МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ОСОБЕННОСТИ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА И СТРУКТУРЫ БИОМИНЕРАЛЬНОЙ КОМПОНЕНТЫ ЗУБНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

С.Л. Вотяков, Д.В. Киселева, Ю.В. Щапова, А.В. Поротников, Н.В. Чередниченко, Ю.В. Мандра

Кальцинированные ткани (кости и зубы человека и животных), сложенные минералом карбонатгидроксиапатитом, - перспективный индикатор загрязнения окружающей среды: их минеральная составляющая имеет способность накапливать из окружающей среды некоторые элементы-примеси, в частности тяжелые металлы. В позвоночных организмах кристаллы карбонатгидроксиапатита микрои наноразмера. Они имеют, как правило, нестехиометрический кальций-дефицитный состав (Ca_{10-x}H_x(PO₄,CO₃)F(OH)_{2-x}), в них широко развиты замещения кальция на двух- и трехвалентные катионы примесей, присутствуют CO₃²⁻ - группировки. Изучение состава примесей в карбонатгидроксиапатите этих тканей дает важную информацию для мониторинга экологической обстановки региона проживания. В частности, исследование содержания свинца в зубах человека проводилось в рамках проекта «System of monitoring the environmental impact of population health» в Чехии [Spěváčková, Šmíd, 1999] и Норвегии [Tvinnereim et al, 1997]. Для решения экологических проблем привлекались данные по составу микропримесей в твердых тканях зубов мелких млекопитающих – мышейполевок [Appleton et al, 2000]. Состав и свойства минеральной составляющей зубной ткани в значительной степени отражают физиологические особенности функционирования организма. Во многих регионах России патологические процессы различной этиологии в твердых тканях зубов (повышенная стираемость зубов абразия, пониженная резистентность к кариозному и некариозному поражению и др.) связаны с неблагоприятной экологической обстановкой, последнее особенно характерно для уральского региона. Вследствие этого не все современные стоматологические технологии и материалы приемлемы в российской медицинской практике. Исследование особенностей микроэлементного состава и дефектов структуры биоминеральной компоненты твердых тканей зуба человека, обоснование схем их типизации остаются актуальными научными задачами и в настоящее время. Спектроскопические методы, в частности микроэлементный ICP-MS-анализ (масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой), электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) – перспективны для изучения состава и свойств вещества биоминералов из организма человека. Эти методы активно используются для решения ряда экологических проблем и вопросов ретроспективной инструментальной дозиметрии по минералу биоапатиту из эмали зуба человека. Большое число публикаций посвящено разработке методик пробоподготовки кальцинированных тканей и выполнения анализа их микропримесного состава. Большой интерес представляет применение методики лазерной абляции в ICP-MS анализе биоапатитов [Lee et al., 1999]. При этом исследователи сталкиваются с тремя основными группами проблем: с необходимостью анализа веществ кальцинированных тканей с низкими и сверхнизкими концентрациями аккумулированных элементов; с влиянием на результаты анализа матричных ионов апатита и органической составляющей; с отсутствием стандартных образцов биоминералов определенного состава.

Цель работы – экспериментальное и теоретическое исследование особенностей микроэлементного состава и структуры биоминеральной компоненты твердых тканей зуба человека, проживающего в уральском регионе, анализ вариаций свойств этих тканей при патологических процессах различной этиологии. Для достижения поставленной цели в данном исследовании отработаны методики химической пробоподготовки твердых тканей зуба к анализу, выполнены ICP-MS анализы на приборе ELAN 6000; выполнено ЭПР исследование особенностей образования радиационных ионрадикалов в твердых тканях зуба пациентов; с целью кристаллохимической интерпретации экспериментальных данных для биогенного апатита получены некоторые предварительные результаты компьютерного квантово-химического моделирования атомного и электронного строения структуры апатита.

Объекты исследования. Изучены твердые ткани зубов пациентов в возрасте от 22 до 50 лет, проживающих в различной экологической обстановке на Урале (г. Екатеринбург), в том числе, работающих при неблагоприятных факторах производственной среды (для примера проанализированы данные по работающим в цехах электролитического рафинирования меди в г. Верхняя Пышма). Исследованы зубы интактные (здоровые), а также пораженные кариозным процессом различной глубины и локализации, депульпированные и склерозированные (с повышенной стираемостью); проанализированы изменения их свойств под действием лабораторного рентгеновского облучения; намечены перспективы применения данных ЭПР для анализа влияния на материал зуба различных адгезивных систем предпломбировочной подготовки.

Методики пробоподготовки к ІСР-МЅ анализу. Уровень концентраций микроэлементов в структуре гидроксиапатита эмали и дентина зубов человека находится в пределах 0.001-1.0 мкг/г. Анализ таких объектов возможен лишь с применением сверхчистых реактивов и посуды для микроанализа на современном аналитическом оборудовании с высокой чувствительностью и точностью определения. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой – идеальный метод решения этой аналитической задачи. Зубная ткань состоит из минеральной и органической фаз. Эмаль содержит до 2% (весовых) органики, а дентин – до 30%. Этот факт важен, так как наличие органических компонентов не может не вызывать трудностей при масс-спектрометрических измерениях из-за наличия изобарных помех. Стоит задача избавиться от органики уже на стадии химического разложения проб. Вследствие этого для разложения проб нами использовалась хлорная кислота квалификации ОСЧ, дополнительно очищенная в кварцевом аппарате при температуре, не превышающей температуру ее кипения. Как установлено, эта кислота прекрасно окисляет органические компоненты эмали и дентина и дает низкий фон холостого опыта. При этом измерения на масс-спектрометре проводились из азотнокислых растворов.

Нами предложена оригинальная многостадийная механико-химическая схема растворения твердых тканей зуба, позволяющая проводить исследования особенностей их послойного микроэлементного состава.

Подготовка проб эмали. Первоначально пробы зубов нагревали в 3% растворе перекиси водорода, несколько раз кипятили в дистиллированной воде, механически освобождали от разрыхленных мягких тканей. Полученные препараты кипятили в дистиллированной воде и устраняли возможные внешние загрязнения, выдерживая в растворе разбавленной 0.05 М соляной кислоты в течение 30 секунд. После двукратного кипячения в дистиллированной воде пробы переносили во взвешенный фторопластовый бюкс и высушивали до постоянного веса в сушильном шкафу при температуре 100°С в течение 5 часов. Зубные ткани гигроскопичны, поэтому высушенные препараты охлаждали 20 минут в бюксах с плотно притертыми крышками в эксикаторе и затем взвешивали. В каждом зубе, подготовленном по приведенной выше схеме, было проведено послойное растворение эмали. Для этого зуб в бюксе выдерживали при комнатной температуре в 2 мл 3.1 М хлорной кислоты в течение 3 и 5 минут и промывали бидистиллированной водой, собирая воду в тот же бюкс. Навеску растворенной эмали вычисляли по разности весов высушенного зуба до и после химического снятия слоя эмали. Количество полученных фракций колебалось от 3 у резцов до 6 у коренных зубов, так как толщина эмали последних существенно выше. Площадь поверхности эмали оценивали до и после растворения каждой порции. Пользуясь данными по плотности зубной эмали [Кораго, 1992], вычисляли величину толщины растворенного слоя эмали в каждом опыте и скорость ее растворения в единицу времени. Далее на рисунках представлены типичные данные по серии из четырех зубов разной степени сохранности, принадлежащих одному человеку (I – здоровый резец без видимых проявлений повышенной стираемости и кариеса; II – коренной зуб с проявлением кариеса; III – резец с проявлениями стираемости второй степени; IV – резец с проявлениями стираемости первой степени); коренной зуб мудрости другого человека (далее М) использовался в качестве контрольного образца,

Подготовка препаратов дентина. Оставшийся после кислотного растворения эмали дентин зуба М был измельчен до порошкообразного состояния. Дентин четырех зубов серии I-IV был распилен на фрагменты. В зубах I и II выделили фракции плащевого и околопульпарного дентина; у зубов с диагностированной повышенной стираемостью первой и второй степени дентин разделили на три фракции: склерозированный, плащевой и околопульпарный. Часть фрагментов дентина была обработана защитными композиционными материалами Single Bond и Xeno, а другая часть оставлена без изменений. Поверхность полученных частей дентина обрабатывали разбавленной 0.05 М соляной кислотой и высушивали в сушильном шкафу при температуре 100°С до постоянного веса. Навески во фторопластовых бюксах растворяли в 0.5 мл ЗМ хлорной кислоты при температуре 135°С. Отмечено, что навески необработанного дентина разлагались в этих условиях за 20-30 минут, а дентина с покрытием Single Bond и Xeno растворялись только при существенно большей экспозиции. В этих пробах структура композита сохранялась в кислоте при нагревании, а дентин начинал разлагаться изнутри лишь через 15-20 минут после начала нагревания. По-видимому, покрытие композиционными материалами увеличивает химическую стойкость дентина, его сопротивляемость воздействию кислотных агентов.

Подготовка препаратов для масс-спектрометрического анализа. Растворы солей

Рис.1. Усредненное содержание основных и примесных элементов в твердых тканях зуба человека (Урал) при использовании схемы растворения в различных кислотах: 1 – HNO₃, 2 – HCl, 3 –HCl+HNO₃, 4 – HClO₄, 5 – данные [Gross, Berndt, 2002].

препаратов эмали и дентина упаривали на плите, далее отгонялись пары HClO₄. Полученные осадки дважды обрабатывали концентрированной азотной кислотой для переведения их в нитраты. В каждый бюкс приливали по 1 мл 14 М HNO₃ и 2 мл бидистиллированной воды, полученные растворы количественно переводили в чистые подготовленные полипропиленовые контейнеры и доводили объём раствора бидистиллированной водой до 25 мл.

В качестве стандартного образца нами был использован апатитовый концентрат АК-2462-82, по составу наиболее близкий к апатиту зубной эмали. Разложение навески стандарта проводили смесью плавиковой и хлорной кислот. Использование HF обусловлено наличием в составе природного концентрата примесей силикатов. Далее все проводимые со стандартом операции были аналогичны операциям с препаратами зубов. В полученных растворах на масс-спектрометре ELAN-6000 было определено содержание Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Co, Cu, Zn, Rb, Sr, Cd, Ba, Pb и P3Э. Коэффициент корреляции логарифмов содержаний, полученных экспериментально, с паспортными данными составил 98.9%.

Особенности микроэлементного состава эмали и дентина зубов пациентов уральского региона. Типичные данные, полученные нами по составу основных (структурно-образующих) и примесных редких и рассеянных элементов в твердых тканях зубов, усредненные по серии проб ряда пациентов, проживающих в уральском регионе, приведены на рис. 1 и 2. Для сопоставления на рисунках пред-





ставлены также данные по содержанию этих элементов в твердых тканях зубов пациентов других регионов согласно [Gross, Berndt, 2002].

Известно, что эмаль накапливает и сохраняет примесные элементы, в частности тяжелые металлы (свинец, медь, цинк, никель, кадмий, кобальт, висмут, сурьма, ртуть, хром), воздействию которых она подвергается. Многие представители этой группы широко распространены в окружающей среде и способны вызывать изменения физико-химических свойств гидроксиапатита. Тяжелые металлы, в частности свинец, «травмируют» минерализацию и встраиваются в гидроксиапатит; такие ионы, как фтор, образуют гипо- и гиперминерализованные слои в эмали и дентине.

Представленные на рис.1 и 2 сопоставительные усредненные результаты по содержанию наиболее характерных примесей для твердых тканей зубов пациентов, проживающих в различных регионах, показывают, что данные для г. Екатеринбурга качественно не хуже, чем для западно-европейского региона. Видно, в чаРис.2. Содержание тяжелых элементов в твердых тканях зуба человека из разных районов проживания: 1 – Урал (данные масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой); 2 – Чехия, согласно [Spěváčková, Šmíd, 1999]; 3 – Норвегия, согласно [Tvinnereim et al, 2000]; 4 – Малайзия, согласно [Chew et al, 2000].

стности, что для исследованных нами зубов содержание Sr составляет 110 ppm, а Ba – 3.2 ppm и в целом того же порядка, что и в цитированной литературе (как правило, содержания Sr и Ва в костях и зубах различаются на два порядка: содержание Sr составляет не более 200 ppm, a Ba – не более 10 ppm [Trueman, Tuross, 2002]). Для исследованных нами зубов содержание Pb составляет 3.33 ppm (согласно [Spěváčková, Šmíd, 1999] среднее содержание Рb в зубах детей составляет 1.42-0.67 ррт, взрослых -7.65 ppm; согласно [Tvinnereim et al, 2000] содержание Pb порядка 1.37 ppm). Содержания Cd и Zn составляют 0.042 и 94 ppm, соответственно, при этом для выборки из 1200 зубов получено, что концентрации Cd и Zn 0.113 ppm и 157 ppm, соответственно [Tvinnereim et al, 2000]. Концентрации остальных тяжелых металлов составляют 0.11 ppm (Cu), 0.01 ppm (Bi), 3.65 ppm (Ni), 1.96 ppm (Co) и 0.05 ppm (Cr), что несколько меньше приведенных в [Gross, Berndt, 2002].

Динамика химического разложения эмали. На рис. 3 представлены данные по динамике растворения эмали в 3М HClO₄ и 6М HCl. На основании полученных данных можно сделать следующие выводы. У коренных зубов (M, II) скорость растворения верхнего слоя эмали минимальна (30 и 34 мкм/мин соответствен-



Рис. 3. Вариации динамики растворения эмали из твердых тканей различных зубов.

1 – здоровый коренной зуб мудрости (условное обозначение М); 2 – здоровый резец без видимых проявлений повышенной стираемости и кариеса (I); 3 – коренной зуб с проявлением кариеса (II); 4 – резец с проявлениями стираемости второй степени (III); 5 – резец с проявлениями стираемости первой степени (IV). Все фракции кроме 4-7 зуба М при растворении в 3М HClO₄; фракции 4-7 зуба М при растворении в 6М HCl. но); его устойчивость к воздействию кислоты максимальна. У резцов (III, IV) скорость растворения верхнего слоя эмали выше, она составляет 44, 47 и 60 мкм/мин соответственно; эмаль этих зубов обладает меньшей резистентностью. В серии из четырёх зубов, расположенных в порядке убывания их сохранности (I, II, IV, III), мы наблюдали увеличение скорости растворения глубинных слоёв эмали (73, 78, 80, 186 мкм/мин соответственно), что может быть следствием нарушения кристаллической структуры, увеличения размеров кристаллов гидроксиапатита или ослабления связи минерал – органическая матрица.

Анализ результатов. Исследованные микроэлементы по уровню их концентрации в эмали и дентине явно могут быть разделены на две группы. В первую входят Ті, Fe, Zn, Sr (их концентрации составляют в эмали более 0.05 мкг/г, в дентине – более 0.03 мкг/г); во вторую группу входят V, Cr, Mn, Ni, Co, Cu, Ba, Pb (их концентрация в эмали и в дентине не превышают 0.02 мкг/г). Содержание Rb, Cd и P3Э в исследуемой серии зубов ниже фоновых содержаний. На рис. 4 представлено распределение элементов обеих групп в самом здоровом (I) и самом больном (III) зубах серии.



Рис. 4. Распределение микроэлементов (а, б – Ті, Fe, Zn, Sr; в, г – Мn, Cu, Ni, Ba; д, е – V, Cr, Co, Pb) по исследованным фракциям эмали и дентина в двух зубах (а, в, д – здоровый резец без видимых проявлений повышенной стираемости и кариеса (зуб I); б, г, е – резец с проявлениями стираемости второй степени (зуб III)).

Анализ содержания элементов показал, что в каждом из зубов Ті, Sr и Со распределены равномерно. Для других элементов явно проявляется относительное обогащение одних зон (слоев) эмали по сравнению с другими. В верхнем слое эмали контрольного зуба М выявлена наибольшая концентрация Fe, Zn, V, Cr, Mn, Ni, Си, Ва и Рb. У зуба I этот же верхний слой эмали обогащен Zn, V, Mn, Ba, Pb. На границе с дентином также обнаружено относительное увеличение концентрации хрома, никеля и меди. Верхний слой эмали зуба II обогащен Fe, Zn, V, Cr, Mn, Ni, Cu, Ba и Pb. В пограничном с дентином слое выявлено превышение над средним уровнем концентраций Fe, Cr, Mn, Ni, Cu и Ba. Для зуба IV с первой степенью стираемости установлено повышенное содержание в первой слое Fe, Zn, Cr, Mn, Cu, Pb. Для самого разрушенного III зуба со стираемостью второй степени обнаружены аномально низкие значения концентраций всех микроэлементов в первом слое эмали, при этом второй слой обогащен Fe, Zn, V, Cr, Mn, Ni, Cu. Эмаль на границе с дентином насыщена хромом и свинцом.

Форма нахождения микроэлементов в структуре матрицы апатита остаётся под вопросом. Возможные варианты: замещение вакансий в кристаллической решетке, образование собственных минералов либо в рассеянном виде, либо в форме микровключений. Возникает вопрос о наличие корреляционных связей между содержаниями этих элементов.

Нами выполнен ассоциативный анализ содержания микроэлементов в эмали и дентине методом многократной корреляции (этот метод достаточно часто используется для анализа распределения малых элементов при решении



геохимических задач, в частности, вопросов седиментогенеза [Бурков, Боровиков, 1968]). В рамках методики все элементы, формирующие исследуемую совокупность, делятся на две «генеральных» (оппозиционных друг другу) группы; для каждой группы выделяются совокупности элементов, обнаруживающие сходное поведение в объекте исследования. В результате применения ассоциативного анализа установлено, что Zn ведёт себя обособленно, не проявляя устойчивой тенденции к ассоциации с другими элементами. Ті и Sr устойчиво ассоциируют везде, кроме самого разрушенного зуба (III). Устойчива ассоциация Mn, Fe, Ni, Cr, которая находится в оппозиции к Ti – Sr ассоциации.

Особый интерес представляет распределение микроэлементов в дентине здоровых и больных зубов, так как оно может свидетельствовать о специфическом влиянии среды на организм человека. Так, если расположить зубы исследуемой серии в порядке убывания их сохранности (различной степени стираемости и поражения кариесом) - I-II-IV-III, то окажется, что в этом ряду содержание стронция монотонно растёт, а содержание цинка снижается, при этом цинк-стронциевое отношение падает достаточно значимо (рис. 5). С учётом того, что сумма концентраций указанных элементов в дентине всех изученных зубов практически постоянна (0.261±0.038 мкг/г), можно предположить, что в процессе развития заболевания происходит замещение стронцием цинка. Возможно, эти элементы могут служить индикаторами различных по направленности процессов микроминералообразования.

ЭПР-исследование твердых тканей зуба человека. Химический состав биоапатита из твердых тканей зуба не является единственным фактором, фиксирующим патологические процессы различной этиологии; важную роль играют при этом и собственные дефекты структуры биоминерала – вакансии, неустойчивые валентные формы ионов, в том числе и карбонатных группировок. Нами показано, что во всех исследованных образцах твердых тканей зуба – в эмали и дентине после лабораторного

Рис. 5. Изменение отношения Zn/Sr в дентине зубов различной степени стираемости и кариеса. рентгеновского облучения наводится сигнал ЭПР, связанный с карбонатными ион-радикалами CO₃³⁻, образующимися из «предцентров» – группировок CO₃²⁻, входящих в структуру минерала гидроксилфторкарбонатапатита. При облучении происходит их перезарядка по схеме: CO₃²⁻+е⁻→CO₃³⁻. Нами изучены зависимости интенсивности сигнала карбонатных ион-радикалов от дозы лабораторного облучения.

Влияние дозы облучения на содержание карбонатных ион-радикалов. На рис. 6 представлены типичные зависимости содержания карбонатных ион-радикалов в эмали и дентине различных зубов от времени рентгеновского облучения. Установлено, что в пределах каждого зуба содержание наведенных облучением карбонатных ион-радикалов в эмали вне зависимости от времени облучения в 1.5-2 раза выше, чем в дентине (дозные зависимости для материала молочных зубов занимают, как правило, промежуточное положение между кривыми для эмали и дентина), т.е. содержание карбонатных предцентров в гидроксилапатите эмали, а также их радиационные свойства (способность к перезарядке при облучении) выше. Полученные результаты согласуются с представлениями о минерале, составляющем эмаль, как о высококристалличной низкодефектной стехиометричной разности. Но при этом нами отмечено, что колебания содержания наведенных облучением

Рис. 6. Зависимости содержания карбонатных ион-радикалов от длительности облучения в твердых тканях зуба.

1 - эмаль интактного зуба, удаленного по ортодонтическим показаниям у больного И., 20 лет; 2 – эмаль депульпированного зуба больного В., 28 лет; 3 - эмаль, пораженная кариозным процессом, зуба больного К., 30 лет; 4 – дентин интактного зуба, удаленного по ортодонтическим показаниям у больного Р., 22 лет; 5 – дентин интактного зуба, удаленного по ортодонтическим показаниям у больного Н., 25 лет; 6 – дентин депульпированного зуба больного Ш., 44 лет, общая доза облучения на ЧАЭС 9.8 р; 7 – дентин депульпированного зуба больного Т., 47 лет, общая доза облучения на ЧАЭС 10.3 р; 8-дентин, пораженный кариозным процессом, зуба больного Л., 20 лет; 9-11 – дентин интактного зуба, удаленного по ортодонтическим показаниям у больного П., 32 лет: 9 – контрольный образец; 10 – образец, обработанный системой Denthesive II; 11 - образец, обработанный системой One step.



Содержание карбонатных ион-радикалов, отн.ед.

карбонатных ион-радикалов в эмали зубов различных пациентов достигают 2-3 раз и более, причем их содержание существенно зависит от состояния зуба: кариозные поражения, а также депульпирование зуба значительно снижают содержание карбонатных ион-радикалов. В последнем случае процессы обмена осуществляется только посредством взаимодействия со слюной, а обмен через пульпу (кровеносное русло и иннервация) при этом отсутствует. Это отражается как на содержании карбонатных предцентров, так и на их радиационных свойствах. Депульпирование зуба приводит к снижению количества физиологической жидкости в нём и изменению релаксационных процессов на ядрах ¹Н и ³¹Р, фиксируемых и методом ЯМР.

Аналогичные закономерности поведения карбонатных ион-радикалов в зависимости от времени облучения установлены и для дентина. Колебания их интенсивности при фиксированной дозе облучения в зависимости от степени возрастного и патологического изменения дентина (вследствие процессов деминерализации и дегидратации) достигают почти 6-7 раз. Следует отметить, что с ростом степени изменения содержание карбонатных ион-радикалов уменьшается, т.е. кариозное поражение зуба и особенно его депульпирование значительно изменяют свойства дентина из-за нарушения в нем процессов обмена веществ. Полученные данные открывают возможность использования содержания карбонатных ион-радикалов в качестве перспективного количественного зонда степени поражения твёрдых тканей зуба.

Влияние предпломбировочной подготовки зубов на содержание карбонатных ионрадикалов. В последние годы в стоматологической практике активно применяются адгезивные системы предпломбировочной подготовки зуба. Их основу составляют достаточно активные по отношению к минеральной составляющей химические реагенты, приводящие к образованию так называемого «гибридного слоя». Спектроскопических исследований влияния этих компонентов до сих пор не проводилось. Нами изучено воздействие двух адгезивных систем (Denthesive II фирмы Kulzer; One step фирмы Bisco), для чего из материала зуба изготовлялись тонкие шлифы, на поверхность которых поэтапно наносились компоненты систем; полученные данные сопоставлялись с контрольными участками образцов, не подвергавшимся обработке. Обработка в значительной

степени сохраняет органическую составляющую зуба, но изменяет (разрушает) неорганическую составляющую приповерхностного, так называемого «смазанного» слоя. Установлено, что в спектре ЭПР дентина зуба после обработки системой Denthesive II и лабораторного облучения качественных изменений не происходит: наблюдаются сигналы, обусловленные карбонатными ион-радикалами. Результаты по динамике изменения содержания карбонатных ион-радикалов от времени облучения приведены на рис. 4в. При одинаковой дозе облучения содержание ион-радикалов всегда выше в образцах, обработанных Denthesive II, чем в обработанных системой One step. Скорость радиационного накопления ион-радикалов в этих образцах также выше и сопоставима с таковой в контрольных. Таким образом установлено, что применение адгезивных систем приводит к изменению отклика минерала на рентгеновское излучение, наиболее выраженному для системы тотального протравливания One step.

Влияние работы в условиях производства рафинированной меди на содержание карбонатных ион-радикалов в твердых тканях зуба пациентов. Изучены зубы пациентов в возрасте от 35 до 50 лет со стажем работы в условиях производства рафинированной меди свыше 10 лет. Исследование проводилось на участках эмали и дентина, пораженных кариесом зубов в стадии дефекта с прогрессирующим быстрым течением. Исследовано влияние адгезивных систем Denthesive-2 (фирма Kulzer), Solid bond (фирма Voco) и Single bond 3M. Установлено (см. табл.1), что до обработки бондинговыми системами в эмали кариозных зубов пациентов, работающих в условиях производства рафинированной меди, содержание карбонатных ион-радикалов всегда ниже, чем в образцах эмали зубов пациентов контрольной группы. После обработки бондинговыми системами эмали зубов пациентов, работающих в условиях производства рафинированной меди, содержание карбонатных ион-радикалов ещё более понижается по сравнению с зубами пациентов контрольной группы. При обработке дентина бондинговыми системами также отмечено понижение содержания карбонатных ионрадикалов. Отмечено, что динамика снижения содержания карбонатных ион-радикалов в твердых тканях зубов существенно зависит от типа бондинговой системы.

Средние содержания карбонатных ион-радикалов (отн. ед.) в твердых тканях зубов – эмали и дентине (числа в скобках) для пациентов, работающих в условиях производства рафинированной меди, по сравнению с данными для пациентов из контрольной группы (отн. ед.)

| Средства воздействия | Пациенты, работающие в условиях производства рафинированной меди | Пациенты из контрольной группы |
|---------------------------------|--|-----------------------------------|
| До обработки | 650 (570) | 500 (420) |
| После обработки Denthesive 2 | 580 (280) | 425 (300) |
| После обработки Solid bond | 469 (200) | 375 (275) |
| После обработки Single bond | 380 (200) | 280 (225) |

Скорость радиационого нарастания карбонатных центров отражает микропримесный состав и терморадиационную стойкость материала твердых тканей зуба индивида, что связано с особенностями его функционирования в конкретной экологической среде. В результате исследования радиационной стойкости твердых тканей зуба, обработанных различными адгезивными системами, используемыми в стоматологической практике при пломбировании и реставрации кариозных полостей, нами предложено оценивать эффективность воздействия адгезивной системы на твёрдые ткани зуба человека с разным уровнем резистентности к кариесу по изменению дозной зависимости накопления карбонатных ион-радикалов. Результаты работы могут быть полезны при решении проблемы типизации на физико-химическом уровне апатитов зуба человека (здоровых и испытавших патологические изменения) из различных экологических обстановок, а также моделировании в лабораторных условиях «in vitro» химических, механических, термических и радиационных воздействий на зубы.

Расчеты атомного и электронного строения апатита. С целью интерпретации экспериментальных результатов выполнены квантовохимические расчеты электронного строения флюорапатита $Ca_{10}F_2(PO_4)_6$ неэмпирическим методом X_6 -дискретного варьирования [Averill, et al., 1977]; в качестве начального приближения использовано приближение идеальной структуры и стехиометрического состава апатита. В дальнейшем полученные данные

об электронной структуре ближнего порядка гипотетического идеального кристалла планируется использовать для расчетов примесей, являющихся спектроскопическими «структурными зондами» реальных кристаллов.

Апатиты кристаллизуются в гексагональной сингонии, пространственная группа С²_{6h} – Р6₃/т [Глинская и др., 1975]. Основу структуры составляют Са-полиэдры двух видов (далее соответствующие атомы кальция обозначаются Ca1 и Ca2). Одни из них представляют собой девятивершинники (Са1)О, в виде тригональных призм с «центрированными» гранями, другие – семивершинники (Са2)О₆F, расположенные по правилу трехзаходного винта вдоль оси 6₂. Призмы смыкаются одна с другой основаниями и образуют колонки; колонки призм связываются с семивершинниками посредством общих атомов кислорода и РО₄-тетраэдров. Анионы фтора располагаются на оси 6₃, образуя непрерывные цепочки; они координированы тремя катионами Са2, образующими треугольник, плоскость которого перпендикулярна тройной оси.

С точки зрения интерпретации экспериментальных результатов по биоапатитам наибольший интерес представляют расчеты трех типов замещений.

1. Расчеты катионов Mn, Mg, Na, K, Sr, Pb в позициях Ca1 и Ca2, а также кальциевых вакансий (для склерозированных Ca-дефицитных зубов). Известно, что катионы металлов (в частности, Mn²⁺) замещают катионы Ca в обоих координационных комплексах Ca1 и Ca2, причем возможны различные количественные соотношения этих замещений [Глинская и др., 1975; Elliott, 2002].

2. Расчеты замещений анионов фтора на OH-группировки, особенно характерные для биогенных минералов [Elliott, 2002; Кнубовец и др., 1975], в том числе с возможным образованием водородных связей при одновременных заменах в соседних позициях OH \rightarrow F и O \rightarrow F, а также замещений Cl \rightarrow F.

3. Расчеты СО₃-группировок, схемы вхождения которых в структуру апатита до сих пор остается дискуссионными. Заметим, что по данным последних исследований наиболее вероятно их присутствие в двух структурно-неэквивалентных окружениях – в позициях РО₄-тетраэдров (замещения В-типа) и в ОН- позициях (замещения А-типа) [Elliott, 2002].

В настоящей работе выполнены расчеты электронной структуры идеальных фрагментов ближнего порядка флюорапатита, необходимые для анализа замещений типа (1) и (2). Для выявления различий химического связывания в координационных комплексах Са1 и Са2 рассчитаны 66-атомный кластер $[(Ca_{u}O_{o})Ca_{s}P_{6}F_{6}O_{36}]^{48-}$ (с центральным ионом кальция Са1 в девятерном кислородном окружении и периферийными катионами Ca, F и P, формирующими вторую координационную сферу Са,) и 74-атомный кластер $[(Ca_{10}O_{6}F)Ca_{10}P_{5}F_{2}O_{49}]^{66-}$ (с центральным ионом Са2 в окружении 6 ионов кислорода и иона фтора) (рис.7, а,б). Для анализа роли ионов фтора в химическом связывании биоапатитов рассмотрен кластер $[F_{uehrp}Ca_3O_{18}]^{31}$ (с центральным ионом F_u в планарном окружении 3 ионов Са2 и координирующих их ионов кислорода)









Рис.7. Кластеры, моделирующие структуру апатита: 66-атомный кластер [(Ca_uO_9) $Ca_8P_6F_6O_{36}$]⁴⁸⁻ с центральным катионом Ca1 (a), 74-атомный кластер [(Ca_uO_6F) $Ca_{10}P_5F_2O_{49}$]⁶⁶⁻ с центральным катионом Ca2 (б), 22-атомный кластер [$F_{uenrp}Ca_3O_{18}$]³¹⁻ с центральным ионом F в планарном окружении 3 катионов Ca2 (в).



Рис.8. Спектры парциальных плотностей состояний атомов Ca1, Ca2, P, F и неэквивалентных атомов кислорода O1, O2 и O3 по данным расчетов кластеров $[(Ca_{\mu}O_{9})Ca_{8}P_{6}F_{6}O_{36}]^{48-}$ (а) и $[(Ca_{\mu}O_{6}F)Ca_{10}P_{5}F_{2}O_{49}]^{66-}$ (б).

(рис.7, в). Позиции атомов в кластерах задавали в соответствии с рентгеноструктурными данными [Hughes et al, 1991]. Согласно этим данным, значения длин связей атомов кальция со структурно-неэквивалентными атомами кислорода O1, O2 и O3 составляют Ca1-O1=2.42 Å, Ca1-O2=2.46 Å, Ca1-O3=2.78 Å, Ca2-O1=2.67 Å, Ca2-O2=2.40 Å, Ca2-O3=2.32 Å и 2.54 Å; межатомное расстояние Ca2-F равно 2.29 Å, расстояния Ca2-Ca2 в треугольниках составляют 3.97 Å, внутритетраэдрические расстояния равны P- O1=1.47 Å, P- O2=1.49 Å, P- O3=1.55 Å.

Спектры парциальных плотностей состояний атомов Ca1, Ca2, P, F и неэквивалентных атомов кислорода O1, O2 и O3 по данным расчетов кластеров [(Ca_uO₉)Ca₈P₆ F₆O₃₆]⁴⁸⁻ и [(Ca_uO₆F)Ca₁₀P₅ F₂O₄₉]⁶⁶⁻ приведены на рис.8. По данным расчета обоих кластеров валентная полоса флюорапатита сформирована 2s, 2p-состояниями атомов кислорода с примешиванием 3s, 3p-состояний фосфора; 2s, 2p-орбитали атомов

фтора дают вклад в области середины O2s и О2р-подзон. Остовные 3р-состояния атомов Ca1 и Са2 энергетически неэквивалентны: для Са2 они расположены на ~2.3 эВ, а для атомов Ca1 - на ~2.1 эВ ниже дна О2ѕ-подзоны. Расщепление состояний Са отражает их структурную неэквивалентность. Электронные конфигурации Ca1 и Ca2 также различаются: Ca14s^{0.28} 4p^{0.40} и Ca14s^{0.27} 4p^{0.38}; несколько более низкие заселенности орбиталей Са2 указывают на более ионный характер его химической связи с окружающими анионами. При этом заселенности перекрывания орбиталей Ca1 с 2р-состояниями атомов О1 и О2 в 3-5 раз превышают заселенности перекрывания орбиталей атомов Са2 с указанными состяниями кислорода, тогда как заселенности перекрывания Са1 с 2р-орбиталями ОЗ, напротив, оказываются в 3-4 раза ниже, чем для Са2. Очевидно, этот отражает структурные и размерные особенности кальциевых полиэдров в апатитах. Заселенности перекры-

Таблица 2

| Ион | Расчетный кластер | | |
|-----------------------|--|---|-----------------------------|
| | $[(Ca_{\mu}O_{9})Ca_{8}P_{6}F_{6}O_{36}]^{48}$ | $[(Ca_{II}O_{6}F)Ca_{10}P_{5}F_{2}O_{49}]^{66}$ | $[F_{II}Ca_{3}O_{18}]^{31}$ |
| Ca* _{1центр} | 1.523 | - | - |
| | ε=0,762 | | |
| Са _{2центр} | - | 1.560 | - |
| | | ε=0,780 | |
| 01 | -1.224 | -1.259 | - |
| O ₂ | -1.246 | -1.252 | - |
| O ₃ | -1.223 | -1.196 | - |
| F _{центр} | - | - | -0.846 |
| F** _{периф} | - | -0.797 | - |
| Рпериф | 2.733 | 2.142 | - |
| | ε=0,683 | ε=0,535 | |
| Са _{1периф} | 1.512 | 1.493 | - |
| Са _{2периф} | 1.424 | 1.328 | 1.373 |

Значения эффективных зарядов атомов в апатите (ед. зар. эл.), полученные при расчете различных модельных кластеров

Примечание. *центр. – центральный атом в кластере, **периф. – периферический, нецентральный атом в кластере.

вания 2р-состояний атомов фтора с 4s, 4p-орбиталями окружающих его атомов Ca2, определенные по данным расчета кластера [F_{центр}Ca₃O₁₈]³¹⁻, практически совпадают с заселенностями перекрывания O3 2p-Ca2 4s,4p что указывает на близкие значения степени ковалентности связи Ca2-F и Ca2-O3. Нижние вакантные состояния образованы Ca1 4s-, Ca2 4s- и P3s, 3p-орбиталями. Энергетический зазор между занятыми и вакантными состояниями составляет около 10 эВ. Полученные закономерности формирования спектра качественно согласуются с результатами неэмпирических расчетов методом DFT-LDA [Galderin L. et al., 2003], однако дают более низкие значения ширин разрешенных зон.

Использованный нами кластерный подход позволил выявить особенности энергетического спектра структурно-неэквивалентных атомов кислорода. Ширина зоны валентных состояний (Е), а также ширины O2s и O2p-подзон ($E_1 u E_2$) увеличиваются в ряду O1 \rightarrow O2 \rightarrow O3: по данным расчета кластера [($Ca_u O_6 F$) $Ca_{10} P_5 F_2 O_{49}$]⁶⁶⁻ значение Е увеличивается от 20,7 эВ до 21,7 эВ, E_1 – от 3,8 эВ до 4,2 эВ, E_2 – от 7,4 эВ до 7,9 эВ. Этот эффект может быть связан с увеличением степени ковалентности связи атомов кислорода с окружающими катионами в указанном ряду. Это предположение согласуется с увеличением

заселенностей перекрывания P3s, 3p- и O2p-орбиталей в 4-5 раз при переходе от O1 и O2 к атомам O3.

Пространственным интегрированием электронной плотности кластеров по методике [Рыжков, 1998] рассчитаны эффективные заряды атомов в апатите, характеризующие пространственную локализацию электронов на атомах (табл. 2). В табл. 2 приведены также величины степени ионности е химической связи катионов с кислородом, определяемые как отношение эффективного заряда к формальной степени окисления катиона. Из табл. 2 видно, что степени ионности связи атомов Са1 и Са2 с окружающими катионами близки, однако Са2 характеризуются несколько более высокой степенью ионности. Этот результат согласуется с преведенными выше данными анализа заселенностей перекрывания. Наименьшие эффективные заряды имеют атомы кислорода ОЗ, что соответствует повышенной степени ковалентности связи этих атомов с окружающими катионами. Наиболее ковалентные связи в рассматриваемой структуре образуют атомы фосфора в тетраэдрах РО₄; расхождения величин зарядов в различных кластерах связаны с периферийным расположением этих атомов в кластерах.

Таким образом, анализ химического свя-

зывания в структуре апатита показывает, что замещения в позициях Са2 катионной подрешетки должны оказывать влияние на характеристики центров в позициях F (в частности, на характеристики СО₃-группировок А-типа) и на характеристики ОН-групп и водородных связей при замещении соседнего фтора на кислород. В свою очередь, следует ожидать изменений свойств центров катионной подрешетки (в частности, парамагнитных центров Mn²⁺) при замещениях в цепочках галоидов. Более ионная связь Са2 с окружающими анионами по сравнению с Cal должна приводить к различиям спектроскопических параметров замещающих катионов в указанных позициях. В первом приближении показана высокая степень ковалентности связи в изолированных РО,-группах в более ионной структуре Са-полиэдров, однако вопросы электронного строения РО,-групп в апатитах и их перестройки при появлении ОН-группы в окружении фосфора, что характерно для биогенных минералов, требуют дальнейших исследований.

Выводы.

1. Предложена оригинальная многостадийная механико-химическая схема растворения твердых тканей зуба, позволяющая проводить исследования особенностей их послойного микроэлементного состава. Показано, что скорость растворения глубинных слоёв эмали увеличивается с уменьшением степени их сохранности, что может быть следствием нарушения кристаллической структуры матрицы, увеличения размеров кристаллитов и ослабления связи минерал – органическая матрица. Выделены две группы примесей (Ti, Fe, Zn, Sr и V, Cr, Mn, Ni, Co, Cu, Ba, Pb), которые по-разному концентрируются по объему эмали и дентина; особенности вхождения элементов зависят от степени сохранности зубной ткани. Элементы Ті и Sr, а также Mn, Fe, Ni, Cr, устойчиво ассоциируют друг с другом, причем первые находятся в оппозиции ко вторым.

2. На основании количественных характеристик дефектности структуры биоапатитов (содержания радиационных карбонатных ионрадикалов) предложена схема типизации зубов, затронутых патологическими процессами различной этиологии. Показано, что содержания этих ион-радикалов при радиационных воздействиях существенно изменяются по образцам зубов, затронутых патологическими процессами, и определяются структурным несовершенством (нестехиометрией) минерала, его микропримесным составом; показана высокая чувствительность последних к смене экологических условий проживания.

3. Выполнены квантовохимические расчеты электронного строения флюорапатита $Ca_{10}F_2(PO_4)_6$ в начальном приближении идеальной структуры и стехиометрического состава минерала. Проанализированы энергетические и пространственные распределения электронной плотности, рассчитаны эффективные интегральные заряды атомов, рассмотрены закономерности химического связывания и различия кристаллохимических позиций катионов и анионов, в которых происходят изоморфные замещения в реальных структурах биоапатитов.

Работа выполнена в рамках программы Президиума Российской академии наук «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ НАУКИ – МЕДИЦИНЕ», а также при финансовой поддержке по проекту № 60 конкурса молодых ученых и аспирантов УрО РАН.

Список литературы

Бурков Ю.К., Боровиков Л.И. Корреляционный анализ закономерностей распределения малых элементов для решения вопросов седиментогенеза // Международный геологический конгресс, XXIII сессия. Доклады советских геологов. М.: Наука. 1968. С. 37-44.

Глинская Л.Г., Щербакова М.Я. Изоморфные замещения и структурные нарушения в апатите по данным электронного парамагнитного резонанса // Физика апатита. Исследование апатита методами спектроскопии / Ред. В.С.Соболев. Новосибирск: Наука. 1975.С.7-63.

Кнубовец Р.Г., Кисловский Л.Д. Исследование анионных замещений в апатитах методом инфракрасной спектроскопии. // Физика апатита. Исследование апатита методами спектроскопии. Ред. В.С.Соболев. Новосибирск: Наука. 1975.С. 63-88.

Кораго А. А. Введение в биоминералогию. Санкт-Петербург: Недра. 1992. 75 с.

Рыжков М.В. Новый метод вычисления эффективных зарядов на атомах в молекулах, кластерах и твердых телах // Ж. структ. хим. 1998. Т. 39. N 6. C.1134-1140.

Appleton J., Lee K.M., Sawicka Kapusta K. et al. The heavy metal content of the teeth of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) as an exposure marker of environmental pollution in Poland // Environmental Pollution, 2000. V. 110. P. 441-449.

Averill F.V., Ellis D.E. An efficient numerical

multicenter basis set for molecular orbital calculations: Applications to FeCl_4 J // Chem. Phys. 1977. V. 59. P. 6412-6418.

Chew L. T., Bradley D. A., Amin Yusoff Mohd, Maah Mohd Jamil Zinc, lead and copper in human teeth measured by indused coupled argon plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) // Applied Radiation and Isotopes. 2000. V. 53. P. 633-638.

Elliott J.C. Calcium phosphate biominerals // Reviews in Mineralogy and Geochemistry. Phosphates / Editors Kohn M.J., Rakovan J., Hughes J.M. 2002. V. 48. P. 427-453.

Galderin L., Stott M.J., Rubio A. Electronic and crystallographic structure of apatites // Phys. Rev. B. 2003. V. 67. P. 134106.

Gross K. A., Berndt C. C. Biomedical application of apatites // Reviews in mineralogy and geochemistry. 2002. V. 48. Phosphates. P. 633-672.

Hughes J., Cameron M., Crowley K. Ordering of divalent cations in the apatite structure: Crystal structure refinements of natural Mn- and Sr-bearing apatite sample //Am. Min.V.76.1991. P. 1857-1862

Lee K. M., Appleton J., Cooke M. et al. Use of

laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry to provide element versus time profiles in teeth // Analytica Chimica Acta. 1999. V. 395. P. 179-185.

Schmidt M.W., Baldridge K.K., Boatz J.A. et al. General Atomic and Molecular Electronic Structure System // J.Comput.Chem. 1993. V.14. P.1347-1363.

Spěváčková V., Šmíd J. Determination of lead in teeth of children for monitoring purposes by elecrothermal atomic absorbtion spectrometry // Spectrochimica Acta part B. 1999. V. 54. P. 865-871.

Trueman C. N, Tuross N. Trace elements in recent and fossil bone apatite // Reviews in mineralogy and geochemistry. 2002. V. 48. Phosphates. P. 489-521.

Tvinnereim H. M., Eide R., Riise T. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations // The Science of the Total Environment. 2000. V. 255. P. 21-27.

Tvinnereim H. M., Eide R., Riise T. et al. Lead in human primary teeth from Norway: changes in lead levels from the 1970s to the 1990s // The Science of the Total Environment. 1997. V. 207. P. 165-177.