

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Zobrazování rozložení vybraných růstových faktorů na povrchu
dentinu pomocí Ramanovy spektroskopie**

Bakalářská práce

Autor:
Školitel:

Nikola Čipaková
RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Studijní program:
Studijní obor:
Forma studia:

B 1407 Chemie
Aplikovaná chemie
prezenční

Olomouc 2017

Bibliografické údaje

Autor:	Nikola Čipaková
Název práce:	Zobrazování rozložení vybraných růstových faktorů pomocí Ramanovy spektroskopie
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zaměřuje na využití Ramanovy spektroskopie v regenerativní endodoncii při léčbě nezralého stálého zubu, díky které je možné zobrazit rozložení jednotlivých růstových faktorů na povrchu kořenového kanálku. Jako růstové faktory extracelulárních dentinových matric byly využity TGF- β 1, BMP-2 a β FGF. Po odstranění sprašné vrstvy pomocí kyseliny EDTA na zubním vzorku s infikovanou dření došlo k navázání růstových faktorů a pomocí Ramanovy spektroskopie a značených protilátek byly faktory na povrchu kanálků úspěšně detekovány.

Klíčová slova	Ramanova spektroskopie, dentinový kanálek, růstové faktory, Ramanovy značky
Počet stran	59
Jazyk	česky

Bibliographical identification

Author	Nikola Čipaková
Title	Imaging of distribution of selected growth factors on a dentin surface using Raman spectroscopy
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
The year of presentation	2017

Abstract

This bachelor thesis is focused on immature permanent tooth treatment in regenerative Endodontics while using Raman spectroscopy. Thanks to Raman's spectroscopy it is possible to display the layout of individual growth factors on the surface of the root canal. As extracellular dentin matrix growth factors were used TGF- β 1, BMP-2 and β FGF. After elimination of smear layer with use of EDTA acid on a tooth sample with infected pulp there developed the connection between growth factors and with Raman spectroscopy and labelled antibodies, channel surface factors were successfully detected.

Keywords	Raman spectroscopy, dentin canal, growth factors, Raman signs
Number of pages	59
Language	Czech

Vysoká škola: Univerzita Palackého v Olomouci Fakulta: přírodovědecká
Katedra: Katedra fyzikální chemie Školní rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jméno: Nikola Čipaková
Studijní obor: Aplikovaná chemie
Název práce: Zobrazování rozložení vybraných růstových faktorů na povrchu dentinu
česky: pomocí Ramanovy spektroskopie
anglicky: Imaging of distribution of selected growth factors on a dentin surface using Raman spectroscopy

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše
2. Prostudování uvedené odborné literatury
3. Experimentální měření
4. Vyhodnocení a interpretace výsledků
5. Vypracování bakalářské práce
6. Příprava a prezentace multimediální prezentace bakalářské práce

Rozsah grafických prací: podle potřeby

Rozsah původní zprávy: 30-50 stran

- Seznam odborné literatury:
- E. D. Ščukin: Koloidní chemie, Academia, Praha 1990.
 - R. J. Hunter: Foundations of Colloid Science, Oxford 2001
 - Ewen Smith: Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach, Wiley, 2005.
 - Sebastian Shlucker: Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications, Wiley, 2011.
 - Shu-Lin Zhang: Raman Spectroscopy and its Application in Nanostructures, Wiley 2012.
 - původní časopisecká sdělení dle vlastní literární rešerše

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Datum zadání bakalářské práce: 12. října 2016

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2017

Čipalova' Nikola

.....
podpis studenta

Václav Ranc

.....
podpis školitele

[Signature]

.....
podpis vedoucího katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Václavu Ranci, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a pomoc během zpracovávání bakalářské práce. Slova díky patří také mé rodině za toleranci, morální a finanční podporu při studiu.

OBSAH

ÚVOD	10
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 ROZDĚLENÍ SPEKTROSKOPICKÝCH METOD	12
1.2 MOLEKULOVÁ SPEKTROSKOPIE	13
1.2.1 UV/VIS spektroskopie	14
1.3 VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE	14
1.3.1 Vibrace molekul	15
1.3.2 Rotace molekul	17
1.4 INFRAČERVENÁ ABSORPČNÍ SPEKTROSKOPIE	18
1.5 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE.....	21
1.5.1 Historie.....	21
1.5.2 Princip metody.....	22
1.5.3 Interpretace Ramanových spekter	25
1.5.4 Instrumentace	26
1.5.5 Rezonanční Ramanova spektroskopie.....	28
1.5.6 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS).....	29
1.5.7 Využití Ramanovy spektroskopie	29
1.6 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ZUBŮ.....	29
1.6.1 Sklovina	30
1.6.2 Zubovina (dentin).....	30
1.6.3 Cement.....	32
1.7 VÝZNAM RŮSTOVÝCH FAKTORŮ V DENTINOVÝCH KANÁLCÍCH.....	33
1.8 DALŠÍ METODY, VYHLEDÁVAJÍCÍ RŮSTOVÉ FAKTORY NA POVRCHU DENTINU	35
1.9 ANALÝZA ZUBŮ POMOCÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE.....	36
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
2.1 POUŽITÝ RAMANŮV SPEKTROMETR.....	38
2.2 NASTAVENÍ SPEKTROMETRU	38
2.3 POUŽITÝ SOFTWARE.....	38
2.4 CHEMIKÁLIE	39
2.5 PŘÍPRAVA VZORKŮ	39
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	41
3.1 PRVNÍ FÁZE – MAPOVÁNÍ RŮSTOVÝCH FAKTORŮ PROTILÁTKOU	41
3.2 DRUHÁ FÁZE – NESPECIFICKÁ SORPCE ZNAČEK NA VZOREK	42
3.3 TŘETÍ FÁZE – ZOBRAZENÍ RŮSTOVÝCH FAKTORŮ POMOCÍ OZNAČENÝCH PROTILÁTEK.....	43
3.4 ČTVRTÁ FÁZE – MAPOVÁNÍ RŮSTOVÝCH FAKTORŮ POMOCÍ OZNAČENÝCH PROTILÁTEK NA INFIKOVANÉM ZUBNÍM VZORKU.....	45

3.5	PÁTÁ FÁZE – MAPOVÁNÍ RŮSTOVÝCH FAKTORŮ POMOCÍ OZNAČENÝCH PROTILÁTEK NA OŠETŘENÉM ZUBNÍM VZORKU	46
4	ZÁVĚR.....	49
5	SUMMARY.....	51
6	SEZNAM OBRÁZKŮ	52
7	SEZNAM TABULEK.....	54
8	SEZNAM LITERATURY	55

ÚVOD

Spektroskopie je vědní obor, který se zabývá studiem interakcí elektromagnetického záření se zkoumanou látkou. Využívá se pro důkaz této látky. Z množství absorbovaného nebo emitovaného záření lze získat údaje o jednotlivých energetických hladinách, z těchto dat lze následně vyvodit informace o struktuře molekul nebo krystalů, jimž studovaná spektra přísluší, nebo stanovit jejich koncentraci. Spektroskopické metody jsou často užívány ve fyzikální a analytické chemii a lze je rozdělit na atomovou nebo molekulovou. Rozdělení na atomovou a molekulovou vychází zejména z toho, nakolik je příslušná metoda schopná detekovat a stanovit ve vzorku prvky (atomová spektroskopie), nebo nakolik je schopná dát výpověď o způsobu, jak jsou atomy v molekule vázány a o struktuře molekul (molekulová spektroskopie). Spektroskopie může být klasifikována na základě veličiny, která je měřena nebo vypočítána nebo podle měřícího procesu.¹

Porovnáním všech spektroskopických metod lze zjistit, že interakce, a tedy také metody můžeme rozdělit do dvou základních skupin. První skupinu tvoří interakce, při nichž dochází k výměně energie mezi zkoumanou látkou a zářením, v druhém případě látka pouze určitým způsobem ovlivňuje vlastnosti procházejícího záření, aniž by docházelo k výměně energie.²

Ramanova spektroskopie je metodou vibrační molekulové spektroskopie, která byla pojmenována po indickém fyzikovi Čandrašékharu Venkatau Ramanovi. Tato metoda využívá Ramanův jev. Používá se rozptyl laserového paprsku, který může s elektrony interagovat v zásadě třemi způsoby, přičemž vznikají zejména Stokesovy linie a anti-Stokesovy linie.

Používá se při analýze pevných látek, kapalin, plynů, dále též při analýze povrchů, či při analýze biologických systémů. Své uplatnění Ramanova spektroskopie nachází od mineralogie a geochemie, přes chemický a farmaceutický průmysl až po biologii a lékařství.³

Jednou z možností aplikace Ramanovy spektroskopie je zobrazování rozložení růstových faktorů na biologickém povrchu, čímž lze zlepšit způsob léčby nezralého stálého zubu v regenerativní endodoncii, aby se dosáhlo zvýšení expozice růstových faktorů na povrchu kořenového kanálků.

Obvyklý způsob léčby zubů s infikovanou dřeví je ošetření kořenového kanálku, které souvisí s odstraněním nekrotické dřevě, určitou úpravou a uzavřením průchodů kořenových kanálků. Léčba dětských zubů je ztížena několika problémy, které mohou vést ke ztrátě zubů dříve, než pacient dosáhne dospělosti. Tím může docházet k různým problémům a deformacím čelisti.⁴

Pomocí speciálního regenerativního způsobu léčby lze eventuálně zlepšit dlouhodobou prognózu zubu. Izolované kmenové buňky zubního původu jsou schopny tvořit tkáň podobné dřeví s ukládáním tubulárního dentinu tehdy, zda jsou transplantovány ve vhodném nosném systému.⁵ Tento způsob je velice finančně náročný a jako alternativní možnost je vhodné použít bezbuněčný přístup regenerativního ošetření.⁶

Bezbuněčný přístup se spoléhá na doručení buněčného lešení, které je bohaté na růstové faktory a může zahrnovat kmenové buňky, nebo je schopno tyto buňky, sídlící v periapikální oblasti přitáhnout. Velmi podstatným krokem je také podmínění povrchu dentinu, protože extracelulární matrice dentinu je bohatá na růstové faktory.⁷

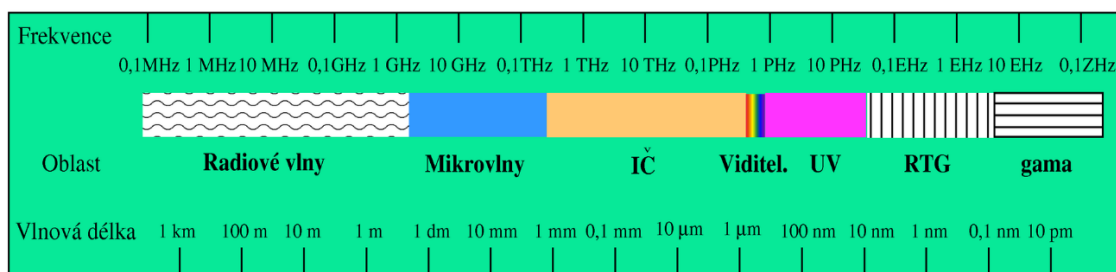
Růstové faktory extracelulárních dentinových matric, které by měly hrát významnou roli v regeneraci dřeví dentinu, jsou přeměňující růstový faktor- β 1 (TGF- β 1), kostní morfogenetický protein-2 (BMP-2) a růstový faktor základního fibroblastu (β FGF).⁸

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Rozdělení spektroskopických metod

Spektroskopické metody se využívají pro důkaz látky, zkoumání její struktury nebo určení její koncentrace pomocí interakcí elektromagnetického záření s neznámou látkou.¹

Každé elektromagnetické záření je popisováno vlnovou délkou, která určuje jeho vlastnosti. Přejechy mezi jednotlivými zářeními jsou plynulé a mnohdy se i překrývají. Druhy záření se rozlišují podle vlnové délky (resp. frekvence) a podle zdroje záření. Patří sem radiové záření, mikrovlny, infračervené záření, viditelné světlo, ultrafialové záření, rentgenové záření a gama záření (viz obr. 1). Mezi jednotlivými druhy nejsou ostré hranice a přechod z jednoho záření do druhého je souvislý. Platí, že záření s vyšší vlnovou délkou má nižší frekvenci, a naopak záření s nízkou hodnotou vlnové délky má vysokou hodnotu frekvence. Každé záření má svoje charakteristické vlastnosti a využití.⁹



Obrázek 1: Elektromagnetické spektrum¹⁰

Srovnáním veškerých metod lze zjistit, že je možné je rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří interakce, při kterých dochází k výměně energie mezi analyzovanou látkou a zářením. Při šíření záření určitým prostředím dochází k jeho absorpci. Opačným procesem k absorpci je emise, tedy vyzáření. Absorbované nebo emitované spektrum není spojité, ale skládá se z mnoha linií (čar nebo pásů), které jsou specifické pro každou látku.

V druhém případě látka ovlivňuje vlastnosti šířícího se záření, aniž by docházelo k výměně energie. Mezi tyto vlastnosti patří např. rychlost a směr průniku (refraktometrie a interferometrie), stáčení roviny polarizovaného záření (polarimetrie), nebo je záření difraktováno (rentgenová difraktometrie) nebo rozptylováno částicemi zakaleného vzorku (turbidimetrie a nefelometrie). Tyto metody jsou relativně jednoduché, ale v mnoha případech poskytují významné informace jak pro praktickou analýzu, tak při řešení některých teoretických otázek.

Při měření s velkým rozsahem energií, lze pak zachytit nejrůznější přechody částic mezi různými energetickými stavy z hlediska uspořádání elektronů, spinu jader a elektronů, vibrace a rotace molekul a získat tak podrobné informace o jejich chemickém složení a struktuře.²

1.2 Molekulová spektroskopie

Molekulová spektroskopie je významnou skupinou spektroskopických metod, kterou je možné výhodně použít k analýze anorganických i organických látek. Díky nepřetržitému vývoji v oblasti instrumentace se snižuje množství vzorku nezbytné pro vlastní analýzu a tím se tyto metody dostávají do různých oblastí.¹¹

V metodách molekulové spektroskopie nastává v případě ultrafialové, viditelné a infračervené spektrometrii při absorpci vhodného záření změna energetického stavu kompletní molekuly. Absorpční spektrum je vytvářeno jednotlivými rozdílně širokými pásy, které vznikají při současné přeměně elektronového, vibračního a rotačního stavu molekuly nebo pouze vibračního a rotačního stavu.²

K rotačním přechodům dochází tehdy, když je energie menší než 0,003 eV. Přechody mezi jednotlivými stavy jsou doprovázeny pohlcením nebo vyzářením fotonu, obdobně jako při přechodu elektronu mezi jednotlivými energetickými hladinami v elektronovém obalu atomu. Mezi jednotlivými rotačními hladinami jsou poměrně malé vzdálenosti, tedy i vzdálenosti mezi jednotlivými rotačními spektrálními čarami jsou malé. Vlnové délky se zpravidla pohybují v mikrovlnné oblasti v intervalech od 0,1 mm do 1 cm.

Čistě vibrační přechody lze získat jedině v případě, kdy molekula nemůže rotovat a jejich energie je menší než 0,2 eV. Tak je tomu v případě pevného skupenství, kde rotační stupně volnosti molekuly přecházejí na vibrační pohyby v mřížce. Vibrační přechody mezi jednotlivými stavy jsou taktéž jako u rotačních přechodů provázeny pohlcením nebo vyzářením fotonu. Vzdálenosti mezi jednotlivými vibračními hladinami jsou o něco větší než vzdálenosti mezi rotačními energetickými hladinami. Vlnové délky se většinou vyskytují v infračervené oblasti spektra v intervalech od 10000 Å do 0,1 mm.²

Elektronové přechody jsou značně rychlé. Energie těchto přechodů se pohybuje okolo 10 eV. Při elektronovém přechodu je možné očekávat, že nedochází ke změnám

vzdáleností jader atomů v molekule, tzn. vibrační a rotační pohyby atomů v molekule lze při elektronových přechodech zanedbat. Vlnové délky se pohybují v oblasti UV/VIS.

Ke kvalitativní analýze se z metod molekulové spektroskopie nejčastěji užívá vibračních spekter. Ve svých detailech je spektrum charakteristické pro jednotlivé látky natolik, že prakticky není možné, aby se vyskytovaly dvě sloučeniny, které by měly zcela shodné spektrum. Pomocí spektra pak lze identifikovat danou látku s použitím knihoven spekter. Při srovnávání experimentálních hodnot s hodnotami tabelovanými je zapotřebí zohlednit veškeré okolnosti, které mohou mít vliv na závěrečnou hodnotu vlnočtu odpovídající vibrace (druh přístroje, skupenství vzorku a jiné).¹¹

1.2.1 UV/VIS spektroskopie

Spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/VIS) je klasická metoda analytické chemie, patřící mezi elektromagnetické spektroskopické metody. Zabývá se měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, absorbujících elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm. Umožňuje s použitím jednoduchých zařízení sledovat a vyhodnocovat roztoky barevných látek. Také v současné době je možné absorpční spektrální analýzu pro její rychlost, přesnost, citlivost a experimentální nenáročnost považovat za jednu z nejužívanějších metod. Mezi metody UV/VIS spektroskopie patří kolorimetrie, fotometrie a spektrofotometrie.

Oblast záření s vlnovou délkou menší než 200 nm se nazývá jako „vakuová“ ultrafialová oblast. Látky, které absorbují záření s vlnovou délkou menší než 300 nm (ultrafialové záření) se oku jeví jako bezbarvé, zatímco látky, absorbující z bílého slunečního záření vlnové délky v rozsahu 380 – 770 nm se jeví oku jako barevné. Pro sledování absorpce je vyžadováno speciální evakuované aparatury, neboť záření je absorbováno vzduchem.²

1.3 Vibrační spektroskopie

Molekulární vibrace dávají dva typy spekter. Kvanta infračerveného záření mohou přemísťovat molekulu ze základního vibračního stavu do vyššího vibračního stavu a při jeho absorpci vzniká infračervené spektrum.

V praxi nejvíce používanou oblastí při zkoumání organických látek je z důvodu konfigurace užití techniky oblast od 4000 cm^{-1} do 666 cm^{-1} ($2,5 - 15,0\text{ }\mu\text{m}$). Spodní hranice oblasti tedy 666 cm^{-1} je zpravidla určena vlivem aplikovaného substrátu, nebo

použité kyvety. Zájem o blízkou infračervenou oblast $14200 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ($0,7 - 2,5 \text{ }\mu\text{m}$), která se využívá např. ke stanovení kovů a vzdálenou infračervenou oblast $700 - 200 \text{ cm}^{-1}$ ($14,3 - 50 \text{ }\mu\text{m}$), která se používá ke kvantitativní analýze se v poslední době výrazně zvýšil.¹²

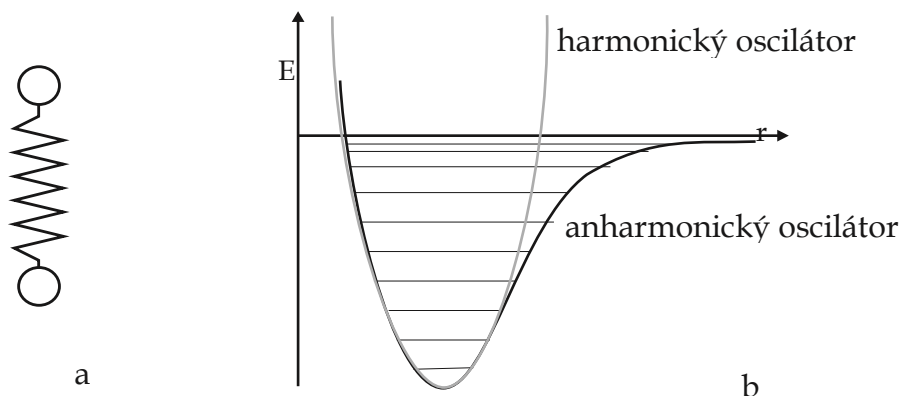
Vibrační spektroskopie se nejčastěji používá ke zkoumání čistoty sloučenin. Infračervená spektra jsou zvláště vhodná k identifikaci polárních příměsí v nepolárních látkách. K stanovení nepolárních příměsí je naopak více výhodná Ramanova spektroskopie.¹⁰

1.3.1 Vibrace molekul

Z kvantové mechaniky plyne pro vibrační přechody dvouatomové molekuly v harmonickém oscilátoru výběrové pravidlo $\Delta v = \pm 1$, tj. nejpravděpodobnější jsou pouze přechody mezi sousedními vibračními hladinami. Poskytneme-li molekule nezbytnou energii ve formě elektromagnetického záření s energií $E_{\text{zář}} = h\nu_{\text{zář}}$, nastane přechod mezi vibračními hladinami, v případě že energie záření $E_{\text{zář}} = \Delta E$, tj. $\nu_{\text{zář}} = \nu$. Je tedy nutné, aby se frekvence pohlceného záření rovnala frekvenci vibrace molekuly. Absorpcí energie se zvýší amplituda vibrací, frekvence vibrace přesto zůstává nezměněna.

Frekvence, při které dochází k přechodu mezi základním a prvním excitovaným stavem ($\Delta v = 0 \rightarrow 1$) se označuje jako základní neboli fundamentální. Ve stavu tepelné rovnováhy se za normální teploty většina molekul nachází v základním vibračním stavu, (obsazení vyšších hladin se zvyšuje podle Boltzmanova zákona s teplotou), proto jsou tyto přechody nejpravděpodobnější.²

V objasnění harmonického oscilátoru jsou energetické rozdíly mezi sousedními hladinami veškerých vibračních stavů stejné, a proto i při populaci vzbuzených vibračních stavů by absorpční spektrum dvouatomové molekuly mělo mít pouze jeden absorpční pás o dané frekvenci. Ve skutečnosti je ve spektrech biatomických molekul pozorováno více absorpčních pásů a vibrace molekuly nejsou čistě harmonické. Vzhledem ke tvaru křivky, která je závislá na elektronickém potenciálu, obsahují molekuly jistou dávku anharmonicity. U reálné tedy anharmonické vibrace se vzdálenosti jednotlivých vibračních hladin snižují (viz obr. 2).



Obrázek 2: Harmonický a anharmonický oscilátor¹³

Vzdálenost jednotlivých vibračních hladin se vyskytují v oblasti stovek až tisíců cm^{-1} , a z důvodu toho můžeme zkoumat vibrační přechody světlem z oblasti infračerveného záření. K tomuto využití byla vytvořena technika infračervené spektroskopie, resp. Ramanovy spektroskopie.¹³

Pomocí mechanického modelu molekuly je možno víceatomovou molekulu charakterizovat jako soustavu hmotných bodů (atomů), které jsou vázané chemickými vazbami. Vibrace víceatomové molekuly je obtížná forma kmitavého pohybu, kterou je možné popsat jako součet jednoduchých harmonických pohybů, tzv. normální vibrací. Při normální vibraci veškeré atomy v molekule vibrují ve stejné fázi a se stejnou frekvencí, ale s odlišnými amplitudami. Každá normální vibrace molekuly je popsána danou frekvencí, směrem a velikostí výchylky jednotlivých atomů, přičemž těžiště soustavy atomů nevibruje.²

Počet normálních vibrací pro danou molekulu je dán počtem jejich vibračních stupňů volnosti. Každá nelineární molekula má k dispozici $3N - 6$ základních módů a lineární molekula $3N - 5$, kde N je počet atomů v molekule.¹³

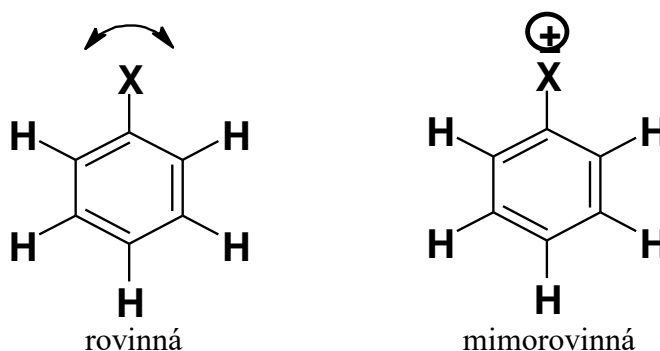
Vibrace dělíme na dvě základní skupiny:

- a) valenční vibrace – atomy se vychylují ve směru vazby a dochází tak ke změně její délky. Dělí se na symetrickou valenční vibraci, kterou označujeme symbolem ν_s a antisymetrickou, kterou značíme jako ν_{as} (viz obr. 3).



Obrázek 3: Valenční vibrace ¹⁴

- b) deformační vibrace – atomy se při vibraci vychylují okolo na směr chemické vazby a dochází tak ke změně valenčního úhlu. U prostorových molekul může změna valenčního úhlu nastat jednak v rovině určité molekuly, jde o tzv. deformační vibraci rovinnou δ a jednak může vzniknout deformace mimo rovinu molekuly, mluvíme pak o tzv. mimorovinnou deformační vibraci γ (viz obr. 4).¹²



Obrázek 4: Deformační vibrace ¹⁴

Vibrační energie celé molekuly nebo vazby se může zvětšit absorpcí elektromagnetického záření pouze tehdy, dochází-li ke změně dipólového momentu při vibraci. Dipólový moment je vektorová veličina, jejíž velikost závisí na rozložení kladných a záporných nábojů v elektroneutralní molekule.²

1.3.2 Rotace molekul

Pro popis rotačního pohybu rigidní dvouatomové molekuly se užívá představa tuhého rotoru. To znamená, že během rotace molekula nemění svoji geometrii a rotuje jako tuhé těleso, přičemž její atomy nemohou konat vibrační pohyb. Rotační energie E_r molekul je kvantována. Dovolené jsou jedině takové přechody mezi energetickými hladinami, při kterých je $\Delta J = \pm 1$.¹³

Na rozdíl od vibrace závisí ΔE_r na rotačním kvantovém čísle J a hladiny nejsou ekvidistantní. Populace vyšších rotačních stavů je za normální teploty mnohem větší než u vibračních stavů, protože jde o velice malé rozdíly energie. Absorpce infračerveného

záření se projeví ve vzdálené infračervené oblasti, ve které získáme ve spektru soubor čar odpovídající odlišným rotačním přechodům.

Rotace polyatomových molekul je rozkládána na otáčení kolem tří hlavních os prostupujícími těžištěm. Dle velikosti momentu setrvačnosti při otáčení kolem nich rozlišujeme molekuly do několika tříd. Pro infračervená spektra molekul lineárních, při kterých je moment setrvačnosti kolem hlavní osy nulový a momenty setrvačnosti kolem dvou zbývajících na sebe kolmých os se rovnají, platí podobné vztahy jako pro spektra molekul biatomických. Pro spektra symetrického setrvačnicku, jako je např. molekula CH_3Cl nebo C_6H_6 a asymetrického setrvačnicku je nezbytné odvozené teoretické vztahy upravit pro reálné molekuly.²

1.4 Infračervená absorpční spektroskopie

Infračervená spektroskopie je spektroskopická metoda analytické chemie patřící mezi metody elektromagnetické spektroskopie. Je určena zejména pro identifikaci, strukturální charakterizaci a stanovení organických a anorganických látek. Zabývá se měřením a posuzováním absorpčních spekter molekul, které absorbují infračervené záření o různých vlnových délkách v rozsahu 800 nm – 100 μm , což odpovídá vlnočtům 12000 – 10 cm^{-1} .² Obrovskou výhodou infračervené spektroskopie je to, že dovoluje měřit vzorky ve všech skupenských stavech, tedy tuhém, kapalném a plynném.¹

Při absorpci tohoto záření dochází ke zvýšení vibračních a rotačních stavů molekuly. Rozdíly energie mezi jednotlivými vibračními a rotačními stavy vzhledem k rozdílům mezi elektronovými stavy jsou velmi malé a k vzbuzení absorpce tedy vystačí záření o nízké energii a větších vlnových délkách, než má záření viditelné, tj. záření infračervené.²

Infračervené záření tedy navazuje na záření viditelné na jedné straně a na záření mikrovlnné na straně druhé (viz obr. č. 1). Podle vžitě konvence je možno infračervené záření rozdělit do několika skupin. Zaprvé na záření v oblasti blízké (near – infrared, NIR), které pokračuje na oblast viditelného záření 800 – 2500 nm, tj. 12000 – 4000 cm^{-1} . Zadruhé na záření v oblasti střední (middle – infrared, MIR) 2,5 – 50 μm , tj. 4000 – 200 cm^{-1} a nakonec na záření ve vzdálené oblasti (far – infrared, FIR) 50 – 100 μm , tj. 200 – 10 cm^{-1} , které umožňuje studium vibrace sloučenin obsahující těžší atomy a vibrace vazeb o nižší energii (např. vodíkové vazby nebo vibrace mřížek tuhých částic). Záření ve vzdálené infračervené oblasti způsobuje změnu rotačních stavů molekul, u kterých je

nezbytná energie malá. Při působení záření střední a blízké infračervené oblasti nastává vibračně-rotací přechod, kdy se současně mění vibrační i rotační stav molekuly.¹

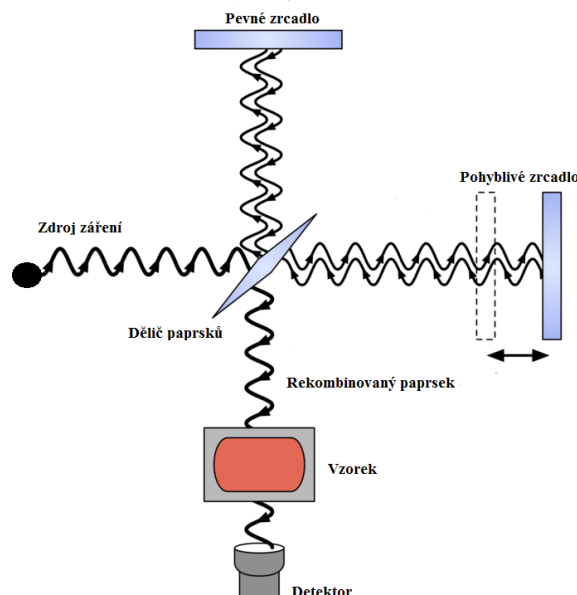
Principem této techniky je pohlcení infračerveného záření při procházení vzorkem, při kterém nastává změna v rotačně vibračních energetických stavů molekuly. Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, převážně vyjádřené v procentech transmitance T nebo jednotkách absorbance A na vlnové délce dopadajícího záření. Transmitance neboli propustnost je definována jako poměr intenzity záření, které proniklo absorbujícím prostředím I , k intenzitě vycházejícího záření ze zdroje I_0 . Hodnoty T jsou vždy menší nebo rovny jedné. Absorbance je určena jako dekadický logaritmus $1/T$. Závislost energie na vlnové délce je logaritmická, z toho důvodu se využívá vlnčet, který je definován jako převrácená hodnota vlnové délky, a proto je uvedená závislost energie na vlnočtu funkcí lineární.¹⁵

Absorpční pásy, jejichž vrcholy se nacházejí v rozsahu $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ jsou vhodné pro identifikaci funkčních skupin (např. $-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{N}-\text{H}$, CH_3 aj.). Pásy v intervalu $1500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ jsou pojmenované oblastí „otisku palce“ (fingerprint region). Leží zde absorpční pásy identifikující každou molekulu jako chemické individuum. To znamená, že díky tomu, že jsou tyto vibrace určeny chováním celého skeletu molekuly, nelze najít dvě látky, které by měly svá spektra v oblasti otisku prstů shodná. Jde převážně o deformační vibrace molekul. Pomocí softwarových programů a digitalizovaných knihoven infračervených spekter lze identifikovat neznámou analyzovanou látku.¹⁶

Měření infračervených spekter je možné provést na dvou základních typech přístrojů: disperzních a interferometrických. Disperzní infračervené spektrometry jsou konstruovány jako jednopaprskové nebo dvoupaprskové přístroje. Obsahují tři základní části, a to zdroj záření, monochromátor a detektor. Zdrojem polychromatického záření pro infračervenou oblast jsou keramické tyčinky, které mají na povrchu nebo uvnitř navinutý odporový drátek rozžhavený na teplotu 1000 až $1400 \text{ }^\circ\text{C}$ (např. nichromový zdroj, Nernstova tyčinka nebo tzv. globar). Takto žhavé těleso emituje záření v oblasti infračerveného spektra. Záření prostupuje vzorkem, který je umístěn do transparentní kyvety (halogenidy kovů, zejména alkalických: NaCl , KBr , CsI , CaF_2 , TlI , TlBr). Za kyvetou se paprsek záření přivádí na vstupní štěrbinu monochromátoru, jehož funkcí je rozklad neboli disperze infračerveného záření na difrakční mřížce, vyrobených

z kovových materiálů. Otáčením odrazové mřížky se na detektor postupně přivádí záření určitého vlnočtu. Přístroje většinou obsahují několik mřížek pro jednotlivé rozsahy vlnočtů, lišící se počtem vrypů na 1 mm. Jako detektory se používají dva základní typy.¹⁷ Prvním je termoelektrický detektor, při kterém elektrický proud vzniká v důsledku ohřevu spoje dvou různých kovů dopadajícím infračerveným zářením. Druhým typem je pyroelektrický detektor. Nejznámější z nich jsou detektory TGS (triglycinsulfát) a DTGS (deuterovaný triglycinsulfát). Tyto ferroelektrické materiály vypovídají velkou teplotní závislost permitivity pod teplotou Curieova bodu (u těchto látek je to 45 až 49 °C).² Curieův bod je charakteristická vlastnost feromagnetických látek, při kterém ztrácí látka své feromagnetické vlastnosti.¹⁸ Změna polarizovatelnosti může být zaznamenána jako elektrický signál. Odezva těchto detektorů je velmi rychlá a dovoluje tak rychlou registraci spektra bez ztráty rozlišení. Těž poměr signálu k šumu je velmi dobrý.²

Disperzní infračervené spektrometry s mřížkovým monochromátorem mají ale svá omezení. Nedostatek je zejména malá citlivost (především v oblasti pod 200 cm⁻¹), pomalost získání spektra, nemožnost získat uspokojivě velkého rozlišení v širokém rozsahu vlnočtů, nízký poměr signálu k šumu a náročnost měření propustnosti pod 1 %.² Proto mnohem rozšířenější a lepší metodou je infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-IR). Při této technice se záznam o absorpci vzorku získá jednorázově ve formě interferogramu, který se díky Fourierovy transformace změní na spektrum v IČ oblasti, tedy závislost velikosti absorpce na vlnočtu záření. Pozitivum této metody je rychlost záznamu interferogramu a možnost akumulace těchto interferogramů pro stejný vzorek.¹ FT-IR technika tak dala možnost vytvářet vibrační spektra pro mnohem menší množství vzorku. Na rozdíl od disperzního přístroje zahrnuje tento druh spektrometru interferometr fungující nejčastěji na principu Michelsonova interferometru (viz obr. 5), jehož hlavními prvky jsou dělič paprsků, pohyblivé a pevné zrcadlo. Pro střední infračervenou oblast se využívá jako dělič paprsků polopropustné zrcadlo, které je zhotoveno depozicí tenké germaniové vrstvy na destičku z bromidu draselného. Rozvoj FTIR spektrometrie umožnil i rozvoj infračervené mikroskopie.¹⁷



Obrázek 5: Michelsonův interferometr ¹⁹

1.5 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je metodou vibrační molekulové spektroskopie. Jedná se o metodu, která je vhodná pro identifikaci látek, při zjišťování jejich složení a struktury. Uplatňuje se při analýze pevných látek (krystalické i amorfni materiály, kovy, polovodiče, polymery atd.), kapalin (čisté látky, roztoky vodné i nevodné), plynů, dále také při analýze povrchů (např. sorbenty, elektrody, senzory) anebo při analýze biologických systémů (od biomolekul až po organismy).³

1.5.1 Historie

Ramanova spektroskopie se rozvinula v první čtvrtině 20. století, kdy byl rozptýl monochromatického záření se změnou frekvence předvídan teoreticky rakouským kvantovým fyzikem Adolfem Smekalem. Jeho práce však zůstala bez povšimnutí. Rozptýl byl poté dlouho dobu studován např. Rayleighem (1871), Einsteinem (1910) a dalšími, ale nikdo z nich nezpozoroval změny frekvencí záření s jedinou výjimkou u X-paprsků sledovaných Arthurem Hollym Comptonem.

Profesor Chandrasekhara Venkata Raman společně s K. S. Krišnanem objasnili v roce 1928 jev neelastického optického rozptylu, který se stal základem metody. Od té doby byl tento jev označován po něm jako Ramanova spektroskopie a za výsledky své práce při studiu rozptylu světla a za objev tzv. Ramanova jevu získal Nobelovu cenu. Stejný objev a téměř ve stejnou dobu se podařil i L. I. Mandelštamovi a G. S. Lansbergovi, kteří však stejně jako Ramanův spoluobjevitel Krišnan Nobelovu cenu nezískali.¹

1.5.2 Princip metody

Principem Ramanovy spektroskopie je měření rozptýleného záření, vznikající při průchodu hmotným předmětem tedy vzorkem o velikosti částic na molekulové úrovni. Působící záření je monochromatické z oblasti UV/VIS až blízké infračervené, které interaguje s molekulami vzorku za současné změny jejich vibračních a rotačních stavů. Nicméně zvolené monochromatické záření nesmí být absorbováno vzorkem.²⁰

Při analýze rozptýleného záření pod úhlem 90° vzhledem ke směru záření ze zdroje bylo zjištěno, že přibližně část 10^{-5} intenzity záření, které dopadá na vzorek je rozptýlováno a dále, že téměř 1 % tohoto rozptýleného záření má odlišnou frekvenci než záření ze zdroje. Rozptýlené záření, jehož frekvence je shodná s frekvencí zdroje, se označuje jako Rayleighův rozptyl.¹ Tento rozptyl je považován za pružný a jedná se o proces dominantní. Rozptýlené záření používá monochromatické záření o určité vlnové délce, které nebude vzorkem pohlcováno a není tak schopno excitovat elektron. Průchod tohoto záření může rozkmitat molekulu složky. Nepochopitelně molekula se dokáže v elektrickém poli polarizovat a vytvořit indukovaný dipól. Svým polem pak může působit na molekulu i elektromagnetické záření. Vzhledem k tomu, že magnetická i elektrická složka záření vibrují určitou frekvencí, vzniklý dipól se rozkmitá stejnou frekvencí. Molekula tak převezme energii od fotonu. Přebytečnou energii hned ztratí při vyzařování záření stejné frekvence, ale menších amplitud do všech směrů a vrátí se do původního energetického stavu. Takhle se např. rozptyluje sluneční záření v čisté atmosféře.²⁰

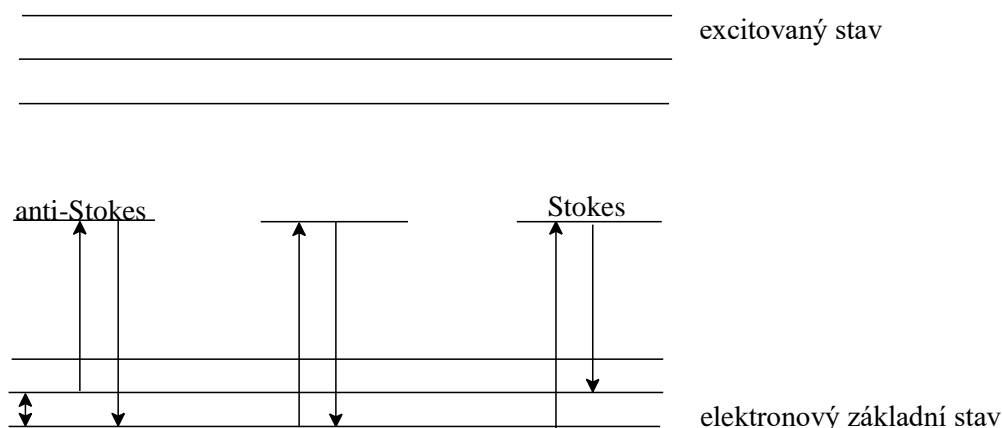
Pokud má rozptýlené záření rozdílnou frekvenci, než je frekvence zdroje, jedná se o proces zvaný Ramanův rozptyl. Tento rozptyl je neelastický a energie rozptýleného fotonu je odlišná od dopadajícího fotonu o jednu vibrační jednotkou. Vibrující molekula se nevrátí zpět na původní hladinu, ale zaujala jiný rotační a vibrační stav. Tato změna nastala ale odlišným způsobem než v infračervené spektrometrii, u které se tento stav mění přímo absorpcí infračerveného záření. Zvýšení vibrační energie si lze představit také tak, že došlo k nepružné srážce fotonu s molekulou, při které foton část své energie přenechal molekule.²¹ Frekvence Ramanova záření je dána součtem a rozdílem frekvence budícího záření ze zdroje a frekvence kmitů v molekulách vzorku, tedy $(\nu_0 \pm \nu_v)$. Podmínkou vzniku tohoto rozptylu je, aby docházelo ke změně polarizovatelnosti během vibrace vazby ve studované molekule.¹

Polarizovatelnost molekuly určuje míru schopnosti posouvat náboje v molekule účinkem elektrického pole v průběhu vibrace a vytvářet indukovaný dipól. Tuto schopnost mají zejména nepolární části molekul, kdežto části polární jsou málo polarizovatelné. Proto se v Ramanově spektru projevují intenzivními pásy především vibrace nepolárních vazeb se symetrickým rozdělením náboje, jejichž polarizovatelnost se při vibraci výrazně mění. Jako příklad je možno uvést C=C, C-C, C≡C, C-S nebo S-S vazeb, jejichž vibrace jsou aktivní v Ramanově spektru narozdíl od spektra infračerveného, kde mají málo intenzivní absorpci. Polarizovatelnost molekuly má také blízký vztah k charakteru molekulových orbitalů a změna polarizovatelnosti je vyvolána jejich deformací.

Dalším příkladem jsou valenční vibrace CO₂. Symetrická vibrace O=C=O nesměruje ke změně celkového dipólového momentu molekuly, z tohoto důvodu není v infračerveném spektru aktivní, ale polarizovatelnost se během vibrace mění, proto tato vibrace dává intenzivní pás v Ramanově spektru. Zatímco antisymetrická vibrace O=C=O vyvolává změnu dipólového momentu, projeví se ve spektru infračerveném. Změny polarizovatelnosti se navzájem ruší a vibrace se neprojeví v Ramanově spektru. Lze tedy říci, že Ramanovo spektrum poskytuje informace o nepolárních vazbách, kdežto infračervené spektrum informace o polárních funkčních skupinách molekul.²

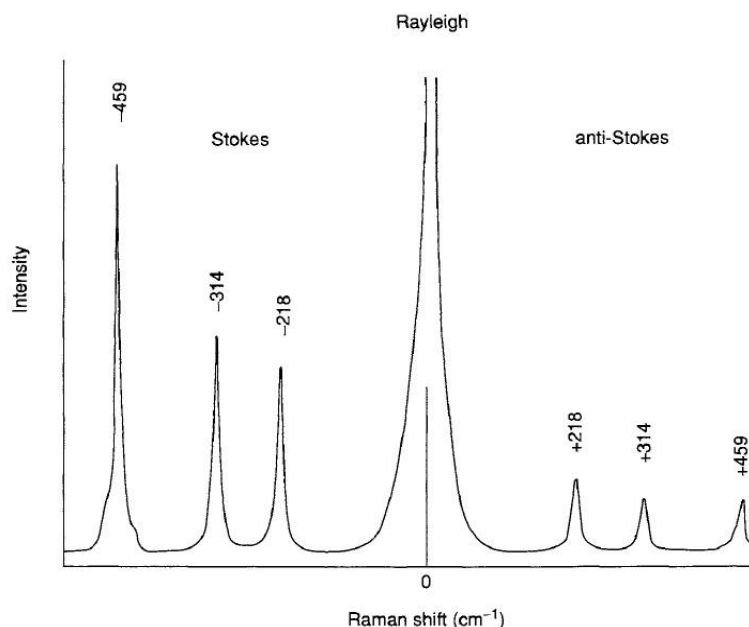
V Ramanově spektru se vyskytují pásy s nižším vlnočtem rozptýleného záření, než je vlnočtem záření dopadajícího. Tyto pásy souvisí s návratem molekuly na vyšší elektronovou a vibrační hladinu po vyzáření nadbytečné energie, než byla hladina původní. Vyzářená energie bude pak menší než energie přijatá. V pozorovaném spektru rozptýleného záření pak vedle pásu s vlnočtem, odpovídajícím Rayleighova rozptylu, vzniknou pásy nazývané jako Stokesovy, nacházející se v Ramanově spektru v oblasti nižších frekvencí.²⁰

Naopak, pokud je molekula před přijetím energie od fotonů ve vyšším vibračním stavu a vrací se po vyzáření energie zpět do nižšího nebo základního stavu, vznikají v registrovaném spektru tzv. anti-Stokesovy pásy (viz obr. 6). Vyzářená energie je pak vyšší než energie přijatá a rozptýlené záření má větší vlnočty než záření dopadající. Tyto pásy lze pozorovat v oblasti vyšších frekvencí Ramanova spektra.



Obrázek 6: Ramanův rozptyl ²²

Intenzita pásů anti-Stokesových je menší než pásů Stokesových, protože se před excitací ve vyšší hladině nachází pouze malé množství molekul. Nicméně jejich vzdálenost od Rayleighovy linie je stejná (viz obr. 7). V řadě praktických případů jsou však měřena spektra pouze v oblasti Stokesova rozptylu, a to s ohledem na nezbytnost odfiltrovat Rayleighův rozptyl, jehož intenzita je zhruba $10^5 - 10^{12}$ krát vyšší než intenzita obvyklých Ramanových linií.²¹



Obrázek 7: Stokesovy a anti-Stokesovy pásy ²³

Ramanovo spektrum je většinou registrován jako rozdíl hodnot frekvencí primárního záření a rozptýleného záření a vzniklé signály se nazývají jako Ramanův posun. Poloha signálů není závislá na vlnočtu použitého budícího záření. Totéž platí pro změnu rotačních stavů molekuly. Hodnota rozdílu je tedy mírou energie, která je potřebná pro změnu vibračního a rotačního stavu molekuly, a je tudíž analogií údajů získaných

infračervenou spektrometrií. Také se tato hodnota rovná vlnočtu některého absorpčního infračerveného pásu a vlnočty odpovídají stejným vibračním a rotačním přechodům. Poloha Ramanových spekter je dána stejnými faktory jako v IČ spektroskopii. Mezi tyto faktory zejména patří hmotnost vibrujících atomů, silové konstanty a geometrie molekul. Podstatný rozdíl je především v aktivitě vibrací.²⁰

1.5.3 Interpretace Ramanových spekter

Ramanova spektra stejně jako spektra infračervená poskytují informace o vibračních a rotačních pohybech polyatomických částic (molekul, krystalů atd.). Obecně vzato, identifikační možnosti Ramanovy spektrometrie jsou porovnatelné s potenciálem infračervené spektrometrie. Je zapotřebí upozornit na to, že vibrační frekvence molekul jsou nezávislé na tom, zda je studujeme infračervenou nebo Ramanovou spektroskopií, ale intenzity spektrálních linií budou pro obě spektroskopické techniky zřetelně odlišné.

V Ramanově spektru je intenzita pásů úměrná druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibračního pohybu, kdežto v infračerveném spektru je úměrná druhé mocnině změny dipólového momentu molekuly.

Vzhled infračervených a Ramanových spekter je tak silně ovlivněn symetrií molekul (buněk krystalu) a symetrií jednotlivých vibračních pohybů. Pro molekuly s nízkou symetrií jsou pásy všech vibrací pozorovatelné v obou typech spekter, ale s rozdílnou intenzitou. Pro molekuly s vysokou symetrií se stávají spektrum infračervené a Ramanovo navzájem doplňkovými. Např. pro molekuly se středem symetrie platí princip alternativního zákazu, tj. pásy vibrací zjevné v Ramanově spektru jsou zakázány v infračerveném spektru a naopak; plně symetrické vibrace jsou aktivní v Ramanově spektru a v infračerveném spektru jsou inaktivní.

Na rozdíl od infračervených spekter je možno velmi snadno identifikovat i řadu symetricky substituovaných skupin, resp. skeletů molekul. Například symetricky substituovaná trojná vazba se běžně projevuje značně silným pásem valenční $C\equiv C$ vibrace v oblasti cca 2260 až 2160 cm^{-1} . Lze ji jednoznačně rozeznat od nesymetricky substituované $C\equiv C$ vazby asi 2180 – 2100 cm^{-1} , eventuálně lze identifikovat více trojných vazeb v jedné molekule. Dále se v Ramanových spektrech zřetelně projevuje dvojná $C=C$ vazba svojí valenční vibrací v oblasti cca 1690 – 1630 cm^{-1} pro nekonjugované alkeny, resp. v oblasti 1660 – 1580 cm^{-1} pro konjugované alkeny. Naopak pouze slabými pásy se

projevují C=O vazby, ať již v ketonech, esterech, amidech atd. Kombinací Ramanovy a infračervené spektroskopie lze pak jednoznačně přiřadit konkrétní pásy v oblasti 1750 – 1580 cm^{-1} ať již vibracím C=O nebo C=C nebo identifikovat odlišný původ pásu.

Pomocí Ramanovy spektroskopie lze úspěšně charakterizovat technicky významné prvkové materiály, např. uhlíkové materiály (grafitické vrstvy, saze, přírodní i umělé diamanty atp.) a křemíkové materiály (elektronika) na rozdíl od infračervené spektroskopie. Dále pak je možno studovat anorganické materiály obsahující těžké prvky, např. korozní oxidické, (di)sulfidické vrstvy pro slitiny těžkých kovů (koroze materiálů v přírodním nebo výrobním prostředí). Při studiu polypeptidů a proteinů je významná možnost sledovat symetrické valenční S-S vibrace disulfidických můstků (např. rovnováha cystin – cystein).

Z hlediska kvalitativní informace lze porovnávat měřená spektra čistých látek s knihovny spekter, a tak provádět identifikaci látek. Ramanovo spektrum je pro identifikaci výborným „otiskem palce“, především je-li při porovnávání změřených a databázových dat dodržena podmínka, že Ramanova spektra byla získána pro stejný fyzikální stav látky. V porovnání s infračerveným spektrem bývá Ramanovo spektrum jednodušší a přehlednější. Ramanova spektra se také využívají pro kvantitativní analýzu. Ramanova spektrometrie se v poslední době uplatňuje i při analýzách životního prostředí či v medicíně chemii.

Samotné měření je relativně rychlé mnohdy nedestruktivní a nevyžaduje obvykle žádnou speciální úpravu vzorku. Minimalizuje se tak spotřeba chemikálií, jednorázově použitelných analytických setů, a tím i generování životního prostředí zatěžujících odpadů. Lze měřit vzorky ve skleněných i některých dalších transparentních obalech. Voda se projevuje jen slabými pásy, a proto je možné snáze než v případě infračervené spektrometrie analyzovat i vodné roztoky. Navíc, optické materiály používané v Ramanově spektroskopii nejsou většinou citlivé na vlhkost. Značně pracnější a časově výrazně náročnější, než samotné měření spekter je mnohdy následné zpracování a vyhodnocování naměřených dat.³

1.5.4 Instrumentace

Pro Ramanovu spektrometrii se užívají jak disperzní spektrometry, tak spektrometry s Fourierovou transformací (FT). Hlavními prvky spektrometru jsou: zdroj

excitujícího záření (laser), vzorkovací prostor (komora), sběrná optika, disperzní prvek (disperzní spektrometry) / interferometr (FT spektrometry) a detektor.

Jako zdroje záření je možné použít různé typy laserů emitující viditelné (VIS) záření, blízké infračervené (NIR) záření, eventuálně i ultrafialové (UV) záření. U jednoduchých spektrometrů je k dispozici jeden laser, většinou pevnolátkový či diodový, který pracuje v kontinuálním nebo kvasikontinuálním režimu. U vědeckých systémů jsou připraveny optické cesty pro několik laserů, umožňujících upravit vlnovou délku excitace řešené problematice. Pozitivem excitace v UV/VIS oblasti je vyšší intenzita rozptylu, protože intenzita rozptylu klesá se čtvrtou mocninou vlnové délky excitujícího záření. Naopak podstatnou nevýhodou jsou rizika velmi intenzivní fluorescence nebo nežádoucích fotochemických reakcí. Tato rizika jsou dána polohou virtuální hladiny v oblasti elektronově excitovaných hladin. Potlačení nežádoucích fotochemických a fotofyzikálních dějů je hlavní výhodou excitace Ramanova jevu v NIR oblasti, kdy virtuální hladina je pod úrovní elektronově excitovaných hladin. NIR excitace je vzhledem k nižší intenzitě rozptylu požaduje systémy o vysoké světelnosti a vysoce citlivé detektory, které je zapotřebí chladit. Výkon laseru je ale limitován riziky ohřevu vzorku, jeho rozkladu, příp. riziky dalších nežádoucích fotofyzikálních a fotochemických procesů. Výkon laseru je možné běžně softwarově nastavit a upravit jeho hodnotu vlastnostem vzorku, požadavkům na rychlost analýzy a na hodnotu poměru signál/šum.

Ramanova spektra se obvykle měří se vzorky umístěnými v uzavřené vzorkové komoře. Komoře je zpravidla přizpůsobena pro měření vzorků v různých skleněných vzorkovnicích (vialkách, ampulích, kyvetách pro UV-VIS spektrometrii nebo kyvetách pro NMR spektrometrii). Takto je možné lehce měřit kapaliny či práškové vzorky v celkovém objemu několika stovek mikrolitrů. Mimo jiné existuje řada různých speciálních držáků, například pro makroskopické měření pevných vzorků. Přístroje jsou mnohdy opatřeny x-y-z polohovacím zařízením, ať už s manuálním ovládním nebo pomocí joysticku, tlačítek anebo ovládacího softwaru.

Mikrospektrometrické měření, kdy je Ramanův spektrometr propojen na optický mikroskop, se používá zejména v případě analýzy povrchů včetně jejich spektrálního mapování.

Z rozptýleného záření je nutné nejprve odfiltrovat Rayleighův rozptyl pomocí filtru. Tím pro obvyklé přístroje dochází ke ztrátě informace v oblasti Ramanových posuvů $\pm 100 \text{ cm}^{-1}$ okolo polohy excitační linie. Kvalitnější přístroje většinou umožňují měřit spektra blíže k excitační linii, a to až k hodnotě pouhých 10 cm^{-1} .

Pro zpracování a detekci rozptýleného záření se v nynější době běžně používají dva výše uvedené typy konstrukce Ramanova spektrometru. Při excitaci Ramanova efektu ve VIS (příp. UV, NIR) oblasti je využíván dispersní přístroj s mřížkovým spektrografem a „plošným“ CCD detektorem. Při registraci Ramanova rozptylu v blízké infračervené oblasti je mnohdy používán interferometr a vysoce citlivý jednobáňový detektor. Jako optický materiál se v uvedených oblastech často užívá kvalitní křemenné sklo.³

1.5.5 Rezonanční Ramanova spektroskopie

Rezonanční Ramanova spektroskopie je varianta „normální“ Ramanovy spektroskopie. „Normální“ Ramanova spektroskopie používá laser k excitaci molekul při jakékoliv vlnové délce, aby byl změřen Ramanův rozptyl tohoto laserového světla. Bez ohledu na mnoho praktických problémů způsobených použitím různých laserových vlnových délek, je konečný výsledek velmi podobný bez ohledu na vlnovou délku, která byla použita.

V rezonanční Ramanovy je excitační vlnová délka pečlivě vybírána, aby docházelo k překrytí elektronového přechodu nebo aby byl přinejmenším v jeho blízkosti. Tím vzniká viditelná absorpce v UV oblasti. Takové překrytí může mít za následek rozptyl záření, který se zvýší v řádu $10^2 - 10^4$. Mez detekce a doba měření je tím výrazně snížena.

Rezonanční Ramanova spektroskopie se takto stává mnohem citlivější technikou, a protože pouze chromofor poskytuje účinnější rozptyl, bude také selektivní pro části molekuly zahrnující chromofor. Chromofor je molekula citlivá na světlo, která absorbuje světelná kvanta s vhodnou vlnovou délkou. Tato kvanta nějakým způsobem změni stav molekuly, např. zkroutí ji, excitují, změni její vodivost atp. Když nastane stav rezonance, je možné získat elektronickou i vibrační informaci ze vzorku. Jedním z klíčových důvodů, proč se tato technika stala důležitější je, že molekuly vedou k velmi dobrému Ramanovu rozptylu. Zahrnují kruhy porfyrinu, které jsou přítomny ve středu řady klíčových enzymů a pigmentů, vyrobených z ftalocyaniny a dalších důležitých tříd molekul, jako jsou

polyacetylenů. U těchto druhů rezonanční Ramanův rozptyl může dát velmi informativní analýzu a z tohoto důvodu je použití této rezonance v posledních letech velmi oblíbené.²¹

1.5.6 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie je metoda povrchem zesílené vibrační spektroskopie, umožňující citlivou identifikaci anorganických i organických látek. Tato technika využívá k zesílení slabého Ramanova signálu energii povrchového plazmonu, vznikající při absorpci elektromagnetického záření určité vlnové délky na povrchu nanočástic z ušlechtilých kovů, např. zlato, stříbro či měď. Po smísení roztoku analytu se suspenzí stříbrných nanočástic, získáme jednoduchý systém pro měření zesílených spekter Ramanova rozptylu.

Největší výhodou SERSu je, že právě díky povrchovému zesílení spektrální odezvy je možné detegovat i velmi malé koncentrace analytu, případně několika analytů. Intenzita signálů v zesílených spektrech je oproti nezesíleným spektrům o několik řádů vyšší, v případě SERS je běžné zesílení o více než 6 řádů, v tzv. „hot spot“ i o více než 10 řádů. Další nezanedbatelnou výhodou této metody je i to, že efektem povrchu je účinně zhasena fluorescence, která u silně fluoreskujících látek často zcela překrývá signál Ramanova rozptylu.²⁴

1.5.7 Využití Ramanovy spektroskopie

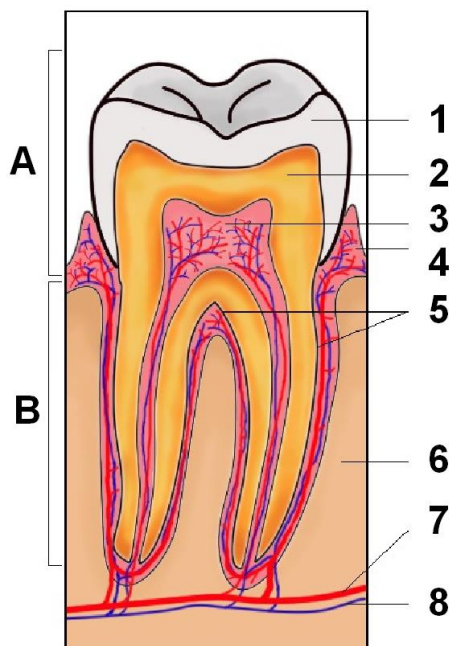
Rozsah použití Ramanovy spektroskopie je velice široké a nevztahuje se jen na jeden vědní obor. Můžeme s ní setkat v chemických oborech, forenzních vědách, kde se uplatňuje při analýze drog a farmaceutik, barev, inkoustů i vláken. Dále se používá v mineralogii při identifikaci minerálů, geologii, medicíně, umění a dalších oborech.³

1.6 Obecná charakteristika zubů

Zuby, latinsky dentes jsou tvrdé kostní útvary nacházející se v dutině ústní. Slouží především k ukusování, oddělování a rozměňování potravy a v neposlední řadě také k obraně a útoku. Pomáhají při správné artikulaci a jejich funkce je také estetická. Soubor zubů se nazývá chrup neboli dentice. Zdravý dospělý člověk má celkem 32 zubů.²⁵

Každý zub se skládá ze tří základních částí, a to korunky, krčku a kořene. Korunka je ta část, která vyčnívá do dutiny ústní a skládá se ze skloviny, zuboviny a zubní dřně. Kořen, který upevňuje zub v lůžku, má částečně odlišnou stavbu než korunka. Skládá se z vaziva, cementu, zuboviny a zubní dřně. Většinou část zubu

tvoří zubovina, která je v oblasti korunky pokrytá sklovinou a v oblasti kořene cementem. Uvnitř zuboviny se nachází dutina, která je vyplněna dřeví. Do dřevové dutiny pronikají kanálky obsahující drobné cévy a nervy, které jsou příčinou citlivosti zubů (viz obr. 8).²⁶



A – korunka, B – kořen, 1 – zubní sklovina, 2 – zubovina, 3 – zubní dřeň, 4 – dásen, 5 – zubní cement, 6 – čelistní kost, 7 – céva, 8 – nerv

Obrázek 8: Stavba zubu ²⁷

1.6.1 Sklovina

Povrch korunky pokrývá vrstva zubní skloviny, nejtvrďší mineralizovaná část v lidském těle obsahující vysoký podíl minerálních látek. Sklovina je bílá, nažloutlá nebo mírně našedlá hmota, která se skládá z 95 % z anorganického materiálu zejména hydroxylapatitu a ze 4 % z vody. Zbylé 1 % představují organické látky, mezi které patří proteiny a lipidy. Její síla se pohybuje mezi jedním až třemi milimetry. Je velmi odolná vůči vnějším vlivům, ale při poškození se již nedá regenerovat a nemůže se plně obnovit. Na povrchu skloviny je tenká Nasmythova blanka, která s věkem postupně mizí.²⁸

1.6.2 Zubovina (dentin)

Největší část lidského zubu tvoří dentin neboli zubovina, která kryje zubní dřeň. Jde o pevnou, ale elastickou tkáň, která je tvořena velkým počtem paralelních tubulů, které jsou umístěny v mineralizované kolagenní matrix. Dentin společně se sklovinou tvoří tvrdou a pevnou strukturu, která je schopná ubránit se velkým tlakům žvýkání

a chrání před obrušováním a zlomeninám. V kořenové části obklopuje dentin cement, který umožňuje kotvení zubu pomocí periodontálních vláken v zubním lůžku. Od skloviny se odlišuje dentin dvěma hlavními vlastnostmi, a to citlivostí a jeho vytvářením během celého života.²⁸

Dentin je žlutobílá zvápenatělá tkáň podobná kosti, od které se liší především tím, že je tvořena buňkami zvané odontoblasty. Je tvrdší než kost, ale není tak tvrdý a pevný jako sklovina. Na rozdíl od skloviny je méně mineralizován, což umožňuje zubu určitou flexibilitu. Obsahuje 70 % anorganických látek, zejména krystaly kalciumhydroxyapatitu, které se nacházejí na kolagenních fibrilách a mezi nimi a 20 % organických látek. Zbytek objemu tvoří voda.²⁹

Skládá se z buněk zvaných odontoblasty a mezibuněčné hmoty, která je produkována těmito buňkami a je tvořena složkou fibrilární a amorfni. Tento proces se nazývá dentinogeneze. Odontoblasty lemují vnitřní část dentinu a oddělují dentin od zubní pulpy. Každá buňka vysílá dlouhý tenký výběžek tzv. Tomensovo vlákno hluboko do dentinu směrem k povrchu skloviny. Funkce odontoblastů je tvořit dentin, představovat vnitřní strukturu dentinu v závislosti na funkci a podílet se při regeneraci zuboviny.³⁰

Dentin existuje ve třech formách, jako primární, sekundární a terciární. Primární dentin je ten, který se vytvořil do ukončení vývoje kořene. Po kompletním prořezání zubu podstoupí dentin řadu změn, které závisí na věku nebo jsou odpovědí na vnější vlivy jako je kaz nebo atrice. Tvorba sekundárního dentinu je asi nejvýraznější změnou související s věkem. Vzhledem k podobné struktuře je někdy náročné rozeznat primární dentin od sekundárního. Tvorba sekundárního dentinu začíná až po dokončení vývoje kořene a probíhá po celý život. Neukládá se stejnoměrně, rychleji se vytváří na stropě a dně dřevné dutiny a v blízkosti odstupu kořenového kanálku. Tím vzniká asymetrická redukce velikosti a tvaru dřevné dutiny během života. Zubní dřev je někdy nucena mimo obvyklou tvorbu primárního a sekundárního dentinu vytvářet i dentin terciární, který vzniká při reakci dřevě na počínající zubní kaz, preparaci nebo zranění.²⁸

Při poškození primárních odontoblastů vlivem vnějších vlivů, dochází ke tvorbě kazu. Vzhledem k odlišnému složení skloviny a dentinu proniká kaz jinak než ve sklovině. Dentin je značně méně mineralizován a obsahuje dentinové tubuly, které dovolují průnik kyselin dovnitř dentinu, a naopak únik minerálních látek z dentinu. Dentino-sklovinné spojení je oblast s nejmenší odolností proti kazu a umožňuje jeho

rychlý postup. V dentinu se kaz šíří rychleji než ve sklovině, odezva na to je demineralizace, remineralizace a bolest. Pulpodentinový komplex reaguje na kaz remineralizací, která směřuje k uzavření dentinových tubulů a tím chrání před dalším postupem kazu.²⁸

Na povrchu dentinu vzniká vrstvička tzv. sprašná vrstva. Tato vrstva je 3 – 15 µm silná mikroskopická drť tvrdých zubních tkáních, obsahující organické i anorganické složky, mikroorganismů a nekrotické tkáně, která se usazuje v kavitě a stěnách kořenových kanálků po úpravě rotačními nástroji (endodontické ošetření, brousky, vrtačky, atd.). Sprašnou vrstvu je takřka nemožné odstranit vodním sprejem. Pevně ulpívá na povrchu dentinu a její přítomnost ovlivňuje vazbu výplňových materiálů, protože v dentinu zakrývá ústí do dentinových tubulů.²⁸

V endodoncii, což je jedna ze specializací zubního lékařství, zabývající se zubní dření a tkáněmi zubních kořenů, se využívá pro odstranění anorganické složky sprašné vrstvy EDTA neboli kyseliny ethylendiaminotetraoctové při výplachu kořenových kanálků. Tato kyselina a její soli jsou významnými chelátory, které s přechodnými kovy vytváří stabilní komplexy rozpustné ve vodě.³¹ Jako další metoda se používá tzv. totálního leptání 37 % kyselinou fosforečnou, která ve formě gelu neleptá pouze sklovinu, ale v kratším čase také dentin. Užití kyseliny na povrch vypreparované kavity v dentinu způsobí v rozmezí několika sekund rozpuštění vrstvičky preparační drtě. Poté dochází rovněž k rozpuštění minerálních komponent dentinu. Díky tomu se zvětší vstupní průměr dentinových kanálků, povrchové bílkoviny se denaturují a odhalí se síť kolagenních vláken. Do této sítě pak lze umístit kompozitní nebo kompomerní materiál.²⁸

1.6.3 Cement

Cement je tenká ale velmi tvrdá pojivová tkáň pokrývající dentin v kořenové části. Je světle žlutý a má matný povrch. Patří k závěsnému aparátu zubu, neboť se podílí na upevnění zubu v zubním lůžku. Svým složením, tvrdostí a vývojem se velice podobá kosti, nicméně jim neprocházejí cévy a neinervuje se. Skládá se z buněk označované jako cementocyty a základní substance. Základní hmotu cementu tvoří z 65 % anorganické látky, z 23 % látky organické a zbylých 12 % je voda. Anorganické látky jsou zejména vápník a fosfor ve formě apatitu a fosforečnanu vápenatého. Organická složka je z 90 % tvořena kolagenními vlákny a malým množstvím interfibrilární hmoty.³²

Cement je na povrchu zubu různě silný, nejsilnější vrstva se nachází na kořenovém apexu a u vícekořenových zubů v interradikulární oblasti (50–200 μm , někdy může přesáhnout až 600 μm) a nejtenčí vrstva cementu je v krčkové části (10–15 μm).

Vnější povrchem cement naléhá na periodontální vlákna a svým vnitřním povrchem se připojuje k dentinu. Jeho funkcí je umožnit navázání periodontálních vláken a tím přispět k pružnému upevnění zubu v zubním lůžku. Cement postupně vzniká během celého života, a to umožňuje opětovné uchycení periodontálních vláken. Stejně jako u dentinu, je na povrchu malá vrstvička, která není kalcifikovaná. Nazýváme ji precement.²⁸

1.7 Význam růstových faktorů v dentinových kanálcích

Endodontická léčba nezralého stálého zubu s odumřelou zubní dřeví je jedna z nejnáročnějších možností léčby v endodoncii. Standardní způsob léčby zubů s infikovanou dřeví je ošetření kořenového kanálku, které zahrnuje úplné odstranění nekrotické dřevě, chemicko-mechanickou úpravu a ucpání stěn kořenového kanálku. Léčba nezralých zubů je ztížena několika problémy, které s vyžralými zuby spojeny nejsou. Kvůli tenkým stěnám kořenového kanálku nezralých zubů je možnost mechanické úpravy významně omezená či zcela znemožněna, a i po takovéto péči jsou velmi náchylné na zlomení.⁴ Ucpání je ve všech směrech velice náročné a často končí vytlačováním látek kvůli velmi širokému nebo otevřenému zubnímu kanálku. Prognóza konvenčně ošetřených nezralých zubů je poměrně špatná a vede ke ztrátě zubů dříve, než pacient dosáhne dospělosti. Takto brzká ztráta zubu je velice náročná pro implantologickou nebo protetickou rekonstrukci.

Všechny ze zmíněných nevýhod konvenční léčby zubního kanálku mohou být vyřešeny speciálním regenerativním způsobem léčby. I přesto, že výsledek této procedury zůstává být nepředvídatelný, v případě, že se povede ztenčení stěn kořenového kanálku a prodloužení délky kořene, může být zlepšena dlouhodobá prognóza zubu.

Ačkoliv bylo prokázáno *in vitro*, že izolované kmenové buňky zubního původu jsou schopny tvořit tkáň podobné dřeví s ukládáním tubulárního dentinu v případě, že jsou transplantovány ve vhodném nosném systému. Tento přístup na bázi buněk je ovlivněn několika problémy⁵, a to nadměrné finanční náklady léčby jednoho zubu spolu s omezenou dostupností kmenových buněk dělají tuto proceduru neproveditelnou pro případy jako je např. apikální parodontitida⁶, což je bakteriální zánět vycházející z oblasti

hrotu kořene mrtvého zubu. Jako alternativní možnost by mohl být bezbuněčný přístup regenerativního ošetření. Tento způsob léčby se zdá být proveditelný, neboť byl prověřen nedávnými lékařskými zprávami a hlášeními.

Tento bezbuněčný přístup se spoléhá na doručení buněčného lešení, které je bohaté na růstové faktory a může obsahovat kmenové buňky nebo je schopno tyto buňky, sídlící v periapikální oblasti přitáhnout. Velmi důležitým krokem je také podmínění povrchu dentinu, protože extracelulární matrice dentinu je bohatá na růstové faktory, které byly zapuštěny během dentinogeneze do šablony kolagenu v průběhu mineralizace.⁷ Ty mohou být uvolněny pomocí demineralizace, která se vyskytuje ve shnilých lézích³³ nebo může být vyvinuta podmíněním specifickou látkou, jako je například kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA).^{5,34} Až do dnešního dne bylo vyčísleno jediné množství uvolněných růstových faktorů z dentinového prachu^{35,36,37} nebo přímo z dentinu.³⁴ Tyto uvolněné růstové faktory jsou použity pouze na vnější aplikaci na povrch zubu a po provedení procedury již nejsou na povrchu stěny kořenového kanálku nadále k dispozici. Pokud je nám známo, množství expozice růstových faktorů na povrch nebylo zatím prostudováno.

Růstové faktory extracelulárních dentinových matric, které by měly hrát nejvýznamnější roli v regeneraci dřevnatého dentinu, přeměňují růstový faktor- β 1 (TGF- β 1), kostní morfogenetický protein-2 (BMP-2) a růstový faktor základního fibroblastu (β FGF).

TGF- β 1 hraje důležitou roli během odlišování kmenových buněk zubní dřevě na odontoblasty⁸ a produkci dentální extracelulární matrice. BMP-2 má silný osteoinduktivní a chondrogenický efekt, který je dobře popsán tak, že stimuluje dentinogenezi v odontoblastech nebo buňkách podobných odontoblastu.³⁸ β FGF je silným mitogenem a stimuluje množení kmenových buněk zubní dřevě a zvyšuje jejich potenciál pro diferenciaci.³⁹

Dosavadní případy revaskularizace neboli obnovení cévního zásobení používaly vysoce koncentrovaný chlornan a vícenásobnou prozatímní medikaci směsí antibiotik za účelem kontroly bakteriální infekce.⁴⁰ Koncentrace antibiotik v těchto směsích dosáhla 1 g/ml, což bylo následně zjištěno jako cytotoxické množství pro kmenové buňky apikální papily⁴¹ a byly navrženy nižší koncentrace 1 mg/ml, nebo užití Ca(OH)_2 .⁴² Později bylo prokázáno, že úprava dentinu vysokou koncentrací chlornanu může mít

negativní vliv na přežití a diferenciaci kmenových buněk od apikální papily⁴³ a zabránění připojení kmenových buněk k dentinu.⁴⁴

V roce 2007 Americká asociace endodontistů v souladu s Americkou akademií pediatrické stomatologie navrhli první léčebný protokol pro regenerativní endodontickou terapii. Ten byl od té doby několikrát opětovně prozkoumán, naposledy v dubnu 2015. Tento léčebný protokol následuje spíše laboratorní postupy, než klinické zkušenosti popsané v kazuistikách nebo jejich sériích. Skládá se z krátkodobého užívání málo koncentrované trojitě antibiotické pasty, nebo Ca(OH)_2 a rozšířeného využití kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA). Toto minimalizuje poškození extracelulární matrice dentinu a zlepšuje uchycení a životaschopnost kmenových buněk z apikální papily.⁴⁵ Na druhou stranu experimenty ukazují, že zbytkové bakterie přetrvaly v nepřístrojovém vybrání kořenových kanálků a šíje, a že je možné je zcela odstranit vysokým procentem chlornanu sodného⁴⁶, nebo léčebným protokolem o dvou návštěvách.⁴⁷ V důsledku toho je dosažení cíle mikrobiální redukce pomocí léčby kořenových kanálků méně pravděpodobné a může vést k nižší úspěšnosti primárního cíle, kterým jsou regenerativní endodontické procedury.⁴⁸

1.8 Další metody, vyhledávající růstové faktory na povrchu dentinu

Pomocí imunohistochemie a konfokální mikroskopie byly zkoumány kmenové buňky získané z dentální buničiny pro zjištění, že kmenové buňky mají potenciál regenerovat dentin a zubní buničinu z důvodu jejich diferenciací kapacity a angiogenních vlastností. Buňky byly izolovány ze třetích molárů člověka a rozšířeny za standardních kultivačních podmínek obsahujících fetální bovinní sérum, nebo sérum lidské. Poté byly nasazeny do zubního řezu a implantovány do imunodeficientních myší. Po 30 dnech byly zuby nakrájeny a vyhodnoceny. Po kultivaci měly kmenové buňky obsahující fetální bovinní sérum koncentraci angiogenních růstových faktorů ekvivalentní s buňkami obsahující lidský sérum. Navíc v kmenových buňkách, které obsahovaly lidský sérum, se produkovalo několik angiogenních faktorů nejméně v 1krát vyšších koncentracích než u buněk obsahující fetální bovinní sérum. Tyto nálezy tedy ukazují, že kmenové buňky z dentální buničiny mohou být izolovány a rozšiřovány bez živočišného séra nebo exogenních růstových faktorů a stále si zachovávají regenerační vlastnosti buničiny. Důsledky těchto nálezů jsou významné pro další vývoj klinických protokolů s použitím těchto buněk v buněčné terapii.⁴⁹

Dále pomocí skenovací elektronové mikroskopie byly zkoumány účinky rekombinantních růstových faktorů na tvorbu terciárního dentinu a intratubulární mineralizaci po aplikaci na hluboké dentinální dutiny v zubech psa. Léčba zahrnovala zubní leptání 37 % kyselinu fosforečnou a aplikaci bioaktivních molekul. Kontrolní skupiny byly ošetřeny 0,1 % psí sérovým albuminem ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem, přičemž byly vynechány růstové faktory. Toto bylo provedeno jak s dentinálním leptáním, tak bez něj. Dentinální odezvy týkající se tvorby terciárního dentinu a intratubulární mineralizace byly hodnoceny po 3 a 8 týdnech, za použití lehké a skenovací elektronové mikroskopie. Některé vzorky byly také podrobeny zkoušce propustnosti dentinu. Výsledky ukázaly, že skupina léčená transformačním růstovým faktorem- β 1 (TGF- β 1) vykazovala signifikantně vyšší terciární tvorbu dentinu a intratubulární mineralizaci v 8 týdenní období ve srovnání s kontrolou a dalšími experimentálními skupinami. Závěrem lze tedy říci, že léčba exponovaných dentinových tubulů s biologicky aktivními molekulami může vyvolat intra-tubulární mineralizaci a tvorbu terciárního dentinu.⁵⁰

1.9 Analýza zubů pomocí Ramanovy spektroskopie

Pomocí Ramanova spektroskopie, rentgenové tomografie a rentgenové fluorescence byla testována molární hypomineralizace. Molární hypomineralizace je strukturální anomálie, která ovlivňuje kvalitu zubní skloviny a má významné důsledky pro orální zdraví. Vývojově hypomineralizovaná sklovina má normální tloušťku a může být v barvě bílé až žluté nebo hnědé, anebo může být bez poškozeného povrchu. Možnost nalezení molární hypomineralizace ve "starých populacích" může omezit několik současných etiologických hypotéz (např. deriváty dioxinů, bisfenoly, antibiotika), aniž by se vyloučila možná multifaktoriální stránka anomálie. V archeologickém kontextu mohou chemické prvky obsažené v pohřebišti poškodit zuby žluté nebo hnědé, a proto by mohly vyvolat taphonomické zkreslení. Účelem této studie bylo testování navrhovaného diagnostického postupu umožňující stanovení patologické nebo taphonomické příčiny změn barvy skloviny a defektů, které se podobají molární hypomineralizaci, která je přítomna na "starých zubech". Byly testovány dvě vzorové skupiny včetně změn odbarvení molární hypomineralizace (n = 12 zubů) od živých pacientů, taphonomické zbarvení (n = 9 zubů) a neznámé změny barvy (n = 2 zuby) ze středověkých vzorků. Výsledkem bylo, že hypomineralizovaná sklovina má sníženou minerální hustotu (p <0,0001) a zvýšený poměr fosfát / beta-karbonát (p <0,01) ve srovnání s normální

sklovinou, zatímco relativní koncentrace manganu, mědi, železa a olova jsou podobné. Při taphonomickém zabarvení byla relativní koncentrace těchto prvků významně odlišná ($p < 0,05$) od normální skloviny, zatímco minerální hustota a profil Ramanových spekter byly srovnatelné.⁵¹

Dále byla Ramanova spektroskopie použita pro kvantitativní posouzení in vitro stupně demineralizace zdravých lidských zubů. Na základě předchozích hodnocení Ramanových výběrových pravidel a na nově navržené analýze hustoty fononových stavů pro vybrané vibrační režimy hexagonální struktury hydroxyapatitu, by mělo být dosaženo hodnocení procesu demineralizace při vystavení zubu vysoce kyselému nápoji in vitro (tj. CocaCola™ Classic, pH = 2,5). Ramanova metoda se ukázala jako velmi citlivá a spektroskopické rysy by mohly přímo souviset s nárůstem stechiometrie povrchové struktury smaltu od počátku demineralizačního procesu. Navrhovaný Ramanův spektroskopický algoritmus může mít určitou obecnost pro hodnocení rizika zubního kazu, což umožní rychlou bezkontaktní diagnostickou praxi ve stomatologii.⁵²

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použitý Ramanův spektrometr

Měření Ramanových spekter bylo prováděno na přístroji Thermo Scientific DXR Raman Microscope (viz obr. 9), nacházející se na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Disperzní Ramanův mikroskop je přístroj určený pro aplikace požadující vysoké prostorové rozlišení, jednoduchost přípravy vzorků a užití silných stránek Ramanovy mikroskopie.



Obrázek 9: Thermo Scientific DXR Raman Microscope ⁵³

2.2 Nastavení spektrometru

Tabulka 1: Nastavení Ramanova spektrometru

Parametr	
Doba expozice	2,00 sec
Počet expozicí	16
Počet expozicí v pozadí	512
Vlnová délka	633 nm
Síla laseru	8 mW
Mřížka	600 vrypů/mm

2.3 Použitý software

Pro vyhodnocování a zpracování spekter byl použitý software Omnic 8.

2.4 Chemikálie

Ramanovou spektroskopií byly měřeny Ramanovy značky Cy3, Cy5 a Cy7 a růstové faktory TGF- β 1, BMP-2 a β FGF na povrchu systému kořenového kanálku. Jednotlivé Ramanovy značky Cy3, Cy5 a Cy7 pochází od společnosti GE Healthcare z Velké Británie. Monoklonální růstové faktory TGF- β 1, BMP-2 a β FGF byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich v Saint Louis. Pro ředění samotných vzorků byla použita destilovaná voda. Kyselina EDTA byla použita na odstranění sprašné vrstvy na povrchu dentinu. Karbodiimidový roztok EDC o koncentraci 0,1 M byl použit k aktivaci karboxylové skupiny pro spontánní reakci s primárními aminy.

2.5 Příprava vzorků

Ramanovy značky Cy3, Cy5 a Cy7 byly zředěny tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 10 μ l/ml. Stejně tak proteiny TGF- β 1, BMP-2 a β FGF byly zředěny na koncentraci 10 μ l/ml. Takto připravené vzorky byly použity pro jednotlivá měření.

V první hypotéze bylo prokazováno, že proteiny TGF- β 1, BMP-2 a β FGF se samostatně neváží na povrch kořenového kanálku. Do třech eppendorfek bylo napipetováno 200 μ l destilované vody a 50 μ l proteinu. Každá eppendorfka obsahovala pouze jeden druh růstového faktoru. Do takto připravených eppendorfek byly na 40 min ponořeny vzorky fyziologického zubu. Po 40 min byl vzorek zubu vytažen, opláchnut destilovanou vodou a změřen pomocí Ramanového spektrometru.

V druhé hypotéze bylo dokazováno, že Ramanovy značky Cy3, Cy5 a Cy7 se taktéž samostatně neváží na povrch dentinu. Do třech eppendorfek bylo napipetováno 990 μ l destilované vody a 10 μ l Ramanovy značky. Každá eppendorfka obsahovala pouze jeden druh cyaninu. Do takto připravených eppendorfek byly na 30 min ponořeny vzorky fyziologického zubu. Po 30 min byl vzorek zubu vytažen, opláchnut destilovanou vodou a změřen pomocí Ramanového spektrometru.

Ve třetí hypotéze bylo dokazováno, že mezi jednotlivými proteiny a Ramanovými značkami dochází k interakci a díky ní k navázání růstových faktorů na povrch dentinového kanálku. Do třech eppendorfek bylo napipetováno 850 μ l destilované vody a 50 μ l proteinu, 50 μ l Ramanovy značky a 50 μ l 0,1 M EDC. Každá eppendorfka obsahovala pouze jeden druh růstového faktoru a cyaninu. Do takto připravených eppendorfek byly na 30 min ponořeny vzorky fyziologického zubu. Po 30 min byl vzorek

zubu vytažen, opláchnut destilovanou vodou a změřen pomocí Ramanového spektrometru.

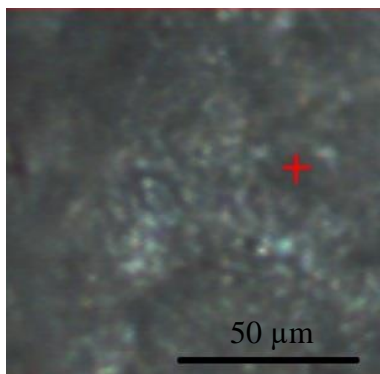
Ve čtvrté hypotéze bylo prokazováno, že díky sprašné vrstvy, která se nachází na vzorku zubu s odumřelou zubní dřeví, nedochází k vzájemnému navázání růstového faktoru a cyaninu k systému kořenového kanálku. Stejně tak, jak u předchozího měření bylo do třech eppendorfek napipetováno 850 μ l destilované vody a 50 μ l proteinu, 50 μ l Ramanovy značky a 50 μ l 0,1 M EDC. Každá eppendorfka obsahovala pouze jeden druh růstového faktoru a cyaninu. Do takto připravených eppendorfek byly na 30 min ponořeny vzorky zubu s infikovanou dřeví. Po 30 min byl vzorek zubu vytažen, opláchnut destilovanou vodou a změřen pomocí Ramanového spektrometru.

V páté hypotéze bylo dokazováno, že po odstranění sprašné vrstvy infikovaného zubu, dochází k interakci proteinu a Ramanovy značky a tím k navázání proteinu na povrch dentinu. Do třech eppendorfek bylo napipetováno 850 μ l destilované vody a 50 μ l proteinu, 50 μ l Ramanovy značky a 50 μ l 0,1 M EDC. Každá eppendorfka obsahovala pouze jeden typ proteinu a značky. Před tím, než byly vzorky zubu s infikovanou dřeví vloženy do eppendorfek, byly ponořeny buď to na 5 min nebo 20 min v kyselině EDTA pro odstranění sprašné vrstvy nacházející se na kořenovém kanálku. Po ošetření byly zubní vzorky ponořeny do připravených eppendorfek na 20 min. Každý vzorek byl co 20 min ponořen do jiné eppendorfky. Celkem po 60 min byl vzorek zubu vytažen, opláchnut destilovanou vodou a změřen pomocí Ramanového spektrometru.

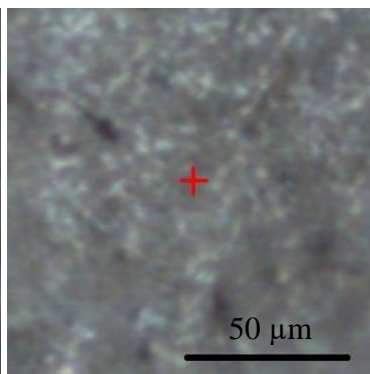
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 První fáze – mapování růstových faktorů protilátkou

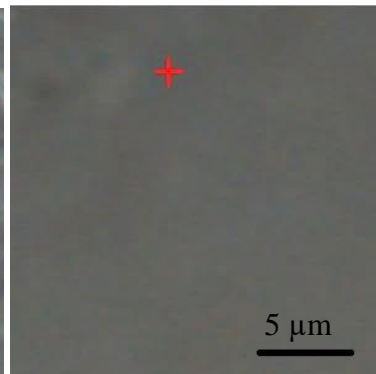
Před samotným měřením na Ramanovém spektrometru bylo nejprve nezbytné nalézt správné místo na dentinovém kanálku (viz obr. 10, 11, 12), díky kterému bylo možné změřit spektra pro testování hypotézy.



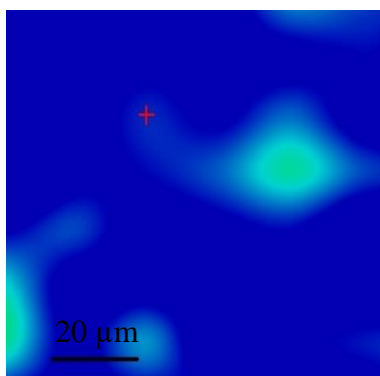
Obrázek 10: Mikroskopický snímek povrchu zubního při mapování βFGF



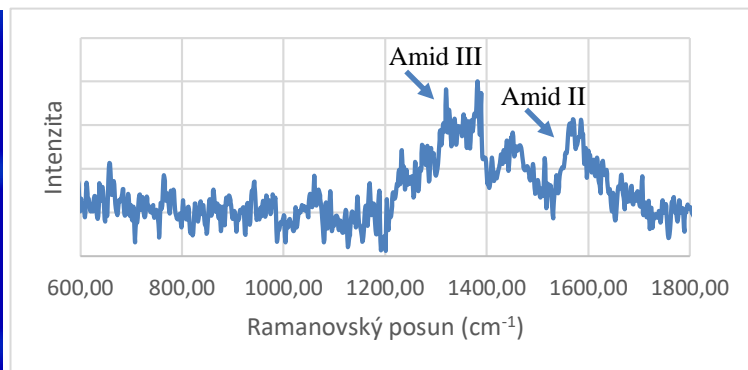
Obrázek 11: Mikroskopický snímek povrchu zubního při mapování BMP-2



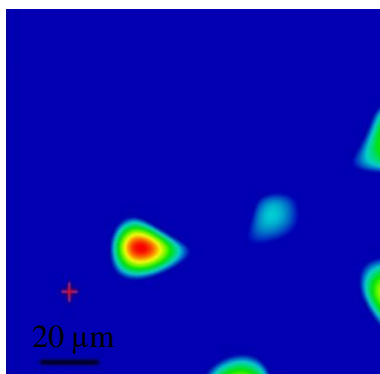
Obrázek 12: Mikroskopický snímek povrchu zubního při mapování snímek TGF-β1



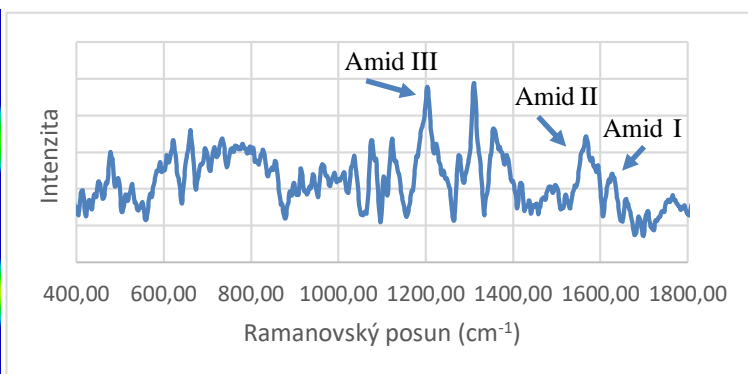
Obrázek 13: Mapa βFGF



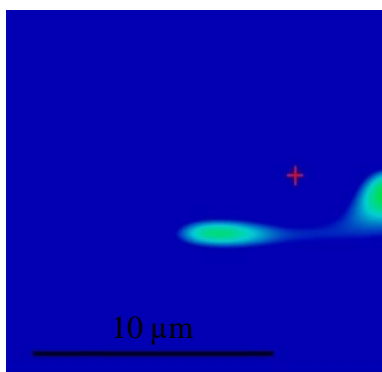
Obrázek 14: Ramanovo spektrum βFGF



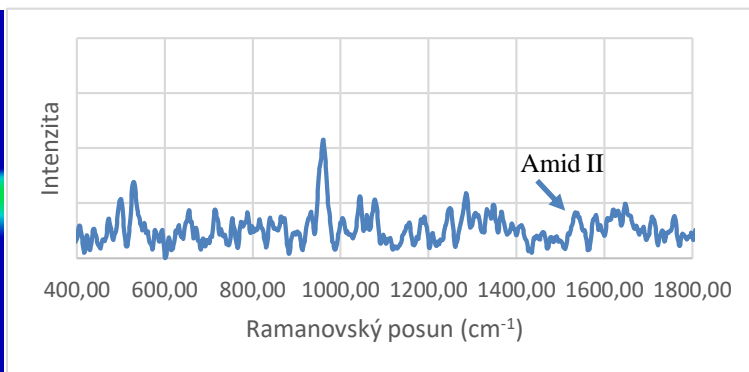
Obrázek 15: Mapa BMP-2



Obrázek 16: Ramanovo spektrum BMP-2



Obrázek 17: Mapa TGF-β1

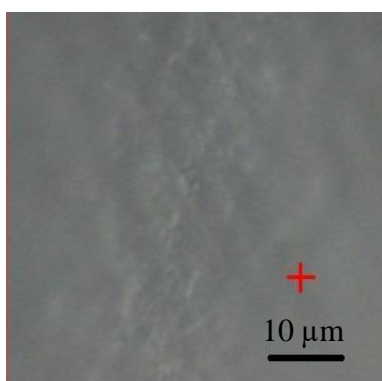


Obrázek 18: Ramanovo spektrum TGF-β1

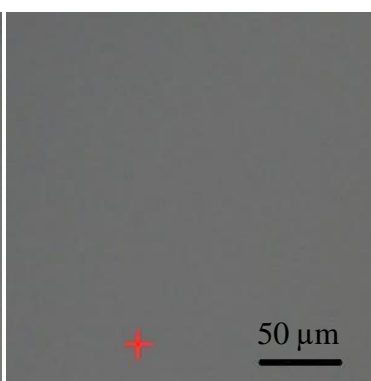
První fáze měla prokázat, že proteiny TGF-β1, BMP-2 a βFGF se váží na povrch dentinového kanálku, ale jejich signál je velice malý. Hypotéza byla dokázána, neboť mapy samotných růstových faktorů (viz obr. 13, 15, 17) prokazují jejich přítomnost na povrchu dentinu. Rovněž tak spektra (viz obr. 14, 16, 18), které byly získány z místa vyznačeného červeným křížkem na mapách proteinů (viz obr. 13, 15, 17), dokazují pravdivost hypotézy. Na spektrech je možné vidět velice slabý Ramanův signál, a proto byly použity Ramanovy značky.

3.2 Druhá fáze – nescifická sorpce značek na vzorek

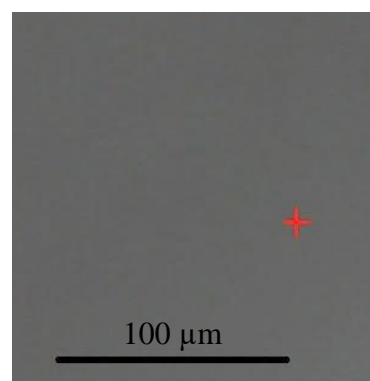
Opět před měřením na Ramanovém spektrometru bylo nejprve nezbytné nalézt správné místo na dentinovém kanálku (viz obr. 19, 20, 21), díky kterému bylo možné změřit spektra pro testování hypotézy.



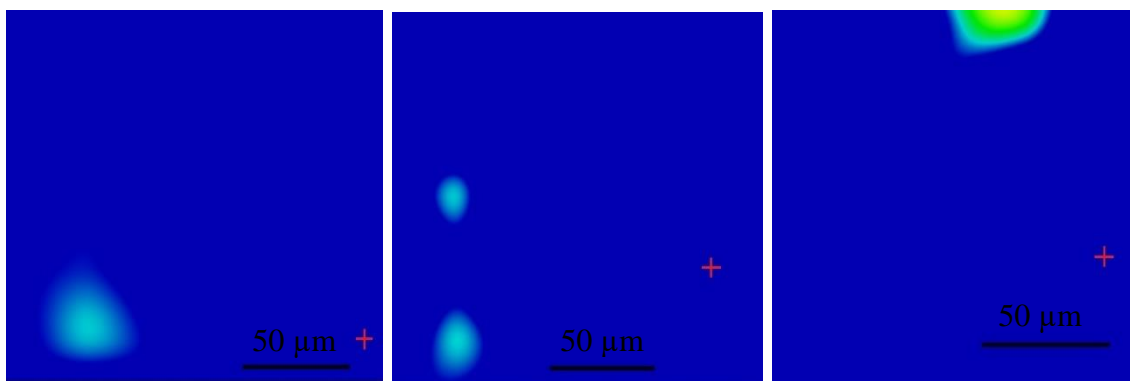
Obrázek 19: Mikroskopický snímek povrchu zubního kanálku při mapování Cy3



Obrázek 20: Mikroskopický snímek povrchu zubního kanálku při mapování Cy5



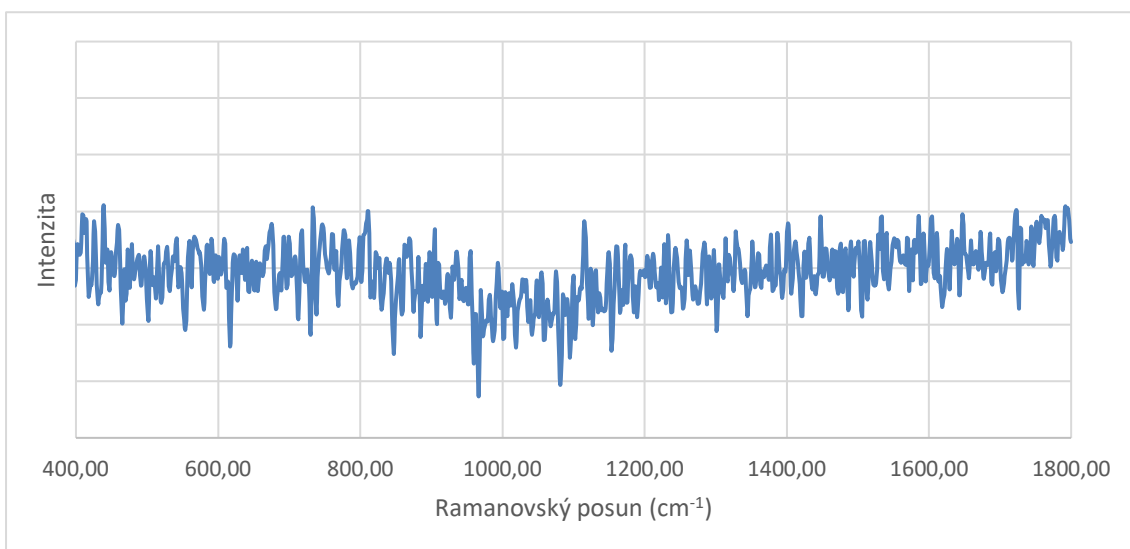
Obrázek 21: Mikroskopický snímek povrchu zubního kanálku při mapování Cy7



Obrázek 22: Mapa Cy3

Obrázek 23: Mapa Cy5

Obrázek 24: Mapa Cy7



Obrázek 25: Ramanovo spektrum Cy3

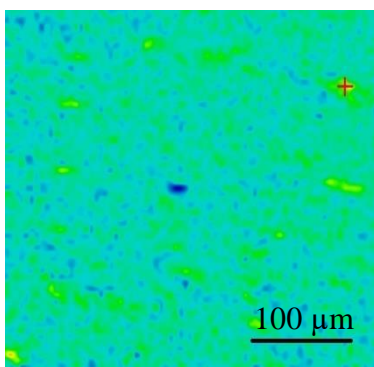
Druhá fáze měla dokázat, že Ramanovy značky Cy3, Cy5 a Cy7 se neselektivně neváží na povrch kořenového kanálku bez přítomnosti růstových faktorů. Hypotéza byla prokázána, neboť mapy samotných značek (viz obr. 22, 23, 24) dokazují jejich nepřítomnost na povrchu dentinu. Taktéž spektrum (viz obr. 16), které bylo získáno z místa označeného červeným křížkem na mapě cyaninu (viz obr. 13), dokazuje pravdivost hypotézy. V naměřených datech není signál cyaninu přítomen, rovněž tak to bylo i u Cy5 a Cy7.

3.3 Třetí fáze – zobrazení růstových faktorů pomocí označených protilátek

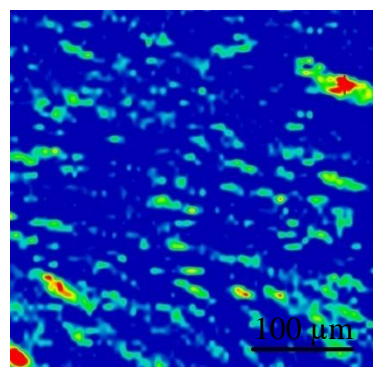
Nejprve bylo nalezeno vhodné místo na povrchu dentinového kanálku pomocí mikroskopu (viz obr. 26), díky kterému bylo možné změřit spektrum pro testování hypotézy.



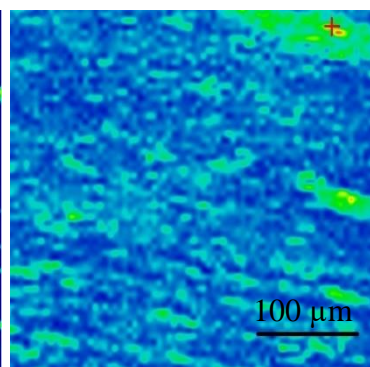
Obrázek 26: Mikroskopický snímek povrchu zubního kanálku při mapování Ramanových značek a růstových faktorů



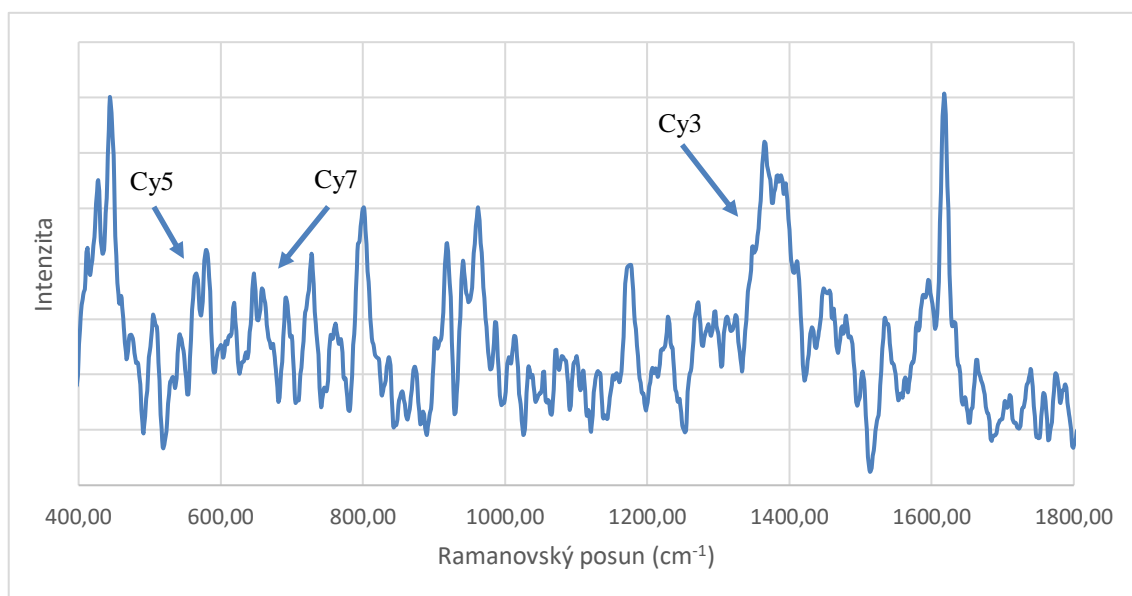
Obrázek 27: Mapa Cy3 a βFGF



Obrázek 28: Mapa Cy5 a BMP-2



Obrázek 29: Mapa Cy7 a βTGF



Obrázek 30: Ramanovo spektrum Ramanových značek a růstových proteinů

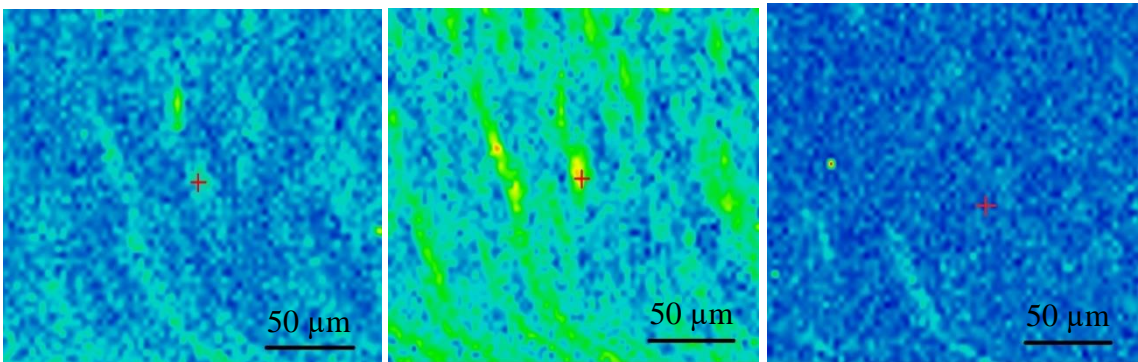
Třetí fáze měla ukázat, že mezi Ramanovými značkami Cy3, Cy5 a Cy7 a proteiny TGF-β1, BMP-2 a βFGF vzniká interakce a díky tomu k navázání proteinů na povrch dentinového kanálku. Hypotéza byla prokázána, neboť mapy jednotlivých Ramanových značek a růstových faktorů (viz obr. 27, 28, 29) prokazují přítomnost proteinů na povrchu dentinu. Taktéž spektrum (viz obr. 30), které bylo získáno z místa vyznačeného červeným křížkem na mapách značek a proteinů (viz obr. 27, 28, 29), dokazuje pravdivost měření. Na spektru je možné vidět zřetelný Ramanův signál pro Cy3, Cy5 a Cy7.

3.4 Čtvrtá fáze – mapování růstových faktorů pomocí označených protilátek na infikovaném zubním vzorku

Před samotným měřením na Ramanovém spektrometru bylo opět nezbytné vyhledat místo (viz obr. 31), díky kterému bylo možné změřit spektrum pro testování hypotézy.



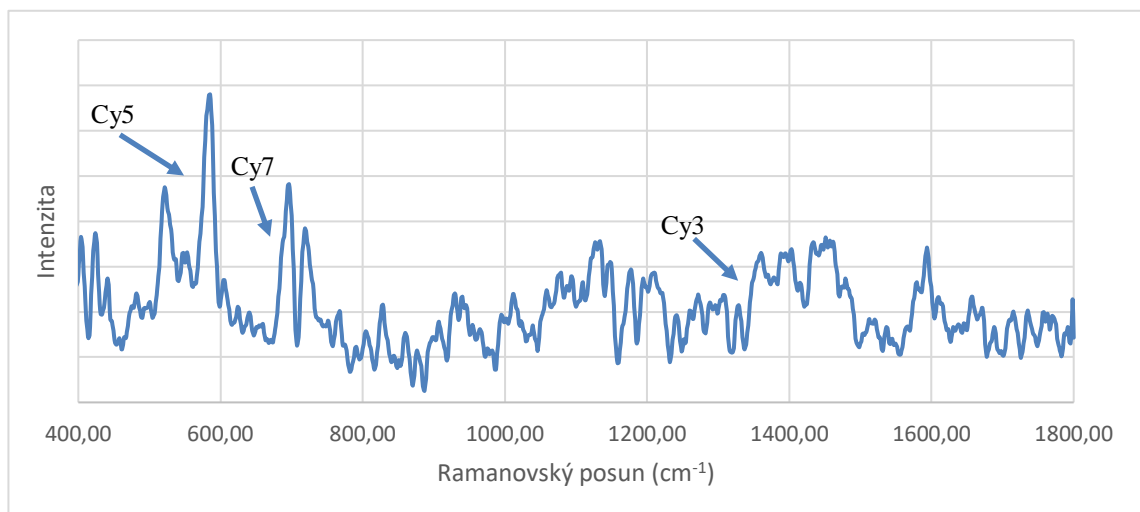
Obrázek 31: Mikroskopický snímek sprašné vrstvy



Obrázek 32: Mapa Cy3 a βFGF

Obrázek 33: Mapa Cy5 a BMP-2

Obrázek 34: Mapa Cy7 a βTGF



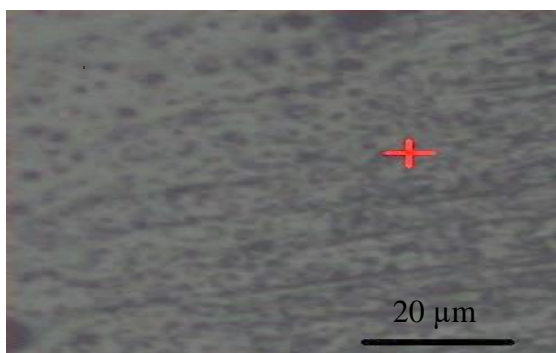
Obrázek 35: Ramanovo spektrum Ramanových značek a růstových faktorů

Čtvrtá fáze měla dokázat, že sprašná vrstva infikovaného zubu ovlivňuje navázání růstových faktorů na povrch kořenového kanálku. Hypotéza byla prokázána, neboť mapy

jednotlivých Ramanových značek a růstových faktorů (viz obr. 32, 33, 34) dokazují přítomnost proteinů ve velmi malém množství na povrchu dentinu. Stejně tak spektrum (viz obr. 35), které bylo získáno z místa vyznačeného červeným křížkem na mapách značek a proteinů (viz obr. 32, 33, 34), dokazuje pravdivost hypotézy. Na spektru lze vidět slabý Ramanův signál pro Cy3, Cy5 a Cy7.

3.5 Pátá fáze – mapování růstových faktorů pomocí označených protilátek na ošetřeném zubním vzorku

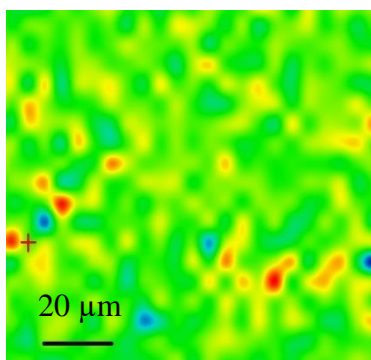
Opět před samotným měřením na Ramanovém spektrometru bylo pomocí mikroskopu vyhledáno vhodné místo (viz obr. 36, 37), díky kterému bylo možné změřit spektra pro testování hypotézy.



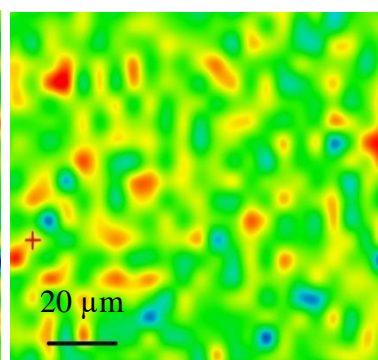
Obrázek 36: Mikroskopický snímek povrchu zubního kanálku po 5 min v EDTA



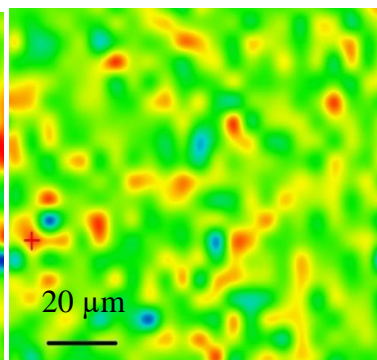
Obrázek 37: Mikroskopický snímek povrchu zubního kanálku po 20 min v EDTA



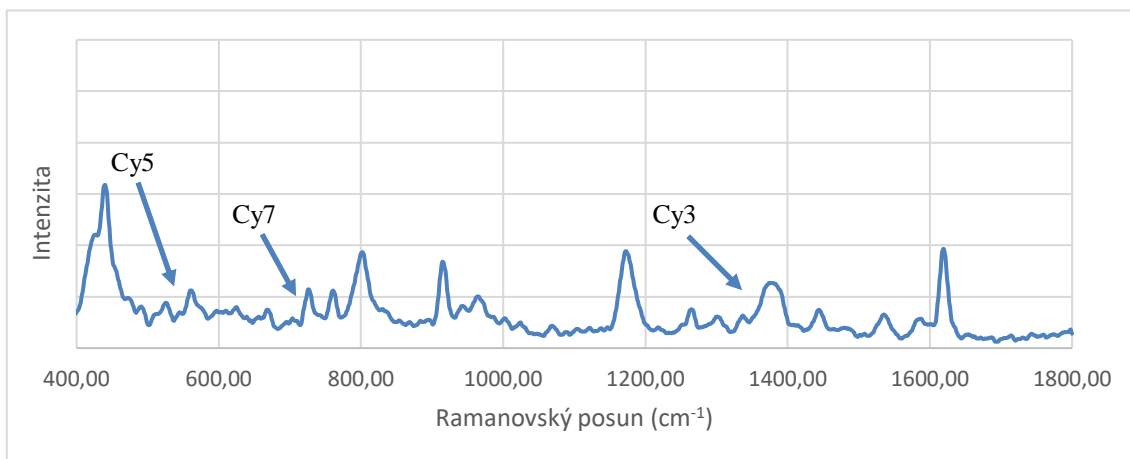
Obrázek 38: Mapa Cy3 a β FGF



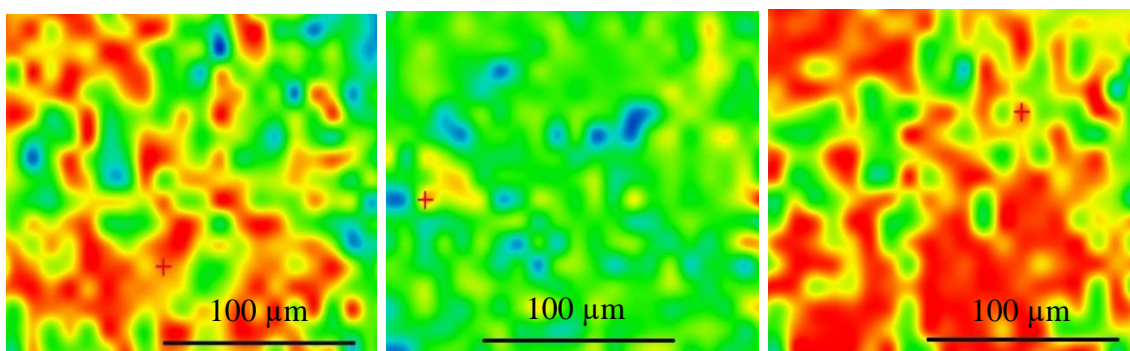
Obrázek 39: Mapa Cy5 a BMP-2



Obrázek 40: Mapa Cy7 a β TGF



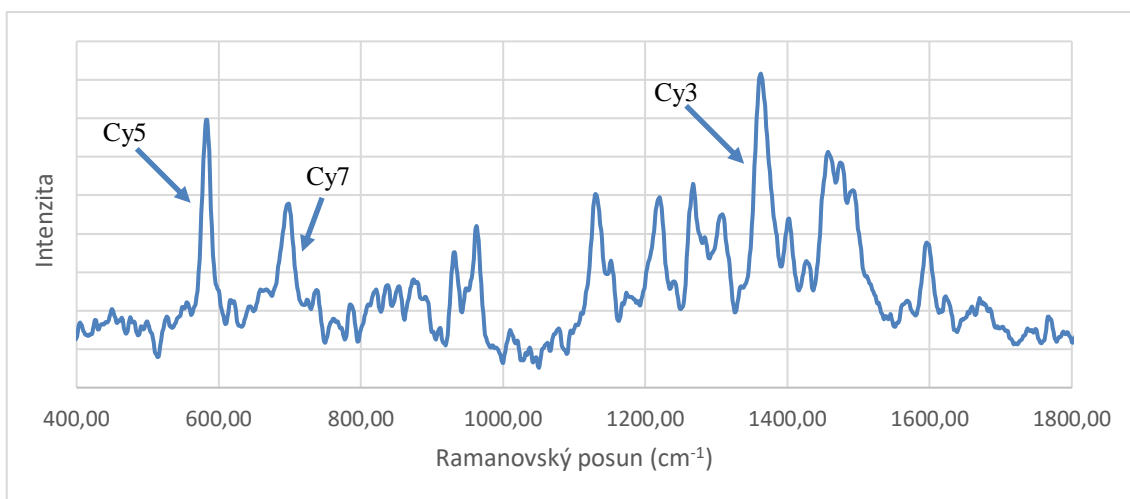
Obrázek 41: Ramanovo spektrum Ramanových značek a růstových faktorů po 5 min působení EDTA



Obrázek 42: Mapa Cy3 a βFGF

Obrázek 43: Mapa Cy5 a BMP-2

Obrázek 44: Mapa Cy7 a βTGF



Obrázek 45: Ramanové spektrum Ramanových značek a růstových proteinů po 20 min působení EDTA

Pátá fáze měla prokázat, že po odstranění správné vrstvy kyselinou EDTA na zubu s infikovanou dření, dochází k navázání růstových faktorů za přítomnosti Ramanových značek na systém dentinového kanálku. Hypotéza bylo dokázána, neboť mapy jednotlivých Ramanových značek a růstových faktorů po 5 min působení kyselinou EDTA (viz obr. 38, 39, 40) a po 20 min působení kyselinou EDTA (viz obr. 42, 43, 44) dokazují přítomnost proteinů na povrchu dentinu. Stejně tak spektra (viz obr. 41, 45),

kteřé byly získány z místa vyznačeného červeným křížkem na mapách značek a proteinů (viz obr. 38, 39, 40, 42, 43, 44), dokazují pravdivost měření. Na spektrech je možné pozorovat zřetelný Ramanův signál pro Cy3, Cy5 a Cy7.

Ve srovnání se čtvrtou fází, kde se na zubním vzorku nachází sprašná vrstva ovlivňující průnik růstových faktorů do dentinových kanálků, je možné pozorovat přítomnost těchto růstových faktorů ve větším množství. Po 5 min ošetření kyselinou EDTA není přítomnost proteinů tak patná jak u vzorku po 20 min ošetření kyselinou EDTA. V závěru lze říci, že nejmenší množství růstových faktorů se nacházelo na vzorku zubu s infikovanou dřením, který obsahoval sprašnou vrstvu. Větší přítomnost proteinů se vyskytovalo na zubním vzorku, který byl ošetřen 5 min kyselinou EDTA a největší množství růstových faktorů je možné pozorovat na vzorku ošetřeném 20 min kyselinou EDTA, což dokazují i jednotlivé mapy a spektra.

4 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo zobrazování rozložení vybraných růstových faktorů na povrchu dentinového kanálku pomocí Ramanovy spektroskopie. Toho lze uplatnit v regenerativní endodoncii jako jednu z možností při léčbě nezralého stálého zubu s infikovanou dření.

Ramanova spektroskopie je metodou vibrační molekulové spektroskopie, která byla pojmenována po indickém fyzikovi Čandrašékharu Venkatau Ramanovi. Tato metoda používá Ramanův jev, který využívá rozptyl laserového paprsku. Laser může s elektrony interagovat v zásadě třemi způsoby, přičemž vznikají zejména Stokesovy linie a anti-Stokesovy linie.

Používá se při analýze pevných látek, kapalin, plynů, dále též při analýze povrchů, či při analýze biologických systémů. Své uplatnění Ramanova spektroskopie nachází v mnoha odvětvích, od mineralogie a geochemie, přes chemický a farmaceutický průmysl až po biologii a lékařství.³

Jako možnost léčby poškozeného zubu jsme zvolili bezbuněčný přístup, který se spoléhá na doručení buněčného lešení bohatém na růstové faktory. Velmi podstatným krokem je také podmínění povrchu dentinu, neboť extracelulární matrice dentinu je bohatá na růstové faktory.⁷ Ty mohou být uvolněny pomocí demineralizace nebo mohou být vyvinuty podmíněním specifickou látkou, jako je například kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA).^{5,34} Tyto uvolněné růstové faktory byly použity pouze na vnější aplikaci na povrch zubu.

Růstové faktory extracelulárních dentinových matic, které byly využity a měly tak hrát nejvýznamnější roli v regeneraci dřevného dentinu, byly růstový faktor- β 1 (TGF- β 1), kostní morfogenetický protein-2 (BMP-2) a růstový faktor základního fibroblastu (β FGF).⁸

Během jednotlivých fází bylo zjištěno, že pomocí kyseliny EDTA lze odstranit sprašnou vrstvu, která ovlivňuje navázání růstových faktorů na povrch dentinového kanálku. Abychom lépe detekovali rozložení proteinů, byly použity Ramanovy značky. Pro zobrazení růstových faktorů na systém dentinu byla využita Ramanova spektroskopie, díky které bylo možné dokázat, že i po 5 min nebo 20 min působení

kyseliny EDTA na zubní vzorek s infikovanou dření dochází k následnému navázání růstových faktorů na povrch kořenového kanálku.

5 SUMMARY

The aim of the bachelor thesis is displaying layout of selected growth factors on dentin canal surface while using Raman spectroscopy. That can be applied in regenerative endodontics as one of the options when treating immature permanent tooth with infected pulp.

Raman spectroscopy is a vibrational molecular spectroscopy method, named after the Indian physicist Chandrašékhar Venkatau Raman. This method uses the Raman effect, which uses laser beam scattering. The laser can interact with electrons in principle in three ways, creating Stokes lines and anti-Stokes lines.

It is used for analysis of solids, liquids, gases, surface analysis or analysis of biological systems. Raman spectroscopy has found its application in various industries, from mineralogy and geochemistry, through the chemical and pharmaceutical industries to biology and medicine.

One of the ways how to treat damaged tooth was chosen cell-free approach relying on delivery of scaffold which is rich on growth factors. Very important step is also conditioning of dentin surface, as extracellular matrix of dentin is rich on growth factors. These can be released via demineralization, which or can develop by conditioning with particular substances, such as ethzlendiaminotetraacetic acid (EDTA). These released growth factors are flushed outside the tooth only.

The growth factors of extracellular dentinal matrix, which are assumed to play the most significant role in pulp-dentin regeneration are transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and basic fibroblast growth factor (β FGF).

During particular measurements, it was found out that thanks to EDTA acid it is possible to remove smear layer which influences connection between growth factors and dentin canal. Raman sings were used to be able to better detect the distribution of proteins. To display growth factors on dentin system was used Raman spectroscopy, thanks that it could prove that even after 5 or 20 minutes of EDTA acid action on tooth with infected pulp occurs following connection of growth factors on dentin canal surface.

6 SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1: ELEKTROMAGNETICKÉ SPEKTRUM ¹⁰	12
OBRÁZEK 2: HARMONICKÝ A ANHARMONICKÝ OSCILÁTOR ¹³	16
OBRÁZEK 3: VALENČNÍ VIBRACE ¹⁴	17
OBRÁZEK 4: DEFORMAČNÍ VIBRACE ¹⁴	17
OBRÁZEK 5: MICHELSONŮV INTERFEROMETR ¹⁹	21
OBRÁZEK 6: RAMANŮV ROZPTYL ²²	24
OBRÁZEK 7: STOKESOVY A ANTI-STOKESOVY PÁSY ²³	24
OBRÁZEK 8: STAVBA ZUBU ²⁷	30
OBRÁZEK 9: THERMO SCIENTIFIC DXR RAMAN MICROSCOPE ⁵³	38
OBRÁZEK 10: MIKROSKOPICKÝ SNÍMEK POVRCHU ZUBNÍHO KANÁLKU PŘI MAPOVÁNÍ βFGF.....	41
OBRÁZEK 11: MIKROSKOPICKÝ SNÍMEK POVRCHU ZUBNÍHO KANÁLKU PŘI MAPOVÁNÍ BMP-2.....	41
OBRÁZEK 12: MIKROSKOPICKÝ SNÍMEK POVRCHU ZUBNÍHO KANÁLKU PŘI MAPOVÁNÍ TGF-β1.....	41
OBRÁZEK 13: MAPA βFGF	41
OBRÁZEK 14: RAMANOVO SPEKTRUM βFGF	41
OBRÁZEK 15: MAPA BMP-2	41
OBRÁZEK 16: RAMANOVO SPEKTRUM BMP-2	41
OBRÁZEK 17: MAPA TGF-β1	42
OBRÁZEK 18: RAMANOVO SPEKTRUM TGF-β1	42
OBRÁZEK 19: MIKROSKOPICKÝ SNÍMEK POVRCHU ZUBNÍHO KANÁLKU PŘI MAPOVÁNÍ CY3.....	42
OBRÁZEK 20: MIKROSKOPICKÝ SNÍMEK POVRCHU ZUBNÍHO KANÁLKU PŘI MAPOVÁNÍ CY5.....	42
OBRÁZEK 21: MIKROSKOPICKÝ SNÍMEK POVRCHU ZUBNÍHO KANÁLKU PŘI MAPOVÁNÍ CY7.....	42
OBRÁZEK 22: MAPA CY3.....	43
OBRÁZEK 23: MAPA CY5	43
OBRÁZEK 24: MAPA CY7.....	43
OBRÁZEK 25: RAMANOVO SPEKTRUM CY3	43
OBRÁZEK 26: MIKROSKOPICKÝ SNÍMEK POVRCHU ZUBNÍHO KANÁLKU PŘI MAPOVÁNÍ RAMANOVÝCH ZNAČEK A RŮSTOVÝCH FAKTORŮ	44

OBRÁZEK 27: MAPA CY3 A β FGF	44
OBRÁZEK 28: MAPA CY5 A BMP-2.....	44
OBRÁZEK 29: MAPA CY7 A TGF- β 1.....	44
OBRÁZEK 30: RAMANOVO SPEKTRUM RAMANOVÝCH ZNAČEK A RŮSTOVÝCH PROTEINŮ	44
OBRÁZEK 31: MIKROSKOPICKÝ SNÍMEK SPRAŠNÉ VRSTVY	45
OBRÁZEK 32: MAPA CY3 A β FGF	45
OBRÁZEK 33: MAPA CY5 A BMP-2.....	45
OBRÁZEK 34: MAPA CY7 A TGF- β 1.....	45
OBRÁZEK 35: RAMANOVO SPEKTRUM RAMANOVÝCH ZNAČEK A RŮSTOVÝCH FAKTORŮ	45
OBRÁZEK 36: MIKROSKOPICKÝ SNÍMEK POVRCHU ZUBNÍHO KANÁLKU PO 5 MIN V EDTA	46
OBRÁZEK 37: MIKROSKOPICKÝ SNÍMEK POVRCHU ZUBNÍHO KANÁLKU PO 20 MIN V EDTA	45
OBRÁZEK 38: MAPA CY3 A β FGF	46
OBRÁZEK 39: MAPA CY5 A BMP-2.....	46
OBRÁZEK 40: MAPA CY7 A TGF- β 1.....	46
OBRÁZEK 41: RAMANOVO SPEKTRUM RAMANOVÝCH ZNAČEK A RŮSTOVÝCH FAKTORŮ PO 5 MIN PŮSOBENÍ EDTA.....	47
OBRÁZEK 42: MAPA CY3 A β FGF	47
OBRÁZEK 43: MAPA CY5 A BMP-2.....	47
OBRÁZEK 44: MAPA CY7 A TGF- β 1.....	47
OBRÁZEK 45: RAMANOVÉ SPEKTRUM RAMANOVÝCH ZNAČEK A RŮSTOVÝCH PROTEINŮ PO 20 MIN PŮSOBENÍ EDTA.....	47

7 SEZNAM TABULEK

TABULKA 1: NASTAVENÍ RAMANOVA SPEKTROMETRU	38
--	----

8 SEZNAM LITERATURY

1. BEKÁREK, V.; FRYŠOVÁ, I. *Optické metody v chemické analýze*. 3. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 61 s. ISBN 978-80-244-1754-7
2. NĚMCOVÁ, I.; ČERMÁKOVÁ L.; RYCHLOVSKÝ P. *Spektrometrické analytické metody I*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 166 s. ISBN 80-246-0776-X
3. MATĚJKA, P. a kolektiv. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie III*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 17 s. ISBN 80-7080-466-1
4. WIGLER, Ronald, Arieh Y. KAUFMAN, Shaul LIN, Nelly STEINBOCK, Hagai HAZAN-MOLINA a Calvin D. TORNECK. Revascularization: A Treatment for Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Incomplete Root Development. *Journal of Endodontics* [online]. 2013, **39**(3): 319-326 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2012.11.014
5. GALLER, Kerstin M., Andreas EIDT a Gottfried SCHMALZ. Cell-free Approaches for Dental Pulp Tissue Engineering. *Journal of Endodontics* [online]. 2014, **40**(4): S41-S45 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2014.01.014
6. HUANG, George T-J. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Frontiers in bioscience*. 2011, **3**(1): S788-800 [cit. 2017-05-03].
7. SMITH, Anthony J., B.A. SCHEVEN, Y. TAKAHASHI, J.L. FERRACANE, R.M. SHELTON a P.R. COOPER. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Archives of Oral Biology* [online]. 2012, **57**(2): 109-121 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.07.008.
8. HE, H, J YU, Y LIU, S LU, H LIU, J SHI a Y JIN. Effects of FGF2 and TGF β 1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biology International* [online]. 2008, **32**(7): 827-834 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.03.013.
9. MALÁ, Z.; NOVÁKOVÁ D.; NOVÁK, R. *Fyzika II*. Praha: Nakladatelství ČVUT, 2004. ISBN 978-80-01-04365-3
10. Common.wikipedia.org: File:ElmgSpektrum.png. [online]. 9. 9. 2005 [cit. 2017-05-03]. Dostupný pod licencí Creative Commons na WWW: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ElmgSpektrum.png>
11. MORAVEC, Z.; KOŠAŘOVÁ V. *Molekulová spektroskopie*. [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupnost: <http://www.sci.muni.cz/chemsekce/frvs2011/pdf/mol-spec.pdf>
12. STUŽKA, V. *Instrumentální metody chemické analýz, IV. Vibrační spektroskopie organ. molekul*. 1. vyd. Olomouc: rektorát Univerzity Palackého v Olomouci, 1976. 146 s

13. Otyepka, M. *Struktura atomů a molekul*. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2010. 83 s. ISBN 978-80-244-2471-2
14. KSANDR, Z.; ADÁMEK, P.; JANEČKOVÁ, E. *Infračervená spektroskopie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1975. 130 s.
15. HORÁK, M.; PAPOUŠEK, D. *Infračervená spektra a struktura molekul*. 1. vyd. Praha: Akademie, 1976. 840 s.
16. Infračervená spektroskopie. [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupnost: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>
17. KANIA, P. *Infračervená spektrometrie*. [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupnost: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?redirected>
18. Co je co. *Curieův bod*. [online]. © 1999 – 2017. 22.3.2004. [cit. 2017-05-03]. Dostupnost: http://www.cojeco.cz/index.php?s_lang=2&detail=1&id_desc=15967
19. Sanchonx. Common.wikipedia.org: File:ElmgSpektrum.png. [online]. 23. 12. 2011 22:55. [cit. 2017-05-03]. Dostupný pod licencí Creative Commons na WWW: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FTIR_Interferometer.png
20. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-8636907-2
21. SMITH, E. a G. DENT. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. Chichester: Wiley, 2005. ISBN 0-471-49794-0
22. MALOŇ, P.; PODLAHA, J. *Fyzikálně-chemické metody, část I*. 23. svazek cyklu Organické chemie. 1. vyd. Praha: ÚOCHB AV ČR. 1999. 151 s. ISBN 80-902130-9-X
23. FERRARO, J. R., NAKAMOTO, K., BROWN, CH. W., *Introductory Raman Spectroscopy*. 2nd ed. San Diego: Academic Press. 2003. 434 s. ISBN 978-0-12-254105-6
24. VAVŘINOVA, D.; MATĚJKA, P. *Možnosti technik povrchem zesílené vibrační spektroskopie při analýze přípravku Chamomilla vulgaris*. [online]. 21.1.13. [cit. 2017-05-03]. Dostupnost: <file:///C:/Users/Nikola/Desktop/BP/SERS%20CZ.pdf>
25. MALÍNSKÝ J., MALÍNSKÁ J., MICHALÍKOVÁ Z.: *Morfologie orofaciálního systému*, Olomouc 2005
26. MIEG, R. *Zuby jako zdroj nemoci*. Praha: Pragma, 2009. 213 s. ISBN 978-80-7349-189-5

27. FENTRESS, S. Common.wikipedia.org: Tooth section international.png [online]. 7.7. 2005. [cit. 2017-05-03]. Dostupný pod licencí Creative Commons na WWW: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tooth_section_international.png
28. NEDOROST, L. a kolektiv. *Atlas histologie tvrdých tkání*. Praha: Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, 2009. ISBN 1804-4409
- 29 DOKLÁDAL, M. *Anatomie zubů a chrupu*. vydavatelství Masarykovy univerzity, 1. vydání, 1995.
30. KOČOVÁ, J. Histologie zubu. [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupnost: <http://www.zubnistranky.cz/histol.pdf>
31. Endodoncie - ošetření kořenových kanálků. *Co je to endodoncie*. [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupnost: <http://www.drstuchlik.cz/sluzby/vykony/endodoncie/>
32. URBAN, F. *Stomatologie*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1964 244 s.
33. FERRACANE, Jack.L., P.R. COOPER a A.J. SMITH. Dentin Matrix Component Solubilization by Solutions at pH Relevant to Self-etching Dental Adhesives. *Journal of Adhesive Dentistry*.2013,15(5):407-412. DOI: 10.3290/j.jad.a29536
34. GALLER, Kerstin M., Wolfgang BUCHALLA, Karl-Anton HILLER, Marianne FEDERLIN, Andreas EIDT, Mona SCHIEFERSTEINER a Gottfried SCHMALZ. Influence of Root Canal Disinfectants on Growth Factor Release from Dentin. *Journal of Endodontics* [online]. 2015, 41(3): 363-368 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2014.11.021
35. ROBERTS-CLARK, D.J a A.J SMITH. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archives of Oral Biology* [online]. 2000, 45(11): 1013-1016 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/s0003-9969(00)00075-3
36. GRAHAM, Lee, Paul R. COOPER, Nicola CASSIDY, Jacques E. NOR, Alastair J. SLOAN a Anthony J. SMITH. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials* [online]. 2006, 27(14): 2865-2873 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.12.020.
37. TOMSON, Phillip L., Liam M. GROVER, Philip J. LUMLEY, Alastair J. SLOAN, Anthony J. SMITH a Paul R. COOPER. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *Journal of Dentistry* [online]. 2007, 35(8): 636-642 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.jdent.2007.04.008
38. NAKASHIMA, Misako. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. 2005, 16(3): 369-376 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.02.011.

39. MORITO Akiyuki, Y KIDA, K SUZIKO, K INOUE, N KURODA, K GOMI, T ARAI a T SATO. Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. *Archives of histology and cytology*. 2009, 72(1): 51-64
40. LAW, Alan S. Considerations for Regeneration Procedures. *Journal of Endodontics* [online]. 2013, 39(3), S44-S56 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2012.11.019. ISSN 00992399.
41. RUPAREL, Nikita B., Fabricio B. TEIXEIRA, Caio C.R. FERRAZ a Anibal DIOGENES. Direct Effect of Intracanal Medicaments on Survival of Stem Cells of the Apical Papilla. *Journal of Endodontics* [online]. 2012, 38(10), 1372-1375 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2012.06.018. ISSN 00992399.
42. ALTHUMAIRY, Riyadh I., Fabricio B. TEIXEIRA a Anibal DIOGENES. Effect of Dentin Conditioning with Intracanal Medicaments on Survival of Stem Cells of Apical Papilla. *Journal of Endodontics* [online]. 2014, 40(4), 521-525 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2013.11.008. ISSN 00992399.
43. MARTIN, David E., Jose Flavio A. De ALMEIDA, Michael A. HENRY, Zin Z. KHAING, Christine E. SCHMIDT, Fabricio B. TEIXEIRA a Anibal DIOGENES. Concentration-dependent Effect of Sodium Hypochlorite on Stem Cells of Apical Papilla Survival and Differentiation. *Journal of Endodontics* [online]. 2014, 40(1): 51-55 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2013.07.026.
44. RING, Karla C., Peter E. MURRAY, Kenneth N. NAMEROW, Sergio KUTTLER a Franklin GARCIA-GODOY. The Comparison of the Effect of Endodontic Irrigation on Cell Adherence to Root Canal Dentin. *Journal of Endodontics* [online]. 2008, 34(12), 1474-1479 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2008.09.001.
45. TREVINO, Ernesto G., Amol N. PATWARDHAN, Michael A. HENRY, Griffin PERRY, Nicholas DYBDAL-HARGREAVES, Kenneth M. HARGREAVES a Anibal DIOGENES. Effect of Irrigants on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla in a Platelet-rich Plasma Scaffold in Human Root Tips. *Journal of Endodontics* [online]. 2011, 37(8): 1109-1115 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2011.05.013
46. NAIR, P.N.R, Stéphane HENRY, Victor CANO a Jorge VERA. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after „one visit“ endodontic treatment. *ORAL SURGERY, ORAL MEDICINE, ORAL PATHOLOGY, ORAL RADIOLOGY, AND ENDODONTOLOGY*. 2005, 99(2):231-52
47. VERA, Jorge, José F. SIQUEIRA, Domenico RICUCCI, Simona LOGHIN, Nancy FERNÁNDEZ, Belina FLORES a Alvaro G. CRUZ. One- versus Two-visit Endodontic Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Histobacteriologic Study. *Journal of*

Endodontics [online]. 2012, 38(8), 1040-1052 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2012.04.010

48. ŽIŽKA, Radovan, Tomáš BUCHTA, Iva VOBORNÁ, Luboš HARVAN a Jiří ŠEDÝ. Root Maturation in Teeth Treated by Unsuccessful Revitalization: 2 Case Reports. *Journal of Endodontics* [online]. 2016, [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2016.02.004

49. PIVA, E.; TARTLE, SA.; NOR, JE.; ZOU, DH.; HATFIELD, E.; GUINN, T.; EUBANKS, EJ.; KAIGLER, D. Dental Pulp Tissue Regeneration Using Dental Pulp Stem Cells Isolated and Expanded in Human Serum. *Journal of Endodontics* [online]. [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.joen.2016.11.018

50. KALYVA, M.; PAPADIMITRIOU, S.; TZIAFAS, D. Transdentinal stimulation of tertiary dentine formation and intratubular mineralization by growth factors. [online]. 13. 4. 2010, [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2010.01690.x

51. GAROT, E.; COUTURE-VESCHAMBRE, C.; ROUAS, P.; LEFRAIS, Y.; MANTON, D.; RODRIGUEZ, V. Diagnostic guide enabling distinction between taphonomic stains and enamel hypomineralisation in an archaeological context. *Archives of oral biology* [online]. [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.11.008

52. PEZZOTTI, G.; ADACHI, T.; GASPARUTTI, I.; MARIN, E.; RONDINELLA, A.; BOFFELLI, M.; YAMAMOTO, T.; VINCINI, G.; ZHU, WL.; ICHIOKA, H.; MARUNAKA, Y.; KANAMURA, N. Vibrational monitor of early demineralization in tooth enamel after in vitro exposure to phosphoric liquid. *Spectrochimica acta part a-molecular and biomolecular spectroscopy* [online]. 2017, [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.saa.2016.08.036

53. Nikolet cz. *DRX Mikroskop*. [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupnost: http://www.nicoletcz.cz/dxr_mikro/