

STUDIUM SLINNÝCH KAMENŮ

EVA GRÝČOVÁ^a, JANA SEIDLEROVÁ^a, PAVEL ŠTRÝMPL^b a SILVIE VALLOVÁ^c^a Centrum nanotechnologií, VŠB – Technická univerzita Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava – Poruba,^b Otorinolaryngologická klinika, Fakultní nemocnice Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava – Poruba,^c Fakulta metalurgie a materiálového inženýrství, VŠB – Technická univerzita Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava Poruba

jana.seidlerova@vsb.cz

Došlo 5.3.14, přepracováno 18.11.14, přijato 1.12.14.

Klíčová slova: slinné kameny, sialolitiáza, infračervená spektroskopie, skenovací elektronová mikroskopie, prášková rtg. difrakce, diferenční termická analýza

Úvod

Část populace trpí onemocněním, které vede k ucpaní slinných žláz a následně vzniku slinných kamenů – sialolitů, které se tvoří ve vývodovém systému velkých slinných žláz a způsobují jeho obstrukci. Tzv. sialolitiáza je nejčastější příčinou benigní obstrukční choroby velkých slinných žláz¹, postihuje především podčelistní žlázu (83 až 94 %), méně často příušní žlázu (4–10 %) a podjazykovou žlázu (1–7 %)². Výskyt sialolitiázy je u dospělé popu-

lace 1,2 %, s mírnou převahou u mužů³. Onemocnění se vyskytuje v produktivním věku mezi 25 a 50 lety, může postihovat výjimečně i děti⁴. Etiopatogeneze vzniku sialolitiázy není dosud zcela objasněna a vysvětluje ji několik teorií (mechanická, zánětlivá, chemická, neurogenní, přítomnost cizího tělesa). Nejspíše však vzniká vždy kombinací několika výše uvedených faktorů^{2,5}. Léčba pacientů je chirurgická a v terapii se začínají prosazovat tzv. miniinvasivní, žlázu šetřící techniky, reprezentované zejména sialendoskopií (endoskopická diagnostika a léčba vývodového systému slinných žláz)⁶. Velikost slinných kamenů se pohybuje od 1 mm do 1 cm (cit.⁷). Jsou popsány kameny o velikosti větší než 1,5 cm, nebo tzv. obří kameny o velikosti 3,5 až 7 cm (cit.^{3,8}). U pacientů se může vyskytnout i více než jeden sialolit². Sialolity obvykle obsahují vápník, fosfor a uhlík^{9–12}.

K objasnění vzniku sialolitů, popř. k prevenci sialolitiázy je důležité znát chemické složení velkého souboru kamenů slinných žláz. K charakterizaci sialolitů byly vybrány metody, které (s ohledem na jejich hmotnost) poskytovaly maximum informací o jejich složení a charakteru.

Experimentální část

Pracoviště autorů získalo během dvou let ve spolupráci s otorinolaryngologickým oddělením FN v Ostravě 40 vzorků slinných kamenů od pacientů různých věkových skupin a pohlaví. Kameny byly po vyjmutí důkladně očištěny a uskladněny, následně byly zváženy, byla změřena velikost a fotograficky zaznamenán jejich tvar a vzhled.

Za účelem získání maximálního množství informací o sialolitech byl vypracován postup jejich analýzy, ve kte-

Tabulka I

Základní dostupné informace o studovaných vzorcích sialolitů

č.	Věk	Pohlaví	Hmot. [mg]	č.	Věk	Pohlaví	Hmot. [mg]	č.	Věk	Pohlaví	Hmot. [mg]
1*	55	žena		15*	51	muž	75	28	29	muž	59
2*	54	muž		16	51	žena	11	29*	17	žena	8
4A*/B*	62	žena		17*			17	30*	31	muž	378
5*	25	žena		18			138	31*	52	muž	14
6	68	muž	188	19*	80	žena	5	32*	58	žena	4
7			1864	20*			549	34*	87	žena	20
8			206	21*	40	žena	9	35	78	muž	32
9*			88	22	43	muž	68	36		žena	60
10*	80	muž	18	23	62	žena	238	37	16	muž	28
11*	26	muž	101	24	25	muž	2	38	51	muž	27
12*	42	žena	2	25*	56	muž	1890	39*	45	žena	204
13*	46	muž	336	26*	39	žena	477	40*	61	muž	2
14*			66	27*	84	žena	7	41	20	žena	15

* vzorek obsahoval částice čistých kovů

rém byl kladen důraz na nedestruktivní techniky. Ke studiu povrchové struktury a chemického složení jednotlivých vzorků byly slinné kameny ponechány v původním stavu a byly nejprve analyzovány skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) firmy Philips XL-30 s rentgenovým spektrometrem EDAX. Tímto postupem byly analyzovány především místa na sialolitu odlišného vzhledu, a tedy i chemického složení. Ke studiu fázového složení vzorku byla použita metoda KBr tablety a difúzní reflektance infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (2000 PERKIN ELMER) a prášková rtg. difrakce pomocí práškového difraktometru (BRUKER D8 ADVANCE) s identifikací fází programem EVA. Vzorky byly před analýzou upraveny mletím na požadovanou velikost zrn. Diferenční termická analýza (DTA) byla provedena při jejich řízeném ohřevu v dynamické atmosféře argonu s průtokem $100 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ s rychlostí ohřevu $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ do $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ v kelímcích z $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (NETZSCH STA 409 EP).

Výsledky a diskuse

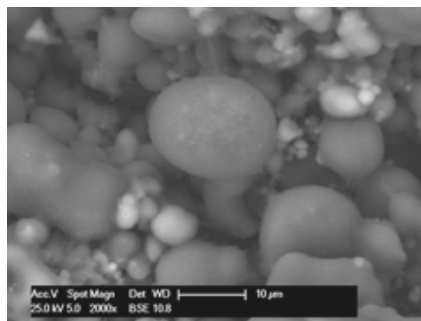
Identifikace, hmotnost a informace o pacientovi (věk, pohlaví) studovaných slinných kamenů jsou uvedeny v tab. I. Nejmladší pacient byl ve věku 16 let a nejstarší 87 let. Pouze jeden z pacientů (vzorek č. 4) měl slinný kámen v pravé i levé podčelistní žláze. V souboru studova-

ných sialolitů se nacházely kameny o hmotnosti od 2 mg do 1890 mg, průměrná hmotnost se pohybovala okolo 200 mg. Na fotografii vzorku č. 25 (obr. 1) je viditelný povrch slinného kamene, který u převážné většiny studovaných vzorků byl tvořen vrásčitými ploškami, vzájemně oddělenými prasklinami, jak ukazuje také snímek SEM vzorku č. 8 při zvětšení $150\times$ (obr. 2). U mnoha vzorků byly při větším zvětšení povrchu vzorku pozorovány také kulovité částice o velikosti mikro až nanometrů, jak ukazuje snímek SEM vzorku č. 28 pořízený při zvětšení $2000\times$ (obr. 3). Literatura také uvádí přítomnost četných mikrostruktur rozmanitých tvarů^{10,12,13}. Z pozorovaného vzhledu sialolitů lze usuzovat, že po vzniku nukleačního zárodku a vzniku krystalu dochází k jeho růstu postupně. Na povrchu současně mohou vznikat další nukleační centra a mohou růst další krystaly.

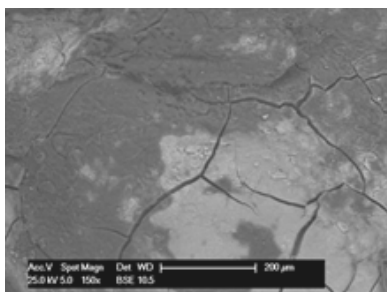
Detailní analýza sialolitů pomocí EDAX (bodová i z plochy) prokázala, že všechny studované vzorky obsahovaly především C, O, Ca a P. Tento závěr potvrzují také publikované studie^{9,12}. Analýza EDAX byla u každého vzorku provedena v několika bodech a plochách, které byly vybrány na základě jejich odlišného vzhledu. Příklad takové analýzy ukazuje obr. 4, který znázorňuje vzorek č. 7 při zvětšení $1000\times$ s vyznačenými místy analýzy (body 4b a 5b) shrnuté v tab. II. $77,5 \%$ sialolitů dále obsahovalo např. Mg, $72,5 \%$ vzorků Na a $37,5 \%$ vzorků obsahovalo také K. U 63% vzorků byla dokázána přítomnost Al, Fe, Cu, Ni, Pb, Ti, Zn. Uvedené prvky byly nalezeny



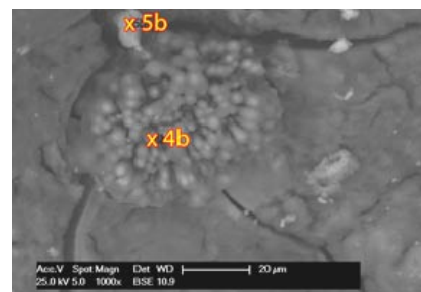
Obr. 1. Fotografie povrchu slinného kamene vzorku č. 25



Obr. 3. Fotografie vzorku sialolitu č. 28 pořízena při zvětšení $2000\times$



Obr. 2. Fotografie vzorku sialolitu č. 8 pořízena při zvětšení $150\times$



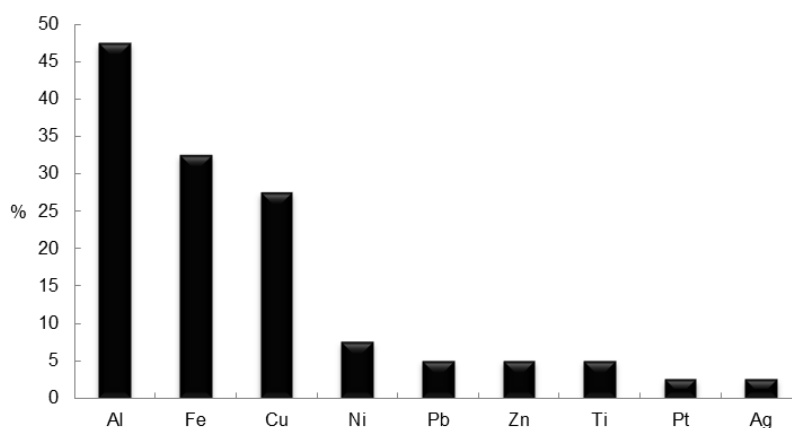
Obr. 4. Fotografie vzorku sialolitu č. 7 pořízena při zvětšení $1000\times$

Tabulka II
Obsah nalezených prvků ve vybraných bodech vzorků sialolitů č. 7 a 4A

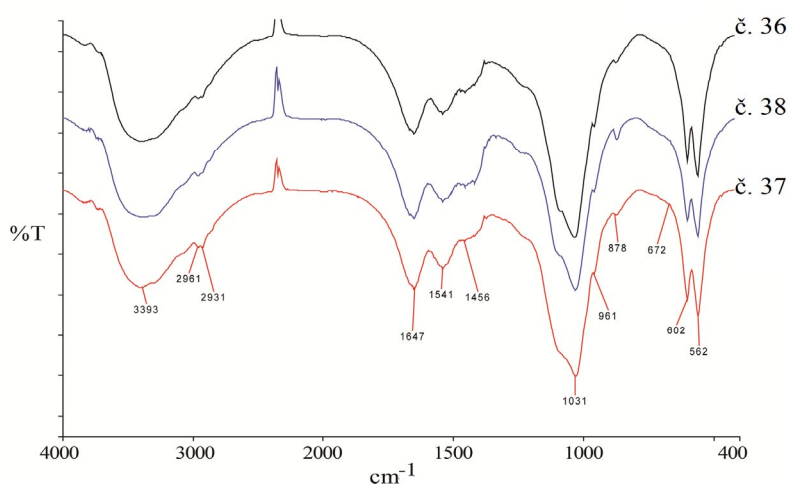
Prvek	Obsah ve vzorku č. 7 [hm. %]		Obsah ve vzorku č. 4A [hm. %]
	bod 4b	bod 5b	bod 1
C	60	25	4
O	24	17	7
P	6	5	1
S	1	–	–
Ca	9	53	3
Pb	–	–	85

i ve formě čistých kovů, jako např. Pb ve vzorku č. 4A. Četnost výskytu kovů ve studovaných vzorcích shrnuje obr. 5. Věk nejmladšího pacienta, u něhož byly nalezeny částice kovů, byl 17 let a věk nejstaršího pacienta 87 let. Je pravděpodobné, že částice kovů byly zachyceny na povrchu slinného kamene a pocházejí ze znečištěného životního prostředí. Podle charakteru polutantu je tento buď organismem vyloučen, nebo dochází k akumulaci v tkáních. Pokud polutant vstupuje orálně, může být vstřebán slinami a postupně zachycen na sialolitu, popř. na stěně slinné žlázy a může vyvolat nukleaci sialolitu^{2,5}.

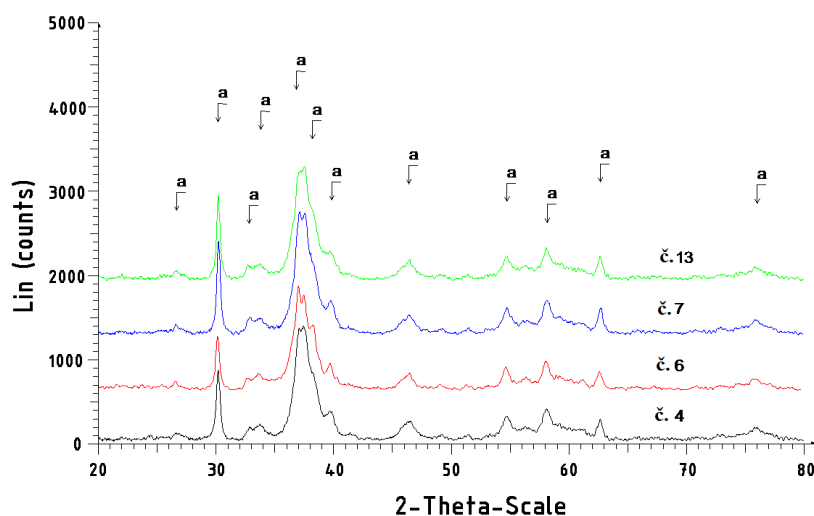
Analýza infračervených spekter dokázala, že všechny vzorky jsou podobného složení a obsahují charakteristické skupiny především uhličitánů (s vlnočty 1456 a 878 cm^{-1}), fosforečnanů (s vlnočty 2914, 1031, 672, 602 a 546 cm^{-1}), hydrogenfosforečnanů (s vlnočty 961 cm^{-1}) a H-O odpovídá-



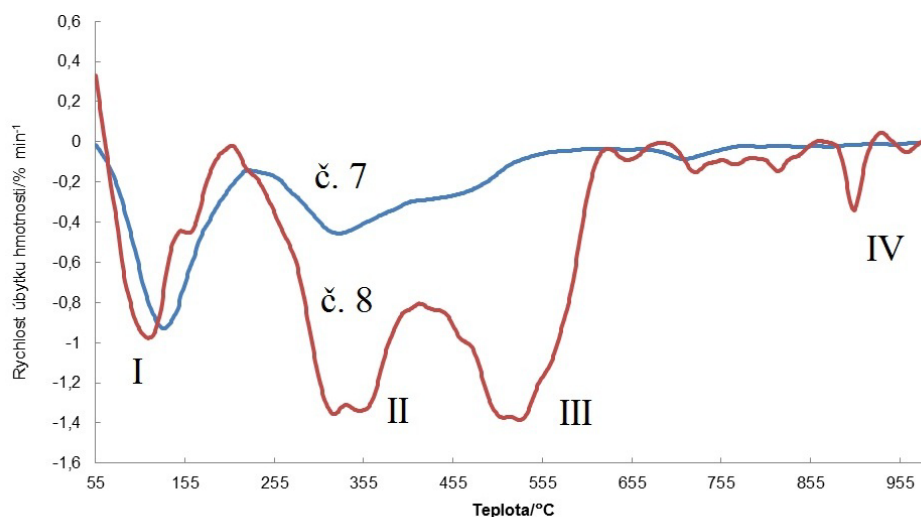
Obr. 5. Četnost výskytu kovů ve studovaných vzorcích sialolitů



Obr. 6. IČ spektrum vybraných vzorků sialolitů č. 36–38



Obr. 7. Difrakční záznam vzorků sialolitů 4, 6, 7 a 13; fáze označená a) je hydroxyapatit, $\text{Ca}_{9,74}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2,08}$



Obr. 8. DTG křivky vzorků sialolitů č. 7 a 8; I – dehydratace, II – dehydroxylace, III – dekarboxylace, IV – dekarboxylace

ující H_2O (vlnočet 1647 cm^{-1}). Pás s vlnočtem 2931 cm^{-1} odpovídá $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{CO}_3\text{OH})_6(\text{OH})_2$ a s vlnočtem 1541 cm^{-1} deformační vibraci N-H skupiny (pocházející pravděpodobně z proteinu). Pásky v oblasti nad 3000 cm^{-1} odpovídají vlhkosti. Výsledky dokumentují IČ spektra vybraných vzorků na obr. 6. Uvedené zjištění je v dobré shodě s literárními údaji^{9–12} i s výsledky rtg. difrakční analýzy na obr. 7 s příkladem difrakčního záznamu vzorků č. 4, 6, 7 a 13. Vedle hydroxyapatitu $\text{Ca}_{9,74}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2,08}$ (HAP) mohou vzorky obsahovat fosforečnan hořečnatu-sodno-vápenatý $(\text{Ca}_{3,892}\text{Na}_{0,087}\text{Mg}_{0,021})(\text{Ca}_{5,491}\text{Na}_{0,123}\text{Mg}_{0,028})(\text{PO}_4)_{5,1}$

a hydroxid hydrogenfosforečnan vápenatý $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$, jejichž difrakční záznamy se překrývají s převažující složkou HAP. Výsledek se shoduje s pracemi Teymoortash a spol.¹¹ a Bahadir Giray a spol.¹²

DTA byly sledovány pouze vzorky, které neobsahovaly částice kovů. Pomocí termogravimetrických (TG) a derivačních termogravimetrických (DTG) křivek (viz obr. 8) byly indikovány čtyři děje: dehydratace (ztráta adsorbované vody do 200 °C), dehydroxylace (ztráta krystalové vody do 400 °C), dekarboxylace (uvolnění CO_2 při rozkladu MgCO_3 do 620 °C) a dekarboxylace (uvolnění

CO₂ při rozkladu CaCO₃ do 950 °C). Z uvedeného příkladu DTG křivek na obr. 8 vyplývá, že termická degradace vzorku č. 7 a 8 probíhá odlišným způsobem. Absence posledního píku (IV) u vzorku č. 7 dokazuje, že tento vzorek neobsahuje CaCO₃. Rovněž píky II a III u tohoto vzorku jsou nevýrazné, takže i obsah MgCO₃ je nepatrný. Naproti tomu vzorek č. 8 prokázal přítomnost obou uhličitánů, identifikovaných píky III a IV. Obsah vody je u obou vzorků srovnatelný. Hydroxyapatit (HAP) i uhličitán hydroxyapatitu v teplotním rozsahu 20–1200 °C nepodléhají žádným degradacím a jsou v tomto teplotním intervalu termicky stabilní¹⁴. DTA i IČ spektroskopii bylo dokázáno, že všechny sialolity obsahují srovnatelný obsah vlhkosti.

Převažující složka slinných kamenů HAP je hojně využívána v biomedicínských aplikacích díky jeho podobnosti s anorganickou minerální složkou zubů a kostí. Pro tyto aplikace se připravuje tzv. mokřým srážením, při kterém se na rozdíl od jiných technik nepoužívají organická rozpouštědla a lze ho popsat chemickou reakcí¹⁵:



Je pravděpodobné, že ve slinách pacientů dochází ke vzniku HAP podle uvedené reakce s následnou krystalizací z roztoku a postupným obalováním dalšími složkami ze slin pacienta. Vznik a růst krystalu z kapaliny nebo přesyaceného roztoku lze rozdělit do několika stádií¹⁶, které zahrnují a) vznik krystalových center, b) růst krystalů a c) spojení malých krystalů za vzniku větších agregátů.

Závěr

V práci byl studován soubor slinných kamenů, které byly vyjmuty pacientům ve FN Ostrava v průběhu dvou let. Průměrná hmotnost studovaných sialolitů byla 200 mg, minimální byla 2 mg, maximální 1890 mg. Slinné kameny byly studovány elektronovou mikroskopií, IČ spektroskopii, rtg. práškovou diffrakcí a DTA.

Získané výsledky ukazují, že všechny studované slinné kameny mají vrásčitý povrch s výskytem prasklin. Vzhled vzorků vypovídá o postupném růstu sialolitu. Hlavní složkou všech vzorků jsou prvky C, O, Ca a P, které tvoří hydroxyapatit. Jednotlivé sialolity se mohou lišit v obsahu CaCO₃ a MgCO₃. Mimo uvedené prvky, 63 % vzorků obsahovalo také Al, Fe, Cu, Ni, Pb, Ti a Zn. Některé kovy (např. Pb) byly nalezeny i ve formě čistých kovových nanočástic. Tato skutečnost může být důkazem, že tyto částice vstupují orálně do organismu, jsou obsaženy ve slinách a následně se usazují na sialolitech nebo inicializují jejich vznik.

Autoři práce děkují za finanční podporu MŠMT (i. č. SP2014/85) a doc. Ing. V. Matějkovi, Ph.D.

LITERATURA

- Choi J., Kim I. K., Oh N. S.: *Int. J. Oral Surg.* 31, 562 (2002).
- Torres Lagares D., Barranco Piedra S., Serrera Figallo M. A.: *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 11, 80 (2006).
- Ledesma-Montes C., Garcés-Ortíz M., Reyes-Gasga J., Saldico-García J. F., Hernández-Flores F.: *Ultrastruct. Pathol.* 31, 385 (2007).
- Lustmann J., Regev E., Melamed Y.: *Int. J. Oral Surg.* 19, 135 (1990).
- Bodner L.: *J. Laryngol. Otol.* 113, 266 (1999).
- Iro H., Zenk J., Escudier M. P., Nahlieli O., Capaccio P., Katz P., Brown J., McGurk M.: *Laryngoscope* 119, 263 (2009).
- Dalkiz M., Dogan N., Beydemir B.: *Turk. J. Med. Sci.* 31, 177 (2001).
- Rai M., Burman R.: *J. Oral Surg.* 67, 1329 (2009).
- Zelentsov E. L., Moroz T. N., Kolmogorov Yu. P., Tolmachev V. E., Dragun G. N., Palchik N. A., Grigorieva T. N.: *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A* 470, 417 (2001).
- Jayasree R. S., Gupta A. K., Vivek V., Nayar V. U.: *Laser Med. Sci.* 23, 125 (2008).
- Teymoortash A., Buck P., Jepsen H., Werner J. A.: *Arch. Oral Biol.* 48, 233 (2003).
- Giray C. B., Dogan M., Alkalin A., Baltusaitis J., Chan D. C., Skinner H. C., Dogan A. U.: *Scanning* 29, 206 (2007).
- Ledesma-Montes C., Garcés-Ortíz M., Saldico-García J. F., Hernández-Flores F., Hernández-Guerrero J. C.: *J. Oral Surg.* 65, 128 (2007).
- Hatakeyama T., Liu Z., v knize: *Handbook of Thermal Analysis*, XV, str. 452. Wiley, Chichester 1998.
- Nayak A. N.: *Int. J. ChemTech. Res.* 2, 903 (2010).
- Triendl L.: *Chemická kinetika*. SPN, Bratislava 1978.

E. Gryčová^a, J. Seidlerová^a, P. Štrympl^b, and S. Vallová^c (^a Nanotechnology Centre, Technical University, Ostrava, ^b Faculty Hospital, Ostrava, ^c Faculty of Metallurgy and Materials Engineering, Technical University, Ostrava): **Study of Salivary Stones**

Forty samples of salivary stones were studied by IR spectroscopy, SEM, DTA and X-ray powder diffraction. A procedure for their analysis was developed. Micro- and nanometric spherical particles were observed on the stone surface, which indicates their gradual growth. The mentioned methods have proved the same hydroxyapatite composition of the studied stones. 63 % of them contained various toxic metals such as Pb, Ti and Zn. The presence of metals on the stone surface proved the negative effect of environmental pollution on human health.