



**ВИЗУАЛИЗАЦИЯ НАЧАЛЬНОГО И КЛИНИЧЕСКИ НЕ РЕГИСТРИРУЕМОГО ФИССУРНОГО
КАРИЕСА ЭМАЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННОЙ КОНТРАСТНОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ
И МИКРОРАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ**

Ю.А. ИППОЛИТОВ*, П.В. СЕРЕДИН**, Д.Л. ГОЛОЩАПОВ**, И.Ю. ИППОЛИТОВ*,
Е.А. ЛЕЩЕВА*, Ю.С. РАССКАЗОВА*, Е.О. АЛЕШИНА*, С.А. МИХАЙЛОВА*

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ул. Студенческая, д. 10, г. Воронеж, 394036, Россия

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
Университетская площадь, д.1, г. Воронеж, 394036, Россия

Аннотация. Цель исследования – визуализация начальных форм клинически не регистрируемого фиссурного кариеса эмали с помощью комплексной оценки данных лазерно-индуцированной флюоресценции и микрорамановской микроспектроскопии. **Материалы и методы исследования.** Для проведения исследования были изучены шлифы удаленных зубов, которые были удалены у пациентов в возрасте 18-30 лет по ортодонтическим показаниям. Для получения шлифов зубов использовали низкоскоростной наконечник с алмазным диском и водяным охлаждением (200 об / мин). Удаленные зубы были распилены так, что сечение проходило через область фиссур. Подготовленные шлифы зубов анализировали с использованием установки лазерно-индуцированной флюоресценции и бесконтактной микрорамановской спектроскопии. **Результаты и их обсуждения.** Установлено с помощью лазерно-индуцированной флюоресценции отличие здоровой эмали от пораженной бактериальной инвазией. Включение в диагностическую схему дополнительно микрорамановской спектроскопии позволяет достоверно идентифицировать, как превращения в органической и минеральной составляющей зубной эмали, так и распространение бактериальной микрофлоры в поражённой области, что дает возможность для получения точного определения границ микрозоны зубной эмали, измененных в следствие начального кариеса. **Выводы.** Анализ результатов исследования позволил установить соответствие между участками на флюоресцентных изображениях образов шлифа зуба с изменениями в минеральной и органической составляющих, сопровождаемыми распространением бактериальной микрофлоры. Это в итоге может предопределить последующий персонифицированный подход к инвазивному лечению фиссурного кариеса зуба на клиническом приеме, когда необходимо использование лазерно-индуцированной контрастной визуализации для контроля твердых тканей зуба с целью эффективной санации отпрепарированной кариозной полости.

Ключевые слова. лазерно-индуцированная флюоресценция, микрорамановская спектроскопия, фиссурный кариес, пристеночная деминерализация и дезорганизация

**VISUALIZATION OF INITIAL AND CLINICALLY UNRECORDED FISSURE ENAMEL CARIES
USING LASER-INDUCED CONTRAST FLUORESCENCE AND MICRO RAMAN SPECTROSCOPY
IN THE LABORATORY**

Yu.A. IPPOLITOV*, P.V. SEREDIN**, D.L. GOLOSHCHAPOV**, I.Yu. IPPOLITOV*,
E.A. LESHICHEVA*, Yu.S. RASSKAZOVA*, E.O. ALESHINA*, S.A. MIKHAILOVA*

*Voronezh State Medical University of N.N. Burdenko, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Studencheskaya str., 10, Voronezh, 394036, Russia

**Voronezh State University of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation,
Universitetskaya square, 1, Voronezh, 394036, Russia

Abstract. Purpose was to visualize the initial forms of the clinically unrecorded fissure enamel caries using complex evaluation of laser-induced fluorescence and micro-Raman microspectroscopy data. **Materials and methods of the research.** To carry out the research, we studied the section of teeth which had been extracted from patients aged 18-30 due to orthodontic indications. To receive the teeth sections, a low-speed point (200

rpm) with a diamond blade and water-cooling system was used. The extracted teeth were sawed up, so that the section passed the fissure part. The prepared teeth sections were analyzed using the laser-induced fluorescence and contact-free micro-Raman spectroscopy device. **Results and their discussion.** Using laser-induced fluorescence, we were able to distinguish the healthy enamel from the one damaged by bacterial invasion. Extra inclusion of micro-Raman spectroscopy into the diagnostic scheme enables us to significantly identify both transformations in the organic and the mineral components of the tooth enamel and the spreading of bacterial microflora in the damaged part, which makes it possible to precisely distinguish the microzone borderlines of the tooth enamel which had been changed due to the initial caries. **Conclusions.** The study results analysis enabled us to establish the correlation between the areas on the fluorescent tooth section images and the changes in the mineral and organic components followed by bacterial microflora spreading. It can eventually predetermine the subsequent personalized approach to fissure caries invasive treatment at a clinical appointment where laser-induced contrast visualization is necessary to control the solid tooth tissues in order to effectively rehabilitate the dissected carious cavity.

Key words. laser-induced fluorescence, micro-Raman spectroscopy, fissure caries, parietal demineralization and disorganization.

Актуальность. При оперативном лечении фиссурного кариеса зуба практикуется минимальное инвазивное вмешательство [6]. Основа такого лечения направлена на удаление пораженных кариесом тканей, но при этом с максимальным сохранением той области ткани, которая не подверглась кариозной атаке и пристеночной деминерализации. Визуальные осмотры в сочетании с рентгенограммами являются в клинической практике ключом к диагностике фиссурного кариеса, однако для оказания комплексной и своевременной стоматологической помощи пациенту этого уже недостаточно. Появление новых методов диагностики таких как конусно-лучевая компьютерная томография, позволили повысить качество обследования твердых тканей зуба [1].

И хотя современные достижения в области терапевтической стоматологии показывают некоторый обнадеживающий прогресс в данной области, задачей номер один является прецизионная и ранняя диагностика областей кариозного поражения. Пространственно-спектральная визуализация с высоким разрешением областей развития кариеса в микро, и наномасштабе может стать ключом к новым принципам профилактики и лечения кариеса [5].

Для обнаружения кариозных поражений видимой гладкой поверхности эмали на начальном этапе возможно применить световую и лазерную флуоресценцию или аутофлуоресценцию. Это исследование основано на применении лазерного излучения для сканирования зубной ткани и оценки различия в плотности, структуре или химическом составе биологической ткани [2].

Для этих же целей может быть использована рамановская спектроскопия, позволяющая оценить химический состав твердых тканей зуба [7, 4].

Однако при определении границ микрозоны зубной ткани, измененной в следствие начального кариеса, было бы хорошо оценить область бактериальной инвазии твердых тканей зуба. Поэтому визуализация начальных форм кариеса должны быть основана на комплексной оценке данных лазерно-индуцированной флуоресценции и рамановской микроспектроскопии [3].

Цель исследования – визуализация начальных форм клинически не регистрируемого фиссурного кариеса эмали с помощью комплексной оценки данных лазерно-индуцированной флуоресценции и микро-рамановской микроспектроскопии.

Материалы и методы исследования. В исследовании использованы шлифы удаленных зубов, которые были получены из зубов пациентов в возрасте 18-30 лет по ортодонтическим показаниям. Пятнадцать удаленных зубов с различной степенью поражения фиссурным кариесом были обследованы с соблюдением норм и правил Хельсинской конвенции и в соответствии с этическим протоколом. Удаленные зубы были помещены в физиологический раствор и хранились при температуре +3°C.

Для проведения исследования были подготовлены шлифы зубов. Для этого с использованием низкоскоростного (200 об / мин) алмазного диска с водяным охлаждением [9] образцы зубов были распилены так, что сечение проходило через область фиссур. На рис. 1 представлено изображение образца шлифа удаленного зуба при увеличении в 5 крат.

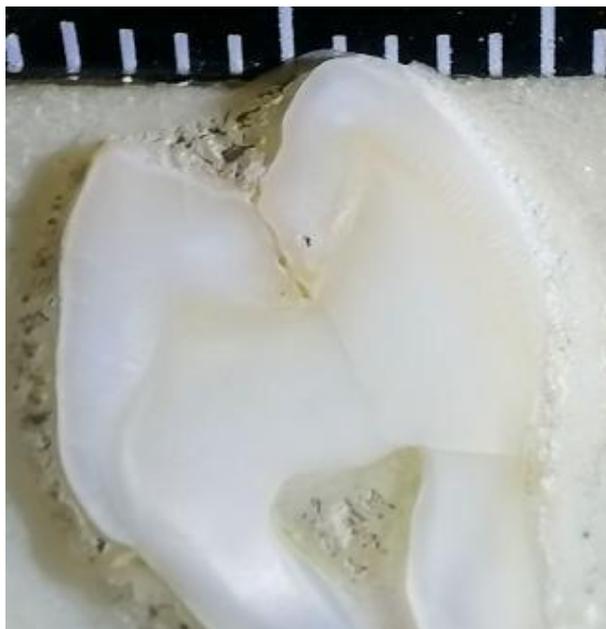


Рис. 1. Оптическое изображение образца шлифа зуба человека, исследованного в работе, увеличении в 5 крат

Подготовленные шлифы зубов анализировали с использованием установки лазерно-индуцированной флюоресценции и бесконтактной микрорамановской спектроскопии.

Установка для получения контрастной визуализации с использованием лазера была применена для визуализации изменений, вызванных кариесом. Участок шлифа зуба освещался лазерным лучом с длиной волны 532 нм. Режекторный фильтр 532 (*TECHSPEC, Edmund Optics, NJ 08007, США*) позволял получать после фильтрации флуоресцентное изображение шлифа зуба.

Рамановские спектры и спектры люминесценции были получены на раман-люминесцентном микроскопе РамМикс М532 (*EnSpectr, Россия*) на базе оптического микроскопа *Olympus (Shinjuku, Токио, Япония)*. Площадь анализируемой микрообласти составила 2x2 мкм. Обработка спектральных данных, коррекция базовой линии выполнялась с помощью программы *Origin 8*.

Результаты и их обсуждение. На рис. 2 представлено оптическое контрастное изображение шлифов зубов с фиссурным кариесом, полученное с использованием методики лазерно-индуцированной флюоресценции.

Анализ оптических изображений шлифов зубов, полученных с увеличением до 5 крат, достоверно показал, что обнаружить начальный кариозный процесс пристеночной деминерализации в фиссуре зуба, даже на зубном шлифе, проходящем через эту систему фиссур, визуально не представлялось возможным.

Сравнение оптических изображений образцов и их флюоресценции показывает, что интенсивность и цвет свечения здоровой и пораженной кариесом ткани различны (рис. 2, 3), где очаги деминерализации имели темные области.



Рис. 2. Оптическое изображение шлифа зуба с использованием методики лазерно-индуцированной флюоресценции в отраженном сигнале, увеличение в 5 крат



Рис. 3. Оптическое изображение образца шлифа зуба, полученное с использованием методики лазерно-индуцированной флюоресценции с использованием *notch*-фильтра, увеличение в 5 крат

Следует отметить, что контраст изображений, полученных в отраженном сигнале является суммой вкладов автофлюоресценции здоровой и кариозной зубной ткани и лазерно-индуцированной эмиссии пораженной ткани.

Изображение, полученное на основе лазерно-индуцированной флюоресценции с применением *notch*-фильтра показало, что процесс развития кариеса может быть прекрасно визуализирован. Комплексный анализ рис. 3 показывает, что интенсивность выделенной *notch*-фильтром флюоресценции значительно выше в тех областях, которые окружают деструктивную зубную ткань. Хорошо известно, что при возбуждении лазерно-индуцированной флюоресценции с использованием источника с длиной волны 532 нм, могут быть возбуждены эмиссионные полосы порфиринов – продуктов жизнедеятельности микроорганизмов вызывающих кариес. При этом детектируемое интенсивное свечение в красной области спектра свидетельствует не только о возрастании доли микроорганизмов области контраста, но и о воз-

можных процессах дезорганизации в зубной ткани, т.е. об изменениях, происходящих уже в органической составляющей эмали исследуемых зубов.

Следует отметить, что ввиду малого размера микрообластей начального кариозного поражения пристеночной деминерализации эмали клинически распознать визуально фактически невозможно. Поэтому для прецизионного и наиболее раннего обнаружения развития кариозного процесса необходимо привлечение бесконтактной спектроскопии комбинационного рассеяния, которая может быть эффективно использована для дифференциации микроскопических зон кариозного поражения эмали с высоким пространственным разрешением.

На рис. 4 при увеличении в 200 крат (рис. 4 а,б,в) приведено изображение шлифа зуба содержащего область инфицированной фиссуры с указанием точек микрорамановского сканирования.

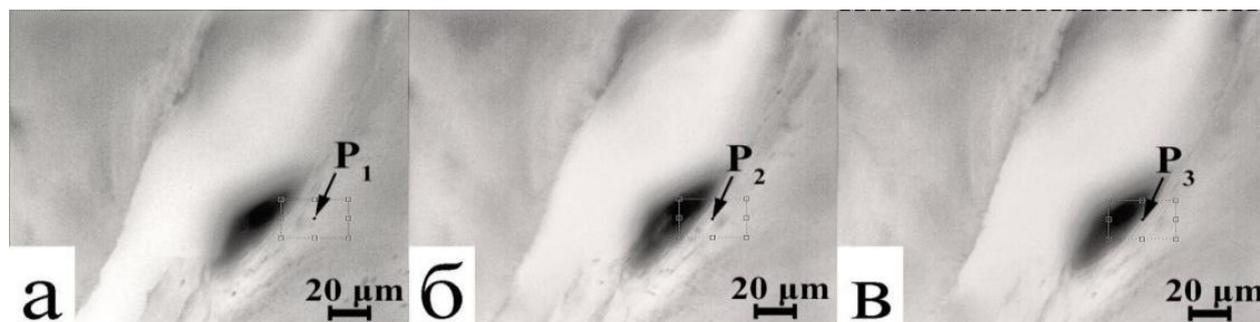


Рис. 4. Оптические изображения участков фиссуры зуба с начальным кариесом с указанием точек P_1, P_2, P_3 микрорамановского сканирования (увеличение 200 крат).

На рис. 5 приведены типичные спектры микрорамановского рассеяния, полученные из области здоровой эмали и эмали прилежащей к инфицированной фиссуре.

Анализ результатов показывает, что наиболее интенсивная мода в рамановском спектре здоровой эмали является характеристическим колебанием фосфат-иона $\nu_1 PO_4^{3-}$ карбонатзамещенного гидроксипатита кальция – основы минеральной составляющей здоровой зубной ткани. Так в спектре здоровой эмали мода $\nu_1 PO_4^{2-}$ локализована около 959.7 cm^{-1} , что совпадает с литературными данными [7]. Этот результат отражает кристаллохимические характеристики карбонатзамещенного апатита, а в частности факт характерного атомарного Ca/P соотношения и содержания карбонат аниона CO_3^{2-} в кристаллической решетке апатита здоровой эмали (замещение B-типа [8]).

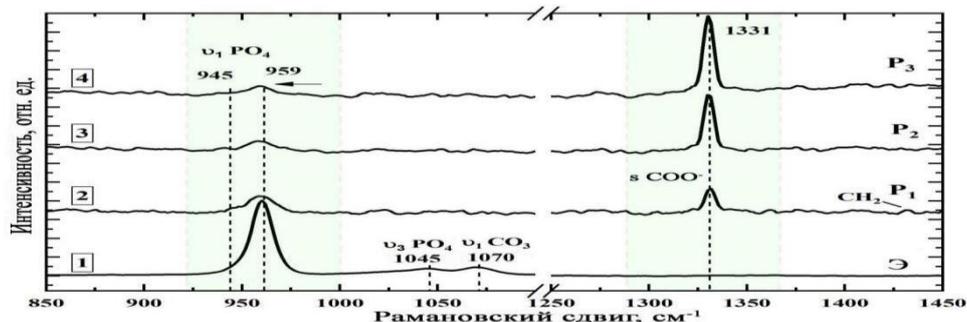


Рис. 5. Результаты микрорамановской спектроскопии, полученные для различных микрообластей шлифа зуба с начальным фиссурным кариесом в точках P_1, P_2, P_3 и здоровой эмали Э.

С использованием автоматизированного моторизованного 2-х осевого столика было выполнено рамановское микросканирование вблизи инфицированной фиссуры зуба по мере удаления от границы пристеночной деминерализации. Это позволило обнаружить границы зоны в эмали, для которой характерно протекание процессов пристеночной деминерализации. Эти участки могут быть обнаружены по изменению положения, интенсивности и формы рамановской полосы PO_4^{3-} в области $945-959 \text{ cm}^{-1}$, относительно ее характеристик в спектре здоровой эмали (рис. 5).

Хорошо видно, что дезорганизация в структуре апатита эмали зуба, возникающая в следствие развития кариозного процесса, приводит не только к уширению полосы фосфат-иона, но и к снижению ее интенсивности по мере приближения к границе кариозной микрополости пристеночной деминерализа-

ции (рис 4, а,б,в) со стороны здоровой ткани. Можно заметить, что вблизи кариозной деминерализации и дезорганизации активным становится дополнительный максимум в области 945 см^{-1} , который может быть приписан к переходным фосфатам, с появлением аморфизированной апатитоподобной структуры.

По мере приближения к области эмали, измененной под действием пристеночной деминерализации, в рамановских спектрах идентифицируется еще один характеристический максимум, расположенный около 1330 см^{-1} , который связан с присутствием бактериальной микрофлоры.

Результаты нашей работы показали, что комбинация данных, полученных на основе лазерно-индуцированной контрастной визуализации и микро-рамановской спектрографии, позволяет однозначно не только детектировать начальные стадии кариеса в эмали, но и выделить зоны бактериального поражения. Использование нескольких независимых параметров, полученных на основе комбинирования и одновременного анализа твердых тканей зуба различными методами, помогут уменьшить количество пропущенных поражений, позволят однозначно установить точный диагноз начального поражения эмали кариесом.

Выводы:

1. Анализ результатов исследования образцов шлифов зубов с начальной степенью фиссурного кариеса при помощи лазерно-индуцированной контрастной визуализацией с *notch* фильтром и микро-рамановской спектроскопии позволил установить соответствие между участками на флюоресцентных изображениях образов шлифа зуба с изменениями в минеральной и органической составляющих, сопровождаемыми распространением бактериальной микрофлоры.

2. Рамановское сканирование с пространственным разрешением на уровне единиц микрометров, позволило определить локальные вариации в структуре эмали, связанные с развитием кариозного процесса и опосредованные не только изменениями в кристаллической структуре апатита, но и проникновением в ткань продуктов жизнедеятельности бактериальной микрофлоры.

3. При инвазивном лечении фиссурного кариеса зуба на клиническом приеме необходимо использование лазерно-индуцированной контрастной визуализации для контроля твердых тканей зуба с целью эффективной санации отпрепарированной кариозной полости.

Финансирование: Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда, номер гранта 23-15-00060.

Литература

1. Ипполитов Ю.А., Гавриш А.В., Ростовцев В.В. Дифференциальная диагностика первичной потери минерального компонента эмали зуба с использованием конусно-лучевой компьютерной томографии // Прикладные информационные аспекты медицины. 2020. Том 23, № 2. С. 36–42.
2. Akarslan Z. Introductory Chapter: Diagnosis of Dental Caries. Dental Caries - Diagnosis, Prevention and Management, 2018.
3. Al-Obaidi R., Saleh H., Collart-Dutilleul P.-Y., Jacquot B., Tassery H., Cuisinier F.J.G., Gergely C., Cloitre T. Relationship between Changes in Chemical Composition of Enamel Subsurface Lesions and the Emitted Nonlinear Optical Signals An in Vitro Study. // Caries Research. 2020. Vol. 54, № 2. P. 144–153.
4. Alturki M., Koller G., Warburton F., Almhöjd U., Banerjee A. Biochemical Characterisation of Carious Dentine Zones Using Raman Spectroscopy // Journal of Dentistry. 2021. Vol. 105. P. 103558.
5. Besnard C., Harper R.A., Moxham T.E.J., James J.D., Storm M., Salvati E., Landini G., Shelton R. M., Korsunsky A.M. 3D Analysis of Enamel Demineralisation in Human Dental Caries Using High-Resolution, Large Field of View Synchrotron X-Ray Micro-Computed Tomography // Materials Today Communications, 2021. Vol. 27. P. 102418.
6. Bomfim D.I., Rahim N.M., Austin R.S. Biomechanical Planning for Minimally Invasive Indirect Restorations. British Dental Journal, 2020. Vol. 229, № 7, P. 425–429.
7. Buchwald T., Okulus Z., Szybowicz M. Raman Spectroscopy as a Tool of Early Dental Caries Detection—New Insights // Journal of Raman Spectroscopy. 2017. Vol. 48, № 8. P. 1094–1102.
8. Goloshchapov D., Buylov N., Emelyanova A., Ippolitov I., Ippolitov Y., Kashkarov V., Khudyakov Y., Nikitkov K., Seredin P. Raman and XANES Spectroscopic Study of the Influence of Coordination Atomic and Molecular Environments in Biomimetic Composite Materials Integrated with Dental Tissue // Nanomaterials. 2021. Vol. 11, № 11. P. 3099.
9. Goloshchapov D.L., Kashkarov V.M., Ippolitov Y.A., Prutskiy T., Seredin, P.V. Early Screening of Dentin Caries Using the Methods of Micro-Raman and Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy // Results in Physics. 2018. Vol. 10. P. 346–347.

References

1. Ippolitov JuA, Gavrish AV, Rostovcev VV. Differencial'naja diagnostika pervichnoj poteri mineral'nogo komponenta jemal'ju zuba s ispol'zovaniem konusno-luchевой komp'yuternoj tomografii [Differential diagnosis of primary loss of mineral component by tooth enamel using cone-beam computed tomography]. *Prikladnye informacionnye aspekty mediciny*. 2020;23(2):36-42. Russian.
2. Akarlan Z. Introductory Chapter: Diagnosis of Dental Caries. *Dental Caries - Diagnosis, Prevention and Management*; 2018.
3. Al-Obaidi R, Saleh H, Collart-Duttilleul PY, Jacquot B, Tassery H, Cuisinier FJG, Gergely C, Cloitre T. Relationship between Changes in Chemical Composition of Enamel Subsurface Lesions and the Emitted Non-linear Optical Signals An in Vitro Study. *Caries Research*. 2020;54(2):144-53.
4. Alturki M, Koller G, Warburton F, Almhöjd U, Banerjee A. Biochemical Characterisation of Carious Dentine Zones Using Raman Spectroscopy. *Journal of Dentistry*. 2021;105:103558.
5. Besnard C, Harper RA, Moxham TEJ, James JD, Storm M, Salvati E, Landini G, Shelton RM, Korsunsky AM. 3D Analysis of Enamel Demineralisation in Human Dental Caries Using High-Resolution, Large Field of View Synchrotron X-Ray Micro-Computed Tomography. *Materials Today Communications*, 2021;27:102418.
6. Bomfim DI, Rahim NM, Austin RS. Biomechanical Planning for Minimally Invasive Indirect Restorations. *British Dental Journal*. 2020;229(7):425-9.
7. Buchwald T, Okulus Z, Szybowicz M. Raman Spectroscopy as a Tool of Early Dental Caries Detection—New Insights. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2017; 48(8):1094-102.
8. Goloshchapov D, Buylov N, Emelyanova A, Ippolitov I, Ippolitov Y, Kashkarov V, Khudyakov Y, Nikitkov K, Seredin P. Raman and XANES Spectroscopic Study of the Influence of Co-ordination Atomic and Molecular Environments in Biomimetic Composite Materials Integrated with Dental Tissue. *Nanomaterials*. 2021;11(11):3099.
9. Goloshchapov DL, Kashkarov VM, Ippolitov YA, Prutskij T, Seredin, PV. Early Screening of Dentin Caries Using the Methods of Micro-Raman and Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. *Re-sults in Physics*. 2018;10:346-7.

Библиографическая ссылка:

Ипполитов Ю.А., Середин П.В., Голошапов Д.Л., Ипполитов И.Ю., Лещева Е.А., Рассказова Ю.С., Алешина Е.О., Михайлова С.А. Визуализация начального и клинически не регистрируемого фиссурного кариеса эмали с использованием лазерно-индуцированной контрастной флуоресценции и микрорамановской спектроскопии в лабораторных условиях // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2023. №6. Публикация 1-3. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2023-6/1-3.pdf> (дата обращения: 10.11.2023). DOI: 10.24412/2075-4094-2023-6-1-3. EDN NQLLDS*

Bibliographic reference:

Ippolitov YUA, Seredin PV, Goloshchapov DL, Ippolitov IYu, Leshcheva EA, Rasskazova YuS, Aleshina EO, Mikhailova SA. Vizualizacija nachal'nogo i klinicheski ne registriruемого fissurnogo kariesa jemali s ispol'zovaniem lazerno-inducirovannoj kontrastnoj fljuorescencii i mikroramanovskoj spektroskopii v laboratornyh uslovijah [Visualization of initial and clinically unrecorded fissure enamel caries using laser-induced contrast fluorescence and micro raman spectroscopy in the laboratory]. *Journal of New Medical Technologies, e-edition*. 2023 [cited 2023 Nov 10];6 [about 7 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2023-6/1-3.pdf>. DOI: 10.24412/2075-4094-2023-6-1-3. EDN NQLLDS

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2023-6/e2023-6.pdf>

**идентификатор для научных публикаций EDN (eLIBRARY Document Number) будет активен после выгрузки полной версии журнала в eLIBRARY