© **Коллектив авторов**, 2012
УДК 616.314.14-091.8

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ОБРАЗОВАНИЙ, ОБНАРУЖЕННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ ДЕНТИНА, МЕТОДАМИ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Н.О. Бессуднова, кандидат физико-математических наук, доцент, **Д.И. Биленко**, кандидат физико-математических наук, профессор, **С.Б. Вениг**, доктор физико-математических наук, профессор, **В.С. Аткин**, **В.В. Галушка**, **А.М. Захаревич**, кандидат физико-математических наук

ФГБОУ ВПО НИУ «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского»

E-mail: nadezda.bessudnova@gmail.com

При проведении серии лабораторных экспериментов обнаружены кристаллические структуры на поверхности дентина, обработанного 38% гелем ортофосфорной кислоты и выдержанного в 95% растворе этанола в течение 30 дней при комнатной температуре. Проведена объемная визуализация указанных поверхностных образований с использованием программного обеспечения Alicona 3D MeX (Alicona GmbH). Рассчитаны метрические характеристики кристаллов. Методы рентгеноспектрального микроанализа применены для определения химического элементного состава дентинной подложки и кристаллов; последние оказались кальций-фосфатными соединениями. Описан механизм формирования кристаллофосфатов кальция на дефектах поверхности дентина за счет диффузии веществ в растворе. Выявлено, что формирование и рост кристаллов происходят путем конечного перераспределения ионов материала дентина.

Ключевые слова: *дентин, формирование и рост кристаллов, визуализация, кальций-фосфатные соединения, брушит, растровая электронная микроскопия, рентгеноспектральный анализ*

EXPERIMENTAL STUDY OF CRYSTAL STRUCTURES OBSERVED ON THE SURFACE OF THE DENTINE WITH THE USE SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

N.O. Bessudnova, D.I. Bilenko, S.B. Venig, V.S. Atkin, V.V. Galuska, A.M. Zakharevich

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education National Research University Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky

In a series of laboratory experiments on the surface of dentin treated with etching gel – 38% Phosphoric Acid, and exposed to 95% ethanol solution for 30 days at ambient temperature the crystal structures have been found. Three-Dimensional Visualization of these superficial masses has been performed with the use of electronic scanning microscopy and aid Alicona 3D MeX software (Alicona GmbH). Metric characteristics of the crystals have been calculated. Methods of X-ray spectral microanalysis were used to determine the chemical elements composition of the dentinal substrate and crystals, the latters turned out to be calcium-phosphate compounds. The mechanism of the formation of Calcium phosphate crystals on the dentin surface defects due to the diffusion of substances in solution has been described. The formation and growth of crystals were found to take place by the way of the eventual redistribution of ions in dentin material.

Key words: *dentin, formation and growth of crystals, visualization, calcium phosphate compounds, brushite, scanning electron microscopy, X-ray spectral analysis*

ВВЕДЕНИЕ

Растровая электронная микроскопия (РЭМ) широко используется для визуализации объектов биологического происхождения в микро- и наномасштабах [1–4]. В настоящем исследовании в качестве объекта изучения был выбран дентин человеческих зубов. Часть подготовленных к исследованию методами РЭМ, но не использованных в эксперименте образцов дентина была оставлена в 95% растворе этанола при комнатной температуре. Через 1 мес при изучении морфологии этих образцов на поверхности дентина были обнаружены кристаллоподобные образования в виде «кустов», подобные представленным на рис. 1.

Целями данного исследования были описание обнаруженных кристаллических образований, их объемная визуализация с определением метрических характеристик, а также выявление механизмов их формирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения морфологии поверхности дентина проведены точные продольные плоскопараллельные распилы образцов зубов толщиной 1мм. Исследуемые поверхности полировали с использованием абразивных дисков Sof-Lex™ (3M ESPE) различной степени зернистости вплоть до 1мкм и далее подвер-

гали травлению 38% гелем ортофосфорной кислоты в течение 60 с с последующим промыванием дистиллированной водой и обработкой в ультразвуковой (УЗ) ванне «Сапфир 1,3» (P_{max} = 130 Вт, время экспозиции – 5 мин) для удаления смазанного слоя.

Дегидратация осуществлялась проведением образцов через растворы этилового спирта повышающейся концентрации с общим временем экспозиции 12 ч [5].

Подготовленные образцы выдерживали в растворе 95% этилового спирта 30 сут, в течение этого периода происходили формирование и рост кристаллов на поверхности дентина.

Дегазация исследуемых образцов осуществлялась в вакууме, с целью уменьшения накопления электростатического заряда на поверхности дентина проводилось напыление золотом в атмосфере аргона.

Исследования проводили с использованием аналитического комплекса на базе растрового электронного микроскопа высокого разрешения SEM Mira\\LMU фирмы «TESCAN» с системой энергодисперсионного анализа EDX INCA ENERGY 350, «Oxford Instruments», используемого нами для локального химического элементного анализа и изучения морфологии, и программного обеспечения Alicona 3D MeX (Alicona GmbH) [6].

Основными методами РЭМ являются регистрация излученных электронов с различными энергиями и зонами генерации [7], в частности вторичных электронов, и анализ характеристического рентгеновского излучения, возникающего в результате взаимодействия падающего электронного пучка с поверхностью образца.

Исследования подготовленных образцов зубов методами РЭМ заключались в получении изображений изменения морфологии поверхности дентина, связанного с образованием на ней кристаллитов. Изучение морфологии проводили в режиме детектирования вторичных электронов, которые наиболее чувствительны к рельефу поверхности.

Для построения объемных образов из 2-мерных изображений морфологии поверхности дентина с обнаруженными на ней кристаллами использован пакет прикладных программ Alicona 3D MeX.

Химический элементный состав кристаллов на поверхности дентина определяли с помощью энергодисперсионной системы микроанализа РЭМ.

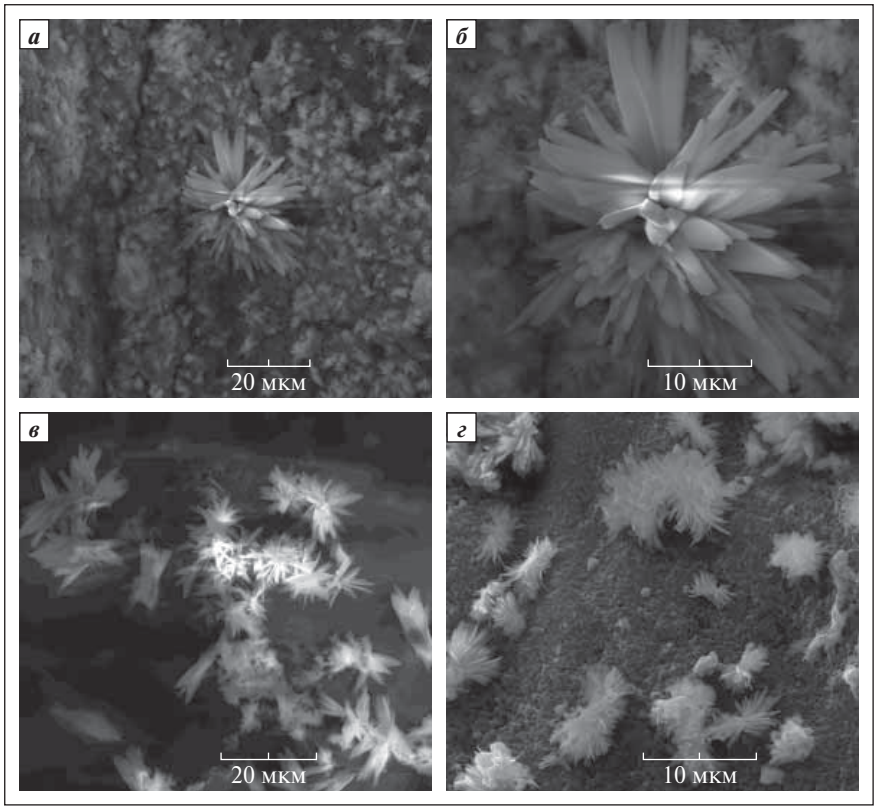

Рис. 1. *РЭМ-изображения морфологии одиночного кристалла (а, б) и группы кристаллов (в, г) на поверхности дентина, полученные в режиме детектирования вторичных электронов. Масштаб указан на электронных изображениях*

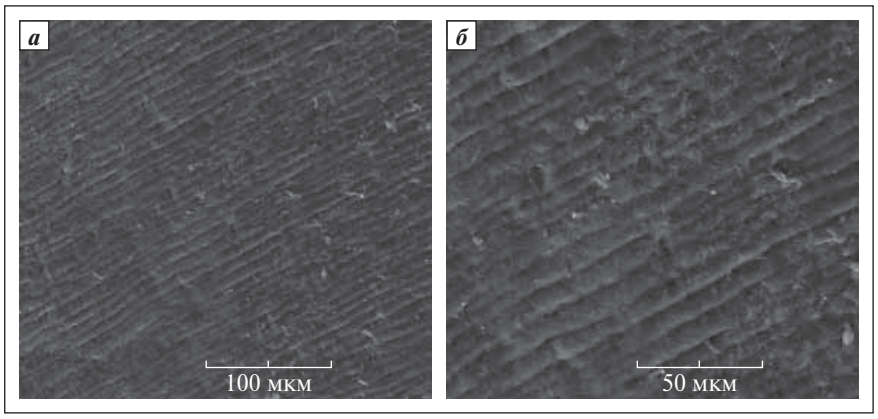

Рис. 2. *РЭМ-изображение морфологии поверхности образцов дентина, не подвергшихся экспозиции в растворе этанола в течение 30 сут при разном увеличении*

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология кристаллов на поверхности дентина

В ходе исследования морфологии дентина методами РЭМ на поверхности образцов, обработанных 38% гелем ортофосфорной

кислоты и выдержанных в течение 30 сут в растворе этанола, обнаружены самообразующиеся структуры, характерное изображение которых приведено на рис. 1. Образования «астроподобного» вида располагались в виде скоплений и характеризовались локальным направленным ростом.

Следует отметить, что на поверхности дентина, из процесса подготовки которого исключена длительная экспозиция в растворе этанола, кристаллические образования не обнаружены (рис. 2).

Объемная визуализация кристаллических образований

Построены 3-мерные модели (3D) кристаллических образований, обнаруженных на поверхности дентина.

Для построения 3D-модели из 2-мерных изображений морфологии образцов дентина использован пакет прикладных программ Alicona 3D MeX. Программа генерирует 3-мерное изображение путем восстановления объема из нескольких плоских проекций, полученных при различных углах падения электронного луча на исследуемый образец. При этом проекции фиксируются таким образом, чтобы область электронного облучения оставалась постоянной. В процессе исполнения алгоритма автоматически выбираются гомологичные точки, расстояния между которыми при совмещении проекций однозначно определяют высоту объекта.

Способы построения объемной модели

Существуют 2 способа изменения углов наблюдения образца:

• по изменению направления падения электронного луча на поверхность, при котором луч отклоняется от нормали к плоскости образца под воздействием магнитных линз. Однако этот способ имеет ряд недостатков. В частности, угол наклона луча не превышает 2° из-за конструктивных особенностей колонны микроскопа; изображение не всегда четкое вследствие потери фокуса из-за наклона луча. Указанный способ применим для анализа гладких поверхностей с незначительной шероховатостью;

• по изменению наклона держателя предметных столиков, т.е. наклона самих образцов относительно луча. Метод выглядит более привлекательным по сравнению с 1-м, поскольку допускает изменение положения столика в пространстве, что дает возможность исследовать образцы различной сложности. Наклон может производиться в автоматическом и ручном режиме.

Общим недостатком для обоих режимов является расфокусировка при изменении угла наклона при работе с большими увеличениями, так как программное обеспечение микроскопа не позволяет производить эвцентрический наклон столика (рис. 3), при котором ось наклона проходит через точку падения электронного луча на образец. При отсутствии функции эвцентрического наклона последняя имитируется путем последовательного изменения угла наклона и перемещения столика в пространстве. При этом важно сохранять размеры области электронного облучения постоянными для корректного преобразования 2-мерных изображений в 3-мерные.

В настоящем исследовании для получения объемных изображений использован ручной режим.

Результаты объемной визуализации

Результаты проведенного 3D-моделирования кристаллических структур на дентинной матрице представлены на рис. 4, 5. Полученные 3D-изображения содержат фрагменты подложки и обнаруженные на ней кристаллы. Изображения позволяют визуализировать общую форму кристаллов и рассчитать их метрические характеристики, в частности, характерные размеры всего образования и объем.

Однако построенные 3D-изображения отличаются от реальных кристаллов тем, что мелкие детали рельефа поверхности на них не разрешены (см. рис. 5). В частности, не отображены ярко выраженные пики и лепестки, хорошо визуализированные в 2-мерном изображении. Невоспроизведение деталей связано с тем, что электронный луч не проникает между экранирующими его выступающими фрагментами кристалла даже при больших углах наклона образца относительно нормали к исходной поверхности. Программа, естественно, не учитывает те нюансы, которых нет в исходной информации.

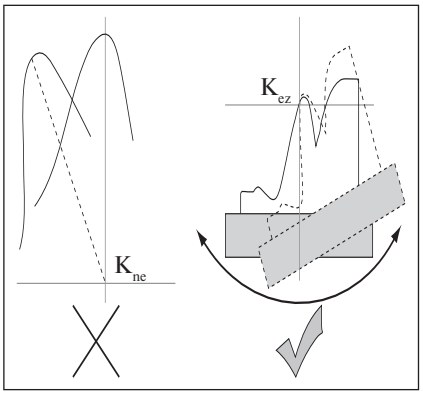

Рис. 3. *Наклон, допускаемый РЭМ: K_{ne} – ось наклона (слева) и эвцентрический наклон; K_{ez} – ось эвцентрического наклона (справа)*

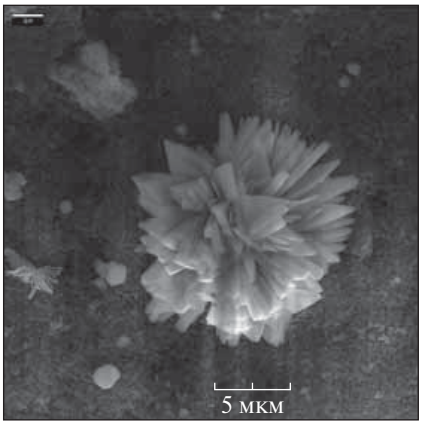

Рис. 4. *РЭМ-изображение морфологии одиночного кристалла на подложке из дентина*

Если часть информации потеряна, следует сопоставлять модель объекта с его 2-мерными изображениями для их взаимного дополнения или использовать встроенную процедуру интерполяции, восстанавливающую недостающие фрагменты 3D-образа. На рис. 6 представлена 3D-модель кристалла до и после процедуры интерполяции.

Определены метрические характеристики модели. Ее характерные размеры не изменялись в результате интерполяции и составляли 16,5 • 16,2 • 11,1 мкм (рис. 7). Объем модели кристалла с неразрешенными мелкими деталями рельефа составлял 297 мкм^3, а после интерполяции – 459 мкм^3. Указанные объемы составляют соответственно 0,1 и 0,17 объема прямоугольного параллелепипеда, описанного вокруг модели. Очевидно, потеря информации о форме исследуемого объекта приводит к ошибке в определении его объема.

Химический состав кристаллических образований

Для участка поверхности дентина с обнаруженными на ней кристаллами представлены морфология и карты распределения основных химических элементов (рис. 8). Плотность распределения белых пикселей (см. рис. 8, б–е) соответствует распределению в образце соответственно кальция (б), фосфора (в), кислорода (г), углерода (д) и кремния (е).

На рис. 9 для того же участка поверхности дентина представлены совмещенные карты распределения химических элементов в цвете (слева), и удивительные цветовые ассоциации из живой природы (справа).

Анализируя карты распределения химических элементов, представленные на рис. 8, 9, можно сделать вывод, что основными элементами, формирующими кристалл, являются кальций, фосфор и кислород.

Для проведения сравнительного анализа химического состава кристалла и дентинной матрицы были выбраны 4 области (рис. 10), в каждой из которых проводился энергодисперсионный анализ. Области 1 и 2 были выбраны на поверхностях кристалла, области 3, 4 – на подложке из дентина.

В табл. 1 и 2 представлены весовое и атомное процентное содержание химических элементов на участках, отмеченных на рис. 10.

Заметим, что в исследуемых образованиях (области 1, 2) отмечается значительное содержание кислорода и высокое по сравнению с подложкой (области 3, 4) содержание кальция и фосфора, что позволяет классифицировать кристалл как кальций-фосфатное соединение. Повышенное содержание углерода в областях 3, 4 указывает на органическую природу подложки.

Эти данные убедительно подтверждают независимость состава от предварительной обработки. Таким образом, рост наблюдаемых структур происходит путем конечного перераспределения материала дентина. Повышенное же содержание углерода в областях 3, 4 подтверждает органическую природу дентинной подложки, а его отсутствие в областях 1, 2 является дополнительным доказательством того, что информация о составе образований не включает в себя данные о составе подложки.

Для идентификации кристалла в настоящей работе использовался

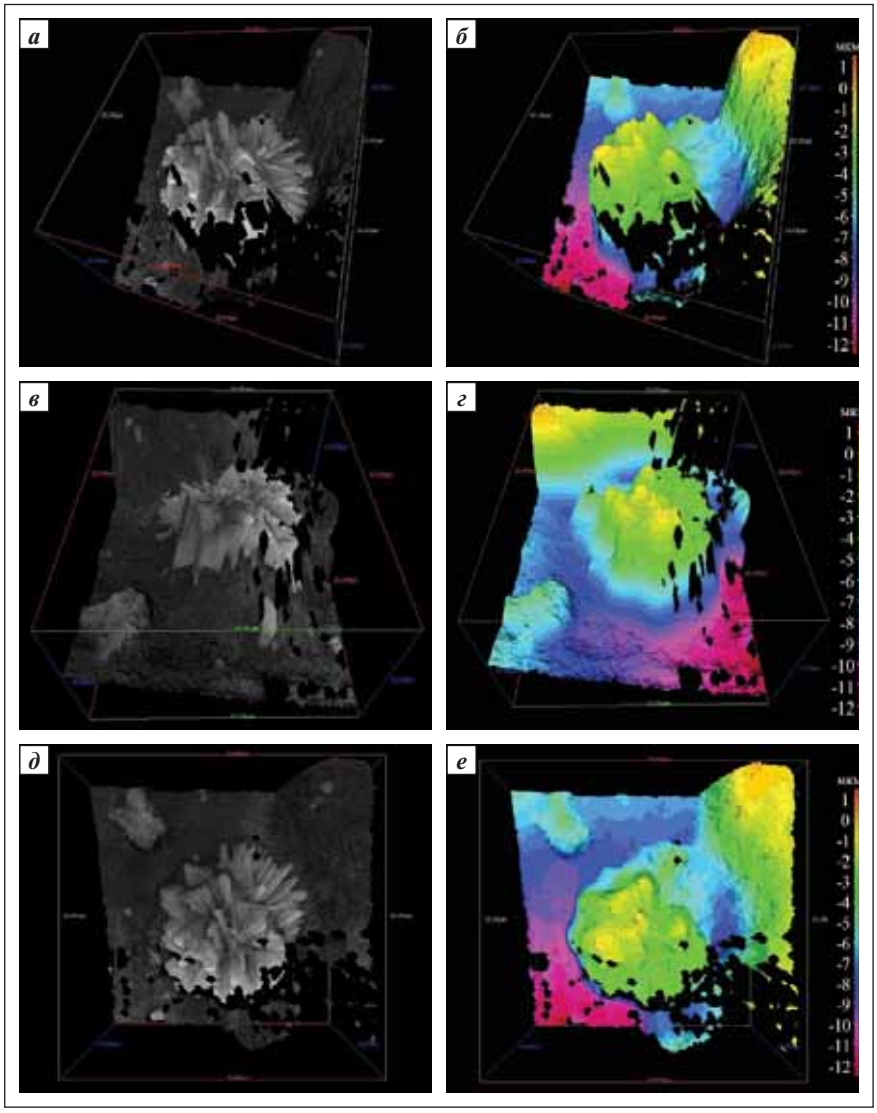

Рис. 5. *3D-модель кристалла в 3 проекциях (а, в, д) и соответствующее распределение высот (б, г, е)*

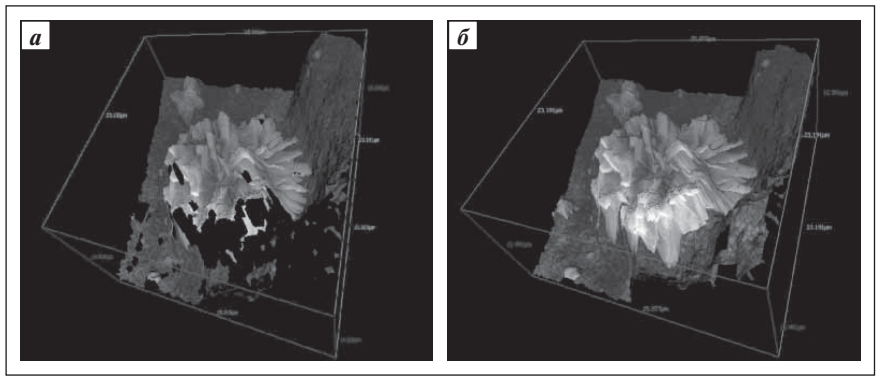

Рис. 6. *3D-изображение кристалла до (а) и после (б) процедуры интерполяции*

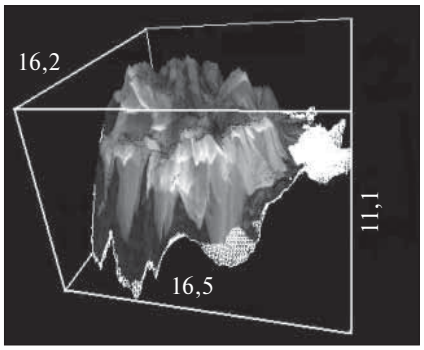

Рис. 7. *Характерные размеры модели обнаруженного кристалла (мкм)*

общеизвестный характеристический параметр ортофосфатов кальция, применяемый в стоматологии, – кальций-фосфорное соотношение.

В 3-компонентной системе $Ca(OH)_2$-H_3PO_4-H_2O существуют 11 неионнозамещенных ортофосфатов с ионным отношением кальция к фосфору от 0,5 до 2,0 [8]. Например, для гидроксиапатита кальция $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ отношение кальция к фосфору в объеме материала равно 1,67. Кальций-дефицитным апатитам $Ca_{10-x}(HPO4)_x(PO4)_{6-x}(OH)_{2-x}$, ($0<x<1$) соответствует пониженное кальций-фосфорное соотношение $1,5<Ca/P<1,67$ [8, 9]. Экспериментально полученные значения отношения Ca/P в наблюдаемых образованиях близко к 1, что соответствует дикальцийфосфатдигидрату (ДКФД) или минералу брушиту ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$).

Механизмы формирования кристаллов

Наблюдаемое в эксперименте формирование кристаллических структур на матрице из дентина может быть объяснено следующим образом.

Зарождение и формирование кристаллов происходит на неоднородностях границах микротрещин и изломов, образующихся в процессе препарирования дентина, при этом в качестве источника ионов кальция может выступать подвергшийся деструкции гидроксиапатит кальция приповерхностного слоя дентина.

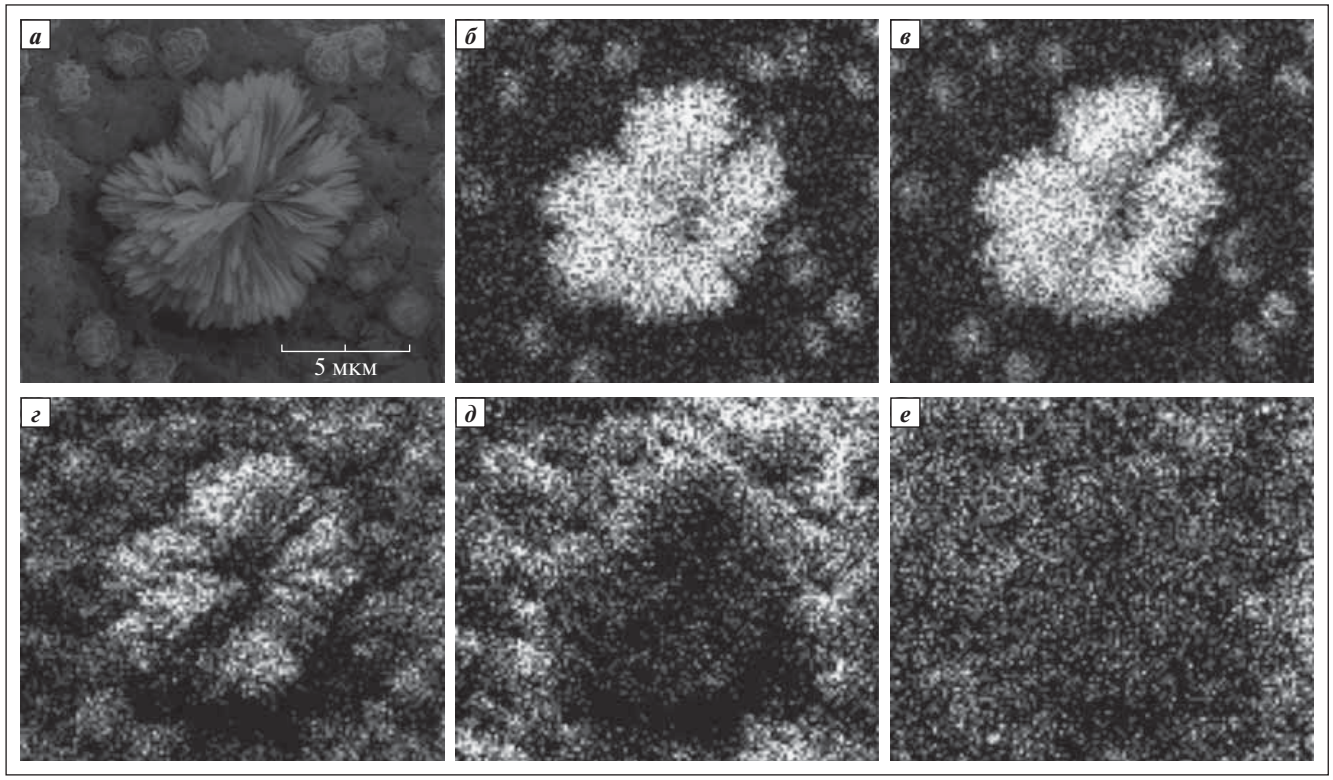

Рис. 8. *Изображение морфологии поверхности дентина, полученное в режиме детектирования вторичных электронов (а), и карты распределения химических элементов в образце: б – кальция; в – фосфора; г – кислорода; д – углерода; е – кремния*

Перенос вещества из разломов на поверхность происходит за счет диффузии ионов, входящих в состав пери- и интертубулярного дентина. Диффузия происходит с участием агента-переносчика ионов - раствора этанола, в который помещены подготовленные образцы. Перенесенные ионы осаждаются на неоднородностях поверхности дентина.

РЭМ-изображения морфологии поверхности дентина, подвергшейся деструкции, представлены на рис. 11, а, б.

Обнаруженные образования в трещинах и разломах визуализируют то, что на участках с развитой поверхностью чаще происходит зародышеобразование и наблюдается рост кристаллических структур.

Края, изломы – это области с механическими разрушениями с высоким содержанием дефектов, что приводит к увеличению значений коэффициентов диффузии и изменению механизма диффузии – от объемной к поверхностной. Развитая поверхность, приводящая к росту активных центров кристаллизации, а также большое количество дефектов на поверхности и переход объемной диффузии в поверхностную хорошо объясняют наблюдаемые образования. Указанные выше эффекты согласуются с предположением о том, что лимитирующий механизм – это диффузия реагентов, составляющих растущие кристаллические образования, единственным источником которых является дентин. Если эти вещества выходят из дентина, лимитирующим могло бы быть образование активных ионов. В этом отношении вода могла бы, на первый взгляд, быть эффективнее этанола, но есть ряд других возможных процессов, которые могли бы трансформировать гидроксиапатиты.

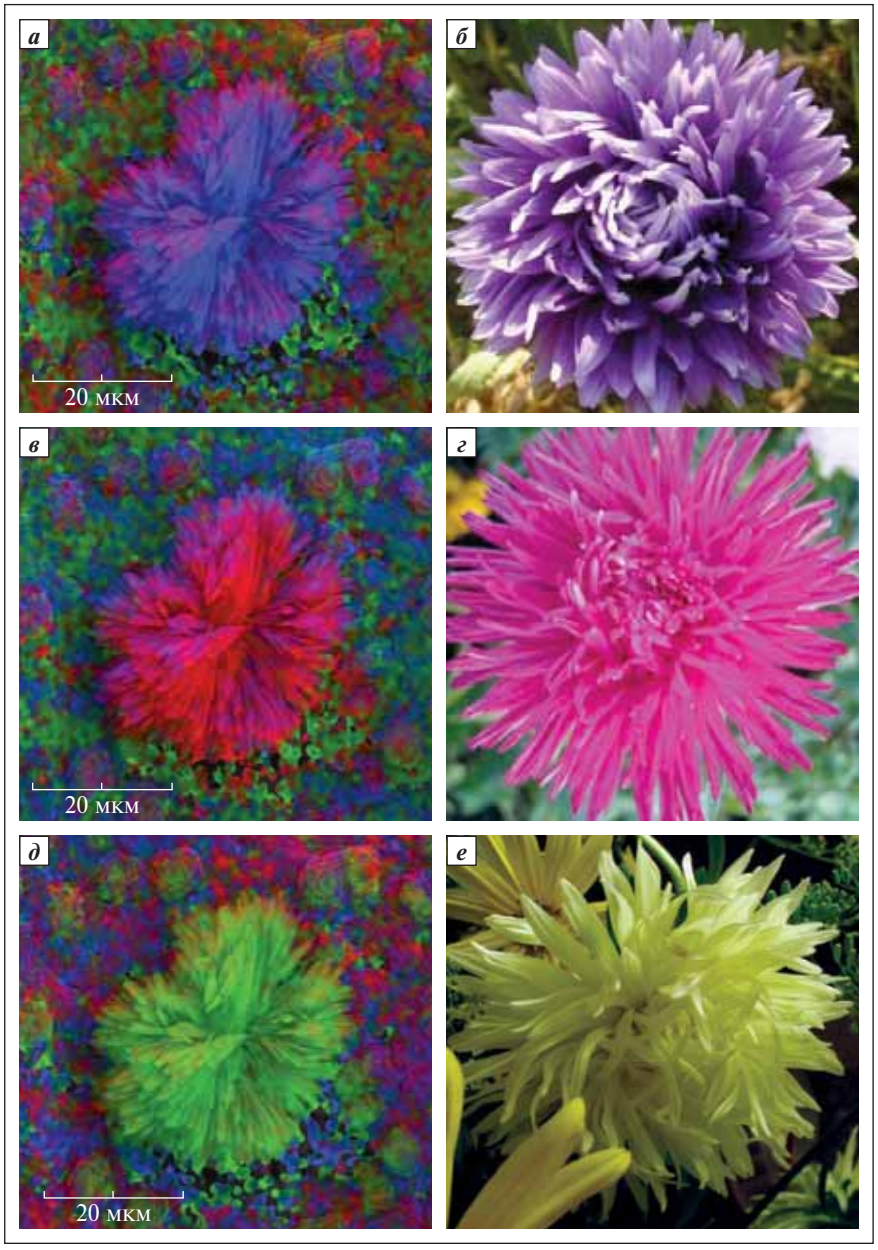

Рис. 9. *Карты распределения химических элементов в образце (а, в, д) и цветовые ассоциации из живой природы (б, г, е): а – распределение синих пикселей соответствует распределению фосфора, красных – кислороду, зеленых – кремнию; в – красным цветом обозначено распределение кальция, синим – кислорода, зеленым кремния; д – зеленым цветом – распределение кальция, красным – кислорода, синим – кремния; б – синяя астра, г – красная астра, е – желто-зеленая астра*

Отметим, что многократное протравливание исследуемых образцов ортофосфорной кислотой приводит к снижению скорости образования кристаллов, что, по-видимому, может быть объяснено сглаживанием поверхности дентина и уменьшением количества активных центров. Другой причиной является то, что источник вещества для формирования кристаллов ограничен.

ВЫВОДЫ

В результате проведенной серии экспериментов:

1) обнаружены кристаллоподобные структуры на поверхности дентина, протравленного 38% гелем ортофосфорной кислоты и выдержанного в 95 % растворе этанола в течение 30 дней при комнатной температуре;

2) применение методов рентгеноспектрального анализа по-

Таблица 1

РЕНТГЕНОСПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ОБРАЗЦА ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ОБЛАСТЕЙ (РЕЗУЛЬТАТЫ УКАЗАНЫ В ВЕСОВЫХ ПРОЦЕНТАХ)

Область	C	O	Si	P	Ca
1 (образование)	7,91	34,14	–	22,49	35,46
2 (образование)	15,48	49,65	0,95	14,58	19,33
3 (подложка)	60,04	35,51	1,66	0,81	1,98
4 (подложка)	57,29	36,91	3,77	–	2,03

Таблица 2

РЕНТГЕНОСПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ОБРАЗЦА ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ОБЛАСТЕЙ (РЕЗУЛЬТАТЫ УКАЗАНЫ В АТОМНЫХ ПРОЦЕНТАХ)

Область	C	O	Si	P	Ca
1 (образование)	14,96	48,46	–	16,49	20,09
2 (образование)	23,96	57,69	0,63	8,75	8,97
3 (подложка)	67,98	30,19	0,80	0,36	0,67
4 (подложка)	65,69	31,77	1,85	–	0,70

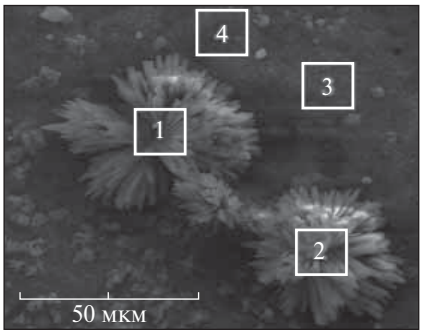

Рис. 10. *Электронное изображение морфологии поверхности дентина с указанием областей, в которых определялся химический элементный состав. Пояснения в тексте*

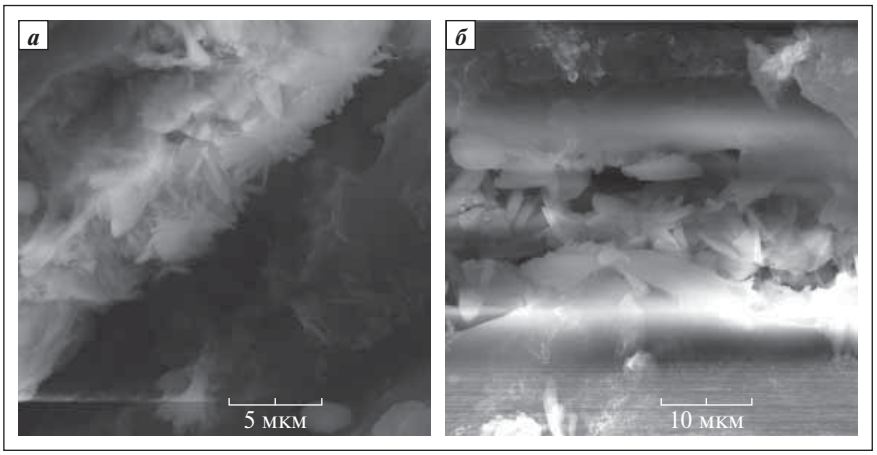

Рис. 11. *РЭМ-изображения кристаллов в разломах материала дентина*

зволило определить химический состав образований, которые представляют собой кальций-фосфатные соединения;

3) впервые визуализированы 3D-структуры кристаллов фосфата кальция на поверхности дентина с применением растровой электронной микроскопии и программного комплекса Alicona 3D MeX. Особенностью построения объемных изображений объектов со сложной геометрией является частичная потеря информации, заключающаяся в том, что мелкие детали рельефа их поверхности не разрешены. Установлено, что источником ошибок являются экранирование электронного луча выступающими фрагментами исследуемого объекта и отсутствие функции эвцентрического наклона образца в используемом растровом электронном микроскопе;

4) определены метрические характеристики кристаллов фосфата кальция: его характерные размеры и объем. Выявлено, что потеря мелких деталей рельефа в построении приводит к ошибке в определении объема кристалла;

5) описан механизм самопроизвольного формирования кристаллов фосфата кальция на дефектах поверхности дентина за счет диффузии веществ в растворе, в результате которой дентин со временем становится пространственно неоднородным веществом. Выявлено, что формирование и рост кристаллов происходят путем конечного перераспределения ионов диффундирующих веществ.

Описание механизмов формирования кристаллов фосфата кальция на поверхности дентина, а также их объемная визуализация могут быть применены для исследования кинетики процессов образования и роста кристаллов и для изучения влияния образовавшихся кристаллов на процессы репарации с образованием заместительного дентина после его препарирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dykstra M., Reuss L. Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting. – Springer publishing, 2003.
2. Marshall D., Helfrich M., Aspden R. Scanning Electron Microscopy of Bone // Methods in Molecular Medicine. – 2003; 80 (4): 311–20, doi: 10.1385/1-59259-366-6: 311.
3. Kubinek R., Zapletalova Z., Vujtek M. et al. Examination of dentin surface using AFM and SEM. Modern Research and Educational Topics in Microscopy, ed. by A.Mendez-Vilas and J. Dias // Microscopy series. – 2007; 3 (2): 593–8.
4. Pereira J., Martineli A., Tung M. Replica of Human Dentin Treated With Different Desensitizing Agents: A Methodological SEM Study In Vitro // Braz Dent J. – 2002; 13 (2): 75–85.
5. Janda R. Preparation of extracted natural human teeth for SEM investigations // Biomaterials. – 1995; 16 (3): 209–17.
6. Alicona 3D MeX User's Guide. Brno, Czech Republic: Alicona Imaging GmbH, 2009.
7. Goldstein J., Newbury D. et al. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. – Springer Science and Business Media, Inc., 2003.
8. Elliot J. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. – Amsterdam: Elsevier, 1994.
9. Hutchens S., Benson R., Evans B. et al. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel // Biomaterials. – 2006; 26: 4661–70.