

## ПОВЕРХНЯ ЕМАЛІ ЗУБА ПІСЛЯ ВПЛИВУ КИСЛОТИ З РІЗНИМ ЧАСОМ ЕКСПОЗИЦІЇ: АТОМНО-СИЛОВА МІКРОСКОПІЯ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)

[lida\\_minko@mail.ru](mailto:lida_minko@mail.ru)

Дане дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри терапевтичної стоматології ФГДО Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Екологія та пародонт. Взаємозв'язок захворювань пародонта та загальної соматичної патології. Дисфункції скронево-нижньощелепового суглобу», Недержавної реєстрації 0114U000112; ІН. 30.000.004.15.

**Вступ.** Атомно-силовий мікроскоп (АСМ) – це високотехнологічний науковий прилад, що дозволяє отримувати збільшене зображення поверхні матеріалів (як фізико-хімічних так і медико-біологічних) із роздільною здатністю порядку кількох нанометрів та маніпулювати наноскопічними об'єктами, наприклад, окремими молекулами. Робота АСМ базується на взаємодії зонда (зондового датчика) з поверхнею досліджуваного зразка. Під взаємодією розуміється відштовхування чи притягування зонда до поверхні за рахунок близькодійних сил Ван-дер-Вальса. Відхилення зонда реєструється відкаліброваною оптичною системою, яка складається з лазера та просторово розділеного оптичного сенсора. АСМ застосовується для одержання профілю поверхні зразка і для зміни його рельєфу, а також для маніпулювання мікро- і наноскопічними об'єктами на поверхні. АСМ дозволяє отримати зображення дійсно тривимірного рельєфу поверхні, а непровідна поверхня не потребує додаткового нанесення тонкого металічного шару, яке часто призводить до змін на поверхні. Крім цього, для роботи АСМ не потрібен вакуум, дослідження в основному виконуються у повітряній атмосфері. Таким чином атомно-силова мікроскопія (АС-мікроскопія) є одним із потужних сучасних методів дослідження морфології поверхні матеріалів та локальних властивостей із високою просторовою роздільною здатністю. Сьогодні практично жодне дослідження в області матеріалознавства, фізики поверхні, тонкоплівкових та наноструктурованих технологій не виконується без методів АСМ.

У цьому зв'язку АС-мікроскопія може становити як науковий так і практичний інтерес для стоматології [1, 4, 5]. Зокрема це стосується дослідження такої важливої характеристики зубної емалі як шорсткість її поверхні. У порожнині рота зубна емаль постійно підлягає різним впливам фізичної і хімічної природи [2, 3, 6], що закономірно впливає на стан її поверхні. До чинників, які призводять до зміни морфології поверхні зубної емалі, належать ендогенні кислоти. Поява кислот у порожнині рота може бути викликана різними

причинами: це – пари промислових кислот; надмірне вживання кислих соків, напоїв, фруктів, рефлюкс шлункового вмісту тощо. Зміни шорсткості поверхні емалі при цьому у мікро- і нанорозмірних масштабах детально ще не вивчені.

**Мета дослідження.** Апробація застосування методу АС-мікроскопії для вивчення топографії поверхні нормальної зубної емалі та емалі, що підлягла кислотній дії з різним часом експозиції кислоти.

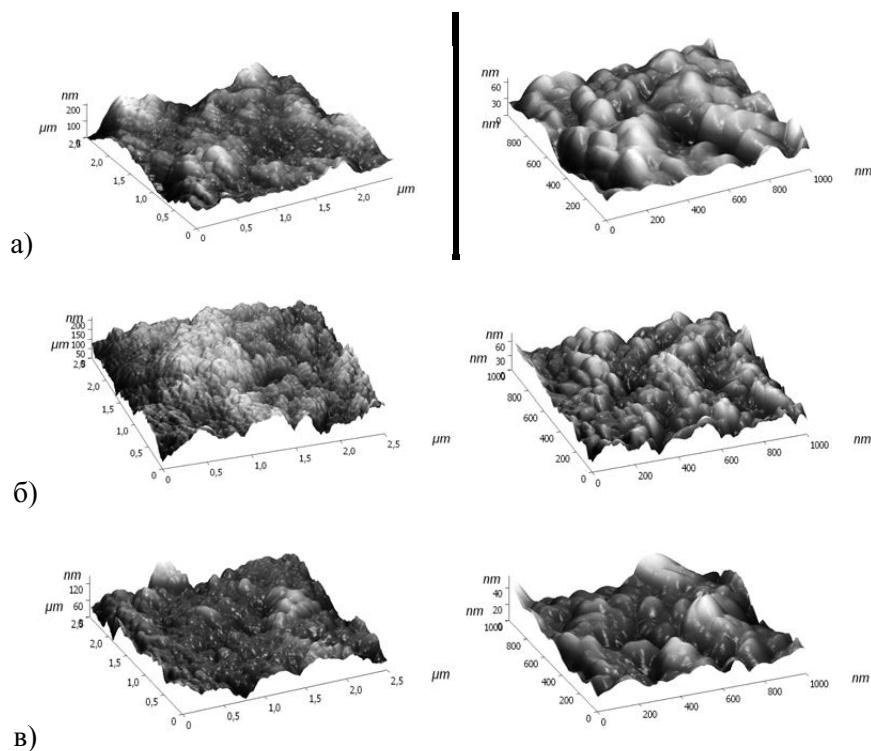
**Об'єкт і методи дослідження.** Для проведення атомно-силової мікроскопії було виготовлено зразки зрілої зубної емалі дев'яти третіх молярів без будь-яких захворювань твердих тканин. Зуби для виготовлення зразків емалі було взято після їх видалення у пацієнтів чоловічої статі віком 25 років.

Щойно видалені зуби обробляли 13% розчином перекису водню, ретельно промивали дистильованою водою, висушували. Щічну поверхню емалі розрізали на зразки за допомогою алмазного диска.

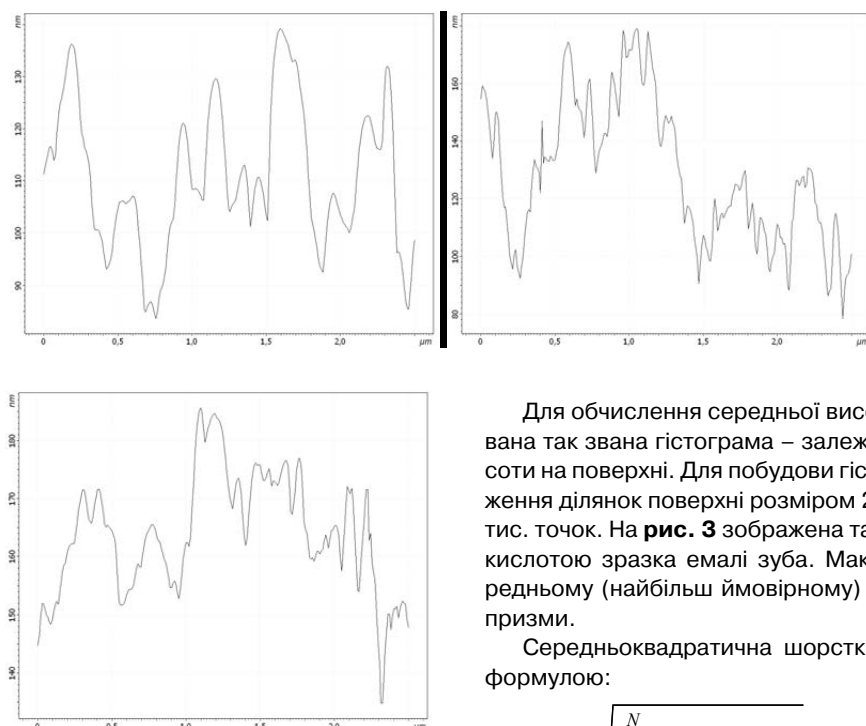
З кожного зуба готували три зразки емалі: 1 зразок – здорова емаль; 2 зразок – поверхня емалі оброблена 0,1% розчином хлористоводневої кислоти протягом 15с; 3 зразок – поверхня емалі оброблена 0,1% розчином хлористоводневої кислоти протягом 30 с.

Топологічні зображення поверхні зразків емалі зуба отримували за допомогою атомно-силового мікроскопа Solver P47-PRO (NT-MDT) у напівконтактному режимі роботи з частотою розгортки 1Гц. У роботі використовували зондові датчики NSG10-A з радіусом заокруглення вістря 10 нм. У результаті отримано низку зображень поверхні емалі різного масштабу та роздільною здатністю 256×256 точок. Опрацювання експериментальних даних і виконання обчислень параметрів морфології поверхні досліджуваних зразків емалі зубів здійснювались з допомогою програмного пакету Image Analysis (NT-MDT). Топологічні дослідження зразків емалі виконані у ННЦ «Фрактал» Львівського національного університету імені Івана Франка кандидатом фізико-математичних наук Куликом Б. Я.

**Результати досліджень та їх обговорення.** На рис. 1 представлено зображення зразків емалі здорової і емалі протравленої 0,1% розчином хлористоводневої кислоти (з різним часом експозиції кислоти). Зображення зразків емалі подано у двох масштабах для кожного зразка: 1×1 мкм та 2,5×2,5 мкм. Структура поверхні здорової емалі (а) представляє собою сукупність щільноупакованих емалевих призм. При цьому головки призм виступають над поверхнею емалі; лежать на одному з нею рівні і видні тільки їхні контури;



**Рис. 1.** Тривимірні зображення поверхні емалі зуба ділянок розмірами 2,5×2,5 мкм і 1×1 мкм отримані за допомогою АСМ для зразків: а) зразок 1; б) зразок 2; в) зразок 3.



**Рис. 2.** Профілі поверхні емалі зразків 1-3 на відрізьку 2,5 мкм.

рідше – представляють собою заглиблення. Рельєф поверхні емалі особливо добре видно на зображеннях ділянок розміром 1×1 мкм (вища кратність збільшення).

Протравлені кислотою зразки емалі (рис. 1 – б, в) візуально незначно відрізняються від поверхні здорової емалі.

Для визначення геометричних розмірів емалевих призм на досліджуваних поверхнях емалі скористалися профілями, які відтворюють переріз тривимірного зображення з площиною. Такі профілі представлені на рис. 2 на відрізьку 2,5 мкм для кожного з досліджуваних зразків. Призми емалі в наших АСМ-зображеннях не є однакового розміру, їхня висота складає десятки нанометрів, в той час як діаметр (ширина) може бути більшим 100 нм.

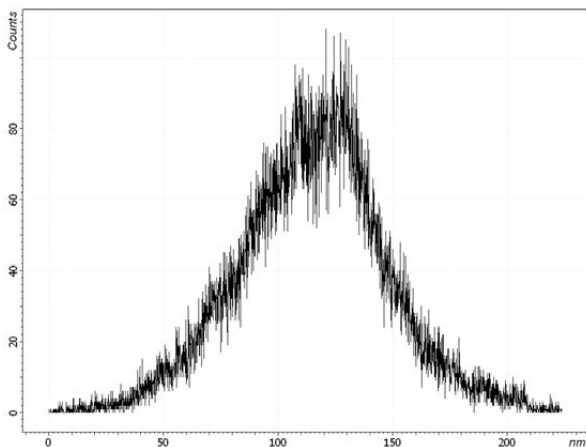
Аналіз профілю поверхні АС-мікроскопією дозволяє оцінити дефекти у структурі досліджуваної поверхні, зокрема встановити розміри «ущелин», які утворюються при дії на поверхню агресивних чинників. Тому максимальні значення різниці між максимумом і мінімумом на гістограмі можуть свідчити, про результат такої дії. У нашому дослідженні власне максимальні перепади висоти, обчислені з профілів, відповідали зразкам емалі, які підлягали обробці кислотою, а мінімальні – зразку здорової емалі.

Для обчислення середньої висоти емалевих призм була побудована так звана гістограма – залежність кількості точок від їхньої висоти на поверхні. Для побудови гістограми було використано зображення ділянок поверхні розміром 2,5×2,5 мкм, які розбивались на 65 тис. точок. На рис. 3 зображена така гістограма для необробленого кислотою зразка емалі зуба. Максимум гістограми відповідає середньому (найбільш ймовірному) значенню вертикального розміру призми.

Середньоквадратична шорсткість поверхні  $R_q$ , визначалась за формулою:

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Z_i - Z_{ave})^2}{N}}, \quad (1)$$

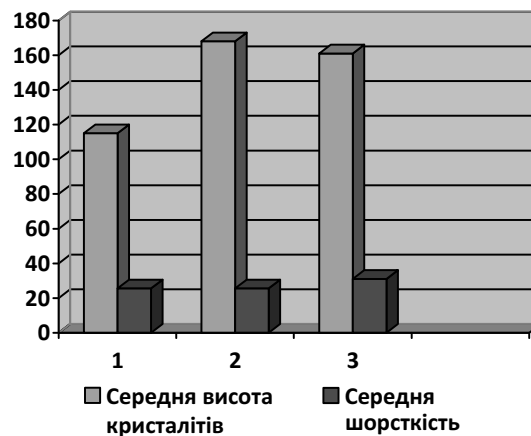
де  $Z_i$  – висота точки,  $Z_{ave}$  – середня висота по поверхні,  $N$  – кількість точок.



**Рис. 3.** Гістограма-розподіл неоднорідностей за їхньою висотою на поверхні необробленого кислотою зразка зубної емалі.

Отримані значення середньої висоти призми і середньо-квадратичної шорсткості поверхні зразків емалі представлені у вигляді діаграми (рис. 4).

Середньо-квадратична шорсткість як показник неоднорідності, «грубості» чи дефектності поверхні емалі у зразках, які піддавались впливу розчину хлористоводневої кислоти є вищою ніж в необробленому кислотою зразку. Аналогічна поведінка спостерігається при оцінці середньої висоти призми емалі. Зрозуміло, що кислота не призводить до росту кристалітів, збільшення висоти зумовлене вимиванням кислотою окремих місць на поверхні, що призводить до збільшення відносних перепадів висоти на поверхні.



**Рис. 4.** Результати обчислення поверхневих параметрів ділянки емалі розміром 2,5\*2,5 мкм у трьох зразках (нм).

**Висновки.**

1. АС-мікроскопія відкриває нові можливості дослідження стану поверхні зубної емалі, вивчення її структури, морфології і обчислення параметрів поверхні.

2. АС-мікроскопія може бути використана в науковій роботі зокрема для експериментального вивчення процесів демінералізації зубів некаріозного походження.

**Перспективи подальших досліджень.** Планується подальше вивчення змін топографії поверхні емалі при впливі екзогенних кислот з метою удосконалення діагностики, розробки та дослідження ефективності методів лікування і профілактики некаріозних уражень зубів.

**Література**

1. Atomic Force Microscopy Study of Tooth Surfaces [Електронний ресурс] / [M. Farina, A. Schemmel, G. Weissmuller et al.] // Journal of Structural Biology. – 1999. – Режим доступу до ресурсу: <http://www.idealibrary.com>.
2. Barbour M. The laboratory assessment of enamel erosion: a review [Електронний ресурс] / M. Barbour, J. Rees // Journal of Dentistry. – 2004. – Режим доступу до ресурсу: <http://www.intl.elsevierhealth.com/journals/jden>.
3. Erosion behavior of human tooth enamel in citric acid solution [Електронний ресурс] / [J. Zheng, F. Xiao, L. M. Qian, Z. R. Zhou] // Tribology International. – 2009. – Режим доступу: <http://www.elsevier.com/locate/triboint>.
4. Finke M. The Early Stages of Native Enamel Dissolution Studied with Atomic Force Microscopy [Електронний ресурс] / M. Finke, K. D. Jandt, D. M. Parker // Journal of Colloid and Interface Science. – 2000. – Режим доступу до ресурсу: <http://www.idealibrary.com>.
5. Property variations in the prism and the organic sheath within enamel by nanoindentation [Електронний ресурс] / J. Ge, F. Z. Cui, X. M. Wang [et al.] // Biomaterials. – 2005. – Режим доступу: <http://www.elsevier.com/locate/biomaterials>.
6. Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30 % hydrogen peroxide / [L. Sun, S. Liang, Y. Sa et al.] // Journal of Dentistry. – 2011. – № 39. – P. 686–692.

УДК 616.314.13:615.242.3]-076

**ПОВЕРХНЯ ЕМАЛІ ЗУБА ПІСЛЯ ВПЛИВУ КИСЛОТИ З РІЗНИМ ЧАСОМ ЕКСПОЗИЦІЇ: АТОМНО-СИЛОВА МІКРОСКОПІЯ**

**Мінько Л. Ю.**

**Резюме.** У статті представлені результати дослідження поверхні емалі зуба після впливу кислоти з різним часом експозиції з застосуванням атомно-силової мікроскопії. Встановлено, що протравлені кислотою зразки емалі візуально незначно відрізняються від поверхні здорової емалі. Результати досліджень профілю вказують, що максимальні перепади висоти, обчислені з профілів, відповідали зразкам емалі, які підлягали обробці кислотою, а мінімальні – зразку здорової емалі. Середньо-квадратична шорсткість поверхні емалі у зразках, які піддавались впливу розчину хлористоводневої кислоти є вищою ніж в необробленому кислотою зразку. Відповідні показники спостерігалися при оцінці середньої висоти призми емалі.

**Ключові слова:** морфологія поверхні емалі, кислотне розчинення емалі, атомно-силова мікроскопія.

УДК 616.314.13:615.242.3]-076

## ПОВЕРХНОСТЬ ЭМАЛИ ЗУБА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ КИСЛОТ С РАЗЛИЧНЫМ ВРЕМЕНЕМ ЭКСПОЗИЦИИ: АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Минько Л. Ю.

**Резюме.** В статье представлены результаты исследования поверхности эмали зуба после воздействия кислоты с разным временем экспозиции с применением атомно-силовой микроскопии. Установлено, что протравленные кислотой образцы эмали визуально незначительно отличаются от поверхности здоровой эмали. Результаты исследований профиля указывают, что максимальные перепады высоты, вычисленные из профилей, отвечали образцам эмали, подлежащих обработке кислотой, а минимальные – образцу здоровой эмали. Среднеквадратическая шероховатость поверхности эмали в образцах, которые подвергались воздействию раствора соляной кислоты выше, чем в необработанном кислотой образце. Соответствующие показатели наблюдались при оценке средней высоты призм эмали.

**Ключевые слова:** морфология поверхности эмали, кислотное растворение эмали, атомно-силовая микроскопия.

UDC 616.314.13:615.242.3]-076

## The Surface of Tooth Enamel and Its Reaction to Acid with Different Time Exposure: Atomic Force Microscopy

Minko L. Yu.

**Abstract.** The article presents study results of tooth enamel surface after immersion in acid with different time exposure. Introduction. Atomic force microscopy (AFM) is one of the most powerful modern methods to research the morphology of material surfaces and their local properties with high spatial resolution. In this regard, AFM may be of scientific and practical interest for dentists. In particular this refers to the study of such important characteristics as enamel surface roughness. The tooth enamel in the mouth cavity is constantly being subject to various influences of physical and chemical nature, which naturally affects the state of the surface. Among the factors that lead to changes in the morphology of dental enamel surface, are endogenous acids. Changes in surface roughness of enamel while in micro- and nanosized scale are not yet fully examined. The aim of study is to test the application of the method of AFM in order to investigate the topography of normal tooth enamel surface, and enamel that was subject to acid action with different exposure time. Object and methods. To carry out the atomic force microscopy procedure samples were taken from mature enamel of nine third molars with no diseases of hard tissues. Teeth for making enamel samples were taken after their removal in male patients aged 25.

Once removed teeth were treated with 13% hydrogen peroxide solution, carefully washed with distilled water and dried. Buccal enamel surface was cut into samples with diamond disc. 3 enamel samples were prepared from each tooth: 1<sup>st</sup> sample – healthy enamel; 2<sup>nd</sup> sample – enamel surface treated with 0.1% solution of hydrochloric acid for 15 seconds; 3<sup>rd</sup> sample – enamel surface treated with 0.1% solution of hydrochloric acid for 30 seconds.

Topological images of tooth enamel surface samples were obtained using an atomic force microscope SolverP47-PRO (NT-MDT) in semi contact mode with a scanning frequency of 1 Hz. During the experiment probe sensors NSG10-A with a radius of the tip curvature of 10 nm were used. As a result, a series of images of the enamel surface of various scale and resolution of 256'256 points were generated. Processing of experimental data and performing calculations of morphology parameters of studied samples of tooth enamel surface were carried out using the software package Image Analysis (NT-MDT).

Results of study and discussion. Images of samples of healthy enamel and enamel etched with 0.1% solution of hydrochloric acid (with different exposure times) are presented in two scales for each sample: 1 × 1 μm and 2,5 × 2,5 μm. The surface structure of healthy enamel is a collection of tightly packed enamel prisms. The prism heads protrude above the enamel surface, or are on the same level with it and only their contours can be seen; seldom they look like dents. The relief of enamel surface is especially well seen in the areas of images sized 1 × 1 μm (higher magnification). Acid etched enamel surface samples visually only slightly differ from the samples with healthy enamel surface. In order to determine the geometrical dimensions of enamel prisms on the studied enamel surfaces the profiles that reflect the cross-section of the three-dimensional image on the segment of 2.5 μm for each of the samples were used. The research results indicate that the maximum height differences calculated from the profiles, correspond to the enamel samples which were subject to acid treatment, and minimal – to samples of healthy enamel. To calculate the average height of enamel prisms a histogram was built, for the construction of which the images of surface areas sized 2,5'2,5 μm, breaking into 65 thousand points, were used. Maximum of the histogram corresponds to the average (most likely) value of the vertical size of the prism. Medium-square roughness as an indicator of heterogeneity, «rudeness» or defectiveness in the enamel surface samples that were exposed to hydrochloric acid solution is higher than in untreated acid samples. A similar behavior is observed when evaluating the average height of enamel prisms. It is clear that the acid does not lead to the growth of crystallites, the increase in height is caused by acid leaching of some areas on the surface, which leads to an increase in the relative height difference.

**Conclusions.** Atomic force microscopy (AFM) opens up new possibilities for investigating the state of the surface enamel, study its structure, morphology and calculates surface parameters. Atomic force microscopy (AFM) can be used in scientific research, especially in experimental studies concerning tooth demineralization process of non-carious origin.

**Key words:** enamel surface morphology, acid dissolution of enamel, atomic force microscopy (AFM).

Рецензент – проф. Скрипніков П. М.

Стаття надійшла 31. 03. 2015 р.