

DOI: 10.15593/RZhBiomech/2018.4.05
УДК 531/534: [57+61]



**Российский
Журнал
Биомеханики**
www.biomech.ru

ОЦЕНКА МИКРОСТРУКТУРЫ И МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ ОЧАГА ИСКУССТВЕННОГО КАРИЕСА ЭМАЛИ ПО ДАННЫМ РЕНТГЕНОВСКОЙ КОМПЬЮТЕРНОЙ МИКРОТОМОГРАФИИ

**А.Д. Левицкая¹, Е.С. Сюткина¹, О.С. Гилева¹,
С.В. Галкин², А.А. Ефимов², Я.В. Савицкий²**

¹ Кафедра терапевтической стоматологии и протезирования стоматологических заболеваний Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера, Россия, 614000, Пермь, Петропавловская, 26, e-mail: anya_levitskaya@mail.ru

² Кафедра геологии нефти и газа Пермского национального исследовательского политехнического университета, Россия, 614990, Пермь, Комсомольский проспект, 29, e-mail: gnfd@pstu.ru

Аннотация. Целью настоящей работы было изучение особенностей микроструктуры и минеральной насыщенности в очаге искусственно (*in vitro*) созданной деминерализации эмали зуба (кариес эмали) методом компьютерной микротомографии. Метод микротомографии, реализуемый с помощью рентгеновской компьютерной установки *Nikon Metrology XT H 225*, обеспечил возможности аттестации макро- и микроструктуры малогабаритных образцов зубов человека *in vitro*, без нарушения целостности, особой подготовки и предварительного разрушения объектов, за относительно короткое время. Многоуровневый анализ, основанный на визуально-инструментальной (по критериям *ICDAS*), стереомикроскопической (*Olympus SZX-16*; *Olympus DP-73*; *Olympus Stream Motion v.1.8*) и микротомографической оценке зубов с искусственно (*in vitro*) созданной по оригинальной методике (патенты РФ на полезную модель №172561 и №171409 от 16.12.2016) очаговой деминерализацией эмали позволил получить объемную информацию о характере моделируемого поражения эмали, подтвердил высокую чувствительность и специфичность используемой экспериментальной модели начального кариеса. Реализован алгоритм качественного и количественного анализа компьютерных томограмм зубов, включающий: 3D-реконструкцию зуба и собственно очага деминерализации эмали с оценкой объемных характеристик, сохранности структуры и др.; морфометрический анализ линейных размеров и геометрических характеристик очагов поражения эмали и их отдельных зон; определение минеральной плотности в различных зонах очага поражения методом эталонной денситометрии. Искусственный кариес эмали клинически соответствовал *ICDAS* (2), по данным микротомографии представлял рентгенопрозрачный структурно-неоднородный очаг поражения треугольной формы, глубиной $423,8 \pm 107,4$ мкм, с разноуровневой утратой минеральной насыщенности, наиболее выраженной в его центральных зонах ($(1,47-1,86) \pm \pm 0,17$ г/см³). Отметим перспективность использования метода компьютерной микротомографии и разработанной модели искусственного кариеса эмали для оценки *in vitro* минеральной насыщенности очага деминерализации при апробации различных средств и методов профилактики и лечения ранних стадий кариеса зубов.

© Левицкая А.Д., Сюткина Е.С., Гилева О.С., Галкин С.В., Ефимов А.А., Савицкий Я.В., 2018
Левицкая Анна Дмитриевна, соискатель, Пермь
Сюткина Евгения Сергеевна, к.м.н., ассистент, Пермь
Гилева Ольга Сергеевна, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой, Пермь
Галкин Сергей Владиславович, д.г.-м.н., профессор, Пермь
Ефимов Артем Александрович, к.г.-м.н., доцент, Пермь
Савицкий Ян Владимирович, инженер, Пермь

Ключевые слова: очаговая деминерализация эмали, искусственный кариес эмали, минеральная плотность, микроструктура, компьютерная томография, рентгеновская томография, микротомография.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование физико-химических механизмов повреждения зубной эмали – особого биоматериала с развитой подобно волоконно-упроченным композитам иерархической структурой, сохраняет актуальность значимой междисциплинарной проблемы физического и стоматологического материаловедения [3, 5, 13, 15]. Наиболее часто повреждение эмали зубов человека наблюдается при кариесе (K02.0), патологические механизмы возникновения которого связаны с прогрессирующей утратой минерального компонента (деминерализацией) эмали под действием кислотопродуцирующих бактерий зубной биопленки [27, 32]. В последние годы у пациентов, проходящих ортодонтическое лечение с использованием брекет-систем, все чаще отмечают особый клинико-патогенетический вариант повреждения твердых тканей зуба – постортодонтическую деминерализацию эмали, физические механизмы которой требуют изучения [6]. Междисциплинарные исследования механизмов возникновения и прогрессирования кариеса зубов с акцентом на диагностику его ранних стадий (K02.0 – кариес эмали: кариес в стадии пятна – очаговая деминерализация эмали, поверхностный кариес) соответствуют основным мировым трендам фундаментальной и практической стоматологии. Для многомасштабной оценки структуры эмали в норме, при различных заболеваниях или повреждениях зубов, а также в динамике различных лечебно-профилактических воздействий с успехом применяется целый спектр высокоточных традиционных, специальных и дополнительных методов оптической, электронной, сканирующей зондовой микроскопии и др. [1, 4, 5, 11, 12, 34, 35], а также методы математического моделирования [7, 31].

Аттестация физико-механических свойств и структуры эмали с оценкой возможностей и особенностей ее ремоделирования при использовании новых лечебно-профилактических технологий требует применения оптимальных экспериментальных моделей искусственного кариеса эмали, разработки адекватных способов их создания *in vitro* и соответствующего аппаратурно-технологического обеспечения, так как существующие методологические подходы не всегда универсальны [8]. При всем многообразии методов, применяемых в экспериментальной стоматологии для анализа микроструктуры здоровой и поврежденной зубной эмали, ценность многих из них ограничивается высоким, вплоть до необходимости полной деструкции образца, уровнем инвазивности, проблемами количественной оценки результатов, продолжительностью и финансовой затратностью исследования, требованиями особой подготовки технического персонала лаборатории и собственно малогабаритных образцов.

Исходя из этого, в современных биомедицинских исследованиях, в том числе в стоматологии [29], были последовательно определены преимущества и перспективы использования рентгеновской компьютерной томографии, а впоследствии и компьютерной рентгеновской микротомографии, сочетающей томографические алгоритмы и рентгеновскую микроскопию [16, 24, 26, 42, 46]. Расширяются возможности применения компьютерной микротомографии в современной консервативно-профилактической стоматологии для: неинвазивного *in vitro* исследования микроморфологии твердых тканей зуба (эмали, дентина) на различных этапах кариозного процесса, включая его ранние, проявляющиеся деминерализацией эмали стадии; количественной морфометрической оценки степени деминерализации на

различной глубине очага поражения эмали; изучения особенностей развития патологического процесса в эмали или дентине под действием различных повреждающих (кариесогенных, химической/механической природы) факторов и его регресса при использовании новых реминерализирующих и реставрационных технологий [18, 20, 22, 23, 37, 47].

На различных моделях искусственного кариеса эмали *in vitro*, на примере образцов удаленных по показаниям зубов с естественными (*in vivo*) кариозными поражениями продемонстрированы преимущества компьютерной микротомографии, проводимой за относительно короткое время, без предварительной специальной подготовки образца и с сохранением его целостности; доказано, что точность и чувствительность метода сопоставимы с прямыми физическими методами – гистологическим исследованием и трансверсальной микрорадиографией, рассматриваемыми в качестве золотого стандарта, однако сопряженными с повреждением или разрушением тестируемого материала [2, 20].

Спектр показаний к использованию компьютерной микротомографии в экспериментальной стоматологии не ограничен проблемными вопросами кариесологии, но распространяется на области эндодонтии (чаще для оценки строения системы корневых каналов зубов и качества их obturации различными пломбировочными материалами) и имплантологии (для динамической оценки плотности кортикальной кости челюстей на этапах лечения) [25, 36, 40]. Возрастает значение микротомографического анализа в стоматологическом материаловедении для исследования структуры, свойств и качества практического применения новых реставрационных, obturационных, адгезивных и костнозамещающих материалов [14, 18, 21, 24, 26, 39, 42, 46, 47].

Цель – изучить особенности микроструктуры и минеральной насыщенности в очаге искусственно (*in vitro*) созданной деминерализации эмали зуба (кариес эмали) методом компьютерной микротомографии.

Для достижения целевой установки была разработана оригинальная методика создания искусственной (*in vitro*) деминерализации эмали, составлен алгоритм многоуровневого анализа микроструктуры зубов с очагами искусственного кариеса эмали, предложен соответствующий аппаратурно-технологический подход к аттестации микроструктуры малогабаритных образцов зубов человека методом компьютерной томографии на рентгеновской установке *Nikon Metrology XT H 225*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка биопрепаратов зубов

Протокол исследования одобрен этическим комитетом ПГМУ им. Е.А. Вагнера. Материалом для экспериментального исследования послужили 12 зубов (первые и вторые премоляры), удаленных по ортодонтическим показаниям у 11 пациентов молодого возраста (4 мужчины и 7 женщин в возрасте от 18 до 25 лет). Операцию экстракции зубов проводили в соответствии с традиционным протоколом, стараясь, однако, исключить малейшее повреждение поверхностного слоя эмали при наложении и фиксации щечек щипцов. В исследование включали зубы с сохраненной коронкой и отсутствием видимых кариозных и некариозных дефектов. Подготовленные образцы зубов подвергали атравматичной механохимической обработке по оригинальной методике (рацпредложение № 2165 от 23.01.2001 «Методика подготовки биопрепаратов удаленных зубов», Гилева О.С., Белева Н.С., Коротин С.В., Гилева Е.С.).

Моделирование искусственного (*in vitro*) кариеса эмали

Искусственный кариес эмали моделировали на вестибулярной поверхности коронки премоляра(ов), используя разработанное нами специальное аппаратно-инструментальное обеспечение – «Устройство для моделирования экспериментального кариеса в стадии пятна методом эмалевого окна» (патент на полезную модель № 172561 от 16.12.2016) [9] и «Сепаратор для хранения биопрепаратов зубов с целью моделирования искусственного кариеса» (патент на полезную модель № 171409 от 16.12.16) [10], а также деминерализирующий гель оригинального состава (рацпредложение № 2757 от 17.05.2018): 3 г праестола 2510 (полиакриламид с молекулярным весом около 14 млн ед.), 8 мл 80%-ной молочной кислоты, 0,4 г дигидрофосфата кальция, раствор гидроксида натрия 1 г в 10 мл воды (добавляется капельно до рН раствора 4,5), дистиллированная вода – до объема 1000 мл.

Этапы создания искусственного (*in vitro*) кариеса эмали представлены на рис. 1.

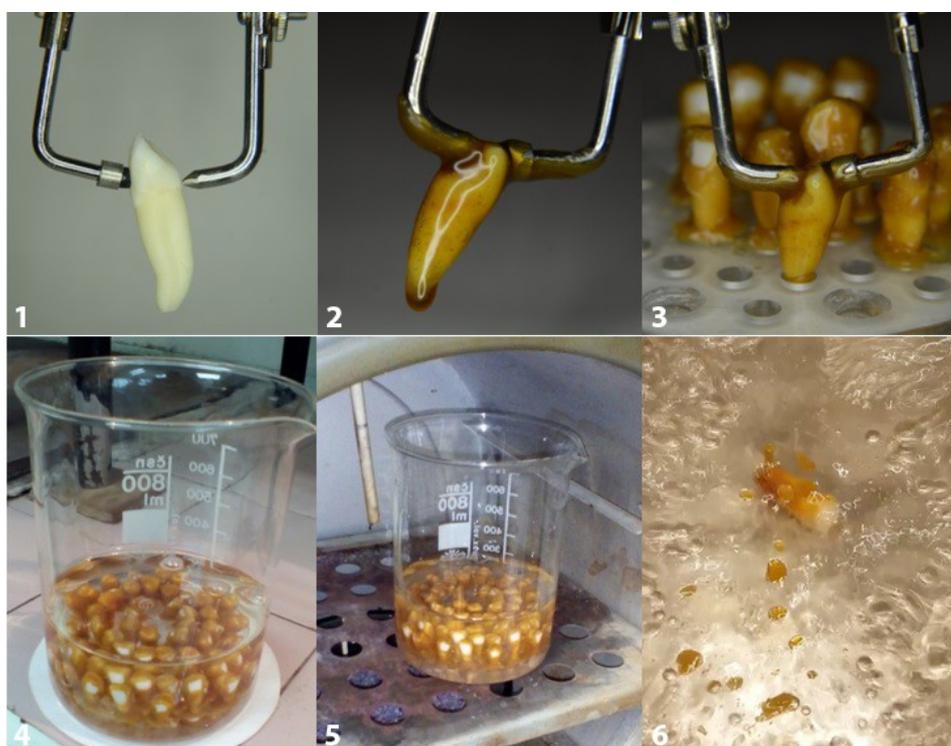


Рис. 1. Этапы создания искусственного кариеса: 1 – установка резинового формирователя «эмалевого окна» в центре вестибулярной поверхности коронки с удержанием ее язычной/небной поверхности с помощью острого конца фиксатора; 2 – погружение тестируемого образца зуба в растопленный липкий воск; 3 – установка образцов, покрытых воском, в сепаратор; 4 – помещение сепаратора с установленными образцами в лабораторный стакан с последующей заливкой деминерализирующего геля; 5 – помещение сепаратора с установленными образцами зубов в термостат при рН = 4,5; $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 10 суток, с заменой раствора каждые 3 суток; 6 – извлечение зубов из деминерализирующего геля; промывка в дистиллированной воде; погружение (10 с) в кипящую воду для снятия воска

Многоуровневый анализ образцов зубов с искусственно созданным кариесом эмали

Многоуровневый анализ зубов с очагами искусственного кариеса эмали проводили визуально, методом стереомикроскопии и компьютерной томографии.

Визуальная оценка зубов с искусственно созданными очагами деминерализации эмали осуществлена пятью калиброванными специалистами – сотрудниками кафедры терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний ПГМУ, проведена при естественном освещении, с использованием стандартного набора стоматологических инструментов. Оценивали наличие кариозного очага(ов) на вестибулярной поверхности коронки, их цвето-текстурные и топографические характеристики. Визуально и инструментально оценивали: цвет пятен и с учетом цвета в неизменных зонах эмали наличие цветового диссонанса коронки зуба; текстуру (гладкая/шероховатая) поверхности пятна; блеск/потерю блеска/помутнение эмали; топографию, размеры и форму очага деминерализации. Интегральную оценку искусственно созданных очагов проводили по критериям *International Caries Detection and Assessment System (ICDAS)* [19, 30, 41].

Обзорные фотографические изображения поверхности зуба с очагами искусственного кариеса эмали получали при увеличении 12,5 крат на стереомикроскопе *Olympus SZX-16*; для захвата изображений использовали камеру высокого разрешения *Olympus DP-73* (рис. 2), совместимую с программным обеспечением *Olympus Stream Motion v.1.8*.

Микроуровневые исследования поверхности и структуры эмали с очагами искусственного кариеса эмали проведены методом рентгеновской компьютерной микротомографии (*Nikon Metrology XT H 225*) в лаборатории петрофизики кафедры «Геология нефти и газа» Пермского национального исследовательского политехнического университета (рис. 3); физико-технические возможности установки отражены в табл. 1.

Для сканирования образец зуба помещали в камеру томографа, устанавливали в вертикальном положении на свободно вращающемся и передвигающемся в трех направлениях столике, закрепляя с помощью специальных насадок и термокля.

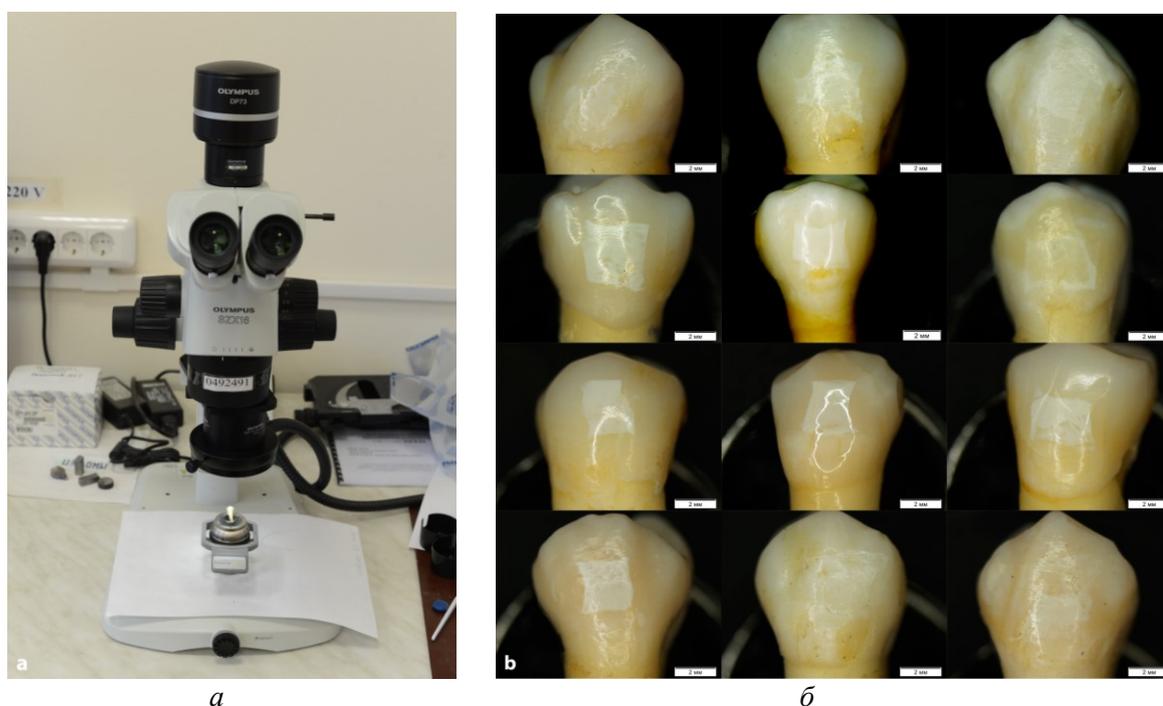


Рис. 2. Стереомикроскоп *Olympus SZX-16* (а); цифровые изображения зубов с очагами искусственно созданного кариеса эмали (б)

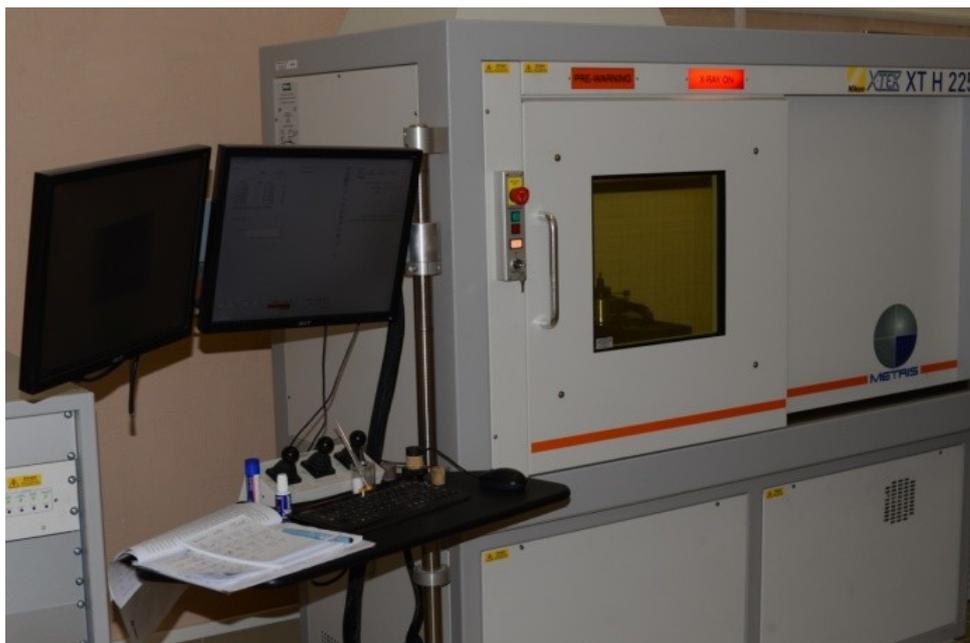


Рис. 3. Компьютерный томограф *Nikon Metrology XT H 225*

Таблица 1

Физико-технические режимы рентгеновской компьютерной установки *Nikon Metrology XT H 225*

Режимы и условия съемки	Значение
Напряжение, кВ	140
Сила тока, мА	65
Фильтр медный, мм	0,25
Размер фокального пятна, мм	0,003
Габариты детектора, мм	200×250
Разрешение детектора, пикселей	1408×1888
Разрешение в пикселе, мм	0,0184
Частота съемки кадров, Гц	3,5
Степень увеличения	×12

Выполнение снимков зубов осуществлялось с 12-кратным увеличением. Расстояние от трубки до объекта исследования (F_1) составляло 50 мм, от объекта до детектора (F_2) – 600 мм (рис. 4).

Сканирование каждого образца зуба производилось в течение 12 часов. Всего получено и проанализировано 151 200 изображений. Компьютерное моделирование зубов проводили с помощью программного продукта *Avizo Fire (Visualization Sciences Group, France)*.

Методика определения масштаба увеличения M определялась формулой

$$M = F_2/F_1, \quad (1)$$

где F_2 – расстояние от объекта до детектора; F_1 – расстояние от трубки (рентгеновский излучатель) до объекта исследования.

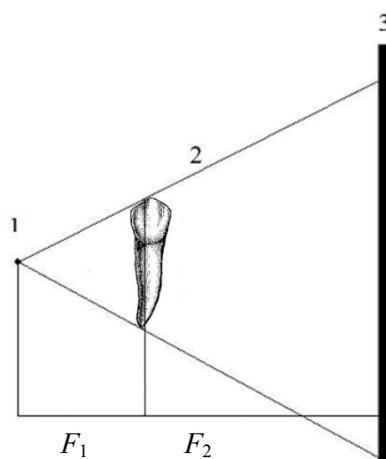


Рис. 4. Схема установки расстояний «трубка – объект» (F_1) и «объект– детектор» (F_2): 1 – рентгеновский излучатель; 2 – объект исследования; 3 – детектор

Методика обработки изображения

Алгоритм анализа компьютерных томограмм зубов включал в себя:

- 3D-реконструкцию зуба, включая твердые ткани и собственно очаг деминерализации эмали; анализ их объемных характеристик, сохранности структур, наличия патологических включений;
- получение и обзорный анализ аксиальных 2D-срезов коронок;
- морфометрический анализ очага деминерализации эмали (форма, линейные размеры – протяженность по ширине (мм), глубина поражения эмали (мкм), толщина поверхностного слоя эмали (мкм));
- выделение зон в очаге поражения с определением минеральной плотности (г/см^3) в каждой из зон; расчет степени утраты минерального компонента в процентном соотношении к плотности интактной эмали.

Оценка минеральной плотности очага деминерализации эмали (г/см^3) методом эталонной денситометрии

Методом ступенчатого прессования с последующим ступенчатым спеканием в печи ($t = 1100\text{ }^\circ\text{C}$) из порошка наноструктурированного гидроксиапатита с размером зерна до 30 нм готовили эталонные диски. Изменение плотности дисков производили путем внесения порошка поливинилового спирта. Ориентируясь на плотность интактной эмали, были созданы диски разной минеральной плотности:

- 1) эталонной, соответствующей интактной эмали ($\rho = 3,0\text{ г/см}^3$);
- 2) максимально высокой ($\rho = 2,5\text{ г/см}^3$);
- 3) высокой ($\rho = 1,701\text{ г/см}^3$);
- 4) средней ($\rho = 1,413\text{ г/см}^3$);
- 5) низкой плотности ($\rho = 1,234\text{ г/см}^3$).

По результатам обмера каждого диска (диаметр 8 мм, высота 3 мм) рассчитывали его объем с точностью до 1 мкм; массу диска определяли путем взвешивания на аналитических электронных весах с точностью до 0,0001 г. Плотность определяли отношением массы к объему. По результатам полученной цветности серого

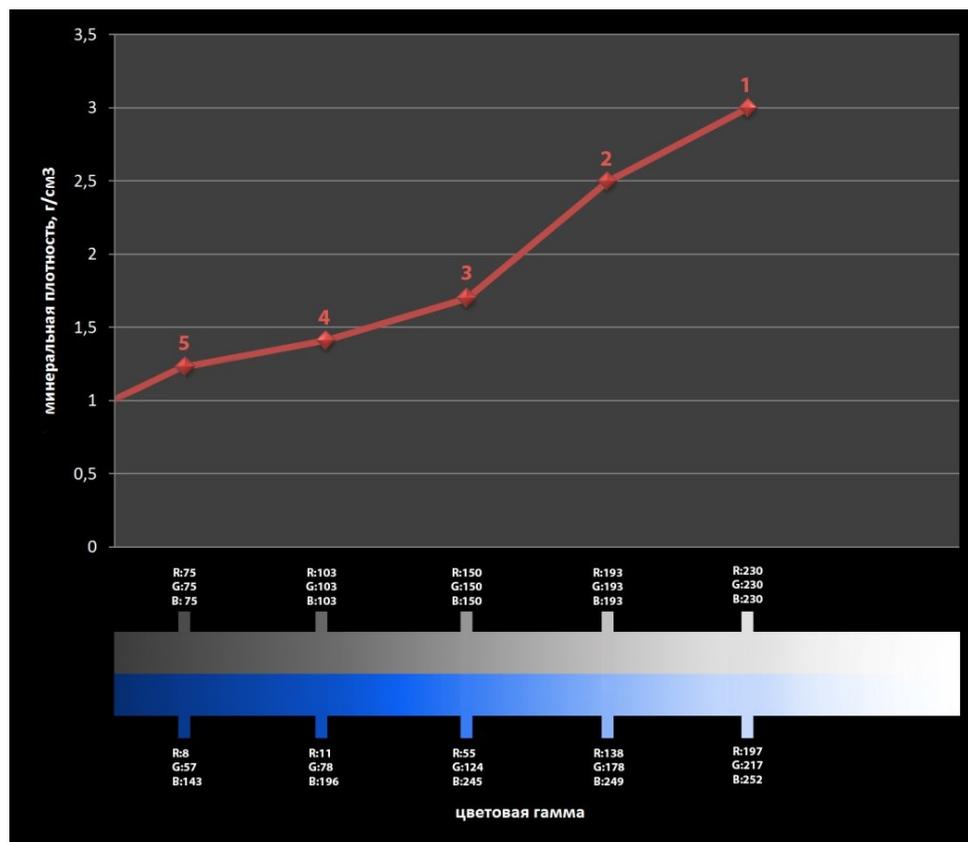


Рис. 5. Калибровочный график зависимости интенсивности цвета серого от минеральной плотности образца

и известной плотности дисков наноструктурированного гидроксиапатита, а также интактной эмали строили калибровочный график зависимости цвета серого от плотности материала (рис. 5). С помощью программы *Adobe Photoshop CC* каждой точке присваивали код серого в системе *RGB*, на основе чего была сформирована эталонная шкала серого. Для улучшения качества анализа изображений шкала серого была переведена в шкалу синего с присвоением кодов *RGB*.

Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую оценку данных проводили с использованием программного обеспечения *Statistica 13* с вычислением значений среднего и стандартной среднеквадратичной ошибки среднего. Достоверность различий показателей рассчитывали по *U*-критерию Манна – Уитни (2):

$$u_{стр} = n_1 n_2 + \frac{n_x(n_x + 1)}{2} - T_x \quad (2)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспертной клинической оценки цветотекстурных характеристик образцов зубов с искусственно созданным кариесом эмали и их увеличенных в 12,5 раза цифровых изображений убедительно свидетельствовали о наличии на их вестибулярной поверхности очагов деминерализации, преимущественно (75,0%) квадратной или, реже (25,0%), овальной форм. Чаше очаги искусственного кариеса были лишены присущего эмали блеска и опалесценции, отличались белым (от

мутновато-опакового до ярко-белого) цветом и имели четко контурируемые границы. С учетом цвета эмали в очаге поражения и ее перифокальных зонах в 91,7% случаев выявляли цветовой диссонанс коронок исследуемых зубов. При зондировании текстура поверхности 83,3% кариозных очагов определялась как неровно шероховатая. Клинические признаки кариозного поражения эмали, выявленные на поверхности абсолютного большинства тестируемых образцов, соответствовали коду 2 по критериям *ICDAS*, что обосновывало высокую чувствительность разработанной нами экспериментальной модели очаговой деминерализации эмали. Ориентировались на данные [38], что наличие на зубах подобных кариозных пятен с шероховатой поверхностью соответствует развитию в эмали зоны деминерализации глубиной от 200 до 300 мкм. Наличие подобных клинико-экспериментальных параллелей предстояло обосновать методом микрокомпьютерной томографии.

Обзорный анализ всех созданных 3D-моделей зубов с искусственным кариесом эмали (рис. 6) свидетельствовал, что внешняя и внутренняя анатомия их твердых тканей (эмали, дентина) в целом соответствовала структуре премоляров верхней или нижней челюстей. Прицельно рассматриваемая зона кариозного поражения эмали была окрашена различными оттенками красного цвета, определялась в центральной части вестибулярной поверхности коронки, распространяясь по направлению к эмалево-дентинной границе на глубину 1/3 эмали.

Морфометрический анализ начинали с обзора тридцати аксиальных 2D-срезов коронки (рис. 7), проходящих через зону поражения по ее максимальной глубине, определяя основные геометрические характеристики очага деминерализации эмали: форму (треугольная, полигональная и др.); средние линейные размеры (протяженность по ширине (мм) очага; максимальная глубина (мкм) зоны поражения эмали); толщину (мм) эмали, определяемую как расстояние от поверхности до эмалево-дентинной границы через зону деминерализации по ее максимальной глубине.

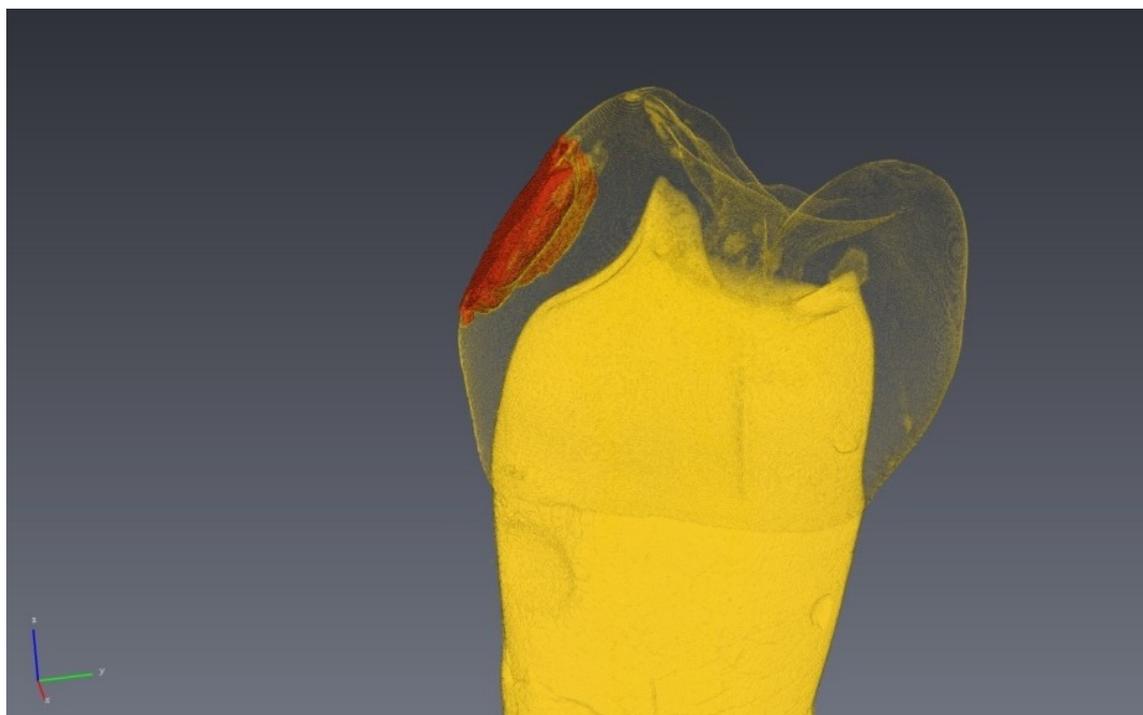


Рис. 6. 3D-изображение 1.4 зуба с очагом искусственного кариеса эмали
в центре вестибулярной поверхности коронки

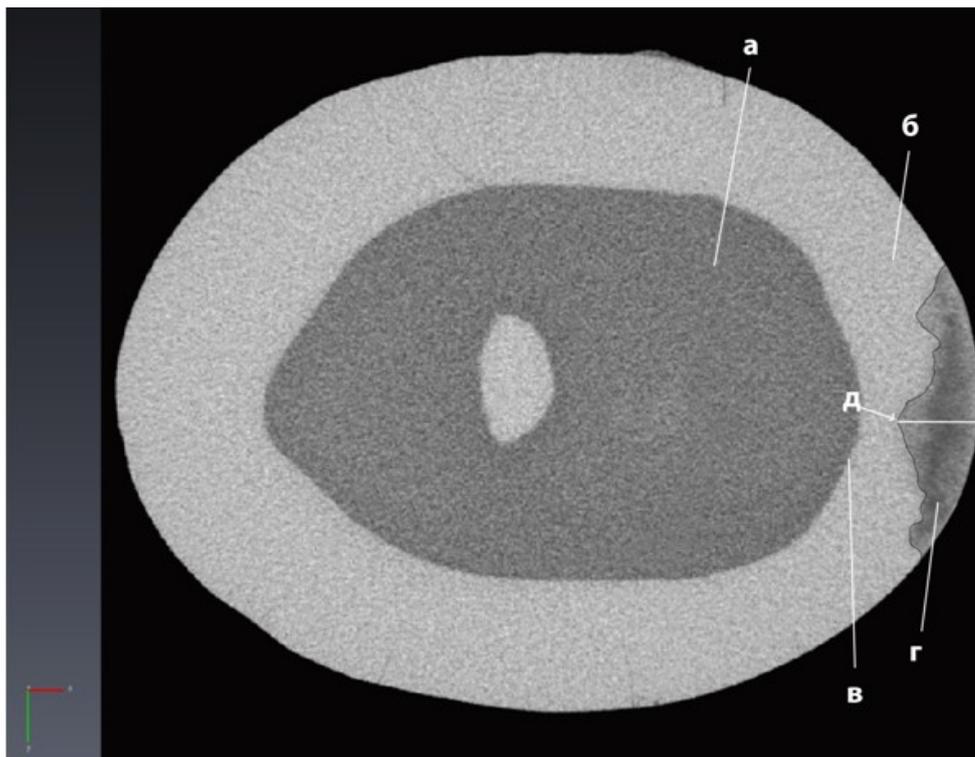


Рис. 7. Аксиальный 2D-срез коронки 3.4 зуба, проходящий через зону деминерализации по ее максимальной глубине: *а* – дентин; *б* – интактная эмаль; *в* – эмалево-дентинная граница; *г* – очаг деминерализации эмали с точкой максимальной глубины (*д*)

Практически все сформированные *in vitro* очаги кариеса эмали имели треугольную форму с вершиной угла, обращенной к эмалево-дентинной границе. Средние показатели толщины эмали варьировались в диапазоне $1,09 \pm 0,11$, что в целом соответствовало нормативным значениям зубов данной групповой принадлежности [13, 17, 22]. Показатели максимальной глубины очага искусственного кариеса, сформированного по разработанной нами методике, находились в диапазоне от 316,4 до 531,2 мкм (среднее значение – $423,8 \pm 107,4$ мкм) и соответствовали данным, полученным на основе анализа иных *in vitro* моделей очаговой деминерализации эмали в целом [8, 23, 28, 33].

По данным микрокомпьютерной томографии, очаги искусственного кариеса характеризовались как рентгенопрозрачные темные зоны с неравномерной оптической плотностью, представлялись структурно-неоднородными, что отражалось в различных оттенках серого/синего цветов.

Замеры интенсивности цвета, согласно минеральной плотности эмали, проводили по точкам соответственно глубине очага поражения и его отдельных зон (рис. 8 *а, б*).

В каждой точке по цвету серого определяли код *RGB* (см. рис. 8, *а*). На калибровочном графике находили соответствующий цвет по цветовой шкале серого (рис. 9), обозначали код *RGB* и проводили координату до пересечения с графиком (определяли точку на графике), из этой точки проводили координату до пересечения с осью минеральной плотности. Контроль определения точек осуществляли по *RGB*-модели синего (см. рис. 8, *б*) с использованием цветовой шкалы синего на калибровочном графике (рис. 9).

Замеры минеральной плотности интактной эмали проведены в 10 произвольно выбранных точках, перифокальных очагу деминерализации, а также в точке *E*, соответствующей переходу прозрачной зоны в область подлежащей неизменной эмали. Толщина неповрежденной эмали от точки *E* до эмалево-дентинной границы находилась в диапазоне $586,0 \pm 107,3$ мкм; минеральная плотность этой области составила $2,76 \pm 0,07$ г/см³ и соответствовала значениям показателей интактной эмали.

Показатели минеральной плотности на различной глубине в зонах *AB*, *BC*, *CD*, *DE* очага деминерализации на примере образца зуба 1.4 представлены на рис. 10.

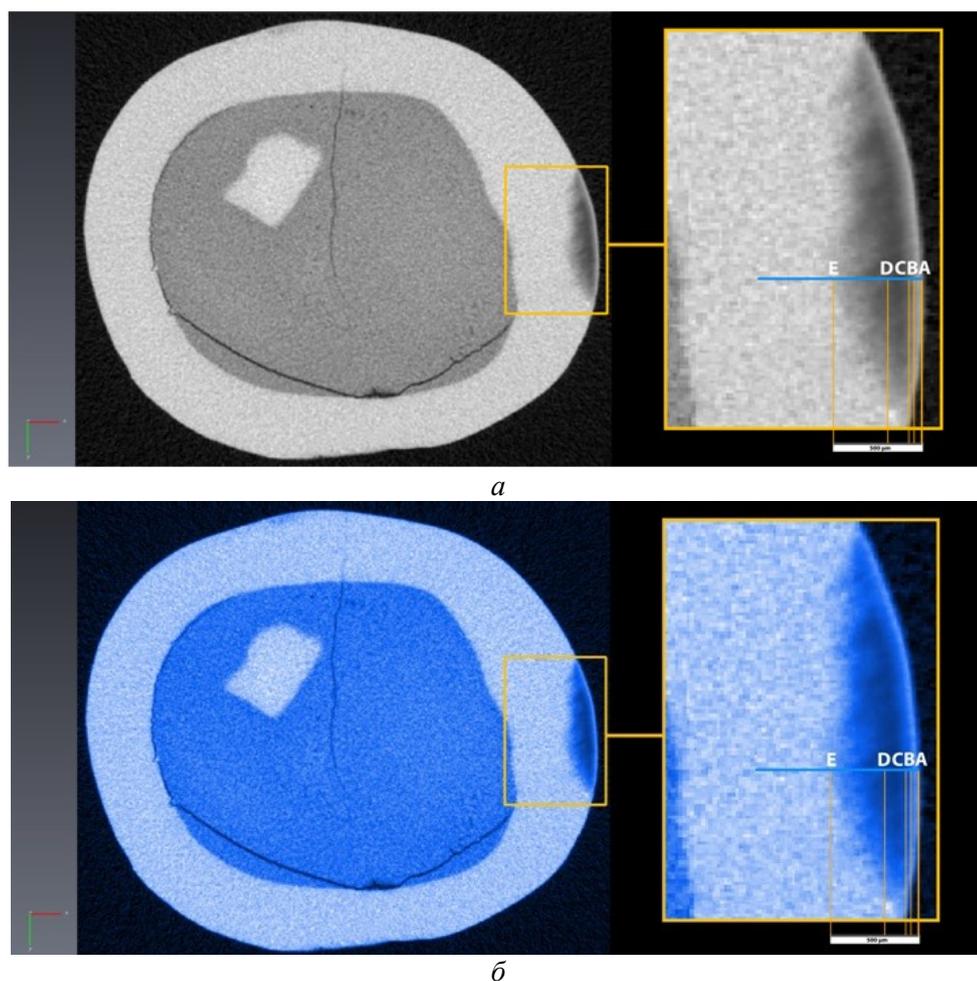


Рис. 8. Аксиальная томограмма 1.4 зуба с очагом деминерализации эмали на вестибулярной поверхности зуба (*а*); RGB-модель очага деминерализации эмали с улучшенными цветовыми и контрастными характеристиками (*б*): *A* – интенсивность цвета/минеральная плотность – на поверхности очага поражения; *B* – максимальная минеральная плотность, фиксируемая в зонах очага поражения; *D* – минимальная минеральная плотность, фиксируемая в зонах очага поражения; *C* – средняя минеральная плотность, фиксируемая в зонах очага поражения; *E* – минеральная плотность в участках интактной эмали. *AB* – поверхностная зона; *BC* – «тело» очага поражения; *CD* – темная зона; *DE* – прозрачная зона

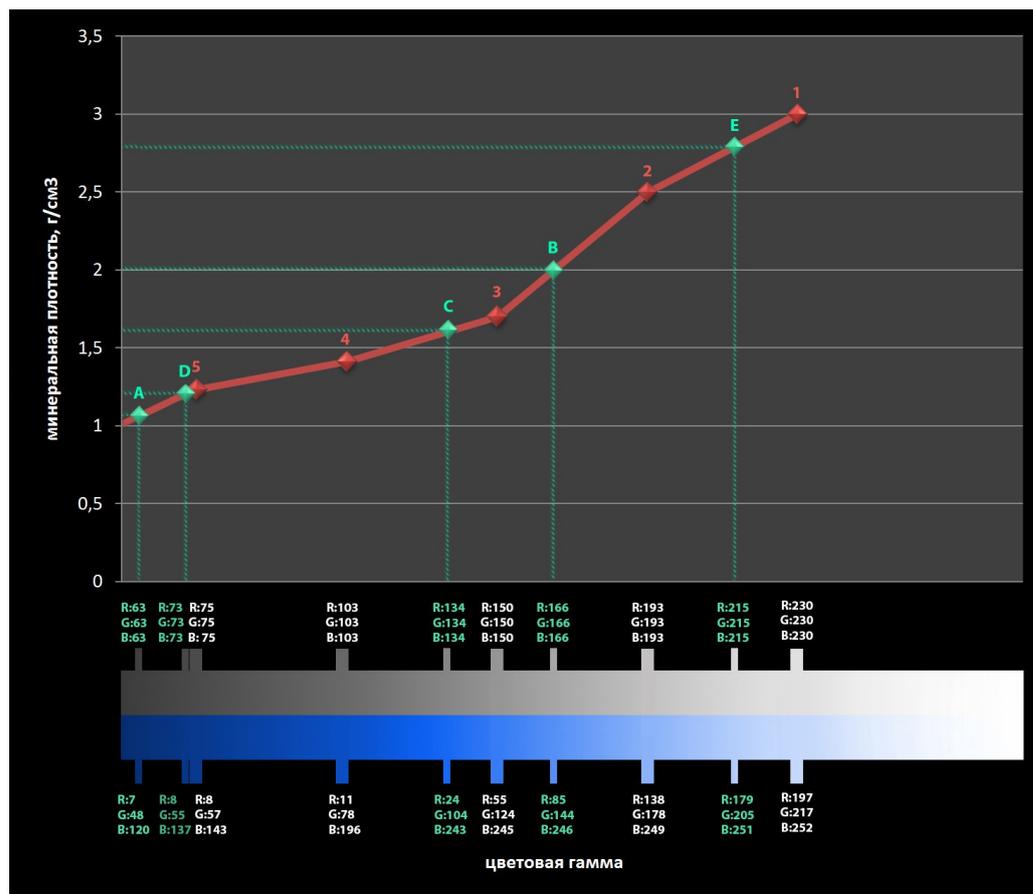


Рис. 9. Калибровочный график зависимости интенсивности цвета по коду RGB от минеральной плотности 1.4 зуба, г/см³

В каждой из четырех зон очага деминерализации эмали зуба 1.4 измеряли глубину поражения. Анализ зависимости показателей глубины той или иной зоны очага поражения и соответствующей ей плотности позволил заключить, что толщина поверхностной зоны эмали (AB) в 1.4 зубе составляла 40 мкм, а ее максимальная минеральная плотность соответственно 2,0 г/см³. Утрата минерального компонента в поверхностном слое (зона AB) относительно плотности интактной эмали составила: максимальная – 62%, минимальная – 25%, средняя – 43,5% от плотности интактной эмали, принятой за 100%.

Тело очага поражения (зона BC) толщиной от 40 до 70 мкм характеризовалось максимальной минеральной плотностью 2,0 г/см³ и минимальной минеральной плотностью 1,6 г/см³. Степень утраты минерального компонента в зоне BC составила: максимальная – 40,6%, минимальная – 25%, средняя – 32,8% от плотности интактной эмали.

Темная зона (CD) имела толщину поражения 70–190 мкм, максимальную минеральную плотность 1,6 г/см³ и минимальную минеральную плотность 1,2 г/см³. Следует обратить внимание, что переход минеральной плотности от максимальной точки B до минимальной точки D был крутой. Степень утраты минерального компонента в зоне CD составила: максимальная – 53,3%, минимальная – 40,6%, средняя – 46,95% от плотности интактной эмали.

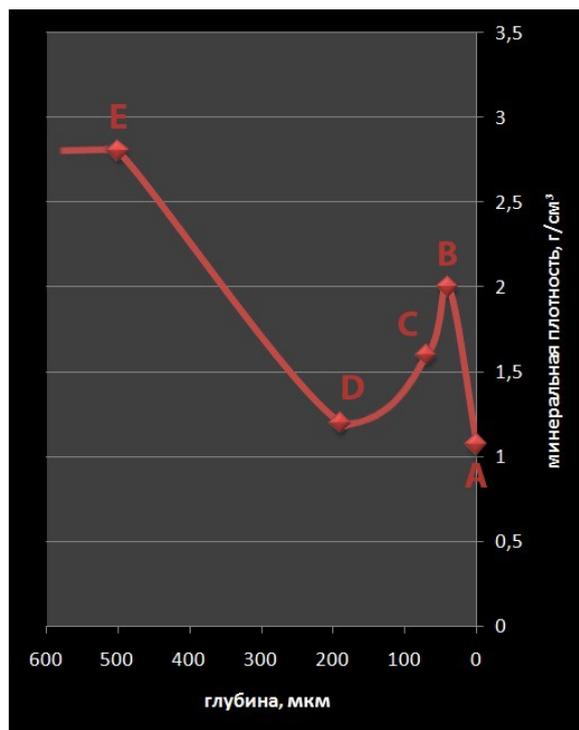


Рис. 10. Показатели минеральной плотности эмали, г/см^3 , на различной глубине, мкм, очага поражения на примере зуба 1.4

Прозрачная зона (*DE*) в очаге поражения толщиной от 190 до 500 мкм имела максимальную минеральную плотность, равную $2,8 \text{ г/см}^3$, и минимальную минеральную плотность $1,2 \text{ г/см}^3$. Переход в сторону эмалево-дентинной границы от минимальной (точка *D*) до максимальной минеральной плотности (точка *E*) весьма пологий. Максимальная минеральная плотность прозрачной зоны соответствовала показателю плотности интактной эмали ($2,8 \text{ г/см}^3$). Степень утраты минерального компонента в зоне *DE* составила: максимальная – 53,3%, минимальная – 0%, средняя – 26,65% от соответствующих показателей интактной эмали.

Проанализированы среднегрупповые показатели толщины и минеральной насыщенности в различных зонах очагов искусственной деминерализации эмали всех двенадцати тестируемых образцов зубов.

Среднегрупповые показатели толщины различных зон в очагах деминерализации эмали представлены в табл. 2.

Очевидно, что прозрачная зона в очагах деминерализации эмали отличалась максимальной толщиной ($173,5 \pm 73,4 \text{ мкм}$), тогда как наименьшие показатели толщины были определены в их поверхностных зонах ($43,1 \pm 31,2 \text{ мкм}$). Центральные участки искусственного кариозного очага («тело» и темная зона, характеризующиеся наибольшей утратой минеральных компонентов эмали) имели достоверно меньшую толщину (соответственно $60,3 \pm 35,1$ и $86,6 \pm 37,2 \text{ мкм}$), что согласуется с данными *M. Shahmoradi* и *M.V. Swain* [43, 44] относительно естественного (*in vivo*) формирующегося кариеса эмали. По мнению многих специалистов, толщина поверхностного слоя пораженной эмали во многом определяет возможности и особенности применения различных методик лечения очаговой деминерализации эмали кариес-инфильтрации, ремотерапии и т.д.

Таблица 2

**Среднегрупповые показатели толщины различных зон
в очагах искусственной деминерализации эмали ($n = 12$)**

Зона в очаге деминерализации эмали	Толщина зоны поражения, мкм
Поверхностная зона (<i>AB</i>)	43,1 ± 31,2 ($p^1 < 0,01$; $p^2 < 0,01$; $p^3 < 0,01$)
Тело очага поражения (<i>BC</i>)	60,3 ± 35,1 ($p^1 < 0,01$; $p^4 < 0,01$; $p^5 < 0,01$)
Темная зона (<i>CD</i>)	86,6 ± 37,2 ($p^2 < 0,01$; $p^4 < 0,01$; $p^6 < 0,01$)
Прозрачная зона (<i>DE</i>)	173,5 ± 73,4 ($p^3 < 0,01$; $p^5 < 0,01$; $p^6 < 0,01$)

Примечание: здесь и в табл. 3 ¹ – достоверность различий между зонами *AB* и *BC*; ² – достоверность различий между зонами *AB* и *CD*; ³ – достоверность различий между зонами *AB* и *DE*; ⁴ – достоверность различий между зонами *BC* и *CD*; ⁵ – достоверность различий между зонами *BC* и *DE*; ⁶ – достоверность различий между зонами *CD* и *DE*.

Наши данные о толщине поверхностного слоя эмали в целом созвучны с результатами, полученными в ряде экспериментальных и клинических работ: *Silverstone* [45] – с расчетной толщиной около 30 мкм; *Groeneveld* и *Arends* [28] – с оценкой толщины поверхностного слоя в очаге искусственного кариеса 27–44 мкм; *Meyer-Lueckel* [33] – со средним значением толщины поверхностного слоя деминерализованной эмали в диапазоне 45 ± 29 мкм; *N.J. Cochrane, P. Anderson et al.* [23] – с более широким разбросом исследуемого показателя от 35 до 130 мкм.

В сравнительном аспекте охарактеризована минеральная плотность в различных зонах очагов искусственного кариеса эмали; данные проанализированы в сравнении с показателями интактной эмали (табл. 3).

Анализ среднегрупповых показателей минеральной насыщенности в различных зонах искусственного кариеса эмали (см. табл. 3) свидетельствует, что наименее выраженные изменения минеральной плотности отмечены в прозрачной зоне (*DE*) – средний показатель 2,03 ± 0,15 г/см³; 73,35% относительно плотности интактной эмали. Плотность поверхностной зоны (*AB*) очага деминерализации в среднем составляла 1,56 ± 0,12 г/см³ (минимальная – 1,05 ± 0,08; максимальная – 2,07 ± 0,12); 56,5% относительно показателей плотности интактной эмали. Минеральная плотность в зоне *BC* составила в среднем 1,86 ± 0,17 г/см³, была достоверно снижена (67,2%) в сравнении с показателями на поверхности очага поражения (*AB*); значения плотности в «теле» очага искусственного кариеса эмали согласуются с таковыми при анализе образцов зубов с очагами естественного кариеса эмали [43, 44]. Минеральная насыщенность в темной зоне (*CD*) очага – до 1,47 ± 0,17 г/см³ в среднем (максимальная – 1,64 ± 0,11; минимальная – 1,29 ± 0,23); 53,1% относительно здоровой эмали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод микротомографии, реализуемый с помощью рентгеновской компьютерной установки *Nikon Metrology XT H 225*, обеспечил возможности аттестации макро- и микроструктуры малогабаритных образцов зубов человека *in vitro*, без нарушения целостности, особой подготовки и предварительного разрушения объектов, за относительно короткое время.

Многоуровневый анализ, основанный на визуально-инструментальной (по критериям *ICDAS*), стереомикроскопической (*Olympus SZX-16*; *Olympus DP-73*; *Olympus Stream Motion v.1.8*) и микротомографической оценке зубов с искусственно (*in vitro*) созданной по оригинальной методике (патенты РФ на полезную модель № 172561 и № 171409 от 16.12.16) очаговой деминерализацией эмали позволил получить объемную информацию о характере моделируемого поражения эмали, подтвердил высокую чувствительность и специфичность используемой экспериментальной модели начального кариеса.

Реализован алгоритм качественного и количественного анализа компьютерных томограмм зубов, включающий: 3D-реконструкцию зуба и собственно очага деминерализации эмали с оценкой объемных характеристик, сохранности структуры и др.; морфометрический анализ линейных размеров и геометрических характеристик очагов поражения эмали и их отдельных зон; определение минеральной плотности в различных зонах очага поражения методом эталонной денситометрии.

Искусственный кариес эмали клинически соответствовал *ICDAS* (2), по данным микротомографии представлял рентгенопрозрачный структурно-неоднородный очаг поражения треугольной формы, глубиной $423,8 \pm 107,4$ мкм, с разноуровневой утратой минеральной насыщенности, наиболее выраженной в его центральных зонах ($1,47-1,86$) $\pm 0,17$ г/см³. Перспективно использование метода компьютерной микротомографии и разработанной модели искусственного кариеса эмали для оценки *in vitro* минеральной насыщенности очага деминерализации при апробации различных средств и методов профилактики и лечения ранних стадий кариеса зубов.

Таблица 3

**Среднегрупповые показатели минеральной плотности, г/см³,
очагов искусственной деминерализации эмали (n = 12)**

Зона в очаге деминерализации эмали	Минеральная плотность зоны поражения, г/см ³
Поверхностная зона (AB)	min A – $1,05 \pm 0,08$ среднее – $1,56 \pm 0,12$ ($p^1 < 0,01$; $p^2 < 0,05$; $p^3 < 0,01$) max B – $2,07 \pm 0,12$
Тело очага поражения (BC)	max B – $2,07 \pm 0,12$ среднее – $1,86 \pm 0,17$ ($p^1 < 0,01$; $p^4 < 0,01$; $p^5 < 0,01$) min C – $1,64 \pm 0,11$
Темная зона (CD)	max C – $1,64 \pm 0,11$ среднее – $1,47 \pm 0,17$ ($p^2 < 0,05$; $p^4 < 0,01$; $p^6 < 0,01$) min D – $1,29 \pm 0,23$
Прозрачная зона (DE)	min D – $1,29 \pm 0,23$ среднее – $2,03 \pm 0,15$ ($p^3 < 0,01$; $p^5 < 0,01$; $p^6 < 0,01$) max E – $2,76 \pm 0,07$

В перспективе полученные данные методом микротомографии в очаге искусственного кариеса эмали позволят создать математическую модель, описывающую изменения минеральной плотности, происходящие *in vivo*. Тем самым предстоит усовершенствовать оборудование микротомографе для определения минеральной плотности в очаге поражения.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №17-48-590562-р_урал_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев А.Ю., Гилева О.С., Муравьева М.А., Свистков А.Л., Скачков А.П. Исследование механических свойств здоровой и поврежденной кариесом зубной эмали с помощью микроиндентирования // Российский журнал биомеханики. – 2012. – Т. 16, № 3. – С. 57–64.
2. Васильев Ю.А. Цифровая микрофокусная технология рентгенографии в оценке анатомического строения зубов: дис. ... канд. мед. наук. – М., 2015.
3. Вотяков С.Л., Мандра Ю.В., Киселева Д.В., Григорьев С.С., Ронь Г.И., Панфилов П.Е., Зайцев Д.В., Ивашов А.С., Сайпеев К.А., Абдулина Ю.Н. Минералогическая стоматология как междисциплинарная область исследований: некоторые итоги и перспективы развития // Проблемы стоматологии. – 2017. – Т. 13, № 1. – С. 3–16.
4. Гажва С.И., Жулев Е.Н., Прогрессова Д.А., Ростов А.В. Оценка изменений микроструктуры рельефа эмали и ее микротвердости в зависимости от воздействий различными отбеливающими системами // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2–3. – С. 14.
5. Гилева О.С., Муравьева М.А., Свистков А.Л., Изюмов Р.И., Левицкая А.Д. Экспериментальное исследование поверхности эмали зуба при различных лечебно-профилактических воздействиях // Вестник Пермского научного центра УрО РАН. – 2017. – № 3. – С. 15–21.
6. Гилева О.С., Муравьева М.А., Сюткина Е.С., Левицкая А.Д. Постортодонтическая деминерализация эмали: клинические особенности и эффективность // Маэстро стоматологии. – 2015. – № 4. – С. 38–46.
7. Гилева О.С., Муравьева М.А., Симакина Н.И., Соколов А.К., Терпугов В.Н. Вычислительное моделирование начальной стадии кариеса зубов: геометрическое моделирование зуба // Вестник Пермского университета. Серия: Математика. Механика. Информатика. – 2012. – № 2. – С. 20–25.
8. Гилева О.С., Муравьева М.А., Вальцифер В.А., Нечаев А.И., Гилева Е.С. Способ моделирования очага деминерализации эмали зуба: пат. на изобретение № 2503067 от 27.12.2013 г.
9. Гилева О.С., Левицкая А.Д. Устройство для моделирования экспериментального кариеса в стадии пятна методом эмалевого окна: пат. на полезную модель RUS № 172561 от 16.12.2016 г.
10. Гилева О.С., Левицкая А.Д. Сепаратор для хранения биопрепаратов зубов с целью моделирования искусственного кариеса: пат. на полезную модель RUS № 171409 от 16.12.2016 г.
11. Гончаров В.Д., Антонова И.Н., Кинчук А.В., Скоробогатова А.И. Методика морфологического и морфометрического анализа поверхности эмали зуба человека с помощью атомно-силовой микроскопии // Морфология. – 2016. – Т. 150, № 5. – С. 71–76.
12. Ерофеева Е.С., Ляпунова Е.А., Оборин В.А., Гилева О.С., Наймарк О.Б. Структурно-функциональный анализ твердых тканей зубов в оценке качества технологий отбеливания // Российский журнал биомеханики. – 2010. – Т. 14, № 2. – С. 47–55.
13. Зайцев Д.В., Григорьев С.С., Антонова О.В., Панфилов П.Е. Деформация и разрушение зубной эмали человека // Деформация и разрушение материалов. – 2011. – № 6. – С. 37–44.
14. Митронин А.В., Волков Д.П., Сенин Р.А., Гогин А.А. Монохроматическая рентгеновская микротомография на синхротронном источнике в оценке глубины проникновения антисептического раствора наносеребра в дентин зуба // Эндодонтия Today. – 2017. – № 3. – С. 14–17.
15. Морозов И.А., Беляев А.Ю., Изюмов Р.И., Ерофеева Е.С., Гилева О.С. Влияние отбеливание на микроструктуру поверхности эмали человеческих зубов // Материаловедение. – 2012. – № 7. – С. 50–55.
16. Пихур О.Л., Плоткина Ю.В., Франк-Каменецкая О.В., Павлов М.Р. Компьютерная рентгеновская микротомография при исследовании твердых тканей зубов // Альманах клинической медицины. – 2008. – № 17. – С. 236–237.
17. Сарычева И.Н., Янушевич О.О., Минаков Д.А., Шульгин В.А. Влияние толщины эмали на характер флуоресценции интактных зубов *in vivo* // Российский стоматологический журнал. – 2014. – № 1. – С. 32–37.

18. Asaizumi M., Karlinsey R.L., Mackey A.C., Kato T., Kuga T. *In vitro* assessments of white-spot lesions treated with NaF plus tricalcium phosphate (TCP) toothpastes using microtomography (micro-CT) // J. of Dentistry and Oral Hygiene. – 2013. – Vol. 5(7). – P. 68–76.
19. Braga M.M., Oliveira L.B., Bonini G.A., Bonecker M., Mendes F.M. Feasibility of the International caries Detection and Assessment System (ICDAS–II) in epidemiological surveys and comparability with standard World Health Organization criteria // Caries Research. – 2009. – № 43. – P. 245–249.
20. Chalas R., Szlajak K., Wojcik–Chęcinska I., Jaroszewicz J., Molak R., Czechowicz K., Paris S., Swieszkowski W., Kurzydowski K.J. Observations of mineralised tissues of teeth in X-ray micro–computed tomography // Folia morphologica. – 2017. – Vol. 76, № 2. – P. 143–148.
21. Chen X., Cuijpers V., Fan M., Frencken J.E. Marginal leakage of two newer glass-ionomer-based sealant materials assessed using micro–CT // Journal of Dentistry. – 2010. – Vol. 38, № 9. – P. 731–735.
22. Clementino-Luedemann T.N., Kunzelmann K.H. Mineral concentration of natural human teeth by a commercial micro-CT // Dent. Mater. J. – 2006. – Vol. 25, № 1. – P. 113–119.
23. Cochrane N.J., Anderson P., Davis G.R., Adams G.G., Stacey M.A., Reynolds E.C. An X-ray microtomographic study of natural white–spot enamel lesions // Journal of Dental Research. – 2012. – Vol. 91, № 2. – P. 185–191.
24. Davis G.R., Evershed A.N., Mills D. Quantitative high contrast X–ray microtomography for dental research // J.Dent. – 2013. – Vol. 41. – P. 475–482.
25. Dowker S.E., Davis G.R., Elliott J.C. X–ray microtomography: nondestructive three–dimensional imaging for in vitro endodontic studies // Oral. Surg. – 1997. – Vol. 83, № 4. – P. 510–516.
26. Elliott J.C., Dover S.D. X–ray microtomography // Journal of Microscopy. – 1982. – Vol. 126, № 2. – P. 211–213.
27. Featherstone J.D.B., Duncan J.F., Cutress T.W. A mechanism for dental caries based on chemical processes and diffusion phenomena during *in vitro* caries simulation on human tooth enamel // Archs of Oral Biology. – 1979. – Vol. 24, № 2. – P. 101–112.
28. Groeneveld A., Arends J. Influence of pH and demineralization time on mineral content, thickness of surface layer and depth of artificial caries lesions // Caries Res. – 1975. – Vol. 9, № 1. – P. 36–44.
29. Hounsfield G.N. Historical notes on computerized axial tomography // J Can Assoc Radiol. – 1976. – Vol. 27, № 3. – P. 135–142.
30. Ismail A.I., Sohn W., Tellez M., Amaya A., Sen A., Hasson H., Pitts N.B. The international caries detection and assessment system (icdas): an integrated system for measuring dental caries // Community Dent Oral Epidemiol. – 2007. – Vol. 35. – P. 170–178.
31. Izumov R.I., Zuev A.L., Rusakov S.V., Gileva O.S., Muraveva M.A. Mathematical modeling of caries initiation and progression occurring in dental enamel // Key Engineering Materials. – 2014. – Vol. 592–593. – P. 362–365.
32. Kidd E.A., Fejerskoo O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms // J. Dent. Res. – 2004. – Vol. 83. – P. 35–38.
33. Meyer–Lueckel H., Paris S., Kielbassa A. Surface layer erosion of natural caries lesions with phosphoric and hydrochloric acid gels in preparation for resin infiltration // Caries Res. – 2007. – Vol. 41. – P. 223–230.
34. Morozov I.A., Belyaev A.I., Isumov R.I., Erofeeva E.S., Gileva O.S. Impact of whitening on the microstructure of human tooth enamel // Inorganic Materials: Applied Research. – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. 71–76.
35. Mortimer K.V., Tranter T.C. A Scanning electron microscope study of carious enamel // Car. Res. – 1971. – Vol. 5. – P. 240–263. DOI: 10.1159/000259751
36. Nazarian A., Snyder B.D., Zurakowski D., Muller R. Quantitative micro–computered tomography: a non-invasive method to assess equivalent bone mineral density // Bone. – 2008. – Vol. 43. – P. 302–311.
37. Nenes A.A., Coutinho E., De Munck J. et al. Caries–removal effectiveness and minimal–invasiveness potential of caries–excavation techniques: a micro–CT investigation // J Dent. – 2011. – Vol. 39. – P. 154–162.
38. Oliver R.Y. The effect of different methods of bracket removal on the amount of residual adhesive // Am J. Orthod. Dentofacial Orthop. – 1988. – Vol. 93, № 3. – P. 196–200.
39. Ozgul B.M., Orhan K., Oz F.T. Micro–computed tomographic analysis of progression of artificial enamel lesions in primary and permanent teeth after resin infiltration // Journal of Oral Science. – 2015. – Vol. 57, № 3. – P. 177–183.
40. Park Y.S., Yi K.Y., Lee Y.S., Jung Y.C. Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration // Clinical Oral Implants Research. – 2005. – Vol. 16. – P. 156–160.
41. Pitts N.B. ‘ICDAS’ – an international system for caries detection and assessment being developed to facilitate caries epidemiology, research and appropriate clinical management // Community Dent Health. – 2004. – Vol. 21. – P.193–8.
42. Sasov A., Van Dyck D. Desktop X-ray microscopy and microtomography // Journal of Microscopy. – 1998. – Vol. 191. – P. 15–158.

43. Shahmoradi M., Swain M.V. Micro-CT analysis of naturally arrested brown spot enamel lesions // J. Dent. – 2017. – Vol. 56. – P. 105–111.
44. Shahmoradi M., Swain M.V. Quantitative characterization and micro-CT mineral mapping of natural fissural enamel lesions // J. Dent. – 2016. – Vol. 46. – P. 23–29.
45. Silverstone L.M. The surface zone in caries and in caries-like lesions produced in vitro // Br. dent. J. – 1968. – Vol. 125. – P. 145–157.
46. Swain M.V., Xue J. State of the art of micro-CT applications in dental research // Int J Oral Sci. – 2009. – Vol. 1. – P. 177–188.
47. Watanabe K., Nakamura T., Ogihara T., Ochiai Y., Watanabe S. Longitudinal evaluation of mineral loss at the earliest stage of enamel demineralization using micro-computed tomography // Health. – 2012. – Vol. 4. – P. 334–340.

THE EVALUATION OF MICROSTRUCTURE AND MINERAL DENSITY OF THE FOCUS OF ARTIFICIAL ENAMEL CARIES USING X-RAY COMPUTER MICROTOMOGRAPHY

A.D. Levitskaya, E.S. Syutkina, O.S. Gileva, S.V. Galkin,
A.A. Efimov, Ya.V. Savitskiy (Perm, Russia)

The aim of this work was to study the features of microstructure and mineral saturation in the focus of artificially (in vitro) created demineralized tooth enamel with the use of computer microtomography. The method of microtomography implemented with the help of an X-ray computer installation Nikon Metrology XT H 225, provided the possibility of certification of macro- and microstructure of small samples of human teeth in vitro, without breaking the integrity, special preparation and preliminary destruction of objects, in a relatively short time. A multilevel analysis based on visual-instrumental (ICDAS criteria), stereomicroscopes (Olympus SZX-16; Olympus DP-73; Olympus Stream Motion v.1.8) and microtopographical assessment of teeth with artificially (in vitro) created focal demineralization of enamel using original technique (patent of Russian Federation No. 172561 and No. 171409 from 16.12.2016) allowed to obtain three-dimensional information on the nature of simulated lesions of the enamel, confirmed the high sensitivity and specificity of the experimental model of primary caries. The algorithm of qualitative and quantitative analysis of computer tomograms of teeth includes 3D-reconstruction of the tooth and the focus of demineralized enamel with the assessment of volume characteristics, safety of the structure, etc.; morphometric analysis of the linear dimensions and geometric characteristics of the lesions of enamel and their individual zones; determination of mineral density in different areas of the lesion by reference densitometry. Artificial enamel caries clinically corresponded to ICDAS (2), according to the microtomography data represented an X-ray diffuse structural heterogeneous lesion center of triangular shape, with a depth of $423.8 \pm 107.4 \mu\text{m}$, with a multi-level loss of mineral saturation, most pronounced in its Central zones ($1.47\text{--}1.86 \pm 0.17 \text{ g/cm}^3$). The use of the method of computer microtomography and the developed model of artificial enamel caries for the assessment of mineral saturation of the demineralization focus in vitro during the approbation of various means and methods of prevention and treatment of early stages of dental caries is promising.

Key words: white spot lesion, artificial enamel caries, mineral density, microstructure, computer tomography, microtomography.

Получено 10 сентября 2018