



УДК 661.31

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТАКТНОЙ, А ТАКЖЕ ПОРАЖЕННОЙ КАРИОЗНЫМ ПРОЦЕССОМ ЭМАЛИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЗУБА МЕТОДОМ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОМИКРОСКОПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

П.В. СЕРЕДИН¹
А.Н. ЛУКИН¹
Ю.А. ИППОЛИТОВ²

¹⁾ Воронежский государственный
университет

²⁾ Воронежская государственная
медицинская академия
им. Н.Н. Бурденко

e-mail: paul@phys.vsu.ru

В нашей работе мы провели исследования интактной, а также пораженной кариозным процессом эмали человеческого зуба с привлечением методов ИК-спектроскопии с использованием синхротронного излучения.

Показано, что кариес эмали характеризуется ростом деформационных и валентных колебаний связей N-C-O, N-H и C=O, что говорит о деструктивных процессах в органическом матриксе кристалла гидроксиапатита.

В результате подповерхностной деминерализации в дальнейшем разрушается и сам кристалл эмали.

Ключевые слова: интактная эмаль, кариес, ИК-спектроскопия.

Введение. Известно, что эмаль — самая твердая ткань человеческого организма. Это позволяет ей в ходе выполнения зубом его функции противостоять воздействию больших механических нагрузок. Вместе с тем она весьма хрупка, и в ней при значительной нагрузке могли бы возникнуть трещины, однако этого обычно не происходит благодаря тому, что под ней находится поддерживающий слой более упругого дентина.

Эмаль — наиболее минерализованная ткань организма. Она на 95% состоит из минеральных веществ (преимущественно гидроксиапатита — ГА, карбонатапатита, фторапатита и др.), на 1,2% — из органических, и 3,8% приходится на воду, связанную с кристаллами и органическими компонентами, и свободную [1].

Сведения об органических веществах, содержащихся в зрелой эмали, очень условны. G. Jenkins [2] приводит следующие цифровые данные о содержании органических веществ в эмали премоляров и моляров (в % от сухой массы): нерастворимые белки — 0,3—0,4%, растворимые — 0,05%, жиры — 0,6%, цитраты — 0,1%. Самые распространенные белки (около 90% от всей органической фракции) — гидрофобные протеины (амелогенины), обогащенные аминокислотами, 10% — кислотные белки — энамелины [3].

Органический матрикс, связанный с кристаллами и в ходе образования эмали обеспечивавший процессы их роста и ориентировки, по мере созревания эмали почти полностью утрачивается. Он сохраняется в виде тончайшей трехмерной белковой сети, нити которой располагаются между призмами. В исследованиях последних лет получены новые данные о природе и функции органической матрицы эмали. В частности, подтверждено, что ее важнейшая роль — это стабилизация буферной системы, обеспечивающей наличие в ней свободных ионов кальция [4].

Органический состав матрицы эмали и поныне изучен меньше, чем ее минеральная фаза. Функциональной элементарной единицей органической матрицы эмали считается растворимый в кислоте кальцийсвязывающий белок, способный осаждаться в нейтральной среде при наличии ионов кальция. Кальцийсвязывающий белок эмали и кислотонерастворимый белок определяют ориентацию кристаллов в призмах эмали и ее структуру. Понимание процессов, происходящих в эмали, как в норме, так и при патологии, во многом зависит от знания ее составных компонентов и связи между органической матрицей и неорганическим веществом. Значение белка в эмали до настоящего времени изучено недостаточно, большинство исследователей отводят ему пассивную роль. Однако существует мнение, что кариесрезистентность эмали зависит от содержания в ней не только неорганических веществ, но и белка.

«Белковая сеть», окружающая апатиты эмали, предотвращает контакт кислоты с апатитом и смягчает ее влияние. Известно, что на ранней стадии развития кариозного процесса, особенно пигментированного пятна, содержание белка в участке поражения увеличивается в 3–4 раза, и это пятно в течение нескольких лет может не превращаясь в кариозную полость, хотя и наблюдается значительная убыль кальция и фосфора. Это служит важным, хотя и не прямым, доказательством роли белка в стабилизации очаговой деминерализации.

Основные затруднения при изучении органических веществ эмали связаны с их идентификацией и оценкой. Поэтому наиболее удобным методом исследования таких систем является Инфракрасная Фурье спектроскопия (FTIR), которая широко используется для определения качественного и количественного состава вещества, позволяет судить не только о молекулярном составе вещества, но и о внутренних напряжениях в его решетке, к которым данный метод является очень чувствительным. Она является эффективным методом исследования строения различных органических и неорганических соединений.

В отличие от ряда других методов, при использовании метода FTIR исследуемая система подвергается слабым внешним воздействиям, поэтому информация, полученная с помощью этого метода, относится к системе, не претерпевшей изменений в результате этих взаимодействий. Преимуществом метода является также относительная простота эксперимента и высокая избирательность. В то же время метод FTIR позволяет получить обширные и разнообразные сведения о строении веществ, о влиянии атомных группировок на соединение, в состав которых они входят. Достоинством ИК-метода является возможность использования её при анализе многокомпонентных смесей. Метод ИК-Фурье спектроскопии позволяет выявить наличие органической составляющей (белковой) в дентине и в незначительных количествах в эмали. Анализ литературных данных, полученных методом ИК-Фурье спектроскопии, показывает, что органическая (белковая) составляющая в зубной ткани пораженной кариесом, возрастает. Однако детальных исследований данной закономерности нами в литературе не обнаружено.

В связи с этим исследования особенностей строения и химического состава зубной эмали как здоровых зубов, так и зубов с кариесом были проведены нами методом ИК-спектроскопии на синхротроне SRC Aladdin Университета Мэдисон, штат Висконсин, США. Измерения проводили на канале Infrared Spectromicroscopy, который обеспечивает работу в диапазоне от 720 до 4000 см⁻¹, с использованием Фурье-спектрометра *Thermo Fisher Scientific*, совмещенного с ИК микроскопом. Площадь анализируемой поверхности образца при получении ИК-спектров с использованием микроскопа 20 × 20 мкм². Поскольку толщина подготовленных шлифов зубной эмали составляла 2-4 мм, то все исследования проводили в режиме измерения коэффициента отражения ИК-излучения от поверхности шлифа эмали.

Таким образом, основной целью работы являлось исследование интактной, а также пораженной кариозным процессом эмали человеческого зуба методом ИК-спектроскопии с использованием синхротронного излучения.

Материалы и методы исследования. Образцы зубов для исследований были подготовлены следующим образом. Вначале зубы, удаленные по медицинским показаниям, были разделены на две группы: первую группы составили интактные (здоровые) зубы, удаленные по ортодонтическим показаниям; во вторую группу вошли зубы с кариозными очагами, удаленные у пациентов при тяжелой степени парадонтита. Удаленные зубы промывали в проточной воде, очищали от зубного налета, поверхность высушивали фильтровальной бумагой. Далее зубы распиливали на специализированной установке алмазным диском с водяным охлаждением и получали пластину толщиной 1-2 мм. Полученный шлиф приклеивали с помощью клея на акрилатной основе на стеклянную пластину толщиной 2 мм и подвергали шлифованию с последующей полировкой с использованием алмазной пасты. На рис. 1 представлен полированный фронтальный шлиф зуба с указанием исследуемых областей. Первая из них – здоровая эмаль, вторая область – эмаль, пораженная кариозным процессом.



Рис. 1. Фронтальный шлиф зуба с указанием исследуемых областей

Результаты исследований. Известно, что глубина проникновения ИК-излучения в анализируемый образец составляет около половины длины волны излучения ($\lambda/2$). Грубая оценка дает нам значение примерно 4-5 мкм. Это означает, что при съемке в режиме отражения часть излучения от источника при определенных условиях не отражается в приповерхностном слое, а может проходить вглубь образца, поэтому проведение анализа требует тщательности при выборе анализируемых областей.

Следует отметить, что в большинстве работ, посвященных анализу ИК-спектров эмали, приводятся ИК-спектры поглощения [5-7]. Это обусловлено тем фактом, что поверхность эмали анализируемого зуба преимущественно неровная, а высокая твердость зубной эмали не позволяет получить качественные спектры методом пропускания или нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО – ATR). Однако, использование ИК-микроскопов, работающих в режиме на отражение, а также высокая интенсивность синхротронного излучения, такого как ИК-источника позволяют исследователям довольно успешно проводить анализ состояния зубной ткани, получая информацию с малого участка полированной поверхности [8], который представляет собой ровную плоскую поверхность.

На рис. 2 приведены спектры отражения, полученные методом ИК-спектроскопии. Как видно из рисунка, основной модой в спектрах является колебание νPO_4^3 , расположенное в области $1000 - 1150 \text{ см}^{-1}$, приписываемое неорганической составляющей зуба, а именно гидроксиапатиту. Остальные колебательные состояния в экспериментальных ИК-спектрах отражения являются слабовыраженными, и поэтому провести качественный и количественный анализ сложно. Кроме того, как уже было указано, основные работы, посвященные исследованиям человеческой эмали и ее неорганической составляющей, были выполнены с использованием ИК-спектроскопии на пропускание, поэтому основные литературные данные приводятся именно для этого метода.

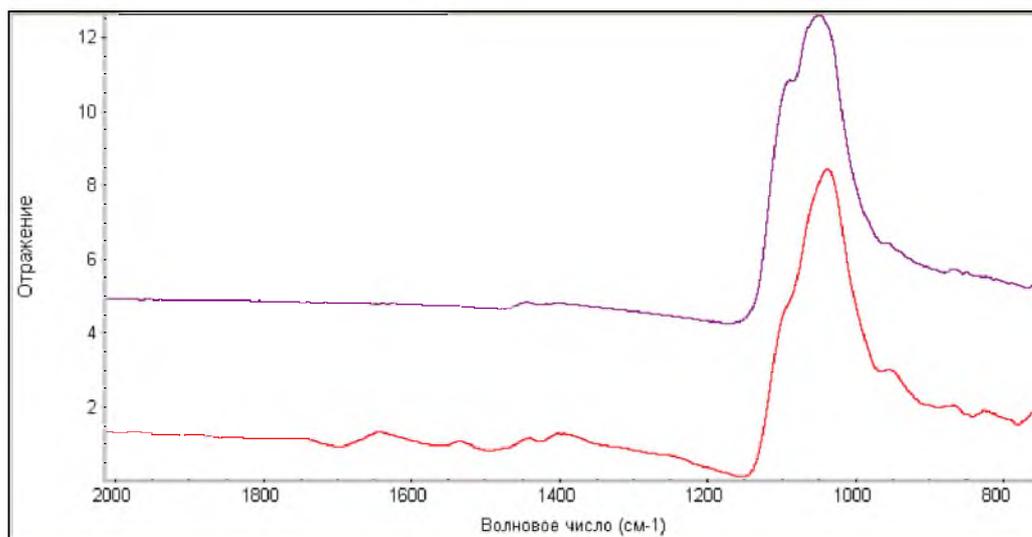


Рис. 2. Спектры отражения, полученные методом ИК-спектроскопии (верхний – здоровая эмаль, нижний – пораженная кариесом)

Однако, учитывая связь между основными оптическими константами, характеризующими взаимодействие электромагнитной волны и поглощающей среды, а также используя соотношения Крамерса – Кронига, на основании известного спектра отражения можно вычислить спектр показателя пропускания или поглощения, и наоборот [9]. Таким образом, мы можем пересчитать экспериментальные ИК-спектры отражения в ИК-спектры поглощения. Для детального рассмотрения нами была выбрана область спектра от 2000 до 900 см⁻¹, так как именно в ней наблюдаются основные особенности, определяющие природу зубной эмали. Полученные результаты приведены на рис. 3.

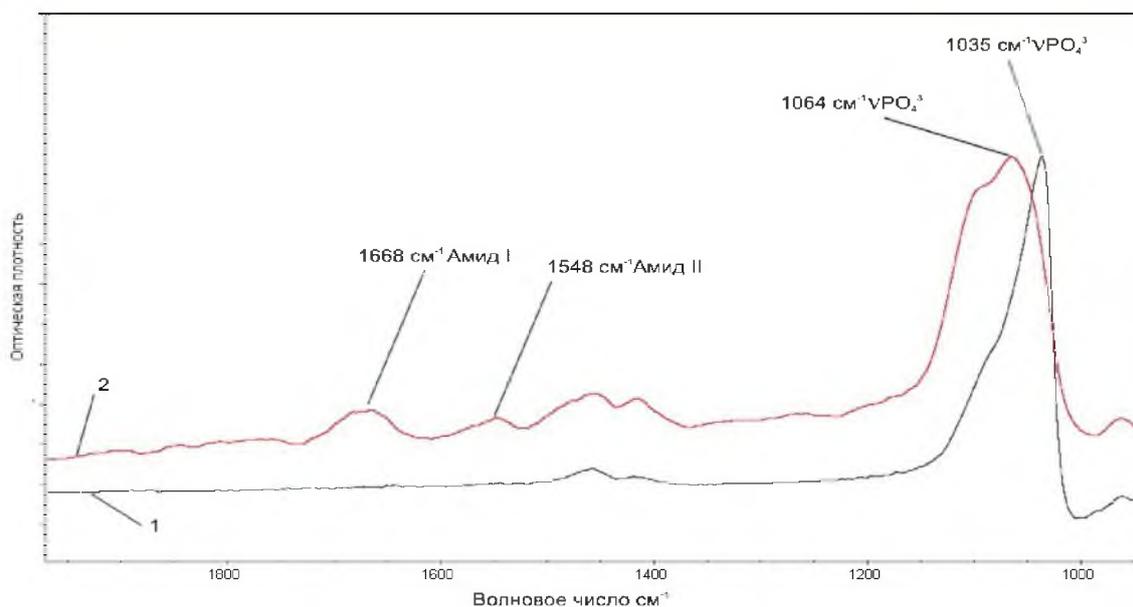
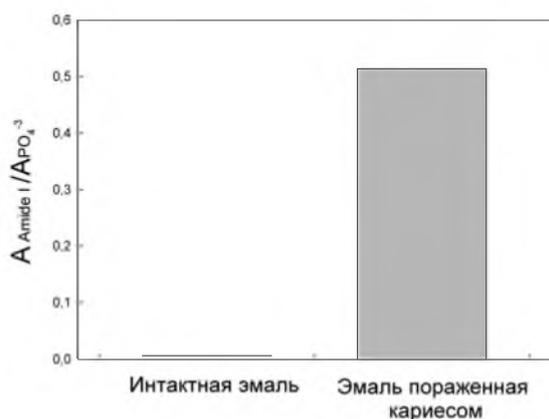
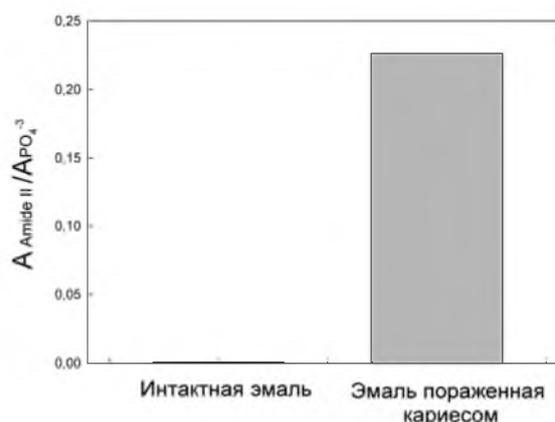


Рис. 3 Спектры оптического поглощения (1 – здоровая эмаль, 2 – кариозная эмаль)

Как видно из рис. 3, на ИК-спектрах поглощения, полученных от исследуемого образца, наблюдаются полосы поглощения, характерные для зубной эмали. Спектр поглощения, полученный от участка здоровой (интактной) эмали (1), существенно отличается от спектра участка эмали, пораженного кариесом (2). В указанной спек-



тральной области на спектре (1) (здоровая эмаль) основная полоса поглощения, связанная с валентными колебаниями νPO_4^{3-} , имеет максимум при 1035 см^{-1} , довольно узкая и имеет слабо выраженное плечо с коротковолновой стороны. Кроме этой полосы на спектре хорошо просматриваются два слабых пика при 1415 см^{-1} и при 1450 см^{-1} , соответствующие плоскостным асимметричным деформационным колебаниям $\delta_{as}(CH_3)$. На спектрах эмали, пораженной кариесом, помимо этих полос связываемых с неорганической составляющей зуба, наблюдаются полосы вторичных амидов – Amide I ($\nu(C=O)$ $1661.7 - 1664.2$), Amid II ($\delta(C-N)$ 1555.8) (смешанное валентно-деформационное колебание связей N-H и C-N), Amid III ($\delta(NH)$ 1240.4). Поскольку наблюдаемые нами полосы поглощения Amide I, Amide II и Amide III связаны с наличием в составе зубной ткани аминокислот, цепочки которых образуют белок, то по величине их интегральной интенсивности можно судить о его концентрации. Количественной характеристикой относительного содержания белковой составляющей в ткани зуба может служить отношение интегральных интенсивностей полос поглощения Amide I, Amide II и Amide III к величине интегральной интенсивности полосы $\nu(PO_4^{3-})$, которая характеризует минеральную (неорганическую) составляющую зубной ткани. Расчет этих отношений был нами произведен с использованием спектрально-программного комплекса OMNIC. Полученные данные для наглядности представлены в виде гистограмм на рис. 4а и 4б.

Рис. 4.а. Гистограмма $A_{Amide I} / A_{PO_4^{3-}}$ Рис. 4.б. Гистограмма $A_{Amide II} / A_{PO_4^{3-}}$

Сопоставляя между собой результаты экспериментальных исследований, мы обнаружили хорошее совпадение положений максимумов линий поглощения между собой. Этот факт позволяет нам считать, что полученные результаты являются достаточно корректными и позволяют выявить некоторые закономерности.

На всех спектрах поглощения эмали полосы, связанные с белковой составляющей (Amide I, Amide II), значительно слабее, чем линии поглощения, связанные с минеральной (неорганической составляющей). Это хорошо видно как на спектрах, так и на гистограммах.

В то же время области эмали, пораженные кариесом или расположенные вблизи них имеют наибольшее содержание органической составляющей, причем отношение составляющей, соотносимой с Amide I к соотносимой с Amide II, составляет примерно 2:1.

Выводы. Таким образом, кариес эмали характеризуется ростом деформационных и валентных колебаний связей N-C-O, N-H и C=O, что говорит о деструктивных процессах в органическом матрикс кристалла гидроксиапатита.

В результате подповерхностной деминерализации в дальнейшем разрушается и сам кристалл эмали.

Литература

1. Быков, В.Л. Гистология и эмбриология органов полости рта человека : учеб. пособие / В.Л. Быков. – СПб., 1998. – 248 с.
2. Уханов, Ю.И. Оптические свойства полупроводников : моногр. / Ю.И. Уханов ; Гл. ред. физ.-мат. литратуры. – М.: Наука, 1977.
3. Jenkins G.N. The physiology and biochemistry of mouth. 4-th Ed. Oxford 1978;599.
4. Goldberg M. et al. Dental mineralization. Int J Dev Biol 1995;39:93-110.
5. Yamakoshi Y. et al. Calcium binding of enamel proteins and their derivatives with emphasis on the calcium-binding domain of porcine sheathlin. Arch Oral Biol 2001;46:1005-1014.
6. Robert L. Karlinsey, Allen C. Mackey, Emily R. Walker, Katherine E. Frederick, Christabel X. Fowler. In vitro evaluation of eroded enamel treated with fluoride and a prospective tricalcium phosphate agent. Journal of Dentistry and Oral Hygiene Vol. 1(4), 2009 p. 52-58.
7. David J. Krutchkoff, Nathaniel H. Rowe. Chemical Changes of Flattened Enamel Surfaces with In Vitro Weak Acid Demineralization. J. Dent. Res. V. 50, N 6, 2009, p. 1589-1593.
8. C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, A. Barroug. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. Materials Science and Engineering. C. v. 27, N 2, 2007, p. 198-205.
9. D. Fried , C. R. Wheeler, C. Q. Le. IR Spectromicroscopy of Laser Irradiated Dental Hard Tissues. www.als.lbl.gov/als/compendium/AbstractManager. 2003

INVESTIGATIONS OF INTACT AND CARIOSITY ENAMEL BY FTIR SPECTROMICROSCOPY USING SYNCHROTRON RADIATION

P.V. SEREDIN¹
A.N. LUKIN¹
Yu.A. IPPOLITOV²

¹⁾ *Voronezh State University*

²⁾ *Voronezh State
Medical Academy*

e-mail: paul@phys.vsu.ru

In our work we have conducted researches intact and cariosity process of enamel of human tooth using by FTIR- spectramicroscopy with use synchrotron radiations.

It is shown that enamel caries is characterised by growth of deformation and valence vibrations N-C-O, N-H and C=O that speaks about destructive processes in organic matrix of hydroxyapatite.

As a result subsurface demineralization also the crystal of enamel further collapses.

Key words: intact enamel, cariosity enamel, FTIR spectromicroscopy.