

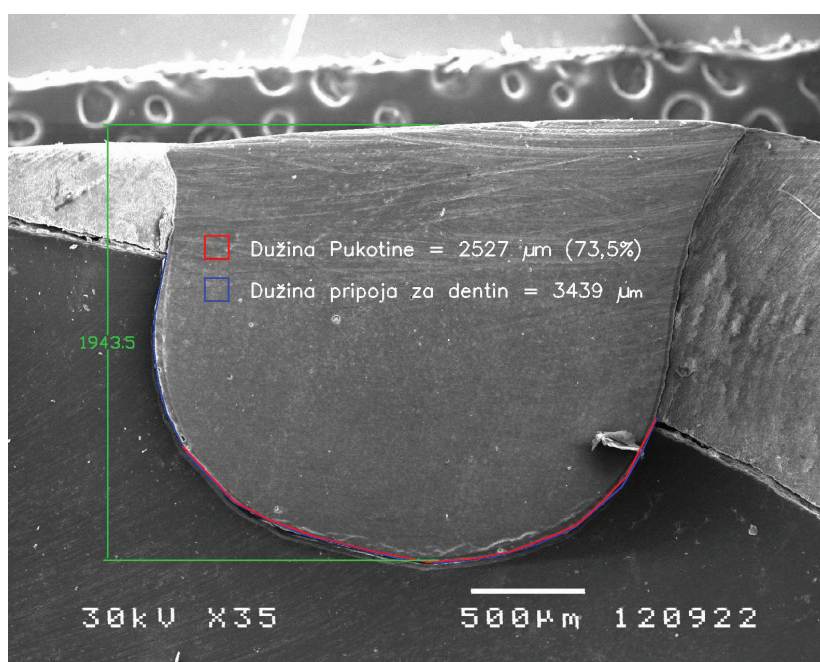


UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Stefan D. Dačić
**ULOGA SVETLOSNO POLIMERIZUJUĆIH I
ADHEZIVNIH TEHNIKA U PROCENI MARGINALNE
ADAPTACIJE KOMPOZITNIH SMOLA ZA GLEĐ I
DENTIN**

Doktorska disertacija



Mentor: Prof. dr Goran Radičević

NIŠ, 2013.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

Prof. dr **Slavoljub Živković**, predsednik sa Stomatološkog fakulteta u Beogradu

Prof. dr **Goran Radičević**, mentor i član sa Medicinskog fakulteta u Nišu

Prof. dr **Ninoslav Đelić**, član sa Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu

Doc. dr **Goran Tošić**, član sa Medicinskog fakulteta u Nišu

Doc. dr **Aleksandar Mitić**, član sa Medicinskog fakulteta u Nišu

Datum odbrane: _____

Naučni doprinos doktorske teze

Adhezivna veza kompozitnih sistema i gleđi i dentina analizirana je na uzorku humanih zuba “*in vitro*”.

Ukupan uzorak činilo je četrdeset zuba. Dvadeset zuba je korišćeno za ispitivanje pripoja kompozitnih smola za gleđ, gde je analiziran ceo obim restauracije na površini krunice zuba.

Preostalih dvadeset zuba služilo je da se ispita marginalni pripoj materijala za gleđ i dentin na sagitalnim presecima zuba kroz restauracije (četrdeset preseka). Upotreba humanih zuba u ispitivanjima adhezivne veze predviđena je protokolom ISO TR11405.

Genotoksični efekat nedovoljno fotopolimerizovanih kompozitnih smola na ćelije zubne pulpe utvrđivan je ispitivanjem primarnih oštećenja DNK humanih limfocita u Komet testu.

Ispitivanja genotoksičnosti rađena su na humanim limfocitima iz krvi dobrovoljnih davalaca (Odobrenje Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu Br. 01-890-13).

Cilj ovog rada je bio da se kvantitativno i kvalitativno proceni veza kompozitnih smola za gleđ i dentin i utvrde vrednosti marginalnog indeksa (MI) u gleđi i dentinu nakon primene dve tehnike fotopolimerizacije kompozita i dva adhezivno-kompozitna sistema. Proveravan je i uticaj fotopolimerizacije na genotoksičnost kompozitnih adheziva.

Na osnovu dobijenih rezultata ovog istraživanja izvedeni su zaključci koji predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti istraživanja dentalnih materijala.

1. Kod gleđi su utvrđene značajne razlike u pripoju kompozitnih restauracija za gleđno tkivo u odnosu na tehniku osvetljavanja i vrstu adhezivno kompozitnog materijala (adhezivnu tehniku). Bolji marginalni pripoj za gleđ obezbeđuje postepena, ili *soft start* fotopolimerizacija, i totalno nagrizajuća *etch and rinse* adhezivna tehnika uz korišćenje *Adper Single Bond 2* i *Filtek Ultimate* (ASB/FU) materijala. Najmanja prosečna širina marginalne pukotine oko kompozitnih restauracija u gleđi i najmanji marginalni indeks (MI) gleđi utvrđeni su kod *soft start* osvetljavanja ASB/FU materijala.
2. Kod dentina nisu utvrđene značajne razlike u pripoju kompozitnih restauracija za dentinsko tkivo u odnosu na tehniku osvetljavanja, ali su utvrđene značajne razlike u odnosu na vrstu adhezivno kompozitnog materijala (adhezivnu tehniku).

Što se tiče dentina, takođe je utvrđena kvalitetnija mikromehanička veza kompozitnih smola za dentin uz totalno nagrizajuću *etch and rinse* adhezivnu tehniku i primenu ASB/FU materijala, kada je izmeren i najmanji marginalni indeks (MI), uz *soft start* osvetljavanje. Međutim, najmanja prosečna širina marginalne pukotine uz dentin utvrđena je kod istog materijala ali uz standardno osvetljavanje. Time je potvrđen značaj MI u preciznijem određivanju kvaliteta pripoja materijala za zubna tkiva. MI obuhvata vrednosti i širine i dužine pukotine oko restoracija i ne mora da se slaže sa procenom kvaliteta pripoja samo na osnovu jednog parametra.

3. Nakon fotoaktivacije kompozitnih adheziva u trajanju od 0, 10 i 40 sek, standardnim halogenim svetlom, utvrđena je statistički značajna razlika genotoksičnih efekata adheziva u odnosu na dužinu njihovog osvetljavanja.

4. Pri fotopolimerizaciji od 0 sek. i 10 sek. postoje genotoksični efekti, s tim da su značajniji za vreme fotopolimerizacije od 0 sek. (odnosno kod neosvetljenih adheziva) u odnosu na fotopolimerizaciju od 10 sek.

5. Pri fotopolimerizaciji adheziva u trajanju od 40 sek. ne postoje značajni genotoksični efekti, detektovani Komet testom.

6. Na osnovu rezultata može se zaključiti da polimerizacija od 10 sek. nije dovoljna da bi se neutralisao genotoksični potencijal dva ispitivana adheziva.

Glavni doprinos disertacije

Veoma je važna pravilna i kompletna fotopolimerizacija kompozitnih smola radi smanjenja njihove zapreminske kontrakcije, povećanja otpornosti na trošenje kao i zbog eliminacije njihove citotoksičnosti i genotoksičnosti. Utvrđeno je da na kvalitet pripoja kompozita za tvrda zubna tkiva, odnosno formiranje što manje ivične pukotine, više utiče način kondicioniranja kaviteta, odnosno tip korišćenog adheziva nego tehnika osvetljavanja.

U ovom istraživanju se takođe, na osnovu dobijenih rezultata, može zaključiti da fotopolimerizacija kompozitnih adheziva u trajanju od 10 sekundi nije dovoljna da bi se neutralisao njihov genotoksični potencijal. Duža fotoaktivacija adheziva (40 sek.) u odnosu na preporuke proizvođača (10 sek.) doprinosi otklanjanju njihove genotoksičnosti.

Istraživanje je sprovedeno na Klinici za stomatologiju u Nišu, Institutu za Biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu i Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu.

SKRAĆENICE I IZRAZI

Adhezivno-kompozitni materijal korišćen u istraživanju:

Adper Single Bond 2 / Filtek Ultimate (FSB/FU)

Adper Easy One / Filtek Ultimate (FEO/FU)

Tehnike osvetljavanja halogenim svetlom, u istraživanju:

Standardno osvetljavanje (*HIP – High Intensity Power*) – 800mW/cm² (40 sek.)

Sof start osvetljavanje (*SOF*) – 400mW/cm² u trajanju 10 sek. + 800mW/cm² (ukupno 60 sek.)

Četiri eksperimentalne grupe restauracija:

Adper Single Bond 2 – Filtek Ultimate – HIP

Adper Easy One – Filtek Ultimate – HIP

Adper Single Bond 2 – Filtek Ultimate – SOF

Adper Easy One – Filtek Ultimate – SOF

Skraćenice za površinski aktivne monomere u adhezivima i kompozitnim smolama:

HEMA – Hidroksietil metakrilat

4 META – 4 metakrilooksietil trimetil anhidrid

TGDMA – trietilen glikol dimetakrilat

Bis GMA – Bisfenol A diglicidil metakrilat

UDMA – Uretan dimetakrilat

GDMA – glicerol dimetakrilat

PMDM – piromelitic acid dietilmetakrilat

NPG – N fenildicin

NTG GMA – N tolglicin glicidil metakrilat

DMA Dimetakrilatni monomer

BIS-EMA Bisfenol-A-etilmetakrilat

BIS-PMA Bisfenol-A-propil metakrilat

MDPB Antibakterijska komponenta u *self etch* adhezivu (12-metakriloil-oksi-dodecil-piridinium-bromide)

HEMA/TEG-DMA free adhezivni sistem i *etanol wet-bonding* – vlažno vezujuća tehnika u inoviranju *etch and rinse* adheziva.

10 MDP – (methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate)

Vrste fotopolimerizujućeg svetla:

Quartz tungsten halogen (QTH),

Light-emitting diode (LED),

Argon ion laser (AL),

Plasma arc curing (PAC).

SADRŽAJ

1. UVOD	9
2. PREGLED LITERATURE	11
2.1. Mehanizam adhezije za gleđ i dentin	11
2.2. Adhezivne tehnike i vrste adheziva	15
2.3. Kvantitativna i kvalitativna ispitivanja veze adhezivnih sistema za zubna tkiva	22
2.4. Kompozitne smole	25
2.5. Fotopolimerizacija, svetlosni izvori i tehnike	30
2.6. Citotoksičnost i genotoksičnost nedovoljno polimerizovanih kompozitnih smola	33
3. HIPOTEZE	36
4. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	37
5. MATERIJAL I METOD	38
5.1. Izbor adhezivnokompozitnih sistema	38
5.2. SEM analiza pripoja kompozita za gleđ i dentin	38
5.3. Komet test	42
6. REZULTATI	44
6.1. Rezultati kvantitativne SEM analize pripoja kompozitnih smola za gleđ (obim restauracija)	44
6.2. Rezultati kvantitativne mikromorfološke SEM analize pripoja kompozitnih smola za dentin	53
6.3. Rezultati kvalitativne mikromorfološke SEM analize pripoja kompozitnih smola za gleđ	64
6.4. Rezultati kvalitativne mikromorfološke SEM analize pripoja kompozitnih smola za dentin	68
6.5. Rezultati ispitivanja genotoksičnosti adheziva	73
7. DISKUSIJA	78
7.1. Diskusija materijala i metoda ispitivanja marginalnog pripoja u zavisnosti od fotopolimerizacije	78
7.2. Diskusija materijala i metoda ispitivanja marginalnog pripoja u zavisnosti od adhezivnog postupka	81
7.3. Diskusija materijala i metoda ispitivanja citotoksičnosti i genotoksičnosti nedovoljno polimerizovanih kompozitnih i adhezivnih smola	86
8. ZAKLJUČAK	93
Literatura	96
Sažetak	105
Abstract	107

1. UVOD

Kompozitni materijali danas mogu da nadoknade izgubljeno zubno tkivo uz potpune funkcionalne i estetske zahteve. Međutim, dugotrajnost kompozitnih ispuna je usko povezana sa kvalitetom veze za tvrde zubne strukture. Pravilan izbor adhezivno/kompozitnog sistema i dobra klinička tehnika su neophodni uslovi za postizanje kvaliteta vezivanja materijala za gleđ i dentin zuba. [1, 2]

Glavni problem svetlosno polimerizujućih kompozita je kontrakcija tokom polimerizacije. Naime, tokom ostvarivanja veze kompozitnih materijala, preko dentin adheziva, za zubne strukture nastaju inicijalni i rezidualni polimerizacioni stresovi duž zidova kaviteta, koji uzrokuju pojavu mikropukotine. [3, 4]

Brojna istraživanja su pokazala da početno svetlo smanjenog intenziteta obezbeđuje bolju marginalnu adaptaciju. Slabiji intenzitet svetla na početku polimerizacije omogućava bolju adaptaciju i tečenje materijala pre nego što dostigne tačku želiranja čime se smanjuje kontrakcioni stres i omogućava bolja marginalna adaptacija. [5, 6, 7, 8, 9, 10]

”*Soft start*” polimerizacija obezbeđuje početni period svetlosne aktivacije niskog intenziteta, a potom jačeg intenziteta čime se obezbeđuje bolji marginalni integritet i bez narušavanja mehaničkih osobina materijala. [6]

Ukoliko kompozitna smola ne primi dovoljnu količinu svetlosne energije određene talasne dužine iz aparata za osvetljavanje, obično dolazi do nepotpune polimerizacije monomera, slabije jačine veze, slabljenja mehaničkih osobina kompozita, mogućnosti oslobađanja nevezanih monomera u usnu duplju i pojave genotoksičnosti i citotoksičnosti. [11]

Kvalitet veze kompozita za tvrda zubna tkiva se najčešće procenjuje jačinom vezivanja ali i odsustvom pukotine po obodu restauracija. Ultrastruktura pripoja i odsustvo mikropukotine zavise kako od tehnike osvetljavanja kompozita tako i od adhezivnog postupka tokom restaurativne procedure. [12]

Za ostvarenje adhezije potrebna je priprema površine zuba kako bi se ostvario blizak kontakt adheziva i adherenta i omogućilo vlaženje gleđi i dentina adhezivom niske viskoznosti. Gledno-dentinski adhezivni materijali imaju ulogu posrednika u vezivanju i retenciji kompozitnih

materijala uz tvrda zubna tkiva. Adhezivne smole se koriste radi pojačanja retencije kompozita, smanjenja mikroproticanja i opadanja post-operativne osetljivosti zuba ispod kompozitnih restauracija. [1, 13, 14, 15, 16, 17, 18]

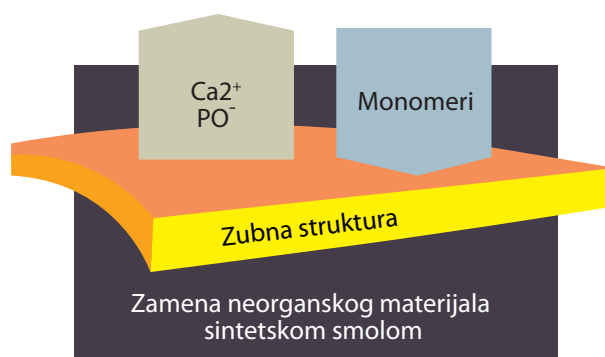
Međutim, nepolimerizovani monomeri iz adheziva mogu da difunduju u pulpu direktno kroz dentinske kanaliće i da izazovu genotoksični i citotoksični efekat na pulparnim ćelijama. HEMA i TEGDMA su glavni (co) monomeri koji se oslobađaju iz materijala na bazi smola, posle njihovog očvršćavanja. Nažalost, malo se zna i o efektima različitih metoda osvetljavanja na citotoksičnost kompozita. Odgovarajuća jačina i vreme osvetljavanja su od velike važnosti za kompletnu polimerizaciju kompozitnih smola kao i za dugotrajnost kompozitnih restauracija. Neadekvatno osvetljene kompozitne i adhezivne smole mogu imati toksični efekat na pulpno tkivo usled otpuštanja neizreagovalih monomera. [19, 20, 21, 22, 23]

I pored intenzivnog proučavanja fotopolimerizujućih tehnika i adhezivnih sistema, odnosno vezujućih mehanizama između kompozita i zubnog supstrata, i dalje postoje klinički problemi usled raskidanja kontakta materijala i zuba. Iz tog razloga se intenzivno traga za jednostavnom, efikasnom i neškodljivom adhezivnom procedurom postavljanja kompozitnih restauracija.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. MEHANIZAM ADHEZIJE ZA GLEĐ I DENTIN

Osnovni princip adhezije za zubni supstrat bazira se na procesima razmene gde neorganski zubni materijal biva zamenjen sintetskom smolom. Ovaj proces obuhvata dve faze. Jedna faza se sastoji u uklanjanju kalcijum fosfata pri čemu nastaju mikroporoziteti na gleđnoj i dentinskoj zubnoj površini. Druga, takozvana faza hibridizacije, obuhvata infiltraciju i polimerizaciju smole unutar formiranih mikroporoziteta. Ovo dovodi do mikromehaničkog vezivanja koje je, u osnovi, bazirano na mehanizmima difuzije. Dok se mikromehaničko vezivanje smatra osnovom ostvarenja dobre veze u kliničkim uslovima, hemijska interakcija između funkcionalnih monomera i komponenata zubnog supstrata se dalje poboljšava. [13]



Slika 1. Mehanizam adhezije kompozitnih smola za tvrda zubna tkiva

Vezivanje za gleđ i dentin, pored načina osvetljavanja kompozita i vrste restaurativnog materijala, zavisi od regionalnih varijacija u strukturi ovih tkiva, od dubine kaviteta, starosti tkiva i niza faktora vezanih za usnu duplju i žvakanje.

Dok neorganski hidroksiapatit čini preko 95% zapremine gleđi, kod dentina je ovaj procenat svega 45%. Takođe, za razliku od regularnih hidroksiapatitnih kristala u gleđi, dentinski hidroksiapatit je uklopljen u organski matriks koji se sastoji uglavnom od kolagena. Postoje regionalne varijacije i u gleđi i u dentinu. Regionalne varijacije dentina se ispoljavaju i u različitoj permeabilnosti – propustljivosti dentina, koja je različita na različitim lokacijama zuba. Vezivanje za gleđ i dentin otežava i prisustvo razmaznog ili zaostalog sloja, debris *smear*

layer koji je posledica zagrevanja površina pri sečenju tkiva. *Smear layer* je debljine 0,5–5µm i prekriva površine sečene gleđi i dentina kao i otvore dentinskih kanalića. Njegova debljina, izgled i sastav variraju u zavisnosti od instrumenta sečenja tvrdih zubnih tkiva. Iako funkcionira kao “difuziona barijera” koja smanjuje propustljivost dentina, ona se smatra nepoželjnom i zato se uklanja kako bi smola mogla da se veže za tkiva ispod nje.

Poboljšanje jačine veze za dentin pomoću adhezivne tehnike totalnog nagrizanja *etch and rinse* prvi je demonstrirao Fusayama sa sar. 1979. godine. Tako je ovaj adhezivni postupak najpre uveden u kliničku stomatološku praksu u Japanu i Americi. Totalno nagrizajući postupak podrazumeva specifičnu pripremu dentina koja se ogleda u sledećem. Nakon ispiranja kondicionera (kiselina) na dentin se nanosi prajmer koji sadrži jedan ili više hidrofilnih monomera smole. Molekuli prajmera kao što su: HEMA (hidroksi etil metakrilat), BPDPM (biphenil dimetakrilat) i 4 META (4 metakriloksietil anhidrid) sadrže dve funkcionalne grupe – hidrofilnu i hidrofobnu grupu. Hidrofilna grupa ima afinitet za vlažnu dentinsku površinu a hidrofobna ima afinitet za smolu. Prajmer vlaži i prodire u kolagensku mrežu dentina podižući je do originalnog nivoa. Prajmer, pored toga što vlaži dentin, povećava i površinsku energiju dentina. Tečna smola iz adheziva prodire u prajmerom pripremljeni dentin i formira sloj od kolagena i smole označen kao „smolom ojačana zona“, „smolom infiltrovani sloj“ ili „hibridni sloj“. Formiranje ovog hibridnog sloja prvi put je opisao Nakabayashi sa sar. 1982. godine i taj sloj se smatra osnovnim vezujućim mehanizmom mnogih savremenih adhezivnih sistema. [17]

Adhezivi prijanjaju uz tvrda zubna tkiva mikromehanički (prodorom jednog materijala u drugi), hemijski (jonskim, kovalentnim i vodonikovim vezama) i fizički (van der Waalsovima vezama). Zbog navedenog načina vezivanja adhezivni ispuni omogućavaju maksimalnu štednju tvrdog zubnog tkiva, minimalno invazivne preparacije, i popravke postojećih ispuna bez ponovnog otvaranja prethodno zatvorenih dentinskih tubulusa. Osim anatomske i funkcionalne nadoknade izgubljenog tvrdog zubnog tkiva, osiguravaju estetski optimalna rešenja i značajno proširuju indikacioni spektar konzervativnih zahvata.

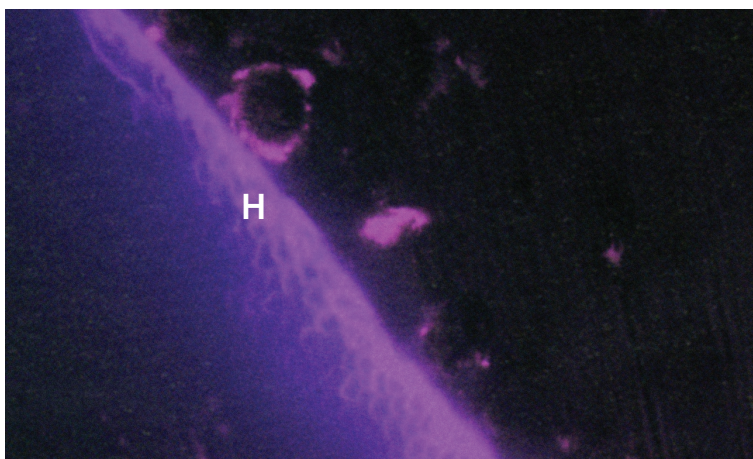
Sam koncept vezivanja smola uz tvrda tkiva počeo je uvođenjem postupka 30 sekundnog nagrizanja gleđi fosfornom kiselinom još 1955. godine. Buonocore je uočio mikromehaničku retenciju poli (metil-metakrilatne) smole (PMMA) u gleđi. Međutim, bez obzira na uspešnu adheziju u gleđi, za kompenzaciju volumetrijskog skupljanja kompozitnih materijala i usavršavanje izrade adhezivnih ispuna, nužno je bilo ostvariti i adheziju u dentinu. Kako su gleđ i dentin strukturno različiti, i postupci adhezije zavise od supstratu koji se tretira. [17, 18]

Adhezija u gleđi

Zbog izrazito visokog mineralnog sadržaja gleđ je ekstremno tvrda. Sadrži 95–96% kristala hidroksiapatita (kalcijum fosfata), 1–2% organskih materija (enamelina i amelogenina) i 3% vode. [16]

Građena je od prizmi prosečnog promera 5 μ m. Ima ih 20000–30000/mm². Unutar prizmi, kristali hidroksiapatita paralelni su sa smerom same prizme, dok su u interprizmatskom prostoru orijentisani u drugom smeru. Prizme počinju uspravno od gleđno-dentinskog spoja, a prema površini zuba čine ugao od 55–100°. Uspravno (vertikalno) u odnosu na površinu zuba su samo na vrhu kvržice i na uglu inter-aproksimalnih grebena.

Nagrizanje gleđi sprovodi se najčešće i najuspešnije 30–40% ortofosfornom kiselinom u trajanju od 30 sekundi. Nagrizanjem se razaraju kristali hidroksiapatita, odstranjuje se stara i hemijski zasićena površina gleđi, uklanja glikoproteinska ovojnica i zaostali sloj i tako povećava reaktivna površina. Selektivno rastapanje kristala hidroksiapatita praćeno je polimerizacijom smole koja se apsorbuje kapilarnim privlačenjem unutar stvorenih pora. Nastaju dva tipa uklještenja: „makro-zupci“ (*macro-tags*) na periferiji prizme i brojni „mikro-zupci“ (*micro-tags*) kao rezultat polimerizacije smole unutar sitnih stvorenih pora u srži svake prizme. [13, 17] Prodor adheziva u interkristalne prostore dovodi do formiranja hibridnog sloja (H) na gleđi. Njega je opisao i istraživao Frankenberger, 2005. Interkristalno i interprizmatski infiltrirana smola na površini gleđi čini hibridni sloj gleđi. [1] (Sl. 2.)



Slika 2. Kontakt između nagrizenih gleđnih prizmi i adheziva. Adheziv je obojen ljubičastom fluorescentnom bojom i može se videti njegova penetracija u inter prizmatske prostore (Banerjee i Watson, 2011.)

Adhezija u dentinu

Dentin je manje mineralizirano tkivo od gleđi, a sadrži 67% neorganske materije, 21% organske materije i 12% vode. Neorganski deo je uglavnom hidroksiapatit, a organski tip I kolagena. Dentin je po tvrdoći između gleđi i kosti i vrlo je elastičan, što je nužno za pravilno funkcionisanje zuba jer omogućava fleksibilnost i sprečava frakture lomljive gleđi.

Dentin je vrlo heterogene strukture. Građen je od gusto složenih dentinskih kanalića (tubulusa) koji sadrže citoplazmatske produžetke formativnih ćelija dentina – odontoblasta. Periodontoblastični prostor je ispunjen proteinskom intratubulusnom tečnošću, intratubulusnim depozitom kolagenih vlakana i minerala. U pojedinim kanalićima postoje i mehanoreceptori nervnih

završetaka. Prosečan broj tubulusa varira od 65000/mm², neposredno uz pulpu, do 15000/mm² uz gleđno-dentinski spoj. Promer tubulusa varira od 2.5 μm uz pulpu do 0.9 μm uz gleđno dentinsku granicu.

Dentinski tubulusi sadrže i ogranke koji se odvajaju svakih 1–2μm pod uglom od 45°, a promera su 300–1000nm. Unutrašnjost tubulusa prekrivena je intratubulusnim dentinom koji gradi visoko mineralizovan zid debljine 45nm uz pulpu i 750nm uz gleđno dentinsku granicu. Navedeni parametri jako utiču na permeabilnost dentina s obzirom na udaljenost od pulpe. Važno je poznavanje razlike u histološkoj građi primarnog, sekundarnog, tercijarnog, intratubulusnog, intertubulusnog, interglobularnog i sklerotičnog dentina. [17]

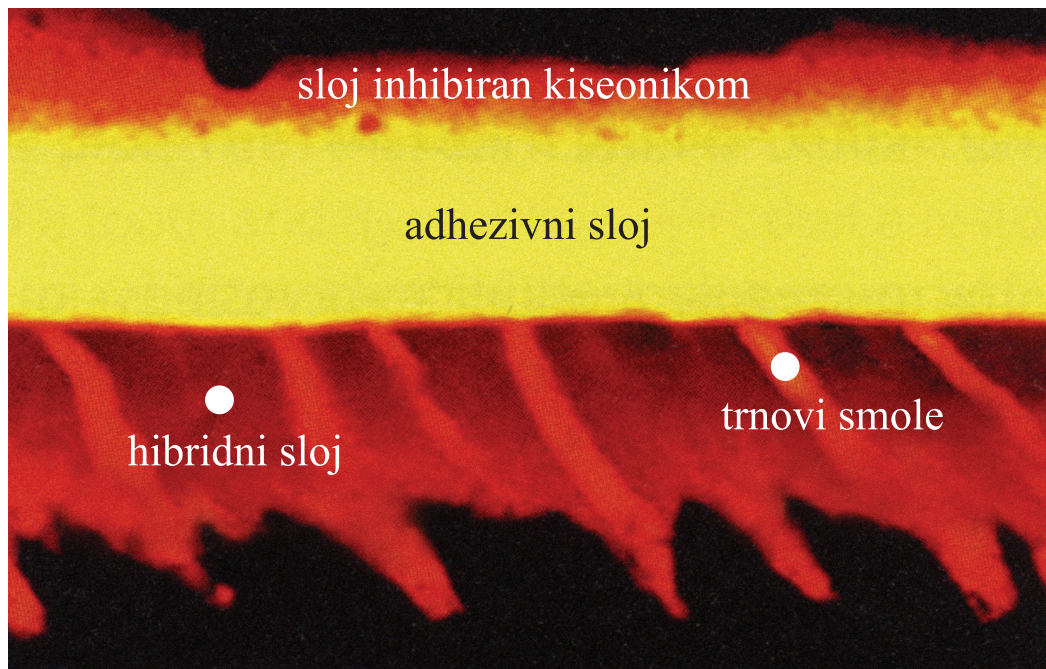
Lumen tubulsa je ograničen visoko mineralizovanim *peritubulusnim* dentinom, koji se još naziva i *intratubulusni* dentin. On je izgrađen uglavnom od kristala apatita sa neznatnim sadržajem organskog matriksa. Tubulusi su razdvojeni *intertubulusnim* dentinom, koji je sastavljen od mreže vlakna kolagena tipa I, koja je ojačana kristalima apatita. Količina intertubulusnog dentina varira u zavisnosti od lokacije. Kristali apatita u dentinu su približnih dimenzija 5x30x100nm, i znatno su manji nego u gleđi a sadrže 4–5% karbonata u odnosu na hidroksiapatit. Manje dimenzije kristala, prisustvo kanalića i visok sadržaj karbonata čine dentin velikim i aktivnim područjem. Procenat površine dentinskih kanalića iznosi 22% u blizini pulpe, do 1% u blizini gleđno-dentinske granice. Područje intertubulusnog matriksa takođe varira od 12% u predentinu do 96% u blizini gleđno-dentinske granice, dok sadržaj peritubulusnog dentina ide od preko 60% do 3% u blizini gleđno-dentinske granice. [24] Vezivanje za dentin je mikromehaničko i hemijsko. Primarni mehanizam vezivanja kompozitnih smola za dentin je mikromehanički i baziran je na difuziji smole u tubuluse, infiltraciji eksponirane kolagene mreže smolom i formiranju hibridnog sloja dentina. Kvalitet veze zavisi od vlažnosti površine dentina, od koncentracije i aplikacije kiseline i načina polimerizacije kompozita.

Hibridni sloj je definisao Nakabayashi kao interdifuzijsko područje koga čine smola, kolagena vlakna i delimično demineralizovani intertubulusni i intratubulusni dentin. Za stvaranje hibridnog sloja potrebna je priprema dentinske površine uklanjanjem ili otapanjem zaostalog sloja i demineralizovanje dentina (nagrizanjem ili kondicioniranjem). Sledi natapanje ogoljene kolagene mreže polimerizujućim hidrofilnim monomerima (*priming* – osnovni premaz; promoter adhezije) i konačni, hidrofobni adhezivni premaz (*bonding*) koji ostvaruje potpunu infiltraciju međukolagenih pora smolom.

Rezultat ovakvog pristupa u tri odvojene faze ili, čak, spajanje faza, je formiranje hibridnog sloja (nano retencija), i smolastih zubaca – trnova smole (mikro retencija) (Sl. 3.) [16]

Opisuju se tri specifične ultramorfološke promene kao rezultat hibridizacije dentina monomerom: obložena kolagena vlakna poput „čupavog tepiha“, smolasti zupci koji hermetiski zatvaraju pulpo-dentinski kompleks i mikro-smolasti zupci, odnosno lateralna tubulusna hibridizacija. Na taj način dolazi do pomirenja hidrofilnog dentina i hidrofobne restaurativne kompozitne smole. [17]

Smatra se da hibridni sloj može da deluje i kao elastični odbojnik koji apsorbuje stres koji se javlja pri polimerizaciji i na taj način sprečava nastanak marginalne pukotine. [17]



Slika 3. Fluorescentna mikrografija pokazuje penetraciju crveno obojenog prajmera u kolagenu mrežu i dentinske kanaliće, uz formiranje hibridne zone oko $15\mu\text{m}$ (nano retencija) kao i trnova smole (mikro retencija). Žuto obojeni adheziv koristi sloj inhibiran kiseonikom da omogući adheziju kompozita (Banerjee i Watson, 2011.)

2.2. ADHEZIVNE TEHNIKE I VRSTE ADHEZIVA

Upotreba restaurativnih kompozitnih materijala i adhezivnih tehnika predstavlja revolucionarni napredak dentalne prakse. Pošto kompoziti nisu adhezivni za tvrda zubna tkiva upotreba vezujućih agenasa (adheziva ili adhezivnih sistema) je deo svakodnevne stomatološke prakse.

Vezivanje za gleđ je pokazalo ogroman klinički uspeh, dok je vezivanje za dentin nepredvidljivo po pitanju dugotrajnosti i integriteta spoja (*interfacial integrity*). Dentin ima kompleksnu biološku strukturu. Novi adhezivni sistemi stvaraju relativno visoku jačinu veze za vlažan ili suvi dentin, uz kompletno ili delimično uklanjanje razmaznog sloja (*smear layer*). Jačina veze može da varira u zavisnosti od unutrašnje vlage (*intrinsic wetness*), regiona dentina i adhezivnog sistema. [14, 25]

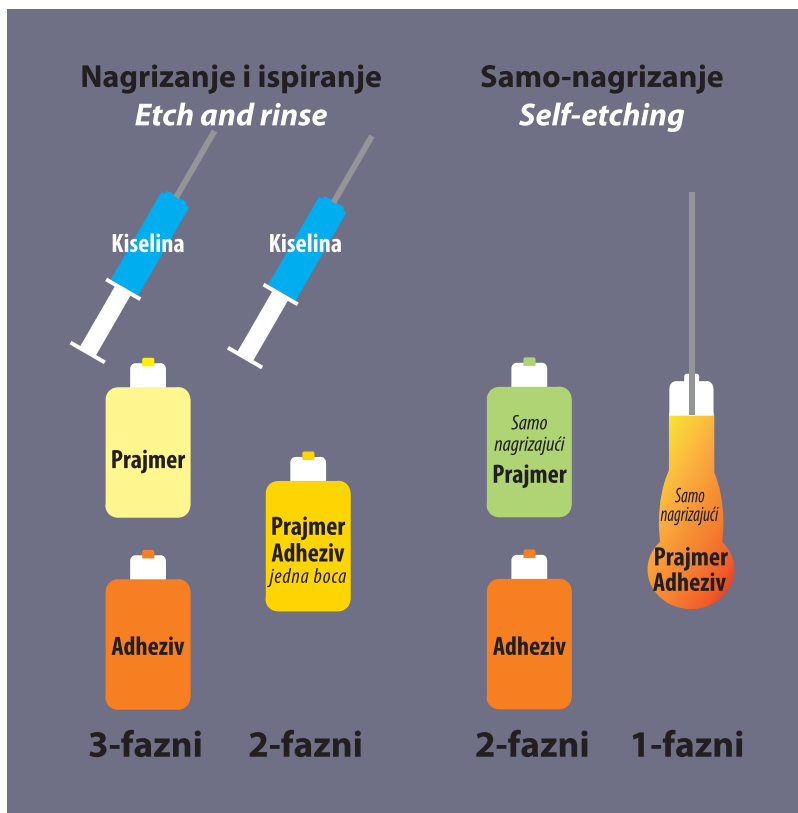
Moderni adhezivni sistemi izgledaju kao film koji se jednostavno namaže četkicom na zub. Realno, to su sofisticirani i komplikovani hemijski sistemi koji reaguju sa različitim molekularnim strukturama dentina i gleđi i sa kompozitnom restaurativnom smolom. Pravilna upotreba i dobra klinička tehnika su neophodni uslovi za postizanje najbolje efikasnosti vezujućeg sistema i restauracije uopšte.

U kliničkim uslovima, zaostali sloj na površini sečenih tvrdih zubnih tkiva je kontaminiran bakterijama i pljuvačkom. Sa ciljem otklanjanja *smear layer* preporučuje se određeni stepen nagrivanja. Rani nekiseli adhezivi nisu zadovoljili uglavnom zato što nisu prodirali dovoljno duboko i nisu omogućavali prodor bonda u intaktni dentin ispod razmaznog sloja.

Kako opisuje Van Meerbeek [15] postoje dve opcije: 1. uklanjanje *smear layer* pre nanošenja bonda, pomoću *etch and rinse* procedure ili 2. korišćenje adheziva koji prodiru kroz *smear layer* i ugrađuju se u ovaj sloj primenom *self-etch* postupka. Kod obe opcije, mikromehanička veza je osnovni mehanizam adhezije za gleđ i dentin. Blagi *self-etch* adhezivi deluju površinski na gleđ i dentin, ostavljajući dovoljno raspoloživog hidroksiapatita za dodatnu hemijsku interakciju, slično vezujućem mehanizmu glas jonomer cemenata. [15]

Difuzija je primarni mehanizam kojim se ostvaruje mikromehanička retencija kompozita za zubna tkiva. Nedavno je otkriveno više dokaza važne uloge dodatne hemijske interakcije na kontaktu zuba sa biomaterijalom, što se posebno odnosi na stabilnost veze. [26, 27]

Većina savremenih adhezivnih sistema oslanja se na koncept potpunog nagrivanja što predrazumeva zasebne faze nagrivanja i ispiranja (*etch and rinse tehnika*). Mogu se nanositi u tri konsektivne faze: nagrivanje kiselinom, osnovni premaz – prajmer i konačni premaz – adheziv. Prva faza je nagrivanje i ona uključuje nanošenje kiseline koja demineralizuje površinski dentin eksponirajući kolagenu mrežu u dubini od 3–5µm. Druga faza je aplikacija prajmera –



Slika 4. Podela etch and rinse adheziva na tro-fazne i dvo-fazne sisteme; podela self etch adheziva na dvofazne i jednofazne sisteme

promotera adhezije. Prajmer sadrži polimerizujuće, hidrofилne monomere rastvorene u acetonu, vodi ili alkoholu. Nosi ih kroz nano-kanale vlažne kolagene mreže i stvara zasebni omotač oko svakog kolagenog vlakna. Nežnim izduvavanjem površine premazane prajmerom, uklanja se rastvarač i zaostaje sjajan film na površini. Konačni postupak (treća faza) je nanošenje hidrofobne smole, adheziva u svrhu završnog popunjavanja međukolagenih pora. [17]

Radi pojednostavljivanja postupka nastali su adhezivi sa spojenom fazom prajmera i adheziva u jednom rastvoru, bočici „one-bottle, uz zasebno početno nagrizanje i ispiranje. U ovom slučaju je važno natapanje kolagene mreže monomerom, i stvaranje dovoljno debelog smolastog sloja (adhezivnog sloja) na vrhu hibridnog sloja da bi se omogućio „koncept elastičnog vezivanja“. Ovaj se problem rešava višestrukim nanošenjem acetonskih adheziva ili upotrebom nano-punjenih adheziva kako bi se postigla jednoličnost hibridnog sloja, i poboljšala stabilnost i trajnost veze. [17]

***Etch and rinse* postupak i vrste adheziva**

Sve kategorije adheziva povezane su sa mehanizmom hibridizacije. Hibridni sloj (HS) je produkt procesa mikromehaničkog povezivanja koji uključuje demineralizaciju, infiltraciju i stvaranje polimera.

Etch and rinse adhezivi se prepoznaju po početnoj nagrizajućoj ili kondicionirajućoj fazi, praćenju fazom kompulsivnog ispiranja. Često se zovu „total-etch“ adhezivi. Ovaj termin je manje pogodan jer *self-etch* adhezivi takođe nagrizaju zubna tkiva i nanose se simultano na gleđ i dentin.

Nagrizajuća faza otklanja *smear layer* i čepove iz dentinskih kanalića, stvarajući nagrižene jamice u gleđi i demineralizujući dentin sa ciljem formiranja mikroretencione površine. Tro-fazni *etch and rinse* sistemi sastoje se od tri odvojene aplikacione etape (nanošenje kondicionera, prajmera i adhezivne smole). U cilju pojednostavljivanja, razvijeni su dvo-fazni *etch and rinse* sistemi koji kombinuju prajming i bonding etapu u jednu; ovi sistemi se označavaju kao *one bottle* adhezivi. Tro-fazni i dvo-fazni *etch and rinse* adhezivi imaju sličan adhezivni mehanizam.

U okviru istraživanja ove doktorske disertacije korišćen je *Adper Single Bond 2*: voda-etanol, dvofazni vlažno vezujući *etch and rinse* adheziv. Svetlosno aktivirajući agens adheziva sadrži 10% koloidalnih čestica punila veličine 5nm.

Vezivanje za gleđ se i dalje najbolje ostvaruje korišćenjem *etch and rinse* postupka. Nagrizanje 35% fosfornom kiselinom uklanja površinski sloj gleđi od nekoliko mikrometara i selektivno rastvara kristale hidroksiapatita unutar prizmatične i interprizmatične gleđi. Ovo povećava mikroskopsku hrapavost, površinu polja za vezivanje adheziva i energiju. Jednostavno nanošenje hidrofobnog bonding agensa dovodi do njegove efikasne infiltracije u svaku jamicu zahvaljujući kapilarnim silama. Nakon *in situ* polimerizacije, formiraju se mikro i makrotrnovi i oni su odgovorni za dugotrajno mikromehaničko vezivanje (*interlocking*) za gleđ tokom *etch and rinse* procedure. Ova veza za gleđ, ne samo što efikasno pečati (*sealing*) ivice restauracije već takođe štiti osetljiviju vezu ostvarenu sa dentinom i sprečava njenu degradaciju.

Adhesive	Sastojci	Batch#	Sastav	Način korišćenja	Proizvođač
Syntac Classic (3-fazni etch and rinse)	Kiselina	FS1814	36% fosforna kiselina	Nagrizati gled i dentin 15 s, ispirati, posušiti.	Ivocla Vivadent
	Prajmer	E52572	Maleinska kiselina TEGDMA, voda, acetone	Naneti prajmer u trajanju od 15 s, posušiti vazduhom.	Schaan
	Heliobond	E10061	Bis GMA, TEGDMA, UDMA	Naneti bond, raspršiti vazduhom, polimerizovati.	Principality of Liechtenstein
Solobond Plus (3-fazni etch and rinse)	Kiselina	26608	36% fosforna kiselina	Nagrizati 15 s, ispirati, posušiti.	Voco, Cuxhaveb, Germany
	Prajmer	29503	Voda, acetone, maleinska kiselina, fluoridi	Naneti, posušiti.	
	Adheziv	29503	Acetone, dime- takrilat, hidroksi metakrilat	Naneti, posušiti, polimerizovati	
OptiBond FL (3-fazni etch and rinse)	Kiselina	707583	37.5% fosforna kiselina	Nagrizati 15 s, ispirati, posušiti.	Kerr, Orange, CA, USA
	Prajmer	709322	HEMA, GPDM, MMEP, etanol, voda, inicijatori	Utrljati 30 s, posušiti.	
	Adheziv	709126	Bis-GMA, HEMA, GPDM, barijum-alu- minijum borosilikat	Naneti, posušiti, polimerizovati	
Admira Bond (2-fazni etch and rinse)	Kiselina	26608	36% fosforna kiselina	Nagrizati 15 s, ispirati, posušiti.	Voco
	Prajmer + Bond	25509	Acetone, dimetak- rilati, inicijatori, stabilizator (BHT)	Utrljati 30 s, posušiti, polimeri- zovati	
Single Bond (2-fazni etch and rinse)	Kiselina	7EJ	35% fosforna kiselina	Nagrizati 15 s, ispirati, posušiti.	3M ESPE, Seefeld, Ger- many
	Prajmer + Bond	1FW	BisGMA, HEMA, dimetakrilati, ko- polimer, inicijator 3-8% voda, etanol	Utrljati 30 s, posušiti, polimeri- zovati	
Single Bond 2 (2-fazni etch and rinse)	Kiselina	7EJ	35% fosforna kiselina	Nagrizati 15 s, ispirati, posušiti.	3M ESPE, Seefeld, Ger- many
	Prajmer + Bond	208826	BisGMA, HEMA, dimetakrilati, ko- polimer, inicijator 3-8% voda, etanol	Utrljati 30 s, posušiti, polimeri- zovati	

Tabela 1. Etch and rinse adhezivi (Preporučena fotopolimerizacija adheziva je 10 s.)

Vezivanje za dentin je i dalje komplikovani proces. Na dentinu fosforna kiselina otklanja *smear layer* i demineralizuje dentin do dubine 3,0–5,0 μ m, izlažući mrežu odnosno nosač (*scaffold*) kolagenih vlakana nakon rastvaranja hidroksiapatita. [29] Ogoljena kolagena vlakna reaguju

kao mikroretencionna mreža za mikromehaničko vezivanje monomera smole koja difunduje u nju i tu se polimerizuje formirajući hibridni sloj. Re-ekspanzija kolagene mreže i njen kolaps izazvan sušenjem vazduhom, nakon kondicioniranja je od velikog značaja za jačinu adheziva. Debljina hibridnog sloja ili dužina trnova smole mogu da igraju važnu ulogu u jačini veze. Zbog inertne prirode kolagenih vlakana i niskog afiniteta monomera za ogoljeni kolagen bez hidroksiapatita, prava hemijska adhezija između kolagena i metakrilatnih monomera nije očekivana. [13]

Loša adaptacija smole za kolagen ostavlja pukotine veličine nanometra koje, kako je dokazano, absorbuju srebro i predstavljaju „nanoleakage“ fenomen. [30] Ovaj proces se smatra primarno odgovornim za degradaciju veze. *In vitro* i *in vivo* istraživanja su ukazala da *etch and rinse* adhezivi mogu da ostvare visoki kvalitet veze i za gleđ i za dentin. Trofazni *etch and rinse* adhezivi često ostvaruju superiorniju vezu od dvo-faznih. Ovi zadnji imaju veću tehničku osetljivost od trofaznih adheziva jer je prosto neshvatljivo da jedna solucija kombinuje dve odvojene funkcije, prajmer i bond smolu. Takođe, tokom starenja integritet veze tro-faznih *etch and rinse* adheziva je bolji tako da oni ostaju „zlatni standard“ među adhezivima. [31]

Rastvor prajmera unutar *etch and rinse* adheziva je glavni faktor koji utiče na učinak vezivanja za tvrda zubna tkiva. Voda/etanol adhezivi pružaju oprastanje aplikacionih grešaka dok adhezivi na bazi acetona zahtevaju izazovniji „*wet-bonding*“, odnosno vlažno vezujuću tehniku.

Nova *etch and rinse* adhezivna tehnologija se zasniva na korišćenju ter-butanol rastvora^a (kod najnovijih dvofaznih *etch and rinse* adheziva). Rastvarač isparava slično kao etanol ali ima bolju stabilnost hemijske reakcije sa monomerima.

Inoviranje tro-faznog *etch and rinse* postupka je uvođenje „unidose“ aplikacionog sistema *etch and rinse* adheziva, *HEMA/TEG-DMA free* adhezivnog sistema i etanol *wet-bonding* ili vlažno vezujuće tehnike. [15] Ova „etanol – vlažno vezujuća tehnika“ dovodi do značajno bolje efikasnosti vezivanja od uobičajene „voda – vlažno vezujuće tehnike“. Aplikacija etanola omogućava hidrofobnim smolama bolju infiltraciju u ogoljenu kolagenu mrežu nastalu delovanjem fosforne kiseline. Očekuje se da ove hidrofobne smole smanje potencijal sorpcije vode na spoju i da poboljšaju stabilnost veze.

Karboksilne i fosforne grupe *etch and rinse* adheziva utiču da monomeri postanu hidrofilni i da funkcionišu kao donori protona, što omogućava jonsko vezivanje sa kalcijumom hidroksiapatita. [27]

Prednost totalno nagrizaćućih *etch and rinse* adheziva je zadovoljavajuće vezivanje za gleđ i dentin i dovoljna debljina hibridnog sloja, a nedostaci su osetljivost procedure, rizik od preteranog nagrivanja i neodgovarajućeg ispiranja, mogućnost ostavljanja presušenog ili prevlažnog dentina, rizik od pretankog sloja ili nedovoljno polimerizovanog sloja zbog inhibicije kiseonikom (adhezivi u jednoj bočici), i nedovoljnog prožimanja demineraliziranog dentina. [17]

***Self-etch* adhezivi**

Nastali su dodavanjem kiselih monomera u HEMA/voda adhezive. Oni ne zahtevaju odvojene *etch and rinse* faze, pošto sadrže kisele monomere koji simultano kondicioniraju i prajmuju

gled i dentin. Kao rezultat toga, rastvorena *smear layer* i demineralizovani produkti se ne ispiraju, već se ugrađuju u adhezivnu smolu.

Self-etch adhezivi mogu biti podeljeni prema broju aplikacionih faza na dvo-fazne i jedno-fazne „*oll in one*“ verzije. Takođe se mogu deliti na osnovu kiselosti (pH) na *mild* pH > 2, *intermediate* pH 1,5 i *strong* pH <1. [13]

Adhesive	Sastojci	Batch#	Sastav	Način korišćenja	Proizvođač
AdheSE (2-fazni self-etch)	Prajmer	E35881	Dimetakrilat, fosforno kiselinski akrilat, voda, stabilizatori	Naneti prajmer u trajanju 30 s, osušiti	Ivocla Vivadent
	Bond	E35881	Dimetakrilat, HEMA, silica, inicijatori i stabilizatori	Naneti bond, posušiti, polimerizovati	
ClarfilSE (2-fazni self-etch)	Samonagrizujućii prajmer	00191A	HEMA, hidrofilni dimetakrilat, 10-MDP, toluidin, kamforhinon, voda	Naneti prajmer u trajanju 30 s.	Kuraray Medical Inc, Tokyo, Japan
AdperPromt L-Pop (1-fazni self-etch, dvokomponentni sistem)	Adheziv Komponenta A	132629	Metakrilatidirani fosfati, svetlosno inicijatori, stabilizeri	Ponešati A i B komponentu, utrljati 15 s, ponoviti kada prvi sloj postane sjajan	3M ESPE
	Komponenta B	132629	Voda, fluoridi, stabilizator		
Hero III (1-fazni self-etch, dvokomponentni sistem)	Tečnost A	0209000043	HEMA, voda, etanol, 2.6-Di-tertbutil hidroksi toluen, nanoffiler	Ponešati tečnost A i B i naneti u trajanju 20 s, posušiti, polimerizovati	
	Tečnost B	0209000043	Pyro-EMA, PEM-F, UDMA, BHT, Camforkinon, EPD		
iBond (1-fazni self-etch, jednokomponentni sistem)	Tečnost	0100121	Aceton, 4-methacrylox yethyltrimellitic anhydride, glutaraldehide	Naneti dovoljan broj slojeva (3-5), posušiti, polimerizovati	Heraeus Kulzer, Donnagen, Germany
Adper Easy One (1-fazni self-etch, jednokomponentni sistem)	Tečnost	440569	HEMA, BisGMA metakrilatni fosforni estri, 1,6 heksanebiol dimetakrilat	Naneti adheziv u trajanju od 20 s, istanjiti, polimerizovati	3M ESPE, Seefeld, Germany

Tabela 2. *Self etch* adhezivi (Preporučena fotopolimerizacija adheziva je 10 s.)

U okviru istraživanja ove doktorske disertacije korišćen je *Adper Easy One*: voda-etanol, jedno fazni vlažno vezujućii *self etch* adheziv (sedma generacija self etch adheziva sa nano česticama).

Blagi – *Mild self-etch* adhezivi demineralizuju dentin površno formirajućii submikronski hibridni sloj, ostavljajućii hidroksiapatitne kristale oko kolagenih vlakana. Jaki – *Strong self-etch*

adhezivi stvaraju trnove smole unutar 3.0–5.0 μ m, i debeli hibridni sloj što podseća na kontakt-nu interakciju *etch and rinse* adheziva; sav hidroksiapatit je rastvoren unutar hibridnog sloja. Umereni – *Intermediate self etch* adhezivi imaju morfološke osobine između blagih i jakih *self-etch* adheziva.

Uprkos malom hibridnom sloju i odsustvu produžetaka smole (trnova), odnosno minimalnoj mikromehaničkoj retenciji, neki blagi *self etch* adhezivi dosežu zadovoljavajuću jačinu veze. Dodatna hemijska interakcija između monomera i rezidualnog (preostalog) hidroksiapatita može objasniti zadovoljavajuće vezivanje blagih *self-etch* adheziva. Ovakva interakcija *self etch* adheziva sa zubnim supstratom u najvećoj meri zavisi od vrste kiselog funkcionalnog monomera i eventualno od kompozicije adheziva. Posledica toga su velike varijacije sposobnosti vezivanja različitih *self-etch* adheziva, koji su trenutno dostupni.

Kod vezivanja za gleđ, jaki *self-etch* adhezivi se, uopšteno, bolje ponašaju od *self-etch* adheziva sa višim pH. Sa nekim blagim *self-etch* adhezivima se postiže visoka jačina i stabilnost veze; to se objašnjava dobrim hemijskim interakcionim potencijalom funkcionalnog monomera 10 MDP (*methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate*). Korišćenjem X-ray photoelectron mikroskopije (XPS) Yoshida i saradnici su pokazali da monomer 10 MDP prevazilazi vezujući potencijal 4-MET i Phenil-P monomera. Hidrolitička stabilnost samog monomera je takođe važna što se posebno odnosi na trajnost veze. [32, 33]

Ultrastrukturno, interakcija *self etch* adheziva sa gleđi je prilično plitka uz retko formirane mikrotrnove. Dok vezivanje za gleđ može ostati problem, posebno sa blagim *self-etch* adhezivima, vezivanje za dentin doseže iste rezultate sa onim postignutim pomoću zlatnog standarda tro-faznih *etch and rinse* adheziva. [13]

Nedavna ispitivanja su takođe pokazala dobre kliničke rezultate sa nekim *self-etch* adhezivima. [34, 35]

Samonagrizajući adhezivni *self etch* sistemi se baziraju na simultanom kondicioniranju i infiltriranju (*prajming*) demineralizirane gleđne i dentinske površine. Klinički pokazuju vrlo dobar uspeh jer ne zahtevaju postupak nagrizanja i ispiranja, čime se smanjuju greške koje nastaju pri aplikaciji i rukovanju s kiselinom, nisu osetljivi na uslove vlažnosti supstrata, što smanjuje postoperativnu preosetljivost i štede vreme. Objedinjenje dve početne faze u adhezivnom tretmanu moguće su zbog primene tzv. samonagrizajućih *prajmera*, baziranih na fosfatnim (PEN-TA, 10-MDP, HEMA-fosfat, di-HEMA-fosfat) ili polikarboksilnim monomerima i kiselinama (4-MET, metakrilatna polialkenoična kiselina, maleična i itakonična kiselina). Ovi adhezivi rastvaraju i delimično demineralizuju zaostali sloj, a s obzirom da se ne ispiraju s tretirane površine, nego se samo izduvavaju vazduhom, otopljeni zaostali sloj kao i kristali hidroksiapatita se ugrađuju u novonastali hibridni sloj. Kako kolagena vlakna nisu u potpunosti ogoljena, preostali hidroksiapatit služi kao receptor za hemijsku vezu fosfatnih ili karboksilnih grupa s funkcionalnim monomerima. Uz navedene prednosti, treba istaći da je kod *self etch* adheziva hibridni sloj tanji, a čepovi u tubulusima kraći.

Zbog ugradnje zaostalog sloja u hibridni sloj postoji namera dodavanja antibakterijske komponente (12-metakriloil-oksi-dodecil-piridinium-bromide – MDPB) u samonagrizajuće sisteme. [17]

Međutim, i dalje je problem kod primene *self etch* adheziva nedovoljna retencija kompozita za gleđ. Bez obzira na favorizovanje modernijih *self etch* adheziva, opšte je prihvaćen zaključak da se primenom totalno nagrizajućeg sistema (*etch and rinse*) ostvaruje bolja veza, odnosno bolji marginalni pripoj kompozita za gleđ. Primenom *etch and rinse* adheziva jačina veze smole za gleđ, merena po metodologiji Sano i sar. (η TBS-microtensile bond strength), može da iznosi i do 40 MPa. Nasuprot tome, kod samonagrizajućih sistema (*self etch*) utvrđena je slabija jačina veze za gleđ i iznosi oko 30 MPa [13]. Slabija jačina veze kod samonagrizajućih sistema se može objasniti formiranjem slabije mikroretencije u gleđi usled primene blago kiselih prajmera. Samonagrizajući prajmeri omogućavaju formiranje mikro trnova, dok makro trnovi smole nedostaju. Takođe se smatra da se prajmer trajno ugrađuje u zubnu površinu obzirom da se ne ispira vodom. Ovo utiče na slabiji kvalitet veze samonagrizajućih adhezivnih sistema za gleđ [13].

Nasuprot iznetim podacima o slabijoj vezi za gleđ, u odnosu na *etch-rinse* adhezive, *self-etch* adhezivi imaju brojne prednosti. Dokazano je da oni poboljšavaju efikasnost kliničkih procedura uz izostavljanje faze obaveznog ispiranja kod *etch and rinse* adheziva, smanjujući vreme sedenja pacijenta na stolici. Kondicionirajuća, ispirajuća i sušuća faza mogu biti kritične i teške za standardizaciju u kliničkim uslovima, eliminisane su kod *self-etch* adheziva. Tehnička osetljivost povezana sa vezivanjem za dehidrirani demineralizovani dentin je eliminisana, pošto više nisu potrebne faze ispiranja i sušenja. Kolaps kolagenske mreže je sprečen a monomeri infiltriraju demineralizovani deo. Teoretski, sprečena je nekompletna infiltracija smole. Pošto *smear layer* i *smear plugs* nisu uklonjeni pre *bonding* procedure, sprečeno je vlaženje dentina dentinskim fluidom iz kanalića a utvrđena je i smanjena postoperativna osetljivost. [15]

Ipak, teško je postići optimalni marginalni pripoj kompozitnih restauracija jednim istim adhezivom za dva različita tkiva kao što su gleđ i dentin. Iz tog razloga se i dalje traga za idealnom adhezivnom tehnikom koja bi se verovatno ogledala u kombinovanoj primeni dve posebne tehnike za gleđ i dentin.

2.3. KVANTITATIVNA I KVALITATIVNA ISPITIVANJA VEZE ADHEZIVNIH SISTEMA ZA ZUBNA TKIVA

Kontakt između restaurativnog materijala i zubnog supstrata mora biti morfološki perfektan kako bi se izbegla akumulacija plaka, sekundarni karijes ili pulparna oboljenja.

Procenjivanje kvaliteta ivica zubnih restauracija je važna u testiranju restaurativnih materijala ili novih aplikacionih tehnika.

Vršena su *in vitro* i *in vivo* istraživanja kvaliteta marginalnog pripoja. Većina istraživača je koristilo *in vitro* metode jer je tada moguća direktna procena.

In vitro metodi sa penetracijom boja podrazumevaju korišćenje 0,5-2% vodenog rastvora fuksina, anilin plavog, fluorescentnih boja, srebrnih boja i radioaktivnih izotopa. [12]

Skening elektron mikroskopska - SEM i transmisijna elektron mikroskopska - TEM proučavanja pružila su značajne informacije o tome na koji način se adhezivni sistemi vezuju za gleđ i dentin zuba.

Roulet i sar, 1989. [12] su prvi opisali metod kvantitativne analize marginalnog spoja restauracija za zubna tkiva pomoću posebnog kompjuterskog programa i sistema koji se priključuje za skening elektronski mikroskop (SEM). Ivice restauracije su trasirane pomoću digitizera na SEM ekranu kako bi se izvršila kvantitativna procena adhezivne veze materijal/zub. Pored merenja dužine marginalnog spoja, opisan je i način kategorisanja ivica i simultano obeležavanje dužine karakterističnog spoja, izraženo u procentima.

Van Meerbeek, 2003 [13] opisuje kompjutersko merenje dužine marginalnih pukotina na SEM mikrografijama kao semi- kvantitativno merenje, dok Frankenberger, 2005 definiše određivanje procenta dužine pripoja kompozitnih restauracija za gleđ i dentin, kao kvalitativnu analizu pripoja adhezivno-kompozitnih sistema [1].

Ivice restauracija pokazuju mnogo varijacija u svojoj morfologiji. Kvantifikacija kvaliteta ivičnog pripoja vršena je na različite načine.

Roulet i sar su, korišćenjem pet kriterijuma za karakterizaciju ivica, pronašli da razlika između dva merenja koja sprovede isti operater sa razmakom od 4 nedelje, iznosi 3%.

Pri merenjima je korišćena sledeća kategorizacija ivica: idealna ivica *perfekt margin*, marginalna pukotina *marginal opening*, prepunjenost *overhang*, nedopunjenost *underhang*, fraktura ivice restauracije *restoration margin fracture* i fraktura gleđne ivice *enamel margin fracture*.

Luo i sar, 2000. [2] su određivali oblike oštećenja i razlike marginalne mikromorfologije između uzoraka tri grupe kompomernih restauracija. Vršili su kvantitativno merenje kontakta korišćenjem analize slike (Quantimet 500+, leica Imaging System Ltd, UK) i količina pukotine oko restauracije bila je izražavana procentom (gap percentage /GP) kontakta materijala i zuba. Maksimalna širina pukotine (MG) beležena je radi izračunavanja marginalnog indeksa (MI) prema formuli:

$$MI = GP \times MG / 100.$$

Zaključili su, na osnovu urađenih merenja, da na kvalitet dentinsko-kompomernog kontakta značajno utiče metod kondicioniranja, odnosno da tretman kaviteta fosfornom kiselinom značajno poboljšava adheziju kompomera za dentin.

U drugom istraživanju, Luo i sar. 2002 [8] su vršili kvantitativnu procenu marginalne pukotine na presecima kompomernih restauracija, odnosno merenje dužine spoja sa pukotinom i dužine spoja bez pukotine i izražavanje ovih dužina u procentima. Takođe su vršili kvalitativnu procenu gleđnih ivica duž obima restauracija (kompjuterskom montažom SEM mikrografija) sa ciljem otkrivanja kohezivnih fraktura u gleđi. Rezultati su pokazali značajno manji procenat ivica sa pukotinom u dentinu kod kaviteta koji su kondicionirani 36% fosfornom kiselinom. Pošto su za fotopolimerizaciju kompomera koristili dve tehnike osvetljavanja i to pulsno aktivirajuću (postepenu) i konvencionalnu, dokazali su da postepeno osvetljavanje poboljšava integritet ivica restauracija jer su kod konvencionalne tehnike osvetljavanja vrlo često otkrivane marginalne frakture gleđi.

Frankenberger i Tay, 2005 [1] su procenjivali marginalni integritet dentinskih adheziva vezanih za gleđ i dentin, korišćenjem SEM I TEM mikrografija. Merili su dužinu ivica restauracija bez pukotine I izražavali je u procentima. Mezio-okluzalni (MO) kaviteti, sa aproksimalnim delom ispod cemento-gleđne granice (CEJ), su preparisani na ekstrahiranim humanim trećim molarima. Direktno kompozitne restauracije (Tetric Ceram) su vezivane pomoću tro faznih *etch-and rinse adheziva* (Syntac Classic, Solobond Plus, OptiBond FL), dvo faznih *etch-and rinse adheziva* (Admira Bond, Single Bond), dvo faznih *self etch adheziva* (AdheSe, Clearfil SE Bond), i jedno faznih *self etch adheziva* ("all in one" Adper prompt, Xeno III, iBond). Analizirane su marginalne pukotine upotrebom SEM i replika tehnike. Vezivni kontakti, pre termo mehaničkog opterećivanja (thermo mechanical loading TML), su takođe bili ispitivani.

U gleđi je identifikovan visok procenat ivica bez pukotine, za sve adhezive. Posle TML, *etch and rinse adhezivi* su pokazivali značajno veći procenat ivica bez pukotine (oko 90%) u komparaciji sa dvo faznim *self etch* (oko 75%) i all-in-one (oko 55%) adhezivima ($p < 0,05$). iBond nije kompletno nagrizao gleđ kroz gleđni *smear layer*. U dentinu, 89-100% ivica bez pukotine uočeno je inicijalno. Posle TML nije bilo statističkih razlika između *etch-and-rinse* (62-70%) i dvo faznog *self etch* (62-63%) adheziva ($p > 0,05$). *All-in one* adhezivi pokazivali su značajno manji procenat ivica bez pukotine (manje od 40%) u dentinu ($p < 0,05$) a posebno iBond, koji je pokazivao najgori marginalni integritet (15%). Prisustvo vodenih kanala unutar adheziva je bila posledica sorpcije vode dok su restauracije bile pod funkcionalnim stresovima.

Na osnovu dobijenih rezultata u ovom istraživanju izvedeni su sledeći zaključci. Gledno vezivanje je mnogo efikasnije kod nagrizanja fosfornom kiselinom. *Etch-and rinse* i dvo fazni *self-etch adhezivi* pokazivali su obećavajuću marginalnu adaptaciju za dentin i imali bolju kliničku prognozu od *all-in-one bonding* pristupa. Vezivanje za sečenu gleđ se razlikovalo prema vrsti korišćenih adheziva i to je objašnjeno na sledeći način.

iBond blagi adheziv, sve u jednom (*self etch* jedno komponentni sistem) nije kompletno rastvarao gleđni *smear layer* (debris) tako da se gleđni hibridni sloj kod njegove primene sastojao uglavnom od debrisa, sa nekompletnom i minimalnom nagrizenošću prizmatične gleđi ispod njega.

Xeno III (*self etch* dvokomponentni sistem) je izazivao blagi površinski efekat nagrizanja gleđnih kristala ali bez značajnog nagrizanja gleđnih prizmi. Ovaj adheziv je stvarao 1,5-3 μm debeo hibridni sloj u prizmatičnoj gleđi, koji se uglavnom sastojao iz interkristalne infiltracije, bez formiranja resa smole.

Adper Prompt (*self etch* dvokomponentni sistem) je dovodio do blago izraženog nagrizanja gleđnih prizmi tako da je stvarao 5-8 μm debeo hibridni sloj koji se uglavnom sastojao od interkristalne infiltracije, pošto je količina izraženog nagrizanja nedovoljna da stvori slobodne trnove smole. Adheziv je bio slab i mestimično odvojen od površine hibridnog sloja, formirajući pukotine između adhezivnog sloja i osnove-matrice.

Nasuprot tome, identifikovano je značajno nagrivanje gleđnih prizmi nakon primene fosforne kiseline, uz stvaranje hibridnog sloja debljine 8-10 μ m, kod trofaznog *etch and rinse* adheziva **Syntac Classic**. Njegov hibridni sloj se sastojao, kako od interkristalne infiltracije tako, i od formiranih resa smole.

Vezivanje za dentin je pokazalo da se konvencionalni sistemi sa odvojenim prajmerom i bonding agensom ponašaju bolje od pojednostavljenih sistema koji kombinuju funkcije prajmovanja i bondiranja, bez obzira na primenu nagrivanja i ispiranja ili samonagrivanja.

Funkcionalni testovi su jasno pokazali da se svi adhezivi, u početku, ponašaju vrlo dobro u pogledu kapaciteta da kompenzuju stresove kontrakcije koji nastaju tokom polimerizacije smole. Ovo se manifestovalo visokim procentom marginalnog pripoja bez pukotine *gap free margins*. Posle testa sa 100 000 ciklusa veza sa dentinom pokazala je prisustvo pukotine, tako da je spoj bez pukotine bio 85% ukupne dužine pripoja. Uzorci sa Single Bond pokazali su transudaciju vode iz dentina, što se videlo na SEM u vidu mehurića između adheziva i dentina. To je bio dokaz permeabilnosti adheziva.

Iako je nanoproticanje univerzalno prisutno u hibridnom sloju dentina kod svih sistema sa nagrivanjem i ispiranjem kao i kod samonagrivajućih adheziva, adhezivni sloj kod Single Bond se karakterisao prisustvom *vodenog drveta* [33]. Objasnjeno je da *vodeno drveće* predstavlja kanale sa ne vezanom vodom koja je bila zarobljena unutar adheziva. Time je dokazan molekularni mehanizam difuzije vode kroz adheziv.

Na osnovu pregleda literature i opisanih istraživanja, može se zaključiti da pojednostavljeni adhezivni sistemi ne mogu biti preporučeni u svim kliničkim slučajevima. Dvofazni samonagrivajući adhezivi pokazuju bolje rezultate od onih označenih kao “sve u jednom” ili “all in one”.

2.4. KOMPOZITNE SMOLE

Zubne kompozitne smole su estetski, plastični restaurativni materijal i zahtevaju adhesive (vezujuće agense) radi njihovog mikro i nano vezivanja za gleđ i dentin. [16]

Brojni istraživači su u proteklih pola veka značajni za razvoj smolastih kompozitnih materijala, ali trojici među mnogobrojnim pripada posebno i nezaobilazno mesto.

Prvi je Michael G. Buonocore, koji je godine 1955, predložio nagrivanje gleđne površine ortofosfornom kiselinom, kao jednostavni postupak u povećavanju adhezije smolastih restaurativnih materijala za tvrde zubne strukture. Drugi je Rafael L. Bowen, koji je stvorio kompozitnu smolu kao estetski restaurativni materijal (bisfenol A glicidil dimetakrilat, danas poznat kao Bis-GMA ili Bowenova smola). Treći je Nobuo Nakabayashi, koji je predložio hibridizaciju dentinskog supstrata i tako ostvario promociju adhezije pomoću infiltracije monomera u zubnu strukturu. [17]

U novije vreme intenziviran je napor za otkrivanjem novih organsko-neorganskih sastava koji imaju sposobnost poboljšanja stepena konverzije i smanjenja polimerizacionog skupljanja kao i povećanja otpornosti na trošenje. Takav materijal je baziran na uretanima i alkosilanima. Takođe, vlaknasto punilo organskih smola doprinosi značajnom povećanju fizičko-mehaničke otpornosti kompozitnog smolastog materijala. Takav materijal je sličan keramici a zove se ceromer ili ormocer.

Pored ovog, istraživanja teku i u drugom smeru. Razvojem bioaktivne formule organske smole i uključivanjem amorfnog kalcijum-fosfata u punilo se pokušava ostvarivanje selektivnog otpuštanja aktivnih jona potrebnih za remineralizaciju demineralizovanog tvrdog zubnog tkiva. Na taj način bi se značajno povećalo karijes protektivno delovanje i smanjila mogućnosti pojave sekundarnog zubnog karijesa. [36]

Osobine kompozitnih restaurativnih materijala mogu biti podeljene u tri kategorije: fizičke, hemijske i biološke. Za kvalitet kompozitnih smola bitne su: fizičke osobine (boja, toplotna provodljivost, otpornost na delovanje sila, viskoznost); hemijske osobine (proces vezivanja, odnosno očvršćavanja - polimerizacija) i biološke osobine (efekat na živa tkiva - citotoksičnost i genotoksičnost). [17]

Fizičke-mehaničke osobine kompozita zavise od količine i vrste čestica punila, procesa spajanja organske i neorganske faze i stepena poroznosti polimerizacionog materijala.

Svetlosno polimerizujući kompoziti, koji se sastoje od jedne paste, imaju daleko manju poroznost od hemijski polimerizujućih (samovezujućih) kompozita. Za svetlosno polimerizujuće kompozite je karakteristično da polimerizacija zavisi od izlaganja materijala adekvatnoj vrsti svetlosti kako bi bilo dovoljno vremena za njihovo nanošenje, pre očvršćavanja. Polimerizacija je spajanje monomera u polimerne lance. Oko 75% polimerizacije se završava nakon deset prvih minuta od izlaganja kompozitne smole svetlosti. Polimerizacija se kontinuirano nastavlja sledeća 24 sata ili čak 2 dana. Određeni procenat smole može da ostane ne polimerizovan. [16]

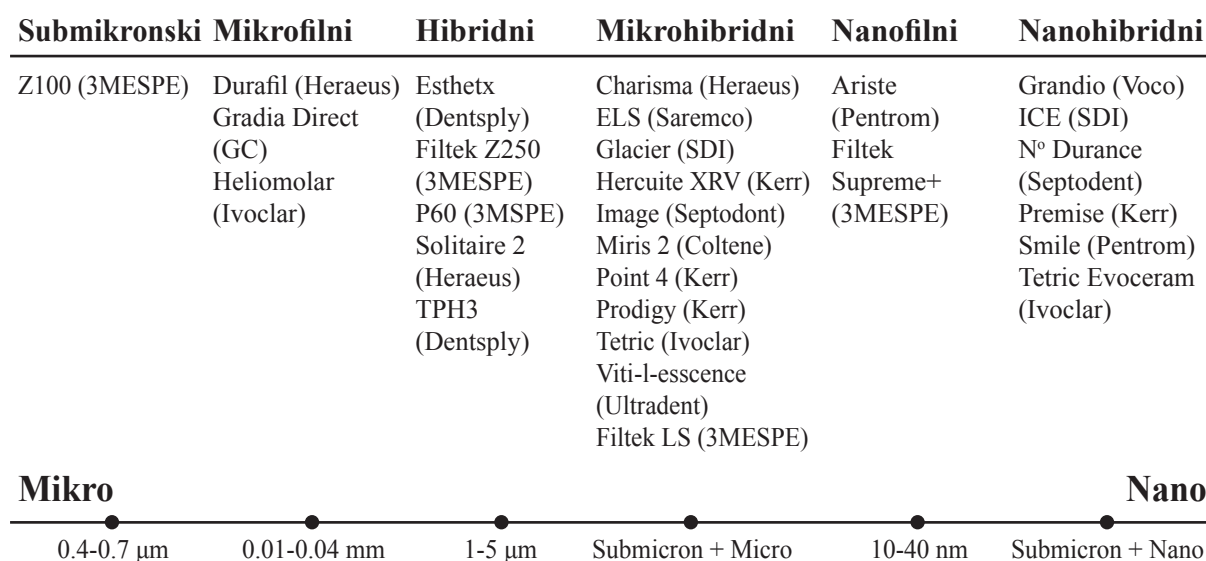
Iako se obrada kompozita može vršiti već 10 minuta od trenutka kada je vršeno osvetljavanje, optimalne fizičke osobine se dostižu tek nakon 24 sata.

Viskoznost je važna osobina kompozitnih materijala na bazi smola. Ona određuje mogućnost pravilnog nanošenja na zubne strukture, odnosno fluidnost materijala. Niska viskoznost je naročito važna kod dentin adheziva, zalivača fisura i tečnih kompozita.

Apsorpcija vode od strane kompozita dovodi do ekspanzije materijala. Veličina čestica, kvalitet i stabilnost supstance za vezivanje organskog materijala sa punilom su važni za količinu apsorbovane vode. Sa druge strane, rastvorljivost svetlosno polimerizujućih kompozita zavisi od njihovog izlaganja dovoljnoj količini svetlosti. Neadekvatno polimerizovani kompozit je sklon većoj apsorpciji vode i rastvorljivosti što je praćeno, klinički, ranom promenom boje ispuna.

Adhezivna stomatologija ima široku primenu tokom zadnjih dekada, uglavnom zbog razvoja kompozita baziranih na BisGMA smoli. U odnosu na kompozite sa BisGMA, ugradnja novih

monomera (UDMA; BisEMA) i novih sistema inicijacije uz nove tehnologije koje se odnose na punioce, značajno su poboljšane osobine ovih materijala i proširena njihova upotreba. [36] Nakon mnogobrojnih pokušaja tokom proteklih trideset godina da se ponudi odgovarajuća podela kompozitnog smolastog materijala, koja bi kliničaru olakšala snalaženje i izbor najpovoljnijeg materijala za pojedine indikacije restaurativnog postupka, danas se smatra da su veličina čestica i količina punila osnovno polazište za svrstavanje odnosno klasifikaciju kompozitnog smolastog materijala (Sl. 5.). [16]



Slika 5. Dijagram prikazuje rangiranje neorganskih čestica u modernim dentalnim kompozitnim smolama i njihove proizvođače (Banerjee i Watson, 2011.)

U okviru istraživanja ove doktorske disertacije korišćen je *Filtec Ultimate* nanohibridni kompozit koji sadrži siliniziranu keramiku i silicijum i monomere UDMA, Bis GMA, Bis EMA i TEGDMA.

Hibridni smolasti kompozitni materijali su nastali kao potreba da se ujedine prednosti dobre površinske poliranosti kompozitnih smola s mikropunilom i visoka otpornost na površinsko trošenje kompozitnih smola s većim česticama. Na taj način se izbegavaju najvažniji nedostaci jedne i druge grupe i nastaje novostvoreni hibridni kompozitni materijal. Takve prednosti hibridnom kompozitnom smolastom materijalu osigurava visoki težinski (78–85%) i zapreminski procenat punila (70–77%) u organskoj matrici Bis-GMA i UDMA. Neorgansko punilo sadrži kvarc, borosilikatno staklo, stroncijum, cirkonijum, amorfni silicijum i litijum i aluminijum fluorosilikatno staklo. Ovakav sastav pored spomenutog osigurava i bolja fizičko mehanička svojstva od kompozitnog smolastog materijala s mikropunilom.

Hibridni kompozitni smolasti materijal poseduje visok modul elastičnosti i ima niži stepen polimerizacionog skupljanja u odnosu na materijale s mikropunilom, veći stepen konverzije kao

i otpornost na apsorpciju vode, a time i niži stepen biodegradacije što značajno utiče na dugotrajnost restaurativnog zahvata.

Mikro hibridni i nano hibridni materijali su nastali zbog potrebe poboljšanja fizičko mehaničkih svojstava kompozita s težnjom da postigne viši stepen površinske poliranosti u odnosu na hibridni materijal. Mikro hibridni i nano hibridni kompozitni materijali sadrže čestice punila znatno manje veličine (submikronske i 10-40 nm u odnosu na hibride čije čestice su 0.4–0.8 μ m, uz istovremeno niži zapreminski postotak neorganskog punila (56–66vol%). Čestice manje veličine osiguravaju bolju poliranost i sjaj površine sličan onom kod kompozitnog smolastog materijala s mikropunilom zadržavajući pritom viši stepen otpornosti na trošenje. [16]

Tečne kompozitne smole uvedene su u kliničku praksu godine 1995. kao novi materijal koji će omogućiti brže, bolje i jednostavnije rukovanje. Ove materijale odlikuje niska viskoznost, manji deo neorganskog punila (44–54%), prosečne veličine čestica od 0.04–1 μ m, nizak modul elastičnosti. Zbog svog sastava pokazuju nešto slabija fizičko-mehanička svojstva od ostalih kompozitnih materijala, ali izrazita sposobnost tečenja kao i niži modul elastičnosti daju im sposobnost apsorpcije stresa i zbog toga prednost u određenim specifičnim indikacijama. Tečni kompozitni materijal je indikovano u sledećim kliničkim situacijama: pečačenje fisura i jamica, mikrokaviteti, mali defekti gleđi i dentina, defekti u cerviksnom području, premazi na dnu kaviteta kao tzv. elastični sloj, premazi kod direktnog prekrivanja pulpe, izrada elastičnih parodontalnih splintova. [36]

Mehanizam stvrdnjavanja kompozitnih smola za ispune

Kompozitni smolasti materijal odlikuje se specifičnim načinom stvrdnjavanja, koji se manifestuje konverzijom molekula monomera u makromolekule polimere unakrsnim povezivanjem (*cross linking*), stvarajući pritom mrežu u koju se uklješte čestice neorganskog punila.

Polimerizacija kompozitnih smola je proces stvrdnjavanja, a odvija se putem tzv. radikalske polimerizacije u tri stepena: 1) *inicijacija* – razgradnjom fotoinicijatora dolazi do oslobađanja primarnog radikala, koji adicijskom reakcijom s monomerom stvara novi slobodni radikal, 2) *rast lančane reakcije* – uzastopna adicija velikog broja molekula monomera uz nastanak makromolekulskih radikala, 3) *zaustavljanje rasta makromolekula* povećanjem koncentracije polimerizacije dolazi do bimolekulskih reakcija nastalih radikala i zaustavljanja rasta lančanih makromolekula. [36]

Stvrdnjavanje smolastog kompozitnog materijala je inicirano osvetljavanjem plavim svetlom koje emituje halogena lampa ili svetlosno emitujuća dioda. Inicijator u većini smolastih kompozitnih materijala je kamforhinon koji reaguje u intervalu talasnih dužina od 400–500nm s maksimumom apsorpcije na 468 nm.

Kvalitet polimerizacije meri se stepenom konverzije monomera u polimer (koji nikada nije 100%), a zavisi od sledećih činilaca: hemijskog sastava materijala, posebno vrste monomera;

koncentracije inicijatora polimerizacije; veličine, vrste i količine neorganskih čestica punila – veći deo punila smanjuje polimerizacijsko skupljanje, ali povećava krutost materijala; intenziteta, vremena i udaljenosti izvora svetlosti od površine kompozita.

Pomeranje i prostorna organizacija molekula monomera odgovorni su za promene volumena tokom polimerizacije.

Na početku procesa polimerizacije smola ulazi u pre-gel fazu u kojoj je organska matrica u viskoznoj plastičnoj formi, koja joj omogućava „razlivanje“ odnosno „tečenje“. U toj fazi se monomeri još uvek mogu pomerati ili skliznuti u novi položaj u organskoj matrici. Proces polimerizacije se dalje nastavlja pri čemu se stvaraju sve veći molekuli, a kompozit stvrdnjava i homogenizuje u tvrdo telo. Tačka u kojoj više nije moguće bilo kakvo kretanje naziva se gel tačka, a označava prelaz iz pre-gel faze u post-gel fazu. Materijal je u kruto elastičnom stanju, ali još uvek se skuplja. Kada se skupljanje završi javlja se napetost odnosno stres.

Geliranje se može prikazati kao trenutak kada tok molekula u materijalu više ne može da kompenzuje skupljanje. Ukupno skupljanje materijala određuje pre gel faza u kojoj materijal još uvek može da kontroliše i kompenzuje polimerizaciono skupljanje. Post-gel faza se smatra odgovornom za pojavu napetosti i sila stresa na spoju kompozita sa zubnim tkivom.

Postoji nekoliko oblika polimerizacionog skupljanja:

Slobodno skupljanje. Ako kompozitni materijal ne leži na čvrstoj površini skupljaće se prema centru. Obzirom da skupljanje nije ometano neće se razviti stres.

Efektivno skupljanje. Ako je kompozitni materijal pričvršćen za samo jednu čvrstu površinu na skupljanje će uticati novostvoreni granični uslovi i neće se razviti gotovo nikakav stres, jer će gubitak volumena biti kompenzovan skupljanjem prema površini vezivanja.

Skupljanje između suprotnih zidova kaviteta. Stres zbog polimerizacionog skupljanja razvije se ako je skupljanje ometano suprotnim zidovima kao sila koja vuče kompozit od zidova kaviteta. Ako stres prekorači snagu adhezivne veze, doći će do kidanja te veze i pojave rubne pukotine. [36]

Da bi se izbeglo polimerizaciono zapreminsko skupljanje kompozitnih smola danas se u organsku matricu ugrađuju ekspandirajući monomeri, odnosno višefunkcionalni ciklički oligomeri kao što su spiroortoestri i ciklički akrilati. Kompozitni smolasti materijal s većim postotkom organskog dela poseduje više monomera koji treba da pređe u polimer i pokazuje veći stepen polimerizacionog skupljanja. Hibridni kompozitni materijal s visokim težinskim i zapreminskim postotkom neorganskog punila pokazuje manje ukupno skupljanje, međutim zbog visokog modula elastičnosti potrebno je sprečiti polimerizacioni stres. Ovaj problem danas se kompenzuje promenom sastava materijala (ekspandirajući monomeri), slojevitom tehnikom postavljanja materijala u kavitet i optimalnom fotopolimerizacijom materijala.

Toplotna ekspanzija kompozitnih smola ogleda se širenjem materijala usled stalnih temperaturnih promena u usnoj duplji, tesno je povezana i s polimerizacionim skupljanjem, a zavisi od koeficijenta termičke ekspanzije materijala.

Sve kompozitne smole podložne su delovanju vode iz usne duplje. Tokom vremena materijal apsorbuje vodu koja dovodi do ekspanzije materijala, a kao posledica toga nastaje rubno obojenje i pukotina koja omogućava propuštanje mikroorganizama u smeru zubne pulpe.

Veličina zapreminskog skupljanja u kompozitima je određena njihovim zapreminskom frakcijom punila i građom i stepenom izmene (*conversion*) smolnog matriksa.

Vrednosti skupljanja vezane za BisGMA (5,2%) i TEGDMA (12,5%) su značajno veće od izmerenih kod tipičnih kompozita koje iznose 2–3%. [37]

Ove razlike su posledica činjenice da je kod hibridnih kompozita, prosečno 60% zapremine zauzeto česticama punila. Mikrofilni kompoziti imaju neorganski sadržaj oko 40 vol%, a imaju zapreminsko skupljanje slično kao hibridni zbog prisustva pre-polimerizovanih kompozitnih čestica koje se nekad zovu „organski fileri“. Nisko viskozni (*flowable*) kompoziti pokazuju zapreminsko skupljanje veće od 5% zbog smanjenog neorganskog sadržaja, koji je najčešće ispod 50vol%. Navedene vrednosti skupljanja su prosečne jer u potpunosti zavise od dužine polimerizacione reakcije. [38]

2.5. FOTOPOLIMERIZACIJA, SVETLOSNI IZVORI I TEHNIKE

Polimerizacija je hemijska reakcija koja nastaje u organskoj smoli, izaziva konverziju monomera u polimere dovodeći do približavanja molekula i do kontrakcije. U ovom procesu, pritisak nastao u kompozitnom koncentratu i na adhezivnom kontaktu između zuba i restaurativnog materijala utiče na integritet ovog regiona i može da dovede do marginalnih defekata, formiranja zjapa, savijanja kvržica i postoperativne osetljivosti. [37]

Jedan od najproučavanijih fenomena u stomatologiji zadnjih godina je polimerizaciona kontrakcija kompozitnih smola. Opšte je poznato da brojni faktori utiču na kontrakciju a to su: hemijski sastav, brzina polimerizacije, metod polimerizacije, modul elastičnosti restaurativnog materijala, faktor konfiguracije kaviteta (faktor C). [39]

Polimerizacija zavisi od veličine neorganskih čestica kompozita i njihovog sastava, boje, transparentnosti, intenziteta svetla, dužine ekspozicije kod osvetljavanja, kao i sastava monomera i koncentracije inicijatora polimerizacije. [39, 40]

Svetlosno polimerizujuće kompozitne smole postale su izrazito popularne od 1970. godine. Omogućavaju bolju estetiku zubnih restauracija i uštedu zdravog zubnog tkiva. Stepem polimerizacije ili vezivanja – očvršćavanja (*cure*) kompozita zavisi od snage (*power density*) ili jačine svetlosnog aparata, vremena ekspozicije, boje smole, veličine čestica punila i opterećenja. [40]

Luo i saradnici su pomoću SEM, istraživali efekat dva faktora na marginalni pripoj kompomera za gleđ i dentin. Postepenu ili pulsno aktivirajuću tehniku su upoređivali sa konvencionalnom

tehnikom osvetljavanja. Zaključili su da postepena ili pulsna tehnika osvetljavanja značajno poboljšava marginalni integritet kompomera. [8]

U istraživanjima Mehl i saradnika, utvrđeno je da režim inicijalnog osvetljavanja svetlom niskog intenziteta uz završnu polimerizaciju komozita svetlom visokog intenziteta, daje značajno bolji ivični integritet, u komparaciji sa kontinuiranim svetlom visokog intenziteta [4].

Kad svetlo prođe kroz restauraciju njegova jačina značajno opada što smanjuje efikasnost polimerizacije i ograničava dubinu vezivanja – očvršćavanja. Snaga – jačina aparata je od osnovne važnosti kod obezbeđenja adekvatne dubine polimerizacije. Neadekvatna polimerizacija smanjuje fizičke i biološke osobine kompozitnih smola. Nedovoljno polimerizovane smole mogu biti i citotoksične. [41, 42, 43]

Postoji više tipova svetlosno polimerizujućih dentalnih aparata na tržištu sa različitim vrstama izvora energije, talasne dužine i intenziteta svetla za polimerizaciju fotoaktivirajućih restaurativnih materijala. [44]

Poznato je da gustina energije (snaga gustine x dužina izlaganja) aparata za osvetljavanje utiče na stepen polimerizacije, dubinu polimerizacije i mehaničke osobine kompozitnih smola. Neka proučavanja su ukazala na recipročan odnos između jačine svetla i vremena izlaganja. Takođe, različiti metodi osvetljavanja mogu dovesti do sličnog stepena konverzije ali do različite strukture polimerne mreže što vodi različitim mehaničkim osobinama kompozita. [45]

Najčešće korišćeni aparat za polimerizaciju je Qartz-tungsten halogen (QTH) aparat. Njegova sijalica je punjena jodnim ili bromnim gasom i sadrži tungsten vlakno. Kada se poveže sa električnom mrežom, tungsten filament se užari i stvara vrlo snažno svetlo. [46] Stvara se belo svetlo koje se zatim filtrira da bi se omogućilo propuštanje samo plavog svetla (400–500nm). Emitovani spektar svetla nije podjednako efikasan u aktiviranju fotoinicijatora. Žarenje (isijavanje toplote) je glavni nedostatak QTH aparata i raste sa porastom vremena osvetljavanja. Drugi nedostaci su ograničeno vreme lampe i degradacija reflektora i filtera tokom vremena.

Jedan od problema vezan sa fotopolimerizacijom materijala koji sadrže smolu je ograničena dubina polimerizacije i rizik od neadekvatne konverzije smole u dubini. Preporučivane su razne mere za prevazilaženje nedovoljne konverzije: dugo vreme ekspozicije, tanki slojevi, primena svetlosnih izvora jakog intenziteta i naknadno osvetljavanje. Adekvatna polimerizacija pomoću QTH aparata zahteva snagu (power density) veću od 400mW/cm², sloj kompozitne smole maksimalno 2mm i vreme ekspozicije 40–60 s. [47, 48]

Noviji aparati su snažniji i omogućavaju veću dubinu polimerizacije ili smanjenje vremena ekspozicije, međutim povećavaju polimerizacionu kontrakciju kompozita. Drugi QTH aparati sa soft-start programima ili dvostepenom polimerizacijom i pulsno – odloženo osvetljavanje omogućavaju početno izlaganje svetlu niske jačine koje je praćeno primenom svetla veće jačine. Cilj je da se poboljša marginalna adaptacija produžavanjem faze tokom koje je kompozitna smola tečna i da se tako nadoknade polimerizaciona kontrakcija i stresovi. [49, 50, 7, 6]

Stepen konverzije (izmena monomera u polimer) meri se različitim metodama. Merenje tvrdoće se široko koristi za procenu polimerizacije kompozitne smole i pruža dobar uvid u stepen konverzije. [51, 52]

Cunha i saradnici su merili tvrdoću kompozitnih ispuna po Knoop-u i nisu našli značajne razlike u tvrdoći nakon primene dve tehnike polimerizacije. Tvrdoća je merena na dubini od 0–5mm, posle kontinuiranog osvetljavanja 40 sek. ($520\text{mW}/\text{cm}^2$) i posle dvo-stepene ili *soft-start* ekspozicije (10 sek. od $150\text{mW}/\text{cm}^2$ praćeno 30 sek. sa $520\text{mW}/\text{cm}^2$). [53]

I druga proučavanja su pokazala da se tvrdoća ne razlikuje na gornjoj i donjoj površini ispuna nakon kontinuirane ili postepene ekspozicije. [54, 55, 6]

Danas postoji veliki broj aparata za polimerizaciju (očvršćavanje) kompozitnih smola. Pored klasičnih QTH aparata, postoje programirajući i/ili jaki QTH aparati, Plazma Arc i LED aparati. QTH aparati visokog intenziteta omogućavaju kraće vreme ekspozicije po sloju. Aparati za polimerizaciju sličnih karakteristika mogu postići različitu dubinu očvršćavanja u zavisnosti od razlika u spektru emitovanog svetla. Takođe, različite kompozitne smole mogu očvršćavati na različite načine. Zbog visoke varijabilnosti kompozitnih smola, aparata za osvetljavanje i režima osvetljavanja teško je predložiti optimalnu kombinaciju. [56]

Da bi se prevazišli neki problemi vezani za QTH aparate, predstavljena je tehnologija light-emitting diode (LED). Za razliku od QTH aparata, spektar galijum nitrid plava (LED) je unutar apsorpcionog pika kamforhinona (450–490nm), kao najčešće korišćenog fotoinicijatora. Zbog toga LED aparati ne zahtevaju filtere. Danas i QTH i LED aparati ispunjavaju standarde ISO 4049 što se tiče dubine osvetljavanja od minimum 2mm u trajanju ekspozicije od 40 sek.

U cilju smanjenja stepena polimerizacione kontrakcije i produženja vremena koje omogućava viskozno tečenje kompozita preporučeno je nekoliko fotoaktivacionih tehnika kao alternative kontinuiranoj iradijaciji visokog intenziteta. [57, 7]

Preporučuju se različite tehnike postepene polimerizacije sa ciljem poboljšanja marginalne adaptacije restauracija od kompozitnih smola a na osnovu usporavanja stepena konverzije smole i umanjenja stresova pri očvršćavanju. [48]

Jedan od postepenih načina osvetljavanja je *soft start* tehnika. Ona koristi smanjenu iradijaciju svetla tokom prvih nekoliko sekundi svetlosne aktivacije, uključivanjem visoke iradijacije za preostalo vreme osvetljavanja sa ciljem obezbeđivanja dovoljne ekspozicije za materijal.

Efikasnost postepenih metoda osvetljavanja prikazana je kroz više studija koje dokazuju značajno smanjenje kontrakcije kompozita u komparaciji sa kontinuiranom fotoaktivacijom visokog intenziteta. [58, 59, 60, 61]

2.6. CITOTOKSIČNOST I GENOTOKSIČNOST NEDOVOLJNO POLIMERIZOVANIH KOMPOZITNIH I ADHEZIVNIH SMOLA

Efikasno vezivanje kompozita je kritički parametar, ne samo za postizanje optimalnih fizičkih osobina očvrslih restauracija, već i za isključivanje kliničkih problema usled toksičnosti neadekvatno polimerizovanih materijala. [19, 21, 22, 23, 41, 62, 63, 64]

Upotreba svetlosno-polimerizujućih kompozitnih materijala je povećana u zadnje vreme zbog poboljšanog sastava, jednostavnijih bonding procedura i naraslih estetskih zahteva pacijenata. Adekvatna polimerizacija je kritični faktor u postizanju maksimalnih fizičkih osobina i kliničkog ponašanja kompozitnih smola. Halogenski svetlosno polimerizujući aparati ostaju najšire korišćeni svetlosni izvor za očvršćavanje kompozita. Ukoliko svetlosno-aktivirajuće kompozitne restauracije ne prime dovoljno energije potrebne talasne dužine iz aparata (*curing* unit), mogu narasti efekti trošenja – habanja. To vodi lomljenju ivica restauracija, smanjenju jačine veze između zuba i restauracije, opadanju tvrdoće i većoj citotoksičnosti i genotoksičnosti kompozita.

U zavisnosti od vrste svetlosnog izvora, osvetljavanje od 500-800 mW/cm² u trajanju 30-40 sek. (15-24 Jcm²) je neophodno radi polimerizacije jednog sloja kompozita koji mora biti dovoljno tanak da primi punu jačinu svetla. Uprkos korišćenju slojeva od 1-3mm, važno je znati da se kompletna polimerizacija nikada ne odigra. Kompozitni materijali stvaraju jako isprepletanu mrežu tokom polimerizacije i pod normalnim uslovima osvetljavanja, ostvari se 45-70% konverzije monomera u polimer. Sastav kompozitnih materijala, veličina čestica punila, tip i vrsta interakcije između monomera i punila, utiču na stepen polimerizacije. Svetlosno polimerizujući aparat takođe može značajno da utiče na polimerizaciju kompozitnog materijala. Jačina svetla, metod (*mode*) polimerizacije i udaljenost vrha svetlosnog provodnika mogu takođe da menjaju dešavanja u materijalu. Teoretski, 100% konverzija monomera u polimer je moguća, ali 25-50% duplih veza monomera praktično ostaje neaktivno u polimeru. Čak i kod potpuno očvrslih restaurativnih materijala, preostaje značajna količina ne vezanih, kratkih polimernih lanaca. Posledica toga je potencijalno otpuštanje neizreagovanih toksičnih komponenata blizu pulpnog tkiva. [65, 66]

Postoji korelacija između količine ne polimerizovanih kompozitnih monomera u kompozitu i magnitudi genotoksičnog efekta. Da bi se prevazišao problem neadekvatne polimerizacije, preporučeni su nove tehnike polimerizacije (soft start i eksponencijalni programi, pulsni program i program visokog i niskog intenziteta). Pored visoko intenzivnog osvetljavanja (HIP - 800mW/cm², 20s), koristi se i program niskog pa visokog osvetljavanja (SOF - 650mW/cm² prvih 5 sek, 800mW/cm² sledećih 25 sek.) i nisko intenzivni program (LOP - 650mW/cm², 30 sek. [19]

Nedovoljno se zna o efektima različitih tehnika osvetljavanja na citotoksičnost i genotoksičnost kompozita. Efikasno osvetljavanje kompozita utiče na poboljšanje fizičkih osobina osvetljenih restauracija i na smanjenje citotoksičnosti neadekvatno polimerizovanih materijala.

Neka *in vivo* proučavanja su pokazala da aplikacija adhezivne smole direktno na otvorenu pulpu ili na tanak sloj dentina izaziva dilataciju i kongestiju krvnih sudova, zapaljenje i pulparne apscese. [67, 22, 23, 20, 68]

Kompletna polimerizaciju adhezivnih smola može biti nemoguća tokom direktnog prekrivanja pulpe. Dokazano je da kiseonik sprečava kompletnu polimerizaciju monomera adhezivne smole. Vlažnost može takođe da spreči kompletnu polimerizaciju adheziva. Ne polimerizovani monomeri difunduju direktno u pulpu kroz otvor na komori ili kroz dentinske tubuluse i izazivaju citotoksične efekte na pulparnim ćelijama.

Mnoga proučavanja su pokazala genotoksičnu aktivnost zubnih materijala *in vitro* i *in vivo* dok su druga bila fokusirana na citotoksičnost dentin bonding agenasa u odnosu na tkivne kulture. Većina ovih *in vitro* proučavanja su se bavila procentom koncentracije raznih sastojaka smole koji inhibišu metabolizam ćelija. Procenjuvani su i interaktivni efekti kombinacije dentin bonding monomera (HEMA, Bis GMA, TEGDMA i UDMA) kao i vreme izloženosti ovim sastojcima, na mišjim fibroblastima limfocitima i pulparnim ćelijama [68].

U kliničkim uslovima, terapija pulpe adhezivnim smolama može da dovede do kontinuiranog oslobađanja neizreagovanih komponenta smole i pulparne inflamacije. Kompozitni adhezivi su citotoksični za odontoblastolike ćelije. Kada se smolni materijal osvetli citotoksični efekat opada. To su potvrdila, između ostalih, i istraživanja Mantellinija i sar. [68] Odontoblastolike ćelije miša (MDPC-23), nediferentovane ćelije pulpe (OD-21) ili makrofagi (RAW 264,7) izlagani su Single-Bondu, polimerizovanom 0-40 s. Primećena je dramatična razlika u odgovorima ćelija na tri uslova polimerizacije (osvetljavanje od 0, 10 ili 40 sec). Nopolimerizovana i delimično polimerizovana adhezivna smola je izazivala apoptozu vrlo naglo, kod svih tipova ćelija. [68]

Genetička toksikologija, kao primenjena grana genetike, ima za cilj detekciju i evaluaciju dejstva različitih genotoksičnih agenasa sposobnih da izazovu oštećenja naslednog materijala. Ova naučna disciplina sve više dobija na značaju obzirom da se u našem okruženju neprekidno povećava broj i raznovrsnost genotoksina. Do danas je razvijeno na desetine testova na genotoksičnost, koji se u laboratoriji sprovode pod striktno kontrolisanim uslovima najčešće prema smernicama Organizacije za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD). Pri tome se koriste različiti biološki sistemi, počev od bakterija, preko jednoćelijskih eukariota (npr. kvasci), voćne mušice (*Drosophila*) do pojedinih vrsta sisara, pa i čoveka. Svakako, uzimanje biološkog materijala pri radu sa čovekom je delikatno, tako da se istraživanja često izvode pod *in vitro* uslovima (npr. ćelije periferne krvi čoveka u kulturi, pojedine ćelijske linije humanog porekla), ili se nakon tretmana čoveka pojedinim lekovima, radioterapijom uzimaju uzorci tkiva i dalje proučavaju pod *in vitro* uslovima. [69]

Razvoj metode elektroforeze DNK pojedinačnih ćelija (engl. *single cell gel electrophoresis*, *SCGE*), popularno nazvane Komet test (engl. *the Comet assay*) je doveo do prave revolucije u genetičkoj toksikologiji omogućivši pouzdanu i senzitivnu detekciju oštećenja DNK sa uvidom

u heterogenost odgovora analizirane grupe ćelija.

Uslovi za izvođenje Komet testa standardizovani su na međunarodnom sastanku održanom 1999. godine u Vašingtonu. [70] Svaki korak pri izvođenju Komet testa podjednako je važan da bi se postigli reproducibilni i pouzdani rezultati. Priprema uzoraka rastvora i korišćenje odgovarajuće opreme podleže striktnoj kontroli kvaliteta kao u tehnikama molekularne biologije. Teorijski, Komet test može da se izvodi na bilo kom tipu ćelija pod uslovom da su žive i da se mogu dobiti u obliku suspenzije.

U ovoj doktorskoj disertaciji obavljena su istraživanja genotoksičnih efekata kompozitnih adheziva (bondova) koji se koriste u stomatološkoj praksi. S obzirom da je reč o supstancama koje direktno dolaze u kontakt sa tkivima čoveka, evaluacija genotoksičnih efekata doprinela bi boljem razumevanju mogućih bioloških promena pod njihovim dejstvom. U te svrhe, upotrebljena je elektroforeza DNK pojedinačnih ćelija (Komet test) kojom je obuhvaćeno testiranje na genotoksičnost dva adheziva (bonda).

3. HIPOTEZE

Ho: Nema značajnih razlika u marginalnoj adaptaciji kompozitnih ispuna za gleđ i dentin nakon primene dve tehnike fotopolimerizacije i dva adhezivno-kompozitna sistema. Dužina svetlosne polimerizacije ne utiče na genotoksičnost adheziva.

Ha: Ima značajnih razlika u marginalnoj adaptaciji kompozitnih ispuna za gleđ i dentin nakon primene dve tehnike fotopolimerizacije i dva adhezivno-kompozitna sistema. Dužina svetlosne polimerizacije utiče na genotoksičnost adheziva.

4. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ovo proučavanje istražuje efekte jačine i dužine osvetljavanja na marginalnu adaptaciju kompozita za različito kondicionirana tvrda zubna tkiva kao i genotoksični efekat različito fotopolimerizovanih kompozitnih adheziva na ćelijsku kulturu.

Neposredni ciljevi istraživanja su bili:

1. Kvantitativna skening elektron mikroskopska (SEM) analiza pripoja kompozita za gleđ
 - a) Utvrđivanje dužine marginalne pukotine duž obima kompozitnih restauracija u gleđi na spojenim SEM mikrografijama, kompjuterskom analizom slika
 - b) Utvrđivanje širine marginalne pukotine duž obima kompozitnih restauracija u gleđi na SEM mikrografijama segmenata obima restauracija, pomoću softvera
 - c) Utvrđivanje Marginalnog indeksa (MI) kompozitnih restauracija u gleđi
 - d) Upoređivanje dobijenih rezultata u odnosu na tehniku fotopolimerizacije (standardna i *soft-start*) i u odnosu na adhezivni postupak (*etch/rinse* i *self etch*)
 - e) Utvrđivanje dužine pripoja kompozitnih restauracija bez pukotina u gleđi.
2. Kvantitativna skening elektron mikroskopska (SEM) analiza pripoja kompozita za dentin.
 - a) Utvrđivanje dužine marginalne pukotine oko kompozitnih restauracija u dentinu na SEM mikrografijama preseka kroz restauracije, kompjuterskom analizom slika
 - b) Utvrđivanje širine marginalne pukotine na spoju kompozitnih restauracija sa dentinom, na SEM mikrografijama preseceka kroz restauracije, pomoću softvera
 - c) Utvrđivanje Marginalnog indeksa (MI) kompozitnih restauracija u dentinu
 - d) Upoređivanje dobijenih rezultata u odnosu na tehniku fotopolimerizacije (standardna i *soft-start*) i u odnosu na adhezivni postupak (*etch/rinse* i *self etch*)
 - e) Utvrđivanje dužine pripoja kompozitnih restauracija bez pukotina u dentinu.
3. Kvalitativna procena ultrastrukture adhezivne veze kompozita za gleđ i dentin pomoću skening elektronskog mikroskopa – SEM mikromorfološka analiza adhezivnog i hibridnog sloja na gleđi i dentinu.
4. Ispitivanje genotoksičnosti nepolimerizovane, delimično polimerizovane i polimerizovane adhezivne smole na kulturi ćelija – *in vitro* Komet test (utvrđivanje genotoksičnosti adheziva nakon njihovog osvetljavanja u trajanju od 0, 10 i 40 sekundi).

5. MATERIJAL I METOD

Eksperimentalni deo doktorske teze, imajući u vidu postavljene ciljeve i hipoteze, je podjeljen u dva dela. U prvom delu je, na osnovu SEM mikrografija adhezivne veze, vršena numerička analiza marginalne pukotine u gleđi po obodu restauracija. Zatim je, takođe pomoću SEM, analiziran marginalni pripoj kompozitnih smola i za dentin na presecima kroz kompozitne restauracije (numerička analiza pukotine u dentinu). Na SEM mikrografijama preseka je takođe vršena kvalitativna, mikromorfološka analiza adhezivnog i hibridnog sloja na gleđi i dentinu. Na osnovu utvrđenih širina i dužina marginalnih pukotina utvrđivan je marginalni indeks (MI) za gleđ i dentin. U drugom delu doktorske teze je utvrđivana genotoksičnost nedovoljno polimerizovanih kompozitnih adheziva. Dobijeni rezultati su numerički obrađeni standardnim procedurama deskriptivne i komparativne statistike.

5.1. IZBOR ADHEZIVNO-KOMPOZITNOG SISTEMA

Adhezivno sredstvo	Kompozit	Proizvođač	Skraćenice
<i>Adper Single Bond 2</i> (LOTN208826)	<i>Filtek Ultimate</i> (LOTN218622)	3M/ESPE	ASB/FU
<i>Adper Easy One</i> (LOT440569)	<i>Filtek Ultimate</i> (LOTN218622)	3M/ESPE	AEO/FU

Tabela 3. Materijali obuhvaćeni ispitivanjem – skraćenice

5.2. SEM ANALIZA PRIPOJA KOMPOZITA ZA GLEĐ I DENTIN

Kao materijal u istraživanjima korišćeno je 40 ljudskih molara. Dvadeset zuba sa kompozitnim restauracijama pete klase korišćeno je za kvantitativnu SEM analizu marginalnog pripoja kompozita za gleđ, odnosno utvrđivanje širine i dužine marginalne pukotine duž obima restauracije. Preostalih dvadeset zuba, takođe sa restauracijama pete klase, je presecano kroz restauracije (40 preseka) radi utvrđivanja širine i dužine marginalne pukotine u dentinu kao i za kvalitativnu, mikromorfološku SEM analizu adhezivnog i hibridnog sloja na gleđi i dentinu.

Preparacije kaviteta i postavljanje kompozitnih restauracija

Dvadeset sveže ekstrahiranih ljudskih molara je očišćeno od konkremenata i ostataka mekog tkiva. Kaviteti pete klase preparisani su rotirajućim instrumentima. Radi standardizacije kaviteta, uvek je korišćeno okruglo dijamantsko svrdlo (107–126 μm , No 806314-001544016, Meisinger, Germany), koje je manjano nakon pet preparacija. Dimenzije kaviteta su bile 2,5–3,0 mm u horizontalnom pravcu i 2mm u vertikalnom pravcu, maksimalne dubine do 2,5 mm, što je kontrolisano graduisanom sondom. Sve ivice kaviteta, za ispitivanje pripoja po obimu restauracija, su bile iznad gleđno cementne granice. Za SEM analizu preseka kaviteti su postavljeni do anatomskog vrata zuba (gleđno cementne granice). Gleđne ivice su zakošavane 0.5–1 mm, finim plamičastim dijamantskim svrdlom (40 μm ISO 806204 lot 540570) uz korišćenje manjih brzina rotacije. Deset zuba je restaurisano adhezivnim kompozitnim sistemom – Adper Singl Bond 2 + Filtek Ultimate – ASB/FU (*etch and rinse* adhezivni sistem i hibridni nanokompozit), dok je preostalih deset zuba restaurisano – Adper Easy One + Filtek Ultimate – AEO/FU (*self etch* adhezivni sistem i hibridni nanokompozit), (Tabela 3.).

Etch and rinse adhezivni postupak i nanošenje – Adper Singl Bond 2 adheziva je sproveden tako što su ivice gleđi i cela površina kaviteta nagrizani kiselinom Scotchbond Etchant (3M ESPE), tokom 15 s. a potom ispirani 10 s. i blago osušeni kuglicom vate. Adheziv je nanošen u 2 uzastopna sloja pokretima utrljavanja, tokom 15 s. Blagom strujom vazduha u trajanju od 5 s. je istanjivan sloj adheziva i polimerizovan standardnim svetlom tokom 10 sekundi. *Self etch* adhezivni postupak i nanošenje Adper Easy One adheziva obuhvatao je nanošenje adheziva na površine gleđi i dentina u trajanju od 30 s. uz pokrete utrljavanja. Višak adheziva odstranjivan je strujom vazduha, radi dobijanja sjajnog tečnog filma na površini kaviteta. Zatim je adheziv polimerizovan standardnim svetlom u trajanju od 10 s. Nakon nanošenja nanohibridnog kompozita Filtek Ultimate u jednom sloju, pet restauracija od ASB/FU i pet restauracija od AEO/FU (10 zuba) je polimerizovano standardno (HIP – High Intensity Power – 800mW/cm² u trajanju od 40 s.) a po pet preostalih restauracija (10 zuba) je polimerizovano postepeno – *soft start* tehnikom (svetlom nižeg intenziteta 10 sekundi a zatim svetlom visokog intenziteta do 60 sekundi, SOF – 400mW/cm² u trajanju 10 s. + 800mW/cm², ukupno 60 sekundi). Adhezivna sredstva i kompozitni materijali su polimerizovani halogenom lampom Elipar Highlight 3M ESPE (Seria No 938020000257) uz striktno poštovanje uputstva proizvođača. Jačina svetlosti na svetlovodu lampe kontrolisana je eksternim radiometrom (Demetron CT USA). Višak kompozita je uklanjnjan poliranjem restauracija Soflex diskovima 3M ESPE. Poliranje je kontrolisano korišćenjem uvećanja x12 na stereo mikroskopu.

Na ovaj način su formirane četiri eksperimentalne grupe restauracija:

Adper Single Bond 2 – Filtek Ultimate – HIP

Adper Easy One – Filtek Ultimate – HIP

Adper Single Bond 2 – Filtek Ultimate – SOF

Adper Easy One – Filtek Ultimate – SOF

Priprema uzoraka za SEM analizu

Uzorci su potom stavljeni u fiziološki rastvor na 37°C, nakon 24h ispirani u alkoholu i sušeni. Zatim su uzorci fiksirani za cilindrične nosače (Dotite point xc 12 carbon JEOL) i nanošen je tanki sloj zlata po površini uzoraka da bi se mogli posmatrati na SEM-u (JFC 1100E Ion Sputter JEOL) Marginalni pripoj kompozitnih restauracija je analiziran pomoću skening elektronskog mikroskopa (SEM) JSM-5300, JOEL Ltd.

Utvrđivanje dužine marginalnih pukotina u gleđi oko restauracija

Za svaki uzorak urađene su SEM mikrografije kompozitnih restauracija pri uvećanju x35, radi prikaza celog obima restauracije na jednom snimku. Zatim su, sukcesivno, snimani delovi obima restauracije do pune dužine obima, pri uvećanju x100, kako bi se proverilo postojanje marginalne pukotine, izmerila njena dužina u mikrometrima i prikazala procentualno u odnosu na ukupnu dužinu obima restauracije (videti sliku 7, a, b, i c). Radi toga je vršeno kompjutersko spajanje SEM mikrografija. Kompjutersko spajanje SEM mikrografija, radi kvantitativne i kvalitativne procene ivičnog pripoja materijala za zubna tkiva, duž obima restauracija vršili su u svojim istraživanjima i: Roulet, 1989; Mehl, 1997; Luo i sar, 2000; 2002; Krejci, 2005, Waldman, 2008. [12, 4, 2, 8, 10, 71].

Procenat dužine pukotine je pored širine pukotine bio neophodan parametar za izračunavanje marginalnog indeksa (MI). U istraživanjima, u okviru ove doktorske disertacije, MI je izračunavan po neznatno izmenjenom obrascu Hansena, 1988. i Lua, 2002. [11, 8]

$$MI = PP \times \dot{S}P / 100$$

Za izračunavanje MI korišćeni su procenat dužine pukotine (PP) i prosečna širina pukotine ($\dot{S}P$). Na osnovu SEM mikrografija celog obima restauracija snimljenih na uvećanja x35, pozicionirane su i spajane SEM mikrografije delova obima restauracija, uvećanja x100. Merenje dužine pukotine duž obima restauracija vršeno je na spojenim SEM mikrografijama x100, kompjuterskim programom Auto Desk AutoCAD. Istim programom je najpre merena ukupna dužina obima restauracije, zatim dužina pukotine i izračunavan procenat dužine pukotine na ivicama kaviteta. Izmerene dužine pukotina su zatim ucrtavane duž obima restauracija na SEM mikrografijama restauracija snimljenih pri uvećanju x35 ili na spojenim SEM mikrografijama koje predstavljaju ceo obim restauracija.

Merenje širina marginalnih pukotina u gleđi, oko restauracije

Širine ivične – marginalne pukotine merene su na skening mikrografijama, takođe, uz pomoć softvera – Autodesk Auto Cad, na uvećanju x1000, na dva segmenta obima gde je pukotina bila najviše i najmanje izražena i to na pet tačaka.

Statistička analiza urađena je deskriptivnom i analitičkom statističkom metodologijom. TWO WAY ANOVA testom (dvofaktorska analiza za dva svetla i dva materijala) i određivana je statistička značajnost uticaja tehnike osvetljavanja i primenjenog adhezivnog postupka (adhezivno kompozitnog materijala) na MI kompozitnih ispuna u gleđi.

Priprema površine preseka restauracija za SEM analizu

Dvadeset sveže ekstrahiranih ljudskih molara je očišćeno od konkremenata i ostataka mekog tkiva. Kaviteti pete klase su preparisani i restaurisani na već opisani način. Restauracije su osvetljavane HIP i SOF tehnikom. Zatim su najpre sečeni korenovi zuba a potom su krunice preseccane longitudinalno kroz kompozitne ispune kako bi se eksponirao spoj materijala i tvrdih zubnih tkiva. Preseci su polirani Sof flex diskovima a zatim kondicionirani 37% rastvorom fosforne kiseline (60 sekundi) i ispirani sprejom vode uz vazdušni pritisak. Nakon toga, površina je natapana 2% rastvorom natrijum hipohlorita tokom 60 sekundi sa ciljem rastvaranja organskog dela debrisa [72]. Priprema uzoraka zuba za SEM vršena je u uslovima visokog vakuma, po već opisanoj metodologiji. Po identifikaciji adhezivnog spoja, vršena je, najpre, kvantitativna analiza pripoja za dentin i to merenjem dužine i širine marginalne pukotine u dentinu a zatim i kvalitativna mikromorfološka analiza pripoja za gleđ i dentin uz utvrđivanje postojanja adhezivnog i hibridnog sloja na površini gleđi i dentina. Uzorci su posmatrani na uveličanju x35, x200, x1000 i x3500, na skening elektronskom mikroskopu.

Utvrđivanje dužina marginalnih pukotina na spoju kompozitne restauracije sa dentinom

Za svaki uzorak urađene su SEM mikrografije preseka kompozitnih restauracija pri uvećanju x35, radi prikaza celog pripoja restauracije za gleđ i dentin na jednom snimku. Zatim su, sukcesivno, snimani delovi pripoja restauracije za gleđ i dentin, do pune dužine pripoja kompozita za zubna tkiva, pri uvećanju x200, kako bi se proverilo postojanje marginalne pukotine u dentinu, izmerila njena dužina u mikrometrima i prikazala procentualno u odnosu na ukupnu dužinu spoja kompozita sa dentinom do gleđno dentinske granice (videti sliku 13, a, b, i c). Procenat dužine pukotine je, pored prosečne širine pukotine, bio neophodan parametar za izračunavanje marginalnog indeksa (MI) za dentin. [12, 4, 2, 8, 10, 71].

Pozicioniranje SEM mikrografija segmenata pripoja sa dentinom i merenje dužine pukotina na spojenim SEM mikrografijama x200, vršeno je kompjuterskim programom Auto Desk AutoCAD. Istim programom je najpre merena ukupna dužina pripoja restauracije za dentin, zatim dužina pukotine i izračunavan procenat dužine pukotine na spoju sa dentinom.

Izmerena dužina pukotine je ucrtavana na mikrografiji x35 ili na spojenim SEM mikrografijama.

Utvrđivanje širina marginalnih pukotina na spoju kompozitnih restauracija sa dentinom

Širine ivične – marginalne pukotine merene su na skening mikrografijama, takođe, uz pomoć softvera – Autodesk Auto Cad, na uvećanju x200, na dva segmenta obima gde je pukotina bila najviše i najmanje izražena i to na pet tačaka.

Statistička analiza urađena je deskriptivnom i analitičkom statističkom metodologijom. TWO WAY ANOVA testom (dvofaktorska analiza za dva svetla i dva materijala) i određivana je statistička značajnost uticaja tehnike osvetljavanja i primenjenog adhezivnog postupka (adhezivno kompozitnog materijala) na MI kompozitnih ispuna u dentinu.

Kvalitativna skening elektron mikroskopska (SEM) analiza pripoja kompozita za gleđ i dentin

Na SEM mikrografijama površina preseka kroz restauracije, snimljenih na uvećanja 200x, 1000x, 3500x analizirani su adhezivni i hibridni sloj gleđi i dentina. Širina ovih slojeva je procenjivana pomoću skalera na monitoru mikroskopa.

5.3. KOMET TEST

Priprema rastvora adheziva

Za ispitivanje genotoksičnosti adheziva, korišćenih u ovom istraživanju, rastvori adheziva su pripremani na sledeći način:

1. Rađene su tri serije rastvora istih uslova.
2. U svaku epruvetu je sipano 1 ml destilovane vode.
3. U destilovanu vodu sipano je 50 μ l adheziva, bez osvetljavanja (0 sec dejstva helio svetla)
4. 50 μ l adheziva stavljeno je na staklenu pločicu i fotopolimerizovano helio svetlom 10 sec
5. Formirani diskovi polimerizovane adhezivne smole su stavljani u 1 ml destilovane vode
6. Isti postupak je korišćen kod osvetljavanja adheziva helio svetlom od 40 s.
7. Na analitičkoj vagi merena je masa 50 μ l adheziva. Vršena su tri merenja i prosečna masa 50 μ l adheziva iznosila je 0.045 g (m_{sr}).
8. Rastvor je ostavljen 2 dana, radi rastvaranja ne polimerizovanog adheziva.
9. U rastvor koji je sadržao rastvoren i nerastvoren adheziv (u obilku taloga kod 0 sec tretmana i u obliku diska kod 10 i 40 sec tretmana) zapremine 1 ml, dodat je 1 ml rastvora 1.8 % NaCl. Nastali rastvor imao je zapreminu 2 ml i koncentraciju 0.9% NaCl što odgovara fiziološkom rastvoru.
10. Rastvori su prebacivani u vijalice i numerisani.
11. Talog i diskovi su postavljeni na staklenu pločicu i sušeni na 60 C⁰, 2 sata
12. Merena je masa nakon sušenja na analitičkoj vagi (m_a) i masa rastvorenog adheziva - bonda (m_b)

$$m_{sr} - m_a$$

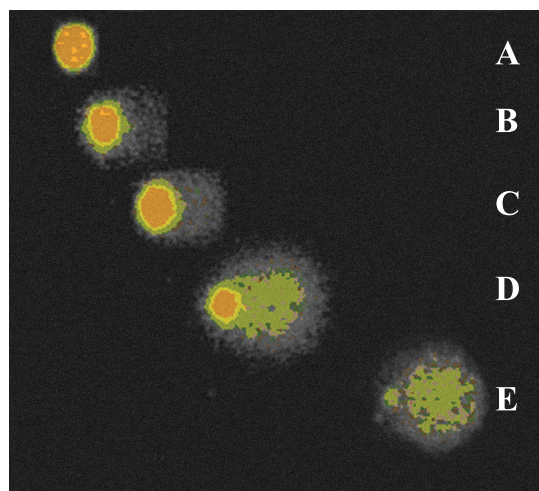
a masena koncentracija je iznosila:

$$\gamma = m_b / V \quad (V = 2 \text{ ml})$$

Elektroforeza DNK pojedinačnih ćelija (Komet test)

Pre svakog eksperimenta, na predmetna stakla je nanošena 1% agaroza (Sigma, St. Louis, MO) u redestilovanoj vodi i zatim su stakla ostavljana na sobnoj temperaturi zaštićena od prašine, najmanje tri dana da se agaroza osuši. Alkalna verzija elektroforeze DNK pojedinačnih ćelija (Komet test) izvođena je na izolovanim limfocitima periferne krvi čoveka, prema Singh i sar. (1988) [73] uz neznatne modifikacije (Tice i sar, 2000; Speit i Rothfuss, 2012). [70, 74]

Suspencija izolovanih limfocita u rastvoru PBS tretirana je bondovima do finalnih koncentracija od 100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/mL}$ na 37°C u trajanju od 30 min. Nakon tretmana, suspenzije ćelija su centrifugirane 5 min na 2000 rpm, ćelijski talog je pomešan sa jednakim volumenom 1% agaroze niske tačke topljenja (Sigma), brzo je postavljan na predmetna stakla sa osušenom agarozom, prekriven pokrovnom ljupticom i ostavljan 5 min na 4°C , da se sloj sa agarozom stegne. Nakon toga, pokrovne ljuptice su pažljivo uklanjane i preko sloja agaroze sa ćelijama dodavano je po 90 μL 0.5% agaroze normalne tačke topljenja, predmetna stakla su prekrivana pokrovnim ljupticama i ponovo ostavljana 5 min na 4°C , da se završni sloj sa agarozom stegne. Kada agarozna očvrstne, pokrovne ljuptice su uklanjane i preparati su potapani preko noći u lizirajući rastvor (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 i 10% DMSO, pH 10 je podešen sa NaOH). Nakon lize, preparati su potapani u kadicu za elektroforezu sa puferom (10 M NaOH, 200 mM EDTA, pH 13) u ukupnom trajanju 30 min na 4°C u potpunom mraku, čime je postignuta denaturacija DNK. Posle odmotavanja DNK heliksa, uključena je elektroforeza (25 V, 300 mA, 30 min na 4°C). Konačno, po završetku elektroforeze predmetna stakla su isprana neutralizujućim rastvorom (0,4 M Tris baza, pH 7,5), tri puta po 5 min. Bojenje preparata vršeno je etidijum bromidom (20 $\mu\text{g/mL}$), pri čemu je korišćeno po 50 μL ovog rastvora po jednom predmetnom staklu. Komete su posmatrane i analizirane na mikroskopu Zeiss Axioimager, opremljenim sa fluoresencijom, a skorovanje kometa vršeno je na uvećanju $100\times$. Evaluacija DNK oštećenja urađena je na isti način kao što su opisali Anderson i sar. (1994) [108]. Naime, ćelije su razvrstavane golim okom u pet kategorija u odnosu na stepen oštećenja DNK koji se zapaža u repu: (A) bez oštećenja tj. oštećenje $<5\%$, (B) nizak stepen oštećenja, približno 5-20%, (C) srednji stepen oštećenja, 20-40%, (D) visok stepen oštećenja, 40-95% i (E) totalno oštećenje, $>95\%$. Radi dobijanja semi-kvantitativne analize podataka, računao se skor DNK oštećenja prema formuli: $2\times B + 3\times C + 4\times D + 5\times E$, gde su B do E procenti ćelija sa gore navedenim kategorijama od B do E. [75]



Slika 6. Pet kategorija oštećenja: (A) bez oštećenja tj. oštećenje $<5\%$, (B) nizak stepen oštećenja, približno 5-20%, (C) srednji stepen oštećenja, 20-40%, (D) visok stepen oštećenja, 40-95% i (E) totalno oštećenje, $>95\%$. (Radaković M, Đelić N, Stanimirović Z. i sar, 2011)

6. REZULTATI

6.1. REZULTATI KVANTITATIVNE SEM ANALIZE PRIPOJA KOMPOZITNIH SMOLA ZA GLEĐ (OBIM RESTAURACIJA)

Utvrđene vrednosti dužine i širine marginalne pukotine u gleđi, duž obima restauracija, prikazane su na SEM mikrografijama, na tabelama i grafikonima. Takođe je prikazana statistička značajnost utvrđenih razlika u pripoju između dve tehnike osvetljavanja i između dva materijala (odnosno dve adhezivne tehnike)

Kvantitativna analiza marginalnog pripoja kompozitnih restauracija za gleđ je pokazala značajne razlike u dužini i širini marginalne mikropukotine oko restauracija, u zavisnosti od tehnike osvetljavanja a naročito u zavisnosti od primenjenog adhezivno kompozitnog materijala, odnosno primenjene dve različite adhezivne tehnike vezivanja kompozita za zubna tkiva.

Utvrđena je značajno bolja marginalna adaptacija kompozita za gleđ uz SOF tehniku fotopolimerizacije i uz korišćenje *etch and rinse* adhezivne tehnike i ASB/FU materijala, u odnosu na *self etch* adhezivnu tehniku i AEO/FU materijal.

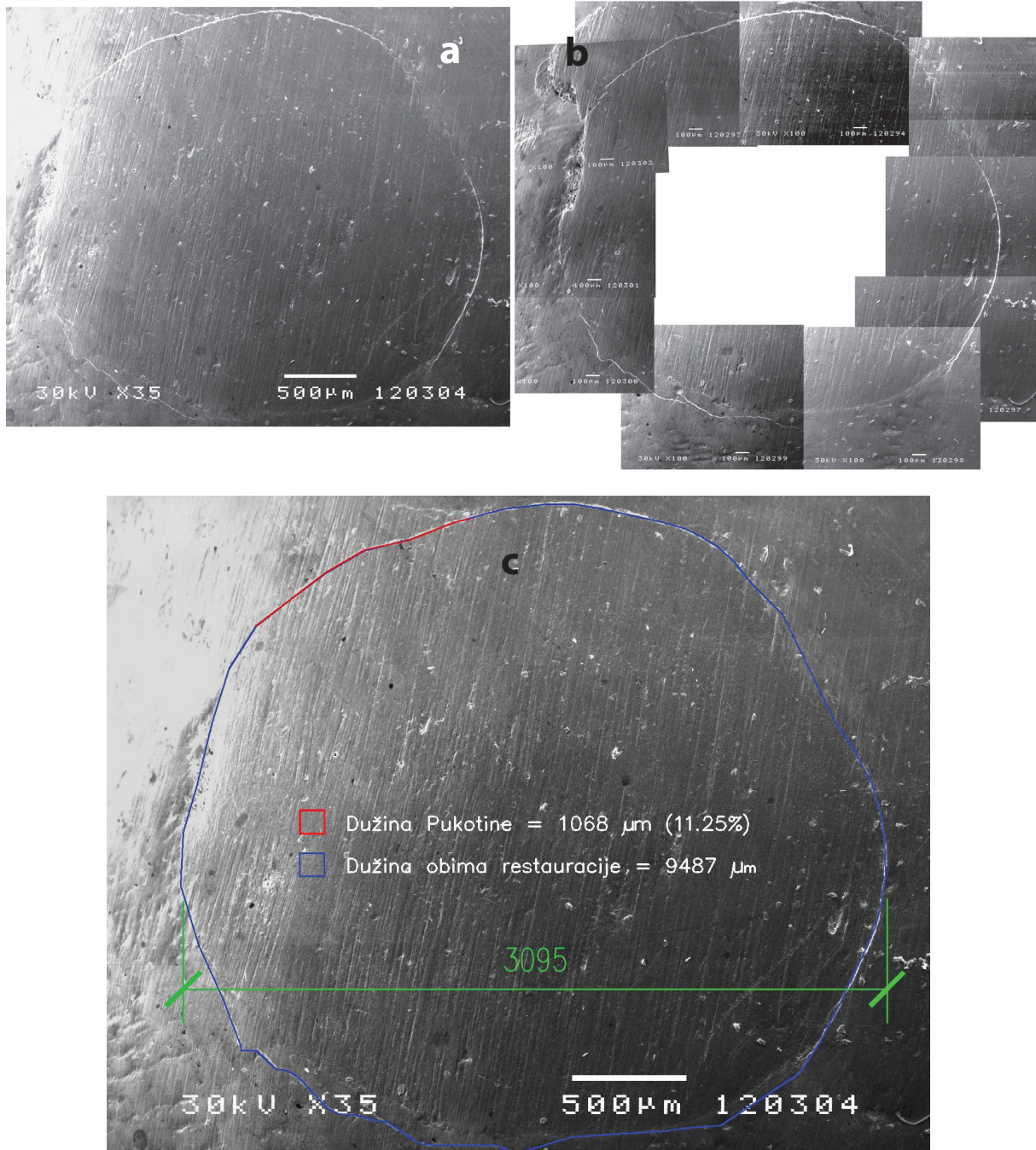
Izmerene dužine ivične pukotine su prikazane na SEM mikrografijama uvećanja x35. Radi lakšeg uočavanja i merenja dužine mikropukotine analiziran je adhezivni spoj kompozita i gleđi duž celog obima restauracija, odnosno svi segmenti pripoja snimljeni na većem uvećanju (x100). Slika 7. (a, b, c) prikazuje nalaz ukupne dužine marginalnog pripoja i dužine pukotine na spoju kompozita i gleđi, za adhezivno kompozitni materijal ASB/FU osvetljava standardnom (HIP) tehnikom. Slika 8. (a, b, c) prikazuje nalaz ukupne dužine marginalnog pripoja i dužine pukotine na spoju kompozita i gleđi, za adhezivno kompozitni materijal AEO/FU osvetljava takođe standardnom (HIP) tehnikom. Slika 9, (a, b, c) predstavlja nalaz ukupnog marginalnog pripoja i dužine pukotine uz gleđ za adhezivno kompozitni materijal ASB/FU, osvetljava postepenom ili *soft start* (SOF) tehnikom, dok slika 10. (a, b, c) prikazuje nalaz ukupne dužine pripoja i dužine pukotine na spoju sa gleđnim tkivom za adhezivno kompozitni materijal AEO/FU, osvetljava takođe postepenom ili *soft start* (SOF) tehnikom.

Prikaz tipičnog marginalnog pripoja kompozita za gleđ po obodu restauracija u zavisnosti od tehnike osvetljavanja i vrste adhezivno kompozitnog materijala, predstavljen je na spojenim SEM mikrografijama (Slika 11. a, b, c, d).

Slika 12. (a, b, c, d) prikazuje tipičan nalaz širine pukotine između kompozita i gleđi nakon primene HIP i SOF tehnike foto polimerizacije kompozita, za oba adhezivno - kompozitna sistema (ASB/FU i AEO/FU).

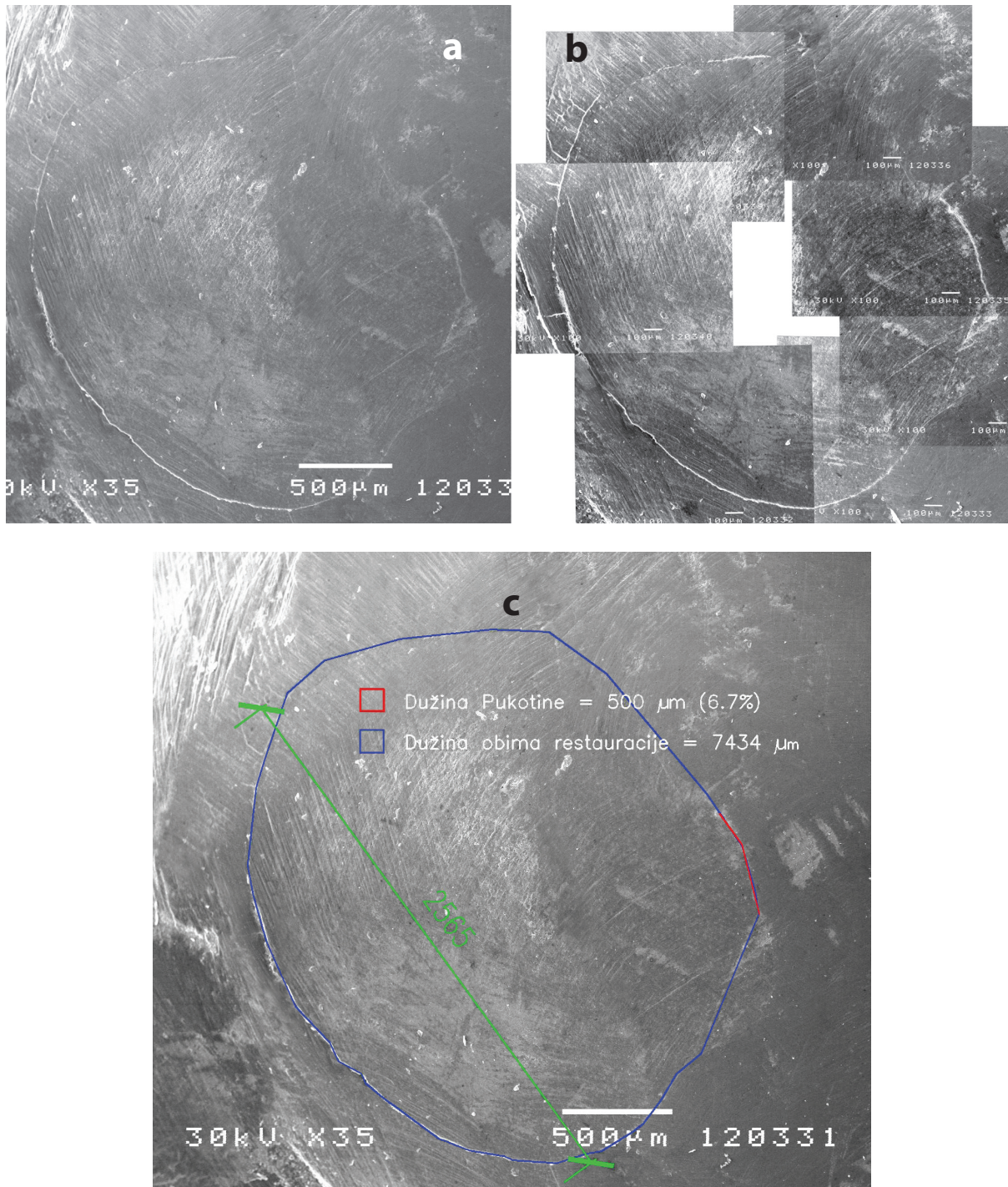
Rezultati merenja dužine marginalne pukotine u gleđi (za 4 grupe uzoraka)

Adper Single Bond 2 – Filtek Ultimate – HIP



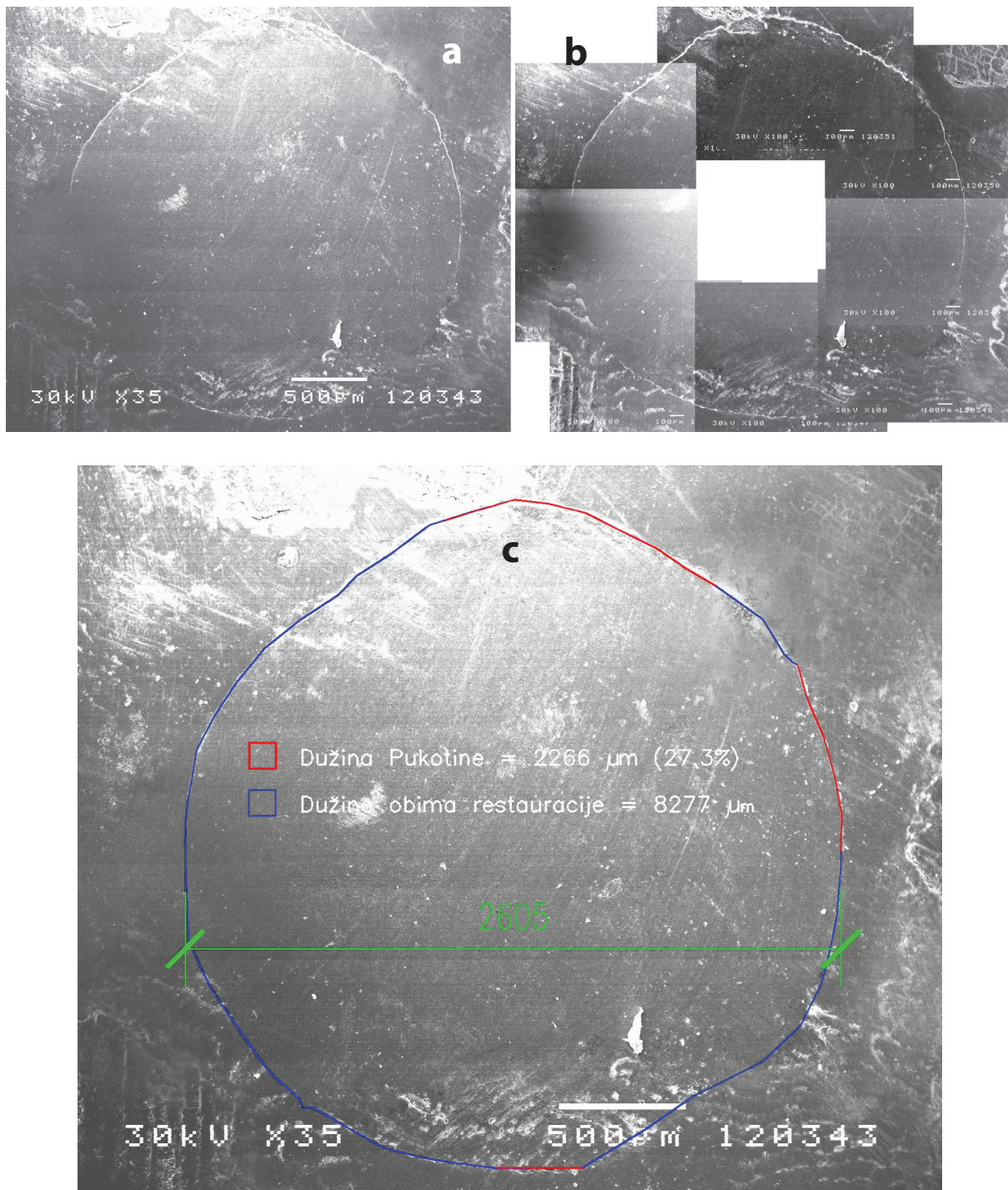
Slika 7. a) SEM mikrografija, uvećanja x35, na kojoj se vidi ceo obim restauracije od Adper Single Bond 2/ Filtek Ultimate u gleđi. Kompozit je polimerizovan standardnom HIP tehnikom osvetljavanja. b) Kompjuterska montaža SEM mikrografija, uvećanja x100, koje predstavljaju sukcesivno snimane segmente obima restauracije od ASB/FU. Ivice restauracije su trasirane do punog prikaza obima restauracije. c) Spojene SEM mikrografije su omogućile merenje dužine marginalne pukotine duž obima. Dužina pukotine je izmerena Auto Desk Auto Cad softverom i prikazana u mikrometrima i procentualno.

Adper Single Bond 2 – Filtek Ultimate – SOF



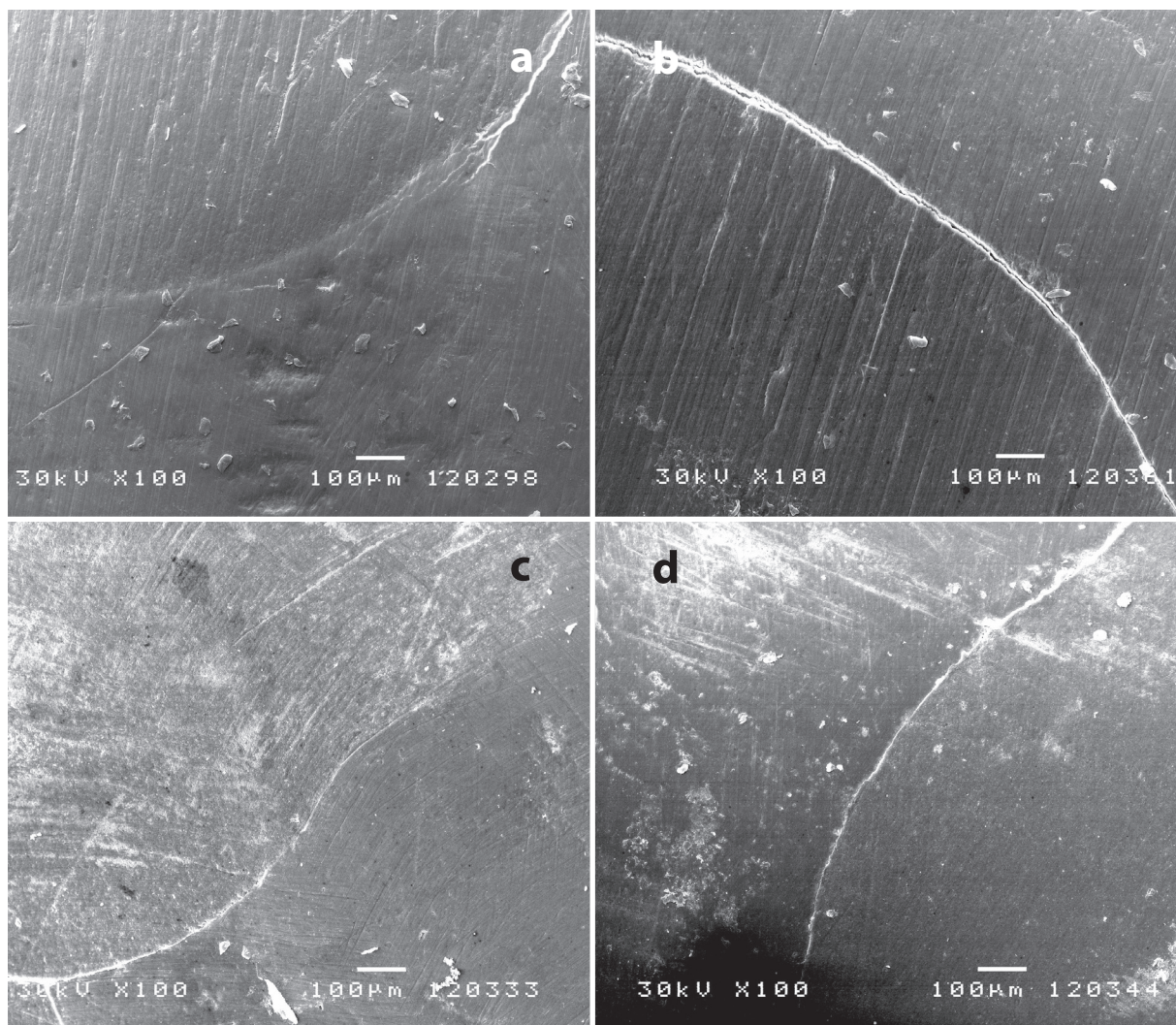
Slika 9. a) SEM mikrografija, uvećanja x35, na kojoj se vidi ceo obim restauracije od Adper Single Bond 2/ Filtek Ultimate u gleđi. Kompozit je polimerizovan sof start ili postepenom (SOF) tehnikom osvetljavanja. b) Kompjuterska montaža SEM mikrografija, x100, koje predstavljaju sukcesivno snimane segmente obima restauracije od ASB/FU. Ivice restauracije su trasirane do punog prikaza obima restauracije. c) Spojene SEM mikrografije segmenata marginalnog pripoja restauracije od ASB/FU za gleđ su omogućile merenje dužine marginalne pukotine duž obima restauracije. Dužina pukotine je prikazana u mikrometrima i procentualno.

Adper Easy One – Filtek Ultimate – SOF



Slika 10. a) SEM mikrografija, uvećanja x35, na kojoj se vidi ceo obim restauracije od Easy One - Filtek Ultimate u gleđi. Kompozit je polimerizovan sof start ili postepenom (SOF) tehnikom osvetljavanja. b) Kompjuterska montaža SEM mikrografija, x100, koje predstavljaju sukcesivno snimane segmente obima restauracije od AEO/FU. Ivice restauracije su trasirane do punog prikaza obima restauracije. c) Spojene SEM mikrografije su omogućile merenje dužine marginalne pukotine duž obima. Dužina pukotine je prikazana u mikrometrima i procentualno.

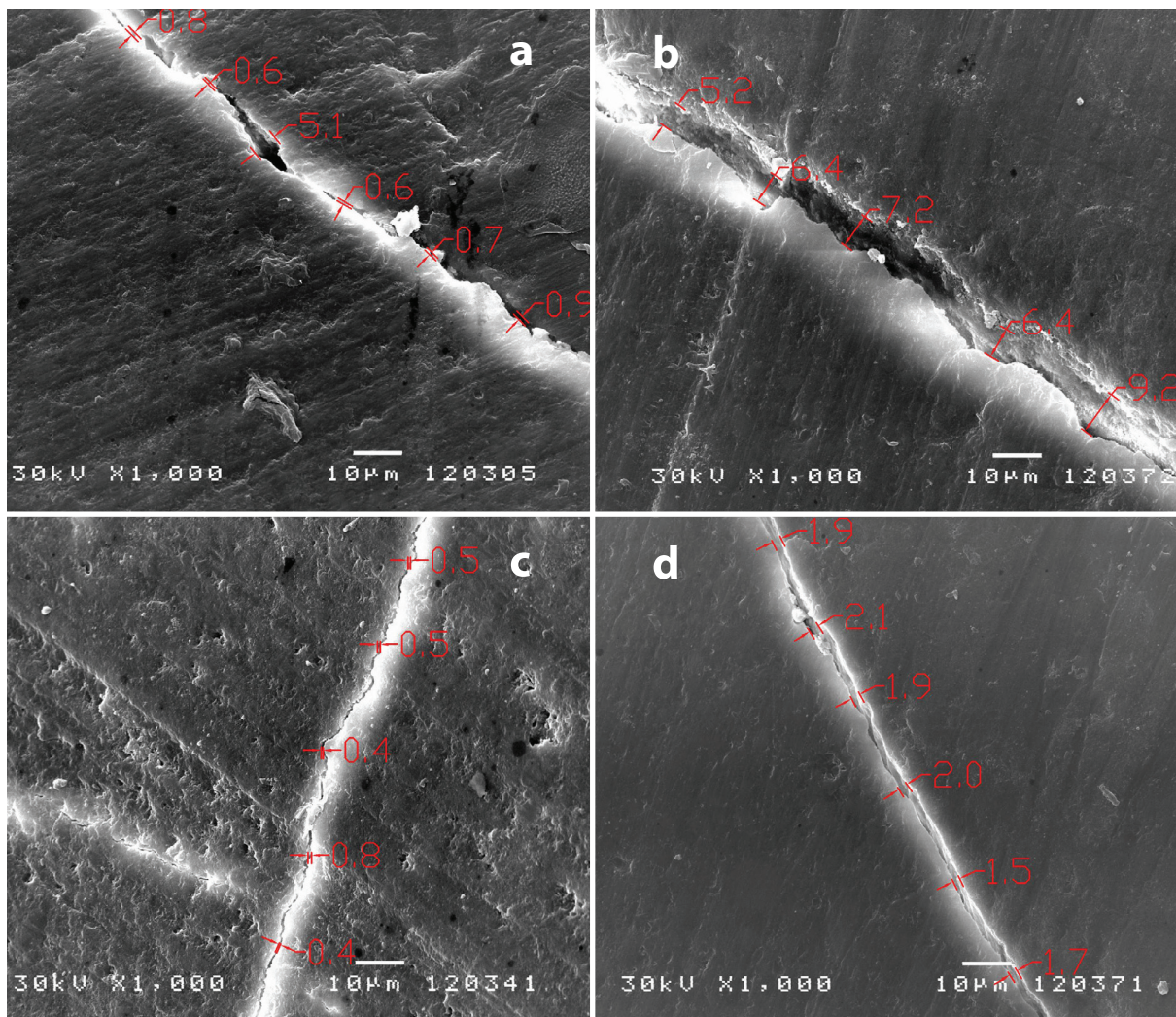
Prikaz tipičnog marginalnog pripoja kompozita za gleđ po obodu restauracija u zavisnosti od tehnike osvetljavanja i vrste adhezivno kompozitnog materijala



Slika 11. a) SEM mikrografija segmenta obima restauracija od Atper Single Bond 2 – Filtek Ultimate, polimerizovanih HIP tehnikom, bez pukotine (etch and rinse adhezivna tehnika) x100. b) SEM mikrografija segmenta obima restauracija od Adper Easy One – Filtek Ultimate, polimerizovanih HIP tehnikom, sa pukotinom (Self etch adhezivna tehnika) x100. c) SEM mikrografija segmenta obima restauracija od Adper Single Bond 2 – Filtek Ultimate, polimerizovanih SOF tehnikom, sa najboljim pripojem za gleđ, x100 (Etch and rinse adhezivna tehnika). d) SEM mikrografija segmenta obima restauracija od Adper Easy One – Filtek Ultimate, polimerizovanih SOF tehnikom, sa neznatnom pukotinom, x100 (Self etch adhezivna tehnika).

Nakon standardne (HIP) tehnike fotopolimerizacije kompozita je uočavana šira i duža marginalna pukotina naročito kod AEO/FU materijala. Nakon *soft start* (SOF) tehnike fotopolimerizacije kompozita marginalna pukotina je bila manje izražena, kod oba materijala.

Rezultati merenja širine marginalne pukotine oko restauracija u gleđi



Slika 12. SEM mikrofotografije, uvećanja x1000, predstavljaju segmente obima restauracija od: a) Adper Single Bond 2 – Filtek Ultimate, polimerizovanih HIP tehnikom, sa prisutnom mikropukotinom (Etch and rinse adhezivna tehnika); b) Adper Easy One – Filtek Ultimate, polimerizovanih HIP tehnikom, sa značajnom pukotinom (Self etch adhezivna tehnika); c) Adper Single Bond 2 – Filtek Ultimate, polimerizovanih SOF tehnikom, sa minimalnom mikropukotinom (Etch and rinse); d) Adper Easy One – Filtek Ultimate, polimerizovanih SOF tehnikom, sa izraženom mikropukotinom (Self etch). Izmerene vrednosti širine pukotine u μm .

Kod *Soft start* (SOF) tehnike fotopolimerizacije kompozita izmerene su manje vrednosti širine marginalne pukotine nego kod standardne (HIP) fotopolimerizacije.

Na osnovu izmerenih dužina i širina marginalnih pukotina oko kompozitnih ispuna u gleđi, utvrđen je prosečni marginalni indeks (MI) gleđi kod standardnog (HIP) i postepenog (SOF) osvetljavanja dva adhezivno-kompozitnih materijala, što je pokazano na Tabeli 4.

Tehnika osvetljavanja	Adhezivno-kompozitni materijal (adhezivna tehnika)	Dužina pukotine (srednja vrednost)	Širina pukotine (srednja vrednost)	MI (marginalni indeks) (srednja vrednost)
HIP (standardna)	ASB/FU (<i>etch and rinse</i>)	736,75 μm (8,31%)	0,806 μm	0,0678
Kontinuirana	AEO/FU (<i>self etch</i>)	3113,04 μm (33,87%)	3,786 μm	1,2858
SOF (postepena)	ASB/FU (<i>etch and rinse</i>)	586,25 μm (6,75%)	0,400 μm	0,0262
Soft start	AEO/FU (<i>self etch</i>)	2241,80 μm (25,30%)	1,868 μm	0,4528

Tabela 4. Rezultati kvantitativne SEM analize adhezivne veze kompozita za gleđ

Na tabeli 4. su prikazani parametri (procenat dužine pukotine i širina pukotine) na osnovu kojih je određen MI gleđi. Uočava se da je najmanji MI gleđi utvrđen kod postepene (SOF) fotopolimerizacije ASB/FU materijala, uz *etch and rinse* adhezivnu tehniku. Takođe je utvrđena i najmanja širina pukotine kod SOF fotopolimerizacije istog materijala.

Osvetljenje	Adh. Sist.	N	Širina pukotine				MI			
			Mean	Std. Dev.	Min	Max	Mean	Std. Dev.	Min	Max
HIP	ASB/FU	50	0,8060	0,92127	0,00	5,10	0,0678	0,09134	0,00	0,57
	AEO/FU	49	3,7857	2,52273	0,00	9,20	1,2858	0,91431	0,00	3,98
	Total	99	2,2808	2,40491	0,00	9,20	0,6707	0,88783	0,00	3,98
SOF	ASB/FU	50	0,4000	0,51508	0,00	2,50	0,0262	0,03213	0,00	0,14
	AEO/FU	50	1,8680	2,06234	0,00	7,50	1,4528	0,48850	0,00	1,81
	Total	100	1,1340	1,66753	0,00	7,50	0,2395	0,40568	0,00	1,81
Total	ASB/FU	100	0,6030	0,77008	0,00	5,10	0,0470	0,07125	0,00	0,57
	AEO/FU	99	2,8172	2,48444	0,00	9,20	0,8651	0,83903	0,00	3,98
	Total	199	1,7045	2,14088	0,00	9,20	0,4540	0,72051	0,00	3,98

Tabela 5. Prosečne vrednosti širine pukotine i indeksa MI gleđi, u zavisnosti od tehnike osvetljavanja

Na tabeli 5. su prikazani osnovni statistički pokazatelji tehnika osvetljavanja i adhezivno-kompozitnih sistema za širinu marginalne pukotine i marginalni indeks (MI) gleđi.

Najmanja prosečna širina pukotine ($0,400 \pm 0,5151$) uočena je u grupi SOF osvetljavanja i primenom ASB/FU materijala a najmanja vrednost indeksa MI ($MI=0,0262 \pm 0,03213$) posle primene SOF osvetljavanja i adhezivno-kompozitnog materijala ASB/FU. Najveća prosečna širina pukotine ($3,7857 \pm 2,5227$) i najveći prosečni $MI=1,2858 \pm 0,9143$ su izmereni kod standardnog osvetljavanja (HIP) i primene AEO/ FU materijala.

Razlike u prosečnoj širini pukotine između svetlosno polimerizujućih tehnika (HIP – 2,2808 μm i SOF – 1,1340 μm) su bile značajne ($r < 0,05$) kao i razlike između različitih adhezivno-kompozitnih sistema (ASB/FU – 0,6030 μm , AEO/FU – 2,8172 μm) ($r < 0,05$). Primenom Two Way ANOVA testa analizirani su rezultati koji prikazuju prisustvo/odsustvo statističke značajnosti izmerenih vrednosti (Tabela 6.)

Osvetljenje	Širina pukotine				MI			
	df	Varijansa	F	Sig.	df	Varijansa	F	Sig.
Corrected Model	3	113,010	38765	0,000	3	16,836	62,799	0,000
Intercept	1	585,210	200,740	0,000	1	41,772	155,810	0,000
Osvetljenje	1	67,153	23,035	0,000	1	9,512	35,480	0,000
AdhSistem	1	246,022	84,391	0,000	1	33,637	125,464	0,000
Osvetljenje* AdhSistem	1	28,421	9,749	0,002	1	7,788	29,051	0,000
Error	195	2,915			195	0,268		
Total	199				199			
Corrected Total	198				198			

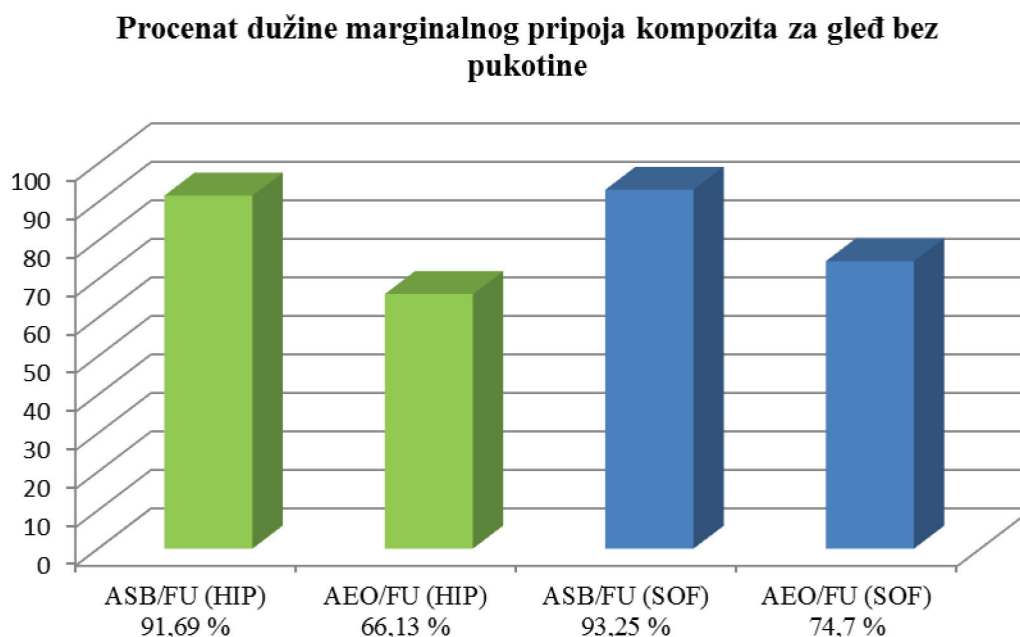
Tabela 6. Značajnost razlika između korišćenih tehnika fotopolimerizacije i korišćenih materijala (adhezivno-kompozitnih sistema) kod gleđi

Na osnovu značajnosti dobijenih u ANOVA testu može se zaključiti da su razlike u prosečnoj širini pukotine koje nastaju usled korišćenja različitih tipova osvetljenja i različitih adhezivnih materijala značajne ($\text{sig}=0,000 < 0,05$). Takođe, na osnovu značajnosti se vidi da postoji i interakcija posmatranih faktora ($\text{sig}=0,002$). Interakcija znači da pukotina kod HIP osvetljavanja nije ista kada se koristi jedan materijal i kada se koristi drugi materijal. Isto važi i za SOF osvetljavanje, odnosno, da se pukotine razlikuju kada se koriste različiti materijali. Isti zaključak se može izvesti i kada je u pitanju indeks MI. Razlike nastale usled korišćenja različite tehnike osvetljavanja su statistički značajne ($\text{sig}=0,000 < 0,05$). Razlike nastale usled korišćenja različitih adhezivno-kompozitnih materijala su, takođe, statistički značajne ($\text{sig}=0,000 < 0,05$). Postoji interakcija osvetljavanja i vrste adhezivnog materijala ($\text{sig}=0,000 < 0,05$), odnosno, MI indeksi gleđi se i kod SOF i kod HIP osvetljavanja razlikuju kada se koriste različiti materijali.

Na osnovu analize značajnosti dobijenih ANOVA testom uočeno je da su razlike u prosečnoj širini pukotine između različitih tehnika osvetljavanja (HIP=2,28 \pm 2.405 μm , SOF=1,343 \pm 0.667 μm) značajne, ($F=23.035$ $\text{sig}=0,000$ $r < 0,0001$) kao i razlike između različitih adhezivnih materijala (ASB/FU=0,603 \pm 0.77 μm , AEO/ FU =2,817 \pm 2.484 μm) ($F=84.391$ $\text{sig}=0,000$ $r < 0,0001$). Na osnovu ovih razlika u značajnosti vidi se da postoji interakcija između tehnike osvetljavanja i vrste adhezivnog materijala ($F=9.749$ $\text{sig}=0,002$).

Razlike u vrednostima MI, usled korišćenja različite tehnike osvetljavanja, su takođe statistički značajne ($F=35.480$ $\text{sig}=0,000$ $r < 0,0001$) kao i razlike usled korišćenja različitih adhezivnih materijala ($F=125.464$ $\text{sig}=0,000$ $r < 0,0001$). I ovde je uočeno da postoji interakcija između tehnika osvetljavanja i vrste adhezivnog materijala ($F=29.051$ $\text{sig}=0,000$ $r < 0,0001$).

Grafički prikaz marginalnog pripoja adhezivno-kompozitnih materijala za gleđ u zavisnosti od tehnike fotopolimerizacije kompozita



Grafikon 1. Najveći procenat pripoja bez pukotine utvrđen je kod marginalne adaptacije ASB/FU materijala za gleđ, uz postepeno (SOF) osvetljavanje i etch and rinse adhezivnu tehniku.

Najbolja marginalna adaptacija kompozitnih smola za gleđ postignuta je pomoću ASB/FU materijala i postepenog, *soft start* (SOF) osvetljavanja, gde je prosečna dužina pripoja bez pukotine iznosila 93,25%. Najslabiji kvalitet pripoja uočen je kod AEO/FU materijala i standardnog, kontinuiranog osvetljavanja (HIP), kada je izmerena prosečna dužina pripoja bez pukotine od 66,13%.

Etch and rinse adhezivna tehnika i materijal ASB/FU su pokazali značajno veći procenat ivica bez pukotine u gleđi (prosečno 92,5%), u poređenju sa *self etch* tehnikom i materijalima AEO/FU (prosečno 70,4%).

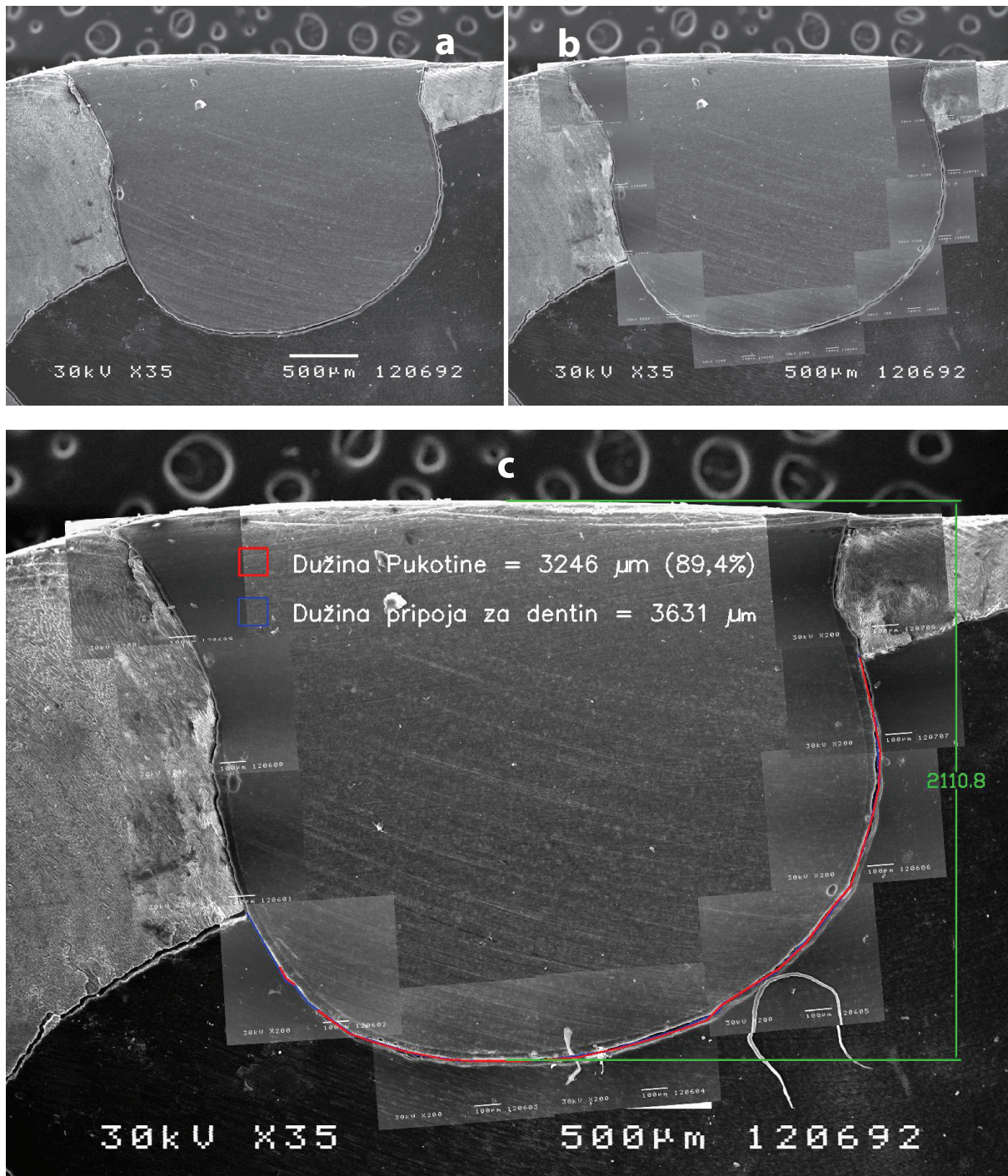
6.2. REZULTATI KVANTITATIVNE SEM ANALIZE PRIPOJA KOMPOZITNIH SMOLA ZA DENTIN (PRESECI KROZ RESTAURACIJE)

Kvantitativna analiza marginalnog pripoja kompozitnih restauracija za dentin pokazala je razlike u dužini i širini marginalne mikropukotine oko restauracija, u zavisnosti od tehnike osvetljavanja a naročito u zavisnosti od primenjenog adhezivno kompozitnog materijala, odnosno primenjene dve različite adhezivne tehnike vezivanja kompozita za zubno tkivo.

Utvrđena je značajno bolja marginalna adaptacija kompozita za dentin uz korišćenje *etch and rinse* adhezivne tehnike i ASB/FU materijala, u odnosu na *self etch* adhezivnu tehniku i AEO/FU materijal. Što se tiče tehnike osvetljavanja kompozita, utvrđen je nešto bolji marginalni pripoj kompozita za dentin uz SOF tehniku fotopolimerizacije, u odnosu na HIP tehniku, ali bez statistički značajnih razlika između tehnika osvetljavanja.

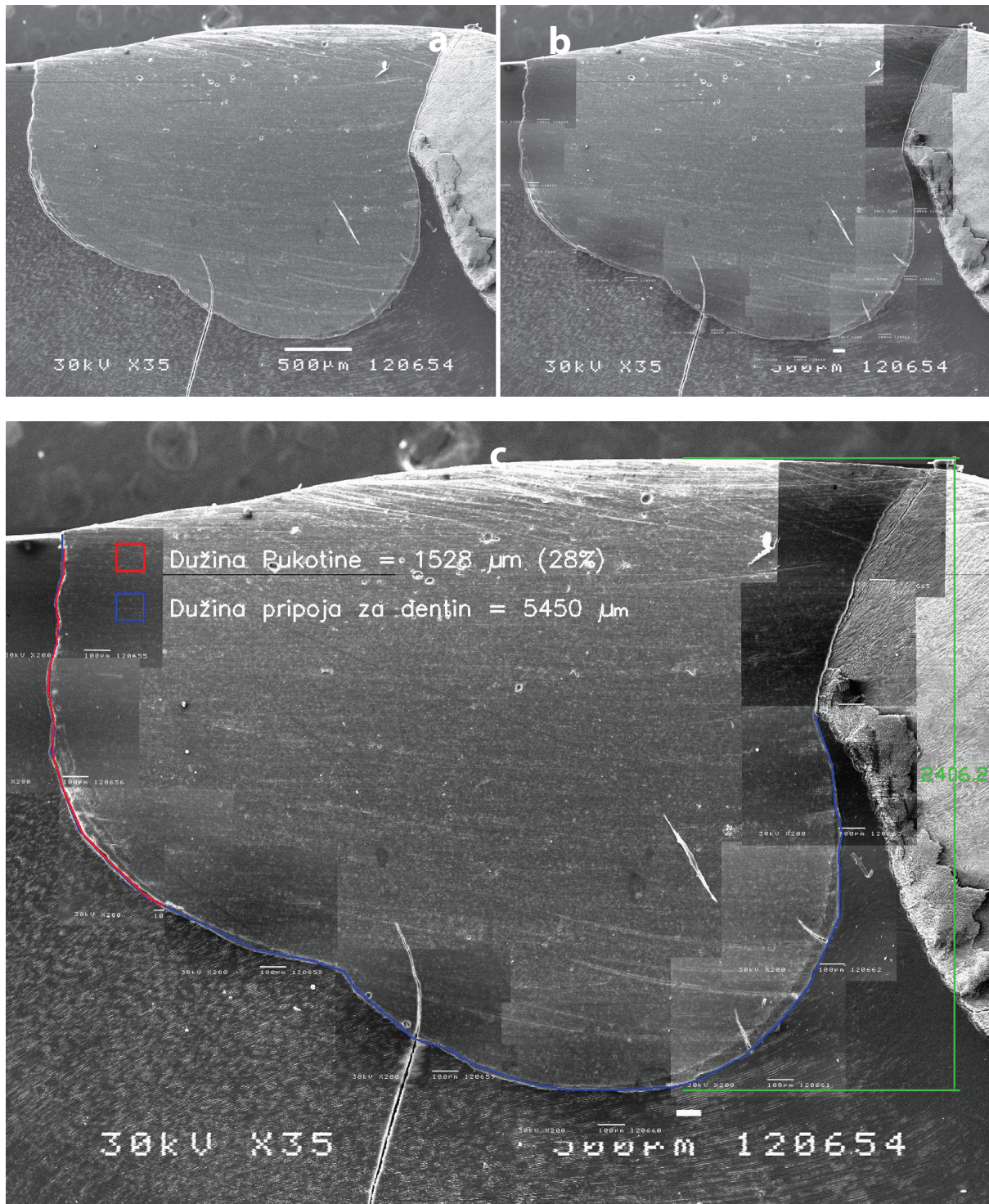
Tipičan nalaz dužina ivičnih pukotina, za sve četiri grupe restauracija, prikazan je na spojenim SEM mikrografijama segmenata pripoja restauracija za dentin, snimljenim pod uvećanjem x100 (Slike 13-16.). Izmerene širine ivične pukotine prikazane su na SEM mikrografijama uvećanja x1000 (Slike 17-20.).

Adper Easy One – Filtek Ultimate – HIP



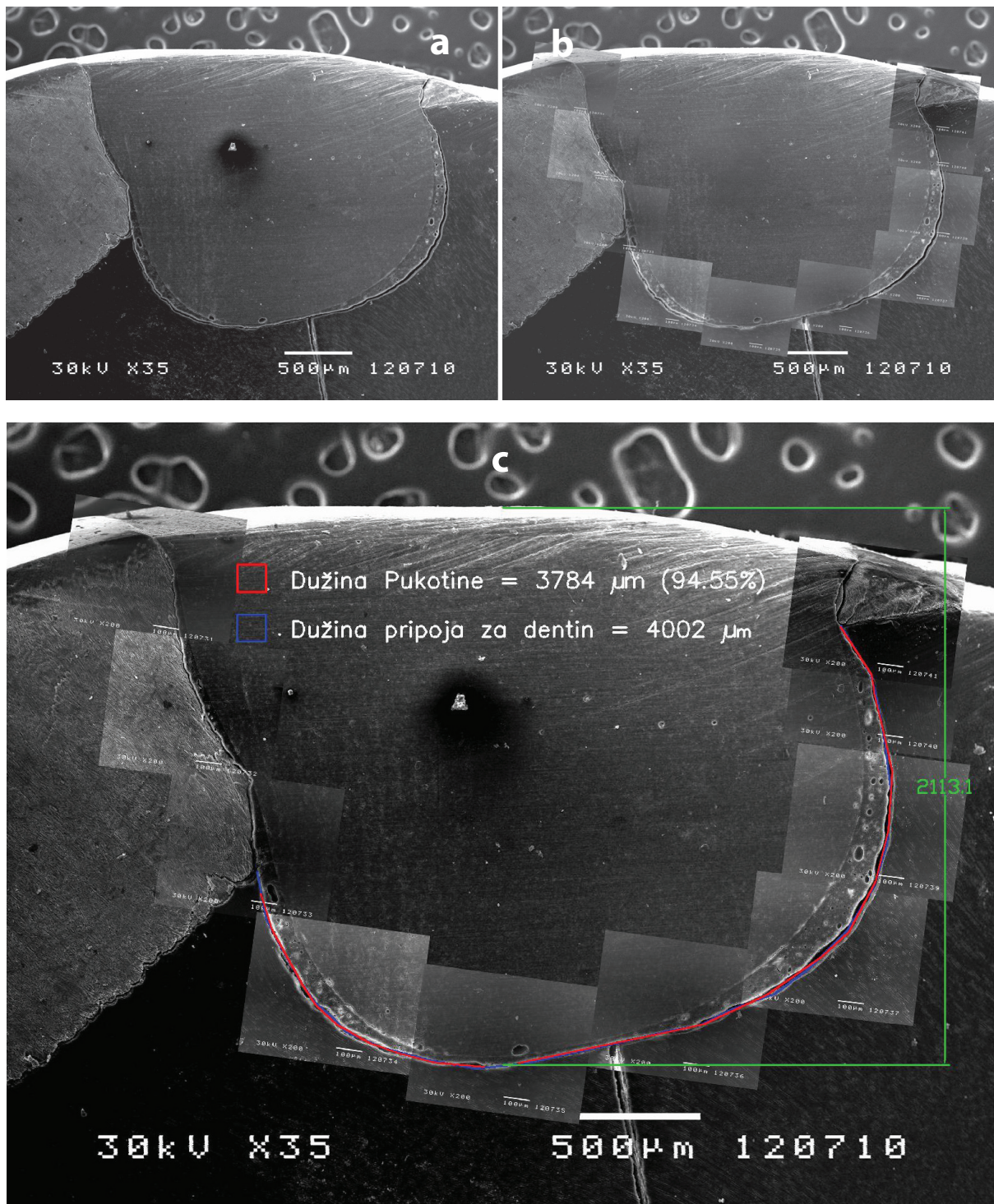
Slika 14. a) SEM mikrografija (uvećanja x35) na kojoj se vidi površina sagitalnog preseka restauracije od Adper Easy One / Filtek Ultimate i njen pripoj za gleđ i dentin. Kompozit je polimerizovan standardnom HIP tehnikom osvetljavanja. b) Kompjuterska montaža SEM mikrografija (uvećanja x200) koje predstavljaju sukcesivno snimane segmente pripoja restauracije od AEO/FU za gleđ i dentin. Ivice restauracije su trasirane do pune dužine pripoja restauracije. c) Spojene SEM mikrografije su omogućile merenje dužine marginalne pukotine u dentinu, duž pripoja. Dužina pukotine u dentinu je prikazana u mikrometrima i procentualno, počev od gledno dentinske granice.

Adper Single Bond 2 – Filtek Ultimate – SOF



Slika 15. a) SEM mikrografija (uvećanja x35) na kojoj se vidi površina sagitalnog preseka restauracije od Adper Single Bond 2/ Filtek Ultimate i njen pripoj za gleđ i dentin. Kompozit je polimerizovan SOF tehnikom osvetljavanja. b) Kompjuterska montaža SEM mikrografija (uvećanja x200) koje predstavljaju sukcesivno snimane segmente prijopa restauracije od ASB/FU za gleđ i dentin. Ivice restauracije su trasirane do pune dužine prijopa restauracije. c) Spojene SEM mikrografije su omogućile merenje dužine marginalne pukotine u dentinu, duž prijopa. Dužina pukotine u dentinu je prikazana u mikrometrima i procentualno, počev od gleđno dentinske granice.

Adper Easy One – Filtek Ultimate – SOF

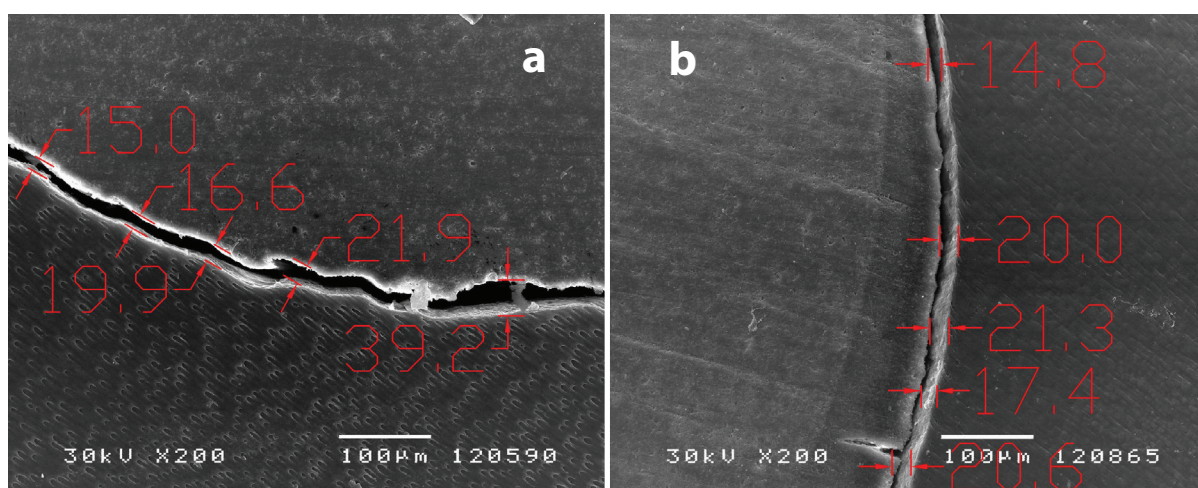


Slika 16. a) SEM mikrografija (uvećanja x35) na kojoj se vidi površina sagitalnog preseka restauracije od Adper Easy One - Filtek Ultimate i njen pripoj za gleđ i dentin. Kompozit je polimerizovan postepenom SOF tehnikom osvetljavanja. b) Kompjuterska montaža SEM mikrografija (uvećanja x200) koje predstavljaju sukcesivno snimane segmente pripoja restauracije od AEO/FU za gleđ i dentin. Ivice restauracije su trasirane do pune dužine pripoja restauracije. c) Spojene SEM mikrografije su omogućile merenje dužine marginalne pukotine u dentinu, duž pripoja. Dužina pukotine u dentinu je prikazana u mikrometrima i procentualno, počev od gledno dentinske granice.

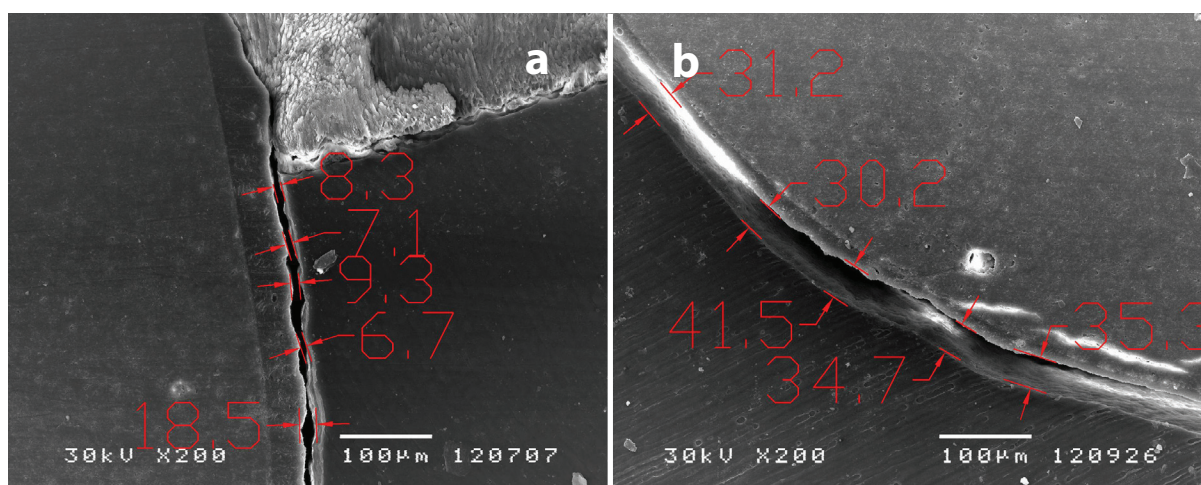
Rezultati merenja širine marginalne pukotine u dentinu

U ovom ispitivanju uočen je najbolji marginalni pripoj kompozita za dentin (najmanje širine pukotine), na preseku restauracija od Adper Single Bond2-Filtek Ultimate, nakon fotopolimerizacije kompozita SOF tehnikom i uz *etch and rinse* adhezivni postupak.

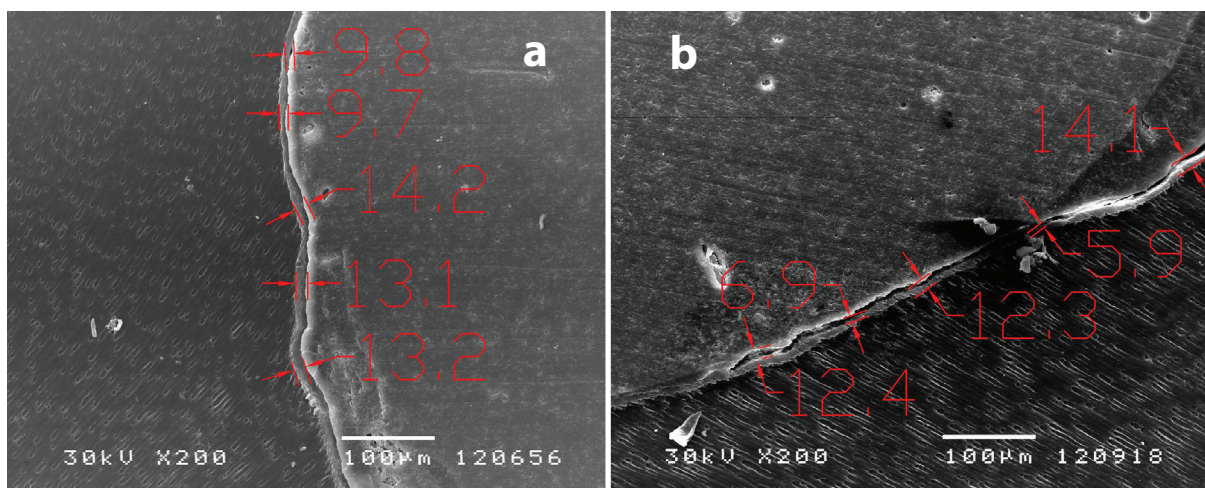
Slabiji kvalitet veze kompozita za dentin (veće širine pukotine) utvrđen je oko restauracija od Adper Easy One - Filtek Ultimate, polimerizovanih HIP i SOF tehnikom (*self etch* adhezivni postupak).



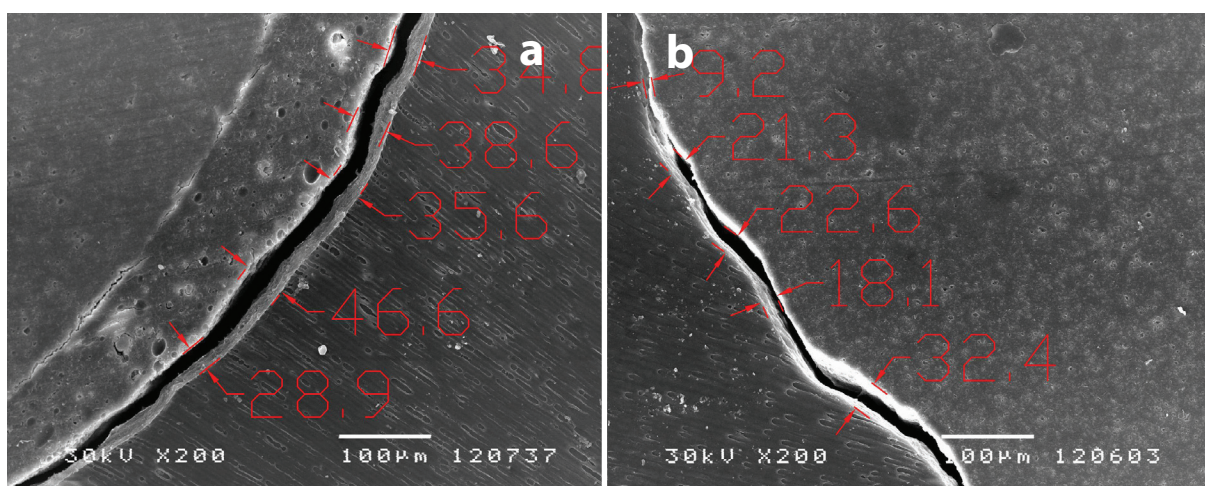
Slika 17. a i b. SEM mikrofotografije (uvećanja x200) sa segmentima ivice restauracija sa pukotinom od Adper Single Bond2 - Filtek Ultimate materijala (HIP osvetljavanje). Etch and rinse adhezivna tehnika. Izmerene širine pukotine su u mikrometrima.



Slika 18. a i b. SEM mikrofotografija (uvećanja x200) sa segmentima ivice restauracija sa pukotinom od Adper Easy One - Filtek Ultimate (HIP osvetljavanje). Self etch adhezivna tehnika. Izmerene širine pukotine su u mikrometrima.



Slika 19. a i b. SEM mikrofotografija (uvećanja x200) sa segmentima ivice restauracija sa pukotinom od Adper Single Bond2 - Filtek Ultimate (SOF osvetljavanje). Etch and rinse adhezivna tehnika. Izmerene širine pukotine su u mikrometrima.



Slika 20. a i b. SEM mikrofotografija (uvećanja x200) sa segmentima ivice restauracija sa pukotinom od Adper Easy One - Filtek Ultimate (SOF osvetljavanje). Self etch adhezivna tehnika. Izmerene širine pukotine su u mikrometrima.

Na osnovu izmerenih dužina i širina marginalnih pukotina oko kompozitnih ispuna u dentinu, utvrđen je prosečni marginalni indeks (MI) dentina kod standardnog (HIP) i postepenog (SOF) osvetljenja dva adhezivno-kompozitna materijala (Tabela 7.).

Na tabeli 7. su prikazani parametri (procenat dužine pukotine i širina pukotine) na osnovu kojih je određen MI dentina. Uočava se da je najmanji MI dentina utvrđen kod postepene (SOF) fotopolimerizacije ASB/FU materijala, uz *etch and rinse* adhezivnu tehniku, iako je najmanja prosečna širine pukotine utvrđena kod standardne (HIP) fotopolimerizacije, istog materijala.

Tehnika osvetljavanja	Adhezivno-kompozitni materijal (adhezivna tehnika)	Dužina pukotine (srednja vrednost)	Širina pukotine (srednja vrednost)	MI (marginalni indeks) (srednja vrednost)
HIP (standardna)	ASB/FU (etch and rinse)	2605,7 μm (54,50%)	7,72 μm	4,72
Kontinuirana	AEO/FU (self etch)	3528,7 μm (79,20%)	15,01 μm	11,65
SOF (postepena)	ASB/FU (etch and rinse)	1232,0 μm (26,90%)	8,5 μm	2,26
Soft start	AEO/FU (self etch)	3558,0 μm (75,60%)	13,79 μm	10,76

Tabela 7. Rezultati kvantitativne SEM analize adhezivne veze kompozita za dentin

Osvetljenje	Adh. Sist.	N	Širina pukotine				MI			
			Mean	Std. Dev.	Min	Max	Mean	Std. Dev.	Min	Max
HIP	ASB/FU	40	7,72	9,28	0,00	39,20	4,72	6,56	0,00	25,09
	AEO/FU	40	15,10	10,92	0,00	41,50	11,65	8,09	0,00	30,50
	Total	80	11,36	10,72	0,00	41,50	8,18	8,10	0,00	30,50
SOF	ASB/FU	30	8,50	11,42	0,00	37,10	2,26	2,99	0,00	9,65
	AEO/FU	40	13,79	14,00	0,00	46,60	10,76	11,88	0,00	44,06
	Total	70	11,52	13,14	0,00	46,60	7,12	10,08	0,00	44,06
Total	ASB/FU	70	8,05	10,18	0,00	39,20	3,67	5,44	0,00	25,09
	AEO/FU	80	14,40	12,49	0,00	46,60	11,20	10,11	0,00	44,06
	Total	150	11,40	11,87	0,00	46,60	7,69	9,06	0,00	44,06

Tabela 8. Prosečne vrednosti širine pukotine i indeksa MI u dentinu, u zavisnosti od tehnike osvetljavanja

Na tabeli 8. su prikazani osnovni statistički pokazatelji tehnika osvetljavanja i adhezivno kompozitnih sistema za širinu marginalne pukotine i marginalni indeks (MI) dentina.

Najbolje rezultate (najmanju širinu pukotine) daje primena HIP osvetljavanja i ASB/FU adhezivni materijal. Najmanja vrednost indeksa MI se dobija kada se koristi osvetljavanje SOF i adhezivni materijal ASB/FU.

Najmanja prosečna širina pukotine ($7,72 \pm 0,9,28$) uočena je u grupi HIP osvetljavanja i primenom ASB/FU materijala a najmanja vrednost indeksa MI ($MI=2,26 \pm 2,99$) posle primene tehnike SOF osvetljavanja i adhezivno-kompozitnog materijala ASB/FU. Najveća prosečna širina pukotine ($15,01 \pm 10,92$) i najveći prosečni $MI=11,65 \pm 8,09$ su izmereni kod standardnog osvetljavanja (HIP) i primene AEO/ FU materijala.

Razlike u prosečnoj širini pukotine između svetlosno polimerizujućih tehnika (HIP-11,36 μ m i SOF-11,52 μ m) nisu bile značajne ($r>0,05$) dok su razlike između različitih adhezivno-kompozitnih materijala bile značajne (ASB/FU-8,05 μ m, AEO/FU-14,40 μ m) ($r<0,05$).

Primenom Two Way ANOVA testa analizirani su rezultati koji prikazuju prisustvo/odsustvo statističke značajnosti izmerenih vrednosti (Tabela 9.)

Osvetljenje	Širina pukotine				MI			
	df	Varijansa	F	Sig.	df	Varijansa	F	Sig.
Corrected Model	3	513,72	3,85	0,110	3	746,17	10,89	0,000
Intercept	1	18700,61	240,47	0,000	1	7975,96	116,49	0,000
Osvetljenje	1	1,78	0,01	0,908	1	103,14	1,50	0,222
AdhSistem	1	1458,50	10,95	0,001	1	2194,81	32,05	0,000
Osvetljenje* AdhSistem	1	36,92	0,27	0,599	1	22,96	0,33	0,563
Error	146	133,12			146	68,46		
Total	150				150			
Corrected Total	149				149			

Tabela 9. Značajnost razlika između korišćenih tehnika fotopolimerizacije i korišćenih materijala (adhezivno-kompozitnih sistema) kod dentina

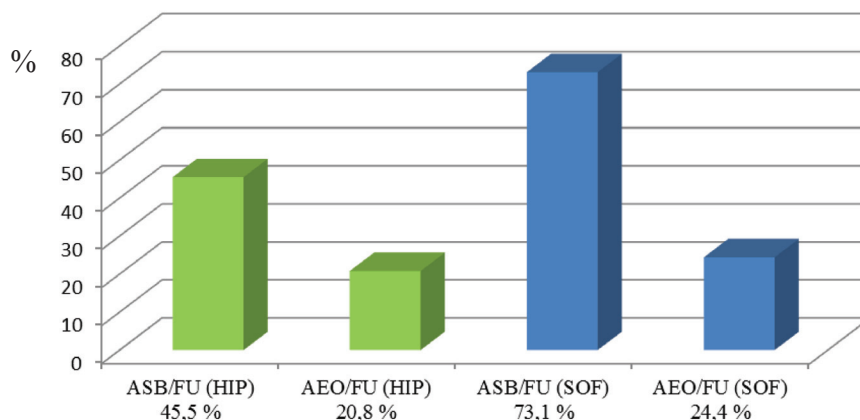
Na osnovu značajnosti dobijenih u ANOVA testu zaključeno je da razlike u prosečnoj širini pukotine u dentinu koje nastaju usled korišćenja različitih tipova osvetljavanja nisu značajne ($\text{sig}=0,908>0,05$), dok usled korišćenja različitih adhezivnih materijala jesu značajne ($\text{sig}=0,001<0,05$). Takođe, na osnovu značajnosti se vidi da ne postoji interakcija posmatranih faktora ($\text{sig}=0,599>0,05$) jer je i kod HIP osvetljavanja i kod SOF osvetljavanja manja pukotina kada se koristi ASB/FU materijal.

Isti zaključak se može izvesti i kada je u pitanju indeks MI. Razlike nastale usled korišćenja različite tehnike osvetljavanja nisu statistički značajne ($\text{sig}=0,222>0,05$). Razlike nastale usled korišćenja različitih adhezivno-kompozitnih materijala su statistički značajne ($\text{sig}=0,000<0,05$). Ne postoji interakcija osvetljavanja i vrste adhezivnog materijala ($\text{sig}=0,563>0,05$), jer je bez obzira na tehniku osvetljavanja MI indeks manji u slučaju korišćenja ASB/FU adhezivnog materijala.

Na osnovu analize značajnosti dobijenih ANOVA testom uočeno je da razlike u prosečnoj širini pukotine između svetlosno polimerizujućih tehnika (HIP=11,36 \pm 10,72 μ m, SOF=11,52 \pm 13,14 μ m) nisu statistički značajne $F=0,01$ ($\text{sig}=0,908>0,05$), dok su razlike između različitih adhezivno-kompozitnih materijala značajne (ASB/FU=8,05 \pm 10,18 μ m, AEO/FU =14,40 \pm 12,49 μ m) $F=10,95$ ($\text{sig}=0,001<0,05$). Ne postoji interakcija posmatranih faktora $F=0,27$ ($\text{sig}=0,599>0,05$) jer je i kod HIP osvetljenja i kod SOF osvetljenja manja pukotina kada se koristi ASB/FU materijal.

Grafički prikaz marginalnog pripoja adhezivno-kompozitnih materijala za dentin u zavisnosti od tehnike fotopolimerizacije kompozita

Procenat dužine marginalnog pripoja kompozita za dentin bez pukotine



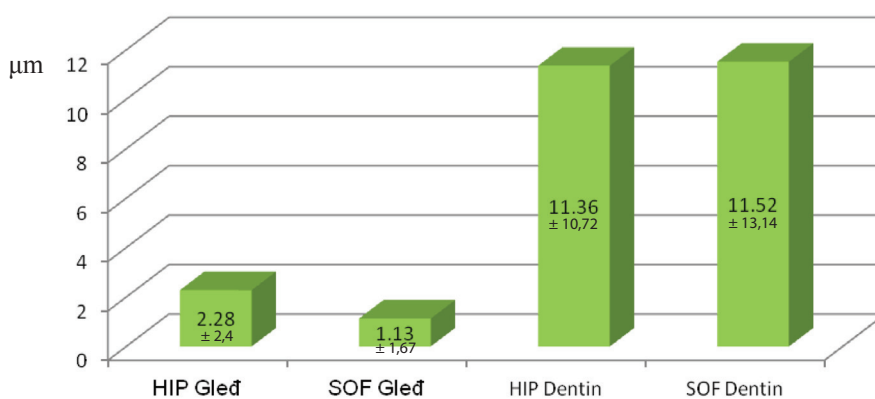
Grafikon 2. Najveći procenat pripoja bez pukotine utvrđen je kod marginalne adaptacije ASB/FU materijala za dentin, uz postepeno (SOF) osvetljavanje i etch and rinse adhezivnu tehniku.

Najbolja marginalna adaptacija kompozitnih smola za dentin utvrđena je kod ASB/FU materijala i postepenog, *soft start* (SOF) osvetljavanja, sa prosečnom dužinom pripoja bez pukotine od 73,1%. Najslabiji kvalitet pripoja uočen je kod AEO/FU materijala i standardnog, kontinuiranog osvetljavanja (HIP), kada je izmerena prosečna dužina pripoja bez pukotine u dentinu od 20,8%.

Etch and rinse adhezivna tehnika i materijali ASB/FU su pokazali značajno veći procenat ivica bez pukotine u dentinu (prosečno 59,3%), u poređenju *sa self etch* tehnikom i materijalima AEO/FU (prosečno 22,6%).

Uporedni grafički prikaz uticaja svetlosnih i adhezivnih tehnika na prosečnu širinu marginalne pukotine i MI kompozitnih restauracija gleđi i dentina

Prosečna širina pukotine kod dve tehnike osvetljavanja



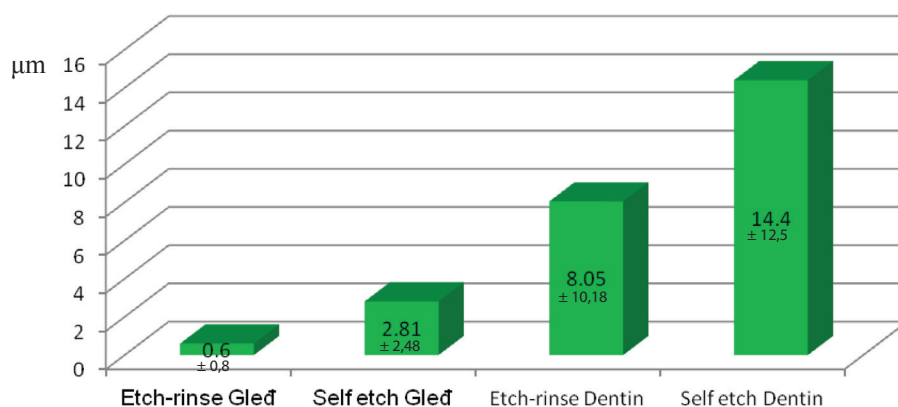
Grafikon 3. Utvrđena je statistički značajna razlika u širini pukotine u gleđi ($\text{sig} = 0,000 < 0,05$) ali ne i u dentinu ($\text{sig} = 0,908 > 0,05$) kod primene HIP i SOF tehnike osvetljavanja. U gleđi je izmerena manja pukotina kod SOF osvetljavanja a u dentinu kod HIP osvetljavanja.

Prosečan MI kod dve tehnike osvetljavanja



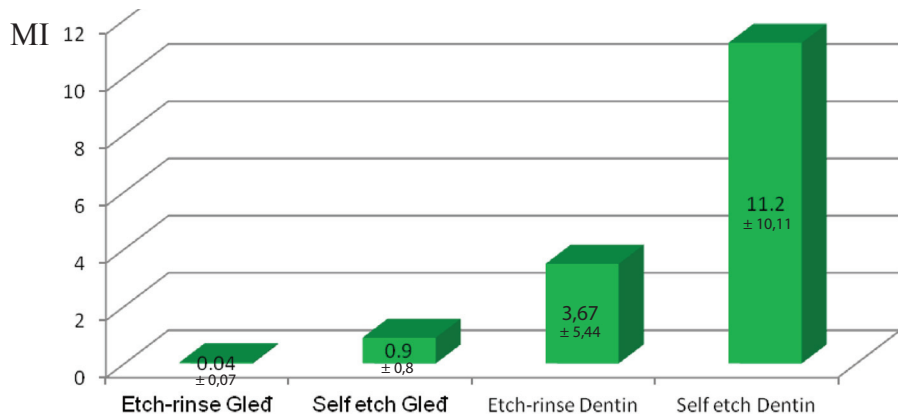
Grafikon 4. Utvrđeno je manji MI gleđi i dentinaa kod SOF osvetljavanja, u odnosu HIP osvetljavanja. Razlike su statistički značajne kod gleđi ($\text{sig} = 0,000 < 0,05$) a nisu značajne kod dentina ($\text{sig} = 0,222 > 0,05$).

Prosečna širina pukotine kod dve adhezivne tehnike



Grafikon 5. Postoje statistički značajne razlike u širini pukotine i kod gleđi i kod dentina u odnosu na etch and rinse i self etch adhezivnu tehniku ($\text{sig} = 0,000 < 0,05$). Uža pukotina je utvrđena, kod oba tkiva, primenom etch and rinse tehnike.

Prosečni MI kod dve adhezivne tehnike



Grafikon 6. Utvrđeno je manji MI (bolji marginalni pripoj kompozita za gleđ i dentin) kod etch and rinse tehnike, razlike su statistički značajne u odnosu na self etch tehniku ($\text{sig} = 0,000 < 0,05$).

6.3. REZULTATI KVALITATIVNE MIKROMORFOLOŠKE SEM ANALIZE PRIPOJA KOMPOZITNIH SMOLA ZA GLEĐ (PRESEK KROZ RESTAURACIJE)

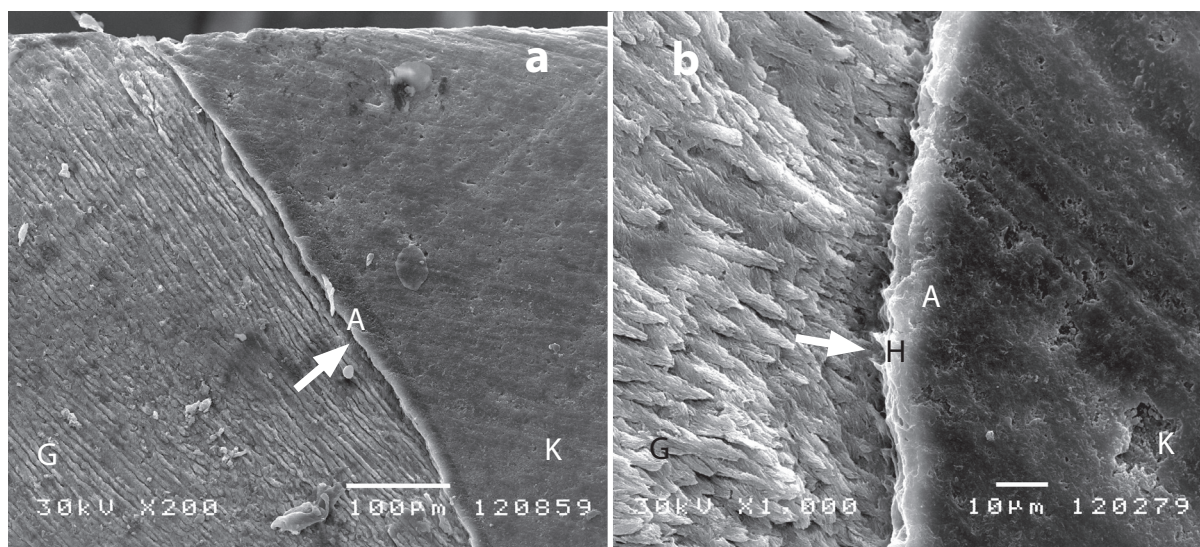
Kvalitativna analiza pripoja kompozitnih smola, na presecima kroz restauracije, je pokazala brojne kraće i duže mikrotrnove polimerizovane smole na spoju Adper Single Bond 2-Filtek Ultimate materijala i gleđi, uz *etch and rinse* adhezivnu tehniku. Ovaj spoj je bio uglavnom, bez mikropukotine, kod istog adhezivno kompozitnog materijala uz *soft start* osvetljavanja (SOF), dok je marginalna adaptacija kompozitne smole, kod primene standardne- kontinuirane (HIP) fotoaktivacije kompozita i *self etch* tehnike, bila nešto slabija, sa retkim mikrotrnovima smole i češćom pojavom mikropukotine.

Kod *etch and rinse* adhezivne tehnike gleđni hibridni sloj se sastojao iz dva elementa: interkristalno infiltrovane smole i formiranih trnova smole koji prodiru u interprizmatske prostore gleđi. Zbog toga je adheziv Adper Single Bond formirao deblji hibridni sloj (5-10 μm) i kraće i duže trnove smole na spoju sa gleđnim tkivom.

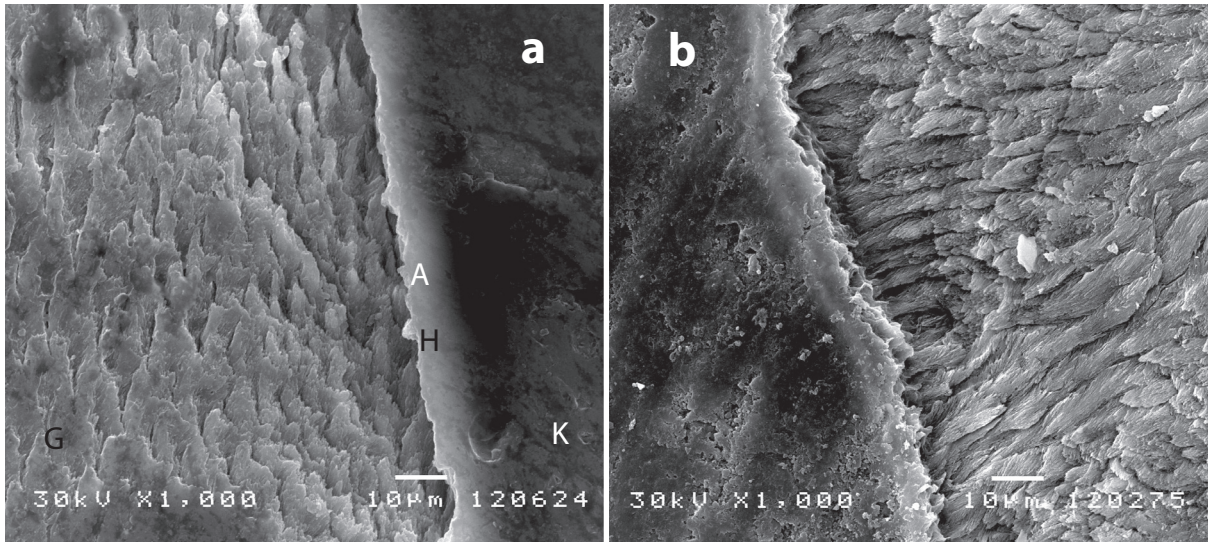
Kod *self etch* adhezivne tehnike gleđni hibridni sloj se sastojao uglavnom od *smear layer*, sa nekompletnom i minimalnom nagrizenošću prizmatične gleđi. Iz tog razloga je adheziv Adper Easy One formirao tanak hibridni sloj (1-3 μm) na prizmatičnoj gleđi. Ovaj sloj se sastojao uglavnom iz interkristalno infiltrovane smole ali bez trnova smole, tako da je često dolazilo do njegovog odvajanja od gleđi.

Reprezentativna adhezija za gleđ dva adhezivno-kompozitna materijala, nakon dve tehnike osvetljavanja kompozita, prikazana je na slikama 21-36.

Tipično za I grupu ASB/FU - HIP (*etch and rinse* tehnika)



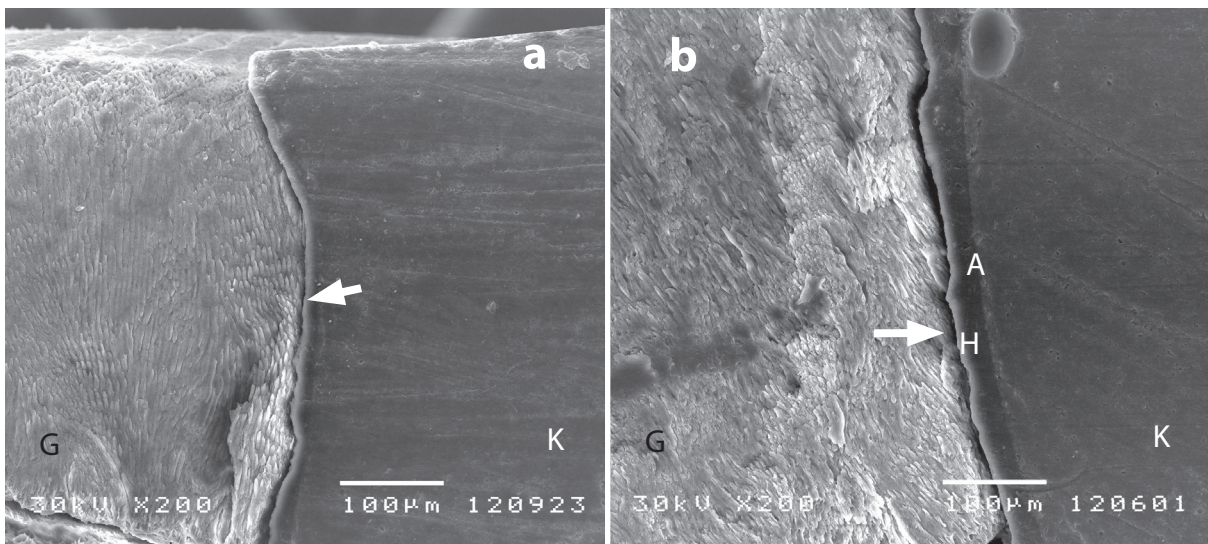
Slika 21. SEM mikrografije predstavljaju pripoj adhezivno-kompozitnog sistema Adper Single Bond 2- Filtek Ultimate za gleđ, uz HIP osvetljavanje kompozita, na presecima kroz restauracije. G: gleđ, K: kompozit, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Adhezivni i hibridni sloj se uočavaju na površini gleđi. Adhezivni sloj je nešto širi od hibridnog sloja. Hibridni sloj je svetlije obojen (strelica) (uvećanje 200x, bar 100 μm). b) Od hibridnog sloja polaze interprizmatski produžeci smole ka gleđi (strelica) (uvećanje 1000x, bar 10 μm).



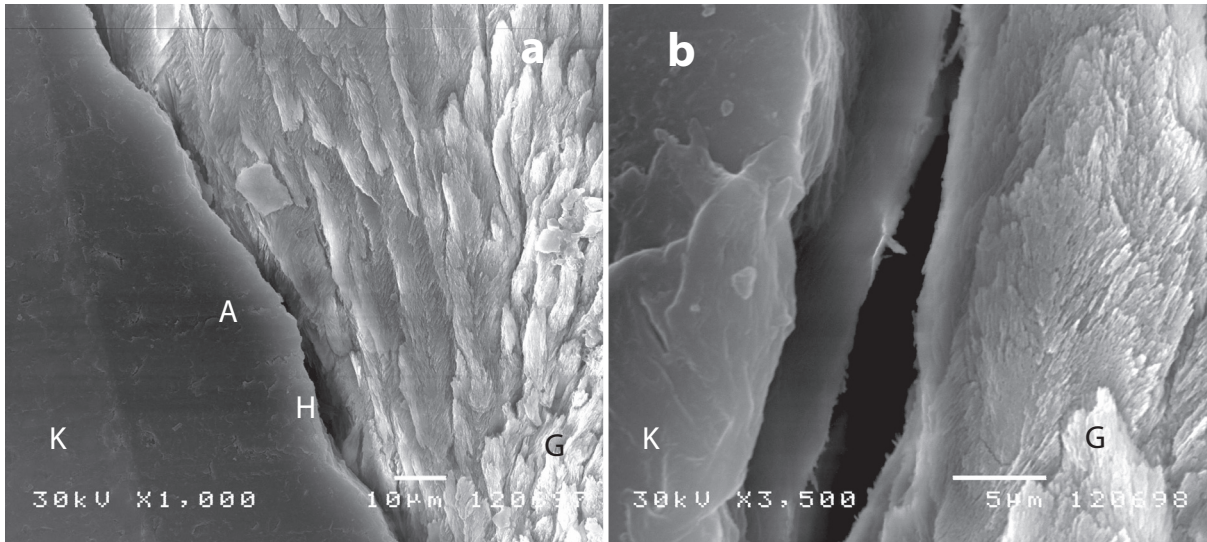
Slika 22. SEM mikrografije prikazuju dobru adhezivnu vezu koju formira Adper Single Bond 2 - Filtek Ultimate sa gleđnim tkivom, uz HIP osvetljavanje kompozita, na presecima kroz restauracije. G: gleđ, K: kompozit, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Adhezivni i hibridni sloj se preklapaju a vide se i interprizmatiski produžeci smole (uvećanje 1000x, bar 10 µm). b) Adhezivni spoj kompozita i gleđi sa jasnije izraženim kraćim i dužim mikrotrnovima smole koji se pružaju od hibridnog sloja prema interprizmatiskim prostorima gleđi (uvećanje 1000x, bar 10 µm).

SEM nalaz je jasno ukazao na postojanje adhezivnog i hibridnog sloja na spoju kompozita i gleđi. Adhezivni i hibridni slojevi na gleđi, kod *etch and rinse* tehnike su se često stapali u jedinstveni sloj debljine 5-10 µm.

Tipično za II grupu AEO/FU - HIP (*self etch* tehnika)



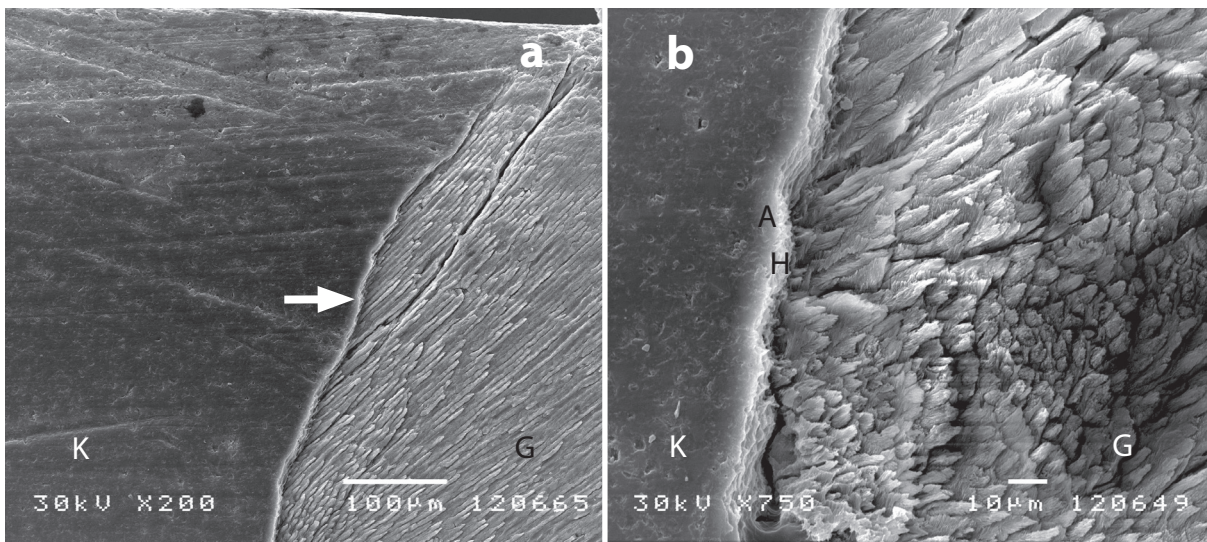
Slika 23. SEM mikrografije prikazuju nedovoljan pripoj Adper Easy One-Filtek Ultimate materijala za gleđ, uz HIP osvetljavanje, na presecima kroz restauracije. G: gleđ, K: kompozit, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Adhezivni i hibridni sloj su odvojeni od gleđi uočljivom mikropukotinom (strelica) (uvećanje 200x, bar 100 µm). b) Debljina adhezivnog sloja varira duž pripoja kompozita za gleđ i mestimično iznosi preko 30 µm. Hibridni sloj je loše definisan i zato teško uočljiv na pojedinim segmentima pripoja kompozita za gleđ. (uvećanje 200x, bar 100 µm).



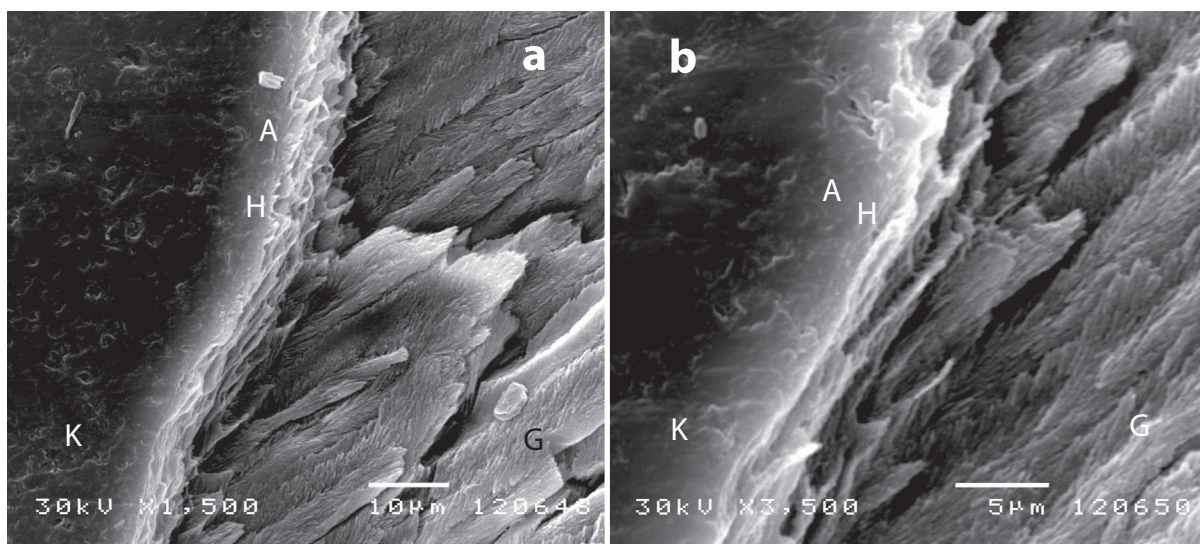
Slika 24. SEM mikrografije prikazuju mikropukotinu na spoju Adper Easy One-Filtek Ultimate materijala za gleđ, uz HIP osvetljavanje, na presecima kroz restauraciju. G: gleđ, K: kompozit, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Vide se deblji adhezivni sloj (25-50 μm) i tanak hibridni sloj uz njega, oba odvojena od gleđi (uvećanje 1000x, bar 10 μm). b) Isti uzorak sa prikazom mikropukotine između kompozita i gleđi (uvećanje 3500x, bar 5 μm).

Adhezivni sloj na gleđi je bio znatno veće debljine od hibridnog sloja, kod self etch tehnike, uz uočljivu mikropukotinu na spoju materijala i gleđi.

Tipično za III grupu ASB/FU - SOF (etch and rinse tehnika)

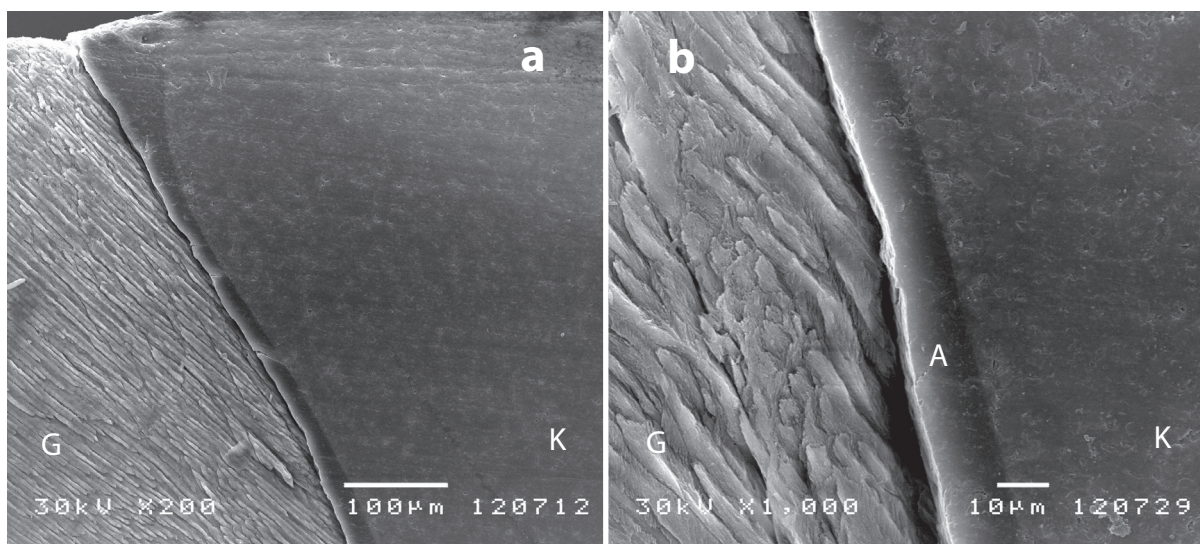


Slika 25. SEM mikrografije predstavljaju dobru adhezivnu vezu Adper Single Bond 2-Filtek Ultimate materijala za gleđ, uz SOF osvetljavanje kompozita, na presecima kroz restauracije. G: gleđ, K: kompozit, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Idealna mikromehanička veza između kompozita i gleđi. Adhezivni i hibridni sloj su povezani sa gleđnim tkivom i nema mikropukotine na spoju (uvećanje 200x, bar 100 μm). b) Adhezivni i hibridni sloj na gleđi se vide kao jedan jedinstveni sloj debljine 5-10 μm . Uočavaju se mikrotrnovi smole prema gleđi (uvećanje 750x, bar 10 μm).

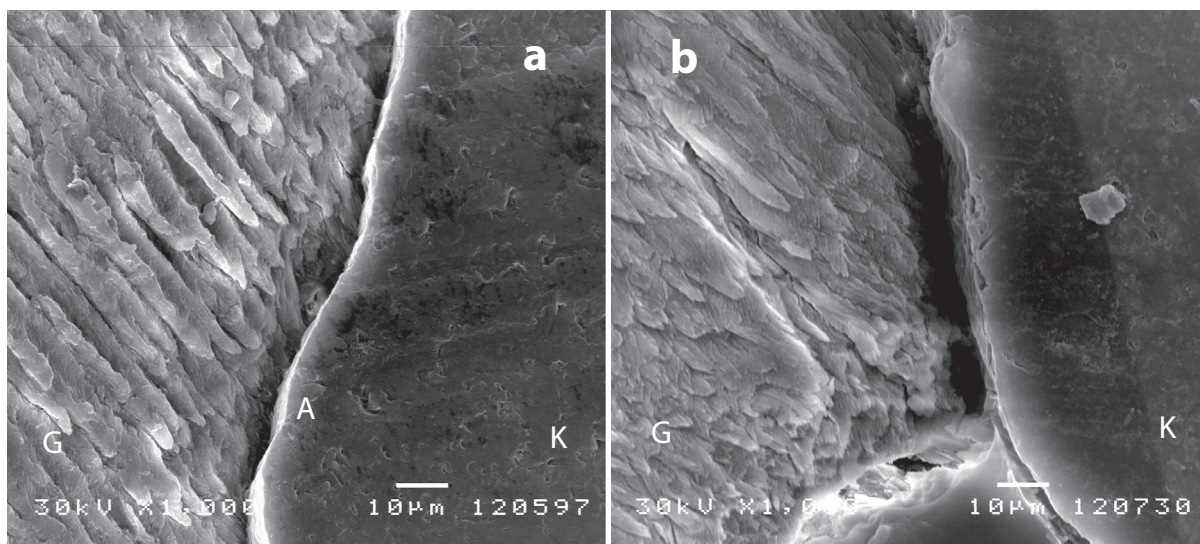


Slika 26. SEM mikrografije prikazuju idealnu adhezivnu vezu Adper Single Bond2-Filtek Ultimate materijala za gleđ, uz SOF osvetljavanje kompozita, na presecima kroz restauracije. G: gleđ, K: kompozit, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Mikromorfološki izgled kvalitetnog adhezivnog spoja kompozita i gleđi. Vide se brojni kraći i duži mikrotrnovi smole koji prodiru u gleđ i stapaju se sa gleđnim tkivom (uvećanje 1500x, bar 10 µm). b) Adhezivni i hibridni sloj na gleđi zajedno čine jedinstven vezivni spoj širine oko 5 µm. Prodor smole u interprizmatске i interkristalne prostore obezbeđuje dobro mikromehaničko vezivanje kompozita za gleđ (uvećanje 3500x, bar 5 µm).

Tipično za IV grupu AEO/FU - SOF (self etch tehnika)



Slika 27. SEM mikrografije predstavljaju nedovoljan marginalni pripoj Adper Easy One-Filtek Ultimate materijala za gleđ, uz SOF osvetljavanje kompozita, na presecima kroz restauraciju. G: gleđ, K: kompozit, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Prisutna je mikropukotina na spoju materijala i gleđi. Adhezivni i hibridni sloj su odvojeni od gleđi (uvećanje 200x, bar 100 µm). b) Adhezivni sloj je značajne debljine dok se hibridni sloj vidi kao tanka bela linija bliže mikropukotini (uvećanje 1500x, bar 10 µm).



Slika 28. SEM mikrografije pokazuju lošu marginalnu adaptaciju adhezivno-kompozitnog sistema Adper Easy One-Filtek Ultimate materijala za gleđ, uz SOF osvetljavanje kompozita, na presecima kroz restauraciju. G: gleđ, K: kompozit, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) izrazita mikropukotina na spoju materijala i gleđi. Nema mikrotrnova smole. Adhezivni i hibridni sloj nisu jasno izraženi (uvećanje 1000x, bar 10 μm). b) Debljina adhezivnog sloja je preko 30 μm . Hibridni sloj se vidi kao veoma tanka, isprekidana bela linija. Oba sloja su odvojena od gleđi značajnom pukotinom. Prikazan je predeo gleđno dentinske granice (uvećanje 1000x, bar 10 μm).

6.4. REZULTATI KVALITATIVNE MIKROMORFOLOŠKE SEM ANALIZE PRIPOJA KOMPOZITNIH SMOLA ZA DENTIN (PRESEK KROZ RESTAURACIJE)

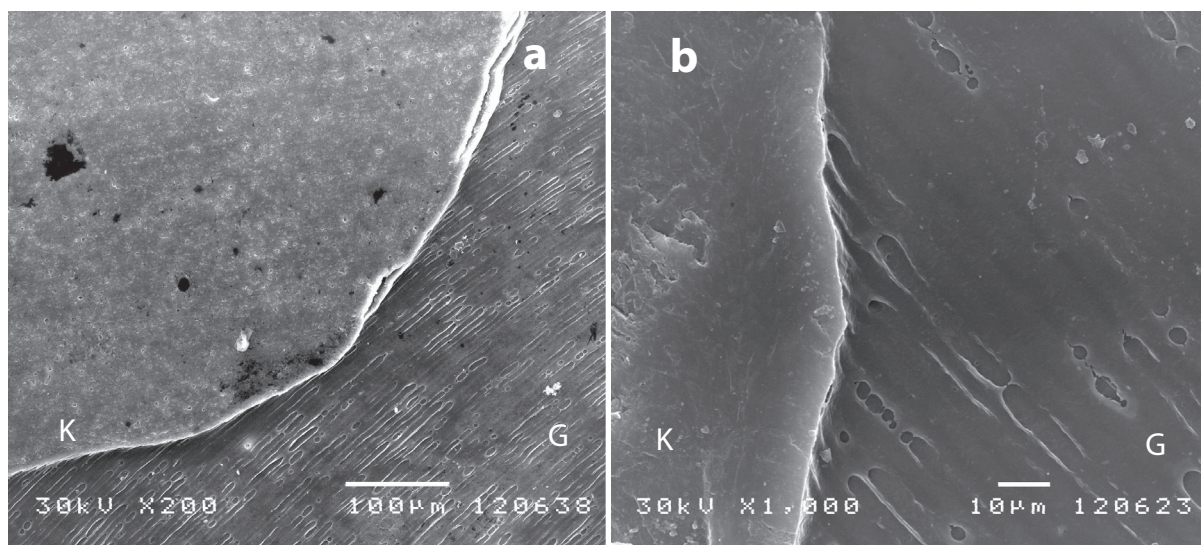
Kvalitativna analiza pripoja kompozitnih smola za dentin je pokazala prisustvo adhezivnog i hibridnog sloja kao i kraće i duže produžetke polimerizovane smole u dentinskim kanalićima na spoju Adper Single Bond2-Filtek Ultimate materijala i dentina, kod obe tehnike fotopolimerizacije kompozita uz kondicioniranje kaviteta fosornom kiselinom (*etch and rinse* adhezivna tehnika). Primena fosorne kiseline je dovela do stvaranja hibridnog sloja znatne debljine (oko 5 μm) dok je debljina adhezivnog sloja inosila od 10-20 μm .

Tipičan SEM nalaz kompozita za dentin kod *etch and rinse* adhezivne tehnike je bio dobra adaptacija materijala uz prodor smole u dentinske kanaliće, dok je manjom dužinom kontakta uočavano popuštanje adhezivne veze i mikropukotine.

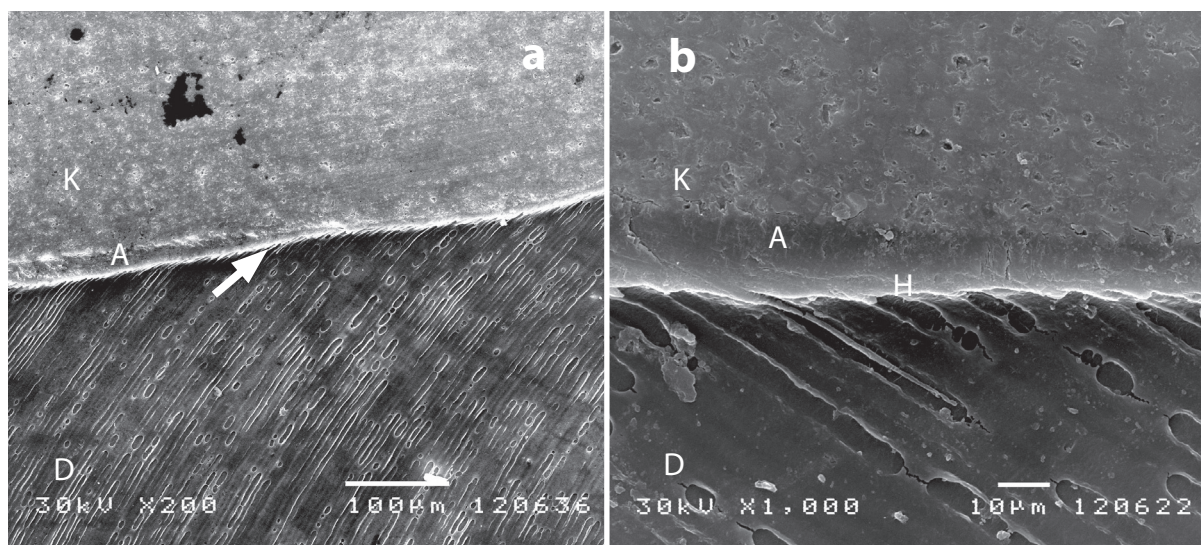
Marginalni pripoj kompozita za dentin, kod primene *self etch* tehnike i AEO/FU materijala je bio znatno slabijeg kvaliteta, sa čestom pojavom mikropukotine, uz obe tehnike osvetljavanja. Veživanje *self etch* adheziva za dentin, odnosno AEO/FU materijala je, usled potpunog rastvaranja dentinske smear layer, dovelo do stvaranja tankog hibridnog sloja (1-2 μm) ili njegovog ne formiranja unutar intertubulusnog dentina. Kod ove adhezivne tehnike nisu viđani intratubulusni produžeci smole. Adhezivni sloj je često bio odvojen od dentina a njegova debljina je varirala od 20-50 μm . Tipičan SEM nalaz pripoja kompozita za dentin, kod primene *self etch* tehnike je bio odvajanje debelog adhezivnog sloja i tankog hibridnog sloja od dentina (kohezivna fraktura) ili odvajanje adhezivnog od hibridnog sloja i formiranje mikro pukotine između njih (adhezivna fraktura).

Na slikama od 30-37. predstavljen je adhezivno kompozitni spoj sa dentinom, za sve četiri grupe uzoraka.

Tipično za I grupu, ASB/FU – HIP (etch and rinse tehnika)

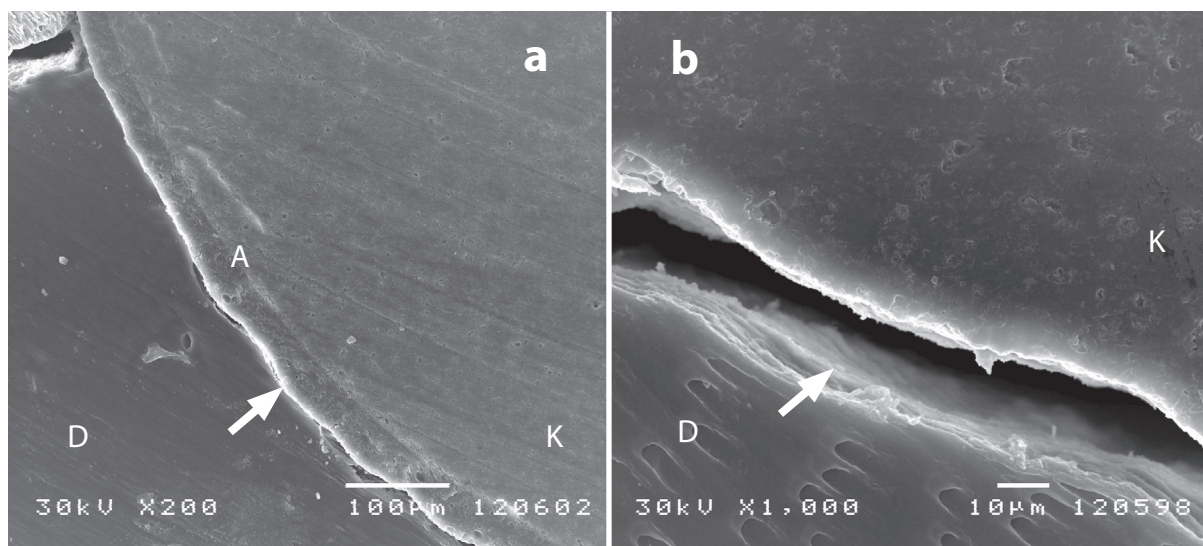


Slika 29. SEM mikrografije uzoraka koji prikazuju zadovoljavajuću adhezivnu vezu koju formira Adper Single Bond 2- Filtek Ultimate materijala sa dentinom, nakon HIP fotopolimerizacije kompozita, na preseccima kroz restauracije. K: kompozit, D: dentin. a) Većom dužinom pripoja se uočava dobra adaptacija materijala za površinu dentina i koso presečene dentinske kanaliće (uvećanje 200x, bar 100 µm) b) Prikaz adhezivne veze istog materijala za dentin na uvećanju 1000x, bar 10 µm.

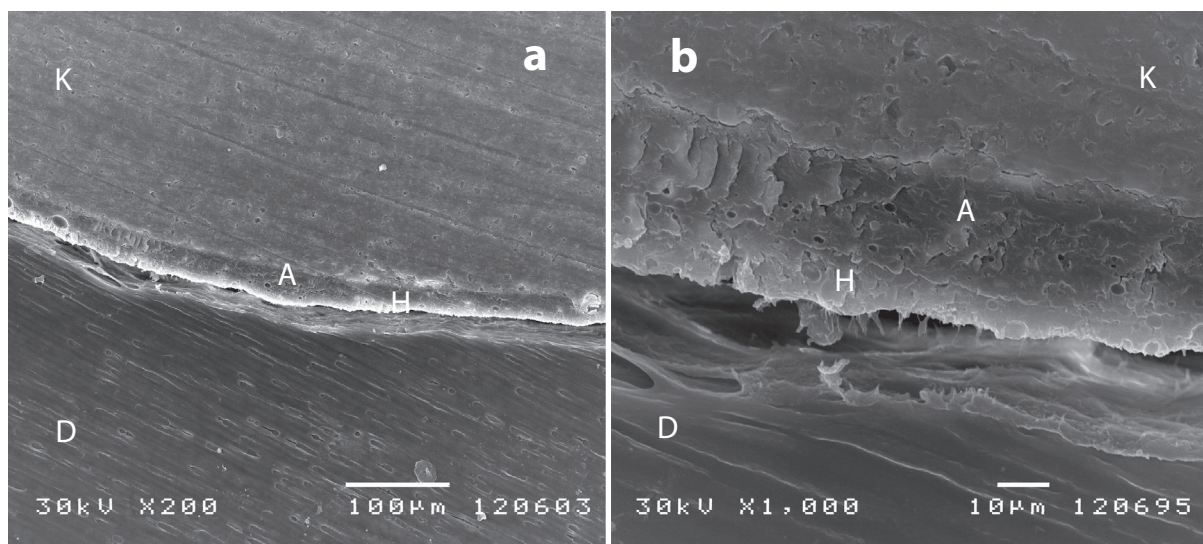


Slika 30. SEM mikrografije prikazuju tipičnu adhezivnu vezu koju formira Adper Single Bond 2- Filtek Ultimate sa dentinom, nakon HIP fotopolimerizacije kompozita, na preseccima kroz restauracije. K: kompozit, D: dentin, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Segment pripoja bez pukotine. Uočava se adhezivni sloj koji je mestimično veće debljine od hibridnog sloja. Hibridni sloj je dobro definisan u vidu deblje bele linije uz dentin (strelica). Vidljiv je i prodor smole u dentinske kanaliće (uvećanje 200x, bar 100 µm). b) Adhezivni sloj je širok 10-20 µm dok širina hibridnog sloja iznosi 3-5 µm. Postoje kraći i duži produžeci smole u dentinskim kanalićima. U centru grafije se vidi jedan duži produžetak smole (uvećanje 1000x, bar 10 µm).

Tipično za II grupu, AEO/FU - HIP (self etch tehnika)

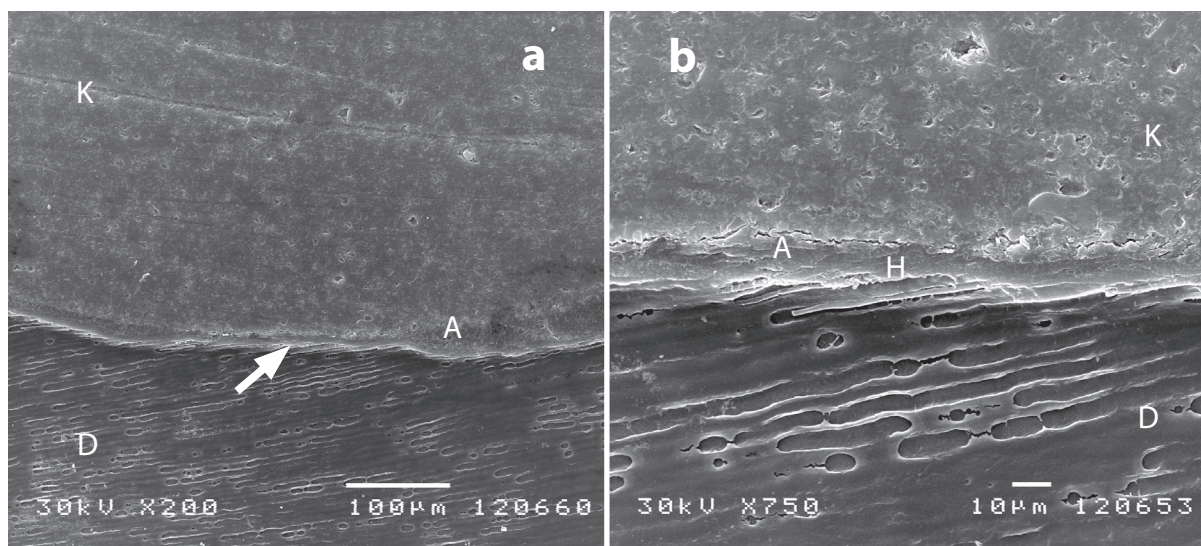


Slika 31. SEM mikrografije uzoraka koji prikazuju nedovoljan marginalni pripoj Adper Easy One – Filtek Ultimate materijala za dentin, nakon HIP osvetljavanja kompozita, na presecima kroz restauracije. K: kompozit, D: dentin, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Deblji adhezivni sloj (oko 50 µm) i veoma tanak hibridni sloj (1-2 µm) su većom dužinom pripoja odvojeni od dentina - kohezivna fraktura na spoju kompozit/dentin. Hibridni sloj je u vidu tanke bele linije i označen je strelicom (uvećanje 200x, bar 100 µm). b) Marginalna mikropukotina između materijala i dentina. Na površini dentina nema tragova smole (uvećanje 1000x, bar 10 µm).

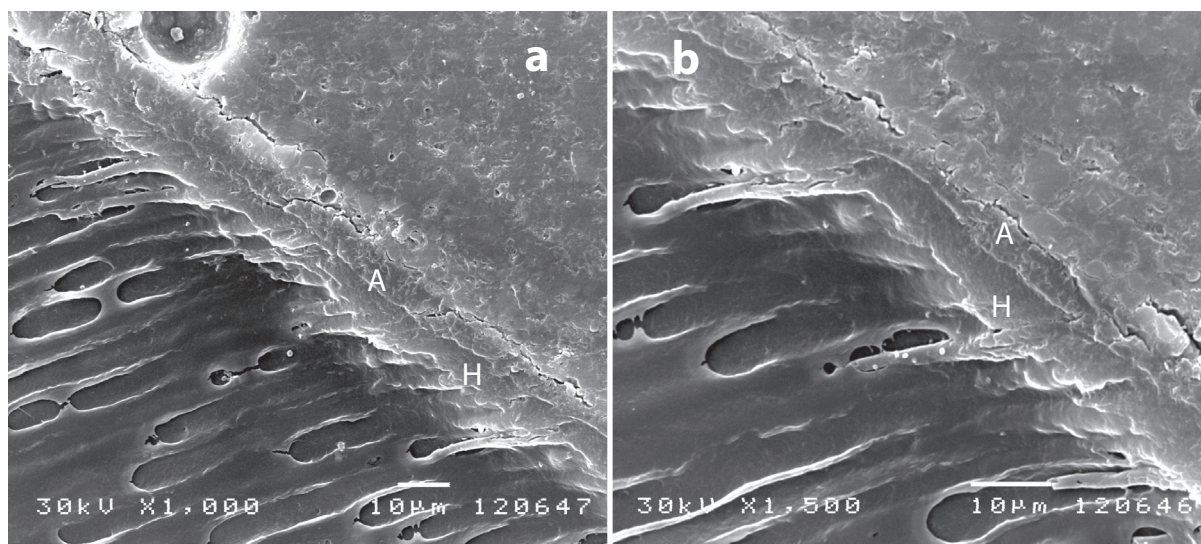


Slika 32. SEM mikrografije prikazuju tipičan marginalni odnos Adper Easy One – Filtek Ultimate materijala za dentin, nakon HIP osvetljavanja kompozita, na presecima kroz restauracije. K kompozit, D dentin, A adhezivni sloj, H hibridni sloj a) Adhezivni sloj je znatno deblji od hibridnog sloja i oba su odvojena od dentina b) Jasno uočljiva razlika u debljini adhezivnog i hibridnog sloja. Iskidani produžeci smole se vide u mikropukotini između kompozita i dentina. To može biti posledica polimerizacione kontrakcije kompozita i slabe adhezivne veze kompozita sa dentinom (uvećanje 1000x, bar 10 µm)

Tipično za III grupu, ASB/FU - SOF (etch and rinse tehnika)

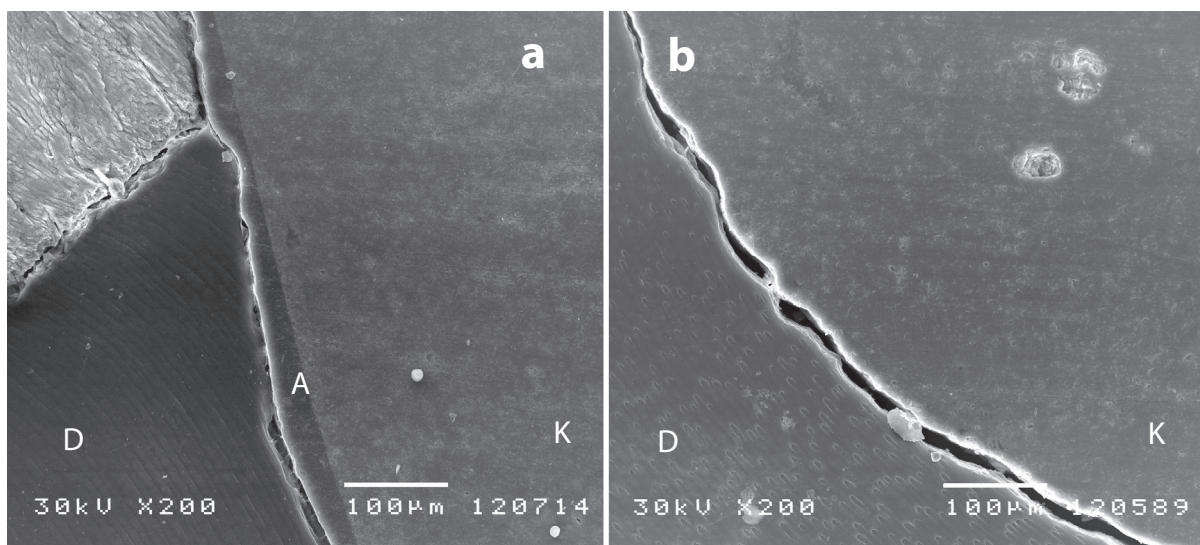


Slika 33. SEM mikrografije uzoraka koji prikazuju idealnu adhezivnu vezu koju formira Adper Single Bond 2- Filtek Ultimate materijala sa dentinom, nakon SOF fotopolimerizacije kompozita, na presecima kroz restauracije. K: kompozit, D: dentin A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Adhezivni i hibridni sloj (strelica) se vide na površini dentina. Uočava se prodor smole u dentinske kanaliće koji obezbeđuje sigurnu mikromehaničku vezu kompozita sa dentinom. Na najvećoj dužini pripoja nema mikropukotine (uvećanje 200x, bar 100 µm). b) Adhezivni i hibridni sloj se preklapaju tako da širina adhezivne veze iznosi 5-10 µm. Vide se duži produžeci smole u koso presečenim dentinskim kanalićima u centru grafije (uvećanje 750x, bar 10 µm).

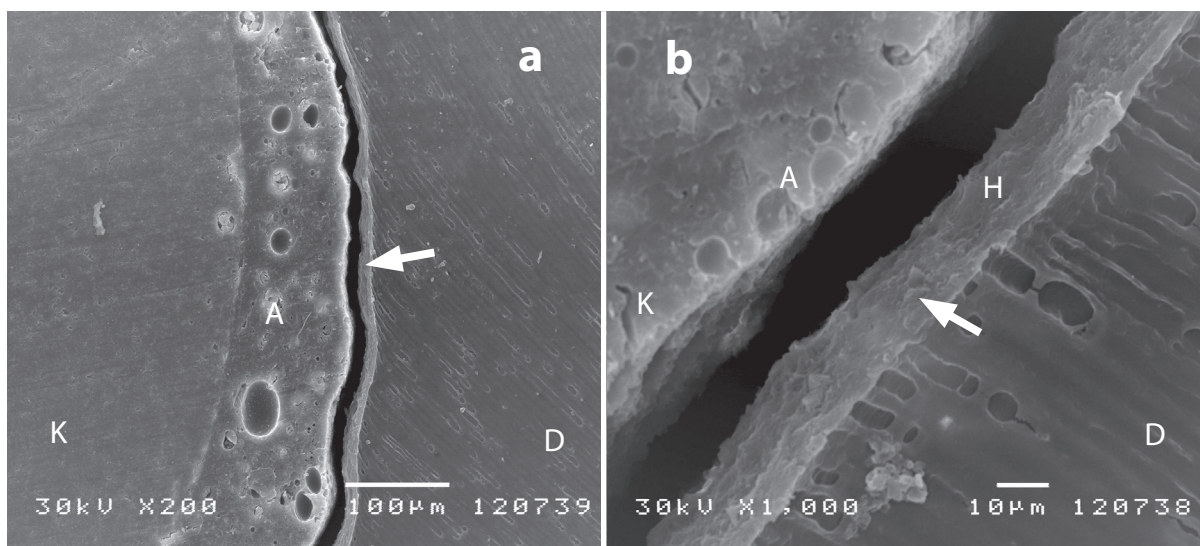


Slika 34. SEM mikrografije uzorka koji prikazuje tipičnu adhezivnu vezu koju formira Adper Single Bond 2- Filtek Ultimate materijala sa dentinom, nakon SOF fotopolimerizacije kompozita, na presecima kroz restauracije. K: kompozit, D: dentin, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Jasno uočljivi adhezivni i hibridni sloj, ukupne širine 10-12 µm. Širina hibridnog sloja je, mestimično, preko 5 µm. Vide se kraći i duži produžeci smole u dentinskim kanalićima (uvećanje 1000x, bar 10 µm). b) Isti uzorak na uvećanju 1500x, bar 10 µm.

Dentin – Tipično za IV grupu, AEO/FU- SOF (*self etch* tehnika)



Slika 35. SEM mikrografije uzoraka koji prikazuju marginalni odnos adhezivno-kompozitnog sistema Adper Easy One- Filtek Ultimate sa dentinom uz SOF fotopolimerizaciju kompozita, na presecima kroz restauracije. K: kompozit, D: dentin, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Adhezivni sloj je značajne debljine koja varira od 20-30 µm dok se hibridni sloj jedva uočava kao izrazito tanka bela linija uz mikropukotinu, u predelu gledno dentinske granice (uvećanje 200x, bar 100 µm). b) Marginalni odnos kompozitne restauracije sa dentinom na dnu kaviteta, uz izraženu mikropukotinu (uvećanje 200x, bar 100 µm).



Slika 36. SEM mikrografije uzorka koji prikazuje izrazitu pukotinu na spoju Adper Easy One- Filtek Ultimate sa dentinom uz SOF fotopolimerizaciju kompozita, na presecima kroz restauracije. K: kompozit, D: dentin, A: adhezivni sloj, H: hibridni sloj. a) Tanak hibridni sloj je ostao na površini dentina (strelica) dok je adhezivni sloj znatne širine odvojen od hibridnog sloja i dentina mikropukotinom. Adhezivni sloj sadrži mehuriće vazduha, verovatno usled primene slabog vazdušnog mlaza tokom izduvavanja viška adheziva iz kaviteta (uvećanje 200x, bar 100 µm). b) Segment marginalnog odnosa kompozit/dentin, sa najširim pukotinom. Vidi se odvajanje adhezivnog od hibridnog sloja ili adhezivna fraktura, kao i tanak hibridni sloj koji je ostao na površini dentina (uvećanje 1000x, bar 10 µm).

6.5. REZULTATI ISPITIVANJA GENOTOKSIČNOSTI ADHEZIVA

Rezultati Komet testa

Rezultati ispitivanja genotoksičnosti adheziva prikazani su na grafikonima 7 do 12. Poređenje razlika u strukturama dobijenih rezultata urađeno je χ^2 testom (tabele 10. i 11.) Pokazano je da se oštećenja DNK (klase kometa od A do E) pri ispitivanju dva adheziva ne razlikuju statistički značajno u istim tretmanima (isto trajanje vremena polimerizacije i ista koncentracija adheziva).

Prema rezultatima χ^2 testa kod prvog adheziva - *Adper Single Bond2* (Tab. 10.) pri vremenu fotopolimerizacije od 0 i 10 sekundi postoji statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu (rastvarač). Pri vremenu polimerizacije od 10 sekundi stepen statističke značajnosti je niži u odnosu na tretman adhezivom bez fotopolimerizacije (vreme polimerizacije od 0 sek.). Nasuprot tome, nakon polimerizacije *Adper Single Bond2* u trajanju od 40 sekundi, pri svim ispitivanim koncentracijama ovog adheziva, stepen oštećenja DNK u Komet testu ne odstupa značajno ($P > 0,05$) od vrednosti negativne kontrole. Slični rezultati su dobijeni i pri ispitivanju drugog adheziva *Adper Easy One* (Tab. 11). Jedino pri vremenu fotopolimerizacije od 40 sekundi ne postoje značajni genotoksični efekti detektabilni u Komet testu, ali pri polimerizaciji od 10 sekundi i 0 sekundi postoji genotoksični efekat, s tim da je on značajniji za vreme polimerizacije od 0 sek. (odnosno bez osvetljavanja) u odnosu na fotopolimerizaciju od 10 sekundi. Na osnovu ovakvih rezultata može se zaključiti da fotopolimerizacija od 10 sekundi nije dovoljna da bi se neutralisao genotoksični potencijal oba ispitivana adheziva.

Tretman		Negativna kontrola		Pozitivna kontrola	
Vrema polimerizacije (s)	Koncentracije ($\mu\text{g/mL}$)	x^2	p	x^2	p
0	1000	32.330	<0,001***	103.100	<0,001***
	500	28.000	<0,001***	108.385	<0,001***
	200	25.202	<0,001***	109.503	<0,001***
	100	24.550	<0,001***	114.426	<0,001***
10	1000	21.232	<0,001***	108.678	<0,001***
	500	18.403	<0,001**	115.494	<0,001***
	200	15.795	<0,003**	119.259	<0,001***
	100	12.629	<0,003*	125.888	<0,001***
40	1000	8.534	<0,074	130.785	<0,001***
	500	4.885	<0,299	138.281	<0,001***
	200	3.691	<0,449	143.167	<0,001***
	100	2.101+	<0,552	148.533	<0,001***

Za x^2 vrednosti beu znaka + broj stepeni slobode $\gamma = 4$, sa znakom + $\gamma = 3$

Tabela 10. Rezultati poređenja oštećenja DNK pri različitim vremenima osvetljavanja i različitim koncentracijama *Adper Single Bond2* adheziva, u odnosu na kontrolne grupe

Prema rezultatima χ^2 testa, nakon fotopolimerizacije *Adper Single Bond2* u trajanju od 40 sec. pri svim ispitivanim koncentracijama ovog adheziva, stepen oštećenja DNK u Komet testu ne odstupa značajno ($P>0,05$) od vrednosti negativne kontrole.

Kod prvog adheziva (Tabela 10.), kao i kod drugog (Tabela 11.) oštećenja DNK izazvana za 0 sekundi fotopolimerizacije za sve primenjene koncentracije, kao i za trajanje polimerizacije od 10 sekundi i koncentracije preko 100 vrlo značajno se razlikuju, a za 100 značajno u odnosu na strukturu u negativnoj kontroli. Pri polimerizaciji od 40 sekundi upotrebom ispitivanih koncentracija dobijen je isti nivo oštećenja kao u negativnoj kontroli. Strukture dobijene za sve tretmane statistički vrlo značajno se razlikuju od strukture u pozitivnoj kontroli.

Tretman		Negativna kontrola		Pozitivna kontrola	
Vrema polimerizacije (s)	Koncentracije ($\mu\text{g/mL}$)	χ^2	p	χ^2	p
0	1000	31.839	<0,001***	104.331	<0,001***
	500	27.636	<0,001***	110.001	<0,001***
	200	24.963	<0,001***	111.226	<0,001***
	100	24.151	<0,001***	115.812	<0,001***
10	1000	21.318	<0,001***	110.431	<0,001***
	500	18.242	<0,001**	116.773	<0,001***
	200	15.713	<0,003**	120.501	<0,001***
	100	12.546	<0,014*	126.794	<0,001***
40	1000	8.613	<0,072	131.800	<0,001***
	500	5.156	<0,272	139.322	<0,001***
	200	3.794	<0,435	144.069	<0,001***
	100	2.039	<0,729	83.261	<0,001***

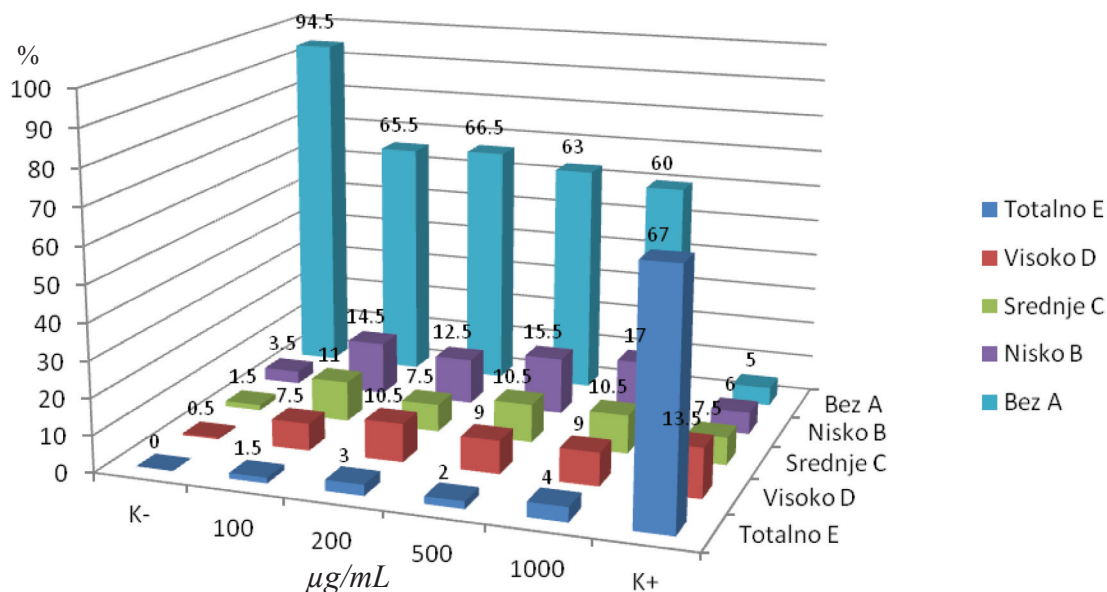
Broj stepeni slobode $\gamma = 4$

Tabela 11. Rezultati poređenja oštećenja DNK pri različitim vremenima osvetljavanja i različitim koncentracijama Adper Easy One adheziva, u odnosu na kontrolne grupe

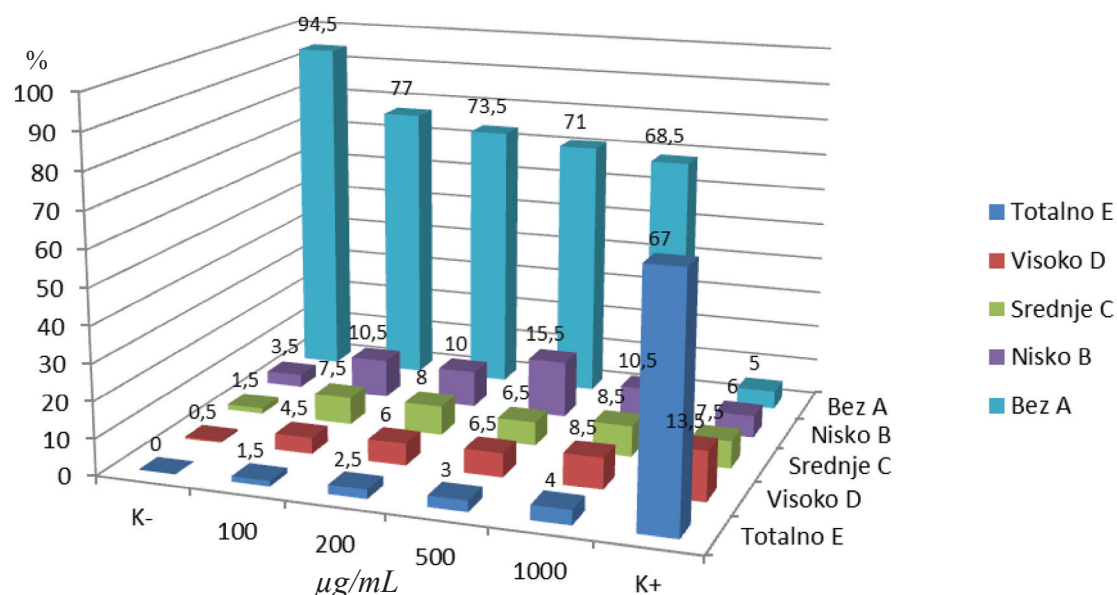
Kod Adper Easy One adheziva, jedino pri vremenu fotopolimerizacije od 40 sek. ne postoji značajan genotoksičan efekat u Komet testu, ali pri polimerizaciji od 10 sek. i 0 sek. postoji genotoksični efekat, s tim da je on značajniji za vreme polimerizacije od 0 sek. (odnosno bez fotopolimerizacije) u odnosu na polimerizaciju od 10 sek.

Rezultati pokazuju da nepolimerizovani adhezivi, pri svim ispitivanim koncentracijama, dovode do visoko signifikantnog ($P<0,001$) porasta stepena oštećenja DNK.

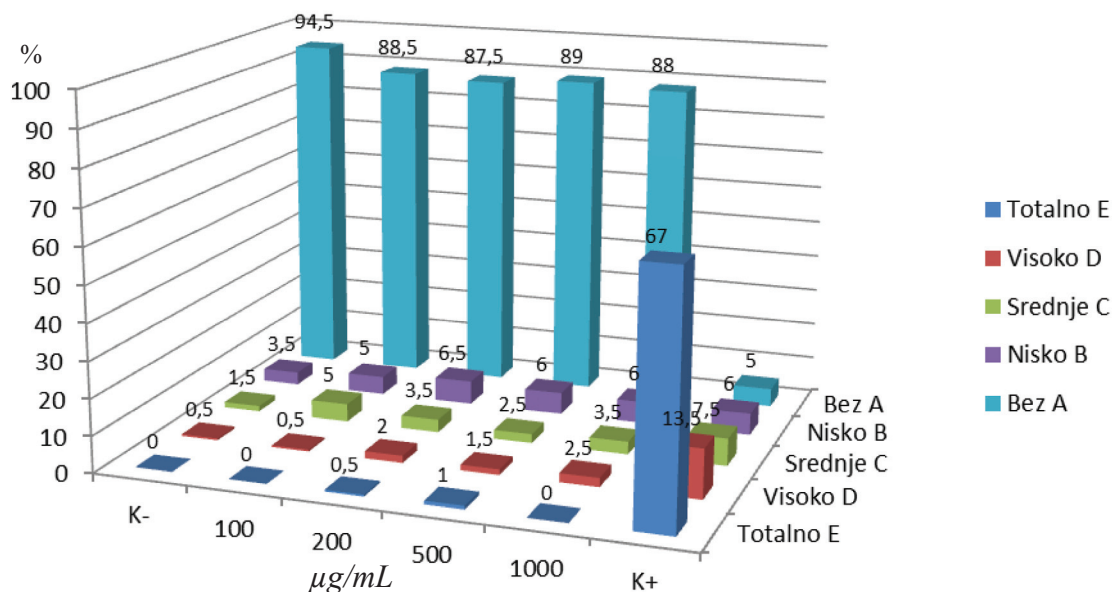
Međutim, oba ispitivana adheziva nakon polimerizacije od 10 sek. ispoljavaju izražen genotoksični efekat sa visokim stepenom statističke značajnosti ($P<0,001$) samo pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji (1000 $\mu\text{g/mL}$). Pri nižim koncentracijama adheziva (500, 200 i 100 $\mu\text{g/mL}$) stepen statističke značajnosti ispoljene genotoksičnosti je manji.



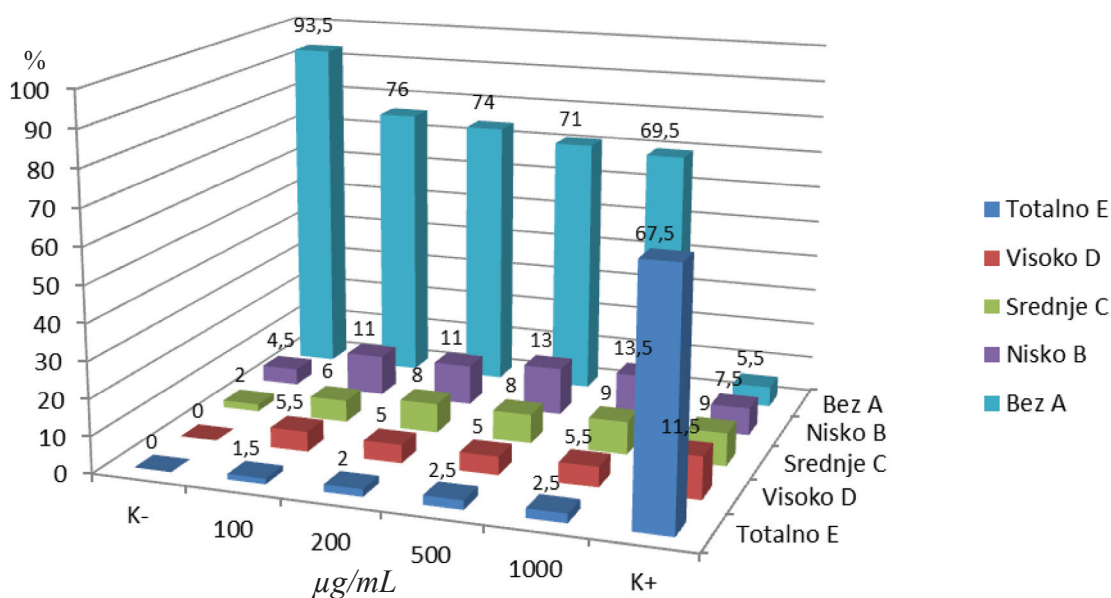
Grafikon 7. Analiza DNK oštećenja na izolovanim humanim limfocitima tretiranim rastvorima Adper Single Bond 2 adheziva. Adheziv nije osvetljavao. Na ordinati je procenat ćelija. Na apscisi K - je oznaka za rastvarač (negativna kontrola) a K+ je 100µM H₂O₂ (pozitivna kontrola) Uočava se da pri osvetljavanju od 0 sekundi postoji značajan procenat limfocita sa oštećenjima DNK. Nopolimerizovani adhezivi, pri svim ispitivanim koncentracijama, dovode do visoko signifikantnog (P<0,001) porasta stepena oštećenja DNK.



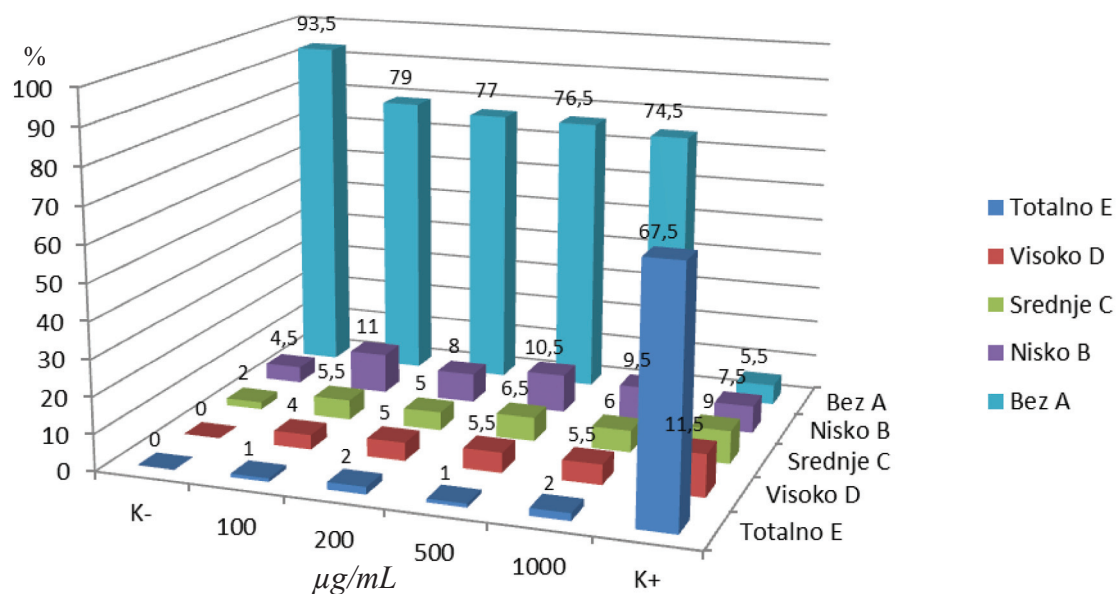
Grafikon 8. Analiza DNK oštećenja na izolovanim humanim limfocitima tretiranim rastvorima Adper Single Bond 2 adheziva. Adheziv je osvetljavao standardno halogenim svetlom u trajanju od 10 sek. Na ordinati je procenat ćelija. K - je oznaka za rastvarač (negativna kontrola) a K+ je 100 µM H₂O₂ (pozitivna kontrola). Pri osvetljavanju adheziva od 10 sekundi, takođe postoji značajan procenat limfocita sa oštećenjima DNK. Ispitivani adheziv, nakon polimerizacije od 10 sek. ispoljava izražen genotoksični efekat sa visokim stepenom statističke značajnosti (P<0,001) samo pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji (1000 µg/mL).



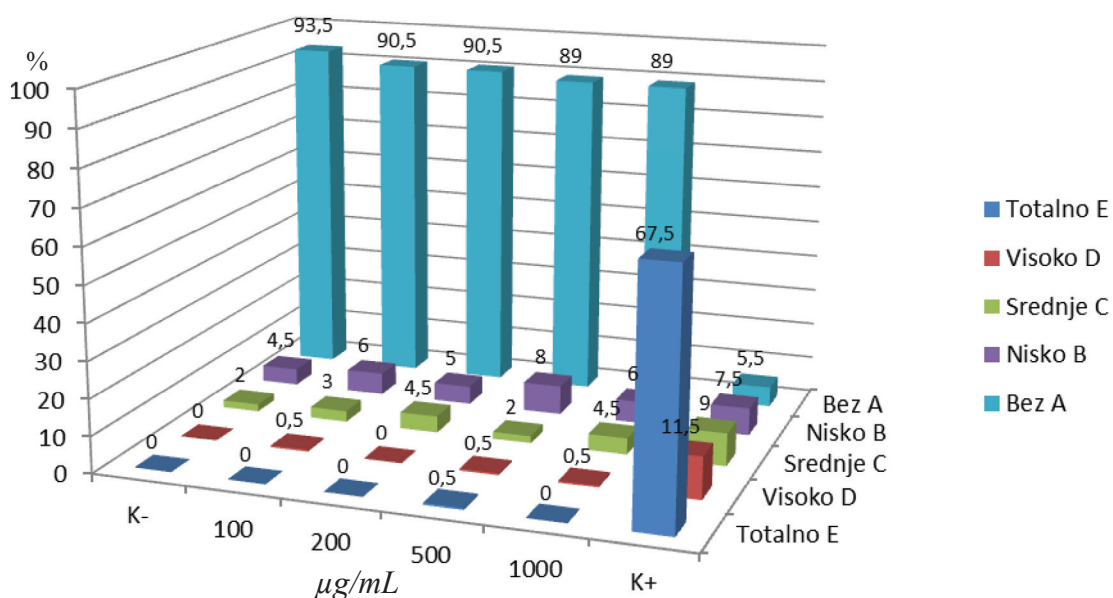
Grafikon 9. Analiza DNK oštećenja na izolovanim humanim limfocitima tretiranim rastvorima Adper Single Bond 2 adheziva. Adheziv je osvetljavao standardno halogenim svetlom u trajanju od 40 sek. Na ordinati je procenat ćelija. K - je oznaka za rastvarač (negativna kontrola) a K+ je 100 µM H₂O₂ (pozitivna kontrola). Značajno manji procenat limfocita sa oštećenjima DNK nakon osvetljavanja adheziva u trajanju od 40 sekundi, u odnosu na osvetljavanje od 0 i 10 sek.



Grafikon 10. Analiza DNK oštećenja na izolovanim humanim limfocitima tretiranim rastvorima Adper Easy One adheziva. Adheziv nije osvetljavao. Na ordinati je procenat ćelija. K - je oznaka za rastvarač (negativna kontrola) a K+ je 100µM H₂O₂ (pozitivna kontrola). Nopolimerizovani adhezivi, pri svim ispitivanim koncentracijama, dovode do visoko signifikantnog (P<0,001) porasta stepena oštećenja DNK.



Grafikon 11. Analiza DNK oštećenja na izolovanim humanim limfocitima tretiranim rastvorima Adper Easy One adheziva. Adheziv je osvetljavan 10 sek. Na ordinati je procenat ćelija. K - je oznaka za rastvarač (negativna kontrola) a K+ je $100\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ (pozitivna kontrola). Ispitivani adheziv, nakon polimerizacije od 10 sek. ispoljava izražen genotoksični efekat sa visokim stepenom statističke značajnosti ($P < 0,001$) samo pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji ($1000\ \mu\text{g/mL}$).



Grafikon 12. Analiza DNK oštećenja na izolovanim humanim limfocitima tretiranim rastvorima Adper Easy One adheziva. Adheziv je osvetljavan 40 sek. Na ordinati je procenat ćelija. K - je oznaka za rastvarač (negativna kontrola) a K+ je $100\ \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ (pozitivna kontrola) Značajno najmanji procenat limfocita sa oštećenjima DNK nakon osvetljavanja adheziva u trajanju od 40 sekundi. Pri vremenu fotopolimerizacije od 40 sek. ne postoje značajni genotoksični efekti detektibilni u Komet testu.

7. DISKUSIJA

Rezultati ovog istraživanja vode ka delimičnom odbacivanju nulte hipoteze što se tiče tehnike osvetljavanja jer soft start tehnika osvetljavanja značajno poboljšava marginalnu adaptaciju kompozita za gleđ, dok nasuprot tome, soft start tehnika ne utiče značajno na pripoj kompozita za dentin.

Što se tiče uticaja adhezivno kompozitnog materijala (adhezivne tehnike), nulta hipoteza je u potpunosti odbačena jer *etch and rinse* adhezivna tehnika (ASB/FU materijal) omogućava značajno bolji kvalitet veze i za gleđ i za dentin, u odnosu na *self etch* adhezivnu tehniku (AEO/FU materijal).

U dentinu, *etch and rinse* adhezivna tehnika (ASB/FU materijal) ostvaruje bolji marginalni pripoj kompozita, kod obe tehnike osvetljavanja kompozita, mada je utvrđena najmanja prosečna širina mikropukotine uz standardo, kontinuirano osvetljavanje istog materijala.

Takodje je odbačena hipoteza da dužina osvetljavanja adheziva ne utiče na njihovu genotoksičnost, pošto je dokazano da značajno manju genotoksičnost imaju adhezivi osvetljavani u trajanju od 40 sek, u odnosu na osvetljavanje od 10 sek.

7.1 DISKUSIJA MATERIJALA I METODA ISPITIVANJA MARGINALNOG PRIPOJA U ZAVISNOSTI OD FOTOPOLIMERIZACIJE KOMPOZITA

Polimerizacija svetlosno aktivirajućih dentalnih kompozita je usko povezana sa zapreminskom kontrakcijom materijala i kontrakcionim stresom što dovodi do neadekvatne veze na spoju restauracija – kavitet. Kada kontrakcioni stres nadmaši jačinu veze, marginalni pripoj se gubi i nastaje pukotina na spoju kompozit – zub. [76]

Kontrakcija raspoloživih kompozitnih smola je na nivou od 2-4%. Usled polimerizacione kontrakcije i stresa remeti se veza kompozitne smole sa zubom i dolazi do oštećenja adhezivnog spoja materijala i zuba. [30]

Na kvalitet rubnog zatvaranja utiču brojni faktori, a pre svega izbor materijala, izbor svetlosnog izvora, odnosno tehnika aplikacije materijala i tehnika svetlosne aktivacije. Ferracane je predložio različite kliničke metode za smanjenje polimerizacionih kontrakcionog stresa kao što su različite metode i brzine osvetljavanja, primena tečnih kompozita kao lajnera, odnosno tehnika slojevitog nanošenja kompozita. [3]

Svetlosna polimerizacija je važan faktor za uspeh i dugotrajnost ispuna. Svetlosni izvor može da varira u svojoj spektralnoj emisiji i jačini. Radi optimalnog kliničkog uspeha, polimerizacioni protokol mora odgovarati adhezivno-kompozitnom materijalu, odnosno mora imati odgovarajuću jačinu svetlosti i talasnu dužinu. [77]

Konfuzija i kontradiktornosti nastaju usled prisustva velikog broja i vrsta svetlosno polimerizujućih izvora i dok proizvođači forsiraju novije tehnologije, za većinu kliničara je klasična QTH (quartz tungsten halogen) lampa, još uvek osnovno sredstvo za polimerizaciju. Danas su sve popularniji LED (light emitting diode) koje zbog svoje efikasnosti i emisionog spektra postaju sve prisutnije u kliničkoj upotrebi. Prve generacije LED (light-emitting diode) su zahtevale duplo dužu ekspoziciju u odnosu na QTH aparate. Ispitivanjem disperzije svetla LED aparata, potvrđeno je da zadnja generacija LED aparata obezbeđuje sličan ili bolji stepen konverzije od QTH polimerizujućeg svetla. U istraživanjima Swift-a i saradnika je zaključeno da je šest od sedam LED polimerizujućih lampi pokazalo slične efekte kao QTH polimerizujuće svetlo. [78]

Novi QTH aparati nude 2 kliničke opcije: jako svetlo od 1200mW/cm² i soft start tehniku polimerizacije. *Soft start* osvetljavanje počinje ekspozicijom niskog intenziteta koje se posle nekoliko sekundi povećava. Više istraživača je došlo do zaključka da usporeno osvetljavanje i produženje faze tečenja kompozitnih smola tokom vezivanja, dovodi do formiranja manjeg marginalnog zjapa. [4, 5, 6, 7, 8]

Svrha usporenog osvetljavanja je kontrola kontrakcionih sila kompozita pomoću usporavanja stepena polimerizacije i produženja viskoelastične faze kompozita. *In vitro* proučavana sugerišu da ovakvi protokoli programiranog osvetljavanja daju restauracije sa boljom adaptacijom za zubna tkiva. [2, 77]

U ovom istraživanju je, za polimerizaciju kompozita, korišćena halogena lampa Elipar Highlight-3M ESPE, USA koja ima program standardnog i soft start osvetljavanja kao i LED (light-emitting diode, Elipar Free Light) lampa istog proizvođača (3M ESPE, USA), sa istim programima polimerizacije. Na osnovu izmerenih širina i dužina marginalnih pukotina oko kompozitnih ispuna u gleđi, utvrđen je najmanji prosečni MI ($0,0262 \pm 0,03213$) kod postepenog (SOF) osvetljavanja i primene *etch and rinse* adhezivne tehnike a najveći prosečni MI ($1,2858 \pm 0,9143$) kod standardnog osvetljavanja (HIP) i primenom *self etch* tehnike. I za dentin je utvrđen najmanji prosečni marginalni indeks ($MI=2,26 \pm 2,99$) uz SOF osvetljavanje ali je zato najmanja prosečna širina pukotine ($7,72 \pm 0,9,28$) uočena u grupi HIP osvetljavanja i primenom ASB/FU materijala. Time je potvrđen značaj MI (jer obuhvata i širinu i dužinu marginalne pukotine) u preciznijem određivanju kvaliteta pripoja materijala za zubna tkiva.

Dobijeni rezultati su saglasni sa nalazima Luo i saradnika [8] koji su, takođe pomoću SEM, istraživali efekat dva faktora na marginalni pripoj kompomera za gleđ i dentin. Postepenu ili pulsno aktivirajuću tehniku su upoređivali sa konvencionalnom tehnikom osvetljavanja. Zaključili su da postepena ili pulsna tehnika osvetljavanja značajno poboljšava marginalni integri-

tet kompomera. Utvrdili su značajno manji procenat mikropukotine kod kaviteta koji su kondicionirani 36% fosfornom kiselinom (*etch and rinse*) postupak. Isti autori su, takođe, utvrđivali MI (pri analizi marginalne adaptacije kompomera za dentin) i pronašli značajno manji MI dentina u grupi zuba gde se primenjivala *etch and rinse* tehnika (MI= 0,3±0,6), u odnosu na grupu zuba gde su koristili *self etch* tehniku (MI= 3,8±4,0) [2].

Međutim veći broj istraživača nije utvrdio razlike u kvalitetu marginale adaptacije kompozita primenom postepene ili *soft-start* polimerizacije [79, 80, 81, 47, 82, 83].

Drugačiji rezultati se mogu povezati sa korišćenjem drugačijih metodologija ispitivanja rubnog zatvaranja, korišćenjem drugih adhezivno kompozitnih materijala i na kraju i različitih svetlosnih izvora.

Blažić i Živković su istraživali kvalitet rubnog zatvaranja kaviteta druge klase, restaurisanih različitim kompozitnim materijalima posle *soft start* i standardne tehnike svetlosne polimerizacije, svetlosnim izvorom LED (light-emitting diode, Elipar FreeLight, 3M ESPE, USA). Razlike u dobijenim rezultatima u kvalitetu rubnog zatvaranja između testiranih kompozitnih materijala nakon primene *soft start* i standardne tehnike fotopolimerizacije nisu bile statistički značajne [79].

Hardan i saradnici su istraživali da li je *soft-start* polimerizacija pogodna da minimizira kontrakcioni stres i uočili su da nije bilo statistički značajnih razlika u mikrocrenju između različitih *soft-start* polimerizacionih modela čak i kod nano-punjenih i mikrohibridnih kompozita [81].

Cavalcante i saradnici su ispitivali 4 fotoaktivirajuća sistema: quartz tungsten halogen (QTH), light-emitting diode (LED), argon ion laser (AL), plasma arc curing (PAC). Nisu našli značajne razlike između fotoaktivacionih sistema i između kompozitnih smola. [44, 82, 47, 83]

Smatra se da problem sa usporenom fotopolimerizacijom može biti u tome što može da izazove nepravilno formiranje polimerne mreže. Rezultati istraživanja ukazuju i na to da su konverzija i njena rezultanta u vidu zapreminskog skupljanja najvažniji faktori u razvoju kontrakcionih stresova kod kompozita [84, 85]. Brojni nalazi takođe potvrđuju da postepena fotopolimerizacija ne utiče značajno na fizičke-hemijske osobine kompozita. [49, 86, 87]

Postoje različite tehnike postepenog osvetljavanja: *Soft start* (dvo fazna tehnika sa početnim periodom svetlosne aktivacije niskog intenziteta praćenim osvetljavanjem svetlom visokog intenziteta) [7], *Ramping tehnika* (postepeno povećanje intenziteta svetla dok ne postigne normalne, uobičajene vrednosti) [5], *Pulsno aktivirajuća tehnika* (slična *soft start* tehnici, ali je karakteristična intervalom čekanja između početnog pulsa niskog intenziteta, koji traje 2-5 sek i završnog izlaganja svetlu visokog intenziteta) [2].

Da bi se prevazišao problem neadekvatne polimerizacije, preporučeni su novi metodi polimerizacije (*soft start* i eksponencijalni programi, pulsni program i program visokog i niskog intenziteta). Pored visoko intenzivnog osvetljavanja (HIP- 800mW/cm², 20s), Knezević i saradnici su

koristili i program niskog pa visokog osvetljavanja (SOF- 650mW/cm² prvih 5s, 800m W/cm² sledećih 25s) i nisko intenzivni program (LOP - 650mW/cm², 30s). LOP program je pokazao najnižu genotoksičnost. Duže vreme osvetljavanja svetlom nižeg intenziteta dovodi do manje genocitotoksičnosti u odnosu na kraće osvetljavanje svetlom jačeg intenziteta. [62, 63.]

Konfuzija i kontradiktornosti nastaju usled prisustva velikog broja i vrsta svetlosno polimerizujućih izvora i dok proizvođači forsiraju novije tehnologije, za većinu kliničara je klasična QTH (quartz tungsten halogen) lampa, još uvek osnovno sredstvo za polimerizaciju.

Polimerizacija kompozitnih smola je kompleksni fenomen. Kvalitet polimerizacije meri se stepenom konverzije monomera u polimer (koji nikada nije 100%), a zavisi od sledećih činilaca: hemijskog sastava materijala posebno vrste monomera, koncentracije inicijatora polimerizacije, veličine, vrste i količine neorganskih čestica punila (veći deo punila smanjuje polimerizacijsko skupljanje, ali povećava krutost materijala) intenziteta, vremena i udaljenosti izvora svetlosti od površine kompozita. Pomicanje i prostorna organizacija molekula monomera odgovorni su za promene volumena tokom polimerizacije. Klinički je ograničena mogućnost pozicioniranja svetlosnog izvoda direktno na sloj kompozita. Pozicija vrha provodnika svetla (homogenost svetla) i divergentni ugao se smatraju glavnim faktorom efikasnosti polimerizujućeg svetla. Potrebni su i klinički dokazi o uticaju svetlosno polimerizujućih i adhezivnih tehnika na kvalitet pripoja kompozitnih smola za zubna tkiva [56].

7.2 DISKUSIJA MATERIJALA I METODA ISPITIVANJA MARGINALNOG PRIPOJA U ZAVISNOSTI OD ADHEZIVNOG POSTUPKA

SEM analiza pripoja kompozitnih smola za gleđ, u ovom ispitivanju pokazala je brojne kraće i duže mikrotnove polimerizovane smole na spoju ASB/FU materijala i gleđi. Mikropukotine nije bilo nakon primene *etch and rinse* adhezivne tehnike i postepenog osvetljavanja dok je kod primene *self etch* adhezivne tehnike, AEO/ FU materijala i standardne fotoaktivacije veza bila slabijeg kvaliteta.

U ranijim SEM istraživanjima Dačića i saradnika, takođe je utvrđen značajno bolji marginalni pripoj kompozita za gleđ pri korišćenju *etch and rinse* adhezivnog postupka i materijala ASB/ Z250 (3M), u odnosu na *self etch* postupak i materijal APL Pop/ Z250 (3M), uz standardno osvetljavanje kompozita, što je u skladu sa nalazima ovog istraživanja [88, 89].

Opšte je prihvaćen zaključak da se primenom totalno nagrizajućeg sistema (*etch and rinse*) ostvaruje dobra veza, odnosno dobar marginalni pripoj kompozita za gleđ. To se objašnjava formiranjem dva tipa trnova smole u gleđi. Makro trnovi smole prodiru u interprizmatsku strukturu gleđi a mikrotnovi u interkristalne prostore gleđnih prizmi. Jačina veze smole za gleđ, merena po metodologiji Sano i sar. (η TBS-microtensile bond strength), može da iznosi i do 40 MPa. Nasuprot tome, kod samonagrizajućih sistema (*self etch*) utvrđena je slabija jačina veze za gleđ i iznosi oko 30 MPa [13].

Slabija jačina veze kod samonagrizajućih sistema se može objasniti formiranjem slabije mikro-retencije u gleđi primenom blago kiselih prajmera. Samonagrizajući prajmeri omogućavaju formiranje mikro trnova, dok makro trnovi smole nedostaju. Takođe se smatra da se prajmer trajno ugrađuje u zubnu površinu obzirom da se ne ispira vodom. Ovo utiče na slabiji kvalitet veze samonagrizajućih adhezivnih sistema za gleđ [1, 13, 14, 15].

Rezultati ovog *in vitro* ispitivanja pokazuju da je kvalitet gleđno-kompozitnog spoja značajno određen načinom kondicioniranja. Potvrđeno je da tretman kaviteta fosfornom kiselinom (*etch and rinse postupak*) značajno poboljšava sposobnost adaptacije adheziva za gleđ. Utvrđena je statistički značajna razlika u širini marginalne pukotine i marginalnog indeksa između sistema sa totalnim nagrizanjem i samonagrizajućeg sistema, sa pojavom šire pukotine i većeg MI oko kompozitnih ispuna postavljenih pomoću samonagrizajućeg sistema.

U ovom istraživanju širina adhezivnog (A) i hibridnog sloja (HS), u zavisnosti od adhezivne tehnike, je iznosila: kod *etch and rinse* tehnike na gleđi, A=5-10 μm ; HS= 5 μm a kod iste tehnike na dentinu A=10-20 μm ; HS= 3-5 μm . Kod *self etch* tehnike uočen je deblji adhezivni sloj a tanji hibridni sloj i na gleđi i na dentinu, u odnosu na prethodnu tehniku (kod gleđi. A=20-30 μm ; HS= 1-3 μm a kod dentina A=20-50 μm ; HS= 1-2 μm)

Cenci i saradnici [90] su ispitivali vezivanje pojedinih adheziva za gleđ i došli do sledećih saznanja, koja su u skladu sa ovim istraživanjem: *iBond*- blagi adheziv, sve u jednom (*self etch* jedno komponentni sistem) ne rastvara kompletno gleđni SL tako da se gleđni hibridni sloj sastoji uglavnom od SL, sa nekompletnim i minimalnim nagrizanjem prizmatične gleđi ispod; *Xeno III* (*self etch* dvo komponentni sistem) izaziva blagi površinski efekat nagrizanja gleđnih kristala ali bez značajnog nagrizanja gleđnih prizmi. Ovaj adheziv stvara 1,5-3 μm debeo hibridni sloj u prizmatičnoj gleđi, koji se uglavnom sastoji iz interkristalne infiltracije, bez formiranja resa smole. *Adper Prompt* (*self etch* dvokomponentni sistem) dovodi do blago izraženog nagrizanja gleđnih prizmi i stvara 5-8 μm debeo hibridni sloj koji se uglavnom sastoji od interkristalne infiltracije pošto je količina izraženog nagrizanja nedovoljna da stvori trnove smole.

I prema nalazima Frankenbergera i sar *self etch* adhezivi stvaraju hibridni sloj koji je tanji nego kod adhezivnih sistema koji koriste fosfornu kiselinu za nagrizanje. Usled blagog nagrizanja gleđnih prizmi, nakon primene *self etch* adheziva debljina hibridnog sloja iznosi 5–8 μm i on se sastoji od interkristalno infiltrovane smole. Pošto je dubina nagrizanja nedovoljna za formiranje dužih trnova smole, adhezija je slaba. Nasuprot tome, nakon primene fosforne kiseline uočene su znatno dublje mikropore u gleđi, formiranje debljeg hibridnog sloja (8–10 μm) kao i dužih trnova smole [1].

Kod samonagrizajućih sistema ravni hibridni sloj, bez slobodnih trnova, ostvaruje mehaničku vezu samo pomoću interkristalne retencije. Zato je ova veza slaba i u njoj nastaju naprsline kad je pod stresom. Suprotno tome, ugradnja smole u vidu trnova obezbeđuje trodimenzionalni prodor smole u nagriženu gleđ, što pojačava otpornost veze na stres [13, 1].

Traganje za restaurativnim materijalom koji poseduje optimalne osobine pripajanja vodi ka brojnim dentalnim materijalima, vezujućim sistemima i restaurativnim tehnikama. Glavna nepogodnost materijala na bazi smola je kontrakcija pri vezivanju. Polimerizaciona kontrakcija kompozita raskida vezu adheziva za zubna tkiva, naročito kod nedovoljno kondicioniranih površina i dovodi do nastajanja marginalne miropukotine. Prevencija marginalne pukotine je u formiranju jače veze adheziva i kompozita za zubna tkiva [90, 91, 92, 93].

Jačina polimerizacione kontrakcije zavisi od: formule matriksa smole i količine punila u kompozitu; dizajna kaviteta; vrste podloge (kompomer, smolom modifikovan GJC, tečni kompozit); veličine, oblika i pozicije sloja kompozita; svetlosne ili hemijske polimerizacije; modula elastičnosti kontrahujućeg materijala, odnosa vezane i slobodne površine restauracije (C faktor); intenziteta vezujućeg svetla i stepena ugrađene poroznosti [94, 95, 96, 97, 98].

Trajnost restauracija je multifaktoralna. Mnogi faktori kao što su rukovanje materijalom, vezujući kapacitet restaurativnog sistema, tehnika nanošenja i osvetljavanja kao i faktori starenja restauracije, kakvi su temperatura i pH ciklusi u ustima, kontinuirano okluzalno opterećenje i hidrolitička degradacija materijala utiču na rezultat. Ipak, prema navodima većeg broja istraživača, dentin vezujući sistemi mogu imati veći klinički značaj na trajnost vezivanja kompozita za gleđ i dentin od tehnike osvetljavanja. [97, 98, 99, 100]

SEM analiza pripoja kompozitnih smola za dentin, na presecima kroz restauracije pokazala je bolji marginalni pripoj za dentin kod primene totalno nagrizajuće, adhezivne tehnike (*etch and rinse*) u odnosu na tehniku samonagrizajućih prajmera (*self etch*). Jasno je da kod totalno nagrizajuće tehnike, postoji idealan spoj adhezivnog materijala sa dentinom, u značajnoj dužini pripoja. Tada su viđani adhezivni i hibridni sloj uz dentin, kao i kraći i duži mikrotrnovi smole u dentinskim kanalićima. Za razliku od ovog nalaza, kod samonagrizajuće tehnike, veoma retko su uočavani produžeci smole u kanalićima.

Rezultati koji se odnose na dentin, pokazuju da je utvrđena značajno bolja marginalna adaptacija kompozita za dentin uz korišćenje *etch and rinse* adhezivne tehnike i ASB/FU materijala, u odnosu na *self etch* adhezivnu tehniku i AEO/FU materijal. Širina HS kod *self etch* adheziva na dentinu iznosila je 1-2 μ m, dok je kod *etch and rinse* adheziva HS bio deblji i njegova širina je iznosila 3-5 μ m.

Frankenberger i Tay [1] su takođe dokazali da nagrizanje dentina fosfornom kiselinom omogućava stvaranje HS debljine 5-6 μ m, kod dvofaznih *etch and rinse* adheziva. Prema njihovom nalazu, nakon primene samonagrizajućih prajmera, odnosno *self etch* adheziva, debljina HS je manja i iznosi 2 μ m.

Jačina adhezivne veze kompozita za dentin (μ TBS), po navodima Van Meerbeeka [13] je veća kod tro-faznih *etch and rinse* adheziva i iznosi oko 50 MPa, u odnosu na dvo-fazne adhezive iste grupe, gde iznosi 39 MPa. Jačina veze kompozita za dentin kod *self etch* adheziva je slabija, odnosno iznosi 40 MPa kod dvo-faznih i svega 20 MPa kod jedno-faznih *self etch*

adheziva. Međutim, jačina veze kompozita za dentin ne mora da bude u korelaciji sa debljinom hibridnog sloja. [24]

Procenat dužine pripoja bez pukotine je odraz efikasnosti marginalne adaptacije kompozitnih restauracija za gleđ i dentin.

U ovom istraživanju je *etch and rinse* adhezivna tehnika pokazala veći procenat dužine ivica bez pukotina i u gleđi i u dentinu. Kod ove adhezivne tehnike je procenat ivica bez pukotine u gleđi iznosio preko 90%, dok je kod *self etch* tehnike iznosio oko 60%. Rezultati ispitivanja pripoja kompozita za dentin, u ovom istraživanju, su takođe pokazali da *etch and rinse* tehnika, takođe, omogućava bolji pripoj kompozita za ovo tkivo jer je dužina kontakta bez pukotine iznosila oko 60%, dok je kod *self etch* tehnike iznosila oko 22%. Lošiji pripoj kompozita za dentin, kod obe adhezivne tehnike, u odnosu na pripoj za gleđ, može se povezati sa invazivnom metodom pripreme površina preseka restauracija za SEM analizu. Sam proces presecanja, tretman površina preseka kiselim rastvorima i dehidratacija prirodnih uzoraka zuba tokom naparavanja zlatom, pre skening mikroskopskog posmatranja, mogli su da utiču na popuštanje veze kompozita sa dentinom (slično delovanju termocikliranja).

Ovi rezultati se slažu sa nalazima Frankenbergera i Tay-a [101]. Njihova merenja su pokazala da *etch end rinse* tehnika formira ivice bez pukotine u dentinu u dužini od 62% dok *self etch* tehnika (all in one adhezivi) formiraju kraću dužinu ivica bez pukotina u dentinu (40-15%), nakon termocikliranja uzoraka. Što se tiče pripoja za gleđ rezultati dobijeni u oba istraživanja su slični.

Blunk i Roulet su 2002. god. [102] analizirali marginalnu adaptaciju cervikalnih restauracija različitih grupa adheziva. Posle jednogodišnjeg držanja u vodi i dve termociklirajuće serije, 93% dužine spoja je bilo bez zjapa kod tro-etapnih *etch/rinse* adheziva Optibond FL (Kerr) i 91% kod blagog dvo-etapnog „*mild*“ *self-etch* adheziva Clearfil SE (Kuraray). Dvo-etapni *etch/rinse* adhezivi kao što je Excite (Vivadent), Optibond Solo Plus (Kerr) i Scotchbond 1 (3M ESPE) pokazali su značajno manji procenat dužine spoja bez zjapa - 80%, 82%, 63%. Manje od polovine dužine marginalnog spoja (48%) bilo je bez zjapa kod jakog jedno-etapnog „*strong*“ *self-etch* adheziva Prompt-L-Pop (3M ESPE). [102].

U ovom istraživanju, dvoetapni *etch/rinse* Adper Single bond 2 pokazao je procenat dužine spoja bez pukotine (prosečno za gleđ i dentin) - 76%, dok je kod jednoetapnog *self etch* adheziva Adper Easy One dužina spoja bez pukotine iznosila 41%.

Nulta hipoteza koja je testirana - da nema razlika u integritetu ivica kompozitnih restauracija na spoju sa gleđi i dentinom a u zavisnosti od dve tehnike osvetljavanja i naročito od dve adhezivne tehnike, nije potvrđena. Postepeno ili *soft start* osvetljavanje je dalo bolje rezultate kod gleđi dok razlike u kvalitetu pripoja kompozita za dentin, u odnosu na dve tehnike osvetljavanja, nisu bile značajne. Međutim, *etch end rinse* adhezivna tehnika se pokazala značajno boljom od *self etch* tehnike kod pripoja materijala i za gleđ i za dentin.

Vrednosti širine marginalne pukotine, kao pokazatelji kvaliteta pripoja materijala za zubna tkiva, ne moraju da se slažu sa vrednostima marginalnog indeksa MI, što je slučaj kod ispitivanja pripoja za dentin. Tako je utvrđena najmanja prosečna širina pukotine u dentinu kod HIP osvetljavanja i ASB/FU materijala (7,72 μ m), dok je najmanji MI utvrđen kod SOF osvetljavanja istog materijala (2,26). Statistička analiza je pokazala da tehnika osvetljavanja nije značajna za pripoj materijala za dentin, dok je adhezivna tehnika, odnosno vrsta adhezivno kompozitnog materijala, veoma značajna.

Primena SEM u ispitivanju marginalnog pripoja

SEM tehnika pruža dovoljnu rezoluciju mikrofografija za identifikovanje formacija širokih nekoliko mikrometara, kao što je marginalna pukotina. SEM se koristi za ispitivanje kvaliteta ivica restauracija pri čemu se kategorizacija ivica vrši na različite načine: supramarginacija (višak materijala na spoju), submarginacija (materijal ispod nivoa ivica kaviteta), fraktura ivica materijala, fraktura ivica gleđi, demineralizacija ivica gleđi, idealna ili kontinuirana ivica (prelaz između restaurativnog materijala i zubnog tkiva nije jasno uočljiv) i ivica sa pukotinom. Najčešće se razmatraju samo dužina kontinuirane ivice i ivice sa pukotinom (kao i širina pukotine) a zanemaruju ostale kategorije ivica obzirom da čine mali procenat ukupne dužine obima restauracija [2, 8, 10, 11, 56, 103, 104, 105, 106, 107].

U ovom istraživanju, pomoću SEM, merene su širine marginalnih pukotina po obodu restauracija postavljenih uz totalno nagrizajući i samonagrizajući postupak. U komparaciji sa svetlosnom mikroskopijom, tehnike merenja pomoću SEM su složene.

Slike sa svetlosne mikroskopije su uvek perpendikularne na optičku osu i objekat se vidi samo u jednom planu, usled minimalne dubine polja. Zato su moguća merenja u svim pravcima na tom planu. Suprotno, kod SEM postoji ekstremno velika dubina polja i objekat je obično nagnut (pod kosinom). Fotografija je samo dvodimenzionalna projekcija trodimenzionalne strukture. Svaka devijacija sa ravne površine, ako restauracija izgleda konveksno, vodi skraćanju mere tog dela. Zato se ne mere ivice restauracije kod jako nagnutih površina. Ako restauracija ima različite površine u različitim ravnima merenje se sprovodi iz različitih pozicija.

Pošto SEM dopušta visoku rezoluciju, marginalni defekti se lako otkrivaju. Nalaz "idealna ivica" "*excellent margin*" se dobija, jedino, pomoću adhezivnih materijala i tehnika. Za procenjivanje adaptacije materijala za zubna tkiva obično se meri dužina i širina marginalne pukotine. Na taj način se vrednuju materijali i procedure unošenja. Indeks MI obuhvata vrednosti i dužine i širine pukotine pa je merodavniji za procenu pripoja materijala.

Postoje i tehnike koje ne zahtevaju presecanje zuba sa ispunom kako bi se na preseku posmatrao pripoj materijala za zub. Presecanje može da utiče na validnost rezultata. Ne invazivne tehnike snimanja kao što su X-ray tomographic microscopy (XTM) ili Magnetic resonance

imaging (MRI) su moguće alternative za ispitivanje kontakta materijala i zuba, bez prethodnog sečenja i poliranja [12]. Takođe se preporučuju X ray photo-electron spectroscopy (XPS) i Atomic absorption spectroscopy (AAS). [14] Kod XTM radioopacitet dentin adheziva, HS i trnova smole su slični.

Sagitalni preseki restauracija, u ovom istraživanju su pripremani pomoću dijamantskog diska uz vodeno hlađenje. Čak i kod studija koje su koristile replika tehniku u pripremi za SEM analizu preseka restauracija, nisu mogli da se izbegnu artefakti usled razvoja stresa tokom presecanja. Razumljivo je da je tehnika presecanja, korišćena u ovom istraživanju, mogla da izazove jatrogeno formiranje pukotina, što je svakako uticalo na lošije rezultate pripoja kompozita za dentin.

Veliki broj *in vitro* studija testira osobine adheziva pomoću procene marginalnog zatvaranja [8, 12, 13, 90, 91, 92, 103, 108]. Korišćenjem SEM, posmatrano je formiranje marginalnog zjapa oko restauracija postavljenih na ekstrahiranim zubima [4, 5, 13, 21, 25, 29]. Ovaj metod otkriva da sile nastale tokom kontrakcije restaurativnog materijala ili termomehaničkog opterećivanja zuba sa restauracijom, narušavaju jačinu veze za gleđ i dentin što vodi nastanku zjapa – pukotine duž margina restauracije. Zaključeno je da su ovakve semi-kvantitativne analize marginalne pukotine klinički relevantne, posebno kad se merenja ponove posle termocikliranja.

Iako postoji tendencija pojednostavljivanja procedure vezivanja, konvencionalni tro-etapni *etch/rinse* adhezivi i dalje pružaju najpogodniju i najpouzdaniju vezu na duže vreme. *Self-etch* pristup možda ima bolju perspektivu u budućnosti. Klinički, kad adhezivi ne zahtevaju *etch and rinse* etape, vreme aplikacije i osetljivost tehnike se znatno smanjuju. Posebno “*mild*” *self-etch* adhezivi, koji se vezuju pomoću kombinovane mikromehaničke i hemijske interakcije za zubno tkivo, jako se približavaju tro-etapnim *etch/rinse, total-etch* sistemima po kvalitetu vezivanja [13]

7.3. DISKUSIJA MATERIJALA I METODA ISPITIVANJA GENOTOKSIČNOSTI NEDOVOLJNO POLIMERIZOVANIH KOMPOZITNIH I ADHEZIVNIH SMOLA

U poslednje vreme upotreba kompozitnih materijala fotopolimerizovanih svetlom dobija na značaju usled poboljšanja njihovog hemijskog sastava, jednostavnosti njihove upotrebe i estetskih efekata po same pacijente. Ključni momenat pri upotrebi ovih materijala je njihova adekvatna polimerizacija čime se poboljšavaju fizičke osobine i kliničke performanse kompozitnih materijala. [109] Za polimerizaciju kompozitnih materijala najviše se koristi osvetljavanje halogenim lampama, mada su u poslednje vreme razvijene i tehnike LED tehnologija (LED od engl. light-emitting diode). [110]

Korišćene su različite metode za proučavanje citotoksičnosti zubnih kompozitnih materijala i njihovih komponenti. [111] Toksičnost dentalnih materijala može se evaluirati *in vitro* testovima ili kliničkim studijama kod čoveka. U *in vitro* testovima se pored citotoksičnosti mogu

određivati i genotoksični efekti (specifična oštećenja DNK ili hromozomske aberacije) pod uticajem dentalnih materijala. Za razliku od drugih tehnika, Komet test koji je korišćen u ovim istraživanjima, ne zahteva kultivaciju ćelija već detektuje primarna oštećenja DNK *in situ* na nivou svake pojedinačne ćelije. Komet test detektuje jedno- i/ili dvolančane prekide DNK kao i druga mesta labilna u pristupu jakih baza (apurinska i apirimidinska mesta, DNK adukti, nekompletna ekscizionna reparacija, ukrštene veze DNK-DNK ili DNK-protein). Usled svoje jednostavnosti, visoke osetljivosti i pouzdanosti dobijenih rezultata Komet test se koristi pri evaluaciji genotoksičnog potencijala različitih fizičkih i hemijskih agenasa. [112, 113, 114]

Imajući u vidu da se malo zna o efektima različitih načina fotopolimerizacije na citotoksičnost i genotoksičnost kompozitnih adheziva, bilo je celishodno ispitati adhezive korišćene u ovim istraživanjima primenom Komet testa. Pri tome su pored nepolimerizovanih adheziva (osvetljavanje 0 sek), upotrebljena još dva vremena fotopolimerizacije u trajanju od 10 sek. i 40 sek. Rezultati ovih istraživanja genotoksičnosti adheziva su pokazali da oba ispitivana adheziva, jedino pri vremenu polimerizacije od 40 sek. nisu ispoljila statistički značajne genotoksične efekte. Tako se ovo vreme fotopolimerizacije može preporučiti kao relativno bezbedno, posebno u poređenju sa vremenom od 10 sek., koje se često primenjuje u praksi, a u našim eksperimentima nije bilo dovoljno da neutrališe potencijalno štetne genotoksične efekte oba ispitivana adheziva.

Prema tome, ukoliko tokom osvetljavanja adheziv ne primi dovoljno energije odgovarajućih talasnih dužina može se očekivati smanjena jačina i čvrstina adhezivne veze za zubna tkiva, i veći stepen citotoksičnosti. [115, 19]

Imajući u vidu sve gore navedeno, može se zaključiti da nepolimerizovan adheziv izaziva genotoksične efekte usled prisustva neizreagovanih monomera koji mogu da dovedu do povećanog stepena oštećenja DNK, koji je detektovan u Komet testu. Pri polimerizaciji od 10 sek. takođe se zapažaju statistički značajni genotoksični efekti, mada u manjem stepenu u poređenju sa nepolimerizovanim adhezivom. Poređenjem stepena statističke značajnosti vrednosti u χ^2 testu jasno je uočeno da oba nepolimerizovana adheziva, pri svim ispitivanim koncentracijama, dovode do visoko signifikantnog ($P < 0,001$) porasta stepena oštećenja DNK. Međutim, oba ispitivana adheziva nakon fotopolimerizacije od 10 sek. ispoljavaju izražen genotoksični efekat sa visokim stepenom statističke značajnosti ($P < 0,001$) samo pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji (1000 $\mu\text{g/mL}$). Pri nižim koncentracijama adheziva (500, 200 i 100 $\mu\text{g/mL}$) stepen statističke značajnosti je manji. Potrebno je napomenuti da je stepen citotoksičnosti meren bojom Tripan plavo pri svim ispitivanim koncentracijama bio u granicama prihvatljivim za Komet test (ispod 20%).

Smatra se da bi detaljnije studije bioloških konsekvenci oslobađanja monomera iz ugrađenih adheziva pružile bolji uvid u eventualne rizike po nasledni materijal, kao i eventualne citotoksične efekte na nivou zubne pulpe.

Knežević i sar. [19] su utvrđivali da li postoji razlika u citotoksičnosti između kompozitnih materijala osvetljavanih na različite načine pomoću LED aparata. Tanki slojevi dva kompozitna materijala polimerizovani su korišćenjem tri različita metoda pomoću Bluephase C8 LED aparata za osvetljavanje: 1. metod visokog intenziteta (HIP-800 mW/cm² 20 sekundi), 2. soft start metod (SOF-650 mW/cm² prvih 5 sekundi, 800 mW/cm² sledećih 25 sekundi) i 3. metod niskog intenziteta (LOP-650 mW/cm², 30 sekundi). Kulture limfocita su tretirane polimerizovanim i nepolimerizovanim kompozitima, korišćenjem jednog od opisanih metoda. Čelije su analizirane na citotoksičnost tripan plavim, a vizuelizacija kometa rađena je etidijum bromidom nakon alkalnog Komet testa. Značajna citotoksičnost je otkrivena kod 120 µg/mL nepolimerizovanih kompozita i kod polimerizovanih pomoću HIP polimerizacione metode. Osvetljavanje pomoću LOP programa (svetlo niskog intenziteta) pokazalo je najnižu genotoksičnost. Zaključak ovog istraživanja je da duže vreme osvetljavanja svetlom niskog intenziteta dovodi do manje citotoksičnosti nego kraća ekspozicija osvetljavanja korišćenjem visokog intenziteta svetlosne emisije iz aparata za osvetljavanje. Komet test je sproveden standardnim protokolom po Singh-u i sar. [73]

Teško je ili čak nemoguće upoređivati rezultate različitih eksperimentalnih ćelijskih kultura, zbog mnogih varijacija eksperimentalnih uslova, kao što je tip ćelija, metod kontakta materijala i vreme ekspozicije. [116] Detalji mehanizma koji dovode do smrti ćelija, genotoksičnosti i odlaganja ćelijskog ciklusa nisu potpuno razumljivi. Monomeri smola mogu biti u stanju da oštete funkciju ćelija u oralnom kavitetu. Tokom zadnje dekade, citotoksičnost i genotoksičnost nekih metakrilata utvrđena je u brojnim istraživanjima. Sigurno je potvrđeno da komonomer TEGDMA izaziva genske mutacije *in vitro*. Gerzina i Hume su pronašli da TEGDMA i HEMA mogu da difunduju kroz dentin u pulpu i da iritiraju pulpu i gingivu. Čak i kod potpuno vezanih restaurativnih materijala, preostaje nevezana značajna količina polimera kratkih lanaca, omogućavajući potencijalno oslobađanje neizreagovalih toksičnih komponenata oko pulparnog tkiva. [66]

Neizreagovali monomeri se izdvajaju najviše tokom prvih 24 časa posle polimerizacije tako da se najveća toksičnost očekuje unutar prvih nekoliko dana. [117, 118]

Kompozitni materijali stvaraju mreže sa jakim poprečnim vezama, tokom polimerizacije, i unutar normalnih uslova osvetljavanja, ostvaruju konverziju (pretvaranje monomera u polimer) prosečno 45%-70% [119, 120]

Sastav kompozitnih materijala, veličina čestica punila i tip i vrste interakcija između monomera i punila, utiču na stepen polimerizacije. Svetlosno polimerizujući aparat takođe može imati značajan uticaj na sposobnost kompozitnog materijala da se polimerizuje. [121]

Jačina svetla, metod polimerizacije (*mode*) i širina ispusta svetla (*band-width of light output*) takođe mogu menjati odgovor materijala. Teoretski, 100% konverzija monomera u polimer je moguća ali 25% do 50% duplih veza monomera ostaje neaktivna u polimeru. [122]

Postoji, takođe, korelacija između količine nepolimerizovanih (neosvetljenih-uncured) monomera u kompozitu i magnitude citotoksičnog efekta. Da bi se prevazišli ovi problemi neadekvatne

polimerizacije, preporučeni su novi metodi osvetljavanja (soft-start, eksponencijalni programi, pulsni program i visoko i nisko intenzivni program).

Citotoksičnost dentalnih kompozita i njihovih komponenata proučavani su pomoću različitih metoda. [123, 124, 125, 126, 127]

Toksičnost dentalnih materijala može biti procenjena preko *in vitro* testa i kroz klinička ispitivanja na ljudima. *In vitro* proučavanja su primarno sprovedena radi procene citotoksičnosti (oštećenja ćelija) ili genotoksičnosti (specifična DNK oštećenja ili hromozomska aberacija) dentalnih materijala. Suprotno od ostalih citogenetskih tehnika, Komet test ne zahteva kultivaciju ćelija, već detektuje primarna DNK oštećenja *in situ* na nivou svake individualne ćelije. Komet test (Comet assay) se koristi za određivanje prisustva jedno - i dvolančanih prekida DNK, kao i mesta osetljivih na alkalije (apurinska i apirimidinska mesta), unakrsnih veza DNK-DNK i DNK-protein, kao i u proučavanjima fenomena reparacije DNK. Zbog svoje jednostavnosti, visoke osetljivosti i tačnosti, Komet test se koristi u proceni genotoksičnog potencijala različitih hemijskih i fizičkih agenasa. [104, 112]

Yap i saradnici su pokazali da kompozitna polimerizacija i citotoksičnost zavise od LED svetlosnog aparata. Oni su zaključili da su kompozitni materijali polimerizovani LED svetlom jače citotoksični od kompozita polimerizovanih konvencionalnim halogenim svetlom. [110]

Hofman i saradnici su komparirali oslobađanje neizreagovalih komponenti iz kompozitne smole posle osvetljavanja standardnom, soft start i brzom metodom. Zaključili su da uzorci polimerizovani brzom metodom (*fast cure modes*) pokazuju najveću rastvorljivost i sorpciju. [128]

Dalja istraživanja vremena elucije (elution time) i oslobađanja komponenata iz kompozitnih materijala polimerizovanih različitim metodama osvetljavanja može biti korisna za bolje razumevanje bioloških rizika ovih modernih restaurativnih materijala i polimerizacionih svetala kod foto polimerizacije.

Sousa Costa i sar. su ispitivali citotoksični efekat tri zubna adhezivna sistema. Neosvetljeni, sveži adhezivi su dodavani kulturi odontoblastolikih ćelija miša. Tri adhezivna sistema su unošena na 120 min u specijalne sudove (Single Bond, 3M –Grupa I), (Prime Bond –Grupa II) i (Syntac Sprint – Grupa III). Rezultati su pokazali da su sveži adhezivi jače toksični od polimerizovanih adheziva. I kisele i ne kisele komponente ovih sistema su bile odgovorne za visok citotoksični efekat ovih dentalnih materijala. [129]

U ovoj doktorskoj disertaciji, takođe je dokazana jača genotoksičnost ne polimerizovani adheziva u odnosu na polimerizovane adhezive.

Citotoksičnost komponenata smole ispitivana je *in vitro* [130, 131, 132] i *in vivo* [133]. Dok su *in vitro* proučavanja pokazala da HEMA (hidroksi etil metakrilat), Bis GMA (bis glicidil metakrilat), BPA (bisphenol), TEGDEMA (trietilen glikol dimetakrilat), UDMA (uretan dimetakrilat), GMA (glicidil metakrilat) i druge prisutne komponente pokazuju sigurne toksične efekte na linije fibroblastičnih ćelija, *in vivo* proučavanja su pokazala da su kompozitne smole,

uključujući adhezivne sisteme, biokompatibilne sa zubnom pulpom [134, 135]. Tako, mnoga proučavanja nanošenja adhezivnih sistema direktno na pulpu životinja, potvrđuju koncept da bakterije, pre nego dentalni materijali, izazivaju iritaciju pulpnog tkiva, ponekad dovodeći do nekroze pulpe [134, 135, 136] Suprotno tome, druga proučavanja su pokazala da materijali na bazi smola nisu pogodni za prekrivanje pulpe. [137, 138,]

Citotoksični potencijal zubnih materijala je potvrđen u mnogim *in vitro* studijama [131, 133, 140] koje određuju citotoksičnost komponenata materijala i identifikuju koncentracije koje izazivaju 50% citotoksičnost u komparaciji sa kontrolama (TC_{50}). U gore navedenim proučavanjima, sastojci smola su nanošeni na ćelijske linije mišjih fibroblasta. Opisani su i efekti sastojaka smole na odontoblastolike ćelije. Prema MacDougell-u i sar. [141] odontoblasti miša su pogodne ćelijske linije za proučavanje citotoksičnih efekata zubnih restaurativnih materijala. Nanošenje adhezivnih smola u direktan kontakt na fibroblaste papile miša, takođe je otkrilo *in vitro* citopatski efekat sastojaka polimerizovanih ili ne polimerizovanih „one bottle“ adhezivnih smola.

ADA (American dental Association) i ANSI (American National standards Institute) preporučuju niz testova kompatibilnosti zubnih materijala. Ovaj niz se sastoji od inicijalnih, sekundarnih i upotrebnih testova (*initial, secondary, usage tests*). Od inicijalnih testova najviše se koriste *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti i mutageneze zubnih materijala i njihovih komponenti na celularnom nivou. Dok su neka proučavanja pokazala genotoksičnu aktivnost zubnih materijala *in vitro* i *in vivo* [142, 143] druga su bila fokusirana na citotoksičnost dentin bonding agenasa u odnosu na tkivne kulture. [130, 131, 132, 140, 144] Većina ovih *in vitro* proučavanja su se bavila procentom koncentracije raznih sastojaka smole koji inhibišu metabolizam ćelija [130, 131, 140, 141, 145] Procenjivani su i interaktivni efekti kombinacije dentin bonding monomera (HEMA, Bis GMA, TEGDMA i UDMA) kao i vreme izloženosti ovim sastojcima, na mišjim fibroblastima [141] limfocitima i pulparnim ćelijama. [145] U kliničkim uslovima, terapija pulpe adhezivnim smolama može da dovede do kontinuiranog oslobađanja neizreagovanih komponenata smole i pulparne inflamacije. Dokazano je da su ispitivani adhezivi citotoksični. Kada se smolni materijal osvetli citotoksični efekat opada. [145]

U istraživanjima Mantellinija i sar. [68]. odontoblastolike ćelije miša (MDPC-23), nediferentovane ćelije pulpe (OD-21) ili makrofagi (RAW 264,7) izlagani su Single-Bondu polimerizovanom 0-40sec. Primena Annexin-a V i propidium jodida pokazala je da Single Bond izaziva apoptozu kod MDPC-23, OD-21 i makrofaga. Proporcija apoptotičnih ćelija zavisi od stepena polimerizacije adhezivne smole. Adhezivna smola izaziva smrt pulparnih ćelija što je udruženo sa aktivacijom pro-apoptotic cistein proteaze Caspase-3. Zaključeno je da adhezivna smola izaziva apoptozu i „cell cycle arrest“ ćelija uključenih u regeneraciju pulpo-dentinskog kompleksa, *in vitro*. Mantellini i sar. su primetili dramatičnu razliku u odgovorima ćelija na tri uslova polimerizacije (osvetljavanje od 0,10 ili 40 sec). Dok nepolimerizovana i delimično polimerizovana adhezivna smola izaziva apoptozu vrlo naglo, kod svih tipova ćelija, polimerizovana adhezivna smola izaziva značajnu apoptozu samo makrofaga. Ovi nalazi se mogu

objasniti niskim ispuštanjem toksičnih elemenata iz polimerizovanih u komparaciji sa nepolimerizovanim adhezivnim smolama, i naglašavaju važnost potpune polimerizacije adhezivnih smola pre nanošenja kompozitnih smola. U zaključku se ističe da adhezivne smole izazivaju apoptozu ili usporavanje prolaska kroz ćelijski ciklus (cell-cycle arrest) ćelija koje imaju glavnu ulogu u pulparnom ozdravljenju i regeneraciji dentina.

U ovoj doktorskoj disertaciji je, takođe, dokazano da ne polimerizovani i delimično polimerizovani adhezivi ispoljavaju veći genotoksični efekat od polimerizovanih adheziva. U ovom doktoratu je korišćeno isto vreme osvetljavanja adheziva od 0,10 i 40 sekundi. a objašnjenje efekata je takođe u niskom ispuštanju toksičnih elemenata iz polimerizovanih adhezivnih smola.

Adhezivni sistemi na bazi smola se koriste radi poboljšanja retencije, smanjenja mikroproticanja i opadanja postoperativne osetljivosti kompozitnih restauracija. *In vivo* proučavanja su pokazala da nanošenje adhezivne smole direktno na eksponiranu pulpu ili preko tankog sloja dentina (manje od 0,5 mm), izaziva dilataciju i kongestiju krvnih sudova, inflamaciju i pulparne apscese [21]. Važno je da nije viđen dentinski most kod većine humanih zuba tretiranim direktnim prekrivanjem pulpe adhezivnim smolama. Nedostatak dentinskog mosta može da učini pulpu osetljivijom na inflamaciju koju izaziva bakterijska kontaminacija usled mikroproticanja, na spoju smola-zub. Napolimerizovani monomeri iz adhezivnih smola mogu da difunduju direktno u pulpu kroz otvor a takođe i kroz dentinske kanaliće i da izazovu citotoksične efekte na pulparnim ćelijama. Histološka proučavanja humanih zubnih pulpi prekrivenih adhezivnim smolama su pokazala jake inflamatorne odgovore i nedostatak regeneracije dentina. [21, 23] Razumevanje mehanizma citotoksičnosti i genotoksičnosti dentalnih materijala je neophodno za selekciju strategije zaštite dentin-pulparnog kompleksa koja omogućava ozdravljenje i regeneraciju dentina.

Tokom razvoja genetičke toksikologije postepeno su dizajnirani testovi koji oštećenja DNK prate na osnovu različitih bioloških pokazatelja (mikronukleusi, razmene sestrinskih hromatida, genske mutacije, hromozomske aberacije itd.). Pored toga, razvijene su senzitivnije metode za detekciju oštećenja DNK kao što je test neplanirane sinteze DNK (engl. unscheduled DNK synthesis, UDS) koji prati efekte na pojedinačnim ćelijama, kao i detekcija jednolanačanih prekida i oštećenja nestabilnih pri visokim pH (engl. alkali labile sites, ALS) putem alkalne elucije. Tehnika UDS prati porast sinteze DNK usled popravke različitih oštećenja tokom ekscizione reparacije. Iako se ovom metodom mogu dobiti podaci o stepenu oštećenja DNK u pojedinačnim ćelijama, sama metoda je veoma skupa, zahteva posebne uslove rada zbog upotrebe radioizotopa i relativno je ograničene osetljivosti. S druge strane, metoda alkalne elucije zahteva veliki broj ćelija za analizu, te imajući u vidu da se izvodi na pulovanom uzorku, ne pruža nikakve podatke o mogućim međućelijskim razlikama u osetljivosti na genotoksični agens.

Ubrzo nakon razvoja Komet testa shvatilo se da on ima niz prednosti nad drugim metodama koje se uobičajeno već decenijama koriste u genetičkoj toksikologiji. Osnovne prednosti su

visoka osetljivost, dovoljan je mali broj ćelija za analizu, fleksibilnost metode (moguće su različite modifikacije osnovne metodologije Komet testa), relativno niska cena, dovoljna je mala količina ispitivane supstance, brzina izvođenja metode (rezultati su gotovi za par dana) i, jedna od najznačajnijih prednosti, široka mogućnost primene ne samo u genotoksikologiji već i u raznim oblastima biomedicine.

Komet test može da se vrši kako pod *in vitro*, tako i pod *in vivo* uslovima. U *in vitro* uslovima testiranje se može obaviti i dodavanjem egzogene metaboličke aktivacije (npr. mikrozomalna frakcija iz jetre pacova tretiranih supstancom Aroclor 1254), mada se mora napomenuti da mikrozomalni enzimi ne mogu u potpunosti da simuliraju *in vivo* uslove. Pre izvođenja *in vitro* Komet testa od velikog je značaja određivanje citotoksičnosti ispitivanog materijala, zato što prevelika citotoksičnost može da dovede do lažno pozitivnih rezultata. Prihvatljivo je da citotoksičnost iznosi najviše do 30%, a ukoliko je veća onda se doza ispitivanog agensa mora da smanji. [146, 147, 148]

Kompjuterski softveri korišćeni u Komet testu određuju niz različitih parametara, ali u praksi se najviše koriste količina DNK u "glavi" komete, količine DNK u "repu" komete i tzv. moment repa (engl. tail moment, TM). Ipak, rezultati iz različitih eksperimenata ili različitih laboratorija mnogo lakše se porede ukoliko se za analizu koriste količina DNK u "glavi" ili u "repu" komete. [149]

Od kliničkih aplikacija Komet test je upotrebljavan u prenatalnoj dijagnostici, proučavanjima katarakte, dijabetesa, astme, reumatoidnog artritisa, sistemskog lupus eritematosus-a, Alzheimerove bolesti itd. Primenom Komet testa u biomonitoringu dobijeni su veoma interesantni rezultati u istraživanjima biološke osnove starenja, oksidativnog stresa pri fizičkom naporu, nepravilne ishrane, uticaja ozona, molekularno-epidemioloških analiza izloženosti štetnim agensima.

Pored ispitivanja genotoksičnog i citotoksičnog delovanja adheziva i kompozita, u novije vreme se vrše i imunohistohemijska ispitivanja koja proučavaju ekspresiju nekih enzima u odontoblastima i pulpnom tkivu posle primene adheziva. Dokazano je da je aktivacija endogenih proteinaza (metaloproteinaza) odgovorna za razlaganje kolagena u hibridnom sloju dentina. Takođe je dokazano da *etch and rinse* i *self etch* adhezivi mogu da aktiviraju gelatinolitičke aktivnosti u dentinu kao i prisustvo metaloproteinaza, posle kiselinske demineralizacije.

Postojanost adhezivne veze između kompozitnih smola i dentina je jedan od najvažnijih faktora za dugotrajnost kompozitnih restauracija. Neophodna je potpuna infiltracija demineralizovanog dentina smolom. Inače, vodena faza iz dentinskih kanalića popunjava ovaj prostor. Kretanje vode između hibridnog sloja i dentina izaziva hidrolizu. Procesom hidrolize prekidaju se kovalentne veze između kolagenih vlakana i smole. Smatra se da je degradacija kolagena izazvana delovanjem enzima matriksnih metaloproteinaza. Ovi enzimi mogu biti poreklom iz bakterija i iz dentinskog matriksa odakle se polako otpuštaju tokom vremena. Ovo je uzrok degradacije adhezivne veze i u slučajevima gde je postignuta opturacija bez mikrocurenja. Prisustvo bakterija nije neophodno da bi nastala degradacija kolagena. Hlorheksidin deluje kao inhibitor matriksnih metaloproteinaza i zaustavlja degradaciju hibridnog sloja. Ovo može imati praktičnu primenu kod ugradnje hlorheksidina u neke buduće adhezivne sisteme. [150, 151]

8. ZAKLJUČAK

Kvantitativna procena marginalnog pripoja kompozita za gleđ, urađena pomoću kompjuterske analize SEM mikrografija, omogućava sledeće zaključke:

1. Kod gleđi postoje značajne kvantitativne razlike u pripoju kompozitnih restauracija za gleđno tkivo u odnosu na tehniku osvetljavanja i vrstu adhezivno kompozitnog materijala (adhezivnu tehniku).
2. Najmanje prosečne dužine i širine marginalne pukotine oko kompozitnih restauracija u gleđi utvrđene su kod *soft start* (SOF) osvetljavanja kompozita i *etch and rinse* adhezivne tehnike, uz korišćenje *Adper Single Bond 2* i *Filtek ultimate* (ASB/FU) materijala.
3. Na osnovu utvrđenih dužina i širina marginalnih pukotina u gleđi određen je i najmanji marginalni indeks (MI) gleđi uz *soft start* tehniku fotopolimerizacije i *etch and rinse* adhezivni postupak, pri korišćenju istog materijala.
4. Najmanji procenat pripoja kompozita bez pukotine, odnosno najbolja marginalna adaptacija za gleđ ostvarena je primenom postepenog ili soft start osvetljavanja i korišćenjem ASB/FU adhezivno-kompozitnog materijala.
5. Na marginalnu adaptaciju kompozita za gleđ imaju značajan uticaj i tehnika fotopolimerizacije i adhezivna tehnika.

Kvantitativna procena marginalnog pripoja kompozita za dentin, urađena pomoću kompjuterske analize SEM mikrografija, upućuje na sledeće zaključke:

6. Kod dentina nisu utvrđene značajne razlike u pripoju kompozitnih restauracija za dentinsko tkivo u odnosu na tehniku osvetljavanja kompozita ali su utvrđene značajne razlike u odnosu na vrstu adhezivno kompozitnog materijala (adhezivnu tehniku).
7. Najmanja prosečna dužina marginalne pukotine između kompozita i dentina utvrđena je kod *soft start* (SOF) osvetljavanja i *etch and rinse* adhezivne tehnike uz primenu ASB/FU adhezivno-kompozitnog materijala.

8. Međutim, najmanja prosečna širina marginalne pukotine između kompozita i dentina utvrđena je kod druge tehnike osvetljavanja (HIP) standardne fotopolimerizacije uz korišćenje iste adhezivne tehnike i istog materijala.
9. Na osnovu utvrđenih dužina i širina marginalnih pukotina u dentinu određen je i najmanji marginalni indeks (MI) dentina kod *soft start* tehnike fotopolimerizacije kompozita i *etch and rinse* adhezivnog postupka, uz primenu ASB/FU adhezivno-kompozitnog materijala.
10. Potvrđen je značaj marginalnog indeksa (MI) u preciznijem određivanju kvantiteta pripoja materijala za zubna tkiva. MI obuhvata vrednosti širine i dužine pukotine oko restauracija tako da je procene pripoja, samo na osnovu jednog parametra, manje pouzdana.
11. Najmanji procenat pripoja kompozita bez pukotine, odnosno najbolja marginalna adaptacija kompozita za dentin ostvarena je primenom ASB/FU adhezivno-kompozitnog materijala i *etch and rinse* adhezivne tehnike, bez obzira na tehniku osvetljavanja.
12. Na marginalnu adaptaciju kompozita za dentin ima veći uticaj adhezivna tehnika u odnosu na tehniku fotopolimerizacije.

Kvalitativna (mikrokorfološka) analiza marginalnog pripoja kompozita za gleđ i dentin utvrdila je:

13. Kvalitativna analiza pripoja kompozitnih smola za gleđ je pokazala najbolji kvalitet veze kod primene *etch and rinse* adhezivne tehnike i postavljanja restauracija od Adper Single Bond 2-Filtek Ultimate materijala. Adhezivni i hibridni slojevi su bili dobro definisani, uz brojne kraće i duže mikrotrnove smole, na spoju materijala i gleđi, naročito primenom postepenog *soft start* (SOF) osvetljavanja kompozita.
14. Kvalitet marginalnog pripoja kompozitne smole za gleđ, kod *self etch* tehnike, je bio nešto slabiji, sa retkim mikrotrnovima smole i češćom pojavom mikropukotine, kod obe tehnike osvetljavanja.
15. Na sagitalnim presecima kompozitnih restauracija, postavljenih uz *etch and rinse* tehniku, gleđni hibridni sloj je bio deblji nego kod restauracija postavljenih primenom *self etch* tehnike, nezavisno od tehnike osvetljavanja.
16. Kod dentina je, takođe, utvrđena kvalitetnija mikromehanička veza kompozitnih smola za ovo tkivo primenom totalno nagrizajuće, *etch and rinse* adhezivne tehnike i ASB/FU materijala. Kod ove adhezivne tehnike na površini dentina uočavani su dobro izražen hibridni sloj, kraći i duži produžeci smole u koso presečenim dentinskim kanalićima.
17. Vezivanja *self etch* adheziva, odnosno AEO/FU materijala, je zbog kompletnog rastvaranja dentinskog *smear layer*; uslovalo stvaranje tanjeg hibridnog sloja ili ne formiranje hibridnog sloja, unutar intertubularnog dentina. Adhezivni sloj je kod *self etch* tehnike bio veće debljine i često odvojen od dentina.

Ispitivanje genotoksičnosti nopolimerizovane, delimično polimerizovane i polimerizovane adhezivne smole na kulturi ćelija – *in vitro* Komet test, je pokazalo:

18. Nakon fotoaktivacije kompozitnih adheziva u trajanju od 0, 10 i 40 sek, standardnim halogenim svetlom, utvrđena je statistički značajna razlika genotoksičnih efekata adheziva u odnosu na dužinu njihovog osvetljavanja.

19. Pri fotopolimerizaciji od 0 sek. i 10 sek. postoje genotoksični efekti, s tim da su značajniji za vreme fotopolimerizacije od 0 sek. (odnosno kod ne osvetljenih adheziva) u odnosu na fotopolimerizaciju od 10 sek..

20. Pri fotopolimerizaciji adheziva u trajanju od 40 sek. ne postoje značajni genotoksični efekti, detektovani Komet testom.

21. Na osnovu rezultata može se zaključiti da polimerizacija od 10 sekundi nije dovoljna da bi se neutralisao genotoksični potencijal dva ispitivana adheziva.

Opšti zaključak istraživanja je da veći uticaj na marginalni pripoj kompozita za zubna tkiva ima adhezivna tehnika (način kondicioniranja kaviteta) u odnosu na tehniku osvetljavanja. Kvantitativna i kvalitativna procena pripoja ukazuju na znatno lošiji pripoj kompozita za dentin u odnosu na pripoj za gleđ, kod obe fotopolimerizacije i adhezivne tehnike. Rezultati navode na zaključak o neophodnosti daljeg usavršavanja adhezivnih sistema.

LITERATURA

1. Frankenberger R, Tay FR. Self-etch vs etch-and-rinse adhesives: effect of thermo-mechanical fatigue loading on marginal quality of bonded resin composite restorations. *Dent Mater* 2005; 21:397-412.
2. Luo Y, Lo ECM, Wei SHY, Tay FR. Marginal adaptation of a new compomer under different conditioning methods. *J Dent* 2000; 28:495-500.
3. Ferracane JL. Developing a more complete understanding of stresses produced in dental composites during polymerization. *Dental Mterials* 2005; 21:36-42.
4. Mehl A, Hickel R, Kunzelmann KH. Physical propertties and gap formation of light-cured composites with and without softstart polymerization. *J Dent* 1997; 3-4(25):321-330.
5. Goracci G, Casa de Martinis L, Mori G. Curing light intensity and marginal leakage of composite resin restorations. *Quintess Int* 1996; 27:355-362.
6. Unterbrink GL, Muessner R. Influence of light intensity on two restorative systems. *J Dent* 1995; 23:183-189.
7. Uno S, Asmussen E. Marginal adaptation of a restorative resin polymerized at reduced rate. *Scand J Dent Res* 1991; 99:440-444.
8. LuoY, Lo ECM, Wei SHY, Tay FR. Comparison of pulse activation vs conventional light-curing on marginal adaptation of a compomer conditioned using a total-etch or a self-etch technique. *Dental Materials* 2002; 18:36-48.
9. Prica D, Galić N, Želježić D, Prica A. Genotoxicity evaluation of five different dentin bonding agents by chromosomal aberation analysis. *J Oral Rehabil* 2006; 33:462-471.
10. Krejci I, Planinic M, Stavridakis M, Bouillaguet S. Resin composite shrinkage and marginal adaptation with different pulse-delay light curing protocols. *Eur J Oral Sci* 2005; 113:531-536.
11. Hansen EK. Effect of postponed polishing on marginal adaptation of resin used with dentin bonding agent. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1988; 96:260-264.
12. Roulet JF, Reich T, Blunck U, Noack M. Quantitative margin analysis in the scanning electron microscope. *Scanning Microsc* 1989; 3(1):147-58; discusion 158-159.
13. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 2003; 28(3):215-35.
14. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self/etch adhesives. *Dental materials* 2011; 27:17-27.
15. Van Meerbeek B. Mechanism of resin Adhesion – Dentin and enamel Bonding. *Compendium of Continuing Education in Dentistry* 2010; 9(31):1-7.

16. Banerjee A, Watson T. Pickard's Manual of Operative Dentistry. New York. *Oxford University Press* 2011; pp88-98.
17. Jerolimov V i sar. Osnove stomatoloških materijala. Zagreb: www.sfzg.hr 2005; 205:201-211.
18. Živković S. Osnovi restaurativne stomatologije. Beograd. Datastatus 2009; p229-250.
19. Knezevic A, Zeljezic D, Kopjar N, Tarle Z. Cytotoxicity of composite materials polymerised with LED Curing Units. *Operative Dentistry* 2008; 33(1):23-30.
20. Pashley DH, Zhang Y, Agee KA, Rouse CJ, Carvalho RM, Russell CM. Permeability of demineralized dentin to HEMA. *Dent Mater* 2000; 16:7-14.
21. Hebling J, Giro EM, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod* 1999; 25:676-682.
22. Chen RS, Liuiw CC, Tseng WY, Hong CY, Hsieh CC, Jeng JH. The effect of curing light intensity on the cytotoxicity of a dentin bonding agent. *Oper Dent* 2001; 26:505-510.
23. Souza Costa CA, Mesas AN, Hebling J. Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am J Dent* 2000; 13:81-87.
24. Drobac Milan. Ispitivanje jačine adhezivne veze i odnosa kompozitnih sistema sa karijesno izmenjenim dentinom. Doktorska disertacija. Novi Sad, 2011.
25. Yesilyurt C, Bulueu B. Bond strength of Total-etch dentin Adhesive Systems on Peripheral and Central dentinal Tissue: A Microtensile Bond Strength Test. *J Contemp Dent Pract* 2006; 2(7):1-12.
26. Inoue Y, Nagakane K, Fukuda R et al. Hydrolytic stability of self-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2004; 84:1160-1164.
27. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res* 2004; 83:454-458.
28. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982; 16:265-273.
29. Perdigao I Lambrechts P, Van Meerbeek B et al. The interaction of adhesive systems with human dentin. *Am J Dent* 1996; 9:167-173.
30. De Munk J, Van Landuyt K, Peumans M et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005; 84:118-132.
31. Shirai K, De Munk J, Yoshida Y et al. Effects of cavity configuration and aging on the bonding effectiveness of six adhesives to dentin. *Dent Mater* 2005; 21:110-124.
32. Inoue S, Kashiroy K, Yoshida Y et al. Hydrolytic stability of self-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2005; 84:1160-1164.
33. Tay FR, Frankenberger R, Krejci I. Single-bottle adhesives behave as permeable membranes after polymerization. *Journal of Dentistry* 2004; 32:611-621.
34. Peumans M, Kanumilli PV, De Munk et al. Clinical effectiveness of contemporary adhesives; a systematic review of current clinical trials. *Dent Mater* 2005; 21:864-881.
35. Peumans M, De Munk J, Van Landuyt K et al. Five-year clinical effectiveness of two-step self-etching adhesives. *J Adhes Dent* 2007; 9:7-10.
36. Šutalo J. Poglavlje 22: Smolasti kompozitni materijali. Osnove stomatoloških materijala. Zagreb. Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2005.

37. Braga RR, Ballester RY, Ferracane JL. Factors involved in the development of polymerization shrinkage stress in resin-composites: A systematic review. *Dental Materials* 2005; 21:962-970.
38. Labella R, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G. Polymerization shrinkage and elasticity of flowable composites and filler adhesives. *Dent Mater* 1999; 15:128-137.
39. Silva MAB, Oliveira S, Tonholo J et al. Effect of the Insertion and Polymerization Technique in Composite Resin Restorations: Analysis of Marginal Gap by Atomic Force Microscopy. *Microsc Microanal* 2010; 16:779-784.
40. Lindberg A, Pentzfeldt A, Van Dijken JW. Effect of power density of curing unit, exposure duration and light guide distance of composite depth of cure. *Clin Oral Investig* 2005; 9:71-76.
41. Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials* 1991; 12:737-740.
42. Davidson CL, Feilzer AJ. Polymerization shrinkage and polymerization shrinkage stress in polymer-based restoratives. *J Dent* 1997; 25:435-440.
43. Venhoven BAM, deGee AJ, Davidson CL. Polymerization contraction and conversion of light curing Bis GMA-based methacrylate resins. *Biomaterials* 1993; 14:871-875.
44. Cavalcante LMA, Peris AR, Ambrosano GMB, Ritter AV; Pimenta LAF: Effect of photoactivation systems and resin composites on microleakage of esthetic restorations. *J Contemp Dent Pract* 2007; 8:70-79.
45. Halvorson RH, Erickson RL, Davidson CL. Energy dependent polymerization of resin-based composite. *Dental Materials* 2002; 18(6): 463-469.
46. Meyer GR, Ernst C-P, Willershausen B. Decrease in power output of new light-emitting diode (LED) curing devices with increasing distance to filling surface. *J Adhes Dent* 2002; 4:197-204.
47. Caughman WF, Rueggeberg FA, Curtis JW. Clinical guidelines for photocuring restorative resins. *J Am Dent Assoc* 1995; 126:1280-1286.
48. Caughman WF, Rueggeberg FA. Shedding new light on composite polymerization. *Oper Dent* 1996; 27:636-638.
49. Asmussen E, Peutzfeldt A. Influence of pulse-delay curing on softening of polymer structures. *J Dent Res* 2001; 80:1570-1573.
50. Rueggeberg FA, Caughman WF, Chan DN. Novel approach to measure composite conversion kinetics during exposure with stepped or continuous light-curing. *J Esthet Dent* 1999; 11:197-205.
51. Asmussen E. Restorative resins: hardness and strength vs quantity of remaining double bonds. *Scand J Dent Res* 1982; 90:484-489.
52. Rueggeberg FA, Ergle JW, Mettenburg DJ. Polymerization depths of contemporary light-curing units using micro-hardness. *J Esthet Dent* 2000; 12:340-349.
53. Cunha LG, Sinhorette MA, Consani S, Sobrinho LC: Effect of different photoactivation methods on the polymerization depth of light-activated composite. *Oper Dent* 2003; 28:155-159.
54. Burgess JO, Walker RS, Porche CJ, Rappold AJ. Light curing-an update. *Comp Cont Ed* 2002; 23:889-906.
55. Feilzer AJ, Dooren LH, de Gee AJ, Davidson CL. Influence of light intensity on polymerization shrinkage and integrity of restoration-cavity interface. *Eur J Oral Sci* 1995; 103:322-326.

56. Harrington E, Wilson HJ. Depth of cure of radiation-activated materials - effect of mould material and cavity size. *J Dent* 1993; 21:305-311.
57. Kanca IJ, Suh BI. Pulse activation: reducing resin-based composite contraction stresses at the enamel cavosurface margins. *Am J Dent* 1999; 12:107-112.
58. Silikas N, Eliades G, Watts DC. Light intensity effects on resin-composite degree of conversion and shrinkage strain. *Dent Mater* 1993; 16:292-296.
59. Sakaguchi RL, Berge HX. Reduced light energy density decreases post-gel contraction while maintaining degree of conversion in composites. *J Dent* 1998; 26:695-700.
60. Emami N, Soderholm K-JM, Berglund LA. Effect of light power density variations on bulk curing properties of dental composites. *J Dent* 2003; 31:89-196.
61. Watts DC, Al-Hindi A. Intrinsic „soft start“ polymerization shrinkage-kinetics in an acrylate-based resin-composite. *Dent Mater* 1999; 15:39-45.
62. Knežević A, Tarle Z, Meniga A, Sutalo J, Pichler G. Influence of light intensity from different curing units upon composite temperature rise. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2005; 32 (5): 362-368.
63. Knežević A, Tarle Z, Ristić M et al. Effectiveness of composite polymerization with LEDs of second generation; Retrieved online April 20, 2007 from <http://iadr.confex.com/iadr/eur05/techprogram/abstract/67637.htm>
64. Pashley DH. The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Oper Dent* 1992; 17:229-242.
65. Imazato S, McCabe JF, Tarumi H, Ehara A, Ebisu S. Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. *Dental Materials* 2001; 17(2):178-183.
66. Hume WR, Gierzia TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Critical Review of Oral Biology and Medicine* 1996; 7(2):172-179.
67. Hebling J, Giro EM, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod* 1999; 25:676-682.
68. Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive Resin Induces Apoptosis and Cell-cycle Arrest of Pulp Cells. *J Dent Res* 2003; 82 (8):592-596.
69. Zimonjić DB, Savković N, Anđelković M. Genotoksični efekti – efekti, principi i metodologija detekcije. Naučna Knjiga, Beograd, 1990, str. 158-69.
70. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobazashi H, Mizamae Y, Rojas E, Rzu J-C, Sasaki YF. Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35:206-21.
71. Waldman GL, Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Microleakage and Resin-to-Dentin Interface Morphology of Pre-Etching versus Self-Etching Adhesive Systems. *The Open Dentistry Journal* 2008; 2:120-125.
72. Margvelashvili M, Goracci C, Beloica M, Papacchini F, Ferrari M. *In vitro* evaluation of bonding effectiveness to dentin of all-in-one adhesives. *Journal Of Dentistry* 2010; 38(2):106-112.
73. Singh NP, McCoz MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988, 175: 184-91.
74. Speit G, Rothfuss A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 2012, 920:79-90.

75. Radaković M, Djelić N, Stanimirivić Z i sar. Evaluation of the effects of ephedrine on human lymphocytes in the comer assay. *Acta Veterinaria* 2011; 4(61):363-371.
76. Brannstrom M. The cause of postoperative sensitivity and its prevention. *Journal of Endodontics* 1986; 12:475-481.
77. Caughman WF, Rueggeberg FA. Shedding New Light on Composite Polymerisation. *Operative Dentistry* 2002; 27:636-638.
78. Swift EJ. Critical Appraisal. Light-emitting-diode curing lights-revisited. Journal Compilation; *Blackwell Munksgaard* 2007; 1(19):56-62.
79. Blažić L, Živković S. Uticaj "soft start" polimerizacije na kvalitet rubnog zatvaranja kompozitnih ispuna. *Serbian Dental J* 2003, 50:59-64.
80. Gajić N, Djeri A, Kojić Ž, Trtić N. Uticaj halogenog svetlosnog izvora na rubno zatvaranje kompozitnih ispuna. *Serbian Dental J* 2010; 57:14-18.
81. Hardan LS, Amm EW, Ghayad A. Effect of different modes of light curing and resin composites on microleakage of Class II restorations. *Odontostomatol Trop* 2008; 31(124):27.
82. Planinic KI, Stavridakis M, Bouillaguet S. Resin composite shrinkage and marginal adaptation with different pulse-delay light curing protocols. *Eur J Oral Sci* 2005; 113:531-536.
83. Swift EJ. Critical Appraisal. Visible light-curing: Part I. *Journal of estetic and restorative dentistry* 2001; 2(13):140-143.
84. Lim B-S, Ferracane JL, Sacaguchi RL, Condon JR. Reduction of polymerization contraction stress for dental composites by two-step light activation. *Dent Mater* 2002; 18:436-444.
85. Lovell LG, Newman SM, Donaldson MM, Bowman CN. The effect of light intensity on double bond conversion and flexural strength of a model, unfilled dental resin. *Dent Mater* 2001; 17:504-511.
86. Asmussen E, Peutzfeldt A. Two-step curing: influence on conversion and softening of a dental polymer. *Dent Mater* 2003; 19:466-470.
87. Moon H-J, Lee Y-K, Lim B-S, Kim C-W. Effects of various light curing methods on the leachability of uncured substances and hardness of composite resin. *J Oral Rehab* 2004; 31:258-264.
88. Dačić S, Dačić-Simonović D, Živković S, Radičević G, Mitić A, Stanojević I, Veselinović A. SEM analiza kvaliteta ivičnog pripoja kompozitnih ispuna za gled posle primene totalno nagrizajućeg i samonagrizajućeg adhezivnog sistema. *Srp Arh Celok Lek* 2009; 137(9-10):475-481.
89. Dačić S, Radičević G, Dačić-Simonović D, Mitić A, Nikolić M. Ispitivanje demineralizacije oko kompozitnih ispuna zuba. *Acta Stom Naissi* 2009; 59(25):859-868.
90. Cenci MS, Demarco FF, de Carvalko RM: Class II composite resin restorations with two polymerization techniques: relationship between microtensile bond strenght and marginal leakage. *J Dent* 2005; 33:603-610.
91. Prati C, Chersoni S, Suppa P, Breschi L: Resistance of marginal enamel to acid solubility is influenced by restorative systems: an *in vitro* scanning electron microscopic study. *Clin Oral Invest* 2003; 7:86-91.
92. Prati C, Saponara Teutonico A, Breschi L, Marchionni S, Savarino L, Mazzotti G: Artificial marginal caries after the use of self etching and total etching bonding sistem. *J Dent Res* 2002; 81:250.

93. Frankenberger R, Perdigao J, Rosa BT, Lopes M: No bottle vs multy botle dentin adhesives a microtensile bond strength and morphological study. *Dent Mater* 2001; 17:373-80.
94. Rukke M: Dental materials for posterior restorations. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8: 139-148.
95. Seixas LC, Seixas FH, Ciccone JC, Souza WCSS; Palma-Dibb RG: Demineralization around restorations with different restorative materials containing fluoride. *Materials Research* 2003; 2(7):235-240.
96. Elderton R.J: A New Approaches to Cavity Dessign. *Br Dent J* 1984; 157:421-431.
97. Feigal RJ, Quelhas J: Clinical trial of a self-etching adhesives for sealant application: success at 24 months with Prompt-L-Pop. *Am J Dent* 2003; 16(4):249-251.
98. Feilzer AJ, De Gee AJ, Davidsn CL: Setting stress in composite resin in relation to configuration of the restoration. *J Dent Res* 1987; 66:1636-1639.
99. Arends J, Christofferson J: The nathure of early caries lesion in enamel. *J Dent Res* 1986; 76:2-11.
100. Carvalho RM, Pereira JC, Yoshiyama M, Pashley DH: A review of polymerisation contraction: the influence of stress development versus stress relief. *Oper Dent* 1996; 21(1):17-24.
101. Frankenberger R, Tay FR. Self-etch vs etch-and-rinse adhesives: effect of thermo-mechanical fatigue loading on marginal quality of bonded resin composite restoration. *Dent Mater* 2005; 21:397-412.
102. Blunck U, Roulet JF. Effect of one-year water storage on the effectiveness of dentin adhesives in Class V composite resin restorations. *Journal of Dental Research* 81 (Special Issue A) Abstract #0946 p A-139.
103. Dačić S, Dačić Simonović D, Radičević G, Mitić A, Tošić G, Ristić I, Veličković S. Marginal Gap and Alteration of Enamel Around Adhesive Restorations of Teeth (*in vitro* SEM investigation). Dačić S, Dačić Simonović D, Radičević G, Mitić A, Tošić G, Ristić I, Veličković S. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 2011; 28(2):109-118.
104. Dačić S, Dačić-Simonović D, Radičević G. Otpornost kondicionirane gleđi na dejstvo kariogenih rastvora. *Srp Arh Celok Lek* 2008; 136(7-8):361-366.
105. Dačić S. Ispitivanje otpornosti marginalne gleđi na kariogeni rastvor u zavisnosti od restaurativnih sistema kaviteta V klase. Magistarska teza. 2007. Niš.
106. Degrange M, Roulet JF. Minimally Invasive Restorations With Bonding. Chicago, Berlin, London, Tokyo, Moscow, Prague, Warsaw. Quintessence Publishing Co, Inc: 1997. p.31-61.
107. Dietschi D. Adhesive metal free restorations. Chicago, Berlin, london, Tokyo, Sao Paolo, Mosvow, Prague and Waersaw: Quintessence Publishing Co, Inc: 1999. p.49-57,79-120.
108. Donovan TE, Becker W, Brodine AH et al. Annual review of selected dental literature: Report of the Committee on Scientific Investigation of the American Academy of Restorative Dentistry. *J Prosth Dent* 2008; 2(100):110-141.
109. Stansbury JW Curing dental resins and composites by photopolymeriyation, *Journal of Esthetic Dentistry* 2000; 12:300-308.
110. Yap AUJ, Saw TY, Cao T, Ng MML Composite cure and pulp-cell cytotoxicity associated with LED curing lights, *Operative Dentistry* 2004; 29:92-99.

111. Schedle A, Frany A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Bolty-Nitulescu G. Cytotoxic effects of dental composites adhesive substances compomer and cements, *Dental Materials* 1998; 14:249-440.
112. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair (principles, applications, and limitations) *Molecular Biology* 2004; 26:249-261.
113. Djelić N, Spremo-Potparević B, Bajić V, Djelić D. Sister chromatid exchange and micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with thyroxine *in vitro*. *Mutation Research* 2006; 604(1-2):1-7.
114. Djelić N, Djelić D, Spremo-Potparević B, Živković L, Marković B. Lozanče O, Blagojević M. Lack of clastogenic effects of L-thyroxine in whole-blood cultured human lymphocytes. *Genetics and Molecular Biology* 2007; 30(4):1144-1149.
115. Price RBT, Felix CA, Andreou P (2003) Evaluation of the second generation of LED curing light. *Journal of the Canadian Dental Association* 2003; 69:666-671.
116. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C et al. Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium. Trypan blue versus TUNEL technique. *British Journal of Ophthalmology* 2002; 86(3)306-310.
117. Kawahara T, Nomura Y, Tanaka N, Teshima W, Okazaki M, Shintani H. Leachability of plasticizer and residual monomer from commercial temporary restorative resins. *Journal of Dentistry* 2004; 32(4)277-283.
118. Geutsern W. Biocompatibility of resin modified filling materials *Critical Review of Oral Biology, Medicine* 2000; 11(3)333-335.
119. Trujilo M, Newman SM, Stansbury JW. Use of near IR to monitor the influence of external heating on dental composite photopolymerization. *Dental Materials* 2004; 20(8):766-777.
120. Knezevic A, Tarle Z, Menigia A, Sutalo J, Pichler G, Ristic M. Degree of conversion and temperature rise during polymerization of composite resin samples with blue diodes. *Journal of Oral Rehabilitation* 2001; 28(6):586-591.
121. Dickens SH, Stansbury JW, Choi KM, Floyd CJE. Photopolymerization kinetics of methacrylate dental resins. *Macromolecules* 2003; 36(16):6043-6053.
122. Imazato S, McCabe JF, Tarumi H, Ehara A, Ebisu S. Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. *Dental Materials* 2001; 17(2):178-183).
123. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effect of dentin bonding components on mouse fibroblast. *Journal of dental Research* 1995; 74(9):1602-1606.
124. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X et al. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomer and cements. *Dental Materials* 1998; 14(6):429-440.
125. Bouillaguet S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC, Krejci I. Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. *Journal of Oral Rehabilitations* 2002; 29(1)7-13.
126. Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, Sullivan IO. *In vitro* cytotoxicity of a composite resin and compomer. *International Endodontic Journal* 2002; 35(1):47-55.
127. Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H. The *in vitro* cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dental Materials* 2001; 17(4):333-339.

128. Hofman N, renner J, Hugo B, Klaiber B. Elution of leachable components from resin composites after plasma arc vs standard or soft start halogen light irradiation. *Journal of Dentistry* 2002; 30(6):223-232.
129. Souza Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC – 23. *Dental Materials* 1999; (15):434-441.
130. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Staw SE. Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin bonding agents *in vitro*. *J Endod* 1992; 18:589-596.
131. Hanks CT, Staw SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 1991; 70:1450-1455.
132. Hashimoto M, Kaga M, Oguchi H. Cellular response to dentin-bonding composite resins with dentin disks using the agar overlay method. *Pediatric Dent J* 1997; 7:103-107.
133. Araujo FB, Barata JS, Costa CAS, Garcia-Godoy F. Clinical, radiographical and histopathological analysis of primary teeth submitted to direct pulp capping with an adhesive system. *Am J Dent* 1998; 65:169-176.
134. Cox CF, Keall CL, Keal HJ, Ostro E, Bergenholtz G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed dental pulps. *J Prosthet Dent* 1987; 57:1-8.
135. Akimoto N, Momoy, Kolno A, Suzuki S, Cox CF. Biocompatibility of clearfill liner bond 2 and clearfill AP-X system on nonexposed and exposed primate teeth. *Quint int* 1998; 29:177-188.
136. Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed SA. Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *J Oral Pathol* 1982; 11:439-450.
137. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent* 1999; 25(10):676-682.
138. Pereira JC, Segala AD, Costa CAS. Human pulp response to direct pulp capping with an adhesive system. Histologic study. *J Dent Res* 1997; 67:180 Abstr. No.1329.
139. Nascimento ABL, Fontana U, Costa CAS. Histologic evaluation of human dental pulp in direct contact with different materials. *J Dent Res* 1998; 77Abstr. No.466.
140. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 1995; 74:1602-1606.
141. MacDougall M, Selden JK, Nydegger JR, Carnes DL. Immortalized mouse odontoblast cell line MO6-G3 application for *in vitro* biocompatibility testing. *Am J Dent* 1998; 10:11-16.
142. Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. *In vitro* synergistic, antagonistic and duration of exposure effects of metal cations on eukaryotic cells. *J Biomed Mater Res* 1992; 26:1297-1309.
143. Tsutsui T, Tamura Y, Yagi E, Hasegava K, Barret JC. Cell-transforming and genotoxic activities of bisphenol-A. *J Dent Res* 1998; 77:640. Abstr. No.466.
144. Heil J, Reiffeisheid G, Waldmann, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutation res* 1996; 368:181-194.
145. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holtz J. *In vitro* cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod* 1996; 22:244-248.
146. Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res* 1995; 5:1162-1167.

147. Elia MC, Storer RD, McKelvey TW, 1994, Rapid DNA degradation in primary rat hepatocytes treated with diverse cytotoxic chemicals: analysis by pulsed field gel electrophoresis and implications for alkaline elution assays. *Environ Mol Mutagen* 1994; 24:181-91
148. Anderson D, Yu T-W, McGregor DB. Comet assay responses as indicators of carcinogenic exposure. *Mutagenesis* 1998; 13:539-55.
149. Olive PL, Banath JP, Durand RE, 1990, Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using Comet assay. *Radiat Res* 1990; 122:86-94.
150. Lehman N, Debret R, Romeas A et al. Self etching Increases Matrix Metalloproteinase Expression in the Dentin - Pulp Complex. *A Assoc Dent Res*, 2009;1 (88):77-82.
151. Osorio R, Yamanti M, Osorio E. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *European Journal of Oral Sciences*. 2011;1(119):79-85.

ULOGA SVETLOSNO POLIMERIZUJUĆIH I ADHEZIVNIH TEHNIKA U PROCENI MARGINALNE ADAPTACIJE KOMPOZITNIH SMOLA ZA GLEĐ I DENTIN

SAŽETAK

Uvod Kvalitet veze kompozita za tvrda zubna tkiva se najčešće procenjuje jačinom vezivanja ili odsustvom marginalne pukotine po obodu restauracija. Marginalni indeks (MI) je značajan pokazatelj efikasnosti pripoja materijala za zubna tkiva jer, u isto vreme, pokazuje vrednosti i širine i dužine marginalne pukotine.

Cilj ovog rada je bio da se kvantitativno i kvalitativno proceni veza kompozitnih smola za gleđ i dentin i utvrde vrednosti MI u gleđi i dentinu, nakon primene dve tehnike fotopolimerizacije kompozita i dva adhezivno-kompozitna sistema. Takođe je ispitivan uticaj dužine fotopolimerizacije na genotoksičnost kompozitnih adheziva.

Materijal i metod Pripremljeno je i restaurisano 40 kaviteta V klase za skening elektron mikroskopsku (SEM) analizu pripoja kompozita za gleđ i dentin. Adhezija za gleđ i dentin je obezbeđivana primenom totalno nagrizaćeg - *etch and rinse* postupka (adheziv *Adper Single Bond 2-ASB/3M ESPE*) odnosno primenom samonagrizaćeg prajmer/adheziva (*Adper Easy One-AEO/3M ESPE*). Fotopolimerizacija kompozitne smole (Filtek Ultimate-3M ESPE) vršena je standardnim halogenim svetlom ili postepeno uz korišćenje soft start programa.

Genocitotoksičnost adheziva je ispitivana Komet testom.

Rezultati Najmanji prosečni MI gleđi utvrđen je kod postepenog ili *soft start* osvetljavanja i primene ASB/FU materijala. Kvalitativna analiza pripoja kompozitnih smola za gleđ pokazala je bolju marginalnu adaptaciju kompozitnih restauracija za gleđ nakon primene *etch and rinse* adhezivne tehnike i postepenog osvetljavanja u odnosu na *self etch* tehniku, i standardnu fotoaktivaciju.

Kod dentina nisu utvrđene značajne razlike u pripoju kompozitnih restauracija za dentinsko tkivo u odnosu na tehniku osvetljavanja ali su utvrđene značajne razlike u odnosu na vrstu adhezivno kompozitnog materijala (adhezivnu tehniku). I kod dentina je uočen bolji kvalitet pripoja kompozita primenom *etch and rinse* adhezivne tehnike, bez obzira na tehniku osvetljavanja.

Komet testom je utvrđena značajno manja genotoksičnost adheziva nakon njihove fotoaktivacije u trajanju od 40 sekundi, u odnosu na fotoaktivaciju od 10 sekundi.

Zaključak Najbolji marginalni pripoj kompozita (najmanji MI) za gleđ obezbeđen je primenom postepene- *soft start* fotoaktivacije, kod *etch and rinse* adhezivne tehnike i ASB/FU materijala. Najbolji marginalni pripoj kompozita (najmanji MI) za dentin utvrđen je, takođe, kod *etch and rinse* adhezivne tehnike i istog materijala, bez obzira na tehniku fotopolimerizacije. Duža fotoaktivacija adheziva (40 sek), u odnosu na preporuke proizvođača (10 sek), doprinosi smanjenju njihove genotoksičnosti.

Ključne reči: kompozitne smole, adhezivi, gleđ, dentin, fotoaktivacija, genotoksičnost.

THE IMPACT OF LIGHT CURING AND ADHESIVE TECHNIQUE ON MARGINAL ADAPTATION OF COMPOSITE RESINS TO ENAMEL AND DENTIN

ABSTRACT

Introduction The quality of bond between composite and hard dental tissue is most commonly estimated on the basis of strength of bond or absence of marginal gap along restoration border. Marginal index (MI) is a significant indicator of the efficiency of the bond between material and dental tissue because it also shows the values of width and length of marginal gap.

The aim of this paper was to estimate quantitative and qualitative features of the bond between composite resin and enamel and dentin, and to determine the values of MI in enamel after application of two techniques of photopolymerization of composite and two composite adhesive systems. Also, the impact of longevity of photopolimerization on genotoxicity of composite adhesives has been investigated.

Material and methods Forty Class V cavities were prepared and restored for scanning electron microscope (SEM) analysis of composite bonding to enamel and dentin. Adhesion to enamel and dentin was secured by etch and rinse procedure (adhesive-Adper Single Bond 2-ASB/3M ESPE), i.e. by self etch primer/adhesive (Adper Easy One-AEO/3M ESPE). Photopolymerization of composite resin (Filtek Ultimate-3M ESPE) was performed using standard halogen light or gradually, using soft start program. Genotoxyciti of adhesives was invastigated using Comet assay.

Results The smallest average MI was determined with gradual light curing and application of ASB/FU material. Qualitative analysis showed better marginal adaptation after application of etch and rinse adhesive technique and gradual light curing, compared to self etch adhesive technique and standard photoactivation.

Dentin did not show significant differences in the bond between composite restorations and dentine tissue compared to light curing technique but significant difference were determined with respect to the type of adhesive composite material (adhesive technique). Dentin also

showed a better quality of the composite bond with etch and rinse adhesive technique, regardless of light curing technique.

Using Comet assay it was concluded that significant lower genotoxicity showed both adhesives after photopolymerization in duration of 40 seconds compared to 10 seconds.

Conclusion The best marginal adaptation of composite (lowest MI) to enamel and dentin was obtained with gradual soft start photoactivation in etch and rinse adhesive technique and ASB/FU material. The best marginal adaptation of composite (lowest MI) for dentin was also determined with etch and rinse adhesive technique and the same material, regardless of photopolymerization technique. Longer duration (40 sek) of photoactivation of adhesives in regard to recommendations of manufactures (10 sek.) contributes to lowering of their genocitotoxicity.

Key words: composite resin, adhesives, enamel, dentin, photoactivation, genotoxycity

Ime i prezime

STEFAN DAČIĆ

Profesija

Doktor stomatologije

Adresa

Maksima Gorkog 8/35

18000 Niš

Srbija

E-mail: stefandacic1978@yahoo.com

Mesto i datum rođenja

Niš, 01. 5. 1978

Obrazovanje

1997. Gimnazija Svetozar Marković u Nišu

2004. Medicinski fakultet u Nišu – Odsek stomatologija (prosečna ocena 9.11)

Učešće na studentskim kongresima

Učestvovao na 42. kongresu studenata medicine i stomatologije Jugoslavije sa međunarodnim učešćem, 17-21. aprila 2001. godine – Lepenski Vir, Vasić, A., Dačić, S.: Adhesivness of dental materials

Aktivnost na profesionalnom planu

Demonstrator na predmetu Bolesti zuba – pretklinika, školske 2002/2003. i 2003/2004.

Radio kao asistent pripravnik na Medicinskom fakultetu – Priština sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici na predmetu Bolesti zuba – pretklinika, od 1. 2. 2005. do 13. 2. 2006.

Radio na Stomatoloskoj klinici u Nišu kao doktor stomatologije na odeljenju Dečija i preventivna stomatologija, od 21. 2. 2006. do 1. 11. 2006.

Zapošljen na Medicinskom fakultetu u Nišu kao saradnik u nastavi na predmetu Bolesti zuba - predklinika od 1. 11. 2006. godine.

Odbranio magistarsku tezu, dana 5. 12. 2007. godine, pod naslovom: „Ispitivanje otpornosti marginalne gleđi na kariogeni rastvor u zavisnosti od restaurativnih sistema kaviteta V klase”. U okviru stručnog usavršavanja, radio na odeljenju Bolesti zuba i endodoncija Stomatološkog fakulteta u Beogradu, od 01. 08. 2009. do 01. 11. 2009. godine.

Položio specijalistički ispit iz Bolesti zuba i endodoncije 09. 07. 2010. god. sa ocenom odličan i time stekao stručni naziv specijaliste Bolesti zuba i endodoncije.

Izabran 31.10.2011. u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Bolesti zuba i endodoncija.

Z a h v a l n o s t

Prof. dr Radičević Goranu,

Najtoplije zahvaljujem na višegodišnjoj podršci istraživanjima marginalnog pripoja kompozitnih restauracija za zubna tkiva, doprinosu analizi rezultata i završnom doterivanju verzije rukopisa doktorata.

Prof. dr Živković Slavoljubu,

Dugujem iskrenu zahvalnost i divljenje njegovoj dobroj volji i ogromnoj energiji da nesebično pomogne tok i završetak ove doktorske teze uz kritičku reviziju rukopisa, analizu i tumačenje rezultata.

Prof. dr Đelić Ninoslavu,

Neizmerno sam zahvalan za ogromnu pomoć u ispitivanju genocitotoksičnosti adhezivnih smola kao i približavanju oblasti genetike ispitivanjima dentalnih materijala, obzirom da bez njegove pomoći ne bih mogao da sprovedem ovakvo ispitivanje.

Inženjeru arhitekture Dačić Milošu,

Dugujem bratsku zahvalnost na pomoći oko korišćenja Autodesk AutoCAD softvera i dobijanju rezultata.

Zahvaljujem inženjeru elektronike Miroslavu Miljkoviću za tehničku pomoć oko SEM, kao i osoblju Instituta za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Restaurativni materijali koji su korišćeni u ovom istraživanju su donirani ljubaznošću predstavništva 3M ESPE u Beogradu i njihovog saradnika Dr Milana Vladislavljevića.

