

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Александров М.Т., Полякова М.А., Кукушкин В.И., Баграмова Г.Э., Бабина К.С., Дмитриева Е.Ф.

ПРИМЕНЕНИЕ РАМАН-ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕМИНЕРАЛИЗАЦИИ ТВЁРДЫХ ТКАНЕЙ ЗУБА

Кафедра терапевтической стоматологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия;

Кафедра ортопедической стоматологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 454092, г. Челябинск, Россия

Цель исследования – обосновать эффективность метода раман-флюоресцентной диагностики в оценке реминерализации твёрдых тканей зуба. В доклиническом исследовании in vitro на 25 модельных тест-объектах зубов (резцы нижней челюсти), удалённых по клиническим показаниям, проводили раман-флюоресцентную спектроскопию с длиной волны зондирующего излучения 532 нм. Преимуществами раман-флюоресцентной спектроскопии являются экспрессность, неинвазивность, простой и неразрушающий контроль степени реминерализации твёрдых тканей зуба [1–3]. В процессе исследования проведён качественный и количественный анализ содержания и распределения гидроксиапатита в эмали в норме и при использовании реминерализующих препаратов. Высокая чувствительность и воспроизводимость метода позволили нам оценивать степень минерализации зуба, эффективность реминерализующих препаратов.

Ключевые слова: эмаль; реминерализация; гидроксиапатит; раман-флюоресцентная спектроскопия.

Для цитирования: Александров М.Т., Полякова М.А., Кукушкин В.И., Баграмова Г.Э., Бабина К.С., Дмитриева Е.Ф. Применение раман-флюоресцентной технологии для оценки эффективности реминерализации твёрдых тканей зуба. *Российский стоматологический журнал*. 2018; 22 (5): 220-223. <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2018-22-5-220-223>

Alexandrov M.T., Polyakova M.A., Kukushkin V.I., Bagramova G.E., Babina K.S., Dmitrieva E.F.

THE USE OF RAMAN FLUORESCENCE TECHNOLOGY TO EVALUATE THE EFFECTIVENESS OF REMINERALIZATION OF SOLID TOOTH TISSUE

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russia;

Federal State budget Educational Institution of Higher Education South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 454092, Chelyabinsk, Russia

The purpose of the study-to justify the effectiveness of the method of Raman-fluorescence diagnostics in the assessment of the remineralisation of the hard tissues of the tooth. In preclinical in vitro study on the model 25 the test object teeth (the incisors of the lower jaw) removed as clinically indicated, carried out Raman-fluorescence spectroscopy with a wavelength of probe radiation of 532 nm. The advantages of Raman-fluorescence spectroscopy are expressiveness, noninvasiveness, simple and non-destructive control of the degree of remineralization of hard tooth tissues [1–3]. In the course of the study, a qualitative and quantitative analysis of the content and distribution of hydroxyapatite in the enamel in the normal and with the use of remineralizing drugs was carried out. The high sensitivity and reproducibility of the method allowed us to assess the degree of mineralization of the tooth, the effectiveness of remineralizing drugs.

Key words: enamel; remineralization; hydroxyapatite; combination fluorescence spectroscopy.

For citation: Александров М.Т., Полякова М.А., Кукушкин В.И., Баграмова Г.Э., Бабина К.С., Дмитриева Е.Ф. The use of raman fluorescence technology to evaluate the effectiveness of remineralization of solid tooth tissue. *Rossiyskii stomatologicheskii zhurnal*. 2018; 22(5): 220-223. <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2018-22-5-220-223>

For correspondence: Aleksandrov Mikhail Timofeevich, Dr.med. Sci., Professor, E-mail: alex_mta@mail.ru.

Information about authors:

Polyakova M.A., <http://orcid.org/0000-0002-4494-2644>;

Babina K.S., <http://orcid.org/0000-0003-4445-0858>.

Acknowledgments. *The study had no sponsorship.*

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

Received 03.08.18

Accepted 16.09.18

Зубная эмаль – самая минерализованная ткань организма. Состав – 96 мас. % неорганического вещества и 4 мас. % органического вещества и воды. Неорганическое вещество в основном состоит из фосфата кальция, связанного с гидроксиапатитом, химическая формула которого $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Наличие гидроксиапатита подтверждается наличием его спектральных полос в твёрдых тканях зуба [4]. Считается, что рамановская спектроскопия позволяет объективно оценивать спектральные полосы, связанные с конкретными химическими структурами твёрдых тканей зуба [5, 6]. Таким образом, эту технологию в настоящее время можно считать предпочтительной при исследовании реминерализации зубов [7–13].

Цель нашего исследования – определить эффективность метода раман-флюоресцентной диагностики реминерализации твёрдых тканей зуба при использовании реминерализующих паст, геля, суспензии и ополаскивателя.

Материал и методы

В настоящем доклиническом исследовании *in vitro* на 25 модельных тест-объектах зубов (резцы нижней челюсти), удалённых по клиническим показаниям, проводили раман-флюоресцентную спектроскопию (после их гигиенической чистки профессиональной зубной пастой), используя лазерный аппаратно-программный комплекс «ИнСпектр М» с длиной волны зондирующего излучения 532 нм. Из них 5 модельных тест-объектов зубов помещены в 10 % суспензию нано-ГАП (Ca, Mg, Zn) на 1 мин в течение 21 дня (срок рекомендуемой для реминерализующей терапии); 5 тест-объектов чистили пастой, содержащей нано-ГАП (Ca, Mg, Zn) ежедневно в течение 21 дня утром и вечером; 5 тест-объектам в течение 21 дня (один раз в день) наносили гель, содержащий нано-ГАП в комплексе с растворимым кальцием в одном препарате; 5 тест-объектов обрабатывали 21 день ополаскивателем ежедневно; контрольная группа – 5 тест-объектов, которые были в деионизированной воде 21 день. Измерения раман-флюоресцентных характеристик твёрдых тканей зуба проводили через 21 день. Повторные измерения во всех группах выполняли через 14 дней для выявления длительности сохранения эффекта минерализации эмали зубов.

АПК «ИнСпектр М» предназначен для измерения спектров рамановского рассеяния или спектров фотолюминесценции жидкостей, твёрдых тел, порошков и гелей. Прибор состоит из лазерного источника излучения, системы сбора, фильтрации и анализа рассеянного излучения, оснащён малошумящим многоканальным детектором – анализатором (ПЗС-линейкой) для измерения амплитудных и спектральных характеристик рассеянного излучения. Спектральный диапазон комплекса покрывает область молекулярных колебаний органических и неорганических веществ, что позволяет в течение нескольких секунд измерять рамановский или флюоресцентный спектр исследуемого объекта, определять спектральное положение и относительные интенсивности рамановских и флюоресцентных спектральных линий. Программное обеспечение данного прибора способствует качественно-

му и количественному анализу получаемых спектров и идентификации вещества, сравнивая получаемый спектр с эталонными [6]. С помощью АПК «ИнСпектр М» исследуемые тест-объекты подвергали неразрушающему воздействию низкоинтенсивного лазерного излучения видимого диапазона (532 нм). Результаты исследования обрабатывали в режиме онлайн, пользуясь в представленной работе аппаратно-программным комплексом. Измерения проводили контактно-стабильно и перпендикулярно к поверхности эмали зуба. Для количественной оценки спектральной интенсивности рамановского излучения (в относительных единицах M ср.) измеряли показатели в максимуме и минимуме его мощности и показатели интенсивности флюоресценции (M ср.). Регистрация и программная обработка результатов исследования занимала 2 мин. Результаты (M ср.) исследования представлены в виде рисунков и таблиц.

Результаты обрабатывали общепринятыми статистическими методами с помощью стандартного блока статистических программ Microsoft Excel (2007) и SPSS Statistics 23 на основании критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Для описания количественных признаков рассчитывали среднее значение и среднее квадратичное отклонение признака M , стандартное отклонение (m). Значения представлены в форме $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

Раман-флюоресцентные характеристики эмали твёрдых тканей зуба в контрольной группе представлены на рис. 1. (см. на вклейке)

Показатели степени минерализации эмали зуба по своей интенсивности не менялись в динамике наблюдения и составили в среднем 324 отн. ед. (различия не достоверны).

Раман-флюоресцентная диагностика эмали центральных нижних резцов до и после реминерализующей терапии показана на рис. 2, *a–г* (см. на вклейке).

Из рис. 2, *a* следует, что после действия реминерализующей пасты рамановская интенсивность гидроксиапатита увеличилась в среднем на 1511 отн. ед. и уменьшилась после 14-дневной дополнительной выдержки в деионизированной воде на 711 отн. ед., но оставалась выше исходных показателей на 800 отн. ед.

Из рис. 2, *б* следует, что после действия реминерализующей суспензии рамановская интенсивность гидроксиапатита увеличилась в среднем на 1337 отн. ед. и уменьшилась после 14-дневной дополнительной выдержки в деионизированной воде на 932 отн. ед., но оставалась выше исходных показателей на 355 отн. ед.

Из рис. 2, *в* следует, что после действия реминерализующей суспензии рамановская интенсивность гидроксиапатита увеличилась в среднем на 1176 отн. ед. и уменьшилась после 14-дневной дополнительной выдержки в деионизированной воде на 942 отн. ед., но оставалась выше исходных показателей на 234 отн. ед.

Из рис. 2, *г* следует, что после действия реминерализующей суспензии рамановская интенсивность гидроксиапатита увеличилась в среднем на 621 отн. ед. и уменьшилась после 14-дневной дополнительной выдержки в деионизированной воде на 376 отн. ед., но

Средние спектральные характеристики эмали до и после реминерализующей терапии

Показатель	Рамановская интенсивность сигнала/длина волны в максимуме	Рамановская интенсивность сигнала/длина волны в максимуме	Рамановская интенсивность сигнала/длина волны в максимуме
Эмаль после курса чистки пастой с nano-ГАП	$y = 671 \pm 309,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$	$y = 2182 \pm 309,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$	$y = 1471 \pm 531,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$
Эмаль после курса суспензии 10% с nano-ГАП	$y = 1280 \pm 898,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$	$y = 2617 \text{ посл}$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$	$y = 1635 \pm 733,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$
Эмаль после курса рем. геля с nano-ГАП	$y = 350 \text{ ль посл}$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$	$y = 1526 \pm 782,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$	$y = 584 \pm 335,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$
Эмаль после курса ополаскивателем	$y = 593 \pm 46,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$	$y = 1214 \pm 370,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$	$y = 838 \pm 263,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$
Эмаль - контроль	$y = 321 \pm 249,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$	$y = 340 \pm 254,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$	$y = 311 \pm 275,$ $x = 963 \text{ см}^{-1}$

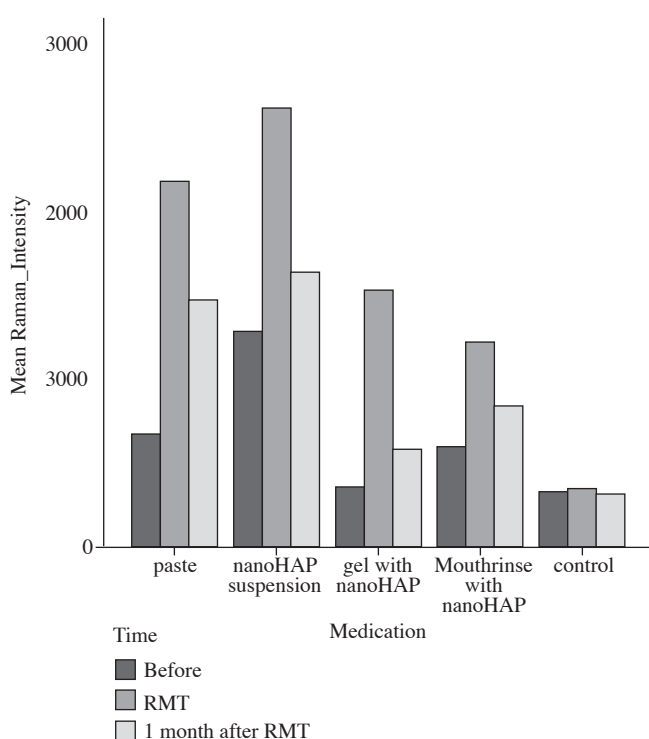


Рис. 3. Раман-флюоресцентные характеристики эффективности различных реминерализующих препаратов.

оставалась выше исходных показателей на 245 отн. ед.

Таким образом, на основе использования раман-флюоресцентной технологии оценки степени минерализации твёрдых тканей зуба при использовании различных реминерализующих препаратов показано, что все они являются достаточно эффективными, длительность реминерализующего эффекта сохраняется и после 14 дней наблюдений. Наиболее эффективным реминерализующим препаратом, как показали наши исследования, по степени активности являются гель, паста, ополаскиватель, суспензия соответственно по убывающей (рис. 3).

Из рисунка следует, что при использовании геля, содержащего nano-ГАП в комплексе с растворимым кальцием, минерализация эмали увеличилась на 336

%; пасты, содержащей nano-ГАП (Ca, Mg, Zn), – на 225 %; ополаскивателя и суспензии с nano-ГАП (Ca, Mg, Zn) увеличилась в обоих случаях на 104 % (во всех случаях по сравнению с исходными показателями минерализации тест-объектов). В контрольной группе показатели практически остались неизменными.

Итоговые систематизированные результаты представлены в таблице.

Таким образом, выявлено, что после проведения курса реминерализующей терапии в течение 21 дня различными реминерализующими препаратами, содержащими nano-ГАП (Ca, Mg, Zn), достоверно происходит повышение интенсивности рамановской линии гидроксиапатита ($p = 0,040$) на всех тест-объектах (т. е. увеличение концентрации гидроксиапатита в эмали зуба), кроме контрольной группы. Наилучшие показатели реминерализующей терапии за 21 день мы получили от геля, содержащего nano-ГАП в комплексе с растворимым кальцием, и пасты, содержащей nano-ГАП (Ca, Mg, Zn). После того как тест-объекты находились месяц в деионизированной воде интенсивность рамановского пика снизилась, но не достигла начальной границы.

Заключение

Таким образом, на основе проведённого исследования по изучению реминерализующей эффективности различных препаратов рамановским методом показано, что все они являются достаточно эффективными, при этом длительность реминерализующего эффекта сохраняется более 14 дней. Наиболее эффективными реминерализующими препаратами, как показали наши исследования, по степени активности являются гель, содержащий nano-ГАП в комплексе с растворимым кальцием, паста, содержащая nano-ГАП (Ca, Mg, Zn), ополаскиватель и суспензия с nano-ГАП (Ca, Mg, Zn) соответственно по убывающей. Полученные данные свидетельствуют, что рамановские технологии позволяют экспрессно, практически в режиме онлайн, «по месту» оценивать как степень минерализации твёрдых тканей зуба, так и проводить выбор и сравнительную оценку различных современных реминерализующих препаратов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I.U. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectros. Rev.* 2008; 43: 134–79.
2. Boskey A.L., Mendelsohn R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib. Spectros.* 2005; 38: 107–14.
3. Krafft C., Sergio V. Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy.* 2006; 20: 195–218.
4. Ramakrishnaiah R., Rehman G., Basavarajappa S., Al Khuraif A.A., Durgesh B.H., Khan A.S., Rehman I. Applications of Raman Spectroscopy in Dentistry: Analysis of Tooth Structure. *Applied Spectroscopy Reviews.* 2015; 50:4, 332–50, DOI: 10.1080/05704928.2014.986734
5. Tramini P., Bonnet B., Sabatier R., Maury L. A method of age estimation using Raman microspectrometry imaging of the human dentin. *Forensic Sci. Int.* 2001; 118: 1–9.
6. Penel G., Leroy G., Rey C., Bres E. Micro-Raman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif. Tissue Int.*, 1998; 63: 475–81.
7. Miyazaki M., Onose H., Moore B. V Analysis of the dentin–resin interface by use of laser Raman spectroscopy. *Dent. Mater.* 2002; 18: 576–80
8. Ko A.C.-T., Hewko M., Sowa M.G., Dong C.C., Cleghorn B., Lin-P'ing Choo-Smith Early dental caries detection using a fibre-optic coupled polarization-resolved Raman spectroscopic system. *Opt. Express.* 2008; 16 (9): 6274–84.
9. Ko A.C.-T., Lin-P'ing Choo-Smith, Hewko M., Sowa M.G., Dong C.C.S., Cleghorn B. Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy. 2006; 14: 203–15.
10. Yang S., Li B., Akkus A., Akkus O., Lang L. Wide-Field Raman Imaging of Dental Lesions School of Dental Medicine. (Case Western Reserve University, Cleveland, OH, 44106, USA. Raman Spectroscopy)
11. Ionita I. Diagnosis of tooth decay using polarized micro-Raman confocal spectroscopy *Rom. Rep. Phys.* 2009; 61: 567–74.
12. Timchenko E.V., Timchenko P.E., Volova L.T., Rosenbaum A.Yu., Kulabukhova A. Yu. J. Physies: Conference Series 769. 2016; 012047 doi:19.1088: 1742-6596/769/1/012047 Анализ тканей зубов с использованием Рамановской спектроскопии.
13. Penel G., Delfosse C., Descamps M., Leroy, G. Composition of bone and apatite biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. *Bone.* 2005; 36 (5): 893–901.

REFERENCES

1. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I.U. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectros. Rev.* 2008; 43: 134–79.
2. Boskey A.L., Mendelsohn R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib. Spectros.* 2005; 38: 107–14.
3. Krafft C., Sergio V. Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy.* 2006; 20: 195–218.
4. Ramakrishnaiah R., Rehman G., Basavarajappa S., Al Khuraif A.A., Durgesh B.H., Khan A.S., Rehman I. Applications of Raman Spectroscopy in Dentistry: Analysis of Tooth Structure. *Applied Spectroscopy Reviews.* 2015; 50:4, 332–50, DOI: 10.1080/05704928.2014.986734
5. Tramini P., Bonnet B., Sabatier R., Maury L. A method of age estimation using Raman microspectrometry imaging of the human dentin. *Forensic Sci. Int.* 2001; 118: 1–9.
6. Penel G., Leroy G., Rey C., Bres E. Micro-Raman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif. Tissue Int.*, 1998; 63: 475–81.
7. Miyazaki M., Onose H., Moore B. V Analysis of the dentin–resin interface by use of laser Raman spectroscopy. *Dent. Mater.* 2002; 18: 576–80
8. Ko A.C.-T., Hewko M., Sowa M.G., Dong C.C., Cleghorn B., Lin-P'ing Choo-Smith Early dental caries detection using a fibre-optic coupled polarization-resolved Raman spectroscopic system. *Opt. Express.* 2008; 16 (9): 6274–84.
9. Ko A.C.-T., Lin-P'ing Choo-Smith, Hewko M., Sowa M.G., Dong C.C.S., Cleghorn B. Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy. 2006; 14: 203–15.
10. Yang S., Li B., Akkus A., Akkus O., Lang L. Wide-Field Raman Imaging of Dental Lesions School of Dental Medicine. (Case Western Reserve University, Cleveland, OH, 44106, USA. Raman Spectroscopy)
11. Ionita I. Diagnosis of tooth decay using polarized micro-Raman confocal spectroscopy *Rom. Rep. Phys.* 2009; 61: 567–74.
12. Timchenko E.V., Timchenko P.E., Volova L.T., Rosenbaum A.Yu., Kulabukhova A. Yu. J. Physies: Conference Series 769. 2016; 012047 doi:19.1088: 1742-6596/769/1/012047 Analysis of dental tissues using Raman spectroscopy. (in Russian)
13. Penel G., Delfosse C., Descamps M., Leroy, G. Composition of bone and apatite biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. *Bone.* 2005; 36 (5): 893–901.

Поступила 03.08.18
Принята в печать 16.09.18

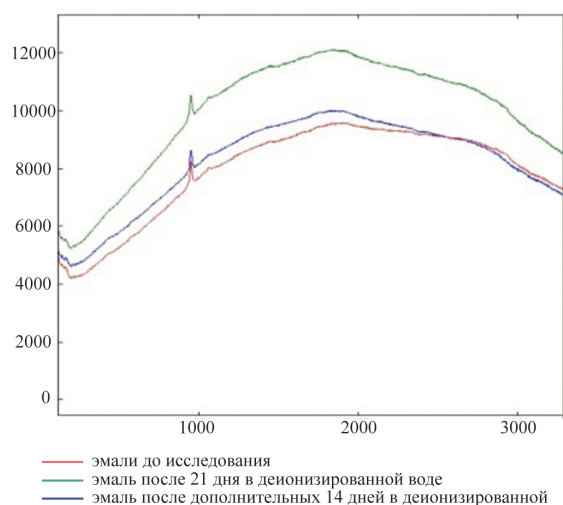


Рис. 1. Спектральные раман-флюоресцентные характеристики эмали зуба контрольной группы.

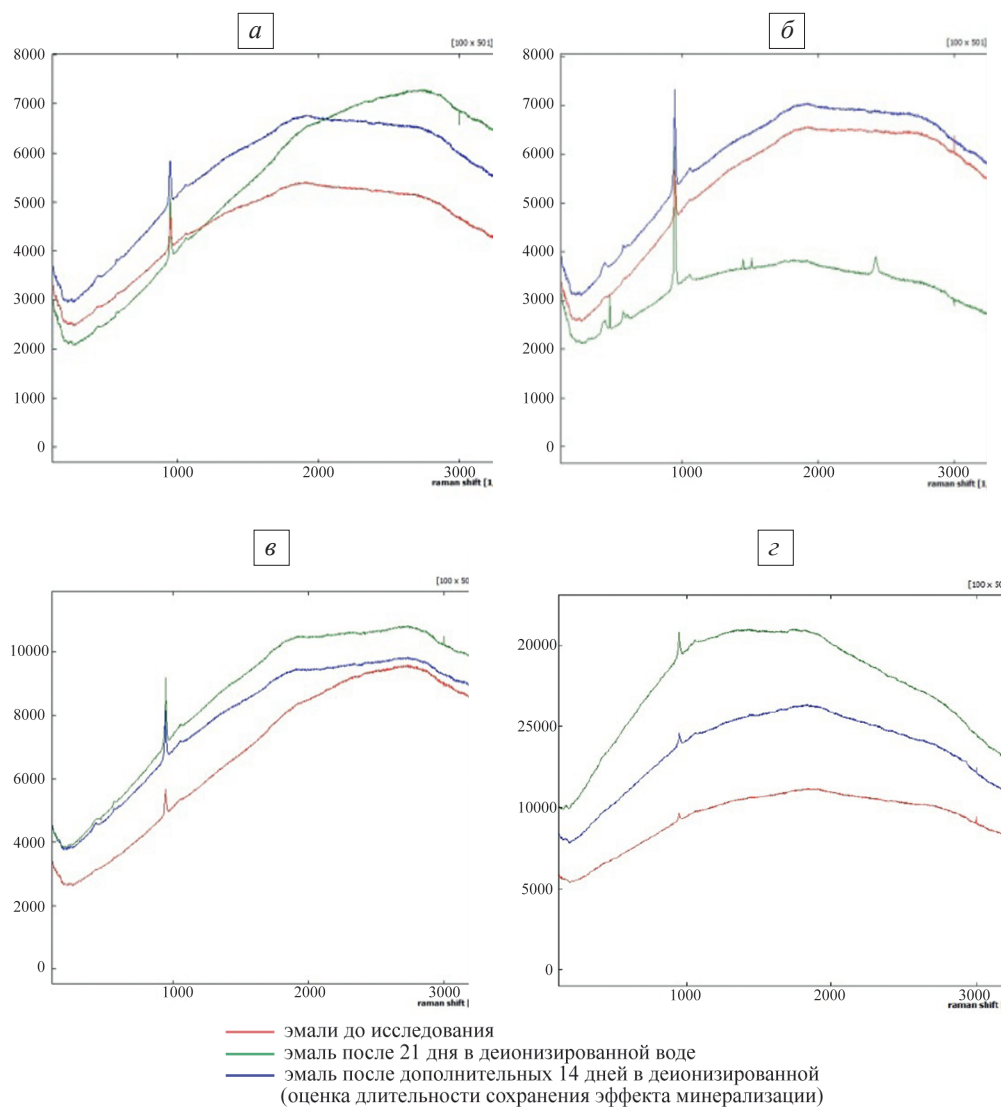


Рис. 2. Интенсивность рамановской линии гидроксиапатитов (963 см^{-1}) при использовании пасты, содержащей нано-ГАП (Ca, Mg, Zn) (а), курса суспензии 10% с нано-ГАП (Ca, Mg, Zn) (б) и курса геля-содержащего нано-ГАП в комплексе с растворимым кальцием (в) и при использовании ополаскивателя (г).