



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKA ISTRAŽIVANJA**

**KARAKTERIZACIJA STRUKTURE I
ADHEZIVNA SVOJSTVA GLEĐI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**Mentor:
Prof. dr Tatjana Puškar**

**Kandidat:
dr Kristina Vicko**

Novi Sad, 2020 godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Kristina Vicko
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Tatjana Puškar, vanredni profesor, Stomatologija (Stomatološka protetika), Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Karakterizacija strukture i adhezivna svojstva gleđi
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Novi Sad, Vojvodina
Godina: GO	2020.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: (broj poglavlja / stranica / slika / tabela / grafikona / referenci) FO	(10 / 131 / 28 / 9 / 13 /187)
Naučna oblast: NO	Stomatologija
Naučna disciplina: ND	Stomatološki materijali
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	zubna gleđ; kondicioniranje zubne gleđi; adhezivi; ispitivanje stomatoloških materijala; skeniranje elektronskim mikroskopom; nagrivanje gleđi kiselinom
UDK	616.314.13:615.461
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	<p>UVOD: Gleđ je supstrat adhezije direktnih i indirektnih ispuna, ljuspi, splintova, zalivača i ortodontskih bravica. Adhezija između materijala i zubnog tkiva je ključna za uspešno sprovođenje različitih stomatoloških intervencija. Ova veza, bez obzira na brojnost i raznovrsnost novih materijala nije u potpunosti rešena. CILJ: Ispitati mehaničke i hemijske osobine gleđi nakon tretmana različitim kondicionerima za pripremu gleđi. Odrediti tvrdoću i modul elastičnosti, odrediti hemijski udeo minerala kalcijuma i fosfata u površinskom sloju gleđi pre i posle nagrivanja različitim kiselinama i utvrditi uticaj prizmatičnosti gleđi na stepen nagrivanja gleđi primenom različitih kiselina. METODE: Sprovedeno je in vitro istraživanje na ekstrahovanim humanim zubima. U odnosu na primenjeni kondicioner analizirano je 192, od toga 96 uzoraka stalnih zuba i 96 uzoraka mlečnih zuba. Pripremljeni uzorci gleđi su analizirani pre i nakon primene četiri vrste kondicionera: 37% ortofosforne kiseline (Kerr, Gel etchant), 10% poliakrilne kiseline (GC, Dentin Conditioner), monomera extra fosforne kiseline (GC G bond), hidroksietilmetakrilata sa fosforom kiselinom (3M Unitek, Transbond™ Plus Self Etching Primer). Određivana je tvrdoća i modul elastičnosti gleđi nanoindentacijom, struktura površinskog sloja gleđi pomoću skeniranja elektronske mikroskopije, dok je hemijski sastav površinskog sloja gleđi određen metodom energetske disperzije spektroskopije.</p>

	<p>REZULTATI: Rezultati modula elastičnosti unutar grupe mlečnih zuba ukazali su na postojanje statistički značajnih razlika između rezultata netretirane okluzalne površine i svih tretiranih uzoraka okluzalne površine, dok analiza tvrdoće gleđi u istoj grupi, ukazala je na statistički značajne razlike između vrednosti netretiranih i svih tretiranih uzoraka, na svim površinama, osim na uzorcima bukalne površine tretiranih poliakrilnom kiselinom. U grupi stalnih zuba, postoje statistički značajne razlike vrednosti modula elastičnosti između uzoraka tretiranih ortofosfornom kiselinom, bez obzira na površinu zuba, u odnosu na grupe u kojima su korišćeni drugi kondicioneri, osim kada su poređeni uzorci lingvalne površine stalnih zuba tretirani ortofosfornom kiselinom sa uzorkom - iste površine tretirane Transbondom. Rezultati tvrdoće gleđi stalnih zuba pokazali su statistički značajne razlike između netretirane, kontrolne grupe i svih grupa testiranih kondicionera, bez obzira na ispitivanu površinu zuba. Svaki primenjeni kondicioner promenio je površinsku morfologiju uzorka. Ortofosforna i poliakrilna kiselina, u najvećoj meri su uticala na pojavu polja nagrivanja tipa 1 i tipa 2. Primenom G bonda i Transbonda pored tipa 1, veliki udeo polja nagrivanja bio je tipa 5. Analiza hemijskih elemenata površinskog sloja gleđi uzoraka pre i nakon kondicioniranja ukazala je na smanjenje udela analiziranih elemenata, osim kiseonika čiji se maseni udeo povećao nakon tretmana sa svim kondicionerima u grupi stalnih i mlečnih zuba.</p> <p>ZAKLJUČAK: Vrednosti tvrdoće gleđi i vrednosti modula elastičnosti značajno se smanjuju nakon nagrivanja gleđi u stepenu koji je u zavisnosti od primenjenog kondicionera. Efekat nagrivanja aprizmatične gleđi je značajno manji u odnosu na stepen nagrivanja prizmatične gleđi, primenom svih testiranih kondicionera. Hemijski udeo minerala kalcijuma i fosfata u površinskom sloju gleđi je značajno niži posle nagrivanja u odnosu na vrednosti pre nagrivanja gleđi, međutim sam odnos Ca i P se ne menja.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	19.4.2018
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: Prof. dr Bojan Petrović, vanredni profesor, Stomatologija (Dečija i preventivna stomatologija), Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Doc. dr Bojana Milekić (Stomatološka protetika), docent, Stomatologija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Doc. Pal Terek (Katedra za tehnologije oblikovanja materijala i inženjerstvo površina), docent, Fakultet Tehničkih Nauka, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Prof. dr Tamara Perić, vanredni profesor (Dečija i preventivna stomatologija), Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu</p> <p>član: Doc.dr Karolina Vukoje, (Bolesti zuba), docent, Stomatologija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p>
---	---

University of Novi Sad
Faculty
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D Thesis
Author: AU	Kristina Vicko
Mentor: MN	Tatjana Puškar, DMD, Ph.D, Associate professor, Medical Faculty, University of Novi Sad
Title: TI	Characterization of the structure and adhesive properties of enamel
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Novi Sad, Vojvodina
Publication year: PY	2020.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad

Physical description: (Chapters / pages / figures / tables / graphs / references) PD	(10 / 131 / 28 / 9 / 13 / 187)
Scientific field SF	Dentistry
Scientific discipline SD	Dental materials
Subject, Key words SKW	Dental Enamel; Dental Etching; Adhesives; Materials Testing; Microscopy, Electron, Scanning; Acid Etching; Dental
UC	616.314.13:615.461
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Note: N	-
Abstract: AB	<p>INTRODUCTION: Dental enamel is a substrate for the adhesion of direct and indirect fillings, veneers, splints, fissure sealants and orthodontic brackets. Adhesion between the material and dental tissue is key to success of various interventions in dentistry. Despite the abundance and variety of new materials, adhesion has not been fully resolved. OBJECTIVES: To investigate the mechanical and chemical properties of the enamel after treatment with different conditioners. Determine the hardness and modulus of elasticity, the chemical content of calcium and phosphate minerals in the surface layer of the enamel before and after etching with different acids, and define the effect of enamel prismaticity on the degree of demineralisation by applying different acids. METHODS: An in vitro study was performed on extracted human teeth. In relation to the conditioner used, 192 were analyzed, of which 96 were permanent teeth and 96 were deciduous teeth. Prepared enamel samples were analyzed before and after the application of four types of conditioner: 37% orthophosphoric acid (Kerr, Gel etchant), 10% polyacrylic acid (GC, Dentin Conditioner), phosphoric acid ester monomer (GC G bond), hydroxyethyl methacrylate with phosphoric acid (3M Unitek, Transbond TM Plus Self Etching Primer). The hardness and modulus of elasticity of the enamel were determined by nanoindentation, the structure of the enamel</p>

surface layer by scanning electron microscopy, while the chemical composition of the enamel surface layer was determined by energy dispersive spectroscopy. RESULTS: The results of the modulus of elasticity within the group of deciduous teeth indicated statistically significant differences between the results of untreated occlusal surface and all treated occlusal surface samples, while the analysis of the hardness of the enamel in the same group indicated statistically significant differences between the values of untreated and all treated samples, on all surfaces except buccal surface samples treated with polyacrylic acid. In the group of permanent teeth, there are statistically significant differences in the value of the modulus of elasticity between the samples treated with orthophosphoric acid, regardless of the tooth surface, compared to the groups in which other conditioners were used, except when the samples of the lingual surface of permanent teeth were treated with orthophosphoric acid in comparison to same sample group treated with Transbond. The results of the hardness of the permanent tooth enamel showed statistically significant differences between the untreated, control group and all groups of conditioners used, regardless of the tooth surface tested. Each conditioner applied changed the surface morphology of the sample. Orthophosphoric and polyacrylic acid, to a large extent, influenced the appearance of etching patterns type 1 and type 2. Using G bond and Transbond alongside to type 1, a large proportion of the etching pattern was type 5. Analysis of the chemical components of the surface layer of the enamel samples before and after conditioning indicated reduction of the proportion of analyzed elements, except for oxygen whose mass fraction increased after treatment with all conditioners in the permanent and deciduous teeth group. CONCLUSION: The values of the hardness of the enamel and the values of the modulus of elasticity decrease significantly after etching of the enamel to a degree that depends on the conditioner applied. The etching effect on aprismatic enamel is significantly smaller than the degree of demineralisation of the prismatic enamel in all conditioners tested. The chemical content of calcium and phosphate minerals in the

	<p>surface layer of the enamel is significantly lower after the conditioning, however the Ca and P ratio does not change.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>April 19th, 2018.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president:</p> <p>Bojan Petrović, DDS, PhD, Associate Professor, Department of Pediatric and Preventive Dentistry, Faculty of Medicine, University of Novi Sad.</p> <p>member:</p> <p>Bojana Milekić, DMD, PhD, Assistant Professor, Department of Prosthodontics Faculty of Medicine, University of Novi Sad.</p> <p>member:</p> <p>Pal Terek, PhD, Assistant Professor (Chair of Forming Technologies and Surface Engineering) Faculty of Tehcnical Sciences, University of Novi Sad.</p> <p>member:</p> <p>Tamara Perić, DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Department of Pediatric and Preventive Dentistry, School of Dental Medicine, University of Belgrade.</p> <p>member:</p> <p>Karolina Vukoje, DMD, PhD, Assistant Professor, Department of Operative dentistry and endodontics, Faculty of Medicine, University of Novi Sad.</p>

Sadržaj

1. Uvod	13
2. Pregled literature.....	15
2.1. Formiranje, sastav i struktura gleđi	15
2.2. Mehanička svojstva intaktne gleđi	21
2.3. Hemijska svojstva intaktne gleđi.....	22
2.4. Svojstva kondicionirane površine gleđi	26
2.5. Klasifikacija dentalnih adhezivnih sistema	29
2.6. Klinički aspekti adhezije sa gleđi.....	31
2.7. Aktuelnosti istraživanja u oblasti	34
3. Cilj	37
4. Hipoteze.....	38
5. Materijali i metode rada.....	39
5.1. Izbor i priprema uzoraka	39
5.2. Osnove metode nanoindentacije.....	43
5.3. Protokol nanoindentacije u istraživanju	49
5.4. Osnove SEM-EDS analize	50
5.5. Protokol SEM-EDS analize u istraživanju	51
5.6. Statistička metodologija	54
6. Rezultati.....	55
6.1. Rezultati određivanja modula elastičnosti i tvrdoće gleđi nanoindentacijom.....	55
6.2. Rezultati analize hemijskog sastava površinskog sloja gleđi SEM-EDS metodom..	68
6.3. Rezultati analize morfologije površinskog sloja gleđi primenom SEM	72
7. Diskusija	82
7.1. Diskusija materijala i metoda.....	82

7.2. Diskusija rezultata	87
7.3. Naučni i stručni doprinos	105
7.4. Primena rezultata istraživanja u kliničkoj praksi	105
7.5. Budući pravci istraživanja	105
8. Zaključak	107
9. Literatura	109
10. Prilog	126

Pregled korišćenih akronima

Akronim	Naziv na engleskom	Naziv na srpskom
AFM	Atomic force microscopy	Mikroskopija Atomskih Sila
E	Elasticity	Elastičnost
EDS	Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy	Energetska Disperziona Spektroskopija
H	Hardness	Tvrdoća
LED	Light Emitting Diode	Svetleća dioda
SEM	Scanning Electronic Microscopy	Skenirajuća Elektronska Mikroskopija

1. Uvod

Predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvatila su ispitivanja mehaničkih i hemijskih svojstva gleđi nakon tretmana različitim kondicionerima za pripremu gleđi za različite stomatološke intervencije.

Adhezivnost, odnosno veza između stomatoloških materijala i zubnog tkiva je ključna za uspešno sprovođenje različitih stomatoloških intervencija. Ova veza, bez obzira na brojnost i raznovrsnost novih stomatoloških materijala nije u potpunosti rešena.

Gleđ je supstrat adhezije direktnih i indirektnih ispuna, kompozitnih i keramičkih ljusti, splintova, zalivača i ortodontskih bravica. Fizička i hemijska svojstva intaktne i preparirane gleđi su različita. U ortodonciji koristi se intaktna bukalna ili lingvalna površina gleđi, kod zalivača okluzalna, a za ispune i ljuste preparisana, presečena gleđ. U dosadašnjim istraživanjima adhezivne veze prvenstveno je fokus na adheziji za hidrofilni dentin, vrstama materijala, hemijskom sastavu i načinu polimerizacije materijala, uslovima usne duplje ali je mali broj radova publikovan na temu uticaja strukture površine gleđi.

Osnovni zadatak adhezivnih sredstava je da formiraju permanentnu vezu između zubnog tkiva i materijala. Ova veza se ostvaruje mehaničkom retencijom, hemijskom adhezijom ili kombinacijom obe. Za obezbeđenje adhezivne veze neophodna je priprema gleđi kondicionerima tehnikom nagrizanja, kada se na površini gleđi formiraju mikrošupljine u koje mogu prodreti adhezivni materijali. Dosta je pažnje poklonjeno načinu pripreme i kondicioniranju gleđi ortofosfornom kiselinom ali ne i analizi kondicionirane gleđi drugim kiselinama koje se sve više koriste u kliničkoj praksi. Ne postoje precizni klinički protokoli u adhezivnim tehnikama sa gleđi. Za sada postoje razlike u postupku primene adheziva isključivo u odnosu na tip zuba (mlečni i stalni), dok ne postoje preporučeni protokoli za različite strane zuba niti za različite adhezivne supstrate kao što su ispuni, zalivači, splintovi, ljuste i bravice. Takođe ne postoji razlika u preporukama primene adheziva kod intaktne i preparirane gleđi.

Detaljna istraživanja o fizičkim i mehaničkim svojstvima zuba su veoma značajna u restaurativnoj stomatologiji i nauci o dentalnim materijalima. Proširenjem indikacija u kojima se koriste novi adhezivni sistemi, kao što su preventivna stomatologija, ortodoncija i dentalna traumatologija, supstrati tvrdih zubnih tkiva koji se koriste tokom ovih procedura i tehnika zahtevaju poseban osvrt i bliža objašnjenja. Ovi podaci su neophodni za numeričko

modelovanje restauriranih zuba kako bi se razumeli procesi prenosa sila unutar zuba, koji je sastavljen od različitih struktura sa različitim mehaničkim svojstvima, ali bi trebalo, sa kliničkog aspekta delovati kao jedna mehanička celina. U idealnom slučaju, restauracija bi trebalo da se ponaša i fizički, termodinamički i mehanički poput samog zuba u oralnom okruženju, posebno kada je podvrgnuta mastikaciji. Očekuje se da će pod silom žvakanja, svaka postavljena zubna nadoknada s adekvatnim i uporedivim mehaničkim svojstvima kao u susednoj strukturi zuba imati duži vek trajanja. Na primer, razlike u modulu elastičnosti gleđi i kompozitne smole rezultiraju značajnim odstupanjima pod okluzalnom silom i visokim lokalizovanim naprežanjem na međuspoju, potencijalno kompromituje ove ključne oblasti, što može rezultirati neuspehom restauracije na međuspoju ili mikrocurenjem, te posledičnim sekundarnim karijesom.

U analizi sistema gleđ-kondicioner-adheziv, neophodno je poznavati tačne osobine svake karike u lancu ponaosob. Pregledom literature zaključuje se da je nedovoljno istražena uloga strukturnih, morfoloških, mehaničkih i hemijskih svojstava gleđi u ovom lancu. Dosadašnja istraživanja u vezi adhezije najčešće su polazila od pretpostavke da gleđ svih zuba podjednako neravnomerno pokazuje prisustvo prizmatične i aprizmatične gleđi. Ipak, istraživanja navode na mogućnost da kvalitet veze sa gleđi zavisi, pre svega od prisustva prizmatične gleđi, a da velika polja aprizmatične gleđi mogu da kompromituju uspeh adhezivne veze zbog nemogućnosti materijala da stvori fizičku vezu sa gleđi.

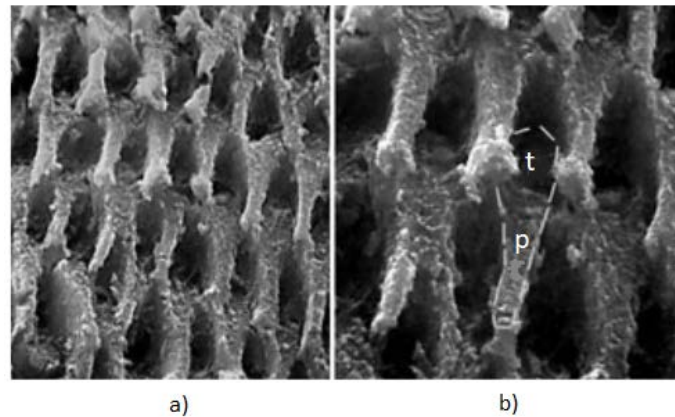
Kod ortodontskih bravica, prevelika jačina veze adheziva sa zubom dovodi do oštećenja zuba, kidanja gleđnih prizmi prilikom skidanja, a premala jačina veze do prevremenog odlepljivanja bravica. Neadekvatna jačina veze može dovesti do neuspeha u terapiji sa ljuspama takođe u vidu odlepljivanja, a kada su u pitanju zalivači jamica i fisura nemogućnost ostvarivanja adekvatne adhezivne veze dovodi do smanjene retencije i ispadanja zalivača. Ostvarivanje adekvatne adhezivne veze moguće je samo uz dobru retenciju adheziva, za šta je neophodno prisustvo prizmatične gleđi. Utvrđivanje postojanja i rasporeda polja aprizmatične gleđi na različitim površinama zuba je od izuzetne važnosti radi postizanja optimalnog kliničkog učinka terapijskih procedura.

2. Pregled literature

2.1. Formiranje, sastav i struktura gleđi

Gleđ je najčvršće tkivo ljudskog organizma i predstavlja visoko-mineralizovanu kristalnu strukturu. Po građi, gleđ sadrži 96% minerala, 4% organskog matriksa i vode. Po hemijskom sastavu gleđni kristali veoma su slični hidroksiapatitima u prirodi. U odnosu na čist hidroksiapatit, gleđni kristali kao „biološki apatiti“, sadrže i nečistoće, jone magnezijuma i karbonata [1].

Gleđ potiče od epitelijalnih ćelija ektoderma. Epitelijalne ćelije se diferenciraju u preameloblaste koji se u sledećoj fazi diferenciraju u sekretorne ameloblaste. Mos-Salentijn (*Moss-Salentijn*) i sar. opisuju tri stadijuma životnog ciklusa ameloblasta: citodiferencijaciju, sekreciju proteinskog matriksa i maturaciju gleđi [2]. U toku embrionalnog razvoja gleđi, preameloblasti sekretuju proteine gleđnog matriksa koji ubrzo započinju formiranje gleđi na površini dentina, udaljavajući se od ove površine i krećući se ka površini buduće krunice zuba. Nakon formiranja inicijalnog sloja gleđi, preameloblasti razvijaju sekretorne produžetke, tzv. Tomesove procesuse i postaju ameloblasti. Pored pojave ovih produžetaka, telo ćelije postaje izduženo, povećava se broj organela, posebno onih zaduženih za sintezu proteina. Tomesovi procesusi su značajni za razvoj gleđi, s obzirom da njihov oblik određuje orijentaciju proteina matriksa i položaj kristala hidroksiapatita. Sekretorni kraj Tomesovog procesusa formira prizmu, dok apikalni deo ameloblasta u blizini početka Tomesovog procesusa sekretuje interprizmatični deo. Na ovaj način stvara se tkivo gleđi koje na preseku podseća na „ključaonicu” ili na „saće meda” koje je predstavljeno na slici 2-1[3].



Slika 2-1. Tomesovi procesusi a) Slojeviti položaj ameloblasta koji formiraju prizmatičnu gleđ b) Tomasov procesus: t-telo ameloblasta; p – procesus. Modifikovano od Skobe Z.[3].

Formiranje kristala počinje u ranoj sekretornoj fazi amelogeneze, blizu apikalnog kraja ameloblasta. Inicijalna mineralizacija započinje unutar proteina matriksa blizu gleđno-cementne granice. Mineralizacija se odvija u fazama, pri čemu se u prvoj fazi mineralizuje sloj gleđi debljine oko $8\mu\text{m}$, osim sloja u neposrednoj blizini gleđno-dentinske granice. U drugoj fazi, mineralizuju se i površinski slojevi gleđi. Tokom treće faze, mineralizacija je jača na unutrašnjem sloju tkiva, dok finalna mineralizacija započinje od spoljašnjeg sloja koji po završetku formiranja postaje najjače mineralizovani deo gleđi [3].

U momentu dostizanja pune debljine gleđnog sloja, ameloblasti završavaju sekretornu funkciju, dolazi do njihove apoptoze, čime formirana gleđna površina, postaje besćelijska zona.

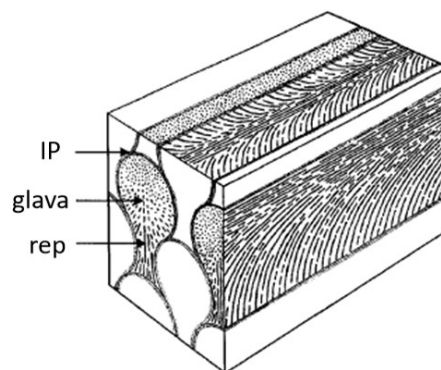
Gleđni matriks sadrži 80-90% proteina (amelogenin, enamelin, ameloblastin) i 10-20% minerala, što se značajno razlikuje od zrele gleđi koja sadrži 80-90% mineralne supstance [4].

Matriks gleđi sadrži dve velike grupe proteina: amelogenine i enameline. Amelogenini su hidrofobni proteini koji čine 90% proteinskog matriksa pre maturacije. Uloga im je nerazjašnjena, međutim smatra se da regulišu fazu maturacije gleđi. U toku sazrevanja gleđi proteolitički enzimi postepeno degradiraju amelogenine, te njihova koncentracija opada [5]. Enameline su hidrofilni glikoproteini, vezani za hidroksiapatitne kristale koji ostaju u tom obliku i nakon sazrevanja gleđi. Bruks (*Brookes*) i sar. opisuju treću grupu proteina tzv. non-amelogenine. Smatra se da je ova grupa proizvod dejstva proteolitičkih enzima na amelogenine u fazi maturacije gleđnog matriksa [6].

Maturacija gleđi počinje nakon formiranja pune debljine matriksa i gubitka Tomesovog procesusa od strane ameloblasta. Tokom ove faze u matriksu se pojavljuje tkivna tečnost i dolazi do pojačane mineralizacije, kada od prethodnih 10-20% mineralnog sastava gleđi nastaje 80-90% [7,8].

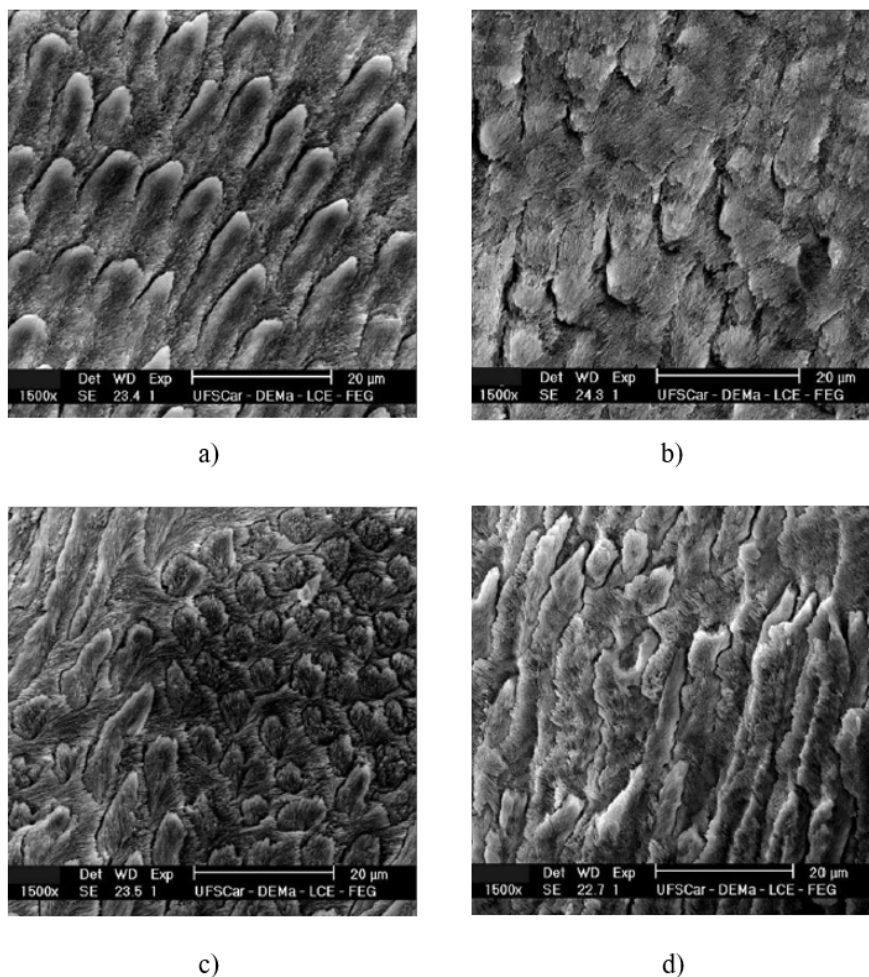
Osnovna strukturna jedinica građe zrele gleđi je heksagonalni hidroskiapatitni kristal ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Istraživanja osnovnih strukturnih jedinica zahtevaju tehnologiju visoke rezolucije, koja se u literaturi opisuje kao analiza ultrastrukture. U hijerarhiji strukture, kristali koji čine neorgansku komponentu gleđi, dalje se grupišu u mineralne nanofibrile, pri čemu grupa nanofibrila formira fibrile, koji se zatim organizuju u vlakna. Fibrili i vlakna formiraju prizmatična i interprizmatična polja posmatrajući na mikrostrukturnom nivou [9,10]. Postoje različite teorije o veličini i obliku kristala [11]. Bojd (*Boyde*) nalazi da je dijametar kristala relativno uniforman unutar gleđi i da oko 10.000 kristala čine prizmu [12]. Međutim, Sakaj (*Sakae*) nalazi da je veličina kristala veća u spoljašnjim slojevima gleđi [1]. Odnos kalcijuma i fosfata u hidroksiapatitu iznosi oko 1,67 i zavisi od mnogih faktora kao što su stepen mineralizacije, tip kristala, starosti tkiva, anatomske lokacije, kao i tehnika koje služe za određivanje njihovog sadržaja [13].

Gleđna prizma ima oblik teniskog reketa gde razlikujemo glavu, vrat i rep prizme. U predelu glave prizma je prosečno širine $5\mu\text{m}$, dok je rep najtanji deo, širine oko $1\mu\text{m}$. Visina prizme iznosi u proseku oko $9\mu\text{m}$. Spoljašnja površina prizme se naziva košuljica, a unutrašnjost, srž prizme (Slika 2-2) [14-16].



Slika 2-2. Šematski prikaz mikrostrukture gleđi, sa karakterističnim izgledom prizme u obliku teniskog reketa. IP – interprizmatično polje. Modifikovano od Habelic (*Habelitz*) i sar. [14]

Prosečna debljina gleđi na mlečnim zubima je 1,14 mm, dok kod stalnih zuba debljina gleđi iznosi 2,58 mm. Drugi autori analizom morfološke strukture gleđi nalaze da prosečne vrednosti širine glave prizme iznose 3,22-3,47 μm kod mlečnih zuba, a nešto su veće širine kod prizmi stalnih zuba i iznose 3,84-4,34 μm [17]. Fos (*Fosse*) i sar. analizirali su gustinu prizmi i našli 21.904 prizmi po mm^2 u površinskom sloju gleđi, dok u blizini gleđno-cementne granice ovaj broj iznosi 47.089 prizmi po mm^2 . Gustina prizmi je veća kod mlečnih nego kod stalnih zuba i broj prizmi raste idući ka unutrašnjem sloju gleđi [18]. Razlike u mikrostrukturi gleđi mlečnih i stalnih zuba prikazane su na slici 2-3.



Slika 2-3. a) Površinski sloj gleđi mlečnih zuba; b) Površinski sloj gleđi stalnih zuba; c) Gleđ mlečnog zuba blizu gleđno-cementne granice; d) Gleđ stalnog zuba blizu gleđno-cementne granice [17].

Veliki broj prizmi formira grupu koje, pružajući se zajedno, formiraju Hanter Šregerove (*Hunter-Schreger*) pruge. Ove pruge su optički fenomen koji nastaje usled različitog pravca pružanja grupe prizama. Hanter Šregerove pruge se lakše uočavaju na uzdužnim presecima u unutrašnjoj trećini gleđi [19,20].

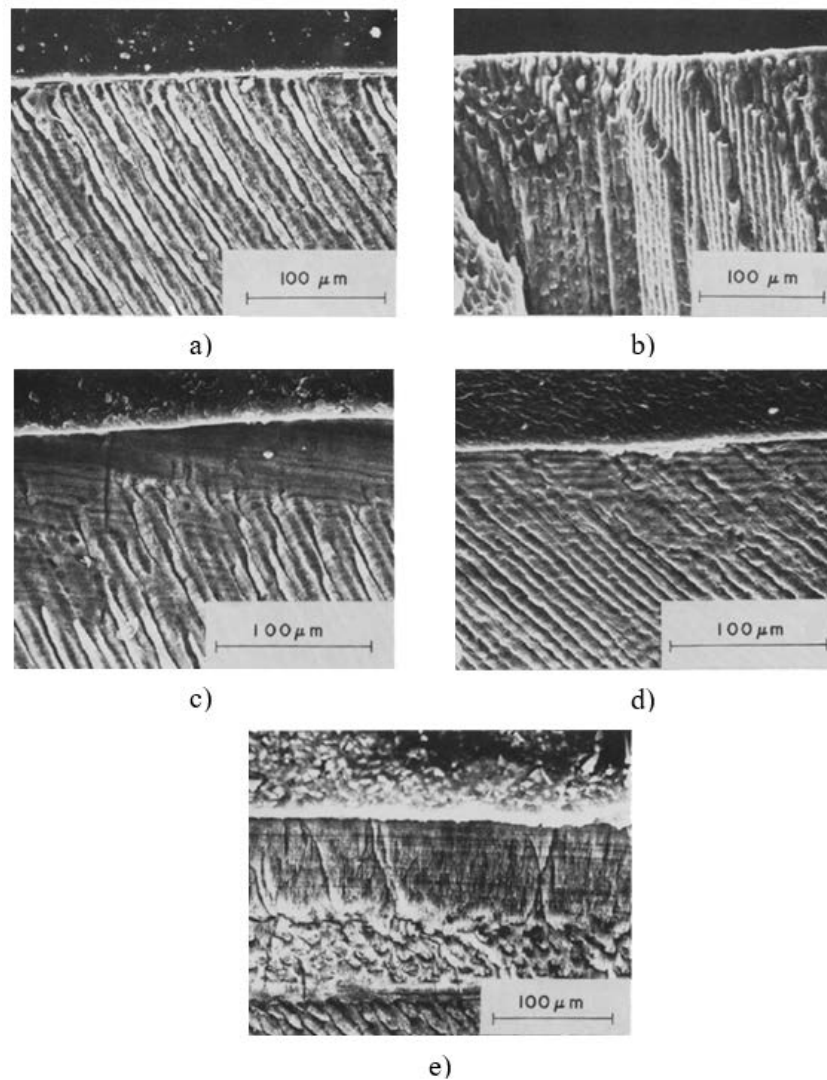


Slika 2-4. Aksijalni presek gleđi: posmatrano na svetlosnom mikroskopu uočavaju se Hanter-Šregerove pruge[20].

Posmatranjem površine pomoću SEM, morfologija površinskog sloja gleđi je različita u odnosu na dublje slojeve. Najšire prihvaćen opis površinskog sloja gleđi je klasifikacija po Vitakeru (*Whittaker*) uz pomoć SEM-a iz 1982. Godine [21]. Roj (*Raue*) i sar. predlažu novu metodu analize orijentacije gleđnih prizmi [22] korišćenjem metode difrakcije X-zraka. U svom radu zaključuju da ova metoda može dati precizne informacije o strukturi gleđi, međutim sama tehnika analize zahteva dalja istraživanja u budućnosti [22].

Struktura površinskog sloja gleđi po Vitakeru (*Whittaker*) obuhvata tri grupe [21]. Tip 1: Prizme su dominantno prisutne i međusobno su najčešće jasno ograničene. Pružaju se relativno upravno ka površini, dok u predelu vrata zuba prizme se savijaju približno 50 μm . Tip 2: Prizme nisu uočljive u površinskom sloju i ovaj tip predstavlja tzv. aprizmatičnu strukturu. Obod prizmi se završava dalje od površinskog sloja, gde spojeni obodi prizmi međusobno formiraju prelomljenu liniju u vidu stepenice [21]. Oprečna su mišljenja o

frekvenciji i distribuciji aprizmatičnih polja. Tip 3 je kompleksna struktura kombinacije tipa 1 i 2 (Slika 2-5).



Slika 2-5. Klasifikacija površinskog sloja gleđi po Vitakeru (Whittaker). Tip 1: SEM snimak a i b. Tip 2: SEM snimak c i d. Tip 3: SEM snimak e [21].

Vitaker (Whittaker) je dokazao da je debljina aprizmatične gleđi veća kod bočnih nego prednjih zuba i pretpostavio da to ima uticaja na jačinu adhezivne veze [21]. Istraživanja Vitakera na uzorku od 550 mlečnih i stalnih zuba dokazala su da dubina i širina aprizmatičnih polja varira u različitim predelima gleđi i da je veća verovatnoća pojave aprizmatičnih polja na mlečnim nego na stalnim zubima, takođe da se verovatnoća pojave aprizmatičnih polja

povećava idući od prednjih ka zadnjim zubima u obe denticije. Dalja istraživanja ukazuju da su kristali unutar aprizmatične gleđi uniformni i pokazuju skoro paralelnu orijentaciju u odnosu na prizmatičnu gleđ, ali i da je pojava i lokalizacija aprizmatičnih polja varijabilna [17,23].

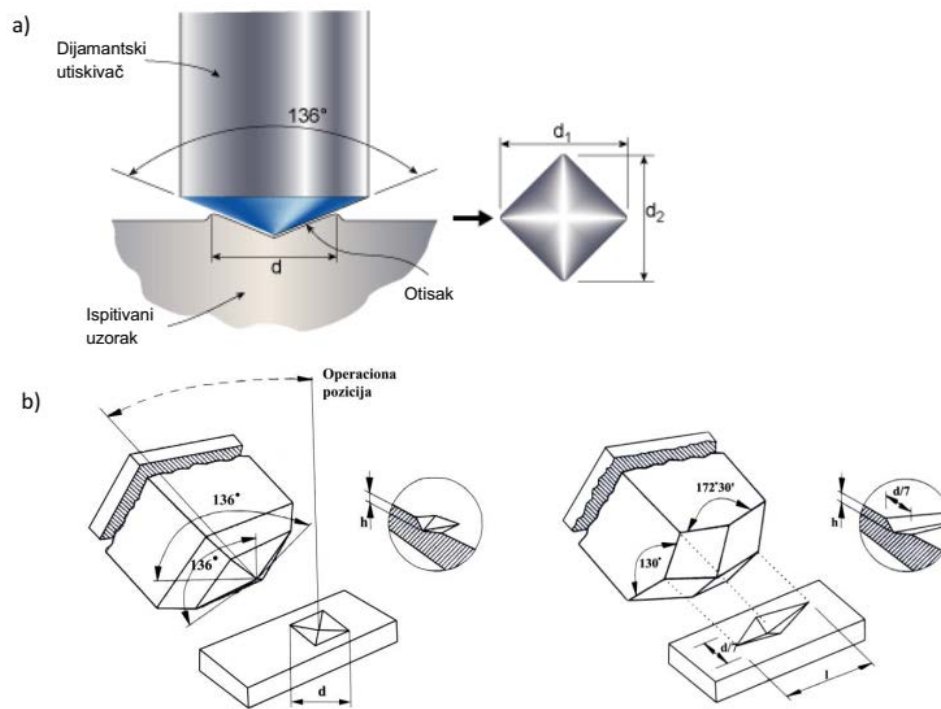
2.2. Mehanička svojstva intaktne gleđi

Gleđ kao najtvrdje tkivo organizma svojim mehaničkim svojstvima idealno ispunjava fiziološke funkcije odgrizanja i žvakanja. Sile mastikacije mogu biti u opsegu od 28 N (Njutna) do 1200 N [24]. Prosečna veličina sile koja deluje na pojedinačni zub prilikom žvakanja je 3-18 N, maksimalna sila je oko 265 N, a maksimalna sila na svim zubima 640 N [25].

Istraživanja pokazuju da se mehanička svojstva gleđi razlikuju u odnosu na mesto merenja, orijentaciju i gustine prizmi i hemijski (mineralni) sastav gleđi na mestu merenja [14,26,27]. Od ovih svojstava zavisi tvrdoća i modul elastičnosti gleđi.

Elastičnost materijala je svojstvo materijala da po prestanku delovanja sile zauzme prvobitni oblik i definisana je modulom elastičnosti. Modul elastičnosti (Jangov modul) je mera krutosti materijala, koji je količnik napona i deformacije u oblasti elastičnih deformacija i izražava se u paskalima (Pa). Modul elastičnosti (E) i tvrdoća (H) gleđi se razlikuju idući od vrha kvržice zuba prema dentinu [26,27].

Tvrdoća je svojstvo materijala da se odupre prodiranju stranog tela u njegovu površinu. Najzastupljeniji metod određivanja tvrdoće je analiza veličine otiska koji ostavlja utiskivač određenog oblika i veličine, pod dejstvom određene sile na ispitivanoj površini. Najčešće konvencionalne primenjivane metode određivanja tvrdoće gleđi su po Knupu (*Knoop*) i Vikersu (*Vickers*), gde se meri veličina otiska, dok se kod nanoindentacije meri dubina prodiranja utiskivača. U analizama po Vikersu, koristi se dijamantski utiskivač oblika piramide sa kvadratnom osnovom i uglom naspramnih stranica od 136 ° (Slika 2-6 a). U Knup testu koristi se utiskivač oblika romba (Slika 2-6 b). Vikersovim testom određeno je da je modul elastičnosti i tvrdoća gleđi generalno veća na okluzalnoj površini gleđi nego na aproksimalnim površinama [26-28]. Utvrđena je korelacija tvrdoće gleđi i mineralnog sastava i varijacije u tvrdoći gleđi u odnosu na lokalizaciju su određene za 3 GPa za promenu od 1% sastava minerala [29].



Slika 2-6. a) Šema utiskivanja b) Geometrija Vickersovog i Knupovog utiskivača.

Modifikovano od Čeh (Čech) i sar. [30].

Sa razvojem tehnike indentacije, mikro i nanoindentacija su sve češće izbor metode istraživanja u određivanju mehaničkih svojstava gleđi. Mikroindentacija koristi male sile ali i dalje meri veličinu otiska kao kod konvencionalnih metoda. Nedostatak metoda merenja veličine otiska je subjektivnost prilikom merenja i određivanja tvrdoće. Takođe, kod veoma tvrdih i krutih materijala, otisci postaju toliko mali da ne postoje optički uređaji kojima može otisak da se izmeri, te su razvijeni metodi instrumentisanog utiskivanja. Merenje karakteristika površina u tom slučaju nije moguće ni konvencionalnom ni mikro metodom. Kod instrumentisanog utiskivanja ovaj problem je prevaziđen merenjem dubine utiskivanja na osnovu čega se preko niza matematičkih formula izračunava površina projekcije kontaktne površine i proračunava tvrdoća [30].

2.3. Hemijska svojstva intaktne gleđi

Gleđ stalnih zuba sadrži 96% neorganskog materijala i 4% organskog materijala i vodu. Neorganski deo većinski čini mineralni hidroksiapatit, kristalna struktura koja sadrži kalcijum

(Ca) i fosfate (P). Prema Mortimeru, osnovna razlika mlečnih i stalnih zuba je u debljini gleđi i stepenu mineralizacije, s tim što kod mlečnih zuba, gleđ čini oko 80% neorganskog materijala [31]. Razlike u mineralizaciji su uzrok različitih mehaničkih ali i kliničkih osobina gleđi mlečnih zuba u odnosu na svojstva gleđi stalnih zuba. Razlike u procentu kalcijuma i fosfata kod mlečnih i stalnih zuba prikazane su u tabeli 2-1 [17].

Tabela 2-1. Razlike u procentu kalcijuma i fosfora kod mlečnih i stalnih zuba [17].

	Stalni zubi		Mlečni zubi	
	Površinski sloj (%)	Blizu gleđno dentinske granice (%)	Površinski sloj (%)	Blizu gleđno dentinske granice (%)
P	21,19	21,11	17,23	17,36
Ca	52,50	56,62	35,11	35,80

Istraživanja Deriz (*Derise*) i sar. nalaze da postoji statistički značajna razlika u procentu kalcijuma i fosfora u gleđi stalnih zuba u odnosu na gleđ mlečnih zuba, dok drugi autori ne nalaze značajne razlike u sastavu ovih minerala kod mlečnih i stalnih zuba [32,33].

Hidroksiapatitni kristali gleđi ne odgovaraju u potpunosti hemijskoj formuli $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, pošto sadrže i nečistoće kao što su karbonati, magnezijum, natrijum i hloride [34,35]. Karbonati mogu da zamene jone fosfata ili hidroksilne grupe i na taj način povećaju rastvorljivost hidroksiapatita, joni magnezijuma mogu zameniti kalcijumove jone i mogu usporiti rast kristala. Takođe joni fluora mogu da zamene hidroksilne grupe i da smanje rastvorljivost hidroksiapatita gleđi [36]. Mnoga istraživanja utvrđuju da fluorapatit pokazuje veću rezistenciju na dejstvo kiselina, što je glavni razlog široke lokalne primene preparata na bazi fluorida u preventivnoj stomatologiji [37]. Zbog svega navedenog uočena je i razlika između površine intaktne gleđi i površine prethodno obrađene, odnosno sečene gleđi. Površina intaktne gleđi je hipermineralizovana i može sadržati veću količinu fluorida. Takođe, neretko je ovaj sloj gleđi i izrazito prizmatičan, u poređenju sa strukturom dubljih slojeva gleđi [38]. Rezultati istraživanja sprovedenih od strane Pula (*Poole*) i Džonsona (*Johnson*) ukazali su na to da je podpovršinski sloj gleđi bogat homogeno raspoređenim prizmama, manje je

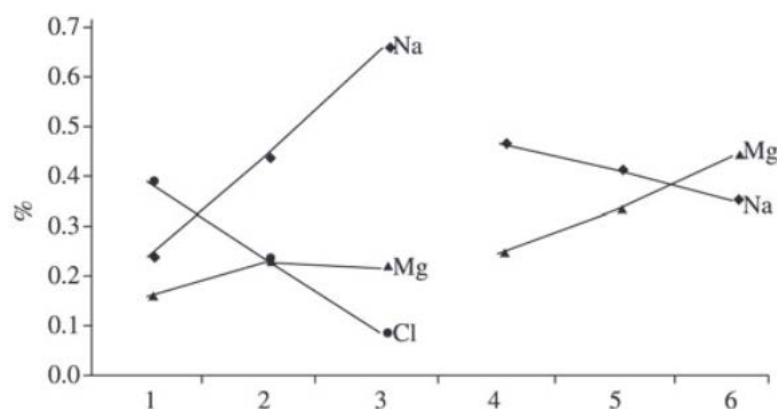
mineralizovan i sadrži manju količinu neorganskog materijala, kao i fluora, nego površina intaktne gleđi [39]. Sve navedeno može rezultovati ograničenim prodiranjem kiseline na površini intaktne gleđi, dok površina prethodno obrađene gleđi može biti manje otporna na dejstvo kiseline i ispoljiti značajno različitu morfološku strukturu, posmatranjem površine pomoću SEM [40].

Hemijski sastav gleđi varira od površinskog sloja prema gleđno-dentinskoj granici. Varijacije mineralnog sastava u odnosu na dubinu i lokalizaciju daju gleđi svojstva anizotropnog materijala, što znači da gleđ ima i različita fizička svojstva u svojim različitim delovima [41,42]. Anizotropnost potiče od različite orijentacije prizmi u tkivu gleđi. U blizini okluzalne površine, prizme su generalno upravne u odnosu na površinu, dok u blizini gleđno-dentinske granice, prizme nemaju pravilnu organizaciju u odnosu na okluzalnu ravan. Tvrdoća gleđi prilikom nanoindentacije je veća ukoliko je pravac indentacije uspravan na uzdužnu osovinu prizmi, nego kad je pravac indentacije paralelan sa gleđnom prizmom. Brejli (*Braly*) i sar. utvrđuju da je ta razlika minimalna i nije značajna. Ista grupa autora utvrđuje da su lokalne varijacije u mineralnom sastavu gleđi uzrok razlike u tvrdoći i elastičnosti gleđi na različitim mestima merenja, a ne orijentacija prizmi [43].

Takođe, u mineralnom sastavu gleđi pojavljuje se blizu 40 elemenata u tragovima: u opsegu od ≥ 1000 ppm, (npr., Zn, Sr, Fe, Al, B, Ba, Pb.) do ≤ 100 ppb (Ni, Li, Ag, As, Se, Nb, Hg) [44].

Na grafikonu 2-1 prikazani su elementi u tragovima (Na, Mg, Cl) idući od površine gleđi zuba prema dentinu.

Grafikon 2-1. Elementi u tragovima u gleđi i dentinu; svaki broj na x osi označava razdaljinu od prosečno 40 μ m (gleđ:1,2; gleđno-dentinska granica:3,4; dentin 5,6). [45]



Procenat natrijuma (Na) i magnezijuma (Mg) se povećava, dok se udeo hlora (Cl) smanjuje idući od površine gleđi ka gleđno-dentinskoj granici. Od gleđno-dentinske granice udeo Na opada, dok u dentinu Cl nije prisutan. Udeo kalcijuma (Ca) i fosfora (P) je konstantan celom debljinom gleđi. Međutim pojava elemenata u tragovima u gleđi kao što su Na, Cl, Mg ne utiču na mehaničke osobine gleđi. Udeo pojedinih elemenata u različitim delovima gleđi prikazano je u tabeli 2-2 [45].

Tabela 2-2. Udeo pojedinih elemenata u različitim delovima gleđi modifikovano od Gutjereza (Gutierrez) i sar. [45].

Element	GLEĐ		
	Površinski sloj	Srednji sloj	Gleđno-dentinska granica
C	38,59 (1,60)	36,28 (0,84)	37,05 (1,51)
O	32,59 (0,91)	34,21 (0,67)	34,51 (0,96)
Na	0,24 (0,08)	0,44 (0,13)	0,66 (0,09)
Mg	0,16 (0,03)	0,23 (0,07)	0,22 (0,03)
P	10,67 (0,34)	10,86 (0,14)	10,46 (0,26)
Cl	0,39 (0,46)	0,25 (0,08)	0,09 (0,04)
Ca	17,36 (0,44)	17,74 (0,28)	16,99 (0,33)
Ca/P	1,63 (0,02)	1,63 (0,01)	1,62 (0,02)

Biohemijske analize utvrđuju da je organski matriks gleđi multikomponentni sistem sastavljen od slobodnih aminokiselina, glicina, monomernih proteina, glikoproteina i kolagena [46]. Najzastupljenije aminokiseline u matriksu su alanin, glutaminska kiselina, glicin, prolin i serin [47].

2.4. Svojstva kondicionirane površine gleđi

Bonokore (*Buonocore*) [48] je prvi predložio koncept kondicioniranja gleđi ortofosfornom kiselinom u cilju povećanja čvrstoće veze između kompozitne smole i nagrižene gleđi. U to vreme, protokol tretmana je podrazumevao kondicioniranje gleđi u trajanju od 60 sekundi [48]. Kao rezultat opisane studije, kiselinsko nagrizanje koristi se u svakodnevnoj praksi, što stvara poroznu površinu gleđi i povećava površinski napon za bolje vezivanje. Daljim eksperimentalnim istraživanjima dokazano je da skraćeno vreme nagrizanja na 15 sekundi rezultuje sličnom površinskom poroznošću gleđi i jačinom adhezivne veze, kao kiselinsko nagrizanje od 60 sekundi, zbog čega je generalno 15-30 sekundi preporučeno vreme nagrizanja gleđi od strane proizvođača [49].

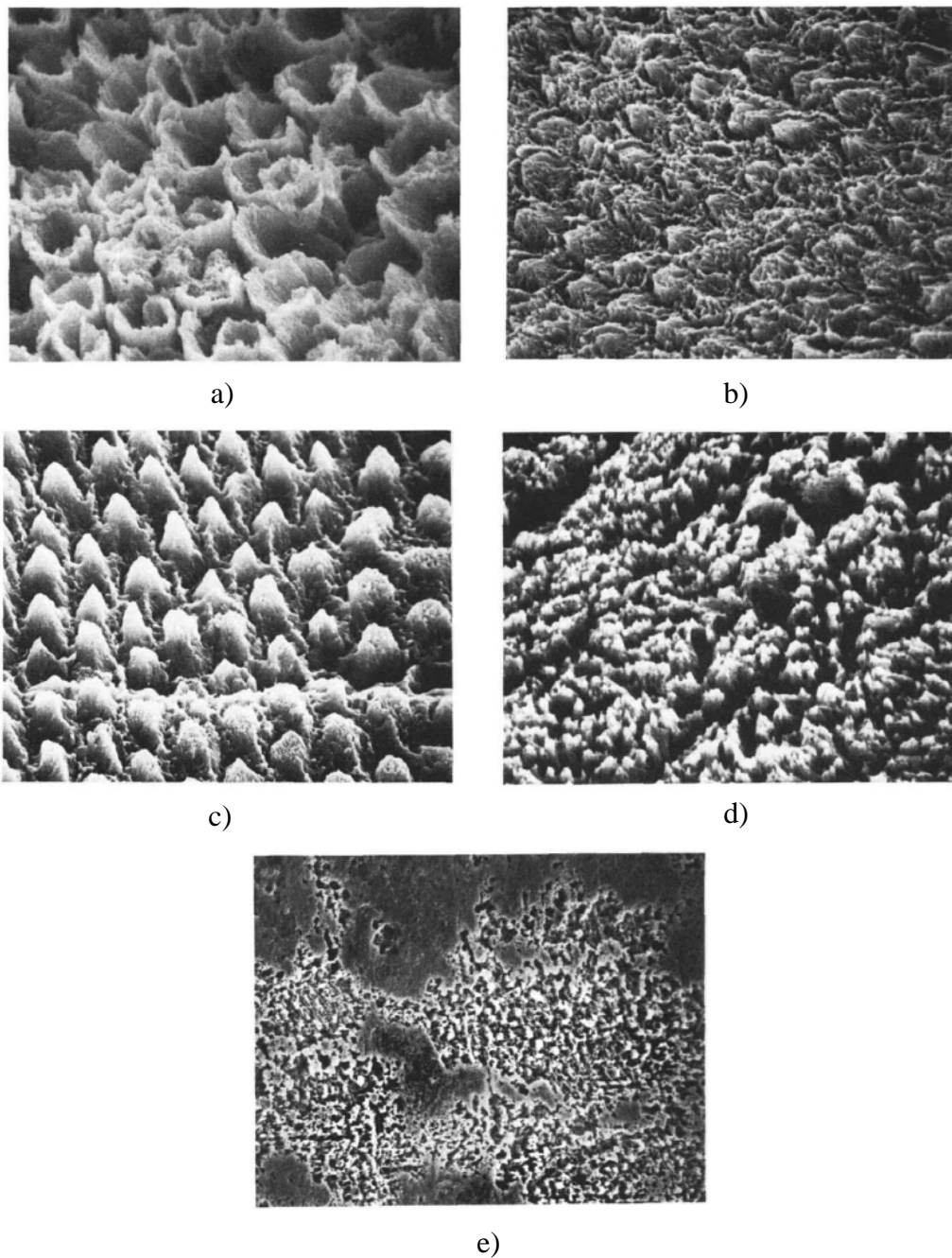
Osnovni princip vezivanja adhezivnih materijala za zubni supstrat je zamena neorganskog sadržaja zuba sintetičkom smolom, odnosno adhezivom [50]. Postupak kondicioniranja korišćenjem 35-38% ortofosforne kiseline, dovodi do fizičkih i hemijskih promena na tretiranoj površini gleđi. Fizičke promene obuhvataju promene morfologije, dok hemijske promene dovode do dekalifikacije neorganskog sadržaja i modifikacije organskih frakcija gleđi, što je dokazano brojnim istraživanjima [51-55].

Delovanjem kiseline na gleđnu strukturu dolazi do rastvaranja hidroksiapatita i procesa demineralizacije. Tretman ortofosfornom kiselinom u cilju kondicioniranja podrazumeva nagrizanje, uklanjanje razmaznog sloja i obezbeđuje relativno hrapavu površinu koja nastaje zbog gubitka minerala usled rastvaranja hidroksiapatita gleđi. Hidrofilni adheziv nakon toga prodire oko stvorenog međuprostora unutar hidroksiapatitnih kristala i proizvodi mikroprodužetke. Ovaj ceo fenomen dovodi do stvaranja adhezivnog hibridnog međusloja odgovornog za mikromehaničku retenciju. Nagrizanje kiselinom rezultira uklanjanjem neorganskih minerala sa površine zuba zbog čega dužina vremena tokom koje je struktura zuba izložena dejstvu kiseline može uticati na osnovne fizičke i mehaničke karakteristike površine gleđi. Izdvajaju se tvrdoća i modul elastičnosti, tvrdoća kao merilo otpornosti preostalog dela

zubne supstance na dejstvo štetnih noksi i stabilnost ispuna, a modul elastičnosti kao direktno merilo retencije [56]. Prekomerno smanjenje u tvrdoći može uticati na međuspoj materijala i gleđi i na rani neuspeh adhezivne veze. Za najbolji mogući adhezivni spoj je presudno da se usko podudaraju moduli elastičnosti dva materijala. Velika neusklađenost elastičnih modula može dovesti do toga da se formiraju područja koncentracije stresa i krajnjeg neuspeha unutar samog materijala ili na međuspoju [57]. Zbog svega navedenog je od izuzetnog značaja ispitivanje upravo ovih parametara, tvrdoće i modula elastičnosti kada se analiziraju svojstva kondicionirane gleđi.

Pravac pružanja gleđnih prizmi utiče na efekat nagrizanja, tako što dolazi do brže demineralizacije gleđi ako kiselina deluje paralelno na uzdužnu osu prizme nego ako je dejstvo kiseline upravno na pravac pružanja prizmi [59,60]. Uočeno je da površinski sloj gleđi svih mlečnih zuba i 70% stalnih zuba sadrži aprizmatičnu strukturu koja rezultuje slabijom mehaničkom retencijom [61]. Kod kondicioniranja gleđi ortofosfornom kiselinom nastaje mikromehanička veza sa adhezivom, dok se kondicioniranjem gleđi poliakrilnom kiselinom i primenom materijala na bazi glas jonomera obezbeđuje hemijska veza. Efekat nagrizanja takođe zavisi od preparacije u gleđi. Zakošene ivice gleđi pod uglom od 45° omogućavaju bolji pristup završecima gleđnih prizmi [62]. Takođe, ispitivanja pomoću SEM-a pokazala su da nagrizanje kiselinom dovodi do pravilnije i konzistentnije šeme nagrizanja na podpovršinskom sloju gleđi nego na površini intaktne gleđi [40].

Silverston (*Silverstone*) i sar. su 1975. godine napravili prvu klasifikaciju nagrižene gleđne strukture nakon primene ortofosforne kiseline i posmatranja iste uz pomoć SEM. Opisana su tri osnovna tipa strukture polja kondicionirane gleđi kojima Galil (*Galil KA*) i Vrajt (*Wright GZ*) dodaju 4. i 5. tip [63,64]. Kod tipa 1 kondicionirane gleđi dominantno je uklonjena srž prizme, kod tipa 2 dominantno su uklonjene košuljice prizmi, dok je srž prizmi očuvana, tip 3 je kombinacija polja 1 i 2. Tip 4 karakteriše relativno ista destrukcija košuljice i srži koja je u depresiji, dok tip 5 karakteriše glatka, ravna površina nakon nagrizanja (Slika 2-7) [64]. Ova klasifikacija je ujedno i najčešće primenjivana u ispitivanjima.



Slika 2-7. Različiti tipovi nagrizanja posmatranjem površine pomoću SEM-a (a) Tip 1; b) Tip 2; c) Tip 3; d) Tip 4; e) Tip 5) modifikovano od Galila i sar. [64].

Međutim, uočeno je da se šema nagrizanja gleđi razlikuje kada su u pitanju različiti tipovi zuba, različite površine i regije/trećine zuba, preparati sa različitom vrstom i

koncentracijom kiseline, dužinom vremena nagrizanja, kao i kada je površina gleđi intaktna, odnosno obrađivana [60,65-69].

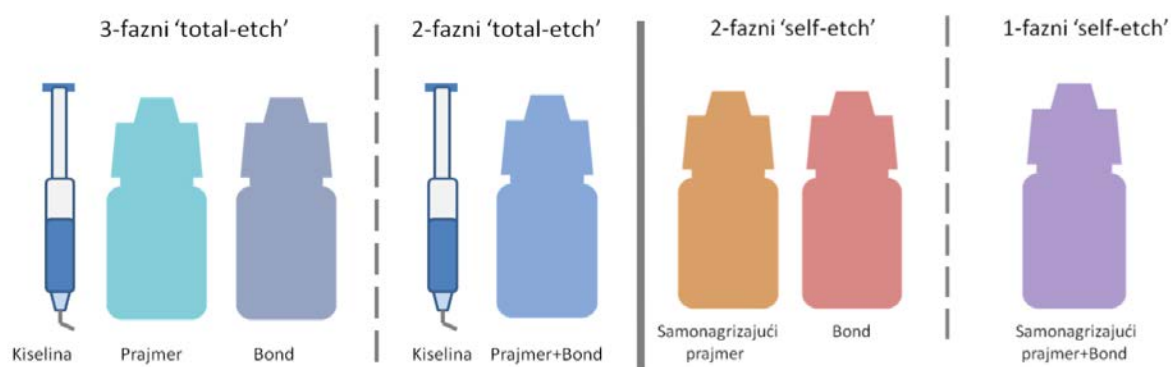
U restaurativnoj stomatologiji, adhezija za gleđ se smatra lako ostvarivom korišćenjem gotovo svih adhezivnih sistema, usled čega je akcenat istraživanja u potpunosti prebačen na poboljšanje adhezivne veze sa dentinom [70]. Kao rezultat, Akademija Stomatoloških materijala (*Academy of Dental Materials*) pokrenula je projekat za razvoj i distribuciju smernica o laboratorijskim metodama ispitivanja koja su korisna za procenu adheziva i cemenata, kompozitnih smola i keramike. U najvećem broju studija ispituju se stalni molari osoba uzrasta od 16 do 40 godina [71]. Ovaj standard podrazumeva laboratorijska ispitivanja različitih aspekata adhezije, istovremeno sa gleđi i dentinom, sa formiranim kavitetima, najčešće lokalizovanim u cervikalnoj trećini zuba [72].

2.5. Klasifikacija dentalnih adhezivnih sistema

Tradicionalnu podelu adheziva na različite generacije na osnovu hronologije pojavljivanja na tržištu, zamenila je klasifikacija adhezivnih sistema predložena od strane Fon Merbek-a (Von Meerbeek) i sar. 2003. godine [73].

Nedostatak podele adheziva na generacije je nedovoljna informativnost sa aspekta hemijskog sastava i kliničke primene određenog adheziva. Takođe, ta klasifikacija nosi sa sobom određene nedoumice, jer se pojedini sistemi mogu svrstati na osnovu hronologije pojavljivanja i hemijskog sastava u jednu, a na osnovu snage vezivanja u drugu generaciju. Kasnije istraživanjima je dokazano da nove generacije adhezivnih sistema nisu nužno i bolje od prethodnih [73,74].

Aktuelna klasifikacija uzima u obzir hemijski sastav i metod kliničke primene i obuhvata dve osnovne grupe: adhezivi sa kiselinskim nagrizanjem (eng. „*total-etch*“) i samonagrizajući adhezivi (eng. „*self-etch*“). U grupi adheziva sa kiselinskim nagrizanjem razlikuju se trofazni i dvofazni sistemi, dok se u grupi samonagrizajućih adheziva razlikuju dvofazni i jednofazni sistemi (Slika 2-8).



Slika 2-8. Šematski prikaz klasifikacije adhezivnih sistema. Modifikovano od Fon Merbek (Von Meerbeek) i sar. [73]

Cilj pronalazjenja novih sistema je smanjenje broja kliničkih koraka i eliminacije greške usled jednostavnije primene sistema. Adhezivna sredstva za tehniku totalnog nagizanja gleđi sadrže: fosforu kiselinu, prajmer i vezivnu smolu ili fosforu kiselinu i kombinovani prajmer i vezivnu smolu u jednoj bočici.

Prajmer sadrži dve funkcionalne grupe monomera, hidrofilne i hidrofobne, pri čemu se molekuli sa hidrofilnim grupama vezuju za površinu gleđi ili dentina a sa hidrofobnim grupama za vezivnu smolu. Po hemijskom sastavu, prajmer čine funkcionalni monomeri, najčešće hidroksietil-metakrilata. Prajmeri, usled kiselosti, mogu uticati na demineralizaciju zubnih tkiva, što je od posebnog značaja kod samonagrizajućih adheziva. Bond ili vezivnu smolu u osnovi čine hidrofobni umreživački monomeri čija je funkcija umrežavanje tokom reakcije polimerizacije i stvaranje polimera. Stvoreni polimeri ostvaruju mikro-mehaničku vezu sa zubnim tkivima sa jedne, a sa druge strane stvaraju kovalentne veze sa umreživačkim monomerima u kompozitnim materijalima [75].

U odnosu na protokol primene, tehnika totalnog nagrizanja popularna je kod kliničara zbog jednostavnosti primene. Tehnika samonagrizajućih prajmera podrazumeva istovremeno kondicioniranje gleđi i dentina, pri čemu nije potrebno ispiranje. Eksperimentalna istraživanja su pokazala da pojednostavljeni sistemi dvofazni „total-etch“ i jednofazni „self-etch“ ostvaruju slabiju vezu za zubnim tkivima u poređenju sa trofaznim „total-etch“ i dvofaznim „self-etch“ sistemom [76,77].

2.6. Klinički aspekti adhezije sa gleđi

Sa razvojem novijih kondicionera i adhezivnih sistema, adhezija za dentin je unapređena samonagrizajućim sistemima, međutim, primena ovih formulacija na gleđi ne daje očekivane i konzistentne rezultate na osnovu sprovedenih kliničkih istraživanja, naročito kada je u pitanju adhezija sa intaktnom gleđi [77-79]. Morfološke analize površine gleđi tretirane samonagrizajućim adhezivima pokazale su prisustvo nedovoljno demineralizovanih površina i druga područja koja su pretežno netaknuta, što bi moglo narušiti infiltraciju monomera i proces hibridizacije [80]. Da bi se poboljšala adhezija za gleđ, preporučuje se korišćenje različitih protokola pripreme površina pre tretmana, povećanje koncentracije monomera, produženje vremena nagrizanja, čak i potpuno uklanjanje aprizmatičnog sloja radi ostvarivanja zadovoljavajuće adhezije [81,82]. Svi ovi navodi su rezultati veoma ograničenog broja eksperimentalnih istraživanja, nisu primenjivi za sve kliničke situacije u kojima se adhezija ostvaruje sa intaktnom gleđi i svakako nemaju osnova za konsenzus u okviru kliničkog protokola koji obuhvata restauracije na zubima, adheziju ortodontskih bravica, postavljanje zalivača jamica i fisura, ostvarivanje veze sa frakturiranom gleđi, postavljanje faseta. Zatim, postoje navodi u literaturi da većina samonagrizajućih adheziva ne nagriza gleđ toliko duboko koliko ortofosforna kiselina, te da nedovoljna dubina nagrizanja može značajno ugroziti adheziju za gleđ [83]. Pokazano je da efikasnost adhezivne veze sa netaknutom gleđi ne zavisi samo od dubine nagrizanja, već i od monomernog sastava svakog materijala [84]. Takođe je izložena pretpostavka da slabija adhezija sa gleđi može biti izazvana velikom količinom nepolimerizovanih kiselih monomera koji ostaju nakon polimerizacije, što sve govori u prilog da nije u potpunosti objašnjena veza između sastava kondicionirajućeg agensa, površine kondicionirane gleđi i snage adhezivne veze [85].

Postoje različiti postupci koji zahtevaju ostvarivanje adhezije sa intaktnom gleđi kao što su : imobilizacija splintom traumatiziranih zuba, postavljanje zalivača jamica i fisura, kao i lepljenje ortodontskih bravica [86].

Intaktna površina gleđi kratko nakon erupcije zuba hipermineralizovana je zasićenim kalcijum fosfatom i sadrži više fluorida koji može pretvoriti hidroksiapatit u fluorapatit, što je značajna razlika u odnosu na preparisanu gleđ [86]. Deblji sloj gleđi aprizmatične strukture, kao što je već naglašeno može sprečiti prodiranje samonagrizajućih prajmera i drugih, slabijih

kondicionera i na taj način neki delovi gleđi ostaju delimično ili potpuno netaknuti, što može rezultirati formiranjem kraćih i slabo definisanih produžetaka smole u hibridni sloj.

Mehanizam vezivanja ovih samonagrizaćućih sistema za gleđ zasnovan je na tzv. nanoretentivnom međusobnom preplitanju između kristalita gleđi i lepljive smole. Ovaj tanki hibridni kompleks smole formiran u gleđi, proizveden samonagrizaćućim kondicionerima bez uobičajenih mikrošupljina koji nastaju dejstvom ortofosforne kiseline može biti odgovoran za slabiju adhezivnu vezu.

Danas je nagrizanje ortofosfornom kiselinom u cilju ostvarivanja adhezije za gleđ široko prihvaćena, ali se sve više navode njeni nedostaci koji se upravo primenjuju u onim indikacijama kada se za adheziju koristi intaktna gleđ. Navodi se da primena ortofosforne kiseline dovodi do smanjenja tvrdoće gleđi, kao i jatrogenog efekta koji ponekad uključuje i gubitak zubne supstance od 6-50 μ m [87]. U zavisnosti od tipa kondicionera, dužine nagrizanja, razlika na površini samog zuba i između zuba, promene tvrdoće, hemijskog sastava i gubitak zubne supstance se ne može predvideti.

U savremenoj stomatologiji za razne kliničke procedure koriste se kondicionirajuća sredstva, pre same procedure, uz ili bez ispiranja nakon primene adhezivnog sredstva [88].

Analizom različitih površina zuba, uočeno je da kod bukalne površine premolara i molara, dominantno su prisutna polja nagrizanja po tipu 1 i tipu 2 u koronarnoj trećini zuba, dok se tip 4 i tip 5 pretežno nalaze bliže cervikalnoj trećini zuba [64].

Površinski sloj intaktne gleđi može biti izražen aprizmatičan, sprečavajući dalju penetraciju kiseline i smanjujući njeno dejstvo, naročito ako su u pitanju manje kiseli samonagrizaćući adhezivi. Manje izraženo nagrizanje kristalne rešetke gleđi dalje može biti uzrok slabije adhezije. Nekoliko istraživača navodi da prisustvo aprizmatične gleđi stvara polje nagrizanja koje ne omogućava adekvatno prodiranje adheziva, što rezultuje slabijom vezom [89-91]. Matik (*Mattick*) i Hobson (*Hobson*) utvrđuju da idealno polje nagrizanja čini oko 5 % bukalne površine zuba i da postoje značajne razlike u strukturi gleđi i polja nagrizanja kod različitih tipova zuba [91].

Većina dosadašnjih saznanja o adhezivnoj vezi sa gleđi potiču iz eksperimentalnih studija. Rezultati *in vitro* ispitivanja osobina zubnih tkiva i stomatoloških materijala nisu uvek u saglasnosti sa kliničkim rezultatima. Samo kontrolisana klinička studija može da dokaže dobar klinički efekat određenog materijala. Međutim, sprovođenje kliničkih studija zahteva

višegodišnje praćenje pacijenata sa redovnim kontrolama da bi se postigla klinička validacija rezultata, zbog čega su češće eksperimentalne studije čiji rezultati daju određene smernice na osnovu kojih se predviđa ponašanje materijala u kliničkim uslovima [92,93].

Brojni su klinički izazovi adhezije sa gleđi. Postavljanje direktnih kompozitnih ispuna je jedna od najčešćih intervencija koje se sprovode u stomatološkoj praksi. Uz adhezivne sisteme i kompozitni materijali su se razvijali od makro i mikro punjenih, hibridnih do nano punjenih kompozita. Najveći problem sa kojim se kliničari suočavaju je polimerizaciono, zapreminsko skupljanje kompozitnih materijala koje iznosi od 1.5 do čak 5% [94].

Poseban klinički izazov u restaurativnoj stomatologiji predstavljaju ispuni pete klase, restauracije nekarioznih lezija, koje mogu nastati zbog erozije, abrazije ili abfrakcije. Ovakve restauracije su neophodne da bi se smanjila hipersenzitivnost, sprečio dalji gubitak tvrdih zubnih tkiva i poboljšala estetika. Retencija ispuna na ovom mestu najvećim delom bazira se na preostaloj gleđi, koje u cervikalnoj trećini zuba često nema, takođe, specifičnost predela vrata zuba je da je dentin često sklerotičan, stoga nepovoljan za vezivanje [80,92,95,96].

U petogodišnjem prospektivnom kliničkom istraživanju Kubo i sar. ispitivali su efekat dvokomponentnog samonagrizajućeg adheziva Clearfil Liner Bond II (Kuraray Medical Inc., Okayama, Japan) i jednokomponentnog, *total-etch*, adhezivnog sistema, Single Bond (3M ESPE, St Paul, MN, USA) za pripremu površine gleđi prilikom restauracije nekarioznih lezija. Restauracije su analizirane nakon pet godina u odnosu na retenciju, marginalno prebojavanje, gingivitis, promenu boje kompozita, trošenje i površinske hrapavosti. Istraživači zaključuju da dvokomponentni samonagrizajući adheziv pokazuje slabiju marginalnu adaptaciju u odnosu na jednokomponentni adhezivni sistem, međutim ta razlika nema statistički ni klinički značaj.

Klinički rezultat polimerizacione kontrakcije kompozita je mikro-curenje, loše rubno zaptivanje, ivično prebojavanje ispuna i mogućnost pojave sekundarnog karijesa. Da bi se postigla jača veza sa gleđi, preporučuje se primena adhezivnih sistema uz prethodno nagrizanje površine zuba radi uklanjanja razmaznog sloja stvorenog na gleđi i dentinu tokom preparacije, kao i demineralizacija zubne strukture, kako bi se postigla jača veza stomatoloških materijala sa zubnom supstancom i osigurala dugotrajnost veze materijala i zuba [80].

U ortodontiji prilikom pripreme površine gleđi za lepljenje bravica, kompozitni lepkovi koji se najčešće koriste zbog svojih dobrih adhezivnih svojstava uspostavljaju fizičku vezu,

prodirući u retenciona mesta prizmatične gleđi. Uspeh lepljenja najviše zavisi upravo od mogućnosti stvaranja retencionih polja u prizmatičnoj gleđi [97].

Nekoliko autora ukazuje na uticaj rasporeda aprizmatične gleđi na bukalnoj površini bočnih zuba i značaj jačine veze u sistemu gleđ-lepak-bravica [98-100]. U većini dosadašnjih studija koja se bavila ispitivanjem jačine veze ortodontskog lepka i gleđi korišćeni su prvi i drugi premolari iz obe vilice u istom uzorku, bez ispitivanja površine gleđi i moguće razlike koja bi uticala na kvalitet veze [101,102]. Hobson, Mekejb i Rug-Gun (*Hobson RS, McCabe JF, Rugg-Gunn AJ*) su utvrdili da postoji različita jačina veze sa istim načinom pripreme gleđi kod različitih tipova zuba [89]. Oni prikazuju da je jačina veze lepka i gleđi zuba bila vrlo slična na bukalnoj površini gornjih i donjih prvih premolara, ali se statistički značajno razlikovala kod drugih gornjih i donjih premolara [89]. Ozturk i saradnici (*Öztürk B et al.*) pokazuju da tip zuba i njegova gleđ utiču na jačinu veze sa lepkom predlažući, na osnovu svojih nalaza, da se buduće studije rade na istim tipovima zuba, različito u gornjoj i donjoj vilici [103]. Hobson, Mekejb i Hog (*Hobson RS, McCabe JF, Hogg SD*) se slažu da postoji značajna razlika u jačini vezivanja lepka za gleđ različitih tipova zuba kao i potrebu za poređenjem načina lepljenja kod različitih tipova zuba, kao i zuba gornje i donje vilice [104].

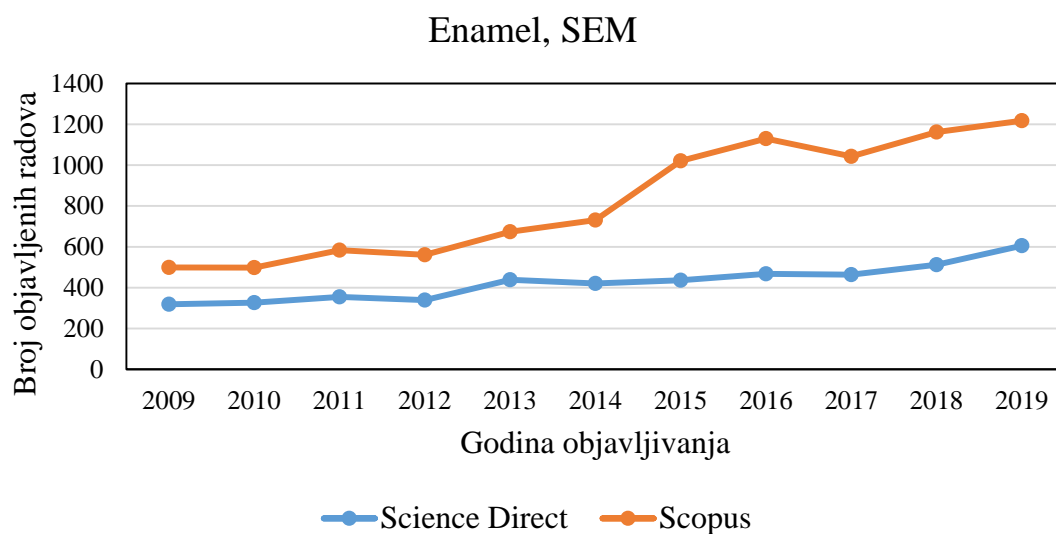
Kompozitni materijali se često koriste u dečijoj i preventivnoj stomatologiji, najčešće kao zalivači jamica i fisura. Takođe, kod rada sa decom, dobra adhezija sa gleđi neophodna je i za postavljanje ispuna, pri čemu u mlečnoj denticiji dodatni problem može da predstavlja ograničena mogućnost postizanja suvog radnog polja. Iz tog razloga, glas jonomer cementi predstavljaju materijal izbora za ispune i zalivače u dečjoj stomatologiji, uz prethodno kondicioniranje površine gleđi [105].

2.7. Aktuelnosti istraživanja u oblasti

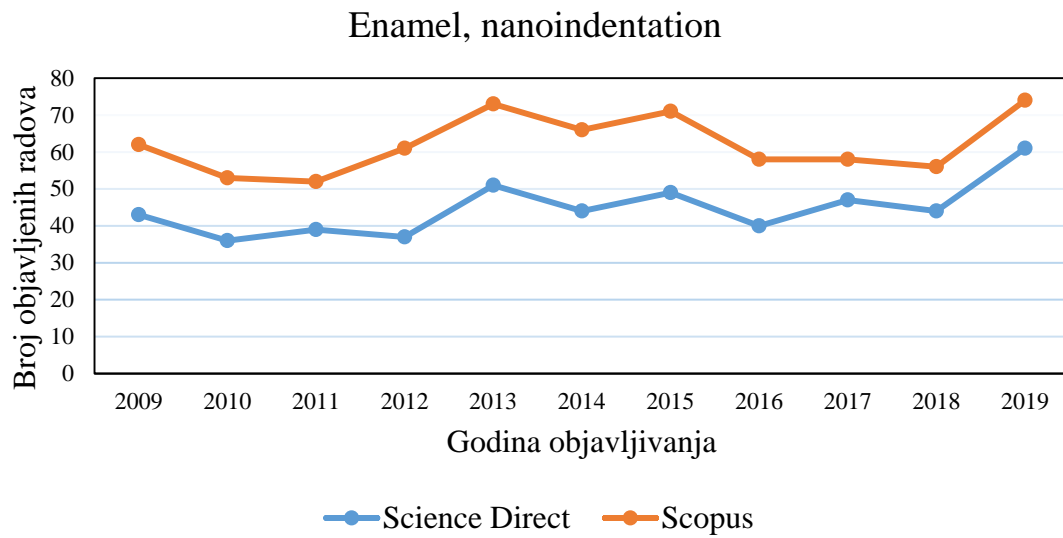
U savremenoj stomatološkoj praksi, dobra adhezija gleđi sa jedne i materijala sa druge strane je imperativ. Sa pronalaskom novih formulacija adhezivnih materijala, sve je više istraživačkih radova koji se bave odnosom materijala i gleđi i analize efekata nagrizanja površine gleđi u smislu promene hemijskih i mehaničkih karakteristika. U dosadašnjim istraživanjima glavni fokus bio je na uticaju ortofosforne kiseline na površinu gleđi, ali je mnogo manji broj radova publikovan na temu uticaja drugih kiselina i uticaja same strukture površine gleđi na adheziju.

Kao vodeći metod za ispitivanje morfoloških promena površina gleđi izdvaja se SEM analiza koja je adekvatna metoda istraživanja, što potvrđuje i veliki broj objavljenih naučnih radova u proteklim godinama sa tendencijom daljeg rasta. Na slici 2-9 prikazan je broj objavljenih naučnih radova u naučnim časopisima gde se u nazivu, ključnim rečima i apstraktu pojavljuju prevodi reči „gleđ, SEM“ („*Enamel, SEM*“) u proteklih 10 godina prema dva vodeća servisa za pretragu naučnih radova, Science Direct-u i Scopus-u.

Za određivanje mehaničkih karakteristika površina, nanoindentacija je jedna od često primenjenih metoda za određivanje modula elastičnosti i tvrdoće uzorka. Slika 2-10 prikazuje broj radova u proteklih 10 godina koja su u naslovu, ključnim rečima ili apstraktu sadržavale prevode reči „gleđ, nano utiskivanje“ („*Enamel, Nanoindentation*“) prema servisima za pretragu naučnih časopisa Science Direct-u i Scopus-u.



Slika 2-9. Broj radova u proteklih 10 godina koji su u naslovu, ključnim rečima ili apstraktu sadržavali reč „Enamel, SEM“ u bazama Science Direct i Scopus.



Slika 2-10. Broj radova u proteklih 10 godina koji su u naslovu, ključnim rečima ili apstraktu sadržavali reč „Enamel, nanoindentation” u bazama Science Direct i Scopus.

3. Cilj

U ovom istraživanju posebna pažnja je posvećena kondicioniranju gleđi kao osnovu adhezije materijala sa gleđi. Ispitivani su parametri koji utiču na uspeh ostvarivanja adhezivne veze sa gleđi, sa akcentom na utvrđivanje mehaničkih, morfoloških i hemijskih promena površinske strukture gleđi nakon primene različitih kondicionera.

Opšti cilj istraživanja bio je da se odrede efekti nagrivanja površine gleđi različitih kiselina koje su korišćene za pripremu površine gleđi za adheziju. Specifični ciljevi istraživanja bili su sledeći:

1. Odrediti tvrdoću i modul elastičnosti gleđi pre i posle nagrivanja različitim kiselinama.
2. Odrediti hemijski udeo minerala kalcijuma i fosfata u površinskom sloju gleđi pre i posle nagrivanja.
3. Utvrditi uticaj prizmatičnosti gleđi na stepen nagrivanja gleđi primenom različitih kiselina.

4. Hipoteze

Uvidom u predmet i cilj istraživanja izvedene su sledeće hipoteze:

- *Hipoteza 1 (H1)*: Vrednosti tvrdoće gleđi i vrednosti modula elastičnosti su značajno manje nakon nagrivanja u odnosu na vrednosti pre nagrivanja gleđi.
- *Hipoteza 2 (H2)*: Hemijski udeo minerala kalcijuma i fosfata u površinskom sloju gleđi je značajno niži posle nagrivanja u odnosu na vrednosti pre nagrivanja gleđi.
- *Hipoteza 3 (H3)*: Step nagrivanja aprizmatične gleđi je značajno manji u odnosu na step nagrivanja prizmatične gleđi.

5. Materijali i metode rada

5.1. Izbor i priprema uzoraka

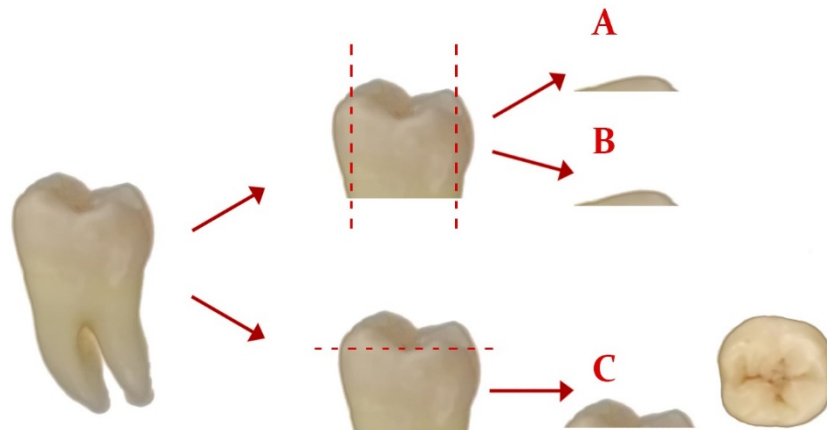
Istraživanje je sprovedeno u *in vitro* uslovima na ekstrahovanim humanim zubima. Upotrebu zuba u eksperimentalne svrhe odobrila je Komisija za etičnost kliničkih ispitivanja na čoveku, Medicinskog Fakulteta u Novom Sadu, broj odluke 01-39/188/1, dana 07.07.2017.

Prikupljeno je ukupno 200 ekstrahovanih zuba od kojih su na kraju odabrana 32 stalna i 32 mlečna zuba za ispitivanje koji su odgovarali svim kriterijumima za uključivanje u studiju. Kriterijumi za uključivanje bili su intaktni stalni, odnosno mlečni zubi gornje i donje vilice bez oštećenja, karijesa, ispuna i netretirani hemijskim agensima. Nakon ekstrakcije zubi su očišćeni od mekih naslaga, čvrstih naslaga i ostataka mekih tkiva, isprani vodom i čuvani u fiziološkom rastvoru na temperaturi od 4⁰ C do početka eksperimenta.

Odgovarajući uzorci dobijeni su obradom zuba i primenom sledećih koraka:

- sečenje sloja gleđi dijamantskim diskom (Isomet, Buehler; Lake Bluff, IL, USA) debljine 0,3 mm sa tri strane svakog zuba. Mezio-distalnim rezom dobijena je lingvalna odnosno bukalna površina, dok je okluzalna površina dobijena transverzalnim rezom zuba (Slika 5-1).
- sečenje svake površine na četiri dela, zbog primene četiri vrste kondicionera (Slika 5-2). Napravljeni uzorci oralne, bukalne i okluzalne površine gleđi su grupisani u tri grupe: A, B, C.

Ukupan broj uzoraka bio je 768. Od toga 384 uzoraka stalnih zuba i 384 uzoraka mlečnih zuba. Po grupi A, B, C bilo je 256 uzoraka, dok po tretmanu svakim kondicionerom bilo je 192 uzoraka po grupi, od toga 96 uzoraka stalnih zuba i 96 uzoraka mlečnih zuba.



*Slika 5-1. Šematski prikaz pripreme uzoraka gleđi A-Bukalna strana; B-Lingvalna strana;
C-Okluzalna strana.*



Slika 5-2. Šematski prikaz sečenja stranica zuba na četiri dela.

Konstruisane su grupe u odnosu na vrstu zuba, stranu/površinu gleđi zuba i vrstu kondicionera koja su korišćena (Tabela 5-1).

Tabela 5-1. Skraćenice naziva grupe i broj uzoraka po ispitivanoj grupi.

VRSTA ZUBA	STALNI ZUBI			MLEČNI ZUBI			TOTAL
Strana zuba/ Vrste kondicionera	A Bukalna	B Lingvalna	C Okluzalna	A Bukalna	B Lingvalna	C Okluzalna	
Kontrolna grupa (netretirana gleđ)	Buk-S (32)	Ling-S (32)	Okl-S (32)	Buk-M (32)	Ling-M (32)	Okl-M (32)	
37% ortofosforna kiselina	Buk-S orto (32)	Ling-S orto (32)	Okl-S orto (32)	Buk-M orto (32)	Ling-M orto (32)	Okl-M orto (32)	192
10% poliakrilna kiselina	Buk-S poly (32)	Ling-S poly (32)	Okl-S poly (32)	Buk-M poly (32)	Ling-M poly (32)	Okl-M poly (32)	192
G bond	Buk-S Gbond (32)	Ling-S Gbond (32)	Okl-S Gbond (32)	Buk-M Gbond (32)	Ling-M Gbond (32)	Okl-M Gbond (32)	192
Transbond™	Buk-S Trans (32)	Ling-S Trans (32)	Okl-S Trans (32)	Buk-M Trans (32)	Ling-M Trans (32)	Okl-M Trans (32)	192
TOTAL	128	128	128	128	128	128	768
	384			384			

Na osnovu podataka dobijenih iz najobimnijeg pregleda mehaničkih svojstava gleđi, objavljenih od strane Zanga (*Zhang*) i sar. uzete su vrednosti standradnih devijacija koje se odnose na tvrdoću i modul elastičnosti koje su iznosile 0.41 GPa, odnosno 6.67GPa u odnosu na tehniku ispitivanja. Uzimajući u obzir sledeće parametre: greška, $\alpha=5\%$ ($Z \alpha=1,96$), snaga uzorka = 80% ($Z \beta=84$), klinički relevantan uzorak od 28 jedinica, određen je minimalan broj potrebnih uzoraka u istraživanju po testiranoj grupi koji čini 8 uzoraka [106].

Pripremljeni uzorci gleđi su analizirani pre i nakon kondicioniranja pomoću sledećih metoda:

- Analiza morfologije površinskog sloja gleđi pomoću SEM
- Analiza hemijskog sastava površinskog sloja gleđi metodom SEM-EDS
- Određivanje tvrdoće i modula elastičnosti gleđi nanoindentacijom

Kondicioniranje uzoraka rađeno je primenom četiri vrste kondicionera (Slika 5-3), i to:

- 1) 37% ortofosforne kiseline (Kerr Gel etchant; Kerr Italia, Scafati, Italija),
- 2) 10% poliakrilne kiseline (GC, Dentin Conditioner; GC Europe N.V, Interleuvenlaan, Belgija),
- 3) monomera estra fosforne kiseline (GC G bond; GC Europe N.V, Interleuvenlaan, Belgija),
- 4) hidroksietilmetakrilata sa fosfornom kiselinom (3M Unitek, Transbond™ Plus Self Etching Primer; 3M Unitek, Landsberg, Nemačka)

Za svaku vrstu primenjenog kondicionera poštovan je protokol proizvođača.

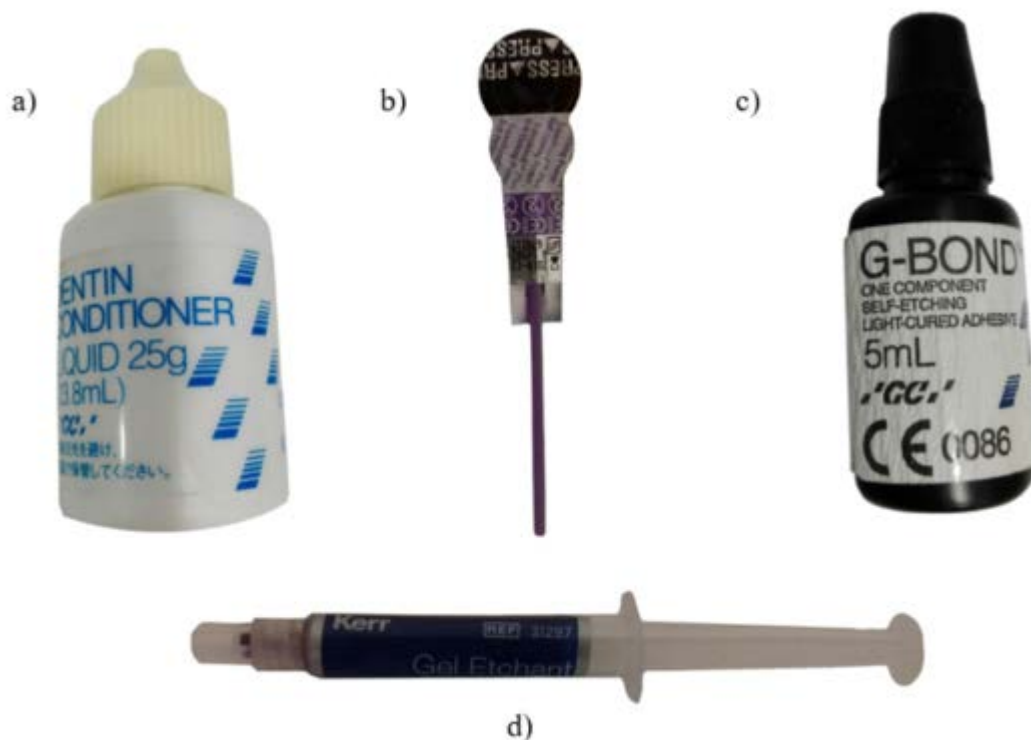
U grupi gde je korišćena 37% ortofosforna kiselina (Kerr, Gel etchant), kondicioner je apliciran na površinu uzorka u trajanju od 30 sekundi, nakon čega je površina isprana vodenim sprejom pustera, posušena vazdušnim mlazom pustera, bez presušivanja gleđi.

U grupi gde je korišćena 10% poliakrilna kiselina (GC, Dentin Conditioner), sredstvo je aplicirano na površinu uzorka u trajanju od 20 sekundi nakon čega su uzorci temeljno isprani, posušeni bez presušivanja gleđi.

Monomerom estra fosforne kiseline (GC G bond), tretirani su uzorci korišćenjem jednokratnog aplikatora, u trajanju od 5 sekundi, zatim sušeni 5 sekundi maksimalnim vazdušnim mlazom pustera, u cilju dobijanja tankog, adhezivnog filma koji se ne pomera na dalju aplikaciju vazdušne struje pustera. Zatim je rađena polimerizacija Halogen / LED (1.100 mW/cm², 385 – 515 nm, Bluephase® style, Ivoclar Vivadent) lampom u trajanju od 10 sekundi, sa udaljenosti manjoj od 10 mm od površine uzorka.

Hidroksietilmetakrilat sa fosfornom kiselinom (3M Unitek, Transbond™ Plus Self Etching Primer) aplikovan je na površinu uzorka u trajanju od 5 sekundi, zatim je sušen 2-3 sekunde vazdušnim mlazom pustera i polimerizovan 10 sekundi Halogen / LED (1.100 mW/cm², 385 – 515 nm, Bluephase® style, Ivoclar Vivadent) lampom sa udaljenosti manjoj od 10 mm.

Kontrolna grupa uzoraka gleđi nije tretirana kiselinom, uzorci su isprani vodom i sušeni pod mlazom pustera.



Slika 5-3. Korišćeni kondicioneri a) GC, Dentin Conditioner b) 3M Unitek, Transbond™ Plus Self Etching Primer c) GC G bond d) Kerr, Gel etchant.

5.2. Osnove metode nanoindentacije

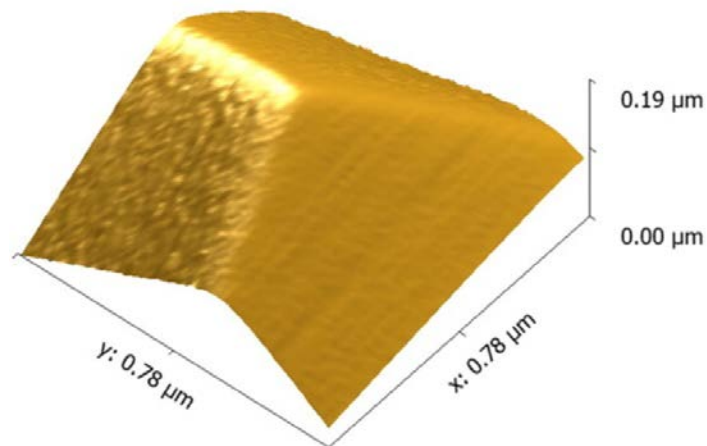
U posljednje dve decenije, većina publikacija o mehaničkim svojstvima kalcifikovanih zubnih tkiva bila je zasnovana na istraživanjima tehnikom nanoindentacije [107]. Ova tehnika je omogućila bolje razumevanje mehaničkih svojstava gleđi, dentina i cementa na makro, mikro i nano nivou. Tvrdoća i modul elastičnosti mere se kao funkcija dubine prodiranja indentera na površinu supstrata i elastičnosti nakon delovanja sile. Jedinstvena mikrostruktura svakog kalcifikovanog tkiva značajno doprinosi varijacijama u merenim mehaničkim svojstvima. Kao složeni hidratizovani biološki kompoziti, relativni udeo različitih komponenti, naime, neorganskog materijala (hidroksiapatit), organskog materijala i vode, određuju se mehanička svojstva zubnih tvrdih tkiva [26].

Primena nanoindentacije u studijama tvrdog zubnog tkiva počela je početkom 90-ih, od tada je objavljen značajan broj studija pomoću ove tehnike. Sistem omogućava merenje mehaničkih svojstava, tvrdoće i modula elastičnosti na površini materijala. Tehnika

nanoindentacije je jednostavnija procedura u poređenju s drugim uobičajenim mehaničkim testovima kao što su ispitivanja pritiska, zatezanja, savijanja, smicanja, posebno na malim uzorcima složenog oblika poput gleđi, dentina i cementa. Nanoindentacija se smatra relativno neinvazivnom metodom i omogućava merenje mehaničkih svojstava vrlo malog odabranog dela uzorka, čija dimenzija može biti na mikrometarskoj ili čak nanometrskoj skali, što je važno za merenje lokalnih svojstava nehomogenih struktura poput kalcifikovanog zubnog tkiva [30,107].

Nanoindentacija ispituje mehanička svojstva materijala u testiranom polju uzorka, u odnosu na parametre primenjene sile [106,107].

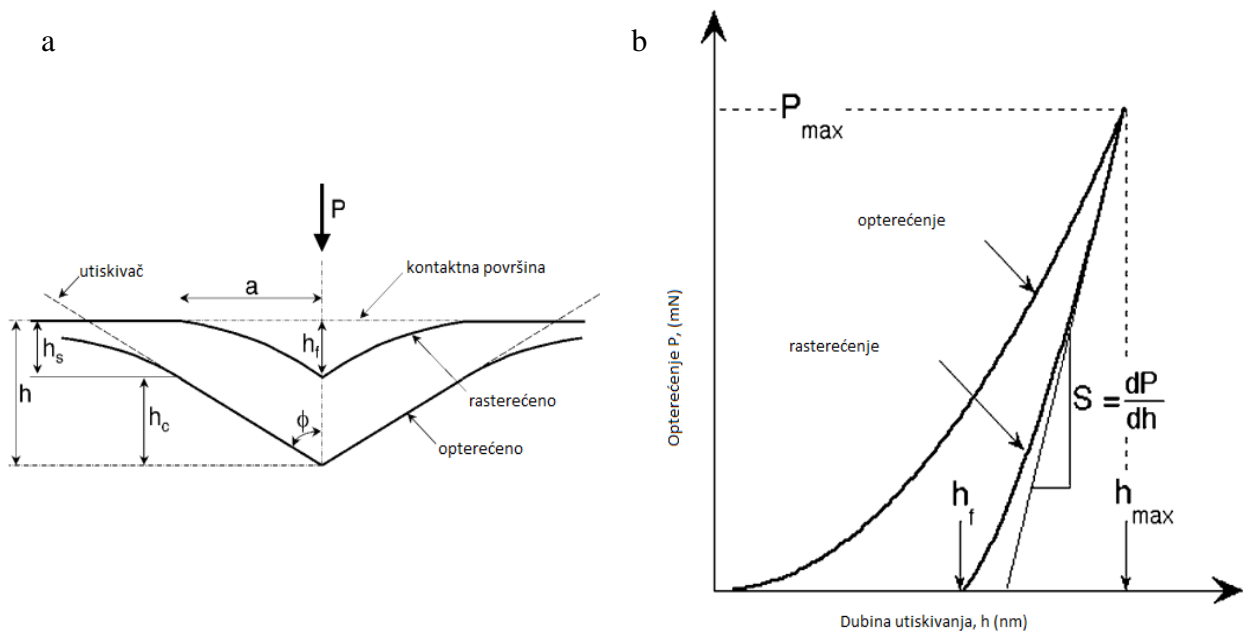
U ispitivanju mehaničkih svojstava materijala tehnikom nanoindentacije u istraživanju disertacije koristio se utiskivač definisanog oblika i geometrije, indentor tipa Berkovič (*Berkovich*) (Slika 5-4). Berkovič indentor je oblika trostrane piramide sa uglom od 115° . Njegova geometrija zasniva se na uglu od $65,27^\circ$ između centralne linije i stranica piramide [108,109].



Slika 5-4. Prikaz vrha indentera [109].

U toku primene metode nanoindentacije meri se odnos sile i dubine utiskivanja, iz čega se dobija kriva utiskivanja. Na osnovu krive utiskivanja i korišćenjem Oliver-Far metode proračunava se modul elastičnosti ispitivanog materijala (E) kao i njegova tvrdoća (H). Podaci se dobijaju iz jednog punog ciklusa opterećenja i rasterećenja.

Oliver (*Oliver*) i Far (*Pharr*) su odredili metodu nanoindentacije koja se primenjuje u površinskim ispitivanjima materijala. Oliver-Farova metoda, na osnovu elastičnog i plastičnog naprezanja materijala i primenom jednog kompleksnog matematičkog modela određuje mehaničke karakteristike materijala, odnosno tvrdoću i modul elastičnosti.



Slika 5-5. Šematski prikaz: (a) Kontakt vrha sa uzorkom. (b) Tipična kriva opterećenja – rasterećenja dobijena nanoindentacijom sa vrhom nanoindentera po tipu Berkovič (Berkovich) modifikovano od [108].

Da bi se dobili precizni rezultati mehaničkih svojstava potrebno je iščitati sa krive opterećenja/rasterećenja (Slika 5-5 (b)) nekoliko parametara: P_{max} – maksimalna sila, h_{max} – maksimalna dubina utiskivanja, nagib gornjeg dela krive tokom inicijalnog rasterećenja S (kontaktna krutost) i h_f koja označava trajnu dubinu kontakta, nakon potpunog rasterećenja. Jedna od bitnih pretpostavki da bi se koristila Oliver-Far metoda za određivanje modula elastičnosti je da prevlaka i podloga imaju slične elastične osobine. U suprotnom neće se dobiti tačna vrednost modula elastičnosti prevlake, posebno kada su one manje debljine.

Kada utiskivač dolazi u kontakt sa materijalom, na koji se primenjuje određena sila, dešava se elastična i plastična deformacija materijala, prilikom čega se ostavlja otisak u materijalu dubine h_c (Slika 5-5 (a)). Prilikom rasterećenja na krivi, ostaje vidna samo plastična

deformacija materijala, dok se elastična deformacija gubi. Elastično pomeranje same površine je predstavljeno sa h_s . Tvrdoća i modul elastičnosti na osnovu prethodno navedenih parametara se dobija uz pomoć sledećih izraza 2.1 i 2.2:

$$H = \frac{P_{max}}{A}, \quad (2.1)$$

$$E = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{S}{\sqrt{A}}, \quad (2.2)$$

gde su:

- H – tvrdoća
- P_{max} – maksimalna sila
- A – projekcija kontaktne površine
- E – modul elastičnosti
- S – kontaktna krutost

U slučaju korišćenja Berkovič utiskivača, kontaktna površina A se računa na osnovu formule 2.3:

$$A = 3\sqrt{3}h_c^2 \tan^2 \alpha, \quad (2.3)$$

Oliver i Far su eksperimentalno dokazali, da se kriva opterećenja prilikom utiskivanja indentera može prikazati formulom 2.4:

$$P = \alpha h^m, \quad (2.4)$$

gde su:

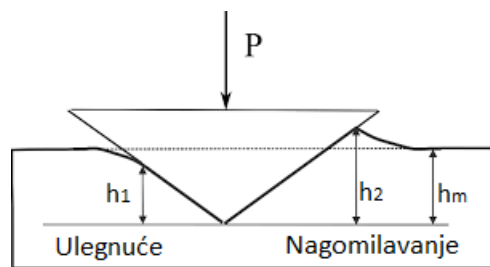
- P - opterećenje,
- h - izmerena dubina utiskivanja i
- α - konstanta povezana sa elastičnim i plastičnim karakteristikama materijala.
- m – korekcionni faktor (njena vrednost je 2 za konusni indenter)

Kontaktna dubina se određuje na osnovu krive opterećenja-rasterećenja, uz pomoć formule 2.5:

$$h_c = h_{max} - \varepsilon \frac{P_{max}}{S}, \quad (2.5)$$

Vrednosti h_{max} , P_{max} i S su predstavljene prethodno, dok ε predstavlja geometrijsku konstantu, koja zavisi od oblika utiskivača i u slučaju Berkovič (*Berkovich*) utiskivača, iznosi $\approx 0,73$ [108].

Neke od grešaka koje se mogu javljati prilikom korišćenja Oliver-Far metode su prouzrokovane od strane nesavršenosti oblika vrha utiskivača, kao i u slučaju kada dolazi do plastične deformacije uzorka tokom utiskivanja, prilikom čega deo materijala biva istisnut na gore oko utiskivača (Slika 5-6). Ukoliko se desi nagomilavanje materijala uz vrh indentera, kontaktna površina deluje veća od stvarne, i kao posledica ove pojave materijal se čini tvrdim nego što je ona u stvarnosti i navodi na nepreciznost merenja.



Slika 5-6. Prikaz nagomilavanja i potonuća u realnosti tokom nanoindentacije.

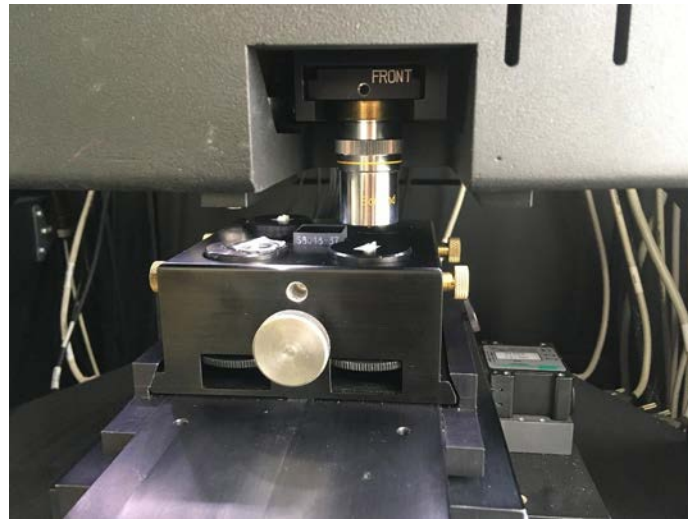
U tabeli 5-2 prikazani su rezultati merenja tvrdoće i modula elastičnosti gleđi nekoliko autora. Modul elastičnosti gleđi kreće se u rasponu od 40 do 100 GPa. Istraživanja utvrđuju da je modul elastičnosti gleđi manja na poprečnim presecima nego na površinskom sloju gleđi i što je veća primenjena sila utiskivanja, niži je modul elastičnosti [106].

Tabela 5-2. Vrednosti tvrdoća i modula elastičnosti gleđi dobijene različitim metodama merenja [106].

Autori	Površina ispitivanja	Metoda testiranja	Sila utiskivanja	Tvrdoća (GPa)	Modul elastičnosti (GPa)
Zu (Xu) i sar.	Površinski sloj gleđi	Standardna Vikers	2-50 N	3,23±0,38	-
	Poprečni presek			3,03±0,09	
Vilems (Willem)s i sar.	Površinski sloj gleđi	Modifikovana Vikers	1,9 N	3,62±0,2	94±5
	Poprečni presek			3,37±0,15	80±4
Vilems (Willem)s i sar.	Površinski sloj	nanoindentacija	10 mN	3,39±0,18	90,59±16,13
Kuj (Cuy) i sar.	Poprečni presek	nanoindentacija	Dubina indentacije (400 i 800 nm)	2,7-6,4	47-120
	Površinski sloj			>6	>115
Žo (Zhou) i sar.	Gledno-dentinska granica	nanoindentacija	Dubina indentacije (100- 2000 nm)	<3	<70
	Površinski sloj			5,7-3,6	104-70
Ge i sar.	Površinski sloj: Prizma	nanoindentacija	1 mN	4,3±0,8	83,4±7,1
	Interprizmatično polje		0,3 mN	1,1±0,3	39,5±4,1
Mahoni (Mahoney) i sar.	Poprečni presek mlečnog molara	nanoindentacija	50 i 150mN	4,9±0,4	80,4±7,7
Maršal (Marshall) i sar.	Poprečni presek gleđi na gledno-dentinskoj granici	AFM indentacija	14 mN	3,51±0,13	63,55±1,46
Poltong (Poolthong)	Bukalna površina, vrh kvržica	nanoindentacija	50 i 150mN	4,74±0,2	90,79±2,2
				4,45±0,3	83,83±6,3
Fong i sar.	Površinski sloj	nanoindentacija	0,3-2,5mN	4,78±0,36	98,3±5,9
	Poprečni presek			4,53±0,26	95,6±4,9
Habelic (Habelitz) i sar.	Površinski sloj	nanoindentacija	1,5 mN	3,8±0,31	87,5±2,1
	poprečni presek			3,3±0,35	72,7±4,4
	Glava prizme			4,3±0,4	88,0±8,6
	Rep prizme			3,7±0,4	80,3±7,2
Habelic (Habelitz) i sar.	Interprizmatično polje	nanoindentacija	0,75 i 1,5 mN	3,9±0,4	86,4±11,7
	Poprečni presek			3,2±0,4–3,7±0,5	74±4
Barbur (Barbour) i sar.	Površinski sloj	nanoindentacija	3 mN	4,81±0,15	99,6±1,8
			5 mN	4,77±0,13	101,9±1,6
			7 mN	4,75±0,12	105,2±1,3

5.3. Protokol nanoindentacije u istraživanju

Tokom ispitivanja mesta indentacije su nasumično raspoređena po celoj površini uzorka. Testovi su rađeni pomoću Agilent Nano indenter G200 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, SAD), pripremljeni uzorci su postavljeni u držač uzoraka pomoću adhezivne trake (Slika 5-7).



Slika 5-7. Pripremljeni uzorci za nanoindentaciju u držaču uzoraka Agilent Nano Indentera G200.

Ovaj nanoindenter koristi najčešće primenjivanu metodu za određivanje tvrdoće materijala, poznatu kao Oliver-Far metoda, koja je opisana u prethodnom poglavlju.

Svi uzorci su ispitivani po istom protokolu nanoindentacije. Pripremljeni uzorci su postavljeni na držač uzoraka nanoindentera i pričvršćeni da se izbegne eventualno moguće pomeranje tokom indentacije. Dubina indentacije nije prelazila 10 % debljine gornjeg sloja kako bi se isključilo nepoželjno delovanje dubljih slojeva zubnog tkiva na merenja u toku određivanja mehaničkih osobina gleđi, stoga su podešeni parametri nanoindentacije od 10 mN primenjene sile i pomakom vrha indentera od 0,1 nm. Testovi su rađeni sa vrhom indentera po tipu Berkovič (*Berkovich*). Kalibracija vrha rađena je na referentnom silika uzorku. Metoda indentacije rađena je sa predefinisanim silama (G-Series, Basic Hardness, Modulus, Tip Cal, Load Control method) koje su korišćene u svim testovima. Korišćena je optička kamera za fokusiranje tačnog mesta merenja. Testirano je deset mesta po uzorku. Kao krajnji rezultat

zabeležena je prosečna vrednost i standardna devijacija rezultata dobijenih u toku ovih merenja. Maksimalna sila na uzorak je podešeno na 1,02 gf (*gramm-force* – sila po gramu) po mestu indentacije, vreme zadržavanja vrha podešeno na 1 sekundu i vreme primene sile na 15 sekundi. Vrednost Poasonovog koeficijenta za gleđ je određen po uzoru na podatke iz literature i podešen na 0,25 [110]. Procenat greške merenja bio je 8%.

Na osnovu rezultata nanoindentacije dobijenih u Excel formatu, koristeći *GraphPad Prism 6* konstruisane su krive optrećenja-rasterećenja.

5.4. Osnove SEM-EDS analize

Pomoću SEM-a stiče se trodimenzionalni uvid u morfologiju ispitivane površine materijala. Sa odabranih mesta uzorka, generiše se dvodimenzionalna slika na kojoj se prikazuju svojstva površine uzorka. SEM slika se generiše na osnovu sekundarnih elektrona i povratno rasejanih elektrona sa analizirane površine u zavisnosti od tipa korišćenog uređaja. SEM koristi fokusirani elektronski snop visokoenergetskih elektrona (u rasponu od 0,5 do 40 keV) u cilju generisanja različitih signala sa površine uzorka. Signali koji se dobijaju u interakciji elektrona sa uzorkom pružaju informacije o morfologiji i teksturi uzorka [111].

SEM je jedna od najčešće korišćenih tehnika za karakterizaciju površine materijala. SEM uređaji vrše uvećanja od 10 do preko 500.000 puta [112]. Osnovni uslovi koji moraju biti ispunjeni da bi se dati uzorak mogao snimati SEM-om su da je uzorak neisparljiv kako bi bilo moguće postići i održati visoki vakuum unutar mikroskopa i da je uzorak elektroprovodljiv. Da bi se uzorci koji imaju malu elektroprovodljivost mogli snimati neophodno ih je najpre naporiti nekim od provodnih materijala kao što su zlato, ugljenik ili neki drugi provodni metal ili legura [112]. SEM analiza je nedestruktivna metoda, jer prilikom emitovanja rendgenskog zračenja ne dolazi do gubljenja mase uzorka, stoga je moguće više puta ponoviti analizu istog materijala. Osim morfologije ispitivanog materijala u slučaju da je SEM udružen sa EDS uređajem, može dati podatke i o hemijskom sastavu uzorka na ispitivanom mestu [113].

EDS koristi elektronski snop mikroskopa, kojim se dejstvuje na ispitivani materijal. Elektronskim snopom se izbiju elektroni iz atoma, pri čemu nastaju X zraci. Upražnjena mesta elektrona, popunjavaju se sa nekim elektronima sa višeg energetskog nivoa pri čemu se oslobađa karakterističan X zrak. Naspram energije X zraka, određuje se hemijski element iz koga je nastao. Količinom X zraka određene energije određuje se količina hemijskog elementa

u površini. Izradom celog spektra energija dobijenih X zraka dobija se EDS spektar iz kojeg se određuju svi hemijski elementi koji su prisutni u površini [112,113].

Većina EDS uređaja ne mogu detektovati elemente sa rednim brojem manjim od 11 iz periodnog sistema elemenata. Takođe, nedostatak metode je da većina detektora, ima malu osetljivost na elemente koji su prisutni u manjoj količini. Na samom uređaju prilikom analize mogu se odrediti koji elementi su preferirani za ispitivanje, pri čemu se vrši detekcija masenog udela tog elementa u površini uzorka [112,113].

Prednosti primene SEM-EDS-a su:

- posmatranje uzorka i njegova direktna vizualizacija;
- postizanje visoke rezolucije (i do 0,1 nm);
- analiza hemijskog sastava uzorka;
- generisanje podataka u digitalnom obliku.

Ograničenja primene SEM-EDS-a su:

- priprema uzorka i dobijanje mikrografija su zahtevni;
- neophodna je kalibracija sa referentnim materijalom;
- materijale kao što su emulzije je teško, odnosno nemoguće pripremiti
- efekti visokog vakuuma i visoke temperature koji nastaju zbog sudara elektronskog snopa sa uzorkom koji zatim neizbežno menja svoje stanje
- tehnika i oprema je skupa [113].

5.5. Protokol SEM-EDS analize u istraživanju

Morfološke karakteristike površine gleđi analizirane su pomoću SEM-a, dok je uz pomoć EDS-a ispitan hemijski sastav uzoraka. SEM/EDS ispitivanja su vršena na aparatu Hitachi TM3030, Japan (Slika 5-8), metodom zasnovane na primeni povratno rasejanih elektrona.



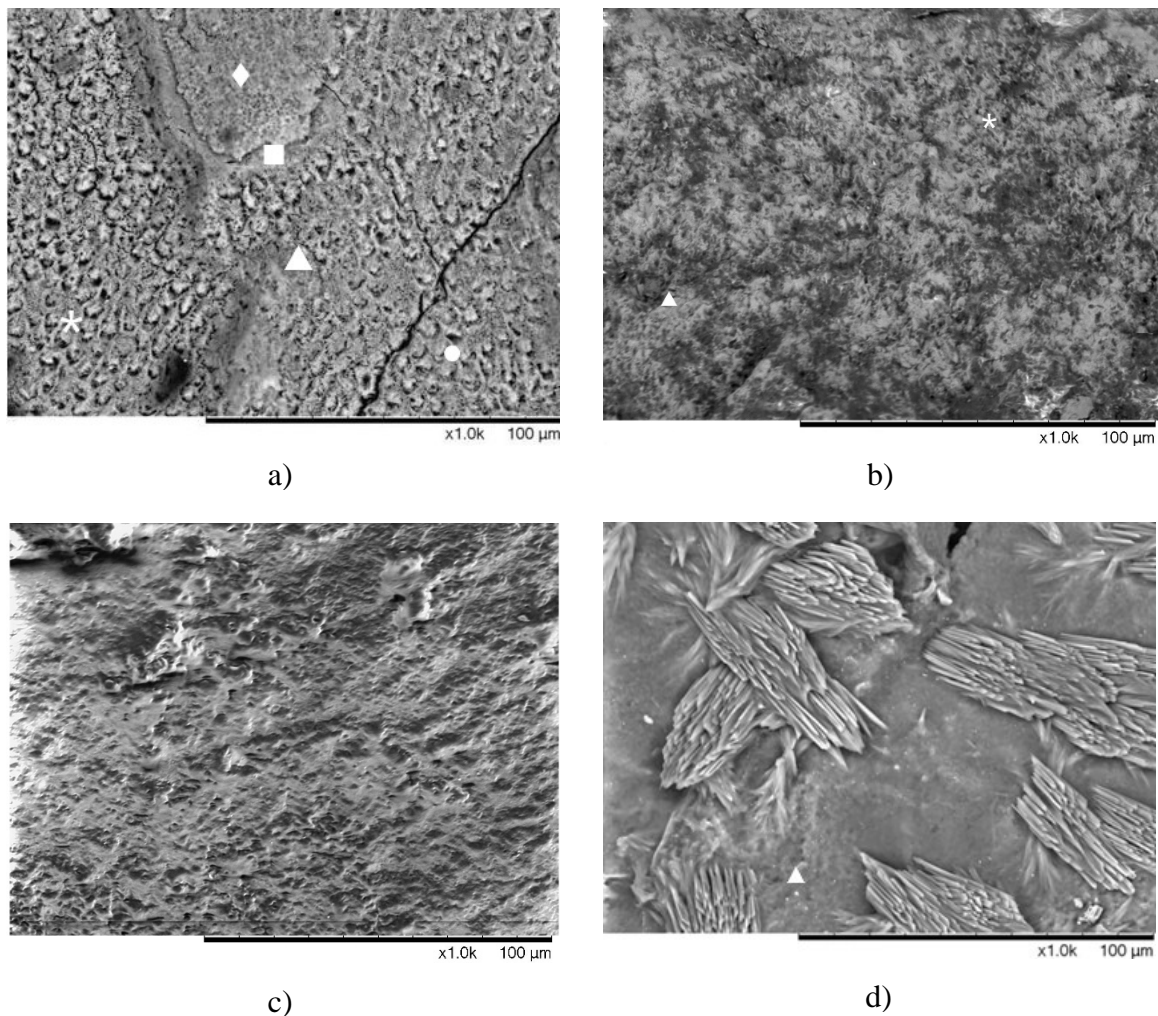
Slika 5-8. SEM/EDS ispitivanja a) Aparat Hitachi TM3030, Japan; b) pripremljeni uzorci.

Analiza morfologije površinskog sloja gleđi pre i posle tretmana kondicionerima pomoću SEM-a u cilju detekcije morfoloških promena prizmatičnosti određena je deskriptivnom metodom koristeći klasifikaciju po Silverstonu (*Silverstone*): tip 1, tip 2, tip 3, tip 4, tip 5 [63,64].

Snimci uzoraka rađene su na uveličanjima od 100, 200, 500, 1000 puta za određivanje tipa nagrivanja. Sistemska metoda opservacije i interpretacije je korišćena za determinisanje analiziranih polja, čime se omogućuje ponovljivost merenja. Svakom analiziranom polju data je ocena tipa nagrivanja. Po uzorku je analizirano 10 različitih mesta, odabrane slučajnim izborom. Dobijene ocene su zatim prebrojane i napravljena je podela na osnovu procentualne zastupljenosti polja nagrivanja [114].

Primer opisa promene morfologije uzoraka (Slika 5-9):

- a). Dominantno prisutna polja nagrivanja tip 1, u srednjem gornjem delu polja prisutan tip 2 i tip 3 u srednjem gornjem delu analiziranog polja uočava se tip 5;
- b). Dominantno prisutna polja nagrivanja tip 1 i 3;
- c). Uočavaju se polja nagrivanja tip 1, uz prisustvo smole na površini uzorka;
- d). Uočavaju se polja nagrivanja tipa 3 uz prisustvo smole.



Slika 5-9. Mikrofotografije uzoraka a) Buk S orto b) Ling M poly c) Okl Gbond d) Okl S Trans na uveličanju od 1000x

* - tip 1 ● - tip 2 ▲ - tip 3 ■ - tip 4 ◆ - tip 5.

SEM analiza je rađena od strane dva istraživača, prema gore pomenutoj klasifikaciji, nezavisno jedan od drugog, da bi se isključila pristrasnost i povećala preciznost deskriptivne metode. Tokom evaluacije, istraživačima nije bila poznata grupna pripadnost ispitivanog uzorka, a u slučaju neslaganja, ponovljen je postupak ocenjivanja za sporne uzorke i postignut konsenzus.

Metodom EDS-a izvršena je analiza hemijskog sastava površinskog sloja gleđi pre i posle tretmana kondicionerima zbog određivanja mineralnog udela određenih hemijskih elemenata i poređenja potencijala dekalifikacije gleđi korišćenih kondicionera. Analiza je

izvršena na 10 mesta, odabranih slučajnim izborom, određivanjem jona kalcijuma (Ca), fosfora (P), kiseonika (O) i ugljenika (C), koji su izraženi kao maseni udeo (w %) ovih elemenata u površinskom sloju gleđi.

5.6. Statistička metodologija

Za analizu nanoindentacije korišćene su mere centralne tendencije (aritmetička sredina), mere varijabiliteta (standardna devijacija), a razlike između ispitivanih grupa određivani su Studentovim T-testom sa nivoom značajnosti postavljenim na $p < 0,05$. Razlika u tvrdoći i modulu elastičnosti između grupa je analizirana jednosmernim, *one-way ANOVA* testom praćenim LSD testom.

Za analizu SEM mikrofotografija morfoloških promena prizmatičnosti korišćene su deskriptivne statističke metode i relativni brojevi (pokazatelji strukture) u vidu provere dobijenih vrednosti. Neparametrijske varijable (klasifikacija po tipu nagrizanja) analizirani su hi-kvadrat testom. Statistička analiza podataka kvantitativnih parametara obuhvatila je testiranja značajnosti promena srednje vrednosti Ca/P indeksa kod tretiranih grupa u odnosu na kontrolnu grupu t-testom, kao i između tretiranih grupa analizom varijanse sa posthoc analizom. Za potrebe proračuna korišćen je *IBM SPSS Statistics 23* alat za analizu statističkih podataka.

6. Rezultati

6.1. Rezultati određivanja modula elastičnosti i tvrdoće gleđi nanoindentacijom

Ispitivanja mehaničkih osobina mlečnih i stalnih zuba obavljena su merenjem modula elastičnosti i tvrdoće zuba. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su u tabelama 6-1 i 6-2.

Tabela 6-1. Prosečne vrednosti modula elastičnosti i tvrdoće gleđi mlečnih zuba.

Površina zuba	Vrsta primenjenog kondicionera	Modul elastičnosti GPa		Tvrdoća GPa	
		Mean	± SD	Mean	± SD
Okluzalna	Bez/kontrolna	28,829 ^A	2,19	2,773 ^A	0,28
	Ortofosforna	24,094 ^{a, B}	1,12	0,252 ^{a, B}	0,03
	Poliakrilna	25,466 ^{a, b}	1,41	1,58 ^{a, b, C}	0,29
	G Bond	26,807 ^{a, b}	1,61	1,45 ^{a, b, D}	0,20
	Transbond	25,561 ^a	2,40	1,135 ^{a, b, c, d}	0,28
Bukalna	Bez/kontrolna	26,515 ^c	2,83	1,778 ^E	0,37
	Ortofosforna	23,791 ^C	2,16	0,431 ^{e, G}	0,09
	Poliakrilna	25,692 ^c	0,96	1,602 ^{F, g}	0,23
	G Bond	25,065	1,20	1,485 ^{e, g}	0,22
	Transbond	24,575	1,63	1,262 ^{e, f, g}	0,29
Lingvalna	Bez/kontrolna	27,128 ^D	3,00	2,048 ^H	0,35
	Ortofosforna	23,862 ^{E, d}	2,50	1,028 ^{h, I}	0,36
	Poliakrilna	25,798 ^e	1,16	1,754 ^{h, i, J}	0,24
	G Bond	25,252	1,90	1,505 ^{h, i, j}	0,22
	Transbond	24,634 ^d	2,03	1,371 ^{h, i, j}	0,31

Mean-aritmetička srednja vrednost; SD- standardna devijacija

*Između vrednosti označenih sa A-a, B-b, C-c, D-d, E-e, F-f, G-g, H-h, I-i, J-j postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$).

Analiza dobijenih rezultata modula elastičnosti unutar grupe mlečnih zuba (Tabela 6-1), ukazala je na postojanje statistički značajnih razlika ($p < 0,05$) i to u najvećoj meri između rezultata netretirane okluzalne površine i svih tretiranih uzoraka okluzalne površine, gde je u zavisnosti od vrste upotrebljenog kondicionera p vrednost bila sledeća: ortofosforna kiselina ($p=0,000$), poliakrilna kiselina ($p=0,001$), G bond ($p=0,030$), Transbond ($p=0,005$). Takođe,

statistički značajna razlika unutar okluzalne grupe postojala je i između vrednosti modula elastičnosti kada je korišćena ortofosforna kiselina i grupa u kojima je korišćena poliakrilna kiselina ($p=0,026$) i G bond ($p=0,000$).

Statistički značajna razlika postojala je i kada je posmatrana bukalna površina mlečnih zuba i to između vrednosti modula elastičnosti kada je korišćena ortofosforna kiselina i grupa u kojima je korišćena poliakrilna kiselina ($p=0,020$), odnosno netretirane, kontrolne grupe ($p=0,026$).

Kada su posmatrani uzorci lingvalne površine mlečnih zuba, razlika u vrednostima modula elastičnosti bila je statistički značajna između kontrolne grupe i između grupe koja je tretirana ortofosfornom kiselinom ($p=0,016$) i Transbondom ($p=0,043$), kao i između grupe tretirane ortofosfornom i grupe tretirane poliakrilnom kiselinom ($p=0,039$). Razlike između rezultata preostalih grupa lingvalne površine mlečnih zuba nisu bile statistički značajne.

Analiza prosečne vrednosti tvrdoće gleđi u grupi mlečnih zuba (Tabela 6-1), ukazala je na statistički značajne razlike između vrednosti netretiranih i svih tretiranih uzoraka, na svim površinama, osim na uzorcima bukalne površine tretiranih poliakrilnom kiselinom, gde razlika nije bila statistički značajna ($p=0,218$, $p>0,05$).

Prosečne vrednosti tvrdoće gleđi bile su niže nakon nagrizanja ortofosfornom kiselinom u poređenju sa svim drugim korišćenim kondicionerima, na svim ispitivanim površinama mlečnih zuba. Statistička analiza ukazala je na postojanje značajne razlike između ortofosforne kiseline u odnosu na sve druge ispitivane kondicionere, kada su korišćeni na bukalnoj, lingvalnoj i okluzalnoj površini mlečnih zuba.

Takođe, statistički značajne razlike postojale su i između vrednosti tvrdoće gleđi lingvalnih površina tretiranih poliakrilnom kiselinom i kada je ista površina tretirana G bondom ($p=0,026$), odnosno Transbondom ($p=0,006$). Analiza rezultata tvrdoće bukalne površine mlečnih zuba ukazala je na postojanje statistički značajne razlike između rezultata grupe uzoraka tretiranih Transbondom u poređenju sa vrednostima tvrdoće iste površine tretirane poliakrilnom kiselinom ($p=0,009$).

Kada je analizirana grupa stalnih zuba, vrednost modula elastičnosti bila je najniža u grupi uzoraka kondicioniranih ortofosfornom kiselinom, kod svih posmatranih površina (Tabela 6-2).

Tabela 6-2. Prosečne vrednosti modula elastičnosti i tvrdoće gleđi stalnih zuba.

Površina zuba	Vrsta primenjenog kondicionera	Modul elastičnosti GPa		Tvrdoća Gpa	
		Mean	± SD	Mean	± SD
Okluzalna	Bez/kontrolna	41,739 ^A	0,76	3,856 ^A	0,63
	Ortofosforna	31,645 ^{a, B}	3,23	0,921 ^{a, B, c}	0,25
	Poliakrilna	37,096 ^{a, b}	2,01	2,103 ^{a, b, c}	0,36
	G Bond	37,477 ^{a, b}	0,79	1,907 ^{a, b, c}	0,17
	Transbond	37,061 ^{a, b}	2,12	1,348 ^{a, b, C}	0,34
Bukalna	Bez/kontrolna	39,064 ^C	1,54	2,882 ^D	0,29
	Ortofosforna	31,240 ^{c, D}	3,42	0,741 ^{d, E, f}	0,24
	Poliakrilna	38,567 ^{d, E}	1,54	2,142 ^{d, e, f}	0,39
	G Bond	36,734 ^{c, d, e}	2,07	1,925 ^{d, e, f}	0,27
	Transbond	36,179 ^{c, d, e}	1,53	1,37 ^{d, e, F}	0,37
Lingvalna	Bez/kontrolna	39,251 ^f	0,93	3,332 ^G	0,79
	Ortofosforna	32,974 ^F	2,51	0,865 ^{g, H, i}	0,17
	Poliakrilna	38,680 ^f	2,92	2,201 ^{g, h, i}	0,31
	G Bond	37,017 ^f	2,26	2,052 ^{g, h, i}	0,32
	Transbond	36,456	3,23	1,522 ^{g, h, I}	0,3

Mean-aritmetička srednja vrednost; SD- standardna devijacija

*Između vrednosti označenih sa A-a, B-b, C-c, D-d, E-e, F-f, G-g, H-h, I-i postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$).

Statistički značajne razlike vrednosti modula elastičnosti uočene su između grupe uzoraka tretiranih ortofosfornom kiselinom, bez obzira na površinu zuba, u odnosu na grupe u kojima su korišćeni drugi kondicioneri, osim kada su poređeni uzorci lingvalne površine stalnih zuba tretirani ortofosfornom kiselinom sa uzorkom iste površine tretirane Transbondom. Kada je ispitivana bukalna površina, razlika je bila statistički značajna i između rezultata dobijenih za vrednost modula elastičnosti nakon primene poliakrilne kiseline u odnosu na rezultate kada su korišćeni G-Bond i Transbond.

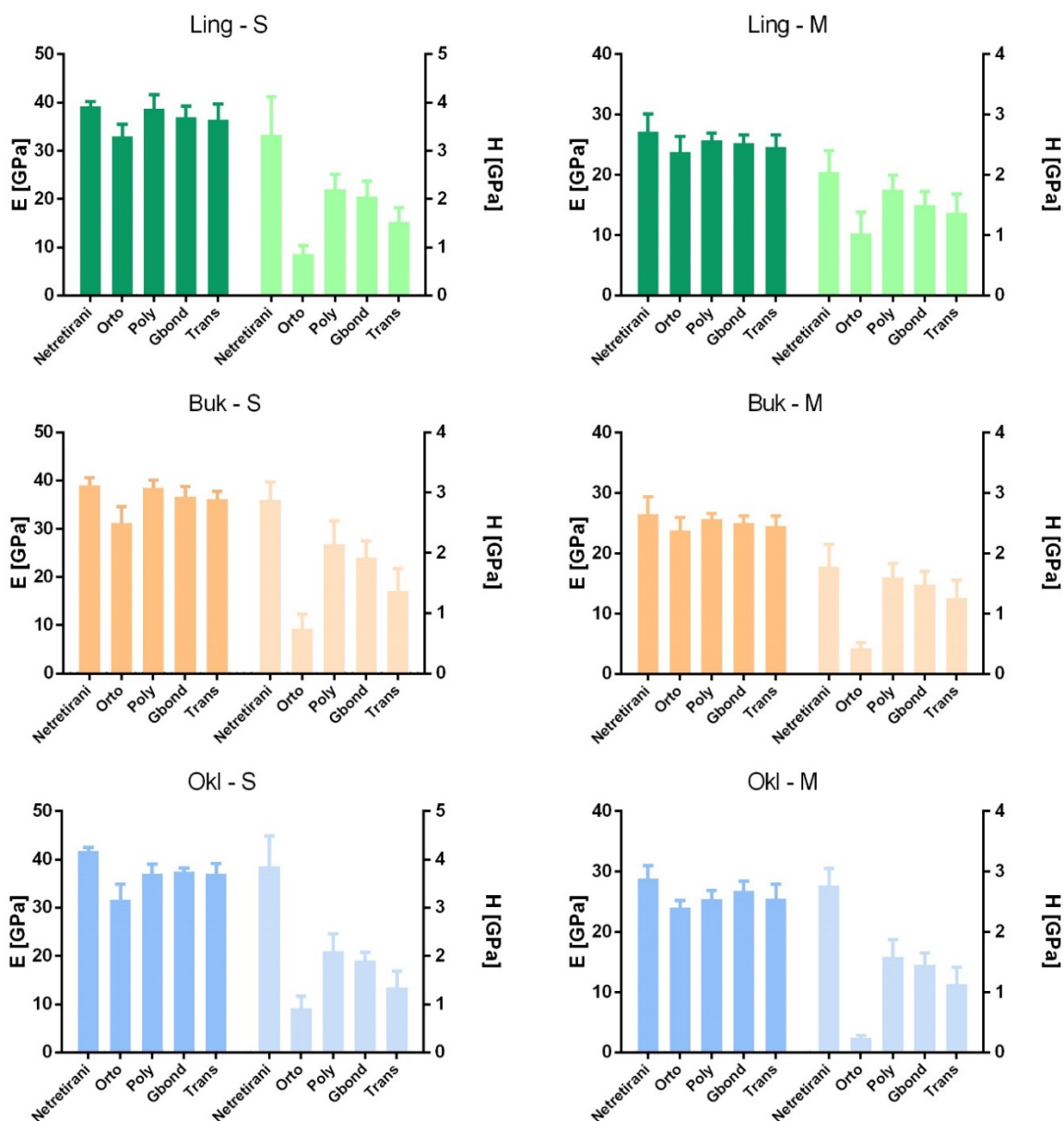
Takođe, rezultati modula elastičnosti stalnih zuba bili su statistički značajni u odnosu na kontrolnu grupu i sve testirane kondicionere primenjene na okluzalnoj površini, dok posmatrano na lingvalnoj strani ova razlika nije bila značajna, a na bukalnoj površini razlika između netretirane grupe je bila značajna u odnosu na sve ispitivane kondicionere, osim poliakrilne kiseline.

Rezultati tvrdoće gleđi stalnih zuba pokazali su statistički značajne razlike između netretirane, kontrolne grupe i svih grupa testiranih kondicionera, bez obzira na ispitivanu površinu zuba. Prosečna vrednost tvrdoće gleđi stalnih zuba na svakoj ispitivanoj površini bila je najmanja kada je korišćena ortofosforna kiselina i statistički se značajno razlikovala u poređenju sa rezultatima dobijenim nakon primene drugih kondicionera.

Statistički značajna razlika između rezultata tvrdoće gleđi kod svih ispitivanih površina uočena je i nakon primene Transbonda u odnosu na poliakrilnu kiselinu, i u odnosu na primenu G bonda.

Na grafikonu 6-1 prikazane su prosečne vrednosti modula elastičnosti i tvrdoće gleđi stalnih i mlečnih zuba sa standardnom devijacijom.

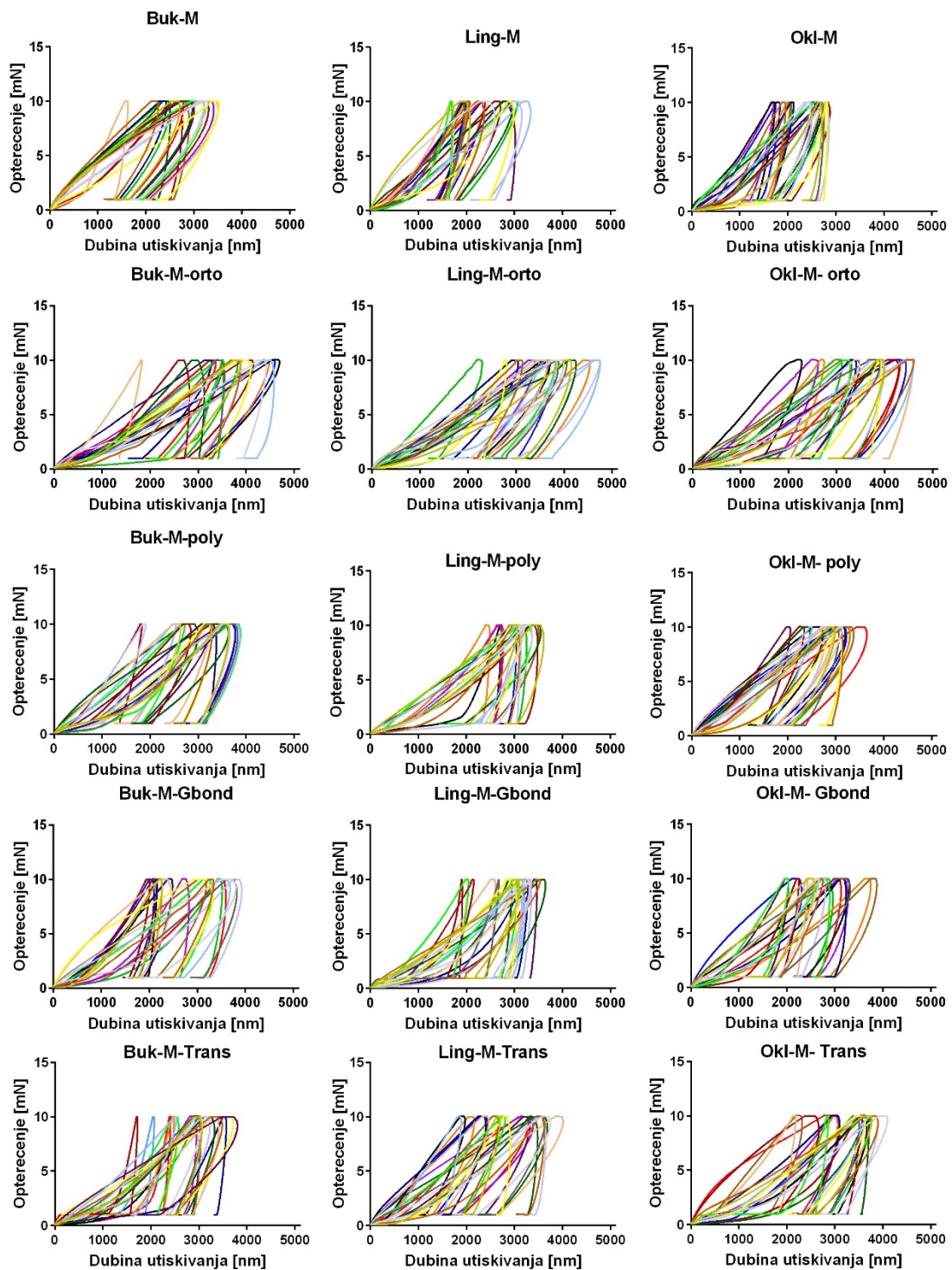
Grafikon 6-1. Prosečne vrednosti modula elastičnosti i tvrdoće gleđi stalnih i mlečnih zuba sa standardnom devijacijom.



Na osnovu podataka nanoindentacije, odnosa sile i dubine utiskivanja dobijene su krive opterećenja-rasterećenja.

U odnosu na primenjeni kondicioner prikazane su krive na grafikonu 6-2 kod mlečnih, a na grafikonu 6-4 kod stalnih zuba.

Grafikon 6-2. Krive opterećenja-rasterećenja – mlečni zubi.

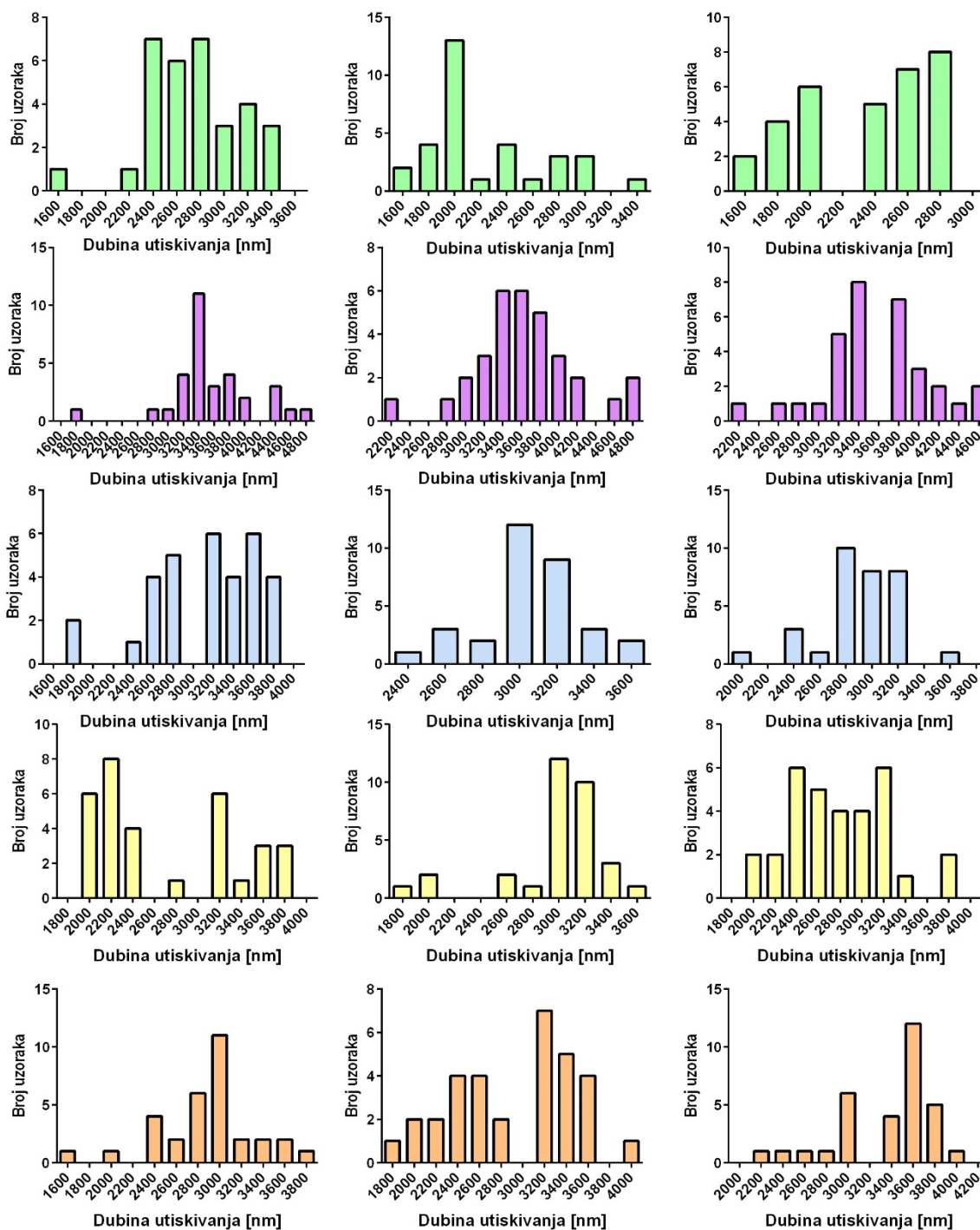


Analiza krivih utiskivanja u grupi uzoraka mlečnih zuba, ukazuje na to da je dubina prodiranja vrha indentera u površinu uzorka najveća u grupi gde je bukalna površina mlečnog zuba tretirana ortofosfornom kiselinom, pri čemu je opseg utiskivanja sa maksimalnom silom iznosio od 2,3 μm - 4,7 μm . Opseg dubina indentacije pre i nakon kondicioniranja uzoraka grupe mlečnih zuba prikazan je na grafikonu 6-3. Dubina indentacije zavisi od nastale demineralizacije i poroznosti površine nakon tretmana kondicionerima i direktno je povezana sa promenom tvrdoće uzorka.

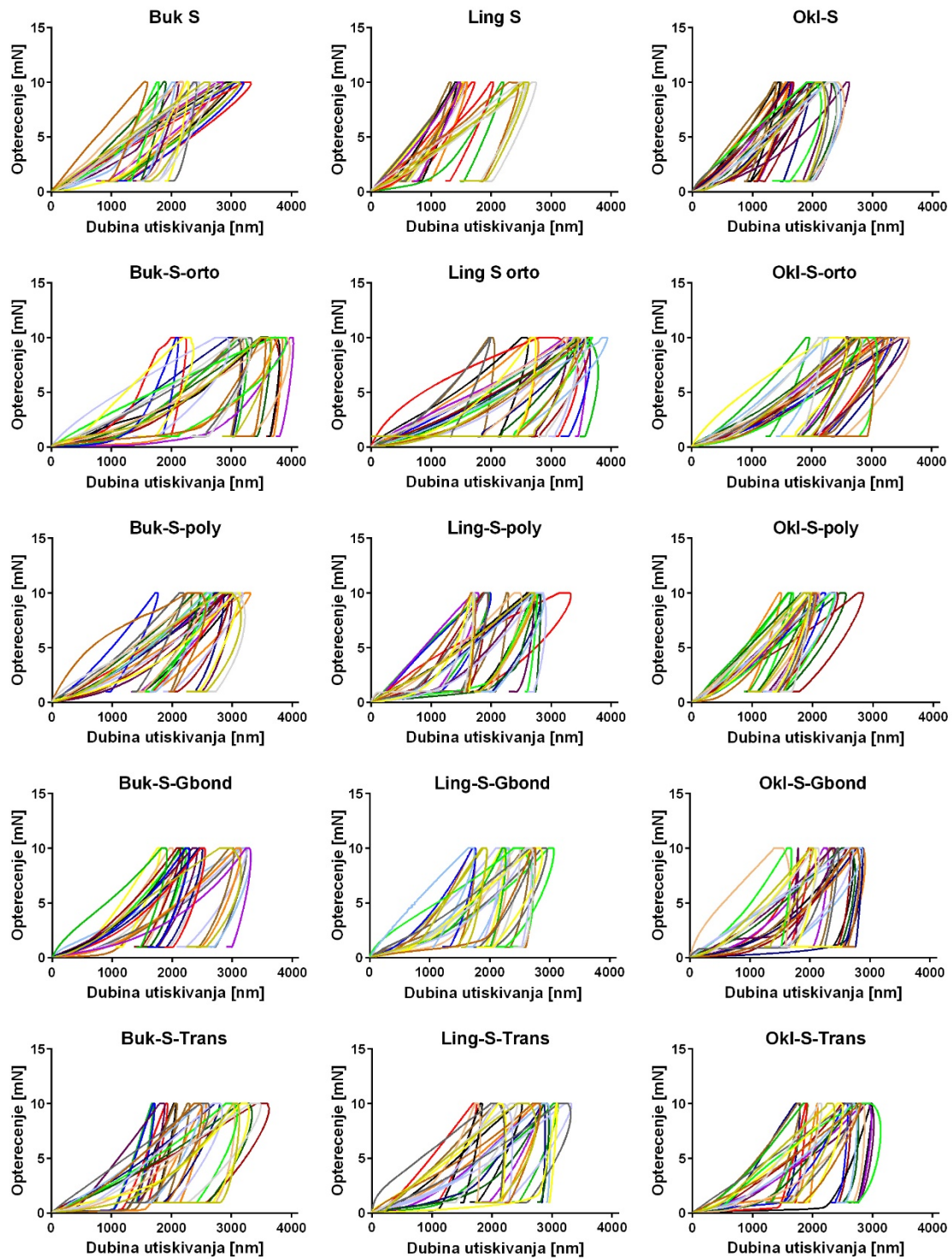
Najmanji opseg između najmanje i najveće dubine utiskivanja uočava se u grupi bukalne strane mlečnih zuba tretiranih poliakrilnom kiselinom koja iznosi od 1,6 μm - 3,4 μm , dok se približni rezultati dubine prodiranja indentera dobijaju nakon tretmana G bondom odnosno Transbondom. Okluzalna površina mlečnih zuba pokazuje najveću tvrdoću u odnosu na druge ispitivane površine, a zatim lingvalna površina.

Najmanja demineralizacija se desila u grupi mlečnih zuba okluzalne strane tretirane poliakrilnom kiselinom gde je dubina utiskivanja indentera pod maksimalnom silom u opsegu od 1,7 μm - 3,2 μm , u odnosu na druge ispitivane površine. Poređenjem krivih može se uočiti da se u grupi netretiranih mlečnih zuba na okluzalnoj površini javljaju strmije krive, dok se u grupi mlečnih zuba nakon tretmana na okluzalnim površinama najčešće pojavljuju uniformne krive, izuzev nakon tretmana Transbondom, gde se pojavljuje trend nejednakih kriva. Ovakav nejednak oblik kriva pojavljuje se i na bukalnoj površini mlečnih zuba tretiranih Transbondom, kao i na lingvalnoj površini mlečnih zuba tretiranih G bondom.

Grafikon 6-3. Histogram dubine utiskivanja indentera u grupi mlečnih zuba.



Grafikon 6-4. Krive opterećenja-rasterećenja– stalni zubi.



U rezultatima kriva opterećenja i rasterećenja u grupi stalnih zuba, prilikom primene najveće sile utiskivanja, dubina utiskivanja je bila najveća kod uzoraka koje su tretirane ortofosfornom kiselinom u odnosu na sve ispitivane površine. Opseg dubina intencije pre i nakon kondicioniranja uzoraka grupe stalnih zuba prikazana je na grafikonu 6-5.

U grupi stalnih zuba na okluzalnoj površini dubina prodiranja indentera bila je 1,8-3,6 μm , dok je u grupi uzoraka bukalne strane stalnih zuba i lingvalne strane stalnih zuba dubina prodiranja je bila slična i iznosila je 2-4 μm .

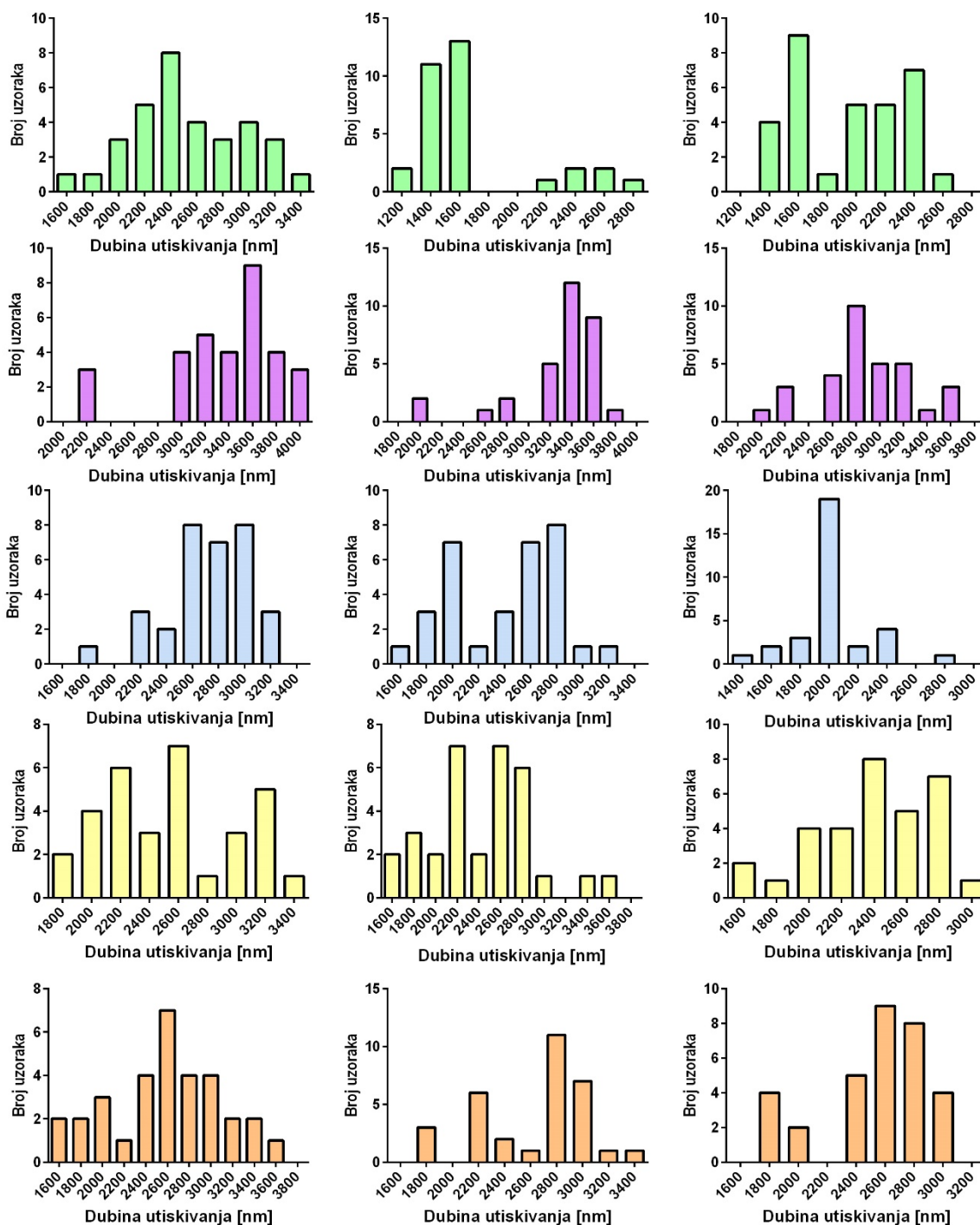
U odnosu na ispitivanu površinu, kada je posmatrana bukalna površina stalnih zuba, najveći modul elastičnosti primećen je nakon tretmana ortofosfornom kiselinom, zatim nakon tretmana G Bondom, Transbondom, a najveća tvrdoća u ispitivanoj grupi je nakon tretmana poliakrilnom kiselinom.

Kada je posmatrana lingvalna površina veće prosečno prodiranje vrha indentera uočeno je nakon tretmana kiselinama u odnosu na netretirane uzorke. U grupi lingvalnih površina stalnih zuba najveći opseg između najveće i najmanje dubine utiskivanja indentera uočen je nakon tretmana ortofosfornom kiselinom, dok je taj opseg bio sličan u grupi nakon tretmana poliakrilnom kiselinom, G bondom i Transbondom.

U analizi rezultata okluzalne strane stalnih zuba, najveća demineralizacija je u grupi uzoraka nakon tretmana ortofosfornom kiselinom, u opsegu dubine prodiranja indentera od 1,8-3,6 μm , u odnosu na druge površine. Zatim je najveći opseg prodiranja indentera nakon tretmana Transbondom, dok je opseg demineralizacije u grupi okluzalne strane stalnih zuba nakon tretmana poliakrilnom kiselinom odnosno G bondom bio približan i kretao se u opsegu 1,5-2,9 μm .

Poređenjem krivih uočavaju se strmije krive u grupi netretiranih stalnih zuba u odnosu na krive tretiranih uzoraka. Dominantno, različiti oblici kriva pojavljuju se na bukalnoj i lingvalnoj strani stalnih zuba tretiranih ortofosfornom kiselinom, kao i na bukalnoj strani stalnih zuba tretiranih poliakrilnom kiselinom.

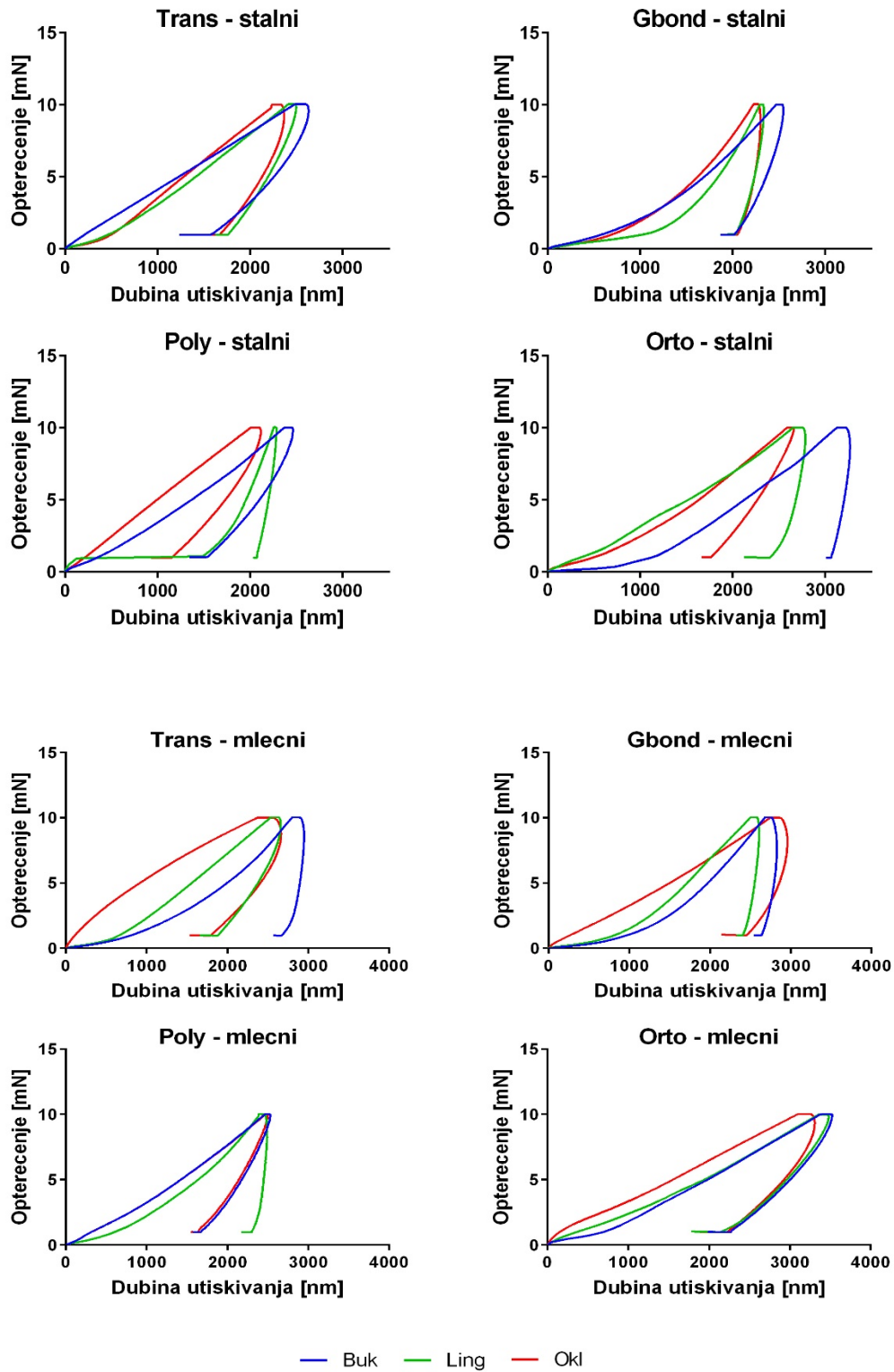
Grafikon 6-5. Histogram dubine utiskivanja indentera u grupi stalnih zuba.



U odnosu na korišćene kondicionere (Grafikon 6-6), u grupi mlečnih zuba najveća prosečna dubina utiskivanja indentera uočena je prilikom korišćenja ortofosforne kiseline. Vrednosti dubine utiskivanja indentera su približna u grupi uzoraka bukalne strane i lingvalne strane mlečnih zuba prosečno 3,5 μm , a nešto manja dubina prodiranja se uočava u grupi okluzalne strane mlečnih zuba tretiranih ortofosfornom kiselinom, prosečno 3,2 μm . Prilikom korišćenja G bonda u grupi mlečnih zuba, prosečna dubina utiskivanja u grupi bukalne i lingvalne strane su približni i iznose 2,8 μm , dok najmanje prosečno utiskivanje indentera je u grupi lingvalne strane prosečno 2,5 μm . Prilikom primene Transbonda u grupi mlečnih zuba, prosečna dubina utiskivanja na bukalnoj strani iznosi 2,7 μm , dok prosečna dubina utiskivanja je približna u grupi lingvalne i okluzalne strane i iznosi 2,4 μm . Primenom poliakrilne kiseline u grupi mlečnih zuba, prosečna dubina utiskivanja je približna kod tri strane ispitivanih površina pri maksimalnom utiskivanju i iznose prosečno 2,3 μm .

U grupi stalnih zuba najveća prosečna dubina utiskivanja bila je u grupi uzoraka tretiranih ortofosfornom kiselinom. Unutar grupe tretiranih ortofosfornom kiselinom, prosečno najveća dubina utiskivanja od 3,1 μm bila je na uzorcima bukalne strane, dok je prosečna dubina utiskivanja okluzalne strane i lingvalne strane približna i iznosi 2,6 μm . Prilikom korišćenja Transbonda na uzorcima bukalne strane stalnih zuba i prosečno je iznosila 2,5 μm , a najmanja dubina utiskivanja indentera bila je na uzorcima okluzalne strane stalnih zuba, koja je prosečno iznosila 2,1 μm . Korišćenjem G bonda dobija se približna demineralizacija površine okluzalne i lingvalne strane stalnih zuba, gde dubina utiskivanja prosečno iznosi 2 μm . Kada se koristi poliakrilna kiselina dubina utiskivanja indentera na uzorcima bukalne strane stalnih zuba prosečno iznosi 2,2 μm , na uzorcima lingvalne strane prosečno 2 μm , dok na uzorcima okluzalne strane stalnih zuba iznosi 1,8 μm .

Grafikon 6-6. Krive opterećenja-rasterećenja stalnih i mlečnih zuba u odnosu na primenjeni kondicioner.



6.2. Rezultati analize hemijskog sastava površinskog sloja gleđi SEM-EDS metodom

Analiza hemijskih elemenata površinskog sloja gleđi uzoraka kontrolne grupe i uzoraka grupa tretiranih različitim kondicionerima ukazala je većinom na smanjenje udela analiziranih elemenata, osim kiseonika čiji se maseni udeo povećao nakon tretmana sa svim kondicionerima, i u grupi stalnih i mlečnih zuba. Takođe, u obe grupe zuba, uočen je i porast vrednosti masenog udela ugljenika, koji se povećao nakon primene svih ispitivanih kondicionera, osim u grupi stalnih zuba, kada je primenjena ortofosforna kiselina i kada je došlo do pada vrednosti ovog elementa. (Tabela 6-3, Tabela 6-4).

Najveće smanjenje udela elemenata kalcijuma (Ca) i fosfora (P) bilo je prisutno u grupi uzoraka stalnih zuba tretiranih G bondom, i do 7 puta manje u odnosu na vrednosti dobijene nakon primene drugih kondicionera, a čak 9 puta manje u odnosu na kontrolnu, netretiranu grupu (Tabela 6-3). Međutim, statistički značajna razlika u smanjenju udela Ca i P uočena je ne samo nakon primene G Bonda, već i nakon tretmana sa svim kondicionerima u odnosu na kontrolnu, netretiranu grupu, kao i kada su kondicioneri poređeni između sebe, osim između ortofosforne kiseline i Transbonda, gde ova razlika nije bila značajna.

U grupi stalnih zuba odnos Ca/P se statistički značajno razlikovao nakon tretmana G bondom, i to na lingvalnoj i okluzalnoj površini, dok se ovaj odnos minerala nije značajno promenio nakon tretmana gleđi drugim kondicionerima, kao ni na bukalnoj površini.

Između vrednosti odnosa Ca/O i P/O za sve površine postoji statistički značajna razlika među svim grupama, osim između uzoraka stalnih zuba koji su tretirani sa Transbondom u odnosu na poliakrilnu kiselinu.

Tabela 6-3. Analizirani elementi u površinskom sloju gleđi stalnih zuba, izraženi u masenom udelu (w %).

Površina zuba	Vrsta primenjenog kondicionera	Analizirani elementi						
		Ca w%	P w%	O w%	C w%	Ca/P ratio	Ca/O ratio	P/O ratio
Okluzalna	Bez/kontrolna	45,99	18,18	26,56	9,28	2,53 ^a	1,73	0,68
	Ortofosforna	29,28	12,05*	52,91	5,76	2,43	0,55	0,23
	Poliakrilna	33,69	13,23	34,24	18,84	2,55 ^a	0,98	0,39
	G Bond	5,37	2,46	38,96	49,49	2,18 ^A	0,14	0,06
	Transbond	30,94	11,53*	30,52	26,27	2,68 ^a	1,01	0,38
Bukalna	Bez/kontrolna	45,41	18,79	27,03	9,98	2,42	1,68	0,70
	Ortofosforna	28,86*	11,30*	52,61	5,51	2,55	0,55	0,21
	Poliakrilna	35,28	13,67	34,65	19,71	2,58	1,02	0,39
	G Bond	4,79	1,85	38,16	49,24	2,59	0,13	0,05
	Transbond	30,78*	11,56*	30,61	26,15	2,66	1,01	0,38
Lingvalna	Bez/kontrolna	46,99	19,00	27,12	10,16	2,47 ^a	1,73	0,70
	Ortofosforna	28,36	11,46*	52,69	5,42	2,47 ^a	0,54	0,22
	Poliakrilna	34,30	13,25	34,36	19,53	2,59 ^a	1,00	0,39
	G Bond	5,50	2,60	39,35	49,82	2,11 ^A	0,14	0,07
	Transbond	31,18	11,85*	30,79	26,68	2,63 ^a	1,01	0,38

Vrednosti označene sa * nisu statistički značajne, dok su ostale vrednosti između sebe statistički značajne.

Vrednosti označene sa A-a su statistički značajne.

Statistički značajna razlika u smanjenju udela Ca i P postojala je i u grupi mlečnih zuba, nakon tretmana sa svim kondicionerima u odnosu na kontrolnu, netretiranu grupu. Podjednako na svim ispitivanim površinama najveće smanjenje udela Ca nastupilo je nakon primene Transbonda, dok se maseni udeo P u najvećoj meri smanjio nakon primene poliakrilne kiseline. Takođe, porast udela kiseonika bio je najveći nakon primene Transbonda na svim ispitivanim površinama. U poređenju različitih kondicionera takođe je postojala statistički značajna razlika u vrednostima Ca i P nakon tretmana gleđi mlečnih zuba između svih ispitivanih kondicionera, osim u vrednostima P na okluzalnoj površini nakon primene poliakrilne kiseline i G Bonda.

Kada su u grupi mlečnih zuba posmatrani rezultati proporcije Ca/P, uočeno je da se vrednosti statistički značajno razlikuju nakon tretmana poliakrilnom kiselinom i Transbondom, posmatrajući sve analizirane površine, u poređenju sa drugim kondicionerima i u poređenju sa kontrolnom grupom.

Međutim, u poređenju rezultata odnosa Ca/P minerala sa kontrolnom grupom, nije postojala statistički značajna razlika nakon primene ortofosforne kiseline, kao ni G bonda.

U analizi vrednosti odnosa Ca/O kod mlečnih zuba, između grupa lingvalne i bukalne površine mlečnih zuba tretirani ortofosforom kiselinom i G bondom ne postoji statistički značajna razlika, kao ni između grupa okluzalne površine tretiranih ortofosforom i poliakrilnom kiselinom. Među ostalim grupama postoji statistički značajna razlika u vrednosti odnosa Ca/O.

Postoji statistički značajna razlika i u vrednosti odnosa Ca/O između kontrolne grupe lingvalne površine mlečnih zuba i grupa gde su primenjeni kondicioneri, dok u slučaju grupa mlečnih zuba bukalne i okluzalne površine, pored statističke značajne razlike kontrolne grupe i svih ostalih grupa gde su primenjeni kondicioneri, takođe postoji statistički značajna razlika u vrednosti Ca/O između uzoraka koji su tretirani ortofosforom kiselinom i Transbondom.

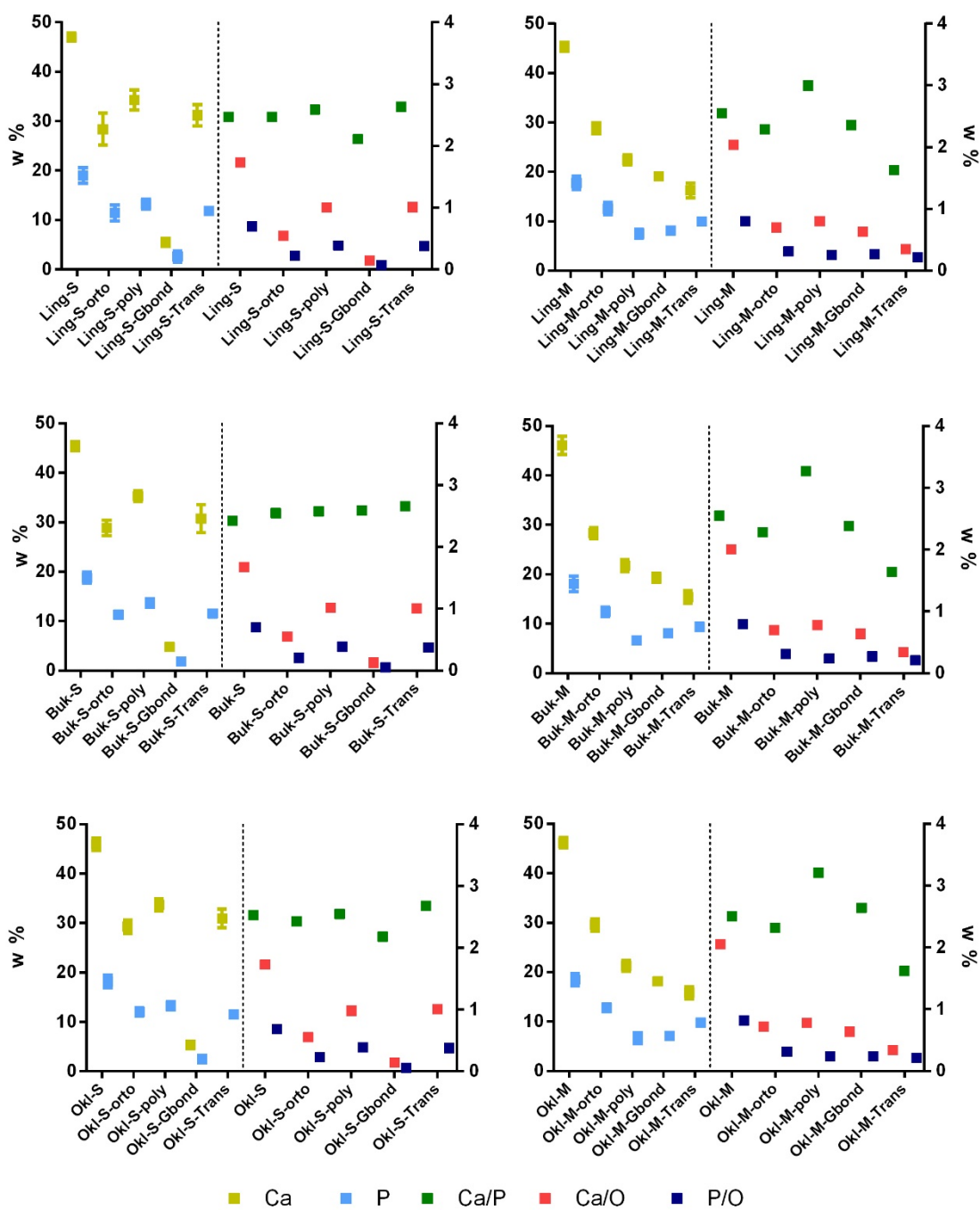
Tabela 6-4. Analizirani elementi u površinskom sloju gleđi mlečnih zuba, izraženi u masenom udelu (w %).

Površina zuba	Vrsta primenjenog kondicionera	Analizirani elementi						
		Ca w%	P w%	O w%	C w%	Ca/P ratio	Ca/O ratio	P/O ratio
Okluzalna	Bez/kontrolna	46,19	18,46	22,53	12,84	2,50●	2.05	0.82
	Ortofosforna	29,57	12,77	40,98	19,37	2,32*	0.72	0.31
	Poliakrilna	21,27	6,62 *	27,38	40,95	3,21	0.78	0.24
	G Bond	18,83	7,13 *	29,40	40,87	2,64*	0.64	0.24
	Transbond	15,86	9,79	46,67	29,38	1,62	0.34	0.21
Bukalna	Bez/kontrolna	46,08	18,08	22,90	12,94	2,55●	2.01	0.79
	Ortofosforna	28,34	12,45	40,39	18,82	2,28*	0.70	0.31
	Poliakrilna	21,75	6,65	27,82	41,77	3,27	0.78	0.24
	G Bond	19,26	8,11	30,24	41,77	2,38*	0.64	0.27
	Transbond	15,41	9,40	45,84	29,36	1,64	0.34	0.21
Lingvalna	Bez/kontrolna	45,32	17,78	22,18	12,59	2,55●	2.04	0.80
	Ortofosforna	28,83	12,58	40,96	19,21	2,29*	0.70	0.31
	Poliakrilna	22,44	7,47	28,22	41,87	3,00	0.80	0.26
	G Bond	19,12	8,09	30,16	41,19	2,36*	0.63	0.27
	Transbond	16,23	9,94	46,15	29,85	1,63	0.35	0.22

Vrednosti označene sa * i sa ● /* nisu statistički značajne, dok su ostale vrednosti između sebe statistički značajne.

Promene masenog udela minerala prikazane su na grafikonu 6-7.

Grafikon 6-7. Promene masenog udela minerala.



6.3. Rezultati analize morfologije površinskog sloja gledi primenom SEM

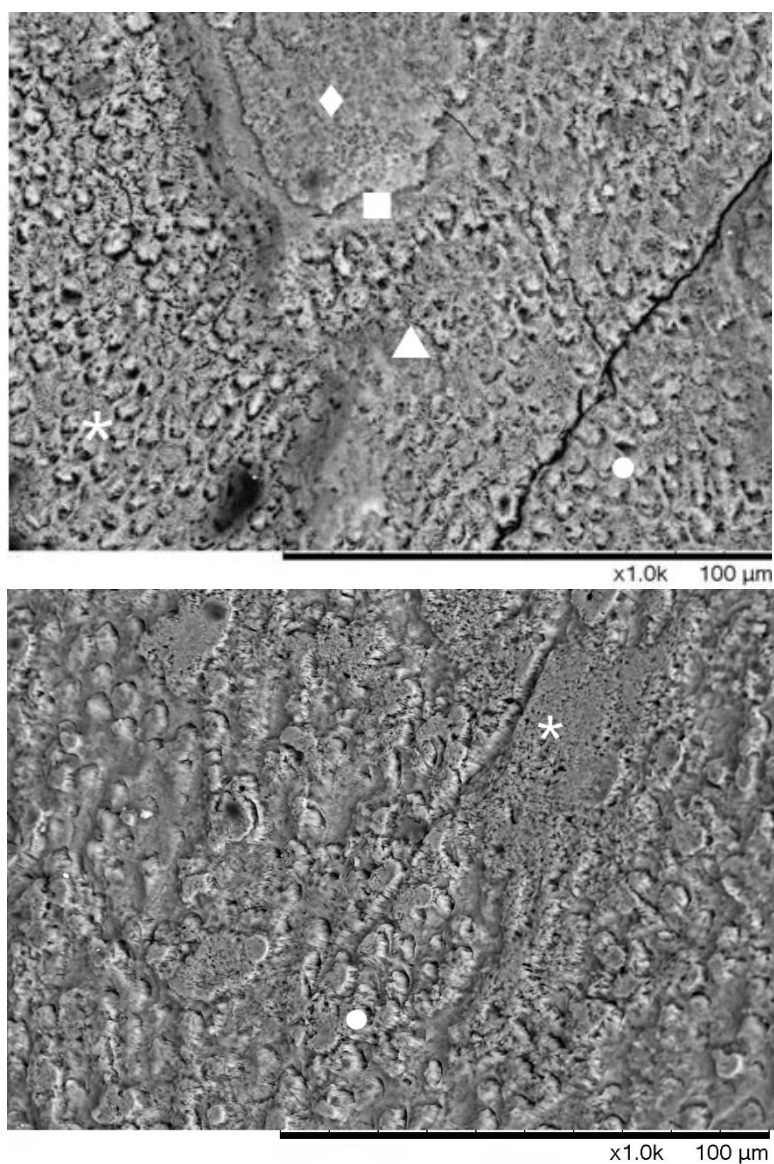
Svaki primenjeni kondicioner promenio je površinsku morfologiju uzorka. Zastupljenost određenih polja nagrizanja razlikuje se u zavisnosti od primenjenog kondicionera. Efekat nagrizanja kondicionera, veličina polja nagrizanja i tip nagrizanja po Silverstonu (*Silverstone*) nije uniforman na posmatranim površinama. Ortofosforna i poliakrilna kiselina, u najvećoj meri su uticala na pojavu polja nagrizanja tipa 1 i tipa 2. Primenom G bonda i Transbonda pored tipa 1, veliki udeo polja nagrizanja bio je tipa 3 (Tabela 6-5).

Tabela 6-5. Procentualna zastupljenosti tipa polja nagrizanja po Silverstonu u odnosu na ispitivane kondicionere.

Primenjena kiselina		Ortofosforna kiselina				
Tip nagrizanja/ Uzorak		1	2	3	4	5
Stalni	Ling-S	70%	22%	8%	/	/
	Buk-S	70%	26%	2%	2%	/
	OkI-S	75%	10%	15%	/	/
Mlečni	Ling-M	82%	10%	8%	/	/
	Buk-M	78%	8%	9%	5%	/
	OkI-M	80%	13%	7%	/	/
		Poliakrilna kiselina				
Tip nagrizanja/ Uzorak		1	2	3	4	5
Stalni	Ling-S	58%	20%	7%	/	15%
	Buk-S	65%	16%	8%	2%	9%
	OkI-S	75%	6%	7%	5%	7%
Mlečni	Ling-M	82%	5%	3%	/	10%
	Buk-M	71%	8%	9%	2%	10%
	OkI-M	40%	3%	7%	30%	20%
		G bond				
Tip nagrizanja/ Uzorak		1	2	3	4	5
Stalni	Ling-S	40%	/	35%	15%	10%
	Buk-S	35%	8%	32%	9%	16%
	OkI-S	37%	12%	36%	/	15%

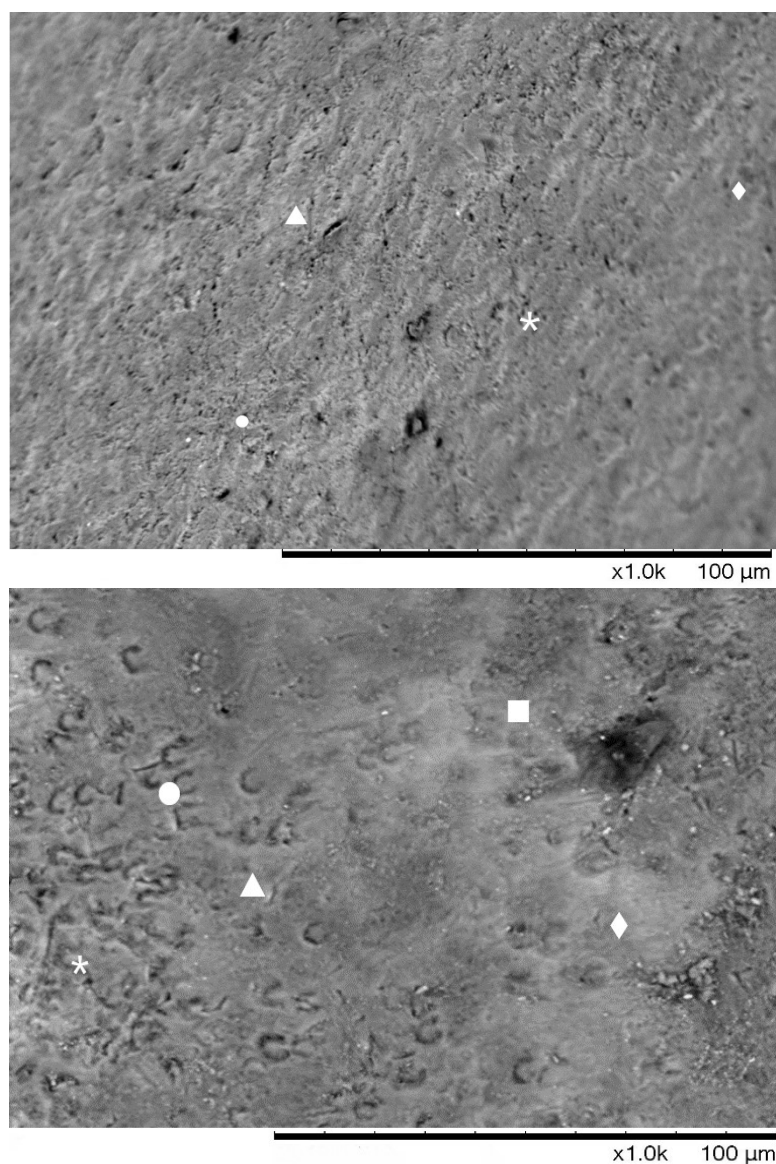
		Transbond				
Tip nagrizanja/ Uzorak		1	2	3	4	5
Mlečni	Ling-M	36%	15%	39%	/	10%
	Buk-M	37%	10%	33%	/	20%
	OkI-M	42%	13%	30%	/	15%
Stalni	Ling-S	35%	10%	40%	5%	10%
	Buk-S	28%	13%	30%	8%	21%
	OkI-S	32%	12%	38%	5%	13%
Mlečni	Ling-M	32%	9%	36%	10%	13%
	Buk-M	37%	10%	12%	15%	26%
	OkI-M	35%	5%	25%	8%	27%

Na SEM mikrofotografijama stalnih i mlečnih zuba, kondicioniranih ortofosfornom kiselinom, uočava se dominantno prisustvo polja nagrizanja tipa 1 i tipa 2 (Slika 6-1, Slika 6-2). Vidljive su otvorene prizme sa mestimično ravnim površinama koje predstavljaju prizmatične zone i intaktne gledne prizme.



Slika 6-1. Reprezentativna SEM mikrofotografija stalnih zuba nakon primene ortofosforne kiseline na uzorku Buk S orto (gore) i Ling S orto (dole) na uvećanju x1000. Morfologija površine posmatranih uzoraka ima izgled saća meda. Dominatno prisustvo polja nagrivanja je tip 1 (zastupljenije nagrivanje centra- srži gleđne prizme). Mestimično se uočavaju polja nagrivanja tip 2, izgledu nalik kaldrmi (zastupljenije nagrivanje perifernog dela gleđne prizme, gde je uklonjena košuljica prizme). Tip 3, tip 4 i tip 5 su ređe prisutni. Na odabranoj gornjoj mikrofotografiji uočava se crna linija sa desne strane i crni defekt u površini sa leve strane koje su pukotine odnosno defekti na površini gleđi nastale pre nagrivanja u sredini usne duplje.

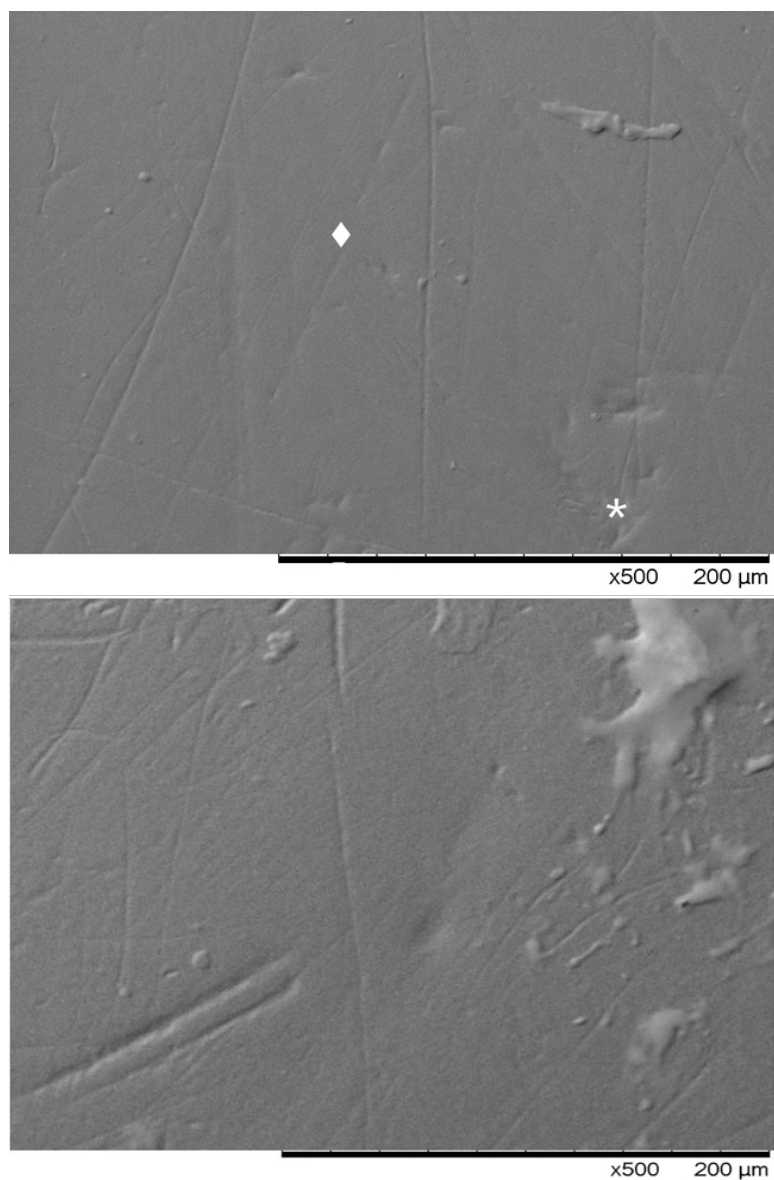
** - tip 1 ● - tip 2 ▲ - tip 3 ■ – tip 4 ◆ - tip 5.*



Slika 6-2. Reprezentativna SEM mikrofotografija mlečnih zuba nakon primene ortofosforne kiseline na uzorku Ling M orto (gore) i Okl M orto (dole) na uvećanju x1000. Morfologija površine posmatranog uzorka podseća na izgled saća meda. Dominatno prisustvo polja nagrizanja je tip 1. Mestimično se uočavaju polja nagrizanja tip 2, koji podsećaju na izgled kaldrme (zastupljenije nagrizanje perifernog dela gleđne prizme). Tip 3, tip 4 i tip 5 su mestimično prisutni

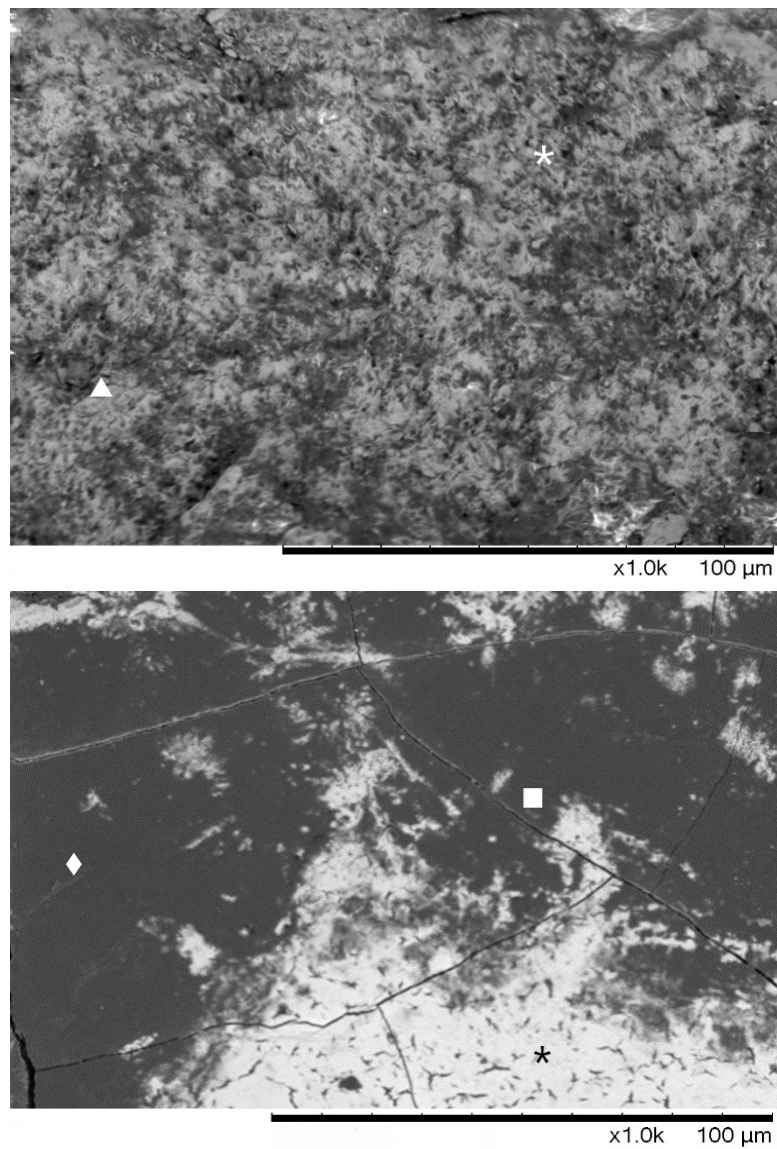
** - tip 1 ● - tip 2 ▲ - tip 3 ■ – tip 4 ◆ - tip 5.*

SEM mikrofotografije stalnih i mlečnih zuba kondicioniranih poliakrilnom kiselinom prikazane su na slikama 6-3 i 6-4.



Slika 6-3. Reprezentativna SEM mikrofotografija stalnih zuba nakon primene poliakrilne kiseline na uzorku Okl S poly (gore), Buk S poly (dole) na uvećanju x500. Posmatrane površine uzoraka pokazuju zaravnjenu, blago matiranu površinu. Vidljivo je pliće, manje agresivno nagrizanje koje podseća na izgled netretirane površine gleđi, uz mestimičnu pojavu ostrvca polja nagrizanja tipa 1 uz dominantno prisustvo polja nagrizanja tipa 5. Uočava se relativno zaravnjena površina gleđi sa minimalnim eksponiranjem gleđnih prizmi, čak i na većim uvećanjima. Prisutni risevi predstavljaju prirodne pukotine na površini gleđi, dok u gornjem desnom uglu na obe slike vidi se nagomilavanje kondicionera.

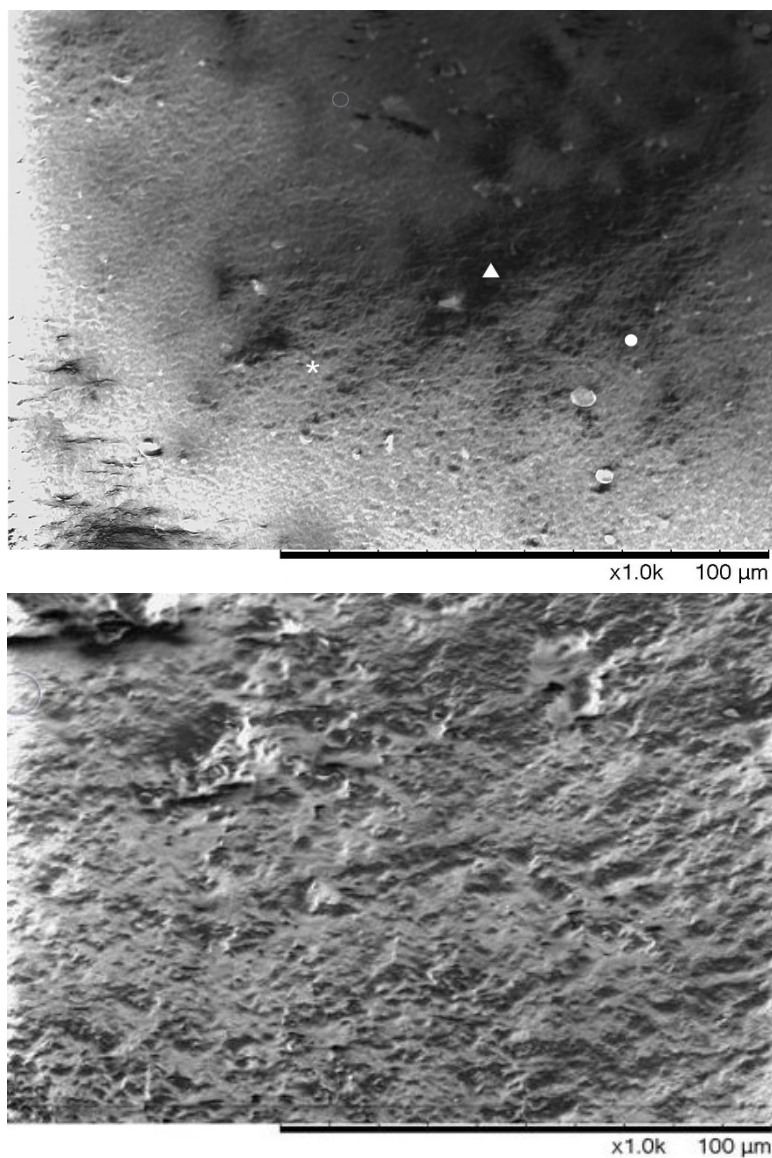
** - tip 1 ◆ - tip 5.*



Slika 6-4. Reprezentativna SEM mikrofotografija mlečnih zuba nakon primene poliakrilne kiseline na uzorcima Ling M poly, Okl M poly na uvećanju $\times 1000$. Posmatrane površine uzoraka pokazuju blago nagriženu, zaravnjenu, matiranu površinu. Crne linije na donjoj slici ukazuju na postojanje pukotina na gleđi površine zuba.

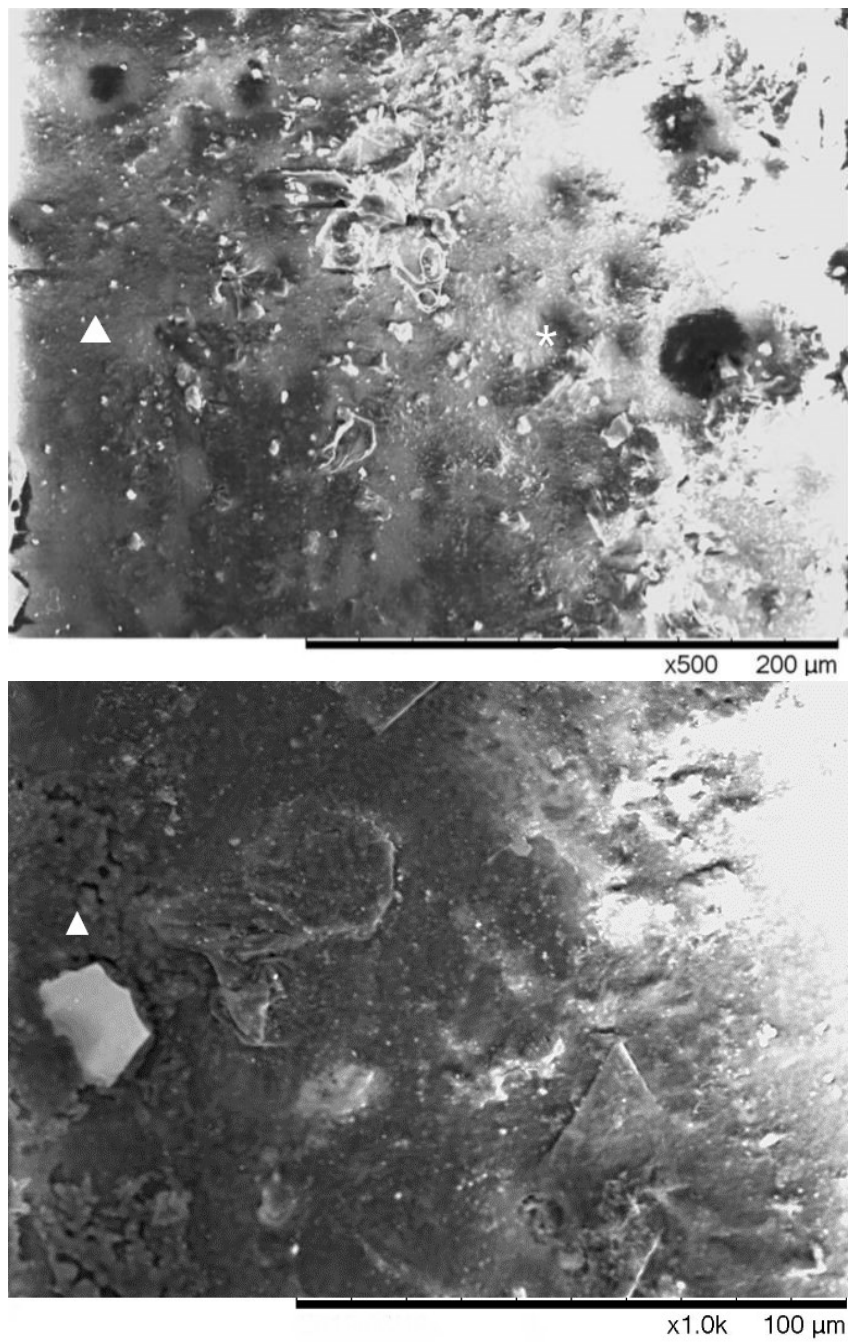
** - tip 1 ▲ - tip 3 ■ - tip 4 ◆ - tip 5.*

Na SEM mikrofotografijama stalnih i mlečnih zuba (Slika 6-5, Slika 6-6) kondicioniranih G bondom vidljivi su delovi smole koja je infiltrirala gleđ.



Slika 6-5. Reprezentativna SEM mikrofotografija stalnih zuba nakon primene G bonda na uzorcima Okl S Gbond i Buk S Gbond na uvećanju x1000. Na posmatranim uzorcima porozna površina gleđi se ne uočava zbog sloja smole G bonda koja je infiltrirala mikrošupljine. Izgled hibridnog sloja nakon primene G bonda nije homogen, već adhezivni sistem pokazuje tendenciju nakupljanja materijala u grozdove.

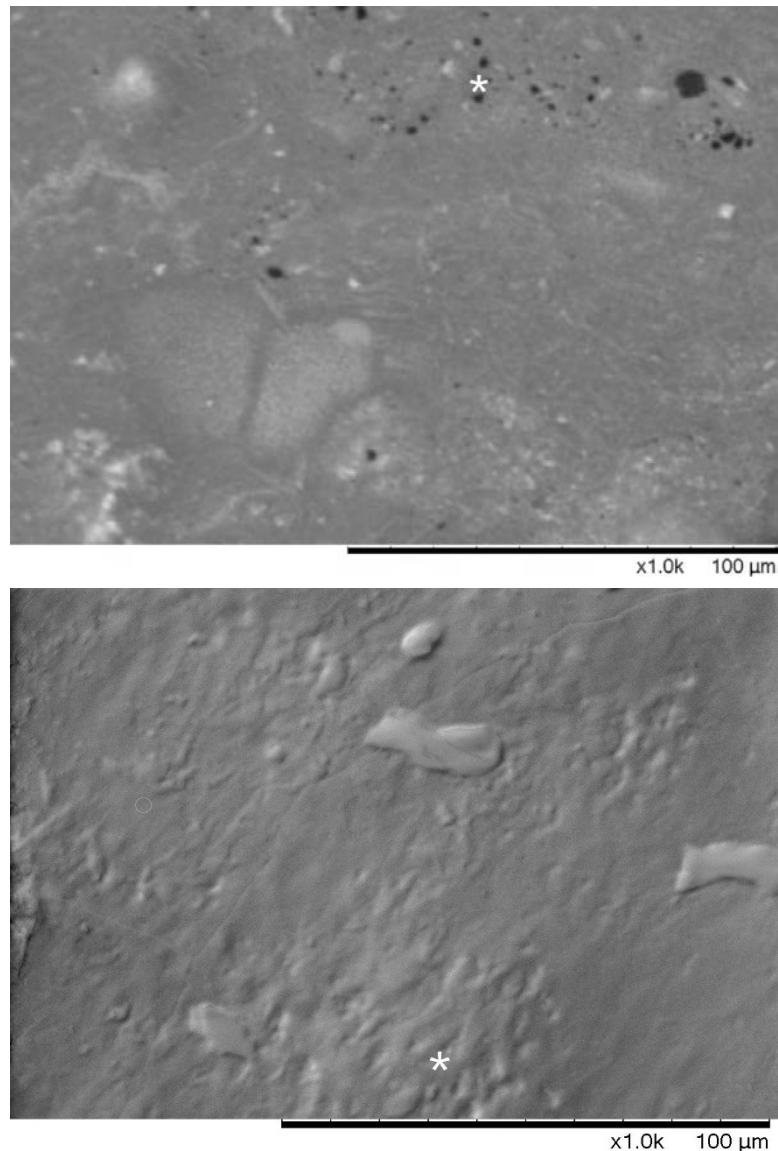
** - tip 1 ● - tip 2 ▲ - tip 3.*



Slika 6-6. Reprezentativna SEM mikrofotografija mlečnih zuba nakon primene G bonda na uzorcima Buk M Gbond i Ling M Gbond na uvećanju x500 odnosno x1000. Na posmatranim uzorcima uočava se hibridni sloj i smolaste nakupine G bonda.

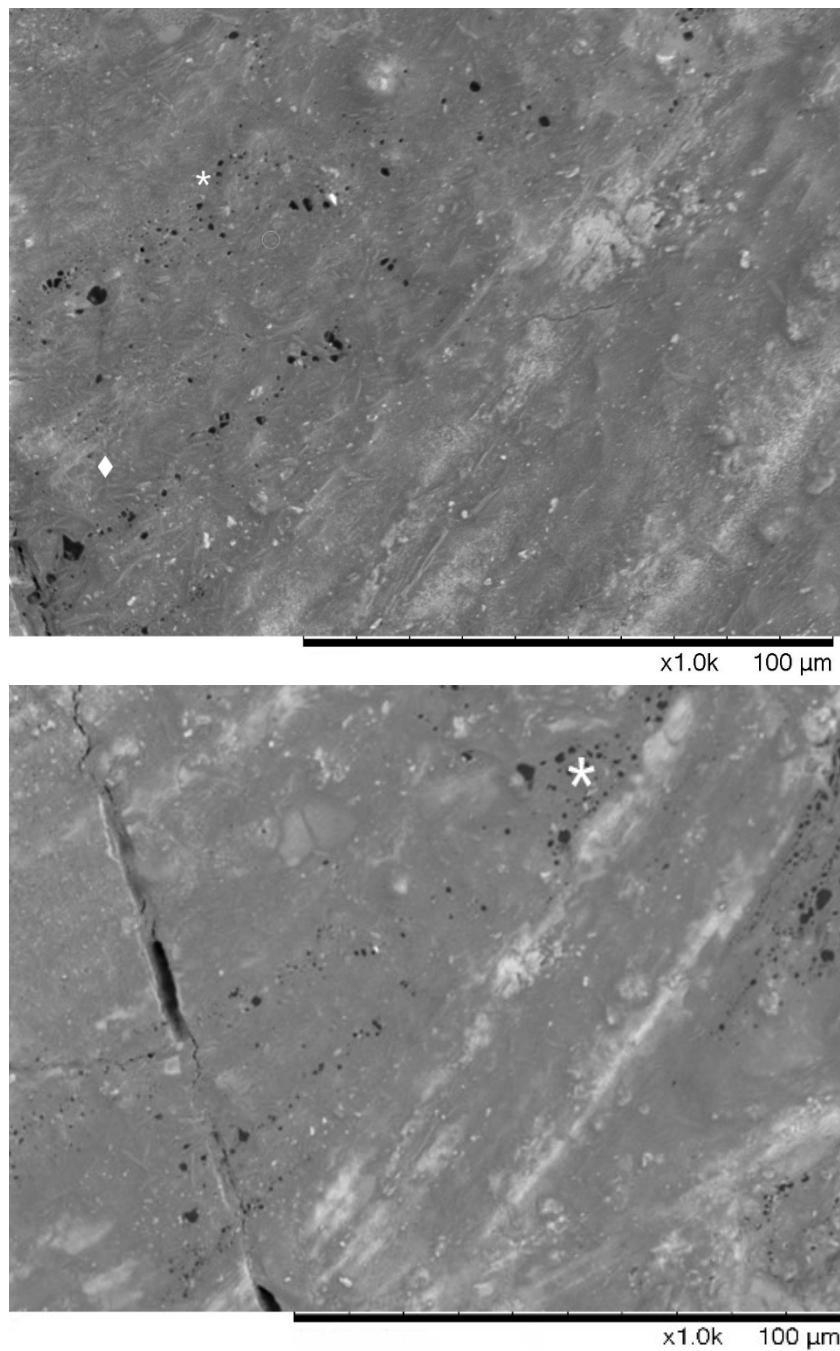
▲ - tip 3.

SEM mikrofotografije stalnih i mlečnih zuba kondicioniranih Transbondom prikazane su na slikama 6-7 i 6-8.



Slika 6-7. Reprezentativna SEM mikrofotografija stalnih zuba nakon primene Transbonda na uzorcima Ling S Trans i Buk S Trans na uvećanju x1000. Prisutan je staklasto-mlečni izgled kondicionirane površine, na kome se uočava homogeni sloj Transbonda, uz mestimično nagomilavanje smolastih ostataka. Uočava se prisustvo zona delimično demineralizovanih gleđnih prizmi ispunjenih smolom, koja pokriva površinu gleđi, kao i relativno zaravnjene zone aprizmatične gleđi bez prisustva infiltracije smolom.

** - tip 1.*



Slika 6-8. Reprezentativna SEM mikrofotografije mlečnih zuba nakon primene Transbonda na uzorcima Ling M Trans i Buk M Trans na uvećanju x1000. Prisutan je staklasto-mlečni izgled kondicionirane površine, na kome se uočava gušći sloj smole Transbonda i mestimična pojava polja nagrizanja tipa 1. Uočava se smolasti hibridni sloj na analiziranim uzorcima.

** - tip 1 ◆ - tip 5.*

7. Diskusija

7.1. Diskusija materijala i metoda

Eksperimentalni protokol za istraživanje razvijen je u skladu sa prethodno korišćenim modelima za ispitivanje mehaničkih i hemijskih osobina gleđi [115,116].

Za razliku od kliničkih istraživanja, *in vitro* ispitivanja se mogu sprovesti pod strogo kontrolisanim uslovima i na velikom broju uzoraka. Negativne strane ovakve studije mogu se odnositi na činjenicu da ne postoje klinički uslovi tokom kondicioniranja uzoraka, što može uticati na mogućnost poređenja rezultata sa drugim eksperimentalnim studijama i studijama sprovedenim u kliničkim uslovima [117].

Istraživanje je sprovedeno u laboratorijskim uslovima na humanim ekstrahovanim zubima nakon dobijene saglasnosti etičke komisije Medicinskog Fakulteta u Novom Sadu. Ekstrahovani zubi su čuvani u fiziološkom rastvoru do obrade, s obzirom na to što u fiziološkom rastvoru dolazi do najmanjih promena sastava gleđi i sprečava se dehidracija uzoraka, što bi u suprotnom moglo dovesti do pojave netačnih rezultata i zaključaka [118-120].

Intaktna gleđ je bila supstrat izbora u ovom istraživanju s obzirom da predstavlja površinu koja je ključna za proces adhezije, neophodne u velikom broju stomatoloških procedura (postavljanja direktnih i indirektnih ispuna, kompozitnih i keramičkih ljuspi, splintova, zalivača i ortodontskih bravica). Preparacija uzoraka rađena je standardizovano i identično za sve uzorke. Kondicioniranje uzoraka obavio je jedan istraživač, kako bi se izbegla razlika u načinu rada između različitih operatora i da bi se postigla maksimalna kontrola tokom ovih faza eksperimenta. U dosadašnjim istraživanjima adhezivne veze fokus je bio prvenstveno na ispitivanju adhezije za hidrofilni dentin, na vrstama materijala, na hemijskom sastavu i načinu polimerizacije materijala. Međutim mali broj radova je publikovan o uticaju strukture površine gleđi na adhezivnu vezu. Takođe, dosta je pažnje poklonjeno načinu pripreme i kondicioniranju gleđi ortofosfornom kiselinom, pri čemu nije rađena uporedna analiza sa drugim kondicionerima koji se sve više koriste u kliničkoj praksi [58,121-124].

U svrhu testiranja bioloških uzoraka kao što su kosti i zubi, nanoindentacija predstavlja metodu izbora određivanja mehaničkih svojstava uzorka, s obzirom da postoji mogućnost preciznog merenja na mikro i nanometarskoj skali [123]. Najčešće korišćena metoda za analizu podataka nanoindentacije je Oliver-Far (*Oliver-Pharr*) metoda [125]. Ova metoda prilagođena

je izotropnim elasto-plastičnim materijalima i omogućuje dobijanje rezultata modula elastičnosti i tvrdoće gleđi sa pretpostavkom da se radi o kvazi-anizotropnom, ne-viskoznom materijalu [126].

Činjenica je da postoje različiti metodološki pristupi analizi mehaničkih karakteristika i primeni metoda nanoindentacije [106]. Usled kompleksne strukture gleđi, kao i ispitivanja raznovrsnih mehaničkih osobina, Zang (*Zhang*) i sar. u svom preglednom radu zaključuju da ne postoje standardni protokoli ni tehnike merenja mehaničkih osobina [106]. Zbog toga postoji potreba da se klasifikuju pojedinačni protokoli u odnosu na primenjene eksperimentalne metode i metode nanoindentacije, kako bi se tačno odredili standardi istraživanja i tražene varijable, a dobijeni rezultati mogli adekvatno interpretirati i upoređivati.

Mnogi istraživači su istakli da priprema i način čuvanja uzoraka, kao i stepen hidriranosti uzorka do samog merenja mogu značajno uticati na mehaničke osobine gleđi, a rezultati modula elastičnosti i tvrdoće uzorka mogu da variraju od 10% do 17% [127], pri čemu, čuvanje uzoraka na vazduhu može značajno uticati na povećanje modula elastičnosti.

U dosadašnjim istraživanjima, modul elastičnosti analiziran je različitim metodama i zapaženo je da se mehanička svojstva gleđi razlikuju po dubini gledano od površine pa do gleđno-dentinske granice. Utvrđeno je da vrednosti za modul elastičnosti površinske strukture gleđi, mereni metodom nanoindentacije, variraju u opsegu od 40-130 GPa. Ovaj širok raspon nije nelogičan usled izražene osetljivosti metode na način pripreme uzorka i nepostojanja standardizovanog protokola testiranja. Takođe, mnogi faktori poput vrste primenjene sile, tipa indentera, zatim vrste zuba (mlečni, stalni), orijentacije prizmi, udela neorganske komponentne, odnosno stepena kalcifikacije i površine koja se tretira, imaju uticaj na dobijeni rezultat. Primena različite vrednosti Poasonovog koeficijenta takođe može biti uzrok varijacija rezultata. Nedvosmisleno je utvrđeno da gore navedeni eksterni faktori mogu značajno uticati na mehaničke karakteristike uzorka zuba, a nedostatak preciznog opisa izvođenja eksperimenta i pripreme uzorka mogu dati ogromne razlike u rezultatima [128,129].

Nanoindentacija je regulisana međunarodno prihvaćenim standardom ISO 14577 [129], kojim je definisan metod testiranja, kao i procedura verifikacije i kalibracije nanoindentera. Po navođenju Luke (*Lucca*) i sar., ovaj standard sadrži tri različita dela, gde je u okviru prvog dela definisan: nano-opseg, gde je maksimalna dubina indentacije manja od 200 nm; mikro-opseg, gde je maksimalna indentacija veća od 200 nm i maksimalna primenjena sila manja od 2 N; i

makro-opseg, gde je maksimalna primenjena sila testiranja između 2 N i 30 kN [130]. Evaluacija nanoindentacije zuba zahteva specifičan izbor protokola kao i odabir drugih parametara kao što su izbor veličine sile, maksimalne sile i dubine utiskivanja.

Kod merenja gde se primenjuje utiskivanje sa malim silama dolazi do izražaja tkz. efekat veličine utiskivanja (*indentation size effect*). Ovaj efekat podrazumeva da se tvrdoća uzorka povećava kako se veličina utiskivanja smanjuje, posledično ispitivani uzorak će biti veće tvrdoće na manjoj dubini utiskivanja [131]. Gleđ kao heterogeni materijal na kojem se vrši merenje ima različitu mikrostrukturu sloja i menja se u zavisnosti od primenjene sile. Izmerene vrednosti mogu da variraju u odnosu na dubinu utiskivanja, zato je potrebno ukalkulisati ovu pojavu i primeniti adekvatan model protokola indentacije. Prilikom određivanja tvrdoće uz pomoć Oliver-Far (*Oliver-Pharr*) metode, gde A označava kontakt površine sa vrhom indentera, u slučaju korišćenja Berkovič (*Berkovich*) utiskivača, ova kontaktna površina se računa na osnovu formule 5.1:

$$A = 3\sqrt{3}h_c^2 \tan^2 \alpha, \quad (5.1)$$

Ako se koristi prethodno navedena formula 5.1, gde postoji pretpostavka da je vrh utiskivača savršenog oblika, mogu se dobiti pogrešni rezultati, jer u stvarnosti proizvodnja vrha utiskivača savršenog geometrijskog oblika nije u potpunosti moguća. Ova devijacija je značajna naročito kod malih dubina utiskivanja ($h < 0.2 \mu\text{m}$), gde se koriste određene konstante u cilju korekcije rezultata, međutim greške u proračunu kontaktne površine i vrednosti tvrdoće mogu i dalje iznositi i do 10% [132].

U istraživanju disertacije korišćen je nano opseg analize uzoraka sa maksimalnom primenjenom silom od 10 mN. Za odabir veličine utiskivanja rađen je test odnosa primenjene sile i dubine utiskivanja, na uzorku gleđi debljine 1,5mm. Očekivane promene pod dejstvom kondicionera se dešavaju u opsegu od 3 - 10 μm od površine gleđi. Analizom rezultata istraživanja utvrđeno je da je maksimalna dubina indentacije primenom sile od 10 mN bila 4000 nm. Kod merenja mehaničkih osobina slojeva utiskivanjem, sila utiskivanja se određuje na način da dubina utiskivanja bude vrednosti najviše do 10% debljine ispitivanog sloja. Na ovaj način meri se tvrdoća gornjeg sloja bez uticaja mehaničkih osobina donjeg sloja, u suprotnom se mere zajedničke mehaničke osobine. U ispitivanjima stomatoloških materijala,

dubina indentacije manja od 1 μm dobija se korišćenjem sile u rasponu od 0,0001-5 g. U ovom radu definisana je maksimalna veličina sile od 10 mN, sa kojom se dobijaju tražene mehaničke karakteristike analiziranog sloja [133].

Prirodno svojstvo zubne površine je da ona nije u potpunosti ravna površina, takva karakteristika uzorka utiče na dobijene rezultate [134]. Odraž tačnosti rezultata su krive utiskivanja dobijene nanoindentacijom koje su oštre i kontinuirane. Prisustvo stepenica i prekida krive ukazuju na moguću grešku prilikom merenja. U tom slučaju došlo je do gubitka kontakta između vrha indentera i uzorka ili je vrh indentera naišao na pukotinu odnosno defekt na površini ispitivanog uzorka. Mesta indentacije se pažljivo biraju, da bi se takve greške svele na minimum. Pojava neobičnih kriva, ne reprezentuju tačne rezultate i kao takve se isključuju iz konačnih rezultata [135]. Procenat takvih kriva utiskivanja u toku istraživanja sprovedenog u disertaciji bio je 8%, što je približno procentu greške od 10%, koja se pojavljuje u drugim istraživanjima [43,136,137]. Heterogenosti krivih dobijenih u toku istraživanja posledica je anizotropne strukture gleđi i hrapavosti ispitivanih površina.

Na izmerene vrednosti mehaničkih karakteristika uzoraka ima uticaj hrapavosti ispitivane površine. Hrapavost površine određuje njene promene u kontaktu sa hemijskim agensom, drugom površinom, utiče na osetljivost površine, morfologiju, trošenje i podnošenje sile [138]. Svi primenjeni kondicioneri menjaju hrapavost uzoraka. U istraživanjima u kojima je vršeno ispitivanje tvrdoće različito tretiranih površina gleđi treba imati u vidu uticaj hrapavosti na merenje tvrdoće, međutim veza između tvrdoće i hrapavosti još nije uspostavljena. Nagrizanjem površine zuba sa različitim sredstvima vrši se i promena hrapavosti površine, s obzirom na to, pad tvrdoće nije vezan samo sa promenom hemijskog sastava u sloju već i može biti posledica velike hrapavosti. U toku nanoindentacije hrapavost ima direktan uticaj na veličinu stvarne kontakne površine između utiskivača i ispitivanog materijala [139].

Nakon nanoindentacije uzoraka, dalja evaluacija sprovedena je pomoću SEM-EDS uređaja, radi detaljne analize morfoloških promena na površini gleđi i promena mineralnog sastava pre i nakon primene kondicionera. U drugim istraživanjima najčešće upotrebljavane metode za procenu morfoloških promena površinske strukture gleđi su SEM-EDS i atomska mikroskopija (AFM) [129,140]. Iako obe metode (SEM i AFM), daju precizne podatke o morfološkim promenama površine, tokom same AFM analize ne postoji mogućnost dobijanja podataka o hemijskim promenama analiziranog uzorka, ali se dobijaju topografski snimci i

parametri hrapavosti površine, koje su glavne prednosti ove metode. Zbog mogućnosti dobijanja podataka o promeni mineralnog sastava uz analizu morfoloških promena, relativne jednostavnosti ispitivanja i dostupnosti institutima za istraživanje, analiza SEM-EDS-om je odabrana kao metod istraživanja u ovom radu. Postoje različite metode ispitivanja hemijskih elemenata: EDS, rendgenske spektroskopije (XPS - *X-ray Photoelectron Spectroscopy*), masene spektrometrije (SIMS-*Secondary Ion Mass Spectroscopy*), Ože analiza (AES - *Auger Electron Spectroscopy*) itd., međutim EDS metoda je najzastupljenija za ispitivanje hemijskog sastava bioloških tkiva, kao što su zubi i kosti [141,142]. Nedostaci EDS metode u pogledu mogućnosti detekcije određenih elemenata i tačnosti kvantitativnih rezultata se mogu prevazići ispitivanjem većeg broja uzoraka i primenom statističkih metoda obrade podataka, što je izvedeno u ovom radu.

Mogućnost primene velikog raspona uveličanja od 10x do 100.000x, pruža velike mogućnosti za razna posmatranja morfologije površine pomoću SEM. Pitanje, na kom uveličanju treba posmatrati i ocenjivati rezultate, još uvek nije u potpunosti usaglašeno između istraživača. Ispitivanjem na manjim uveličanjima sagledavaju se šire površine i njihova morfologija, gde se u isto vreme, jedno pored drugog mogu uočiti različiti tipovi nagrizanja gleđi. Veća uveličanja omogućuju uvid u mikrostrukturu i građu površinskog sloja gleđi, kao i preciznije procene nagriženih struktura i određivanja tipa kondicionirane površine gleđi prema klasifikaciji po Silverstonu (*Silverstone*) [143]. Na većim uvećanjima odabrana regija se može pogrešno protumačiti kao reprezentativna slika za celokupnu površinu uzorka. Različite studije koje su ispitivale efikasnost kondicioniranja gleđi, koristile su različita uvećanja za ocenu efikasnosti nagrizanja, posmatrane pomoću SEM-a. Na osnovu protokola iz literature, u ovoj studiji, vršeno je posmatranje pod četiri uvećanja: 100x, 200x, 500x i 1000x, da bi se rezultati drugih istraživanja mogli lakše porediti sa rezultatima iz ovog rada. Neujednačenost različitih istraživanja, može da oteža poređenje rezultata [144-146].

Postoji mogućnost za pristrasnost posmatrača prilikom odabira regije za posmatranje, kao i prilikom ocenjivanja i interpretacije dobijenih rezultata. Činjenica da subjektivna interpretacija može uticati na pravilno tumačenje dobijenih rezultata, govori u prilog tome da ova metoda ima i nedostataka [147]. U toku ovog rada da bi se isključila pristrasnost, SEM analiza rađena je od strane dva istraživača, takođe tokom evaluacije, ocenjivanje je bilo „slepo”, odnosno istraživačima nije bila poznata grupna pripadnost ispitivanog uzorka.

7.2. Diskusija rezultata

Dobijeni rezultati morfoloških karakteristika gleđi stalnih i mlečnih zuba nakon nagrizanja ortofosfornom kiselinom u ovom istraživanju su slični prethodno opisanim od strane Silverstona (*Silverstone*) i Retifa (*Retief*) [63,84]. Morfološki SEM snimci površinske strukture gleđi tretirane ortofosfornom kiselinom na uvećanjima x100, x200, imaju površinu koja izgleda kao da je prekrivena snegom, dok na većim uvećanjima x500, x1000, uočava se tipičan izgled koji podseća na pčeline saće. Dominantni tip nagrizanja u grupi uzoraka nakon tretmana ortofosfornom kiselinom bio je tip 1, gde je dominantno uklonjena srž prizme, međutim površina nagrizanja, odnosno demineralizacija srži prizme i interprizmatičnog polja nije bila uniformna. Određena polja ukazuju i na postojanje aprizmatičnih polja tipa 5, što može da se objasni time da su deo uzoraka stalnih zuba činili premolari ekstrahovani iz ortodontskih razloga, kod kojih je utvrđeno često prisustvo aprizmatičnih polja, što može rezultovati češćom pojavom polja nagrizanja tipa 4 i tipa 5 [21]. Poređenjem uzoraka stalnih i mlečnih zuba, prethodno tretiranih ortofosfornom kiselinom, nalazi se slična učestalost pojave polja tipa 1 i tipa 2 u grupi mlečnih zuba. Neznatna razlika u tipu nagrizanja među vrstama zuba može da se objasni slabijim delovanjem kondicionera na manje mineralizovanu, aprizmatičnu površinu mlečnih zuba. Zbog takve strukture mlečnih zuba, moguć je slabiji efekat kondicionera i češća pojava nenagriženih polja. Analize mlečnih zuba pomoću SEM su nedovoljno istražena, moguće delom zbog težine skupljanja većeg broja uzoraka zdravih mlečnih zuba, a delom jer je manji fokus na ispitivanju adhezije sa gleđi mlečnih zuba. Mogući razlog toga je da su mlečni zubi prisutni kraći period u usnoj duplji, dok stalni zubi ostaju 7-8x duže [36,148]. U odnosu na stranu zuba u grupi stalnih i mlečnih zuba tretiranih ortofosfornom kiselinom analizom SEM mikrofotografija, ne uočavaju se različitosti u morfologiji nagrizanja bukalne i lingvalne strane zuba, međutim postoji statistički značajna razlika u pojavi polja nagrizanja tipa 1 kada se tretira okluzalna strana stalnih zuba. Veća procentualna zastupljenost ovog tipa nagrizanja kod uzoraka okluzalne strane može biti posledica veće prizmatičnosti i većeg udela neorganske komponente ove površine u odnosu na lingvalnu, odnosno bukalnu stranu, gde se ostrva aprizmatične gleđi češće uočavaju. Specifičnost okluzalne strane zuba je kvržično-grebenski i fisurni kompleks, koja nije prisutna na lingvalnoj odnosno bukalnoj strani zuba. Takva

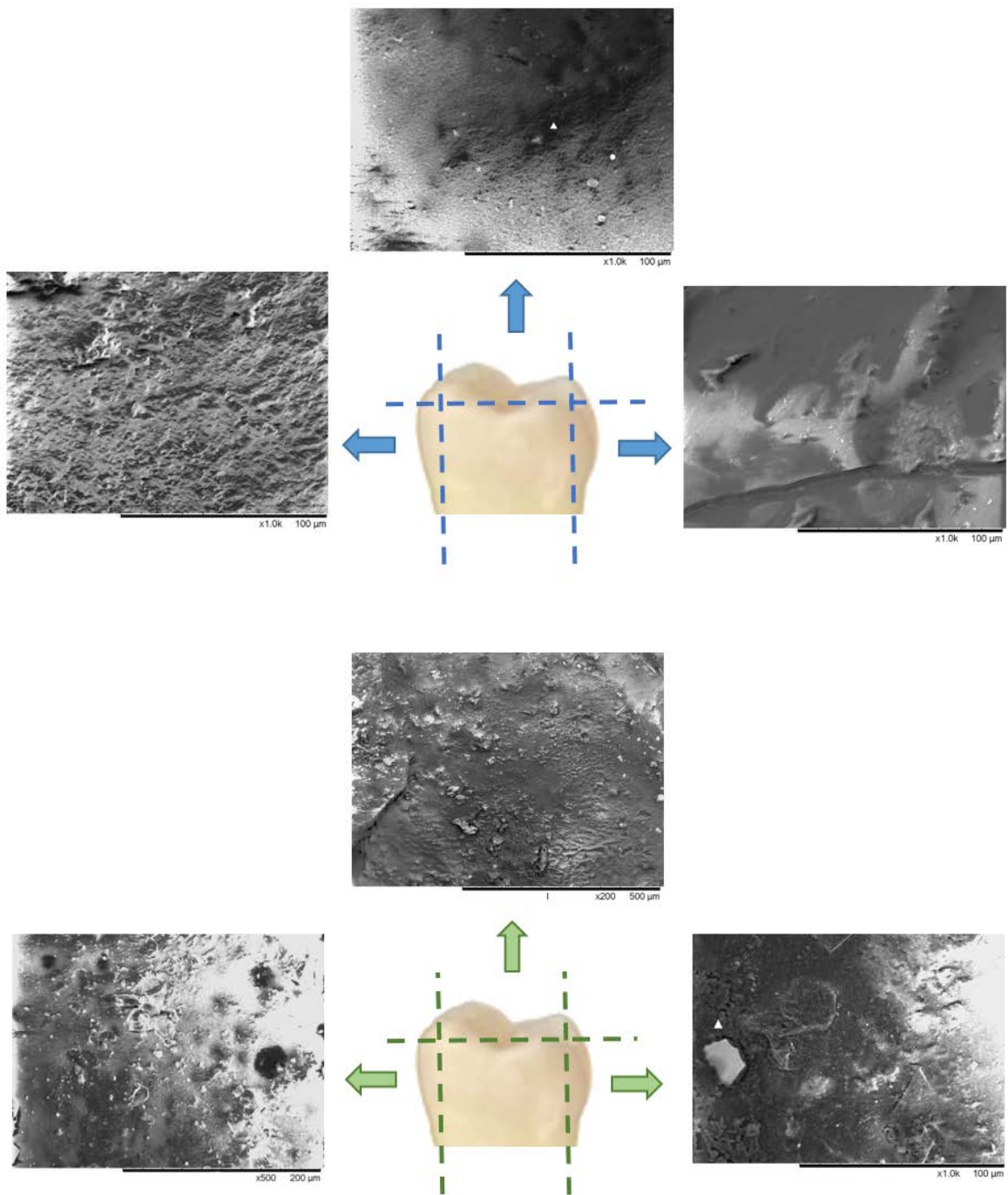
morfologija okluzalne strane može biti uzrok zarobljavanja odnosno većeg zadržavanja sloja kondicionera na tretiranoj površini i posleđično agresivnijeg nagrizanja.

Površina gleđi nakon tretmana poliakrilnom kiselinom i samonagrizajućim adhezivima se razlikuje u odnosu na SEM nalaze nakon kondicioniranja ortofosfornom kiselinom. Postoji jasna razlika već na manjim uveličanjima od x100, x200 u morfologiji uzoraka tretiranih ortofosfornom, poliakrilnom kiselinom i samonagrizajućim adhezivima.

Kod uzoraka gde je primenjena poliakrilna kiselina uočava se matirana, blago nagrižena površina, mestimično vrlo slična netretiranoj površini gleđi. Uočene mikropukotine i brazde na SEM mikrofotografijama su najverovatnije nastala tokom normalnog trošenja gleđi tokom četkanja i profilaktičkog poliranja. Brazde se češće i jasnije uočavaju na površini gleđi tretiranih poliakrilnom kiselinom, nego na površinama tretiranih ortofosfornom kiselinom. Ovakav izgled rezultat je manje agresivnosti poliakrilne kiseline na gleđ, što je odraz efekta hemijskog sastava kondicionera [149]. Smit (*Smith*) i sar. opisuju da nakon dejstva poliakrilne kiseline na površini gleđi ostaju sulfatni joni koji stvaraju beličasti kristalni depozit kalcijum sulfata, koji daje matiranu površinu kondicioniranog polja. Na istim uzorcima na većim uvećanjima x500, x1000 mogu se naći polja nagrizanja tipa 1 i tipa 2 koja su prisutna kod uzoraka tretiranih ortofosfornom kiselinom opisanim od strane Silverstona (*Silverstone*). Rezultati nakon nagrizanja poliakrilnom kiselinom, ukazuju na to da ne dolazi do značajnih morfoloških promena nakon tretmana, što korespondira sa rezultatima drugih istraživanja [150]. Poređenjem vrste zuba tretiranih ovom kiselinom, kod mlečnih zuba je veća učestalost pojave tipa 1, a kod stalnih zuba su češća polja tipa 2, dok su ostali tipovi polja nagrizanja približno zastupljeni u obe grupe. Strukturu mlečnih zuba karakteriše veći udeo interprizmatičnog prostora u odnosu na strukturu stalnih zuba, posleđično i veća poroznost, što je jedan od faktora stepena demineralizacije dejstvom kondicionera. Veći stepen poroznosti, uzrokovana je većom frakcijom interprizmatičnog polja, što povećava propustljivost kiselina. Veći koeficijent difuzije kiselina utiče na veću zastupljenost nagrizanja centra srži gleđnih prizmi [151,152]. U odnosu na posmatrane površine u grupi okluzalne strane mlečnih zuba je značajna razlika u zastupljenosti polja nagrizanja tipa 1, u odnosu na bukalnu i lingvalnu stranu iste grupe i u odnosu na sve posmatrane površine iz grupe stalnih zuba. Selektivna demineralizacija posledica je različite prizmatičnosti, odnosno razlike u angulaciji prizama uzrokuje različit potencijal demineralizacije istog kondicionera na različitim mikroregijama

površine. Iako izostaje značajna morfološka promena površine gleđi nakon tretmana poliakrilnom kiselinom, dobra adhezivna veza bazira se na hemijskoj vezi između tretirane površine i restauracija, a u manjem delu na morfološkoj promeni, pojavi mikrošupljina i ostvarivanju mehaničke veze po mehanizmu ključa i brave [150].

Kod uzoraka tretiranih samoadhezivnim sistemima u okviru ove disertacije, uočavaju se udubljenja, ogrebotine, kristali gleđi i smola koja prekriva površinu gleđi. Mestimično se uočavaju polja blage demineralizacije do polja demineralizacije koje su slične nagrivanju sa ortofosfornom kiselinom. Ovakva razlika i učestalost pojave različitih tipova nagrivanja tokom korišćenja istog kondicionera, moguća je usled neujednačene prizmatičnosti gleđi. Analizom tipa nagrivanja, vrlo slične zastupljenosti tipa nagrivanja se uočavaju kod korišćenja G bonda i Transbonda. Ovakav rezultat se objašnjava sličnom hemijskom sastavu oba kondicionera koji pripadaju jednokomponentnim samonagrivačim sistemima sa prajmerom. Poređenjem vrste zuba i strana zuba tretiranih G bondom, uočava se da kondicioner tipično menja morfološki izgled tretirane površine (Slika 7-1). G bondom tretirane površine na SEM mikrofotografijama pokazuju nakupine smole na površini kondicionirane gleđi, pri čemu nema morfoloških značajnih razlika između vrste zuba i analiziranih površina.



Slika 7-1. Poređenje SEM mikrofotografija površina tretiranih Gbondom u odnosu na vrstu (gore: stalni, dole: mlečni zubi) i površinu zuba (levo: bukalna, gore: okluzalna, desno: lingvalna strana).

U poređenju tretiranih površina G bondom i onih tretiranih Transbondom uočava se gušći sloj smole na površini gleđi nakon efekta Transbonda. Penetracija smole u poroznu površinu gleđi, stvara novu strukturu koja je delom gleđ, delom smola koja se naziva hibridnim slojem, što ukazuje da različiti kondicioneri produkuju različitu i sebi svojstvenu morfologiju nagrizenih gleđi [74]. Tanki hibridni sloj smole koji se nalazi u površinskom sloju nagrizenih gleđi može biti uzrok slabije adhezivne veze i upitnog uticaja na površinu gleđi [117]. Jačina adhezivne veze je u određenim slučajevima slična jačini veze postignutoj nakon kondicioniranja gleđi sa ortofosfornom kiselinom, bez obzira na razlike u morfološkim tipovima nagrizenja [79,153-156]. Međutim kontroverze o efikasnosti nagrizenja i dalje postoje, s obzirom da druge studije ne pokazuju istu jačinu adhezivne veze [157-159].

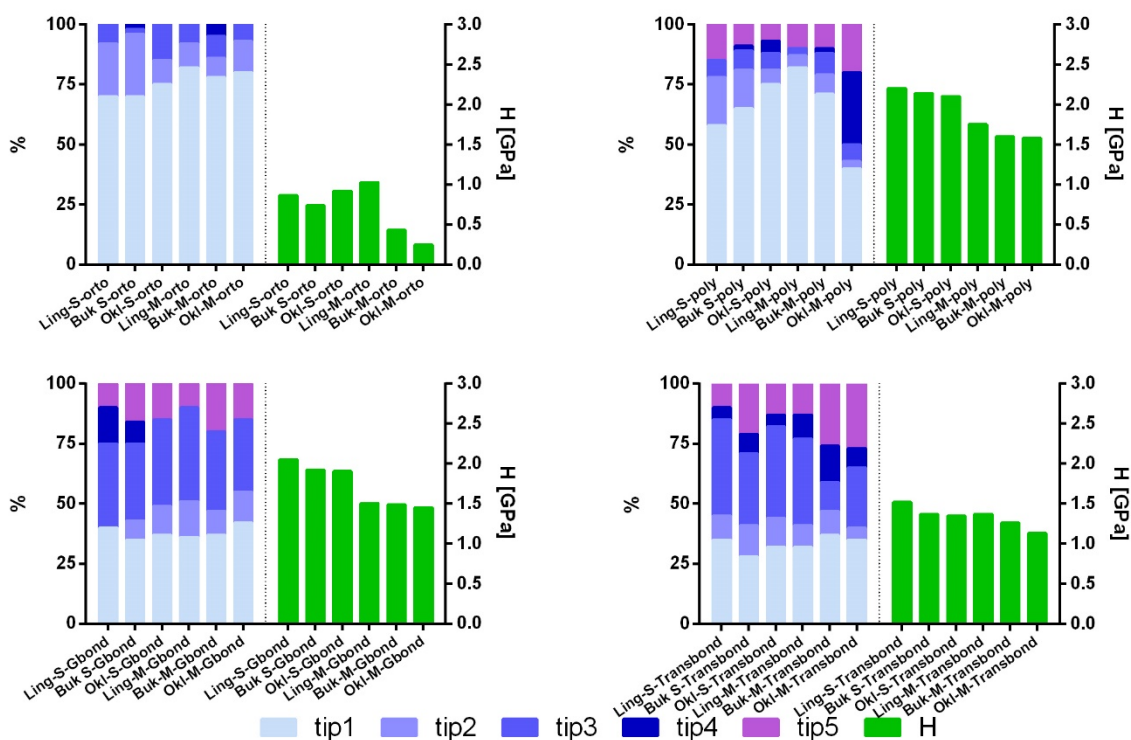
Istraživanja su pokazala da samonagrizajući adhezivni sistemi ne nagrizeju gleđ u meri kao što se to dešava prilikom primene ortofosforne kiseline i da je prisutan veći udeo polja nagrizenja tipa 4 i tipa 5, što korespondira sa dobijenim rezultatima istraživanja sprovedenog u disertaciji [137]. Pešli (*Pashley*) i Tej (*Tay*) nalaze da efikasnost samonagrizujućih prajmera na intaktnu gleđ ne zavisi isključivo od agresivnosti nagrizenja, već i od količine monomera u sastavu materijala. Oni ukazuju na mogućnost da velika količina preostalih nepolimerizovanih monomera koji ostaju nakon prosvetljavanja mogu biti uzrok slabije adhezivne veze sa gleđi [160]. Međutim, drugi autori ne potvrđuju korelaciju agresivnosti samonagrizujućih adheziva, tipa nagrizenja i jačine adhezivne veze [80,161]. Perdigao je u svom istraživanju zaključio da ne postoji korelacija jačine adhezivne veze sa tipom nagrizenja nakon kondicioniranja gleđi samonagrizujućim sistemima [162]. Utvrđene su razlike u tipu nagrizenja, odnosno morfologiji uzoraka nakon nagrizenja ortofosfornom kiselinom i samonagrizujućim adhezivima u istraživanju Verasinj (*Weerasinghe*) i sar. kojima korespondiraju rezultati istraživanja ovog rada. Nakon primene ortofosforne kiseline, na površini uzoraka se ne pojavljuju smolasti produžeci, što je osnovna razlika u morfološkom izgledu uzoraka tretiranih sa samonagrizujućim adhezivima. Verasinj (*Weerasinghe*) i sar. dalje analiziraju SEM mikrofotografije površine tretirane ortofosfornom kiselinom, uz dodatno primenjeni prajmer i bond, gde utvrđuju sličnost sa izgledom SEM mikrofotografija uzoraka tretiranih samonagrizujućim adhezivima. Ista grupa istraživača ukazuje i na morfološke razlike, odnosno da snopovi smole dublje penetriraju u gleđ prethodno tretiranu ortofosfornom kiselinom i to oko 3,5 mikrona, dok se nakon primene samonagrizujućih kondicionera uočava tanji sloj smole

debljine oko 1 mikrona [163]. Ovakav nalaz ukazuje na manje agresivno dejstvo samonagrizajućih adheziva u odnosu na ortofosfornu kiselinu, što je utvrđeno i u istraživanju ove disertacije.

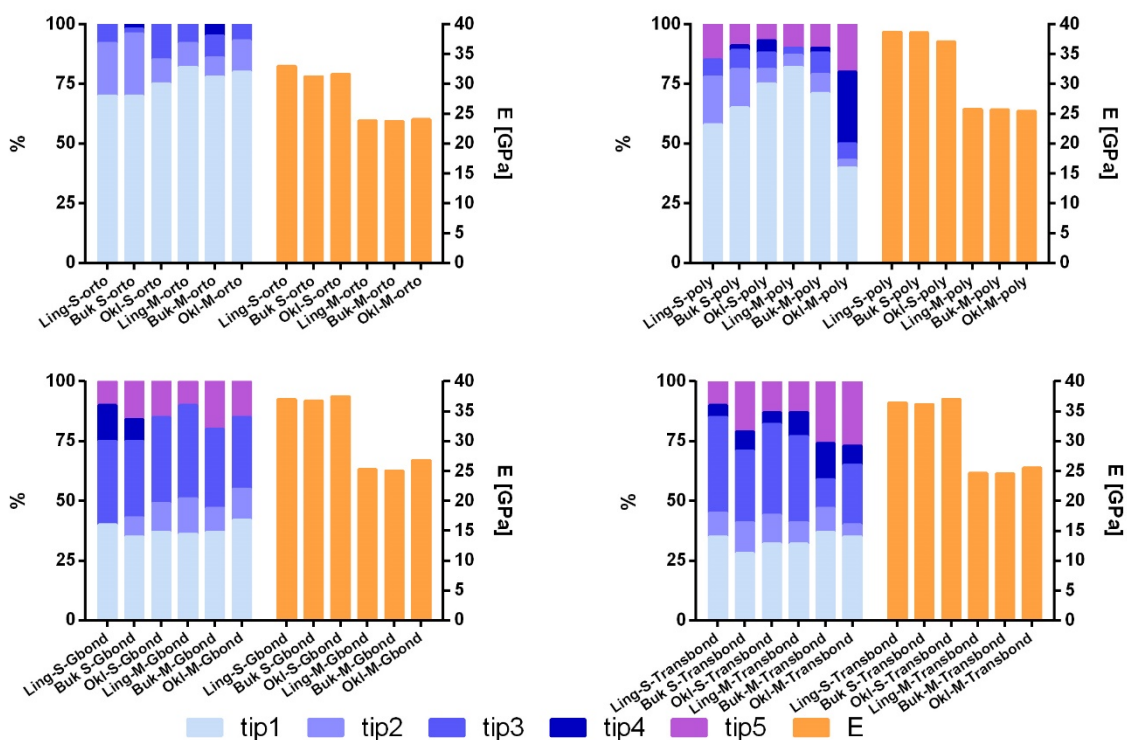
Dejstvom kondicionera pored morfologije, menjaju se hemijski sastav, hrapavost i mehaničke karakteristike površine gleđi.

Korelacija morfoloških promena po tipu nagrizanja i promena vrednosti tvrdoće i modula elastičnosti gleđi mlečnih i stalnih zuba prikazana je na grafikonu 7-1 i 7-2.

Grafikon 7-1. Korelacija zastupljenosti tipa nagrizanja po Silverstonu i tvrdoće gleđi stalnih i mlečnih zuba nakon primene različitih vrsta kondicionera.



Grafikon 7-2. Korelacija zastupljenosti tipa nagrizanja po Silverstonu i modula elastičnosti



Analiza vrednosti tvrdoće, modula elastičnosti i zastupljenosti tipa nagrizanja, govori u prilog tome da manje agresivno nagrizanje utiče na manje smanjenje vrednosti tvrdoće i u grupi mlečnih i stalnih zuba. Utvrđeno je da je modul elastičnosti niži kod svih tretiranih uzoraka u odnosu na rezultate modula elastičnosti netretirane gleđi kako u grupi stalnih i tako i u grupi mlečnih zuba. Analizom rezultata uočava se da što je veća zastupljenost polja tipa 1 i tipa 2, vrednost modula elastičnosti ispitivanih površina u grupi stalnih zuba je manja, dok u grupi mlečnih zuba ne uočava se veza između tipa nagrizanja i modula elastičnosti. U ovom istraživanju poređenjem različitih kondicionera utvrđeno je da poliakrilna kiselina najmanje, zatim samonagrizajući kondicioneri (G bond i Transbond), dok ortofosforna kiselina najviše utiče na morfološke i mehaničke promene nakon tretmana. Ovakav rezultat može da se objasni razlikama u agresivnosti nagrizanja kondicionera. U zavisnosti od pH vrednosti odnosno od konstante disocijacije kiselina, adhezivni sistemi se po agresivnosti nagrizanja klasifikuju na : „jake“ ($\text{pH} < 1$), „srednje jake“ ($\text{pH} \approx 1,5$), „blage“ ($\text{pH} \approx 2$) i „veoma blage“ ($\text{pH} \geq 2,5$) adhezivne sisteme [164]. Što je agresivniji sistem, dublja je demineralizacija. G bond koji je korišćen u ovom istraživanju je jednokomponentni sistem koji je na bazi acetona, čija je pH vrednost 2,4.

G bond ima najveću pH vrednost u odnosu na druge korišćene kondicionere, koji su kiselij (37% ortofosforna kiselina: pH=1,10% poliakrilna kiselina: pH=1,9, Transbond: pH=1,5). Iako su pH vrednosti približne, SEM mikrofotografije pokazuju da svaki od testiranih kondicionera ima specifični tip nagrizanja. Jedna grupa autora smatra da su samonagrizajući sistemi zadovoljavajuća alternativa kondicioniranju gleđi ortofosfornom kiselinom, uprkos morfološkim razlikama u tipu nagrizanja i promeni hemijske strukture tretirane površine [165].

Protokol nagrizanja gleđi ortofosfornom kiselinom od 30 sekundi je korišćen u okviru ove disertacije, a dobijeni rezultati tvrdoće na uzorcima stalnih i mlečnih zuba korespondiraju sa rezultatima Zafar i sar., za isti vremenski interval nagrizanja gleđi. U svom istraživanju ispitivali su, promene modula elastičnosti i tvrdoće gleđi nakon primene ortofosforne kiseline u različitim vremenskim intervalima, primenom maksimalne sile utiskivanja od 4mN. Dobijeni rezultati ukazuju da se tvrdoća gleđi nakon kondicioniranja od 15 sekundi smanjuje sa 4,5 GPa na 2,2 GPa, nakon 30 sekundi smanjuje se na 1,4 GPa, a nakon 60 sekundi ispod 1 GPa [166]. Zafar i sar. na istim uzorcima, određuju vrednost modula elastičnosti od 40-60 Gpa što je veća vrednost u odnosu na vrednosti modula elastičnosti (31,6-32,97±1,5 GPa) dobijenim u istraživanju u okviru disertacije. Ove razlike moguće je objasniti primenom različite sile utiskivanja u protokolu poređenih istraživanja, gde su Zafar i sar. koristili 4mN, dok je maksimalna primenjena sila u istraživanju disertacije bila veća i iznosila je 10 mN. U istraživanju grupe autora Rominu i sar., nakon tretmana gleđi stalnih zuba ortofosfornom kiselinom, utvrđeno je da dolazi do smanjenja nivoa Ca i P, a dolazi do povećanja nivoa O što u potpunosti korespondira sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju [167]. U analizi hemijskog sastava gleđi mlečnih zuba, Alcantara (*Alcantara*) i sar., nalaze da nakon tretmana ortofosfornom kiselinom dolazi do smanjenja masenog udela Ca i P, porasta udela O, dok se vrednost odnosa Ca/P nakon tretmana gleđi ne menja, što korespondira sa rezultatima istraživanja sprovedenog u disertaciji [150]. Nepromenjen odnos Ca/P ukazuje na ujednačen odnos gubitka minerala, čiji značaj u literaturi nije utvrđen. Vrednost odnosa Ca/P ostaje konstantna nakon primene ortofosforne kiseline, bez obzira na efekat kondicionera, stepen demineralizacije, vrstu i površinu zuba, što je takođe utvrđeno u nekoliko istraživanja [168,169].

Analizom rezultata mineralnog udela Ca i tvrdoće nađena je pozitivna korelacija u istraživanju disertacije, što korespondira sa rezultatima drugih autora [150]. Površine sa većom

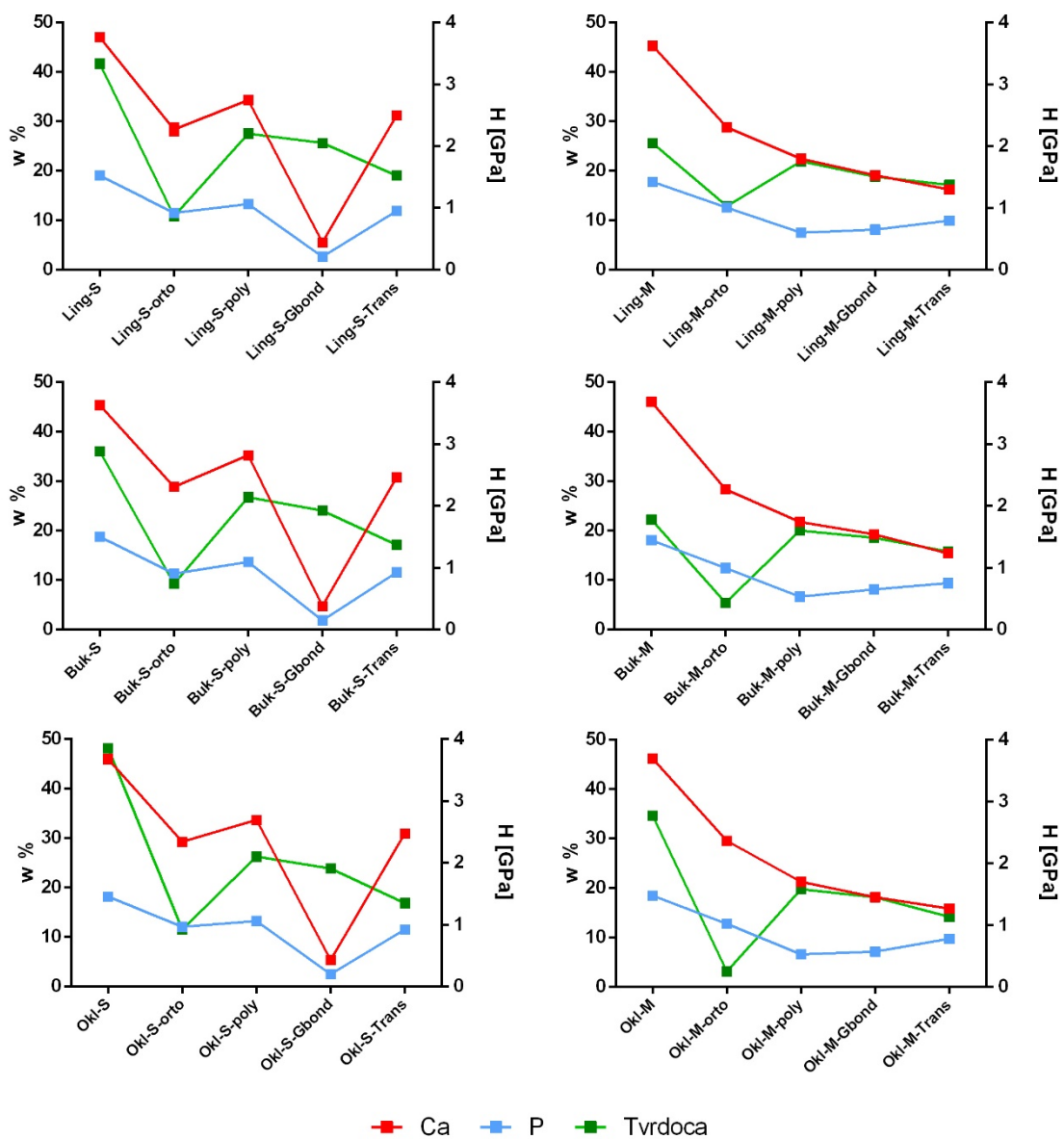
koncentracijom Ca i P su pokazala veće vrednosti tvrdoće. Manje vrednosti tvrdoće povezane su sa smanjenim udelom Ca i P. Ovakav nalaz je utvrđen i od strane drugih autora [170,171].

U okviru istraživanja disertacije, uočeno je povećanje masenog udela C, kod svih tretiranih površina i mlečnih i stalnih zuba, što ukazuje na demineralizaciju površine gleđi i manje stabilnu kristalnu rešetku hidriksiapatita. Povećana rastvorljivost takve kristalne strukture u korelaciji je sa smanjenjem tvrdoće i modula elastičnosti gleđi. Ovi rezultati korespondiraju sa rezultatima istraživanja Ksu (*Xu*) i sar. i sa rezultatima istraživanja Pan i sar. [172,173].

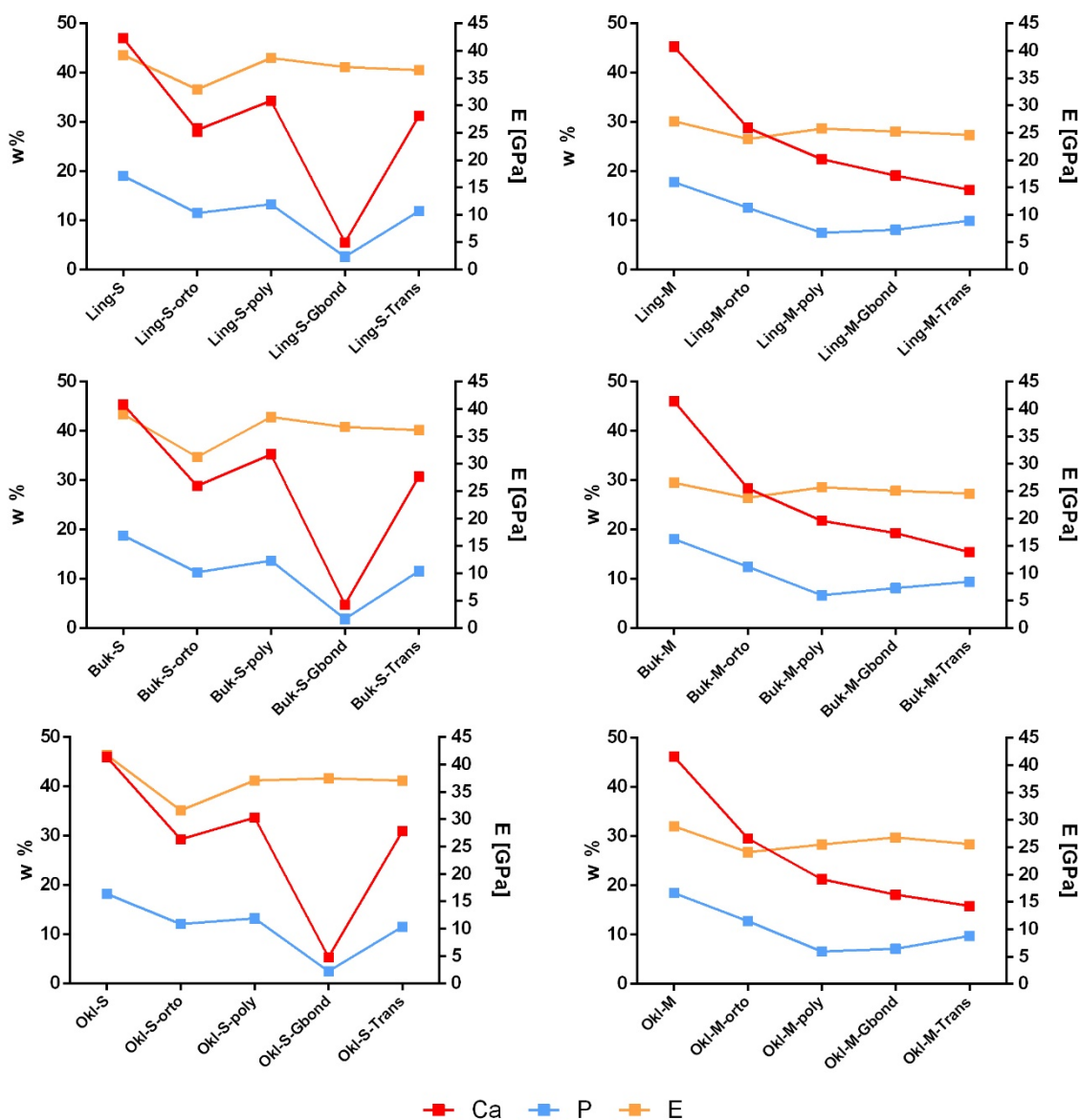
U istraživanju disertacije, dejstvom poliakrilne kiseline dolazi do očekivanog smanjenja udela Ca, P, a porasta O i C, što je indikator nastalog procesa demineralizacije. Poliakrilna kiselina kao "blagi" kondicioner za pripremu površine za GJC restauracije, površinu gleđi čini hrapavom, stvara intermedijerni sloj na površini supstrata, koji potpomaže razmeni jona i postizanju hemijske veze između GJC matriksa i oslobođenih Ca i P u hibridnom sloju tretirane površine. Istraživanja Smita (*Smith*) i sar. opisuju reakciju oslobođenih jona Ca sa površine zuba u sloj poliakrilne kiseline, gde ti joni sa sulfatnim jonima grade kristalni depozit dihidrat kalcijum sulfata [149]. Srednja vrednost modula elastičnosti gleđi stalnih zuba nakon tretmana poliakrilnom kiselinom iznosio je 37 ± 2 GPa u slučaju okluzalne strane, $38,5 \pm 1,5$ GPa bukalne, a $38,6 \pm 2,9$ GPa u slučaju tretmana lingvalne strane. Poređenjem promena modula elastičnosti tretiranih površina, dobijaju se vrednosti statistički značajno manje u odnosu na kontrolnu grupu, a statistički značajne razlike ne nalaze se između različitih površina nakon tretmana. Primenom poliakrilne kiseline značajno se smanjuje vrednost tvrdoće gleđi stalnih zuba u odnosu na netretiranu gleđ. U odnosu na posmatrane površine ne postoje razlike u izmerenim vrednostima, s obzirom da vrednosti tvrdoće u grupi okluzalne i bukalne strane iznose 2,1 GPa, dok je prosečna vrednost u grupi lingvalne strane 2,2 GPa. Isti trend smanjenja tvrdoće je uočena kod svih posmatranih grupa, u grupi mlečnih zuba. Korelacija hemijskog sastava površine sa izmerenim vrednostima mehaničkih karakteristika ukazuje na vezu između tih svojstava, što je prikazano na grafikonu 7-3 i 7-4. U korelaciji promene masenog udela minerala Ca, P i vrednosti tvrdoće poliakrilnom kiselinom tretiranih površina gleđi stalnih zuba uočava se, da se za procentualni pad minerala dolazi do procentualno dvostrukog smanjenja tvrdoće istih površina u odnosu na kontrolnu grupu. U grupi mlečnih zuba nakon tretmana poliakrilnom kiselinom, smanjenjem mineralnog udela uočava se sličan trend smanjenja

tvrdooe površina bukalne i ligvalne strane. U grupi uzoraka okluzalne strane uočeno je veće smanjenje tvrdooe za isti obim gubitka minerala. Ovakav nalaz moguć je usled veće prizmatičnosti gleđi na ovoj strani zuba, koja kao takva, izloženija je jačem dejstvu kiselinskog agensa.

Grafikon 7-3. Korelacija masenog udela Ca i P u površini gleđi stalnih i mlečnih zuba i tvrdooe nakon primene različitih vrsta kondicionera.



Grafikon 7-4. Korelacija masenog udela Ca i P u površini gleđi stalnih i mlečnih zuba i modula elastičnosti nakon primene različitih vrsta kondicionera.



Studije koje su proučavale uticaj samonagrizajućih adheziva, pokazuju različite rezultate o njihovoj efikasnosti, zato što se na površini gleđi, mogu primetiti područja, koja nisu u potpunosti demineralizovana i postoje potpuno nenajetkane zone [150]. Prilikom korišćenja kondicionera, površina uzorka predstavlja promenjeni sloj strukture gleđi, a u slučaju primene samonagrizajućih adheziva (G bonda i Transbonda), može doći do istiskivanja

delu smolastog materijala prilikom indentacije. U slučaju pojave plastične deformacije uzorka tokom utiskivanja, deo materijala je istisnut na gore uz indenter. U ovom slučaju kontaktna površina tokom indentacije deluje kao da je veća od stvarne. Posledica ove pojave je merenje veće vrednosti tvrdoće uzorka nego što je ona u stvarnosti [174].

Analizom rezultata uočava se da su mehaničke karakteristike gleđi i hemijske promene strukture površine međusobno zavisne. Najčešće korišćeni markeri u EDS analizama su Ca, P, C, O. Površina gleđi u usnoj duplji je neprekidno izložena hemijskim i strukturalnim modifikacijama usled cikličnog smenjivanja procesa demineralizacije i remineralizacije. Usled kontinuirane razmene jona sa oralnom sredinom, očekivano je da gleđ različitih idividua, različito reaguje na tretman kondicionerima, u zavisnosti od starosti, kvaliteta pljuvačke i ishrane. Klinička relevantnost hroničnog uticaja ovih faktora nije još utvrđena u istraživanjima [175].

Alcantara (*Alcantara*) i sar., ispitivali su efekat Transbonda kao predstavnika grupe samonagrizajućih adheziva i utvrdili su povećanje vrednosti P i Ca u analiziranom sloju nakon tretmana ovim kondicionerom, međutim razlika nije bila statistički značajna u odnosu na vrednosti dobijene u kontrolnoj grupi [150]. Ova pojava može da se objasni činjenicom da se kod primene Transbonda kiseli prajmer ne ispire, pri čemu joni kalcijuma i fosfora oslobođeni rastvaranjem kristala hidroksiapatita ostaju delom suspendovani u sloju prajmera [176]. Ovakvi rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima prezentovanog istraživanja, gde se nakon tretmana Transbondom umesto neznatnog povećanja, uočava blago smanjenje masenog udela kalcijuma i fosfora, koje takođe nije bilo statistički značajno. Neslaganje rezultata moguć je zbog različite pripreme uzorka, gde se za pripremu gleđi koristila abrazivna pasta za čišćenje površine, dok u protokolu istraživanja u okviru disertacije nije vršena obrada uzorka pre primene kondicionera.

Karakterizacije hemijske strukture gleđi stalnih i mlečnih zuba poliakrilnom kiselinom i G bondom nisu navedena u literaturi.

Alcantara (*Alcantara*) i sar. ispitivali su i efekat samonagrizajućeg adheziva (Adper Prompt, 3M, ESPE, St. Paul, MN, USA), gde utvrđuju smanjene vrednosti masenog udela Ca i P, nepromenjen odnos Ca i P, a porast masenog udela O. Međutim u svom istraživanju ne nalaze statističke značajne razlike između navedenih rezultata i kontrolne grupe. U okviru ovog istraživanja disertacije iz grupe samonagrizajućih adheziva ispitan je efekat G bonda i

Transbonda. Rezultati dobijeni za navedene adhezive korespondiraju sa rezultatima istraživača Alcantara (*Alcantara*) i sar. u smislu statistički značajnog smanjenja vrednosti Ca, P i povećanja O, međutim ne i za vrednost odnosa Ca/P, koji ostaje nepromenjen [150]. Poređeni kondicioneri Adper Promt, G bond i Transbond, iako pripadaju grupi samonagrizajućih adheziva su različitog hemijskog sastava što je mogući razlog opisanih razlika u vrednostima hemijskog sastava nakon njihove primene.

U istraživanju sprovedenog u ovoj disertaciji, analizom rezultata mehaničkih karakteristika gleđi mlečnih i stalnih zuba, primećuje se da dobijeni rezultati u potpunosti korespondiraju sa navodima iz literature kada je u pitanju tvrdoća gleđi, a da je modul elastičnosti niži u odnosu na većinu objavljenih studija [106]. Zbog pojave nižih vrednosti modula elastičnosti u kontrolnim grupama i u grupama tretiranim kondicionerima, postoji potreba da se ukaže na sve potencijalne razloge dobijanja ovakvih rezultata. Varijacije u vrednostima javljaju se usled različite pripreme uzorka, različitog protokola merenja, nedostataka i moguće greške metode i kao najznačajnija varijabila anizotropna struktura gleđi usled različite prizmatičnosti i razlika u orijentaciji prizmi u sloju.

Prilikom merenja vrednost modula elastičnosti varira u zavisnosti od smera sile u odnosu na osovinu pružanja gleđnih prizmi. Viša vrednost E nastaje kada je sila primenjena paralelno orijentaciji prizmi jer će se odstupanju najviše odupirati poravnati kristali unutar strukture, dok će u vertikalnim i kosim smerovima na pomicanje više uticati manje kruto organsko tkivo koje okružuje kristale što rezultira nižim vrednostima modulima elastičnosti [177,178]. Ge i saradnici su objavili slične rezultate kakvi su dobijeni i u ovoj disertaciji, gde su se pomenuti autori upravo bavili varijacijama mehaničkih svojstava samih prizmi i interprizmatičnih prostora i zaključili da i u strogo kontrolisanim uslovima ove varijacije mogu dostići i do 74% [10]. S obzirom da je tema istraživanja sprovedenog u ovoj disertaciji upravo bila intaktna površina gleđi, nepravilne prizmatičnosti, očekivano je da su u izmerenim vrednostima tvrdoće obuhvaćene vrednosti kako sa površine prizme, tako i interprizmatičnih prostora.

Habelic (*Habelitz*) i sar. nalaze da gleđne prizme i interprizmatična polja imaju sličan modul elastičnosti i tvrdoću, gde modul elastičnosti prizme iznosi $88,0 \pm 8,6$ GPa, a u zoni interprizmatičnog polja vrednost je $86,4 \pm 11,7$ GPa, a takođe je dobijena slična vrednost tvrdoće u zoni prizmi ($4,3 \pm 0,4$ GPa), i u interprizmatičnom polju ($3,9 \pm 0,4$ GPa). Ovo je suprotno

rezultatima Gea i sar. (*Ge et al.*) i rezultatima dobijenim u toku ovog istraživanja, gde je i do 2-3 puta veća razlika u modulu elastičnosti [10]. Velike varijacije među objavljenim rezultatima mogu se pripisati individualnim razlikama u lokalnoj mikro- i hemijskoj strukturi gleđi. Mehanička svojstva gleđi takođe zavise od mesta na zubu i od ispitivanog sloja. U istraživanju Anker (*Angker*) i sar. nalaze da su u zonama gde je pravac pružanja gleđnih prizmi paralelan vrednosti tvrdoće i modula elastičnosti $3,9 \pm 0,3$ GPa, odnosno $87,5 \pm 2,2$ GPa, dok su u zonama koje su vertikalne ove vrednosti $3,3 \pm 0,3$ GPa i $72,2 \pm 4,5$ GPa [107].

U istraživanju Gea (*Ge*) i sar., odvojeno su analizirana mehanička svojstva gleđne prizme i interprizmatičnog prostora, gde je rezultat tvrdoće gleđi u regiji prizmi iznosio $4,3 \pm 0,8$ GPa, dok je modul elastičnosti iznosio $83,4 \pm 7,1$ GPa prilikom primene sile od 1 mN. S druge strane, prilikom primene sile od 0,3 mN tvrdoća određena u interprizmatičnom prostoru iznosila $1,1 \pm 0,3$ GPa, dok je modul elastičnosti bio $39,5 \pm 4,1$ GPa. Ovi rezultati su vrlo slični rezultatima prezentovanog istraživanja, gde se modul elastičnosti stalnih zuba bez tretmana gleđi kretao u rasponu od $39,25 - 41,7 \pm 1,5$ GPa, a tvrdoća od $2,88 - 3,85 \pm 0,7$ GPa.

U prethodnim istraživanjima strukture gleđi, utvrđeno je da je količina organske komponente u vidu proteinskih fragmenata u interprizmatičnom prostoru mnogo veća i da sadrži manje neorganskih kristala, nego u samim prizmama. Ovo može biti ključni razlog znatnog smanjenja tvrdoće i modula elastičnosti u slučajevima kada mesto nanoindentacije obuhvata upravo ova polja [179]. Mehanička svojstva koja su određena na nivou interprizmatičnog polja, predstavljaju zajednička svojstva kako organskih tako i mineralnih komponenti, s obzirom da mineralizovani fibrili gleđi prožimaju i interprizmatična polja, a ovakva jedinstvena struktura gleđi je odraz principa mineralizacije gleđi prilikom razvoja [180]. Kuj (*Cuy*) i sar. varijacije između rezultata dobijenih za tvrdoću i modul elastičnosti pripisuju strukturnim specifičnostima hidroksiapatitnih kristala i sadržaju soli kalcijuma i fosfata, čija količina zavisi od lokacije merenja, dok Jang (*Jiang*) i sar. ovaj nalaz objašnjavaju gustinom i položajem gleđnih prizmi, odnosno prisustvom različite količine vode u gleđi [14,134,181].

U velikom delu literature, ispitivane su mehaničke osobine poprečnog preseka gleđi, na različitim dubinama gleđi, kao i blizu gleđno-dentinske granice. Gleđ u blizini gleđno-dentinske granice (DEJ) ima prosečnu smanjenu tvrdoću i modul elastičnosti za oko 26% u poređenju sa spoljašnjom površinom gleđi [181]. Veličina prizmi opada sa rastojanjem prema

gledno dentinskoj granici; prema tome, zapreminski udeo mekših, interprizmatičnih struktura beleži dvostruko povećanje što nesumnjivo doprinosi smanjenju tvrdoće i krutosti [182]. U tako dobijenim rezultatima, takođe, postoje velike varijacije u opsegu tvrdoće (0,5–6 GPa) i modula elastičnosti gleđi (10–115 GPa) [40]. U većini studija, uzorci su pripremani tako što je gleđ sečena mikrotomom u aksijalnom pravcu u odnosu na centar prizme. Nakon toga uzorci su najpre tretirani odgovarajućim kiselim rastvorima a zatim polirani [26,183]. Nesumnjivo je da ovakav pristup rezultira uniformnijim rezultatima i većim vrednostima modula elastičnosti jer je ispitivana sama srž gleđne prizme. U većini studija istraživači su površinu gleđi izravnavali pomoću silicijum-karbidnih borera pre nanošenja adheziva i tako uklanjali površinsku gleđ [86]. Rezultati takvih studija, iako nesumnjivo dragoceni za adhezivnu stomatologiju i razvoj dentalnih materijala ne mogu biti primenjeni na kliničke situacije u kojima se gleđ ne uklanja [86]. Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji bio je ispitati strukturu netaknute gleđi, pa je zbog toga svaki uzorak analiziran bez ikakve prethodne pripreme u smislu poliranja i bez impregnacije smolom, što je moglo dovesti do toga da su dobijene niže vrednosti u toku ovog istraživanja. Iz tog razloga nije moguće strogo poređenje apsolutnih vrednosti rezultata studija u kojima nisu korišćeni isti ili bar približni eksperimentalni protokoli, jer se ne dobijaju pravi zaključci. Međutim s obzirom na uniformnost dobijenih rezultata moguće ih je međusobno upoređivati i pratiti efekat kondicioniranja na površinu gleđi što je bio i cilj ovog istraživanja.

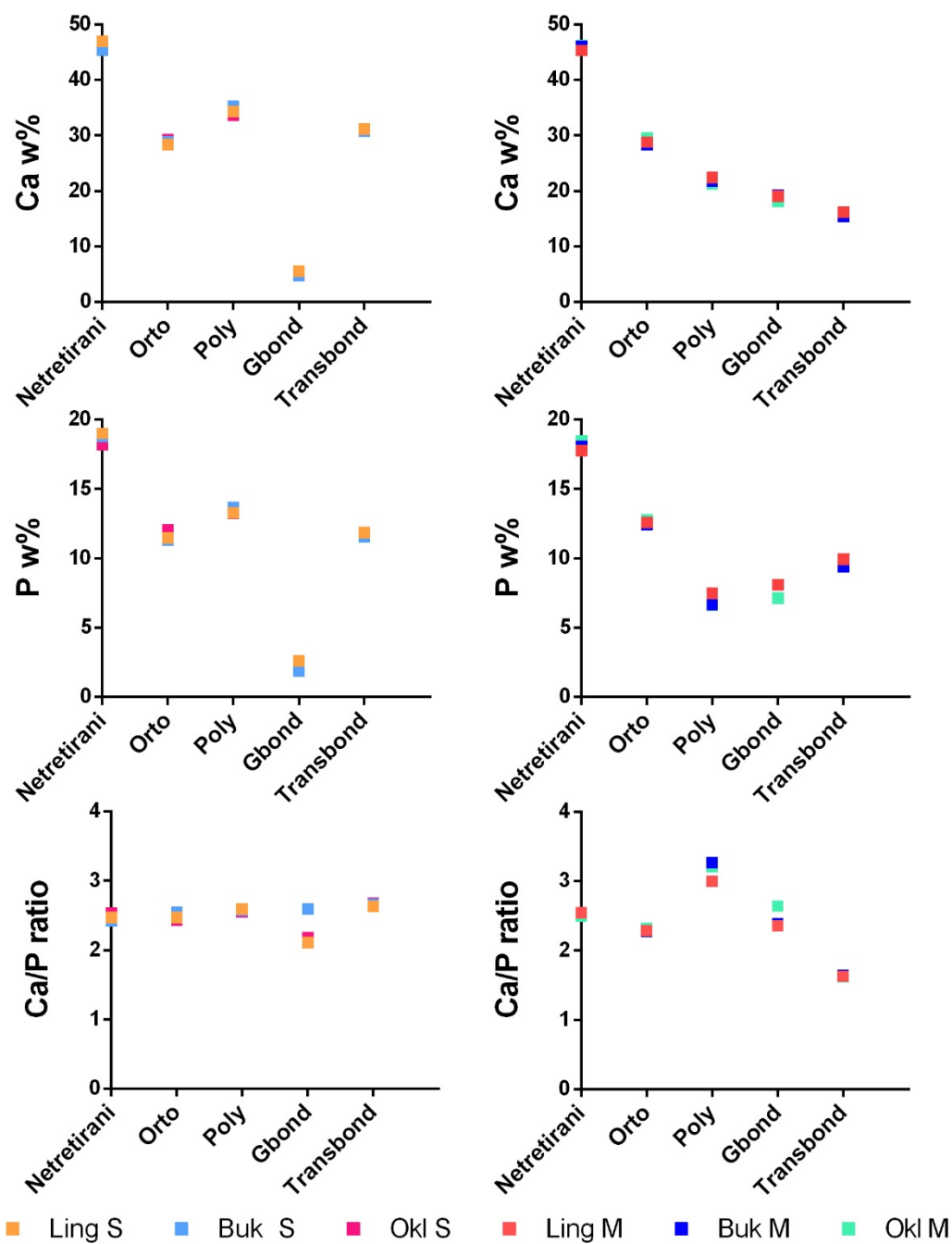
U manjem broju radova pomoću nanoindentacije su ispitivani mlečni zubi i utvrđena je prosečna vrednost tvrdoće mlečnih zuba od $3,81 \pm 0,73$ GPa, dok prosečna vrednost modula elastičnosti za gleđ iznosi $96,84 \pm 7,68$ GPa primenom sile od 50 mN odnosno $82,10 \pm 12,47$ GPa pri jačini 150 mN utiskivanja [143,144]. U ovoj disertaciji dobijene su niže vrednosti za tvrdoću ($1,77-2,77 \pm 0,3$ GPa), kao i za modul elastičnosti ($26,5 -28,8 \pm 0,3$ GPa), međutim maksimalna primenjena sila utiskivanja bila je 10 mN, što može biti glavni razlog različitih rezultata. Takođe druga grupa istraživača Mahoni (*Mahoney*) i sar., utvrđuje veće vrednosti tvrdoće gleđi mlečnih zuba ($4,88 \pm 0,41$ GPa) primenom sile od 50 mN i $4,87 \pm 0,29$ GPa pri jačini 150 mN utiskivanja. Oni su zaključili da mehaničke osobine mogu da variraju čak i u istom uzorku, što je posledica anizotropne prirode tvrdih zubnih tkiva [184].

Očekivano je da se, usled razvojnih, morfoloških i dimenzionih razlika, gleđ mlečnih zuba različito mehanički ponaša u odnosu na stalne zube. Morfološki površina mlečnog zuba

pokazuje sličnu strukturu posmatrano pomoću SEM, uz manje prisustvo prizmatičnih polja i većeg pojasa interprizmatičnih prostora. U EDS analizi svi analizirani minerali su zastupljeni u sličnom odnosu između poređenih grupa kada se analizira ista vrsta zuba, dok razlike postoje u mineralnom sastavu gleđi stalnih i mlečnih zuba pre i nakon kondicioniranja. Ovo korespondira sa rezultatima Derise i sar. [32]. Poređenjem mehaničkih svojstava gleđi mlečnih i stalnih zuba takođe postoje značajne razlike. Vrednosti tvrdoće kod stalnih zuba su prosečno veće za 1,1 GPa u odnosu na tvrdoću mlečnih zuba, dok vrednosti modula elastičnosti su veće u istoj grupi za 11,2-13,5 GPa, u odnosu na isto svojstvo kod mlečnih zuba. Utvrđena je razlika u stepenu rastvorljivosti gleđi mlečnih u odnosu na gleđ stalnih zuba, što se povezuje sa razlikama u strukturi. Mineralni udeo u gleđi mlečnih zuba je 81.3-94.2 %, dok kod stalnih je blizu čistom sintetskom apatitu i sadrži oko 96% [107,181]. Demineralizacija gleđi mlečnih i stalnih zuba pokazuju značajne razlike nakon kondicioniranja kiselinama, gde mlečni zubi su podložniji demineralizaciji što je i ranije opisano u literaturi [185]. Gleđ mlečnih zuba je slabije mineralizovana u odnosu na stalne zube, međutim, nema sveobuhvatnih studija koje upoređuju mehanička svojstva mlečnih i stalnih zuba. Vrednosti tvrdoće objavljene za gleđ mlečnih zuba od strane Mahoni (*Mahoney*) i sar. su nešto više od onih za stalne zube uz korišćenje iste metodologije [184]. U oba eksperimenta, indentacije su sprovedene na gleđi u srednjem delu uzoraka koji su bili odsečeni u poprečnoj koronarnoj ravni. S druge strane, druga istraživanja pokazuju da gleđ stalnih zuba ima superiornija mehanička svojstva u odnosu na gleđ mlečnih zuba [186,187]. Ove varijacije u objavljenim rezultatima se mogu objasniti na različite načine. One mogu zavisi od izbora zuba, jer je pokazano da se mehanička svojstva zuba značajno razlikuju među različitim grupama zuba. Takođe, bitna karakteristika koja utiče na mehanička svojstva kako mlečnih tako i stalnih zuba je starost nakon erupcije. Zatim, sveukupna izloženost fluoridima i štetnim noksama zuba pre ekstrakcije u velikoj meri može uticati na mehanička svojstva. Kako je već rečeno, vrednosti mehaničkih svojstava zavise od preseka u odnosu na pravac pružanja gleđnih prizmi, pa je upoređivanje apsolutnih vrednosti dobijenih određenim merenjem poželjno obavljati u odnosu na ekvivalentne preseke. Ovo su sve klinički izazovi koje je izuzetno teško reprodukovati i kontrolisati prilikom uzorkovanja i pripreme kliničkog materijala za eksperimentalne procedure. Svakako su potrebna dalja istraživanja po standardizovanim protokolima kako bi dobijeni rezultati bili uporedivi.

U istraživanju ove disertacije ispitivanjem efekta istog kondicionera na različite strane iste vrste zuba, uočavaju se određene razlike između analiziranih mehaničkih svojstava. Primenom ortofosforne kiseline u grupi stalnih zuba postoji statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti tvrdoće tretirane okluzalne, bukalne i lingvalne strane. Isti nalaz uočava se u grupi mlečnih zuba. Primenom poliakrilne kiseline, G bonda i Transbonda nisu nađene značajne razlike među vrednostima tvrdoće različitih strana gleđi, nezavisno od vrste zuba. Od četiri testirana kondicionera ortofosforna kiselina ima dokazano najagresivnije dejstvo, najnižu pH vrednost, što posebno ističe mehanička svojstva mikroregija pojedinačnih strana. Vrednosti tvrdoće i modula elastičnosti su veće na okluzalnoj strani u odnosu na lingvalnu i bukalnu stranu. U analizi rezultata modula elastičnosti ne postoji razlika između površina nakon tretmana sa svim testiranim kondicionerima, Ksu (*Xu*) i sar. utvrdili su da takve razlike vrednosti modula elastičnosti ne postoje ni kod netreterianih zuba što korespondira sa rezultatima ove disertacije [172]. Razlike u hemijskom sastavu nakon dejstva iste kiseline, na različitim stranama zuba prikazane su na Grafikon 7-5. Uočeno je da ne postoje statističke značajne razlike u promeni Ca u odnosu na ispitivane strane pod dejstvom istog kondicionera nezavisno od vrste zuba. Razlike u masenom udelu P je primećena kod bukalne strane stalnih zuba u odnosu na bukalnu i lingvalnu stranu pod dejstvom G bonda, dok dejstvom drugih ispitivanih kondicionera slična je vrednost P tri posmatrane površine nakon tretmana. Takav rezultat utiče na različit odnos Ca/P poređenjem bukalne i okluzalne, odnosno lingvalne strane. Na bukalnoj strani stalnih zuba Galil i sar. utvrđuju prisustvo polja tipa 1 i tipa 2 bliže vrhu kvržice, a tip 4 i tip 5 u blizini vrata zuba [64], dok Matik (*Mattick*) i Hobson navode da idealno polje za lepljenje čini tek oko 5 % bukalne površine zuba [91]. Ovakvi navodi ukazuju na heterogenost strukture ove površine. U grupi mlečnih zuba ne postoji statistički značajna razlika u mineralnom udelu P između ispitivanih površina dejstvom ortofosforne kiseline, poliakrilne kiseline i Transbonda. Razlike u mineralnom udelu P nađeni su poređenjem okluzalne sa bukalnom odnosno lingvalnom stranom. Veće oslobađanje P iz hidroksiapatita gleđi kod uzoraka okluzalne strane mlečnih zuba može biti posledica veće prizmatičnosti, većeg udela neorganske materije i razlika kompleksne fisurne morfologije ove površine u odnosu na lingvalnu i bukalnu stranu.

Grafikon 7-5. Promene hemijskog sastava u odnosu na ispitivane strane u grupi mlečnih i stalnih zuba.



7.3. Naučni i stručni doprinos

Precizno ocenjivanje strukture gleđi omogućuje bolje predviđanje ishoda adhezije u budućnosti. Od izuzetnog značaja je da stomatološki materijal pokazuje vrlo slična mehanička svojstva zubnim tkivima, u smislu modula elastičnosti i tvrdoće. Velike razlike mogu dovesti do napona i naprsnuća, odlamanja nadoknade ili raskida veze. Bolje poznavanje strukturalnih različitosti površine gleđi daje mogućnost promene protokola korišćenja testiranih materijala. Preciznija bazična saznanja o karakterizaciji gleđi pružile bi u praksi, kliničaru prave smernice pri izboru materijala, koje bi omogućile poboljšanje adhezivne veze u stomatološkim tretmanima, a samim tim i obezbedile bolji kvalitet pružene terapije.

7.4. Primena rezultata istraživanja u kliničkoj praksi

Na osnovu rezultata ovog eksperimentalnog istraživanja, preporuka kliničaru prilikom pripreme površine gleđi stalnih zuba je da se prilikom postavljanja kompozitnih restoracija u gleđi (ispune, fasete, viniri) prednost daje samoadhezivnim sistemima, s obzirom da su manje invazivni po strukturu gleđi u odnosu na ortofosfornu kiselinu i daju sličan kvalitet polja nagrizanja. Prilikom postavki zalivača na bazi GJC, preporuka je da se koristi poliakrilna kiselina, da bi se povećao kvalitet nagrizanja površine. Prilikom lepljenja bravica na intaktne gleđne površine preporuka je da se koristi kondicioner iz grupe samonagrizajućih adheziva, jer omogućuju manju promenu strukture i posledično manji gubitak gleđi, u odnosu na ortofosfornu kiselinu. Ukoliko se desi odlepljivanje bravice u toku terapije, a pritom nema jasnih znakova okluzalne traume i pacijent negira uzimanje čvrste, lepljive hrane, uzrok može biti aprizmatično polje gleđi u regiji lepljenja bravica. Preporuka je radi dobijanja veće površine lepljenja prvobitna primena ortofosforne kiseline, a zatim samonagrizajućeg adheziva, kako bi se obezbedila adekvatna retencija bravice do kraja ortodontske terapije.

7.5. Budući pravci istraživanja

Uz primenu AFM, bilo bi moguće preciznije određivanje utlastrukturnih karakteristika površine aprizmatične i prizmatične gleđi. Ciljano korišćenje nanoindentacije, gde bi se odredio precizan položaj prizmi i interprizmatičnog prostora prvobitno netretiranih i tretiranih uzoraka dalo bi dodatne informacije o mehaničkim svojstvima gleđi. Ovom metodom moguće je testirati i upoređivati nove kondicionere koji se pojavljuju na dentalnom tržištu. Za

ispitivanja morfologije tretirane gleđi mogle bi se raditi analize primenom mikro CT-a, gde bi se trodimenzionalno predstavila dubina nagrizanja i stekao dodatni uvid efekat kondicionera.

8. Zaključak

Na osnovu dobijenih i analiziranih rezultata istraživanja u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Vrednosti tvrdoće gleđi i vrednosti modula elastičnosti značajno se smanjuju nakon nagrizanja u stepenu koji zavisi od primenjenog kondicionera. *Potvrđivanje H1.*
- Vrednosti tvrdoće kod stalnih zuba su prosečno veće za 1,1 GPa u odnosu na tvrdoću mlečnih zuba, dok vrednosti modula elastičnosti su veće u istoj grupi za 11,2-13,5 GPa, u odnosu na isto svojstvo kod mlečnih zuba.
- Vrednosti tvrdoća i modula elastičnosti su veće na okluzalnoj strani u odnosu na lingvalnu i bukalnu stranu kod netretiranih zuba.
- Različite strane zuba tretirane istim kondicionerom imaju sličnu vrednost modula elastičnosti.
- Mehaničke karakteristike tretirane gleđi međusobno su zavisne od promene hemijskog sastava i promene morfologije tretirane površine gleđi.
- Određivanjem hemijskog udela minerala u površinskom sloju gleđi pre i posle nagrizanja, utvrđuje se da je hemijski udeo minerala kalcijuma i fosfata u površinskom sloju gleđi značajno niži posle nagrizanja, međutim sam odnos Ca i P se ne menja. *Potvrđivanje H2.*
- Procentualnim padom minerala dolazi do procentualno dvostrukog smanjenja tvrdoće površina tretiranih sa ortofosfornom, poliakrilnom kiselinom i Transbondom u odnosu na kontrolnu grupu.
- Analizom morfologije površine gleđi utvrđeno je da stepen prizmatičnosti gleđi utiče na stepen nagrizanja gleđi, gde je efekat nagrizanja aprizmatične gleđi značajno manji u odnosu na stepen nagrizanja prizmatične gleđi, kod svih testiranih kondicionera. *Potvrđivanje H3.*
- Kondicioneri iste grupe daju sebi svojsvtenu morfologiju kondicionirane gleđi posmatrano pomoću SEM. Postoji jasna razlika u morfološkom izgledu kondicionirane gleđi ortofosfornom kiselinom, poliakrinom kiselinom i kondicinerima iz grupe samonagrizajućih adheziva.

- Ispitivani samonagrizajući adhezivi: G bond i Transbond daju sličnu morfologiju površine gleđi posmatrano pomoću SEM.
- Okluzalna strana stalnih zuba, usled veće prizmatičnosti, nakon tretmana kiselinama daje dominantno polja nagrizanja tipa 1, dok je to manje zastupljeno nakon tretmana bukalne i lingvalne strane kod obe denticije.
- Ne postoji jasna razlika u morfološkom izgledu kondicionirane površine poređenjem gleđi mlečnih i stalnih zuba.
- Najmanji gubitak gleđi, odnosno najmanja demineralizacija nastaje nakon primene poliakrilne kiseline a najveća nakon primene ortofosforne kiseline.

9. Literatura

- [1] Sakae, T. (1988) X-ray diffraction and thermal studies of crystals from the outer and inner layers of human dental enamel. *Archives of Oral Biology* 10:707-713.
- [2] Moss-Salentijn L, Moss ML, Yuan MS. The ontogeny of mammalian enamel. *Tooth enamel microstructure*. Rotterdam: Balkema;1997;p5-30.
- [3] Skobe Z. SEM evidence that one ameloblast secretes one keyhole-shaped enamel rod in monkey teeth. *Eur J Oral Sci.* 2006 May;114:338-42.
- [4] Beynon AD, Dean MC. Hominid dental development. *Nature.* 1991 May;351(6323):196-.
- [5] Chen E, Piddington R, Decker S, Park J, Yuan ZA, Abrams WR, Rosenbloom J, Feldman G, Gibson CW. Regulation of amelogenin gene expression during tooth development. *Dev Dynam.* 1994 Mar;199(3):189-98.
- [6] Brookes SJ, Robinson C, Kirkham J, Bonass WA. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1995 Jan 1;40(1):1-14.
- [7] Robinson, C., Brookes, S.J., Shore, R.C., and Kirkham, J. (1998) The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci* 106:282-291.
- [8] Fincham AG, Luo W, Moradian-Oldak J, Paine ML, Snead ML, Zeichner-David M. Enamel biomineralization: the assembly and disassembly of the protein extracellular organic matrix. In: Teaford MF, Meredith-Smith M, Ferguson, M.W.J. (eds). *Development, Function and Evolution of Teeth*. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.p37-61.
- [9] Cui FZ, Ge J. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1(3):185-91.
- [10] Ge JC, Cui FZ, Wang XM, Feng HL. Property variations in the prism and the organic sheath within enamel by nanoindentation. *Biomaterials.* 2005 Jun 1;26(16):3333-9.
- [11] Rönholm, E. Ultra-structure of developing human enamel electron microscopy of human amelogenesis. *J Dent Res.*1961 Jan; 40(4):668-669.
- [12] Boyde A. The development of enamel structure. *J R Soc Med.* 1967;60:923-8.

-
- [13] Rotstein I, Dankner E, Goldman A. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endodont.* 1996 Jan 1;22(1):23-6.
- [14] Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arch Oral Biol.* 2001;46(2):173-83.
- [15] Brauchli LM, Baumgartner EM, Ball J, Wichelhaus A. Roughness of enamel surfaces after different bonding and debonding procedures. *J Orofac Orthop.* 2011;72(1):61-7.
- [16] Zolotarev VM, Grisimov VN. Architectonics and optical properties of dentin and dental enamel. *Opt. Spectrosc.* 2001;90(5):753-9.
- [17] De Menezes Oliveira MA, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti MA, De Menezes FC, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microscopy research and technique.* 2010 May;73(5):572-7.
- [18] Fosse G. A quantitative analysis of the numerical density and the distributional pattern of prisms and ameloblasts in dental enamel and tooth germs. III. The calculation of prism diameters and numbers of prisms per unit area in dental enamel. *Acta Odontol Scand.* 1968 Jan 1;26(4):315-36.
- [19] Nanci A. Enamel: composition, formation, and structure. *Ten Cate's oral histology development, structure, and function.* St. Louis: Mosby; 2008:p141-90.
- [20] Lynch CD, O'sullivan VR, Dockery P, McGILLYCUDDY CT, Rees JS, Sloan AJ. Hunter-Schreger band patterns and their implications for clinical dentistry. *J Oral Rehabil.* 2011 May;38(5):359-65.
- [21] Whittaker DK. Structural variations in the surface zone of human tooth enamel observed by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 1982;27(5):383-92.
- [22] Raue L, Gersdorff N, Rödiger M, Klein H. New insights in prism orientation within human enamel. *Arch Oral Biol.* 2012;57(3):271-6.
- [23] Low IM, Duraman N, Mahmood U. Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth. *Mater Sci Eng C.* 2008 Mar 10;28(2):243-7.
- [24] Ferrario VF, Sforza C, Zanotti G. Maximal bite forces in healthy young adults as predicted by surface electromyography. *J Dent.* 2004 Aug 1;32(6):451-7.

-
- [25] Waters NE. Some mechanical and physical properties of teeth. In: Vincent J, Curry J (eds). *The mechanical properties of biological materials*. Cambridge: Cambridge University Press, 1980:p99-134.
- [26] Xu, H.H.K., Smith, D.T., Jahanmir, S., Romberg, E., Kelly, J.R.,Thompson, V.P., Rekow, E.D. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *J. Dent.Res.* 1998 Mar;77(3):472-80.
- [27] Craig, R.G., Peyton, F.A. The microhardness of enamel and dentin. *J. Dent. Res.* 1958 Aug;37(4):661-8.
- [28] Meredith, N., Sherriff, M., Setchell, D.J., Swanson, S.A.V., 1996.Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique.*Arch Oral Biol.* 1996 Jun 1;41(6):539-45.
- [29] Staines M, Robinson WH, Hood JA. Spherical indentation of tooth enamel. *Journal of materials science.* 1981 Sep 1;16(9):2551-6.
- [30] Maier A, Niederbrucker G, Stenger S, Uhl A. Efficient focus assessment for a computer vision-based Vickers hardness measurement system. *Journal of electronic imaging.* 2012 May;21(2):021114.
- [31] Mortimer KV. The relationship of deciduous enamel structure to dental disease. *Caries res.* 1970;4(3):206-23.
- [32] Derise NL, Ritchey SJ, Furr AK. Mineral composition of normal human enamel and dentin and the relation of composition to dental caries: I. Macrominerals and comparison of methods of analyses. *J Dent Res.* 1974 Jul;53(4):847-52.
- [33] Lakomaa EL, Rytomaa I. Mineral composition of enamel and dentin of primary and permanent teeth in Finland. *Eur J Oral Sci.* 1977 Apr;85(2):89-95.
- [34] Hunter ML, West NX, Hughes JA, Newcombe RG, Addy M. Erosion of deciduous and permanent dental hard tissue in the oral environment. *J Dent.* 2000 May 1;28(4):257-63.
- [35] Wang LJ, Tang R, Bonstein T, Bush P, Nancollas GH. Enamel demineralization in primary and permanent teeth. *J Dent Res.* 2006 Apr;85(4):359-63.

-
- [36] Alkattan R, Lippert F, Tang Q, Eckert GJ, Ando M. The influence of hardness and chemical composition on enamel demineralization and subsequent remineralization. *J Dent*. 2018 Aug 1;75:34-40.
- [37] Marinho VC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane DB Syst Rev*. 2013(7)
- [38] Perdigao J, Gomes G, Duarte S, Lopes MM. Enamel bond strengths of pairs of adhesives from the same manufacturer. *Oper Dent*. 2005 Jul 1;30(4):492.
- [39] Pool DF, Johnson NW. The effects of different demineralizing agents on human enamel surfaces studied by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol* 1967;12:1621–34.
- [40] Hadad R, Hobson RS, McCabe JF. Micro-tensile bond strength to surface and subsurface enamel. *Dent Mater*. 2006 Sep 1;22(9):870-4.
- [41] Zhou J, Hsiung LL. Depth-dependent mechanical properties of enamel by nanoindentation. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Apr;81(1):66-74.
- [42] Zaytsev D, Panfilov P. Anisotropy of the mechanical properties of human dental enamel. *Mater Lett*. 2015 Nov 15;159:428-31.
- [43] Braly A, Darnell LA, Mann AB, Teaford MF, Weihs TP. The effect of prism orientation on the indentation testing of human molar enamel. *Arch Oral Biol*. 2007 Sep 1;52(9):856-60.
- [44] de Dios Teruel J, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJ. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol*. 2015 May 1;60(5):768-75.
- [45] Gutiérrez-Salazar MD, Reyes-Gasga J. Microhardness and chemical composition of human tooth. *Mater Res*. 2003 Jun;6(3):367-73.
- [46] Acil Y, Mobasser AE, Warnke PH, Terheyden H, Wiltfang J, Springer I. Detection of mature collagen in human dental enamel. *Calcified tissue int*. 2005 Feb 1;76(2):121-6.
- [47] Weidmann SM, Eyre DR. Amino acid composition of enamel protein in the fully developed human tooth. *Caries Res*. 1967;1:349-55.
- [48] Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955; 34: 849-53.
- [49] Sakaguchi RL, Powers JM. *Craig's restorative dental materials*. Philadelphia, PA: Elsevier/Mosby; 2012
-

-
- [50] Van Meerbeek B, Vargas S, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P, et al. Adhesives and cements to promote preservation dentistry. *Oper Dent*. 2001;6:119–44.
- [51] Fernandes ACR, Bridi EC, do Amaral FLB, França FMG, Flório FM, Basting RT. Microtensile bond strength of silorane or methacrylate resin-based composites associated to selfetching or conventional adhesives to dentin after different storage times. *Int J Adhes Adhes* 2014; 48: 28-34.
- [52] Dieng-Sarr F, Sharrock P, Dabsie F, Grégoire G. Modifications of the organic and mineral fractions of dental tissues following conditioning by self-etching adhesives. *J Dent* 2011; 39: 141-7.
- [53] Choi S, Rhee Y, Park J, Lee G, Kim K, Park J, Park Y, Park H. Effects of fluoride treatment on phosphoric acid-etching in primary teeth: An AFM observation. *Micron* 2010; 41: 498-506.
- [54] Bolaños-Carmona V, González-López S, Briones-Luján T, De Haro-Muñoz C, de la Macorra JC. Effects of etching time of primary dentin on interface morphology and microtensile bond strength. *Dent Mater* 2006; 22: 1121-9.
- [55] Garcia-Godoy F, Gwinnett AJ. Effect of etching times and mechanical pretreatment on the enamel of primary teeth: An SEM study. *Am J Dent* 1991; 4: 115-8
- [56] Zafar MS, Ahmed N. The effects of acid etching time on surface mechanical properties of dental hard tissues. *Dent Mater J*. 2015 May 28:2014-083.
- [57] Zafar MS, Ahmed N. Nanoindentation and surface roughness profilometry of poly methyl methacrylate denture base materials. *Technol Health Care* 2014; 22: 573-81.
- [58] Shi L, Wang L, Duan Y, Lei W, Wang Z, Li J, Fan X, Li X, Li S, Guo Z. The improved biological performance of a novel low elastic modulus implant. *PLoS One*. 2013 Feb 21;8(2):e55015.
- [59] Zhu JJ, Tang AT, Matinlinna JP, Hägg U. Acid etching of human enamel in clinical applications: A systematic review. *J. Prosthet. Dent*. 2014;112(2):122-35.
- [60] Gardner A, Hobson R. Variations in acid-etch patterns with different acids and etch times. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001;120(1):64-7.
- [61] Gwinnett A. The ultrastructure of the “prismless” enamel of permanent human teeth. *Arch Oral Biol*. 1967;12(3):1109-15.

-
- [62] Falian H, Dexin Z, Weizhong J, Zhu G. Bonding of resinous filling materials to acid-etched teeth: a scanning electron microscopic observation. *Quintessence Int.* 1989;20(1):27-30.
- [63] Silverstone LM, Saxton CA, Dogon IL, Fejerskov O. Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel examined by scanning electron microscopy. *Caries Res.* 1975;9(5):373-87.
- [64] Galil KA, Wright GZ. Acid etching patterns on buccal surfaces of permanent teeth. *Pediatr Dent.* 1979;1(4):230-4.
- [65] Carstensen W. The effect of different phosphoric acid concentrations on surface enamel. *Angle Orthodont.* 1992;62:51–8.
- [66] Kodaka T, Mori R, Miyakawa M. Sequential observations followed by acid etching on the enamel surfaces of human teeth under scanning microscopy at low vacuum. *Microsc Res Technol.* 1993;24:429–36.
- [67] Meola MT, Papaccio G. A scanning electron microscope study of the effect of etching time and mechanical pre-treatment on the pattern of acid etching on the enamel of primary teeth. *Int Dent J.* 1986;36:49–53.
- [68] Gracia-Godoy F, Gwinnett AJ. Effect of etching times and mechanical pretreatment on the enamel of primary teeth: an SEM study. *Am J Dent.* 1991;4:115–8.
- [69] Hobson RS, Rugg-Gunn AJ, Booth TA. Acid-etch patterns on the buccal surface of human permanent teeth. *Arch Oral Biol.* 2002;47:407–12
- [70] Armstrong S, Breschi L, Özcan M, Pfefferkorn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dent Mater.* 2017 Feb 1;33(2):133-43.
- [71] ISO/DTS 11405 Dentistry — Testing of adhesion to tooth structure ISO/TC 106 D, Subcommittee SC1. Filling and restorative materials ISO/TS 11405:2015, Dentistry—testing of adhesion to tooth structure; 2015
- [72] Schroeder M, Correa IC, Bauer J, Loguercio AD, Reis A. Influence of adhesive strategy on clinical parameters in cervical restorations: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017 Jul 1;62:36-53.
-

-
- [73] Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Buonocore Memorial Lecture. Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges. *Oper dent*. 2003;28(3):215.
- [74] Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergil-Mutluay A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent mater*. 2011 Jan 1;27(1):1-6.
- [75] Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*. 2007 Sep 1;28(26):3757-85.
- [76] Živković S, Kolar M, Blažić L, Vučetić M, Tošić G. Smear layer on dentin in Restorative Dentistry. *Stomatološki glasnik Srbije*. 2004;51(4):169-76.
- [77] Sezinando A. Looking for the ideal adhesive—a review. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*. 2014 Oct 1;55(4):194-206.
- [78] Di Francescantonio M, de Oliveira MT, Shinohara MS, Ambrosano GM, Giannini M. Bond strength evaluation of self-etch and total-etch adhesive systems on intact and ground human enamel. *Braz J Oral Sci*. 2016 Dec 12:1462-6.
- [79] Miyazaki M, Sato H, Onose H, Moore BK, Platt JA. Analysis of the enamel/adhesive resin interface with laser Raman microscopy. *Oper dent*. 2003 Mar 1;28(2):136-42.
- [80] Kanemura N, Sano H, Tagami J. Tensile bond strength to and SEM evaluation of ground and intact enamel surfaces. *J Dent*. 1999 Sep 1;27(7):523-30.
- [81] Perdigão J, Geraldeli S. Bonding characteristics of self-etching adhesives to intact versus prepared enamel. *J Esthet Restor Dent*. 2003 Jan;15(1):32-42.
- [82] Daronch M, De Goes MF, Grande RHM, Chan DCN. Antibacterial and conventional self-etching primer system: morphological evaluation of intact primary enamel. *J Clin Pediatric Dent*. 2003;27(3):251-6.
- [83] Hannig M, Grafe A, Atalay S, Bott B. Microleakage and SEM evaluation of fissure sealants placed by use of self-etching priming agents. *J Dent*. 2003; 32: 75-81.

-
- [84] Pashley DH, Tay FR. Aggressiveness of contemporary self-etching adhesives Part II: etching effects on unground enamel. *Dent Mater.* 2001; 17: 430-44
- [85] Hannig M, Bock H, Bott B, Hoth-Hannig W. Inter-crystallite nanoretention of self-etching adhesives at enamel imaged by transmission electron microscopy. *Eur J Oral Sci.* 2002 Dec;110(6):464-70.
- [86] Devarasa GM, Subba Reddy VV, Chaitra NL, Swarna YM. Self-etching adhesive on intact enamel, with and without pre-etching. *Micros res techniq.* 2012 May;75(5):650-4.
- [87] Hashimoto Y, Hashimoto Y, Nishiura A, Matsumoto N. Atomic force microscopy observation of enamel surfaces treated with selfetching primer. *Dent mater J.* 2013 Jan 31;32(1):181-8
- [88] Carpena Lopes G, Narciso Baratieri L, de Andrada C, Mauro A, Vieira LC. Dental adhesion: Present state of the art and future perspectives. *Quintessence Int.* 2002 Mar 1;33(3): 213-24.
- [89] Hobson RS, McCabe JF, Rugg-Gunn AJ. The relationship between acid-etch patterns and bond survival in vivo. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;121(5):502-9.
- [90] Bagheri M, Pilecki P, Sauro S, Sherriff M, Watson TF, Hosey MT. An in vitro investigation of pre-treatment effects before fissure sealing. *Int J Paediatr Dent.* 2017;27(6):514-22.
- [91] Mattick CR, Hobson RS. A comparative micro-topographic study of the buccal enamel of different tooth types. *J Orthod.* 2000;27(2):143-8.
- [92] Duke ES, Robbins JW, Snyder DS. Clinical evaluation of a dentinal adhesive system: three-year results. *Quintessence Int.* 1991 Nov 1;22(11).
- [93] Van Dijken JW. Clinical evaluation of three adhesive systems in class V non-cariou lesions. *Dent Mater.* 2000 Jul 1;16(4):285-91.
- [94] Beloica, M., Mandinic, Z., Vulicevic, Z.R., Led aparati za inicijaciju polimerizacije kompozitnih materijala. *Stomatolog,* 2010;4:42-6.
- [95] Folwaczny M, Mehl A, Kunzelmann KH, Hickel R. Clinical performance of a resin-modified glass-ionomer and a compomer in restoring non-cariou cervical lesions. 5-year results. *Am J Dent.* 2001 Jun;14(3):153-6.

-
- [96] Kubo S, Kawasaki K, Yokota H, Hayashi Y. Five-year clinical evaluation of two adhesive systems in non-carious cervical lesions. *J Dent.* 2006 Feb 1;34(2):97-105.
- [97] Sharma S, Tandon P, Nagar A, Singh GP, Singh A, Chugh VK. A comparison of shear bond strength of orthodontic brackets bonded with four different orthodontic adhesives. *J Orthod Sci.* 2014;3(2):29-33.
- [98] Millett D T, Gordon P H. A 5-year clinical review of bond failure with a no-mix adhesive (Right on). *Eur J Orthod* 1994;16:203-11.
- [99] Sunna S, Rock W P. Clinical performance of orthodontic brackets and adhesive systems: a randomized clinical trial. *Br J Orthod.* 1998;25:283-7.
- [100] Sunna S, Rock P. An ex vivo investigation into the bond strength of orthodontic brackets and adhesive systems. *Br J Orthod.* 1999;26:47-50.
- [101] Mustafa A, Tsoi JK, Matinlinna JP. Aspects of enamel bonding using experimental silanes for orthodontic adhesion. *Int. J. Adhes. Adhes.* 2016;70:137-41.
- [102] Zielinski V, Reimann S, Jäger A, Bourauel C. Comparison of shear bond strength of plastic and ceramic brackets. *J Orofac Orthop.* 2014;75(5):345-57.
- [103] Öztürk B, Malkoç S, Koyutürk AE, Çatalbaş B, Özer F. Influence of different tooth types on the bond strength of two orthodontic adhesive systems. *Eur J Orthod.* 2008;30(4):407-12.
- [104] Hobson RS, McCabe JF, Hogg SD. Bond strength to surface enamel for different tooth types. *Dent Mater.* 2001;17(2):184-9.
- [105] Beloica, D., Vulovic, M., Gajic, M., Stevanovic, R., Ivanovic, M., Carevic, M., Vulicevic, Z., Markovic, D., Decja stomatologija. Beograd: Data STATUS. 2005. 438p
- [106] Zhang YR, Du W, Zhou XD, Yu HY. Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *International journal of oral science.* 2014 Jun;6(2):61-9.
- [107] Angker L, Swain MV. Nanoindentation: application to dental hard tissue investigations. *J Mater Res.* 2006 Aug;21(8):1893-905.
- [108] Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res.* 1992 Jun;7(6):1564-83.
- [109] Čech J, Haušild P, Kovářik O, Materna A. Examination of Berkovich indenter tip bluntness. *Materials & Design.* 2016 Nov 5;109:347-53.

-
- [110] Peterson DR, Bronzino JD, editors. Biomechanics: principles and applications. CRC press; 2007 Sep 25.
- [111] Zhu FY, Wang QQ, Zhang XS, Hu W, Zhao X, Zhang HX. 3D nanostructure reconstruction based on the SEM imaging principle, and applications. *Nanotechnology*. 2014 Apr 16;25(18):185705.
- [112] Radović, M. Magnetne nanočestice na bazi Fe₃O₄ obeležene radioaktivnim itrijumom za mogućnu primenu u hipertermijsko-radionuklidnoj terapiji tumora. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju;2017. 115p.
- [113] S. Mentus, U. Mioč, Odabrane metode fizičko-hemijske analize, Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, 1993.
- [114] Marchionni S, Baldissara P, Monaco C, Scotti R. A systematic method for predetermined scanning electron microscope analysis in dental science. *Scanning*. 2010 Mar;32(2):97-103.
- [115] Vučinić S, Petrović B, Kojić S, Šipovac M, Stefanović S; Stojanović G. Influence of specimen preparation and nanoindentation protocol on the mechanical properties of bovine bone. *Proceedings of Papers – 5th International Conference on Electrical, Electronic and Computing Engineering, IcETRAN 2018*, Palić, Serbia, June 11 – 14, 2018. p728-31.
- [116] Shinohara MS, Oliveira MT, Hipólito VD, Giannini M, Goes MF. SEM analysis of the acid-etched enamel patterns promoted by acidic monomers and phosphoric acids. *J Appl Oral Sci*. 2006 Dec;14(6):427-35.
- [117] Fernández-Estevan L, Millan-Martínez D, Fons-Font A, Agustín-Panadero R, Román-Rodríguez JL. Methodology in specimen fabrication for in vitro dental studies: Standardization of extracted tooth preparation. *J Clin Exp Dent*. 2017 Jul;9(7):e897.
- [118] de Melo Maranhão K, Klautau EB, Pereira PD, Guimarães RB, Pantoja VG. The effect of storage solutions on enamel of bovine teeth. *Salusvita, Bauru*. 2009;28(2):129-34.
- [119] Aydın B, Pamir T, Baltacı A, Orman MN, Turk T. Effect of storage solutions on microhardness of crown enamel and dentin. *Eur J Dent*. 2015 Apr;9(2):262.

-
- [120] Hua LC, Wang WY, Swain MV, Zhu CL, Huang HB, Du JK, Zhou ZR. The dehydration effect on mechanical properties of tooth enamel. *J Mech Beh Biomed mater.* 2019 Jul 1;95:210-4.
- [121] Frankenberger R, Lohbauer U, Roggendorf MJ, Naumann M, Taschner M. Selective enamel etching reconsidered: better than etch-and-rinse and self-etch?. *J Adhes Dent.* 2008 Sep 1;10(5).
- [122] Bertolotti RL. Total etch—the rational dentin bonding protocol. *J Esthet Restor Dent.* 1991 Jan;3(1):1-6.
- [123] Koenigswald W, Sander PM. Glossary of terms used for enamel microstructures. *Tooth enamel microstructure.* 1997:267-80.
- [124] Fjeld M, Øgaard B. Scanning electron microscopic evaluation of enamel surfaces exposed to 3 orthodontic bonding systems. *Am J Orthod Dentofac.* 2006 Nov 1;130(5):575-81.
- [125] Oliver WC, Pharr GM. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *J Mater Res.* 2004 Jan;19(1):3-20.
- [126] Fan Z, Rho JY. Effects of viscoelasticity and time-dependent plasticity on nanoindentation measurements of human cortical bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003 Oct 1;67(1):208-14.
- [127] Wang XJ, Chen XB, Hodgson PD, Wen CE. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bovine bone measured by nanoindentation. *Trans Nonferrous Met Soc China.* 2006 Jun 1;16:s744-8.
- [128] Mazurkiewicz AD. The effect of trabecular bone storage method on its elastic properties. *Acta Bioeng Biomech.* 2018;20(1).
- [129] Novitskaya E, Chen PY, Hamed E, Jun L, Lubarda VA, Jasiuk I, McKittrick J. Recent advances on the measurement and calculation of the elastic moduli of cortical and trabecular bone: a review. *Theor Appl.* 2011;38(3):209-97.
- [130] Lucca DA, Herrmann K, Klopstein MJ. Nanoindentation: Measuring methods and applications. *CIRP annals.* 2010 Jan 1;59(2):803-19.

-
- [131] Pharr GM, Herbert EG, Gao Y. The indentation size effect: a critical examination of experimental observations and mechanistic interpretations. *Ann Rev Mater Res.* 2010 Aug 4;40:271-92.
- [132] Guo WC, Xu H, Gao XQ, Hou XL, Li Y. A modified method for hardness determination from nanoindentation experiments with imperfect indenters. *Adv Mater Scid Eng.* 2016 Jan 1;1-8
- [133] Willems G, Celis JP, Lambrechts P, Braem M, Vanherle G. Hardness and Young's modulus determined by nanoindentation technique of filler particles of dental restorative materials compared with human enamel. *Journal of biomedical materials research.* 1993 Jun;27(6):747-55.
- [134] Jiang H, Liu X-Y, Lim CT, Hsu CY. Ordering of self-assembled nanobiominerals in correlation to mechanical properties of hard tissues. *Appl Phys Lett.* 2005;86:163901–163903.
- [135] Van Meerbeek B, Willems G, Celis JP, Roos JR, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Assessment by nano-indentation of the hardness and elasticity of the resin-dentin bonding area. *J Dent Res.* 1993 Oct;72(10):1434-42.
- [136] Zafar MS, Ahmed N. Nanomechanical characterization of exfoliated and retained deciduous incisors. *Technol Health Care.* 2014;22(6):785-93.
- [137] Perdigão J, Geraldini S. Bonding characteristics of self-etching adhesives to intact versus prepared enamel. *J Esthet Restor Dent.* 2003;15:32-41.
- [138] Eliades T, Gioka C, Eliades G, Makou M. Enamel surface roughness following debonding using two resin grinding methods. *The Eur J Orth.* 2004 Jun 1;26(3):333-8.
- [139] Las Casas EB, Bastos FS, Godoy GC, Buono VT. Enamel wear and surface roughness characterization using 3D profilometry. *Tribol Int.* 2008 Dec 1;41(12):1232-6.
- [140] Akasapu A, Hegde U, Murthy PS. Enamel surface morphology: An ultrastructural comparative study of anterior and posterior permanent teeth. *J Microsc Ultra.* 2018 Jul;6(3):160.
- [141] Marshall SJ, Bayne SC, Baier R, Tomsia AP, Marshall GW. A review of adhesion science. *Dental materials.* 2010 Feb 1;26(2):e11-6

-
- [142] Marshall Jr GW, Marshall SJ, Bayne SC. Restorative dental materials: scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. *Scan Micros*. 1988 Dec;2(4):2007
- [143] Silverstone LM, Hicks MJ, Featherstone MJ. Oral fluid contamination of etched enamel surfaces: an SEM study. *J Am Dent Assoc (1939)*. 1985 Mar;110(3):329-32.
- [144] Boyde A. Enamel. In *Teeth*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1989 p309-473.
- [145] Di Hipolito V, de Goes MF, Carrilho MR, Chan DC, Daronch M, Sinhorette MA. SEM evaluation of contemporary self-etching primers applied to ground and unground enamel. *J Adhes Dent*. 2005.
- [146] TÜRKÜN M, Sevgican F, Pehlivan Y, Aktener BO. Effects of 10% carbamide peroxide on the enamel surface morphology: a scanning electron microscopy study. *J Esthet Restor Dent*. 2002 Jul;14(4):238-44.
- [147] Soares R, De Ataíde ID, Fernandes M, Lambor R. Assessment of enamel remineralisation after treatment with four different remineralising agents: A Scanning Electron Microscopy (SEM) Study. *J Clin Diag Res*. 2017 Apr;11(4):ZC136.
- [148] Choi, Su-Mi & Choi, Young-Chul & Park, Jae-Hong & Choi, Sung. (2008). The effect of etching time on the pattern of acid etching on the enamel of primary teeth. *The journal of the Korean Academy of Pediatric Dentistry*. 2008 Aug 31;35(3):437-45.
- [149] Smith DC, Cartz L. Crystalline interface formed by polyacrylic acid and tooth enamel. *Journal of dental research*. 1973 Sep;52(5):p1155.
- [150] Alcantara-Galeana MD, Contreras-Bulnes R, Rodríguez-Vilchis LE, Espinosa-Pesqueira ME, Barrera-Ortega CC, López-Hurtado IM, Fernández-Bobadilla A. Microhardness, structure, and morphology of primary enamel after phosphoric acid, self-etching adhesive, and Er: YAG laser etching. *Int J Opt*. 2017 Mar 9;ID7634739.
- [151] Sabel N, Robertson A, Nietzsche S, Norén JG. Demineralization of enamel in primary second molars related to properties of the enamel. *The Scientific World Journal*. 2012 Jan 1;2012.
- [152] Wang LJ, Tang R, Bonstein T, Bush P, Nancollas GH. Enamel demineralization in primary and permanent teeth. *J Dent Res*. 2006 Apr;85(4):359-63.
- [153] Hannig M, Reinhardt KJ, Bott B. Self-etching primer vs phosphoric acid: an alternative concept for composite-to-enamel bonding. *Oper Dent*. 1999;24:172-80.
-

-
- [154] Kaaden C, Powers JM, Friedl KH, Schmalz G. Bond strength of self-etching adhesives to dental hard tissues. *Clin Oral Investig.* 2002;6:155-60.
- [155] Kanemura N, Sano H, Tagami J. Tensile bond strength to and SEM evaluation of ground and intact enamel surfaces. *J Dent.* 1999;27:523-30.
- [156] Perdigão J, Lopes L, Lambrechts P, Leitão J, Van Meerbeek B. Effects of a self etching primer on enamel shear bond strengths and SEM morphology. *Am J Dent.* 1997;10:141-6.
- [157] Torii Y, Itou K, Nishitani Y, Ishikawa K, Suzuki K. Effect of phosphoric acid etching prior to self-etching primer application on adhesion of resin composite to enamel and dentin. *Am J Dent.* 2002;15:305-8.
- [158] Van Meerbeek B, De Munck J, Mattar D, Van Landuyt K, Lambrechts P. Microtensile bond strengths of an etch&rinse and self-etch adhesive to enamel and dentin as a function of surface treatment. *Oper Dent.* 2003;28:647-60.
- [159] Perdigão J. Dentin bonding as a function of dentin structure. *Dent Clin.* 2002 Apr 1;46(2):277-301.
- [160] Pashley DH, Tay FR. Aggressiveness of contemporary selfetching adhesives Part II: etching effects on unground enamel. *Dent Mater.* 2001;17:430-44.
- [161] Kanemura N, Sano H, Tagami J. Tensile bond strength to and SEM evaluation of ground and intact enamel surfaces. *J Dent.* 1999 Sep 1;27(7):523-30.
- [162] Perdigao J, Lopes L, Lambrechts P, Leitao J, Van BM, Vanherle G. Effects of a self-etching primer on enamel shear bond strengths and SEM morphology. *Am J Dent.* 1997 Jun;10(3):141-6.
- [163] Weerasinghe DS, Nikaido T, Wettasinghe KA, Abayakoon JB, Tagami J. Micro-shear bond strength and morphological analysis of a self-etching primer adhesive system to fluorosed enamel. *J Dent.* 2005 May 1;33(5):419-26.
- [164] Van Meerbeek, B, Peumans, M, Poitevin, A, Mine, A, Van Ende, A, Neves, A, et al.. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater* 2010;26(2):e100-21.

-
- [165] Hannig M, Reinhardt KJ, Bott B. Self-etching primer vs phosphoric acid: an alternative concept for composite-to-enamel bonding. *Oper Dent*. 1999 May 1;24:172-80.
- [166] Zafar MS, Ahmed N. The effects of acid etching time on surface mechanical properties of dental hard tissues. *Dent Mater J*. 2015 May 28:2014-083.
- [167] Rominu RO, Rominu M, Rusu LC, Sinescu C, Ardelean L, Pop DM, Petrescu EL, Negrutiu ML. The Effect of Surface Treatment on Human Enamel—a SEM/EDAX Study. *Revista De Chimie*. 2011 Sep 1;62(9):937-40.
- [168] Sabel N, Dietz W, Lundgren T, Nietzsche S, Odelius H, Rythén M, Rizell S, Robertson A, Norén JG, Klingberg G. Elemental composition of normal primary tooth enamel analyzed with XRMA and SIMS. *Swed Dent J*. 2009 Jan 1;33(2):75-83..
- [169] Kodaka T, Debari K, Kuroiwa M. Mineral content of the innermost enamel in erupted human teeth. *Microscopy*. 1991 Feb 1;40(1):19-23.
- [170] Ferreira RI, Haiter-Neto F, Tabchoury CP, Bóscolo FN. In vitro induction of enamel subsurface demineralization for evaluation of diagnostic imaging methods. *Journal of Applied Oral Science*. 2007 Oct;15(5):392-8.
- [171] Davidson CL, Hoekstra IS, Arends J. Microhardness of sound, decalcified and etched tooth enamel related to the calcium content. *Caries research*. 1974;8(2):135-44.
- [172] Xu C, Reed R, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. The distribution of carbonate in enamel and its correlation with structure and mechanical properties. *Journal of materials science*. 2012 Dec 1;47(23):8035-43.
- [173] Pan H, Darvell BW. Effect of carbonate on hydroxyapatite solubility. *Crystal Growth & Design*. 2010 Feb 3;10(2):845-50.
- [174] Menčík J. Uncertainties and errors in nanoindentation. *Nanoindentation in Materials Science*. 2012 Oct 17;54:53-86.
- [175] Teaford MF. What do we know and not know about diet and enamel structure. *Evolution of the human diet: the known, the unknown, and the unknowable*. 2007:56-76.

-
- [176] Dorminey JC, Dunn WJ, Taloumis LJ. Shear bond strength of orthodontic brackets bonded with a modified 1-step etchant-and-primer technique. *Am J Orthod Dentofac.* 2003 Oct 1;124(4):410-3.
- [177] M.F. Ashby and D.R.H. Jones: *Engineering Materials: An Introduction to Their Properties and Applications*, 1st ed. (Pergamon Press, Oxford, UK, 1985) p. 25.
- [178] I. Spears: A three-dimensional finite element model of prismatic enamel: A reappraisal of the data on the Young's modulus of enamel. *J. Dent. Res.* 1997 Oct;76(10):1690-7.
- [179] Warshawsky H. Organization of crystals in enamel. *The Anatomical Record.* 1989 Jun;224(2):242-62.
- [180] Finke M, Hughes JA, Parker DM, Jandt KD. Mechanical properties of in situ demineralised human enamel measured by AFM nanoindentation. *Surf Sci.* 2001;491:456–67.
- [181] Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Arch Oral Biol.* 2002;47:281–291.
- [182] S. Poolthong: Determination of the mechanical properties of enamel, dentine and cementum by an ultra micro-indentation system. Ph.D. Thesis. University of Sydney, Sydney, Australia (1998).
- [183] Chan YL, Ngan AH, King NM. Use of focused ion beam milling for investigating the mechanical properties of biological tissues: a study of human primary molars. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2009 Aug;2(4):375-83
- [184] Mahoney E, Holt A, Swain M, Kilpatrick N. The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth: an ultra-micro-indentation study. *J Dent.* 2000 Nov;28(8):589-94.
- [185] Wang LJ, Tang R, Bonstein T, Bush P, Nancollas GH. Enamel demineralization in primary and permanent teeth. *Journal of dental research.* 2006 Apr;85(4):359-63.
- [186] Lippert F, Parker DM, Jandt KD. Susceptibility of deciduous and permanent enamel to dietary acid-induced erosion studied with atomic force microscopy nanoindentation. *Eur. J. Oral Sci.* 2004 Feb;112(1):61-6.

- [187] Lussi A, Kohler N, Zero D, Schaffner M, Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model. *Eur. J. Oral Sci.* 2000 Apr;108(2):110-4.

10. Prilog

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Карактеризација структуре и адхезивна својства глеђи
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Медицински факултет Нови Сад б) Istraživačko- razvojnom institutu za informacione tehnologije biosistema - Institutu BioSens в)
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Ova disertacija je deo rada projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u okviru projekta: Istraživanje i razvoj metoda modeliranja i postupaka izrade dentalnih nadoknada primenom savremenih tehnologija i računarom podržanih sistema TR 35020.
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p><u>Докторска дисертација</u></p> <p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни</p> <p>б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови</p> <p>б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи</p> <p>в) генотипови: навести врсту _____</p> <p>г) административни подаци: навести врсту _____</p>

д) узорци ткива: хумани зуби

ђ) снимци, фотографије: СЕМ микрофотографије

е) текст: литература

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: експериментални подаци

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека .xlsx .xls

б) SPSS фајл, датотека .sps

в) PDF фајл, датотека .pdf

г) Текст фајл, датотека .docx

д) JPG фајл, датотека .jpeg .png

е) Остало, датотека .pzfx

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли 30

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је _____

б) варијабле које се више пута мере односе се на _____

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, наноиндентација и СЕМ-ЕДС

анализа _____

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, прикупљање података из

литературе _____

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

наноиндентација и СЕМ-ЕДС

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан применом статистичких тестова, одбацивањем екстрема и валидацијом резултата _____

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је изведена поређењем добијених података са литературним подацима

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијум докторских дисертација на Универзитету у Новом Саду

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) *Не*

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклопити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање
Комисија за етичност клиничких истраживања на човеку, 07.07.2017

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- а) јавно доступни
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Кристина Вицко, kristina.vicko@yahoo.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Кристина Вицко, kristina.vicko@yahoo.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Кристина Вицко, kristina.vicko@yahoo.com