

УДК: 616.314:616-001.28

**ОСОБЛИВОСТІ СКЛАДУ
ТВЕРДИХ ТКАНИН ЗУБІВ ОСІБ
З РАДІАЦІЙНИМ ОПРОМІНЕННЯМ В АНАМНЕЗІ**
(за даними раманівської спектроскопії)

В. Г. Бебешко¹, Л. В. Завербна², Л. О. Дарчук³

¹ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", м. Київ

²Львівський національний медичний університет

імені Данила Галицького, м. Львів

³Інститут фізики напівпровідників імені В. С. Лашкарьова НАУ м. Київ
Хімічний факультет університету м. Антверпена, Бельгія

Ключові слова: зуби, опромінення, спектроскопія.

Серед чисельних методик дослідження структури кісткової тканини найефективнішими визнано поляризаційну світлову мікроскопію, що дозволила розпізнати три типи остеонів компактної кістки [1], а також рентгенівський мікроструктурний аналіз, який дозволив виявити особливості розташування колагенових фібріл довкола остеону [2]. Найбільшу складність у використанні цих методик становить гетерогенність кісткової тканини, і як наслідок, погана візуалізація рентгенівським променем її органічної матриці. Ці недоліки дозволяє усунути методика вібраційної мікроспектроскопії. На даний час широке застосування отримав метод раманівської спектроскопії, який дозволив спростити дослідження мінеральної і органічної складових, як пластинчатої, так і губчастої кісток. Оскільки принцип цього методу базується радше на розсіюванні світла, аніж на його поглинанні, досліджуваний зразок можна використовувати неодноразово у різних проекціях, не боячись деструктивних змін, що виникають під час проведення самого дослідження [3]. Ще однією перевагою раманівської електроскопії у порівнянні з інфрачервоною спектроскопією є висока роздільність (0,5–1 мкм), що робить можливим аналіз біологічно важливих ділянок; таких як ділянки навколо мікротріщин, окремі остеони, зв'язки між органічними і неорганічними компонентами кісткової тканини, а також структуру тубулярного дентину, розмір каналців якого ~ 1 мкм [4].

Метою даного дослідження стала оцінка молекулярних і міжмолекулярних зв'язків у кристалах гідроксиапатиту твердих тканин зубів та

їх порушення внаслідок дії іонізуючого випромінення (ІВ) методом раманівської спектроскопії.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження стали 8 зубів, видалених за медичними показаннями у людей, які зазнали впливу ІВ в дозах 0,7–1,7 Гр. Контрольна група — 10 зубів, видалених у мешканців м. Львова, ще не зазнали радіаційного впливу. Для роботи використовували установку Renishaw-in-Via 2000 р. випуску з довжиною хвилі збуджуючого лазера 785 нм. Лазерний промінь фокусовано об'єктивами мікроскопа на поверхню зразків зубів, діаметр лазерного променя становив 2–4 мкм. Комбінаційне розсіювання зумовлене непружним зіштовхуванням фотонів з молекулами або іонами речовини в процесі якого вони обмінюються енергією. По зміні енергії фотона можна судити про зміну енергії молекули, тобто про перехід її на новий енергетичний рівень. Принцип цього методу базується на законі Штарка-Енштейна, згідно з яким кожен поглинений квант світла активує тільки одну молекулу.

$$E=hv, \quad (1)$$

де h — стала Планка ($h=6,625 \cdot 10^{-34}$ Дж·с), v — частота падаючого кванта. Молекула, що перебуває у незбудженному стані з енергією E_0 , під дією кванта з енергією hv_0 збуджується в проміжний (віртуальний) стан енергією $E_{\text{вір}}$, звідки може або повернутися у вихідний стан, випустивши квант hv_0 (реелівське розсіювання), або перейти у стан E_i , випустивши квант $h(v_0-v_i)$, що призводить до появи у спектрі розсіяного випромінення ліній з частотами v_0-v_i (стоксові лінії).

Якщо до поглинання фотону молекула перебуває у збудженному стані з енергією E_i , то після розсіювання світла вона може перейти як у початковий, так і в основний стан E_0 , тоді енергія розсіяного світла зростає, складаючи $h(v_0+v_i)$, що приводить до появи у спектрі ліній з частотами v_0+v_i (антистоксові лінії). Енергетичний стан речовини характеризує різницю енергій збуджуючого і розсіяного світла E_i+hv_i , тобто найважливішою характеристикою раманівських спектрів є не самі частоти, а їх зміщення (shift) відносно частоти реелівської лінії [5].

Після очищення від м'яких тканин видалені зуби замочували на 24 год. у розчині гіпохлориту натрію для звільнення від додаткових органічних нашарувань, промивали дистильованою водою і заливали полімером. Після його застигання зуби розпиливали поздовж на тонкі пластинки товщиною 1–1,5 мм.

Раманівські спектри досліджували у ділянці 100–3200 см⁻¹ зі спектральним поділом у 4 см⁻¹. Для поліпшення співвідношення сигналу до

шуму застосовували акумуляцію до 5–7 сканів. Усі спектри отримані в режимі pinhole. Спектральні криві складалися з декількох характерних смуг колагену і гідроксиапатиту. Розмах смуг встановлено відносно до найсильнішої смуги спектру v_1 (PO_4^{3-}) на частоті 960 cm^{-1} . Співвідношення органічних компонентів до неорганічних фіксоване згідно з ідеалізованою моделлю гідроксиапатиту, описаною [6].

Результати досліджень. Аналіз спектрів твердих тканин зубів показав, що внаслідок впливу ІВ в дозах 0,7–1,7 Гр структура кристалів гідроксиапатиту зазнає істотних змін у порівнянні з контролем.

Емаль (рис. 1). У складному контурі раманівського спектру емалі найінтенсивніше вирізняється смуга з максимумом поглинання у хвильовому числі (ХЧ) 960 cm^{-1} , що характеризує повносиметричні валентні коливання v_1 іону PO_4^{3-} . Ця смуга практично не зазнає змін у спектрах досліджуваних зразків, оскільки зв'язки PO_4^{3-} найміцніші у кристалі гідроксиапатиту. В діапазоні частот зв'язків фосфатних залишків з ХЧ 430 cm^{-1} і 580 cm^{-1} , притаманними асиметричним невираженим коливанням v_2 і асиметричним деформаційним коливанням v_4 іона PO_4^{3-} зазначено зростання інтенсивності цих смуг, що вказує на перебудову фосфатного компоненту мінерального матриксу.

Зростання інтенсивності смуги з ХЧ 1071 cm^{-1} (зв'язки іону CO_3^{2-}) свідчить про збільшення внеску карбонатів у структуру мінеральної решітки гідроксиапатиту.

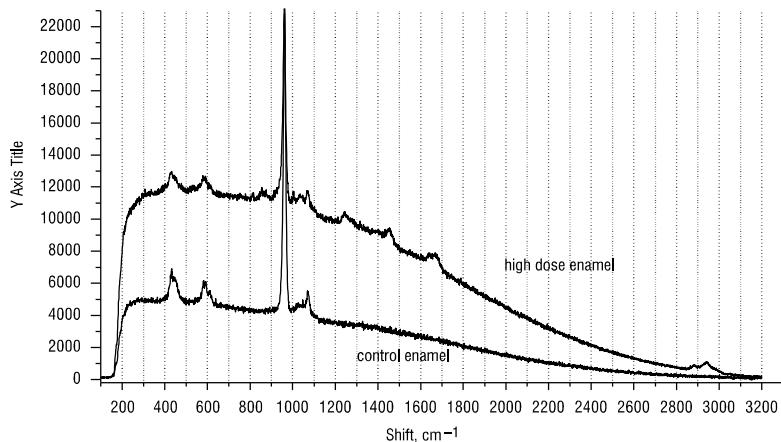


Рис. 1. Спектр раманівського розсіювання емалі пацієнтів контрольної групи і людей з дозою опромінення 0,7–1,7 Гр

Що стосується органічної складової, відмінності між основною групою і контролем, були наступні: на ділянці $800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ зареєстровано появу смуги з ХЧ 815 cm^{-1} , що відповідає скелетним С–С зв'язкам, а також збільшення інтенсивності смуг з вершинами у ХЧ 855 cm^{-1} групи С–СН проліну і 875 cm^{-1} — групи С–С гідроксипроліну. ХЧ на ділянці 1003 cm^{-1} є характерним для коливання ароматичного кільця фенілаланіну.

На ділянці спектру емалі зубів основної групи вирізняються смуги з ХЧ 1216 , 1247 , 1256 cm^{-1} властиві коливанням зв'язків $-\text{CH}_2$ глутамінової кислоти. ХЧ 1650 і 1670 cm^{-1} відображають коливання групи $\text{C}=\text{O}$ Аміду I, що свідчить про розриви цих зв'язків. На частотах 1455 , 2850 , 2940 і 2980 cm^{-1} емалі опромінених зубів виражені симетричні коливання груп $-\text{CH}_3$ і $-\text{CH}_2$ вказують на здовжнення вуглеводневого ланцюга.

Дентин (рис. 2). Під час дослідження фосфатної частини раманівського спектру дентину зубів людей з дозами $0,7\text{--}1,7\text{ Гр}$ IV в анамнезі зареєстровано зміни, що вказують на істотну перебудову мінеральної та органічної складових. Судячи із співвідношень інтенсивності смуг поглинання фосфатних аніонів раманівського спектру, їх площа стала меншою. Тільки смуга повносиметричних коливань v_1 іону PO_4^{3-} з вершиною у ХЧ 960 cm^{-1} залишається найсильнішою у спектрі. На частотах 430 , 580 і 1032 cm^{-1} знижується інтенсивність відповідно асиметричних невиражених коливань v_2 , асиметричних деформаційних коливань $v_{\text{ол}}$ і асиметричних валентних коливань v_3 іону PO_4^{3-} , які

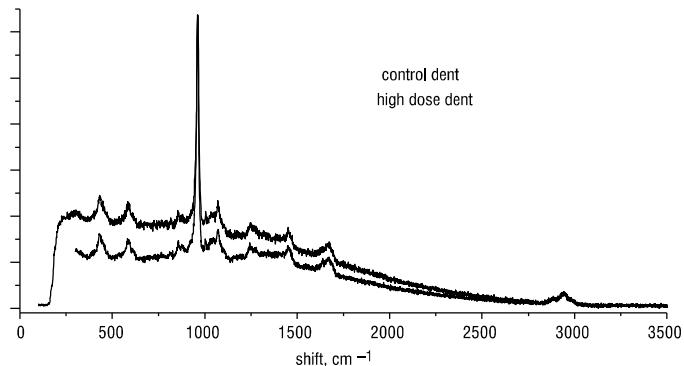


Рис. 2. Спектр раманівського розсіювання дентину пацієнтів контрольної групи і людей з дозою опромінення $0,7\text{--}1,7\text{ Гр}$

очевидно, належать розчинним формам фосфатів. Водночас спадає інтенсивність смуги з ХЧ 1071 cm^{-1} , що вказує на розриви зв'язків CO_3^{2-} і руйнування карбонатапатиту.

Органічна матриця дентину зубів основної групи представлена чіткими смугами, що вказують на руйнування зв'язків C—CH і C—C ароматичних амінокислот проліну (хвильове число 921 cm^{-1}) і гідроксипроліну (хвильове число 876 cm^{-1}), а на ділянці $1245\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$ зросла інтенсивність смуги Аміду III у порівнянні з контролем. Такі зміни раманівського спектру вказують на руйнування білка колагену, який є основним органічним компонентом дентину зубів. На частотах 1455 , а також 2283 , 2940 і 2980 cm^{-1} відзначено зростання коливань зв'язків термінальних груп $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$, які вказують збільшення органічної складової.

Цемент (рис. 3). Істотні зміни відбулися внаслідок впливу великих доз ІВ в органічній і неорганічній складових цементу. Це, по-перше, згладження раманівського спектру на частотах $200\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, по-друге, суттєва зміна спектральної кривої на ділянці $1100\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$. Ідентифікація отриманих спектрів показала зниження інтенсивності повносиметричних v_1 , на ділянках $200\text{--}430\text{ cm}^{-1}$ та $580\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ асиметричних деформаційних v_4 , коливань фосфатних зв'язків P—O.

Окрім того, у проекції ХЧ 430 і 444 cm^{-1} можлива поява зв'язків притаманних SiO^{2-} -вібраційні коливання силікофосфатів. Тільки смуга з вершиною на частоті 960 cm^{-1} , що відповідає повносиметричним коливанням v_1 іону PO_4^{3-} , зберігає високу інтенсивність. Як і в дентині відмічено руйнування зв'язків ароматичних амінокислот проліну і

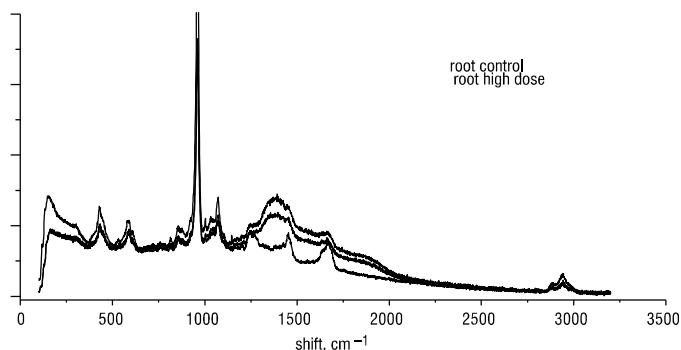


Рис. 3. Спектр раманівського розсіювання цементу пацієнтів контрольної групи і людей з дозою опромінення $07\text{--}1,7\text{ Гр}$

гідроксипроліну (ХЧ 815 і 855 см⁻¹ відповідно). В інтервалі ХЧ 1245–1300 см⁻¹ рamanівського спектру значно збільшується смуга коливань зв'язків груп N—H Amіду III, а також смуги коливань груп —C—C, кінцевих —CH₂, —CH₃, і так званих ножицеподібних коливань груп —CH₂, які показують істотну перевагу органічної субстанції над неорганічною.

Обговорення результатів

При оцінюванні рamanівського спектру твердих тканин зубів, перш за все, вирізняють відмінності між спектральними кривими емалі і дентином та цементом основної і контрольної груп зубів. Ця різниця є закономірною, оскільки у процесі ембріогенезу емаль зубів розвивається із ектодерми, а дентин і цемент мають мезенхімальне походження.

У відсотковому співвідношенні солі фосфорнокислого кальцію емалі становлять до 90%, вуглекислого кальцію близько 4%, а також до 20 різних мікроелементів. Мінеральні солі мають вигляд кристалів гідроксиапатиту (75,4%), карбонатапатиту (12,06%), хлорапатиту (4,4%), фторапатиту (0,66%) і оточені гідратною оболонкою. Крім мінеральних солей, в емалі міститься незначна кількість органічних речовин — до 1,2%. Амінокислотний склад білкової фракції емалі істотно відрізняється від амінокислотного складу білків колагену і креатину, які є складовою дентину і цементу зубів. Існує думка, що органічну основу емалі складає нерозчинна тримірна сітка кальцізв'язуючого білка, який безпосередньо зв'язаний з кристалами гідроксиапатиту [7].

Детальний аналіз спектральної кривої емалі зубів людей з великими дозами ІВ показав незначні зміни мінеральної складової кристалу гідроксиапатиту емалі, такі як: перебудова кристалічної решітки і зростання внеску карбонат-апатиту. Стосовно органічної матриці нами проведено ідентифікацію коливань зв'язків окремих груп іонів. Смуги, що вказують на руйнування зв'язків амінокислот проліну і гідроксипроліну та поява додаткових зв'язків груп —CH₂, —CH₃ свідчать про зміну хімічного складу органічної складової емалі і порушення її параметрів.

Нашу увагу привернула наявність у спектрі, як контрольної, так і основної груп чітких смуг, притаманних ароматичному кільцу амінокислоти фенілаланіну, а також глутаміну. В наукових джерелах [8–10] описано лише одну білкову структуру, де наявні обидві амінокислоти — білок остеонектин, причому вони утворюють зв'язок типу E-F-hend, за допомогою якого з'єднуються з іонами Ca²⁺ кристалу гідроксиапатиту.

Найбільшу кількість остеонектину синтезують остеобласти і одонтобласти — до 15% всіх неколагенових білків [11, 12]. Функції, які виконує остеонектин у різних тканинах остаточно не встановлено,

але на сьогоднішній день не викликає сумнівів його участь у багатьох важливих процесах на етапі ембріогенезу і гістогенезу тканин, де він сприяє процесу мінералізації [13, 14]. Відомо, що в процесі ембріогенезу від емалевого органу залишається лише дві структури: емаль і її кутикула. Всі інші тканини заміщаються мезенхімою.

Дані наукової літератури і власні дослідження дозволяють нам допустити гіпотезу, що описана вище білок-кальцій-білок тримірна структура емалі — це білок остеонектин.

Дентин і цемент зуба за своїми властивостями і структурою нагадують грубоволокнисту кісткову тканину, але відрізняються від неї більшою твердістю, відсутністю клітин і кровоносних судин. Дентин містить 70% неорганічних, 20% органічних речовин і 10% води. Органічна частина дентину на 82% складається з колагену 1-го типу і 18% неколагенових сполук. У цементі концентрація мінеральних речовин становить 62–65%, органічних 23–26% і 12% води. Колаген є основною органічною складовою матриксу цементу. Основні неорганічні компоненти дентину і цементу представлені апатитами, а також кальцієм і фосфором. До їх складу також входить незначна кількість міді, фтору, заліза, свинцю та ін. [7].

Зміни, які відбуваються під впливом ІВ у дентині і цементі зубів свідчать про руйнування фосфатних сполук, що складають основу кристалу гідроксиапатиту. Водночас відбувається інтенсивне руйнування білка колагену (зниження інтенсивності смуг зв'язків проліну і гідроксипроліну, а також зростання інтенсивності смуги Аміду III вказує на розрив первинної структури білкової молекули) і заміна його вуглеводневими сполуками (здовження вуглеводневих ланцюгів групами $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$), які ослаблюють тканини зуба і знижують їх стійкість до дії механічних і хімічних подразників.

Висновки

1. Методика раманівської спектроскопії дозволяє ідентифікувати хімічні сполуки твердих тканин зубів, а також зміни параметрів мінерального каркасу кристалу гідроксиапатиту під впливом ІВ в дозах 07–1,7 Гр, що супроводжується посиленим розривом фосфатних зв'язків.

2. У людей з дозами радіаційного опромінення 07–1,7 Гр руйнується колагенова спіраль органічної речовини дентину і цементу зубів.

3. Міжкристалічний простір, що утворився внаслідок деструктивних процесів у твердих тканинах зубів заповнюється низькодиференційованою сполучною тканиною, не здатною утримувати кристали гідроксиапатиту.

4. За попередніми даними можна допустити, що основною органічною сполукою емалі зубів є білок остеонектин. Ця гіпотеза не є остаточною і вимагає додаткових досліджень.

Автори складають подяку керівнику лабораторії хімічного факультету університету м. Антверпена проф. Рене Ван Грікену за ласкаво надану можливість користування устаткуванням установи.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Ascenzi, M. G.* Collagen orientation patterns in human secondary osteons, quantified in the radial direction by confocal microscopy [Text] / M. G. Ascenzi, A. Lomovtev // J. Struct. Biol. — 2006. — № 153. — P. 14–30.
2. *Wagermaier, W.* Spiral twisting of fibre orientation inside bone lamellae [Text] / W. Wagermaier, H. S. Gupta, A. Gourrier [et al.] // Biointerphases. — 2006. — № 1. — P. 1–5.
3. *Timlin, J.A.* Chemical microstructure of cortical bone probed by Raman transects [Text] / J. A. Timlin, A. Carden, M. D. Morris // Appl. Spectr. — 1999. — № 53. — P. 1429–1435.
4. Spatial distribution of phosphate species in mature and newly generated mammalian bone by hyperspectra Raman imaging [Text] / J. A. Timlin, A. Carden, M. D. Morris [et al.] // J. Biomed. Opt. — 1999. — № 4. — P. 22–34.
5. *Шуберт, М.* Введение в нелинейную оптику (Ч.1: классическое рассмотрение) [Text] / М. Шуберт, Б. Вильгельм. — М.: МГУ. — 1973. — 244 с.
6. *Tsuda, H.* Raman Spectroscopy in Dental Research: a Short Review of Recent Studies [Text] / H. Tsuda, J. Arends. // J. Dent. Res. — 1997. — Vol. 11(4). — P. 539–547.
7. Терапевтична стоматологія [Текст] / За ред. А. К. Ніколішина. — Полтава, 2005. — С. 63–75.
8. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen [Text] / J. D. Termine [et al.] // Cell 1981. — Vol. 26. — P. 99–105.
9. Biosynthesis of osteonectin by fetal porine carawrial cells *in vitro* [Text] / K. Otsuka [et al.] // J. Biol Chem. — 1984. — Vol. 259. — P. 9805–9812.
10. High-affinity and low-affinity calcium bindind and stability of the multidoma in extra-cellular 40-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/ osteonectin) [Text] / P. Maurer [et al.] // Eur. J. Biochem. — 1992. — Vol. 205. — P. 233–240.
11. Immunohistochemicfl localization of osteonectin in developing human and calf bone using monoclonal antibodies [Text] / P. Bianco [et al.] // Calcif. Tissue Int. — 1988. — Vol. 43. — P. 155–161.
12. Distribution of osteonectin in RNA and protein during human embryonic and fetal development [Text] / S. Munalo [et al.] // J. Histochem. Cytochem. — 1992. — Vol. 40. — P. 283–291.
13. *Everill, E. A.* Expression of SPARC is correlated with distnet morphologies in F 9 murine embryonal carcinoma cells [Text] / E. A. Everill, E. H. Sage [et al.] // Exp. Cell Res. — 1992. — Vol. 199. — P. 134–146.
14. *Lane, T. F.* Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca^{2+} — binding sites modulate cell shape [Text] / T. F. Lane, E. H. Sage // J. Cell Biol. — 1990. — Vol. 111. — P. 3065–3076.
15. *Sage, E. H.* Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions: SPARS, tenascin and thrombospondin [Text] / E. H. Sage, P. Bornstein // J. Biol Chem. — 1991. — P. 14831–14834.

**ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА ТВЕРДЫХ ТКАНЕЙ ЗУБОВ
ЛИЦ С РАДІАЦІОННИМИ ОБЛУЧЕНИЕМ В АНАМНЕЗЕ
(по данным рамановской спектроскопии)**

В. Г. Бебешко¹, Л. В. Завербна², Л. А. Дарчук³

*¹ГУ “Національний науковий центр радіаційної медицини
НАМН України”, г. Київ*

*²Львівський національний медичинський університет
імені Данила Галицького, г. Львів*

*³Інститут фізики польоводників імені В. Е. Лашкарева НАУ г. Київ
³Хімічний факультет університета г. Антверпен, Бельгія*

Проведено исследование состава твердых тканей зубов у облученных большими дозами ионизирующего излучения (ИИ) в анамнезе методом рамановской спектроскопии. Установлено, что вследствие воздействия больших доз ИИ изменяются параметры минерального каркаса кристалла гидроксиапатита, разрушается колагеновая спираль органического вещества дентина и цемента зубов, между-кристаллическое пространство заполняется соединительной тканью. Предложена гипотеза о том, что основанием белок-Са-белок трёхмерной структуры является белок остеонектин.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, твердые ткани зубов, рамановская спектроскопия, остеонектин.

**PECULIARITIES OF THE STRUCTURE OF TOOTH HARD TISSUES
IN THE PERSONS WITH IONIZING RADIATION IN THE ANAMNESIS
(according to the data of Raman spectroscopy)**

V. G. Bebeshko¹, L. V. Zaverbna², L. O. Darchyk³

¹DU “National Research Center for Radiation Medicine HAMN Ukraine”, Kyiv

²Lviv National Medical University named by Danylo Galytsky, Lviv

³Institute of Semiconductor Physics named by VE Lashkaryov NASU, Kyiv

³Chemical Faculty of the University of Antwerp, Belgium

Investigations of the structure of tooth hard tissues in persons subjected to the influence of high doses of ionizing radiation by the method of Raman established changes of mineral structure of hydroxyapatite crystals, collagen spirals of organic substance of tooth dentin and cementum. Intercrystalline spaces of tooth structures were filled up by the connective tissue. Hypothesis has been introduced that in the base of the three-dimensional enamel structure protein-calcium-protein is the protein osteonectin.

Key words: ionizing radiation, hard tooth structures, Raman spectroscopy, osteonectin.