

ИЗУЧЕНИЕ ДИФФУЗИИ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В ДЕНТИНЕ ЗУБА ЧЕЛОВЕКА

© 2018 г. А.А. Селифонов* **, В.В. Тучин* *** ****

*Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

**Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, 112

***Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский просп., 49

****Институт проблем точной механики и управления РАН, 410028, Саратов, ул. Рабочая, 24

E-mail: Selif-ei@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.05.17 г.

Исследована диффузия водного раствора красителя метиленового синего через срез дентина зуба человека с помощью спектроскопии диффузного отражения. Для количественной оценки скорости диффузии применен метод, основанный на использовании модифицированного закона Бугера–Ламберта–Бера, и проведена аппроксимация экспериментальных данных в рамках модели свободной диффузии. Впервые получено значение коэффициента диффузии метиленового синего в срезе дентина зуба человека *ex vivo*. Среднее значение коэффициента диффузии составило $(6,74 \pm 1,32) \cdot 10^{-6}$ см²/с. Также методами рентгенофлуориметрии и сканирующей электронной микроскопии определен микроэлементный состав образцов и изучена морфология поверхности различных участков срезов зуба человека, для которых исследовалась диффузия красителя.

Ключевые слова: дентин, оптическая спектроскопия, рентгенофлуориметрия, сканирующая электронная микроскопия, коэффициент диффузии, метиленовый синий, стоматология.

DOI: 10.1134/S0006302918060212

Изучение диффузии химических агентов в биологических тканях, в том числе в твердых тканях, является важной и актуальной задачей в области практической медицины. Изучение метаболических процессов, осуществляемых посредством диффузии, а также диагностика различных заболеваний на ранних этапах на молекулярном уровне получили в последнее время большое развитие и популярность с использованием современных оптических методов [1–5]. Актуальность усовершенствования диагностических возможностей, лечение различных (в том числе онкологических) заболеваний, применение иммунохимических методов, развитие методов тераностики и др. привлекает внимание многих исследователей к вопросам диффузии различных агентов в биологических тканях [6–14]. Открытие во второй половине двадцатого века лазеров послужило развитию перспективного направления в медицине – фотодинами-

ческой терапии с применением целого класса веществ, называемых фотосенсибилизаторами (ФС). Механизм цитотоксического действия фотодинамической терапии можно описать следующим образом. Введенные в биосистему молекулы ФС избирательно накапливаются в мембранах и митохондриях опухолевых клеток или в патогенах. Когда концентрация ФС достаточна, он активируется при воздействии света видимого или ближнего инфракрасного диапазона на длине волны, эффективной для возбуждения молекул ФС. При облучении сенсibilизированных клеток светом возбужденные молекулы ФС взаимодействуют с растворенными в ткани молекулами кислорода, находящимся в основном триплетном состоянии (³O₂). В результате происходит переход нетоксичного молекулярного кислорода из триплетного состояния в короткоживущее синглетное состояние (¹O₂), находясь в котором, кислород обладает сильным цитотоксическим действием [15–19]. Синглетный кислород за короткое время жизни успевает полностью разрушить опухолевые

Сокращения: ФС – фотосенсибилизатор, МС – метиленовый синий.

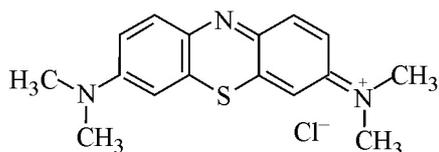


Рис. 1. Структурная формула красителя метиленового синего.

клетки или патогены. При этом цитотоксический эффект напрямую зависит от глубины проникновения ФС определенной концентрации и света в ткани.

В последние годы применение фотодинамической терапии для антимикробных целей стремительно расширяется. Наиболее успешные результаты получаются при сочетании местного применения ФС на очаг инфекции и последующего облучения низкоинтенсивным излучением, которое должно поглощаться молекулами ФС, накопившимися в очаге инфекции, который может находиться на некоторой глубине внутри ткани [20–24]. Для эффективного использования и улучшения метода требуется изучение диффузии ФС в различных биологических тканях.

В этой связи одним из перспективных агентов для применения в тераностике, новой области медицины, использующей одновременное проведение диагностических и терапевтических процедур, является краситель метиленовый синий (МС), широко используемый в медицинской практике. МС ($M = 319,85$ г/моль) представляет собой темно-зеленые кристаллы с бронзовым блеском, растворимые в воде, этаноле, нерастворимые в эфире, бензоле и имеет структурную формулу, представленную на рис. 1. Это тиазиновый катионный краситель, проявляющий себя в различных применениях как эффективное средство с минимальными побочными эффектами. В частности, он актуален при использовании как антимикробное средство при фотодинамической терапии [25–27], а также применяется как противоядие (антидот) при отравлениях сероводородом, угарным газом и цианистыми соединениями. Препарат может использоваться для приема внутрь как взрослыми, так и детьми старше одного года, при местном применении препарат не абсорбируется в системный кровоток.

Водный раствор МС в области спектра 200–800 нм имеет несколько пиков поглощения. Основной пик поглощения красителя имеет два максимума: первый при 668 нм, что соответствует мономерной форме красителя, и второй, значительно менее выраженный, на длине волны 612 нм, соответствующий димерной форме. В ультрафиолетовой области спектра МС имеет

два значительно меньших пика поглощения с максимумами на длинах волн 246 и 295 нм.

МС обладает способностью связываться с карбоксилатными или сульфонатными группами органических молекул и легко проникать в клетки микробов, чем обусловлены его антисептические свойства [28]. Он применяется в стоматологии для определения степени деминерализации эмали зубов, лечения стоматита, кариеса, молочницы, герпеса в полости рта, а также для ускорения регенерации слизистых [17,29–38]. МС обладает минимальной токсичностью, безопасностью и низкой стоимостью. В последнее время МС все больше привлекает интерес исследователей и клиницистов благодаря наличию фотодинамической антибактериальной активности.

Несмотря на значительное число публикаций о применении МС в медицинских целях, изучение биофизических явлений, лежащих в основе технологии применения биосовместимых красителей для диагностики, фотодинамической и фототермической терапии, остается актуальным. В том числе актуальным является изучение диффузии агентов в биологических тканях.

Целью настоящей работы является определение скорости диффузии водного раствора МС в dentine зуба человека с помощью метода спектроскопии диффузного отражения и использования модели свободной диффузии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для *ex vivo* исследования послужили три среза моляров постоянных зубов человека. Зубы были извлечены у пациентов в стоматологической клинике по медицинским показаниям. Удаленные зубы хранили в физиологическом растворе при 4°C в темном месте не более 30 мин. Влажные зубные образцы разрезали алмазным диском на срезы толщиной около 1 мм. Часть образцов разрезали вдоль оси роста, а часть – поперек. Срезы протравливали 35%-й ортофосфорной кислотой в течение 15 с, далее удаляли кислоту с помощью струи воды. Затем с помощью щетки и 95%-го этилового спирта проводили очистку поверхности от продуктов распиливания и других внешних загрязнителей, для этого образец помещали в ультразвуковую ванну Techsonic UD100 SH-45 L (Eumax, Китай) на 10 мин и протирали его безворсовой салфеткой, смоченной в спирте. Высушивали образцы на воздухе в течение суток. Толщину образцов биоткани измеряли микрометром, измерения проводили в нескольких точках образца и усредняли. Точность каждого измерения ± 10 мкм.

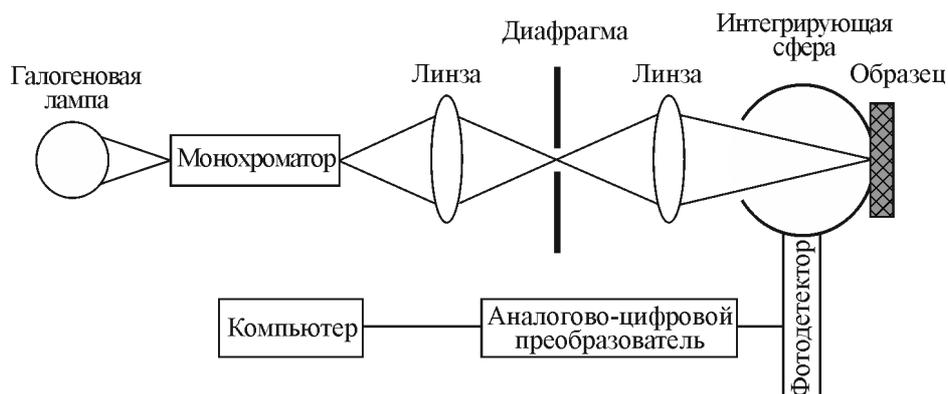


Рис. 2. Принципиальная оптическая схема двухлучевого спектрофотометра с интегрирующей сферой.

Морфологию поверхности срезов зубной ткани исследовали на сканирующем электронном микроскопе Mira II LMU (Tescan, Чехия) в режиме детектирования вторичных электронов (при ускоряющем напряжении 30 кВ). Для этого образцы фиксировали на специальной углеродной подложке (углеродный скотч) и напыляли на их поверхность золото. Элементный состав образцов зуба человека определяли на сканирующем электронном микроскопе (в %) и на рентгенофлуориметре Inpov X-5000 (Olympus, США) с кремниевым дрейф-детектором (в ppm).

Для измерения коэффициентов отражения в оптическом диапазоне использовали двухлучевой спектрофотометр UV-2550 (Shimadzu, Япония) с интегрирующей сферой в режиме диффузного отражения в спектральном диапазоне 400–1000 нм. Система измерений включает в себя источник света, монохроматор для выделения требуемого спектрального участка излучения, систему формирования профиля монохроматического светового пучка, интегрирующую сферу с встроенным фотоприемником и систему регистрации сигнала. Все составляющие представляют собой единую конструкцию спектрофотометра, за исключением интегрирующей сферы, которая является сменной приставкой [39]. Источником излучения служила галогеновая лампа с фильтрацией излучения в исследуемом спектральном диапазоне. Нормировку спектров перед началом измерений проводили на сигнал от эталонного отражателя BaSO_4 . Все эксперименты проводили при комнатной температуре ($\sim 20^\circ\text{C}$). На рис. 2 указано расположение образца при регистрации спектров диффузного отражения.

В качестве проникающего агента использовали метиленовый синий квалификации «ч.д.а.». Определение коэффициента диффузии МС в биоткани основано на измерении кинетики изменения спектра диффузного отражения.

Для проведения спектрофотометрических измерений каждый образец среза зуба фиксировали в специальном зажиме в виде рамки с окном 5×5 мм, погруженной в кювету с водным раствором МС с концентрацией $4,5 \cdot 10^{-5}$ М. Измерения коэффициента диффузного отражения проводили в течение двух–восьми часов до прекращения изменений в спектрах отражения. Для количественной оценки изменения содержания красителя в биоткани и расчета коэффициента диффузии применяли метод, основанный на использовании модифицированного закона Бугера–Ламберта–Бера [40,41]:

$$A = -\ln \frac{I}{I_0} = \mu_a \sigma \rho + G, \quad (1)$$

где μ_a – коэффициент поглощения; ρ – расстояние между источником и детектором обратно рассеянного излучения; σ – дифференциальный фактор длины пути фотона, учитывающий удлинение траектории регистрируемых фотонов, обусловленное многократным рассеянием, G – константа, определяемая геометрией среды и эксперимента [2].

С учетом уравнения (1) оптическая плотность образца среза дентина, измеренная в различные моменты времени при проникновении красителя в биоткань, определяется как [42,43]:

$$A(t, \lambda) = A(t = 0, \lambda) + \Delta\mu_a(t, \lambda)L, \quad (2)$$

где t – время; $\Delta\mu_a(t, \lambda) = \epsilon(\lambda)C(t)$ – разность между коэффициентами поглощения биоткани в определенный момент времени и начальный момент времени; $\epsilon(\lambda)$ – молярный коэффициент поглощения красителя, л/(см·моль); $C(t)$ – концентрация красителя в биоткани, моль/л; $A(t = 0, \lambda)$ – оптическая плотность образца, измеренная в начальный момент времени, до

его окрашивания; L – эффективная длина пути регистрируемых фотонов, зависящая как от поглощающих, так и от рассеивающих характеристик среды, а также от расстояния между источником и детектором, см.

Процесс транспорта красителей в биотканях может быть описан в рамках модели свободной диффузии [44]. При этом обычно используются следующие допущения относительно процесса переноса: 1) имеет место только концентрационная диффузия, т.е. поток красителя в биоткани в данной точке пропорционален градиенту концентрации красителя в этой точке; 2) коэффициент диффузии постоянен во всех точках внутри исследуемого образца биоткани.

Геометрически образец биоткани представляется в виде плоскопараллельной пластины конечной толщины. Поскольку при проведении экспериментов проникновение красителя осуществляется только с одной стороны образца, то можно решать одномерную задачу диффузии, т.е. уравнение:

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2}, \quad (3)$$

представляющее собой второй закон Фика, где $C(x, t)$ – концентрация красителя (метиленового синего) в образце дентина, г/мл; D – коэффициент диффузии, см²/с; t – время, в течение которого происходит процесс диффузии, с; x – пространственная координата по толщине образца биоткани, см. Поскольку в наших экспериментах объем раствора метиленового синего значительно превышает объем образца зуба, то соответствующие граничные условия имеют следующий вид:

$$C(0, t) = C_0; \quad \frac{\partial C(l, t)}{\partial x} = 0, \quad (4)$$

где C_0 – концентрация красителя в растворе, г/мл; l – толщина образца биоткани, см. Второе граничное условие отражает тот факт, что диффузия метиленового синего внутрь образца зуба происходит только с одной стороны образца. Начальные условия отражают отсутствие красителя во всех внутренних точках образца среза зуба до его взаимодействия с красителем, т.е.

$$C(x, 0) = 0. \quad (5)$$

Решение уравнения диффузии (3) с учетом начальных (5) и граничных (4) условий позволяет оценить среднюю концентрацию раствора метиленового синего внутри образца в каждый момент времени [45]:

$$C(t) = C_0 \left(1 - \frac{8}{\pi^2} \right) \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{(2i+1)^2} \times \exp(- (2i+1)^2 t \frac{\pi^2 D}{l^2}), \quad (6)$$

где $C(t)$ – усредненная по объему концентрация красителя во внутритканевой жидкости среза зуба. В первом приближении уравнение (6) может быть записано в виде:

$$C(t) = C_0 \left(1 - \exp\left(-\frac{t\pi D}{l^2}\right) \right), \quad (7)$$

а уравнение (2) как:

$$\begin{aligned} \Delta A(t, \lambda) &= A(t, \lambda) - A(t=0, \lambda) = \\ &= \Delta \mu_a(t, \lambda) L = \varepsilon(\lambda) C_0 \left(1 - \exp\left(-\frac{t\pi D}{l^2}\right) \right) L. \end{aligned} \quad (8)$$

Из анализа кинетики изменения ΔA (эффективная оптическая плотность, рассчитанная в момент времени t) подбирали величину D по уравнению (8), учитывая коэффициенты, полученные после аппроксимации данных.

При исследовании биотканей эффективную оптическую плотность можно описать экспоненциальным законом (8), однако необходимо учитывать, что из-за многократного рассеяния эффективный путь миграции фотона, прежде, чем он будет поглощен, скорее всего не будет равен толщине биоткани. Для слоя толщиной d можно использовать диффузионное уравнение [2] для получения средней длины пробега L_t фотонов (теоретическое):

$$L = \frac{\mu'_{\text{eff}} (\mu'_s d - 1) \exp\left(\frac{2\mu'_{\text{eff}}}{\mu'_s}\right) - (\mu'_s d + 1)}{2\mu_a \mu'_s \exp\left(\frac{2\mu'_{\text{eff}}}{\mu'_s}\right) - 1}, \quad (9)$$

где μ'_{eff} – эффективный коэффициент ослабления или обратная длина диффузии, 1/см; μ_a – коэффициент поглощения, 1/см; μ'_s – приведенный (транспортный) коэффициент рассеяния, 1/см; d – толщина образца, см;

Для дентина зуба человека [47] для $\lambda = 633$ нм: $g = 0,9$; $\mu_a = 4$ см⁻¹; $\mu_s = 280$ см⁻¹.

$$\mu'_{\text{eff}} = [3\mu_a (\mu'_s + \mu_a)]^{1/2}, \quad (10)$$

$$\mu'_s = \mu_s (1 - g), \quad (11)$$

где g – параметр анизотропии рассеяния.

Таблица 1. Элементный состав исследуемых образцов зуба человека

Рентгенофлуориметрический анализ	Элемент ppm	S 3170	Cl 332	K 401	Sc 6067	Fe 583	Ni 64	Cu 20	Zn 432	As 13	Rb 817	Sr 491	W 71
Сканирующая электронная микроскопия	Элемент %	C 51,0		N 10,1		O 23,6		P 4,6			Ca 10,2		

Для оценки средней длины пробега L_e фотонов (экспериментальной) учитывали коэффициент, пропорциональный величине ϵC_0 из полученного уравнения аппроксимации экспериментальных данных. Поскольку в качестве агента диффузии использовали окрашенный водный раствор метиленового синего, то срез дентина по истечению времени t заметно окрашивался, тем самым увеличилось поглощение образца. Поэтому, для того чтобы получать правильные значения L_e , в формулу (8) вводили поправочный коэффициент x :

$$\Delta A(t, \lambda) = A(t, \lambda) - A(t=0, \lambda) = \Delta \mu_a(t, \lambda)L = (12)$$

$$= x \epsilon(\lambda) C_0 \left(1 - \exp\left(-\frac{t\pi D}{l^2}\right) \right) L,$$

где x учитывает удлинение траектории регистрируемых фотонов из-за многократного рассеяния, расстояние между источником и детектором обратно рассеянного излучения в конкретном спектрофотометре, а также геометрию измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Твердая часть зуба состоит из эмали и дентина. Эмаль является сравнительно прозрачной

тканью, поэтому оптические свойства зуба (отражение, поглощение, рассеяние, цвет) определяются в основном дентином. Дентин построен из основного вещества, пронизанного канальцами, которые начинаются в пульпе, около внутренней поверхности дентина, и веерообразно расходятся к его наружной поверхности. Поглотителями в дентине являются белковоподобные молекулы, а рассеивателями – кристаллы гидроксиапатита диаметром 2,0–3,5 нм и длиной вплоть до 100 нм. Элементный состав образцов зуба приведен в табл. 1. Можно считать, что зуб представляет собой пучки согласованных природных световодов [46]. Извитая форма световодов определяет высокую эффективность освещения пульпы практически независимо от того, каким образом свет попадает на внешнюю поверхность зуба. Волноводный эффект существенно более выражен в дентине, чем в эмали. Отражение света на периодических структурах зубной ткани дает информацию о ее строении [2]. Дентин и эмаль имеют неровную поверхность и прочно сцеплены между собой за счет дентино-эмалевого соединения (рис. 3а).

На продольном срезе (рис. 3а) дентинные канальца идут параллельно срезу, имея различную форму, угол загиба и диаметр. У поперечного среза дентинные канальцы срезаны и рас-

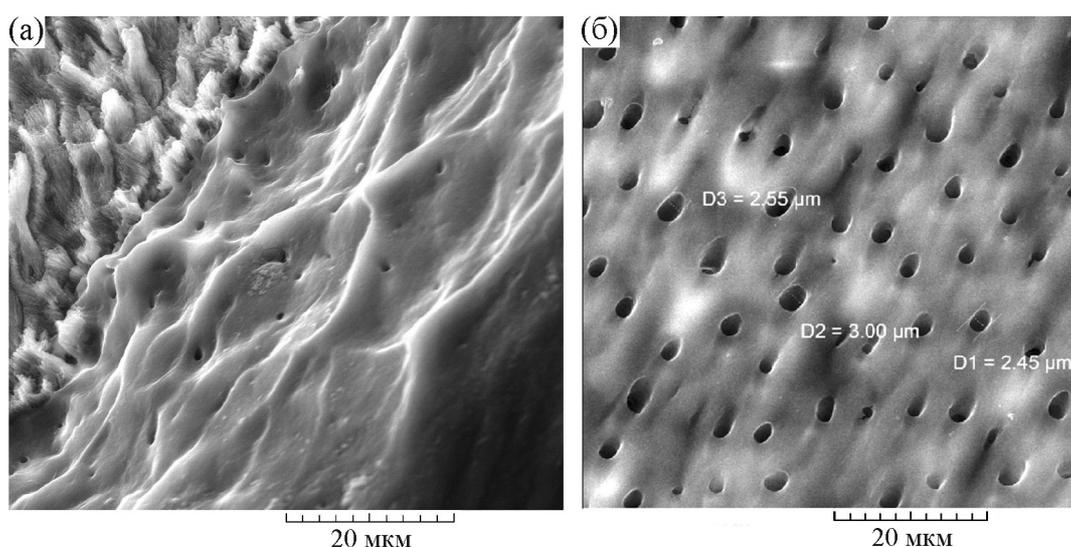


Рис. 3. Электронные микрофотографии среза зуба (при увеличении в 5000 раз: (а) – на границе эмаль-дентин; (б) – поперечного среза.

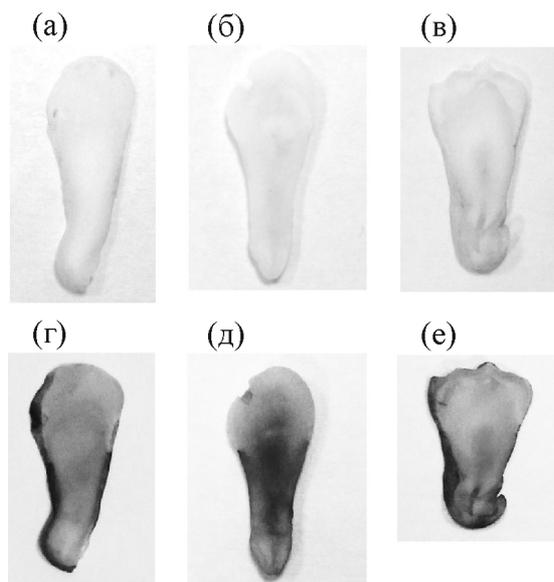


Рис. 4. Фото исследуемых образцов зубов человека до (а–в) и после (г–е) диффузии МС.

полагаются под разным углом к поверхности, размер дентиновых тубул в среднем равен 2,5–3,5 мкм (рис. 3б). Дентинные каналы имеют S-образную форму в области коронки зуба, в области корня они проходят прямолинейно, расширяясь веерообразно кверху к наружной поверхности. В различных частях поперечного среза дентина имеется разное количество и плотность дентинных канальцев.

Были исследованы два образца зубной ткани второго моляра разных людей (рис. 4а, 4б) и один образец зубной ткани третьего моляра (рис. 4в). Проникая в дентин зуба, МС изменяет форму спектров отражения образцов, что проявляется в виде характерных полос поглощения МС на спектре диффузного отражения образца дентина (рис. 5). Из представленного рисунка хорошо видно, что все изменения в спектрах отражения локализованы в спектральной области 580–700 нм, соответствующей полосам поглощения димерной и мономерной форм водного раствора МС, спектр поглощения которого представлен на рис. 6.

Проникновение красителя в срез зуба не вызывает заметных изменений рассеивающих характеристик дентина, о чем свидетельствует отсутствие изменений в спектрах отражения в области 750–800 нм, в которой форма спектра отражения определяется только спектральной зависимостью коэффициента рассеяния, а МС не имеет полос поглощения. В области 650–700 нм, соответствующей максимуму полосы поглощения красителя, отчетливо видно изменение в спектре отражения. В области 580–

650 нм наблюдается общее снижение спектра отражения под влиянием второго пика поглощения (609 нм) МС, соответствующего димерной форме красителя. В течение первого часа изменения в спектре диффузного отражения значительны и хорошо заметны (рис. 6). Затем изменения в спектрах становятся минимальными, что говорит о насыщении среза дентина красителем по всему объему. При этом положение пика поглощения мономеров МС не смещается и остается вблизи 668 нм. Для образца среза дентина, спектр диффузного отражения которого представлен на рис. 6, насыщение произошло через 145 мин нахождения в водном растворе МС.

Данные изменения также видны на кинетических зависимостях коэффициента отражения образца, измеренных для разных длин волн (рис. 7). Из рис. 7 видно, что коэффициент отражения образца практически не меняется ни в области 400 нм, ни в области 750 нм, для которых интенсивность обратного рассеянного излучения определяется рассеивающими характеристиками исследуемого образца. В то же время на длинах волн 612 и 668 нм наблюдается спад коэффициента отражения, вызванный ростом поглощения образца вследствие проникновения красителя, при этом в первые 30 мин коэффициент отражения имеет достаточно резкий спад, последующие изменения коэффициента отражения носят плавный монотонный характер вплоть до полного прекращения изменения. Эти кинетические зависимости представляют собой типичные диффузионные кривые.

На рис. 8 показана типичная кинетическая кривая для изменения ΔA образца зуба, при его окраске МС, на длине волны 668 нм. Хорошо видно, что изменения оптической плотности образца зуба наблюдаются в течение примерно 90 мин с момента его взаимодействия с раствором МС, после чего диффузия красителя в образец прекращается и изменения оптической плотности не наблюдаются. Коэффициент диффузии МС определяли из анализа участка экспериментальной кривой, соответствующего изменению оптической плотности, с учетом толщины образца, методом наименьших квадратов. Вычисления для каждого образца выполнялись для десяти длин волн в спектральной области 600–700 нм, а полученные значения усреднялись. Результаты расчета для всех образцов представлены в табл. 2, среднее значение коэффициента диффузии составило $(6,74 \pm 1,32) \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$. Найденная средняя длина пробега фотонов $L_l = 0,085 \pm 0,014 \text{ см}$, т.е. свет ослабевает в e -раз на длине, меньшей длины образца

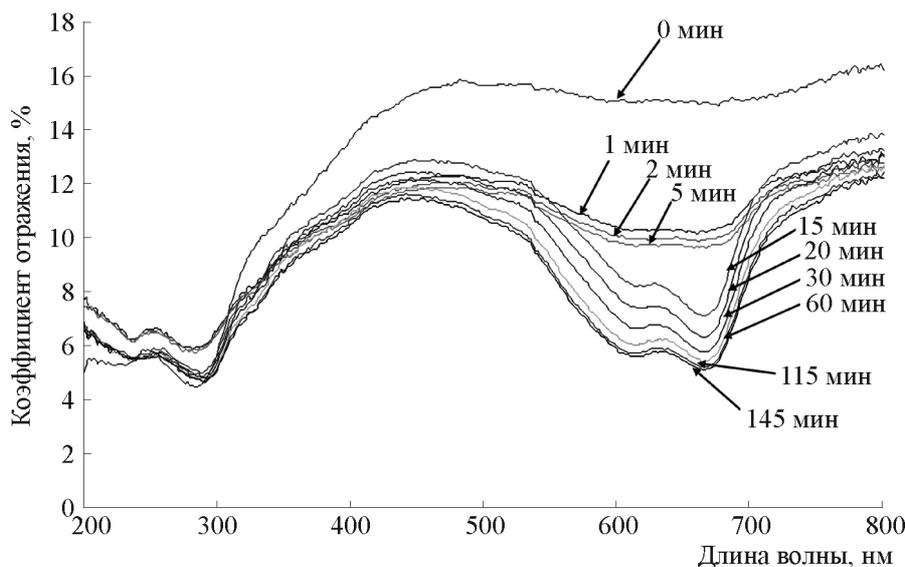


Рис. 5. Спектры диффузного отражения дентина в процессе диффузии метиленового синего, измеренные в различные моменты времени.

среза дентина зуба человека. При использовании коэффициентов, полученных после аппроксимации данных, $L_e = 4,6$ см, что значительно превосходит L_r . Из-за увеличения оптического поглощения образцов за счет диффузии красителя значение поправочного коэффициента χ в формуле (12) (при $L_e = 0,08$ см), равнялось 52,1.

Диаметр и объем дентинных канальцев в значительной мере зависят от возраста исследуемых зубов и состояния здоровья человека и были различными у каждого из исследуемых образцов. Рассчитанная эффективная оптическая плотность зависит от пористости и структурно-морфологического строения каждого образца зуба, поскольку определяется из экспериментально полученных коэффициентов диффузного отражения (во времени) дентина, что и составляет основную погрешность определения коэффициента диффузии красителя в образце. Типичные значения коэффициентов диффузии водных растворов красителей в биоткани находятся в диапазоне 10^{-5} – 10^{-6} см²/с [45]. Значения коэффициента диффузии МС в дентине

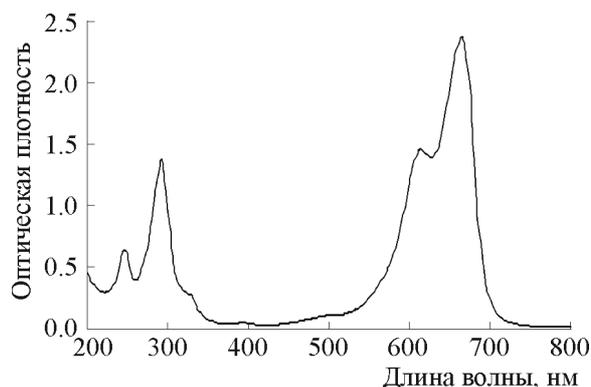


Рис. 6. Спектр поглощения водного раствора метиленового синего ($4,5 \cdot 10^{-5}$ М).

зуба человека нами в литературе не найдены. Авторами работы [43] методом регистрации коэффициента отражения было найдено среднее значение коэффициента диффузии МС в патологически измененной слизистой оболочке верхнечелюстной пазухи человека, составившее

Таблица 2. Значения коэффициентов диффузии МС и длины пробега фотонов в срезах дентина зуба человека

№ среза	Толщина среза, мм	Коэффициент диффузии, см ² /с	Средняя длина пробега фотонов L_r , см
1	0,92	$(7,44 \pm 0,60) \cdot 10^{-6}$	0,080
2	0,97	$(6,15 \pm 0,20) \cdot 10^{-6}$	0,093
3	0,93	$(6,63 \pm 0,40) \cdot 10^{-6}$	0,083
Среднее значение	$0,94 \pm 0,05$	$(6,74 \pm 1,32) \cdot 10^{-6}$	$0,085 \pm 0,014$

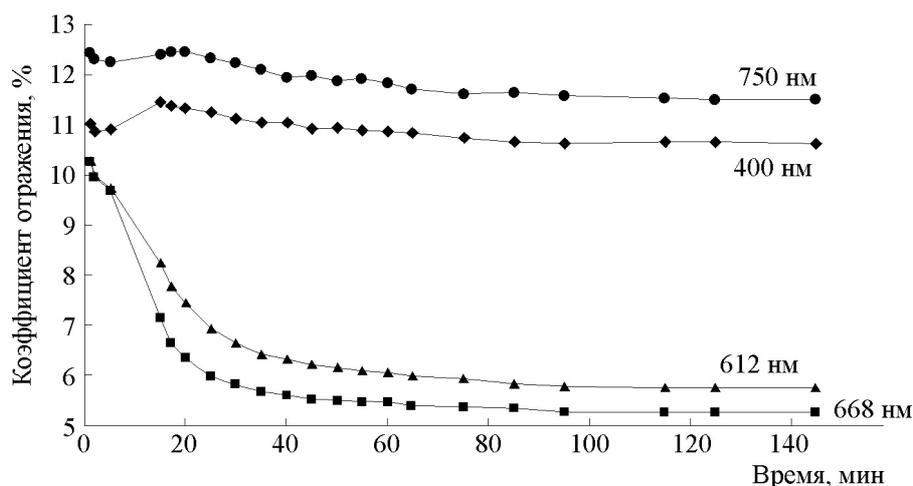


Рис. 7. Кинетические зависимости изменения коэффициента отражения одного из образцов дентина для разных длин волн при воздействии водного раствора МС.

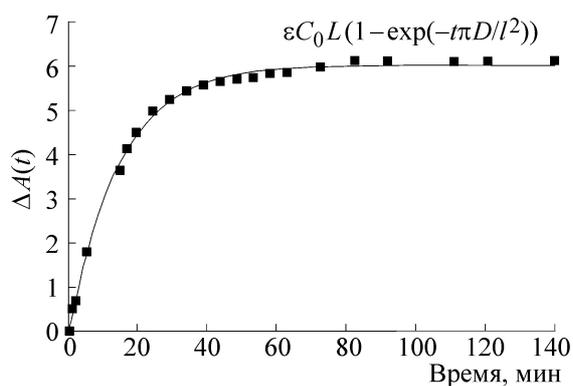


Рис. 8. Кинетика разностной эффективной оптической плотности образца дентина при его взаимодействии с водным раствором МС (длина волны 668 нм). Символы соответствуют экспериментальным данным, сплошная кривая представляет аппроксимацию экспериментальных данных в рамках предложенной модели свободной диффузии.

$(4,8 \pm 2,9) \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$. Это на порядок меньше, чем полученное нами значение коэффициента диффузии, что может быть объяснено пористым строением и отсутствием возможности заметного набухания и сужения пор дентина зуба человека по сравнению со слизистой тканью.

Полученные результаты имеют общий характер и могут быть использованы не только в видимом, но и в терагерцовом диапазоне, как для исследования кариеса зубов, так и для мониторинга скорости диффузии агентов в твердых тканях и материалах, включая подповерхностную окраску предметов старинной жи-

вописи [48–51]. С другой стороны, развиваемые терагерцовые технологии мониторинга диффузии агентов и скрытой окраски твердых материалов могут существенно обогатить неинвазивные методы диагностики и мониторинга в стоматологии.

ВЫВОДЫ

В работе представлены экспериментальные данные исследования диффузии фотодинамического красителя метиленового синего, растворенного в дистиллированной воде, через срез дентина зуба человека *ex vivo*. Согласно проведенным исследованиям установлено, что время полного окрашивания образцов зубной ткани различно и колеблется от 60 до 185 мин, что зависит от физиологических особенностей образцов и возраста пациентов. Впервые определен коэффициент диффузии МС в дентине зуба человека, который составил в среднем $(6,74 \pm 1,32) \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$. Найдена средняя длина пробега фотонов $L_f = 0,085 \pm 0,014 \text{ см}$ и введен поправочный коэффициент $\chi = 52,13$, в формулу для нахождения эффективной оптической плотности, которая успешно применялась для нахождения экспериментальной длины пробега фотонов при исследовании диффузии водного раствора метиленового синего в дентин зуба человека. Результаты исследований могут быть применены для усовершенствования имеющихся методов ранней диагностики кариеса, а также для фотодинамической терапии заболеваний полости рта, в частности зубной ткани.

Выражаем благодарность директору ООО НПП «Наноструктурная технология стекла» Ю.С. Скибиной за помощь в подготовке образцов; заведующему лабораторией диагностики наноматериалов и структур ОНИ НС и БС СГУ А.М. Захаревичу за помощь в изучении морфологии поверхности образцов зуба человека методом сканирующей электронной микроскопии. ВВТ благодарен за финансовую поддержку Российскому фонду фундаментальных исследований (грант № 17-00-00272 в рамках комплексного проекта № 17-00-00275-К).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Тучин, *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* (Физматлит, М., 2010).
2. V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostics* (SPIE Press, Bellingham, 2015).
3. V. V. Tuchin, IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. **13**, 1621 (2007).
4. V. V. Tuchin, *Optical Clearing of Tissues and Blood* (WA: SPIE Press, Bellingham, 2006).
5. D. Zhu, K. V. Larin, Q. Luo, V. V. Tuchin, Laser Photonics **5** (7), 732 (2013).
6. S. Carvalho, L. Gueiral, E. Nogueira, et al., J. Biomed. Opt. **9** (22), 1506 (2017).
7. E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Yu. P. Sinichkin, et al., J. Biomed. Opt. **7**, 471 (2002).
8. M. H. Khan, B. Choi, S. Chess, et al., Lasers Surg. Med. **34** (2), 83 (2004).
9. L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira, et al., J. Biomed. Opt. **20** (5), 059801 (2015).
10. L. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira, et al., Laser Phys. **23**, 075606 (2013).
11. M. G. Ghosn, N. A. Befru, E. F. Carbajal, et al., Opt. Laser Eng. **46** (12), 911 (2008).
12. A. C. Ribeiro, O. Ortona, S. M. N. Simxes, et al., J. Chem. Eng. Data. **51** (5), 1836 (2006).
13. H. Q. Zhong, Z. Y. Guo, H. J. Wei, et al., Las. Phys. Lett. **7** (4), 315 (2010).
14. А. Н. Башкатов, Э. А. Генина, Т. Г. Каменских и др., Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. **16** (3), 167 (2016).
15. A. C. Kubler, T. Naase, C. Staff, et al., Med. Laser Appl. **20**, 37 (2005).
16. M. R. Hamblin, T. Hasan, Photochem. Photobiol. Sci. **3** (5), 436 (2004).
17. А. А. Красновский, А. И. Григорьев и Ю.А. Владимиров, в сб. *Основы и применение фотодинамической и лазерной терапии* (МАКС Пресс, М., 2015), сс. 173–218.
18. B. C. Wilson, Ciba Found. Symp. **146**, 60 (1989).
19. T. Dai, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy **6** (3), 170 (2009).
20. Е. С. Тучина, В. В. Тучин, Г. Б. Альтшулер и др., Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. **8** (1), 21 (2008).
21. E. S. Tuchina, N. F. Permyakova, and V. V. Tuchin, Proc. SPIE **6535**, 301 (2007).
22. E. A. Genina, A. N. Bashkatov, G. V. Simonenko, et al., J. Biomed. Opt. **9** (4), 828 (2004).
23. V. V. Tuchin, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, et al., Lasers Surg. Med. **33**, 296 (2003).
24. R. Hayek, N. Araujo, M. A. Gioso, et al., J. Periodontol. **76**, 1275 (2005).
25. N. G. Loebel, C. C. Galler, and R. C. Andersen, Int. J. Oral Health Dent. Manag. **2** (1), 1(2018).
26. R. Probst, F. Reinecke, and G. Geginat. Eur. Surg. Res. **37**, 246 (2005).
27. M. Wilson, J. Appl. Bacteriol. **75**, 299 (1993).
28. I. S. Ovchinnikov, G. M. Shoub, and V. V. Tuchin, Proc. SPIE **4001**, 390 (2000).
29. E. A. Genina, V. A. Titorenko, A. V. Belikov, et al., J. Biomed. Opt. **20** (12), 128004 (2015).
30. M. Wilson, J. Appl. Bacteriol. **75**, 299 (1993).
31. M. Bhatti, S. Nair, A. MacRobert, et al., Curr. Microbiol. **43**, 96 (2001).
32. N. Kömerik and A. MacRobert, J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. **25**, 487 (2006).
33. К. Конопка and Т. Goslinski, J. Dent. Res. **86**, 694 (2007).
34. P. Meisel and T. Kocher, J. Photochem. Photobiol. B **79**, 159 (2005).
35. C. N. Street, A. J. Gibbs, L. A. Pedigo, et al., J. Photochem. Photobiol. B **85**, 137 (2009).
36. G. Altschuler and V. V. Tuchin, U.S. Patent 7,354,448 (2008).
37. A. Braun, C. Dehn, F. Krause, et al., J. Clin. Periodontol. **35**, 877 (2008).
38. А. Б. Узденский, Биофизика **61** (3), 547 (2016).
39. В. И. Кочубей и А. Н. Башкатов, *Спектроскопия рассеивающих сред: Учеб. пособие* (Новый ветер, Саратов, 2014).
40. J. R. Mourant, T. M. Johnson, G. Los, et al., Phys. Med. Biol. **44**, 1397 (1999).
41. A. Zourabian, A. Siegel, B. Chance, et al., J. Biomed. Opt. **5**, 391 (2000).
42. E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, Medic. Laser Application **23** (1), 31 (2008).
43. Э. А. Генина, А. Н. Башкатов, Е. Э. Чикина и др., Биофизика **52** (6), 1104 (2007).
44. Э. А. Генина, А. Н. Башкатов и В. В. Тучин, *Квантовая электроника* **44** (7), 689 (2014).
45. А. Котык и К. Яначек, *Мембранный транспорт* (Мир, М., 1980).
46. V. N. Grisimov, Proc. SPIE **3564**, 237 (1999).
47. V. V. Tuchin and G. V. Altschuler, in *Fundamentals and Applications of Biophotonics in Dentistry* (Imperial College Press, UK, 2007), Chapter 9.
48. М. М. Назаров, А. П. Шкуринов, Е. А. Кулешов и др., Квантовая электроника **38** (7), 647 (2008).

49. А. А. Езерская, И. В. Романов, О. А. Смолянская и др., Науч.-технич. вестн. Санкт-Петербургского государственного университета информационных технологий, механики и оптики, **6** (76), 92 (2011).
50. J. W. Bowen, T. Owen, J. B. Jackson, et al., IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol. **5** (6), 1005 (2015).
51. О. А. Smolyanskaya, I. J. Schelkanova, M. S. Kulya, et al., Biomed. Opt. Express **9** (3) 1198 (2018).

Investigation of the Diffusion of Methylene Blue through Dentine in the Human Tooth

A.A. Selifonov* ** and V.V. Tuchin* * ******

**Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevskii,
Astrakhanskaya ul. 83, Saratov, 410012 Russia*

***Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, B. Kazachaya ul. 112, Saratov, 410012 Russia*

****Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics,
Kronverkskiy prosp. 49, St. Petersburg, 197101 Russia*

*****Institute of Precision Mechanics and Control, Russian Academy of Sciences,
ul. Rabochaya 24, Saratov, 410028 Russia*

The diffusion of an aqueous solution of methylene blue through a section of dentine of the human tooth was studied with the use of diffuse reflectance spectroscopy. The method based on a modified Bouguer–Lambert–Beer law was applied for the quantitative assessment of the rate of diffusion and experimental data were fitted by the approximation within the free-diffusion model. For the first time, the coefficient of the diffusion of methylene blue through a section of dentine of the human tooth *ex vivo* was calculated. The mean value of the diffusion coefficient was $(6.74 \pm 1.32) \cdot 10^{-6}$ cm²/s. The microelement composition of the samples was determined using X-ray fluorescent method and scanning electron microscopy. The morphology of the surface of various parts of sections of the human tooth was investigated.

Keywords: dentine, optical spectroscopy, X-ray fluorescence, scanning electron microscopy, diffusion coefficient, methylene blue, dentistry