

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2016
УДК 611.34.018

В. Д. Гончаров¹, И. Н. Антонова², А. В. Кипчук², А. И. Скоробогатова³

МЕТОДИКА МОРФОЛОГИЧЕСКОГО И МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПОВЕРХНОСТИ ЭМАЛИ ЗУБА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

¹ Отдел современных стоматологических технологий (руков. — д-р мед. наук В. Н. Грисимов), Научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии; ² кафедра пропедевтики стоматологических заболеваний (зав. — д-р мед. наук И. Н. Антонова), Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова; ³ кафедра теоретических основ электротехники (зав. — Е. Б. Соловьева), Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина)

Для 3D-визуализации структуры поверхности эмали зуба человека и возможности количественной оценки и сопоставления полученных изображений предложена методика исследования твердых тканей зуба с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Работа выполнена на 24 продольных спилах зубов различных групп (резцы, моляры) с интактной внешней поверхностью эмали, не подвергшейся обработке, удаленных у пациентов в возрасте 17–30 лет по медицинским показаниям. В результате тестирования методики было подобрано оптимальное сочетание параметров — Height, Mag Sin Phase для АСМ-исследования твердых тканей зуба в полуконтактном режиме. Предложены и обоснованы критерии морфометрического анализа исследуемой поверхности (средняя волнистость; средняя шероховатость). Составленный протокол позволил установить структурные особенности поверхности эмали зуба человека на наноуровне в норме и может применяться (in vitro) для сопоставления ультраструктуры поверхности и ее морфометрии при различных патологических состояниях, после воздействия механических, химических и других факторов на поверхность эмали.

Ключевые слова: эмаль зуба, поверхность, кристаллы гидроксиапатита, атомно-силовая микроскопия, методика

Для понимания изменений, происходящих на поверхности эмали зуба, необходимо использование методов исследования, позволяющих изучать её ультраструктурные особенности, не нарушая первоначальный рельеф [6]. В последнее время с этой целью как зарубежными [15–18], так и отечественными [9, 14] исследователями широко используется атомно-силовая микроскопия (АСМ). Интерес к изучению микроструктуры, топологии твердых тканей зуба обусловлен не только их уникальными свойствами, но и желанием прогнозировать, моделировать и корректировать их изменения под влиянием различных факторов с целью достижения стабильных результатов лечения основных стоматологических заболеваний [4, 5, 7, 12, 19, 20]. Однако до сих пор не выработаны единые критерии, позволяющие сопоставлять полученные результаты АСМ-изображений.

Цель исследования — разработать методику АСМ-исследования поверхности эмали зуба человека и определить критерии, позволяющие применять морфологический и морфометрический анализ для объективной оценки, полученных с помощью АСМ-изображений.

Была исследована поверхность эмали 24 интактных зубов человека (12 — резцов и 12 — моляров), удаленных по ортодонтическим показаниям у пациентов от 17 до 30 лет. Сбор

материала осуществляли в соответствии с требованиями «Этической экспертизы биомедицинских исследований» [3]. После удаления зубы промывали в проточной воде, очищали от остатков мягких тканей, помещали в раствор 0,9% натрия хлорида и хранили не более 10 сут при температуре 5–7 °С. Перед проведением исследований готовили продольный спил: на низкоскоростной бормашине алмазным сепарационным инструментом с водяным охлаждением срезали часть зуба, оставляя образец толщиной 1,5–2,0 мм с сохранением щечной (вестибулярной) поверхности. После этого образец промывали дистиллированной водой и сушили при температуре 90 °С в течение 5 мин, закрепляли на стеклянной пластине. В процессе исследований мы установили отсутствие необходимости предварительной обработки изучаемой поверхности (как, например, для растровой электронной микроскопии) [1], существенно искажающей структуру исследуемого объекта. На каждом образце резца или моляра выбирали по 3 участка поверхности, расположенных на расстоянии от 2,5 до 10 мм по направлению к корню зуба. Исследование проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа Curtus Light (Nano Scan Technology, Россия). Зондирование поверхности проводили стандартными зондами (серия NSG 15 компании NT-MDT, Россия) с резонансными частотами

Сведения об авторах:

Гончаров Вадим Дмитриевич (e-mail: vdqoncharov@rambler.ru), отдел современных стоматологических технологий, Научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Антонова Ирина Николаевна, Кипчук Алена Васильевна (e-mail: dentist-alena@yandex.ru), кафедра пропедевтики стоматологических заболеваний, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8

Скоробогатова Алена Игоревна, кафедра теоретических основ электротехники, гр. 3503, Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина), 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 5

от 300 до 400 кГц в «полуконтактном» режиме. Зонд представляет собой массивное прямоугольное основание, на краю которого размещается балка (кантилевер). К этой балке крепится тонкая «иголка» с радиусом закругления кончика 10 нм, взаимодействие которой с исследуемой поверхностью и фиксирует микроскоп.

Исследование строения спилов зубов с применением «полуконтактной» колебательной методики АСМ, по нашему мнению, позволяет наиболее точно оценить состояние поверхности. Сущность режима анализа заключалась в том, что в процессе сканирования при использовании этой методики колеблющийся кончик зонда касался поверхности и испытывал взаимодействие отталкивающих, адгезионных, капиллярных и других сил [10]. Таким образом, непосредственное механическое взаимодействие зонда с исследуемой поверх-

ностью при этом практически отсутствует. Одновременно регистрировалось изменение не только амплитуды колебаний кантилевера, но и сдвиг фазы, обусловленный неоднородностью поверхности кристаллов гидроксиапатита. Это обстоятельство в наших исследованиях используется для получения фазового контраста. В проводимых исследованиях определяли такие параметры, как высота (Height), сигнал, пропорциональный произведению амплитуды переменного сигнала на частоте модуляции на синус сдвига фазы колебаний кантилевера относительно опорного сигнала (Mag Sin), фаза (Phase). Высота позволяет оценить трехмерную картину исследуемого объекта, выяснять наиболее характерные элементы ее структуры (рис. 1).

На параметры фаза и MAG Sin перепад высот в рассматриваемых образцах практически не оказывает влияние, поэтому, если, наряду с крупными, в структуре поверхности есть неоднородности в десятки раз более мелкие, их особенности удобнее исследовать именно с помощью этих параметров [2].

Порядок АСМ-сканирования:

1. Выбрать зону сканирования на поверхности образца, определив расположение и количество точек, в которых будет проводиться исследование.
2. Провести предварительное сканирование поверхности размером 100×100 мкм (с разрешением 500 на 500 точек при частоте 1 Гц).
3. В полученной таким образом 3D-картине поверхности эмали выбрать участок с наиболее характерной структурой.
4. Дальнейшие исследования выбранного участка проводить с последовательным уменьшением зоны сканирования до 50×50, 15×15 и 5×5 мкм (с разрешением 1000 на 1000 точек при частоте 1 Гц).

Результаты наших исследований показали, что поверхность зубов различных групп имеет характерные элементы структуры. Поэтому в дальнейшем будут приведены результаты, типичные для определённого зуба и конкретного расстояния от жевательной поверхности до исследуемой области. В частности, на рис. 2 представлены результаты исследования зон сканирования поверхности эмали резца и моляра. Для наглядности приведены 3D-изображения с одинаковым масштабом по высоте.

Наглядность автоматически не обеспечивает единую трактовку результатов исследования. Внести элемент объективности в полученную информацию можно с использованием математической обработки полученных изображений поверхности, т. е. морфометрического анализа. С этой целью на основе функций программы Gwyddion (Czech Metrology Institute) были отобраны 2 критерия оценки рельефа поверхности.

Критерий 1 — («Wa» — средняя волнистость). Основан на сравнении отдельных характерных участков сканированных поверхностей. Для этого на исследованных поверхностях, размером 50×50 мкм выделяют 3 типа характерных участков (см. рис. 2). Для поверхности эмали зуба это: 1 — ровная поверхность с мелкими неоднородностями, образуемая обычными кристаллами гидроксиапатита; 2 — поверхность с преобладанием выходов «канальцев» (углубления); 3 — поверхность с преобладанием крупных кристаллов гидроксиапатита, которые имеют вид «наростов» на краях выходов «канальцев» (углублений).

Последние 2 типа поверхности удобнее всего сравнивать по параметру «волнистости» — среднему размеру крупных неоднородностей и расстояния между ними, которое описывается параметром «длина волны профиля». Чем больше

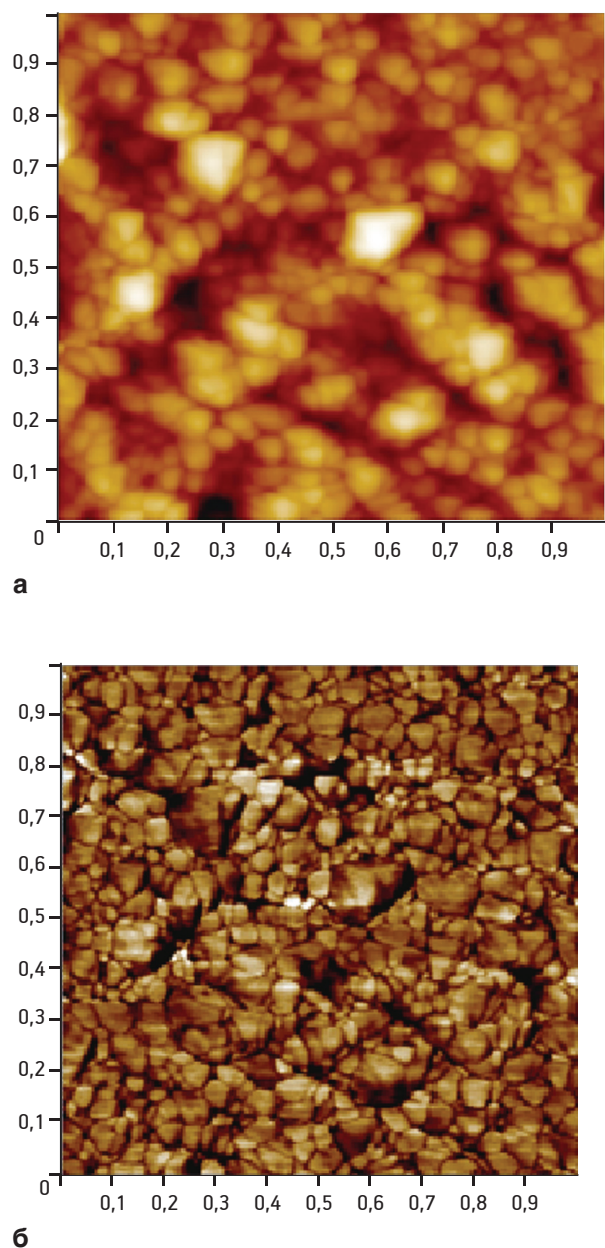


Рис. 1. Продольный спил зуба.

Поверхность эмали зуба человека (а — параметр высота; б — параметр фаза). Разрешение 10×10 мкм. Атомно-силовая микроскопия в «полуконтактном» режиме

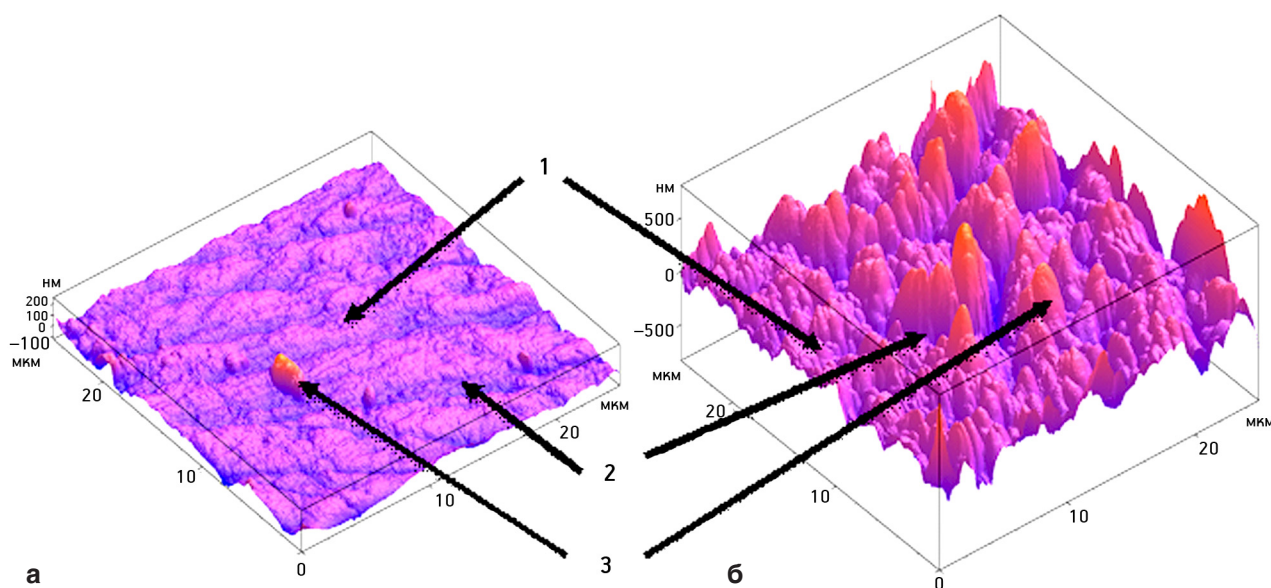


Рис. 2. Продольный спил зуба.

Поверхность эмали зуба (а — резца, б — моляра) на расстоянии 5 мм от жевательной поверхности. 1 — ровная поверхность с мелкими неоднородностями, образуемая обычными кристаллами гидроксиапатита; 2 — поверхность с преобладанием выходов «канальцев» (углубления); 3 — поверхность с преобладанием крупных кристаллов гидроксиапатита, которые имеют вид «наростов» на краях выходов «канальцев» (углублений). Атомно-силовое микроскопическое исследование. Разрешение 15×15 мкм

волнистость, тем больше высота и глубина крупных неоднородностей в исследуемом образце.

На рис. 3 приведены данные АСМ-исследования поверхности эмали моляра, полученные усреднением по 10 произвольно выбранным линиям на выделенном фрагменте 43×43 мкм при разрешении 1000×1000 и частоте 1 Гц. На этом рисунке приведены результаты сканирования (текстура) и то, как программа разделяет эти результаты на крупные (волнистость) и мелкие (шероховатость) неоднородности.

Исследования показали, что для зубов одного типа средние размеры неоднородностей на разных характерных участках (выбранных по протоколу исследования) различаются незначительно (рис. 4).

Результаты сканирования поверхности эмали зуба получены на расстоянии 5 мм от жевательной поверхности. «Длина волны профиля» во всех случаях составляла 470 нм и отличалась от этого значения не более чем на 17%.

На рис. 5 приведены результаты сравнения количества крупных неоднородностей профиля поверхности в области одинакового размера (50×50 мкм, разрешение 1000×1000 точек) для разных типов зубов и разных расстояний (5, 10 мм) от жевательной поверхности.

Результаты, полученные с использованием 1-го предложенного критерия, находятся в соответствии с субъективными оценками морфологического описания АСМ-изображений ультраструктуры, а именно: средняя высота неоднородностей эмали резцов в несколько раз меньше, чем моляров. Применение этого критерия целесообразно для морфометрического анализа крупных неоднородностей исследуемой поверхности твердых тканей зуба.

2-й критерий — основан на оценке количества точек сканированной поверхности, которые находятся на определенном расстоянии от нулевой плоскости.

Программа Gwyddion позволяет сосчитать количество точек, расположенных на определенном расстоянии, усред-

нить данное значение и, тем самым, определить преимущественное положение точек на поверхности. В результате такой обработки основная часть неоднородностей группируются около нулевого значения. При этом положительным значениям соответствуют «наросты» кристаллов гидроксиапатита на поверхности, отрицательным — «углубления» в ткани. Для удобства восприятия полученной информации графики распределения частиц по поверхности приводятся в относительных единицах (рис. 6).

Обработка информации, полученной при сканировании поверхностей, позволяет наглядно определить общие черты и различия структуры поверхности исследованных образцов твердых тканей зуба. О степени «гладкости» исследованных поверхностей можно судить, введя параметр «Δh» — изменение высоты поверхности на уровне половины сечения, в которой группируются по высоте 50% точек сканированной поверхности, что позволяет оценить размер области исследования, наглядно и количественно определить общие черты и различия ультраструктуры эмали сравниваемых образцов (таблица).

По данным литературы, для экспериментального АСМ-исследования поверхности эмали зуба в основном используются «контактный» или «неконтактный» способы [8, 9, 14, 17, 18]. Сочетание «полуконтактного» режима с выбором трех параметров сканирования каждой области при последовательном сокращении зоны исследования (от 100 до 5 мкм) обеспечивает получение максимально достоверных

Сравнительная характеристика исследуемого образца эмали зуба человека по показателю Δh (нм)

Расстояние от жевательной поверхности (мм)	Резец	Моляр
5	55±7	110±12
10	69±10	362±35

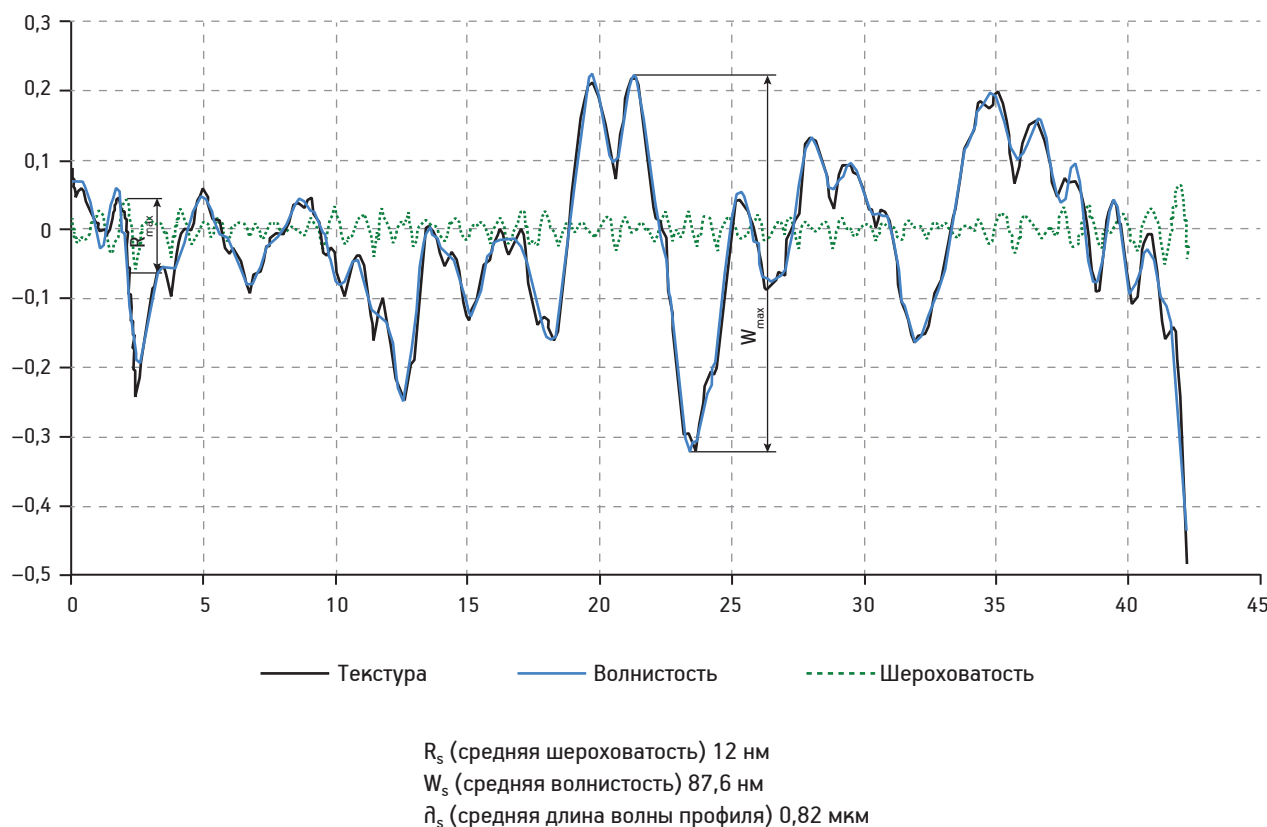


Рис. 3. Данные атомно-силового микроскопического исследования поверхности эмали моляра, полученные усреднением по 10 произвольно выбранным линиям на выделенном фрагменте 43×43 мкм при разрешении 1000×1000 и частоте 1 Гц.

По оси абсцисс — расстояние продольного сканирования поверхности образца эмали зуба (мкм); по оси ординат — высота рельефа поверхности образца эмали (нм)

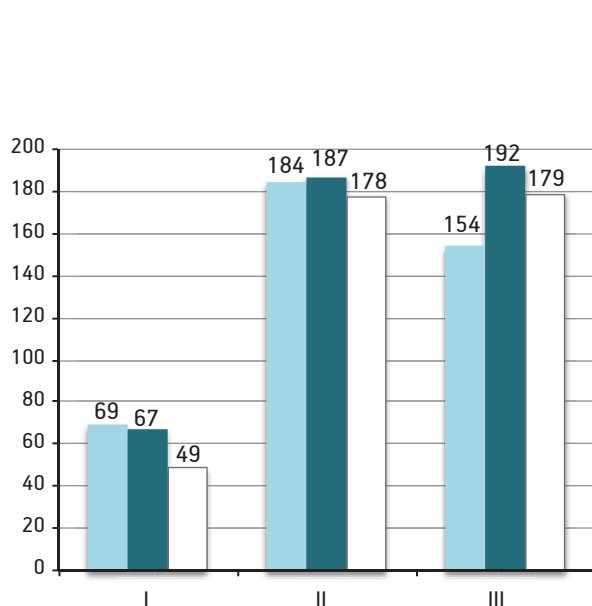


Рис. 4. Средняя волнистость трёх характерных участков интактных моляров.

По оси абсцисс — участки моляров; по оси ординат — исследованный параметр (W_a , нм)

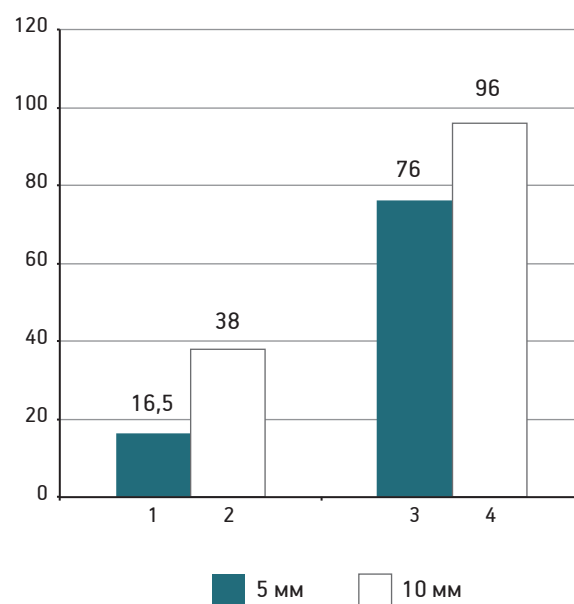


Рис. 5. Результаты сравнения средней волнистости профиля поверхности в области одинакового размера (50×50 мкм при разрешении 1000×1000) у разных типов зубов.

По горизонтальной оси — 1, 2 — резцы; 3, 4 — моляры; по оси ординат — средняя волнистость (W_a , нм)

3D-изображений ультраструктуры эмали зуба и является преимуществом настоящей методики в сравнении с другими предложенными методами АСМ-исследования. Это позволяет не использовать множество переменных и сложные математические вычисления по формулам, доступным лишь специалистам с физико-математическим образованием, а ограничиться двумя предложенными критериями для количественной оценки и объективного морфометрического анализа исследуемого образца эмали зуба. Методика анализа микроструктуры эмали зубов при помощи АСМ, включающая первичную обработку микроизображений и структурный анализ составляющих на основе сложных математических вычислений, предложена И.А.Морозовым и соавт. [9]. «Картографический подход» этих исследователей по аналогии с географическими картами близок к изложенному нами, однако, требует количественного анализа с учетом множества параметров: площади и объема всех составляющих рельефа, размера, периметра и компактности профиля поверхности и др. Для получения точных результатов требуется многократное исследование одного и того же участка поверхности эмали, нанесение на поверхность сканирования процарапанных линий (координатной сетки). Таким образом, методику сложно широко применять. Другие авторы [13, 17, 18] ограничиваются только морфологическим (описательным) анализом полученных АСМ-изображений. Некоторые исследователи используют также обработку поверхности эмали, например, протравливание 37% ортофосфорной кислотой в течение 2 с перед проведением АСМ-исследований [11]. По нашим данным, это существенно искажает результаты исследования поверхности эмали. Следовательно, для объективизации АСМ-исследований необходимо стандартизировать: подготовку спилов зуба, выбор оптимальных режимов исследования в соответствии с поставленной задачей, определить инструменты морфометрического анализа для объективизации и сопоставления полученных результатов.

Итак: 1) отсутствие предварительной обработки исследуемой поверхности позволяет увидеть и определить форму, размеры, а также пространственную организацию кристаллов гидроксиапатита на наноуровне; 2) сочетание трех параметров АСМ-сканирования в «полуконтактном» режиме и последовательного уменьшения исследуемой области от 100 до 5 мкм позволяет получать максимально подробные изображения участка поверхности эмали зуба и характерных элементов его ультраструктуры; 3) апробация методики на исследованных образцах даёт возможность утверждать, что предложенная методика проста в использовании, при этом не уступает по объективности более сложным методам морфометрии поверхности эмали зуба.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонова И.Н., Гончаров В.Д., Кипчук А.В., Боброва Е.А. Опыт исследования твердых тканей зуба с помощью атомно-силовой микроскопии // *Стоматология*. 2014. № 4. С. 11–14.
2. Антонова И.Н., Гончаров В.Д., Кипчук А.В., Боброва Е.А. Особенности морфологического строения неорганической составляющей эмали и дентина зуба человека на наноуровне // *Морфология*. 2014. Т. 146, вып. 5. С. 52–56.
3. Белоусов Ю.Б. Этическая экспертиза биомедицинских исследований: Практические рекомендации. М.: ОКИ, 2005.
4. Зайцев К.И., Карасик В.Е., Юрченко С.О. и др. Диагностика деминерализации эмали зуба с помощью терагерцовой спек-

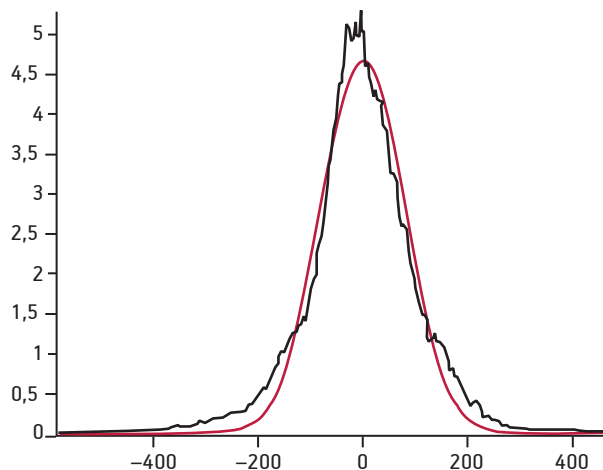


Рис. 6. Распределение частиц по поверхности эмали.

По оси абсцисс — высота рельефа поверхности образцов (нм); по оси ординат — относительное количество частиц гидроксиапатита (отн. ед.)

- троскопии // *Инженерный журн.: наука и инновации*. 2012. № 12. С. 33–48.
5. Макеева И.М., Бессуднова Н.О., Матасов М.Д. Католюминесценция как дополнительный метод исследования химического состава твердых тканей зуба // *Стоматология для всех*. 2014. № 2. С. 6–10.
6. Макеева И.М., Бякова С.Ф., Чуев В.П., Шевлюк Ю.В. Электронно-микроскопическое исследование твердых тканей зуба при клиновидных дефектах // *Стоматология*. 2009. Т. 88, № 4. С. 39–42.
7. Мандра Ю.В., Ронь Г.И., Вотяков С.Л. Современные диагностические подходы в изучении микроэлементного состава твердых тканей зубов при повышенной стираемости // *Уральск. мед. журн*. 2008. № 10. С. 85–89.
8. Морозов И.А., Беляев А.Ю., Изюмов Р.И. Экспериментальное исследование микроструктуры поверхности эмали человеческих зубов // *Материаловедение*. 2012. Вып. 184, № 7. С. 50–55.
9. Морозов И.А., Свистков А.Л., Гилёва О.С., Ерофеева Е.С. Экспериментальное исследование влияния профессионального отбеливания на микроструктуру поверхности эмали зубов // *Росс. журн. биомех*. 2010. Т. 14, № 1 (47). С. 56–64.
10. Мошников В.А., Федотов А.А., Румянцева А.И. Методы сканирующей зондовой микроскопии в микро- и наноэлектронике: учеб. пособие. СПб.: Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2003.
11. Патент РФ № 2458675. Способ изготовления препаратов зубов для морфологических исследований эмалевых призм в атомно-силовом (АСМ) и инвертированном микроскопах / А.С.Коршунов, И.Л.Шестель, Н.А.Давлеткильдеев, А.С.Лосев, Л.А.Шестель, В.П.Конев. Заявка № 2011117971/15 от 04.05.2011 г. // *Опублик. в БИ*. 2012. № 23. С. 87.
12. Пихур О.Л. Возрастные изменения состава и строения твердых тканей зуба взрослого человека: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2015.

13. Шумилов Б.Р., Воробьева Ю.Б., Малахова И.Е. Современные представления о кристаллической структуре гидроксиапатита и процессах возрастных изменений эмали зуба (исследование in vitro) // Журн. анат. и гистопатол. 2015. Т. 4, № 1 (13). С. 77–86.
14. Шумилов Б.Р., Кулин Д.А., Красавин В.Н. Новые аспекты изучения ультраструктуры эмали и решения проблемы краевого прилегания композитов // Вестн. новых мед. технологий. 2013. Т. 20, № 2. С. 330–334.
15. Bertassoni L., Habelitz S., Pugach M. et al. Evaluation of surface structural and mechanical changes following remineralization of dentin // Scanning. 2010. Vol. 32. P. 312–319.
16. Cerci B.B., Roman L.S., Guariza-Filho O. et al. Dental enamel roughness with different acid etching times: Atomic force microscopy study // Eur. J. Gen. Dent. 2012. Vol. 1. P. 187–191.
17. Lechner B.D., Röper S., Messerschmidt J. et al. Monitoring demineralization and subsequent remineralization of human teeth at the dentin-enamel junction with atomic force microscopy // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015. Vol. 7, № 34. P. 18937–18943.
18. Poggio C., Ceci M., Beltrami R. et al. Atomic force microscopy study of enamel remineralization // Ann. Stomatol. (Roma). 2014. Vol. 5, № 3. P. 98–102.
19. Taube F., Marczewski M., Norén J.G. Deviations of inorganic and organic carbon content in hypomineralised enamel // J. Dent. 2014. Vol. 43, № 2. P. 269–278.
20. Yang S., Li B., Akkus A. Wide-field Raman imaging of dental lesions // Analyst. 2014. Vol. 139, № 12. P. 3107–3114.

Поступила в редакцию 20.04.2016

Получена после доработки 07.06.2016

METHOD FOR MORPHOLOGICAL AND MORPHOMETRIC ANALYSIS OF HUMAN TOOTH ENAMEL USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY

V.D. Goncharov¹, I.N. Antonova², A.V. Kipchuk²,
A.I. Skorobogatova³

An atomic force microscopy (AFM) study technique was developed to allow 3D visualization of human tooth enamel surface structure and quantitative evaluation and comparison of the obtained images. The work was performed on 24 longitudinal sections of different groups of teeth (incisors, molars) with intact untreated outer surface of the enamel, removed on medical indications from patients aged 17–30 years. After testing the method, an optimal combination of «Height», «Mag Sin» and «Phase» settings was chosen for AFM study of dental hard tissues in semi-contact mode. Criteria for morphometric analysis of the studied surface (medium wave, average roughness) were proposed and justified. The formulated protocol allowed to describe normal structural features of human tooth enamel surface on nanoscale; it can be used (in vitro) for examining the enamel surface ultrastructure and its morphometry under pathological conditions and after its exposure to mechanical, chemical and other factors.

Key words: *tooth enamel, surface, crystals of hydroxyapatite, atomic force microscopy, method*

¹ Department of Modern Stomatologic Technologies,

² Department of Propedeutics of Stomatological Diseases, Research Institute of Stomatology and Maxillofacial Surgery, First I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University;

³ Department of Theoretical Basis of Electrical Engineering, St. Petersburg V.I. Ulyanov-Lenin State University of Electrical Engineering