

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ ЭМАЛИ ЗУБА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ*

О.С. Гилева, *Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера*

М.А. Муравьева, *Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера*

А.Л. Свистков, *Институт механики сплошных сред УрО РАН*

Р.И. Изюмов, *Институт механики сплошных сред УрО РАН*

А.Д. Левицкая, *Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера*

Несмотря на успехи современной профилактической стоматологии и ортодонтии в области технологии и материаловедения, развитие очаговой деминерализации зубов по-прежнему остается серьезным нежелательным последствием ортодонтического лечения с использованием несъемных конструкций. Цель исследования состояла в оценке результатов комбинированного лечения постортодонтической деминерализации эмали, основанного на последовательном проведении методики кариесинфильтрации и ламинирования проинфильтрированной эмали защитным многофункциональным покрытием пролонгированного действия.

Ключевые слова: *очаговая деминерализация эмали, кариесинфильтрация, фторотерапия, ремотерапия, фторвысвобождающее защитное покрытие эмали.*

Актуальным направлением современной фундаментальной стоматологии является изучение микромеханических и топологических свойств поверхности эмали зуба в норме, на ранних стадиях кариеса (очаговая, в том числе постортодонтическая, деминерализация эмали, ОДЭ) и на различных этапах лечебно-профилактических воздействий [1]. Анализ структуры и свойств эмали предполагает адекватную подготовку образцов для исследования [2, 3, 7] их фиксацию и иммобилизацию для получения точных результатов.

Эмаль зуба – природный биоконкомпозит со сложной иерархической структурой,

представленной минерализованными призмами и органическим межпризменным веществом, обладает уникальными физико-механическими свойствами: упругостью в сочетании с пластичностью и прочностью [12].

Закономерности развития кариозного процесса могут быть изучены *in vitro* на адекватной экспериментальной модели искусственного кариеса эмали [12], позволяющей на принципах физического материаловедения проанализировать упруго-механические свойства и структуру новообразуемой структурно-неоднородной среды – проинфильтрированной све-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края (гранты № 14-08-96012, 17-48-590562).

токомполитом и заламинированной лаком деминерализованной эмали на макро-, мезо- и микроскопическом уровнях. Принимая во внимание результаты последних междисциплинарных исследований этого направления [4, 5, 7], можно предположить, что применение современных высокоточных методов экспериментального исследования позволит наглядно охарактеризовать процессы ремоделирования структуры, деминерализованной после пропитывания композитом, создать теоретические предпосылки для повышения качества (эффективности и безопасности) лечения пациентов с ОДЭ.

В соответствии с поставленными в работе целью и задачами на основе принципов физического материаловедения изучены топологические и микромеханические свойства, проведена аттестация микроструктуры естественных биоматериалов (интактная и пораженная кариесом эмаль зуба человека) и искусственных полимерных стоматологических материалов (светоотверждаемый высокотекучий светокompозит Ison, многофункциональный материал ClinPro XT Varnish) на разных (макро-, микро- и мезоскопический) уровнях, в различных экспериментально-моделируемых ситуациях («искусственный» кариес – очаговая деминерализация или кариес эмали – после инфильтрации светокompозитом Ison и после ламинирования многофункциональным покрытием ClinPro XT Varnish).

Для решения экспериментальных задач был развит и последовательно реализован комплексный материаловедческий подход, основанный на использовании и анализе результатов современных физико-механических и химических методов исследования, а также ряда оригинальных методик, адаптирующих эти методы к специфике исследования искусственных и стоматологических материалов и естественных биоматериалов зубов человека.

Материалом для экспериментального исследования послужили 40 удаленных по ортопедическим и ортодонтическим показаниям зубов, на 32 из которых (рез-

цы и клыки) моделировали искусственный кариес по авторской методике, а на коронках 8 (клыки и премоляры) уже определялся кариес эмали. Методика создания искусственного кариеса эмали основана на особом технологическом режиме действия деминерализующего геля оригинального состава, разработанного в лаборатории многофазных дисперсных систем ИТХ УрО РАН, на область «открытого эмалевого окна» по периферии брекета, фиксируемого на коронке фронтального зуба. Зубы со сформированной ОДЭ помещали в специальный пластиковый бокс для оптимального хранения биоматериала. Визуальные признаки ОДЭ (формирование кариозного пятна с типичными цветотекстурными, топографическими, геометрическими и другими характеристиками) были подтверждены результатами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), на аппарате Evex Mini-SEM HR-3000 в специализированном низковакуумном режиме для биологических объектов.

Известны различные методы исследования топологии (микрорельефа, микроархитектоники) поверхности зуба: стандартная профилометрия с расчетом параметра шероховатости Ra [1, 8] или показателя Херста, характеризующего фрактальную размерность пространственного рельефа эмали [2], оптическая или атомно-силовая микроскопия поверхности зуба [5].

В работе комплексное изучение микроархитектоники поверхности и микроструктуры эмали проводили методом сканирующей атомно-силовой зондовой микроскопии на установке «Nano-DST».

Прибор «Nano-DST» позволяет регистрировать локальное взаимодействие сенсора (кантилевера + зонд) с поверхностью исследуемого образца эмали. При перемещении микрозонда вдоль поверхности образца острие шипа приподнимается и опускается, очерчивая микрорельеф поверхности. Наглядное трехмерное изображение профиля (рельефа) получается после соответствующей компьютер-

ной обработки цифровой информации. Размер видимых объектов на исследуемой поверхности может варьироваться от десятков микрометров до единиц нанометров. Программное обеспечение позволяет обрабатывать полученные изображения, исследовать отдельные участки рельефа, измерять шероховатость, проводить сравнительный анализ данных в области интактной эмали зуба, в ОДЭ и в участке эмали после инфильтрации светокомпозитом Icon.

В процессе экспериментального исследования прибором «Nano-DST» сканирование поверхности образца эмали осуществлялось в полуконтактном режиме, когда регистрация силового взаимодействия между исследуемой поверхностью и зондом позволяла сделать вывод о рельефе поверхности и однородности структуры, получить ее трехмерное изображение. Результаты представляли итог осреднения данных, полученных в различных участках поверхности исследуемых зубов. Размер участка сканирования варьировался от 15×15 до 30×30 мкм при разрешении в плоскости $x-y$ 1024×1024 точки. Обработка результатов проводилась методом алгоритмов в пакетах прикладных программ MatLab [6].

Цветные АСМ-изображения (сканы) поверхности эмали позволяют получить весьма ориентировочную характеристику рельефа ее поверхности, исходя из факта, что наименьшей высоте поверхности соответствует наиболее темный оттенок на скане, а наибольшей – самый светлый. При анализе изображений невозможно четко определить границы, форму структурных образований исследуемой поверхности, количественно обработать полученные результаты. По полученным АСМ-изображениям практически невозможно дать объективную сравнительную характеристику рельефа интактной и деминерализованной эмали, а также определить закономерности ее ремоделирования после различных лечебно-профилактических воздействий.

Для нивелирования этих недостатков

метода АСМ, в развитие существующего картографического метода исследования микроструктуры поверхности отбеленного зуба, нами предложен оригинальный способ исследования структуры поверхности интактной и деминерализованной эмали зуба (*рацпредложение № 2596 от 25.09.2012 г. «Способ исследования структуры поверхности интактной и деминерализованной эмали зуба»*).

Данный способ предполагает многократное изучение участков интактной и деминерализованной эмали, а также эмали после инфильтрации жидкотекучим светокомпозитом Icon, поэтому на исходно исследуемую поверхность эмали с помощью инденторной установки «Nano-Test-600» наносили координатную сетку, позволяющую анализировать микроархитектонику одной и той же области эмали зуба на всех последующих этапах эксперимента. Размеры исследуемой области эмали 20×20 мкм.

На следующем этапе анализа микроархитектоники поверхности эмали, в соответствии с идеей географических карт, все данные о ее рельефе, полученные с помощью АСМ и наноиндентирования, подвергались компьютерной аппроксимации, в результате которой вся исследуемая поверхность эмали зуба разбивалась на участки «возвышенностей» (высотой от +200 до +400 нм), «равнин» (от 0 до +200 нм), «низменностей» (глубиной от 0 до -200 нм), «углублений» (от -200 до -400 нм) и «впадин» (от -400 нм и более) относительно отсчетного (нулевого) уровня.

Самой важной задачей картографического метода является определение отсчётного (нулевого уровня), так как от него можно измерять высоту и глубину рельефа, рассчитывать его статистические характеристики, например, процентное распределение площади поверхности в зависимости от уровня ее рельефа, измерять глубину деструкции эмали при кариесе.

Расчеты по определению нулевого уровня проведены участниками междис-

циплинарного проекта РФФИ [6]. В работе для расчета отчетного уровня предложен специальный алгоритм, включающий нахождение частотного распределения высот и выбора самой распространенной высоты, т.е. соответствующей наибольшей частоте, так как если выбирать нулевой уровень как среднее арифметическое координаты z , то появившаяся впадина резко изменит шкалу и полученные результаты не будут иметь физического смысла. То же самое произойдет, если встретится очень высокий подъем границы с малой площадью основания (крутой пик). Требовалось ввести нулевой уровень так, чтобы это понятие имело физический смысл и могло использоваться для количественной оценки особенностей рельефа поверхности эмали. Таким образом, считали, что при частотном распределении поверхности по уровням появление больших впадин слабо повлияет на визуализацию неизменившихся участков.

Функция окраски полученного изображения поверхности в зависимости от координаты каждой точки встроена в атомно-силовой микроскоп «Nano-DST». На изображениях поверхности эмали зуба человека, обработанных картографическим методом (картограммах), рельеф поверхности, в зависимости от найденной высоты h относительно нулевого уровня, условно разбивали на пять составляющих:

1. Возвышенности (окрашиваются коричневым цветом) – это области, в которых значения высоты лежат в диапазоне от 200 до 400 нм.

2. Равнинная часть (окрашивается зеленым цветом) – это области, в которых отклонения от средней высоты находятся в диапазоне от 0 до 200 нм.

3. Низменности (окрашиваются голубым цветом) – это области, в которых отклонения высоты лежат в диапазоне от 0 до –200 нм.

4. Углубления (окрашиваются синим цветом) – это области, в которых отклонения высоты лежат в диапазоне от –200 до –400 нм.

5. Впадины (окрашиваются черным

цветом) – это области, в которых отклонения высоты превышают –400 нм.

Проблемы практического использования АСМ в экспериментальной стоматологии зачастую связаны с нестандартной формой зуба как объекта исследования, имеющего определенную кривизну вестибулярной поверхности, сложную топографию жевательной поверхности и т.д. Для решения этой проблемы нами предлагается использовать своеобразную силиконовую «подложку», позволяющую плотно, строго параллельно предметному столику прибора фиксировать и иммобилизовать биопрепарат зуба для последующего точного АСМ-анализа. В качестве материала для создания подобной «подложки» нами предлагается использовать силиконовый слепочный материал «Express STD» фирмы 3M ESPE. Силиконовые массы созданы на основе кремнийорганических полимеров – силиконовых каучуков, широко используются в современной протетической стоматологии. Выпускаются в виде двух паст – основной и катализаторной.

Методика получения оттисковой силиконовой массы несложна: к необходимому количеству основной массы добавляют катализаторную пасту, паста плотной консистенции набирается специальными мерниками и после добавления катализатора перемешивается в руках. Время замешивания – 30–45 с, время отверждения – 4–8 мин.

При выборе материала для «подложки» ориентировались на следующие преимущества силиконовых масс: практически идеальное воспроизведение деталей, простота перемешивания и точность дозировки массы и катализатора, разнообразие вязкостей масс, размерная стабильность и точность, сохраняющиеся при длительном хранении, устойчивость к деформациям и идеальное восстановление формы после них, высокая тиксотропность, гидрофильность, адгезионные свойства, возможность качественной дезинфекции, отсутствие неприятного вкуса и запаха, нетоксичность, гипоаллерген-

ность. Обращали внимание на то, что нельзя замешивать силиконовые массы, работая в латексных перчатках.

Выбранный нами «Express STD» силиконовый материал фирмы 3M ESPE контрастен по отношению к цвету зуба, прочно связывается с биоматериалом зуба, неяркий, при необходимости биоматериал зуба легко извлекается из силиконовой «подложки». Имеет большое значение, что при исследованиях биоматериала зубов в атомно-силовом микроскопе возможен анализ поверхности под заданными углами, а также изменение основания силиконовой «подложки» под размер столика. Для удобства манипуляционной работы с биоматериалом зуба нами предложена особая форма силиконовой «подложки» в форме песочных часов с рифлениями в местах фиксации пальцев, чтобы биопрепарат, зафиксированный в «подложке», не выскальзывал из рук.

Для удобства манипуляций силиконовые «подложки» можно готовить индивидуально (для зубов различной групповой принадлежности): для центральных и боковых резцов верхней челюсти размером 23–25 мм, для центральных и боковых резцов нижней челюсти – 20–21 мм, для клыков верхней и нижней челюсти – 25–30 мм, для премоляров верхней и нижней челюсти – 20–23 мм, для моляров верхней и нижней челюсти – 21–24 мм. Исследование биопрепарата зуба в АСМ, используя предлагаемый нами способ их фиксации и иммобилизации на силиконовой «подложке», оптимизирует исследовательский процесс, повышает точность получаемых результатов, расширяет диагностический потенциал АСМ-анализа ТТЗ *in vitro*.

На основе предложенного способа «картографирования» проведен количественный структурный анализ составляющих рельефа («возвышенностей», «равнин», «низменностей», «углублений» и «впадин») интактной, деминерализованной, проинфильтрированной жидкотекучим светокомпозитом Ison и заламинированной многофункциональным гибри-

дным покрытием ClinPro XT Varnish эмали зуба человека. В зависимости от процентного распределения различных составляющих рельефа составлены карты поверхности (картограммы) участков: эмали интактного зуба, участка эмали в очаге деминерализации, участка эмали после инфильтрации материалом Ison, участка проинфильтрированной и заламинированной эмали. При визуальной оценке картограммы поверхности эмали интактного зуба видно, что ее рельеф представлен преимущественно «равнинами» (от 0 до +200 нм) и «возвышенностями» (от +200 до +400 нм) относительно расчетного нулевого уровня. «Низменности» и «углубления» составляют 18,54% и 5,82% соответственно. Анализ гистограммы распределения поверхности эмали по уровням ее рельефа показал, что ее профиль является относительно ровным, без резких перепадов высот (в пределах 400 нм), т.е. для эмали интактного зуба характерен структурно-однородный тип рельефа поверхности.

На картограмме в очаге деминерализации эмали происходит кардинальное изменение поверхности зуба. Границы структур на ее поверхности становятся более размытыми, извилистыми, происходит исчезновение «возвышенностей» (4,78%) и «равнин» (4,89%), появляются новые «минусовые» элементы текстуры, такие как «низменности» (от 0 до –200 нм), «углубления» (от –200 до –400 нм) и «впадины» (от –400 нм и более). На гистограмме распределения поверхности по уровням видно, что основную площадь занимают «впадины» и «углубления» – до 87,99%. Разрушается поверхностный слой эмали, глубина деструкции достигает –400 нм. Текстура эмали становится неровной, формируется шероховатый рельеф поверхности.

На картограмме поверхности проинфильтрированной и заламинированной многофункциональным покрытием ClinPro XT Varnish эмали визуально определяется восстановление цвета изображения до исходного за счет исчезновения

глубоких «впадин», уменьшения площади «углублений» на 19,66%. Изображение представлено такими уровнями рельефа, как «равнины» – 52,3%, «возвышенности» и «низменности» в 29,11% и 13,55% случаях соответственно. Профиль поверхности эмали выравнивается за счет 2-кратного уменьшения перепада высот рельефа, сглаживается шероховатая деминерализованная текстура, характерная для очага деминерализации после кариес-инфильтрации, происходит ремоделирование поверхности эмали.

Таким образом, результаты сканирования поверхности эмали с помощью атомно-силовой зондовой микроскопии, интерпретируемые на основе оригинального картографического метода, позволяют установить характерные качественные цветотекстурные и количественные признаки изменения микрорельефа и микроструктуры эмали на ранних стадиях кариеса: достоверное ($p < 0,001$) увеличение площади участков деструкции глубиной

от –200 до –400 нм и более относительно расчетного нулевого уровня – «впадин» и «углублений» (соответственно на 63,2% и 18,9%, в сравнении с интактной эмалью); достоверное ($p < 0,001$) уменьшение представительства «равнинных» участков поверхности эмали и ее «возвышенностей» с высотой от 0 до 400 нм (соответственно на 45,2% и 20,9% в сравнении с интактной эмалью); более чем 2-кратное увеличение перепадов высот на различных участках поверхности кариозного пятна; утрата четкости границ между основными структурными единицами рельефа и усиление локальной шероховатости. После инфильтрации и ламинирования очага деминерализации многофункциональным высокотекучим полимером рельеф поверхности ремоделированной эмали сглаживается, утрачивает шероховатость; частотное распределение, размеры и площадь геометрических составляющих рельефа поверхности приближаются к показателям интактной эмали ($p > 0,05$).

Библиографический список

1. Гилева О.С., Муравьева М.А., Сюткина Е.С., Левицкая А.Д. Постортодонтическая деминерализация эмали: клинические особенности и эффективность лечения // *Маэстро Стоматологии*. – 2005. – № 14(60). – С. 38–46.
2. Ерофеева Е.С. Повышение качества лечения пациентов с дисколоритами фронтальных зубов (экспериментально-клиническое исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Пермь, 2010. – 23 с.
3. 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.
4. Зайцев Д.В. Физические механизмы релаксации напряжений в природных материалах с иерархической структурой: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Екатеринбург, 2011. – 25 с.
5. Мандра Ю.В., Ронь Г.И., Вотяков С.Л., Киселева Д.В. Применение атомно силовой микроскопии в оценке морфоструктурных изменений при повышенной стираемости зубов // *Проблемы стоматологии*. – 2008. – С. 5–9.
6. Морозов И.А., Свистков А.А., Гилёва О.С., Ерофеева Е.С. Экспериментальное исследование влияния клинического отбеливания на микроструктуру поверхности эмали зубов // *Российский журнал биомеханики*. – 2010. – Т. 14. – № 1. – С. 56–64.
7. Панфилов П.Е., Зайцев Д.В., Григорьев С.С. Деформационное поведение твердых тканей зубов человека // *Сборник статей. I Всероссийское рабочее совещание по проблемам фундаментальной стоматологии*. – 2013. – С. 247–263.
8. Коротин С.В. Экспериментально-клиническая оценка эффективности применения различных методов профессиональной гигиены полости рта: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Пермь, 2006. – 19 с.
9. Belyaev A.Yu., Zuev A.L., Gileva O.S., Muraveva M.A. Experimental studies of elastic properties of dental enamel and photopolymer used for early caries treatment // *Key Engineering Materials*. – 2014. – Vol. 592-593. – P. 358–361.
10. Izyumov R.I., Rusakov S.V., Zuev A.L., 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.

11. *Izumov R.I., Svistkov A.L.* Cartographic method of surface characteristics analysis // *Pattern Recognition and Image Analysis*. – 2016. – Vol. 26. – № 1. – P. 78–88.
12. *Lawn B.R., Lee J.W., Chai H.* Teeth: Among Nature's Most Durable Biocomposites // *Annu Rev. Mater. Res.* – 2010. – № 40. – P. 55–75.

**EXPERIMENTAL RESEARCH OF THE ENAMEL SURFACE OF A TOOTH
AFTER DIFFERENT KINDS OF TREATMENT**

O.S. Gileva¹, M.A. Muraveva¹, A.L. Svistkov², R.I. Izyumov², A.D. Levitskaya¹

¹ *Perm State Medical University named after E.A. Wagner*

² *Institute of Continuous Media Mechanics UB RAS*

Enamel demineralization still remains one of the serious undesirable effects of fixed orthodontic appliance therapy, despite techniques and material advances in preventive dentistry and orthodontics. The study was undertaken to evaluate the results of the post-orthodontic white spot lesion treatment, using a new approach based on the combination of caries infiltration technique with application of durable Fluoride-releasing enamel protective coating.

Keywords: enamel demineralization, white spot lesions, caries infiltration technique, fluoride therapy, remineralization therapy, enamel protective coating.

Сведения об авторах

Гилева Ольга Сергеевна, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний, Пермский государственный университет им. академика Е.А. Вагнера (ПГМУ), 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: ogileva@ Rambler.ru

Муравьева Мария Анатольевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний, ПГМУ; e-mail: rav.m2204@gmail.com

Сvistков Александр Львович, доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией микромеханики структурно-неоднородных сред, Институт механики сплошных сред УрО РАН (ИМСС УрО РАН), 614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 1; e-mail: svistkov@icmm.ru

Изыумов Роман Игоревич, аспирант лаборатории микромеханики структурно-неоднородных сред, ИМСС УрО РАН; e-mail: izumov@icmm.ru

Левицкая Анна Дмитриевна, аспирант кафедры терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний, ПГМУ; e-mail: smehach713@mail.ru

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.