

ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

doi: 10.51639/2713-0568_2022_2_1_19

УДК 543.424

ГРНТИ 29.31.27

ВАК 01.04.05

Сравнительный спектральный анализ разной степени деминерализации биоматериалов из ювенильных зубов

¹ Тимченко Е. В., ¹ Тимченко П. Е., ² Волова Л. Т., ¹ Фролов О. О., ² Власов М. Ю.,
^{1*} Шипко С. С.

¹ 443086, Россия, Самара, Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва

² 443099, Россия, Самара, Самарский государственный медицинский университет, биотехнологический центр «БиоТех»

e-mail: laser-optics.timchenko@mail.ru, timpavel@mail.ru, volovalt@yandex.ru,
frolovalch@gmail.com, mvlasov1@rambler.ru, * s.shipko567@gmail.com

Проведены эксперименты по оптической оценке методом Рамановской спектроскопии биоматериалов из ювенильного дентина, деминерализованных соляной кислотой с разной степенью нормальности. Каждый образец был разрезан на две равные части и далее поделен на две основные группы, в соответствии с этапами их обработки: первая группа – биоматериалы из ювенильного дентина, деминерализованные в соляной кислоте 1,2 Н степени нормальности; вторая группа – биоматериалы из ювенильного дентина, деминерализованные в соляной кислоте 1,8 Н степени нормальности. Деминерализация осуществлялась в растворе соляной кислоты по технологии «ЛИОПЛАСТ» [ТУ-9398-001-01963143-2004]. Показано, что в процессе деминерализации соляной кислотой ювенильные зубы величина степени нормальности раствора кислоты вызывает незначительные изменения. При деминерализации 1,2 Н раствором соляной кислоты сохраняется большее количество органических компонент по сравнению с деминерализацией 1,8 Н раствором соляной кислоты.

Ключевые слова: ювенильный дентин, Рамановская спектроскопия, спектральный анализ, деминерализованные биоматериалы, изменения в дентине, деминерализованный костный трансплантат, деминерализованный матрикс.

Введение

Остеопластические материалы являются основой для формирования собственной ткани пациента. Эти материалы служат биосовместимой матрицей для построения костной ткани в период её регенерации и должны полностью замениться собственной тканью пациента. В стоматологии применяются различные типы остеопластические материалов: аутогенные, аллогенные, ксеногенные и синтетические материалы. Аллогенные аналоги костной ткани считаются наиболее доступным источником биоматериалов-заменителей, которые содержат биологически активные клеточные структуры. Известно, что зубы

развиваются из клеток нервного гребня, и большое количество структурных белков являются аналогичным для костной ткани. Вследствие этого дентин, составляющий более 85 % структуры зубов, может быть применен в качестве трансплантатного материала в процессе аугментации [1].

Дентин содержит 35 % органических веществ и 65 % неорганических веществ. Деминерализация необходима, поскольку кристаллический гидроксипатит препятствует высвобождению факторов роста. Кроме того, процесс деминерализации не приводит к деградации факторов роста. Многие исследования показали, что деминерализованным костным трансплантатам свойственны высокая остеоиндуктивность, малая антигенность, антибактериальные свойства и хорошая переносимость организмом реципиента. Дентин является биосовместимым и после его трансплантации формируется костная ткань. В работе [2] показано, что основные способы изготовления деминерализованных костных трансплантатов основаны на обязательном использовании соляной кислоты, т.к. использование других кислот нежелательно при их изготовлении из-за снижения остеоиндуктивности полученных биоматериалов. Для изготовления биоматериалов была применена технология «ЛИОПЛАСТ» [ТУ-9398-001-01963143-2004].

Оценка степени деминерализации биоматериалов из ювенильного дентина является актуальной задачей, т.к. биологический состав трансплантата напрямую влияет на его приживляемость.

Оптические методы исследований широко применимы в различных областях [3–5], в том числе они применимы и для оценки биоматериалов: рентгенологические исследования, компьютерная томография, гистоморфологические исследования, магнитно-резонансная томография, денситометрия, спектроскопия комбинационного рассеяния и т.д. [6–8]. Одним из методов оценки качества биоматериалов является Рамановская спектроскопия, как показано в работе [9] данный метод позволяет фиксировать колебания минеральных соединений, определяющих химический состав твердых тканей зубов, и колебания органических компонент. Использование метода спектроскопии комбинационного рассеяния позволяет исследовать кристаллическую структуру твердых тканей зубов при патологических процессах, как показано в работе [10]. В работе [11] при помощи метода Рамановской спектроскопии происходит определение характера минерализации твердых тканей человека.

Целью исследования является оценка и сравнение биоматериалов, полученных из ювенильного дентина, деминерализованного соляной кислотой с различной степенью нормальности, с помощью метода спектроскопии КР.

Материалы и методы

Объектами исследований являлся дентин, полученный из здоровых ювенильных зубов предварительно механически обработанных. Каждый образец был разрезан на 2 равные части и далее поделен на две основные группы, в соответствии с этапами их обработки: 1 группа – биоматериалы из ювенильного дентина, деминерализованные в соляной кислоте 1,2 Н степени нормальности; 2 группа – биоматериалы из ювенильного дентина, деминерализованные в соляной кислоте 1,8 Н степени нормальности. Деминерализация осуществлялась в растворе соляной кислоты по технологии «ЛИОПЛАСТ» [ТУ-9398-001-01963143-2004].

В качестве основного метода анализа биоматериалов на основе ювенильного дентина был использован метод спектроскопии КР, реализуемый с помощью экспериментального стенда, включающий в себя рамановский пробник RPB-785 (фокусное расстояние 7,5 мм), совмещенный с лазерным модулем Luxx MasterLML-785.0RB-04 (мощность до 500 мВт,

длина волны $784,7 \pm 0,05$ нм) и высокоразрешающий цифровой спектрометр Shamrock sr-303i, обеспечивающий спектральное разрешение 0,15 нм, со встроенной охлаждаемой камерой DV420A-OE (спектральный диапазон 200-1200 нм) [12].

Анализ спектров осуществлялся в программной среде Magic Plot Pro, а также с помощью метода дискриминантного анализа (LDA) в программе IBMSPSS Statistics. Усреднение спектров проводилось в математическом программном пакете Mathematica 8 [13].

Анализ

На рисунке 1 представлены усредненные спектры комбинационного рассеяния 2 групп образцов: молочных зубов после деминерализации в 1,2 Н и 1,8 Н растворах соляной кислоты. Основные различия проявляются в линиях КР 474 см^{-1} (Polysaccharides, amylose), 528 см^{-1} (Phosphatidylserine), 813 см^{-1} (C-C stretching (collagen assignment)), 854 см^{-1} ((C-O-C) skeletal mode of α -anomers (polysaccharides, pectin)), 918 см^{-1} (Proline, hydroxyproline), 1027 см^{-1} ($\nu_3 \text{ PO}_4$), 1051 см^{-1} ($\nu_3 \text{ PO}_4$), 1088 см^{-1} (C-C stretch, PO_2 stretch), 1171 см^{-1} (Tyrosine (collagen type I)), 1241 см^{-1} (Asymmetric phosphate stretching modes), 1271 см^{-1} (Collagen (amide III)), 1299 см^{-1} (CH_2 deformation (lipid)), 1448 см^{-1} (CH_2CH_3 deformation, CH_2 deformation, CH_2 , Collagen), 1556 см^{-1} (Amide II), 1663 см^{-1} (Proteins, including collagen I), 1741 см^{-1} (Ester group) [14–16].

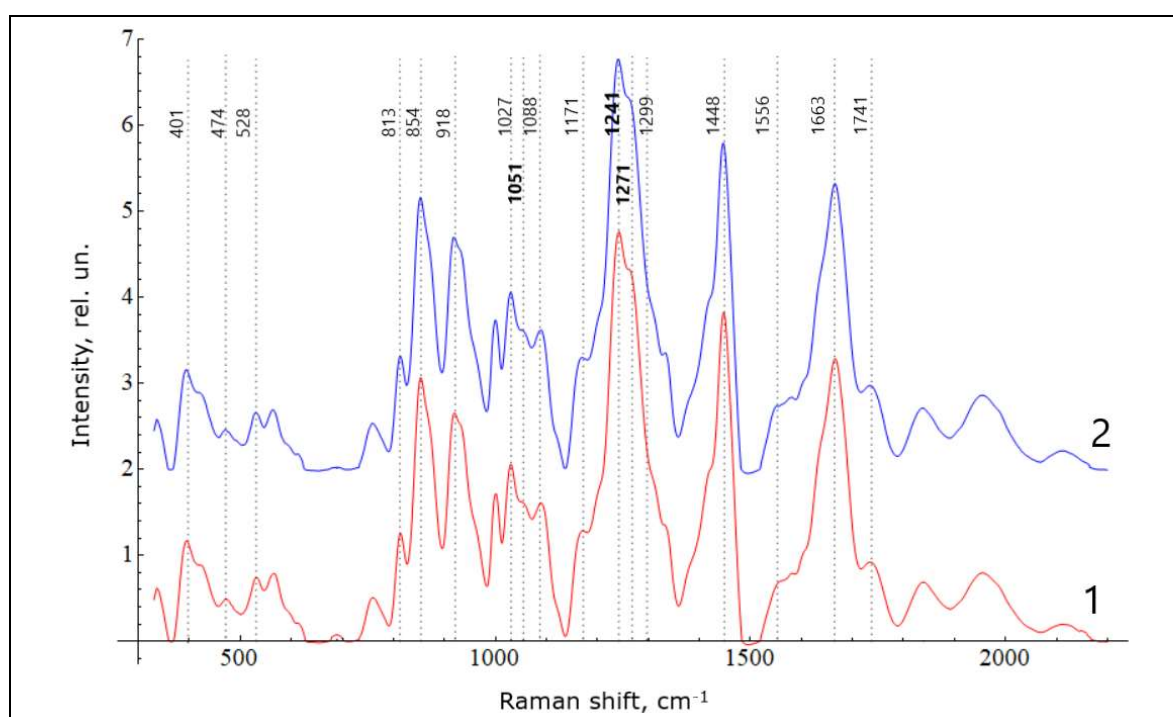
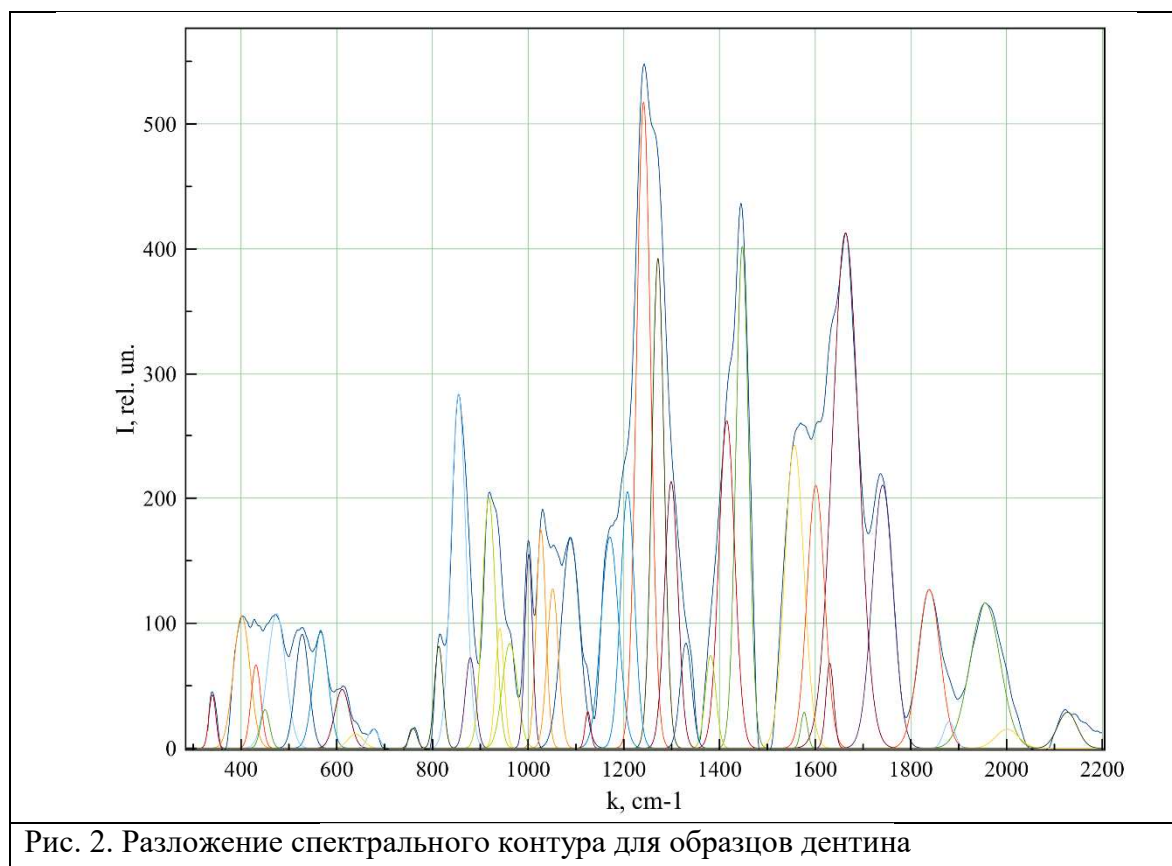


Рис. 1. Усреднённые нормализованные спектры КР образцов ювенильного дентина: 1 – биоматериалы из ювенильных зубов, деминерализованных в 1,2 Н соляной кислоты, 2 – биоматериалы из ювенильных зубов, деминерализованных в 1,8 Н соляной кислоты

Для повышения информативности полученных спектров КР был произведен нелинейный регрессионный анализ спектров, состоящий в их разложении на спектральные линии. На рисунке 2 представлен результат разложения спектрального контура на сумму распределений линий Гаусса.



Среднее значение коэффициента детерминации результирующего спектра от исходного в области $300 \dots 2000 \text{ см}^{-1}$ составило $R^2 = 0,99$, относительная погрешность определения интенсивности спектральных линий а не превышает 6 %, усреднённое стандартное отклонение координаты линии x_0 составляет $0,5 \text{ см}^{-1}$, усреднённое стандартное отклонение ширины линии (HWHM) Гаусса dx составило $1,8 \text{ см}^{-1}$.

Для дальнейшего анализа полученных после разделения спектральных линий исследуемых объектов был выбран метод линейного дискриминантного анализа в программной среде IBM SPSS Statistics.

На рисунке 3 представлены результаты LDA сравнения двух групп образцов. Проанализированы 64 спектра молочных зубов (32 деминерализованных в 1,2 Н растворе соляной кислоты и 32 деминерализованных в 1,8 Н растворе соляной кислоты). Дискриминантная функция LD-1 описывает дисперсию на 100 %. Положительные значения LD-1 характерны для спектров КР, полученных из материалов, деминерализованных в 1,8 Н растворе соляной кислоты.

На рисунке 4 показаны коэффициенты матрицы факторной структуры, имеющие физический смысл корреляции между переменными в модели и дискриминирующей функцией. Чем выше по модулю значение LD-1 для переменной, тем в большей степени она определяет разницу в дискриминационной модели между группами образцов.

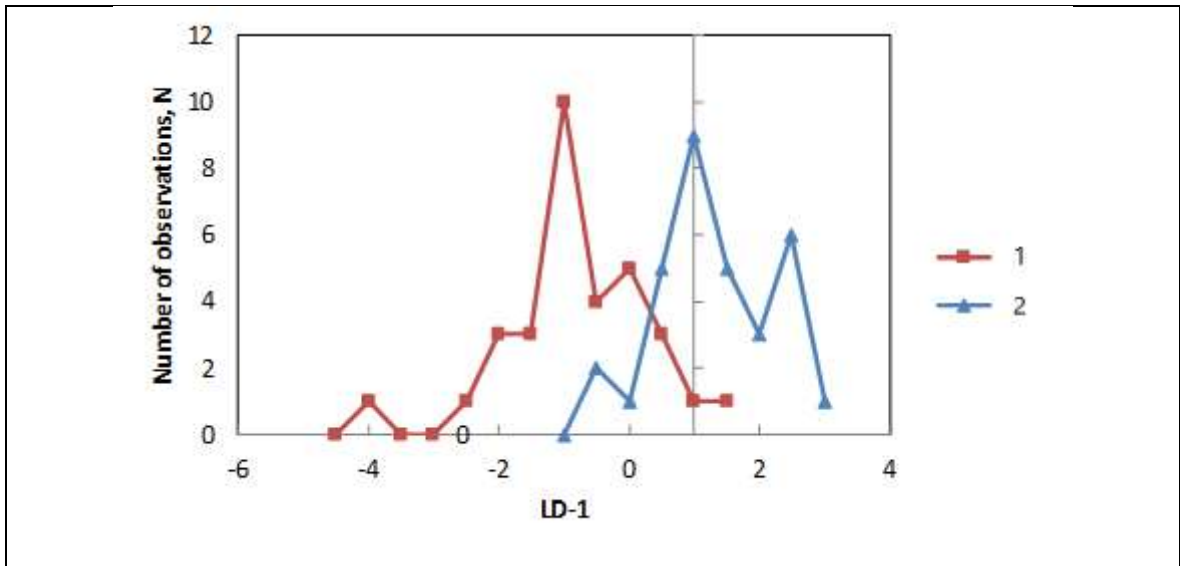


Рис. 3. График значений линейной дискриминантной функции

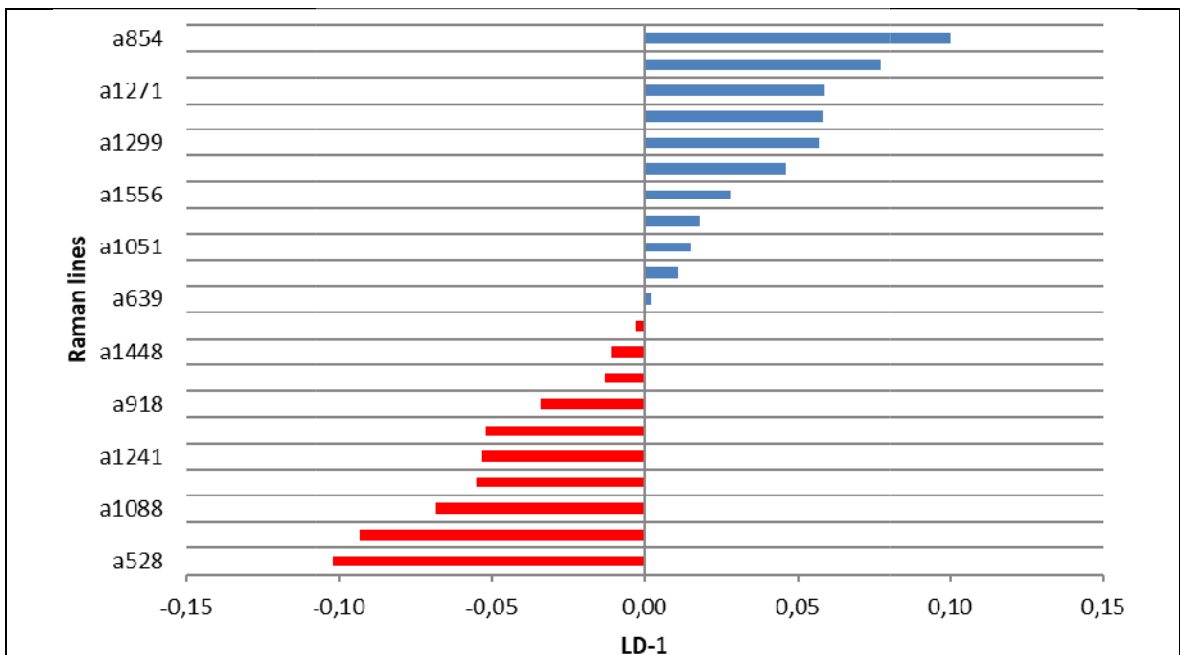


Рис. 4. Значения коэффициентов факторной структуры

Заключение

В результате проведённых исследований были установлены основные спектральные отличия биоматериалов из ювенильного дентина, деминерализованных в соляной кислоте различной степени нормальности. Показано, что деминерализация раствором 1,2 Н соляной кислоты позволяет сохранить большее количество органических компонент по сравнению с деминерализацией раствором 1,8 Н, о чем свидетельствует увеличение интенсивности линий 918 см^{-1} (Proline, hydroxyproline), 1171 см^{-1} (Tyrosine (collagetypeI)), 1271 см^{-1} (Collagen (amideIII)), 1663 см^{-1} (Proteins, includingcollagenI).

Конфликт интересов

Авторы статьи заявляют, что у них нет конфликта интересов по материалам данной статьи с третьими лицами, на момент подачи статьи в редакцию журнала, и им ничего не известно о возможных конфликтах интересов в настоящем со стороны третьих лиц.

Список литературы

1. Tanoue R., Ohta K., Miyazono Y. et al. Three-dimensional ultrastructural analysis of the interface between an implanted demineralised dentin matrix and the surrounding newly formed bone. *SciRep.* 2018. Vol. 8. № 2858. [Электронный ресурс]. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21291-3>
2. Булатов А. А., Калинин А. В., Савельев В. И. Современные способы изготовления, стерилизации и консервации деминерализованных костных трансплантатов (обзор литературы) // *Травматология и ортопедия России.* 2005. № 1(34). С. 55–59.
3. Привалов В. Е., Шеманин В. Г. Экспериментальное зондирование промышленных аэродисперсных потоков // *Научно-технические Ведомости СПбПУ. Физико-Математические науки.* 2014. № 4(206). С. 64–73.
4. Мкртычев О. В., Привалов В. Е., Фотиади А. Э., Шеманин В. Г. Лазерная абляция нанокompозитов // *Научно-технические Ведомости СПбПУ. Физико-Математические науки.* 2015. № 1 (213) С. 128–135.
5. Привалов В. Е., Шеманин В. Г. Лидарное уравнение с учётом конечной ширины линии генерации лазера // *Известия РАН.* 2015. Т. 79. № 2. С. 170–180.
6. Юрьев Е. М., Ушаков А. И., Серова Н. С., Багиров Э. А., Канноева М. В. Дифференциальный подход к выбору костно-пластического материала при дентальной имплантации в условиях дефицита костной ткани // *Российская стоматология.* 2014. № 7(4). С. 30–33.
7. Пикалюк В. С., Кутя С. А., Шадуро Д. В. Модификация методики гистологического исследования костной ткани // *Морфология.* 2010. Т. IV. № 3. С. 72–76.
8. Токмакова А. Ю., Юшков П. В., Ульянова И. Н., Чернова Т. О., Анциферов М. Б. Оценка состояния костной ткани у больных с синдромом диабетической стопы // *Проблемы эндокринологии.* 2002. № 48(4). С. 31–35.
9. Легких А. В., Мандра Ю. В., Киселева Д. В. Метод рамановской спектроскопии как средство оценки морфологии микрорельефа поверхности зуба, а также степени минерализации твёрдых тканей зубов // *Вестник Уральского государственного медицинского университета.* 2015. № 2(3). С. 214–217.
10. Мандра Ю. В., Ивашов А. С., Вотяков С. Л., Киселева Д. В. Возможности применения рамановской микроспектроскопии для исследования структурных особенностей твёрдых тканей зубов // *Проблемы стоматологии.* 2011. № 1. С. 24–27.
11. Минаева С. А., Михайловский А. А., Антонов Е. Н., Гольдштейн Д. В., Попов В. К., Волков А. В., Морфологическое исследование твердых тканей лицевого скелета с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния // *Российская стоматология.* 2015. № 8(1). С. 3–10.
12. Timchenko P. E., Timchenko E. V., Volova L. T. etc. Raman spectroscopy method for the evaluation of bone bioimplants made using the «Lyoplast» technology from cadaveric and in vivo resected bone tissue // *Journal of Physics: Conference Series.* 2018. Vol. 1038. Issue 1.
13. Timchenko E. V.; Timchenko P. E.; Frolov O. O.; Yagofarova E. F.; Chernyy-Tkach K. B.; Zybin M. A.; Dolgushov G. G. Optical Methods for Periodontitis Early Rapid Diagnosis // *Electrical Engineering and Photonics (EEExPolytech), IEEE 2019, № 978-1-7281-4439-9/19.* P. 298–300. [Электронный ресурс]. URL: DOI 10.1109/EEExPolytech.2019.8906802

14. M. Anwar Alebrahim, C. Krafft, W. Sekhaneh, B. Sigusch and J. Popp. ATR-FTIR and Raman spectroscopy of primary and permanent teeth // *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 3. 2014. P. 15–27. [Электронный ресурс]. URL: DOI 10.3233/BSI-130059
15. M. Anwar Alebrahim, C. Krafft and J. Popp. Raman imaging to study structural and chemical features of the dentin enamel junction // *International Conference on Advanced Materials (ICAM 2015)*, IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. 2015. № 92. [Электронный ресурс]. URL: doi:10.1088/1757-899X/92/1/012014
16. Gisele Fernandes Dias, Ana Cláudia Rodrigues Chibinski, Fábio André dos Santos, Viviane Hass, Fabiana Bucholdz Teixeira Alves, Denise Stadler Wambier. The hardness and chemical changes in demineralized primary dentin treated by fluoride and glass ionomer cement // *Rev. odontol. UNESP*. 2016. Vol. 45. № 1. [Электронный ресурс]. URL: <https://doi.org/10.1590/1807-2577.0881>.

Comparative spectral analysis of different degrees of demineralization of biomaterials from juvenile teeth

¹ Timchenko E. V., ¹ Timchenko P. E., ² Volova L. T., ¹ Frolov O. O., ² Vlasov M. Yu.,
^{1*} Shipko S. S.

¹ 443086, Russia, Samara, Samara National Research University named after
 Academician S. P. Korolev

² 443099, Russia, Samara, Samara State Medical University, BioTech Biotechnology Centre

Experiments on the optical evaluation by Raman spectroscopy of biomaterials from juvenile dentin demineralized with hydrochloric acid with varying degrees of normality were carried out. Each sample was cut into 2 equal parts and further divided into two main groups, according to the stages of their processing: Group 1 – biomaterials from juvenile dentin demineralized in hydrochloric acid of 1.2 N degree of normality; group 2 – biomaterials from juvenile dentin demineralized in hydrochloric acid of 1.8 N degree of normality. Demineralization was carried out in a hydrochloric acid solution using the «LIOPLAST» technology [TU-9398-001-01963143-2004]. It is shown that during the demineralization of juvenile teeth with hydrochloric acid, the degree of normality of the acid solution causes minor changes. Demineralization with 1.2 N hydrochloric acid solution preserves a large number of organic components compared to demineralization with 1.8 N hydrochloric acid solution.

Key words: juvenile dentin, Raman spectroscopy, spectral analysis, demineralized biomaterials, changes in dentin, demineralized bone graft, demineralized matrix.