УДК 616.314-002-073.584.

Г.Ю. Лидман, П.М. Ларионов*,
С.В. Савченко**, А.М. Оришич***,
И.А. Рожин***, А.Н. Малов***, Н.А. Маслов***,
А.Т. Титов****, И.Г. Косицына**, Я.А. Зайцева****

E-mail: belgus@mail.ru

ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ КАРИОЗНОГО ПРОЦЕССА НА ОСНОВЕ ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И РЕНТГЕНСПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА

* Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина;
** Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава;
*** Институт теоретической и прикладной механики СО РАМН;
**** Объединенный институт геологии СО РАМН

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, кариозное поражение зубов может рассматриваться как самая часто встречающаяся болезнь. Эта патология нередко приводит к потере зубов, что является причиной временной утраты общей трудоспособности людей молодого и зрелого возраста [4]. Кариес развивается у подавляющего числа людей и к зрелому возрасту достигает 91%. Многочисленные исследования показали, что развитие и течение кариеса может проявляться в системных заболеваниях опорно-двигательного аппарата, инфекционных поражениях сердца, а также других заболеваниях внутренних органов [1].

Наиболее значимой в ряду диагностических проблем является установление зоны демаркации (границы) между интактной – здоровой – и пораженной тканями, что определяет в последующем объем резекции тканей зуба и характер его лечения [5]. В настоящее время для решения указанных задач существует набор традиционных методов, используемых для диагностики кариозного поражения, – электроодонтодиагностика, дентальная рентгенография и др. Однако эти методы несовершенны и имеют ограниченный диапазон применения.

В то же время успешно развиваются методы оптической диагностики, основанные на анализе характеристик спектральных показателей лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) для тканей сердечно-сосудистой системы, минеральной составляющей кальцифицированных клапанов сердца, крупных сосудов [2, 3, 8]. Более того, в настоящее время опытные образцы прибора DIAGNODENT™, созданного на основе флуоресцентной диагностики, проходят успешные клинические испытания, в которых уточняется диагностическая значимость прибора для различных форм поражения зуба использованием длины волны λ 655 nm [6, 7]. Объективная потребность в разработке нового метода точной диагностики стоматологических заболеваний послужила инициирующим фактором нашего исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Были исследованы 229 образцов зубов от пациентов в возрасте от 19 до 75 лет, in vitro. Материал был собран на базе специализированного стоматологического отделения Медико-санитарной части г. Новосибирска в период с 2005-го по 2007 год и классифицирован по возрасту, полу пациентов, порядковому номеру зуба, степени кариозного процесса и развившегося осложнения. Мужчины были в качестве пациентов в 128 наблюдениях, женщины – в 101.

Материал был распределен на пять групп, в соответствии с возрастными периодами человека. Возрастную группу «I» составили пациенты от 19 до 30 лет, группу «II» – от 31 до 40 лет, группу «III» – от 41 до 50 лет, группу «IV» – от 51 до 60 лет, группу «V» – от 60 до 75 лет.

Нативные образцы зубов были исследованы методом лазерно-индуцированной флуоресценции. В качестве источника излучения, возбуждающего флуоресценцию, использовали KrF эксимерный лазер (λ=248 нм). Длительность импульса излучения лазера составляла 5 нс, энергия 5-10 мДж. Для регистрации использовали спектрограф с голографической дифракционной решеткой, в качестве приемника излучения – ПЗС камеру с усилителем яркости. Образец ткани располагали на предметном столике из слабо флуоресцирующего материала – нержавеющей стали. Флуоресценцию собирали с помощью сферического зеркала, в фокусе которого находилась входная щель спектрографа, то есть измеряли спектр, усредненный по поверхности образца. Поскольку нормировка на спектральную чувствительность фотокатода усилителя яркости не проводилась, истинная форма спектра на приведенных графиках искажена, однако относительные изменения на них можно прослеживать с высокой точностью.

Впоследствии выполнялся макроскопический анализ образцов, гистологическое исследование (окрашивание гемотоксилинэозином и по Ван-Гизону). Готовились образцы для сканирующей микроскопии и последующего рентгеноспектрального анализа. Рентгеноспектральный микрозондовый химический анализ исследуемых веществ зубов проводился с использованием Si (Li) энергетического детектора фирмы OXFORD. Использование рентгеноспектрального микрозондового химического анализа позволило провести количественный химический анализ в микрообъеме, с площади шлифа и получить распределение разных элементов по площади сканирования. Для

проведения количественного химического анализа по эталонам использовалась программа INCA Energy 300. В работе использовались параметрические показатели, среднеарифметическое значение и его стандартная ошибка M±m, оценка статистической значимости факторов по критериям ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты макроскопического и гистологического исследования показали, что практически все деструктивные проявления поверхностного кариеса наблюдались и при среднем кариесе, только имели более распространенный характер. В то же время при поздних стадиях кариеса можно было наблюдать специфические черты, которые характерны для таких общепатологических процессов, как атрофия и патологическая регенерация. Интересно, что зоны деструкции часто отграничивались от интактного дентина участками оссификации, что сочеталось с атрофией канальцев дентина. К одной из наиболее интересных черт мы отнесли блокаду групп дентинных трубочек в интактном дентине, далеко за зональным деструктивным поражением (рис. 1). Также постоянным признаком 3-4-й стадий кариеса было обнаружение вторичного дентина, характеризовавшегося аномальным распределением дентинных трубочек и неравномерной минерализацией. Мы выявили специальный морфологический симптом последних стадий кариеса – пристеночная эктопическая оссификация просветов каналов и полостей зубов (рис. 2, 3, 4).

Рентгеноспектральный анализ исследуемого материала показал изменение минерального состава твердых тканей зуба: Ca, P, Mg, а также соотношение Ca/P, в зависимости от поражения кариесом. Апатиты эмали и дентина зубов человека характеризуются переменным химическим составом, который зависит от множества факторов, таких как био-

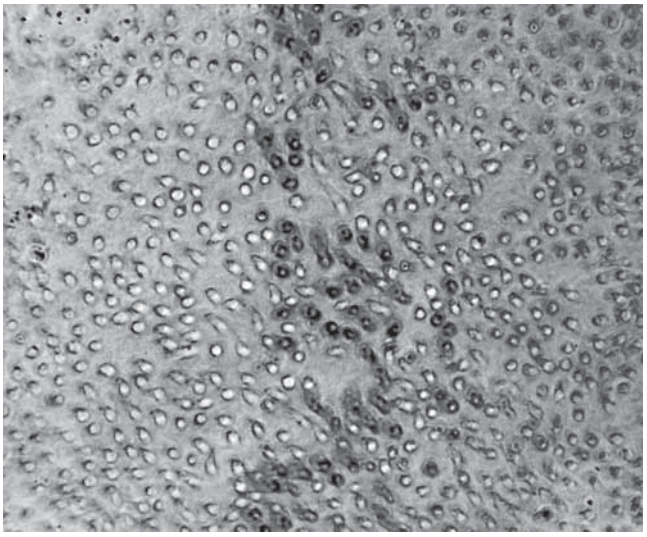

Рис. 1. Средний кариес, «блокада» дентинных трубочек эозинофильными массами. Окраска гематоксилинэозином. Объектив. Увеличение ×914. Масляная иммерсия

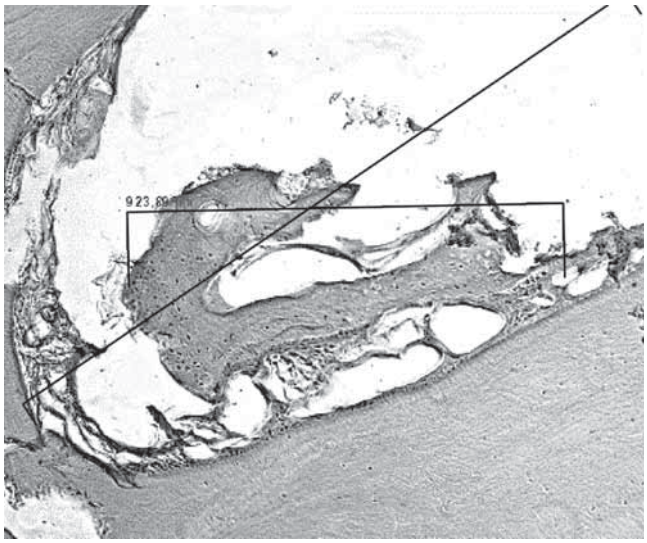

Рис. 2. Глубокий кариес. Пристеночный оссификат в полости зуба. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение ×114. Фазовый контраст

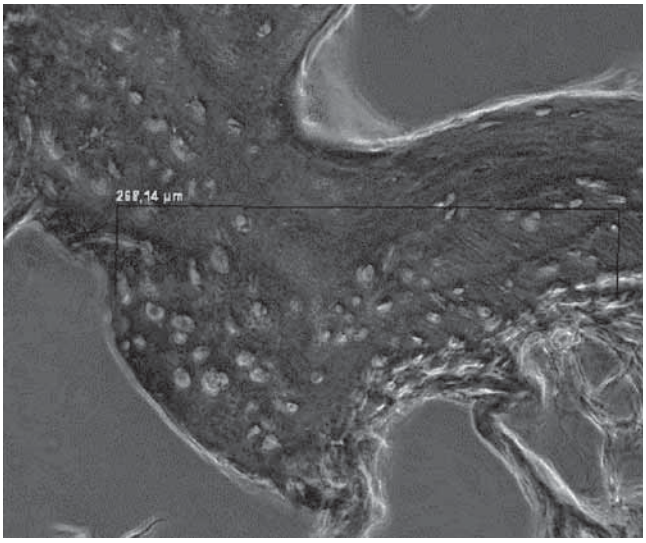

Рис. 3. Глубокий кариес. Оссификат в полости зуба. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение ×360. Фазовый контраст

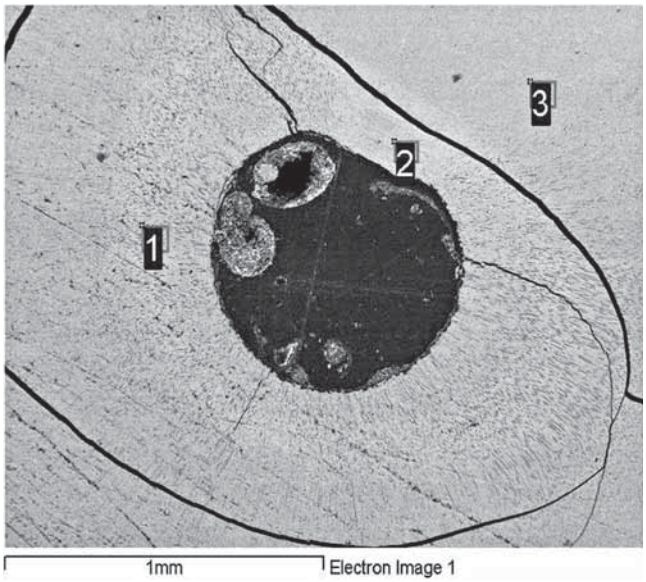

Рис. 4. Шлиф зуба, глубокий кариес. В полости зуба пристеночный оссификат (1 – вторичный дентин 2 и 3 – интактный дентин). Сканирующая электронная микроскопия

геохимические условия местности, экологические и профессиональные факторы, возраст пациентов, сопутствующие стоматологические заболевания, и других. О том, как сильно исследуемый апатит отличается от гидроксиапатита с идеальной формулой Ca10 (PO4)6(OH)2, принято судить по значению отношения Ca/P. Чем больше дефицит кальция, тем меньше оно по сравнению со значением 1,67, характерным для идеального состава. При развитии кариеса это отношение может достигать 1,3. Поэтому мы использовали коэффициент Ca/P как критерий кариесрезистентности твердых тканей зуба.

При анализе мы выяснили, что на 1-2-х стадиях кариеса уровни Ca, P, Mg, а также соотношение Ca/P в интактной и пораженной кариесом эмали различаются незначительно, прослеживается тенденция к снижению уровня минеральных компонент, что представлено в таблице 1.

Из результатов исследований, представленных в таблице 2, следует, что на 3-4-х стадиях кариозного процесса имеет место явное снижение уровня минеральных компонент, присутствующих в тканях зуба, в патологическом дентине по сравнению с интактным.

Также мы исследовали спектры ЛИФ интактных зубов и зубов, пораженных кариесом. Результаты представлены на рис. 5-7. Полученные спектры имеют достаточно сложный характер: сравнивая все полученные данные, можно сделать вывод, что в ткани зуба присутствуют, по крайней мере, четыре флуоресцирующих компонента. Первый, отвечающий за спектральную полосу с максимумом в районе 450 нм (рис. 6 и 7), скорее всего, принадлежит минеральной составляющей – гидроксиапатиту [3]. Второй, отвечающий за спектральную полосу с максимумом в районе 390 нм (рис. 5), присутствует в соединительных тканях – коллагене и эластине. Еще два флуо-

Таблица 1

Результаты рентгенспектрального анализа по относительному содержанию Ca, P, Mg, Ca/P в здоровой и патологической (пораженной кариесом 1-2-й стадий) эмали (M±m)

Мин. состав	Интактная	Патологическая
Ca	21,1±0,27	20,3±0,39
P	14±0,44	14,0±0,25
Ca/P	1,58±0,6	1,47±0,3
Mg	0,9±0,17	0,75±0,04*

(*) – P<0,05 ANOVA.

Таблица 2

Результаты рентгенспектрального анализа по относительному содержанию Ca, P, Mg, Ca/P в здоровом и патологическом (пораженном кариесом 3-4-й стадий) дентине (M±m)

Мин. состав	Интактный	Патологический
Ca	20,2±0,34	18,7±0,42*
P	13,8±0,24	13,5±0,17
Ca/P	1,48±0,22	1,43±0,18
Mg	1,20± 0,09	0,97±0,05*

(*) – P<0,05 ANOVA.

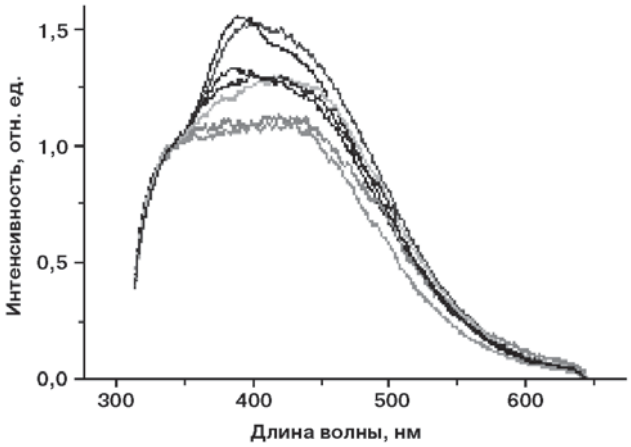

Рис. 5. Суммарный график спектров ЛИФ для всех возрастных групп, интактные зубы

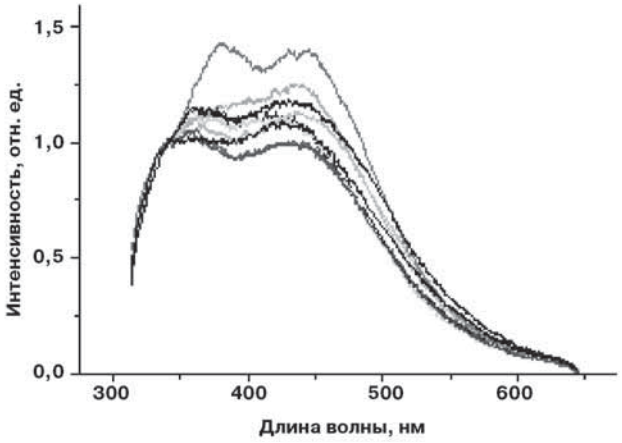

Рис. 6. Суммарный график спектров ЛИФ для всех возрастных групп, 1-2-й ст. кариеса

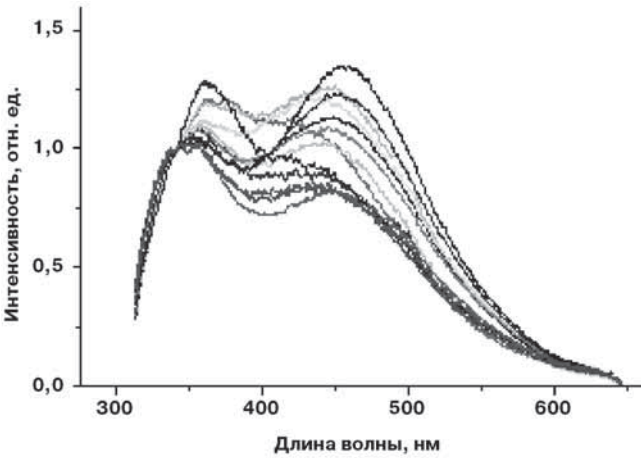

Рис. 7. Суммарный график спектров ЛИФ для всех возрастных групп 3-4-й ст. кариеса

рофора отвечают за спектральную полосу 330-370 нм, предположительно с максимумами около 340 и 360 нм (рис. 7) – подобные спектры ЛИФ характерны для белков, содержащих триптофан. Таким образом, спектр зуба представляет собой сумму спектров множества компонент, относительный вклад которых зависит от индивидуальных особенностей пациента и степени поражения патологическими процессами. Для удобства сравнения измеренные спектры были нормированы на интенсивность на длине волны 340 нм.

Сложный многокомпонентный состав ЛИФ затрудняет сравнение различных спектров, однако, несмотря на это, можно наблюдать некоторую зависимость характера спектра ЛИФ от стадии кариозного процесса по сравнению со спектрами интактных зубов, что показано на рис. 5-7.

Для спектра ЛИФ интактного зуба характерно формирование широкой спектральной полосы во всей измеряемой области – наблюдался относительно равномерный вклад всех флуоресцирующих компонент, некоторые спектры имели ярко выраженный «коллагеновый» максимум в районе 390 нм (рис. 5). В областях 330-370 нм и 410-600 нм все спектры имели схожий характер, то есть для интактных зубов характерно определенное соотношение «белковых» и «минеральной» составляющих, а отличия, связанные с индивидуальными особенностями, определяются вкладом «коллагеновой» составляющей.

При кариозном процессе 1-2-й стадий происходило формирование провала в области 380-400 нм за счет снижения интенсивности флуоресценции «коллагеновой» спектральной полосы (рис. 6). Относительная интенсивность «белковой» (330-370 нм) и «минеральной» (410-600 нм) спектральных полос была близка к характерной для интактных зубов, однако флуоресценция в области 330-370 нм имела уже разрозненный характер: у различных образцов положение максимума в различной степени смещено в длинноволновую сторону, что говорит об изменении белкового состава в зоне деструкции.

При 3-4-й стадиях кариозного процесса отмечалось явное увеличение провала в области 380-400 нм: происходило практически полное исчезновение «коллагеновой» спектральной полосы (рис. 7). Характер флуоресценции в области 330-370 нм также разнороден, а для некоторых образцов наблюдалось заметное снижение спектральной полосы с максимумом в районе 450 нм, что говорит о деминерализации тканей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана диагностическая модель различных стадий кариеса для оценки структурных изменений твердых тканей зуба методом лазерно-индуцированной флуоресценции, открывающая новые перспективы точной диагностики кариозного поражения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боровский Е.В. Клинико-морфологическая характеристика кариеса эмали. //Клин. стоматология. – 2005. – №4. – С. 65-69.
2. Ларионов П.М., Малов А.Н., Оришич А.М., Щукин В.С. Лазерно-индуцированная флуоресценция сердечных тканей при поражении кальцинозом. //Журнал прикладной спектроскопии. – 1997. – Т. 64. – С. 539-544.
3. Ларионов П.М., Малов А.Н., Маслов Н.А., Оришич А.М., Титов А.Т., Щукин В.С. Влияние минерального компонента на спектр лазерно-индуцированной флуоресценции биотканей, пораженных кальцинозом. //Журнал прикладной спектроскопии. – 1999. – Т. 66. – №3 – С. 846-849.
4. Недосеко В.Б. Оптимизация процесса профилактики кариеса зубов //Ин-т стоматологии. – 2003. – №1. – С. 38-41.
5. Окушко В.Р. Легенда о кариесной инфекции / В.Р. Окушко //Новое в стоматологии. – 2003. – №1. – С. 41-42.
6. Itoh K, Kusunoki M, Oikawa M, et al H. In vitro comparison of three caries dyes. //Am J Dent. 2009. – Vol. 22. – №4. – P. 195-9.
7. Sainsbury AL, Bird PS, Walsh LJ. DIAGNOdent laser fluorescence assessment of endodontic infection.//J Endod. – 2009. – Vol. 35. – №10. – P. 1404-7.
8. Larionov P.M., Malov A.N., Maslov N.A., Orishich A.M., Titov A.T., and Shchukin V.S. Influence of mineral components on laser-induced fluorescence spectra of calcified human heart-valve tissues. //Applied Optics. – 2000. – Vol. 39. – №22. – P. 4031-4036.

POSSIBILITIES OF CARIES PROCESS DIAGNOSIS ON THE BASIS OF LASER-INDUCED FLUORESCENCE AND ROENTGEN-SPECTRAL ANALYSIS

G.Yu. Lidman, P.M. Larionov, S.V. Savchenko, A.M. Orishich, I.A. Rozhin, A.N. Malov, N.A. Maslov, A.T. Titov, I.G. Kositsyna, Ya.A. Zaytseva

SUMMARY

Establishing demarcation zone between intact and injured tissue is of most importance because it determines volume of the tooth tissues resection and its treatment character. Methods of optical diagnosis based on the analysis of characteristics of spectral indicators of laser-induced fluorescence for many practical areas of science are successfully developed. Currently, experimental specimen of DIAGNODENT which was created on the basis of fluorescent diagnosis are under clinical testing.

Key words: caries diagnosis, fluorescence.