

УДК:616.31

ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОСТРУКТУРЫ ПОРАЖЕННЫХ КАРИЕСОМ ФИССУР
ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЗУБОВ МЕТОДАМИ РЕНТГЕНОВСКОЙ ДИФРАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Ю.А. ИППОЛИТОВ, П.В. СЕРЕДИН, В.М. КАШКАРОВ, И.Ю. ИППОЛИТОВ, STEPHEN DOYLE,
Я.А. ТУРОВСКИЙ

ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н.Бурденко Минздрава России».
394000, г. Воронеж, ул. Студенческая 10, тел (4732) 53-05-36
Воронежский государственный университет, 394000, г. Воронеж, Университетская площадь 1
Synchrotron Light Source ANKA

Аннотация: в нашей работе проведены исследования пораженной кариозным процессом эмали человеческого зуба с привлечением методов рентгеновской дифракции с использованием синхротронного излучения. Показано, что появление кариеса характеризуется уменьшением не только размера кристаллитов гидроксиапатита, что может быть связано как со строением зуба, так и воздействием кариозного процесса, но и уменьшением индексов кристалличности и текстурированности, что является предпосылкой деструктивных процессов в органическом матриксе зубной эмали.

Ключевые слова: кариес, фиссура, микродифракция, гидроксиапатит.

STUDY OF FISSURE CARIOUS OF HUMAN TEETH MICROSTRUCTURE BY X-RAY DIFFRACTION
OF SYNCHROTRON RADIATION

Y.A. IPPOLITOV, P.V. SEREDIN, VM KASHKAROV, I.U. IPPOLITOV, STEPHEN DOYLE,
J.A. TUROVSKIY

N.N.Burdenko Voronezh State Medical Academy
Voronezh State University
Synchrotron Light Source ANKA

Abstract: investigations of the intact dental enamel as well as carious-affected human dental enamel were performed in the work by X-ray diffraction of synchrotron radiation. Caries of enamel is characterized by decrease of crystallinity index and by the absence of the preferable orientation of hydroxyapatite (HAP) crystals within the affected enamel. It means the presence of the destructive processes in the organic matrix of hydroxyapatite crystal.

Key words: caries, fissure, microdiffraction, hydroxyapatite

Известно, что эмаль – самая твердая ткань человеческого организма. Это позволяет ей в ходе выполнения зубом его функции противостоять воздействию больших механических нагрузок. Хорошо известно, что эмаль более чем на 90% состоит из минеральных веществ (преимущественно гидроксиапатита – ГАП $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, флюорапатита $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$, карбонатапатита, и др.), на 1,2% – из органических, и 3,8% приходится на связанную с кристаллами и органическими компонентами и свободную воду.

Данные о органических веществах, содержащихся в зрелой эмали, очень условны. G. Jenkins 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 – эмалины [4,5].

Известно, что твердая зубная ткань находится в состоянии постоянной деминерализации и минерализации из-за контакта со слюной в следствие чего и может появиться кариес. Развитие кариозного процесса сопровождается образованием нескольких различных зон в эмали: полупрозрачной зоны, темной зоны, тела кариеса и поверхностной зоны. 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 превращаться в кариозную полость, хотя и наблюдается значительная убыль кальция и фосфора – деминерализация, в то время как в темной зоне кариеса эмали может наблюдаться минерализация. До появления полости в твердой ткани зуба развитие кариозного процесса обратимо и структура эмали может быть восстановлена и, вероятно, огромную роль в процессах стабилизации и обратимости процессов очаговой деминерализации в твердых тканях зуба может играть белок [7].

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. Подтверждено, что ее важнейшая роль – это стабилизация буферной системы, обеспечивающей наличие в ней свободных ионов кальция [6]. Стоит отметить, что 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. 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. Таким образом, 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.

До нас уже был проведен ряд исследований человеческих зубов, в том числе с привлечением синхротронного излучения. Однако в этих работах исследовались твердые ткани человеческих зубов в основном в порошкообразной форме [8,9], что конечно же удобно в частности для проведения исследований методом порошковой дифракции, но при этом теряется чистота эксперимента.

Таким образом, изучение структуры и химического состава интактной и пораженной кариесом эмали даст нам более глубокое понимание начального изменения в твердых тканях зуба. Поскольку поверхность образцов эмали на начальных стадиях кариозного процесса достаточно мала, то наиболее удобными методами в таком исследовании будут выступать микродифракция рентгеновских лучей, которая откроет ценные и подробные данные о минеральном составе как у здоровых и так и у кариозных зубов. А что касается изучения органических веществ эмали, то целесообразным будет привлечение ИК-Фурье спектроскопии, которая позволит выявить наличие органической составляющей (белковой) в эмали [1].

Материалы и методы исследования. Образец зуба с кариозным очагом, удаленный у пациента по ортодонтическим показаниям, а также при пародонтитах тяжелой степени, был подготовлен следующим образом. Вначале зуб промывали в проточной воде, очищали от зубного налета, поверхность высушивали фильтровальной бумагой. Далее зуб распилили на специализированной установке алмазным диском с водяным охлаждением и получали пластину толщиной до 1 мм. Полученный шлиф приклеили с помощью клея на акрилатной основе на стеклянную пластину толщиной 2 мм и подвергли шлифованию с последующей полировкой с использованием алмазной пасты. На рис. 1,а приведена фотография анализируемого образца.

Изучение микроструктуры зубной ткани методом рентгеновской микродифракции было проведено на канале ANKA-PDIFF синхротрона ANKA, г. Карлсруе, Германия. Анализируемая область в этом случае составляла 100×100 мкм². Источник излучения – 1.5Т поворотный магнит (Ес=6keV). Для эксперимента использовалось монохроматическое излучение, соответствующее $K\alpha_1$ излучению меди с длиной волны $\lambda=1.54032\text{Å}$.

На рис. 1 приведены участки эмали и точки в инфицированной фиссуре эмали зуба, для которых проведено микродифракционное исследование.

Результаты и их обсуждение. Из полученных экспериментальных данных следует, что индексы Миллера исследованных материалов соответствуют синтетическому Calcium Phosphate Hydroxide (Hydroxylapatite) $\text{Ca}_{9.868}(\text{PO}_4)_5.586(\text{OH})_4.006 \text{HAP}$. Никаких дополнительных фаз на основе кальция нет.

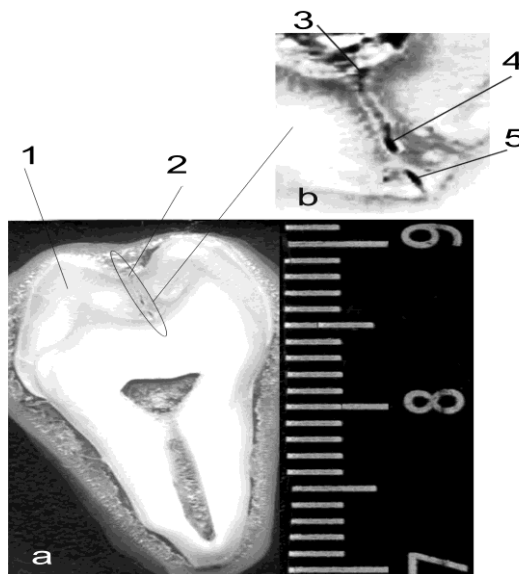


Рис. 1. Фронтальный шлиф зуба с указанием исследуемых областей

Используя метод Ритвельда, мы рассчитали параметры кристаллической решетки для анализируемых участков зуба. Эти данные приведены в таблице.

Таблица

Результаты микродифракционного анализа

	Параметры решетки		Индекс текстурированности		Индекс кристалличности, CI	Размер кристалла ГАП, nm	
	a, Å	c, Å	R(300)	R(112)			
Синтетический био-ГАП [8]	9.40	6.87	-	-	-	40	
Интактная эмаль (точка 1, рис.1)	9.44	6.88	11.3	2.14	1.11	40	
Кариоз-ная эмаль (рис.1)	точка 3	9.44(5)	6.88	10.6	4.69	0.55	35
	точка 4			3.16	2.55	1.28	40
	точка 5			2.35	2.93	0.62	30

На рис. 2 приведены результаты рентгеновской микродифракции, полученные в области наиболее интенсивных линий в спектре от интактной эмали – (1,2) и трех точек в фиссуре распространения кариеса с возрастанием глубины, (3) – начало фиссуры, (4) – центр фиссуры, (5) – глубина фиссуры соответственно.

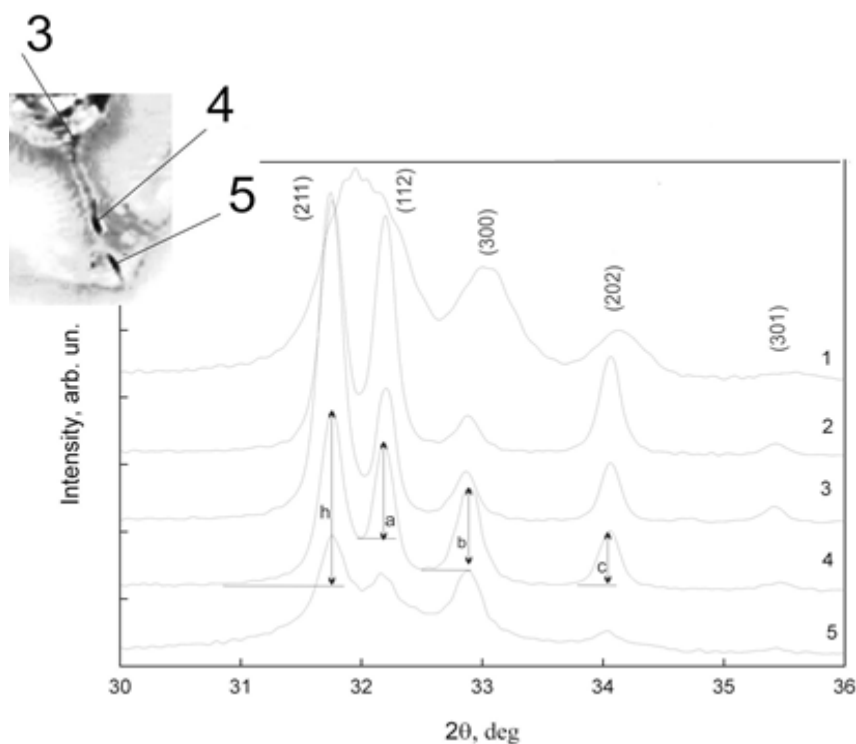


Рис. 2. Результаты рентгеновской микродифракции.

Как можно заметить из рис. 2, зерна гидроксиапатита в различных анализируемых точках эмали человеческого зуба имеют выраженную преимущественную ориентацию – текстуру, что можно заметить по изменению интенсивностей трех наиболее сильных линий (211), (300), (112) на дифрактограммах образцов.

Для количественной оценки степени текстурированности можно использовать величину, называемую индексом текстурированности образца – R, который может быть определен по соотношению интенсивностей наиболее сильных линий $I(211)/I(300)$ и $I(211)/I(112)$. Для стандартного гидроксиапатита (ГАП) в порошковой форме соотношение наиболее сильных линий в дифракционном спектре имеет следующее значение $I(211)/I(300)=1.63$ и $I(211)/I(112)=1.94$.

Таким образом индекс текстурированности может быть рассчитан следующим образом
 $R(300)=I(211)/I(300)/1.63$
 $R(112)=I(211)/I(112)/1.94$.

Когда $R=1$, то зерна гидроксиапатита случайным образом распределены, в то время как $R>1$ или $R<1$ указывает на наличие преимущественной ориентации кристаллов ГАП в эмали, т.е. текстуры. Расчеты показывают, что для здоровой эмали индекс текстурированности принимает значение 11.3, в то время как для точек (3), (4), (5) в стенке фиссуры – 10.6, 3.16, 2.35 соответственно. Для понимания изменений в структуре твердых тканей зуба при развитии кариозного процесса в них, мы можем дать полуколичественные оценки этих изменений, проанализировав результаты рентгеновской микродифракции, приведенные на рис. 2 с введением такой величины как индекс кристалличности введенный Pearson [11]. В соответствии с этим методом кристаллический индекс кристаллов гидроксиапатита может быть вычислен с помощью высоты дифракционных пиков $h=(211)$, $a=(112)$, $b=(300)$ и $c=(202)$. Основная проблема предложенного метода состоит в том, чтобы правильно разделить эти пики в спектре. Высота пика измеряется так как представлено на рис. 2 для дифракции от области внутри кариозной фиссуры: от максимума дифракции линии, до минимума интенсивности линии – ложбины, образованной двумя близкими линиями (рис. 2).

Таким образом, индекс кристалличности CI может быть определен в соответствии с выражением:

$$CI = \frac{a + b + c}{h}$$

Рассчитанный индекс кристалличности CI для интактной эмали принимает следующие значение – 1.11, что совпадает с приводимым в литературе [6], в то время как для точек (3), (4), (5) в кариозной фиссуре этот индекс имеет значение 0.55, 1.28, 0.62 соответственно.

Известно, что содержание упорядоченной, т.е. кристаллической части в образцах пропорционально индексу кристалличности. Таким образом, снижение индекса означает аморфизацию кристалла ГАП. Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о том, что с ростом пристеночной деминерализации эмали зуба – кристаллы ГАП, упорядоченные в интактной эмали, как известно, перпендикулярно границе эмаль-дентин, с глубиной проникновения кариозного процесса распределены случайным образом в коллагеновой матрице, что соответствует случаю микрокристаллического порошкового ГАП. В то же время наблюдается аморфизация самого кристалла гидроксиапатита, т.е. его разрушение.

На основании экспериментальных данных мы можем определить размер кристаллов гидроксиапатита в соответствии с формулой Шеррера:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

где D – размер кристаллитов, K – константа близкая к 0.9, λ – длина волны характеристического излучения меди 1.540598 Å, β – полуширина рентгеновской линии (211), по которой выполнялся анализ, θ – брегговский угол для плоскости (211). Полученные результаты приведены в таблице. Для здоровой эмали размеры кристаллов ГАП составляют ~ 40 нм и как можно заметить из полученных расчетных данных уменьшаются при погружении в фиссуру.

Следует отметить, что в работе [7] приведены аналогичные исследования твердых тканей зуба методом микродифракции, однако величины кристаллитов ГАП определенные авторами работы значительно отличаются от тех, что удалось рассчитать нам. По-видимому, при определении размера кристаллита ГАП эмали и дентина авторы работы [9] допустили ошибку. Она связана с тем, что в виду слабого углового разрешения плоского детектора, использованного для получения дебаеграмм, плоскости дифракции (211) и (112) слились в единый дифракционный максимум (это хорошо видно из графиков приведенных в работе [9]) полуширина которого использовалась при расчете размера кристаллов ГАП.

Вот почему очень важно при анализе низко симметричных систем методами рентгеновской дифракции выбирать высокоточный гониометр и детектор, с высоким пространственным разрешением.

Результаты приведенные выше наглядно показывают разницу между здоровой эмалью и при возникновении кариозного процесса. Большой размер кристалла (40 нм), высокие индексы текстурированности и кристалличности, а также минимум органической составляющей – все это характеризует здоровую эмаль и согласуется с современными представлениями о ней и результатами аналогичным нашей работ [8]. В тоже время возникновение фиссурного кариеса по данным ИК-спектроскопии [2,3] характеризуется ростом органической составляющей в стенке фиссуры. Анализ различных точек кариозной фиссуры методом рентгеновской микродифракции показал, что с глубиной можно отметить уменьшение не только размера кристаллитов ГАП, но и уменьшение индексов кристалличности и текстурированности.

Все это является результатом разрушения органического матрикса, удерживающего кристаллиты ГАП и задающего им ориентацию, что приводит к дальнейшему их разупорядочению и разрушению в следствии механических воздействий и кариозного процесса.

Выводы. Таким образом, фиссурный кариес эмали характеризуется уменьшением индекса кристалличности и текстуррированности, а также отсутствием преимущественной ориентации кристаллов ГАП в пораженной эмали, что говорит о деструктивных процессах в органическом матриксе кристалла гидроксиапатита. В результате пристеночной деминерализации в дальнейшем разрушается и сам кристалл эмали.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

"We acknowledge the Synchrotron Light Source ANKA for provision of beamtime at the PDIFF beamline and we would like to thank Dr. S. Doyle for assistance in using lab PDIFF."

Литература

1. *Ипполитов, Ю.А.* Разработка и оценка эффективности методов нормализации обменных процессов твердых тканей зуба в условиях развития кариозного процесса: автореф. дис. ...докт. мед.наук. / Ю.А. Ипполитов.– Воронеж, 2012.– 48 с.
2. *Середин, П.В.* Исследования интактной, а также пораженной кариозным процессом эмали человеческого зуба методом ИК-спектро-микроскопии с использованием синхронного излучения / П.В. Середин, А.Н. Лукин, Ю.А. Ипполитов // Научные ведомости БелГУ.– 2011.– № 1.– С. 23–27.
3. *Ипполитов, Ю.А.* Исследования методом ИК-спектромикроскопии с использованием синхронного излучения интактных и пораженных кариозным процессом эмали и дентина человеческого зуба / Ю.А. Ипполитов, А.Н. Лукин, П.В. Середин // Вестник новых медицинских технологий.– 2012.– Т. XIX.– № 2.– С. 343–346.
4. *Jenkins, G.N.* The physiology and biochemistry of mouth. 4-th Ed / G.N.Jenkins. Oxford 1978;599.
5. Dental mēineralization / M. Goldberg [et al.] // Int J Dev Biol.– 1995.– 39:93–110.
6. Calcium binding of enamel proteins and their derivatives with emphasis on the calcium-binding domain of porcine sheathlin / Y. Yamakoshi [et al.] // Arch Oral Biol 2001.– 46.– P. 1005-1014.
7. D: Appl. Phys. 42 (2009) 235408 Structural and thermal behaviour of carious and sound powders of human tooth enamel and dentine / J. Phys. //Gaby E Tiznado-Orozco, R Garc'ia-Garc'ia and J Reyes-Gasga
8. High-resolution X-ray microdiffraction analysis of natural teeth Jing Xue, Linling Zhang, Ling Zou, Yunmao Liao, Jiyao Li, Liying Xiao and Wei Li //J. Synchrotron Rad. (2008). 15, 235–238
9. Fowler. In vitro evaluation of eroded enamel treated with fluoride and a prospective tricalcium phosphate agent / L. Robert [et al.]// Journal of Dentistry and Oral Hygiene Vol. 1(4), 2009.– P. 52–58.
10. Domashevskaya Synthesis Of Nanocrystalline Hydroxyapatite By Precipitation Using Hen's Eggshell/ D.L. Goloshchapov [et al.]// Ceramics International 39 (2013).– P. 4539–4549
11. Early Diagenetic Evolution of Bone Phosphate: An X-ray Diffractometry Analysis /Alain Person Hervé Bocherens Jean-François Saliège Valéry Zeitoun Martine Gérard//Journal of Archaeological Science Volume 22, Issue 2, March 1995, Pages 211–221