© И.Н.Антонова, В.Д.Гончаров, А.В.Кипчук, Е.А.Боброва, 2014 УДК 611.314.018

И.Н.Антонова, В.Д.Гончаров, А.В.Кипчук и Е.А.Боброва

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ЭМАЛИ И ДЕНТИНА ЗУБА ЧЕЛОВЕКА НА НАНОУРОВНЕ

Кафедра пропедевтики стоматологических заболеваний (зав. — д-р мед. наук И.Н.Антонова), отдел современных стоматологических технологий (руков. — д-р мед. наук В.Н.Грисимов), Научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова

На 20 шлифах моляров и премоляров постоянных зубов человека определены режимы зондовой атомно-силовой микроскопии, позволяющие оценить размер, форму, пространственную конфигурацию структурообразующих кристаллов гидроксиапатита неорганической части эмали и дентина. Установлено, что большая часть кристаллов эмали имеют размер 40–60 нм и более плоскую форму. Средний размер частиц дентина — 60–80 нм. Микропространства между ними имеют форму эллипсоида вращения с размерами 120 на 60 нм.

Ключевые слова: зуб, эмаль, дентин, кристаллы гидроксиапатита, атомно-силовая микроскопия

Современное представление о гистологическом строении твердых тканей зуба основано на использовании таких методов исследования, как световая и электронная микроскопия, причем материалом обычно являются продольные или поперечные шлифы удаленных по клиническим показаниям зубов. Существующие методики подготовки шлифов включают фиксацию, контрастирование, напыление, изготовление реплик [4, 8, 12], что, безусловно, искажает ультраструктурную организацию тканей. Новые методы исследования, в частности атомно-силовая микроскопия (АСМ), помогают дополнить существующие знания о строении эмали и дентина зуба на наноуровне [7, 10, 17, 18]

В последнее десятилетие опубликовано много исследований твердых тканей зуба на микроструктурном уровне, в частности работ, посвященных изучению кристаллической решетки неорганической составляющей эмали и дентина. Эти работы требуют специальных знаний в области физикохимических наук, поэтому проводятся совместно со специалистами, работающими в области биотехнологий [2, 3, 9].

Цель настоящего исследования — изучить особенности строения неорганической составляющей твердых тканей зуба человека (эмали, дентина) и основные закономерности их пространственной организации на наноуровне.

Материал и методы. Исследованы продольные и поперечные шлифы 10 интактных постоянных зубов, удаленных по ортодонтическим показаниям у пациентов в возрасте от 17 до 30 лет. Сбор материала осуществляли в соответствии с требованиями «Этической экспертизы биомедицинских исследований» [15]. Свежеудаленные зубы промывали в проточной воде, очищали от мягких тканей, хранили в 0,9% растворе натрия хлорида при температуре 5–7 °С. Из каждого зуба готовили 2 шлифа — продольный и поперечный (выше экватора коронки зуба). Толщина шлифов, полученных путём распила на низкоскоростной бормашине алмазным сепарационным диском с водяным охлаждением, — 2 мм. Для выравнивания поверхности использовали микромотор и полировочные диски различной зернистости (Sof-Lex, 3M ESPE, США), ручную доработку.

Предварительные исследования свидетельствуют, что подготовка шлифа зуба, которая обычно заключается в травлении и полировке с использованием порошков и паст, существенно искажает результаты. Чтобы избежать этого, мы модифицировали стандартную методику [4, 7].

Наша методика подготовки шлифа для ACM-исследований исключает применение любых средств пропитывания и полировки тканей, кислотное травление твёрдых тканей зуба. Вместо этого для удаления плохо связанных частиц используется обработка поверхности шлифа в ультразвуковой ванне собственной конструкции с последующей сушкой в течение 12 ч при температуре 25 °C в потоке воздуха. Такая обработка обеспечивает визуализацию неорганической компоненты эмали и дентина на наноуровне.

Исследования структуры тканей зуба проводили с помощью сканирующих зондовых микроскопов Ntegra Prima (NT-MDT, Россия) и Certus Light (Nano Scan Technology, Россия) в лаборатории Санкт-Петербургского государствен-

Сведения об авторах:

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

ного электротехнического университета. Подобное оборудование позволяет на наноуровне исследовать микрорельеф поверхности и его локальные свойства. При этом, в полуконтактном режиме были использованы стандартные зонды, закрепленные на консоли с радиусом закругления кончика 10 нм. Расстояние между зондом и поверхностью шлифа составляет 0,1-10,0 нм [7, 10, 11]. Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу рабочей консоли. По величине изгиба определяют и силу взаимодействия зонда с поверхностью исследуемого образца. Основные регистрируемые параметры — деформация изгиба консоли и деформация кручения консоли — определяют режимы исследования (height и mag*sin). Оптическая система преобразует полученные данные и фиксирует результат в компьютере. Результаты таких исследований наиболее наглядно выглядят в 3D-разрешении. (*рис. 1, а, б*). В плоском варианте при существенном различии высот в исследуемом объекте эти результаты исследования оказываются недостаточно наглядны. В этом случае, так же как при оптических методах исследования, можно сфокусировать и получить чёткое изображение только на определённом уровне. Поэтому значительная часть наших результатов представлена с помощью параметров mag*sin, значения которых в меньшей степени зависят от распределения высот. Это наглядно демонстрируют приведённые результаты сканирования в режиме height (puc. 2, a) и mag*sin (см. рис. 2, б). При исследовании по высоте участки, которые находятся на разном расстоянии от взятой за основу поверхности образца, выделяются неодинаковой интенсивностью цвета. Исходя из этих измерений определяли размеры частиц.

Результаты исследования. Проведённые нами АСМ-исследования показывают, что эмаль и дентин представляет собой принципиально пористые, состоящие из отдельных однотипных частиц, ткани зуба. При этом основная часть кристаллов гидроксиапатита эмали в поперечном ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



Рис. 1 Поперечный шлиф эмали зуба.

 кристаллы гидроксиапатита с размером от 40 до 60 нм;
кристаллы гидроксиапатита с размером от 100 до 200 нм;
микропоры. Атомно-силовая микроскопия.
3В-модель. Разрешение 1×1 мкм

сечении образцов имеют сложную форму и размеры между 40 и 60 нм (см. рис. 1). Наряду с этими частицами наблюдается некоторое количество кристаллов гидроксиапатита размером от 100 до 200 нм (см. рис. 1) и микропоры (см. рис. 1), характерные размеры которых не превышают 200 нм.

Кристаллы отличаются по размерам и плотности прилегания в зависимости от расположения и ткани (эмаль или дентин) (см. рис. 2, б). Проведённые исследования показали, что размер кристаллов гидроксиапатита, составляющих ткани зуба, плавно изменяются от преимуще-



Рис. 2. Поперечный шлиф дентина зуба.

Атомно-силовая микроскопия. а — режим Height, б — режим mag*sin. Разрешение 1×1 мкм

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



Рис. 3. Размер структурообразующих частиц эмали (а) и дентина (б) зуба.

1 — вершины кристаллов гидроксиапатита; 2 — профиль микропространств; 3 — изменение направления (изгиб) микропространств в форме «эллипсоида вращения»

ственно 60–80 нм в дентине до 40–60 нм в эмали (puc. 3, a, 6).

Типичная картина продольного сечения образца дентина приведена на *рис. 4*. В этом сечении кристаллы гидроксиапатита имеют форму неравносторонних гексогональных фигур с характерными размерами поперечного и продольного сечения 60 нм и 120 нм, соответственно (*рис. 5*). Длинная сторона направлена преимущественно к поверхности зуба. Отдельные частицы, связы-



Рис. 4. Продольный шлиф дентина зуба.

1 — микропространства с формой эллипсоида вращения, размер 120 нм на 60 нм (соотношение сторон 2:1); 2 — соединение кристалла гексагонемной формы гидроксиапатита по короткой стороне; 3 — микропространства сложной формы. Атомно-силовая микроскопия. Режим mag*sin. Разрешение 3.5×3.5 мкм ваясь по короткой стороне гексогональной формы, образуют соединения, напоминающие «цепь» (см. рис. 5). Цепи кристаллитов представляют собой вытянутые структуры диаметром от 50 до 150 нм и длиной до нескольких мкм (см. рис. 5), которые, в свою очередь, объединяются в более крупные структуры — пучки призм, границы которых окаймляют группу в 20-30 структурных единиц. В одних случаях кристаллы плотно примыкают друг к другу, в других — между ними присутствуют микропространства (см. рис. 5), поперечные размеры которых изменяются от 50 до 300 нм и имеют сложную пространственную организацию в виде эллипсоида вращения с характерными размерами 120 нм на 60 нм, т.е. с соотношением сторон 2:1 (см. рис. 3, б). Длинная сторона эллипсоида направлена преимущественно к поверхности зуба.

Эти просветы в живой ткани зуба заполнены органическим компонентом. Сложность пространственной структуры приводит к тому, что на поверхности поперечного сечения исследуемого участка шлифа зуба нет сквозного канала определенной направленности (см. рис. 5).

Более полно представить различия продольного и поперечного сечения структуры эмали и дентина позволяют сравнения 3D-картины (см. рис. 1 и 5) при одинаковом разрешении.

Обсуждение полученных данных. По результатам электронной микроскопии, поверхность эмали зуба человека имеет характерный рельеф — в виде перикиматий и углублений (ямок) [3, 13]. 3D-структура ткани, выявленная в данном исследовании, наглядно демонстрирует это. На наноуровне видно, что структура неорганической составляющей эмали и дентина зуба человека однотипна по своей природе. Кристаллы гидроксиапатита в этих тканях отличаются только характером организации: плотностью расположения, формой частиц. Так, эмаль зуба составляют более плоские, плотно расположенные частицы кристаллов, в то время как дентин — более округлые, рыхло расположенные. Это обусловлено, в том числе, функциональным состоянием тканей: а именно, воздействием жевательной нагрузки [3, 16]. Эмаль зуба при такой структуре демонстрирует большую прочность, в то время как дентин — эластичность, достигающуюся не только плотностью расположения частиц в ткани, но и особым соединением их между собой на наноуровне в виде «цепей». Общепринято, что в тонком слое шлифа зуба дентинные трубочки расположены параллельно друг другу и равномерно распределены по его сечению. Установлено, что кристаллы гидроксиапатита, составляющие основу эмалевых призм и неорганическую составляющую дентина, имеют гексагональную форму [1, 5, 14]. Наши исследования показывали, что эта форма повторяется на ультраструктурном уровне, имеет вид не равностороннего шестиугольника, в виде сот, а характерно вытянутого. Впервые показано, что соединение структурных элементов происходит по короткой стороне шестигранника. Геометрические параметры дентинных трубочек и закономерности их расположения в ткани зуба хорошо изучены [6, 13]. Обнаружено, что диаметр трубочек неравномерен на протяжении от пульпы к эмали зуба, а по отношению к дентино-эмалевому соединению направление меняется вплоть до перпендикулярного, при этом они частично изогнуты, имеют разветвления, бифуркации. Анализ АСМ-изображения показывает, что при одинаковом разрешении более полную картину о внутренней структуре твёрдых тканей зуба позволяет получить сочетание режимов сканирования. Полученные нами данные свидетельствуют, что микропространства имеют эллипсоидную форму, подчиняясь строгой математической закономерности. Сложность пространственной структуры приводит к тому, что на поверхности поперечного сечения, микропространства имеют вид простых углублений. Диаметр дентинных трубочек уменьшается в направлении от пульпы зуба к эмалево-дентинному соединению соответственно от 2-3 до 0,5 мкм. Также происходит изменение плотности расположения канальцев от дентина к эмали [2]. Результаты данного исследования демонстрируют, что от дентина к эмали пропор-



Рис. 5. Продольный шлиф дентина зуба.

1 — кристаллы гидроксиапатита неравносторонней гексагонемной формы; 2 — соединение кристаллов гидроксиапатита дентина зуба; 3 — цепи кристаллов гидроксиапатита диаметром от 50 до 150 нм; 4 — микропространства размером от 50 до 300 нм. Атомно-силовая микроскопия. 3D-модель. Разрешение 2,0×3,5 мкм

ции просвета канальцев уменьшаются в строгой последовательности. В частности, на поперечном шлифе дентина они занимают от 10–15% площади сечения (крупные канальцы — 5–7%), в аналогичном шлифе эмали их суммарная площадь не превышает 5–7%, при этом крупных канальцев практически не наблюдается.

Таким образом, с помощью ACM удалось уточнить основные характеристики неорганической составляющей твердых тканей зуба. Для исследования формы и пространственного расположения частиц кристалла гидроксиапатита оптимальным является режим исследования mag*sin и построение 3D-модели, в то время как режим height («по высоте») позволяет установить точный размер частиц на продольных и поперечных шлифах. Сопоставление полученных данных помогает визуализировать пространственную организацию эмали и дентина зуба человека на наноуровне, определить конфигурацию микропространств в исследуемых тканях.

ЛИТЕРАТУРА

- Быков В. Л. Гистология и эмбриология органов полости рта человека: Учебное пособие. М., ГЭОТАР-Медиа, 2014.
- Золотарев И.К. Структурная организация дентиновых трубочек в коронковой части зуба. Институт стоматологии, 2006, № 2, с. 78–80.
- Ипполитов Ю. А. Функциональная морфология эмали человеческого зуба. Вестн. новых мед. технол., 2010, т. 12, № 2, с. 56–58.
- 4. Костиленко Ю.П. и Бойко И.В. Метод изготовления препаратов прижизненно сохраненных зубов для многоцелевых исследований. Клин. анат. и операт. хир., 2004, № 3, с. 63–65.

- Костиленко Ю. П. и Бойко И. В. Структура зубной эмали и ее связь с дентином. Стоматология, 2005, т. 84, № 5, с. 63–65.
- Леонтьев В.К. Особенности микроструктуры эмали и дентина интактных и кариозных зубов. Материалы конф. посвящ. памяти проф. А.А. Паникаровского. М., изд-во ЦНИИ стоматологии, 2002, с. 59–62.
- 7. Лозовская Е.Л. Атомно-силовая микроскопия. Наука и жизнь, 2004, № 1, с. 60.
- Луцкая И.К. Гистология зуба. Соврем. стоматол., 2006, № 4, с. 37–43.
- Мандра Ю. В., Ивашов А. С., Вотяков С. Л. и Киселева Д. В. Возможности применения романовской микроспектроскопии для исследования структурных особенностей твёрдых тканей зубов человека. Пробл. стоматол., 2011, № 1, с. 24–26.
- Миронов В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии: учебное пособие, Нижний Новгород. Изд-во РАН, 2004.
- Мошников В.А., Федотов А.А. и Румянцева А.И. Методы сканирующей зондовой микроскопии в микро- и наноэлектронике: Учебное пособие. СПб., Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2003.
- 12. Роскошная А.С., Багров Д.В., Онищенко Г.Е. и Шайтан К.В. Применение атомно-силовой микроскопии для визуализации срезов тканей. В кн.: Современные достижения бионаноскопии. Материалы Третьей международной конференции. М., Изд-во МГУ им. М.В. Ломоносова, 2009. с.47.
- Тихонов Э.П. Микро- и макроморфология в формировании генезиса твердых тканей зубов. Институт стоматологии, 2005, № 2(27), с. 73–77.
- Цимбалистов А.В., Пихур О.Л., Франк-Каменецкая О.В. и др. Результаты исследования морфологического строения, химического состава и параметров кристаллической решетки апатитов твердых тканей зубов. Институт стоматологии, 2004, № 2(23), с. 60–63.

- Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации. Под ред. Ю.Б. Белоусова. М., изд. Российского общества клин. исслед., 2005.
- Bajaj D. and Arola D. Role of prism decussation on fatigue crack growth and fracture of human enamel. Acta Biomater., 2009, v. 5, p. 3045–3056.
- Binnig G., Quate C. F. and Gerber C. Atomic force microscope. Phys. Rev. Lett., 1986, v. 56, № 9, p. 930–933.
- Elhaum R., Tal E., Perets A. et al. Dentin micro-architecture using harmonic generation microscopy. J. Dent., 2007, v. 35, p. 150–155.

Поступила в редакцию 28.04.2014

PECULIARITIES OF THE MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF THE INORGANIC COMPONENT OF HUMAN DENTAL ENAMEL AND DENTIN AT NANO-LEVEL

I.N.Antonova, V.D.Goncharov, A.V.Kipchuk and Ye.A.Bobrova

Using the polished sections of 20 permanent human molars and premolars, the regimes of probe atomic force microscopy were assessed that permit the definition of the size, shape, spatial configuration of the structure-forming hydroxyapatite crystals of enamel and dentin inorganic component. It was found that the major part of enamel crystals had the size of 40–60 nm and were more flattened. Dentin crystal average size was equal to 60–80 nm. Microspaces between them had the shape of rotational ellipsoid sized 120 nm by 60 nm.

Key words: tooth, enamel, dentin, hydroxyapatite crystals, atomic force microscopy

Department of Propaedeutics of Dental Diseases, Department of Modern Stomatological Technologies, Research Institute of Stomatology and Maxillo-Facial Surgery, First St.Petersburg I.P.Pavlov State Medical University