

РОЛЬ ЛАЗЕРНОЙ КОНФОКАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ИЗУЧЕНИИ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ЗУБОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Николаева А. В., Павлова Е. А., Котов М. И.

*Научные руководители: канд. мед. наук, доц. Домбровская Ю. А.,
канд. мед. наук, доц. Кравец О. Н.*

*Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И. И. Мечникова, г. Санкт-Петербург*

Резюме. С помощью лазерной конфокальной сканирующей микроскопии и масс-спектрометрии возможно послойное изучение тканей зубов при различных патологиях. Целью данного исследования стало изучение минерального состава эмали, дентина и цемента на разной глубине слоёв при кариесе и некариозных поражениях зубов современных людей и людей, проживавших с X по XX вв., а также сравнить количественное соотношение изотопов стронция и рубидия в эмали, дентине и цементе. Был проведён анализ микроэлементного состава твёрдых тканей зубов в 3 шлифах: поверхностных, средних и глубоких слоях эмали, дентина и цемента. В интактных твердых тканях преобладают O, C, Ca, P. Выявлено повышенное содержание F и Fe при пародонтите и Zr, Na, Zn и S при патологической стираемости. Изменение микро- и макроэлементного состава твёрдых тканей зубов приводит к модификации структуры всех слоёв, что должно учитываться при лечении различных патологий и в разработке методов всех уровней профилактики. При проведении масс-спектрометрического анализа для выявления содержания изотопов стронция-87, -86 и рубидия-86 в твёрдых тканях зубов предварительной сепарации эмали от дентина не требуется.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, лазерная конфокальная сканирующая микроскопия, микроэлементный состав тканей зубов

Актуальность. Актуальность палеоодонтологических исследований заключается в получении уникальных данных о структуре твёрдых тканей зубов, адаптационных механизмах и воздействии окружающей среды на стоматологический статус, что выходит за рамки исключительно археологических интересов. Однако традиционные методы микроэлементного и гистологического анализа зачастую носят инвазивный и деструктивный характер, что ограничивает их применение при изучении редких и ценных

археологических образцов [3]. Кроме того, эти методы не всегда позволяют получить трехмерную информацию о внутренней микроструктуре на субмикронном уровне, критически важную для понимания начальных стадий кариеса, процессов реминерализации и характера износа эмали [4].

В этом контексте лазерная конфокальная сканирующая микроскопия – надёжная и неинвазивная альтернатива, открывающая горизонты для изучения уникальных археологических находок без их полного

разрушения. Высокое пространственное разрешение, возможность послойного сканирования с последующей трехмерной реконструкцией и отсутствие необходимости в сложной пробоподготовке делают лазерную конфокальную сканирующую микроскопию идеальным инструментом для исследования микроэлементного состава любых слоёв древних зубов. Этот метод позволяет с беспрецедентной точностью оценить такие параметры, как количественное содержание различных элементов на поверхности твёрдых тканей зуба, характер микроповреждений и распределение микротрещин, кроме того - визуализировать микроструктуру тканей.

Получаемые с помощью лазерной конфокальной сканирующей микроскопии данные не только углубляют наши знания об особенностях стоматологических заболеваний в исторической ретроспективе, но и имеют ценность в современной клинической практике. Анализ изменений микроэлементного состава тканей древних зубов, развивавшихся в отсутствие современных диетических факторов и средств гигиены, позволяет выявить связь между распространённостью стоматологических заболеваний и воздействием эндо- и экзогенных факторов на их развитие. Таким образом, исследование древних зубов с применением лазерной конфокальной сканирующей микроскопии служит связующим звеном между палеопатологией и практической стоматологией [4].

Важно учитывать то, что в зависимости от наличия кариозных и некариозных поражений зубов микроэлементный состав дентина, эмали и

цемента различен [1]. Проследив динамику изменений элементного состава твёрдых тканей зубов на протяжении веков, можно предположить, как те или иные элементы в кристаллической решётке связаны с развитием стоматологических заболеваний и разработать методики профилактики заболеваний. С помощью растровой электронной микроскопии, а также стерео- и поляризационной микроскопии появляется возможность изучить микроэлементный состав тканей зубов на разной глубине слоёв.

Цель: изучение минерального состава эмали, дентина и цемента на разной глубине слоёв при кариесе и некариозных поражениях зубов современных людей и людей, проживавших с X по XX вв., а также сравнение количественного соотношения изотопов стронция и рубидия в эмали и дентине.

Материалы и методы. Для проведения микроанализа состава эмали и дентина 66 зубов древних людей с X - XX вв. и 14 зубов современных людей XXI в. проводилась пробоподготовка, которая заключалась в механической очистке образцов, фотофиксации в стереомикроскопе, заливке в эпоксидную смолу с дальнейшим получением полированных поверхностей в разных плоскостях зуба: поверхностных, средних и глубоких слоях эмали, дентина и цемента. Подготовленные образцы были проанализированы как при помощи световой, так и сканирующей электронной микроскопии на микроскопе-микроанализаторе ТМ 3000 (Hitachi, Япония). Для получения более точного количественного содержания микроэлементов в ткани производилось предварительное напыление

поверхности материала углеродом.

Археологический одонтологический материал был предоставлен из коллекции федерального государственного бюджетного учреждения науки института проблем освоения Севера Сибирского отделения Российской академии наук. Зубы, датированные X - XX веками, мы условно отнесли к группе древних зубов, так как судя по историческим справкам и анализу условий проживания, эти люди не пользовались зубными пастами, не могли быть участниками программ профилактики стоматологических заболеваний. Данная группа сравнивалась с зубами современных людей XXI века, удалённых по хирургическим, пародонтологическим и ортодонтическим показаниям.

Критериями включения в исследование служили целостность зубов (отсутствие сколов и повреждений тканей) и закрытие верхушек корней зубов. В исследовании участвовали люди старше 18 лет и моложе 66 лет. Критерии исключения составили временные зубы, зубы с незакрытыми верхушками корней и препараты со сколами коронковой или корневой части.

Зубы были разделены на 4 группы по нозологическим формам: 1. зубы, экстрагированные из челюстей, костная ткань которых имела признаки деструктивных изменений альвеолярного отростка, характерные для пародонтита (n=22);

2. зубы, на которых имелись факетки стирания и за счёт этого имелось укорочение анатомической длины зубов, т.е. имелись признаки патологической стираемости (n=22);

3. интактные зубы, не имеющие признаков заболеваний твёрдых тканей зубов, периодонта и костной ткани, окружающей зуб, составили контрольную группу (n=22);

4. зубы, с кариозными поражениями тканей на поверхности (n=14).

С помощью настольного растрового электронного микроскоп-микроанализатора ТМ 3000 (Hitachi, Япония) был проведён анализ микроэлементного состава твёрдых тканей зубов в 3 шлифах: поверхностных, средних и глубоких слоях эмали, дентина и цемента. При проведении микроанализа каждой ткани был проведён усреднённый анализ участка эмали и дентина под увеличением на поверхности от 100 до 500 раз.

Полученные данные были проанализированы с помощью статистической программы GraphPad Prism 8 Statistics Guide и Microsoft Office Excel 2017 [4].

Для масс-спектрометрического анализа, использовались современные третьи моляры, удаленные по хирургическим показаниям. С помощью турбинного наконечника и алмазного копьевидного бора диаметром 1 мм была проведена сепарация эмали от дентина. Метод измерения массовых долей и изотопных отношений рубидия 87 и стронция 86 основан на химическом разложении образцов, последующем выделении соответствующих элементов в виде солей минеральных кислот и измерении изотопных отношений методом термоионизационной масс-спектрометрии. Для измерения массовых долей определяемых компонентов используется метод внутреннего изотопного стандарта с

применением стандартных образцов, обогащённых малораспространёнными изотопами соответствующих элементов [2].

Результаты и их обсуждение.

Было получено количественное содержание микроэлементов в поверхностных, средних и глубоких слоях эмали, дентина и цемента зубов. В интактной эмали преобладают O, C, Ca, P, так же Sr, Na, Cl, Rb прослеживаются в следовых концентрациях (элементы расположены в порядке убывания), в интактном цементе – C, O, Ca, P, а Sr, Na, Rb, Si – в следовых значениях, в интактном дентине – C, O, Ca, P, обнаружены так же следы Sr, F, Na, Sn. В эмали и дентине с патологической стираемостью преобладают O, C, Ca, P, так же в следовых значениях обнаружены Sr, Na, F, Sn. В цементе при пародонтите и патологической стираемости – O, C, Ca, P, следовые значения Sr, F, Na, Mg. Выявлена статистически значимая взаимосвязь между количеством Ca, P и Sr в составе твёрдых тканей зубов, которая позволяет предположить, что содержание данных элементов влияет на степень резистентности тканей к кариозным процессам. Повышенное содержание F и Fe в дентине при пародонтите по сравнению с зубами контрольной группы объясняет частое отсутствие кариозного процесса при развитии пародонтита. Факт статистически значимого увеличения содержания Zr, Na, Zn и S в цементе зубов с поражениями тканей пародонта и патологической стираемостью, возможно, носит компенсаторный характер и требует дополнительного изучения. Наблюдается изменчивость минерального состава и его

выраженная зависимость от экзогенных факторов. Получена взаимосвязь нозологической формы заболевания и микроэлементного состава. В результате исследования была составлена и запатентована база данных содержания микроэлементов в твёрдых тканях древних и современных зубов, при патологии и в норме (в интактном состоянии). Изучение структуры дентина, эмали и цемента под микроскопом привело к созданию атласа фотографий зубов и тканей, выполненных на базе научного парка в СПбГУ на аппаратах: конфокальном лазерном микроскопе LEICA TCS SPE (Leica, Германия) и систему со сфокусированными электронным и ионным зондами QUANTA 200 3D (FIA, Нидерланды). Получены образцы эмали массой 0,05106 грамм, и дентина 0,04241 грамм. Выявленное соотношение $^{87}\text{Rb}/^{86}\text{Sr}$ с трассером в эмали 0,00366 ($2\sigma \% = 0,152$) и в дентине 0,00392 ($2\sigma \% = 0,207$) сопоставимо между собой. Соотношение стронция 87/86 без трассера составляет в эмали 0,709444 ($2\sigma \% = 0,0007$), в дентине – 0,709357 ($2\sigma \% = 0,0007$).

Выводы. Методика послойного проведения исследования позволяет локально определить микроэлементный состав изучаемых образцов. Получено количественное содержание микроэлементов в поверхностных, средних и глубоких слоях эмали, дентина и цемента зубов.

При изучении минерального состава эмали интактных зубов и зубов с кариесом, установлена значимость группы элементов, определяющих патологические изменения в очаге поражения, а именно, углерода, фосфора,

кальция, хлора и серы, кислорода и натрия. Эмаль имеет более выраженные отличия по элементному составу, так как она подвергается влиянию экзогенных факторов: пищевой рацион, состав средств гигиены, факторы вирулентности микроорганизмов. По данным исследования было выявлено, что содержание кальция в современных и древних зубах сопоставимо.

Получена зависимость нозологической формы заболевания от микроэлементного состава. При проведении сравнительного анализа между микроэлементным составом зубов современных людей и древних в глубоких слоях выявлена тенденция к увеличению концентрации всех

элементов, кроме углерода, при этом соотношение элементов между собой стабильно с течением времени.

Изменение микро- и макроэлементного состава твёрдых тканей зубов приводит к модификации структуры всех слоёв эмали, дентина и цемента, что, безусловно, должно учитываться при лечении различных патологий и в разработке методов всех уровней профилактики.

При проведении масс-спектрометрического анализа для выявления содержания изотопов стронция-87, -86 и рубидия-86 в твёрдых тканях зубов предварительной сепарации эмали от дентина не требуется.

Литература

1. Ахмедбейли, Р. М. Современные данные о минеральном составе, структуре и свойствах твердых зубных тканей / Р. М. Ахмедбейли // Биомедицина. – 2016. – № 2. – С. 22–27.
2. Власова, М. И. Изучение микроэлементного состава твердых тканей зубов человека по данным масс-спектрометрии с лазерной абляцией / М. И. Власова, Д. В. Киселева // Проблемы стоматологии. – 2013. – № 6. – С. 4–7.
3. Вотяков, С. Л. Минералогическая стоматология как междисциплинарная область исследований: последние результаты и перспективы развития / С. Л. Вотяков, Ю. В. Мандра, Г. И. Ронь, Д. В. Киселева // Актуальные проблемы стоматологии. – 2017. – Т. 13, № 1. – С. 3–16.
4. Домбровская, Ю. А. Эволюционные тенденции изменения микроэлементного состава эмали, поверхностных слоев дентина, цемента зубов человека в Северо-Западном регионе Сибири в норме и при патологии в X–XX веках / Ю. А. Домбровская, О. Н. Кравец, А. В. Николаева, М. И. Котов, В. И. Домбровская, К. А. Бенкен, А. В. Силин // Стоматология. – 2025. – Т. 104, № 1. – С. 5–8.

THE ROLE OF LASER CONFOCAL SCANNING MICROSCOPY AND MASS SPECTROMETRY IN STUDYING THE ELEMENTAL COMPOSITION OF TEETH IN VARIOUS DENTAL DISEASES

Nikolaeva A.V., Pavlova E.A., Kotov M.I.

Tutors: PhD, associate professor Dombrovskaya Yu. A.

PhD, associate professor Kravets O. N.

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg

Resume. Using laser confocal scanning microscopy and mass spectrometry, it is possible to study the layers of tooth tissue in various pathologies. The purpose of this study was to examine the mineral composition of enamel, dentin, and cement at different depths in caries and non-caries lesions of modern and historical teeth, as well as to compare the quantitative ratio of strontium and rubidium isotopes in enamel, dentin, and cement. The microelement composition of the hard tissues of teeth was analyzed in 3 polished samples: the surface, middle, and deep layers of enamel, dentin, and cement. In intact hard tissues, O, C, Ca, and P predominate. An increased content of F and Fe was found in periodontitis, and Zr, Na, Zn, and S were found in pathological attrition. Changes in the micro- and macroelement composition of the hard tissues of teeth lead to modifications in the structure of all layers, which should be taken into account in the treatment of various pathologies and in the development of methods for all levels of prevention. When conducting mass-spectrometry analysis to detect the content of strontium-87, -86, and rubidium-86 isotopes in the hard tissues of teeth, no pre-separation of enamel from dentin is required.

Keywords: mass spectrometry, laser confocal scanning microscopy, trace element composition of dental tissues.