

Легких А.В.¹, Мандра Ю.В.¹, Киселева Д.В.²

Сравнительная оценка степени минерализации твердых тканей зубов методом рамановской спектроскопии

1 - ГБОУ ВПО УГМУ МЗ РФ, г. Екатеринбург; 2 - Институт геологии и геохимии УрО РАН, г. Екатеринбург

Legkih A.V., Mandra.Y.V., Kiseleva D.V.

Comparative assessment of hard dental tissues mineralization degree by raman spectroscopy technique

Резюме

Спектроскопические методы, в частности, ИК-спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния света, рамановская спектроскопия, являются основными в изучении особенностей структуры и дефектообразования кости и твердых тканей зубов. Метод позволяет получать информацию об особенностях локальной молекулярной структуры поверхности зуба. Актуальным является определение модели микро-дефектообразования поверхности зубов с целью определения морфологии дефектов и профилактики их образования.

Ключевые слова: рамановская спектроскопия, патологическая стираемость зубов, оценка минерализации твердых тканей зубов

Summary

Infrared spectroscopy and Raman spectroscopy are basic methods in defect formation structure studies of bones and hard tissues of teeth. The method allows to obtain the information of the tooth surface local molecular structure. It is essential to determine the model of the teeth' surfaces micro-defect formation of to verify the morphology of the defects and prevent their formation.

Keywords: raman spectroscopy, tooth attrition, mineralization degree assessment

Введение

Рамановская спектроскопия широко применяется в исследованиях твердых тканей зубов. В биологических тканях рамановская спектроскопия фиксирует молекулярные и ионные колебания минеральных соединений, определяющих химический состав твердых тканей зубов, таких как фосфат, карбонат и гидрофосфат-ионы, а также многочисленные колебания от органического компонента – белковых включений. На спектрах симметричные колебания молекул или ионов являются самыми интенсивными [2].

Известны работы с использованием рамановского спектрометра по картированию молекулярных группировок минеральной и органической компоненты зуба человека: распределение органических веществ оценивалось по валентному колебанию связи С-Н в области 2880 - 2700 см⁻¹, фосфат- и карбонат ионов - по симметричным валентным колебаниям $\nu_s(\text{PO})$ при 961 см⁻¹ и $\nu_s(\text{CO})$ при 1070 см⁻¹ [3].

Линия симметричного валентного колебания $\text{PO}_4^{3-}(\nu_1)$ является самой интенсивной в спектре минерализованной ткани. Ее особенностью является высокая чув-

ствительность к минеральному окружению: частота и форма этой линии зависят от локального окружения и изменяются вследствие ионных замещений и изменения степени кристалличности. Во многих исследованиях апатитовых тканей и синтетических апатитов частота линии $\text{PO}_4^{3-}(\nu_1)$ связывалась с составом окружающего минерала [2].

Цель исследования – качественная оценка изменения минерального состава зубов человека при кариозном поражении и патологической стираемости зубов в пределах эмали.

Материалы и методы

Объект исследования – зуб 2.1 (рис.1), удаленный по поводу хронического пародонтита тяжелой степени тяжести. В области режущего края определяются фасетки стираемости в пределах эмали, на медиальной контактной поверхности отмечается наличие полости в пределах эмали. Поверхность зуба была очищена с использованием циркулярной щетки и пасты Detartrine. С использованием прямого наконечника и алмазного диска с водяным охлаждением из одного зуба было изготовлено три

образца размером 2х1х1 см с сохранением исследуемых патологических элементов: интактная эмаль (контроль), патологическая стираемость в пределах эмали, кариес в пределах эмали.

Измерения проведены на рамановском спектрометре LabRam HR Evolution (ИГТ УрО РАН) с основными характеристиками: спектральный диапазон 200 – 2000 см⁻¹; лазер возбуждения 632 нм; используемые объективы 50х и 100х.

Оцифрованные спектры обработаны в программе PeakFit V.4.11, произведена коррекция базовой линии, сглаживание спектров, разложение суммарных пиков на элементарные составляющие.

Произведено разложение суммарного пика PO43- в области 940-975 см⁻¹ на три элементарные составляющие (950, 960 и 967 см⁻¹), описываемые произведением элементарных функций Лоренца и Гаусса были приписаны разупорядоченному фосфату, фосфату В-типа и кристаллическому незамещенному апатиту [2].

Результаты и обсуждение

Линия симметричного валентного колебания PO43-(ν1) является самой интенсивной в спектре минерализованной ткани. Ее особенностью является высокая чувствительность к минеральному окружению: частота и форма этой линии зависят от локального окружения и изменяются вследствие ионных замещений и изменения степени кристалличности. Частота линии PO43-(ν1) связывалась с составом окружающего минерала. В общем случае, в костной и зубной ткани полоса фосфата ν1 является суперпозицией всех трех составляющих; обычно она имеет несимметричную форму из-за вклада колебаний разупорядоченного фосфата и незамещенного гидроксиапатита [2].

Принято классифицировать апатитовое окружение с использованием трех широких категорий с различными частотами соответствующих линий. В замещенном карбонат-апатите В-типа (карбонат-ионы замещают фосфат-ионы в решетке апатита) фосфатная линия ν1 проявляется в диапазоне 955-959 см⁻¹. В кристаллическом

незамещенном гидроксиапатите линия ν1 сдвигается в область 962-964 см⁻¹. И, наконец, линия с частотой 945-950 см⁻¹ свидетельствует о наличии разупорядоченной фосфатной решетки апатита [2].

Область 1065-1070 см⁻¹ соответствует колебаниям карбонат-иона В-типа. Для оценки отношения фосфат/карбонат принято использовать отношения интенсивностей соответствующих пиков рамановского спектра: 959 см⁻¹ для PO43- и 1070 см⁻¹ для CO32-, причем можно использовать как отношение амплитуд пиков, так и их площадей.

Область 1400-1800 см⁻¹. Колебания органической матрицы в данной области обусловлены, в основном, двумя разновидностями связей: колебания связей -CO-NH-, формирующих белковую основу, и колебания, связанные с боковыми цепочками аминокислот. На рамановских спектрах наиболее ярко проявляются пики белковых связей амидной группировки -CONH2, имеющей 9 колебательных мод: амид I (1655-1675 см⁻¹), который представляет собой, главным образом, валентное колебание C=O; амид II (1560 см⁻¹, деформационное колебание N-H, валентное C-N); амид III (1240-1260 см⁻¹, валентное C-N, деформационное N-H) [1].

Как видно из визуального сопоставления спектров, интактная эмаль характеризуется низким фоном, явно выраженными линиями неорганической составляющей (фосфат, карбонат-ионов). На спектрах кариозной зубной ткани и ткани с повышенной стираемостью зафиксирован высокий фон от люминесценции деминерализованных участков, появляются широкие линии от органической составляющей, причем для повышенной стираемости наблюдается низкоинтенсивный пик PO43-.

Можно проследить изменение рамановских спектров при развитии кариеса на рис.1. видно, что при приближении к кариозной полости уменьшается линия фосфата (минеральной компоненты) и появляются широкие линии органических составляющих, а также увеличивается люминесцентный фон.

Числовые показатели разложенного суммарного пика PO43- приведены в таблице 1.

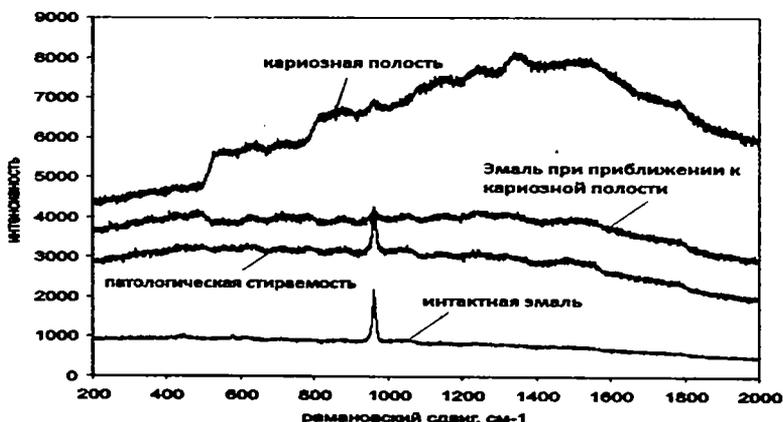


Рис.1 Изменения на рамановских спектрах, фиксирующиеся при приближении к кариозной полости.

Таблица 1. Числовые показатели разложенного суммарного пика PO43-

	Доля разупорядоченного фосфата, %	Доля фосфата В-типа, %	Доля кристаллического незамещенного апатита, %
Интактная эмаль	13,6	73,3	13,0
	8,5	75,2	16,3
	18,3	72,0	9,7
	8,3	80,8	10,9
	8,5	82,7	8,8
	18,4	76,1	5,6
	8,0	79,2	12,7
	14,7	75,3	10,0
21,5	64,3	14,2	
среднее	13,3	75,4	11,2
Кариез эмали	29,1	59,3	11,7
	57,8	33,4	8,8
	13,6	57,0	29,4
	7,7	44,6	47,8
	8,0	56,6	35,5
среднее	23,2	50,2	26,6
Повышенная стираемость в пределах эмали	11,3	85,9	2,8
	5,9	25,4	68,7
среднее	8,6	55,6	35,7

Исходя из данных таблицы, во всех исследованных образцах преобладает апатит, в решетке которого карбонаты замещают фосфат-ионы (В-тип). Содержание апатита В-типа уменьшается в ряду повышенная стираемость - кариез до 55,6% и 50,2 %, соответственно. Для кариеза характерно наибольшее содержание разупорядоченного фосфата, для тканей с повышенной стираемостью - наименьшее.

С использованием линий 960 см-1 и 1240 см-1 (фосфат и коллаген, соответственно) для образцов с проявлениями кариеза и повышенной стираемости было рас-

считано отношение минерал/органическая матрица; на спектрах интактной эмали пиков от органической составляющей не зафиксировано. Для кариозных тканей среднее соотношение минерал/органическая матрица составило 0.31, а для повышенной стираемости - 0.64 (рис.2).

Оценивая уровень изменения минерализации твердых тканей зуба при кариезе можно говорить о явлении деминерализации: высокая доля разупорядоченного фосфата, резкое уменьшение фосфата В-типа и соотношения минерал/органической матрицы.

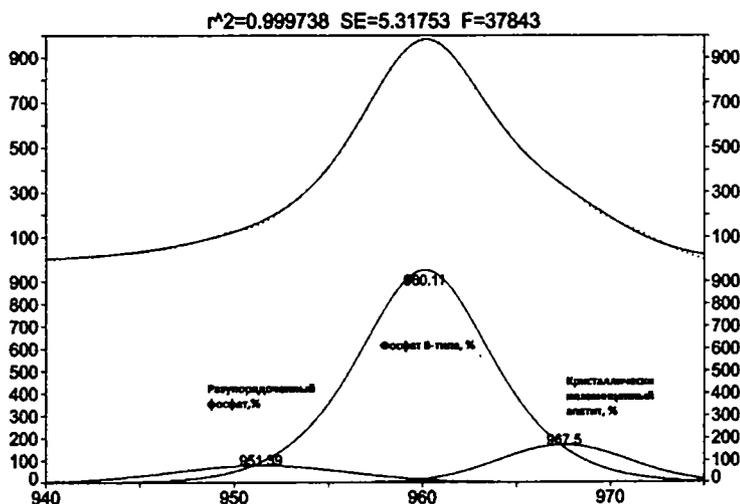


Рис. 2 Разложение суммарного пика PO43- в области 940-975 см-1 на три элементарные составляющие.

При оценке изменения уровня минерализации твердых тканей зуба при начальной стадии патологической стираемости в пору говорить о явлении дисминерализации (повышение доли кристаллически-замещенного апатита, незначительное снижение фосфата В-типа и уменьшение концентрации фторида более чем на 50%).

Сопоставление качественной и количественной оценки состава минеральной составляющей патологии твердых тканей зубов определяет персонализированный подход к лечению и профилактике прогрессирования заболевания.

Выводы

1. Все исследованные образцы состоят преимущественно из карбонат-апатита, замещенного по В-типу, максимальное количество которого характерно для интактной эмали, минимальное – для кариозной ткани; промежуточное положение занимают ткани с повышенной стираемостью.

2. Кариозные ткани характеризуются наибольшим содержанием разупорядоченного фосфата - замещения

А-типа (карбонат-ионы замещают гидроксил-ионы) или присутствие аморфного фосфата кальция.

3. Для кариозных тканей среднее соотношение минерал/органическая матрица составляет 0.31, а для тканей с повышенной стираемостью – 0.64.

4. При развитии кариеса уменьшается содержание минеральной компоненты (уменьшается линия фосфата) и появляются широкие линии органических составляющих, а также увеличивается люминесцентный фон. ■

Легких Александр Владимирович – аспирант кафедры пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний ГБОУ ВПО УГМУ МЗ РФ, г. Екатеринбург; Мандра Юлия Владимировна – проректор по науке и инновациям, д.м.н., доцент кафедры пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний ГБОУ ВПО УГМУ МЗ РФ, г. Екатеринбург; Киселева Дарья Владимировна – кандидат геолого-минералогических наук, старший научный сотрудник ИГТ Уро РАН г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Легких Александр Владимирович, тел. +7-953-60-43-960, e-mail: lyogkih@yandex.ru

Литература:

1. Ager III J.W., Nalla R.K., Balooch G., Kim G., Pugach M., Habelitz S., Marshall G.W., Kinney J. H., O'Ritchie R. On the Increasing Fragility of Human Teeth With Age: A Deep-UV Resonance Raman Study // *Journal of Bone and Mineral Research*. 2006. V. 21. № 12. P.1879-1887.
2. Tarnowski C.P., Ignelzi Jr M.A., Morris M.D. Mineralization of Developing Mouse Calvaria as Revealed by Raman Microspectroscopy // *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002. V.17. № 6. P. 1118-1126.
3. Wentrup-Byrne E., Armstrong C. A., Armstrong R.S., Collins B.M. Fourier Transform Raman Microscopic Mapping of the Molecular Components in a Human Tooth // *Journal of Raman Spectroscopy*. 1998. V.28. №2-3. P.151-158.