

РАМАНОВСКАЯ МИКРОСПЕКТРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ БИОМИНЕРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ

Д. В. Киселева, С. Л. Вотяков

*Институт геологии и геохимии УрО РАН, г. Екатеринбург,
Kiseleva@igg.uran.ru*

В настоящей работе приведен обзор исследований методом лазерного КР-микрорзонда (рамановской микроспектроскопии) ряда биоминеральных фосфатных образований, обсуждаются также оригинальные результаты авторов по изучению современных и ископаемых (с возрастом до 40 тыс. лет) костных тканей мелких млекопитающих (полевок), а также костных и зубных тканей современного человека (головок бедренных костей, здоровых и затронутых дегенеративными изменениями – коксартрозом, эмали и дентина интактных зубов и зубов, пораженных процессами различной этиологии – кариесом, повышенной стираемостью и последствиями депульпирования).

Современные микроспектроскопические методы (ИК-микроскопия, КР-микрорзонд) достаточно широко используются при изучении особенностей структуры и дефектообразования органо-минеральных агрегатов – костных и зубных тканей. Эти методы (в особенности лазерный КР-микрорзонд) дают информацию об особенностях локальной молекулярной структуры тканей с пространственным разрешением до 0.5–1 мкм; они характеризуются простотой пробоподготовки, сниженными требованиями к образцу (он может быть непрозрачным, гидратированным и др.) и отсутствием разрушений после анализа. Линии на КР-спектрах настолько узки, что даже малые сдвиги частоты и изменения формы линий могут быть четко зафиксированы, что, в свою очередь, позволяет различать разнообразные химические соединения, ответственные за полосы [Tarnowski et al., 2002].

Метод лазерной КР-микроскопии достаточно широко применяется в исследованиях современной и ископаемой костной (зубной) ткани и является дополняющим данные ИК-микроскопии при анализе структурных изменений и межмолекулярных реакций. В биологических тканях на КР-спектрах фиксируются колебания структурных молекулярных и ионных единиц неорганической составляющей – карбонат-гидроксиапатита (фосфат-, карбонат- и гидрофосфат-ионов), а также многочисленные колебания, связанные с протеиновой матрицей. На спектрах симметричные колебания молекул (ионов) – самые интенсивные [Tarnowski et al., 2002]. Разрушение кристаллической решетки кости в совокупности с встраиванием в ее структуру примесных ионов отражается на КР-спектрах ископаемых костных тканей [Thomas et al., 2007]. По КР-спектрам возможны оценки степени замещения матричных ионов, ионной гетерогенности, относительного содержания структурных карбонат-ионов, наличия карбоната кальция, а также люминесцирующих ионов.

Лазерный КР-микрорзонд достаточно широко применяется в материаловедческих стоматологических исследованиях при оценке воздействия различных процедур препарирования зуба, пломбирования и протезирования, кислотного травления, лазерной обработки [Soares et al., 2006]; при этом оценивается степень изменения как минеральной, так и органической составляющей дентина и эмали. В работе [Wentrup-Burne et al., 1998] проведено КР-микрорзондовое картирование молекулярных группировок минеральной и органической компоненты зуба человека. КР-микрорзонд достаточно широко применяется при исследовании костных имплантов, покрытых тонкими слоями улучшающих биосовместимость материалов [Otto et al., 1996].

Отметим наиболее информативные участки КР-спектра фосфатных биоминералов (рис. 1).

Интенсивность, отн.ед.

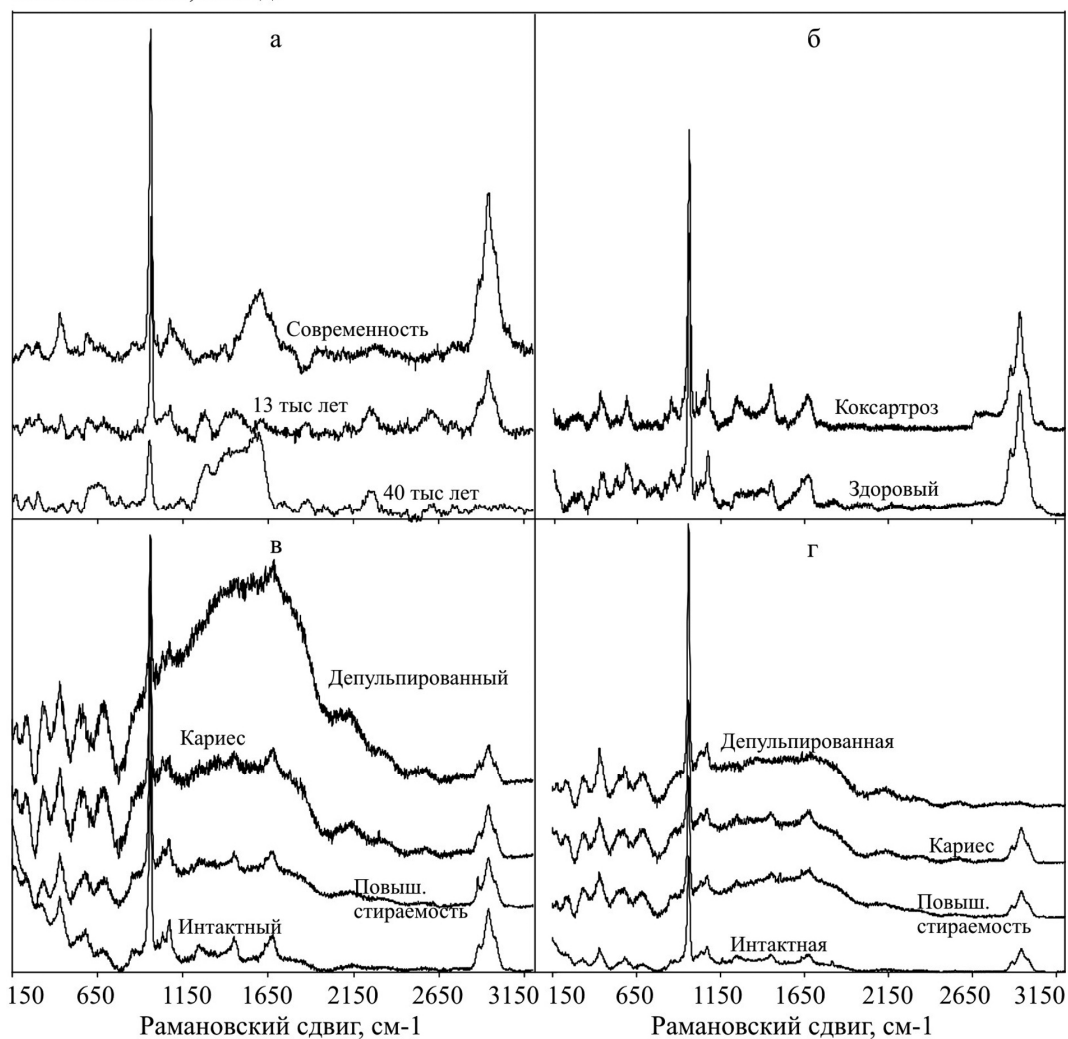


Рис. 1. КР-спектры ряда биоминеральных фосфатных образований – современных и ископаемых костных тканей мелких млекопитающих (полевок) (а); костных тканей современного человека (головки здоровых и затронутых коксартрозом бедренных костей) (б); интактных и пораженных вследствие процессов различной этиологии (кариес, повышенная стираемость, депульпирование) зубных тканей современного человека – дентина (в) и эмали (г).

Область $920-980\text{ см}^{-1}$. Линия симметричного валентного колебания PO_4^{3-} (ν_1) является самой интенсивной в спектре минерализованной ткани. Ее особенностью является высокая чувствительность к минеральному окружению: частота и форма этой линии зависят от локального окружения и изменяются вследствие замещений анионных группировок и изменения степени кристалличности. Во многих исследованиях тканей и синтетических апатитов частота линии PO_4^{3-} (ν_1) связывалась с составом окружающего минерала [Tarnowski et al., 2002].

В КР-спектроскопии минерализованных тканей принято подразделять апатитовое окружение на три группы с различными частотами соответствующих линий. В замещенном карбонат-апатите В-типа (карбонат-ионы замещают фосфат-ионы в решетке апатита) фосфатная линия ν_1 фиксируется в диапазоне $955-959\text{ см}^{-1}$. В высококристаллическом незамещенном гидроксиапатите линия ν_1 сдвигается в область $962-964\text{ см}^{-1}$. Линия с частотой $945-950\text{ см}^{-1}$ свидетельствует о наличии разупорядоченной фосфатной решетки апатита [Tarnowski et al., 2002]. Происходит ли это вследствие замещений А-типа (карбонат-ионы замещают гидроксил-ионы) или из-за присутствия аморфного фосфата кальция, неясно; авторы [Tarnowski et al., 2002] используют термин «разупо-

рядоченный фосфат». В общем случае, в костной и зубной ткани полоса фосфата ν_1 является суперпозицией всех трех составляющих; обычно она имеет несимметричную форму из-за вклада колебаний разупорядоченного фосфата и незамещенного гидроксипатита. Для оценки степени кристалличности апатита используют вычисление ширины линии фосфата ν_1 на ее полувысоте.

Область 1065–1070 см^{-1} соответствует колебаниям карбонат-иона В-типа. Для оценки отношения фосфат-карбонат используется отношение интенсивностей (или их площадей) соответствующих пиков на спектре – 959 (для PO_4^{3-}) и 1070 см^{-1} (для CO_3^{2-}).

Область 1400–1800 см^{-1} . Полосы в данной области обусловлены, в основном, двумя разновидностями колебаний связей органической матрицы: колебаниями связей –CO-NH-, формирующих белковую основу, и колебаниями, связанными с боковыми цепочками аминокислот. На КР-спектрах наиболее ярко проявляются пики белковых связей амидной группировки –CONH₂, имеющей 9 колебательных мод; в спектре регистрируются следующие полосы: амид I (1655–1675 см^{-1}), который представляет собой, главным образом, валентное колебание C=O; амид II (1560 см^{-1} , деформационное колебание N-H, валентное C-N); амид III (1240–1260 см^{-1} , валентное C-N, деформационное N-H) [Ager et al., 2006]. Низкоинтенсивное плечо пика при 1620 см^{-1} авторы [Ager et al., 2006] соотносят с колебаниями боковой цепочки тирозина Y8a. Пик 1450 см^{-1} соответствует деформационному крутильному колебанию CH₂ в коллагене (два атома водорода, ковалентно связанных с одним и тем же атомом углерода, симметрично двигаются подобно веслам при гребле) [Draper et al., 2005]. Во многих публикациях пик колебаний амида I (1665 см^{-1}) используется для оценки относительного содержания органической матрицы и расчета отношений минерал – органическая матрица [Tarnowski et al., 2002; Ager et al., 2006].

Область 2750–3350 см^{-1} . Пики в этой области, как правило, соотносят с колебаниями связей C-H (2880–2935, 3070 см^{-1}) и C-N (3320, 3435 см^{-1}) в коллагене [Uthgenannt et al., 2007]. Отношение площадей пиков 960 см^{-1} /2940 см^{-1} использовалось в цитированной работе для оценки соотношения минерал-коллаген.

На основании рассчитанных характеристик КР-спектров изученных образцов выявлены закономерности изменения их структурных особенностей (степени минерализации ткани и степени кристалличности биогенного фосфата, межпозиционного распределения карбонатных группировок) в зависимости от степени фоссилизации и возраста захоронения пяточных костей полевок, дегенеративных изменений (коккартроза) головки бедренных костей человека, а также поражений зубной ткани человека, вызванных патологическими процессами различной этиологии.

Авторы признательны Н. Г. Смирнову (Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург), С. А. Лемешевой (Омский Государственный Университет, г. Омск) и Ю. В. Мандра (Уральская Государственная Медицинская Академия) за предоставленные образцы, а также А. М. Галкину (ЗАО «Найтек Инструментс», г. Москва) и М. А. Крыловой (Институт минералогии УрО РАН, г. Миасс) за помощь в проведении экспериментальных исследований.

Работа выполнена в рамках программ РАН № 20 и 23 фундаментальных исследований Президиума РАН.

Литература

Ager III J. W., Nalla R. K., Balooch G., Kim G., Pugach M., Habelitz S., Marshall G. W., Kinney J. H., O'Ritchie R. On the Increasing Fragility of Human Teeth With Age: A Deep-UV Resonance Raman Study // Journal of Bone and Mineral Research. 2006. V. 21. № 12. P. 1879–1887.

Draper E. R. C., Morris M. D., Camacho N. P., Matousek P., Towrie M., Parker A. W., Goodship A. E. Novel Assessment of Bone Using Time-Resolved Transcutaneous Raman Spectroscopy // *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005. V. 20. № 11. P.1968–1972.

Otto C., de Grauw C. J., Duindam J. J., Sijtsma N. M., Greve J. Applications of Micro-Raman Imaging in Biomedical Research // *Journal of Raman Spectroscopy*. 1998. V. 28. № 2–3. P. 143–50.

Soares L. E. S., Brugnera Junior A., Zanin F., Pacheco M. T. T., Martin A. A. Molecular analysis of Er:YAG laser irradiation on dentin // *Braz. Dent. J.* 2006. Vol. 17. №.1. P. 15–19.

Tarnowski C. P., Ignelzi Jr M. A., Morris M. D. Mineralization of Developing Mouse Calvaria as Revealed by Raman Microspectroscopy // *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002. V. 17. № 6. P. 1118–1126.

Thomas D. B., Fordyce R. E., Frew R. D., Gordon K. C. A rapid, non-destructive method of detecting diagenetic alteration in fossil bone using Raman spectroscopy // *Journal of Raman Spectroscopy*. 2007. V. 38. № 12. P. 1533–1537.

Uthgenannt B. A., Kramer M. H., Hwu J. A., Wopenka B. and Silva M. J. Skeletal Self-Repair: Stress Fracture Healing by Rapid Formation and Densification of Woven Bone // *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007. V. 22. № 10. P. 1548–1556.

Wentrup-Byrne E., Armstrong C. A., Armstrong R. S., Collins B. M. Fourier Transform Raman Microscopic Mapping of the Molecular Components in a Human Tooth // *Journal of Raman Spectroscopy*. 1998. V. 28. № 2–3. P. 151–158.