СТОМАТОЛОГИЯ

УДК 616.314.14–073.43:611.018.4–053.2–047.37–08 (045) Оригинальная статья

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ И РОСТА КРИСТАЛЛОВ ZN-ГИДРОКСИАПАТИТА НА ДЕНТИННОЙ ПОДЛОЖКЕ ПРИ УЛЬТРАЗВУКОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Л. Н. Казакова *— ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, ассистент кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии, кандидат медицинских наук;* ***О. С. Терещук*** *— ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, ассистент кафедры симуляционного обучения;* ***А. В. Кулигин*** *— ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, заведующий кафедрой симуляционного обучения, профессор, доктор медицинских наук;* ***Д. Е. Суетенков*** *— ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, заведующий кафедрой стоматологии детского возраста и ортодонтии, доцент, кандидат медицинских наук;* ***С. Я. Пичхидзе*** *— ФГБОУ ВО «Саратовский ГТУ им. Гагарина Ю. А.», профессор кафедры физического материаловедения и биомедицинской инженерии, доктор технических наук;* ***А. В. Гариевская*** *— ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, ординатор кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии.*

STUDY OF ZN-HYDROXYAPATITE CRYSTALS FORMATION AND GROWTH ON DENTINE BASE AT ULTRASONIC INFLUENCE

L. N. Kazakova *— Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Children Dentistry and Orthodontics, Assistant, Candidate of Medical Sciences;* ***O. S. Tereschuk*** *— Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Simulation-based Learning, Assistant;* ***A. V. Kuligin*** *— Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Head of Department of Simulation-based Learning, Professor, Doctor of Medical Sciences;* ***D. Ye. Suetenkov*** *— Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Head of Department of Children Dentistry and Orthodontics, Assistant Professor, Candidate of Medical Sciences;* ***S. Ya. Pichkhidze*** *— Yuri Gagarin State Technical University of Saratov, Department of Physical Materials Science and Biomedical Engineering, Professor, Doctor of Technical Sciences;* ***A. V. Garievskaya*** *— Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Children Dentistry and Orthodontics, Post-graduate.*

Дата поступления — 28.04.2017 г. Дата принятия в печать — 15.05.2017 г.

Казакова Л. Н., Терещук О. С., Кулигин А. В., Суетенков Д. Е., Пичхидзе С. Я., Гариевская А. В. **Исследование формирования и роста кристаллов Zn-гидроксиапатита на дентинной подложке при ультразвуковом воздействии. Саратовский научно-медицинский журнал 2017; 13 (2): 260–265.**

Цель: изучение особенностей самопроизвольного роста кристаллов гидроксиапатита на дентинной подложке при использовании полученного искусственным путем Zn-гидроксиапатита в сочетании с ультразвуковым воздействием. *Материал и методы.* Проводили динамическое исследование структуры дентинной подложки во временном интервале после предварительной стандартной обработки поверхности дентинных шлифов и деления их на две группы: контрольную и экспериментальную. Во второй группе на поверхность шлифа наносили мелкодисперсный Zn-ГА в сочетании с УЗ. Исследования проводили с использованием аналитического комплекса на базе растрового электронного микроскопа высокого разрешения SEM Mira II LMU (Tescan) с системой энергодисперсионного анализа. *Результаты.* С течением времени изменяется структура поверхности дентинного шлифа за счет направленного роста кристаллов Zn-ГА. *Заключение.* Проведенное исследование показало возможность формирования стабильной структуры на дентинной подложке при использовании Zn-ГА в сочетании с УЗ.

Ключевые слова: кристалл, гидроксиапатит, дентин, ультразвук.

Kazakova LN, Tereschuk OS, Kuligin AV, Suetenkov DYe, Pichkhidze SYa, Garievskaya AV. **Study of Zn-hydroxyapatite crystals formation and growth on dentine base at ultrasonic influence. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2017; 13 (2): 260–265.**

The objective: the study analyses the features of spontaneous growth of hydroxyapatite crystals on dentinal substrate using (by the use of) artificially grown Zn-hydroxyapatite combined with ultrasonic treatment. *Material and Methods.* A dynamic study of dentinal substrate structure was conducted in a certain time interval after standard primary surface treatment of dentin micro-sections, divided into control and experimental groups. Dentin surfaces in the second group were covered by finely dispersed Zn-hydroxyapatite in combination with ultrasonic treatment. The investigation was performed by use of analytical complex based on scanning electron microscope with high resolution SEM Mira II LMU (Tescan) and energy dispersive analysis system. *Results.* There were revealed the structural changes of dentinal substrate surface over time period due to directional growth of Zn-hydroxyapatite crystals. *Conclusion.* The conducted study showed the possibility of formation of the stable structures in the dentinal substrate when using Zn-hydroxyapatite in combination with ultrasonic treatment.

Key words: crystal, hydroxyapatite, dentine, ultrasound.

Введение. Принцип «биологической целесообразности» в современной стоматологии является основным по отношению к тканям зуба, особенно в детской стоматологии. Несвоевременное применение витальных или девитальных методов часто приводит к гибели зоны роста и формированию неполноценного корня зуба в лучшем случае или резорбции корня зуба при неблагоприятном течении воспалительного процесса в тканях периодонта. Следует избегать удаления пульпы в тех случаях, когда патологические изменения в ней обратимы и возможно ее сохранение. В этих клинических случаях необходимо комплексное фармакологическое воздействие на пульпу, которое, купировав воспалительный процесс, предотвратило бы его дальнейшее распространение, стимулировало бы репаративные процессы пульпы и способствовало бы восстановлению ее функции в полном объеме. Таким образом, становится очевидной важность сохранения целостности даже слабоминерализованного дентина дна кариозной полости при лечении кариеса у детей.

К сожалению, до настоящего времени достаточно редко используются препараты, способные восстановить структуру дентина, идентичную интактному зубу. Применяемые лечебные прокладки на основе гидроокиси кальция редко формируют полноценный барьер. Формирующийся пористый дентинный мостик, да еще через несколько месяцев, оказывается не связанным с пломбой, поставленной во время лечения, что ухудшает адгезию материала и способствует микроподтеканиям. Стимуляция функции одонтобластов способствует образованию вторичного дентина, что приводит к уменьшению объема полости зуба, облитерации корневых каналов, образованию дентиклей и тем самым к нарушению архитектоники системы корневых каналов. Все эти изменения затрудняют эндодонтическую обработку каналов при необходимости. Препарат или метод, позволяющий стимулировать направленный рост кристаллов гидроксиапатита (ГА) со стороны отпрепарированной полости, имел бы больше преимуществ и меньшее количество осложнений в сравнении с имеющимися лечебными прокладками, применяемыми при лечении глубокого кариеса у детей [1].

Цель: изучение особенностей самопроизвольного роста кристаллов гидроксиапатита на дентинной подложке при использовании полученного искусственным путем Zn-гидроксиапатита в сочетании с ультразвуковым воздействием.

Задачи: 1) охарактеризовать оптимальные условия активного роста кристаллов Zn-ГА в условиях эксперимента, 2) изучить динамику роста кристаллов Zn-ГА на дентинной подложке.

Материал и методы. Материалом исследования являлись подготовленные дентинные шлифы ранее удаленных по ортодонтическим показания постоянных зубов на этапе восходящего развития у детей. Для изучения морфологии поверхности дентина проведены распилы образцов зубов, изготовлены шлифы. Исследуемые образцы были отполированы, затем подвергались травлению 38%-ным гелем ортофосфорной кислоты в течение 60 с, после чего их промывали дистиллированной водой и обрабатывали в ультразвуковой ванне «УЗУМИ-2» (мощность Pmax=130 Вт, время экспозиции 5 мин) для удаления смазанного слоя [2, 3]. Шлифы помещали в спиртовой раствор для дегидратации на 12 ч. Исследуемые образцы разделили на две группы: первая — контрольная (5 дентинных шлифов); вторая — экспериментальная (10 дентинных шлифов).

Последующая дегазация исследуемых образцов обеих групп осуществлялась в вакуумной камере напылительной установки Emitech K450X. В контрольной группе дальнейшие манипуляции не проводились. На поверхность образцов второй группы наносили полученный в лабораторных условиях мелкодисперсный Zn-ГА в сочетании с ультразвуковым воздействием. Исследовались дентинные шлифы обеих групп в одинаковом временном интервале, идентичными методами исследования.

Исследования осуществляли с использованием аналитического комплекса на базе растрового электронного микроскопа (РЭМ) [3] высокого разрешения SEM Mira II LMU (Tescan) с системой энергодисперсионного анализа EDX INCA ENERGY 350 (Oxford Instruments), используемого нами для локального химического элементного анализа и изучения морфологии дентинного шлифа. Методами РЭМ проводили регистрацию излученных и отраженных электронов с различными энергиями и зонами генерации, 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 изменений морфологии поверхности дентина, связанных с образованием на ней кристаллов. Изучение морфологии проводилось в режиме детектирования вторичных электронов, которые наиболее чувствительны к рельефу поверхности. Информацию о рельефе собирали на основе анализа состояния приповерхностной зоны генерации вторичных электронов. Химический элементный состав кристаллов на поверхности дентина определялся с помощью энергодисперсионной системы микроанализа.

Рентгеноструктурный фазовый анализ образца ГА осуществлялся на дифрактометре ДРОН-4 с использованием рентгеновской трубки с медным анодом (Cu-K_αизлучение) [4, 5]. Для анализа дифрактограмм применялась база данных PCPDFWIN, v. 2.02 (1999, объединенный центр по порошковым дифракционным стандартам (JCPDS)).

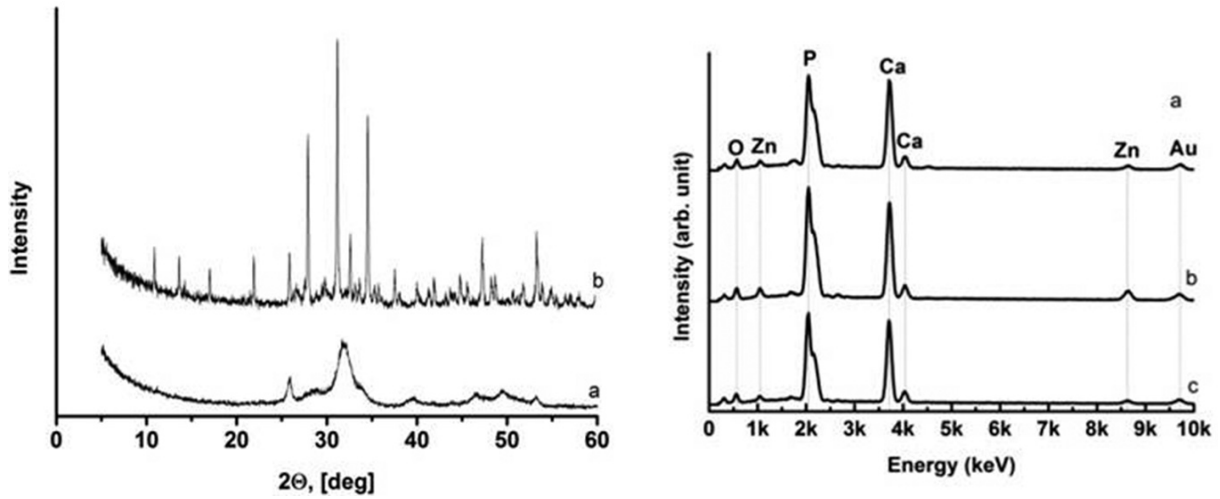
Синтез Zn-гидроксиапатита проводился методом осаждения из водных растворов по реакции: $(10-x)\,Ca^{2+}+xZn^{2+}+6PO_4^{3-}+2OH^- \rightarrow Ca_{10-x}Zn_x(PO_4)_6(OH)_2$, $0<x<2$. Оптимальными условиями синтеза является температура t=20є, влажность 58% и pH раствора на уровне 9–12.

Качественный состав исходных веществ: $Ca(NO_3)_2 4H_2O$ — нитрат кальция, ГОСТ 1922–84; $(NH_4)_2HPO_4$ — диаммонийфосфат (аммоний фосфорно-кислый 2-замещенный, диаммофос), ГОСТ 8515–75; массовая доля влаги до 4% веса; NH_4OH — 25%-ный водный раствор, ГОСТ 9–92; хлорид цинка $ZnCl_2$ — ГОСТ 4529–78.

Водный раствор соли нитрата кальция и хлорида цинка помещали в химический стакан с мешалкой и в течение часа прикапывали раствор диаммонийфосфата. Для поддержания pH раствора добавляли NH_4OH, разведенный водой 1:10.

Созревание синтезированного осадка проходило в оптимальных температурных условиях 24 ч в химическом стакане. Следующим этапом его отфильтро-

Ответственный автор — Казакова Лариса Николаевна
Тел.: 8-905-32-10-611
E-mail: kleo.ok@yandex.ru



а *б*

Рис. 1: *а* — рентгенофлюоресцентный анализ прессованных частиц синтезированного Zn-ГА; *б* — энергодисперсионный рентгеновский анализ прессованных частиц синтезированного Zn-ГА

вывали через бумажный фильтр, сушили при температуре 90…95єС, а затем в течение двух часов при температуре 400єС для удаления остатков NH_4NO_3 и далее в течение 6 ч прокаливали при температуре 600єС для придания ему кристаллической структуры.

К полученным данным применены непараметрические методы статистического анализа.

Результаты. Подтверждение структуры Zn-ГА проводилось с помощью рентгенофазового анализа, который позволяет определять содержание различных кристаллических фаз одного и того же вещества.

Присутствие при 400єС на РФА-дифрактограмме фона свидетельствовало о наличии аморфной фазы Zn-ГА. При 600єС степень кристалличности порошка Zn-ГА возрастает (рис. 1). Возможно также присутствие незначительного количества следующих примесей: гидрата фосфата кальция $Ca_3(PO_4)_2xH_2O$, №000-18-0303; Zn-гидроксиапатита формулы $Ca_{10}Zn_{0.30}(PO_4)_6(O_{0.68}(OH)_{1.24})$, №010-80-6198, Zn-пирофосфата $Zn_2P_2O_7$, №010-73-1648, Ca, Zn-фосфата $Ca_{19}Zn_2(PO_4)_{14}$ №0000-48-1196.

Энергодисперсионный рентгеновский (ЭДР/EDX) анализ прессованных частиц синтезированного Zn-ГА подтверждает наличие Zn в структуре препарата (рис. 1б).

Определение концентраций химических элементов проводилось путем сравнения интенсивности характеристического рентгеновского излучения (ХРИ) эталонных образцов для каждого конкретного химического элемента с измеренной интенсивностью ХРИ исследуемых образов (таблица; рис. 2). Значения интенсивности ХРИ эталонных образцов содержатся в базе данных ПО РЭМ.

По данным ПЭМ, размер частиц Zn-ГА находится в пределах 19–45 nm. Основная часть частиц имеет вытянутую стержневую и игольчатую формы, при наличии их агломератов (рис. 3).

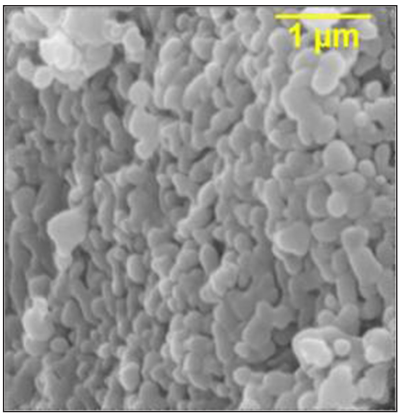
Zn, включенный в структуру ГА, повышает толерантность формирующейся структуры к действию бактериального фактора за счет антибактериального эффекта цинка.

При детальном изучении поверхности шлифов дентина через 3, 7, 10, 15 суток были выявлены изменения рельефа поверхности во второй группе (рис. 4). На поверхности дентина определялись как одиночные астроподобные кристаллы, так и их скопления. За исследуемый период размеры сформировавшихся кристаллов в пределах одного поля варьировались от 19 до 150 nm, наибольший прирост количество кристаллов наблюдали на третьи и седьмые сутки. На 10-е, 15-е сутки наблюдали увеличение объема кристаллов.

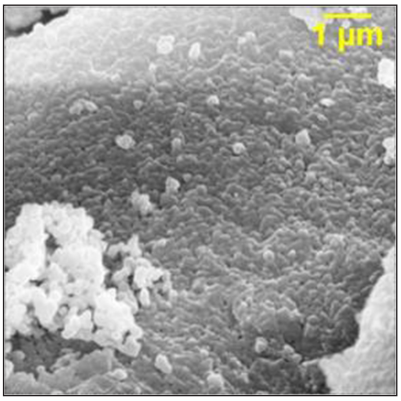
Рост кристаллов гидроксиапатитов наиболее бурно проходил на поверхности активных центров ден-

Соотношение сигналов в спектре ЭДРА Zn-ГА (размер выборки n=10)

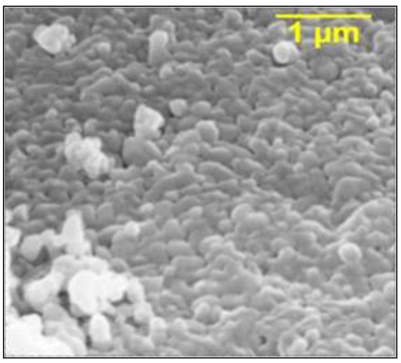
Степень замещения	Элемент	Оценочное среднее нормализованного исследуемого параметра	Стандартная ошибка среднего
x=2,0	P	27,11	0,86
	Ca	51,76	1,06
	Zn	21,13	1,01
x=1,0	P	27,38	0,62
	Ca	60,62	1,00
	Zn	12,00	1,39
x=0,7	P	32,39	0,34
	Ca	59,26	0,99
	Zn	8,35	1,2



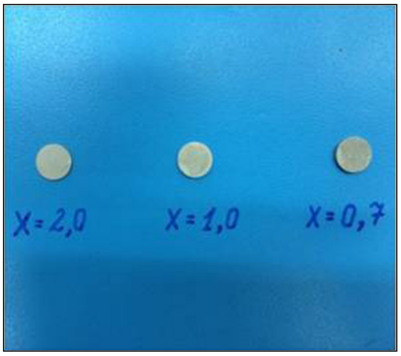
а



б

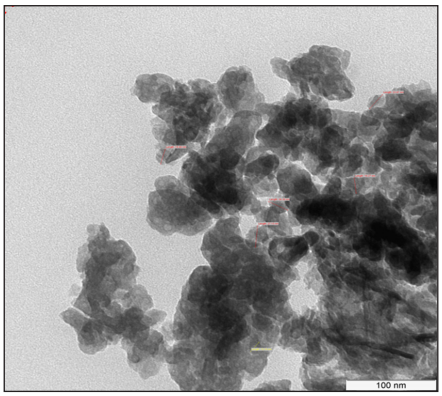


в

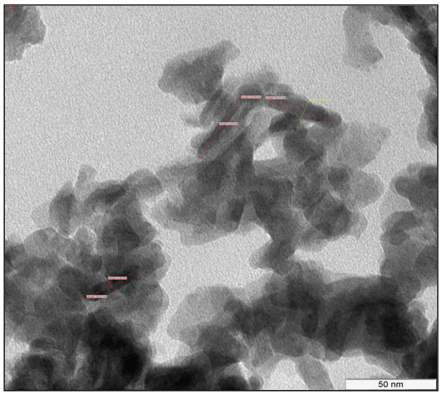


г

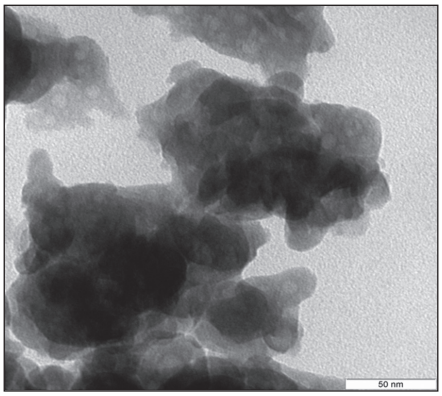
Рис. 2. Образцы синтезированного Zn-ГА с разной степенью замещения кальция, фосфора, цинка: *а* — x=2,0; *б* — x=1,0; *в* — x=0,7; *г* — прессованные образцы синтезированного Zn-ГА



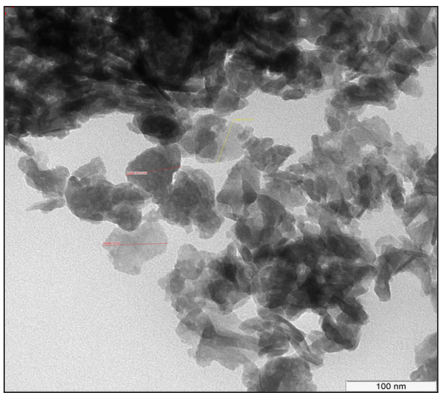
а



б



в



г

Рис. 3. ПЭМ-изображение частиц синтезированного Zn-ГА с разной степенью увеличения

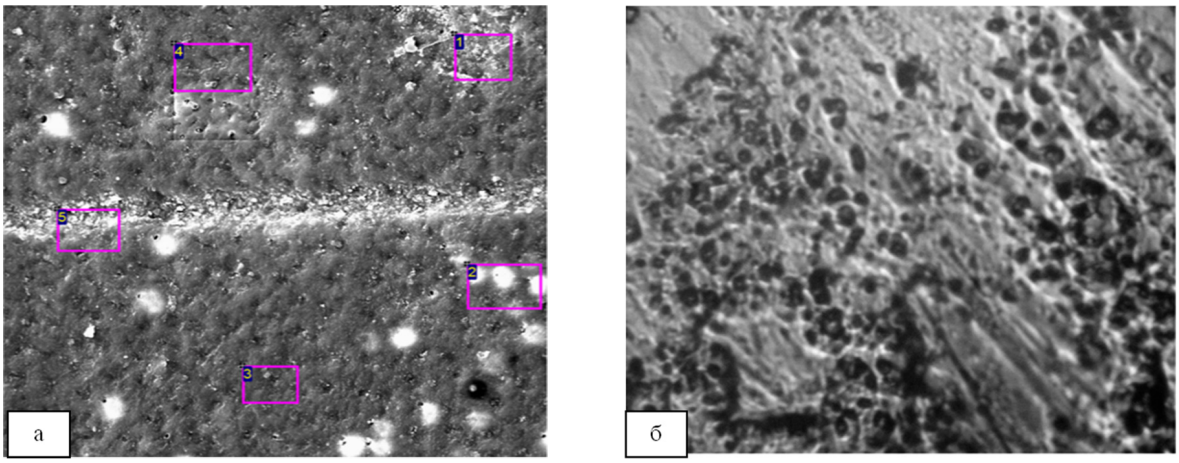


Рис. 4. Изменение рельефа поверхности дентинной подложки: *а* — поверхность дентина с формирующимися кристаллами Zn-ГА; *б* — поверхность дентина при отсутствии роста кристаллов

тина, максимально приближенных к белковым структурам (см. рис. 4).

Использование критерия Крускала — Уоллиса и критерия Ньюмена — Кейлса позволило выявить значимое отличие (уровень значимости 0,05) кристаллов в областях 1 и 5 от химических образований в областях 2, 3 и 4. Области 1 и 5 могут быть классифицированы как кальцийфосфатные соединения с высоким содержанием кислорода, кальция и фосфора, по сравнению с подложкой (области 2, 3 и 4).

Обсуждение. Анализ химического состава исследуемых образований позволяет выделить кристаллы и классифицировать их как кальцийфосфатное соединение — в области 1 и 5, так как здесь определяется высокое содержание кислорода, кальция и фосфора по сравнению с подложкой — области 2, 3, 4, (рис. 5). Эти данные убедительно подтверждают, что предварительная обработка не влияет на состав образцов. Повышенное содержание углерода в областях 2, 3, 4 свидетельствует об органической природе дентинной подложки, а снижение его концентрации в областях 1 и 5 является дополнительным доказательством того, что информация о составе образований не содержит данных о составе подложки.

Для идентификации кристалла в настоящей работе использовалось кальций-фосфорное соотношение — общеизвестный характеристический параметр ортофосфатов кальция; для гидроксиапатита кальция $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ отношение кальция к фосфору в объеме материала равно 1,67. Однако в образцах встречали и дикальцийфосфат дигидрат, у которого значение отношения Ca/P близко к единице.

Анализ характеристического рентгеновского излучения показал: в образцах второй группы с выросшими кристаллами область когерентности находилась в более высоком диапазоне в сравнении с образцами первой группы. При росте кристаллов на поверхности дентина области когерентного рассеяния в объеме материала дентина увеличиваются, определяется уширение линий дифрактограмм материала дентина с выращенными на его поверхности кристаллами и без них [6, 7]. Наличие на дифрактограмме многочисленных рефлексов и незначительного фона свидетельствует о высокой степени кристалличности ГА.

Рост кристаллов ГА происходит за счет мелких кристаллитов гидроксиапатита, находящихся в аморфном состоянии. По нашим наблюдениям, в этом состоянии они быстрее взаимодействуют с ак-

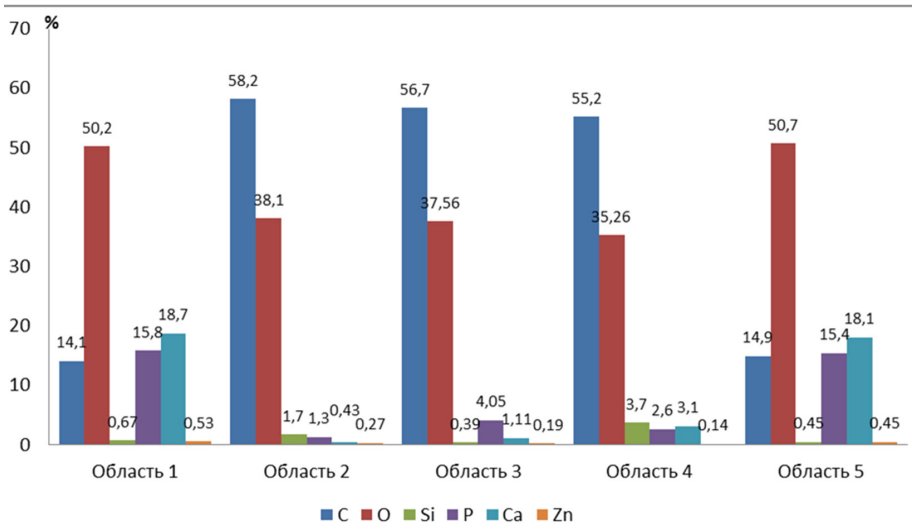


Рис. 5. Результаты рентгеноспектрального анализа химического состава различных областей дентинной подложки

тивными центрами белковых соединений в структуре дентина.

Первоначальная адсорбция Zn-ГА к гидрофильной части белка при УЗ-воздействии на дентин способствует более ориентированному росту кристаллов Zn-ГА на его поверхности и по структуре дентинных трубочек.

Характерных изменения структуры шлифа контрольной группы на всех этапах исследования выявлено не было.

Заключение. Проведенное исследование показало возможность адсорбции и направленного роста ГА на дентинной подложке при использовании Zn-ГА в сочетании с УЗ. Ультразвуковые колебания позволяют тщательнее перемешивать частицы Zn+ГА, способствуют очищению поверхности и открытию активных центров на подложке. В большинстве случаев ядра нуклеации формируются наиболее активно в области гидрофильной части белковых структур подложки. Контролируемый рост кристаллов ГА на поверхности дефекта и формирование ткани, близкой по составу к биологической, способствуют формированию стабильной структуры на границе двух сред.

Конфликт интересов отсутствует.

Авторский вклад: концепция и дизайн исследования, написание статьи — Л.Н. Казакова, О.С. Терещук; получение данных, обработка данных — С. Я. Пичхидзе, О.С. Терещук, А.В. Кулигин, А.В. Гариевская; анализ и интерпретация результатов — Л.Н. Казакова, С. Я. Пичхидзе; утверждение рукописи для публикации — А.В. Кулигин, Д.Е. Суетенков, С. Я. Пичхидзе.

References (Литература)

1. Kiselnikova LP, Zueva TE, Boyarkina ES, et al. Clinical references on maintaining sick children caries of teeth. In: Stomatologija detskogo vozrasta. M., 2016; p. 1–8. Russian (Кисельникова Л.П., Зуева Т.Е., Бояркина Е.С. и др. Клинические рекомендации по ведению больных кариесом зубов детей: Проект. Секция СтАР. В кн.: Стоматология детского возраста. М., 2016; с. 1–8).

2. Bessudnova NO, Bilenko DI, Venig SB, et al. Pilot studies of the crystal educations found on the surface of dentine, methods raster electronic микроскопии. Molecular medicine 2012; (5): 55–61. Russian (Бессуднова Н.О., Биленко Д.И., Вениг С. Б. и др. Экспериментальные исследования кристаллических образований, обнаруженных на поверхности дентина, методами растровой электронной микроскопии. Молекулярная медицина 2012; (5): 55–61).

3. Bessudnova NO, Atkin VS, Skaptsov AA, et al. Formation of crystals of phosphate of calcium on the surface of dentine as a basis for a reparation of a bone tissue. Saratov: SGTU, 2015; 17 p. Russian (Бессуднова Н.О., Аткин В.С., Скапцов А.А. и др. Формирование кристаллов фосфата кальция на поверхности дентина как основа для репарации костной ткани. Саратов: СГТУ, 2015; 17 с.).

4. Nikolayenko SA, Tsipperle M, Lobauer U, et al. A research of biomimetic formation of a hydroxyapatite on the surface of dentine. Stomatology 2007; (6): 20–25 Russian (Николаенко С. А., Ципперле М., Лобауэр У. и др. Исследование биомиметического формирования гидроксиапатита на поверхности дентина. Стоматология 2007; (6): 20–25).

5. Fadeyeva IV, Bakunova NV, Komlev VS, et al. Zinc and argentiferous hydroxyapatites: synthesis and property. Reports of Academy of Sciences 2012; 442 (6): 780–783. Russian (Фадеева И.В., Бакунова Н.В., Комлев В.С. и др. Цинк и серебросодержащие гидроксиапатиты: синтез и свойства. Доклады Академии наук 2012; 442 (6): 780–783).

6. Ginye AA. X-ray analysis of crystals: The theory and the practice / Belova EN, Kvitki SS, Tarasova VP, translated from French; Belov NV, ed. Moscow: State publishing house of physical and mathematical literature, 1961; 604 p. Russian (Гинье А. Рентгенография кристаллов: теория и практика / пер. с франц. Е.Н. Беловой, С. С. Квитки, В.П. Тарасовой под ред. акад. Н.В. Белова. М.: Гос. Изд-во физ.-мат. лит-ры, 1961; 604 с.).

7. Byrappa K, Ohachi T. Crystal Growth Technology. Norwich: William Andrew Publishing Inc; New York: Springer, 2003; 590 p.