

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

## МЕТОД РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ КАК СРЕДСТВО ОЦЕНКИ МОРФОЛОГИИ МИКРОРЕЛЬЕФА ПОВЕРХНОСТИ ЗУБА, А ТАКЖЕ СТЕПЕНИ МИНЕРАЛИЗАЦИИ ТВЕРДЫХ ТКАНЕЙ ЗУБОВ

*Уральский государственный медицинский университет  
Институт геологии и геохимии УрО РАН  
г. Екатеринбург*

### Аннотация

С помощью рамановской спектроскопии, применяемой в исследованиях твердых тканей зубов, проведена качественная оценка минерального состава зубов, определение морфологии микрорельефа твердых тканей зубов человека в пределах эмали при интактном состоянии, при кариозном поражении и патологической стираемости зубов.

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

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 C-H в области 2880-2700 см<sup>-1</sup>, фосфат- и карбонат ионов — по симметричным валентным колебаниям vs (PO) при 961 см<sup>-1</sup> и vs (CO) при 1070 см<sup>-1</sup> [3].

Линия симметричного валентного колебания PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (ν<sub>1</sub>) 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. Во многих исследованиях апатитовых

тканей и синтетических апатитов частота линии PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (ν<sub>1</sub>) связывалась с составом окружающего минерала [2].

**Цель исследования** — качественная оценка изменения минерального состава зубов, определение морфологии микрорельефа твердых тканей зубов человека при кариозном поражении и патологической стираемости зубов в пределах эмали.

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 Detartine. С использованием прямого наконечника и алмазного диска с водяным охлаждением из одного зуба было изготовлено три образца размером 2 x 1 x 1 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<sup>-1</sup>; лазер возбуждения 632 нм; используемые объективы 50x и 100x.

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  $\text{PO}_4^{3-}$  в области  $940\text{-}975\text{ см}^{-1}$  на три элементарные составляющие ( $950$ ,  $960$  и  $967\text{ см}^{-1}$ ), описываемые произведением элементарных функций Лоренца и Гаусса были приписаны разупорядоченному фосфату, фосфату В-типа и кристаллическому незамещенному апатиту [2].

Линия симметричного валентного колебания  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_1$ ) 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  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_1$ ) связывалась с составом окружающего минерала. В общем случае, в костной и зубной ткани полоса фосфата  $\nu_1$  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  $\nu_1$  проявляется в диапазоне  $955\text{-}959\text{ см}^{-1}$ . В кристаллическом незамещенном гидроксиапатите линия  $\nu_1$  сдвигается в область  $962\text{-}964\text{ см}^{-1}$ . И, наконец, линия с частотой  $945\text{-}950\text{ см}^{-1}$  свидетельствует о наличии разупорядоченной фосфатной решетки апатита [2].

Область  $1065\text{-}1070\text{ см}^{-1}$  соответствует колебаниям карбонат-иона В-типа. Для оценки отношения фосфат/карбонат принято использовать отношения интенсивностей соответствующих пиков рамановского спектра:  $959\text{ см}^{-1}$  для  $\text{PO}_4^{3-}$  и  $1070\text{ см}^{-1}$  для  $\text{CO}_3^{2-}$ , причем можно использовать как отношение амплитуд пиков, так и их площадей.

Область  $1400\text{-}1800\text{ см}^{-1}$ . Колебания органической матрицы в данной области обусловлены, в основном, двумя разновидностями связей: колебания связей  $\text{-CO-NH-}$ , формирующих белковую основу, и колебания, связанные с боковыми цепочками аминокислот. На рамановских спектрах наиболее ярко проявляются пики белковых связей амидной группировки  $\text{-CONH}_2$ , имеющей 9 колебательных мод: амид I ( $1655\text{-}1675\text{ см}^{-1}$ ), который представляет собой, главным образом, валентное колебание  $\text{C=O}$ ;

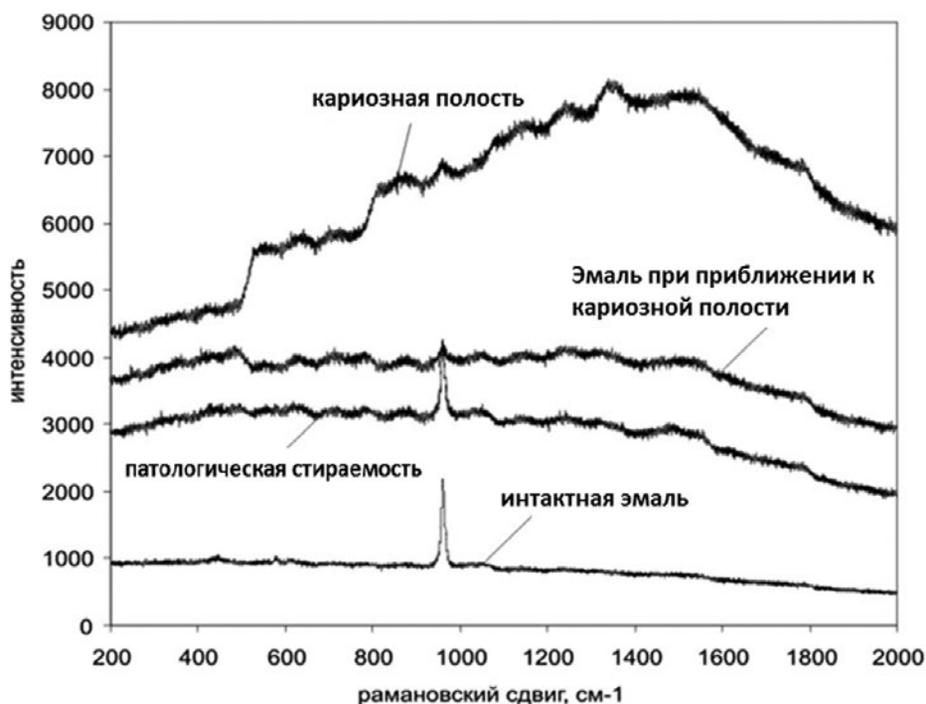


Рис. 1. Изменения на рамановских спектрах, фиксирующиеся при приближении к кариозной полости

амид II ( $1560\text{ см}^{-1}$ , деформационное колебание N-H, валентное C-N); амид III ( $1240\text{--}1260\text{ см}^{-1}$ , 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  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Можно проследить изменение рамановских спектров при развитии кариеса. На рисунке 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  $\text{PO}_4^{3-}$  приведены в таблице 1.

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

Для образцов с проявлениями кариеса и повышенной стираемости было рассчитано 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.

На рисунках 2, 3 можно увидеть поверхность эмали в области фасеток стирания экспериментального образца под увеличением 50х. Определяются дефекты округлой формы в пределах эмали, морфологически сходные с формой воронки. Размер дефекта —  $90 \times 90\text{ мкм}$ . Эмалевый гребень на протяжении всего периметра воронки сохранен. Уровень минерализации тканей в области гребня эмали и дна «воронки» значительно отличается.

При увеличении 100х возможна более детальная визуализация микрорельефа поверхности: интактная эмаль (рис. 4) — поверхность однородная, гомогенная без нарушения целостности структуры с четким рисунком поверхности эмалевых призм. На рисунке 5 поверхность эмали неоднородная, структура

Таблица 1

Числовые показатели разложенного суммарного пика  $\text{PO}_4^{3-}$

	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
Кариес 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

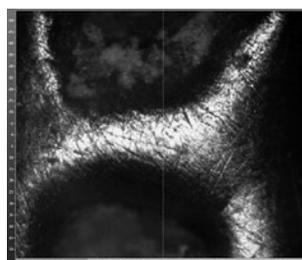


Рис. 2. Фотография экспериментального образца под увеличением х 50. Дефект твердых тканей в пределах эмали размером  $90 \times 90\text{ мкм}$

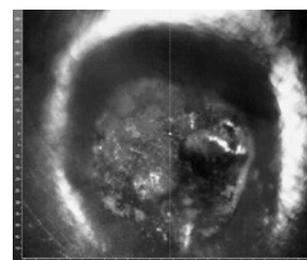
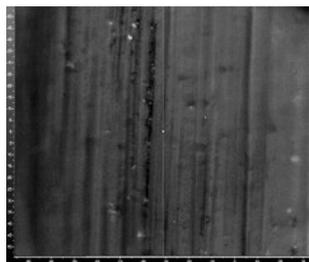
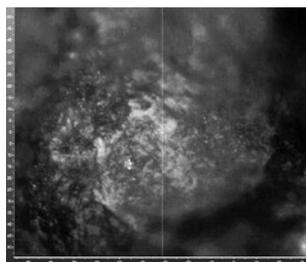


Рис. 3. Дефект твердых тканей зуба при патологической стираемости: «Эмалевый кратер» —  $100 \times 90\text{ мкм}$ . Увеличение 50х



**Рис. 4.** Поверхность интактной эмали под увеличением 100х



**Рис. 5** Кариозная полость в пределах эмали. Увеличение 50х

эмали нарушена. В центре фотографии определяется участок повышенной минерализации — часть сохраненной эмали, по периферии участка затемнения — зоны деминерализации эмали.

Детальное описание морфологии микро-рельефа поверхности твердых тканей зубов при патологической стираемости и кариозном процессе параллельно с оценкой уровня минерализации каждой исследуемой точки возможно при увеличении 50х.

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

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 персонафицированный подход к лечению и профилактике прогрессирующего 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.

#### **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.