

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.314-073.537

Александров М.Т.¹, Кукушкин В.И.², Маргарян Э.Г.¹, Паиков Е.П.¹, Баграмова Г.Э.³

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ РАМАН-ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ В СТОМАТОЛОГИИ

¹ ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Россия;

² Институт физики твёрдого тела Российской академии наук, 142432, Москва, Россия;

³ Российский университет дружбы народов, 115093, Москва, Россия

Представлено экспериментальное обоснование и аппаратно-программное обеспечение применения раман-флюоресцентных медицинских технологий в стоматологии. Предложены высокочувствительные и высокоспецифические экспресс-методики диагностики кариеса, степени деминерализации твёрдых тканей зуба, видовой индикации микробов и экспресс-определения их чувствительности к лекарственным препаратам, верификации лекарственных препаратов и наркотических веществ, экспресс-диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований. Широкий диапазон клинико-диагностических возможностей метода и предложенного отечественного аппаратно-программного комплекса раман-флюоресцентной диагностики рекомендуется к клиническому применению.

Ключевые слова: раман-флюоресцентная диагностика; аппаратно-программный комплекс; кариес; рамановская линия гидроксила апатита зуба; рамановские спектры микробов; раман-флюоресцентные спектры опухолей.

Для цитирования: Александров М.Т., Кукушкин В.И., Маргарян Э.Г., Паиков Е.П., Баграмова Г.Э. Возможности и перспективы применения раман-флюоресцентной диагностики в стоматологии. Российский стоматологический журнал. 2018; 22(1): 4-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-4-11>

Alexandrov M.T.¹, Kukushkin V.I.¹, Margaryan E.G.³, Pashkov E.P.², Bagramova G.E.¹

POSSIBILITIES AND PERSPECTIVES OF RAMAN FLUORESCENCE DIAGNOSTIC APPLICATION IN DENTISTRY

¹ Clinical science center of women health rehabilitation, Institute of Solid State Physics, I.M. Sechenov First MSMU, 119991, Moscow, Russia;

² Institute of solid state physics, Russian Academy of Sciences, 142432, Moscow, Russia;

³ Peoples' friendship University of Russia, 115093, Moscow, Russia Experimental-theoretic rationale and hardware-software device of application of Raman-fluorescence medical technologies in dentistry were performed.

High-sensitive and high-specific express methods of caries and demineralization level of hard tooth tissues diagnostic, species indication of germs and express determination of its sensitivity to medications, verification of medications and drugs, malignant and benign neoplasms express diagnostic were presented.

Wide range of method's clinical-diagnostic capabilities and of presented domestic hardware-software complex of Raman fluorescence diagnostic are recommended for clinical application.

Key words: Raman-fluorescence diagnostic; hardware-software complex; caries; Raman line; tooth hydroxyapatite; Raman germs scattering; Raman-fluorescent spectra of tumors.

For citation: Alexandrov M.T., Pashkov E.P., Bagramova G.E., Kukushkin V.I., Margaryan E.G. Possibilities and perspectives of raman fluorescence diagnostic application in dentistry. Rossiyskii stomatologicheskii zhurnal. 2018; 22(1): 4-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-4-11>

For correspondence: Margaryan Edita Garnikovna, Cand. med. Sci., assistant of Department of therapeutic stomatology of the I. I. Sechenov First MSMU, E-mail: edita@mail.ru.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 15.09.17

Accepted 16.12.17

Введение

В настоящее время в медицине, в том числе в стоматологии, всё большую актуальность приобретают лазерные инновационные, экспрессные медицинские лечебно-диагностические технологии на основе ра-

ман- и/или люминесцентных аппаратно-программных комплексов. Зондирующее лазерное излучение (в широком спектральном и энергетическом диапазоне) используют как средство лечения [1–4] и одновременно как средство возбуждения раман-люминесцентных диагностических характеристик [5] исследуемого биологического объекта (этому направлению биофотометрии посвящено предлагаемое исследование). Методика основана на том, что по регистрируе-

Для корреспонденции: Маргарян Эдита Гарниковна, канд. мед. наук, ассистент кафедры терапевтической стоматологии Первого МГМУ им. И.И. Сеченова, E-mail: edita@mail.ru

мым раман- и/или люминисцентным спектральным (ЛРФД) характеристикам исследуемых объектов (метаболизмы микробов, клеток, тканей, биологических жидкостей в норме и при патологии) можно проводить диагностику заболеваний и процессов микробной, метаболической, неопластической и иной природы [6].

В связи с этим цель нашего исследования – экспериментальное обоснование возможности применения лазерных аппаратно-программных комплексов и применение раман-флюоресцентных медицинских технологий в стоматологии.

Материал и методы

Все исследования и клинические наблюдения выполнены на медицинском аппаратно-программном комплексе «ИнСпектр М» [Патент на полезную модель RU 130700 от 27.07.2013]. С его помощью в течение нескольких секунд производили запись спектрального положения и относительных интенсивностей рамановских и/или люминисцентных линий, своего рода «отпечатков пальцев» исследуемой субстанции, поиск и сравнение их со спектральной базой данных и последующая идентификация исследуемого объекта. Результаты анализа обрабатывали с помощью удобного программного интерфейса и записаны в формате «png».

Анализ с образцами микроскопического размера вне полости рта проводили на рамановском микроскопе «ИнСпектр М532» (рис. 1 на вклейке). Для визуального исследования объекта использовался стандартный режим работы микроскопа с использованием окуляров и/или видеокамеры. В его конструкции 30 мВт синий или зелёный одномодовый лазер, обеспечивающий высококачественное спектральное разрешение. При этом в ручном режиме подбирался фокус на определённой точке образца, в которой записывался спектр ЛРФД. С одного объекта снимали 8–10 показателей в разных точках с последующим их усреднением и выводом на один график для анализа.

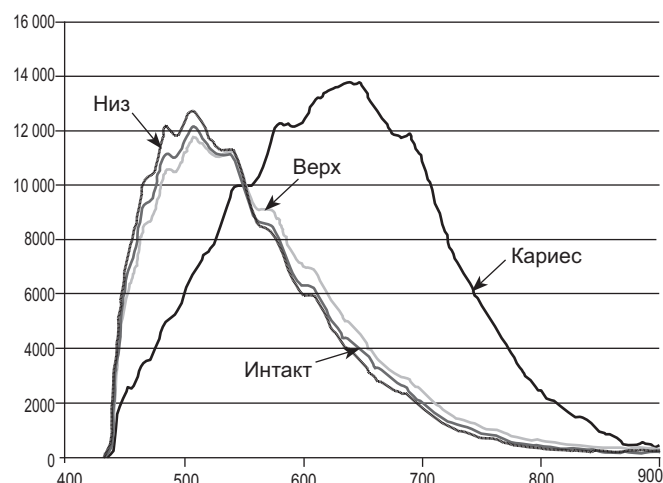


Рис. 3. Спектральные характеристики твёрдых тканей зуба в норме и при патологии при использовании синего лазера-405 нм. Здесь и на рис. 4–5: $I_{\text{фл}}$ – интенсивность флуоресценции в отн.ед. по вертикали, по горизонтали – длины волн в нм.

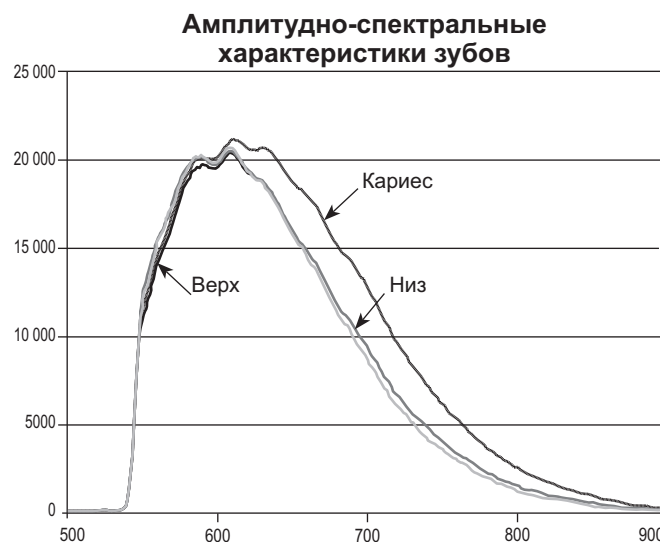


Рис. 4. Спектральные характеристики твёрдых тканей зуба в норме и при патологии при использовании зелёного лазера-514 нм.

Также применяли ЛРФД непосредственно в полости рта за счёт компактности и портативности модификации прибора «ИнСпектр М», включающей как оптическое волокно, так и различные насадки (рис. 2).

Экспериментальные исследования метода фотодинамической терапии (ФДТ) проводили в несколько этапов. 1. Обоснование технологии выбора, регистрации и активации хлорофиллсодержащего препарата (фотостим); 2. Моделирование объёмной ФДТ в пробирке; 3. Исследование накопления хлорофиллсодержащего препарата (фотостим) в тканях и органах; 4. Исследование эффекта воздействия объёмной акти-

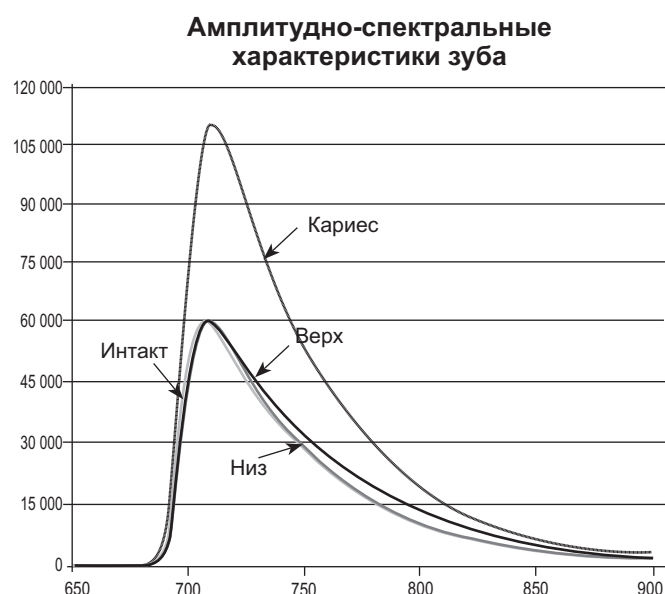


Рис. 5. Спектральные характеристики твёрдых тканей зуба в норме и при патологии при использовании красного лазера-632.8 нм.

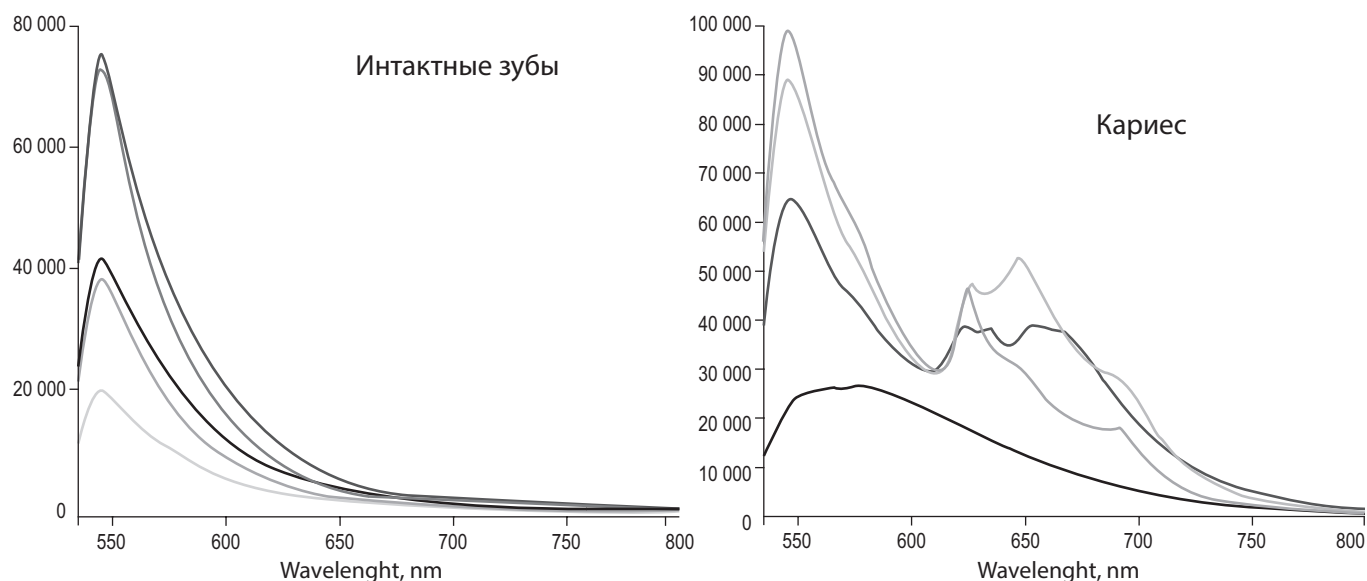


Рис. 6. Спектры интактных (нормальных) и пораженных кариесом твёрдых тканей зубов.

вированной ФДТ на микробы и опухолевые клетки (культуральный материал) *in vitro*; 5. Моделирование эффекта объёмной активированной ФДТ на животных (карцинома Эрлиха).

Результаты

Проведён выбор наиболее информативного АПК для диагностики кариеса (рис. 3–5) и изучены спектры ЛРФД кариеса и степени деминерализации зуба (рис. 6–8). Наиболее информативным и приемлемым для клинического применения оказался АПК ЛКД с длиной волны 405 нм, поэтому последующие исследования твёрдых тканей зуба проводили именно на этой установке.

Из представленных данных на рис. 7 и 8 на мело-

вых пятнах зубов (при флюорозе) в спектре рассеянного света видны линии фторапатитов, содержание которых сильно повышено. На здоровых же зубах видны преобладающие линии гидроксиапатитов и кальций апатитов. Проявляются значительные отличия спектров интактных и кариозных тканей зуба. В диапазоне 620–720 нм в спектрах вторых отчётливо видны люминесцентные линии бактериальной микрофлоры (сдвиг спектра вправо), отсутствующие у интактных тканей.

Очевидно, что методика является патогенетически обоснованной, так как она в экспресс-режиме способна выявлять такие звенья патогенеза кариеса, как

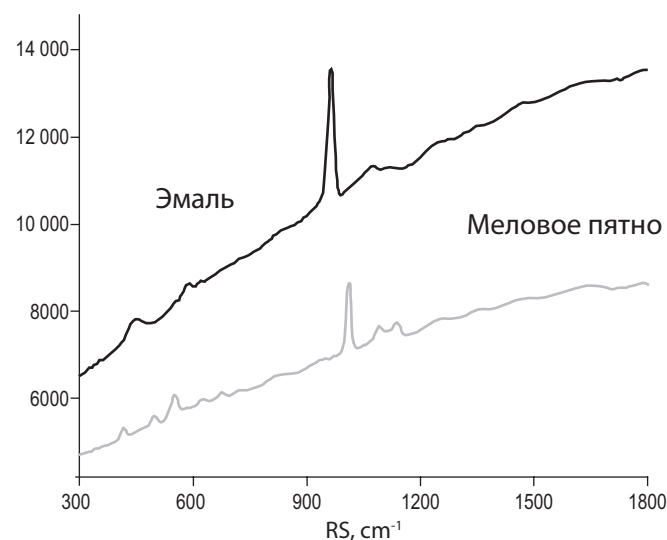
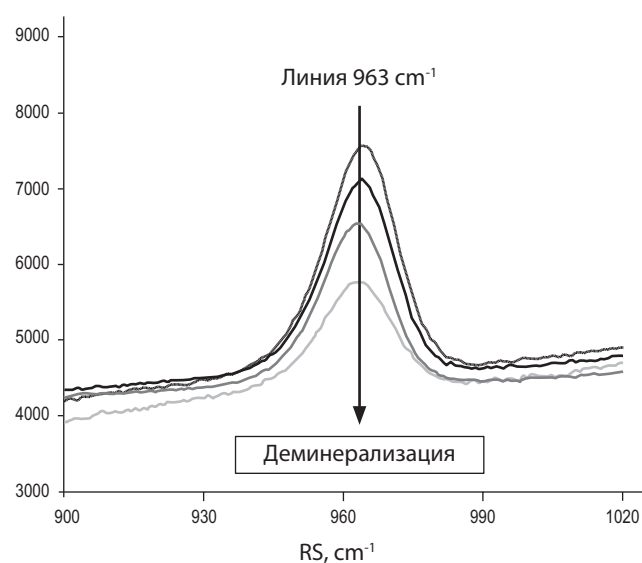


Рис. 7. Нахождение рамановских линий гидроксиапатитов, кальцийапатитов и фторапатитов в меловом пятне (при флюорозе) и в непоражённой эмали.

Рис. 8. Снижение интенсивности рамановской линии гидроксиапатитов (963 cm^{-1}) при развитии кариеса за счёт падения степени деминерализации зуба (время регистрации и обработки сигнала-30-60 сек).

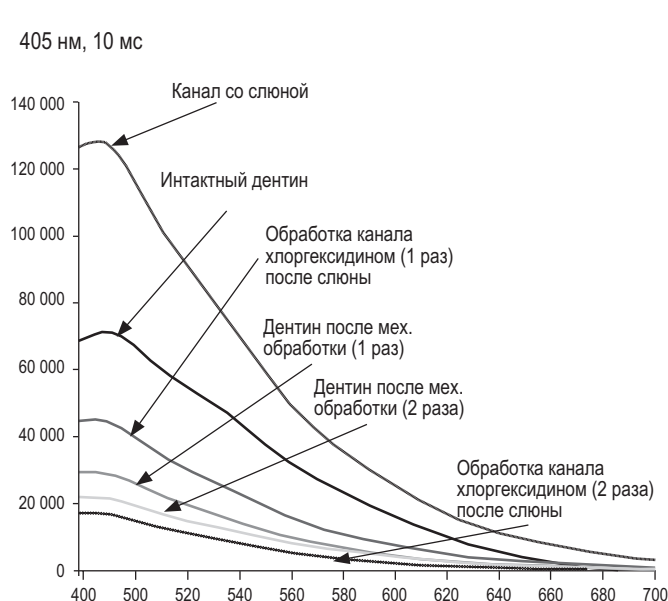


Рис. 9. Резкое снижение интенсивности флюоресценции полости и канала зуба до показателей интактной ткани (дентин – зелёный) после медикаментозной обработки (т. е. обработка проведена качественно). Лазер с длиной волны 405 нм.

микробный фактор, а также степень деминерализации зуба под действием этого фактора. Данная технология позволяет также объективно и качественно оценивать эффективность механической и медика-

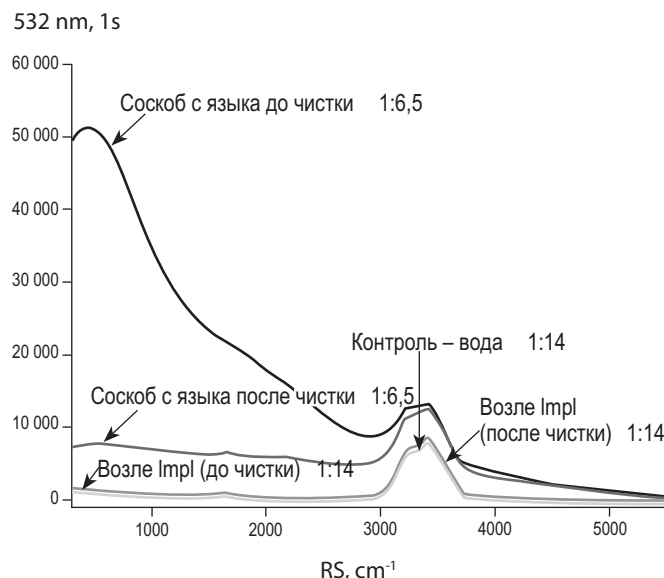


Рис. 10. При возбуждении зелёным лазером (515 нм) видна сильная резонансная люминесценция (вблизи линии лазера) на образце соскоба с языка до и после чистки (разведение соскоба с языка в дистиллированной воде 1:6,5).

ментозной обработки полости и канала зуба (рис. 9), состояния гигиены полости рта (рис. 10) с высокой степенью аналитической чувствительности (рис. 11–12 на вклейке, рис. 13), не уступающей бактериологическому методу (10^4 – 10^5 КОЕ/мл). Как видно из рис. 9, интенсивность люминесценции соскоба с языка до

Pseudomonas aeruginosa

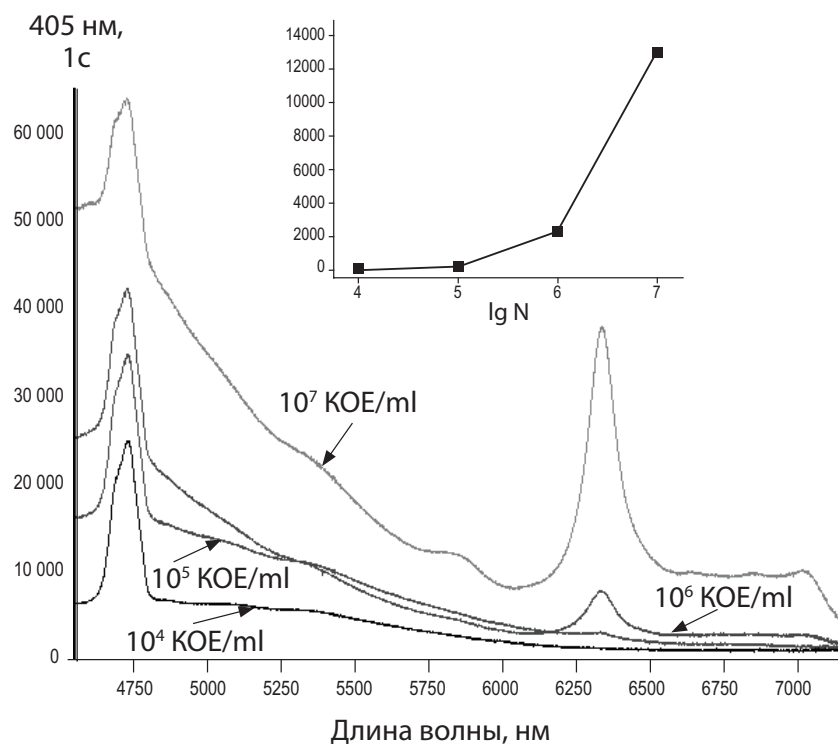


Рис. 13. Спектры люминесценции суспензий *Pseudomonas aeruginosa* при разных объёмных концентрациях.

Рамановское рассеяние света: спирты

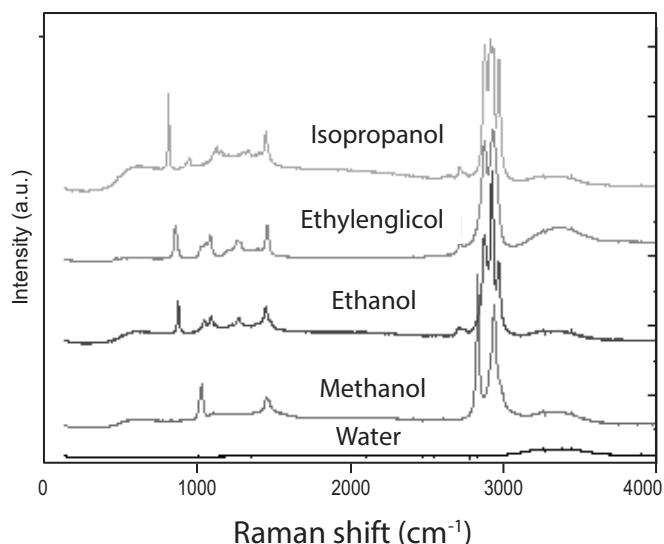


Рис. 15. Рамановские спектры различных спиртов.

его очистки на порядок больше, чем таковая после (даже при разведении соскоба в воде 1 : 6,5). Разницы между образцами возле Impl (дентальный имплантат) до и после чистки (разведение 1 : 14) нет, но их люминесценция в обоих случаях более интенсивная, чем у контрольного образца воды.

Индикация лекарственных препаратов и наркотических веществ в концепции применения РФД в стоматологии и других областях медицины заключается не только в большей информативности, удобстве и мало-

габаритности, но и на основе того, что посредством данной методики можно идентифицировать различные органические (лекарственные препараты, спирты, наркотические вещества) и неорганические вещества, база данных которых позволит исключить приобретение и использование подделок и не сертифицированной продукции. Для этого нет необходимости приобретать отдельный АПК РФД, а только базу данных продукта, который вводится в память используемого для клинических целей компьютера (рис. 14, 15).

Определение чувствительности микробов к антимикробным препаратам показало, что после внесения хлорамина спектр синегнойной палочки исчез и спектр раствора хлорамин + бактерия (1:1) стал похож на спектр хлорамина (рис. 16). Это означает, что бактерии под действием данного антисептика инактивированы и разрушены. Это даёт возможность индивидуально подобрать адекватную этиотропную терапию в комплексном лечении пациентов, а в совокупности с отмеченными выше ЛРФД-технологиями оценивать в итоге эффективность лечения.

В концепции развития ЛРФД-технологии стало возможным также экспрессно определять тканевую принадлежность, проводить дифференцировку между интактными тканями, доброкачественными и злокачественными опухолями (рис. 17).

Обоснован антимикробный и противоопухолевый эффект объёмной активированной фотодинамической терапии заболеваний и процессов микробной и неопластической природы с использованием АПК ЛФД и хлорофиллсодержащего препарата (фотостим), активированного вне организма. На рис. 18, 19 видно, что при использовании активированного фотостима наблюдалось подавление зоны роста микроорганизма через 24 ч. Таким образом, способность фотосенси-

Определение чувствительности микробов к антимикробным препаратам

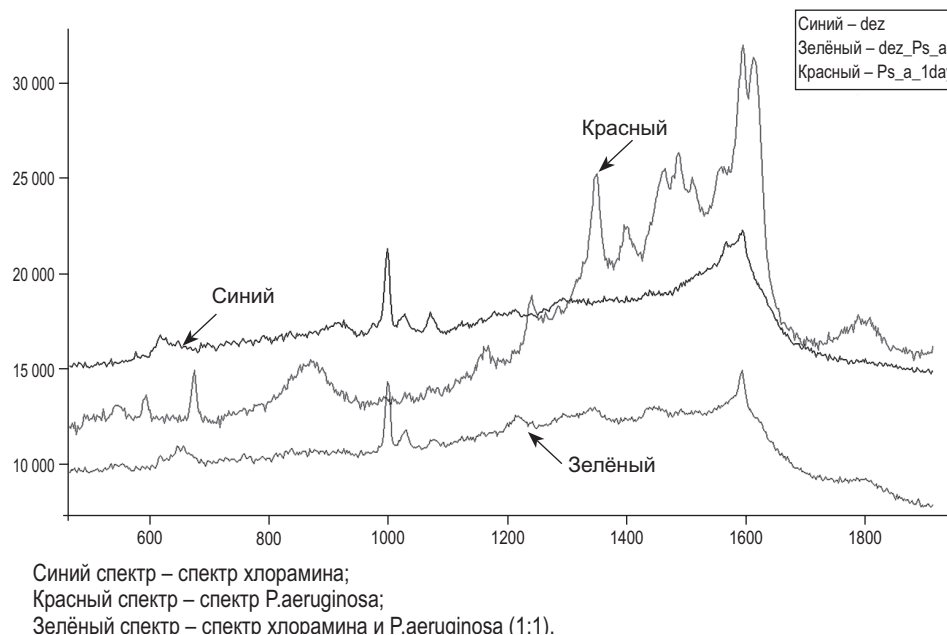


Рис. 16. Сравнительный анализ спектров 1% хлорамина при воздействии на штамм бактерии. Время исследования 2–3 мин.

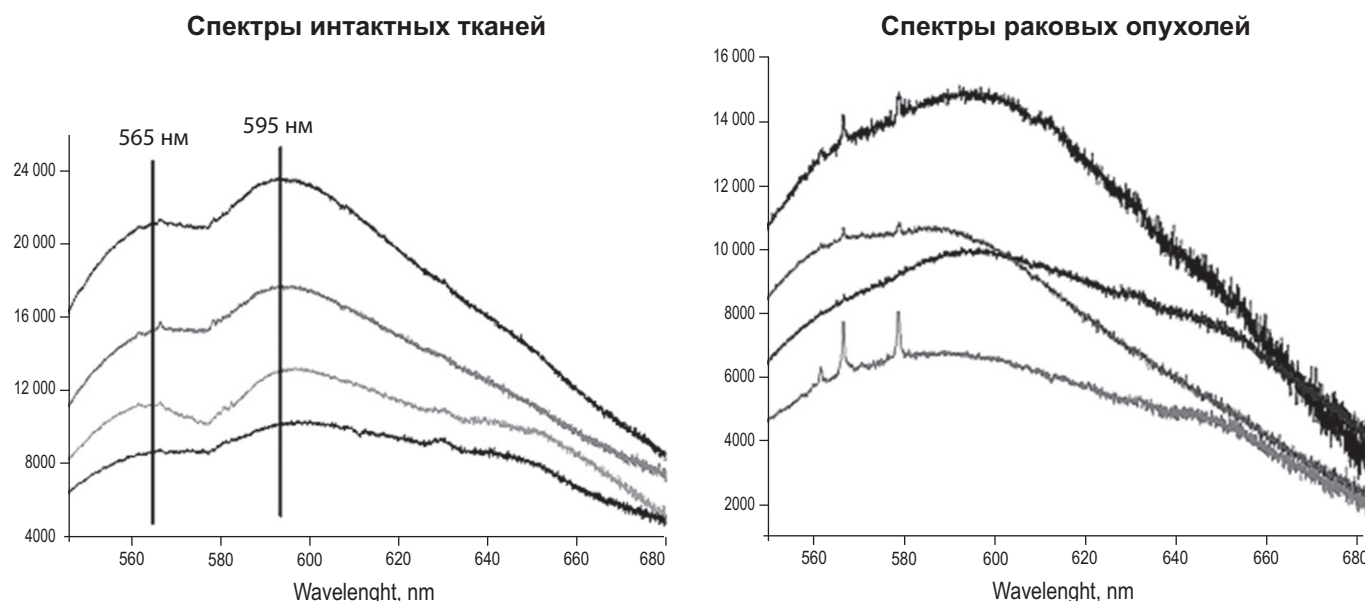


Рис. 17. ЛРФД интактных и опухолевых тканей.

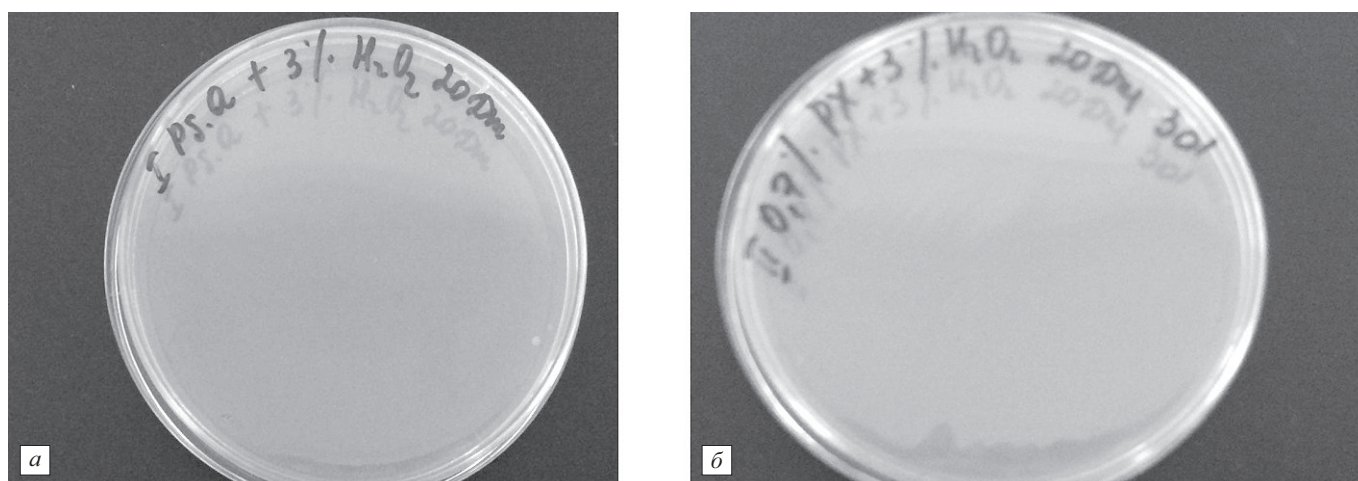


Рис. 18. Исследование действия объёмной активированной ФДТ на культуру микробов.

P. aeruginosa и фотостим с добавлением 3% H_2O_2 , активированный 20 Дж – роста нет (а); добавлен через 30 мин после активации – роста нет (б).

билизатора накапливаться в изменённых тканях, микробных клетках с реализацией эффекта летальной фотосенсибилизации бактерий может быть использована, по-видимому, при лечении заболеваний и процессов микробной природы, в том числе при выявлении антибиотикорезистентных штаммов патогенных микроорганизмов. Выявленный эффект существенным образом зависит от концентрации вводимого активированного препарата, длины волны и дозы лазерной его активации (оптимизация эффекта лечения) (рис. 20).

Результаты объёмной активированной ФДТ на опухолевых клетках (*in vitro*) показали (рис. 21), что в контроле клеток происходит активация хемотаксиса в 1,4 раза через сутки после воздействия хемокина. При действии активированного препарата при облучении 100 с миграционная активность опухолевых клеток значительно снижается (в 2,5–4 раза в зависимости от времени) по сравнению с контролями как инду-

цированного, так и спонтанного хемотаксиса. Таким образом, можно сказать, что ФДТ может снижать миграционную активность опухолевых клеток, что потенциально может быть использовано для блокировки процесса метастазирования у онкологических больных.

Апробация методики объёмной активированной ФДТ при лечении опухолей (карцинома Эрлиха у мышей) установила, что мыши в группе с чистым контролем были активны и живы в течение всего исследования (1 год). Мыши со вторым чистым контролем быстро увеличивались в размерах (асцит) и погибали на 4–6-й день. Мыши, получавшие неактивированный хлорофилл, содержащий препарат или раствор 1:10 H_2O_2 3% погибали на 6–12-й день. Мыши, получавшие активированный препарат в разведении 1:10, жили 21–24 дня, а при его разведении 1:1000 погибали в пределах 10 дней. Убедительно показан вероятный противоопухолевый эффект хло-



Рис. 19. Накопление активированного препарата фотостим в различных органах и тканях при различных его концентрациях в питьевой воде.

а – 0,07%, б – 0,007%, в – 0,0007% нижний график. Увеличение концентрации препарата приводит к его накоплению в различных органах и тканях.

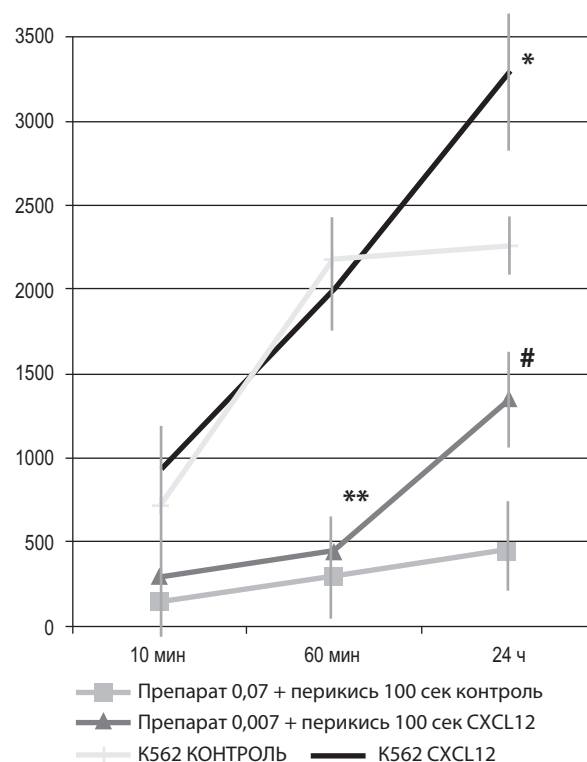


Рис. 20. Миграционная активность клеток K562 под действием препарата фотостим в концентрации 0,07%.

рофиллсодержащего препарата, активированного вне организма.

Таким образом, ЛРФД медицинская технология является уникальным инструментом в арсенале клинициста-стоматолога. Она совмещает экспрессность, высокую диагностическую и, главное, аналитическую чувствительность, не уступающую современным методам (бактериологический, гистологический, оптический и др.), с функциями высокотехнологичного лабораторного оборудования. Метод и аппаратура АПК РФД для его реализации, позволяют экспрессно идентифицировать ткани челюстно-лицевой области и вещества органической и неорганической природы непосредственно на рабочем месте врача-стоматолога, расширяя диагностические возможности в отношении заболеваний и процессов микробной природы, неопластических процессов тканей и органов челюстно-лицевой области в норме и при патологии.

При этом он полностью удовлетворяет потребностям массового стоматологического приёма, позволяя анализировать материал, как непосредственно из полости рта (с помощью оптического волокна), так и вне её на основе фокусировки лазерного луча с помощью микроскопа, совмещённого с лазерным прибором. Представленная медицинская технология требует своего скорейшего внедрения в клиническую практику.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров М.Т., Zubov C.B., Березинская А.С. и соавт. Экспериментально-теоретическое обоснование принципов и особенностей применения метода лазерно-конверсионной диагностики для оценки состояния твёрдых тканей зуба в норме и при патологии (кариес). *Российский стоматологический журнал*. 2013; 4: 6–10.
2. Александров М.Т., Зуев В.М., Кукушкин В.И. и соавт. Исследование спектральных характеристик органов малого таза у женщин и их клиническое значение. *Онкогинекология*. 2013; 3: 61–7.
3. Александров М.Т., Кукушкин В.И., Амбарцумян О.А. и соавт. Идентификация микроорганизмов на основе эффекта гигантского рамановского рассеяния. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013; 5: 97–100.
4. Александров М.Т. Лазерная клиническая биофотометрия (теория, эксперимент, практика). М.: Техносфера; 2008.
5. Кукушкин В.И., Ваньков А.Б., Кукушкин И.В. Взаимосвязь гигантского усиления сигналов рамановского рассеяния и люминесценции на наноструктурированных металлических поверхностях. *Письма в ЖЭТФ*. 2013; 98(6): 383–8.
6. Сарычева И.Н., Янушевич О.О., Минаков Д.А. и соавт. Ранняя диагностика кариеса зубов методом лазерно-индуцированной флюоресценции. *Российская стоматология*. 2012; 3: 47–58.

REFERENCES

1. Alexandrov M.T., Zubov S.V., Berezhinskaya A.S. et al. Experimental-theoretical rationale of principles and features of application of laser-converse diagnostic method for evaluating the condition of hard teeth tissues in normal and in pathological conditions (caries). *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal*. 2013; 4: 6–10. (in Russian)
2. Alexandrov M.T., Zuev V.M., Kukushkin V.I. et al. Research of spectral characteristics of women's pelvic organs and its clinical value. *Oncoginekologiya*. 2013; 3: 61–7. (in Russian)
3. Alexandrov M.T., Kukushkin V.I., Ambartsumyan O.A. et al. Germs identification based on giant Raman scattering. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2013; 5: 97–100. (in Russian)
4. Alexandrov M.T. *Laser clinical Biophotometry (theory, experiment, practice) [Lazernaya klinicheskaya Biofotometriya (teoriya, experiment, praktika)]*. Moscow: Tekhnosfera Publ.; 2008. (in Russian)
5. Kukushkin V.I., Van'kov A.B., Kukushkin I.V. Giant Raman scattering signal amplification and luminescence correlation on nanostructured metal surfaces. *Pis'ma v ZhETF*. 2013; 98(6): 383–8. (in Russian)
6. Syracheva I.N., Yanushevich O.O., Minakova D.A. et al. Early teeth caries diagnostic with laser-induced fluorescence method. *Rossiyskaya stomatologiya*. 2012; 3: 47–58. (in Russian)

Поступила 15.09.17

Принята к печати 16.08.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК: 616.31-018.73-009.7]-092:612.815.1

Арутюнов С.Д., Перцов С.С., Муслов С.А., Шанидзе З.Л.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПОРОГОВ БОЛЕВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА К МЕХАНИЧЕСКИМ СТИМУЛАМ

ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова
Минздрава РФ, Москва, Россия, 127473, Москва

Тактильная и болевая чувствительности слизистой оболочки рта являлись предметом изучения широкого ряда исследователей. Авторы отмечали неодинаковую чувствительность слизистой оболочки в её различных зонах и зависимость от наличия или отсутствия различных хронических заболеваний, а также других факторов. Однако численные значения порогов возбуждения баро- и механорецепторов слизистой оболочки полости рта недостаточно подробно освещены в литературе, опытные данные весьма разрозненны, часто представлены без указания точности и методов измерения или участков полости рта, для которых были получены. Системные исследования, посвящённые диагностике чувствительности сопряжённых с зубочелюстными протезами тканей протезного ложа к давлению, практически отсутствуют. В данном сообщении мы предприняли некоторую попытку исправить эти пробелы. В нём приведены конкретные численные значения порогов болевой чувствительности слизистой оболочки полости рта человека и животных при механических воздействиях на основе литературных данных. Установлено, что среднее значение нижней границы порога болевой чувствительности, по данным различных авторов, составляет 20,72 г/м², верхней границы – 63,82 г/м². Также представлены результаты численного анализа математической модели obturator челюстного протеза – слизистая оболочка края дефекта верхней челюсти, в рамках которой определено давление на слизистую оболочку края дефекта в зависимости от материала obturatorа.

Ключевые слова: тактильная; болевая чувствительность; порог; слизистая оболочка; полость рта.

Для цитирования: Арутюнов С.Д., Перцов С.С., Муслов С.А., Шанидзе З.Л. Исследования порогов болевой чувствительности слизистой оболочки полости рта к механическим стимулам. *Российский стоматологический журнал*. 2018; 22(1): 11–17. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2018-22-1-11-17>

Arutyunov A.S., Pertsov S.S., Muslov S.A., Shanidze Z.L.

THE STUDY OF THRESHOLDS OF PAIN SENSITIVITY OF ORAL MUCOSA TO MECHANICAL STIMULI

A.I. Evdokimov Moscow State Medical Stomatological University, 127473, Moscow, Russia

Tactile and pain sensitivity of the oral mucosa has been the subject of study of a number of researchers. However, the numerical values of the thresholds of the excitation of the baro- and mechanoreceptors of the mucosa of the oral cavity not

Для корреспонденции: Муслов Сергей Александрович, д-р биол. наук, проф., E-mail: muslov@mail.ru.

К ст. М.Т. Александрова и соавт.

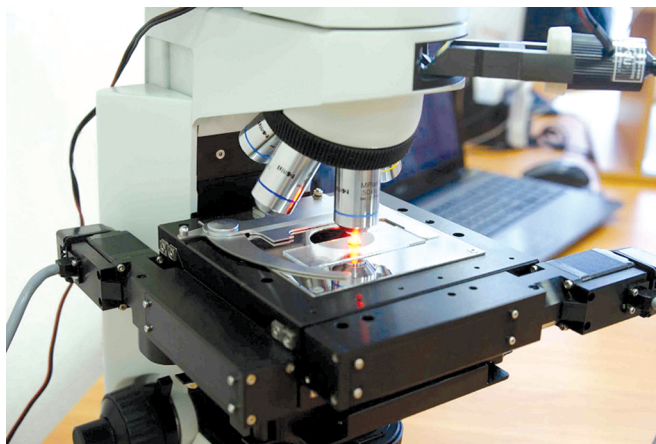


Рис. 1. Рамановский микроскоп «ИнСпектр М532» и 2D-сканирующая моторизованная подвижка.



Рис. 2. Модификации прибора «ИнСпектр М» с оптическим волокном и насадками для работы с биологическими жидкостями, мазками и биопсийным материалом.

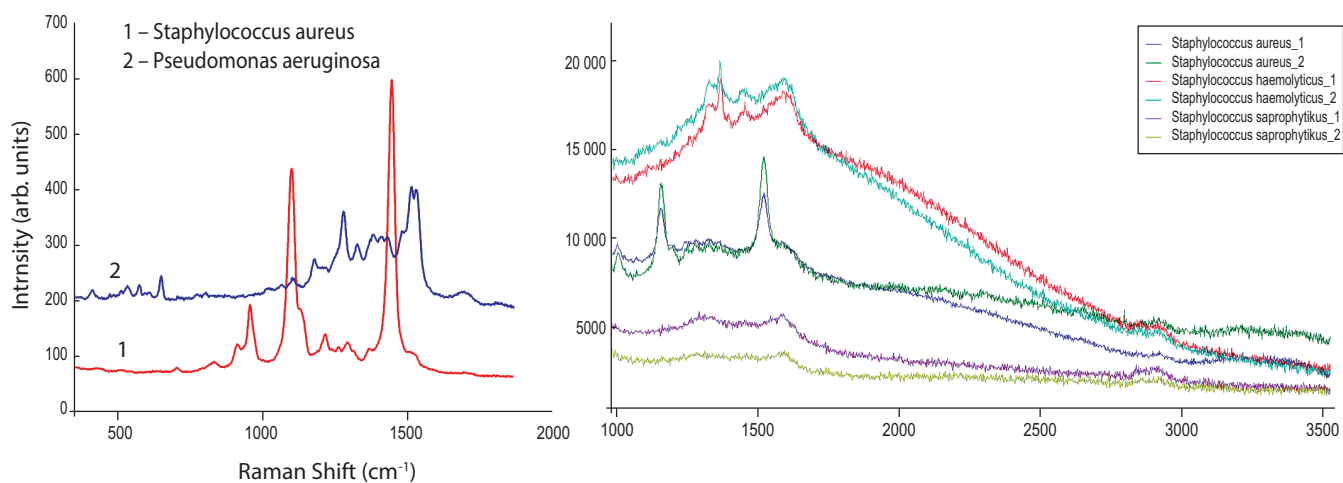


Рис. 11. Слева - сравнение спектров *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*; справа - сравнение спектров различных клинических штаммов стафилококка.

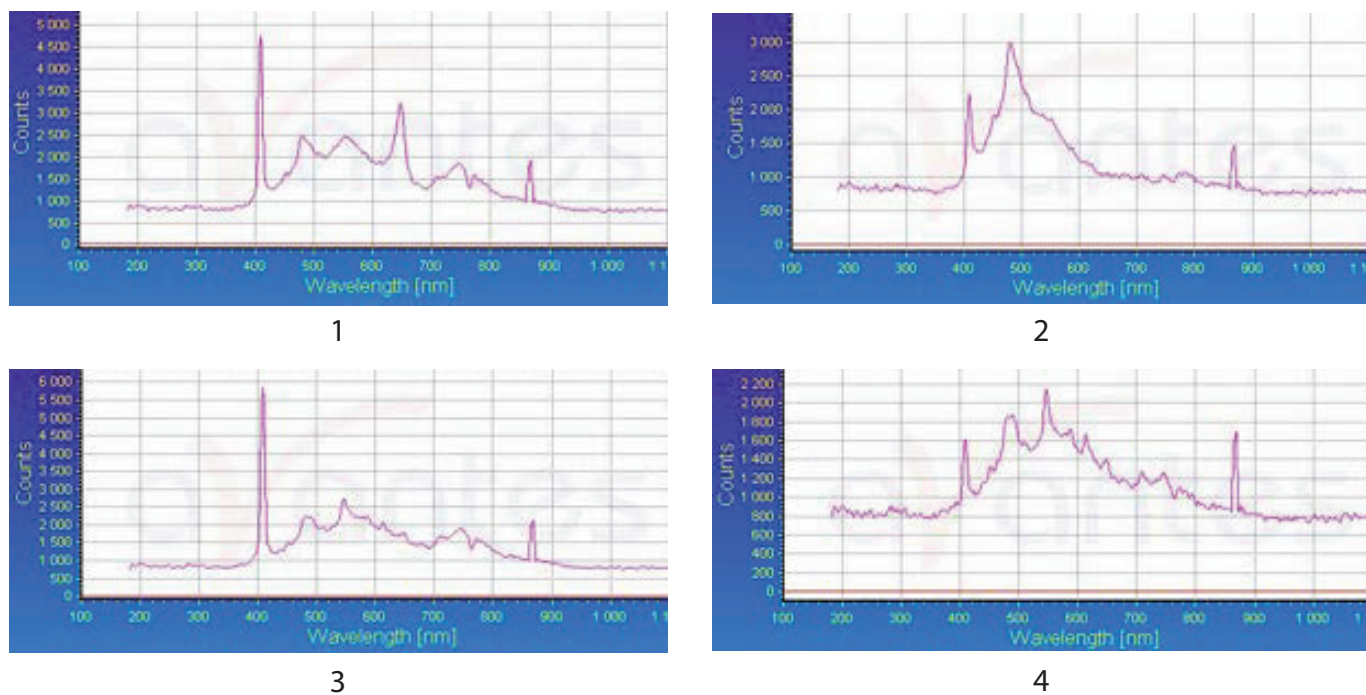


Рис. 12. 1 – *Staphylococc Aureus*, 2 – *Candida Ablicana*, 3 – *Eshirisia Colli*, 4 – *Streptococcus Pyogenes*.

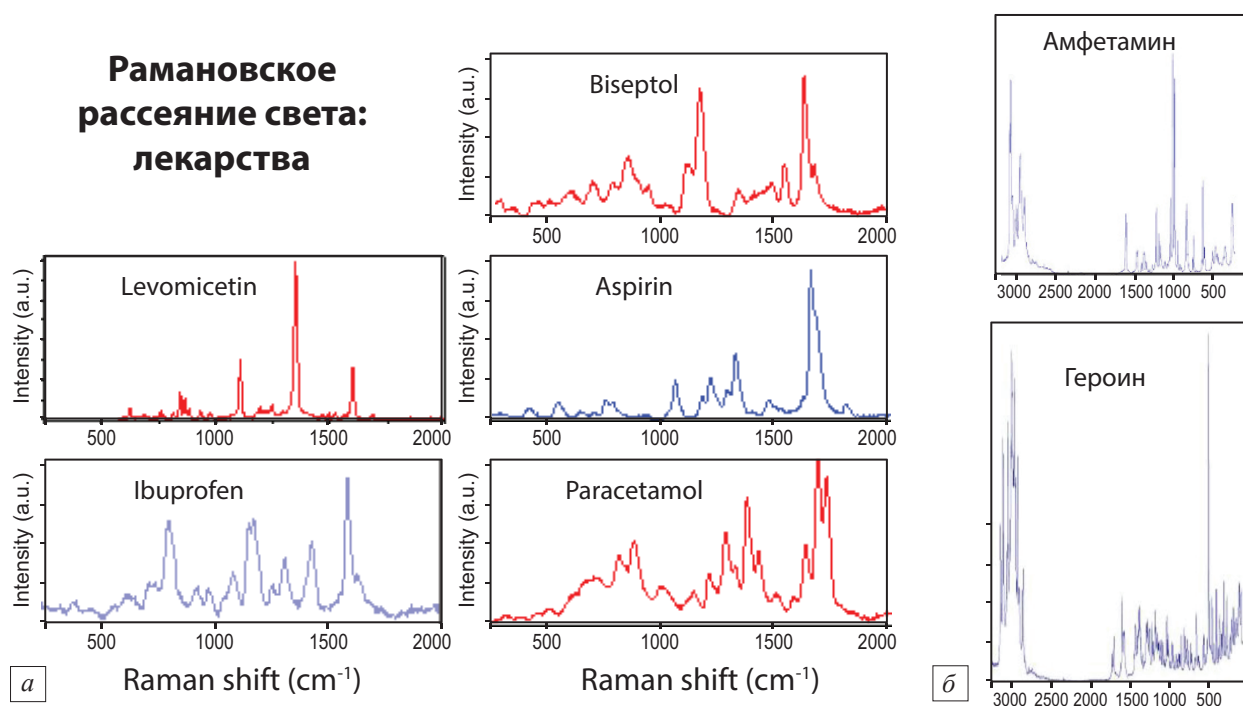


Рис. 14. Рамановские спектры лекарственных (а) и наркотических веществ (б).