коэффициенты и использованы двумерные плоскости:

$$D = I_{1069}/I_{956}, P = I_{956}/I_{870}, F = I_{1098}/I_{956}, \quad (2)$$

$$O = I_{870}/I_{1004}, M = I_{580}/I_{956},$$

где I_i – интенсивность линии на волновом числе i , D – коэффициент, пропорциональный изменению содержания карбонатных ионов кальция в зубной ткани (замещение B -типа ионов $(\text{PO}_4)^{3-}$ на $(\text{CO}_3)^{2-}$), P – коэффициент, отражающий содержание фосфатных ионов кальция относительно коллагенового матрикса ткани зуба, F – коэффициент, характеризующий замещение A -типа ионов OH^- на $(\text{CO}_3)^{2-}$, O – коэффициент, характеризующий органическую состав-

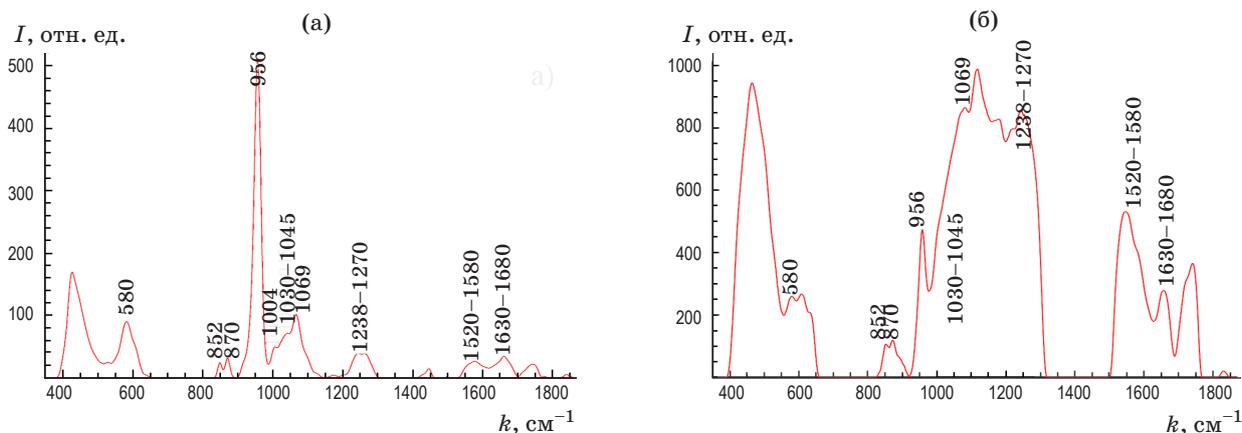


Рис. 3. Спектры КР образца здорового дентина (а) и образца с кариесом (б).

ляющую, представленную гидроксипролином и фенилаланином, M – коэффициент, характеризующий минеральную составляющую, представленную модами ν_1 и ν_4 колебания $(\text{PO}_4)^{3-}$.

На рис. 4 приведены двумерные зависимости коэффициентов P и D (2). Из рис. 4а видно, что точки эмали, пораженной кариесом, цемента и дентина, равно как и дентина с кариесом хорошо укладываются в гиперболическую зависимость, а стало быть, соотношение интенсивностей линий у твердых тканей на волновых числах 1069 и 870 см^{-1} остается постоянным даже при образовании кариеса, в то же время точки кальцификатов зуба с дегенерацией пульпы лежат выше, а следовательно, характеризуются увеличением соотношения на волновых числах 1069 и 870 см^{-1} , что может быть использовано в диагностике фиброзного пульпита.

Кариес характеризуется ростом коэффициента D и уменьшением коэффициента P , что обусловлено снижением содержания ионов $(\text{PO}_4)^{3-}$. Коэффициенты P и D эмали, пораженной кариесом, по значениям приближаются к соответствующим коэффициентам цемента. На начальной стадии кариеса, когда происходят изменения в минеральной составляющей эмали, необходимо более детальное исследование пораженных зон для выяснения точных численных критериев диагностики.

Далее, на рис. 5 представлены двумерные зависимости коэффициентов F и D (2). Карбонатные ионы способны занимать две эквивалентные позиции в структуре гидроксиапатита, замещая гидроксил или фосфатные ионы с образованием карбонатгидроксиапатита B - и A -типа [13]. В результате контроль изменения

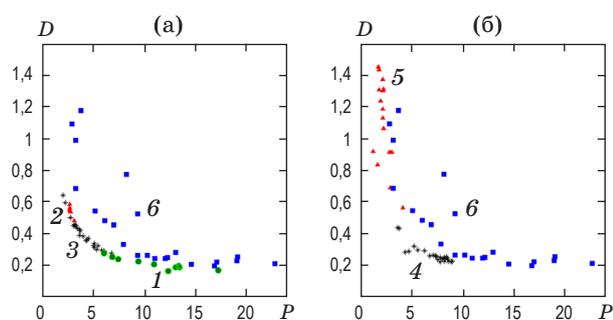


Рис. 4. Двумерные зависимости коэффициентов D и P зуба с кариесом. Поверхность зуба (а): эмаль (1), пораженная кариесом область эмали зуба (2), цемент зуба (3). Поперечный срез зуба (б): здоровый дентин (4), дентин с кариесом (5), образцы кальцификатов зуба с дегенерацией пульпы (6).

ориентации кристаллов гидроксиапатита в зависимости от степени замещения позволяет оценить состояние тканей зуба. При увеличении степени замещения происходит независимое заполнение B - и A -позиций в структуре карбонатгидроксиапатита карбонатными ионами.

Доля замещения A -типа уменьшается незначительно, в отличие от замещения B -типа, доля которого меняется в зависимости от биологического окружения. Из рис. 5 можно видеть, что параметры D и F линейно связаны. В результате, в эмали преобладает замещение гидроксильной группы на анион $(\text{CO}_3)^{2-}$ (замещение A -типа), замещение группы $(\text{PO}_4)^{3-}$ на $(\text{CO}_3)^{2-}$ (B -типа) происходит реже. При патологических процессах, таких как кариес и кальцификация, происходит сдвиг в сторону замещения B -типа.

На рис. 6 представлены двумерные зависимости коэффициентов O и M (2) органической

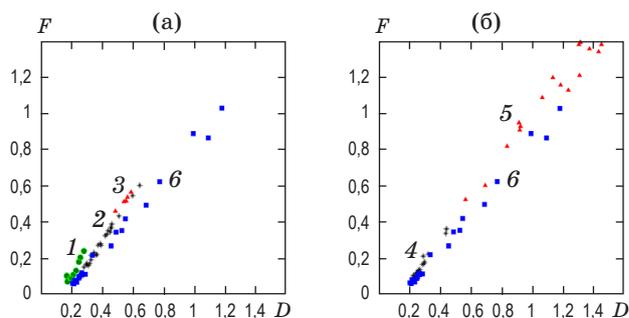


Рис. 5. Двумерные зависимости коэффициентов F и D зуба с кариесом. Поверхность зуба (а): эмаль (1), пораженная кариесом область эмали зуба (2), цемент зуба (3). Поперечный срез зуба (б): здоровый дентин (4), дентин с кариесом (5), образцы кальцификатов зуба с дегенерацией пульпы (6).

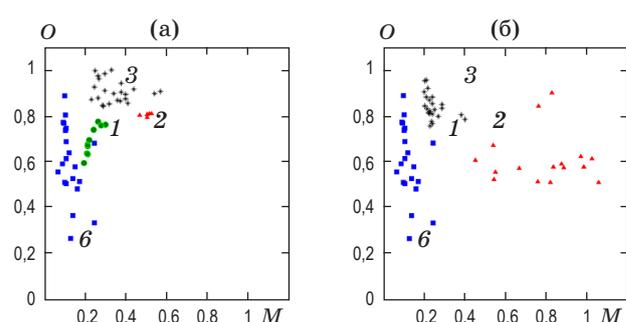


Рис. 6. Двумерные зависимости коэффициентов O и M зуба с кариесом. Поверхность зуба (а): эмаль (1), пораженная кариесом область эмали зуба (2), цемент зуба (3). Поперечный срез зуба (б): здоровый дентин (4), дентин с кариесом (5), образцы кальцификатов зуба с дегенерацией пульпы (6).

составляющей зуба, представленной гидроксипролином и фенилаланином, и минеральной составляющей, характеризуемой модами ν_1 и ν_4 колебания иона $(\text{PO}_4)^{3-}$.

Как можно видеть из рис. 6, каждому виду тканей зуба соответствует определенная область значений коэффициентов M и O . Так, например, образцам с кариесом характерны значительные изменения в кристаллической структуре гидроксиапатита, о чем свидетельствует увеличение интенсивности линии 580 см^{-1} , отвечающей за асимметричную деформационную моду колебаний, относительно интенсивности линии 956 см^{-1} , соответствующей симметричной валентной моде колебаний, а диапазоны полученных значений M и O составляют $0,45\text{--}1,06$ и $0,51\text{--}0,90$ соответственно. При этом на образцах кальцификатов было установлено снижение интенсивности линии 580 см^{-1} относительно интенсивности линии 956 см^{-1} , а значения M и O составили $0,07\text{--}0,25$ и $0,27\text{--}0,89$. Особенностью здоровых дентина и цемента зуба является высокое значение параметра O , характеризующего структурную целостность коллагена, которое составляет $0,76\text{--}1,00$, при этом значения параметра M варьируются в диапазоне $0,21\text{--}0,57$.

Таким образом, двумерные зависимости (рис. 4–6) позволяют определить не только вид ткани зуба, но и наличие патологических изменений.

В качестве контрольного метода анализа была использована растровая электронная микроскопия (РЭМ) с модулем рентгенофлуорес-

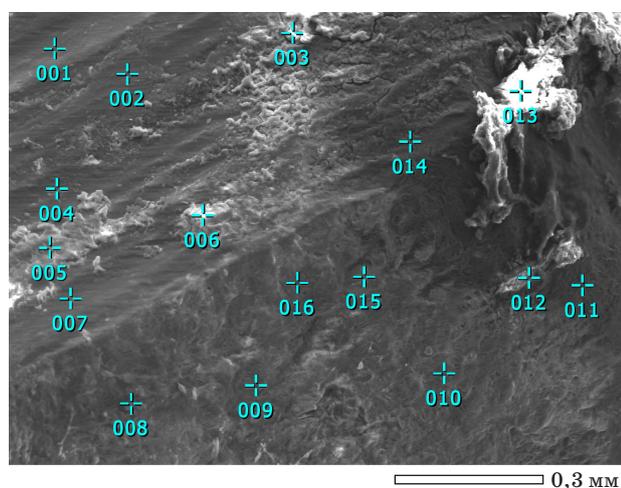


Рис. 7. Структура поверхности кальцификата пульпы зуба с дегенерацией пульпы (РЭМ; ускоряющее напряжение 30 кВ, ток пучка 1 нА, количество точек – 16).

центного анализа. На рис. 7 представлен микроснимок структуры поверхности образца кальцификата с хронической дегенерацией пульпы.

Из рис. 7 можно видеть, что поверхность образца кальцификата имеет определенную степень шероховатости с новообразованиями или наростами. Содержимое кальция и фосфора в этих образцах составило $11,3\text{--}17,9$ и $6,9\text{--}10,3$ мас %, что соответствует отношению Ca/P $1,63\text{--}1,74$. В работе [14] с помощью РЭМ было установлено отношение Ca/P в стехиометрическом гидроксиапатите, которое составило $1,63\text{--}1,68$. Данная особенность объясняется строением кальцификатов, которые представляют собой неклеточные образования с высоким содержанием гидроксилапатита кальция. Полученные результаты так же были подтверждены другими авторами [15] на основе анализа РЭМ образцов кальцификатов пульпы. Процентное содержание кальция и фосфора в работе [15] составило $32,12\%$ и $14,69\%$ при отношении Ca/P $2,19$, а отношение Ca/P чистого стехиометрического гидроксилапатита – $2,15$.

Заключение

Получены спектры КР образцов здорового дентина и дентина, пораженного кариесом. В результате исследований были определены особенности кариозного дентина и кальцификатов пульпы зуба. Выявлено, что кальцификатам, в отличие от образцов дентина, характерно высокое значение отношения интенсивности на волновом числе 956 см^{-1} линии КР, отвечающей за валентное колебание иона $(\text{PO}_4)^{3-}$ в гидроксиапатите, к интенсивности линии на 870 см^{-1} гидроксипролина.

Введены критерии идентификации различных типов патологий. Соотношение интенсивностей в твердых тканях на волновых числах 1069 и 870 см^{-1} остается постоянным даже при образовании кариеса, в то же время кальцификаты зуба с дегенерацией пульпы характеризуются ростом соотношения на волновых числах 1069 и 870 см^{-1} , что может быть использовано в диагностике фиброзного пульпита.

Кариес характеризуется ростом коэффициента D и уменьшением коэффициента P , что обусловлено уменьшением содержания ионов $(\text{PO}_4)^{3-}$.

Значения коэффициентов P и D эмали, пораженной кариесом, близки к значениям этих

коэффициентов для цемента. Для определения точных численных критериев диагностики на начальной стадии кариеса, когда происходят изменения в минеральной составляющей эмали, требуется более детальное исследование пораженных зон эмали.

Каждому виду тканей зуба соответствует определенная область значений M и O . Значительные изменения в кристаллической структуре гидроксиапатита наблюдаются у образцов с кариесом и образцов кальцификатов, о чем свидетельствует увеличение у первых и уменьшение у вторых интенсивностей линии 580 см^{-1} , отвечающей за асимметричную деформационную моду колебаний $(\text{PO}_4)^{3-}$, относительно интенсивности линии 956 см^{-1} , соответствующей симметричной валентной моде колебаний того

же иона. Образцы здоровых дентина и цемента зуба имеют высокое значение коэффициента O , характеризующего структурную целостность коллагена, которое составляет $0,76\text{--}1,00$, при этом значения коэффициента M варьируются в диапазоне $0,21\text{--}0,57$. Отклонение от этих значений может являться диагностическим критерием нарушений в тканях зуба.

Снижение концентрации ионов $(\text{PO}_4)^{3-}$ при кариесе зубов было также отмечено в работе [6].

Представленная работа требует продолжения исследований с целью разработки неинвазивного прибора спектроскопии комбинационного рассеяния для диагностики ранней стадии кариеса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

* * * * *

ЛИТЕРАТУРА

1. Бостон Д.Б. Новый подход к лечению фиссурного кариеса // Клинич. стоматология. 2007. № 2. С. 24–29.
2. Казеко Л.А., Тихонова С.М., Пустовойтова А.А. Современные подходы в диагностике кариозной болезни // Стоматологический журнал. 2007. № 3. С. 251–255.
3. Тихонова С.М. Выявление групп населения с наивысшей интенсивностью кариозной болезни // Стоматологический журнал. 2002. № 4. С. 52–53.
4. Ramakrishnaiah R., Rehman G., Basavarajappa S., Khuraif A., Durgesh B., Khan A., Rehman I. Applications of Raman spectroscopy in dentistry: Analysis of tooth structure // Appl. Spectrosc. Rev. 2015. V. 50. № 4. P. 332–350.
5. Miyazaki M., Onose H., Moore B. Analysis of the dentin-resin interface by use of laser Raman spectroscopy // Dent. Mater. 2002. V. 18. P. 576–580.
6. Мандра Ю.В., Ивашов А.С., Вотяков С.Л., Киселева В.В. Возможности применения рамановской микроспектроскопии для исследования структурных особенностей твердых тканей зубов человека // Экспериментально-клиническая стоматология. 2011. № 1. С. 24–28.
7. Ruddle C. Cleaning and shaping the root canal system // eds. Pathways of the Pulp. 2002. P. 231–292.
8. Timchenko E.V., Timchenko P.E., Volova L.T., Ponomareva Yu.V., Taskina L.A. Raman spectroscopy of the organic and mineral structure of bone grafts // Quant. Electron. 2014. V. 44. № 7. P. 696–699.
9. Zhao J., Lui H., Mclean D.I., Zeng H. Automated auto uorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy // Soc. Appl. Spectrosc. 2007. V. 61. № 11. P. 1225–1232.
10. Rehman I., Movasaghi Z., Rehman S. Vibrational spectroscopy for tissue analysis / Series in Medical Physics and Biomedical Engineering. CRC Press Taylor & Francis, 2012. P. 271.
11. Mandair G., Morris M. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength // BoneKEY Reports. 2015. V. 4. P. 620–625.
12. Buchwald T., Kozielski M., Szybowicz M. Determination of collagen fibers arrangement in bone tissue by using transformations of Raman spectra maps // Spectroscopy: An International Journal. 2012. V. 27. № 2. P. 107–117.
13. Климашина Е.С. Синтез, структура и свойства наноразмерных карбонатзамещенных гидроксиапатитов для создания резорбируемых биоматериалов // Сб. научн. работ победителей конкурса научно-исслед. работ студентов и аспирантов в области химических наук и наук о материалах в рамках Всероссийского фестиваля науки (30 июля–15 августа 2011 г.). 2011. Т. 1. С. 67–85.
14. Eidelman N., Boyde A., Bushby A., Howell P., Sun J., Newbury D., Miller F., Robey P., Rider L. Microstructure and mineral composition of dystrophic calcification associated with the idiopathic inflammatory myopathies // Arthritis Res. Ther. 2009. V. 11. № 5. P. 1–21.
15. Le May O., Kaqueler J. Electron probe micro-analysis of human dental pulp stones // Scanning microsc. 1993. V. 7. № 1. P. 267–271.