

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 548.5:537.533.35:616.31

Н.О.Бессуднова<sup>2</sup>, И.М.Макеева<sup>1</sup>, С.Б.Вениг<sup>2</sup>, В.С.Аткин<sup>2</sup>**ОБЪЕМНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КРИСТАЛЛОПОДОБНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ, ОБНАРУЖЕННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ ДЕНТИНА, МЕТОДАМИ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова (199911, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2); <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО НИУ Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

*Обнаружены кристаллические структуры на поверхности дентина, обработанного 38% гелем ортофосфорной кислоты и выдержанного в 95% растворе этанола в течение 30 дней при комнатной температуре. Проведена объемная визуализация указанных поверхностных образований с использованием растрового электронного микроскопа и программного обеспечения Alicona 3D MeX ("Alicona GmbH"). Рассчитаны метрические характеристики кристаллов. Выявлено, что потеря мелких деталей рельефа в построении приводит к ошибке в определении объема кристалла. Показано, что форма построенных моделей кристаллических образований наилучшим образом аппроксимируется объемными сегментами эллипсоида.*

**Ключевые слова:** дентин, формирование кристаллов, объемная визуализация, растровая электронная микроскопия

*The 3D visualization of Crystal-like formations observed on dentine surface using scanning electron microscopy Bessudnova N.O., Makeeva I.M., Venig S.B., Atkin V.S.*

*Crystal formations on the surface of dentine etched using 38% orthophosphoric acid were observed after the dentin had been exposed to 95% ethanol in solution for 30 days at room temperature. The 3D visualization of surface formations was carried out using scanning electron microscopy and Alicona 3D MeX software (Alicona GmbH). Metric characteristics of the mentioned above structures were determined and the nature of possible errors on the steps of model design was studied. It was shown that the shape of the crystal models were likely to be approximated by ellipsoid segments.*

**Key words:** dentine, crystal formation, 3D visualization, scanning electron microscopy

**Введение**

Растровая электронная микроскопия (РЭМ) широко используется для визуализации объектов биологического происхождения на микро- и наномасштабах [2, 5–7]. В настоящем исследовании в качестве объекта изучения был выбран дентин человеческих зубов. Проводя подготовку образцов дентина к исследованию методами РЭМ, часть подготовленных, но не использованных в эксперименте образцов была оставлена в 95% растворе этанола при комнатной температуре. Через 1 мес при изучении морфологии этих образцов на их поверхности были обнаружены кристаллоподобные образования.

Цель данного исследования – визуализация обнаруженных на поверхности дентина кристаллических образований и определение их метрических характеристик.

**Материал и методы**

*Подготовка образцов дентина.* Для изучения морфологии поверхности дентина отобраны образцы моляров. Проведены точные продольные плоскопараллельные распилы образцов зубов толщиной 1 мм. Исследуемые поверхности полировали с использованием абразивных дисков Sof-Lex™ ("3MESPE") различной степени зернистости, вплоть до 1 мкм, и далее подвергали травлению 38% гелем ортофосфорной кислоты в течение 60 с с последующим промыванием дистиллированной водой и обработкой в ультразвуковой ванне Сапфир 1,3 ( $P_{\max} = 130$  Вт; время экспозиции 5 мин) для удаления смазанного слоя.

Бессуднова Надежда Олеговна – канд. физ.-мат. наук, тел. 8(909)337-06-60, e-mail: nadezda.bessudnova@gmail.com

Дегидратация осуществлялась проведением образцов через растворы этилового спирта повышающейся концентрации с общим временем экспозиции 12 ч [4].

Подготовленные образцы 30 сут выдерживали в растворе 95% этилового спирта, за этот период проходило формирование и рост кристаллов на поверхности дентина.

Дегазацию исследуемых образцов осуществляли в вакууме, с целью уменьшения накопления электростатического заряда на поверхности дентина проводили напыление золотом в атмосфере аргона.

*Техника эксперимента.* Исследования выполняли с использованием аналитического комплекса на базе растрового электронного микроскопа высокого разрешения SEM Mira\\LMU фирмы "TESCAN" и программного обеспечения Alicona 3D MeX ("Alicona GmbH") [1].

Исследования подготовленных образцов зубов методами РЭМ заключались в получении изображений изменения морфологии поверхности дентина, связанного с образованием на ней кристаллитов. Изучение морфологии проводили в режиме детектирования вторичных электронов, которые наиболее чувствительны к рельефу поверхности [3].

Для построения объемных образов из двумерных изображений морфологии поверхности дентина с обнаруженными на ней кристаллами использовали пакет прикладных программ Alicona 3D MeX.

**Результаты и обсуждение**

Морфология кристаллов на поверхности дентина. В ходе исследования морфологии дентина методами РЭМ на его поверхности, обработанной 38% гелем ортофосфорной кислоты и выдержанной в течение 30 сут в растворе этанола, обнаружены

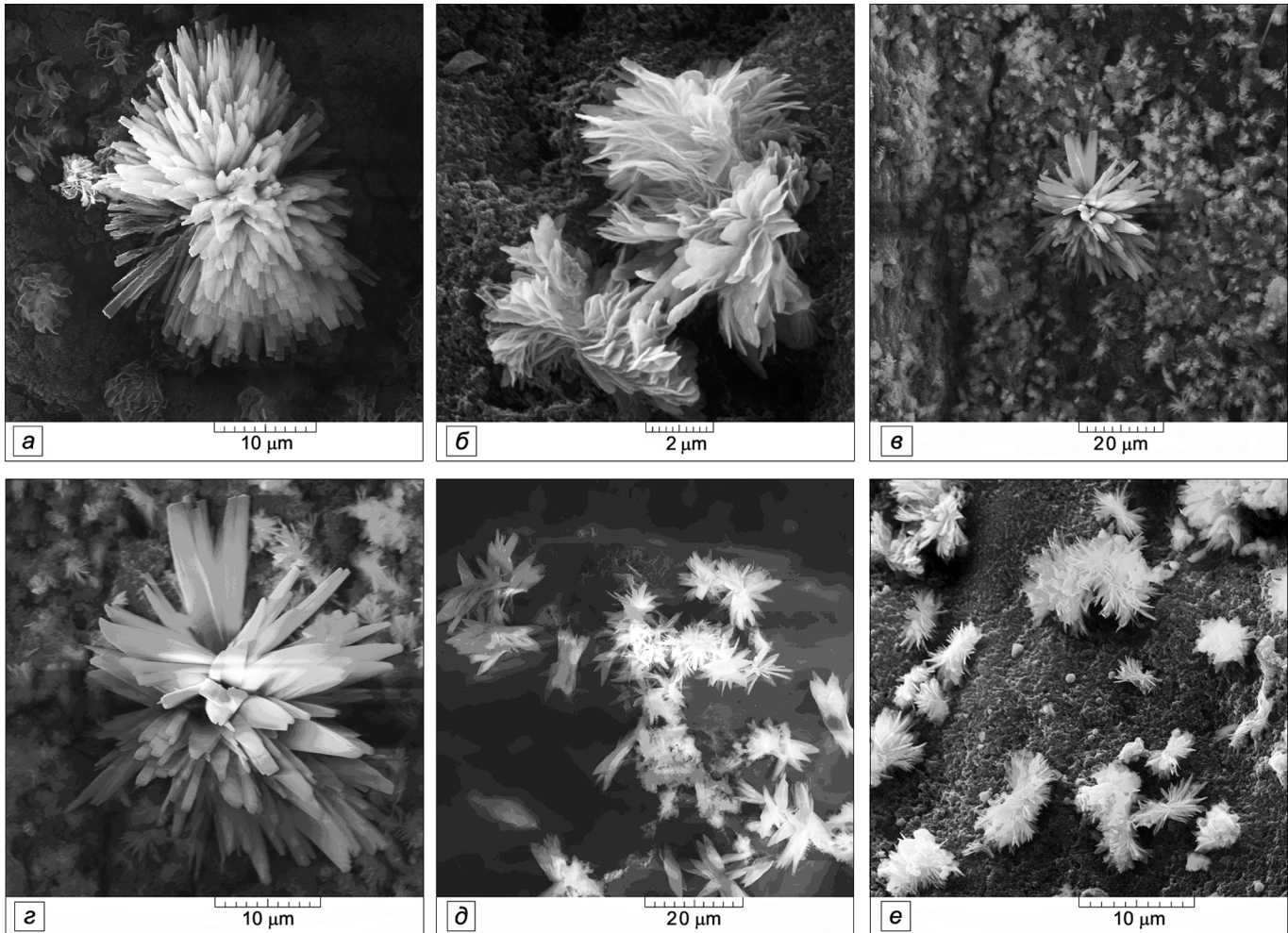


Рис. 1. РЭМ-изображения морфологии одиночных кристаллов (а, в, з) и группы кристаллов (б, д, е) на поверхности дентина, полученные в режиме детектирования вторичных электронов. Масштабы указаны на электронных изображениях

самообразующиеся структуры (рис. 1). "Астроподобные" образования располагались в виде одиночных кристаллов и скоплений, характеризовались локальным направленным ростом.

Следует отметить, что на поверхности дентина, из процесса подготовки которого исключена длительная экспозиция в растворе этанола, кристаллические образования не обнаружены (рис.2).

*Объемная визуализация кристаллических образований.* Проведено построение трехмерных моделей кристаллических образований, обнаруженных на поверхности дентина.

Для построения 3D-модели из двумерных изображений морфологии образцов дентина использовали пакет прикладных программ Alicona 3D MeX. Программа генерирует трехмерное изображение путем восстановления объема из нескольких плоских проекций, полученных при различных углах падения электронного луча на исследуемый образец. При этом проекции фиксируются таким образом, чтобы область электронного облучения оставалась постоянной. В процессе исполнения алгоритма автоматически выбираются гомологичные точки, расстояния между которыми при совмещении проекций однозначно определяют высоту объекта.

*Способы построения объемной модели.* Существует 2 способа изменения углов наблюдения образца: по изменению направления падения электронного луча на поверхность и изменению наклона держателя предметных столиков, т. е. наклона самих образцов относительно луча. При этом наклон может проводиться в автоматическом и ручном режиме.

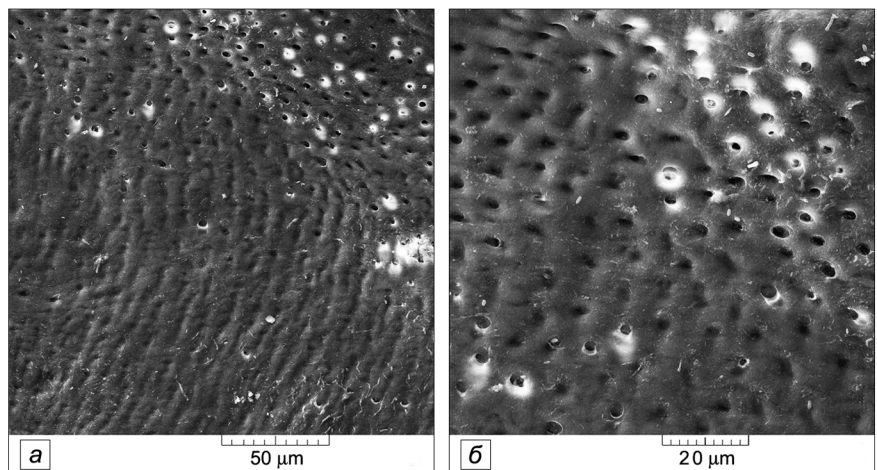


Рис. 2. РЭМ-изображения морфологии поверхности образцов дентина, не подвергшихся экспозиции в растворе этанола в течение 30 сут.

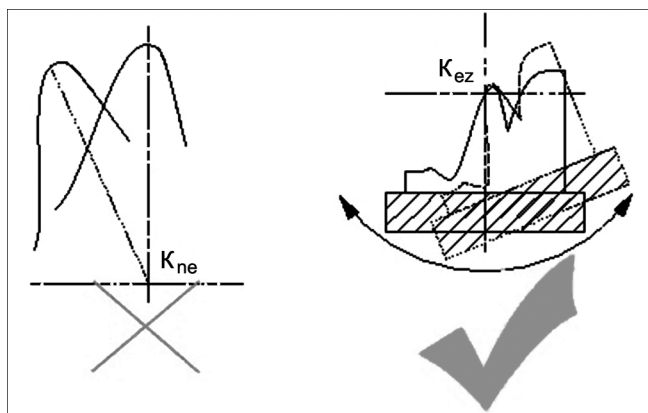


Рис. 3. Наклон, допускаемый РЭМ, Kne ось наклона (слева) и эвцентрический наклон, Kez – ось эвцентрического наклона (справа).

Общим недостатком для обоих режимов является расфокусировка при изменении угла наклона при работе на больших увеличениях, так как программное обеспечение микроскопа не позволяет производить эвцентрический наклон столика, при котором ось наклона столика проходит через точку падения электронного луча на образец (рис.3). При отсутствии функции эвцентрического наклона, последняя имитируется путем последовательного изменения угла наклона и перемещения столика в пространстве. При этом важно сохранять размеры области электронного облучения постоянными для корректного преобразования 2-мерных изображений в 3-мерные.

В настоящем исследовании для получения объемных изображений проводили изменение угла наклона столиков в ручном режиме, что позволило исследовать образцы с более сложной геометрией.

**Результаты объемной визуализации.** В качестве примера объемной визуализации на рис. 5 приведены результаты построения 3D-модели кристалла и дентинной матрицы, представленных на рис. 4. Полученные 3D-изображения содержат фрагменты подложки и обнаруженный на ней кристалл. Они позволяют визуализировать общую форму кристалла и рассчитать его метрические характеристики в частности характерные размеры всего образования и объем.

Однако построенное 3D-изображение отличается от реального кристалла тем, что мелкие детали рельефа поверхности на нем не разрешены (см. рис. 5, а). В частности, не отображены ярко выраженные пики и лепестки, хорошо визуализированные в двумерном изображении. Невоспро-

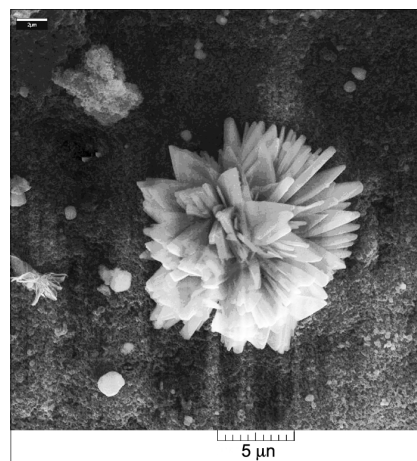


Рис. 4. РЭМ-изображение морфологии одиночного кристалла на подложке из дентина.

изведение деталей связано с тем, что электронный луч не проникает между экранирующими его выступающими фрагментами кристалла даже при больших углах наклона образца относительно нормали к исходной поверхности. Программа естественно не учитывает те нюансы, которых нет в исходной информации.

Если часть информации потеряна, следует сопоставлять модель объекта с его двумерными изображениями для их взаимного дополнения или использовать встроенную процедуру интерполяции, восстанавливающую недостающие фрагменты 3D-образа. На рис. 5, б представлена 3D-модель кристалла после процедуры интерполяции.

На рис. 6 на 2-й полосе обложки представлена 3D-модель этого же кристалла на дентинной подложке при различных углах наблюдения и соответствующее цветовое распределение по высоте.

Определены метрические характеристики модели. Ее характерные размеры не изменялись в результате интерполяции и составляли 16,5×16,2×11,0 мкм. Объем модели кристалла с неразрешенными мелкими деталями рельефа (см. рис. 5, а) составлял приблизительно 297 мкм<sup>3</sup>, а после процедуры интерполяции (см. рис. 5, б) – 459 мкм<sup>3</sup>. Очевидно, потеря информации о форме исследуемого объекта до проведения процедуры интерполяции приводит к ошибке в определении его объема. Для оценки достоверности результатов проведено сравнение программно рассчитанных объемов с таковыми прямоугольного параллелепипеда и сегмента эллипсоида, описанных около построенной модели (рис. 7, а, б). Результаты расчетов представлены в таблице.

Объемы построенной модели до и после процедуры интерполяции составляют соответственно 0,1 и 0,16 объема прямоугольного параллелепипеда, описанного вокруг модели. Для эллипсоида эти отношения определяются как 0,19 и 0,3 соответственно. Следует отметить, что форма кристалла геометрически ближе к эллипсоидной.

**Выводы**

В результате проведенной серии экспериментов:

1. Обнаружены кристаллоподобные структуры на поверхности дентина, протравленного 38% гелем ортофосфорной кислоты и выдержанного в 95 % растворе этанола в течение 30 дней при комнатной температуре;

2. Впервые визуализированы 3D-структуры кристаллов фосфата кальция на поверхности дентина с применением растровой электронной микроскопии и программного комплекса Alicona 3D MeX;

3. Особенностью построения объемных изображений объектов со сложной геометрией является частичная потеря

**Программно рассчитанные объемы модели и описанных около нее фигур**

Объект	Формула для вычисления объема	Значение объема, мкм <sup>3</sup>
Модель до процедуры интерполяции	-	297
Модель после процедуры интерполяции	-	459
Прямоугольный параллелепипед	$V = abc$ , где a, b, c – стороны прямоугольного параллелепипеда	2936,75
Сегмент эллипсоида (половина)	$V = \frac{4}{6} \pi abc$ , где a, b, c – полуоси эллипсоида	1537,68

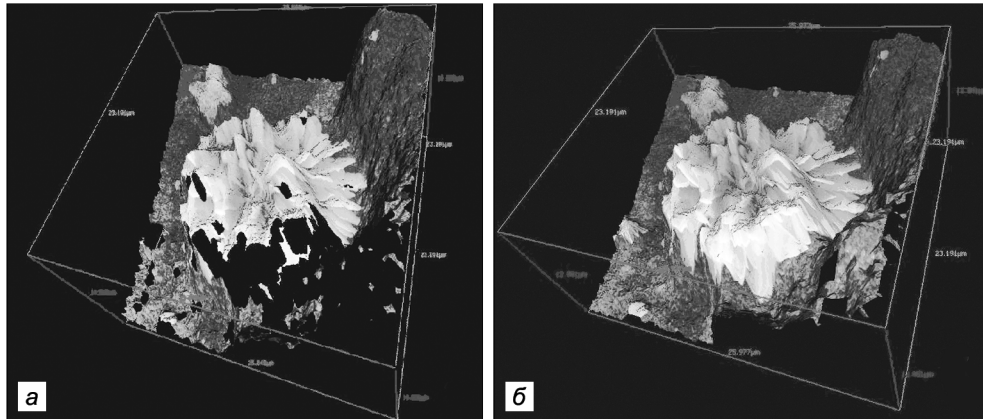


Рис. 5. Трехмерное изображение кристалла до (а) и после (б) процедуры интерполяции.

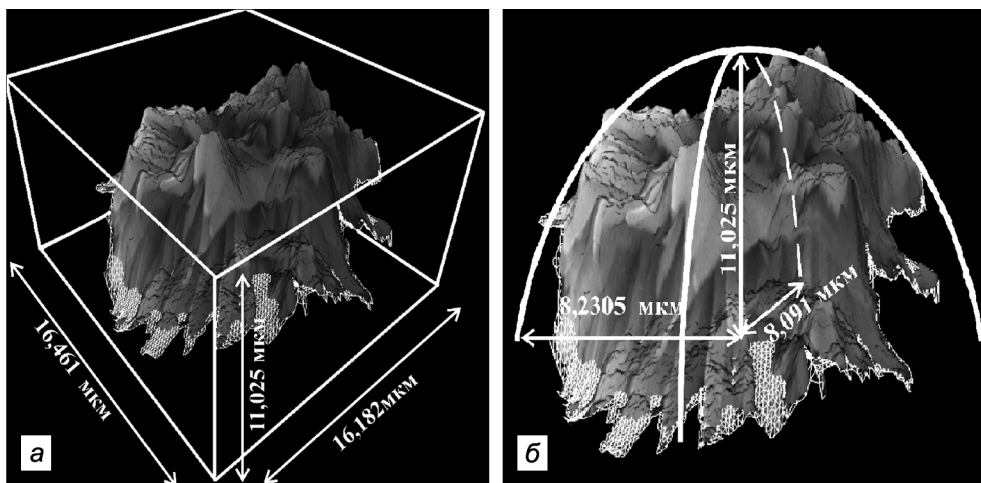


Рис. 7. Характерные размеры модели кристалла и аппроксимации ее объема параллелепипедом (а) и сегментом эллипсоида (б).

информации, заключающаяся в том, что мелкие детали рельефа их поверхности не разрешены. Установлено, что источником ошибок являются экранирование электронного луча выступающими фрагментами исследуемого объекта и отсутствие функции эвцентрического наклона образца в используемом растровом электронном микроскопе;

4. Определены метрические характеристики кристаллических образований: его характерные размеры и объем. Выявлено, что потеря мелких деталей рельефа в построении приводит к ошибке в определении объема кристалла. Показано, что построенные модели кристаллических образований наилучшим образом аппроксимируются объемными сегментами эллипсоида.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Alicona 3D MeX user's Guide. Brno: Alicona Imaging GmbH; 2009.

2. Dykstra M.J., Reuss L.E. Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting. : Springer publishing; 2003.
3. Goldstein J., Newbury D. et al. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. : Springer Science and Business Media, Inc.; 2003.
4. Janda R. Preparation of extracted natural human teeth for SEM investigations. Biomaterials. 1995; 16(3): 209–17.
5. Kubinek R., Zapletalova Z., Vujtek M. et al. Examination of dentin surface using AFM and SEM. Modern Res. Educ. Topics Microscopy. Microscopy Ser. 2007; 3(2): 593–8.
6. Marshall D., Helfrich M.H., Aspden R.M. Scanning electron microscopy of bone. Meth. Mol. Med. 2003; 80(4): 311–20; doi: 10.1385/1-59259-366-6:311.
7. Pereira J.C., Martineli A.C.B.F., Tung M.S. Replica of human dentin treated with different desensitizing agents: A methodological SEM Study in vitro. Braz. Dent. J. 2002; 13(2): 75–85.

Поступила 08.11.12