



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Radomir G. Barac

**UTICAJ BEZALKOHOLNIH I
ALKOHOLNIH PIĆA NA HUMANU GLEĐ I
ULOGA DENTALNE PELIKULE U ZAŠTITI
GLEĐI OD EROZIJE: *IN VITRO* STUDIJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Radomir G. Barac

**THE INFLUENCE OF SOFT AND
ALCOHOLIC DRINKS ON HUMAN
ENAMEL AND THE PROTECTIVE ROLE
OF DENTAL PELLICLE AGAINST ENAMEL
EROSION: AN *IN VITRO* STUDY**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2021.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Prof. dr Jovanka Gašić, redovni profesor u penziji, Medicinski fakultet Univerzitet u Nišu

Naslov: Uticaj bezalkoholnih i alkoholnih pića na humanu gleđ i uloga dentalne pelikule u zaštiti gleđi od erozije: *in vitro* studija

Rezime: Cilj ove studije je bio da se proceni erozivni potencijal 14 napitaka: 11 bezalkoholnih (pet gaziranih, od toga dva energetska), šest negaziranih (dva voćna soka, dva sportska i dva čaja) i tri alkoholna pića (pivo, crveno i belo vino) i ustanovi doprinos pojedinih komponenti dentalne pelikule u zaštiti gleđi od erozivnog oštećenja. Erozivni potencijal je određivan merenjem pH i titrabilne kiselosti (TK). Guarana i Schweppes su imali najniže izmerene inicijalne vrednosti pH, a najviše sok od narandže i aronije. Coca-Cola je pokazala najnižu, dok je sok od narandže imao najvišu TK. Hrapavost erodovanih gleđnih površina je ispitivana analizom parametara hrapavosti na uzorcima gleđi koji su potapani u napitke tri puta dnevno u trajanju od 15, 30 i 60. minuta tokom 10 dana. Najintenzivniju eroziju gleđne površine pokazali su uzorci potopljani u Red Bull u vremenskoj izloženosti od 15, u sok od narandže od 30 i u Coca-Cola napitku od 60 minuta. Zeleni i crni čaj nisu uzrokovali erozivne promene. Morfologija gleđne površine je analizirana skening elektronskom mikroskopijom (SEM) prema scor-skali od 0-3. Najveću prosečnu ocenu su pokazali uzorci izloženi Red Bull-u, a najmanju zelenom čaju. Ultrastrukturne promene na gleđnoj površini su uglavnom pratile parametre hrapavosti. Međutim, ni ultrastrukturne promene, ni parametri hrapavosti, nisu bili uvek usaglašeni sa vrednostima pH i TK, ukazujući na složenije mehanizme nastanka erozije. U cilju ispitivanja zaštite gleđi od erozije pripremljene su četiri vrste pljuvačke: humana stimulisana pljuvačka (skupljena od zdravih donora), veštačka pljuvačka i dve dijalizovane pljuvačke, od kojih jedna sadrži salivarne proteine i jone, a druga samo salivarne proteine bez jona. Uzorci gleđi su imali četiri ciklusa potapanja u određenu pljuvačku, a zatim u limunsku kiselinu u trajanju od tri minuta. Nakon analize parametara hrapavosti dobijenih mikroskopom atomskih sila (MAS), zaključeno je da pelikula formirana od pljuvačnih proteina bez pljuvačnih jona pruža najbolju zaštitu od erozije.

Naučna oblast: Stomatologija
Naučna disciplina: Bolesti zuba

Ključne reči: Gleđna erozija, alkoholna i bezalkoholna pića, pH i TK, površinska hrapavost, SEM, MAS

UDK: **616.314.14:663.2/.8(043.3)**

CERIF
klasifikacija: **B730**

Tip licence
Kreativne
zajednice:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Jovanka Gašić, MD, PhD, Retired Professor, Medical Faculty, University of Niš
Title:	The influence of soft and alcoholic drinks on human enamel and the protective role of dental pellicle against enamel erosion: an <i>in vitro</i> study
Abstract:	<p>This research aimed to estimate the erosive potential of 14 beverages – 11 nonalcoholic drinks (five carbonated beverages, two of which were energy drinks), six soft drinks (two types of fruit juice, two sports drinks and two types of tea) and three alcoholic beverages (beer, red wine and white wine) – and to determine the extent to which certain components of the dental pellicle contributed to the protection of the enamel against the erosive damage.</p> <p>The erosive potential was determined by measuring the pH and titratable acidity (TA). Guarana and Schweppes demonstrated the lowest initial pH values, whereas the orange juice and the aronia juice had the highest ones. Coca-Cola had the lowest value of the TA while the orange juice had the highest TA value.</p> <p>The roughness of the eroded enamel surfaces was examined by the analysis of the roughness parameters on the enamel samples dipped in the beverages three times a day for 15, 30 and 60 minutes throughout the period of 10 days. The most intensive enamel erosion was observed in the following samples: those immersed in Red Bull for 15 minutes, the ones immersed in the orange juice for 30 minutes and the samples immersed in Coca-Cola for 60 minutes. Green and black tea did not cause any erosive changes.</p> <p>The enamel surface morphology was analysed by means of the scanning electron microscope (SEM) according to the score-scale from 0 to 3. The samples dipped in Red Bull had the highest average grade, while those immersed in green tea had the lowest one. The SEM changes on the enamel surface were generally accompanied by the roughness parameters, but the profilometric parameters and morphological changes were not always consistent with the pH and TA, which implied more complex mechanisms involved in the development of erosion.</p> <p>Four types of saliva were prepared to examine the protection of enamel from erosion: the human stimulated saliva (collected from healthy donors), artificial saliva and two types of dialysed saliva, one of which contained salivary proteins and ions while the other one had only salivary proteins without ions. The enamel samples were first immersed in a particular saliva four times and then in the citric acid for three minutes. After analyzing the roughness parameters obtained by the atomic force microscope (AFM), it was concluded that the pellicle formed from salivary proteins without saliva ions provides the best protection against erosion.</p>
Scientific Field:	Dentistry

Scientific
Discipline:

Restorative dentistry

Key Words:

Enamel erosion, soft and alcoholic drinks, pH and TA, surface-roughness, SEM, AFM

UDC:

616.314.14:663.2/.8(043.3)

CERIF
Classification:

B730

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

ZAHVALNICA

Podrška i pomoć su neizostavni u rešavanju svih životnih pitanja. Zato svi ljudi teže da stvore mrežu koju sačinjavaju članovi porodice, prijatelji, kolege na koje se mogu u svakom trenutku osloniti.

Ponosan sam na činjenicu da mogu da popunim stranu sa posvetom i zahvalnicom, ona ne govori samo o ljudima koji su mi podrška, već o meni. Zahvalan sam onim ljudima koji su mi svojim stručnim savetima i dobronamernim kritikama pomogli da postavim i predstavim osnovne zamisli dugogodišnjeg rada.

Pre svih, posebnu zahvalnost na podršci, sugestijama, savetima i danonoćnom zajedničkom radu dugujem mojoj mentorki, prof. dr Jovanki Gašić. Zahvalan sam joj što nije žalila trud i vreme, od početka istraživanja pa do njegovog kraja, davala dragocene i konstruktivne smernice, usmeravala moje naučne ideje i doprinela uspešnom okončanju istraživanja i konačnoj realizaciji doktorske disertacije.

U izradi doktorske disertacije veliku podršku svojim znanjem, sugestijama i savetima pružili su mi prof. dr Ivana Stojanović, prof. dr Dušanka Kitić, prof. dr Goran Radenković sa Medicinskog fakulteta u Nišu i prof. dr Slavoljub Živković sa Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

Zahvaljujem se prof. dr Goranu Radenkoviću sa Mašinskog fakulteta u Nišu, dr Dani Vasiljević-Radović sa Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu, kao i Slavoljubu Živanoviću, Miroslavu Miljkoviću i Marku Deniću sa Medicinskog fakulteta u Nišu na nesebičnoj pomoći u laboratorijskom i eksperimentalnom radu na čemu sam im neizmerno zahvalan.

U obradi statističkih podataka pomogo mi je Mile Ranđelović sa Univerziteta u Nišu, kao i prof. dr Vesna Milić Janković sa Ekonomskog fakulteta u Nišu i na tome sam im zahvalan.

Takođe, ne manju zahvalnost dugujem prof. dr Aleksandru Mitiću kao i kompletnom kolektivu Odeljenja za bolesti zuba i endodonciju na podršci, pomoći i saradnji.

I na kraju svestan njihovog doprinosa, a u nadi da će uspeti sami sebe da prepoznaju, neizmerno se zahvaljujem svojoj porodici, brojnim prijateljima, kolegama i studentima na podršci tokom izrade doktorske disertacije i pomoći u realizaciji eksperimentalnog istraživanja.

Posebno sam zahvalan mojoj majci na bezgraničnoj ljubavi i podršci kako u izradi doktorske disertacije, tako i u rešavanju životnih problema. Pokojnom ocu Goranu želim da posvetim doktorsku disertaciju, za nesebičnu ljubav i istrajnost u obavljanju najtežeg posla u životu – roditeljstva.

Doktorska disertacija je deo rezultata projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije“ br. III 41018, kao i internog projekta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu „Kliničko i eksperimentalno ispitivanje stomatognatog sistema i savremenih terapijskih procedura“ br. 1114629-4/11.

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Definicija pojmova „erozija zuba” i „erozivno trošenje zuba”	3
2.2. Savremeni koncept erozivnog oštećenja gleđi	3
2.3. Dentalna erozija i ishrana	6
2.3.1. pH rastvora	6
2.3.2. Tip kiseline	7
2.3.3. Puferska svojstva erozivnih supstanci	9
2.3.4. Koncentracija kalcijuma, fosfata i fluorida	10
2.3.5. Adhezivnost.....	11
2.3.6. Temperatura erozivne supstance	11
2.3.7. Viskoznost.....	12
2.4. Klasifikacija napitaka	12
2.4.1. Vrste bezalkoholnih pića	13
2.4.2. Alkoholna pića	15
2.4.3. Čajevi	16
2.5. Faktori koji zavise od pacijenta	17
2.5.1. Struktura tvrdih zubnih tkiva - gleđi	17
2.5.2. Potencijal pljuvačke u zaštiti od dentalne erozije	19
2.5.3. Dentalna pelikula i erozija.....	21
2.5.4. Navike konzumiranja erozivnih supstanci (napitaka)	24
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	26
4. MATERIJAL I METODE	27
4.1. Ispitivanje erozivnog potencijala bezalkoholnih i alkoholnih napitaka	27
4.1.1. Ispitivana pića	27
4.1.2. Određivanje inicijalne pH vrednosti pića i titrabilne kiselosti	29
4.2. Ispitivanje hrapavosti i morfoloških karakteristika gleđne površine nakon izlaganja ispitivanim pićima u funkciji vremena	29
4.2.1. Uzorci gleđi	29
4.2.2. Priprema uzoraka gleđi za profilometrijsku analizu posle izlaganja erozivnim rastvorima u različitom vremenskom trajanju.....	30
4.2.3. Statistička obrada podataka	31
4.2.4. Priprema uzoraka gleđi za skening elektron mikroskopsku analizu posle izlaganja erozivnim rastvorima.....	32
4.2.5. Statistička obrada podataka	33

4.3. Ispitivanje uticaja različitih komponenti pljuvačke na zaštitni potencijal pelikule od erozivnog oštećenja gleđi	34
4.3.1. Uzorci pljuvačke	34
4.3.2. Priprema uzoraka pljuvačke dijalizom ukupne stimulisane pljuvačke	34
4.3.3. Priprema uzoraka gleđi za inkubacione rastvove i erozivni izazov limunskom kiselinom i njihova analiza mikroskopom atomskih sila	35
4.3.4. Institucije u kojima je obavljeno istraživanje.....	37
5. REZULTATI	38
5.1. Rezultati merenja pH i TK.....	38
5.2. Rezultati merenja parametara hrapavosti erodovanih gleđnih površina stylus profilometrom.....	39
5.3. Rezultati SEM istraživanja	57
5.4. Rezultati merenja parametara hrapavosti erodovanih gleđnih površina posmatranjem pod MAS.....	70
6. DISKUSIJA.....	78
6.1. Diskusija rezultata ispitivanja erozivnog potencijala bezalkoholnih i alkoholnih napitaka.....	78
6.2. Diskusija rezultata ispitivanja hrapavosti gleđne površine nakon izlaganja uzoraka bezalkoholnim i alkoholnim pićima u funkciji vremena	80
6.3. Diskusija rezultata ispitivanja morfoloških karakteristika gleđne površine nakon izlaganja uzoraka bezalkoholnim i alkoholnim pićima	89
6.4. Diskusija rezultata ispitivanja uticaja različitih komponenti pljuvačke na zaštitni potencijal pelikule od erozivnog oštećenja gleđi.....	92
7. ZAKLJUČCI	98
8. LITERATURA	101
BIOGRAFIJA AUTORA	116

1. UVOD

Dentalna erozija, koja podrazumeva demineralizaciju zuba bez učešća bakterija, tokom poslednjih godina postaje pravi izazov i za istraživače i za kliničare. Ovu činjenicu potkrepljuju ne samo izveštaji iz stomatoloških ordinacija, već i veliki broj akademskih publikacija na tu temu. Dok je sedamdesetih godina prošlog veka svake godine objavljivano manje od pet studija, od 2000. godine taj broj progresivno raste i, u poslednje vreme, savremena literatura o erozivnom oštećenju zuba broji gotovo sto publikacija godišnje [1]. Ovaj upečatljiv broj radova na temu erozivnog oštećenja zuba u savremenoj literaturi odražava vidan pad pojave karijesne demineralizacije, što je omogućilo da erozija dobije na značaju.

Ipak, svest o erozijama zuba od strane šire populacije još uvek nije na dovoljno visokom nivou. Na primer, jedna od epidemioloških studija je pokazala da visok procenat anketirane dece smatra da je redovno pranje zuba najbolja zaštita od erozije. Ovo jasno ukazuje na nedostatak pravih informacija i zamenu važnih pojmova [2]. Za većinu stanovništva, erozivne promene zuba u ranim fazama su samo kozmetički problem [1]. Takođe, kliničari su često zbunjeni znacima i simptomima erozije, kao i njenim sličnostima i razlikama u odnosu na druge oblike trošenja zuba - abraziju, atriciju i abfrakciju. Ova činjenica opravdava termin *erozivno trošenje zuba* koji podrazumeva demineralizaciju zubne supstance kiselinama i sledstveni gubitak površinskog tkiva, kao rezultat istovremenog i/ili naknadnog izlaganja mehaničkim silama [1,3,4].

Kisele supstance koje su odgovorne za eroziju zuba mogu imati interno ili eksterno poreklo, ili oba istovremeno. Najčešći spoljašnji faktori dentalne erozije su: voćni sokovi, gazirana pića, sportski i energetske napici [5–8] čija se potrošnja naglo povećala poslednjih decenija. Prema najnovijoj internet bazi podataka, vodeći potrošači bezalkoholnih (naročito gaziranih) napitaka su Sjedinjene Američke Države sa 154 litara godišnje potrošnje po stanovniku. U Evropi, vodeće zemlje u potrošnji bezalkoholnih pića su Belgija sa 109, koju slede Nemačka i Norveška sa po 98 litara godišnje potrošnje po glavi stanovnika. Podaci iz akademske literature ukazuju da je Evropa vodeći potrošač energetskih napitaka, dok su u SAD najpopularnija sportska pića [3].

Erozivno dejstvo može imati i kisela hrana, kao i kiseli dodaci u ishrani (kiselo voće, ukišeljeno povrće, prelive za salate, kisele bombone, tablete vitamina C za žvakanje itd.) [5,9]. Osim što se može javiti kod hroničnih alkoholičara, zubna erozija može predstavljati problem kod osoba koje se bave degustacijom vina, jer prolongirani kontakt kiselog pića i gleđi može rezultirati njenim oštećenjem [10,11].

Kod endogenih erozija osnovni razlozi za dospevanje želudačne kiseline u usnu duplju su: gastroezofagealni refluksna bolest (GERB) [12,13], vomitus u toku trudnoće, bulimija, anoreksija nervosa, kserostomija i malapsorcioni sindrom [14,15].

U procesu rastvaranja gleđi učestvuju hemijski faktori: pH, puferi, kapacitet, titrabilna kiselost, kao i koncentracija kalcijuma, fosfata i fluorida u pićima i hrani [16,17]. U ovom radu, u cilju razumevanja hemijskog aspekta erozivnog oštećenja, u poglavlju *Pregled literature* biće objašnjeni neki pojmovi koji su važni za nastanak i razvoj erozivnog oštećenja, a na kojima insistira savremena literatura [3,16,18]. Ovo se odnosi na činjenicu da ne postoji fiksna kritična pH vrednost za eroziju zuba kao za karijes, već se ona mora izračunati na osnovu koncentracije kalcijuma i fosfata iz erozivnog rastvora [1,5,19]. Dalje, erozivni rastvori, osim uklanjanja površinskog sloja gleđi, utiču na rastvaranje minerala i unutar omekšanog sloja - ispod površine („*near surface demineralization*”), slično kao kod razvoja karijesnog procesa [1,16]. S druge strane, kada se radi o fizičkim parametrima koji utiču na procese demineralizacije, ističe se značaj polu-statičkog sloja rastvora u neposrednoj okolini gleđne površine koji se naziva *Nernst-ov* sloj. Mučkanje ili zadržavanje pića u ustima obično uzrokuje veću eroziju, jer se ovaj sloj kontinuirano obnavlja i ne dostiže zasićenost koja bi usporila ili sprečila eroziju [3,20].

Podaci iz literature ukazuju da dentalna pelikula može delimično da zaštiti površinu gleđi od promena nastalih izlaganjem kiselinama [21,22]. Osim što je preventivni potencijal salivarne pelikule ograničen, on individualno varira, pri čemu sastav pelikule igra važnu ulogu u ovoj varijabilnosti [23,24]. Poglavlje *Pregled literature* pruža informacije o fizičkim svojstvima dentalne pelikule, kao i o njenom sastavu, ukazujući da još uvek postoji određena polemika o uticaju različitih komponenti pelikule (pljuvačnih jona i/ili proteina) na erozivnu demineralizaciju [20,25–27].

Ovo istraživanje je realizovano sa ciljem da se proceni erozivni potencijal različitih napitaka, koja su često sastavni deo svakodnevne ishrane, pri čemu, neka od njih konzumiraju osobe gotovo svih generacija. Pored toga, napravljen je pokušaj da se razjasni doprinos pojedinih komponenti dentalne pelikule u zaštiti gleđi od erozivnog oštećenja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Definicija pojmova „erozija zuba” i „erozivno trošenje zuba”

„Erozija zuba” i „erozivno trošenje zuba” su termini koji se koriste u vezi uticaja kiselina na zubnu površinu. Najcitiranija definicija erozije zuba je Imfield-ova (1996), koja podrazumeva patološko, hronično i ireverzibilno rastvaranje tvrdih zubnih tkiva izazvano kiselinama nebakterijskog porekla [28]. Ovo oboljenje se u potpunosti razlikuje od karijesa i po etiologiji i po objektivnom nalazu. Ukoliko prvo usledi „napad” kiselom supstancom, dolazi do gubitka strukturnog integriteta i pojave razmekšanog sloja na zubnoj površini koja postaje osetljiva na dejstvo abrazivnih sila [19,29]. Ove abrazivne sile ukloniće razmekšani sloj sa gleđi, uzrokujući gubitak čvrste supstance, dok njihov uticaj na zdravu površinu zuba neće imati veliki značaj [30]. Gubitak čvrstog zubnog tkiva može uslediti i bez značajnijeg oštećenja abrazijom, a slučajevi dugotrajnog ponavljanja erozivnih izazova (na pr. GERB, hronično povraćanje i sl.) mogu rezultirati erozijom zuba. S druge strane, dostupni dokazi sugerišu da su erozivni izazovi *in vivo* kratki i da sama erozija verovatno neće biti direktan uzrok gubitka zubne površine. Iz tog razloga, Shellis i sar. su sugerisali da termin „zubna erozija” treba da uključuje ne samo slučajeve početne demineralizacije („razmekšanja”) već i svaki gubitak zubne površine izazvan isključivo produženim izlaganjem kiselinama, dok izraz „erozivno trošenje zuba” treba da podrazumeva uticaj bilo koje mehaničke abrazivne sile posle primarnog dejstva kiselina. Zbog toga bi termin „zubna erozija” trebalo koristiti za hemijske, a „erozivno trošenje zuba” za hemijsko-mehaničke procese [1,4,29].

Iako su kiseli izazovi u eksperimentima zubne erozije često dovoljni da izazovu gubitak tkiva bez uključivanja abrazije, ustanovljeni modeli erozivnog oštećenja zubnog tkiva podrazumevaju i one koje nastaju samo hemijskim kao i one koje nastaju hemijsko-mehaničkim putem [29], bez obzira da li su po tipu jednokratnog (bez remineralizacije) [31,32] ili ciklus-izlaganja (sa naizmeničnim periodima de- i remineralizacije) [7,33,34].

2.2. Savremeni koncept erozivnog oštećenja gleđi

Zubni karijes predstavlja destrukciju tvrdih zubnih tkiva sa posledicama koje se ispoljavaju ne samo na površini, nego i unutar podpovršinske regije. Za razliku od toga, zubna erozija se, do nedavno, definisala samo kao površinski fenomen [35]. Iako se demineralizacija uglavnom dešava na površini zuba, izgleda da je patofiziologija zubne erozije mnogo složenija.

U početku, kada rastvor dospe u usnu šupljinu, mora da „prođe” kroz stečenu gleđnu pelikulu pre nego što uopšte stupi u interakciju sa samom površinom gleđi [16,22]. Difuzijom kroz gleđnu pelikulu, kiseli rastvor stiže na površinu gleđi, gde će joni vodonika (H^+) početi da rastvaraju gleđne kristale. Pod uticajem H^+ prvo se pokreće rastvaranje omotača prizmi, kasnije jezgara prizmi, pri čemu nastaje poznati izgled saća [36]. Osim snažnog uticaja H^+ jona na granici (interfejsu) rastvora i gleđi, Featherstone and Rodgers su 1980-ih ukazali i na važnost nedisosovane (nejonizovane) forme organskih kiselina u karijesnom procesu. Kada su organske kiseline prisutne u rastvoru, tj. pljuvački, deo molekula kiseline će ostati u svom nedisosovanom obliku, dok će drugi deo disosovati prema jednačini:



Tokom formiranja podpovršinske lezije u procesu ranog karijesa, nedisosovani oblik kiseline bi mogao brže prodirati u pore gleđi od disosovanog oblika zbog nedostatka naelektrisanja. Ulazeći u gleđ, nedisosovani molekuli se rastvaraju, pri čemu se obezbeđuje mobilni izvor H^+ jona koji pomaže u održavanju kiselosti sredine koja podržava rastvaranje [37].

Godine 2013., Shellis i sar. su eksperimentalno dokazali da ovi procesi važe i za eroziju. Erozivno rastvaranje se javlja ne samo na spoju (interfejsu) između rastvora i gleđi već i unutar tankog, delimično demineralizovanog omekšanog sloja gleđi. Za ovaj proces predložili su termin „*near-surface demineralization*”. Otuda demineralizacija „u blizini površine” opisuje proces omekšavanja tokom zubne erozije, naglašavajući činjenicu da zubna erozija nije isključivo površinski fenomen, već se javlja i u ograničenom opsegu podpovršinskog omekšanog sloja (nekoliko μm) usled dejstva nedisosovane forme organskih kiselina. Autori su takođe zaključili da ovaj proces prvenstveno zavisi od koncentracije nedisosovanog oblika organske kiseline u porama gleđi, a manje od puferskih osobina same kiseline [38].

Tokom demineralizacije na površini i „*near-surface*” području izlazak jona iz zubnih tvrdih tkiva naknadno će dovesti do lokalnog porasta pH i jona u tečnom sloju u blizini minerala zuba [19]. Ovaj polu-statički sloj rastvora je izuzetno važan u održavanju stabilnosti bliskog okruženja gleđne površine i naziva se „Nernstov sloj”. Veća koncentracija ovih jona u Nernst-ovom sloju povećava stepen zasićenja u neposrednoj blizini gleđne površine i, u trenutku kada postane zasićen, ne dolazi do dalje demineralizacije gleđi. Međutim, na Nernstov sloj, u *in vivo* uslovima, utiču normalni pokreti tokom mastikacije i konzumiranja tečnosti, tako da kontinuirani protok kiselih napitaka preko zuba dovodi do stalnog obnavljanja (zamene) Nernst-ovog sloja, bez mogućnosti dostizanja nivoa zasićenja [39]. Ovaj proces je od posebne važnosti kada je erozivna supstanca slabo zasićena u odnosu na mineral zuba. Ukoliko takve

tip kiseline, puferska svojstva, nivo kalcijuma, fosfata i fluoride, adheziju i druge fizičke faktore), klasifikaciju ciljanih nutritivnih faktora (bezalkoholna, alkoholna pića, čajevi) sa potencijalno erozivnim uticajem na površinu gleđi, faktore koji zavise od pacijenta (predispozicija za eroziju: histološke karakteristike gleđi, uloga pljuvačke i dentalne pelikule), uključujući i faktore koji zavise od navika konzumiranja erozivnih supstanci.

2.3. Dentalna erozija i ishrana

Erozivni potencijal hrane i pića zavisi od njihovog sastava. Analizom mnogih proizvoda utvrđeni su niska pH vrednost i visoka vrednost puferskih svojstava (puferski kapacitet i titrabilna kiselost) kao glavni faktori rizika, a koncentracija kalcijuma kao glavni zaštitni faktor u određivanju erozivnog potencijala [5]. Ne treba procenjivati erozivni potencijal samo na osnovu pH jer ne postoji jedinstvena kritična pH za eroziju, što će u daljem tekstu biti detaljno objašnjeno. Puferska svojstva supstance (određena vrstom kiseline i vrednošću pH) utiču na otpornost proizvoda da se neutrališu pljuvačkom [17,18,38]. Ukoliko erozivna supstanca sadrži neke dodatke, poput lepka, koji se adheriraju za zubnu površinu, može se produžiti erozivni izazov [18,41]. Klinički značajan rizik od erozije postoji: kada su zubna tkiva izložena supstancama sa visokim erozivnim potencijalom, kada je to izlaganje često, i / ili kada se dešava tokom dužeg perioda [42].

2.3.1. pH rastvora

Vrednost pH je pokazatelj inicijalne koncentracije vodonikovih jona u rastvoru, ali ne daje informacije o ukupnoj kiselosti rastvora (pića ili hrane), tj. o prisustvu nedisosovanih kiselina. Iako utiče na stepen zasićenja (određivanjem aktivnosti PO_4^{3-} i OH^- jona), ona predstavlja važan nezavisan faktor rastvaranja [17]. U studijama koje upoređuju raspon pH vrednosti, odnos između demineralizacije i pH može biti linearan [38] ili nelinearan [43,44], u zavisnosti od tehnike merenja koja se koristi za kvantifikovanje stepena demineralizacije. Važno je notirati da ne postoji fiksna „kritična pH” za eroziju, kao što je opisano za karijes, delimično zbog vrlo promenljivog sastava erozivnih rastvora u oralnom okruženju [1,5].

Kritična pH vrednost i erozija zuba. „Kritična pH” je pH vrednost pri kojoj je rastvor zasićen u odnosu na određenu čvrstu supstancu, npr. mineral gleđi. Ukoliko rastvor ima pH ispod kritične vrednosti, smatra se nezasićenim u odnosu na čvrstu supstancu i može izazvati njeno rastvaranje. S druge strane, ukoliko je pH rastvora iznad kritične vrednosti, rastvor je tada

prezasićen u odnosu na čvrstu supstancu i dolazi do taloženja minerala [45]. Kritična pH vrednost zavisi i od rastvorljivosti čvrste supstance (gleđ, dentin) i od koncentracija (ili tačnije od aktivnosti) relevantnih mineralnih sastojaka rastvora. U slučaju zubnih minerala, glavni relevantni sastojci su kalcijum, fosfat i, u manjoj meri, fluorid. Ovi minerali određuju stepen zasićenja rastvora koji će pokrenuti ili rastvaranje ili precipitaciju (taloženje) supstance [5,19].

U odnosu na karijes, tečnost plaka je relevantni „rastvor” za de- i remineralizaciju iz koga se izračunava kritična pH vrednost. Na osnovu prosečnih koncentracija kalcijuma i fosfata, izračunato je da je kritična pH za gleđ - između 5,5 i 5,7. Iako su koncentracije kalcijuma i fosfata prilično konstantne za određenu osobu, one mogu varirati kod različitih ljudi, vršeći uticaj na kritičnu pH, što delimično objašnjava među-individualne razlike u kritičnim pH vrednostima [19].

Po definiciji, erozija zuba je rastvaranje minerala tvrdih zubnih tkiva u odsustvu plaka. Stoga se gore pomenuta kritična pH vrednost (određena iz sastava tečnosti plaka) ne može smatrati pokazateljem nastanka erozije zuba. Relevantan „rastvor” iz koga se može izračunati kritična pH vrednost je sama erozivna supstanca (a ne plak). Tačnije, kritična pH vrednost za zubnu eroziju zavisice od koncentracije relevantnih mineralnih sastojaka u svakom erozivnom rastvoru. Takođe, koncentracija kalcijuma je najvažniji faktor koji određuje kritičnu pH, ali i koncentracije fluorida i fosfata, će imati važnu ulogu. Uzimajući u obzir da će se ove koncentracije razlikovati od rastvora do rastvora i biće različite od onih koje se nalaze u tečnosti plaka, kritična pH za gleđ će, i u slučaju erozije, takođe varirati [1]. Objavljeno je da su kritične vrednosti pH vrednosti (pH_c) u odnosu na hidroksiapatit (za različite potencijalno erozivne supstance) od 3,9 do 6,5. Ipak je važno notirati da će, kada je pH ispod 3,9, rastvor biti nezasićen u odnosu na mineral gleđi. To znači da će se mineral zuba rastvoriti nezavisno od njegove koncentracije fluorida, fosfata ili kalcijuma, pri čemu kalcijum može podešavati brzinu rastvaranja. Zbog toga se smatra da ne postoji fiksna kritična pH vrednost u vezi sa erozijom zuba [1].

2.3.2. Tip kiseline

Erozija zuba nastaje ili pomoću jona vodonika dobijenih iz različitih (jakih ili slabih kiselina) ili anjona koji mogu vezati ili stvoriti komplekse sa kalcijumom. Vodonikov jon napada kristale minerala zuba reagujući sa karbonatnim ili sa fosfatnim jonom, što dovodi do direktnog nagrizanja površine zuba. Na primer, hlorovodonična kiselina (jedina jaka kiselina)

potpuno disosuje na jone vodonika i hlora pri svim pH vrednostima. Na taj način, ona brzo i direktno rastvara i uklanja minerale sa površine zuba, i, ukoliko je prisutna u manjoj količini, erozivni efekat ove kiseline će biti značajno ograničen zbog visokog stepena disocijacije. Hloridni jon ne igra nikakvu ulogu u procesu rastvaranja minerala [16,40,46].

Sve ostale kiseline, potencijalni uzročnici erozivnog oštećenja, su slabe kiseline koje su pri niskim pH vrednostima u nedisosovanom obliku, ali postupno disosuju sa porastom pH. To su kiseline koje se nalaze u hrani i pićima: fosforna (Cola napici), limunska (voće, voćni sokovi, sportska i energetska pića), sirćetna (sirće, prelive za salate, kiseli krastavci), jabučna (jabuke, ananas, grožđe, sok od narandže, belo vino), vinska (grožđe, šampanjac, crveno vino), mlečna (sir, jogurt, crveno vino) i askorbinska kiselina (vitamin C kao dodatak hrani i piću, neka gazirani napici -Sinalco, Izostar itd). Zbog svoje postupne disocijacije, slabe kiseline imaju ulogu pufera i tako se suprotstavljaju promenama pH vrednosti [1,47].

U zavisnosti od toga koliko H^+ jona može da obezbedi jedan molekul kiseline, one se dele na mono (sirćetna i mlečna), di (jabučna i vinska) i triprotonske (fosforna i limunska) kiseline. Tako, na primer, limunska kiselina ima mogućnost da proizvede tri jona vodonika iz svakog molekula koji direktno rastvara gleđne minerale na već opisan način (reakcijom sa karbonatnim ili fosfatnim jonima). Ipak, uticaj limunske kiseline na gleđnu površinu je mnogo složeniji. Osim vodonikovih jona, u vodenom rastvoru limunske kiseline nalaze se kiseli anjoni (citrati) i nedisosovani molekuli kiseline. S obzirom na broj jona vodonika u molekulu, ova kiselina će disosovati u tri faze i imaće tri vrednosti konstante disocijacije (konstanta disocijacije kiselina K_a , je kvantitativna mera jačine kiseline u rastvoru). S druge strane, citratni anjon može da gradi komplekse sa kalcijumom uklanjajući ga sa površine kristala. Aktivnost limunske kiseline zavisi i od pH. Pri nižim vrednostima pH, ova kiselina disocijacijom obezbeđuje jone vodonika koji direktno napadaju površinu minerala, a pri višim pH, citratni jon izvlači kalcijum sa površine kristala. Kod srednjih vrednosti pH funkcionišu oba mehanizma. Limunska kiselina tako pokazuje dvostruko štetno dejstvo demineralizujući površinu zuba [40].

Slično limunskoj, i fosforna kiselina spada u klasu triprotonskih (trobaznih kiselina), sa tri vrednosti konstante disocijacije, obezbeđujući jone vodonika pri nižoj pH i vezivanje sa kalcijumom u rastvoru pri većoj vrednosti pH. Razlika postoji u formiranju kompleksa sa kalcijumom koji su kod citrata jači i imaju trodimenzionalni oblik molekula [40].

Pri disocijaciji (slabe) sirćetne kiseline joni vodonika se kontinuirano oslobađaju i troše u interakciji sa gleđnim apatitom sve dok se ne iscrpi sva dostupna količina kiseline. Stvaranje kompleksa kalcijuma/acetat je vrlo slabo i igra malu ulogu u eroziji [40].

S druge strane, mlečna kiselina se jače vezuje za kalcijum zbog bočno vezane OH grupe u molekulu. Mlečna kiselina (pKa 3,86) je jača od sirćetne kiseline (pKa 4,76), pa tako lakše obezbeđuje jone vodonika, proizvodeći niži pH u rastvoru. Međutim, laktat takođe vezuje kalcijum. Zanimljivo je da zbog toga mlečna kiselina može da nagrize zubnu gleđ čak i pri pH 6-7, gde gotovo nema jona vodonika, a nagrivanje je posledica vezivanja kalcijuma sa laktatnim jonom [40].

2.3.3. Puferska svojstva erozivnih supstanci

Puferska svojstva predstavljaju važan faktor erozivnog potencijala, što je dokumentovano u multivarijantnim analizama podataka o različitim potencijalno erozivnim supstancama [5,6,8,47]. Osim toga, puferovanje se smatra vrlo važnim faktorom u kinetici erozije. Što je efikasnije puferovanje proizvoda, to će erozivni izazov trajati duže, jer će se proizvod bolje odupreti neutralizujućem efektu pljuvačke [16–18,38].

Puferska svojstva rastvora se mogu proceniti na dva načina: puferskim kapacitetom (β), koji predstavlja meru otpornosti na promenu pH u odnosu na nativnu vrednost i titrabilnom kiselosti (TK), koja meri ukupni pufer između početne i definisane veće vrednosti pH. Oba parametra se mogu proceniti titracijom: puferski kapacitet pomoću nagiba titracione krive pri pH rastvora, dok se TK procenjuje količinom baze koja je potrebna za povišenje pH do unapred definisane vrednosti [16]. Vrednost TK se obično meri na pH 5,5 ili pH 7,0. Iako je u mnogim eksperimentima titracija erozivnih rastvora vršena do pH 7,0 (ili čak 10,0) [5,7,44,48], mnogi autori smatraju da je niža vrednost pH (5,5) pogodnija za istraživanje erozivnog oštećenja, dok je područje između pH 5,5 i pH 7,0 manje važno za proces erozije [6,8,38,49]. Titrabilna kiselost je ukupna koncentracija svih kiselina koje disosuju dajući H^+ jone između početne i krajnje vrednosti pH. Ipak, mnogi radovi navode TK kao zapreminu dodate baze (u mililitrima) za povišenje pH do određene vrednosti. Da bi se omogućilo poređenje između studija, neophodno je, prvo, odrediti krajnji pH titracije i, drugo, rezultate prikazati kao vrednost TK. U cilju jasnijeg prikazivanja rezultata, preporučuje se određivanje TK u „mmol/L do pH 5,5” [38].

Titrabilna kiselost, kao mera puferovanja rastvora, direktno je povezana sa koncentracijom nedisosovanog oblika kiseline u erozivnoj supstanci [16]. Nedisosovani oblik kiseline je od velike važnosti, jer nema naelektrisanje i može lakše da difunduje u „near surface” sloj gleđi. Kako je već napomenuto, kada se tamo nađe, ova vrsta disosuje delujući kao protonski (H^+) nosač u mineralu gleđi i održava kiselo (nezasićeno) stanje koje pospešuje dalje

rastvaranje [38,40]. To znači da će pH sredine duže ostati niska, a rastvaranje gleđi će nastaviti da napreduje. Drugim rečima, supstance sa višom titrabilnom kiselošću i visokim puferским kapacitetom imaju veći erozivni potencijal. S druge strane, veće vrednosti TK predstavljaju snažan pokazatelj viših koncentracija nedisovanih vrsta kiseline, što zauzvrat dovodi do veće erozije gleđi. Kako je TK u direktnijoj vezi sa koncentracijom nedisosovane kiseline u odnosu na β , ona je prikladnija mera puferovanja u studijama erozivnog potencijala [38].

2.3.4. Koncentracija kalcijuma, fosfata i fluorida

Sadržaj kalcijuma, fosfata i fluorida u hrani ili piću su važni faktori erozivnog potencijala jer utiču na stepen porasta ili pada koncentracije u lokalnom okruženju površine zuba. Nije neuobičajeno da se erozivni potencijal (između ostalih parametara- pH, TK, puferски kapacitet) izračunava na osnovu stepena zasićenosti u odnosu na hidroksi- i fluorapatit određivanjem količine kalcijuma, fosfata i fluorida u napitku [17]. Ukoliko su koncentracije minerala veće od vrednosti koje se nalaze u potencijalno erozivnoj tečnosti, ona neće moći da rastvori mineral zuba čak i ako je njena pH ispod kritične vrednosti. Na primer, kiselo mleko (slično i jogurt) ima koncentraciju kalcijuma 69 mmol/L i sadržaj fosfata 39,2 mmol/L. Stoga se ovaj rastvor smatra prezasićenim u odnosu na gleđne minerale i, čak i sa pH od 4,2, nema erozivni uticaj na gleđ. Slično tome, sok od narandže (pH=4,0) kome su dodati kalcijum (42,9 mmol/L) i fosfat (31,2 mmol/L) nije erodovao gleđnu površinu i nakon sedmodnevnog izlaganja, dok je čist sok od narandže izazvao izrazito erozivno oštećenje [50].

Modifikacija bezalkoholnih pića niskim koncentracijama kalcijuma ili kombinacijom kalcijuma, fosfata i fluorida može imati značajan zaštitni potencijal na eroziju zuba [51]. Dok su Attin i sar. sugerisali da dodavanje samo fosfata erozivnim pićima (ili rastvorima kiselina) takođe smanjuje erozivni potencijal [51], Hemingvai i sar. nisu pronašli takvu korelaciju, smatrajući da su joni kalcijuma važniji u zaštiti jer se rastvaraju iz hidroksiapatita pre fosfatnih jona [52]. U literaturi postoje podaci da bi u rastvoru mogle postojati četiri vrste fosfata (H_3PO_4 , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} i PO_4^{3-}), pri čemu na njihove koncentracije snažno utiče pH rastvora. Pri kiseljoj pH, većina fosfata je u obliku $H_2PO_4^-$. Jedini oblik fosfata od značaja za jonsku aktivnost gleđi, tj. onaj koji utiče na stepen zasićenja, je PO_4^{3-} . Međutim, koncentracije PO_4^{3-} pri niskoj pH u rastvoru su isuviše niske bi uticale na efikasno ometanje demineralizacije gleđi [5,52].

Fluoridi mogu pružiti izvestan zaštitni efekat pićima sa pH većom od one koja je naznačena krivom zasićenja fluorapatita pri datim koncentracijama Ca i PO_4 [18]. Lussi i sar. [41] i Mahoney i sar. [53] otkrili su obrnutu korelaciju erozivnog potencijala sa sadržajem

fluora u različitim napicima. Iako se može videti da naslov rukopisa sugerira suprotno, Larsen i Richards su objavili da je dodavanje fluorida (CaF_2) smanjilo erozivni potencijal samo onim bezalkoholnim pićima koja imaju $\text{pH} > 3$ i visoke ukupne koncentracije fluorida (7–26 mg/l) [54]. Suplementacija fluorom verovatno se nije pokazala kao korisna strategija, jer je erozivni izazov isuviše agresivan, a koncentracija fluorida, koja se može uključiti u proizvod za potrošnju, je (isuviše) niska. Primena fluorida direktno na zub može pružiti zaštitu protiv erozije (kao i protiv karijesa) [18].

2.3.5. Adhezivnost

Postoje razlike u sposobnosti napitaka da se adheriraju za gleđ u zavisnosti od njihovih termodinamičkih osobina [18]. Što je veća adhezija kisele supstance, vrlo je izvesno da će vreme kontakta sa površinom zuba biti duže. Jedno istraživanje je pokazalo je da je „potiskivanje” pljuvačke sa površine zuba pomoću *Cola* napitka zahtevalo energiju od 14 mJ/m^2 , dok je za *Diet Colu* bilo potrebno samo 5 mJ/m^2 . Međutim, „potiskivanje” filma od *Cola* napitka pomoću pljuvačke je zahtevalo čak 45 mJ/m^2 , a za uklanjanje filma od *Diet Cole* i veća energija (52 mJ/m^2). Čini se da je teže izmestiti film bezalkoholnih pića pljuvačkom nego film pljuvačke bezalkoholnim pićem, što dokazuje važnost adhezivnosti u povećanju erozivnog potencijala kiselih supstanci [55].

2.3.6. Temperatura erozivne supstance

Literaturni podaci uglavnom potvrđuju da je kiseli napitak koji se služi vruć erozivniji od istog pića koji se služi hladan [56,57]. Dve *in vitro* studije, koje su istraživale uticaj temperature na erozivnost limunske kiseline, utvrdile su značajno povećanje erozije sa porastom temperature kiseline na 5° , 35° i 60°C [56] i 4° , 20° , 35°C i 50°C [57]. Ovo, u kombinaciji sa niskom pH, može objasniti zašto neki biljni čajevi mogu biti agresivni erozivni agensi [58].

Međutim, u studiji Steiger-Ronay i sar., gde je ispitivan uticaj temperature erozivnih pića u interakciji sa remineralizujućim delovanjem pljuvačke, porast temperature tečnosti nije uzrokovao značajno povećan gubitak supstance posle dejstva limunske kiseline, soka od narandže i *Coca-Cola-e Zero*. Ipak, *Sprite Zero* i dva ispitivana voćna čaja su dovela do značajno većeg gubitka gleđi pri zagrevanju napitaka. Iako metodologija primenjena u ovoj

studiji predstavlja najpribližnije *in vivo* stanje, preporuka autora je da se temperatura za pojedina erozivna pića pri konzumiranju održava što je moguće nižom, zbog znatno većeg erozivnog potencijala pri višim temperaturama [33]. Autori su objasnili svoj rezultat cikličnim eksperimentom koji je rađen u interakciji sa remineralizujućim delovanjem pljuvačke. Preciznije, uzorci gleđi su bili naizmenično podvrgnuti erozivnom izazovu i remineralizaciji veštačkom pljuvačkom. Ova činjenica može objasniti odstupajuće rezultate studije Steiger-Ronay u poređenju sa drugim publikacijama koje istražuju ovu materiju [33].

2.3.7. Viskoznost

Viskoznost može uticati na „aktivnost” Nernstovog sloja, tankog, relativno stabilnog sloja rastvora koji je najbliži površini gleđi. Viskoznost napitka može usporiti eroziju usporavanjem zamene rastvora na površini. Ova pojava bi takođe mogla biti povezana sa koeficijentom prodiranja tečnosti. Viskoznost pića, zajedno sa kontaktnim uglom i površinskom napetošću, određuje njegov koeficijent penetracije [59], meru sposobnosti prodiranja tečnosti u kapilarni prostor, kao što su pore. Prema ovoj teoriji, piće male viskoznosti imaće visok koeficijent prodiranja, što rezultuje većim erozivnim potencijalom [60].

2.4. Klasifikacija napitaka

Pića se mogu definisati kao „tečnosti koja su u osnovi dizajnirana ili razvijena za ljudsku upotrebu” [61]. Sastoje se od raznolike grupe prehrambenih proizvoda, od vode do širokog spektra komercijalno dostupnih tečnosti poput voćnih sokova, sintetičkih napitaka, alkoholnih pića, mleka, mlečnih napitaka, čaja, kafe, itd. Uprkos brojnim razlikama u sastavu i osobinama, njihova zajednička karakteristika je sposobnost da deluju kao sredstvo za gašenje žeđi. S obzirom da su heterogena, ne postoji opšteprihvaćena uredba koja definiše kako treba klasifikovati pića [62]. Klasifikacija pića se može zasnivati na mnogim kriterijumima, uključujući sastav, karbonizaciju, sadržaj alkohola i fiziološke efekte [61,63].

Pića se prvenstveno mogu podeliti na prirodna i sintetička. Prirodna pića su sva ona koja se dobijaju upotrebom prirodnih sastojaka ili prirodnim procesom transformacije (mleko, voćni sok i vino), dok se sintetička pića dobijaju dodavanjem veštačkim jedinjenja, kao što su aromatične supstance, boje ili šećerni sirup [64].

Druga vrsta klasifikacije pića zasniva se na prisustvu ili odsustvu ugljen-dioksida. Ugljen-dioksid se može dodati vodi (gazirana voda), slatkim pićima (*Cola* napici) ili se može prirodno proizvesti tokom procesa fermentacije, kao kod vina i piva [62].

Treći kriterijum klasifikacije se zasniva na sadržaju alkohola. Ova klasifikacija je najčešće korišćen način podele napitaka. Alkoholna pića karakteriše prisustvo etanola koji se stvara u procesu fermentacije. Ona su dalje podeljena u tri klase: pivo, vino i žestoka pića. Pivo je proizvod koji nastaje fermentacijom rastvorljivog dela ječma (slada) ili drugih proizvoda od žitarica poput pirinča i kukuruza. Vino se dobija fermentacijom grožđa kvascima (npr. *Saccharomices cerevisiae*) i mlečnim bakterijama. Žestoka alkoholna pića sadrže visoku količinu alkohola (> 15%). Alkoholna pića se mogu proizvoditi od različitih sirovina (npr. biljaka, voća, žitarica) i podvrgavaju se destilaciji fermentisanih proizvoda ili maceraciji sirovina u etil alkoholu. S druge strane, bezalkoholna pića (poput voćnih sokova i gaziranih napitaka) ne sadrže etanol [61,62].

Sledeći kriterijum za klasifikaciju pića je temperatura serviranja. Određena pića konzumiraju se samo vruća, na temperaturi iznad 65-70°C, („vrući napicima” - čaj, kafa, čokolada i mleko). Međutim, ledeni čaj i hladna kafa služe se rashlađeni. Većina voćnih, mlečnih, alkoholnih i bezalkoholnih pića su primeri „hladnih pića” [61,62].

Dalje, pića se mogu klasifikovati na osnovu fizioloških efekata (npr. ekscitanta) koja se mogu očekivati od stimulativnih pića (npr. kafe i čaja). Stimulativni efekti potiču od biohemijских komponenti (kofeina, teobromina, fenolnih jedinjenja, etanola) koje deluju na nervni i cirkulatorni sistem. Suprotno tome, nestimulativna pića nemaju fiziološki efekat (npr. voćni sokovi, bezalkoholna pića). Stoga, u okviru ovih klasifikacija, bezalkoholna pića mogu biti: prirodna ili sintetička, gazirana ili negazirana, mogu imati fiziološka dejstva ili biti bez njih, a mogu se služiti topli i/ili hladni [61,62].

U fokusu ovog istraživanja su bezalkoholna i alkoholna pića sa potencijalno erozivnim svojstvima, kao i topli napici koji uključuju dve vrste čaja.

2.4.1. Vrste bezalkoholnih pića

Ne postoji dostupna jedinstvena definicija bezalkoholnih pića, ali opšte je prihvaćeno da su to zaslađeni napici na bazi vode, obično sa balansirajućom kiselooću [65]. Aromatizovani su upotrebom prirodnih ili veštačkih supstanci, često su obojeni i sadrže izvesnu količinu voćnog soka, voćne kaše ili drugih prirodnih sastojaka. Preovlađujući sastojak je voda, tako da je hidratacija organizma primarna funkcija ovih napitaka. Slatkoća i druge karakteristike

poboljšavaju ukus i čine ove proizvode privlačnijim potrošačima. Opšte je prihvaćeno da kategorija bezalkoholnih pića ne podrazumeva čaj, kafu, mlečne napitke i, donedavno, alkohol. Međutim, u mnogim bezalkoholnim pićima mogu biti prisutne minimalne količine alkohola (manje od 0,5%) koji služi kao rastvarač za dodate arome [65]. Postoje dve osnovne vrste bezalkoholnih pića: gotovi proizvodi - spremni za korišćenje (koji dominiraju na svetskom tržištu) i koncentrovani koji se razređuju pre konzumacije. Tu spadaju sirupi i voćne kaše. Bez obzira da li su koncentrovana ili razblažena, bezalkoholna pića, osim vode, sadrže zaslađivač (saharozu, glukozu i fruktozu, mada su veštački zaslađivači sve češći), kiselinu (limunsku, jabučnu ili fosforu), aromu, boje i konzervanse [65].

Gazirana bezalkoholna pića već decenijama dominiraju u potrošnji bezalkoholnih pića u svim zemljama sveta. Osim vode i ugljen-dioksida, koji se dodaje pićima da bila gazirana, ostali sastojci su uglavnom veštački zaslađivači, već pomenute kiseline i aditivi u koje može spadati i voćni sok, U ovoj kategoriji dominiraju varijante bez kalorija i sa nižom kalorijskom vrednošću [66].

Voćni sok je 100% čisti sok koji se pravi od celog voća ili voćne pulpe. Po pravilu, voćnom soku se ne dodaje šećer, zaslađivači, konzervansi, arome ili boje. Postoje varijante bistrih sokova, sokova sa homogenom (gustom) strukturom, ili sa komadićima voća, uz dodatak vitamina C [66]. Zbog niske pH vrednosti i visokog puferskog kapaciteta, gazirana bezalkoholna pića i voćni sokovi mogu izazvati dentalnu eroziju [5,6,8,49].

Sportska pića se nazivaju i „elektrolitska pića” jer nadoknađuju gubitak tečnosti i elektrolita i trenutno obezbeđuju energiju tokom vežbanja i sportskih aktivnosti. Osim vode, sadrže ugljene hidrate (uglavnom glukozu i fruktozu) i elektrolite (natrijum, kalijum i hlorid) [66]. Sportska pića imaju za cilj sprečavanje dehidracije i poboljšanje sportskih fizičkih performansi pre, tokom ili posle sportskih aktivnosti. Iako su ova pića, pre svega, dizajnirana za potrebe sportista, poslednjih godina postala su popularna i kod onih koji se ne bave aktivno sportom, naročito kod osoba mlađe generacije [66]. Postoje tri vrste sportskih napitaka koji sadrže različite količine elektrolita i ugljenih hidrata.

- Izotonična pića sadrže tečnost, elektrolite i 6-8% ugljenih hidrata. Ona brzo zamenjuju tečnost izgublenu znojenjem i obezbeđuju snabdevanje ugljenim hidratima. Ova vrsta pića je izbor za većinu sportista, posebno kod trkača na srednje i duge staze, ali i za učesnike timskih sportova.
- Hipotonična pića sadrže tečnost, elektrolite i nizak nivo ugljenih hidrata. Imaju manje natrijuma od izotoničnih napitaka i koriste ih sportisti kojima je potrebna tečnost bez ugljenih hidrata, poput gimnastičara.

- Hipertonična pića imaju visok nivo ugljenih hidrata. Mogu se koristiti za dopunu dnevnog unosa ugljenih hidrata nakon vežbanja (posebno zbog nadoknade zaliha glikogena u mišićima). Mada se od svih sportskih napitaka najmanje koriste, mogu ih uzimati oni koji imaju naporne i zahtevne treninge kako bi zadovoljili energetske zahteve tokom vežbanja. Ukolioko se koriste tokom vežbanja, hipertonična pića treba da se uzimaju zajedno sa izotoničnim pićima u cilju rehidracije.

Suprotno tome, *energetska pića* sadrže veliku količinu šećera i kofeina; stoga mogu poboljšati mentalne i fizičke performanse, odžavati budnost, poboljšati koncentraciju, izdržljivost i raspoloženje [67]. Sadržaj i koncentracija kofeina se u velikoj meri razlikuju među raznim brendovima.

Iako se potrošnja bezalkoholnih pića povećala tokom poslednjih decenija, ali i zadržala na ovom visokom nivou tokom poslednjih 5–10 godina, potrošnja sportskih i energetskih pića je u poslednjoj deceniji izrazito porasla za (približno za 60%) u odnosu na raniji period [66,68]. Ovo može biti dodatni faktor rizika za eroziju. Erozivni potencijal sportskih i energetskih napitaka je ispitivan u nekoliko studija [5,67,69–74].

2.4.2. Alkoholna pića

Alkoholna pića sadrže etil alkohol u različitim koncentracijama. Proizvode se postupkom prirodne ili kontrolisane fermentacije. Umerena konzumacija alkohola obično ne uzrokuje erozivno oštećenje zubnih tkiva. S druge strane, prekomerna količina alkohola povezana je sa pojavom erozivnih lezija na zubnim tvrdim tkivima. Veliki broj alkoholnih pića su kisela i imaju pH oko 3,0, što može prouzrokovati eksternu eroziju [48]. Još jedan problem kod pacijenata sa alkoholizmom je često povraćanje nakon što konzumiraju velike količine alkohola [15,75]. Izveštava se da hronični alkoholizam uzrokuje oštećenje gastrointestinalnog trakta, što rezultira GERB-om ili hroničnim gastritisom, dovodi do povećane kiselosti u usnoj duplji i uzrokuje demineralizaciju gleđi [15,76].

Na osnovu korišćenih sirovina i tehnologije obrade koja se koristi u proizvodnji, alkoholna pića mogu se klasifikovati u tri glavne grupe: pivo, vino i žestoka pića.

Pivo je treće piće na svetu koje se najviše konzumira (iza vode i čaja). Priprema se od *vort-a* (rastvorljive tečnosti ječmenog slada) sa odgovarajućim kvascem da bi nivo alkohola dostigao raspon od 4-8%. Pored alkohola, pivo karakteriše i „šumeće” svojstvo, tj. pena koju proizvodi ugljen-dioksid. Gorkom ukusu i aromi piva doprinose čvrste supstance hmelja (*Humulus lupulus*) kao a-izo-kiseline, i mala količina polifenola. Postoji mnogo varijanti piva,

ali dve su popularnije. Prva je „Lager” varijanta koju fermentira donji kvasac, odnosno *Saccharomices pastorianus* na nižoj temperaturi (7-12°C) tokom dužeg perioda, dok se „Ale” varijanta proizvodi kvascem gornjeg vrenja, tj. *Saccharomices cerevisiae* na relativno višoj temperaturi (18-25°C) [77].

Vina se proizvode od različitih vrsta voća, grožđa, breskve, šljive ili kajsije. Najčešće se koristi grožđe (zeleno i crveno). Grožđe se macerira da bi pustilo sok koji podleže fermentaciji zahvaljujući širokom spektru kvasaca, uključujući *Saccharomices spp.*, *Pichia spp.*, *Stellata spp.* i određenim bakterijama mlečne kiseline. Trajanje fermentacije je duže u poređenju sa pivom i, da bi razvilo poželjne karakteristike, potrebno je da prođe duže vreme (šest do dvanaest meseci) [77].

Postoje dve glavne vrste vina, belo (napravljeno od zelenog grožđa) i crveno (od crvenog ili plavog grožđa). Crveno vino sadrži antocijanin (kao pigment za bojenje) i podvrgnuto je sekundarnoj fermentaciji nazvanoj „malolaktička fermentacija” kako bi dobilo blaži ukus. Sadržaj alkohola u vinu se kreće od 9-16% (v/v) [77]. Vina, naročito crvena, sadrže veliku količinu polifenola. Prema literaturnim podacima, polifenoli imaju afinitet da se „ugrađuju” u dentalnu pelikulu i povećavaju njenu protektivnu ulogu u nastanku erozivnog oštećenja [3].

Potencijal vina da izazove eroziju zuba zavisi od sadržaja voćnih kiselina, pri čemu su najviše zastupljene vinska i jabučna [1,47]. Niska pH vina, za koju se izveštava da se kreće od 3,0 do 4,0 i niske koncentracije jona P i Ca [5], takođe su važni za erozivni efekat ovog napitka. Pored kiselosti, navike među degustatorima vina su dodatni faktor rizika za eroziju zuba. Izvesna količina vina se drži se u ustima nekoliko sekundi, zatim se blago „provalja” jezikom tako da vino dopre do korena jezika, a zatim se proguta ili izbací. Pored toga, svaka degustacija traje satima i tokom sesije se može testirati 20–40 različitih vrsta vina [76]. Uticaj vina na dentalnu eroziju je istraživan u nekoliko *in vitro* studija [10,11,44].

2.4.3. Čajevi

Čaj je jedno od najčešće konzumiranih pića na svetu, a globalna potrošnja zauzima drugo mesto, odmah nakon vode, a znatno ispred kafe, piva, vina i gaziranih bezalkoholnih pića [78]. Svi pravi čajevi potiču od biljke *Camellia sinensis* i predstavljaju napitke sa prijatnim ukusom, lekovitim svojstvima i jedinstvenim sociokulturnim karakteristikama [79]. Poslednjih decenija intenzivno su istraživani efekti čaja na promociju zdravlja. U odnosu na stepen fermentacije, čajevi se mogu klasifikovati u šest kategorija: zeleni čaj (nefermentisan), žuti čaj

(blago fermentisan), beli čaj (srednje fermentisan), ulong (*oolong*) (polufermentisan), crni čaj (potpuno fermentisan) i tamni (*puerh*) čaj (postfermentisan) [78,79]. Klinička istraživanja ukazala su na preventivne i terapijske efekte čaja na mnoge bolesti povezane sa stresom, poput kardiovaskularnih bolesti, bolesti gastrointestinalnog trakta, jetre, dijabetesa tipa 2 itd. [79]. Štaviše, nekoliko ispitivanja pokazalo je da su polifenoli i kofein glavni sastojci odgovorni za različite bioaktivnosti i prepoznatljiva senzorna svojstva čajeva [78,79].

Sa stanovišta ove disertacije, interesantni su zeleni i crni čaj. Zbog razlika u načinu prerade i nivoima oksidacije, imaju važne hemijske razlike, posebno u sadržaju polifenola. U zelenom čaju su najzastupljeniji polifenoli katehini, poput epigalokatehin-3-galata (EGCG), dok u crnom čaju preovlađuju teaflavini [80]. Uprkos ovoj razlici, većina ostalih polifenola u sastavu oba čaja je slična. Dok su objavljeni podaci o erozivnom potencijalu biljnih i voćnih čajeva [58], ustanovljeni su pozitivni efekti crnog i zelenog čaja na procese erozivnog oštećenja zuba, upravo zbog prisustva polifenola [81].

2.5. Faktori koji zavise od pacijenta

Izgleda da postoje velike razlike između individua u vezi njihove podložnosti prema erozivnom oštećenju. Trenutno saznanje u vezi „predispozicije” prema eroziji sugerise da ove varijacije postoje zbog razlika u osetljivosti tvrdih zubnih tkiva na rastvaranje, kao i razlika količini, protoku, viskoznosti, puferskim karakteristikama pljuvačke i td. [82]. Pacijenti sa smanjenom brzinom protoka pljuvačke ili smanjenim puferskim kapacitetom posebno su podložni erozivnom gubitku zuba [83]. Različiti razlozi mogu smanjiti adsorpciju pljuvačnih proteina na površinu gleđi i „usporiti” formiranje pelikule koja utiče na smanjenje erozivnog oštećenja [22]. Takođe, pljuvačka obezbeđuje manju ili veću količinu kalcijuma, fosfata i fluorida koja je neophodna za održavanje prezasićenog stanja u blizini površine zuba i omogućavanje ponovnog očvršćavanja erodirane zubne supstance [83]. Osim spomenutih predisponirajućih faktora, na razvoj i brzinu erozivnog oštećenja utiču i specifična ponašanja (loše navike) koja mogu povećati vreme kontakta između zuba i kisele supstance.

2.5.1. Struktura tvrdih zubnih tkiva - gleđi

Sa stanovišta ove disertacije, gleđ će biti u fokusu analize podložnosti tvrdih zubnih tkiva na erozivno oštećenje.

Histologija zdrave gleđi je opsežno istražena. To je vitalna, gusto zbijena mineralizovana struktura koja se uglavnom sastoji od kalcijuma i fosfata u obliku nestehiometrijskog hidroksiapatita [84]. Mineral je organizovan u obliku prizmi (koje se u literaturi nazivaju štapovima ili šipkama) heksagonalne strukture. Dimenzije ovih kristala je teško izmeriti, ali je objavljeno da su vrednosti širine i debljine od 50 do 70, odnosno 20 do 25 nm. Ostale komponente gleđi su organski materijal (2 vol.%) i voda (11 vol.%) [84]. Visok sadržaj minerala čini gleđ otpornom na fizičke uticaje. Vrednost tvrdoće gleđi varira u zavisnosti od mernog sistema i primenjenog opterećenja [85], a takođe se razlikuje u pogledu regiona krunice zuba, kao i u odnosu na udaljenost od površine, tako da ne postoji fiksna vrednost. Tvrdoća gleđi je dovoljna da izdrži većinu fizičkih sila koje se javljaju tokom fizioloških procesa (npr. žvakanje) ili oralnih higijenskih mera. Stoga se pretpostavlja da čak i forsirane navike oralne higijene ne bi bile relevantne za trošenje zdrave gleđi [86].

Pri erozivnoj demineralizaciji gleđi dolazi do rastvaranje minerala sa površine, što stvara grubu nepravilnu strukturu, sličnu obrascu nagrizanja poznatom iz adhezivne stomatologije [87]. Malo se zna o tome koliko duboko seže delimično demineralizovana zona; zabeležene su vrednosti u rasponu od nekoliko do oko 100 mikrona [88]. Kada se izlaganje kiseline nastavi, dolazi do velikog gubitka gleđi. Na takvim demineralizovanim gleđnim površinama smanjuje se mikrotvrdoća. Kao posledica toga, erodovana gleđ je manje otporna na fizičke sile od zdravog tkiva i, barem pod eksperimentalnim uslovima, gubitak gleđi je znatno povećan pod erozivnim/abrazivnim uslovima u poređenju sa erozijom ili samo abrazijom, a količina abrazivnog trošenja je povezana sa gubitkom mikrotvrdoće [82].

Iako se nagađa da se delimično demineralizovana površinska zona lako uklanja fizičkim silama, studije skenirajuće elektronske mikroskopije otkrile su da su znaci demineralizacije i struktura prizmi koje su nagrižene kiselinom još uvek vidljivi i nakon četkanja zuba [89].

Histologija eksperimentalne erozije gleđi, proizvedene na *in situ* ili *in vitro* modelima je prilično dobro shvaćena, podrazumevajući da je erozivna demineralizacija u takvim uslovima intenzivnija u poređenju sa situacijom *in vivo*. Odgovarajući eksperimentalni dizajni mogu sadržati pojedinačne erozivne izazove ili cikluse erozije i remineralizacije tokom određenog vremena, što rezultuje znatno većim gubitkom tkiva nego u *in vivo* uslovima [90]. Stoga je razumno pretpostaviti da su strukturne promene koje se javljaju u uslovima stvarnog života mnogo manje izražene - tim više što erozivno habanje *in vivo* nije jednostavan proces, već se sastoji od „rafalnih“ i „tihih“ perioda, u zavisnosti od navika, načina života i opšte zdravstvene situacije [91].

Shodno tome, rana studija replike otkrila je različitu morfologiju erozivnog habanja, u rasponu od nepravilnih i jamičastih struktura do više ili manje glatkih površinskih lezija. Nagađalo se da su prve povezane sa aktivnim lezijama, dok druge karakterišu neaktivne stadijume [91]. Za sada nema podataka o fizičkim svojstvima *in vivo* lezija, posebno u pogledu mikrotvrdoće. Pretpostavlja se da je erozivna demineralizacija *in vivo* mnogo manje ozbiljna, što takođe može važiti i za gubitak mikrotvrdoće.

Da li su ove razlike između eksperimentalnih i *in vivo* lezija relevantne za „prenošenje” eksperimentalnih rezultata u uputstva za pacijente ostaje još uvek nedovoljno razjašnjeno [91].

2.5.2. Potencijal pljuvačke u zaštiti od dentalne erozije

Pljuvačka se smatra najvažnijim biološkim faktorom u prevenciji zubne erozije zbog svoje sposobnosti da deluje direktno na sam erozivni agens razređivanjem, čišćenjem, neutralisanjem i puferovanjem kiselina. Takođe igra važnu ulogu u stvaranju dentalne pelikule, smanjuje brzinu demineralizacije i poboljšava remineralizaciju čineći kalcijum, fosfat i fluorid dostupnim erodovanoj gleđi i dentinu [2,92]. Najbolji klinički pokazatelj zaštitnih svojstava je protok pljuvačke, budući da svi gore navedeni parametri zavise od toga [93]. Izvešteno je da je prosečna brzina protoka nestimulisane pljuvačke od 0,3-0,5 ml/min i oko 1 ml/min stimulisane pljuvačke, sa normalnom dnevnom proizvodnjom između 0,5 i 1,5 litara [94]. Osobe kod kojih je količina nestimulisane pljuvačke manja od 0,1 ml/min, kao i one kod kojih je izlučivanje stimulisane pljuvačke manje od 0,7 ml/min, rizične su za nastanak karijesa, a verovatno, i za nastanak erozije [83].

Aktivnost pljuvačke pre erozije. Pljuvačka započinje svoj zaštitni efekat protiv erozije i pre izazova kiselinom, povećanjem brzine protoka kao odgovorom na ekstraoralne stimulse poput mirisa [95,96] ili vida [97]. Kisela hrana ima snažan uticaj na anticipativni protok pljuvačke [95,97], koji se može značajno povećati u poređenju sa normalnim nestimulisanim protokom [96]. Hipersalivacija se takođe javlja pre povraćanja kao odgovor iz „centra za povraćanje” u mozgu [98], što se često primećuje kod osoba koje pate od anoreksije i bulimije nervose, ruminacije ili hroničnog alkoholizma. Pretpostavlja se da eliminacija ovih etioloških faktora može minimizirati eroziju izazvanu kiselinama želučasnog porekla. S druge strane, pacijenti sa simptomima gastroezofagealne refluksne bolesti nemaju mogućnost „zaštite” od erozivnog oštećenja preko povećane količine pljuvačke pre regurgitacije, jer je ovo nehotičan odgovor koji ne koordiniše autonomni nervni sistem [99].

Veća brzina protoka pljuvačke stvara povoljne uslove za sprečavanje ili minimiziranje početnog erozivnog napada usled povećanja organskih i neorganskih sastojaka pljuvačke. Od primarnog interesa za eroziju su: ugljena kiselina (H_2CO_3)/hidrogenkarbonat (HCO_3^-), dihidrogen fosfat (H_2PO_4^-)/hidrogen fosfat (HPO_4^{2-}), kalcijum (Ca^{2+}) i fluorid (F^-) [100,101]. Ovi joni su povezani sa povećanjem puferskog kapaciteta pljuvačke i održavanjem integriteta zuba [102]. Vodonik-karbonat je glavni puffer pljuvačke i njegova koncentracija se povećava sa oko 5 mmol/L u nestimulisanoj do 60 mmol/L u stimulisanoj ukupnoj pljuvački. Koncentracija dihidrogen fosfata reguliše se u suprotnom smeru od 5 mmol/L nestimulisane pljuvačke do 3 mmol/L u stimulisanoj pljuvački [103]. Proteinski puferski sistem takođe može biti od važnosti pri nižim nivoima pH (ispod 4,5). U kliničkim studijama, pljuvačka je kod pacijenata sa simptomima gastroezofagealne refluksne bolesti imala niži puferski kapacitet od zdravih kontrola, što je moglo doprineti njihovom većem broju erozivnih lezija [104–106].

Aktivnost pljuvačke tokom erozije. Kada kiselina dospe u usnu duplju, dolazi do aktiviranja nekoliko pljuvačnih mehanizama koji štite zube. Intra-oralni stimuli pljuvačke uglavnom su posledica hemijske i mehaničke stimulacije. Potencijalno erozivne namirnice i pića [5] izazivaju snažan odgovor. Nakapavanje 4 % limunske kiseline na jezik dovele su do porasta srednje brzine protoka pljuvačke do znatno viših vrednosti od protoka nestimulisane pljuvačke. Takođe, žvakanje može da stimuliše lučenje pljuvačke [107]. Pretpostavlja se da stimulacija mehanoreceptivnih neurona u mekim tkivima usne duplje može rezultovati refleksnim lučenjem pljuvačke [27]. U zavisnosti od oralnih stimulusa, „aktiviraju se“ različite pljuvačne žlezde, što dovodi do promena u protoku i sastavu pljuvačke i uticaja na njen nivo zaštite [96]. Žvakaća guma povećava protok pljuvačke i trebalo bi da bude korisna u prevenciji erozije zuba, izuzimajući kisele guma za žvakanje naročito ako se često menjaju u relativno kratkom vremenskom periodu. Niža brzina protoka smanjuje kapacitet pljuvačke u kiselinama koje su u stanju da neutrališu dejstvo pljuvačke svojim puferskim svojstvima i tako povećaju mogućnost za razvoj erozije [108,109].

Određena mesta na zubu, koja se slabo ispiraju pljuvačkom, ili se ispiraju uglavnom mukoznom pljuvačkom, imaju veću verovatnoću da podlegnu eroziji u poređenju sa mestima zaštićenim seroznom pljuvačkom [110]. Lussi i sar. su pokazali znatno brži oporavak pH na drugom mandibularnom premolaru u poređenju sa maksilarnim centralnim sekutićem, nakon konzumiranja soka od narandže [111]. Autori su ovo objasnili blizinom prvog premolara i izvodnog kanala parotidne pljuvačne žlezde. Vreme potrebno da pljuvačka neutrališe i/ili očisti kiselinu sa površine zuba izmereno je *in vivo* pH elektrodama i pokazano je da se kreće između 2 i 5 minuta [112].

Pljuvačka takođe omogućava formiranje stečene pelikule koja štiti od erozije sprečavajući direktan kontakt između kiseline i površina zuba [113] (opisano u sledećem poglavlju). Ovaj zaštitni efekat diktira sastav, debljinu i vreme sazrevanja pelikule i ograničen je agresivnošću erozivnog izazivača.

Neki morfološki aspekti mogu ometati delovanje pljuvačke i razvoj erozije. Različita lokacija zuba u ustima može ih učiniti podložnijim eroziji, ne samo zbog razlika u zaštititi pljuvačkom već i zbog njihove izloženosti mehaničkim silama koje su rezultat kontakta sa okolnim mekim tkivima [114] i jezikom [115].

Aktivnost pljuvačke nakon erozije. Kada se erozivno sredstvo neutrališe ili ukloni sa površine zuba, pljuvačni kalcijum i fosfat mogu remineralizovati erodovanu gleđ [116,117]. Značajno poboljšanje remineralizacije se dešava u prisustvu fluoridnih jona [118–120]. Jedna studija *in situ* je analizirala obnavljanje mikrotvrdoće gleđi i dentina koji su prethodno erodovani kiselim napicima. Remineralizacija uzoraka gleđi se dogodila nakon 24 sata izlaganja oralnom okruženju u 37,8% [121].

Iako je važna, zaštita pljuvačke (pre, tokom i nakon izlaganja kiselinu) možda neće biti dovoljna da spreči eroziju zuba. Ovi, gore navedeni, biološki zaštitni faktori se najbolje mogu razumeti ukoliko se smatraju fiziološkim odgovorom domaćina na povremene ili blage epizode izazova kiselim supstancama. Patološke posledice se ne javljaju ukoliko erozivni izazov (snaga i / ili učestalost) ne pređe određeni prag, ili odgovor domaćina nije adekvatan za suzbijanje erozivnog napada. Prema Meurman-u i sar., ukoliko je erozivni izazov dovoljno jak, čak ni normalan protok pljuvačke i funkcija pljuvačke ne mogu zaštititi zube. Kao posledica toga, zubna erozija može biti dramatično pojačana visoko erozivnim izazovima i/ili disfunkcijom pljuvačke [108].

2.5.3. Dentalna pelikula i erozija

Stečena pelikula nastaje adsorpcijom proteina, peptida, lipida i drugih makromolekula prisutnih u pljuvački. Formiranje pljuvačne pelikule je dinamičan proces koji započinje odmah sa adsorpcijom pojedinačnih peptida i proteina na očišćenu površinu zuba. U roku od 1 min na površini gleđi može se otkriti elektron-gusti sloj pelikule (debljine 10–20 nm) [122].

Ova adsorpcija proteina pljuvačke na površini gleđi nastaje usled elektrostatičkih interakcija između naelektrisanih grupa makromolekula, s jedne strane, i jona fosfata i kalcijuma na površini apatita s druge strane [122–125]. Pored jonskih interakcija, van der

Vaalsove sile i hidrofobne interakcije doprineće adsorpciji proteina pljuvačke na površinu zuba [124]. Naknadno formiranje pelikule karakterišu proteinsko-proteinske interakcije i adsorpcija pojedinačnih proteina, proteinskih aglomerata i drugih biomakromolekula, uglavnom iz pljuvačke, ali i iz tečnosti gingivalnog sulkusa, krvi, bakterija, sluzokože i hrane [122,124,126]. Iz objavljenih mikrografskih snimaka transmisionog elektronskog mikroskopa pretpostavlja se da se pljuvačna pelikula, formirana *in vivo*, sastoji od dva sloja: gusto zbijenog bazalnog sloja inicijalno adsorbovanih proteina na koji se taloži složeniji i heterogeniji globularni sloj, sastavljen od heterotipskih proteinskih agregata [127].

Formiranje pljuvačne pelikule se smatra selektivnim procesom, jer se u pelikuli nalazi samo ograničeni broj proteina koji se detektuju u pljuvački [128]. Nedavna ispitivanja koja koriste modernu proteomiku pokazala su da *in vivo* oblikovana gleđna pelikula sadrži više od 130 proteina [129,130]. Pri kategorizaciji pelikulnih proteina na osnovu njihove moguće uloge i funkcije, mogle bi se identifikovati tri glavne grupe, koje zajedno čine više od 60% svih proteina pelikule [23,130]. Prva grupa uključuje proteine koji imaju sposobnost vezivanja jona kalcijuma (npr. kiseli proteini bogati prolinom, histatini ili staterin). Drugu grupu čine proteini koji otkrivaju visoku tendenciju vezivanja fosfatnih jona. Treću grupu karakterišu proteini koji su relevantni za interakcije sa drugim proteinima (protein-protein interakcije) [130,131]. Koristeći proteomske pristupe, moglo bi se vrlo brzo pokazati da postoji tendencija da salivarni proteini sa velikim afinitetom za kalcijum ili fosfat budu obilniji u ranim fazama (5–10 min) formiranja pelikule, dok proteini koji otkrivaju protein-protein interakcijska svojstva budu obilniji u kasnijoj fazi (2 h) formiranja *in vivo* pelikula [131]. Ovi podaci potvrđuju dvoslojni model stvaranja *in vivo* pelikula sa biohemijske tačke gledišta.

Iako bi proteom pelikule mogao uskoro biti detaljno okarakterisan, počinju da se pojavljuju informacije i o drugim komponentama pelikule. Gasnom hromatografijom i ESI-MS analizom identifikovano je 11 masnih kiselina u uzorcima pelikula *in vivo*. Palmitinska, stearinska i oleinska kiselina predstavljaju glavne kiseline i čine više od 80% masnih kiselina u pelikuli [132]. Ovi podaci pružaju neke vrlo dragocene uvide u vezi sa lipidnim sastavom pljuvačne pelikule, ali kompletan lipidom pelikule još uvek treba istraživati.

Zaštitna svojstva pelikule od izazova kiselinama. Nekoliko studija *in situ* i *in vivo* ukazuju da pelikula ima potencijal da zaštiti površinu gleđi od erozivne demineralizacije [133–135]. U skladu s tim, ova ispitivanja otkrivaju da prirodno formirana pelikula pruža evidentan inhibitorski efekat na promene koje izazivaju kiseline (npr. gubitak minerala, smanjenje mikrotvrdoće i povećanje hrapavosti) na površini gleđi tokom erozije. Međutim, efikasnost pljuvačne pelikule da smanji demineralizaciju i zaštiti površinu gleđi od erozivnih kiselina

snažno se razlikuje, zavisno od dizajna studije, pa je stoga teško proceniti tačan nivo zaštite površine gleđi fiziološki formiranom pelikulom. Pelikula je opisana kao polupropustljiva membrana koja reguliše i modifikuje procese demineralizacije na površini zuba [21,22,122]. Fiziološka pelikula smanjuje i usporava demineralizaciju gleđi tokom izlaganja kiselinu; međutim, ona ne inhibira u potpunosti promene na gleđnoj površini izazvane kiselinama [133–135]. Moglo bi se pretpostaviti da smanjenje gubitka kalcijuma uzrokovano *in situ* formiranom gleđnom pelikulom iznosi oko 60% [135]. Međutim, pelikula ne može zaštititi površinu zuba od snažnih erozivnih izazova (na pr. ispijanje 10 ml soka od narandže u trajanju od 15 sekundi, 40 puta, u roku od 10 minuta) [133]. Ovi nalazi *in situ* nedavno su potvrđeni podacima koji pokazuju da *in vitro* formirani 15-časovni sloj pljuvačne pelikule obezbeđuje inhibiciju erozije pri kratkotrajnom izlaganju limunskoj kiselini (≤ 4 min) [23].

Mehanizam zaštite koju pelikula pruža površini zuba od erozije. Pretpostavljalo se da je sloj pelikule nerastvorljiva mreža adsorbovanih pljuvačnih biopolimera [122,123]. Demineralizacija površine zuba se može desiti samo nakon difuzije H^+ jona iz kiseline kroz pelikulu ili nakon (delimičnog) rastvaranja i uklanjanja stečene pelikule izazvane interakcijom sa kiselinom. Zbog svoje mrežaste strukture pelikula ne može sprečiti direktan kontakt između erozivnog agensa i površine zuba, međutim, može smanjiti i usporiti trenutnu interakciju između kiselina i gleđne površine. Takođe, proteini adsorbovani u sloju pelikule mogu delovati kao pufer vezivanjem H^+ jona ili kiselina koji napadaju površinu zuba [122,123].

Do sada su specifične komponente pljuvačne pelikule, koje su uglavnom odgovorne za smanjenje erozivnih oštećenja na površini gleđi, identifikovane samo delimično. Proteini koji sadrže domene koji vezuju kalcijum (kao što su kiseli proteini bogati prolinom, histatini ili staterin) igraju važnu ulogu kao proteini prekursora pelikule [23,122] i smatraju se važnim za zaštitna svojstva pelikule protiv kiselina. Posle adsorpcije na zubnu površinu, ovi proteini koji vezuju kalcijum mogu održavati visoke koncentracije kalcijuma unutar sloja pelikule i blizu površine apatita, čime stabilizuju površinu gleđi i smanjuju erozivnu demineralizaciju [22].

Obezbeđeni su dokazi da sloj pelikule formiran *in situ* na porcelanskim diskovima sadrži kalcijum koji se može rastvoriti izlaganjem limunskoj kiselini [134]. Ovo zapažanje podržava potencijalnu funkciju pelikule kao depoa za jone kalcijuma. Ovakvi rezultati ukazuju da jonski sastav pljuvačke pojačava zaštitne efekte demineralizacije pljuvačnih pelikula, verovatno održavanjem stanja zasićenosti jona kalcijuma i fosfata unutar pelikule. Na taj način dolazi do suzbijanja demineralizacije gleđi [25]. Noviji podaci *in vitro* ispitivanja takođe sugerišu da joni kalcijuma mogu lako da difunduju u i izvan pelikule, omogućavajući tako „slobodnu“ razmenu kalcijuma između pljuvačke i adsorbovanih proteina pelikule u fiziološkim uslovima, što će biti

važno za procese remineralizacije [125]. Ovi nalazi sugerišu da sloj pelikule igra važnu ulogu u održavanju integriteta i mineralne homeostaze površina zuba.

Prikazani su kontradiktorni rezultati u vezi sa odnosom između debljine pelikule i njenog zaštitnog potencijala od dejstva kiselina [136–138]. S jedne strane, prikazana je korelacija između debljine *in situ* pelikule i njenog zaštitnog efekta od erozivnog rastvaranja kiselinama [136]. S druge strane, nije primećen jasan uticaj debljine *in situ* pelikule i njenih zaštitnih svojstava [137,138]. Stoga su neophodne dalja istraživanja kako bi se razjasnila važnost debljine pelike zbog njenih inhibicijskih efekata.

Dobar pristup prevenciji erozivne demineralizacije površine zuba bio bi pojačavanje zaštitnih svojstava pelikule modifikovanjem njenog sastava. Dijetetske komponente (kao što su kazein, polifenoli ili lipidi), koje imaju sposobnost da se adsorbuju i uklope u sloj pljuvačne pelikule, trebalo bi da povećaju inhibicioni potencijal pelikule u odnosu na erozivna oštećenja [22].

Sa aspekta ove disertacije od značaja su polifenoli, s obzirom na to da su u radu ispitivani napici koji sadrže ove supstance (crveno i belo vino, čajevi). *In vitro* eksperimenti su pokazali da tretman polifenolnim agensima uzrokuje povećanje debljine pelikule, kao i taloženje i nakupljanje pljuvačnih proteina [139,140]. Uticaj polifenolnih sredstava na formiranje i funkciju pljuvačne pelikule još uvek nije detaljno istražen u *in situ* studijama.

2.5.4. Navike konzumiranja erozivnih supstanci (napitaka)

Rizik od erozivnog oštećenja se znatno povećava sa količinom i učestalošću erozivnih proizvoda koji se konzumiraju u toku dana. Takođe su važne i navike pri konzumiranju. Opasnost koju predstavlja erozivno kiselo piće manja je ukoliko se ono proguta velikim gutljajima za kratko vreme nego ako se pijucka tokom dužeg perioda; svako zadržavanje kiselog napitka u ustima pre gutanja povećava opasnost, posebno ukoliko se „kombinuje” sa mućkanjem. Klinička zapažanja sugerišu da konzumiranje pića preko slamke koja se postavlja palatinalno može smanjiti rizik od erozije, ali ako se kisela pića konzumiraju kroz slamku koja je postavljena ispred zuba, može doći do erozivnog oštećenja sekutića [82]. Svako „uznemiravanje” Nernstovog sloja može da ubrza erozivni proces. Ovo je primećeno u dve studije gde je istraživana erozija mlečnih zuba koristeći različite brzine agitacije. Oba eksperimenta su izvedena potapanjem mlečnih zuba u kisele napitke na 2 ili 4 min, na istoj temperaturi od 30°C, ali uz korišćenje dve različite vrste agitacije: u jednoj studiji [6] korišćeno

je nežno „mešanje” (kao kod pacijenata koji normalno ispijaju tečnost), a u drugoj studiji [8] primenjena je snažna agitacija (slično pacijentima koji mučkaju i zadržavaju piće u ustima). Snažno mešanje uzrokuje znatno veću erozije od blagog mešanja bez obzira na vreme agitacije. Jedino se nisu primećivale značajne razlike pri korišćenju bombona u spreju u trajanju od 4 minuta. Supstance poput spreja sa slatkišima toliko su agresivne da će uobičajeni unos (čak nežno „uznemirivanje”) za malo duži vremenski period (4 min) već naneti maksimalnu štetu zubima. Može se zaključiti da način unosa erozivne supstance igra značajnu ulogu u početnoj eroziji gleđi, i praćena je značajnim gubitkom površinske tvrdoće.

Ovaj efekat je primećen i kod pacijenata koji imaju usvojena specifična ponašanja koja povećavaju vreme kontakta između zuba i kisele supstance. U studiji kontrole slučaja, O’Sullivan i Curzon, upoređivali su grupu pacijenata koji su imali erozivno trošenje zuba sa grupom pacijenata koji su imali aktivne karijesne lezije i treću (kontrolnu) grupu koja nije imala ni zube sa erozijom ni karijes. Autori su primetili da je 43% pacijenata sa erozivnim trošenjem zuba imalo neku vrstu već prihvaćene i usvojene navike konzumiranja, poput držanja pića u ustima, sisanja ili mučkanja, dok je samo 15% pacijenata sa karijesom i 3% iz kontrolne grupe imalo takve navike. Dakle, tokom kliničke procene pacijenata sa erozivnim trošenjem zuba, važno je proceniti njihovo ponašanje i navike pri konzumiranju pića [141].

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

U ovom istraživanju su postavljeni sledeći ciljevi:

1. ustanoviti erozivni potencijal četrnaest napitaka: jedanaest bezalkoholnih (pet gaziranih, od toga dva energetska napitka), četiri negazirana (dva voćna soka, dva sportska napitka), tri alkoholna pića (pivo, crveno i belo vino) i dva čaja (zeleni i crni), merenjem inicijalne pH i izračunavanjem titrabilne kiselosti (TK);
2. ustanoviti površinsku hrapavost erodovane gleđi nakon izlaganja napicima u različitom vremenskom trajanju merenjem parametara hrapavosti pomoću *stylus* profilometrije;
3. ustanoviti morfološke promene na gleđnoj površini posle izlaganja različitim napicima pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije korišćenjem specifične score-skale;
4. ustanoviti razlike u zaštiti od erozivnog oštećenja potapanjem gleđnih uzoraka u: prirodnu pljuvačku, koja sadrži pljuvačne proteine i jone, veštačku pljuvačku koja sadrži samo jone i dve dijalizovane pljuvačke: prirodnu pljuvačku dijalizovanu veštačkom pljuvačkom (sadrži takođe pljuvačne proteine i jone, ali u nešto drugačijem obimu od nedijalizovane prirodne pljuvačke) i prirodnu pljuvačku dijalizovanu dejonizovanom vodom (koja sadrži samo pljuvačne proteine) u cikličnom *in vitro* modelu erozivnog oštećenja sa limunskom kiselinom.

Takođe su postavljene sledeće hipoteze:

- pića sa nižom inicijalnom pH vrednošću i višom TK imaju veći erozivni potencijal,
- pića sa većim erozivnim potencijalom dovode do intenzivnijih morfoloških promena na gleđnoj površini
- duže vreme izlaganja kiselim napicima dovodi do veće hrapavosti površine gleđi
- uključivanjem dijalizovanih pljuvački u eksperiment može se očekivati preciznije određivanje komponenti dentalne pelikule koje imaju ulogu u zaštiti gleđi od erozivnog oštećenja

4. MATERIJAL I METODE

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanje je realizovano u tri pravca: od ispitivanja erozivnog potencijala četrnaest različitih vrsta bezalkoholnih i alkoholnih napitaka, preko analize hrapavosti i morfoloških karakteristika erodovane gleđne površine nakon izlaganja ispitivanim pićima u funkciji vremena, do procene uticaja različitih komponenti pljuvačke na zaštitni potencijal pelikule od erozivnog oštećenja gleđi.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (br. 12-14250-2/5 od 18.12.2018) i Etičkog odbora Klinike za stomatologiju u Nišu (br. 01-1201/2 od 05.10.2018)

4.1. Ispitivanje erozivnog potencijala bezalkoholnih i alkoholnih napitaka

Ispitivanje erozivnog potencijala napitaka koji su korišćeni u eksperimentu je realizovano na Katedri Hemija i Katedri Farmacija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

4.1.1. Ispitivana pića

Za ispitivanje erozivnog potencijala napitaka, kao i njihovog uticaja na površinu humane gleđi korišćeno je 12 komercijalno dostupnih pića i dve vrste čaja: tri gazirana bezalkoholna pića (*Coca-Cola*, *Schweppes*, *Sprite*), dva energetska pića (*Guarana* i *Red Bull*), dva voćna soka (narandža i aronija), dva sportska pića (*Aqua Viva Recharge Strong* i *Isodrinx isotonic Sports Drink*), dva čaja: (zeleni i crni) i tri alkoholna pića: (pivo, belo i crveno vino). Za svako piće korišćena su po četiri komercijalna pakovanja. Tabela 1 daje prikaz korišćenih napitaka, ime proizvođača i supstance koje ulaze u njihov sastav.

Tabela 1. Prikaz korišćenih napitaka i supstanci koje ulaze u njihov sastav

Piće		Sastav
Proizvođač		
1.	Coca-Cola HBC – Srbija A.D. Zemun, Srbija	Voda, šećer, ugljen-dioksid, boja: karamel (E150d), fosforna kiselina, prirodne arome uključujući i kofein
2.	Schweppes Bitter Lemon „HBC – Srbija A.D. Zemun, Srbija	Voda, visoko fruktozni sirup, sok od limuna, ugljen-dioksid, ekstrakt limuna, limunska kiselina, arome, konzervans kalijum-sorbat, antioksidans askrobinska kiselina, stabilizatori E 1450 i E 445, boja karoteni.
3.	Sprite „HBC – Srbija A.D. Zemun, Srbija	Voda, visoko fruktozni sirup, ugljen-dioksid, limunska kiselina, regulator kiselosti natrijum-citrati, prirodne arome limuna i limete, konzervans natrijum-benzoat.
4.	Guarana „Knjaz Miloš“ A.D., Arandelovac, Srbija	Voda, šećer, ugljen-dioksid, limunska kiselina, taurin, aroma guarane, kofein, vitaminska mešavina, konzervans: natrijum-benzoat, boja: E150d
4.	Red Bull Red Bull, GmbH Fuschl am See, Austija	Voda, saharoza, glukoza, limunska kiselina, ugljen dioksid, taurin, regulatori kiselosti, kofein, vitamini, arome, boje (karamel obični, riboflavin)
5	Isodrinx Isotonic Sports Drink „Nutrend“ D.S.Chvalkovice, Republika Češka	Voda, šećer, glukoza, regulator kiselosti, limunska kiselina, natrijum hlorid, natrijum citrat, bela emulzija (stabilizatori E1450 i E445), kalcijum glukonat, konzervans kalijum sorbat, kalijum glukonat, konzervans natrijum benzoat, magnezijum citrat, aroma, boja brilijant plava
6.	Aqua Viva Recharge „KNJAZ MILOŠ“ A.D., Arandelovac, Srbija	Voda, fruktoza, dekstroza, limunska kiselina, natrijumcitrati, kalijumfosfat, magnezijumkarbonat, kuhinjska so, konzervansi: E202 i E211, stabilizatori E414 i E445, aroma crvene pomarandže, zaslađivač E960 – steviol glikozidi, boje E110 i E122
7.	Life Premium 100% voćni sok pomarandža „Nectar“ D.O.O. Bačka Palanka, Srbija	Voda, koncentrisani voćni sok narandže, limunska kiselina
8.	Sok od aronije	Antocijani, proantocijanidini, fenolne kiseline, flavanoli, pektini, organske kiseline, proteini, ugljeni hidrati, vitamin C, vitamin E, karotenoidi, jod, kalijum, kalcijum i magnezijum
10.	Zaječarsko Pivo Heineken Srbija D.O.O. Zaječar, Srbija	Voda, ječmeni slad, kukuruzna krupica, ekstrakt hmelja
11.	Tikveš - Kratošija Classic Crveno Vino Vinarska Vizba A.D. Skopje, Severna Makedonija	Voda, alkohol 12%, glicerol, organske kiseline, tanini, fenoli, antocijanini, flavan-3-oli, flavonoli
12.	Royal Grozd – Rizling Stono suvo belo vino Vinarija Levač D.O.O Rekovac, Srbija	Voda, alkohol 10,5%, mlečna kiselina, jabučna kiselina, vinska kiselina, limunska kiselina, jantarna kiselina, sirćetna kiselina i sulfati
13.	Zeleni čaj	Kofein, teofilin, teobromin, kemferol, kvercetin, hlorogenska kiselina, kafena kiselina, galna kiselina, katehinski tanini, heterozidi terpenskih alkohola, masti, proteini, minerali, vitamin C, vitamin B
14.	Crni čaj	Kofein, teofilin, teobromin, kemferol, kvercetin, kafena kiselina, galna kiselina, masti, proteini, minerali, fluor, vitamin C, vitamin E

4.1.2. Određivanje inicijalne pH vrednosti pića i titrabilne kiselosti

Početne pH vrednosti analiziranih pića i čajeva i njihova titrabilna kiselost su određivane pomoću multifunkcionalnog elektronskog uređaja *CONSORT C830* (*Consort bvba, Belgija*) čija je elektroda kalibrisana korišćenjem standardnih puferskih rastvora (*Consort bvba, Belgija*) pH 4,0 i pH 7,0 pre svake analize.

Nakon otvaranja pakovanja (limenke ili flašice) ili pripreme čaja, u staklenu čašu je odmereno 50 ml analiziranog pića/čaja na sobnoj temperaturi. Potom je u čašu uronjena prethodno kalibrisana elektroda uređaja i sadržaj je mešan na magnetnoj mešalici sve dok nije očitana ustaljena pH vrednost na uređaju.

Titrabilna kiselost (TK) je određena pH-metrijskom titracijom analiziranog uzorka nakon merenja početne pH vrednosti. Uzorak je titriran standardnim rastvorom NaOH koncentracije 0,9613 M, koji je dodavan u alikvotima od 0,3 ml (sem pri određivanju titrabilne kiselosti za crni čaj i zeleni čaj kada je standardni rastvor NaOH dodavan pažljivo iz birete u kapima tj. u alikvotima od 0,05 ml., jer je 1 kap \approx 0,05 ml) uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon dodavanja svakog alikvota titracionog sredstva očitana je i zabeležena ustaljena pH vrednost analiziranog uzorka. Titrabilna kiselost je izražena kao broj ml titracionog sredstva (0,9613 M NaOH) potrebnog za povećanje pH vrednosti od početne izmerene vrednosti do pH 5,5, pH 7,0 [142].

4.2. Ispitivanje hrapavosti i morfoloških karakteristika gleđne površine nakon izlaganja ispitivanim pićima u funkciji vremena

4.2.1. Uzorci gleđi

Za analizu erodovane površine gleđi korišćene su krunice impaktiranih humanih trećih molara, hirurški ekstrahovanih od pacijenata starosti od 18 do 25 godina. Posle ekstrakcije, zubi su dezinfikovani u 1% rastvoru timola, a zatim potopljeni u 1% NaOCl na 24 časa. Nakon pažljivog uklanjanja ostataka mekog tkiva, korenski deo zuba je odstranjen dijamantskim svrdlom i cirkularnom šajbnom, a krunice su čuvane u fiziološkom rastvoru do početka eksperimenta. Od krunica su preparisani uzorci gleđi za:

- ispitivanje erozivnog uticaja bezalkoholnih i alkoholnih pića u funkciji vremena i evaluaciju promena na gleđnoj površini pomoću kontaktne profilometrije i skenirajuće elektronske mikroskopije;
- ispitivanje protektivnog dejstva dentalne pelikule (tj. različitih inkubacionih rastvora) pre erozivnog izazova limunskom kiselinom i evaluaciju promena na gleđnoj površini pomoću mikroskopa atomskih sila.

4.2.2. Priprema uzoraka gleđi za profilometrijsku analizu posle izlaganja erozivnim rastvorima u različitom vremenskom trajanju

Priprema uzoraka za profilometrijsku analizu izvršena je u skladu sa prethodno opisanim metodologijama [143–146] koje su modifikovane za ovu studiju. Krunice zuba su dijamantskom testerom (sa vodenim hlađenjem) presečene na distalnu, mezijalnu, bukalnu i lingvalnu "četvrtinu". Tako je dobijeno 344 uzoraka od približno 86 zuba (ukoliko je neka "četvrtina" bila oštećena u toku preparacije krunica, zamenjena je presecanjem novog uzorka).

Da bi se olakšalo merenje parametara hrapavosti, napravljeni su kružni kalupi prečnika 16 mm i dubine 3 mm koji su ispunjeni akrilatom. Svaki uzorak je uronjen u smolu, tako da površina gleđi bude dostupna merenju. Posle čišćenja rotacionom četkicom, uzorci su isprani vodom i osušeni vazduhom; zatim su nasumično podeljeni u 14 eksperimentalnih grupa (Tabela 1.) i jednu kontrolnu. Svaka eksperimentalna grupa sastojala se od 24 uzorka, osam za svako vreme izlaganja (15, 30 i 60 min); Osam kontrolnih uzoraka je čuvano u veštačkoj pljuvački.

Eksperimentalni uzorci su imali sledeći tretman: 1) potapanje u 50 ml napitka na sobnoj temperaturi ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) tokom 15, 30 i 60 min, uz povremeno mućkanje; 2) ispiranje sa 5 ml destilovane vode; 3) potapanje u veštačku pljuvačku u trajanju od približno 4h. Ovaj ciklus se ponavljao tri puta dnevno tokom 10 dana. Uzorci su preko noći čuvani u veštačkoj pljuvački. Eksperimentalni rastvori (originalna pakovanja bezalkoholnih i alkoholnih napitaka), u koje su potapani uzorci gleđi, menjana su na 24 sata.

Po završetku eksperimenta, uzorci su ispirani destilovanom vodom, potpuno osušeni i pripremani za analizu hrapavosti erodovane gleđne površine.

Hrapavost erodovanih gleđnih površina je ispitivana stilus-dijamantskim profilometrom, *Mitutoyo SurfTest SJ-301*, analizom parametara hrapavosti R_a , R_q , R_z , R_y koji su prikazani u Tabeli 2 (*International Standards Organization*) [147].

Tabela 2. Parametri za određivanje hrapavosti površine erodovane gleđi

Parametri	Opis
R_a	Aritmetički sredina svih odstupanja neravnina od srednje linije
R_q	Geometrijski sredina svih odstupanja neravnina od srednje linije
R_z	Srednja visina neravnina - prosek od pet uzastopnih merenja maksimalnih i minimalnih vrednosti neravnina na referentnoj dužini
R_y (max)	Najveća visina neravnina - udaljenost između najviše i najniže tačke neravnina na referentnoj dužini

Tačke merenja hrapavosti su nasumično izabrane na površini uzorka. Za svaki uzorak su urađena tri merenja, a zatim je izračunata srednja vrednost koja je uključena u dalju statističku analizu.

Da bi se minimizirala merna sila skeniranja izabran je detektor za koga je pretpostavljeno da odgovara materijalu i obliku predmeta koji se meri (površina gleđi), od 0,75 mN i radijusom vrha merne igle (stilusa) od 2 μ m, koji, prema *Mitutoio SurfTest* SJ - 301 uputstvu, ne izaziva oštećenje na površini uzorka, a pin je kalibrisan neposredno pre testiranja. Merenje je sprovedeno pod sledećim uslovima: temperatura 25°C, brzina kretanja dijamantske merne igle 0.25 mm/s, dužina merne linije 0.5 mm, prelomna tačka (cut-off 2.5mm) [143]. Da bi se isključile moguće greške, merenje površinske hrapavosti je urađeno od strane samo jednog ispitivača.

4.2.3. Statistička obrada podataka

Podaci dobijeni ovim istraživanjem statistički su obrađeni programom *SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences Program – ver. 15.0)*. Rezultati su predstavljani tabelarno.

Kontinualne varijable u istraživanju prikazane su srednjim vrednostima (\bar{X}) i standardnim devijacijama (SD). Ispitivanje normalnosti distribucije kontinualnih varijabli testirano je Šapiro-Vilk testom (*Shapiro-Wilk test*).

Poređenje srednjih vrednosti između dve nezavisne grupe ispitanika vršeno je Studentovim t testom nezavisnih uzoraka (*Student's t Test for Independent Samples*) u slučaju normalnih raspodela, a, ako je distribucija vrednosti odstupa od normalne raspodele, Man-Vitnijevim testom (*Mann-Whitney test*).

Poređenje vrednosti ispitivanih kontinualnih varijabli između svih tipova napitaka vršeno je analizom varijanse (ANOVA) i sledstvenom Post Hoc (*Post Hoc*) analizom (*Tukey HSD Test* u slučaju homogenosti varijansi, a u suprotnom je primenjivan *Dunnet Test*).

Utvrđivanje zavisnosti ispitivanih kontinualnih varijabli od vremena izlaganja utvrđivano je ANOVOM, kada su za sve vrednosti kontinualnih parametara za sve tri dužine ekspozicije raspodele varijabli bile normalne, a u suprotnom slučaju korišćen je Kruskal – Volisov (*Kruskal-Wallis*) test.

Kao prag statističke značajnosti korišćen je nivo greške procene manji od 5% ($p < 0,05$).

4.2.4. Priprema uzoraka gleđi za skening elektron mikroskopsku analizu posle izlaganja erozivnim rastvorima

Početne pripreme uzoraka za SEM analizu su bile slične priprema uzoraka za profilometrijsko ispitivanje, s tim što su krunice ekstrahovanih trećih molara presećane u mezio-distalnom pravcu na vestibularne i oralne polovine. Korišćeno je 120 uzoraka (60 krunica) koji su podeljeni u 14 eksperimentalnih grupa i jednu kontrolnu, tako da je svaka grupa imala po 8 uzoraka. Eksperimentalni uzorci su podvrgavani samo jednom vremenu izlaganja (15 minuta). Za razliku od pripreme za profilometrijsko ispitivanje, uzorci za SEM su odmah po sečenju krunica stavljeni u UZ kupatilo sa vodom da bi se uklonio debris sečenja, a zatim uranjani u kontrolni i eksperimentalne rastvore. Dalja procedura je bila slična kao i kod prethodne pripreme: uzorci su potapani u 50 ml ispitivanog napitka 15 min. na sobnoj temperaturi, tri puta dnevno u trajanju od 10 dana, uz obavezno povremeno mućkanje. Između ciklusa potapanja, uzorci su stajali u veštačkoj pljuvački, koja je služila i kao stalni medijum za osam kontrolnih uzoraka.

Na kraju eksperimenta, uzorci su sušeni na vazduhu, a zatim pričvršćeni za cilindrične nosače sredstvom za fiksiranje (Dotite paint xc 12 Carbon JEOL, Tokio, Japan) uz nanošenje tankog sloja zlata po površini uzorka u uređaju za jonsko raspršivanje (JFC 1100E Ion Sputter JEOL) [148]. Površinska morfologija gleđi je posmatrana i procenjivana na okluzalnim i srednjim trećinama vestibularnih i oralnih strana krunica zuba pomoću SEM (JEOL-JSM-5300) na uvećanju od 500, 2000 i 3500x.

Analizirano je erozivno trošenje gleđne površine (*honeycomb, cobblestone-appearance, atipično nagrizanje*) sa kvantitativnom procenom oštećenja prema scor-sistemu (Tabela 3): [148,149].

Tabela 3. Kriterijum ocenjivanja za evaluaciju SEM mikrografija

OCENA	PROMENE	OPIS PROMENA NA GLEDNOJ POVRŠINI
0	Odsutne	Nepromenjena površina sa prisutnim perikimatama, plitkim ulegnućima, neznatnom izbrazdanošću, razvojnim porama
1	Blage	Iregularna polja sa izraženim ulegnućima i žlebovima, naglašenim brazdama, ali bez demineralizacije prizmatske i/ili interprizmatske gleđi.
2	Umerene	Iregularna polja sa većim brojem pora koje imaju povećan dijametar, prisustva demineralizacija prizmatske/interprizmatske gleđi
3	Teške	Rastvaranje površine gleđi sa dekompozicijom morfologije prizmi

Kvantitativnu procenu erozivnih promena na mikrografijama su procenjivala tri istraživača nezavisno jedan od drugog, ne znajući unapred kojoj grupi uzorak pripada (ocenjivanje na slepo). Ukoliko su isti uzorci dobili različite ocene, konačnom ocenom se smatrala ona sa većom numeričkom vrednošću, pri čemu je bilo potrebno da je označe najmanje dva istraživača.

4.2.5. Statistička obrada podataka

Statistička analiza morfoloških promena gleđne površine, koja je procenjena scor sistemom, urađena je Kruskal-Wallis testom, a Mann-Whitney-U test je korišćen za post hoc poređenja ($p < 0.05$).

4.3. Ispitivanje uticaja različitih komponenti pljuvačke na zaštitni potencijal pelikule od erozivnog oštećenja gleđi

4.3.1. Uzorci pljuvačke

Uzorci pljuvačke, koja je stimulirana žvakanjem komada parafina u trajanju od 10 minuta, prikupljeni su od zdravih dobrovoljaca (studenti Medicinskog fakulteta u Nišu) u jutarnjim satima, dva časa nakon prvog obroka [150]. Volonterima je savetovano da dva puta isperu usta destilovanom vodom pre sakupljanja pljuvačke. Stimulirana pljuvačka je sakupljena u ohlađene bočice koje su čuvane u frižideru dok je trajao postupak prikupljanja. Pljuvačka je, zatim, objedinjena i centrifugirana u trajanju od 20 min na 4°C (4000 g) [151]. Posle centrifugiranja, supernatant je podeljen u alikvotne od 20 ml koji su zaleđeni na - 80°C. Pre upotrebe, zamrznuti uzorci prirodne pljuvačke su odmrzavani na sobnoj temperaturi od 22 ±1 °C u toku istog vremenskog perioda (3 časa) [20,26]. Odmrznuti uzorci pljuvačke su korišćeni za izradu inkubacionih rastvora pomoću kojih je procenjivan uticaj različitih komponenti na zaštitni potencijal pelikule od erozivnog oštećenja gleđi.

Veštačka pljuvačka sa formulacijom: 1,5 mM Ca(NO₃)₂, 0,90 mM KH₂PO₄, 130 mM KCl i 60 mM Tris pufera i sa vrednošću pH= 7,4 [152], korišćena je kao medijum za kontrolne uzorke, kao medijum za eksperimentalne uzorke između demineralizacionih ciklusa, kao rastvor za dijalizu humane pljuvačke i kao jedan od inkubacionih rastvora za procenu zaštitne uloge dentalne pelikule.

4.3.2. Priprema uzoraka pljuvačke dijalizom ukupne stimulirane pljuvačke

Dijaliza ukupne humane stimulirane pljuvačke (HP) je sprovedena ca Mega Pur-A-Lizer™ dijaliznim kompletom sa prorezima membrane od 1 kDa (*PURGI0020, Sigma Aldrich*) da bi se dobili uzorci različitih vrsta pljuvačke, koji su čuvani zamrznuti do erozivnog izazova gleđnih uzoraka limunskom kiselinom.

Uzorci od 20 ml humane pljuvačke su odleđeni i dijalizovani sa veštačkom pljuvačkom ili dejonizovanom vodom.

Dijaliza humane pljuvačke veštačkom pljuvačkom (VP) je izvedena u 2 litra veštačke pljuvačke tokom 48 h na 4°C. Veštačka pljuvačka je menjana nakon 2, 8, 16 i 24h.

Dijaliza dejonizovanom vodom (DV) izvedena je u 5 litara dejonizovane vode u vremenskom trajanju od 72h na 4°C. Voda je menjana nakon 2, 8, 16, 24 i 48h.

Sakupljanjem humane pljuvačke, korišćenjem veštačke pljuvačke i procesom dijalize za ovaj eksperiment su bile dostupne četiri vrste pljuvačke pomoću kojih je procenjivan uticaj različitih komponenti na zaštitni potencijal pelikule od erozivnog oštećenja gleđi. Kontrolni inkubacioni medijum je predstavljala vlažna komora (Tabela 4) [26].

1. Ukupna humana stimulisana (centrifugirana) pljuvačka (HP)
2. Veštačka pljuvačka koja sadrži samo jone (VP)
3. Humana pljuvačka dijalizovana sa veštačkom pljuvačkom koja sadrži i salivarne proteine i jone (HP/VP) i
4. Humana pljuvačka dijalizovana sa dejonizovanom vodom koja sadrži samo salivarne proteine bez jona (HP/DV)

Tabela 4. Distribucija jona i proteina u inkubacionim rastvorima

Grupa	Inkubacioni rastvor - pljuvačka	Metod dijalize	Kalcijum i fosfat joni	Proteini
Kontrola	Vlažna komora	-	-	-
HP	Humana stimulisana (centrifugirana) pljuvačka	-	++	+
VP	Veštačka pljuvačka	-	+	-
HP/VP	Humana stimulisana (centrifugirana) pljuvačka	Veštačka pljuvačka	+	+
HP/DV	Humana stimulisana (centrifugirana) pljuvačka	Dejonizovana voda	U tragovima	+

Novopripremljeni uzorci pljuvačke su zaleđeni na -80°C u količinama od 1,85 ml i tako čuvani sve do nastavka eksperimentalnog protokola.

4.3.3. Priprema uzoraka gleđi za inkubacione rastvore i erozivni izazov limunskom kiselinom i njihova analiza mikroskopom atomskih sila

Ukupno 40 uzoraka gleđi je pripremljeno od impaktiranih umnjaka presecanjem krunica zuba na bukalne i lingvalne polovine. Za razliku od pripreme za profilometrijsko ispitivanje, gde su kalupi sa akrilatom služili kao čvrsta podloga koja sprečava pomeranje uzorka i olakšava

merenje hrapavosti dijamantskim stilusom, u ovoj pripremi su korišćena dva kalupa (identičnog prečnika koji su postavljeni jedan iznad drugog) sa ciljem obezbeđivanja ravnomernog poliranja uzoraka [26]. Uzorci (polovine krunica) su uranjeni u kalupe ispunjene akrilatom sa gleđnom stranom okrenutom prema gore. Tanji (gornji) kalupi (debljine 200 nm) su uklonjeni i uzorci su polirani korišćenjem rotacionih abrazivnih silicijum karbidnih šmirglica i šajbni finoće 18,3, 10 i 5-6 μm . Poliranje je nastavljeno i nakon uklanjanja debljih kalupa primenom dijamantske paste i fine tkanine, a vršeno je pod stalnim hlađenjem. Posle poliranja, uzorci su čuvani u fiziološkom rastvoru do sledećeg postupka u eksperimentu. Pred sam nastavak eksperimenta, uzorci su dodatno polirani dijamantskom pastom finoće 1nm pod stalnim hlađenjem. Između poliranja i nakon finalnog poliranja, svi uzorci sa akrilatnom podlogom su dodatno čišćeni u vodenom ultrazvučnom kupatilu. Posle ispiranja, uzorci su nasumično podeljeni u 5 grupa (n=8) za svaki inkubacioni rastvor (Tabela 4): vlažna komora (kontrola, K grupa), humana ukupna stimulisana (centrifugirana) pljuvačka (HP grupa), veštačka pljuvačka (VP grupa), HP dijalizovana sa veštačkom pljuvačkom (HP/VP grupa) i HP dijalizovana sa dejonizovanom vodom (HP/DV grupa) [26].

Dalji eksperiment se sastojao od četiri ciklusa inkubacije-erozije. Jedan ciklus je podrazumevao pojedinačno uranjanje uzoraka gleđi 1h u 1,8 ml odgovarajućeg inkubacionog rastvora (pljuvačke) u vodenom kupatilu sa mešanjem (70 obrt/min) na 37⁰C (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany). Kontrolna grupa je stajala u vlažnoj komori 1h na 37⁰C. Nakon toga, uzorci su ispirani dejonizovanom vodom i osušeni vazduhom.

Uzorci su zatim podvrgnuti erozivnom izazovu koji se sastojao od pojedinačnog potapanja uzoraka u 10 ml limunske kiseline (1%, pH 3,6) u vodenom kupatilu sa mešanjem (70 obrt/min) u trajanju od 3 min na 25⁰C (P-D Industriegesellschaft mbH Prüfgerätewerk, Dresden, Germany). Ukupno vreme izlaganja uzoraka kiselini je iznosilo 12 minuta. Nakon toga, uzorci su ispirani tekućom vodom i osušeni vazduhom. [26].

Procena topografije površine uzoraka je vršena pomoću mikroskopije atomskih sila korišćenjem MAS model *AutoProbe CP-Research SPM* (TM Microscopes-Bruker). Merenja su rađena u kontaktnom modu. Dobijene su slike u tri nasumično odabrane oblasti za površinu od $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, brzinom 0,9 Hz, sa rezolucijom od 256×256 piksela, pomoću maksimalne kontaktne sile od 2,5 N. Na osnovu dobijenih slika, merene su prosečne vrednosti hrapavosti (R_a i R_q) za svaku skeniranu oblast. Za obradu rezultata korisceni su softveri Image Processing and Data Analysis Version 2.1.15 i SPMLab Analysis, DI SPMLab NT Ver. 6.0.2.

4.3.4. Institucije u kojima je obavljeno istraživanje

1. Odeljenje za bolesti zuba, Klinika za dentalnu medicinu Niš, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu
2. Naučnoistraživački centar za biomedicinu, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu
3. Institut za biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu
4. Laboratorija za mašinske materijale, Mašinski fakultet, Univerzitet u Nišu
5. Centar za mikroelektronske tehnologije, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

5. REZULTATI

5.1. Rezultati merenja pH i TK

Početne pH vrednosti analiziranih napitaka i titrabilna kiselost su izražene kao srednje vrednosti trostrukog merenja \pm standardna devijacija (Tabela 5).

Tabela 5. Vrednosti inicijalne pH i titrabilna kiselost do pH 5,5 i 7,0

	Analizirano piće	Inicijalna pH	Titrabilna kiselost do pH	
			5,5	7,0
1.	Coca Cola	2,56 \pm 0,06	0,54 \pm 0,05	1,73 \pm 0,07
2.	Schweppes Bitter Lemon	2,54 \pm 0,03	2,72 \pm 0,05	4,37 \pm 0,05
3.	Sprite	2,71 \pm 0,04	1,87 \pm 0,03	2,85 \pm 0,06
4.	Guarana No Sleep	2,51 \pm 0,03	3,24 \pm 0,03	4,96 \pm 0,05
5.	Red Bull	3,32 \pm 0,08	3,27 \pm 0,05	5,21 \pm 0,04
6.	Isodrinx Isotonic Sports Drink	3,43 \pm 0,02	1,55 \pm 0,03	2,41 \pm 0,05
7.	Aqua Viva Recharge (crvena pomorandža) Strong	3,18 \pm 0,03	1,84 \pm 0,06	3,14 \pm 0,04
8.	Life Premium 100% voćni sok pomorandža	3,82 \pm 0,04	4,28 \pm 0,03	5,83 \pm 0,05
9.	Sok od aronije	4,04 \pm 0,04	0,71 \pm 0,03	1,08 \pm 0,05
10.	Zaječarsko svetlo pivo	3,96 \pm 0,05	0,64 \pm 0,05	1,59 \pm 0,07
11.	Crveno vino Kratošija	3,49 \pm 0,05	1,82 \pm 0,04	2,34 \pm 0,03
12.	Belo vino Rizling	3,02 \pm 0,06	2,69 \pm 0,03	3,18 \pm 0,05
13.	Zeleni čaj*	6,64 \pm 0,02	/	0,13 \pm 0,03
14.	Crni čaj*	6,61 \pm 0,04	/	0,12 \pm 0,02

Inicijalna pH vrednost za većinu ispitivanih napitaka je bila ispod 5,5. *Guarana No sleep* i *Schweppes Bitter Lemon* su imali najniže prosečne vrednosti pH (2,51 \pm 0,03 i 2,54 \pm 0,03). Zeleni i crni čaj su pokazali nešto niže vrednosti pH od neutralne (6,64 \pm 0,02 i 6,61 \pm 0,04). Kisela pića sa najvišom izmerenom inicijalnom pH i statistički značajnom razlikom u odnosu na neutralnu pH vrednost su voćni sokovi: *Life Premium 100% voćni sok pomorandža*

($3,82 \pm 0,04$) i sok od aronije ($4,04 \pm 0,04$). Nije bilo statistički značajne razlike između napitaka u okviru pojedinih grupa.

U okviru merenja TK *Coca-Cola* je pokazala brzi odgovor pri dodavanju NaOH od samo 0,54 ml da bi se dostigla pH vrednost od 5,5 što je i najniža izmerena vrednost TK i 1,73 ml da bi se dostigla pH do 7,0. Sok od narandže je imao najveću TK, sa 4,28 ili 5,83 ml NaOH da bi se dostigle ekvivalentne vrednosti pH.

5.2. Rezultati merenja parametara hrapavosti erodovanih gleđnih površina stylus profilometom

Kao što smo već naglasili, podaci dobijeni ovim istraživanjem statistički su obrađeni programom SPSS 15.0 (*Statistical Package for the Social Sciences Program – ver. 15.0*). Rezultati su predstavljani tabelarno.

Kontinualne varijable u istraživanju prikazane su srednjim vrednostima (\bar{X}) i standardnim devijacijama (SD). Ispitivanje normalnosti distribucije kontinualnih varijabli testirano je Šapiro-Vilk testom (*Shapiro-Wilk test*).

Poređenje srednjih vrednosti između dve nezavisne grupe ispitanika vršeno je Studentovim t testom nezavisnih uzoraka (*Student's' t Test for Independent Samples*) u slučaju normalnih raspodela, a, ako je distribucija vrednosti odstupa od normalne raspodele, Man-Vitnijevim testom (*Mann-Whitney test*).

Poređenje vrednosti ispitivanih kontinualnih varijabli između svih tipova napitaka vršeno je analizom varijanse (ANOVA) i sledstvenom Post Hok (*Post Hoc*) analizom (*Tukey HSD Test* u slučaju homogenosti varijansi, a u suprotnom je primenjivan *Dunnet Test*).

Utvrdjivanje zavisnosti ispitivanih kontinualnih varijabli od vremena izlaganja utvđivano je ANOVOM, kada su za sve vrednosti kontinualnih parametara za sve tri dužine ekspozicije raspodele varijabli bile normalne, a u suprotnom slučaju korišćen je Kruskal–Volisov (*Kruskal-Wallis*) test.

Kao prag statističke značajnosti korišćen je nivo greške procene manji od 5% ($p < 0,05$).

Tabela 6. Vrednosti parametara hrapavosti površine gleđi u odnosu na vrstu pića - vreme izlaganja 15 min

Parametri hrapavosti	Vrsta pića			
	a. Coca-Cola	b. Schweppes	c. Sprite	d. Guarana
R _a	3,90±0,86	3,60±0,86	3,60±0,51	3,55±0,52
R _q	4,33±1.16	4,29±1,12	4,32±0,72	4,55±1,34
R _z	11,36±2.68	8,65±2,87	11,14±3,06	11,43±6,93
R _y	12,42±2.36	15,18±4,43	16,01±3,54	13,77±9,65
	e. Red Bull	f. Iso	g. Aqua Viva	h. Sok od narandže
R _a	3,87±0.41	3,26±0,99	3,04±0,90	3,56±1,05
R _q	4,86±0.86	4,01±1,45	3,82±1,27	4,12±1,12
R _z	17,66±7.12	8,61±3,55	9,75±2,95	12,82±4,06
R _y	18,82±6.35	12,46±5,29	14,70±4,26	15,51±5,63
	i. Sok od aronije	j. Pivo	k. Crveno vino	l. Belo vino
R _a	2,33±0.47 ^{ae**}	2,37±0,95 ^{ae**}	2,63±1,00	2,79±0,71
R _q	2,82±0.53 ^{e**}	2,80±0,95 ^{e**}	3,23±1,20	3,26±0,88
R _z	7,18±2.25	6,99±2,48	11,12±5,29	7,71±1,84
R _y	9,92±1.88	10,01±2,74	15,76±8,17	12,24±3,99
	m. Zeleni čaj	n. Crni čaj		
R _a	1,92±0.50 ^{f*bcdh**ae***}	2,13±0,35 ^{bcdh*ae***}		
R _q	2,54±0.71 ^{acd*e**}	2,51±0,47 ^{abc*de**}		
R _z	6,86±1.90	7,67±3,41		
R _y	10,75±2.37	10,64±3,35		

Parametri hrapavosti su dati kao srednja vrednost (X)±standardna devijacija (SD) ANOVA: F_{Ra}=6,39 (p<0,001), F_{Rq}=4,80 (p<0,001), F_{Rz}=4,49 (p<0,001), F_{Ry}=2,22 (p<0,05) (značajnost zavisnosti parametra hrapavosti od tipa napitka – najviša je za R_a, a najniža za R_y) a – vs Coca Cola, b – vs Schweppes, c – vs Sprite, d – vs Guarana, e – vs Red Bull, f – vs ISO, h – vs Sok od narandže Post Hoc Tests (Tukey HSD Test, Dunnet Test): * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

U uzorcima koji su eksponirani 15 minuta generalno najviše vrednosti svih parametara hrapavosti utvrđene su kod *Red Bull* napitka. Od ovog generalizovanog stanovišta odstupa parametar R_a koji je minimalno više vrednosti kod *Coca-Cole*, ali sa znatno višom vrednošću standardne devijacije. Najniže vrednosti parametara R_a i R_z su u uzorcima zelenog čaja, R_q uzorcima crnog čaja, a R_y u uzorcima sa sokom aronije.

Parametar hrapavosti R_a statistički značajno zavisi od tipa napitka, $F_{Ra}=6,39$, $p<0,001$ (ANOVA).

Zapaža se da je R_a visokih vrednosti kod uzoraka u gaziranim napicima (*Red Bull*, *Coca-Cola*, *Schweppes*, *Sprite*, *Guarana*) slede uzorci u soku od narandže i *ISO* sportskom napitku. Nakon toga uzorci u sportskom napitku *Aqua Viva Recharge*, zatim u crvenom i belom vinu, pa potom u soku od aronije, pivu, te crnom i zelenom čaju. Vrednosti R_a kreću se u rasponu od $1,92\pm 0,50$ (zeleni čaj) do $3,90\pm 0,86$ (*Coca-Cola*).

Sledstvenom Post Hoc analizom Tukey HSD testom utvrđene su statistički značajno niže vrednosti R_a kod uzoraka u zelenom čaju u odnosu na aroniju ($p<0,05$), *Schweppes*, *Sprite*, *Guaranu* i sok od narandže ($p<0,01$), a najizraženije u odnosu na *Coca-Cola* i *Red Bull* ($p<0,001$).

Statistički značajno niže vrednosti R_a kod uzorka u crnom čaju utvrđene su u odnosu na *Schweppes*, *Sprite*, *Guaranu* i sok od narandže ($p<0,05$), a na nivou statističke značajnosti $p<0,001$ u odnosu na *Coca-Colu* i *Red Bull*.

Kod uzoraka u aroniji kao i pivu R_a je statistički značajno niže vrednosti u odnosu na uzorke u *Coca-Coli* i *Red Bull*-u ($p<0,01$).

Parametar hrapavosti R_q takođe statistički značajno zavisi od tipa napitka, $F_{Rq}=4,80$, $p<0,001$ (ANOVA).

R_q je visokih vrednosti kod uzoraka u gaziranim napicima (*Red Bull*, *Guarana*, *Coca-Cola*, *Sprite*, *Schweppes*) slede uzorci u soku od narandže i *ISO* sportskom napitku. Nakon toga uzorci u sportskom napitku *Aqua Viva Recharge*, zatim u crvenom i belom vinu, pivu, pa potom u soku od aronije, zelenom i crnom čaju. Vrednosti R_a kreću se u rasponu od $2,51\pm 0,50$ (crni čaj) do $4,86\pm 0,86$ (*Red Bull*).

Tukey HSD testom u sledstvenoj Post Hoc analizi utvrđene su statistički značajno niže vrednosti R_q kod uzoraka u crnom čaju u odnosu na *Coca-Colu*, *Schweppes* i *Sprite* ($p<0,05$), kao u odnosu na *Guaranu* i *Red Bull* ($p<0,01$). Niže vrednosti ovog parametra utvrđene su i kod uzoraka u zelenom čaju u odnosu na *Coca-Colu*, *Sprite* i *Guaranu* ($p<0,05$) i *Red Bull* ($p<0,01$).

Uzorci u soku od aronije imaju statistički značajno niže vrednosti R_q u odnosu na one u *Red Bull-u* ($p < 0,01$).

I parametar hrapavosti R_z takođe statistički značajno zavisi od tipa napitka, $F_{R_z}=4,49$, $p < 0,001$ (ANOVA), Ipak, sledstvenom Post Hoc analizom, Dunnet testom nisu utvrđene statistički značajne razlike pri međusobnom poređenju uzoraka u različitim napicima. R_z je najviši kod uzoraka u *Red Bull-u*, soku od narandže, *Guarani*, *Coca-Cola*, *Sprite*, crvenom vinu, pa tek potom u *Aqua Viva Recharge*, *Schweppes*, *ISO*, belom vinu. Vrednosti R_z kreću se od $6,86 \pm 1,90$, kod zelenog čaja, do $17,66 \pm 7,12$, kod *Red Bull-a*.

Parametar hrapavosti R_y takođe statistički značajno zavisi od tipa napitka u kome su uzorci, ali statistički manje izraženo $F_{R_y}=2,22$, $p < 0,05$ (ANOVA). Ni u slučaju ovog parametra Dunnet testom nisu utvrđene statistički značajne razlike pri međusobnom poređenju uzoraka u različitim napicima. I ovde je najviše vrednosti kod uzoraka u *Red Bull-u* ($18,82 \pm 6,35$), potom u *Sprite*, crvenom vinu, soku od narandže, *Schweppes-u*, *Aqua Viva Recharge-u*, *Guarani*, *ISO*, *Coca-Coli*, belom vinu, zelenom čaju, crnom čaju, pivu, a najmanja vrednost je kod uzoraka u soku od aronije ($9,92 \pm 1,88$).

Na osnovu ANOVE, poredeći vrednosti F, kao i nivoe značajnosti, možemo konstatovati da svi ispitivani parametri hrapavosti statistički zavise od tipa napitka u kome su uzorci, ali da ta zavisnost najizraženija kod parametra hrapavosti R_a , a najmanje izražena kod parametra R_y .

Tabela 7. Vrednosti parametara hrapavosti površine gleđi u odnosu na vrstu pića - vreme izlaganja 30 min

Parametri hrapavosti	Vrsta pića			
	a. Coca-Cola	b. Schweppes	c. Sprite	d. Guarana
R _a	4,86±1,33	4,44±0,93	4,03±1,57	3,86±1,00
R _q	5,61±1,17	5,18±1,07	4,94±2,00	4,90±1,45
R _z	14,31±4,74	17,03±2,40	14,38±8,01	14,12±5,50
R _y	16,70±3,61	19,31±1,35	19,61±10,76	19,81±8,17
	e. Red Bull	f. ISO	g. Aqua Viva	h. Sok od narandže
R _a	4,03±0,24	3,60±0,55	3,33±1,85	5,29±1,10
R _q	5,74±0,27	4,41±0,77	4,16±2,37	5,84±1,34
R _z	13,95±2,36	14,53±5,39	11,72±4,39	19,61±7,33
R _y	18,70±2,68	17,56±3,76	16,66±8,50	20,01±7,46
	i. Sok od aronije	j. Pivo	k. Crveno vino	l. Belo Vino
R _a	2,38±0,69 ^{ab*eh**}	2,53±0,79 ^{be*h**}	2,73±0,89 ^{h*}	3,05±0,80 ^{h*}
R _q	2,81±1,10 ^{b*ah**}	2,80±1,10 ^{abh*}	3,30±0,95 ^{ah*}	3,52±1,04
R _z	8,30±2,19 ^{e*b***}	8,19±3,01 ^{b**}	9,24±4,04 ^{b*}	10,45±2,34 ^{b**}
R _y	10,93±2,01 ^{e**b***}	11,59±2,76 ^{be**}	13,64±4,47	15,38±3,40
	m. Zeleni čaj	n. Crni čaj		
R _a	2,28±0,17 ^{ab*fh**e***}	2,31±1,12 ^{h**}		
R _q	2,91±0,38 ^{bfn*a***e***}	2,80±1,30 ^{ah*}		
R _z	6,95±2,02 ^{e**b***}	7,80±3,52 ^{b**}		
R _y	10,37±2,82 ^{f*e**b***}	10,79±4,94		

Parametri hrapavosti su dati kao srednja vrednost (X)±standardna devijacija (SD) ANOVA: F_{Ra}=7,25 (p<0,001), F_{Rq}=6,05 (p<0,001), F_{Rz}=5,79 (p<0,001), F_{Ry}=3,57 (p<0,001) (značajnost zavisnosti parametra hrapavosti od tipa napitka – najviša je za R_a, a najniža za R_y) a – vs Coca-Cola, b – vs Schweppes, e – vs Red Bull, f – vs ISO, h – vs Sok od narandže, Post Hoc Tests (Dunnet Test): * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Najviše vrednosti svih parametara hrapavosti u uzorcima koji su eksponirani 30 minuta utvrđene su za sok od narandže. Najniže vrednosti parametara R_a , R_z i R_y utvrđene su u uzorcima sa zelenim čajem, dok su veoma slične najniže vrednosti R_q dobijeni za uzorke u pivu i crnom čaju.

Parametar hrapavosti R_a statistički značajno zavisi od tipa napitka, $F_{R_a}=7,25$, $p<0,001$ (ANOVA).

Pored uzoraka u soku od narandže, R_a je najviših vrednosti kod uzoraka u gaziranim napicima (*Coca-Cola*, *Schweppes*, *Red Bull*, *Sprite*, *Guarana*, *ISO*), slede uzorci u sportskom piću *Aqua Viva Recharge*, a zatim u belom i crvenom vinu, potom pivu, soku od aronije, te crnom i zelenom čaju. Vrednosti R_a kreću se u rasponu od $2,28\pm 0,17$ (zeleni čaj) do $5,29\pm 1,10$ (sok od narandže).

Sledstvenom Post Hoc analizom Dunnet testom utvrđene su statistički značajno niže vrednosti R_a kod uzoraka u zelenom čaju u odnosu na *Coca-Colu* i *Schweppes* ($p<0,05$), *ISO* i sok od narandže ($p<0,01$) i najizraženije u odnosu na *Red Bull* ($p<0,001$).

Statistički značajno niže vrednosti R_a kod uzorka u crnom čaju utvrđene su u odnosu na sok od narandže ($p<0,01$).

Kod uzoraka u aroniji statistički značajno niže vrednosti R_a su u odnosu na uzorke u *Coca-Coli* i *Schweppes-u* ($p<0,05$), *Red Bull-u* i soku od narandže ($p<0,01$). Statistički značajno niže vrednosti R_a u uzorcima piva su u odnosu na uzorke u *Schweppes-u* i *Red Bull-u* ($p<0,05$), kao i soku od narandže ($p<0,01$). U odnosu na uzorke u soku od narandže statistički značajno su niže i vrednosti R_a uzoraka u belom, kao i u crvenom vinu ($p<0,05$).

R_q parametar hrapavosti statistički takođe značajno zavisi od tipa napitka, $F_{R_q}=6,05$, $p<0,001$ (ANOVA).

R_q je osim kod uzoraka u soku od narandže visokih vrednosti i kod uzoraka u gaziranim napicima (*Red Bull*, *Coca-Cola*, *Schweppes*, *Sprite*, *Guarana*, *ISO*), slede uzorci u sportskom piću *Aqua Viva Recharge*, zatim u belom i vinu, pa potom u zelenom čaju, soku od aronije, crnom čaju i pivu. Vrednosti R_q kreću se u rasponu od $2,80\pm 1,10$ (pivo), odnosno $2,80\pm 1,30$ (crni čaj) do $5,84\pm 1,34$ (sok od narandže).

Dunnet testom u sledstvenoj Post Hoc analizi utvrđene su statistički značajno niže vrednosti R_q kod uzoraka u crnom čaju i pivu u odnosu na *Coca-Colu* i sok od narandže, a u slučaju uzoraka u pivu i u odnosu na uzorke u *Coca-Coli* ($p<0,05$). Kod uzoraka u zelenom čaju utvrđene su statistički niže vrednosti ovog parametra u odnosu na uzorke u *Schweppes-u*, *ISO*, soku od narandže ($p<0,05$), *Coca-Coli* ($p<0,01$) i *Red Bull-u* ($p<0,001$). Uzorci u soku od

aronije imaju statistički značajno niže vrednosti R_q u odnosu na one u *Schweppes-u* ($p < 0,05$), kao i u odnosu na one u *Coca-Coli*, *Red Bull-u* i soku od narandže ($p < 0,01$). R_q u uzorcima sa crvenim vinom statistički je značajno niži u odnosu na ovaj parametar u uzorcima sa *Coca-Colom* i sokom od narandže ($p < 0,05$).

Parametar hrapavosti R_z takođe statistički značajno zavisi od tipa napitka, $F_{R_z} = 5,79$, $p < 0,001$ (ANOVA). Vrednosti R_z kreću se od $6,95 \pm 2,02$, kod zelenog čaja, do $19,61 \pm 7,33$, kod soka od narandže. Sledstvenom Post Hoc analizom, Dunnet testom u uzorcima zelenog čaja utvrđene su statistički značajne razlike pri poređenju sa uzorcima *Red Bull-a* ($p < 0,05$) i *Schweppes-a* ($p < 0,001$), dok su vrednosti R_z u uzorcima soka od aronije statistički značajno niže nego u uzorcima *Red Bull-a* ($p < 0,05$) i *Schweppes-a* ($p < 0,001$). U odnosu na vrednosti R_z u uzorcima sa *Schweppes-om*, statistički su takođe značajno niže vrednosti ovog parametra u uzorcima sa crvenim vinom ($p < 0,05$), kao i u uzorcima sa pivom, belim vinom i crnim čajem ($p < 0,001$).

Kao i prethodna tri i parametar hrapavosti R_y takođe statistički značajno zavisi od tipa napitka u kome su uzorci, $F_{R_y} = 3,57$, $p < 0,001$ (ANOVA). I ovde je najviše vrednosti kod uzoraka u soku od narandže ($20,01 \pm 7,46$), slede uzorci sa *Guaranom*, *Sprite*, *Schweppes-om*, *Red Bull-om*, *ISO*, *Coca-Colom* i sportskim pićem *Aqua Viva Recharge*, a potom sa belim vinom, crvenim vinom, pivom, te crnim i zelenim čajem, što je najniža vrednost $10,37 \pm 2,82$. Dunnet testom utvrđeni je da su u uzorcima u zelenom čajju statistički značajno niže vrednosti u odnosu na uzorke sa napitkom *ISO* ($p < 0,05$), *Red Bull-om* ($p < 0,01$) i *Schweppes-om* ($p < 0,001$). R_y u uzorcima sa pivom statistički je značajno niži u odnosu na uzorke sa *Red Bull-om* ($p < 0,01$) i *Schweppes-om* ($p < 0,001$). R_y u uzorcima sa pivom, kao i sa sokom aronije statistički je značajno niži u odnosu na uzorke sa *Red Bull-om* ($p < 0,01$), kao i *Schweppes-om* – $p < 0,01$ pri poređenju sa uzorcima sa pivom, odnosno $p < 0,001$ pri poređenju sa uzorcima sa sokom aronije.

Poredeći vrednosti F (ANOVA), može se konstatovati da svi ispitivani parametri hrapavosti statistički zavise od tipa napitka u kome su uzorci i da je ta zavisnost najizraženija za parametar hrapavosti R_a , a najmanje izražena za parametar R_y .

Tabela 8. Vrednosti parametara hrapavosti površine gleđi u odnosu na vrstu pića - vreme izlaganja 60 min

Parametri hrapavosti	Vrsta pića			
	a. Coca-Cola	b. Schweppes	c. Sprite	d. Guarana
R _a	6,06±1,97	4,52±1,02	4,32±0,32	5,30±1,47
R _q	7,31±2,71	5,54±1,40	5,09±0,32	7,23±2,94
R _z	22,35±13,39	14,67±4,60	11,87±2,97	19,91±7,61
R _y	26,87±13,01	22,39±8,52	12,70±2,42 ^{e*}	23,51±10,88
	e. Red Bull	f. ISO	g. Aqua Viva	h. Sok od narandže
R _a	5,32±1,01	4,09±1,61	3,81±1,59	6,03±1,53
R _q	5,84±1,53	4,90±1,85	4,53±1,99	6,89±1,80
R _z	14,22±3,02	15,64±6,76	12,72±7,38	22,06±5,42 ^{c*}
R _y	22,76±4,84	20,63±8,58	17,49±8,54	23,71±6,27
	i. Sok od aronije	j. Pivo	k. Crveno vino	l. Belo vino
R _a	3,59±0,55	2,65±1,04 ^{h*e**}	2,91±1,34 ^{h*}	3,53±0,41
R _q	4,51±0,62	3,67±1,47	3,56±1,51	3,89±0,45 ^{c**}
R _z	13,79±2,80	16,69±3,39	10,48±4,33 ^{h*}	10,31±1,78 ^{h^j*}
R _y	17,43±2,90	15,91±7,54	15,11±5,47	11,38±2,02 ^{hⁱ*e**}
	m. Zeleni čaj	n. Crni čaj		
R _a	2,40±0,54 ^{abdil*ch**c***}	2,46±0,71 ^{abd*ceh**}		
R _q	3,02±0,68 ^{behⁱ*c**}	3,37±1,66		
R _z	8,55±2,24 ^{h^j**}	9,75±4,25 ^{h*}		
R _y	11,34±3,13 ^{h*c**}	13,38±6,92		

Parametri hrapavosti su dati kao srednja vrednost (X)±standardna devijacija (SD) ANOVA: F_{Ra}=8,92 (p<0,001), F_{Rq}=5,92 (p<0,001), F_{Rz}=4,70 (p<0,001), F_{Ry}=4,01 (p<0,001) (značajnost zavisnosti parametra hrapavosti od tipa napitka – najviša je za R_a, a najniža za R_y) a – vs Coca-Cola, b – vs Schweppes, e – vs Red Bull, f – vs ISO, h – vs sok od narandže, Post Hoc Tests (Dunnet Test): * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Među uzorcima koji su eksponirani 60 minuta najviše vrednosti svih parametara hrapavosti utvrđene su za *Coca-Colu*, a najniže za zeleni čaj.

R_a parametar hrapavosti zavisi statistički značajno od tipa napitka, $F_{R_a}=8,92$, $p<0,001$ (ANOVA).

Posle uzoraka u *Coca-Coli*, gde je najviša vrednost ($6,06\pm 1,97$). R_a je visokih vrednosti u uzorcima u soku od narandže, a potom kod gaziranih napitaka *Red Bull-u*, *Guarani*, *Schweppes-u*, *Sprite*, *ISO*, te u sportskom piću *Aqua Viva Recharge*, posle čega slede uzorci u soku od aronije, po vrednosti vrlo blisko njemu u belom vinu, a potom u crvenom vinu, pivu, crnom i na kraju najniže vrednosti je u zelenom čaju $2,40\pm 0,54$ (zeleni čaj).

Sledstvenom Post Hoc analizom Dunnet testom utvrđene su statistički značajno niže vrednosti R_a kod uzoraka u zelenom čaju u odnosu na *Coca-Colu*, *Schweppes*, *Guaranu*, sok od aronije i crveno vino ($p<0,05$), *Red Bull* i sok od narandže ($p<0,01$) i najizraženije u odnosu na *Sprite* ($p<0,001$).

Statistički značajno niže vrednosti R_a kod uzorka u crnom čaju utvrđene su u odnosu na *Coca-Colu*, *Schweppes* i *Guaranu* ($p<0,05$), kao i u odnosu na *Sprite*, *Red Bull* i *ISO* ($p<0,01$).

Kod uzoraka u pivu statistički su značajno niže vrednosti R_a u odnosu na uzorke u soku od narandže ($p<0,05$) i *Red Bull-u* ($p<0,01$). Vrednost R_a u uzorcima belog vina statistički značajno su niže no u uzorcima soku od narandže ($p<0,05$).

Parametar hrapavosti R_q takođe statistički značajno zavisi od tipa napitka, $F_{R_q}=5,92$, $p<0,001$ (ANOVA).

R_q je najviše vrednosti kod uzoraka u *Coca-Coli* ($7,31\pm 2,71$), posle čega slede sok od narandže, a zatim *Red Bull*, *Guarana*, *Schweppes*, *Sprite*, *ISO*, a potom uzorci u mineralnoj vodi te u soku od aronije, belom vinu, pivu, crvenom vinu, crnom čaju, dok je najniža vrednost u uzorcima zelenog čaja ($3,02\pm 0,68$).

U sledstvenoj Post Hoc analizi, Dunnet testom, utvrđene su statistički značajno niže vrednosti R_q kod uzoraka u zelenom čaju u odnosu na *Schweppes*, *Red Bull*, sok od narandže i sok od aronije ($p<0,05$), kao i u odnosu na uzorke u *Sprite* ($p<0,01$). R_q u uzorcima belog vina statistiki je značajno niže vrednosti u odnosu na uzorke u napitku *Sprite* ($p<0,01$).

Takođe, parametar hrapavosti R_z statistički značajno zavisi od tipa napitka, $F_{R_z}=4,70$, $p<0,001$ (ANOVA). Vrednosti R_z kreću se od $8,55\pm 2,24$, kod uzoraka zelenog čaja, do $22,35\pm 13,39$ kod uzoraka u *Coca-Coli*. Posle *Coca-Cole*, najviše vrednosti su u soku od narandže, *Guarani*, pivu, *ISO*, *Schweppes-u*, *Red Bull-u*, soku od aronije, *Aqua Viva Recharge*, crvenom i belom vinu, te u crnom i zelenom čaju. Sledstvenom Post Hoc analizom, Dunnet

testom u uzorcima zelenog čaja utvrđene su statistički niže vrednosti soka od narandže i piva ($p < 0,01$). U odnosu na uzorke soka od narandže statistički značajno su niže vrednosti i u uzorcima crnog čaja, crvenog i belog vina ($p < 0,05$). R_z u uzorcima belog vina statistički je značajno niži i u odnosu na uzorke u pivu ($p < 0,05$).

I parametar hrapavosti R_y takođe statistički značajno zavisi od tipa napitka u kome su uzorci, $F_{R_y} = 4,01$, $p < 0,001$ (ANOVA). Kao što je već rečeno, najviše vrednosti je kod uzoraka u *Coca-Coli* ($26,87 \pm 13,01$), slede uzorci sa sokom od narandže, *Guaranom*, *Red Bull-om*, *Schweppes-om*, *ISO*, *Aqua Viva Recharge-om*, sokom od aronije, pivom, crvenim vinom, crnim čajem, *Sprite*, belim vinom, a najniža vrednost je u uzorcima sa zelenim čajem ($11,34 \pm 3,13$). Dunnet testom, u sledstvenoj Post Hoc analizi kod uzoraka sa zelenim čajem, ali i belim vinom utvrđene su statistički značajno niže vrednosti u poređenju sa uzorcima u soku od narandže ($p < 0,05$) i *Red Bull-om* ($p < 0,01$). Niže vrednosti u uzorcima sa belim vinom su i u odnosu na uzorke sa sokom od aronije ($p < 0,05$). R_y u uzorcima sa *Sprite* takođe je statistički značajno niže vrednosti u odnosu na uzorke u *Red Bull-u* ($p < 0,01$).

I u ovom slučaju se na osnovu vrednosti F (ANOVA), može konstatovati da svi ispitivani parametri hrapavosti statistički zavise od tipa napitka u kome su uzorci i da je ta zavisnost najizraženija za R_a , a najmanje izražena za parametar R_y .

Tabela 9. Vrednosti parametra hrapavosti površine gleđi R_a u odnosu na vreme izlaganja piću

Vreme izlaganja	Vrsta pića			
	a. Coca-Cola	b. Schweppes	c. Sprite*	d. Guarana
15	3,90±0,86 ^{a***}	3,60±0,86 ^{a***}	3,60±0,51 ^{a***}	3,55±0,52 ^{a***}
30	4,86±1,33 ^{a***}	4,44±0,93 ^{a***}	4,03±1,57 ^{a***}	3,86±1,00 ^{a***}
60	6,06±1,97 ^{a***b*}	4,52±1,02 ^{a***}	4,32±0,32 ^{a***b**}	5,30±1,47 ^{a** b*}
	e. Red Bull ^{***}	f. ISO	g. Aqua Viva	h. Sok od narandže ^{**}
15	3,87±0,41 ^{a***}	3,26±0,99 ^{a**}	3,04±0,90 ^{a***}	3,56±1,05 ^{a***}
30	4,03±0,24 ^{a***}	3,60±0,55 ^{a***}	3,33±1,85 ^{a***}	5,29±1,10 ^{a***b**}
60	5,32±1,01 ^{a***bc**}	4,09±1,61 ^{a***}	3,81±1,59 ^{a***}	6,03±1,53 ^{a***b*}
	i. Sok od aronije ^{***}	j. Pivo	k. Crveno vino	l. Belo vino
15	2,33±0,47 ^{a**}	2,37±0,95 ^{a*}	2,63±1,00 ^{a**}	2,79±0,71 ^{a**}
30	2,38±0,69 ^{a*}	2,53±0,79 ^{a**}	2,73±0,89 ^{a**}	3,05±0,80 ^{a**}
60	3,59±0,55 ^{ab*** c**}	2,65±1,04	2,91±1,34 ^{a*}	3,53±0,41 ^{a***b*}
	m. Zeleni čaj	n. Crni čaj	Kontrolna grupa	
15	1,92±0,50	2,13±0,35 ^{a**}	1,68±0,18	
30	2,28±0,17	2,31±1,12		
60	2,40±0,54 ^{a**}	2,46±0,71 ^{a*}		

Parametri hrapavosti su dati kao srednja vrednost (X)±standardna devijacija (SD)

a – vs Control group, b – vs 15 min, c – vs 30 min

(ANOVA, Kruskal-Wallis Test, Student's t Test for Independent Samples, Man-Whitney test)

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Vrednost koeficijenta hrapavosti R_a generalno su veće kada je vreme izloženosti duže. Statistički značajna zavisnost R_a od vremena izloženosti utvrđena je kod uzoraka u *Sprite* ($p < 0.05$), soku od narandže ($p < 0,01$), a naročito soku od aronije i *Red Bull-u* ($p < 0,001$).

Poređenjem koeficijenata R_a između uzoraka istog napitka, ali različitog vremena izloženosti utvrđena je statistički značajna razlike između uzoraka soka od narandže izloženih 30 u odnosu na one izložene 15 minuta ($p < 0,01$). Najznačajnije statističke razlike uočavaju se pri poređenju uzoraka izloženih 15 min. u odnosu na one izložene 60 minuta. To je slučaj kod uzoraka *Coca-Cole*, *Guarane*, soka od narandže, soka od aronije i belog vina ($p < 0,05$), potom *Sprite* i *Red Bull-a* ($p < 0,01$), a najznačajnija je kod soka od aronije ($p < 0,001$). Uočavaju se i razlike između uzoraka izloženih 30 i 60 minuta i to kod uzoraka u *Red Bull-u* i soku od aronije ($p < 0,01$).

Izuzev u slučaju uzoraka u crnom čaju koji je izložen 30 minuta i zelenog istog trajanja izloženosti, zelenog čaja izloženog 15 i uzoraka u pivu izloženih 60 minuta, vrednosti koeficijenta hrapavosti statistički su značajno više u odnosu na kontrolu, sa nivoima značajnosti datim u Tabeli 9.

Tabela 10. Vrednosti parametra hrapavosti površine gleđi R_q u odnosu na vreme izlaganja piću

Vreme izlaganja	Vrsta pića			
	a. Coca-Cola	b. Schweppes	c. Sprite	d. Guarana*
15	4,33±1,16 ^{a***}	4,29±1,12 ^{a***}	4,32±0,72 ^{a***}	4,55±1,34 ^{a***}
30	5,61±1,17 ^{a***}	5,18±1,07 ^{a***}	4,94±2,00 ^{a***}	4,90±1,45 ^{a***}
60	7,31±2,71 ^{a***}	5,54±1,40 ^{a***}	5,09±0,32 ^{a***b*}	7,23±2,94 ^{a***bc*}
	e. Red Bull	f. ISO	g. Aqua Viva	h. Sok od narandže**
15	4,86±0,86 ^{a***}	4,01±1,45 ^{a**}	3,82±1,27 ^{a***}	4,12±1,12 ^{a***}
30	4,74±0,27 ^{a***}	4,41±0,77 ^{a***}	4,16±2,37 ^{a***}	5,84±1,34 ^{a***b*}
60	5,84±1,53 ^{a***b*c*}	4,90±1,85 ^{a***}	4,53±1,99 ^{a***}	6,89±1,81 ^{a***b*}
	i. Sok od aronije***	j. Pivo	k. Crveno vino	l. Belo vino
15	2,82±0,53 ^{a**}	2,80±0,95	3,23±1,20 ^{a**}	3,26±0,88 ^{a**}
30	2,81±0,79 ^{a*}	2,80±1,10 ^{a*}	3,30±0,95 ^{a***}	3,52±1,04 ^{a**}
60	4,51±0,62 ^{a***bc***}	3,67±1,47 ^{a**}	3,56±1,51 ^{a*}	3,89±0,45 ^{a***b*}
	m. Zeleni čaj	n. Crni čaj	Kontrolna grupa	
			2,09±0,24	
15	2,53±0,71	2,51±0,47 ^{a*}		
30	2,91±0,38	2,80±1,30		
60	3,02±0,68 ^{a**}	3,37±1,66		

Parametri hrapavosti su dati kao srednja vrednost (X)±standardna devijacija (SD)

a – vs Control group, b – vs 15 min, c – vs 30 min

(ANOVA, Kruskal-Wallis Test, Student's 't' Test for Independent Samples, Man-Whitney test)

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

I u slučaju koeficijenta hrapavosti R_q njegove vrednost su veće kada je vreme izloženosti duže. Statistički značajna zavisnost R_q od vremena izloženosti utvrđena je kod uzoraka u *Guarane*, ($p < 0,05$), soka od narandže ($p < 0,01$), a posebno u soku od aronije ($p < 0,001$).

Poređenjem koeficijenata hrapavosti R_q između uzoraka istog napitka, različitog vremena izloženosti, utvrđena je statistički značajna razlike između uzoraka izloženih 30 u odnosu na one izložene 15 minuta za sok od narandže ($p < 0,05$). Najznačajnije statističke razlike uočavaju se pri poređenju uzoraka izloženih 15 min. u odnosu na one izložene 60 minuta, kod uzoraka *Sprite*, soka od narandže, i belog vina ($p < 0,05$), a još značajnija je kod *Red Bull-a* ($p < 0,01$) i soka od aronije ($p < 0,001$). Postoje i razlike između uzoraka izloženih 30 i 60 minuta: kod uzoraka *Guarane*, *Red Bull-a* ($p < 0,05$) i soku od aronije ($p < 0,001$).

Izuzev u slučaju uzoraka u pivu trajanja izloženosti 15 min, zelenog čaja 15 i 30 minuta i crnog čaja 30 i 60 minuta vrednosti koeficijenta hrapavosti R_q statistički su značajno više u odnosu na kontrolu, sa nivoima značajnosti datim u Tabeli 10.

Tabela 11. Vrednosti parametra hrapavosti površine gleđi R_z u odnosu na vreme izlaganja piću

Vreme izlaganja	Vrsta pica			
	a. Coca-Cola*	b. Schweppes***	c. Sprite	d. Guarana
15	11,36±2,68 a***	8,65±2,87 a***	11,14±3,06 a***	11,43±6,93 a***
30	14,31±4,74 a***	17,03±2,40 ab***	14,38±8,01 a***	14,12±5,50 a**
60	22,35±13,39 a***	14,67±4,60 a***b**	11,87±2,97 a***	19,91±7,61 a***
	e. Red Bull	f. ISO*	g. Aqua Viva	h. Sok od narandže*
15	17,66±7,12 a**	8,61±3,55 a*	9,75±2,95 a***	12,82±4,06 a***
30	13,95±2,36 a***	14,53±5,39 a***b*	11,72±4,39 a***	19,61±7,33 a***
60	14,22±3,02 a***	15,64±6,76 a***b**	12,72±7,38 a***	22,06±5,42 a***b**
	i. Sok od aronije**	j. Pivo***	k. Crveno vino	l. Belo vino*
15	7,18±2,25 a**	6,99±2,48 a**	11,12±5,29 a**	7,71±1,84 a***
30	8,30±2,19 a***	8,19±3,01 a**	9,24±4,04 a**	10,45±2,34 a***b*
60	13,79±2,80 ac***b**	16,69±3,39 ac***b**	10,48±4,33 a**	10,31±1,78 a***b**
	m. Zeleni čaj	n. Crni čaj	Kontrolna grupa	
			4,72±1,23	
15	6,86±1,90 a*	7,67±3,41 a**		
30	6,95±2,02 a**	7,80±3,52 a*		
60	8,55±2,24 a***	9,75±4,25 a**		

Parametri hrapavosti su dati kao srednja vrednost (X)±standardna devijacija (SD)

a – vs Control group, b – vs 15 min, c – vs 30 min

(ANOVA, Kruskal-Wallis Test, Student's' t Test for Independent Samples, Man-Whitney test)

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Vrednosti hrapavosti R_z su u većini uzoraka veće kada je vreme izloženosti duže, ali ne u slučaju svih ispitivanih napitaka. Naime uočava se da to nije u potpunosti slučaj kod uzoraka u *Schweppes-u*, *Sprite*, *Red Bull-u*, crvenom vinu, pa delimično i u belom vinu. Statistički značajna zavisnost R_z od vremena izloženosti ustanovljena je kod *Coca-Cole*, *ISO*, soka od narandže i belog vina na nivou od $p < 0.05$, zatim kod soka od aronije ($p < 0,01$), a najizraženije u slučaju *Schweppes-a* i piva ($p < 0,001$).

Poređenjem koeficijenata R_z između uzoraka istog napitka, različitog vremena izloženosti utvrđena je statistički značajna razlike između uzoraka izloženih 30 u odnosu na one izložene 15 minuta *ISO*, belo vino ($p < 0,05$), a najznačajnije za *Schweppes* ($p < 0,05$). Statistički razlike uočavaju se pri poređenju uzoraka izloženih 15 u odnosu na one izložene 60 minuta za *Schweppes*, *ISO*, sok od narandže, sok od aronije, pivo i belo vino ($p < 0,01$). U slučaju soka od aronije i piva utvrđene su statistički značajne razlike između uzoraka izloženih 30 i 60 minuta ($p < 0,01$).

U slučaju uzoraka svih napitaka, bez obzira na trajanje izloženosti vrednosti koeficijenta hrapavosti R_z statistički su značajno više u odnosu na kontrolu, sa nivoima značajnosti datim u Tabeli 11.

Tabela 12. Vrednosti parametra hrapavosti površine gleđi R_y u odnosu na vreme izlaganja piću

Vreme izlaganja	Vrsta pića			
	a. Coca-Cola ^{**}	b. Schweppes	c. Sprite	d. Guarana ^{**}
15	12,42±2,36 ^{a***}	15,18±4,43 ^{a***}	16,01±3,54 ^{a***}	13,77±9,65 ^{***}
30	16,70±3,61 ^{a***b*}	19,31±1,35 ^{a***b*}	19,61±10,76 ^{a***}	19,81±8,17 ^{a***b*}
60	26,87±13,01 ^{a***b*}	22,39±8,52 ^{a***}	12,70±2,42 ^{a***b*}	23,51±10,88 ^{a***b*}
	e. Red Bull	f. Iso	g. Aqua Viva	h. Sok od narandže
15	18,82±6,35 ^{a**}	12,46±5,29 ^{a*}	14,70±4,26 ^{a***}	15,51±5,63 ^{a***}
30	18,70±2,68 ^{a***}	17,56±3,76 ^{a***}	16,66±8,50 ^{a***}	20,01±7,46 ^{a***}
60	22,76±4,84 ^{a***}	20,63±8,58 ^{a***b*}	17,49±8,54 ^{a***}	23,71±6,27 ^{a***b*}
	i. Sok od aronije ^{***}	j. Pivo	k. Crveno vino	l. Belo vino
15	9,92±1,88 ^{a**}	10,01±2,74 ^{a**}	15,76±8,17 ^{a*}	12,24±3,99 ^{a**}
30	10,93±2,01 ^{a***}	11,59±2,76 ^{a***}	13,64±4,47 ^{a***}	15,38±3,40 ^{a***}
60	17,43±2,90 ^{a***bc***}	15,91±7,54 ^{a**}	15,11±5,47 ^{a**}	11,38±2,02 ^{a***c*}
	m. Zeleni čaj	n. Crni čaj	Kontrolna grupa	
			7,31±1,28	
15	10,75±2,37 ^{a**}	10,64±3,35 ^{a**}		
30	10,37±2,82 ^{a**}	10,79±4,94		
60	11,34±3,13 ^{a**}	13,38±6,92 ^{a*}		

Parametri hrapavosti su dati kao srednja vrednost (X)±standardna devijacija (SD)

a – vs Control group, b – vs 15 min, c – vs 30 min

(ANOVA, Kruskal-Wallis Test, Student's 't' Test for Independent Samples, Man-Whitney test)

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Iako su vrednosti hrapavosti R_y u većini uzoraka veće kada je vreme izloženosti duže, to ipak nije slučaj kod uzoraka u *Red Bull-u*, crvenom i belom vinu, delimično i kod zelenog čaja. Statistički značajna zavisnost R_y od trajanja izloženosti ustanovljena je kod *Coca-Cole*, *Guarane* ($p < 0,01$) i soka od aronije ($p < 0,001$).

Poređenjem koeficijenta R_y između uzoraka istog napitka, ali različitog vremena izloženosti utvrđena je statistički značajna razlike između uzoraka izloženih 30 i 15 minuta za *Coca-Colu*, *Schweppes* i *Guaran-u* ($p < 0,05$). Pri poređenju uzoraka izloženih 15 u odnosu na one izložene 60 minuta za utvrđene su statistički značajne razlike za *Coca-Colu*, *Sprite*, *ISO*, sok od narandže ($p < 0,05$), a posebno za sok od aronije ($p < 0,05$). Statistički značajne razlike između uzoraka izloženih 30 i 60 minuta utvrđene su kod uzoraka u belom vinu ($p < 0,05$) i soku od aronije ($p < 0,001$).

Izuzev u uzorcima u crnom čaju koji su izloženi 30 minuta u slučaju uzoraka svih ostalih napitaka, za sva trajanja izloženosti vrednosti koeficijenta hrapavosti R_y statistički su značajno više u odnosu na kontrolu, sa nivoima značajnosti prikazanim u Tabeli 12.

5.3. Rezultati SEM istraživanja

Srednja ocena morfoloških promena ustanovljenih na gleđnoj površini posle različitih erozivnih izazova prikazana je na Tabeli 13.

Tabela 13. Srednja ocena morfoloških promena na gleđnoj površini posle različitih erozivnih izazova

Coca-Cola	Schweppes Bitter Lemon	Sprite	Guarana No Sleep	Red Bull	Isodrinx Isotonic Sports Drink	Aqua Viva Recharge (crvena pomorandža) STRONG	Life Premium 100% voćni sok pomorandža	Sok od aronije	Zajechaarsko svetlo pivo	Crveno vino	Belo vino	Zeleni čaj*	Crni čaj*
2,625	2,5	2,5	2,375	2,75	2,375	2,25	2,5	1,75	0,75	1,25	1,375	0,125	0,25
±0,52	±0,53	±0,53	±0,52	±0,46	±0,74	±0,71	±0,53	±0,46	±0,46	±0,46	±0,52	±0,35	±0,46

Ustanovljeno je da najveću prosečnu ocenu imaju uzorci koji su bili izloženi *Red Bull* napitku ($2,75 \pm 0,46$), a najmanju oni koji su potopljeni u *zeleni čaj* ($0,125 \pm 0,35$).

Kruskal Wallis test (neparametrijska ANOVA) pokazuje da se svi uzorci izloženi ispitivanim napicima (uključujući i kontrolnu grupu) značajno razlikuju.

Srednje ocene morfoloških promena na svim uzorcima su pojedinačno testirane u odnosu na kontrolnu grupu korišćenjem Mann-Whitney testa, koji ukazuje da se samo uzorci izloženi zelenom i crnom čaju ne razlikuju značajno od kontrolne grupe (Tabela 14).

Tabela 14. Statistička značajnost srednjih ocena morfoloških promena na uzorcima gleđi eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu grupu

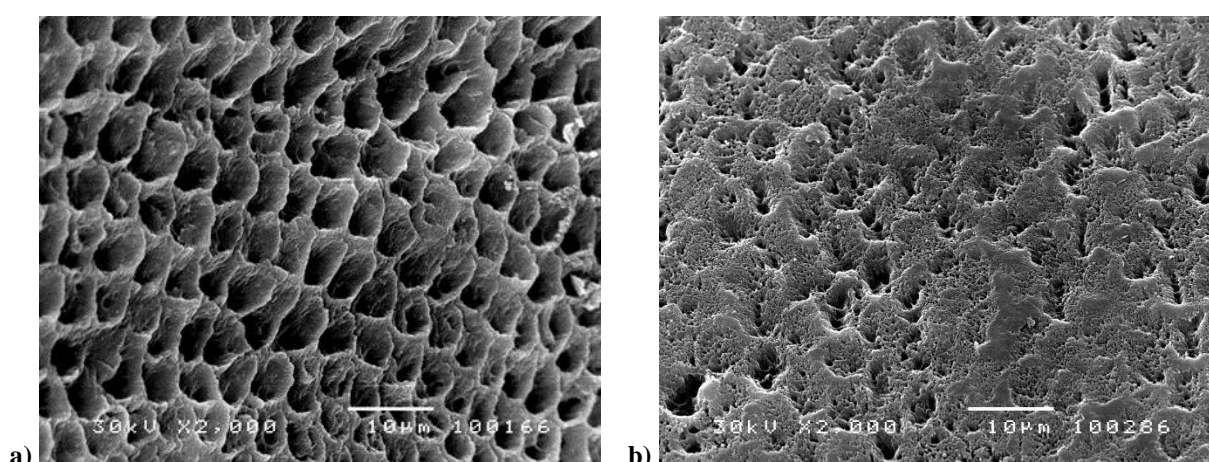
	Eksperimentalne grupe	Statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu	
		Z	p
I	Coca-Cola	3,664	p<0,0001
II	Schweppes Bitter Lemon	3,651	p<0,0001
III	Sprite	3,651	p<0,0001
IV	Guarana No Sleep	3,664	p<0,0001
V	Red Bull	3,703	p<0,0001
VI	Isodrinx Isotonic Sports Drink	3,633	p<0,0001
VII	Aqua Viva Recharge (crvena pomorandža)	3,633	p<0,0001
VIII	Life Premium 100% voćni sok pomorandža	3,651	p<0,0001
IX	Sok od aronije	3,703	p<0,0001
X	Zaječarsko svetlo pivo	3,001	p<0,005
XI	Crveno vino	3,703	p<0,0001
XII	Belo vino	3,664	p<0,0001
XIII	Zeleni čaj*	1,001	p>0,05 n.s.
XIV	Crni čaj*	1,464	p>0,05 n.s.

Srednje ocene morfoloških promena na uzorcima svih grupa su pojedinačno testirane u odnosu na uzorke sa najvećom prosečnom ocenom (*Red Bull*) i uzorke sa najmanjom prosečnom ocenom (*zeleni čaj*). Mann-Whitney test je pokazao da ipak nije postojala značajna razlika između uzoraka potopljenih u *Coca-Colu*, *Schweppes*, *Sprite*, *Guaranu*, *Isodrinx Isotonic Sport Drink*, *Aqua Viva Recharge (crvenu pomorandžu)* i *Life Premium 100% voćni sok od pomorandže*, kao ni ovih uzoraka pojedinačno u odnosu na *Red Bull*. Statistički značajne razlike su postojale između uzoraka potopljenih u *sok od aronije*, *pivo*, *crveno* i *belo vino* u odnosu na *Red Bull*, dok, između nabrojanih uzoraka nije ustanovljena značajna razlika. *Zeleni* i *crni čaj* nisu erodovali površinu gleđi i srednje ocene uzoraka potopljenih u ove napitke se nisu međusobno značajno razlikovale, ali je postojala statistička značajnost u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe (Tabela 15).

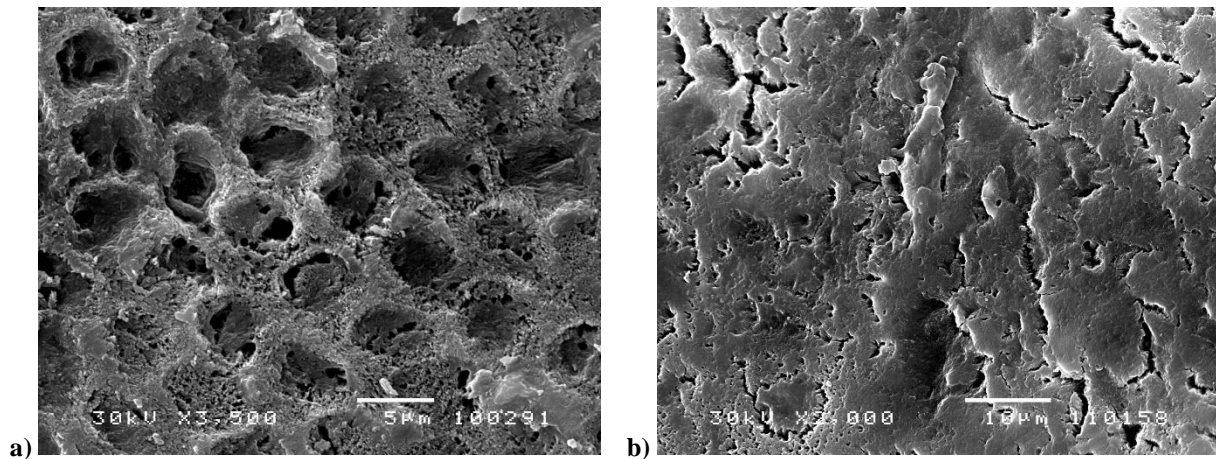
Tabela 15. Statistička značajnost srednjih ocena morfoloških promena na uzorcima gleđi eksperimentalnih grupa u odnosu na uzorke izložene *Red Bull-u* i *zelenom čaju*

Eksperimentalne grupe		Statistička značajnost u odnosu na			
		Red Bull		Zeleni čaj	
		Z	p	Z	p
I	Coca-Cola	0,522	p>0,05 n.s.	3,578	p<0,0001
II	Schweppes Bitter Lemon	1,001	p>0,05 n.s.	3,566	p<0,0001
III	Sprite	1,001	p>0,05 n.s.	3,566	p<0,0001
IV	Guarana No Sleep	1,464	p>0,05 n.s.	3,578	p<0,0001
V	Red Bull			3,614	p<0,0001
VI	Isodrinx Isotonic Sports Drink	1,108	p>0,05 n.s.	3,496	p<0,0001
VII	Aqua Viva Recharge (crvena pomorandža)	1,554	p>0,05 n.s.	3,496	p<0,0001
VIII	Life Premium 100% voćni sok pomorandža	1,001	p>0,05 n.s.	3,366	p<0,0001
IX	Sok od aronije	3,009	p<0,005	3,510	p<0,0001
X	Zaječarsko svetlo pivo	3,554	p<0,0001	2,440	p<0,05
XI	Crveno vino	3,354	p<0,005	3,335	p<0,005
XII	Belo vino	3,229	p<0,005	3,340	p<0,005
XIII	Zeleni čaj*	3,614	p<0,0001		
XIV	Crni čaj*	3,554	p<0,0001	0,620	p>0,05 n.s.

Ovo istraživanje je pokazalo sve tipove nagrizanja kiselinom koji su opisani u literaturi (88,202), osim tipa 5 (demineralizacija površine gleđi sa dominacijom ravnih, glatkih polja). Prisutan je bio tip 1 - demineralizacija centara prizmi koja daje gleđi izgled pčelinjeg saća - *honeycomb appearance*, tip 2 - demineralizacija periferije prizmi koja daje gleđi izgled kaldrme ili riblje krljušti - *cobblestone appearance*; tip 3 - kombinacija tipa 1 i 2, i tip 4 koji daje površini atipičan izgled, bez morfoloških osobina karakterističnih za gleđne prizme, tako da gleđna površina ima izgled mape, slagalice, mreže (slike 2 i 3).



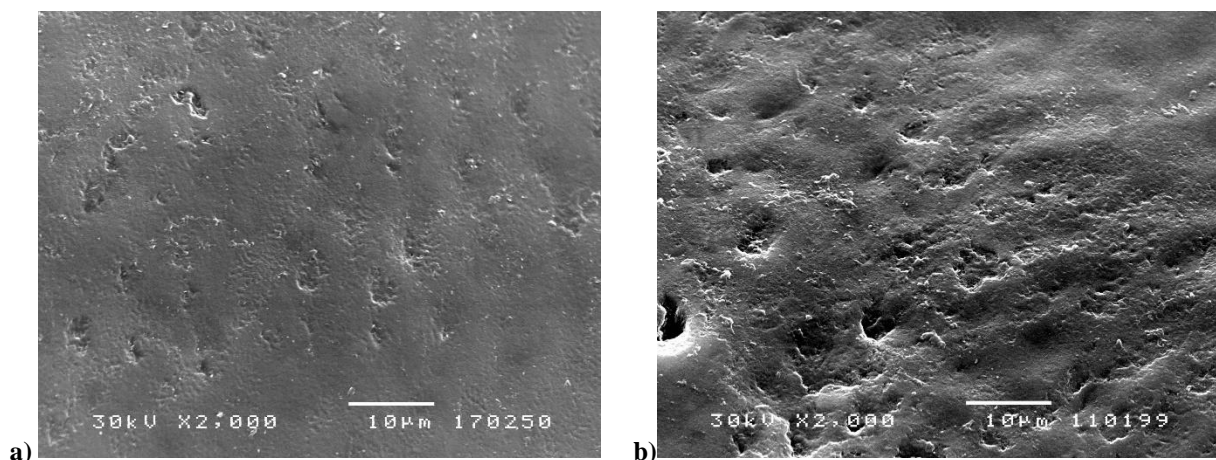
Slika 2. a) SEM mikrografija gleđne površine sa tipom 1 nagrizanja (*Coca-Cola*), uvećanje 2000x; b) SEM mikrografija gleđne površine sa dominacijom tipom 2 nagrizanja (*ISO sports drink*); uvećanje 2000x



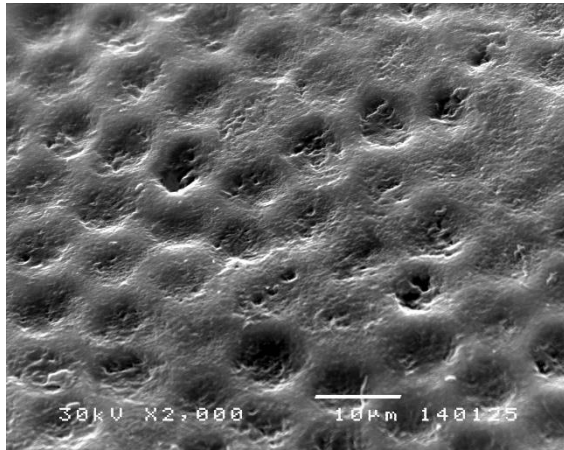
Slika 3. a) SEM mikrografija gleđne površine sa tipom 3 nagrizanja (kombinacija tipa 1 i 2). Sitnozrnasti kristali prekrivaju veliko polje demineralizovane i prizmatske i interprizmatske supstance (*Red Bull*), uvećanje 3500x; b) SEM mikrografija gleđne površine sa tipom 4 nagrizanja: gingivalna trećina gleđne površine posle erozivnog dejstva napitka *Life Premium 100% voćni sok pomorandža*, uvećanje 2000x.

Da bi se odredio intenzitet nastalih morfoloških promena, bilo je potrebno uvesti scor – skalu sa deskriptivnim ocenama koje bi omogućile procenu oštećenja na gleđnoj površini posle različitih erozivnih izazova. Na osnovu literaturnih podataka [153] usvojen je scor-sistem ocenjivanja (od 0 do 3) koji je modifikovan i prilagođen ciljevima postavljenim u ovoj studiji (opisan u poglavlju *Materijal i metode*).

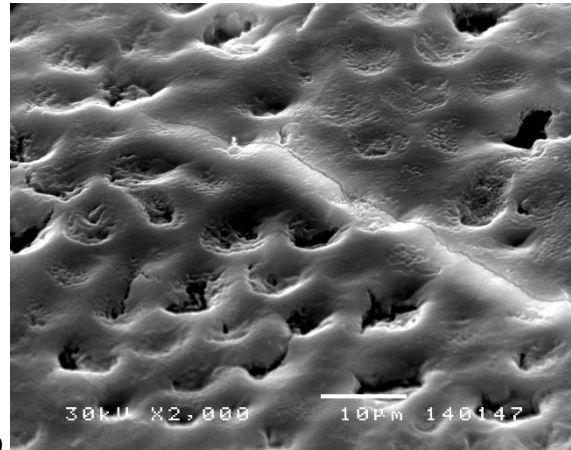
Scor-sistem se nije "poklapao" sa tipovima nagrizanja (koji su prikazani kroz kvalitativnu analizu), već su predstavljali pokušaj "kvantitativnog" prikaza promena na gleđnoj površini koja je bila izložena različitim, manje ili više kiselim rastvorima (slike od 6-9). U istraživanju su procenjivane samo srednje i okluzalne trećine; mikrografije gingivalnih trećina su samo notirane i nisu dobijale ocene po scor sistemu.



Slika 4. SEM mikrografije gleđne površine sa ocenom 0; a) površina gleđi je neizmenjena; jedva uočljivo prisustvo perikimata, plitkih ulegnuća, razvojnih pora (2000x); b) Uzorak sa izraženim ulegnućima i porama, bez znakova ikakve erozije (2000x);

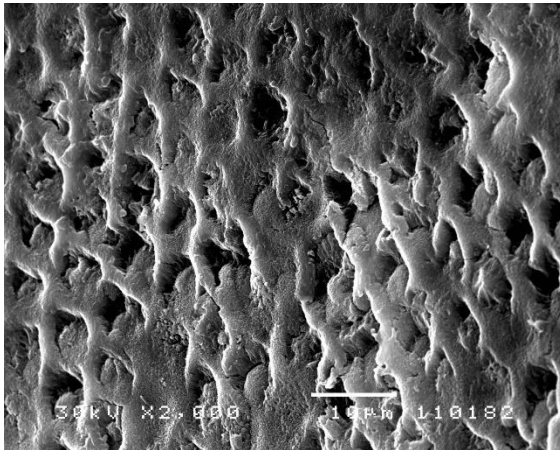


a)

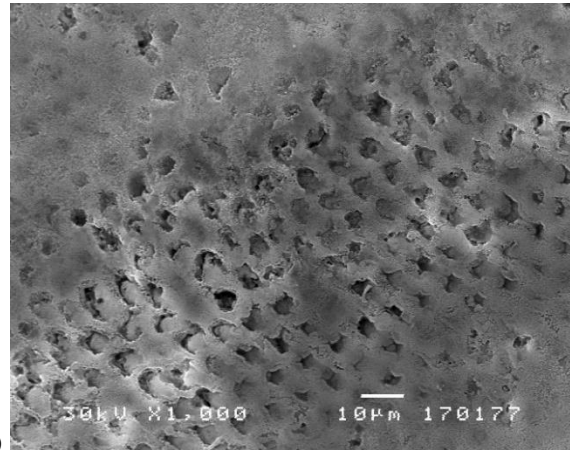


b)

Slika 5. SEM mikrografija gledne površine sa ocenom 1; a) iregularno polje sa ulegnućima povećane dubine, ali bez demineralizacije prizmatične i interprizmatične gleđi, uvećanje 2000x; b) osim povećane dubine gleđnih iregularnosti, uočava se prisustvo žlebova i brazdi, uvećanje 2000x

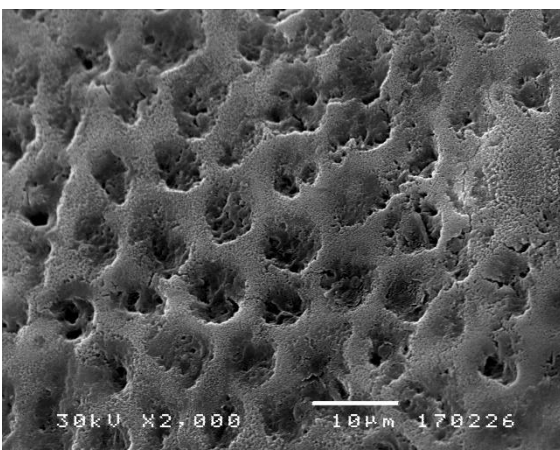


a)

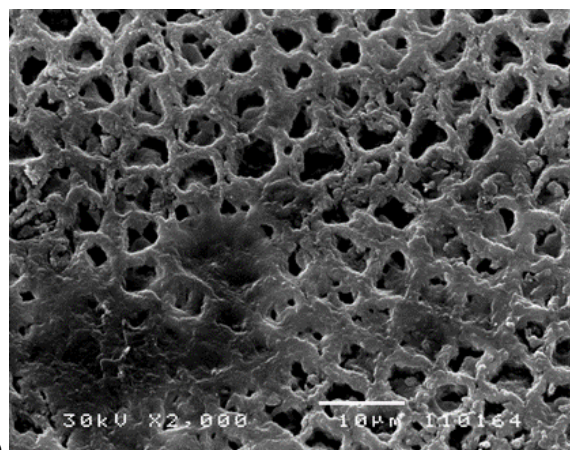


b)

Slika 6. SEM mikrografije gledne površine sa ocenom 2; Izražena iregularnost sa znacima erozije; a) demineralizacija intraprizmatske supstance, uvećanje 2000x; b) demineralizacija interprizmatske supstance, uvećanje 1000x.



a)

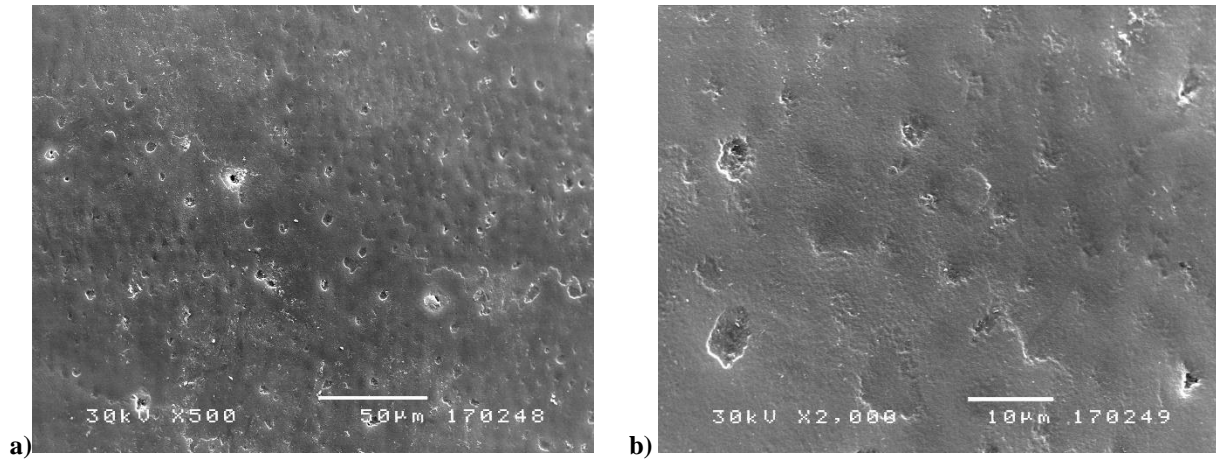


b)

Slika 7. SEM mikrografije gledne površine sa ocenom 3. Difuzna demineralizacija gleđi sa dekompozicijom morfologije prizmi a) jasno vidljivi globularni kristali u interprizmatskim poljima i "vlaknasti" kristali u centralnim delovima prizmi, uvećanje 2000x; b) intenzivno oštećenje gleđne površine sa rastvaranjem inter i intraprizmatske supstance, uvećanje 2000x

Kontrolna grupa

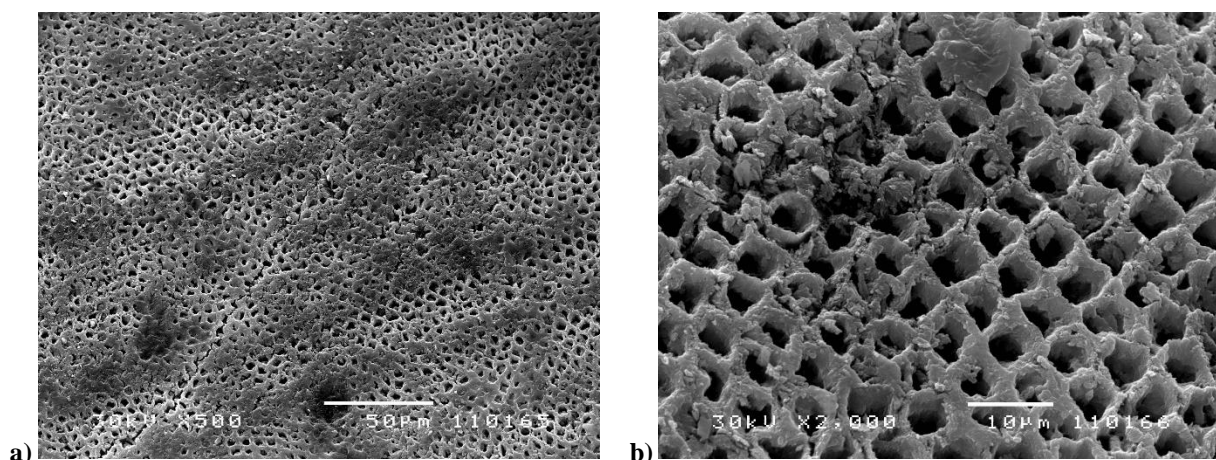
Na glednim površinama, koje nisu bile izložene eksperimentalnim rastvorima, uočavale su se tipične strukture zdrave gleđi: perikimate, pritke brazde i udubljenja, gleđne pore (Slika 8).



Slika 8. SEM mikrografije površine gleđi *kontrolnog uzorka*; a) prisutna je neznatna površinska iregularnost, plitka udubljenja i razvojne pore. Uočavaju se i perikimate, uvećanje 500x; b) isti uzorak na uvećanju 2000x.

Grupa I – Coca-Cola

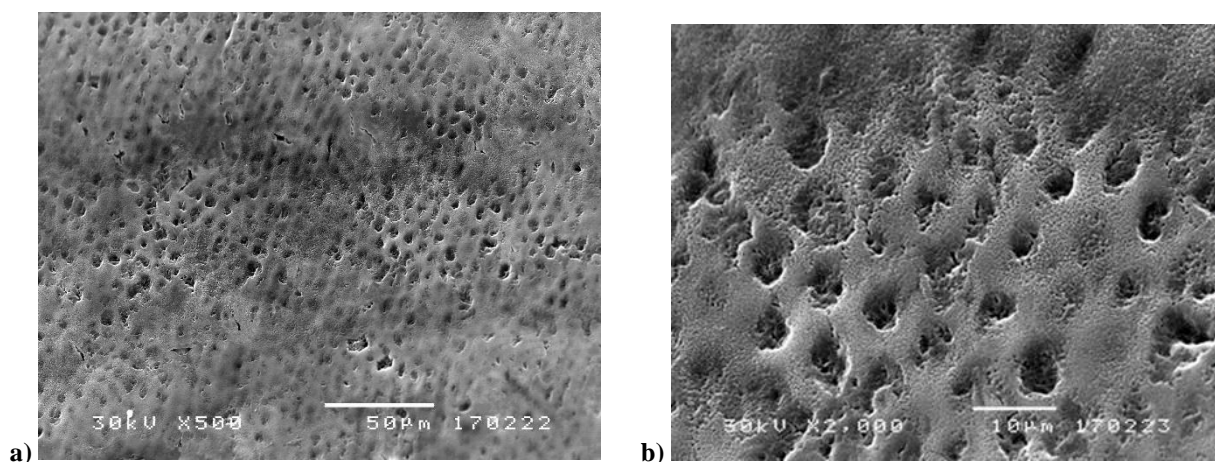
Površina gleđi izložena *Coca-Cola* napitku pokazala je znatne promene strukture (Slika 9). Nakon 450 minuta ukupnog izlaganja ovom erozivnom rastvoru može se uočiti "honeycomb" model površinske erozije, što ukazuje na predominantno rastvaranje jezgara gleđnih prizmi. **Pet uzoraka ove grupe je dobilo najvišu ocenu.** Prema Mann-Whitney testu, srednje vrednosti ocena ove grupe su se statistički razlikovale od ocena koje su dodeljene uzorcima grupa od IX do XIV, kao i od uzoraka kontrolne grupe.



Slika 9. SEM mikrografija površine gleđi nakon izlaganja *Coca-Cola* napitku; a) "honeycomb" model površinske erozije sa pretežnom razgradnjom jezgara prizmi uz izlaganje interprizmatske gleđi (500x); b) isti uzorak na uvećanju 2000x

Grupa II - Schweppes Bitter Lemon

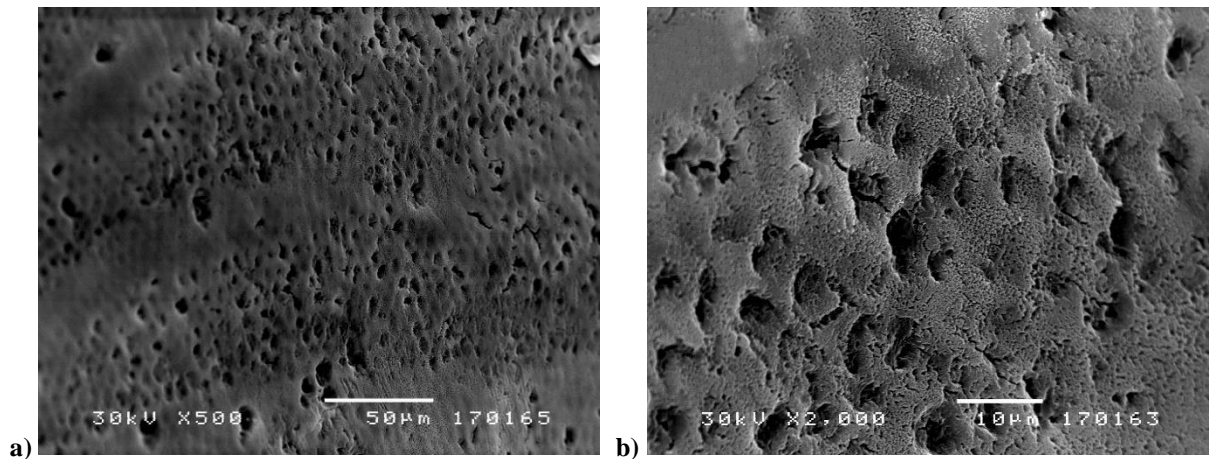
U ovoj grupi su zapažene promene koje su po scor-sistemu bile slične promenama nađenim na uzorcima I grupe, ali je morfološki model ovih promena bio drugačiji; iregularnost gleđne površine se ogledala u povećanju broja i veličine pora, kao i prisustvu brojnih pukotina. Na većem uvećanju dobijena je slika aprizmatične gleđi sa sitnozrnastom strukturom i brojni "krateri" sa oštećenim obodom i delimično razorenim središtem (Slika 10). **Sa četiri uzorka kojima je dodeljena najviša ocena, Schweppes grupa spada u grupu uzoraka sa agresivno erodovanom površinom gleđi.**



Slika 10. SEM mikrofografija površine gleđi nakon izlaganja *Schweppes Bitter Lemon* napitku; a) povećanje dubine gleđne iregularnosti, povećanje veličine pora i brojne pukotine, uvećanje 500x; b) na uvećanju 2000x se uočava gubitak aprizmatičnog sloja, sitnozrnasta površina gleđi i česta pojava "kratera"

Grupa III – Sprite

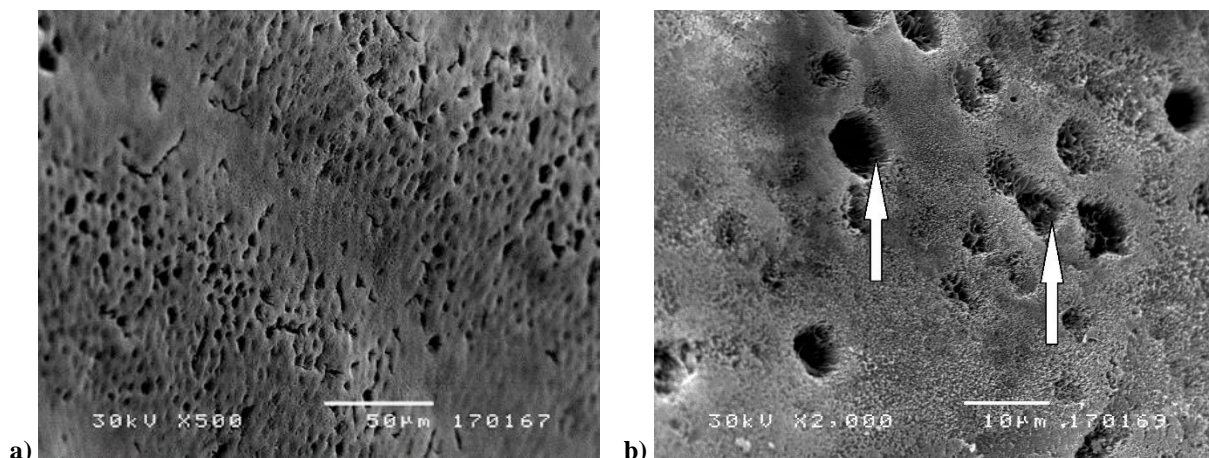
Uzorci gleđi ove grupe su pokazali slične morfološke karakteristike kao i uzorci grupe II. Karakteristične promene su uglavnom zapažene na većim uvećanjima: difuzna demineralizacija čitave površine gleđi sa sitnozrnastim kristalima koji prekrivaju i interprizmatsku i intraprizmatsku supstancu (Slika 11). **I u ovoj grupi četiri uzorka su dobila ocenu 3.**



Slika 11. SEM mikrografija površine gleđi nakon izlaganja *Sprite* napitku. a) erodovana površina gleđi pokazuje rastvaranje uglavnom u oblastima košuljica prizmi; b) dominacija difuzno raspoređenih kristala zrnastog oblika, koji formiraju neravni sloj "maskirajući" erodovanu površinu gleđi

Grupa IV – Guarana - No Sleep

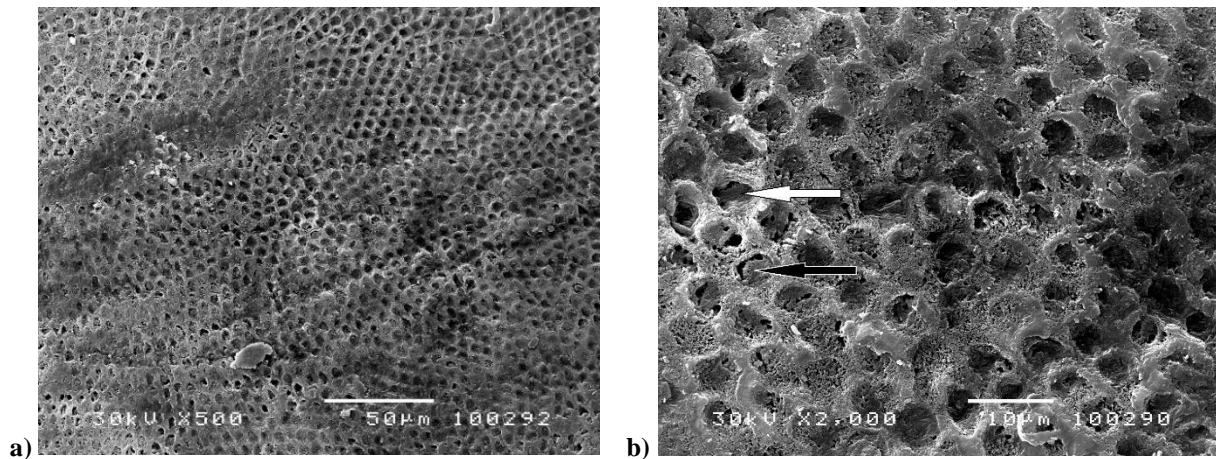
Uzorci ove grupe pripadaju agresivno erodovanim površinama gleđi, zajedno sa uzorcima prethodnih grupa (I, II i III) (Slika 12). Na uvećanju 2000x zapažaju se globularni i *rod-sharped* kristali u poljima košuljica prizmi (strelice). **Ocenu 3 su dobila tri uzoraka.**



Slika 12. SEM mikrografije površine gleđi nakon izlaganja *Guarana – No Sleep* napitku; a) erozija koja je zahvatila ovojnice (košuljice) prizmi. b) osim kristala zrnastog oblika na interprizmatskim poljima i na "ulazu" u pojedine prizme, uočavaju se i kristali izdužene, vlaknaste strukture (strelice)

Grupa V – Red Bull

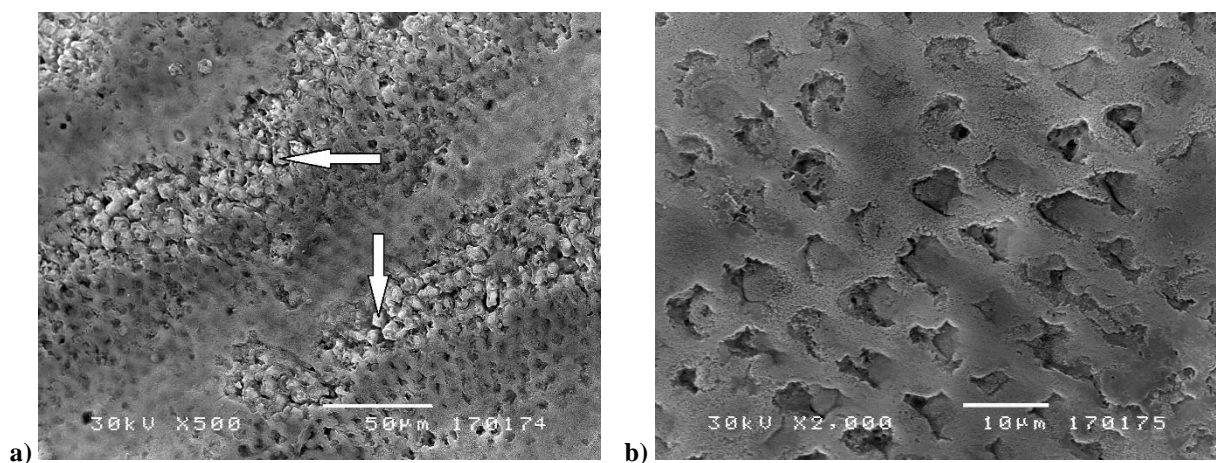
Na SEM mikrografijama, uzorci potopljeni u *Red Bull* su pokazali intenzivno erozivno oštećenje koje je po morfološkim karakteristikama bilo bliže promenama zapaženim kod *Coca-Cola* uzoraka u odnosu na uzorke ostalih gaziranih napitaka. Gleđna površina je pokazala tip 1 i tip 2 nagrizanja, a na većem uvećanju i sitno zrnaste kristale koji prekrivaju inter i intraprizmatsku supstancu. **Ova grupa je imala šest uzoraka koji su dobili ocenu 3** (Slika 13).



Slika 13. SEM mikrografije površine gleđi nakon izlaganja Red Bull napitku; a) uočljiv *honeycomb* tip erozije, uvećanje 500x; b) snažno rastvaranje inter i intraprizmatске substance koja je prekrivene sitno zrnastim kristalima; bela strelice pokazuju tip 1 model erozije gleđnih struktura; crna strelice označavaju tip 2, uvećanje 2000x

Grupa VI - Isodrinx isotonic sports drink

Osim četiri uzorka ove grupe koji su imali ocenu 3, ostali uzorci su pokazali očuvanje centralnih delova prizmi. U njihovoj neposrednoj blizini zapažena su i ulegnuća centara prizmi, označena kao promene "koje liče na otisak kopita", ("*hoof-like*" forma prizme) jasno vidljiva na većem uvećanju (Slika 14).

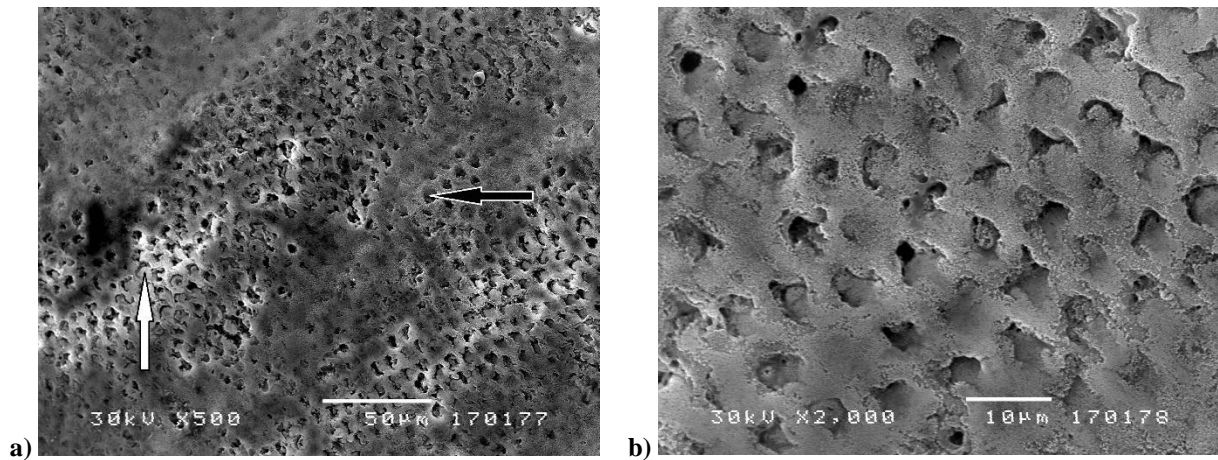


Slika 14. SEM mikrografije površine gleđi nakon izlaganja Isodrinx Isotonic Sports Drink napitku. a) u pojedinim delovima se uočava rastvaranje interprizmatске substance sa očuvanim centralnim delovima prizmi (*coblestrone* tip) (strelice). Neposredno ispod ovog polja zapaža se ulegnuće centara prizmi, bez njihovog potpunog razaranja uvećanje 500x; b) polje sa "utisnutim" prizmama koje imaju različitu dubinu ("*hoof-like*" forma prizme), uvećanje 2000x.

Grupa VII - Aqua Viva Recharge (crvena pomorandža)

Morfološke promene na gleđnoj površini posle imerzije u *Aqua Viva Recharge* su na manjem uvećanju jasno pokazale kombinovanu demineralizaciju sa dominacijom *honeycomb* tipa. Na većem uvećanju je prikazana regija sa sličnom morfologijom koja je nađena i u grupi

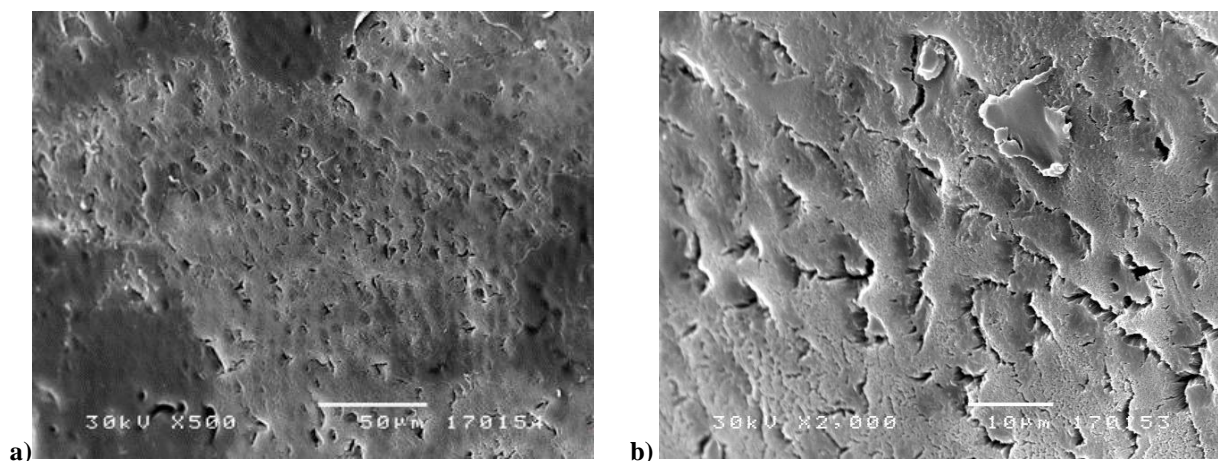
uzoraka uronjenih u drugo ispitivano sportsko piće (grupa VI) (Slika 15). **Tri uzorka ove grupe su dobila najveću ocenu.**



Slika 15. SEM mikrografije površine gleđi nakon izlaganja Aqua Viva Recharge napitku. a) Kombinovani model (tip III nagrizanja gleđi) bele strelice pokazuju tip I, a crne strelice označavaju tip II model nagrizanja, uvećanje 500x; b) uočljive "hoof-like" prizme koje su blago prekrivene kristalima zrnastog oblika, uvećanje 2000x

Grupa VIII - Life Premium 100% voćni sok od narandže

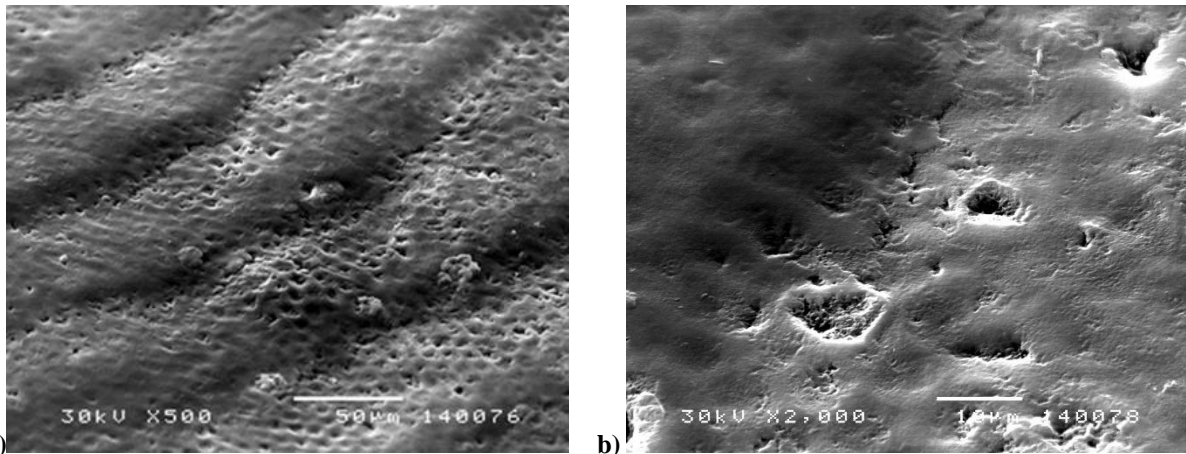
Površina gleđi izložena soku od narandže je na većini uzoraka ispoljila atipičnu strukturu, u literaturi poznatu kao tip 4. Na Slici 16 prikazan je deo srednje trećine gleđne površine sa dominantnim i dubokim brazdama i pukotinama. **Četiri uzorka ove grupe su dobila ocenu 3.**



Slika 16. SEM mikrografije površine gleđi nakon izlaganja napitku Life Premium 100% voćni sok pomorandža. a) atipično nagrizanje površine gleđi sa dubokim brazdama i pukotinama, uvećanje 500x; b) detalj sa prethodne slike na uvećanju 2000x

Grupa IX - Sok od aronije

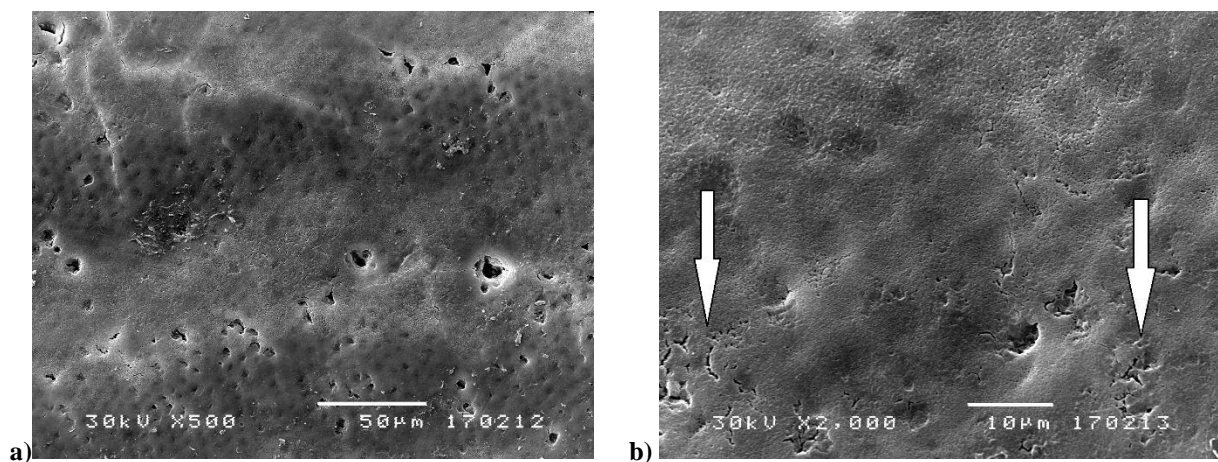
Uzorak gledi prikazan na Slici 17a posle imerzije u sok od aronije pokazuje sve morfološke karakteristike erozivnog oštećenja gledi kome se dodeljuje ocena 1. Međutim, na većem uvećanju zapažena je i demineralizacija centara pojedinih prizmi. **Čak šest uzoraka ove grupe je dobilo ocenu 2.**



Slika 17. SEM mikrografije površine gledi nakon izlaganja soku od aronije. a) blago erodovana gledi pokazuje naglašena ulegnuća, duboke pore i centralnu demineralizaciju pojedinih prizmi, uvećanje 500x; b) isti uzorak na uvećanju 2000x

Grupa X - Zaječarsko svetlo pivo

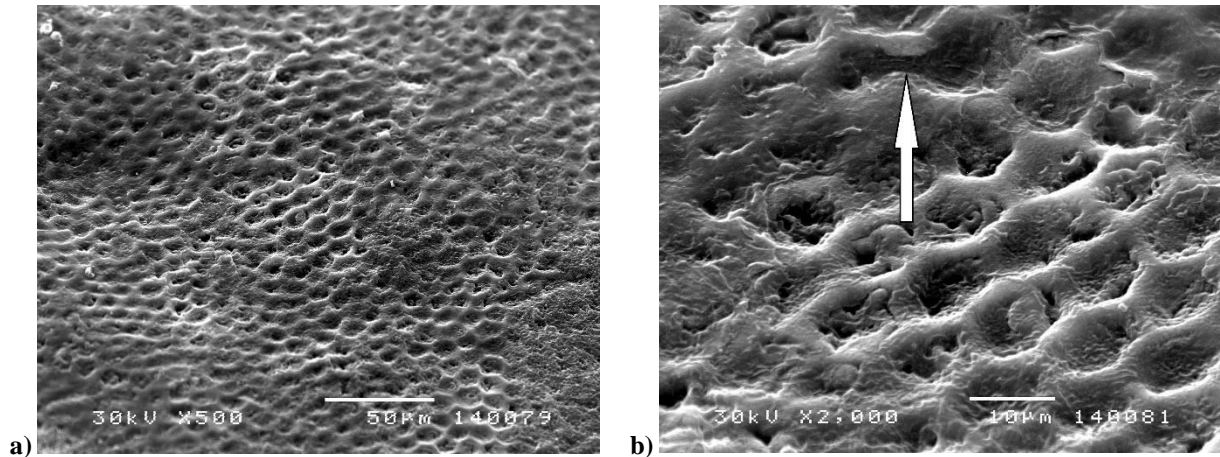
Od osam ispitivanih uzoraka tretiranih pivom, dva uzorka su imala ocenu 0, a **šest uzoraka ocenu 1.** Slika 18 pokazuje SEM mikrografije sa neznatnom iregularnošću morfologije gledne površine, uočljivim perikimatama i plitkim udubljenjima.



Slika 18. SEM mikrografije površine gledi nakon izlaganja pivu. a) uočljive perikimate, nekoliko dubokih pora i plitka udubljenja, uvećanje 500x; b) slabo izražena iregularnost, neznatna poroznost i jedno manje polje atipičnog nagrizanja (strelica), uvećanje 2000x

Grupa XI – Crveno vino

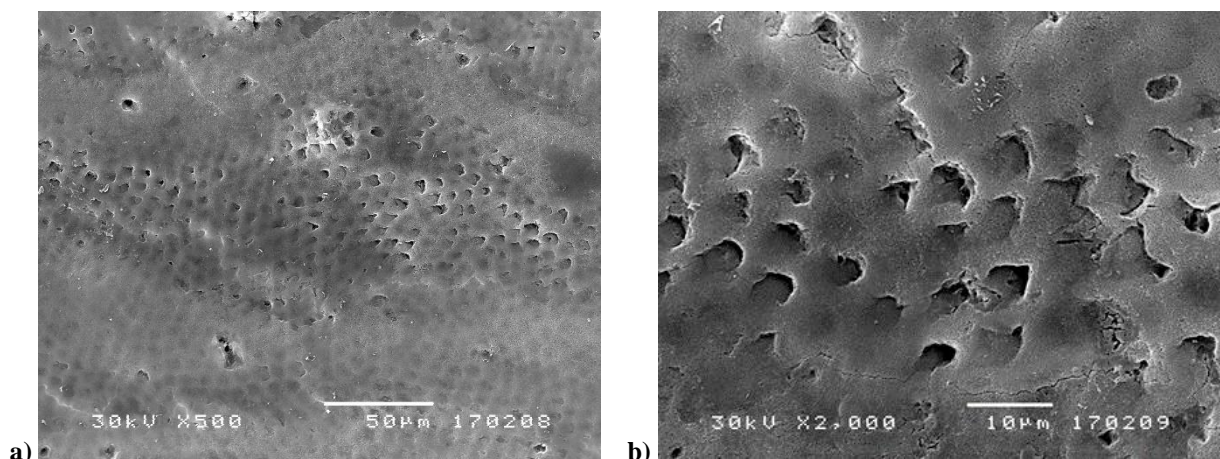
Uzorci uronjeni u crveno vino su pokazali blaži stepen erozivnog oštećenja. Uočena su plića udubljenja koja su dala gleđi sačast izgled. Na pojedinim mestima uočavao se tipičan raspored gleđnih prizmi u obliku "ključaonice" (Slika 19). **Dva uzorka ove grupe su imala ocenu 2.**



Slika 19. SEM mikrografije površine gleđi nakon izlaganja crvenom vinu. a) plitka udubljenja sa naglašenom "honeycomb" strukturom, uvećanje 500x; b) detalj sa prethodne slike, uvećanje 2000x. Strelica pokazuju "key-hole" uređenje gleđnih prizmi

Grupa XII – Belo vino

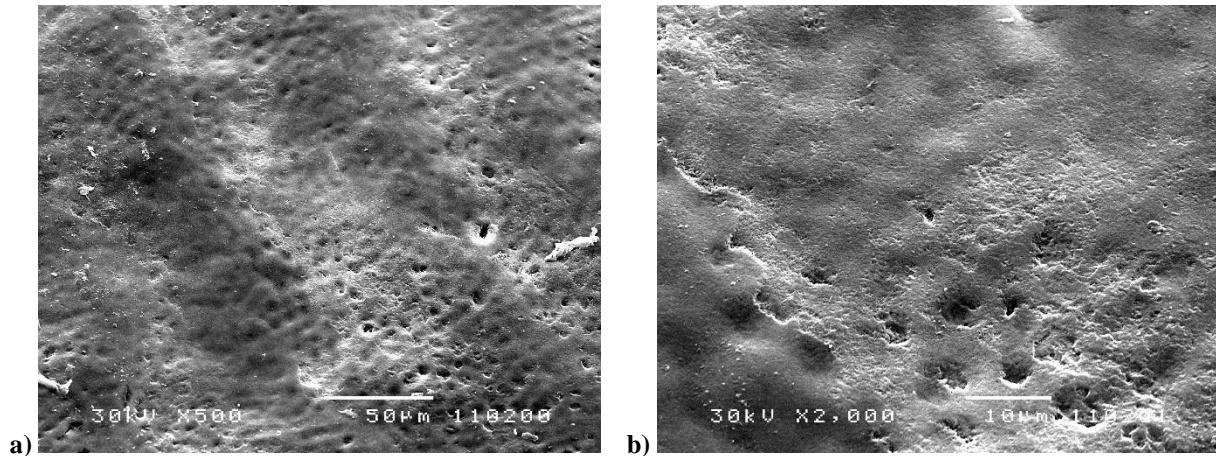
Tri uzorka sa erozivnim oštećenjem gleđne površine posle potapanja u belo vino su pokazala polja demineralizacije prizmatične gleđi i **ocenjena su ocenom 2.** Na većem uvećanju, uočavalo se nekoliko manjih pukotina, uz dominaciju "hoof-like" forme prizmi.



Slika 20. SEM mikrografije površine gleđi nakon izlaganja belom vinu. a) iregularna polja sa naglašenim konturama prizmi, ali i prisutna demineralizacijom prizmatične gleđi, uvećanje 500x; Na većem uvećanju uočljiva "hoof-like" forma prizmi, ali na površini koja nije prekrivena kristalima zrnastog oblika, uvećanje 2000x.

Grupa XIII – Zeleni čaj

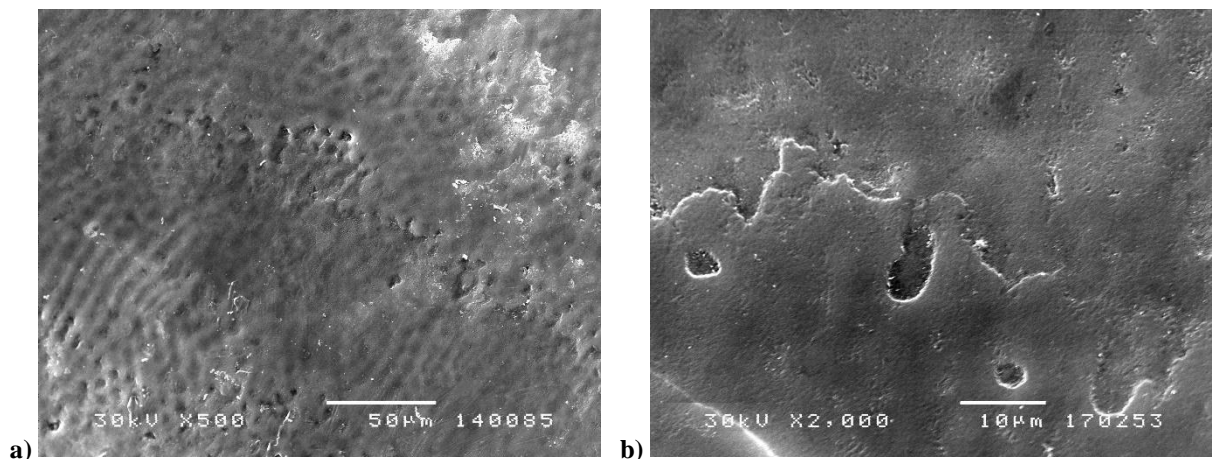
Svi uzorci ove grupe, **osim jednog sa ocenom 1**, bili su slični kontrolnim uzorcima. I na manjim (500x) i na većim uvećanjima (2000x) uočavale su se perikimate i razvojne pore (Slika 21).



Slika 21. SEM mikrografije površine gleđi nakon izlaganja zelenom čaju. a) perikimate i razvojne pore na intaktnoj gleđnoj površini, 500x; b) uzorak iz iste grupe na uvećanju 2000x.

Grupa XIV – Crni čaj

Iako su dva uzorka potopljena u crni čaj dobila ocenu 1, na većini mikrografija gleđne površine uzoraka ove grupe uočavale su se morfološke promene definisane ocenom 0, sa ulegnućima i malim brojem izraženih pora (Slika 22).



Slika 22. SEM mikrografije površine gleđi nakon izlaganja crnom čaju. a) površina gleđi sa plitkim nepravilnim udubljenjima i nekoliko izraženih pora, uvećanje 500x; b) uzorak iz iste grupe na uvećanju 2000x.

5.4. Rezultati merenja parametara hrapavosti erodovanih gleđnih površina posmatranjem pod MAS

U Tabeli 16 predstavljene su prosečne vrednosti R_a parametra kod uzoraka koji su potapani u različite imerzione rastvore pre i posle erozivnog izazova limunskom kiselinom. Najmanja prosečna vrednost (a i medijalna vrednost) R_a je zabeležena kod kontrolnih uzoraka, a najveća u uzorcima imerzovanim sa prirodnom pljuvačkom dijalizovanom pomoću veštačke pljuvačke (HP/VP). Najveću disperziju u izmerenim vrednostima R_a pokazali su uzorci potopljeni u HP/DV (koji imaju i najveću standardnu devijaciju).

Tabela 16. Prosečne vrednosti parametra R_a po grupama

Grupa	Mean	Median	Std. Deviation
KONTROLA	38,1767	35,2100	10,50870
HP/DV	71,3950	61,0450	34,96278
VP	86,8400	89,2900	13,99004
HP	90,3000	88,4750	12,08007
HP/VP	105,3483	101,4300	21,29339
Opšti prosek	78,4120	85,3250	30,10080

Testiranje značajnosti razlike u prosečnim vrednostima R_a između uzoraka izvršeno je primenom Kruskal-Volishovog (*Kruskal-Wallis H*) testa, koji je otkrio statistički značajnu razliku u prosečnim vrednostima R_a između uzoraka. Izračunata vrednost iznosi 15,256, a realizovani nivo značajnosti je 0,004 (što je znatno manje od 0,05).

Dalja analiza značajnosti razlika između parova uzoraka izvršena je primenom neparametarskog *Mann-Whitney U* testa (Tabela 17).

Tabela 17. Analiza značajnosti razlika između parova R_a parametra

Parovi		Razlika u prosečnim vrednostima	Vrednost statistike testa	Realizovani nivo značajnosti (Sig.)
KONTROLA	HP/DV	-23,26	-2,082	0,041
	VP	-48,66*	-2,882	0,002
	HP	-52,12*	-2,882	0,002
	HP/VP	-81,03*	-2,882	0,002
HP/DV	VP	-25,39	-0,801	0,485
	HP	-28,85	-0,961	0,394
	HP/VP	-57,76	-1,601	0,132
VP	HP	-3,46	-0,160	0,937
	HP/VP	-32,36	-1,441	0,180
HP	HP/VP	-28,91	-1,441	0,180

Pri donošenju zaključaka o značajnosti razlike u prosečnim vrednostima, nivo značajnosti testa (alfa) koji je u svakom testiranju 0,05, u ovom slučaju je podeljen sa brojem sprovedenih testova (Bonferonijevo prilagođavanje), tako da se realizovani nivoi značajnosti u testiranju (Sig.) porede sa 0,005. Prema tom kriterijumu, statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima R_a postoji između kontrolnih uzoraka i uzoraka potapanih u VP, kontrolnih uzorka i uzoraka imerzovanih u HP i kontrolnih uzorka i uzoraka imerzovanih u HP/VP. U svim ostalim poređenjima razlika u prosečnim vrednostima merenja R_a parametra nije statistički značajna.

Najmanja razlika u prosečnim vrednostima R_a je zabeležena između uzoraka koji su potopljani u VP i HP, dok je najveća između kontrolnih uzorka i uzoraka potopljenih u HP/VP.

U Tabeli 18. predstavljene su prosečne vrednosti R_q parametra hrapavosti na uzorcima koji su potopljani u različite inkubacione medijume. Najmanja prosečna vrednost (a i medijalna vrednost) R_q je zabeležena kod kontrolnih uzoraka, dok je najveća u uzorcima imerzovanim sa HP/VP.

Najveću disperziju u izmerenim vrednostima R_q pokazali su uzorci koji su stajali u HP/DV (tu je izračunata najveća standardna devijacija).

Tabela 18. Prosečne vrednosti parametra R_q po grupama

Grupa	Mean	Median	Std. Deviation
KONTROLA	47,9100	46,2950	14,35246
HP/DV	91,3333	79,1950	42,77114
VP	111,6700	113,5500	17,65492
HP	115,7983	115,5200	14,15821
HP/VP	134,3300	128,0950	27,28967
Opšti prosek	100,2083	110,5950	38,31662

Kruskal-Wallis test je otkrio statistički značajnu razliku u prosečnim vrednostima R_q parametra između uzoraka potopljenih u različite pljuvačne medijume. Izračunata vrednost testa je 15,247, a realizovani nivo značajnosti je 0,004 (što je znatno manje od 0,05).

Dalja analiza značajnosti razlika između parova uzoraka izvršena je takođe primenom *Mann-Whitney U* testa (Tabela 19).

Tabela 19. Analiza značajnosti razlika između parova R_q parametra

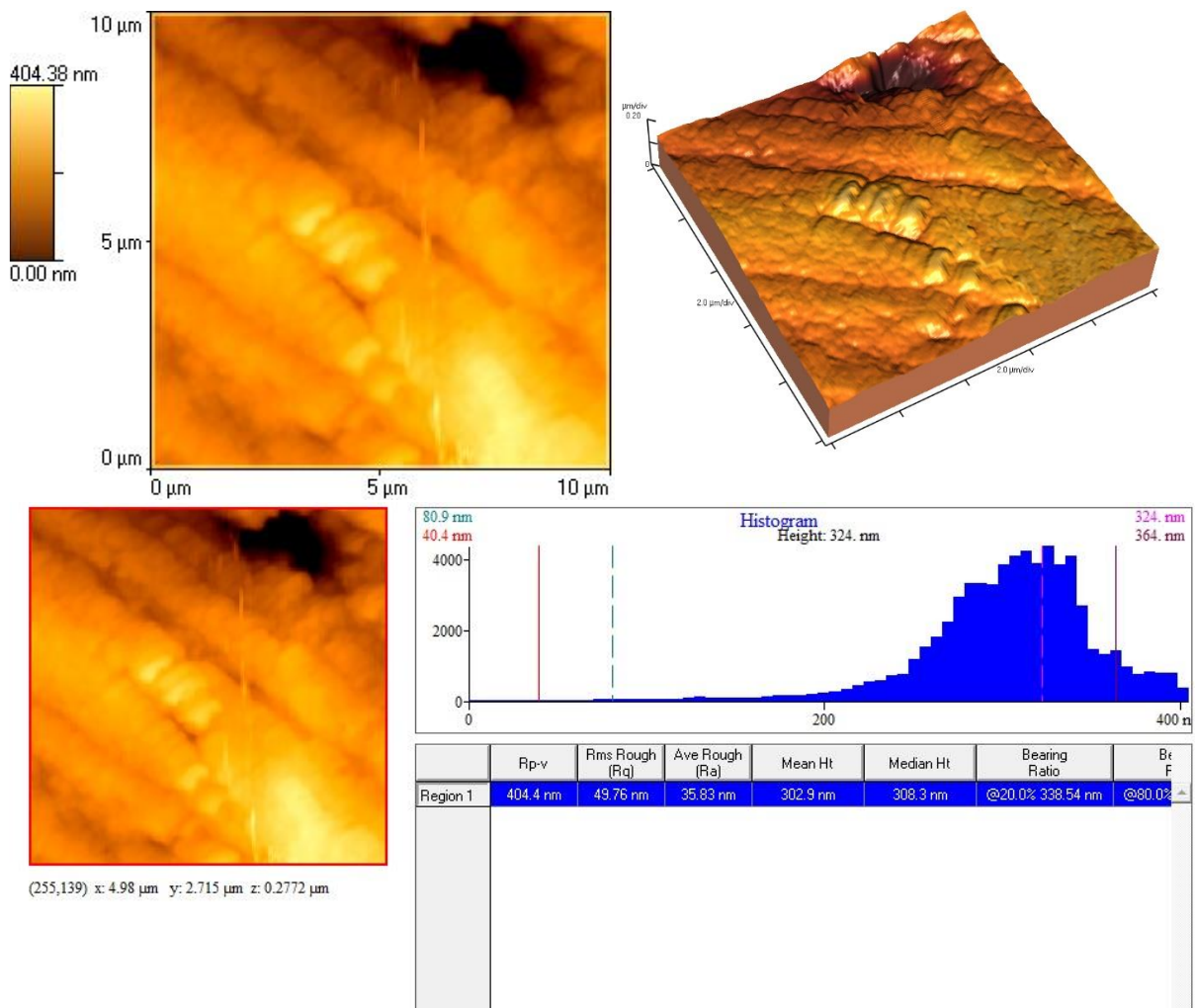
Parovi		Razlika u prosečnim vrednostima	Vrednost statistike testa	Realizovani nivo značajnosti (Sig.)
KONTROLA	HP/DV	-31,22	-2,082	0,041
	VP	-63,76*	-2,882	0,002
	HP	-67,88*	-2,882	0,002
	HP/VP	-91,82*	-2,882	0,002
HP/DV	VP	-32,53	-0,801	0,485
	HP	-36,66	-0,967	0,394
	HP/VP	-60,59	-1,601	0,132
VP	HP	-4,13	-0,160	0,937
	HP/VP	-28,06	-1,441	0,180
HP	HP/VP	-23,93	-1,441	0,180

I u ovom slučaju je primenjeno Bonferonijevo prilagođavanje, pri čemu se realizovani nivoi značajnosti u testiranju (Sig.) porede sa 0,005. Prema tom kriterijumu, statistički značajna

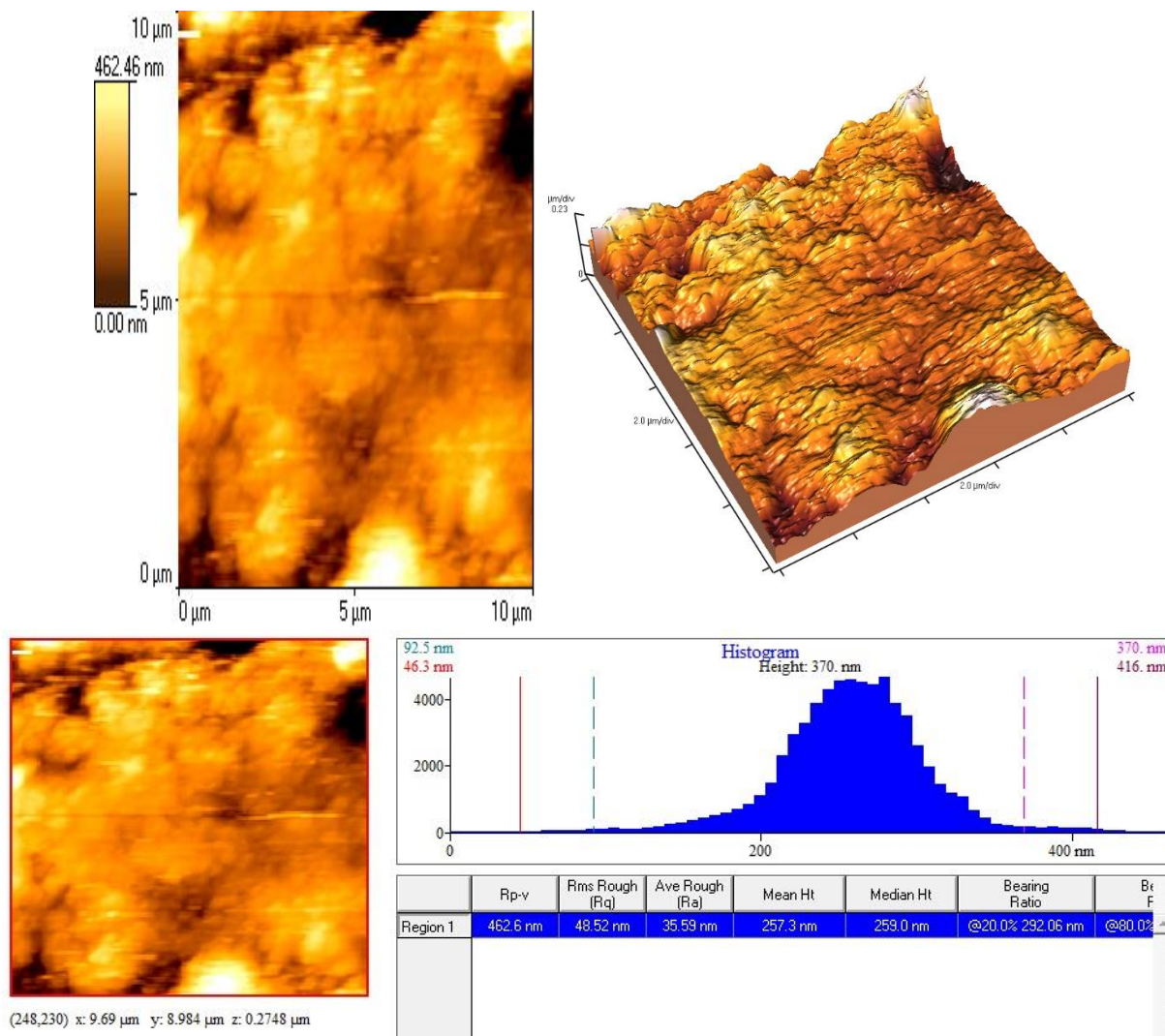
razlika u prosečnim vrednostima R_q postoji između kontrolnih uzorka i uzoraka potopljenih u VP, kontrolnih uzoraka i uzoraka potopljenih u HP i kontrolnih uzoraka kao i uzoraka potopljenih u HP/VP. U svim ostalim poređenjima razlika u prosečnim vrednostima R_q parametra nije statistički značajna.

Najmanja razlika u prosečnim vrednostima R_q je zabeležena između uzoraka potopljenih u VP i HP, dok je najveća između kontrolnih uzorka i uzoraka potopljenih u HP/VP.

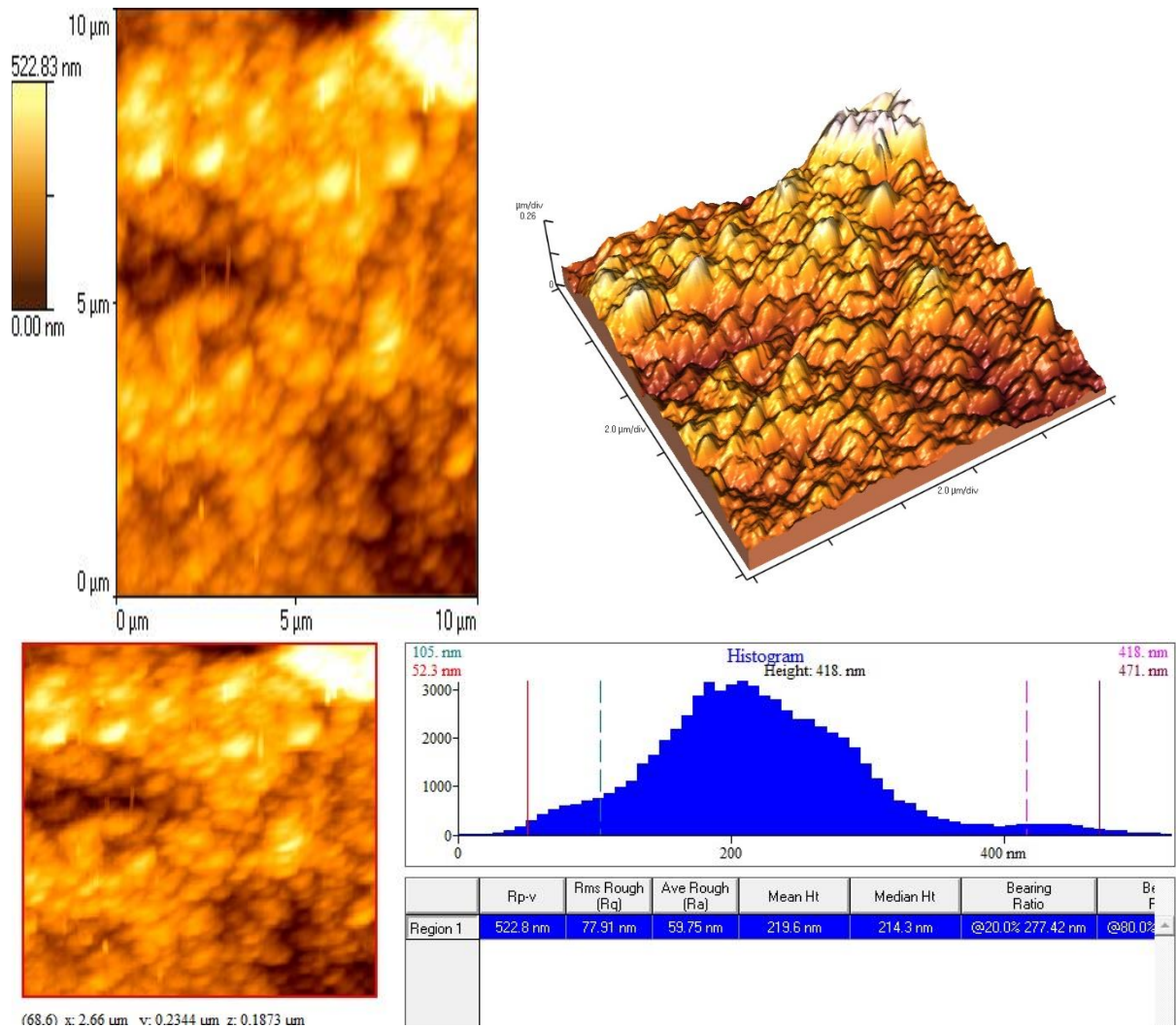
Na slikama 23.-27. dat je 2D i 3D MAS prikaz kontrolnog gleđnog uzorka i uzoraka potapanih u humanu pljuvačku, veštačku pljuvačku i dve dijalizovane pljuvačke (HP/VP i HP/DV).



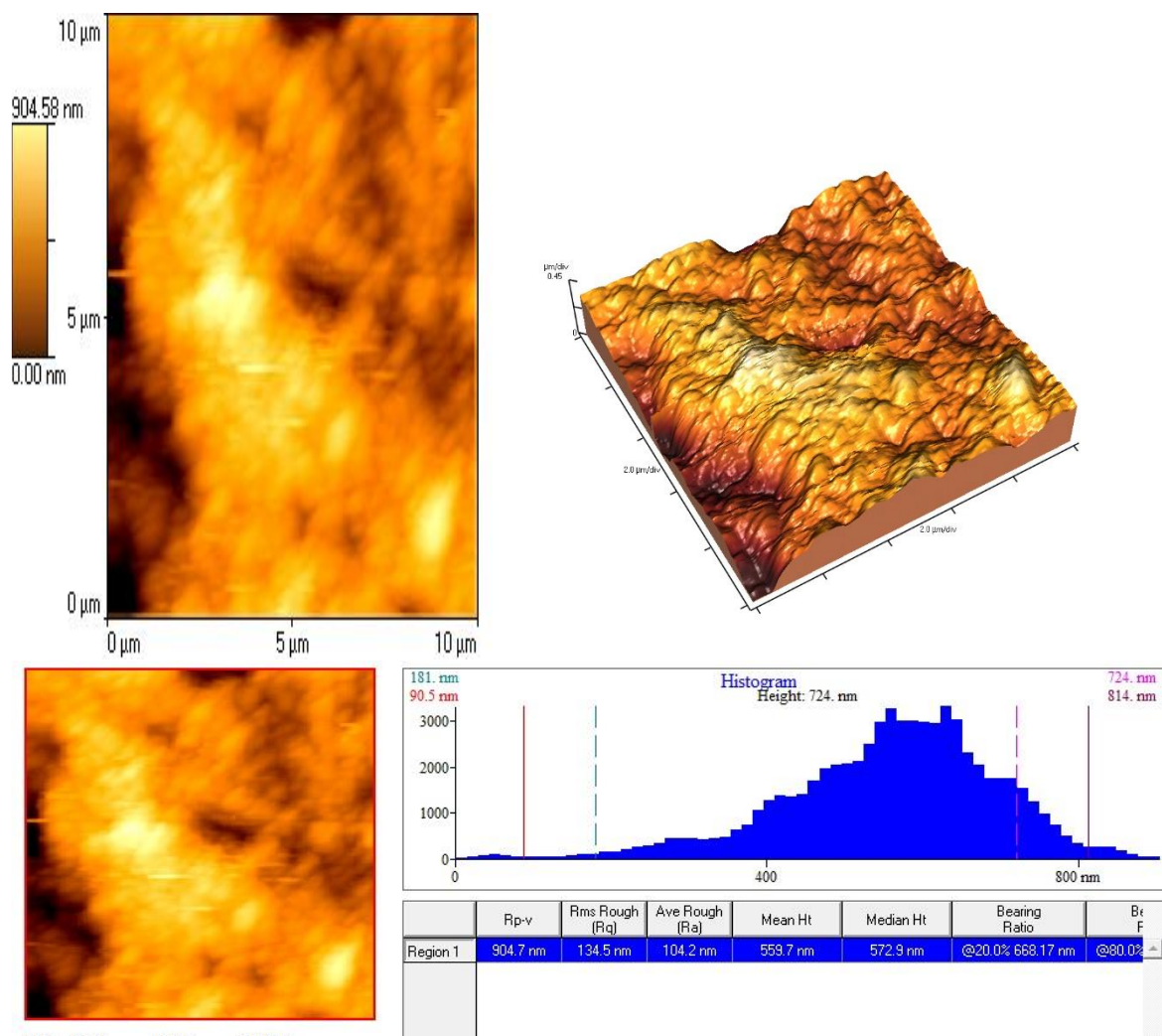
Slika 23. 2D i 3D MAS prikaz kontrolnog uzorka sa izračunatim parametrima hrapovosti



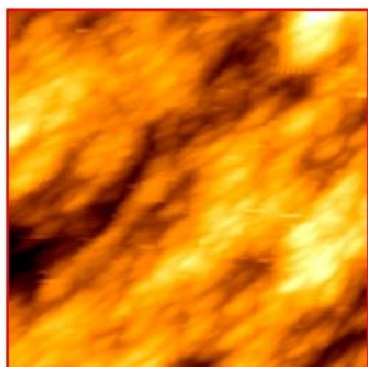
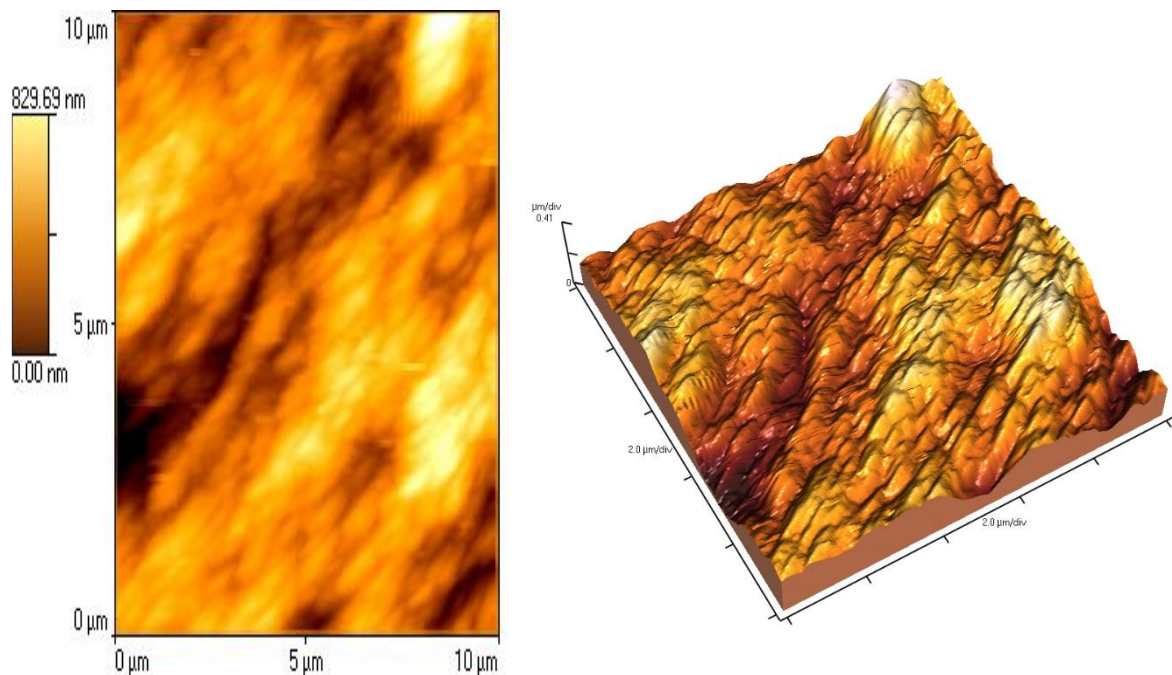
Slika 24. 2D i 3D MAS prikaz tipičnog glednog uzorka potapanog u humanu pljuvačku dijalizovanu sa dejnozovanom vodom (HP/DV) i izračunatim parametrima hrapavosti



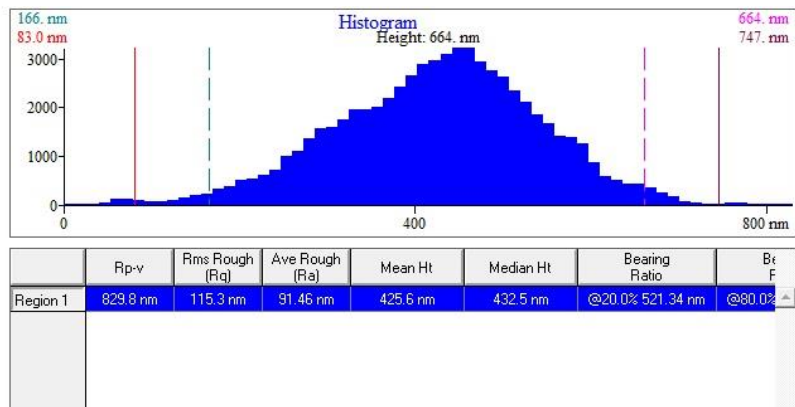
Slika 25. 2D i 3D MAS prikaz tipičnog gleđnog uzorka potapanog u veštačku pljuvačku (VP) i izračunatim parametrima hrapavosti



Slika 26. 2D i 3D MAS prikaz tipičnog gleđnog uzorka potapanog u humanu pljuvačku (HP) i izračunatim parametrima hrapovosti



(132,6) x: 5.16 μm y: 0.2344 μm z: 0.2370 μm



Slika 27. 2D i 3D MAS prikaz tipičnog glednog uzorka potapanog u humanu pljuvačku dijalizovanu sa veštačkom pljuvačkom (HP/VP) i izračunatim parametrima hrapovosti

6. DISKUSIJA

6.1. Diskusija rezultata ispitivanja erozivnog potencijala bezalkoholnih i alkoholnih napitaka

Erozivni potencijal neke supstance (sposobnost izazivanja zubne erozije) zavisi od nekoliko hemijskih parametara, kao što su: pH i puferska svojstva, koncentracija kalcijuma i fosfata (stepen zasićenja) i sadržaj fluorida. Da li će erozivni potencijal napitka uspeti da se ispolji kroz erozivno oštećenje zuba, zavisice od faktora domaćina i uslova izloženosti [1,3,4,18]. Puferska svojstva vodenog rastvora predstavljaju meru otpornosti na promenu pH i mogu se izraziti kroz titrabilnu kiselost (količina baze u mmol/L, potrebna za podizanje pH na definisani nivo od 5,5 i/ili 7,0) i puferski kapacitet (određivanje koliko baze može da podnese rastvor bez promene pH vrednosti) [16–18]. U ovom istraživanju, korišćenim pićima je merena inicijalna pH koja predstavlja meru kiselosti supstance i važan je pokazatelj zubne erozije: sa smanjenjem pH ispitivane supstance, povećava se erozivno oštećenje, nezavisno od načina kojim se meri erozija [50]. Ipak, moguće je da u situacijama kada rastvor ima nisku pH, neki drugi uticaji budu dovoljno snažni i spreče eroziju, ali isto tako, erozija može da napreduje i u rastvoru sa relativno visokom pH u odsustvu olakšavajućih faktora. Stoga je sugerisano da ne postoji fiksna kritična pH za eroziju zuba [45,47]. Ova vrednost se izračunava na osnovu koncentracije kalcijuma i fosfata u samom erozivnom rastvoru (poglavlje *Pregled literature*). Lussi i sar. (2014) su objavili kritične vrednosti pH (pH_c) u odnosu na hidroksiapatit za različite napitke, kisele dodatke ishrani i medikamente i ustanovili da su se one kretale od 3,9 do 6,5. Iz tih podataka izdvojene su kritične vrednosti pH nekoliko napitaka čiji je erozivni potencijal određivan u ovoj doktorskoj tezi (*Coca Cola* 5,1; *Sprite* 6,5; sok od narandže 3,6; pivo 5,0; crveno vino 5,1; belo vino 5,1, crni čaj 5,6) [1].

Veliki broj studija koje su proučavale erozivni potencijal kiselih napitaka i hrane izračunavalo je inicijalnu pH vrednost [5,7,8,10,154]. U ovo istraživanje je bilo uključeno 14 napitaka: 11 bezalkoholnih (pet gaziranih, od toga dva energetska napitka), četiri negazirana (dva voćna soka i dva sporska napitka i dva čaja), tri alkoholna pića (pivo, crveno i belo vino) i dva čaja (zeleni i crni). Dobijeni rezultati su slični izveštajima pH vrednosti pića publikovanih od strane drugih istraživača; na primer: pH *Coca Cola* napitka 2,56 u poređenju sa 2,45 [5], 2,55 [6], 2,67 [7], 2,37 [154], 2,55 [8], 2,44 [153]; pH vrednost *Red Bull* energetskog pića bila je 3,32 u poređenju sa 3,30 [5], 3,81 [70], 3,35 [8], pH soka od narandže 3,82 u poređenju sa 3,56 [5], 3,63 [6], pH belog vina 3,02 u odnosu na 2,99 [10], 3,60 [5], pH zelenog čaja 6,64 u

poređenju sa 6,30 [146], 5,45 [155], 5,4 [81]. Od sportskih napitaka, ovo ispitivanje je uključilo domaće brendove - *Isodrinks Isotonic Sports Drink* (pH =3,43) i *Aqua Viva Recharge* (pH=3,18), koji su mogli da se porede jedino sa sportskim napicima onih brendova koji su objavljeni u literaturi, kao što je *Gatorade* sa pH=3,17 [5], 2,89 [8] ili *Isostar* (pH=3,87) [5]. Takođe, ne postoje podaci u literaturi o ispitivanju erozivnog potencijala soka od aronije.

U ovom istraživanju, opseg ustanovljenih pH vrednosti se kretao od $2,51 \pm 0,03$ (*Guarana No Sleep*) do $6,64 \pm 0,02$ (*zeleni čaj*). Vrednosti pH su merene na sobnoj temperaturi neposredno po otvaranju pakovanja (flašice ili limenke) sa napitkom, uključujući i pripremljene čajeve koji su ohlađeni do temperature $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Merenje pH odmah nakon otvaranja ambalaže gaziranih napitaka je bilo posebno važno jer oslobađanje ugljen-dioksida utiče na porast pH vrednosti [50,156,157].

Reddy i sar. su objavili jednu opsežnu studiju izračunavanja pH vrednosti 380 komercijalno dostupnih bezalkoholnih pića u SAD [154]. Na osnovu krive rastvorljivosti gleđnih apatita, za koju su Larsen i Nyvad ustanovili da pokazuje logaritamski porast sa padom pH u laboratorijskim ravnotežnim uslovima, Reddy i sar. su predložili da se hemijski erozivni potencijal pića razdvoji u 3 zone: zona izuzetno erozivnih napitaka sa pH <3, zona erozivnih (pH od 3,0 do 3,99) i zona minimalno erozivnih napitaka (pH \geq 4,0). Prema pomenutoj preporuci, u ovom istraživanju, sva gazirana pića osim *Red Bull*-a bi spadala u izuzetno erozivne napitke, zoni erozivnih bi pripadali: sok od narandže, sportska i alkoholna pića, kao i *Red Bull*, a minimalno erozivna pića bi bila: sok od aronije, zeleni i crni čaj [50,154].

Bez obzira na ovaj naglašen teoretski pristup rastvorljivosti apatita u funkciji pH, niska vrednost pH erozivne supstance (napitka) nikako ne znači i nužno rastvaranje gleđi. Erozivni potencijal napitka će zavisiti i od sadržaja jona kalcijuma i fosfata, koji se mogu smatrati zaštitnim faktorima [1,6,18,50]. Jedan od primera je jogurt koji ima pH oko 4, ali nije erozivan zbog visokih koncentracija ovih jona [5,7].

Od puferskih svojstava, ova studija se orijentisala na određivanje titrabilne kiselosti, parametra erozivnog potencijala koji se smatra pogodnijim od puferskog kapaciteta jer duže održava koncentraciju vodonikovih jona dostupnim za interakciju sa zubnom površinom, tj. ima "bliži" odnos sa koncentracijom nedisosovane kiseline [38]. U odnosu na pH, Jensdottir i sar. su ustanovili značajnu korelaciju između TK i rastvaranja zubnog tkiva nakon dužeg izlaganja bezalkoholnim pićima (24 sata), dok je nakon kratkotrajne izloženosti (3 min) erozija bila povezana sa pH, a ne i sa TK. Stoga su sugerisali da je TK bolji pokazatelj erozivnog potencijala tokom dužih erozivnih izazova, a pH je precizniji za kratku izloženost [158].

Titribilna kiselost ispitivanih pića u ovom istraživanju se kretala od $0,54\pm 0,05$ (*Coca-Cola*) do $4,28\pm 0,03$ (*Life Premium 100% voćni sok od narandže*) za titraciju do pH 5,5, odnosno, od $1,08\pm 0,05$ (*sok od aronije*) do $5,83\pm 0,05$ (*Life Premium 100% voćni sok od narandže*) za titraciju do pH 7,0. Zbog visoke pH čajeva (iznad 5,5), njihova TK je izračunavana samo do pH 7,00 i iznosila je $0,13\pm 0,03$ za zeleni i $0,12\pm 0,02$ za crni čaj.

Vrednosti TK izmerene u ovoj studiji bile su slične rezultatima drugih autora [7,32,44,49,156,159], kada se porede vrednosti u mililitrima dodate baze do dostizanja pH na 5,5 ili 7,0. Savremena literatura sugeriše da TK treba izračunavati kao koncentraciju u mmol/L, što je hemijski ispravnije i omogućava lakše poređenje [3,16,18]. Stoga je u ovom istraživanju bilo teže komparirati dobijene vrednosti TK napitaka sa podacima iz studija koje su koristile preporučene jedinice [5,6,8,160,161]. Ipak, nivoi vrednosti ovog parametra erozivnog potencijala u literaturi su se gotovo uvek uklapale sa dobijenim nivoima vrednosti u ovom istraživanju, bez obzira na način izračunavanja TK.

Profilometrijski parametri i nalaz morfoloških promena na gleđnoj površini nisu uvek pratili izračunate vrednosti pH ili TK pića u ovom istraživanju, ukazujući na složenije mehanizme nastanka erozije, što će biti predmet diskusije u sledećim podglavljima.

6.2. Diskusija rezultata ispitivanja hrapavosti gleđne površine nakon izlaganja uzoraka bezalkoholnim i alkoholnim pićima u funkciji vremena

Metodologija proučavanja erozivnog oštećenja gleđne površine varira u velikoj meri. Ne samo da ovo otežava poređenje već i nije utvrđena validnost različitih metoda [17,159]. Većina studija je koristila jednokratnu ekspoziciju, ali sa različitim vremenima izlaganja uzoraka erozivnim supstancama, od 15 s do 15 min [19,159,162], završno sa 24 h i više. [158]. U kliničkim situacijama izlaganje zubne površine erozivnim supstancama je relativno kratko, do nekoliko minuta, nakon čega se stanje u oralnoj sredini vraća u normalu. Međutim, konzumiranje uobičajene zapremine napitka (npr. limenke ili flašice od 300 ml) verovatno traje duže. Trenutno nema saznanja o klinički najrelevantnijoj izloženosti [159]. Budući da je erozivno oštećenje rezultat kumulativnog izlaganja kiselinama, vreme izloženosti od 15 i 30 minuta može biti opravdano, dok se izlaganje od 60 minuta može smatrati predugim, ali klinički vrlo mogućim. Iako većina istraživanja ne precizira učestalost, pojedine studije su primetile da je erozivno trošenje zuba povezano sa četiri ili više porcija kiselih proizvoda dnevno [34,163]. Ovo istraživanje je podrazumevalo desetodnevni tretman, pri čemu su uzorci gleđi potapani u erozivne rastvore tri puta dnevno u trajanju od 15, 30 i 60 minuta.

Osim *in vitro* erozivnih promena na površini gleđi koje mogu biti uzrokovane jednokratnim izlaganjem kiselim rastvorima [142,164,165], primenjuju se i ciklus-erozivni eksperimenti u kojima se uzorci naizmenično podvrgavaju demineralizujućim i remineralizujućim rastvorima [7,33,34,155]. U ovom istraživanju je korišćen ovaj drugi model, gde je moguće vernije imitirati *in vivo* uslove pod kojima se odvija erozija: potapanje uzoraka u bezalkoholne i alkoholne napitke uključujući povremenu agitaciju, zatim, izlaganje uzoraka atrificijelnoj pljuvački, ponovni erozivni izazov itd.

Veštačka pljuvačka je, kao medijum za remineralizaciju, često korišćena u ciklus-eksperimentima, uključujući i čisto erozivne [34] i erozivno-abrazivne modele istraživanja [166,167]. Nekoliko studija je procenjivalo i različite formulacije veštačke pljuvačke u ekperimentima sa erozivnim izazovima [168] i ustanovilo da postoje formulacije koje sadrže samo elektrolite [81], elektrolite sa karboksimetilcelulozom [169] i elektrolite sa mucinom [166,167]. Prema sugestiji iz literature, u *in vivo* uslovima, neki proteini pljuvačke vezuju kalcijum, tako da će veštačke pljuvačke na bazi elektrolita i bez proteina verovatno imati visok stepen zasićenja i moguću sklonost ka precipitaciji prekomernih količina kalcijum fosfata [29]. Preporučuje se da se stepen zasićenja veštačke pljuvačke u eksperimentima sa erozijom prilagodi korigovanim koncentracijama kalcijuma kojima će se izbeći taloženje minerala [29]. U ovom delu istraživanja korišćena je veštačka pljuvačka sa elektrolitima iste ili slične formulacije kao u nekoliko studija koje su se bavile sličnom tematikom [20,26,33].

Za *in vitro* eksperimente erozije i erozivnog zubnog trošenja vrlo je važno obezbediti izvestan protok kiselih napitaka preko uzoraka da bi se obezbedilo stalno obnavljanje Nerstnovog sloja (videti pregled literature). Na ishod eksperimenta u velikoj meri mogu uticati varijacije u brzini mešanja erozivnog rastvora [29]. Šta više, protok može varirati od potpunog "mirovanja", preko blage agitacije, do kontinuiranog mešanja pri različitim brzinama (kalibrisana mešalica) [170], ili upotrebom komore kroz koju se erozivni rastvor pumpa poznatom brzinom [51]. U ovom istraživanju je primenjeno povremeno i blago protresanje bočica sa rastvorima sa ciljem da se "imitira" uobičajen način konzumiranja napitka u ustima (bez mućkanja ili zadržavanja).

Hrapavost površine zuba je sveukupnost mikro-geometrijskih nepravilnosti na površini dentalnog tkiva, koje mogu nastati zbog erozivnog dejstva različitih supstanci, a profilometrija predstavlja tehniku kojom se mere varijacije nepravilnosti površine datog objekta [171]. Hrapavost erodovanog objekta se meri na dva načina: direktno, pomoću kontaktne igle ili indirektno, pomoću profilometrijskog lasera. Direktna metoda podrazumeva prevlačenje profilometrijske igle preko površine pri čemu se registruju sve neravnine na određenoj mernoj

dužini. Iako u literaturi postoje podaci o nekim nedostacima ove metode (nemogućnost registrovanja udubljenja koja su uža od vrha igle, rizik da dijamantski vrh dovede do oštećenja uzorka) [171], ova tehnika se odlikuje visokim stepenom preciznosti i važeći standardi o merenju površinskih tekstura se definišu korišćenjem ove metode [171–173]. Veliki broj istraživanja je koristio ovu metodu za procenu uticaja erozivnih supstanci na tvrda zubna tkiva [7,33,74,155,174,175]. U prilog ovome, vredno je spomenuti istraživanje Heurich i sar. koji su pokazali da, čak i kada se uzmu u obzir dubine "ogrebotina" nastalih mernim uređajem tokom ispitivanja površine uzorka, one ne mogu imati značajan uticaj na vrednost površinske hrapavosti erozivno oštećenih uzoraka. Profilometar korišćen u prisutnoj studiji primenio je silu od samo 0,75 mN i imao je poluprečnik vrha dijamantske "olovke" od 2 μm . Oba parametra su približna onima koje su Heurich i sar. koristili u svom eksperimentu (0,87 mN i 2 μm). Slično zapažanje su objavili Gurković i sar. 2017. godine [174].

Jedan od mogućih problema u vezi diskusije dobijenih rezultata tiče se ograničenog broja studija koje su pomoću *stylus* profilometrije analizirali površinsku hrapavost gleđnih uzoraka posle izlaganja istim supstancama koje su korišćene u ovom istraživanju. Uzimajući u obzir mogućnost da različite metode različito registruju erozivne promene (mikrotvrdoća, površinska hrapavost, gubitak kalcijuma iz tkiva), čak i da različiti uređaji za istu metodu mogu rezultirati različitim apsolutnim vrednostima erozivnog oštećenja [174], u ovom istraživanju je jedini mogući način bio da se porede relativne vrednosti koje bi rezultate različitih metoda mogle učiniti uporedivim. To znači da je, u ovom istraživanju, napravljen pokušaj da se na osnovu izračunatih parametara erozivnog potencijala, "uparenih" sa vrednostima dobijenih parametara hrapavosti i ocena morfoloških promena, proceni erozivno oštećenje gleđne površine (na određeni erozivni izazov) komparacijom sa rezultatima drugih autora, bez obzira na primenjenu metodologiju.

Ovo istraživanje je ukazalo da su bezalkoholna gazirana pića, uključujući energetska pića (*Red Bull*, *Guarana No Sleep*), voćne sokove, sportska, kao i alkoholna pića prouzrokovala povećanje parametara hrapavosti na uzorcima gleđi, pri čemu je, za većinu od njih, to povećanje bilo statistički značajno u odnosu na kontrolu. Zeleni i crni čaj nisu štetno uticali na gleđnu površinu.

U ovom istraživanju nisu se svi profilometrijski parametri povećavali sa vremenom izloženosti. Parametar R_a je u svim slučajevima pokazivao linearan odnos između vremena izlaganja i erozije, što je u skladu sa podacima iz literature [146]. Izračunavanje R_a je uobičajeno u analizi površine dentalnih tkiva i materijala posle dejstva erozivnih supstanci (kiselih napitaka, sredstava za izbeljivanje i td.) [10,74,146,175–178]. Ovaj parametar pokazuje

prosečnu vrednost hrapavosti, ali ne daje informacije o karakteristikama nepravilnosti površine, pri čemu i veoma izražene i minimalne neregularnosti mogu pokazati iste R_a vrednosti [171]. Stoga, ovo istraživanje je uključilo i određivanje drugih parametara, R_q , R_z i R_y , sa ciljem dobijanja preciznijih rezultata [7,143]. Takođe parametar R_q , koji predstavlja geometrijsku sredinu svih odstupanja od srednje linije je pokazao linearan odnos vremena izlaganja i erozije, osim za *Red Bull* i sok od aronije (15 i 30 minuta), ali bez statističke značajnosti, dok je kod piva ovaj parameter za izloženost od 15 i 30 minuta bio gotovo identičnih vrednosti.

Kod nekih uzoraka (*Schweppes*, *Sprite*, *Red Bull*, crveno i belo vino) ustanovljen je nelinearan odnos između R_z i R_y parametara i vremena izlaganja, kao i najviše vrednosti ovih parametara u najkraćem vremenu izloženosti (*Red Bull*, crveno vino). Ovi parametri imaju više "kvalitativan" prilaz površinskoj hrapavosti jer ukazuju na velika odstupanja neravnina od medijalne linije. Ustanovljene široke varijacije na erodovanim površinama pojedinih uzoraka (na koje ukazuje naročito R_y parametar) mogu odražavati razlike u rastvaranju usled različite orijentacije gleđnih prizmi i različito mineralizovanih regija gleđi [179].

Sva gazirana pića su pokazala snažan erozivni uticaj na površinu gleđnih uzoraka. Njihova pH je bila između 2,51 (*Guarana No Sleep*) i 3,32 (*Red-Bull*), a $TA_{5,5}$ između 0,54 (*Coca-Cola*) i 3,27 (*Red Bull*). U literaturi postoje podaci da gazirana pića imaju veći erozivni efekat u poređenju sa negaziranim [158,180,181]. Objašnjenje za ovu konstataciju (bar kad su u pitanju *in vivo* istraživanja) leži u činjenici da se gazirana pića duže zadržavaju u ustima u odnosu na negazirane napitke zbog prijatnog "reskavog" ukusa [74] a duži kontakt gleđi sa erozivnim izazovom dovodi do jačeg oštećenja. Takođe, sva gazirana pića sadrže ugljenu kiselinu koju stvara ugljen-dioksid u rastvoru, ali erozivni efekat ovih napitaka najverovatnije potiče od dodatnih kiselina [74]. Fosforna kiselina se dodaje *Cola* napicima zbog karakterističnog ukusa i da bi se "suprotstavila" slatkoći. Ostala gazirana pića (uostalom, kao i negazirana) sastoje se od organskih kiselina kao što su limunska, vinska, jabučna ili askorbinska. One doprinose kiselosti napitka, ali se mogu koristiti kao modifikatori ili sredstva za puferovanje i aromatizaciju [182]. Gazirana pića "počinju" sa niskim pH (odmah po otvaranju pakovanja), ali je utvrđeno da ne zahtevaju veliku titraciju natrijum hidroksidom, kao što je slučaj kod negaziranih napitaka, tj. pića na bazi voća koja, pak, sadrže više rafiniranih ugljenih hidrata [183]. Neke studije su pokazale da su bezalkoholna pića koja sadrže limunsku kiselinu erozivnija od onih koja sadrže fosfornu kiselinu [184], dok su druga pokazala suprotno [181]. Jedan od zanimljivih podataka iz literature je da mnoga ispitivana pića sadrže i fosfornu i limunsku kiselinu u svom sastavu, kao što je *Diet-Coke* [71,74], *Coca-Cola Light* [1,5] i *Pepsi-Cola* [1,6]. Neslaganja u pogledu davanja prednosti u erozivnom potencijalu jednoj od ove dve

kiseline leži u činjenici da su obe trobazne (triprotonske) i mogu da oslobode do tri jona vodonika. Na taj način, one postepeno disosuju dozvoljavajući H^+ jonima da stalno budu aktivni i oštećuju površinu zuba. Ipak, kompleksi koje anjoni ovih kiselina grade sa kalcijumom se razlikuju. Anjon citrata se ponaša kao helator izvlačeći kalcijum iz tvrdih zubnih tkiva, a fosfatni anjon je aktivan samo u obliku PO_4^{3-} i, izgleda, manje sposoban da izdvoji jone kalcijuma iz rastvora [16,40].

Najintenzivniju eroziju gleđne površine, tj. povećanje svih parametara hrapavosti, pokazali su uzorci potopljeni u *Red Bull* u vremenskoj izloženosti od 15 minuta, u sok od narandže u vremenskoj izloženosti od 30 minuta i u *Coca-Cola* napitku u vremenskoj izloženosti od 60 minuta. *Red Bull* se pokazao veoma erozivnim, iako je ovo piće imalo višu vrednost pH (3,32) od *Coca Cola*-e, *Schweppes*-a, *Sprite*-a, *Guarana*-e, sportskog napitka *Aqua Viva Recharge* i belog vina, i višu $TA_{5,5}$ (3,27) u odnosu na sve napitke, osim soka od narandže. Prema podacima iz literature, nezasićene supstance sa niskim pH i visokom titrabilnom kiselošću (i visokim puferskim kapacitetom) imaju veći erozivni potencijal, dok supstance sa visokim koncentracijama Ca^{2+} i fosfata uzrokuju manju demineralizaciju [18]. Bez obzira na ustanovljenu, relativno visoku pH vrednost (3,32) po kojoj *Red Bull* ne spada u izuzetno erozivne supstance [50,154], snažan erozivni potencijal ovog energetskog napitka potvrđen je i u prethodnim studijama [185], uzrokujući promene na gleđi [8], dentinu [32], površini korena zuba [165], čak i gleđno-cementnoj granici [44]. Ovakav erozivni potencijal može biti povezan sa prisustvom limunske kiseline i visokom koncentracijom rafiniranih ugljenih hidrata (saharoza, glukoza) koji podstiču stvaranje kiselina [185]. Već je napomenuto (poglavlje *Pregled literature*) da je limunska kiselina veoma erozivna, i zahvaljujući helatnom kapacitetu, uzrokuje sekvestraciju kalcijuma iz pljuvačke i zubnih minerala. Preciznije, *Red Bull* sadrži natrijum citrat, pufersko sredstvo za koje se smatra da pomaže u održavanju nivoa pH, a takođe je i supstanca koja se može izdvojiti i vezati za kalcijum [74].

U ovom istraživanju je ustanovljeno da sok od narandže ima najvišu titrabilnu kiselost, što je u skladu sa nalazima iz literature [5–8,44], pa bi se mogla očekivati veća demineralizacija gleđnih uzoraka. Međutim, dobijeni rezultati su pokazali da su sva gazirana pića izazvala veću eroziju posle izloženosti od 15 minuta u odnosu na sok od narandže. Svi parametri hrapavosti osim R_z su bili niži od istoimenih parametara gaziranih napitaka. Ovaj parametar, koji izračunava proseku od pet uzastopnih merenja maksimalnih i minimalnih vrednosti neravnina na referentnoj dužini, pokazivao je visoke vrednosti koje su bile niže jedino kod uzoraka uronjenih u *Red Bull*. Može se pretpostaviti da je površina gleđnog uzorka uronjenog u sok od narandže bila manje oštećena, ali "hrapavija" u odnosu na uzorke uronjene u gazirane napitke. Kada su

u pitanju duži erozivni izazovi, rezultati su drugačiji; posle 30 minuta ciklične izloženosti, svi parametri hrapavosti su imali najviše vrednosti kod uzoraka izloženih soku od narandže. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora i objašnjavaju pozitivnu korelaciju TK i gleđne demineralizacije u funkciji vremena [5,158,159]. Štaviše, TK je povezana sa nedisosovanim molekulima kiseline koji su nenaelektrisani i sposobni da vode proces demineralizacije ka dubljim slojevima tkiva, disosujući u podpovršinskoj gleđnoj zoni [16,38] (videti *Pregled literature*). U ovom eksperimentu, uzorci gleđi su uronjeni dovoljno dugo u supstance (sok od narandže) da bi se neutralisala kiselina, odnosno da bi molekuli kiseline disosovali do te mere da to utiče na proces demineralizacije. Ipak, neslaganje u odnosu na rezultate drugih istraživača se odnosi na najduže vreme izloženosti soku od narandže, ne toliko u pogledu stepena erozivnosti (svi parametri hrapavosti imaju očekivano visoku vrednost) nego u činjenici da je *Coca-Cola* posle ciklične izloženosti od 60 minuta pokazala najviše vrednosti svih parametara hrapavosti, što, iako bez statističke značajnosti, nije uobičajen nalaz. *Coca-Cola* ima najnižu TA od svih ispitivanih napitaka i pH koja je viša i od pH *Sprite* i *Guarana* napitaka. Stoga se ovaj rezultat ne može objasniti vezom sa molekulima nedisosovane kiseline. Može se pretpostaviti da količina Ca u napitku utiče na dobijene rezultate. Već je naglašeno da veća koncentracija Ca povećava stepen zasićenja u rastvoru, smanjujući tako njegov erozivni efekat [1,17]. U ovom istraživanju nisu određivane koncentracije Ca, fosfata i fluorida, ali, prema podacima iz literature *Coca-Cola* (kao, uostalom i sva gazirana pića), sadrži tri do četiri puta manju koncentraciju Ca u odnosu na sok od narandže. Istovremeno, količina neorganskih fosfata je dva do tri puta viša u *Cola* napicima u odnosu na druga ispitivana pića (izuzimajući crveno i belo vino [3,5]. Lussi i saradnici su u svojim istraživanjima objavili da su veće koncentracije fosfata u erozivnim supstancama povezane sa većim gubitkom površinske tvrdoće na mlečnim zubima [6]. Ovakav rezultat autori su obrazložili činjenicom da su najviše vrednosti fosfata izmerene upravo u visokoerozivnim supstancama, kao što su *Coca-Cola*, *Pepsi*, *Rivella*, *Gatorade*, a da neka od njih, poput *Coca-Cola* i *Pepsi*, imaju visok sadržaj fosforne kiseline i, shodno tome, visoke koncentracije fosfata [6].

Sa ustanovljenim pH vrednostima (3,43 i 3,18), a prema preporuci iz literature [50] ispitivana sportska pića *Isodrinx Isotonic Sports Drink* i *Aqua Viva Recharge* pripadaju (srednje) erozivnim napicima. Svi profilometrijski parametri su pokazali niže vrednosti u svim vremenima izloženosti u odnosu na gazirana pića, ali bez statističke značajnosti. Nije bilo moguće porediti rezultate ovog nalaza sa drugim istraživanjima, pošto su analizirana pića domaćih brendova. Erozivni potencijal sportskih napitaka je već potvrđen u nekoliko studija [5,69,71]. Poređenjem sastava ispitivanih pića (prema proizvođaču) sa sastavom sportskih

napitaka iz literature (limunska kiselina, natrijum ili magnezijum citrat, niska koncentracija kalcijuma) [69] može se ustanoviti velika sličnost, što, pored visokih vrednosti profilometrijskih parametara, potvrđuje erozivnost ispitivanih sportskih napitaka.

Za sok od aronije je, u ovom radu, karakterističan R_q parameter koji je bio statistički značajan čak na nivou $p < 0,001$ pri poređenju uzoraka izloženih 15 min. u odnosu na one od 60 min. Već je napomenuto da ovaj parameter ukazuje na velika odstupanja krive hrapavosti od medijalne linije i "nepravilnije" oštećenje uzorka u kvalitativnom smislu. Ustanovljeno je da sok od aronije ima pH 4,04 i nisku vrednost TK, i, po tim karakteristikama, spada u minimalno erozivne supstance. Osim polifenola, o kojima sledi diskusija u daljem tekstu, bobice aronije sadrže i druge bioaktivne sastojke, uključujući vitamine, bioelemente, karotenoide, tanine, pektine, organske kiseline, proteine i bioaktivne ugljene hidrate, ali se javljaju u manjim količinama od polifenolskih jedinjenja. Najvažniji među njima su antioksidativni vitamini (C i E), karotenoidi i minerali kao što su jod, kalijum, kalcijum i magnezijum. Od organskih kiselina, pasterizovani sok aronije sadrži jabučnu u najvećoj količini (čak 11 g/l) i limunsku u količini od oko 250mg/l [186]. U literaturi ne postoje podaci o erozivnom potencijalu soka od aronije, tako da nije bilo moguće uporediti rezultate ovog istraživanja sa drugim studijama. Dobijeni parametri (pH, TK, površinska hrapavost i morfologija površine tretiranih uzoraka), kao i prisustvo zaštitnih supstanci (polifenoli, Ca), opravdavaju zaključak ove studije da sok od aronije ne oštećuje značajno gleđnu površinu.

Dok je erozivni potencijal bezalkoholnih napitaka dobro dokumentovan, nema dovoljno podataka o uticaju alkoholnih pića na eroziju dentalnih tkiva. Iako postoji stalni trend povećanja potrošnje bezalkoholnih pića, crvena i bela vina, kao i pivo se mogu smatrati popularnim pićima i kod mlađe i kod starije populacije.

Zannata i sar. su ispitivali mikrotvrdoću goveđe gleđi posle potapanja uzoraka u tri različita brenda piva u trajanju od 5, 30 i 60 min [187]. Ustanovili su da je samo pivo *Hainecken* pokazalo smanjenje mikrotvrdoće nakon izlaganja od 60 minuta, iako je njegova pH bila neznatno viša (pH=4,35) od druga dva ispitivana piva, ali ipak niža od kritične (kritična pH za pivo iznosi 5,0 [5]). Pretpostavili su da je razlog tome veća količina citrata stvorenog u toku fermentacije ječmenog slada, koji nije u potpunosti potrošen za vreme procesa kuvanja. Erozivna sposobnost (*Hainecken*) piva se može objasniti sposobnošću citrata da helira kalcijum prisutan u hidroksiapatitu gleđi. Ipak, sva ispitana piva su imala mali potencijal da izazovu eroziju gleđi u poređenju sa *Coca-Colom*. U nedavno objavljenom istraživanju, potvrđen je erozivni potencijal piva *Hainecken*, ali samo na osnovu merenja inicijalne pH i TK [48]. Prisutna studija je pokazala da pivo ne predstavlja snažnu erozivnu supstancu. Iako *Zaječarsko pivo* ima

relativno nisku pH (3,9) i $TK_{5,5}=0,64$, profilometrijski parametri su bili statistički značajno niži od parametara svih gaziranih napitaka, kao i od soka od narandže. Suštinski, ovi rezultati se uklapaju u konstataciju Meire i sar. [48] i Zanate i sar [187] da, u odnosu na vrste i brendove piva, postoje jasne razlike između njihovih erozivnih potencijala.

Degustatori vina koji svakodnevno konzumiraju preko 20 vrsta ovog pića, kao i hronični alkoholičari imaju veći rizik od erozije na zubnim tkivima nego osobe koje povremeno uživaju u vinu [11,188]. Podaci u literaturi o produženom delovanju crvenog i belog vina pokazuju njihov visok erozivni potencijal, dok se mali broj istraživača bavio umerenim delovanjem vina, ili drugih alkoholnih pića na površinu zuba. [10].

Willershausen i sar. su u svojoj *in vitro* studiji ispitivali uticaj belih i crvenih vina na uzorke humane gleđi u vremenskom trajanju od 24 sata [10]. Količine oslobođenog kalcijuma određene su kolorimetrijski, srednja vrednost površinske hrapavosti (R_a) izmerena je profilometrom, a kvantitativna analiza elemenata, tj. mogući gubitak minerala - korišćenjem mikroanalizatora sa elektronskom sondom. Rezultati su pokazali da je belo vino sorte *Rizling* imalo najnižu pH vrednost i najvišu TK i da je prouzrokovalo statistički značajno veće oslobađanje Ca iz erodiranih uzoraka [11]. U trenutnoj studiji, takođe, belo vino iste vrste je imalo nižu pH (3,02 u odnosu na 3,49) i višu vrednost TK (2,69 u odnosu na 1,82) od crvenog vina (*Kratošija*). Svi parametri hrapavosti u svim vremenima izloženosti su imali veće vrednosti za belo u odnosu na crveno vino, osim parametara R_z (izloženost 15 min.) i R_y (izloženost 15 i 60 min.) koji su bili viši za crveno vino, ali bez statističke značajnosti.

Nedavno je (2021. godine) objavljena jedna studija sa ciljem da se proveriti uticaj crvenog vina, soka od narandže, soka od jabuke i limunske kiseline na kinetiku erozije gleđi i analizira erozivni potencijal ovih supstanci u prisustvu i odsustvu stečene gleđne pelikule [139]. Sa stanovišta diskusije u ovom poglavlju disertacije, interesantni su rezultati dobijeni izlaganjem uzoraka gleđi (koji nisu imali dentalnu pelikulu) odgovarajućim erozivnim rastvorima. Priprema takvih uzoraka je podrazumevala inkubaciju u vlažnoj komori 2 časa na 37°C, ispiranje u dejonizovanoj vodi i sušenje pre erozivnog izazova. Autori su zapazili da su crveno vino i sok od narandže prouzrokovali znatno manju eroziju u odnosu na sok od jabuke i limunsku kiseline, bez obzira na sličnu inicijalnu i određenu kritičnu pH vrednost za svaku supstancu. To je objašnjeno činjenicom da su hrana i pića bogata polifenolom u stanju da direktno na površini gleđi naprave tanku zaštitnu "oblogu" u odsustvu dentalne pelikule [189]. Nasuprot činjenici da precizan mehanizam delovanja ovih polifenolskih "obloga" nije u potpunosti razjašnjen, mnogo je razumljivija povezanost polifenola sa gleđnom pelikulom, što je od značaja za *in vivo* uslove. Molekuli polifenola mogu lako da reaguju sa proteinima

pljuvačke, formirajući proteinsko-polifenolne komplekse koji se vezuju sa proteinima stečene gleđne pelikule. U stečenoj gleđnoj pelikuli modifikovanoj crvenim vinom, količine adsorbovanih proteina su 10 puta veće od količine proteina u nemodifikovanoj pelikuli [140,190], pri čemu se povećava i njena debljina i otpornost na uklanjanje. Prema internetskoj bazi podataka o polifenolima (*Phenol-Explorer*) [191], crveno vino sadrži najveću količinu polifenola, oko 215 mg različitih vrsta polifenola/100 ml vina, dok belo vino sadrži primetno manje polifenola (32,1 mg polifenola/100 ml), što može objasniti zašto je belo vino erozivnije od crvenog [5].

Konsumacija čajeva povoljno deluje na zdravlje ljudi zbog dokazanih antioksidativnih svojstava. Čajevi sadrže širok spektar hemijskih jedinjenja, ali njihova aroma i brojni korisni efekti uglavnom potiču od, već spomenutih, polifenola. U literaturi postoji malo studija vezanih za procenu erozivnog potencijala komercijalno dostupnih čajeva preko izračunavanja pH vrednosti i titrabilne kiselosti, što se uglavnom odnosi na biljne i voćne čajeve [58,192]. U ovoj studiji, svi profilometrijski parametri na gleđnim uzorcima tretiranim čajevima su se značajno razlikovali od parametara ostalih eksperimentalnih uzoraka. Ipak, pojedini parametri nisu pokazali značajnu razliku u odnosu na kontrolu. Ovo je bio očekivan nalaz, s obzirom da postoji opravdana pretpostavka da prisustvo polifenola u supstancama može da pruži zaštitu gleđi od erozije i u *in vitro* uslovima, kada nije prisustva gleđna pelikula [139]. Druga istraživanja su dokazala da zeleni i crni čaj, slično crvenom vinu, mogu modifikovati dentalnu pelikulu i poboljšati njen zaštitni efekat od erozije gleđi [81]. Takođe, nekoliko publikacija je navelo da su polifenoli inhibitori aktivnosti različitih metaloproteinaza i, u tom smislu, mogu imati zaštitni efekat kod erozije dentina [193]. Dalje, crni i zeleni čaj sadrže i fluorid, ali u koncentraciji koja može imati protektivan efekat u odnosu na karijes, ali ne i značajnu ulogu u zaštiti od erozivnog oštećenja [81].

U ovom istraživanju je korišćena *stylus* profilometrija za ispitivanje površinske hrapavosti tretiranih uzoraka gleđi. Ova metoda registruje samo nepravilnosti površine, a ne i količinu izgubljene gleđi [145,194]. Na ovaj način se može objasniti neočekivan nalaz hrapavosti u pojedinim slučajevima, kao i niže vrednosti pojedinih parametara kod dužih izlaganja ispitivanim pićima u poređenju sa kraćim izlaganjem (30 u odnosu na 15 minuta i 60 u odnosu na 30 minuta).

6.3. Diskusija rezultata ispitivanja morfoloških karakteristika gleđne površine nakon izlaganja uzoraka bezalkoholnim i alkoholnim pićima

U ovom poglavlju diskutovani su rezultati dobijeni skenirajućom elektronskom mikroskopijom uzoraka gleđi koji su izloženi cikličnom modelu erozije sa naizmeničnim de- i remineralizacionim izazovima, uz korišćenje samo jednog vremenena izlaganja (15 minuta). Ovom tehnikom se mogu analizirati nepolirane površine uzoraka gleđi koje su bile izložene ne samo dejstvu potencijalno erozivnih rastvora, već i sredstvima za izbeljivanje, remineralizujućim supstancama itd, pri čemu je omogućena kvalitativna procena demineralizacije (ili remineralizacije) površine na osnovu posmatranja specifičnih morfoloških i strukturnih karakteristika gleđi [171–173].

Skenirajuća elektronska mikroskopija radi na principu raspršivanja elektrona na površini uzorka i dobijeni signal daje informacije o topografiji i sastavu površine. SEM mikrografije imaju veliku dubinu polja (svi njihovi delovi su u fokusu, uprkos različitoj dubini), pa stoga mogu da daju 3-D slike visoke rezolucije. Za konvencionalni SEM, površina mora biti presvučena materijalom koji je električno provodljiv kako bi se sprečilo nakupljanje elektrostatičkog naelektrisanja. Ovaj materijal je obično zlato, a uzorci će nesumnjivo biti trajno izmenjeni tokom procesa isušivanja i naparavanja [171,172].

Iz tog razloga se efekti tretmana ne mogu proučavati konvencionalnim SEM-om, jer serijska merenja nisu moguća. Ograničenje u smislu serijskih merenja se može se delimično prevazići korišćenjem „*environmental*” SEM-a, (ESEM) koji koristi niži vakuum i omogućava posmatranje u vlažnim uslovima, tako da uzorci ne moraju biti osušeni ili naparavani. Rezolucija je niža od one kod konvencionalnog SEM-a, ali ESEM se pokazao korisnim u studijama gde je potrebno ponoviti ispitivanje i porediti ga sa prethodnim [85]. Zbog toga, SEM može biti odlična dopuna neke od kvantitativnih metoda, pogotovu ukoliko se koristi opisna *score*-skala [172]. Postoji mogućnost pripreme uzoraka za SEM pomoću „replika tehnike”, ali je tada prisutan rizik od njihovog uništavanja, uz prikazivanje nedovoljno preciznih rezultata [171].

U ovom istraživanju, gleđni uzorci koji su bili izloženi erozivnom izazovu pokazali su velike varijacije u morfologiji površine. Pri korišćenju SEM analize poželjno je pridržavati se preporuka iz literature, koje podrazumevaju neka „pravila”. U cilju postizanja uporedivosti između studija trebalo bi u eksperimentima koristiti uvek istu vrstu zuba (sekutići, očnjaci, premolari ili molari), koji su uporedivi u što većem broju aspekata [195]. Za ovaj deo studije korišćeno je 120 gleđnih uzoraka koji potiču od trećih, impaktiranih molara. Njihove površine

su bile potpuno intaktne (nisu bile izložene ni mastikatornim silama ni mehaničkim silama zubne četkice), bez ikakvih promena na površini (ogrebotine, urezi i sl.) koje su inače karakteristične za zube u funkciji. Takođe, ista procedura izlaganja erozivnoj supstanci (npr. *etching* priprema gleđne površine u adhezivnoj stomatologiji ili ortodontici) dovodi do znatne razlike u ultrastrukturnom modelu erozivnog oštećenja, ne samo između različitih zuba, nego i na susednim poljima jednog istog zuba [196].

U ovom istraživanju, morfologija površine erodovane gleđi je posmatrana i procenjivana samo na okluzalnim i srednjim trećinama vestibularnih i oralnih strana krunica zuba. U cilju bolje kvalitativne analize i opisivanja stepena oštećenja na gleđi i njenim pojedinim delovima, uključena je modifikovana skala sa ocenama od 0-3. Ocena 0 je dodeljena nepromenjenoj površini sa prisutnim perikimatama, plitkim ulegnućima, neznatnom izbrazdanošću i razvojnim porama, dok je ocenom 3 okarakterisano rastvaranje površine gleđi sa dekompozicijom morfologije prizmi. U tom smislu, gingivalne trećine zuba, koje su takođe analizirane, nisu procenjivane pomoću scor-sistema, jer se njihova morfologija, u većini slučajeva, znatno razlikovala od morfologije okluzalnih i centralnih regija bočnih površina krunica.

Prema podacima iz literature, erozivno oštećenje u prizmatičnoj gleđi se prvo dešava u perifernim delovima prizmi, a zatim se rastvaranje nastavlja u njihovim jezgrima. Kasnije su zahvaćena i interprizmatska područja. Aprizmatska gleđ podleže iregularnom tipu rastvaranja. Kao rezultat gubitka minerala i na periferiji i u centralnim delovima prizama dobija se površina sa tankim, odvojenim snopovima kristala [197].

U ovom istraživanju, morfološke promene na gleđnim uzorcima, tretiranim različitim rastvorima, nisu uvek bile istovetne po svom erozivnom potencijalu sa svojim „parovima” kojima su određivani pH, TA i profilometrijski parametri. Ovo je očekivan rezultat, s obzirom da je ispitivan erozivni potencijal relativno velikog broja (različitih) supstanci, ali sa malim brojem uzoraka po supstanci.

Tako, na primer, *Red Bull* je dobio najveći broj ocena 3 (šest od osam uzoraka) i time pokazao najveći erozivni potencijal. Na gleđnoj površini, sa tipom nagrizanja 1 i 2, na većem uvećanju su se uočavali i sitno zrnasti kristali koji prekrivaju inter i intraprizmatsku supstancu. Nije bilo moguće porediti ultrastrukturu površine gleđi sa drugim studijama koje su istraživale erozivnost ovog napitka. Ipak, snažan erozivni potencijal *Red Bull*-a je dokazan drugim metodama kao što su mikrotvrdoća gleđi [5,8], visok sadržaj šećera [185], dubina lezije u gleđi i dentinu [32], profilometrija [74]. Sva ova istraživanja su uzela u obzir i pH i TK. Nedavno je objavljena morfološka studija gleđno cementne granice posle uranjanja u erozivne napitke i

ustanovljen je snažan erozivni potencijal *Red Bull*-a, sa „cepanjem” CGG, jasno vidljivim otvorenim dentinskim tubulima i nepravilnošću morfologije cementa [44].

Kao što se očekivalo, površina gleđi potopljena u *Coca-Cola* pokazivala je dominaciju demineralizacije tipa 1. Erozivno rastvaranje je obuhvatilo jezgro prizme (štapa), uz potpunu izmenu morfologije: prizme su bile ozbiljno pogođene i veće rastvaranje jezgra prizmi u poređenju sa onim u interprizmatskim oblastima dalo je gleđi „*honeycomb*” izgled. Sa pet uzoraka koji su imali najvišu ocenu, *Coca Cola*, zajedno sa *Red Bull*-om spada u grupu najerozivnijih supstanci sa nešto drugačijim modelom demineralizacije od drugih gaziranih napitaka. U literaturi postoji nekoliko radova koji su ispitivali erodovanu gleđnu površinu posle dejstva *Coca-Cole*. Ovaj nalaz se generalno uklapa sa nedavno objavljenim istraživanjem ultrastrukture gleđnih uzoraka uronjenih u *Coca-Cola* napitak koji takođe ukazuje na centralni tip demineralizacije prizmi kod kraćih izloženosti [157]. Ipak, u trenutnoj studiji postojao je cikličan model erozije sa naizmeničnim erozivnim izazovima i „remineralizacijom” u veštačkoj pljuvački, sa ukupnim vremenom izloženosti napitku od 450 časova. U studiji Torres i sar. gde je takođe primenjeno ciklus potapanje (3 puta po 5 minuta u trajanju od sedam dana) i procenjivanje pomoću SEM, demineralizacioni proces je zahvatio celu površinu gleđi, ali je bio izraženiji u interprizmatskoj regiji [198].

Ostala gazirana pića (*Guarana*, *Schweppes*, *Sprite*) su pokazala sličan erozivni potencijal u morfološkom smislu, sa rastvaranjem u oblasti košuljica prizmi i zrnastim kristalima na „ulazu” u pojedine prizme. Ovakav, gotovo umeren, nalaz nije u skladu sa izračunatim vrednostima pH i TK kod *Guarane*, s obzirom da je kod ovog napitka ustanovljena najniža pH, tako da je mogla da se očekuje snažnija demineralizacija, u odnosu na „samo” tri dobijene najviše ocene.

Kod sportskih napitaka uočena je jedna specifična struktura nastala rastvaranjem prizmi koja je u literaturi označena kao „*hoof-like*” forma [199]. Različita „dubina” kod ovakve morfološke forme može ukazati na različit gubitak minerala u različitim delovima prizmi. Cheng i sar. (2009) su na AMF zapazili ovu pojavu, koja je postajala izraženija sa vremenom izlaganja kiselinu [199].

Erozivni izazov soka od narandže je dao atipičnu sliku demineralizacije sa obrisima prizmi i gleđnom površinom koja je pokazivala duboke brazde i pukotine. Ovaj nalaz je mogao da se uporedi sa SEM rezultatima studije koja je komparirala morfološke promene između soka od narandže i gastičnog soka. Rezultati su vrlo usaglašeni, s obzirom da je u obe studije eksperiment rađen pod (gotovo) istim uslovima [34].

Kod uzoraka koji su morfološki izražavali visok ili relativno visok erozivni potencijal (gazirana pića, sportski i energetske napici) u većini slučajeva su primećene skupine globularnih ili vlaknastih kristala koje su prekrivale ili potpuno maskirale erodovanu površinu gleđi.

Sok od aronije, sva alkonolna pića, kao i čajevi nisu dobili ni jednu najvišu ocenu na SEM mikrografijama gleđi, mada je sok od aronije imao šest uzoraka sa ocenom 2. Od alkoholnih napitaka, belo vino se pokazalo najerozivnijim. Skening mikrografije uzoraka posle potapanja u čajevu se nisu razlikovale od kontrole, iako su njihovi profilometrijski parametri ukazivali na izvesno oštećenje.

U ovoj tezi je samo profilometrijski (a ne i morfološki) ispitivana zavisnost erodovanih površina gleđi i vremena izloženosti. Podaci iz literature ukazuju da SEM izgled morfoloških promena u prirodno erodovanoj gleđi zavise od stadijuma zubne erozije [200]. Štaviše, SEM ekstrahovanih zuba sa klinički dijagnostikovanom erozijom ukazao je na postojanje razlika u morfologiji susednih erodovanih područja. Erodovala gleđ je, u nekim oblastima, pokazala rastvaranje samo u delu omotača, a u drugim - rastvaranje i jezgra i omotača prizama. To znači da se i rane i uznapredovale erozivne lezije mogu istovremeno pojaviti na istim površinama zuba, što naglašava „nepredvidivu” prirodu klinički ispoljene erozije [200].

6.4. Diskusija rezultata ispitivanja uticaja različitih komponenti pljuvačke na zaštitni potencijal pelikule od erozivnog oštećenja gleđi

Pljuvačka korišćena u ovoj studiji je skupljena od više donora, objedinjena i pripremljena za dalji eksperiment. Ovakva, objedinjena pljuvačka je već korišćena u nekoliko eksperimenata [26,81]. Postoji polemika oko toga da li je bolje koristiti pljuvačku od jednog davaoca ili objedinjenu pljuvačku uzetu od nekoliko pojedinaca. Prvi pristup se može opravdati obezbeđivanjem doslednosti, a drugi - izbegavanjem pristrasnosti [29]. Prema podacima iz literature, izgleda da se zaštitni efekat *in vitro* pelikule (nastale uranjanjem uzoraka gleđi i dentina u individualnu nestimulisanu i necentrifugisanu pljuvačku) znatno razlikuje između pojedinaca [201]. Međutim, sastav pljuvačke se menja sa stepenom i načinom stimulacije, sa vremenom stimulacije i sa vremenom u toku dana. Stoga, presudno je standardizovati metod i vreme sakupljanja bez obzira da li je uključen jedan ili više donora [29], što je ispoštovano u ovom eksperimentu. Ova objedinjena pljuvačka je imala određen tretman (opisan u poglavlju *Materijal i metode*) do zamrzavanja i određen protokol pri odmrzavanju. Na osnovu podataka iz literature, moguće je da zamrzavanje i odmrzavanje pljuvačke dovede do precipitacije

određenih proteina [202]. Ipak, u ovom istraživanju, nije primećena ni zamućenost niti bilo kakav talog nakon odmrzavanja pljuvačke. Čak i da je postojala precipitacija, ona bi podjednako uticala na sve grupe, tako da se mogu isključiti razlike između grupa uzrokovanih zamrzavanjem i odmrzavanjem [26]. Odleđena pljuvačka se zatim koristila za formiranje dve dodatne grupe: jedna grupa je dijalizovana veštačkom pljuvačkom, što je za rezultat imalo jednak sadržaj jona kao u veštačkoj i sličan sadržaj proteina kao u humanoj pljuvački, a druga grupa je dijalizovana dejonizovanom vodom, što je rezultovalo rastvorom sa (samo) salivarnim proteinima i odsustvom ili vrlo niskom koncentracijom jona. Iako u ovom istraživanju nisu mereni kalcijumovi i fosfatni joni, pretpostavlja se da nije bilo moguće ukloniti u potpunosti sve jone iz pljuvačke posle dijalize dejonizovanom vodom. Ova pretpostavka je opravdana zbog činjenice da salivarni proteini i peptidi imaju afinitet da vezuju kalcijumove i fosfatne jone [26]. Bez obzira na tu činjenicu, usvojena je sugestija Baumman-a i sar. da se humana pljuvačka dijalizovana sa dejonizovanom vodom (HP/DV) smatra sredinom koja ne sadrži slobodne jone, već samo salivarne proteine [26].

Shodno ciljevima koji su postavljeni za ovaj deo studije, pristupilo se prvo izlaganju uzoraka (jednoj od pripremljenih) pljuvački, a nakon toga i erozivnom rastvoru. Da bi se formirala pelikula koja će pružiti (izvesnu) zaštitu od erozivnog izazova neophodno je da se gleđ izloži pljuvački u trajanju od najmanje 60 minuta [24]. Zatim je usledio erozivni „napad” (limunska kiselina u trajanju od 3 minuta), što je predstavljalo jedan ciklus. Eksperiment je završen posle četiri ciklusa sa ukupnim izlaganjem kiselinu od 12 minuta.

Prema preporuci iz literature, za dijalizu je odabrana membrana sa prorezima takve veličine kroz koje je moguća samo difuzija jona i molekula mase manje od jednog kDa, tako da sadržaj proteina uglavnom ostane u dijalizovanom rastvoru [26]. *Dalton* je jedinica atomske mase, a, s obzirom da su proteini veliki molekuli, njihova atomska masa se obično izražava u kilodaltonima. Međutim, pojedini salivarni peptidi imaju masu manju od 1 kDa i mogli su difundovati iz pljuvačke. Osim toga, neki salivarni proteini su mogli da se „zalepe” za dijaliznu membranu i da budu uklonjeni iz dijalizovane pljuvačke. Iako bi ovo predstavljalo izvesno ograničenje, Baumman i sar. smatraju tolerantnom ovu nemogućnost apsolutno precizne količine proteina u dijalizovanim pljuvačkama [26]. Prema tome, za HP/VP i HP/DV se može pretpostaviti da su imale isti sadržaj proteina (jer su obe dijalizovane), ali bi bilo logično da on bude niži od sadržaja proteina u nedijalizovanoj HP. Što se tiče jonskog sastava, humana stimulisana pljuvačka dijalizovana sa dejonizovanom vodom (HP/DV) ne bi trebalo da sadrži jone, ili bi oni morali da se nađu samo u tragovima.

Pored dijalizovanih saliva i HP, korišćena je i veštačka pljuvačka (VP) da bi se procenio samo uticaj prisutnih jona. S obzirom da koncentracija jona u veštačkoj pljuvački nikako nije mogla da bude identična koncentraciji jona u HP, dijaliza humane stimulisane pljuvačke sa veštačkom pljuvačkom (HP/VP) je omogućila da ona ima (gotovo) isti sadržaj proteina kao HP, ali i iste koncentracije jona kao VP. Ovo je obezbedilo direktno poređenje uticaja veštačke pljuvačke (tj. samo mineralnih jona) sa onom pljuvačkom koja sadrži i mineralne jone i proteine (HP/VP).

Rezultati površinske hrapavosti posle imerzije uzoraka u VP su, u ovoj tezi, pokazali niže vrednosti u odnosu na ostale medijume, a statistička značajnost je jedino ustanovljena u odnosu na kontrolne uzorke. Druge studije, koje su koristile duže periode uranjanja gleđnih uzoraka u VP, pokazale su očvršćavanje erodovanih površina [169,203].

Posle obavljenih ciklusa re i demineralizacije sa pripremljenim pljuvačkama i limunskom kiselinom uzorci su posmatrani na MAS. Pomoću MAS je moguće ispitivanje različitih supstanci u visokoj rezoluciji, uključujući površinu tvrdih zubnih tkiva, polimere, keramiku, metale, biomolekule itd [31,204–206]. Različiti režimi rada omogućavaju merenje, pre svega, površinske topografije, ili razlika u elastičnosti [172]. Mikroskop atomskih sila je korišćen u studijama erozije za kvalitativan pristup poređenja površine tvrdog zubnog tkiva i gleđne pelikule nakon izlaganja različitim erozivnim agensima [20,31]. Generalno, MAS je u stanju da meri razlike u visini nepravilnosti površine - reda veličine jednog atoma, čineći tehniku pogodnom za otkrivanje vrlo ranih faza gubitka supstance usled erozivnih i abrazivnih napada [199]. Takođe, pogodan je za izradu grafija erozivno izmenjenih površina tvrdog zubnog tkiva ili za merenje površinske hrapavosti [20,204].

Topografija površine gleđnih uzoraka, u ovom istraživanju, dobijena je u kontaktnom modu, snimanjem naizmeničnim režimom (režimom tapkanja), koji minimizira habanje površine zuba. Procenjivana su dva parametra: R_a (srednja vrednost hrapavosti) i R_q (kvadratni koren srednje vrednosti hrapavosti), što je omogućilo potpunije razumevanje promena površinske teksture uzrokovane svakim od pljuvačnih rastvora [207].

Najveću prosečnu vrednost R_a i R_q parametara pokazali su uzorci u HP/VP, a najmanju u HP/DV. To znači da su najmanju prosečnu hrapavost pokazali uzorci gleđi koji su „zaštićeni” pljuvačkom koja je sadržavala samo pljuvačne proteine. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima Baumann-a i sar., koji su uzorke gleđi tretirali istim erozivnim izazovom i istim pljuvačnim medijumima, s tom razlikom što su ispitivali površinsku tvrdoću umesto površinske hrapavosti [26]. Merenje površinske tvrdoće, kao i količine izgubljenog kalcijuma je vršeno posle svakog ciklusa (i posle erozivnog izazova i posle potapanja u inkubacione rastvore). Ustanovljen je pad

vrednosti mikrotvrdoće posle svakog erozivnog „napada”, ali i blagi porast mikrotvrdoće posle potapanja u inkubacione rastvore. „Očvršćavanje” gleđi je zavisilo od vrste remineralizujućeg medijuma. Najbolji rezultati su dobijeni sa pelikulom sastavljenom od HP/DV, koja je pokazala najmanje ukupno smanjenje mikrotvrdoće i najmanju količinu oslobođenog kalcijuma. Rezultati dobijeni u ovoj tezi sugerišu da najniža vrednost površinske hrapavosti gleđi kod inkubacije sa HP/DV ukazuje na bolju zaštitnu „moć” pelikule u odnosu na druge medijume. Važno je istaći da je fokus istraživanja ovog dela disertacije bio ustanoviti (samo) zaštitni efekat ispitivanih medijuma, a ne i njihovu remineralizujuću sposobnost, koja je bila jedna od ciljeva studije *Baumann-a i sar.* Iako se metodom površinske hrapavosti mogu registrovati samo nepravilnosti na površini uzorka, bez količine izgubljene gleđi [145,194], vreme izloženosti kiseline od (samo) 12 minuta bi trebalo da bude dovoljno kratko da ne izazove „zaravnjavanje” površine uzoraka i pruži realan uvid u procenjivanje zaštite pojedinih inkubacionih rastvora.

Rezultati dobijeni u ovoj studiji su u suprotnosti sa rezultatima *Martins-a i sar.* [25], koji su zaključili da dijalizovana pljuvačka nije pružala dobru zaštitu od demineralizacije gleđi i da je celokupna pljuvačka bila efikasnija u zaštiti od erozije. Ipak, rezultati spomenute studije su dobijeni pod različitim uslovima u odnosu na uslove u kojima je rađen eksperiment u okviru ove disertacije.

Na temu uloge različitih komponenti pljuvačke/dentalne pelikule u zaštiti gleđi od erozije, *Mutahar i sar.* su objavili dva rada. U jednom je pokazano da jednodnevno izlaganje prirodnoj pljuvački (kombinaciji minerala i proteina) pruža bolju zaštitu od erozivnog trošenja u poređenju sa veštačkom pljuvačkom (koja sadrži samo minerale) i dejonizovanom vodom [20]. U drugom istraživanju je ustanovljeno da proteini ukupne pljuvačke pružaju bolju zaštitu od erozija od proteina pljuvačke iz (samo) parotidne žlezde [27].

Rezultati dobijeni u ovoj tezi (kao i rezultati dobijeni u studiji *Baumann-a i sar.*) čine se vrlo neobičnim; rastvor bez slobodnih jona (HP/DV), u kome su samo proteini, dali su bolje rezultate u zaštiti jedne visoko mineralizovane supstance kakva je gleđ. Već je objavljeno da organske komponente (proteini) pljuvačke, bilo samostalno ili interakcijom sa hemijskim svojstvima pljuvačke, mogu imati značajan uticaj na osetljivost površine zuba na demineralizaciju [83]. U slučaju HP/DV, većina jona, posebno kalcijuma i fosfata, uklonjena je iz pljuvačke. Kada su u pljuvački prisutni joni kalcijuma i fosfata, oni će se takmičiti za mesta vezivanja na proteinima koji vezuju kalcijum i fosfat sa jonima koji se nalaze na površini gleđi. U nedostatku kalcijumovih i fosfatnih jona u pljuvački, može se dogoditi da se proteini koji vezuju kalcijum i fosfat u HP/DV bolje vežu za površinu gleđi. Zbog toga je bazni sloj salivarne pelikule koji se formira od HP/DV verovatno više vezan za površinu gleđi i stoga je više štiti

od erozije. Takođe, postoji pretpostavka da salivarni proteini penetriraju u gleđne pore koje su se otvorile zbog erozivnog izazova. Na taj način, oni deluju kao premošćujući ligamenti između susednih prizmi, čime se ojačava gleđ [208].

Iako su prirodna pljuvačka (HP) i HP/VP imale veći ili isti sadržaj proteina u odnosu na HP/DV i sadržavale su i veću koncentraciju kalcijuma i fosfata, pokazale su značajno manji zaštitni efekat od HP/DV [26].

Slike dobijene korišćenjem MAS u ovoj tezi potvrđuju da erozivno oštećenje pokazuje razlike između površina gleđi koje su potopljene u različite vrste pljuvačke. Iako su podaci o površinskoj teksturi u literaturi još uvek kontradiktorni, opšte je prihvaćeno da erozivni izazovi povećavaju hrapavost gleđi do određenog nivoa, pre nego što površina postane potpuno „zaglađena” [207]. U ovoj studiji, MAS slike kontrolnih uzoraka gleđi pokazale su relativno ravnu površinu sa vidljivim tragovima poliranja. Uzorci uronjeni u prirodnu pljuvačku pokazali su znake erozije, pri čemu su se pojavljivale strukture nalik prizmama; međutim, ovaj efekat je bio znatno manje jasan od onog na uzorcima uronjenim u prirodnu pljuvačku dijalizovanu veštačkom pljuvačkom (HP/VP). Utvrđeno je da su ove površine bile najhrapavije od svih uzoraka, pri čemu se centri prizama nisu uočavali, dok je periferija ostala relativno neoštećena. Ovo je dovelo do pojave visokih, oštrih pikova koji su uočeni na 2D profilu. Sličan nalaz je već saopšten u literaturi [209] kao tip 1 model nagrizanja vidljiv na MAS. Uzorci gleđi uronjeni u veštačku pljuvačku su pokazali tipično erodovanu površinu sa uočljivim prizmama i interprizmatskom supstancom. Ovaj nalaz nije u skladu sa predhodno saopštenim [20]. U uzorcima sa HP/DV uočavala su se znatno ravnija polja u kojima je daleko teže bilo da se definišu njihove strukture poput prizmi i interprizmatske supstance. U prisutnom istraživanju, površinska hrapavost nije merena posle svakog ciklusa, već samo na kraju eksperimenta, posle 12 minuta izloženosti limunskoj kiselini. Metodologija koja je korišćena u ovom delu disertacije potvrđuje da je ovaj vremenski period cikličnog izlaganja erozivnom izazovu spada u optimalne, pri proučavanju ranih erozija [26].

Zbog mnogih razlika između *in vitro* i *in vivo* stvorenih pelikula, još uvek ne postoji pogodan *in vitro* model erozivnog oštećenja i erozivnog trošenja zuba koji može verno da opiše kliničku situaciju. To podrazumeva jedinstvene karakteristike oralnog okruženja kao što su: dinamika protoka pljuvačke, aktivnost enzima, debljinu stečene pelikule, osobine površine koja sadrži minerale, kao i zdravlje i starost pacijenata [124,210]. Pored toga, *in vitro* studije koriste brušene i polirane površine gleđi koje su osetljivije na delovanje kiseline i sadržaj minerala je drugačiji u poređenju sa spoljnim prirodnim slojem gleđi [82,211]. Međutim, pouzdan, tačan, klinički relevantan *in vitro* model erozivnog trošenja zuba za proučavanje uloge dentalne

pelikule u zaštiti od erozije bio bi od velike koristi; smanjilo bi skupe i dugotrajne *in situ* modele.

Mnogi autori sugerišu složenost erozivnog procesa i činjenicu da *in vitro* istraživanja ne mogu u potpunosti da reprodukuju klinička stanja. *In vitro* studije treba tumačiti samo kao mogućnost predviđanja erozivnog potencijala kiselih supstanci [5,164]. Erozijska je multifaktorska stanja, a njen nastanak i razvoj zavise od mnogih rizičnih i zaštitnih faktora, kao i od njihove međusobne interakcije [1,3]. Zbog toga je potrebno više vrsta analiza. Dalje studije su neophodne kako bi se poboljšalo razumevanje preciznih mehanizama koji učestvuju u napredovanju erozije, kao i u njenoj zaštiti. Iako ova studija ne može u potpunosti da pokaže složeno oralno okruženje, ona potvrđuje erozivni potencijal nekih bezalkoholnih i alkoholnih napitaka u odnosu na vreme izlaganja i ukazuje na mogućnost najbolje „opcije” pomoću koje dentalna pelikula pruža zaštitu gleđi od erozivnog oštećenja.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu ispitivanja erozivnog potencijala četrnaest napitaka, merenjem inicijalne pH i titrabilne kiselosti zaključeno je sledeće:

- Najniže inicijalne vrednosti pH su ustanovljene kod napitaka *Guarana No Sleep* i *Schweppes Bitter Lemon*, a najviša vrednost je zabeležena kod zelenog i crnog čaja.
- Najnižu vrednost titrabilne kiselosti do pH 5,5 su imale *Coca-Cola* i sok od aronije, a najvišu *Life Premium 100% voćni sok pomorandža* i *Red Bull*.

Analizom ustanovljenih parametara hrapavosti površine gleđi (R_a , R_q , R_z i R_y) posle potapanja u ispitivane napitke, pomoću *stylus* profilometrije, u cikličnom modelu eksperimenta sa povećanjem vremena izloženosti, zaključeno je sledeće:

- Najintenzivniju eroziju gleđne površine pokazali su uzorci potopljani u *Red Bull* u vremenskoj izloženosti od 15 minuta, u *Life Premium* sok od narandže od 30 minuta i u *Coca-Cola* napitku od 60 minuta.
- Parametri hrapavosti R_a i R_q su za sve napitke pokazivali povećanje vrednosti sa porastom vremena izloženosti gleđnih uzoraka.
- Parametar hrapavosti R_z je pokazivao za sve napitke povećanje vrednosti sa porastom vremena izloženosti gleđnih uzoraka, osim za *Schweppes Bitter Lemon*, *Sprite*, *Red Bull* i crveno vino.
- Parametar hrapavosti R_y je pokazivao za sve napitke povećanje vrednosti sa porastom vremena izloženosti gleđnih uzoraka, osim za *Red Bull*, crveno i belo vino.

Analizom erodovanih gleđnih uzoraka pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije zaključeno je sledeće:

- ustanovljena su četiri od pet morfoloških tipova nagrizanja kiselinom: tip 1 (*honeycomb model*), tip 2 (*cobblestone*) model, tip 3 - kombinacija tipa 1 i 2, kao i tip 4, koji daje površini atipičan izgled, bez karakterističnih osobina za gleđnu morfologiju.
- *honeycomb* model je najčešće ustanovljen model erozije (*Coca Cola*, *Red Bull*, sportska pića, sok od aronije, belo vino)
- Iako je dominirao tip 1, sportski napici (a kod nekih uzoraka i *Red Bull*) su erodovali gleđnu površinu i kombinovanim tipom nagrizanja, pri čemu su se na većem uvećanju uočavala erodovana polja sa „utisnutim” prizmama koje imaju različitu dubinu (*"hoof-like"* forma prizme).

- Sok od narandže je uzrokovao atipično nagrizanje površine gleđi sa dubokim brazdama i pukotinama.
- Na većem uvećanju, većina ispitivanih napitaka sa ustanovljenim erozivnim potencijalom (*Schweppes Bitter Lemon*, *Sprite*, *Guarana - No Sleep* i, u izvesnoj meri, sportski napici) pokazala je prisustvo globularnih i vlaknastih kristala, koji su manje ili više maskirali erodovanu površinu gleđi.
- Uzorci gleđi potopljani u *Red Bull* su imali najveću prosečnu ocenu (ustanovljenu skalom od 0 do 3), a uzorcima potopljenim u zeleni čaj su dodeljene ocene koje su u proseku bile najniže.
- Profilometrijski parametri i nalaz morfoloških promena na gleđnoj površini nisu uvek pratili izračunate vrednosti pH ili TK pića.

Analizom ustanovljenih parametara hrapavosti površine gleđi (R_a i R_q) u cikličnom modelu eksperimenta sa limunskom kiselinom i dijalizovanim pljuvačkama, korišćenjem mikroskopa atomskih sila zaključeno je sledeće:

- Uzorci gleđi, koji su potapani u humanu pljuvačku dijalizovanu sa dejonizovanom vodom (HP/DV) i formiranom pelikulom sastavljenom od pljuvačnih proteina bez pljuvačnih jona, pokazali su najniže prosečne vrednosti parametara hrapavosti.
- Uzorci gleđi, koji su potapani u humanu pljuvačku dijalizovanu sa veštačkom pljuvačkom (HP/VP) i formiranom pelikulom sastavljenom od pljuvačnih proteina i jona, pokazali su najviše vrednosti parametara hrapavosti.
- Uzorci potopljani u veštačku pljuvačku (VP) (koja sadrži samo jone) su pokazali niže vrednosti parametara hrapavosti u odnosu na ostale medijume, osim za kontrolne uzorke gde je zabeležena statistički značajna razlika.
- Prosečne vrednosti parametara hrapavosti se nisu značajno razlikovale između pelikula stvorenih u HP (proteini i joni) i VP (samo joni), ali su pokazali značajnu razliku od parametara hrapavosti kontrolnih uzoraka, pri čemu je prosečna vrednost R_q parametra za HP bila značajno veća u odnosu na pelikulu stvorenu u HP/DV.
- Moguće je očekivati da pelikula koja sadrži samo pljuvačne proteine pruža bolju zaštitu gleđi u *in vitro* uslovima, u odnosu na pelikulu stvorenu prirodnom pljuvačkom, veštačkom pljuvačkom i prirodnom pljuvačkom dijalizovanom pomoću veštačke pljuvačke, što se može objasniti jačim vezivanjem proteina koji vezuju kalcijum i fosfat za površinu gleđi u slučajevima kada u pljuvački nedostaju slobodni joni.

- Ovakav nalaz, koji nije kompatibilan sa *in vivo* situacijom (s obzirom da se razlikuje od prirodnog medijuma), sugerise da je neophodno ustanoviti tacan sastav pelikule (ne samo proteina, vec i jona) koji bi mogao da pruži najbolju zaštitu od erozije.
- Rezultati ove studije mogu doprineti razradi nekih preventivnih mera u pokušaju usporavanja erozivnih izazova *in vivo* i usmeravanju budućih istraživanja ka korišćenju imerzionog rastvora u kome zubna gleđ, pri *in vitro* izlaganju erozivnim supstancama, može imati najefikasniju zaštitu.

8. LITERATURA

1. Lussi A, Carvalho TS. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci* 2014;25:1-15. doi:10.1159/000360380
2. Dugmore CR, Rock WP. Awareness of tooth erosion in 12 year old children and primary care dental practitioners. *Community Dent Health* 2003;20(4):223—227. <http://europepmc.org/abstract/MED/14696741>
3. Carvalho TS, Lussi A. Chapter 9: Acidic Beverages and Foods Associated with Dental Erosion and Erosive Tooth Wear. *Monogr Oral Sci* 2020;28:91-98. doi:10.1159/000455376
4. Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, Hara AT, Huysmans M-CDNJM, Lussi A, Moazzez R, Vieira AR, West NX, Wiegand A, Young A, Lippert F. Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR. *Caries Res* 2020;54(1):2-6. doi:10.1159/000503308
5. Lussi A, Megert B, Shellis RP, Wang X. Analysis of the erosive effect of different dietary substances and medications. *Br J Nutr* 2012;107(2):252-262. doi:10.1017/S0007114511002820
6. Lussi A, Carvalho TS. Analyses of the Erosive Effect of Dietary Substances and Medications on Deciduous Teeth. *PLoS One* 2015;10(12):e0143957-e0143957. doi:10.1371/journal.pone.0143957
7. Barac R, Gasic J, Trutic N, Sunaric S, Popovic J, Djekic P, Radenkovic G, Mitic A. Erosive Effect of Different Soft Drinks on Enamel Surface in vitro: Application of Stylus Profilometry. *Med Princ Pract* 2015;24(5):451-457. doi:10.1159/000433435
8. Carvalho TS, Schmid TM, Baumann T, Lussi A. Erosive effect of different dietary substances on deciduous and permanent teeth. *Clin Oral Investig* 2017;21(5):1519-1526. doi:10.1007/s00784-016-1915-z
9. Li H, Zou Y, Ding G. Dietary Factors Associated with Dental Erosion: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2012;7(8):e42626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042626>
10. Willershausen B, Callaway A, Azrak B, Kloss C, Schulz-Dobrick B. Prolonged in vitro exposure to white wines enhances the erosive damage on human permanent teeth compared with red wines. *Nutr Res* 2009;29(8):558-567. doi:10.1016/j.nutres.2009.08.004
11. Kwek SXR, Mian M, Hall C, Xie Z, Yong R, Kaidonis J, Townsend GC, Ranjitkar S. Nanoscratch testing for the assessment of enamel demineralization under conditions simulating wine erosion. *Aust Dent J* 2015;60(1):12-17. doi:10.1111/adj.12277
12. Wilder-Smith CH, Materna A, Martig L, Lussi A. Longitudinal study of gastroesophageal reflux and erosive tooth wear. *BMC Gastroenterol* 2017;17(1):113. doi:10.1186/s12876-017-0670-1
13. Ortiz ADC, Fideles SOM, Pomini KT, Buchaim RL. Updates in association of gastroesophageal reflux disease and dental erosion: systematic review. *Expert Rev*

Gastroenterol Hepatol Published online February 2021:1-10.
doi:10.1080/17474124.2021.1890030

14. Marshall TA. Dietary assessment and counseling for dental erosion. *J Am Dent Assoc* 2018;149(2):148-152. doi:10.1016/j.adaj.2017.11.006
15. Moazzez R, Bartlett D. Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci* 2014;25:180-196. doi:10.1159/000360369
16. Shellis RP, Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the Chemistry of Dental Erosion. In: *Monographs in Oral Science*. Vol 25. ; 2014:163-179. doi:10.1159/000359943
17. Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. *Caries Res* 2011;45 Suppl 1:24-32. doi:10.1159/000325917
18. Barbour ME, Lussi A. Erosion in relation to nutrition and the environment. *Monogr Oral Sci* 2014;25:143-154. doi:10.1159/000359941
19. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res* 2011;45 Suppl 1:2-12. doi:10.1159/000325915
20. Mutahar M, Carpenter G, Bartlett D, German M, Moazzez R. The presence of acquired enamel pellicle changes acid-induced erosion from dissolution to a softening process. *Sci Rep* 2017;7(1):10920. doi:10.1038/s41598-017-11498-1
21. Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MAR, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol* 2014;59(6):631-638. doi:https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.02.002
22. Hannig M, Hannig C. The pellicle and erosion. *Monogr Oral Sci* 2014;25:206-214. doi:10.1159/000360376
23. Brevik SC, Lussi A, Rakhmatullina E. A new optical detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer. *J Dent* 2013;41(5):428-435. doi:10.1016/j.jdent.2013.02.011
24. Wetton S, Hughes J, West N, Addy M. Exposure Time of Enamel and Dentine to Saliva for Protection against Erosion: A Study in vitro. *Caries Res* 2006;40(3):213-217. doi:10.1159/000092228
25. Martins C, Castro GF, Siqueira MF, Xiao Y, Yamaguti PM, Siqueira WL. Effect of dialyzed saliva on human enamel demineralization. *Caries Res* 2013;47(1):56-62. doi:10.1159/000343574
26. Baumann T, Kozik J, Lussi A, Carvalho TS. Erosion protection conferred by whole human saliva, dialysed saliva, and artificial saliva. *Sci Rep* 2016;6(1):34760. doi:10.1038/srep34760
27. Mutahar M, Bartlett D, Carpenter G, Moazzez R. Proteins from whole mouth saliva mediate greater protection against severe erosive tooth wear than proteins from parotid saliva using an in vitro model. *J Dent* 2020;95:103319. doi:10.1016/j.jdent.2020.103319
28. Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 1996;104(2 (Pt 2)):151-155. doi:10.1111/j.1600-0722.1996.tb00063.x

29. Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and Models in Erosion Research: Discussion and Conclusions. *Caries Res* 2011;45(suppl 1(Suppl. 1):69-77. doi:10.1159/000325971
30. Voronets J, Lussi A. Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2010;14(3):251-256. doi:10.1007/s00784-009-0288-y
31. Li P, Oh C, Kim H, Chen-Glasser M, Park G, Jetybayeva A, Yeom J, Kim H, Ryu J, Hong S. Nanoscale effects of beverages on enamel surface of human teeth: An atomic force microscopy study. *J Mech Behav Biomed Mater* 2020;110:103930. doi:https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103930
32. Ehlen LA, Marshall TA, Qian F, Wefel JS, Warren JJ. Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. *Nutr Res* 2008;28(5):299-303. doi:https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.03.001
33. Steiger-Ronay V, Steingruber A, Becker K, Aykut-Yetkiner A, Wiedemeier DB, Attin T. Temperature-dependent erosivity of drinks in a model simulating oral fluid dynamics. *J Dent* 2018;70:118-123. doi:https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.01.002
34. Braga SRM, De Faria DLA, De Oliveira E, Sobral MAP. Morphological and mineral analysis of dental enamel after erosive challenge in gastric juice and orange juice. *Microsc Res Tech* 2011;74(12):1083-1087. doi:10.1002/jemt.20998
35. Meurman JH, ten Gate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci* 1996;104(2):199-206. doi:https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00068.x
36. Meurman JH, Frank RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 1991;25(1):1-6. doi:10.1159/000261335
37. Featherstone JD, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res* 1981;15(5):377-385. doi:10.1159/000260541
38. Shellis RP, Barbour ME, Jesani A, Lussi A. Effects of buffering properties and undissociated acid concentration on dissolution of dental enamel in relation to pH and acid type. *Caries Res* 2013;47(6):601-611. doi:10.1159/000351641
39. Shellis RP, Finke M, Eisenburger M, Parker DM, Addy M. Relationship between enamel erosion and liquid flow rate. *Eur J Oral Sci* 2005;113(3):232-238. doi:10.1111/j.1600-0722.2005.00210.x
40. Lussi A. Erosive Tooth Wear – A Multifactorial Condition of Growing Concern and Increasing Knowledge. In: *Monographs in Oral Science*. Vol 20. ; 2006:1-8. doi:10.1159/000093343
41. Lussi A, Jaeggi T, Jaeggi-Schärer S. Prediction of the erosive potential of some beverages. *Caries Res* 1995;29(5):349-354. doi:10.1159/000262091
42. Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, Schmalz G, Shellis RP, Tveit AB, Wiegand A. Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear--diagnosis and management. *Clin Oral Investig* 2015;19(7):1557-1561. doi:10.1007/s00784-015-1511-7
43. Jain P, Nihill P, Sobkowski J, Agustin MZ. Commercial soft drinks: pH and in vitro

- dissolution of enamel. *Gen Dent* 2007;55(2):150-154; quiz 155, 167-168.
44. Mitic AD, Gasic JZ, Barac RG, Radenkovic GS, Sunaric SM, Popovic JZ, Nikolic MM. Ultrastructural changes in the cemento-enamel junction caused by acidic beverages: An in vitro study. *Microsc Res Tech* 2020;83(2):91-98. doi:<https://doi.org/10.1002/jemt.23392>
 45. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc* 2003;69(11):722-724.
 46. Hannig M, Khanafer AK, Hoth-Hannig W, Al-Marrawi F, Açil Y. Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. *Clin Oral Investig* 2005;9(1):30-37. doi:10.1007/s00784-004-0284-1
 47. Lussi A, Hellwig E. Risk assessment and causal preventive measures. *Monogr Oral Sci* 2014;25:220-229. doi:10.1159/000360612
 48. Meira IA, Fernandes NLS, de Lavôr JR, Sampaio FC, de Oliveira AFB. Investigation of the erosive potential of different types of alcoholic beverages. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr* 2020;20:1-8. doi:10.1590/pboci.2020.050
 49. Shroff P, Gondivkar SM, Kumbhare SP, Sarode S, Gadbail AR, Patil S. Analyses of the Erosive Potential of Various Soft Drinks and Packaged Fruit Juices on Teeth. *J Contemp Dent Pract* 2018;19(12):1546-1551.
 50. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res* 1999;33(1):81-87. doi:10.1159/000016499
 51. Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM. Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol* 2003;48(11):753-759. doi:10.1016/s0003-9969(03)00156-0
 52. Hemingway CA, Parker DM, Addy M, Barbour ME. Erosion of enamel by non-carbonated soft drinks with and without toothbrushing abrasion. *Br Dent J* 2006;201(7):447-450; discussion 439; quiz 466. doi:10.1038/sj.bdj.4814073
 53. Mahoney E, Beattie J, Swain M, Kilpatrick N. Preliminary in vitro assessment of erosive potential using the ultra-micro-indentation system. *Caries Res* 2003;37(3):218-224. doi:10.1159/000070448
 54. Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res* 2002;36(1):75-80. doi:10.1159/000057595
 55. Ireland AJ, McGuinness N, Sherriff M. An investigation into the ability of soft drinks to adhere to enamel. *Caries Res* 1995;29(6):470-476. doi:10.1159/000262117
 56. West NX, Hughes JA, Addy M. Erosion of dentine and enamel in vitro by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. *J Oral Rehabil* 2000;27(10):875-880. doi:10.1046/j.1365-2842.2000.00583.x
 57. Eisenburger M, Addy M. Influence of liquid temperature and flow rate on enamel erosion and surface softening. *J Oral Rehabil* 2003;30(11):1076-1080. doi:10.1046/j.1365-2842.2003.01193.x
 58. Phelan J, Rees J. The erosive potential of some herbal teas. *J Dent* 2003;31(4):241-246. doi:10.1016/s0300-5712(03)00048-4

59. Aykut-Yetkiner A, Wiegand A, Ronay V, Attin R, Becker K, Attin T. In vitro evaluation of the erosive potential of viscosity-modified soft acidic drinks on enamel. *Clin Oral Investig* 2014;18(3):769-773. doi:10.1007/s00784-013-1037-9
60. Aykut-Yetkiner A, Wiegand A, Bollhalder A, Becker K, Attin T. Effect of acidic solution viscosity on enamel erosion. *J Dent Res* 2013;92(3):289-294. doi:10.1177/0022034512473115
61. Mudgil D, Mudgil S. *Beverages: Processing and Technology*. Scientific Publishers; 2018.
62. Vinci G, Maddaloni L. Biogenic Amines in Alcohol-Free Beverages. *Beverages* 2020;6(1). doi:10.3390/beverages6010017
63. Sayed A. The Beverages. *Agric Res Technol Open Access J* 2018;14(5):160-168. doi:10.19080/artoaj.2018.14.555933
64. Bhattacharjee C, Saxena VK, Dutta S. Fruit juice processing using membrane technology: A review. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2017;43:136-153. doi:https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.002
65. Ashurst PR. *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*. John Wiley & Sons, Ltd.; 2016. doi:10.1002/9781118634943
66. Tahmassebi JF, BaniHani A. Impact of soft drinks to health and economy: a critical review. *Eur Arch Paediatr Dent Off J Eur Acad Paediatr Dent* 2020;21(1):109-117. doi:10.1007/s40368-019-00458-0
67. Bunting H, Baggett A, Grigor J. Adolescent and young adult perceptions of caffeinated energy drinks. A qualitative approach. *Appetite* 2013;65:132-138. doi:10.1016/j.appet.2013.02.011
68. Schlueter N, Luka B. Erosive tooth wear - a review on global prevalence and on its prevalence in risk groups. *Br Dent J* 2018;224(5):364-370. doi:10.1038/sj.bdj.2018.167
69. Cochrane NJ, Yuan Y, Walker GD, Shen P, Chang CH, Reynolds C, Reynolds EC. Erosive potential of sports beverages. *Aust Dent J* 2012;57(3):359-364; quiz 398. doi:10.1111/j.1834-7819.2012.01708.x
70. Pinto SCS, Bandeca MC, Silva CN, Cavassim R, Borges AH, Sampaio JEC. Erosive potential of energy drinks on the dentine surface. *BMC Res Notes* 2013;6(1):67. doi:10.1186/1756-0500-6-67
71. Owens B, Mallette J, Phebus J. Effects of Carbonated Cola Beverages , Sports and Energy Drinks and Orange Juice on Primary and Permanent Enamel Dissolution. *Austin J Dent* 2014;1(1):1-7.
72. Ostrowska A, Szymański W, Kołodziejczyk Ł, Bołtacz-Rzepkowska E. Evaluation of the Erosive Potential of Selected Isotonic Drinks: In Vitro Studies. *Adv Clin Exp Med* 2016;25(6):1313-1319. doi:10.17219/acem/62323
73. Antunes LS, Veiga L, Nery VS, Nery CC, Antunes LA. Sports drink consumption and dental erosion among amateur runners. *J Oral Sci* 2017;59(4):639-643. doi:10.2334/josnusd.16-0611
74. Kitchens M, Owens BM. Effect of carbonated beverages, coffee, sports and high

- energy drinks, and bottled water on the in vitro erosion characteristics of dental enamel. *J Clin Pediatr Dent* 2007;31(3):153-159. doi:10.17796/jcpd.31.3.11571653t8206100
75. Robb ND, Smith BG. Prevalence of pathological tooth wear in patients with chronic alcoholism. *Br Dent J* 1990;169(11):367-369. doi:10.1038/sj.bdj.4807386
 76. Schlueter N, Tveit AB. Prevalence of erosive tooth wear in risk groups. *Monogr Oral Sci* 2014;25:74-98. doi:10.1159/000359938
 77. Singh A, Raju P, Jana A. Lesson 24. Scope and classification of beverages. Food technology-1. Published 2012. <http://ecoursesonline.iasri.res.in/mod/resource/view.php?id=5852>
 78. Naumovski N, Foscolou A, D’Cunha NM, Tyrovolas S, Chrysohoou C, Sidossis LS, Rallidis L, Matalas A-L, Polychronopoulos E, Pitsavos C, Panagiotakos D. The Association between Green and Black Tea Consumption on Successful Aging: A Combined Analysis of the ATTICA and MEDiterranean Islands (MEDIS) Epidemiological Studies. *Molecules* 2019;24(10). doi:10.3390/molecules24101862
 79. Zhao C-N, Tang G-Y, Cao S-Y, Xu X-Y, Gan R-Y, Liu Q, Mao Q-Q, Shang A, Li H-B. Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of 30 Tea Infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark Teas. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2019;8(7). doi:10.3390/antiox8070215
 80. Wang Y, Ho C-T. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J Agric Food Chem* 2009;57(18):8109-8114. doi:10.1021/jf804025c
 81. Niemeyer SH, Baumann T, Lussi A, Meyer-Lueckel H, Scaramucci T, Carvalho TS. Salivary pellicle modification with polyphenol-rich teas and natural extracts to improve protection against dental erosion. *J Dent* 2021;105:103567. doi:10.1016/j.jdent.2020.103567
 82. Carvalho TS, Lussi A. Susceptibility of enamel to initial erosion in relation to tooth type, tooth surface and enamel depth. *Caries Res* 2015;49(2):109-115. doi:10.1159/000369104
 83. Hara AT, Zero DT. The potential of saliva in protecting against dental erosion. *Monogr Oral Sci* 2014;25:197-205. doi:10.1159/000360372
 84. Berkovitz B, Boyde A, Frank R, Höhling H, Moxham B, Nalbandian J, Tonge C. *Teeth*. 1st ed. Springer; 1989. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-83496-7
 85. Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res* 2011;45 Suppl 1:13-23. doi:10.1159/000326819
 86. Addy M, Hunter ML. Can tooth brushing damage your health? Effects on oral and dental tissues. *Int Dent J* 2003;53 Suppl 3:177-186. doi:10.1111/j.1875-595x.2003.tb00768.x
 87. Tanaka O, Camargo E, Cerci B, Guariza Filho O, Roman L. Dental enamel roughness with different acid etching times: Atomic force microscopy study. *Eur J Gen Dent* 2012;1:187. doi:10.4103/2278-9626.105385
 88. Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C. Tin-containing

- fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: an in vitro tin-uptake, tissue-loss, and scanning electron micrograph study. *Eur J Oral Sci* 2009;117(4):427-434. doi:10.1111/j.1600-0722.2009.00647.x
89. Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Silva SMB da, Delbem ACB, Machado MA de AM, Buzalaf MAR. Scanning electron microscopic study of the in situ effect of salivary stimulation on erosion and abrasion in human and bovine enamel. *Braz Oral Res* 2008;22(2):132-138. doi:10.1590/s1806-83242008000200007
 90. Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies--insights and rational concepts. *Caries Res* 2011;45 Suppl 1:53-59. doi:10.1159/000325946
 91. Ganss C, Lussi A, Schlueter N. The histological features and physical properties of eroded dental hard tissues. *Monogr Oral Sci* 2014;25:99-107. doi:10.1159/000359939
 92. Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004;38 Suppl 1:34-44. doi:10.1159/000074360
 93. Tenovuo J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25(1):82-86. doi:10.1111/j.1600-0528.1997.tb00903.x
 94. Navazesh M, Kumar SKS. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:35S-40S. doi:10.14219/jada.archive.2008.0353
 95. Lee VM, Linden RW. An olfactory-submandibular salivary reflex in humans. *Exp Physiol* 1992;77(1):221-224. doi:10.1113/expphysiol.1992.sp003578
 96. Engelen L, de Wijk RA, Prinz JF, van der Bilt A, Bosman F. The relation between saliva flow after different stimulations and the perception of flavor and texture attributes in custard desserts. *Physiol Behav* 2003;78(1):165-169. doi:10.1016/s0031-9384(02)00957-5
 97. Christensen CM, Navazesh M. Anticipatory salivary flow to the sight of different foods. *Appetite* 1984;5(4):307-315. doi:10.1016/s0195-6663(84)80003-3
 98. Adams DH. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. *Gut* 2007;56(8):1175. doi:10.1136/gut.2007.121533
 99. Saksena R, Bartlett DW, Smith BG. The role of saliva in regurgitation erosion. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 1999;7(4):121-124.
 100. Larsen MJ, Pearce EIF. Saturation of human saliva with respect to calcium salts. *Arch Oral Biol* 2003;48(4):317-322. doi:10.1016/s0003-9969(03)00007-4
 101. Dodds MWJ, Johnson DA, Yeh C-K. Health benefits of saliva: a review. *J Dent* 2005;33(3):223-233. doi:10.1016/j.jdent.2004.10.009
 102. Dawes C, Kubieniec K. The effects of prolonged gum chewing on salivary flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 2004;49(8):665-669. doi:10.1016/j.archoralbio.2004.02.007
 103. Ferguson D. Salivary glands and saliva. In: *Applied Physiology of the Mouth.* ; 1975:145-179.
 104. Carolina M, Scarillo C, Corr F, Lercio MM, Ribeiro L, Coelho MA, Henry A. Salivary parameters and teeth erosions in patients with gastroesophageal reflux disease.

- 2012;(3):214-218. doi:10.1590/S0004-28032012000300009.
105. Gudmundsson K, Kristleifsson G, Theodors A, Holbrook WP. Tooth erosion, gastroesophageal reflux, and salivary buffer capacity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79(2):185-189. doi:10.1016/s1079-2104(05)80280-x
 106. Moazzez R, Bartlett D, Anggiansah A. Dental erosion, gastro-oesophageal reflux disease and saliva: how are they related? *J Dent* 2004;32(6):489-494. doi:10.1016/j.jdent.2004.03.004
 107. Yeh CK, Johnson DA, Dodds MW, Sakai S, Rugh JD, Hatch JP. Association of salivary flow rates with maximal bite force. *J Dent Res* 2000;79(8):1560-1565. doi:10.1177/00220345000790080601
 108. Meurman JH, Toskala J, Nuutinen P, Klemetti E. Oral and dental manifestations in gastroesophageal reflux disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78(5):583-589. doi:10.1016/0030-4220(94)90168-6
 109. Järvinen VK, Rytömaa II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. *J Dent Res* 1991;70(6):942-947. doi:10.1177/00220345910700060601
 110. Young WG, Khan F. Sites of dental erosion are saliva-dependent. *J Oral Rehabil* 2002;29(1):35-43. doi:10.1046/j.1365-2842.2002.00808.x
 111. Lussi A, von Salis-Marincek M, Ganss C, Hellwig E, Cheaib Z, Jaeggi T. Clinical study monitoring the pH on tooth surfaces in patients with and without erosion. *Caries Res* 2012;46(6):507-512. doi:10.1159/000339783
 112. Millward A, Shaw L, Harrington E, Smith AJ. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages. *Caries Res* 1997;31(1):44-49. doi:10.1159/000262373
 113. Hannig M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig* 1999;3(2):88-95. doi:10.1007/s007840050084
 114. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Influence of abrasion in clinical manifestation of human dental erosion. *J Oral Rehabil* 2003;30(4):407-413. doi:10.1046/j.1365-2842.2003.01098.x
 115. Gregg T, Mace S, West NX, Addy M. A study in vitro of the abrasive effect of the tongue on enamel and dentine softened by acid erosion. *Caries Res* 2004;38(6):557-560. doi:10.1159/000080586
 116. Gedalia I, Dakuar A, Shapira L, Lewinstein I, Goultschin J, Rahamim E. Enamel softening with Coca-Cola and rehardening with milk or saliva. *Am J Dent* 1991;4(3):120-122.
 117. Zero DT, Fu J, Scott-Anne K, Proskin H. Evaluation of fluoride dentifrices using a short-term intraoral remineralization model. *J Dent Res* 1994;73:272.
 118. Hooper SM, Newcombe RG, Faller R, Eversole S, Addy M, West NX. The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: studies in situ and in vitro. *J Dent* 2007;35(6):476-481. doi:10.1016/j.jdent.2007.01.003
 119. Hara AT, Kelly SA, González-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, Zero DT. Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in

- situ. *Caries Res* 2009;43(1):57-63. doi:10.1159/000201591
120. Ren Y-F, Liu X, Fadel N, Malmstrom H, Barnes V, Xu T. Preventive effects of dentifrice containing 5000ppm fluoride against dental erosion in situ. *J Dent* 2011;39(10):672-678. doi:10.1016/j.jdent.2011.07.009
 121. Fushida C, Cury JA. Evaluation of enamel-dentine erosion by beverage and recovery by saliva and fluoride. *J Dent Res* 1999;78:410.
 122. Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 2006;19:29-64. doi:10.1159/000090585
 123. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 2012;91(12):1110-1118. doi:10.1177/0022034512462578
 124. Hannig C, Hannig M. The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 2009;13(2):123-139. doi:10.1007/s00784-008-0243-3
 125. Ash A, Ridout MJ, Parker R, Mackie AR, Burnett GR, Wilde PJ. Effect of calcium ions on in vitro pellicle formation from parotid and whole saliva. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2013;102:546-553. doi:https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.048
 126. Zhang YF, Zheng J, Zheng L, Shi XY, Qian LM, Zhou ZR. Effect of adsorption time on the lubricating properties of the salivary pellicle on human tooth enamel. *Wear* 2013;301(1):300-307. doi:https://doi.org/10.1016/j.wear.2012.11.037
 127. Rehage M, Delius J, Hofmann T, Hannig M. Oral astringent stimuli alter the enamel pellicle's ultrastructure as revealed by electron microscopy. *J Dent* 2017;63:21-29. doi:10.1016/j.jdent.2017.05.011
 128. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem* 2003;278(7):5300-5308. doi:10.1074/jbc.M206333200
 129. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res* 2007;6(6):2152-2160. doi:10.1021/pr060580k
 130. Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Duarte JA, Domingues PM, Amado FML. Peptide profile of human acquired enamel pellicle using MALDI tandem MS. *J Sep Sci* 2008;31(3):523-537. doi:10.1002/jssc.200700486
 131. Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, Siqueira WL. Proteomic Evaluation of Acquired Enamel Pellicle during In Vivo Formation. *PLoS One* 2013;8(7):e67919. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067919
 132. Reich M, Kümmerer K, Al-Ahmad A, Hannig C. Fatty acid profile of the initial oral biofilm (pellicle): an in-situ study. *Lipids* 2013;48(9):929-937. doi:10.1007/s11745-013-3822-2
 133. Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res* 2006;85(7):612-616. doi:10.1177/154405910608500706

134. Jager DHJ, Vieira AM, Ligtenberg AJM, Bronkhorst E, Huysmans MCDNJM, Vissink A. Effect of salivary factors on the susceptibility of hydroxyapatite to early erosion. *Caries Res* 2011;45(6):532-537. doi:10.1159/000331938
135. Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol* 2004;49(11):903-910. doi:10.1016/j.archoralbio.2004.05.008
136. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res* 1999;78(12):1821-1828. doi:10.1177/00220345990780120901
137. Hannig M, Balz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 1999;33(5):372-379. doi:10.1159/000016536
138. Hannig M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 2001;35(2):142-148. doi:10.1159/000047446
139. Carvalho TS, Pham KN, Niemeyer SH, Baumann T. The effect of red wine in modifying the salivary pellicle and modulating dental erosion kinetics. *Eur J Oral Sci* 2021;129(1):e12749. doi:https://doi.org/10.1111/eos.12749
140. Joiner A, Muller D, Elofsson UM, Malmsten M, Arnebrant T. Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles studied by ellipsometry. *Eur J Oral Sci* 2003;111(5):417-422. doi:10.1034/j.1600-0722.2003.00073.x
141. O'Sullivan EA, Curzon ME. A comparison of acidic dietary factors in children with and without dental erosion. *ASDC J Dent Child* 2000;67(3):160,186-192.
142. Benjakul P, Chuenarrom C. Association of dental enamel loss with the pH and titratable acidity of beverages. *J Dent Sci* 2011;6(3):129-133. doi:https://doi.org/10.1016/j.jds.2011.05.001
143. Korkut DS, Korkut S, Bekar I, Budakçi M, Dilik T, Cakicier N. The effects of heat treatment on the physical properties and surface roughness of Turkish Hazel (*Corylus colurna* L.) wood. *Int J Mol Sci* 2008;9(9):1772-1783. doi:10.3390/ijms9091772
144. Chuenarrom C, Benjakul P. Comparison between a profilometer and a measuring microscope for measurement of enamel erosion. *J Oral Sci* 2008;50(4):475-479. doi:10.2334/josnusd.50.475
145. Ren Y-F, Zhao Q, Malmstrom H, Barnes V, Xu T. Assessing fluoride treatment and resistance of dental enamel to soft drink erosion in vitro: applications of focus variation 3D scanning microscopy and stylus profilometry. *J Dent* 2009;37(3):167-176. doi:10.1016/j.jdent.2008.09.008
146. Fujii M, Kitasako Y, Sadr A, Tagami J. Roughness and pH changes of enamel surface induced by soft drinks in vitro-applications of stylus profilometry, focus variation 3D scanning microscopy and micro pH sensor. *Dent Mater J* 2011;30(3):404-410. doi:10.4012/dmj.2010-204
147. International Standards Organization: Geometrical Product Specifications (GPS). Surface Texture: Profile Method; Measurement Standards. Standard I. ISO. Presented at the: 2001.

148. Meurman JH, Frank RM. Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res* 1991;25(2):81-87. doi:10.1159/000261348
149. Pimenta-Dutra A-C, Albuquerque RC, Morgan L-F-DS-A, Pereira G-M, Nunes E, Horta M-C-R, Silveira F-F. Effect of bleaching agents on enamel surface of bovine teeth: A SEM study. *J Clin Exp Dent* 2017;9(1):e46-e50. doi:10.4317/jced.53011
150. Jiang J, Park NJ, Hu S, Wong DT. A universal pre-analytic solution for concurrent stabilization of salivary proteins, RNA and DNA at ambient temperature. *Arch Oral Biol* 2009;54(3):268-273. doi:10.1016/j.archoralbio.2008.10.004
151. Sieber KR, Schmidt C, Baumann T, Lussi A, Carvalho TS. Acquired Enamel Pellicle Modification with Casein and Mucin in Different Concentrations and its Impact on Initial Dental Erosion. *Caries Res* 2019;53(4):457-466. doi:10.1159/000499579
152. Kirkham J, Firth A, Vernals D, Boden N, Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Aggeli A. Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *J Dent Res* 2007;86(5):426-430. doi:10.1177/154405910708600507
153. Colombo M, Mirando M, Rattalino D, Beltrami R, Chiesa M, Poggio C. Remineralizing effect of a zinc-hydroxyapatite toothpaste on enamel erosion caused by soft drinks: Ultrastructural analysis. *J Clin Exp Dent* 2017;9(7):e861-e868. doi:10.4317/jced.53790
154. Reddy A, Norris DF, Momeni SS, Waldo B, Ruby JD. The pH of beverages in the United States. *J Am Dent Assoc* 2016;147(4):255-263. doi:10.1016/j.adaj.2015.10.019
155. de SOUZA BM, Vertuan M, Gonçalves IVB, Magalhães AC. Effect of different citrus sweets on the development of enamel erosion in vitro. *J Appl Oral Sci* 2020;28:1-6. doi:10.1590/1678-7757-2020-0182
156. Cochrane NJ, Cai F, Yuan Y, Reynolds EC. Erosive potential of beverages sold in Australian schools. *Aust Dent J* 2009;54(3):238-244. doi:10.1111/j.1834-7819.2009.01126.x
157. Panić Z. Uticaj gaziranih pića na tvrda zubna tkiva. Published online 2018.
158. Jensdottir T, Bardow A, Holbrook P. Properties and modification of soft drinks in relation to their erosive potential in vitro. *J Dent* 2005;33(7):569-575. doi:10.1016/j.jdent.2004.12.002
159. Jager DHJ, Vieira AM, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Estimated erosive potential depends on exposure time. *J Dent* 2012;40(12):1103-1108. doi:10.1016/j.jdent.2012.09.004
160. Tenuta LMA, Fernández CE, Brandão ACS, Cury JA. Titratable acidity of beverages influences salivary pH recovery. *Braz Oral Res* 2015;29. doi:10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0032
161. Meira I-A, Dos Santos E-J-L, Fernandes N-L-S, de Sousa E-T, de Oliveira A-F-B, Sampaio F-C. Erosive effect of industrialized fruit juices exposure in enamel and dentine substrates: An in vitro study. *J Clin Exp Dent* 2021;13(1):e48-e55. doi:10.4317/jced.57385
162. Hara AT, Zero DT. Analysis of the erosive potential of calcium-containing acidic

- beverages. *Eur J Oral Sci* 2008;116(1):60-65. doi:10.1111/j.1600-0722.2007.00513.x
163. Lussi A, Schaffner M. Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res* 2000;34(2):182-187. doi:10.1159/000016587
 164. Wang Y-L, Chang C-C, Chi C-W, Chang H-H, Chiang Y-C, Chuang Y-C, Chang H-H, Huang G-F, Liao Y-S, Lin C-P. Erosive potential of soft drinks on human enamel: an in vitro study. *J Formos Med Assoc* 2014;113(11):850-856. doi:10.1016/j.jfma.2014.06.002
 165. Caneppele TMF, Jeronymo RDI, Di Nicoló R, de Araújo MAM, Soares LES. In Vitro assessment of dentin erosion after immersion in acidic beverages: surface profile analysis and energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study. *Braz Dent J* 2012;23(4):373-378. doi:10.1590/s0103-64402012000400011
 166. Assunção CM, Lussi A, Rodrigues JA, Carvalho TS. Efficacy of toothpastes in the prevention of erosive tooth wear in permanent and deciduous teeth. *Clin Oral Investig* 2019;23(1):273-284. doi:10.1007/s00784-018-2434-x
 167. Hara AT, Lippert F, Zero DT. Interplay between experimental dental pellicles and stannous-containing toothpaste on dental erosion-abrasion. *Caries Res* 2013;47(4):325-329. doi:10.1159/000347051
 168. Ionta FQ, Mendonça FL, de Oliveira GC, de Alencar CRB, Honório HM, Magalhães AC, Rios D. In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. *J Dent* 2014;42(2):175-179. doi:10.1016/j.jdent.2013.11.009
 169. Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent* 2001;29(5):371-376. doi:https://doi.org/10.1016/S0300-5712(01)00026-4
 170. Hemingway CA, Shellis RP, Parker DM, Addy M, Barbour ME. Inhibition of hydroxyapatite dissolution by ovalbumin as a function of pH, calcium concentration, protein concentration and acid type. *Caries Res* 2008;42(5):348-353. doi:10.1159/000151440
 171. Field J, Waterhouse P, German M. Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. *J Dent* 2010;38(3):182-190. doi:10.1016/j.jdent.2010.01.002
 172. Attin T, Wegehaupt FJ. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci* 2014;25:123-142. doi:10.1159/000360355
 173. Joshi M, Joshi N, Kathariya R, Angadi P, Raikar S. Techniques to Evaluate Dental Erosion: A Systematic Review of Literature. *J Clin Diagn Res* 2016;10(10):ZE01-ZE07. doi:10.7860/JCDR/2016/17996.8634
 174. Gyurkovics M, Baumann T, Carvalho TS, Assunção CM, Lussi A. In vitro evaluation of modified surface microhardness measurement, focus variation 3D microscopy and contact stylus profilometry to assess enamel surface loss after erosive-abrasive challenges. *PLoS One* 2017;12(4):e0175027. doi:10.1371/journal.pone.0175027
 175. Karda B, Jindal R, Mahajan S, Sandhu S, Sharma S, Kaur R. To Analyse the Erosive Potential of Commercially Available Drinks on Dental Enamel and Various Tooth Coloured Restorative Materials - An In-vitro Study. *J Clin Diagn Res* 2016;10(5):ZC117-21. doi:10.7860/JCDR/2016/16956.7841

176. González-Cabezas C, Jiang H, Fontana M, Eckert G. Effect of low pH on surface rehardening efficacy of high concentration fluoride treatments on non-cavitated lesions. *J Dent* 2012;40(6):522-526. doi:10.1016/j.jdent.2012.03.002
177. Dündar A, Şengün A, Başlak C, Kuş M. Effects of citric acid modified with fluoride, nano-hydroxyapatite and casein on eroded enamel. *Arch Oral Biol* 2018;93:177-186. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.06.009
178. Bansal K, Gupta S, Nikhil V, Jaiswal S, Jain A, Aggarwal N. Effect of Different Finishing and Polishing Systems on the Surface Roughness of Resin Composite and Enamel: An In vitro Profilometric and Scanning Electron Microscopy Study. *Int J Appl basic Med Res* 2019;9(3):154-158. doi:10.4103/ijabmr.IJABMR_11_19
179. Arends J, Schuthof J, Jongebloed W. *Mineral Properties of the Outer Tooth Surface; in Leach SA (Ed): Dental Plaque and Surface Interactions in the Oral Cavity*. IRL Press; 1980.
180. Seow WK, Thong KM. Erosive effects of common beverages on extracted premolar teeth. *Aust Dent J* 2005;50(3):173-178; quiz 211. doi:10.1111/j.1834-7819.2005.tb00357.x
181. Rajeev G, Lewis AJ, N S. A time based objective evaluation of the erosive effects of various beverages on enamel and cementum of deciduous and permanent teeth. *J Clin Exp Dent* 2020;12(1):e1-e8. doi:10.4317/jced.55910
182. Tahmassebi JF, Duggal MS, Malik-Kotru G, Curzon MEJ. Soft drinks and dental health: a review of the current literature. *J Dent* 2006;34(1):2-11. doi:10.1016/j.jdent.2004.11.006
183. Wongkhantee S, Patanapiradej V, Maneenut C, Tantbirojn D. Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and tooth-coloured filling materials. *J Dent* 2006;34(3):214-220. doi:10.1016/j.jdent.2005.06.003
184. West NX, Hughes JA, Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *J Oral Rehabil* 2001;28(9):860-864. doi:10.1046/j.1365-2842.2001.00778.x
185. Cavalcanti AL, Costa Oliveira M, Florentino VG, dos Santos JA, Vieira FF, Cavalcanti CL. Short Communication: In vitro assessment of Erosive Potential of Energy Drinks. *Eur Arch Paediatr Dent* 2010;11(5):253-255. doi:10.1007/BF03262757
186. Borowska S, Brzóška MM. Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and Their Products as a Possible Means for the Prevention and Treatment of Noncommunicable Diseases and Unfavorable Health Effects Due to Exposure to Xenobiotics. *Compr Rev food Sci food Saf* 2016;15(6):982-1017. doi:10.1111/1541-4337.12221
187. Zanatta RF, Esper MÂLR, Valera MC, Melo RM, Bresciani E. Harmful Effect of Beer on Bovine Enamel Microhardness – In Vitro Study. *PLoS One* 2016;11(10):e0163440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163440>
188. Mandel L. Dental erosion due to wine consumption. *J Am Dent Assoc* 2005;136(1):71-75. doi:<https://doi.org/10.14219/jada.archive.2005.0029>
189. Sileika TS, Barrett DG, Zhang R, Lau KHA, Messersmith PB. Colorless multifunctional coatings inspired by polyphenols found in tea, chocolate, and wine. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013;52(41):10766-10770. doi:10.1002/anie.201304922

190. Joiner A, Muller D, Elofsson UM, Arnebrant T. Ellipsometry analysis of the in vitro adsorption of tea polyphenols onto salivary pellicles. *Eur J Oral Sci* 2004;112(6):510-515. doi:10.1111/j.1600-0722.2004.00166.x
191. Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)* 2010;2010:bap024. doi:10.1093/database/bap024
192. Lunkes LBF, Hashizume LN. Evaluation of the pH and titratable acidity of teas commercially available in Brazilian market. *RGO - Rev Gaúcha Odontol* 2014;62(1):59-64. doi:10.1590/1981-8637201400010000092623
193. De Moraes MDR, Carneiro JRM, Passos VF, Santiago SL. Effect of green tea as a protective measure against dental erosion in coronary dentine. *Braz Oral Res* 2016;30. doi:10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0013
194. Paepegaey A-M, Barker ML, Bartlett DW, Mistry M, West NX, Hellin N, Brown LJ, Bellamy PG. Measuring enamel erosion: a comparative study of contact profilometry, non-contact profilometry and confocal laser scanning microscopy. *Dent Mater* 2013;29(12):1265-1272. doi:10.1016/j.dental.2013.09.015
195. Grenby TH. Methods of assessing erosion and erosive potential. *Eur J Oral Sci* 1996;104(2 (Pt 2)):207-214. doi:10.1111/j.1600-0722.1996.tb00069.x
196. Carstensen W. The effects of different phosphoric acid concentrations on surface enamel. *Angle Orthod* 1992;62(1):51-58. doi:10.1043/0003-3219(1992)062<0051:TEODPA>2.0.CO;2
197. Eisenburger M, Shellis RP, Addy M. Scanning electron microscopy of softened enamel. *Caries Res* 2004;38(1):67-74. doi:10.1159/000073923
198. Torres CP, Chinelatti MA, Gomes-Silva JM, Rizóli FA, Oliveira MAH de M, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Surface and subsurface erosion of primary enamel by acid beverages over time. *Braz Dent J* 2010;21(4):337-345. doi:10.1590/s0103-64402010000400009
199. Cheng Z-J, Wang X-M, Cui F-Z, Ge J, Yan J-X. The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. *Biomed Mater* 2009;4(1):15020. doi:10.1088/1748-6041/4/1/015020
200. Worawongvasu R. Scanning Electron Microscope Characterization of Erosive Enamel in Human Teeth. *Ultrastruct Pathol* 2015;39(6):395-401. doi:10.3109/01913123.2015.1054014
201. Wetton S, Hughes J, Newcombe RG, Addy M. The effect of saliva derived from different individuals on the erosion of enamel and dentine. A study in vitro. *Caries Res* 2007;41(5):423-426. doi:10.1159/000104802
202. Francis CA, Hector MP, Proctor GB. Precipitation of specific proteins by freeze-thawing of human saliva. *Arch Oral Biol* 2000;45(7):601-606. doi:10.1016/s0003-9969(00)00026-1
203. Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res* 2001;35(3):211-215. doi:10.1159/000047458

204. Poggio C, Lombardini M, Vigorelli P, Colombo M, Chiesa M. The role of different toothpastes on preventing dentin erosion: an SEM and AFM study. *Scanning* 2014;36(3):301-310. doi:10.1002/sca.21105
205. Lombardini M, Ceci M, Colombo M, Bianchi S, Poggio C. Preventive effect of different toothpastes on enamel erosion: AFM and SEM studies. *Scanning* 2014;36(4):401-410. doi:10.1002/sca.21132
206. Picoş AM, Petean I, Picoş A, Dădârlat-Pop A, Răchişan A-L, Tomşa AM, Petrăchescu NM, Petri C, Badea ME, Măgurean ID. Atomic force microscopy analysis of the surface alterations of enamel, dentin, composite and ceramic materials exposed to low oral pH in GERD. *Exp Ther Med* 2021;22(1):673. doi:10.3892/etm.2021.10105
207. Las Casas EB, Bastos FS, Godoy GCD, Bueno VTL. Enamel wear and surface roughness characterization using 3D profilometry. *Tribol Int* 2008;41(12):1232-1236. doi:10.1016/j.triboint.2008.03.008
208. Yahyazadehfar M, Arola D. The role of organic proteins on the crack growth resistance of human enamel. *Acta Biomater* 2015;19:33-45. doi:10.1016/j.actbio.2015.03.011
209. Parkinson CR, Shahzad A, Rees GD. Initial stages of enamel erosion: An in situ atomic force microscopy study. *J Struct Biol* 2010;171(3):298-302. doi:https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.04.011
210. Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 2001;46(4):293-303. doi:10.1016/s0003-9969(00)00134-5
211. Ganss C, Klimek J, Schwarz N. A comparative profilometric in vitro study of the susceptibility of polished and natural human enamel and dentine surfaces to erosive demineralization. *Arch Oral Biol* 2000;45(10):897-902. doi:10.1016/s0003-9969(00)00041-8

BIOGRAFIJA AUTORA

Radomir Barac je rođen dana 17.11.1982. godine u Nišu. Osnovnu školu „Vožd Karađorđe“ i gimnaziju „Stevan Sremac“ - prirodno matematički smer, završio je takođe u Nišu.

Studije Medicinskog fakulteta u Nišu na odseku stomatologija započeo je školske 2001/2002, a diplomirao 11.11.2008 godine sa prosečnom ocenom 9,81. Diplomski rad pod nazivom “Behčetrov sindrom” odbranio je sa ocenom 10. Takođe, sve stručne predmete iz oblasti stomatologije položio je sa ocenom 10.

Uparedo sa studijama na Medicinskom fakultetu, školske 2002/2003. godine, upisao je i Fakultet za trgovinu i bankarstvo „Janićije i Danica Karić“ na Univerzitetu „Braća Karić“, odsek trgovina, i diplomirao 29.12.2006. godine sa prosečnom ocenom 9,71.

Školske 2009/2010 upisao je master akademske studije na Ekonomskom fakultetu u Nišu - smer Menadžer u turizmu i diplomirao sa prosečnom ocenom 9,17. Završni master rad pod nazivom „Urbani turizam Srbije“ sam odbranio 11.07.2012. godine i tako stekao zvanje - master ekonomista.

Decembra 2020. godine na Medicinskom fakultetu u Nišu je položio specijalistički ispit iz Bolesti zuba i endodoncije i time stekao zvanje specijaliste.

Tokom studija Radomir Barac je bio stipendista Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije “Fond za mlade talente”. Za postignut uspeh na studijama dobio je zahvalnicu Medicinskog fakulteta povodom proslave 45 godina postojanja Medicinskog fakulteta. Kao student završne godine državnog fakulteta za ostvarene rezultate tokom studija dobio je diplomu u okviru projekta “Investiramo u evropske vrednosti, Eurobank EFG štedionica nagrađuje najbolje studente Srbije”. Takođe, za postignute rezultate bio je uključen u projekat “Putujemo u Evropu” 2007. godine, gde je na proputovanju proveo mesec dana.

Vojnu obavezu je regulisao tokom apsolvantskog staža 2008. godine, služeći civilno u Kliničkom centru u Nišu na odeljenju Radiologija.

Tokom studija je učestvovao na više naučno-stručnih skupova studenata medicine i stomatologije. Kao koautor na radu autora Predraga Janoševića “Značaj poliranja kompozitnih

materijala” učestvovao je na 46. Kongresu studenata medicine i stomatologije u Kotoru od 3. do 7. maja 2005. godine.

Aktivno se služi engleskim i nemačkim jezikom i ima izvanredno poznavanje rada na računaru.

Od marta 2017. godine zapošljen je u zvanju asistenta na Medicinskom fakultetu u Nišu na predmetu UNO „Bolesti zuba i endodoncija – pretklinika“ gde obavlja sve nastavne i vannastavne poslove.

Takođe je bio stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj i, kao doktorant, učestvovao na projektu „Proizvodnja novih dijetetskih proizvoda za rizične populacije zasnovana na kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi biohemijskih markera zdravstvenog rizika konzumiranja mleka“ - evidencioni broj projekta: TR 31060. Trenutno je učesnik projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije“ - evidencioni broj projekta: III 41018, kao i internog projekta Medicinskog fakulteta u Nišu „Kliničko i eksperimentalno ispitivanje stomatognatog sistema i savremenih terapijskih procedura“ (Br. 11).

Kao student doktorskih akademskih studija i asistent na Medicinskom fakultetu u Nišu, objavio je jedan autorski (podržan od strane projekta TR 31060) i više koautorskih radova u međunarodnim časopisima sa impakt faktorom („SCI“ lista). Takođe je autor i koautor radova objavljenih u domaćim časopisima sa recenzijom, kao i brojnih saopštenja štampanih u izvodu sa međunarodnih i domaćih naučnih skupova.

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

УТИЦАЈ БЕЗАЛКОХОЛНИХ И АЛКОХОЛНИХ ПИЋА НА ХУМАНУ ГЛЕЋ И УЛОГА ДЕНТАЛНЕ ПЕЛИКУЛЕ У ЗАШТИТИ ГЛЕЋИ ОД ЕРОЗИЈЕ: *IN VITRO* СТУДИЈА

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

(Име, средње слово и презиме)

Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: **УТИЦАЈ БЕЗАЛКОХОЛНИХ И АЛКОХОЛНИХ ПИЋА НА
ХУМАНУ ГЛЕЂ И УЛОГА ДЕНТАЛНЕ ПЕЛИКУЛЕ У ЗАШТИТИ ГЛЕЂИ ОД
ЕРОЗИЈЕ: *IN VITRO* СТУДИЈА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

(Име, средње слово и презиме)

Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

УТИЦАЈ БЕЗАЛКОХОЛНИХ И АЛКОХОЛНИХ ПИЋА НА ХУМАНУ ГЛЕЂ И УЛОГА ДЕНТАЛНЕ ПЕЛИКУЛЕ У ЗАШТИТИ ГЛЕЂИ ОД ЕРОЗИЈЕ: *IN VITRO* СТУДИЈА

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство **(CC BY)**
2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде **(CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прераде **(CC BY-ND)**
6. Ауторство – делити под истим условима **(CC BY-SA)¹**

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

(Име, средње слово и презиме)

¹ Аутор дисертације обавезан је да изабере и означи (заокружи) само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у наставку текста.