

ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КАК МЕТОД РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ КАРИЕСА

Казарина Л.Н.¹, Вдовина Л.В.¹, Рунова О.А.¹

¹ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России», Нижний Новгород, Россия (603005, Нижний Новгород, пл.Минина и Пожарского, 10/1), e-mail kassandra@mail.ru

В статье отражено применение метода инфракрасной спектроскопии при ранней диагностике кариеса. Проведено собственное исследование параметров инфракрасных спектров ротовой жидкости в норме и при кариесе. Представлены данные собственного исследования ротовой жидкости. Установлено, что при кариесе в дентине уменьшается содержание фосфатов и увеличивается содержание карбонатов, ухудшается структура гидроксиапатита, уменьшается концентрации ионов кальция и фосфора. Установлено снижение белковой составляющей дентина по сравнению с фосфатами и карбонатами. Подчеркнуто значение применения данного метода для диагностики кариеса. Сделан вывод о целесообразности применения метода инфракрасной спектроскопии при ранней диагностике кариеса в дентине у пациентов группы сравнения.

Ключевые слова: эмаль зуба, дентин зуба, гидроксиапатит, инфракрасная спектроскопия, диагностика, кариес

INFRARED SPECTROSCOPY AS THE METHOD OF EARLY DIAGNOSTICS OF DENTAL CARIES

Kazarina L.N.¹, Vdovina L.V.¹, Runova O.A.¹

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation (603005, Nizhny Novgorod, Minin and Pozharsky Square, 10/1), e-mail: kassandra@mail.ru

The article reflects the application of the method of infrared spectroscopy for the early diagnostics of dental caries. A proper study of the parameters of the infrared spectra of oral liquid in normal and caries. The dates of individual research of oral liquid are showed. During caries decreases phosphate and carbonate content increases in dental dentin, deteriorating structure of hydroxyapatite, decreases the concentration of ions of calcium and phosphorus. A decrease of the protein component dentine compared with phosphates and carbonates. The significance of this method for the diagnosis of caries. The conclusion about the appropriateness of the method of infrared spectroscopy for the early detection of caries in the dentine in patients comparison group.

Keywords: dental enamel, dental dentin, hydroxyapatite, infrared spectroscopy, diagnostic test, caries

Кариес зубов является узловой проблемой стоматологии, весьма интересной в теоретическом и исключительно важной в практическом отношении. В экспериментальной и клинической медицине возрос интерес к новым методам диагностики, лечения и профилактики различных заболеваний, что, в частности, обусловлено появлением многочисленных электронных приборов, позволяющих проводить качественное и количественное исследование биологических жидкостей и тканей на уровне нанотехнологий, сделавших возможным выявление механизмов молекулярных превращений, которые вызывают патологические изменения в организме человека. Одним из наиболее перспективных является метод инфракрасной спектроскопии.

Инфракрасная спектроскопия (ИКС) – раздел молекулярной оптической спектроскопии, изучающей спектры поглощения и отражения электромагнитного излучения в ИК-области. Метод ИК-спектроскопии позволяет осуществлять раннюю диагностику кариеса у

пациентов. Этот метод может быть использован в стоматологической практике для исследования состояния ротовой жидкости с целью выявления кариеса, как на начальных, так и на поздних стадиях развития, объективизации диагноза, планирования объема стоматологического вмешательства и последующей оценки эффективности лечения. Нормальное функционирование эмали поддерживается за счет динамического равновесия деминерализации и реминерализации. При возникновении условий для нарушения этого равновесия происходит превалирование процесса деминерализации [1, 4, 10]. Согласно современным представлениям о причинах возникновения и развития кариозного процесса, именно деминерализация эмали лежит в его основе [5, 6, 7, 8]. Однако, наряду с процессами вымывания минеральных веществ из очага поражения, происходит и их поступление из ротовой жидкости. Установлено также, что выход минеральных веществ и их поступление в эмаль способствуют поддержанию постоянства состава эмали [8].

При изучении кариозного процесса в аспекте механизма его возникновения, первостепенное значение имеет информация о строении эмали зуба, поскольку в большей степени эмаль определяет устойчивость зуба к кариесу [9]. Строение дентина и цемента во многом сходно, так как эти ткани имеют одно онтогенетическое происхождение. Статистически достоверных различий между процессами, происходящими при кариесе в дентине и цементе зуба, не выявлено [12]. Это позволяет нам рассматривать процессы, происходящие в дентине и цементе зуба при кариесе в одной группе.

Зрелая эмаль зубов состоит из минеральной (95%), органической (1,2%) составляющих и воды (3,8%). Минеральную основу эмали составляют кристаллы апатитов. Кроме гидроксиапатита (75%), в эмали содержатся карбонапатит (19%), хлорапатит (4,4%), фторапатит (0,66%). В составе химических неорганических соединений кальция составляет 37%, а фосфор — 17% [3]. Состав апатитов минерализованных тканей как в норме, так и при патологии может колебаться в весьма значительных пределах. Оптимальный состав гидроксиапатита соответствует формуле $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ с молярным отношением Ca/P равным 1,67 [5, 6]. В природе встречаются гидроксиапатиты с этим соотношением от 1,33 до 2,0. Это является следствием наличия вакантных мест в кристалле гидроксиапатита и способностью к замещению атомов и ионов внутри кристалла при потере или поступлении ионов извне. Именно эта особенность определяет вариабельность строения кристалла гидроксиапатита. Дентин, по своему объему и массе, составляет основу зуба. Основу неорганического вещества составляет гидроксиапатит (60-66%), фторапатит (1%), карбонат магния (3-4%), карбонат кальция (3%) и в небольшом количестве фторид кальция [2]. Изучая химический состав зубов методом спектрографического анализа, многие авторы обнаружили в зубах человека ряд микроэлементов: Ni, Ti, Co, Sr, Pb, Al, Zn, Cu, Mn, Mg и другие [2, 5, 6,

7, 8]. Химический состав зубных тканей зависит от состояния обменных процессов в организме и тесно связан с теми биохимическими реакциями, которые в нем происходят [7].

При кариесе в стадии белого пятна общее содержание белковых компонентов органического матрикса эмали увеличивается почти в два раза. Повышение содержания белка происходит за счет увеличения фракции растворимого белка и высокомолекулярных пептидов [6]. В пигментированном пятне общее содержание белка остаётся на том же уровне, но уменьшается количество водорастворимого белка, фракция свободных аминокислот увеличивается в восемь раз по сравнению с интактной эмалью и в 2,5 раза выше, чем в белом кариозном пятне. Неорганический фосфор снижен в белом кариозном пятне на 73%; содержание углеводов в органическом веществе по сравнению с интактной эмалью возрастает в 12 раз, содержание липидов снижается [6]. В поверхности эмали белого кариозного пятна содержится в 2—3 раза больше фтора, чем в других участках кариозной эмали. В кариозной эмали определяется меньшее количество азота, чем в белке интактной эмали, большее число аминокислот и в большем количестве. По данным [8, 9] содержание кальция в эмали при кариесе снижается в 4 раза и достигает 10,52%, при норме – 42,21 %, фосфора в 2 раза с 20% до 10%.

При кариесе изменения дентина начинаются с нарушения структурной целостности вследствие деминерализации его минеральной составляющей, дезинтеграции и последующего разрушения органической матрицы. Значительно увеличивается доля органической составляющей (на 40%), и уменьшается доля минерального компонента (до 53%) [5, 6]. В свою очередь, в зубах, пораженных кариесом, на видимо неизменных участках эмали и дентина значительных изменений химического состава не происходит [5, 6, 7, 8]. Пусковым механизмом формирования кариозной полости является деминерализация эмали, выражающаяся в изменениях структуры кристалла гидроксиапатита. Апатиты эмали характеризуются наличием включений - карбонатных групп и ряда химических элементов в следовых количествах (натрия, магния, калия, хлорида, цинка, фторида); кроме того, в решетке кристалла нередко сохраняются вакантные места. Вакансии и включения и существенно изменяют плотность кристалла биологического апатита и влияют на его растворимость. Выход ионов из апатита в окружающую среду начинается при снижении до критического уровня в ней количества свободных ионов, составляющих апатиты. Растворяясь, апатит распадается на отдельные ионы; при постепенном снижении pH раньше других растворяются апатиты, содержащие карбонаты, магний, натрий и цитраты, позже – апатиты с фторидами. Катионный состав тканей подвергается постоянным изменениям в ходе жизнедеятельности зуба, в связи со способностью кристаллов гидроксиапатита к

изоморфным и гетероморфным изменениям. Кроме того, нельзя исключать и возрастные изменения, происходящие в зубе, накопление одних веществ и потеря других [3].

Анализ имеющихся данных обнажает необходимость поиска других веществ, определяющих строение тканей зуба в норме и при патологии. Согласно знаниям об особенностях химического строения кристалла гидроксиапатита, именно анионы играют значительную роль в поддержании строения и функции всего кристалла. Так как именно они определяют форму, заряд, полярность кристалла, что опосредованно свидетельствует о кариесрезистентности кристалла. Таким образом, для диагностики ранних форм кариеса основное значение несет изменение отношений концентраций анионов между собой и определение их качественного и количественного соотношения. ИКС позволяет с меньшей затратой усилий и времени достичь достоверных результатов, что несомненно будет способствовать улучшению степени диагностики, возможности диагностировать ранние изменения в предклиническом периоде с тем, чтобы минимизировать последствия для организма. Известно, что наблюдение за содержанием анионов более информативно, так как может быть зафиксировано на современных приборах - спектрофотометрах, а катионы в рамановском и инфракрасном спектрах не отображаются и не поглощаются, следовательно, изменение их концентраций не может помешать наблюдениям за анионами.

На спектрах фиксируются колебания структурных молекулярных и ионных единиц неорганической составляющей – карбонат-гидроксиапатита, таких как фосфат-, карбонат- и гидрофосфат-ионы, а также многочисленные колебания, связанные с протеиновой матрицей. ИКС позволяет также зафиксировать качественные и количественные изменения концентраций белковой составляющей тканей. В настоящее время спектрофотометрические методы (инфракрасная спектрометрия, рамановская спектроскопия) являются основными в изучении структуры и дефектообразования органоминеральных соединений, к которым относятся ткани зуба. Кроме того, простота подготовки проб и сниженные требования к образцу тканей делают метод ИКС перспективным в данной области. Нами было принято решение исследовать ткани зуба на предмет изменения соотношения минеральной и органической составляющей в норме и при патологии. Это позволило выбрать три основных параметра для оценки изменения тканей зуба: отношение полос поглощения карбонатов к фосфатам, карбонатов к органической матрице, фосфатов к органической матрице. Относительное изменение этих параметров будет свидетельствовать об изменениях, происходящих в тканях зуба.

Цель исследования: изучить применение инфракрасной спектроскопии для ранней диагностики кариеса.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования послужили 40 удаленных человеческих зубов. Материал был получен после экстракции зубов по ортодонтическим и ортопедическим показаниям. Материал был разделен на группы: контрольная группа - интактные зубы (20 зубов), группа исследования - зубы, пораженные кариесом дентина (20 зубов). После экстракции зубы обрабатывались в проточной воде, очищались от налета, высушивались фильтровальной бумагой. После этого приготавливался порошок из тканей зуба посредством послойного распила турбинным наконечником с водяным охлаждением. Материал собирался в чашки Петри, высушивался естественным образом. Из каждого зуба изготавливалось два образца твердых тканей: эмаль и дентин. После этого в ступке приготавливалась мелкодисперсная смесь из порошка и вазелинового масла до необходимой концентрации. Исследование проводили с помощью метода ИК-спектроскопии биологических тканей и жидкостей (2). Также исследованию подвергалась ротовая жидкость. Были сформированы две группы: группа контроля – группа пациентов с интактными зубными рядами (20 человек), группа сравнения – пациенты с различными формами кариеса зубов (20 человек) (диагноз был установлен клинически). Забор материала проводили путем сбора нестимулированной слюны в пробирку в количестве 2-3 мл утром натощак. Для исследования ротовую жидкость высушивали в течение двух дней при комнатной температуре. Образец готовили в виде суспензии в вазелиновом масле. Регистрацию спектров поглощения производили на спектрофотометре «Carl Zeiss Jena SPECORD IR-75»(Германия), в диапазоне волновых чисел 1700-400 см⁻¹. В качестве расчётных ИК-спектроскопических величин найдены 3 параметра (П₁ (1070/1017), П₂ (1070/1665), П₃ (1017/1665)), являющиеся частными от деления высот пиков аналитических полос поглощения фосфатов, карбонатов и белков исследуемых материалов друг на друга [3, 8]. Полученные данные были обработаны на IBM PC/AT с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6.0 (Windows XP) и Microsoft Excel с использованием методов одномерной статистики.

Результаты исследования В ходе исследования рассчитаны параметры ИК-спектров ротовой жидкости пациентов группы контроля и группы сравнения. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Изменение параметров ИК-спектров ротовой жидкости при кариозном процессе

Параметры	П ₁ (1070/1017)	П ₂ (1070/1665)	П ₃ (1017/1665)
Группа контроля	1,22 ± 0,12	0,57 ± 0,09	0,52 ± 0,02
Группа сравнения	1,64 ± 0,14*	0,78 ± 0,11*	0,60 ± 0,03*

* - различия достоверны по сравнению с группой контроля ($p \leq 0,05$).

Как видно из табл.1. при кариесе достоверно увеличиваются значения параметров Π_1 , Π_2 , Π_3 ИК-спектров ротовой жидкости на 34,4%, 36,8% и 15,4% ($p \leq 0,05$) соответственно. В работах [13, 14] показано, что полосы поглощения 1070 см^{-1} соответствует колебаниям карбонат-иона, 1017 см^{-1} - колебаниям незамещенного фосфат-иона, 1665 см^{-1} – колебаниям белка (органической составляющей тканей зуба). Нами было отмечено увеличение значений параметров Π_1 ИК-спектров слюны пациентов группы сравнения, т.е. частное от деления высоты пика поглощения 1070 см^{-1} на высоту пика поглощения 1017 см^{-1} увеличивается, а значит, в ротовой жидкости пациентов группы сравнения уменьшается содержание фосфатов и увеличивается содержание карбонатов. Отмечено увеличение значений параметров Π_2 и Π_3 ИК-спектров слюны пациентов группы сравнения, т.е. отмечается снижение белковой составляющей ротовой жидкости по сравнению с фосфатами и карбонатами, где в качестве спектроскопических параметров используются иные характеристические частоты поглощения белковой составляющей – $960, 860 \text{ см}^{-1}$, но, несмотря на это, выявлена аналогичная динамика изменения соотношения минеральная фаза – органическая матрица. Полученные данные свидетельствуют о том, что возникновение кариеса в зубе приводит к изменению соотношения фосфатов, карбонатов и белков. Также были исследованы параметры ИК-спектров тканей зуба (дентина и эмали) пациентов группы контроля и группы сравнения. Результаты представлены в таблице 2 и 3.

Таблица 2

Изменение параметров ИК-спектров дентина зуба при кариесе

Параметры	Π_1 (1070/1017)	Π_2 (1070/1665)	Π_3 (1017/1665)
Группа контроля (дентин)	$0,83 \pm 0,02$	$2,85 \pm 0,25$	$3,38 \pm 0,12$
Группа сравнения (дентин)	$0,88 \pm 0,02^*$	$4,11 \pm 0,34^*$	$4,46 \pm 0,14^*$

* - различия достоверны по сравнению с группой контроля ($p \leq 0,05$).

Из табл.2. видно, что при заболевании кариесом достоверно увеличиваются значения параметров Π_1 , Π_2 , Π_3 ИК-спектров дентина зуба ($p \leq 0,05$) на 6,02%, 44,2% и 32%. Таким образом, в дентине у пациентов группы сравнения уменьшается содержание фосфатов и увеличивается содержание карбонатов. Отмечено уменьшение структурной упорядоченности, кристалличности гидроксиапатита, уменьшение концентрации ионов кальция и фосфора, а также выявлены обратные взаимосвязи между содержанием фосфат-ионов и карбонат-ионов. Установлено снижение белковой составляющей дентина по сравнению с фосфатами и карбонатами. Найдена положительная корреляция ($r=1$) между

изменением параметров ИК-спектров ротовой жидкости и дентина зуба. В табл.3. показано изменение параметров ИК-спектров эмали зуба.

Таблица 3

Изменение параметров ИК-спектров эмали зуба при кариозном процессе

Параметры	П ₁ (1070/1017)	П ₂ (1070/1665)	П ₃ (1017/1665)
Группа контроля (эмаль)	0,74 ± 0,03	9,66 ± 0,21	4,70 ± 0,16
Группа сравнения (эмаль)	0,80 ± 0,02*	7,33 ± 0,17*	3,92 ± 0,11*

* - различия достоверны по сравнению с группой контроля ($p \leq 0,05$).

При заболевании кариесом достоверно увеличивается значение параметра П₁, на 8,02% ($p \leq 0,05$), а параметры П₂, П₃ ИК-спектров дентина зуба снижаются ($p \leq 0,05$) на 31,8% и 20% (соответственно). В эмали зуба пациентов группы сравнения уменьшается содержание фосфатов и увеличивается содержание карбонатов, и увеличивается содержание белковой составляющей по сравнению с минеральной частью. Таким образом, найдена положительная корреляция ($r=1$) между изменением параметра П₁ ИК-спектров ротовой жидкости и эмали зуба, и отрицательная корреляция ($r= -1$) между изменением параметров П₂ и П₃ ИК-спектров ротовой жидкости и эмали зуба.

Список литературы

1. Гордеев А.С. Инфракрасная спектроскопия биологических жидкостей и тканей // Современные технологии в медицине. - 2010. - №1. - С. 84-98.
2. Ипполитов Ю.А. Исследования методом ИК-спектроскопии с использованием синхротронного излучения интактных и пораженных кариозным процессом эмали и дентина человеческого зуба / Ю.А. Ипполитов, А.Н. Лукин, П.В. Середин. II Вестник новых медицинских технологий. - 2012. - Т. XIX, № 2. - С. 343-346.
3. Киселева Д.В., Адамович Н.Н., Вотяков С.Л., Мандра Ю.В. Особенности микроэлементного состава зубных тканей человека по данным ИСП масс спектрометрии с лазерной абляцией / Ежегодник – 2012. Труды института геологии и геохимии им. акад. А.Н. Заварицкого УрО РАН. Вып. 160. Екатеринбург: ИГГ УрО РАН. 2013. С. 334-337.
4. Лидман Г.Ю. Лазерно-индуцированная флюоресценция и рентгенспектральный анализ кариозного процесса твердых тканей зуба / Г.Ю. Лидман, П.М. Ларионов, С.В. Савченко, Е.Л. Лушникова, А.М. Оришич, И.А. Рожин, А.Н. Малов, Н.А. Маслов, А.Т. Титов, И.Г. Косицина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины -2010.-том 148. -№3.- С. 350-353.

5. Павлова Т.В., Бавыкина Т.Ю. Сравнительная оценка минерального состава и ультрамикроструктуры тканей зуба в норме и при кариесе // Современные наукоемкие технологии. – 2009. – № 12 – С. 15-18.
6. Пешкова Э.К., Павлова Т.В. Морфофункциональные аспекты кариозного процесса // Современные наукоемкие технологии. – 2014. – № 2 . – стр. 73-76.
7. Середин П.В. Исследования интактной, а также пораженной кариозным процессом эмали человеческого зуба методом ИК-спектроскопии с использованием синхронного излучения / П.В. Середин, А.Н. Лукин, Ю.А. Ипполитов // Научные ведомости БелГУ. – 2011. – № 1. – С. 23-27.
8. Beniash E, Simmer JP, Margolis HC. (2005). The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. J Struct Biol 149:182-190.
9. Krutchkoff, D.J.; Rowe, N.H., Mark, H.B., JR: Infrared Internal Reflection Spectroscopy of Human Enamel Surface, Arch Oral Biol 16:161-175, 1971.
10. Rey C., Combes C., Drouet C., Sfihi H., Barroug A. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. Materials Science Engineering 2007; 27: 2: 198-205. Y.Yamakoshi, 2001.

Рецензенты:

Косюга С.Ю., д.м.н., профессор, зав. кафедрой стоматологии детского возраста ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России», г. Нижний Новгород;

Гажва С.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой стоматологии ФПКВ ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России», г. Нижний Новгород.