

Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Bruno Štimac

**REMINERALIZIRAJUĆI UČINAK  
BIOAKTIVNA STAKLA 45S5 NA POVRŠINU ČAKLINE**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju pod vodstvom doc. dr. sc. Eve Klarić Sever, dr. med. dent. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

Lektor za hrvatski jezik: Neli Mindoljević

Raška 19 A

10 000 Zagreb

Lektor za engleski jezik: Maja Zrilić

Malešnica 29

10 000 Zagreb

## **Popis kratica**

ACP – amorfni kalcijev fosfat

BG – bioaktivno staklo

CPP – kazein fosfopeptid

DV – destilirana voda

HA – hidroksiapatit

TM – Tooth Mousse

## Sadržaj rada

1. Uvod	1
2. Hipoteze	5
3. Materijali i metode, uzorci	6
4. Rezultati	14
5. Rasprava	26
6. Zaključci	30
7. Zahvale	31
8. Popis literature	32
9. Sažetak	38
10. <i>Summary</i>	40

## 1. Uvod

U današnje vrijeme, usporedno s tehnološkim, medicinskim i znanstvenim dostignućima, sve više pozornosti obraćamo, uz estetiku, i na samu kvalitetu izvedenih restaurativnih zahvata na zubima. Sukladno tomu reakcija i oporavak vitalnih tkiva postali su vrlo važnom stavkom. U restaurativnoj dentalnoj medicini prigodom nadoknade karijesom oštećenih tvrdih zubnih struktura nameće se pitanje posljedične strukture i tvrdoće cakline kojoj prethodi tretman ortofosfornom kiselinom u procesu jetkanja. Budući da postoje saznanja kako kiselina u procesu jetkanja smanjuje čvrstoću same caklinske strukture mijenjajući joj mineralni sastav i strukturu, a samim time otklon od fiziološki intaktnog stanja, svakako je potrebno istražiti djelotvornost raznih materijala za remineralizaciju demineralizirane cakline i usporediti njihovu kakvoću.

Dentalni karijes poznat je kao propadanje zubnih tkiva te ga se često pojednostavljuje u njegovom procesu nastajanja. Naime, mnogi ljudi, kao i doktori dentalne medicine, smatraju karijes jednostavnim nastankom „rupa“ u zubnim strukturama, a ne dugotrajnim procesom bolesti. Poznato je već stotinu godina kako karijes uzrokuju bakterije koje fermentiraju hranu producirajući time kiseline te razlažući zubne minerale. U proteklih nekoliko desetljeća proces je mnogo bolje definiran uključenjem aspekata poput mikrobiologije, sline, kompozicije zubnih minerala, zubne ultrastrukture, difuzijskih procesa, kinetike demineralizacije, reverzibilne demineralizacije poznate kao remineralizacija te faktora koji pridonose reverzibilnosti procesa (1-12). Kariogene bakterije su esencijalne za proces bolesti. Najmanje dvije velike grupe bakterija nazvane *Streptokoki mutans* te *Laktobacili* sposobne su proizvesti organske kiseline tijekom metabolizma fermentirajućih ugljikohidrata (5,12-14). Nastale kiseline uključuju laktičnu, formičnu te propionsku koje su pokazale sposobnost razlaganja minerala cakline i dentina (2,15,16).

Postoji nekoliko faza karijesne lezije o kojima ovisi efektivnost procesa remineralizacije. Početna karijesna lezija, u trajanju nekoliko mjeseci, tzv. „white spot“ pokazuje najviši remineralizacijski potencijal jer je kariogeni proces zahvatio samo površinske slojeve cakline u minimalnoj dubini te se zbog toga može dijagnosticirati isključivo klinički, a na ekstrahiranim zubima i elektronskim mikroskopom u laboratoriju (17-20). Najvažniji klinički znak za uspješnost remineralizacije jest nekavitirana karijesna lezija.

Demineralizacija se javlja u dva stadija. Prvi stadij jest bakterijsko metaboliziranje fermentirajućih ugljikohidrata čime se produciraju organske kiseline te difundiraju u zubno tkivo kroz vodu koja okružuje kristale minerala. Kad kiselina dosegne osjetljivu stranu na kristalnoj površini kalcij i fosfati se otpuštaju u okolnu vodenu fazu između kristala. Te zone su vidljive i na elektronskom mikroskopu kao bijele mrlje. Ako su na kristalnoj površini u to vrijeme prisutni fluoridni ioni u dostatnoj količini, oni se mogu adsorbirati na površinu kristala te značajno inhibirati proces demineralizacije (21). Remineralizacija je prirodni tjelesni obnavljajući proces za nekavitirane karijesne lezije ispod površine (7).

Kalcij i fosfat, primarno iz sline no moguće i iz drugih topikalnih izvora, difundiraju u zubno tkivo te se uz pomoć fluorida nadograđuju na postojeće kristale češće nego što formiraju nove kristale (2). Nova kristalna površina je sastavljena od ljuskica dobro formiranih minerala sličnih fluorapatitu, ovisno o količini prisutnih fluorida. Fluoridni ioni adsorbiraju se na površinu apatitnih kristala zubnih minerala te privlače kalcijeve ione koji nadalje privlače fosfatne čime započinju izgradnju fluorapatitu nalik remineraliziranu ljusku na kristalnoj površini. Tim procesom smanjuje se propusnost same površine u odnosu na onu karboniziranoga hidroksiapatita te je kiselinama iz novog dentalnog plaka teže prodrijeti kroz strukturu (21).

Dodaci slini koji sadrže kalcij i fosfate pokazuju prednosti u korištenju i prevenciji nastanka karijesa. Fluor ubrzava remineralizacijski proces, te formira integralni dio nove ljuske na površini kristala (7). Budući da je karijesni proces definiran kao dinamičan proces u ustima, procesi demineralizacije i remineralizacije se stalno izmjenjuju dok god u ustima postoje kariogene bakterije, fermentirajući ugljikohidrati i slina. Dominaciju određenog procesa u kariogenom ciklusu determinira ravnoteža između patoloških i protektivnih faktora (1,2,22).

Remineralizacijska terapija, proizvodi kristale minerala koji su rezistentniji na izazov kiselina nego li su to izvorni kristali koji čine caklinu i dentin. Stoga je sama remineralizacija često dovoljna da zaustavi napredak karijesne lezije i reparira subpovršinsku leziju. Brojna *in situ* te *in vitro* istraživanja su to upravo i potvrdila (23-30). Također, mnoga klinička istraživanja s fluoridiranim zubnim pastama pokazala su značajnu redukciju karijesnih lezija iz čega se može jasno zaključiti kako je proces uspješne remineralizacije najveći doprinos uspjehu proizvoda za prevenciju. *In vivo* i *in situ* istraživanja koja su izravno mjerila remineralizaciju ili inhibiciju demineralizacije također su potvrdili navedene koncepte (25).

Postoje mnogi preparati na bazi različitih minerala i spojeva koji se koriste za proces remineralizacije cakline nakon procesa jetkanja ortofosfornom kiselinom u kojem se nadoknađuju kiselinom odstranjeni minerali te narušena strukturna cjelovitost. Neki od najpoznatijih remineralizacijskih materijala su bioaktivno staklo (BG) te amorfni kalcijev fosfat (ACP) i kazein fosfopeptid (CPP).

Bioaktivno staklo se sastoji od  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$  i  $\text{P}_2\text{O}_5$  te se primarno koristi u ortopediji zahvaljujući svojstvu povezivanja sa živim koštanim tkivom preko površinskog sloja hidroksiapatita koji se precipitira prigodom izlaganja tkivnim tekućinama (31). Čestice stakla u vodenom mediju dovode do stvaranja hidroksiapatitnog sloja čestica bioaktivna stakla, otpuštanja iona u okolnu otopinu, površinsku precipitaciju sloja amornog kalcijevog fosfata i njegovu postupnu reorganizaciju u kristalnu strukturu hidroksiapatita koji je termodinamički stabilniji (32,33). Ovo svojstvo razlog je korištenja bioaktivnih stakla u parodontologiji te implantologiji u novije vrijeme (34). Svojstvo otpuštanja kalcijevih i fosfatnih iona korisno je zbog potvrđene uloge ovih iona u remineralizaciji tvrdih zubnih tkiva i karijes protektivnom učinku (35). Dodatni proces koji bi mogao doprinijeti prevenciji sekundarnog karijesa predstavlja taloženje hidroksiapatita u prostor mikropukotine, čime se otežava ili sprečava prodor mikroorganizama i njihovih metaboličkih produkata (36). Slična pojava dovodi do obliteracije dentinskih tubula, što može pomoći pri smanjenju postoperativne preosjetljivosti (37).

S ciljem prevencije sekundarnog karijesa, istraživanja su u novije vrijeme usmjerena prema razvoju bioaktivnih kompozitnih materijala s antibakterijskim i/ ili remineralizirajućim svojstvima (38). Aktivna biostakla pokazuju potencijalnu vrijednost kao punila kompozitnih materijala. U eksperimentalnim kompozitima kojima su dodana bioaktivna stakla zapažen je potencijal za remineralizaciju tvrdih zubnih tkiva posredovanjem kalcijevih i fosfatnih iona, dok rast kristala hidroksiapatita na restorativnoj površini doprinosi brtvljenju mikropukotine koja je nastala tijekom polimerizacijskog skupljanja materijala, čime se prevenira nastanak sekundarnog karijesa (39-41). Takvi materijali inhibiraju bakterijsku aktivnost na površini kompozitnog ispuna i regeneriraju demineralizirana zubna tkiva precipitacijom iona otpuštenih iz restauracije (42, 43). Otapanjem bioaktivna stakla snižava se pH vrijednost u okolini restauracije čime se postiže antibakterijski učinak (44).

CPP u metastabilnoj otopini pokazao je zapanjujuću mogućnost stabilizacije amornog kalcijeva fosfata. Zahvaljujući mnogostrukim fosfoseriliranim ostacima, CPP se veže i stvara

nanoklastere ACP-a, sprečavajući njihov rast do kritične veličine potrebne za stvaranje jezgri mineralizacije i transformaciju faze (45). Kazeinfosfopeptidi imaju važnu zadaću kao nosači ACP-a, lokalizirajući visokotopljivu fazu kalcijeva fosfata na površini zuba. Ta lokalizacija održava velik koncentracijski gradijent kalcijevih i fosfatnih iona u potpovršinskom sloju cakline (46). CPP-ACP pokazuje i dobar protukarijesni učinak, pri čemu CPP stabilizira i lokalizira ACP na površini zuba te tako puferira pH plaka, smanjuje demineralizaciju i poboljšava remineralizaciju cakline (49).

Amorfni kalcijev fosfat jest esencijalna mineralna faza koja je oblikovana u mineraliziranim tkivima te je prvi komercijalni proizvod kao umjetni hidroksiapatit. Radi svojih svojstava često se koristi u dentalnoj medicini, ortopediji te drugim granama medicine. Prvi put je opisan sredinom 1960. godina kao amorfni talog nastao slučajnim miješanjem visokih koncentracija kalcijeva klorida te natrijeva fosfata (50,51). ACP je inicijalna čvrsta faza koja precipitira iz visoko zasićene kalcij fosfatne otopine i može se konvertirati u stabilne kristalične faze kao što su oktakalcij te apatitni produkti. Njegov morfološki oblik, strukturni model i rendgenski difrakcijski uzorci tipični su za nekristalične strukture s redovitom regulacijom kratka dometa. Dokazano je da ACP ima bolju *in vivo* osteoinduktivnost nego hidroksiapatit, biorazgradivost od trikalcij fosfata, dobru bioaktivnost te ne pokazuje citotoksičnost (50).

U kliničkim istraživanjima vodice za ispiranje usta koje su sadržavale CPP-ACP pokazalo se kako su se vrijednosti kalcija te anorganskog fosfata u supragingivalnom plaku snizile nakon uporabe vodice kroz period od 2 do 3 dana (52). Dokazana je konkurencija CPP- ACP na vezna mjesta u dentalnom plaku sa kalcijem čime se onemogućava stvaranje kalcijevih mostića u pelikuli kojim se bakterije vežu za pelikulu te međusobno (53). To pokazuje kako će se smanjiti gubitak minerala u kariogenom procesu te osigurati bolji izvor kalcija za inhibiciju demineralizacije te stimulaciju remineralizacije jer su otopine s većim udjelom CPP-ACP-a stabilizirale kalcijeve i fosfatne ione (53).

Svrha ovoga istraživanja je bila dokazati potencijalni remineralizacijski učinak bioaktivna stakla 45S5 na površinu demineralizirane cakline i usporediti ga s učinkom komercijalno dostupnog preparata za remineralizaciju i tretman početnoga karijesa.



## **2. Hipoteze**

1. Topikalna primjena bioaktivna stakla dovodi do porasta mikrotvrdoće demineralizirane cakline.
2. Topikalna primjena bioaktivna stakla dovodi do remineralizacije na površini cakline.

### **3. Materijali i metode, uzorci**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Bioaktivno staklo 45S5**

Bioaktivna stakla pripadaju skupini topljivih stakala koja se sastoje od promjenjivih omjera  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$  i  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Temeljna karakteristika im je topljivost u vodi te otpuštanje kalcijevih i fosfatnih iona. Dio otpuštenih iona precipitira na površini bioaktivna stakla u obliku amornog kalcijevog fosfata koji se spontano transformira u termodinamički stabilniji kalcijev hidroksiapatit. U ovome istraživanju koristili smo bioaktivno staklo 45S5 (BG) (Schott, Landshut, Njemačka) koje smo koristili u formi praha zamiješanog s redestiliranom vodom da bi dobili gustu otopinu (konzistencije vrhnja, paste) koju smo nanosili metalnom špatulom (Carl Martin, Solingen, Njemačka) na površinu cakline u kontaktnom sloju od 2 mm. Pripremljena pasta biostakla i redestilirane vode (miješana u omjeru 1:1) mijenjala se svakodnevno, a tretman se provodio kroz 14 dana, pri čemu su uzorci držani u inkubatoru na  $37^\circ\text{C}$  (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn).



Slika 1. Prah bioaktivna stakla 45S5 ( Schott, Landshut, Njemačka)

### 3.1.2. Tooth Mousse

Tooth Mousse (TM) (GC, Japan) je zubna pasta na bazi vode koja sadrži RECALDENT™ (CPP-ACP: kasein fosfopeptid – amorfni kalcij fosfat). Pri primjeni CPP-ACP u oralnom okruženju on se veže za biofilme, plak, bakterije, hidoksiapatit i meko tkivo i otpušta biološki raspoloživ kalcij i fosfat. U ovome istraživanju koristili smo Tooth Mousse, okusa vanilije, koji smo nanosili na površinu cakline izravno iz tube, te smo ga razmazali metalnom špatulom (Carl Martin, Solingen, Njemačka) u kontaktnom sloju od 2 mm. Pasta se mijenjala svakodnevno, a tretman se provodio kroz 14 dana, pri čemu su uzorci držani u inkubatoru na 37° C (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein).



Slika 2. Tooth Mousse (GC, Japan)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Mikrotvrdoća

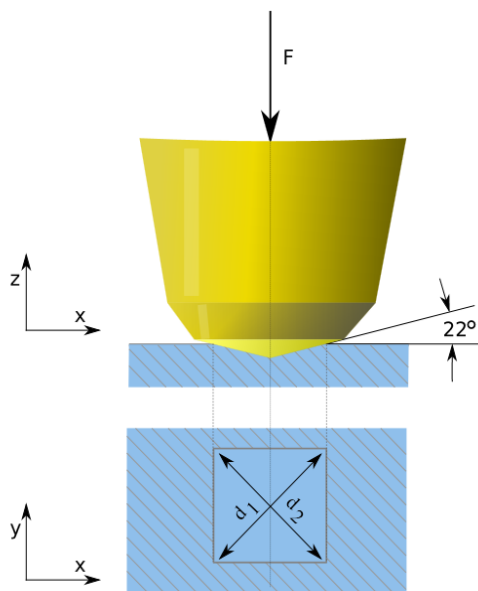
Tvrdoća je otpornost materijala na prodiranje. Po definiciji, tvrdoća predstavlja otpornost materijala prema prodiranju nekoga drugog znatno tvrdjeg tijela. Vickers je svojom metodom uklonio glavne nedostatke Brinell-ove metode, pa je po ovoj metodi moguće mjeriti i najtvrdje materijale, a nadalje kod Vickersa tvrdoća nije ovisna o primijenjenoj sili. Prvi nedostatak uklonjen je primjenom najtvrdjeg materijala, dijamanta za penetrator, a drugi geometrijom penetratora. Naime kod Vickersa je penetrator istostrana četverostrana piramida

s kutom između stranica od  $136^\circ$ . Ovakav kut nije odabran nasumce, već se utiskivanjem penetratora s tim kutom, dobivaju vrijednosti tvrdoće neovisne o primijenjenoj sili, stoga se tvrdoća mekih materijala i tvrdih materijala može mjeriti primjenom iste sile, a isto tako se tvrdoća istog materijala može mjeriti s različitim opterećenjima. Utiskivanjem ovakvog penetratora u materijalu ostaje otisak oblika piramide. S pomoću mjernog mikroskopa mjere se dijagonale ( $d_1$ ,  $d_2$ ) baze piramide otisnute u materijalu, a tvrdoća se određuje prema izrazu :

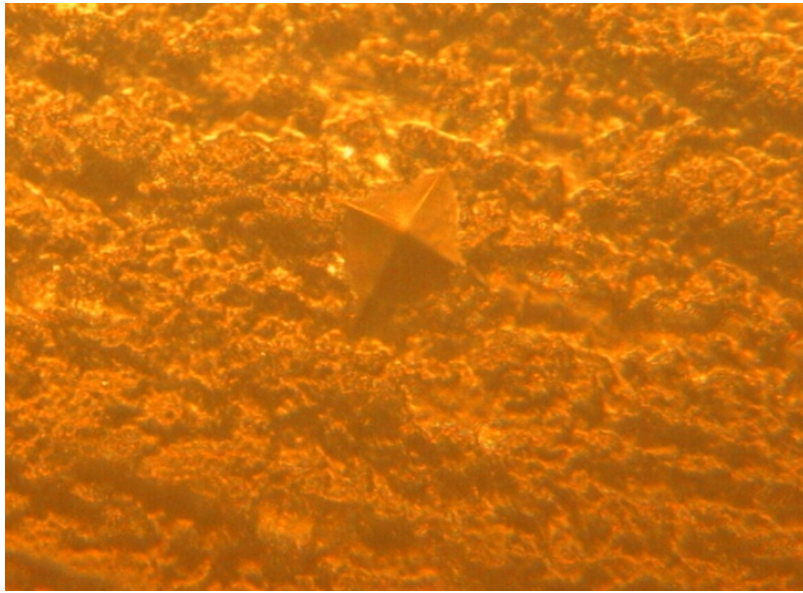
$$HV = F \times 0,189 / d^2$$

gdje je  $F$  primijenjena sila u N,  $d$  aritmetička srednja vrijednost dijagonala baze piramide u mm ( $d=(d_1+d_2)/2$ ).

Mikrotvrdoća cakline prije jetkanja, neposredno nakon dvominutnog jetkanja 37 % ortofosfornom kiselinom, nakon dvotjednog tretmana BG ili preparatom TM, te nakon dvotjednog držanja u destiliranoj vodi (DV) (kontrola) testirala se Vickersovim testom mikrotvrdoće (Leitz Miniload 2 Microhardnes Tester, Njemačka) pri čemu se koristila sila od 200 g kroz 10 sekundi. Za mjerenje se koristila dijamantna piramida koja se aplicirala na površinu uzorka. Mjerenja su se izvršila na pet različitih mjesta udaljenosti  $100 \mu\text{m}$  i izračunana je srednja vrijednost.



Slika 3. Uređaj za mjerenje mikrotvrdoće (Leitz Miniload 2 Microhardnes Tester, Njemačka)



Slika 4. Otisak piramide na površini cakline

### 3.2.2. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM)

Prikazuje površinu uzorka skenirajući je putem jakog snopa elektrona. Elektroni dolaze u interakciju s atomima površine promatranog uzorka i formiraju signale koji sadrže podatke o topografskom izgledu površine, sastavu i električnoj provodljivosti uzorka. Vrste signala koje proizvodi SEM uključuju sekundarne elektrone, elektrone povratne difuzije, RTG zrake, katoluminiscenciju temeljenu na elektronskom topu, te trenutne i odaslane elektrone. SEM ima moć otkrivanja detalja i prikazivanja površinskih struktura veličina manjih od 1 do 5 nanometara. Zbog uskog snopa elektrona možemo dobiti vrlo iscrpan prikaz dubine samih struktura koje promatramo. Taj trodimenzionalni prikaz doprinosi jasnoći cjelokupnog promatranja površine uzorka. Mogućnost povećanja varira od 10 pa sve do 500.000 - 850.000 puta, što je otprilike 250 puta veće povećanje nego što nam može omogućiti svjetlosni mikroskop. SEM radi pod visokim naponom gdje molekule plina interferiraju sa zrakom elektrona i emitirajućim sekundarnim elektronima povratne difuzije koji se koriste za prikazivanje (54).



Slika 5. Pretražni elektronski mikroskop JSM 7000F (JEOL, Japan) sa spektroskopom karakterističnog X-zračenja INCA-350 (Oxford Instruments, Engleska)

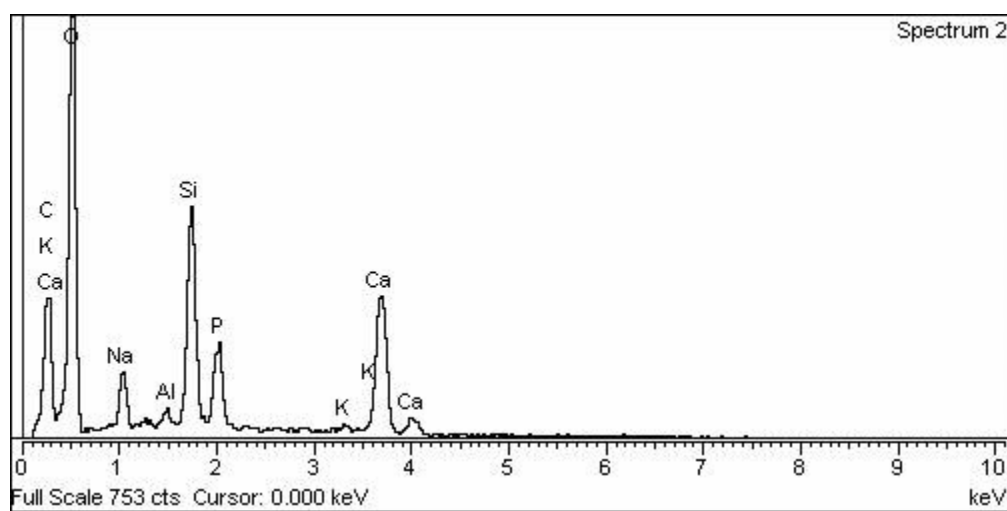
### 3.2.3. Mikromorfološka SEM analiza

Jedan uzorak od svake skupine je nasumično izabran i analiziran pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa JSM 7000F (JEOL, Japan) prije jetkanja, nakon dvominutnog jetkanja 37 % ortofosfornom kiselinom i nakon dva tjedna tretmana BG i TM. Uzorci su se posušili i fiksirali na aluminijski nosač. Morfologija cakline je promatrana pod povećanjem do 20 000 puta. Promjene cakline su klasificirane: bez promjena, umjerene do slabe promjene (umjerene promjene površinske morfologije s iregularnim obilježjima i promjenama) i promjene površine (gubitak površinske strukture i minerala), odlaganje minerala i kristala na površini cakline.

### 3.2.4. Spektroskopija karakterističnog X-zračenja (EDS)

Prijelazima između elektronskih stanja kako atoma, tako i molekula, bavi se spektroskopija. U usporedbi s molekulama atomi su u spomenutom kontekstu specifični po tome što imaju samo elektronske stupnjeve slobode, izuzevši nuklearni spin i translaciju. Molekule s druge strane imaju, samom svojom strukturom uvjetovane, dodatne, vibracijske i rotacijske stupnjeve slobode. U spektroskopiji rendgenskim zračenjem rabimo koherentno raspršenje X-zračenja na elektronskim oblacima atoma u kristalima. Kristalna struktura, opisana kristalnom rešetkom, znači da pravilnost razmještaja atoma u prostoru postoji na udaljenostima mnogo većim od atomskih dimenzija. Kristali su uglavnom anizotropni, što znači da su pravilnosti

razmještaja atoma različite u pojedinim smjerovima pa će izgled interferencijskih spektara ovisiti o smjeru promatranja kristala. Za proučavanje bioloških makromolekula uobičajeno se koriste X- zrake valne duljine oko 0,1 nm proizvedene sinkotronsom radijacijom (55). Kvantitativne i kvalitativne promjene u kemijskom sastavu cakline određene su spektroskopijom karakterističnog X-zračenja, EDS spektrometar, INCA-350 (Oxford Instruments, Engleska).



Slika 6. Prikaz mjerenja EDS analizom INCA-350 (Oxford Instruments, Engleska)

### 3.2.5. Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija primjenjuje neelastično raspršenje svjetla, Ramanovo raspršenje za prikupljanje spektroskopskih podataka. Elektromagnetsko zračenje, raspršeno na molekuli, sadrži dvije komponente koje dolaze od vibracija ili rotacija molekula. Ramanovi spektrofotometri rabe izvor monokromatskog zračenja koje je usmjereno na uzorak. Zračenje, raspršeno pod nekim kutom (obično pod 90°) vodi se na monokromator, iz kojeg se propušta samo jedna valna duljina. Skeniranjem u području valnih duljina oko valne duljine izvora zračenja, dobiva se spektar. Spektar se sastoji od jedne linije velikog intenziteta, koja odgovara valnoj duljini upadnog zračenja (Rayleighovo raspršenje), te skupa vrpci i/ili linija pri većim valnim duljinama (antistokesovo raspršenje) i skupine vrpci i/ili linija pri manjim valnim duljinama (Stokesovo raspršenje) puno manjeg intenziteta. Te skupine linija odgovaraju vibracijskom i/ili rotacijskom spektru molekule. Energija spektroskopskog

prijelaza se određuje razlikom energija iz Stokesove ili antistokesove vrpce i valne duljine upadnog, monokromatskog zračenja (56).

U ovome istraživanju koristili smo se uređajem Spectrum GX (PerkinElmer, Waltham, SAD) uz ekscitaciju NdYAG laserom valne duljine od 1064 nm i snage 400 mW. Ekscitirano područje uzorka bilo je kružnog oblika, promjera 0,5 mm. Raman spektri su snimljeni u 100 skenova, uz rezoluciju od 4 cm<sup>-1</sup>. Spektri su obrađeni s pomoću dodatka Kinetics za Matlab (Mathworks, Natick, Massachusetts, SAD).

### 3.3. Uzorci

#### 3.3.1. Uzorci za mjerenje mikrotvrdoće

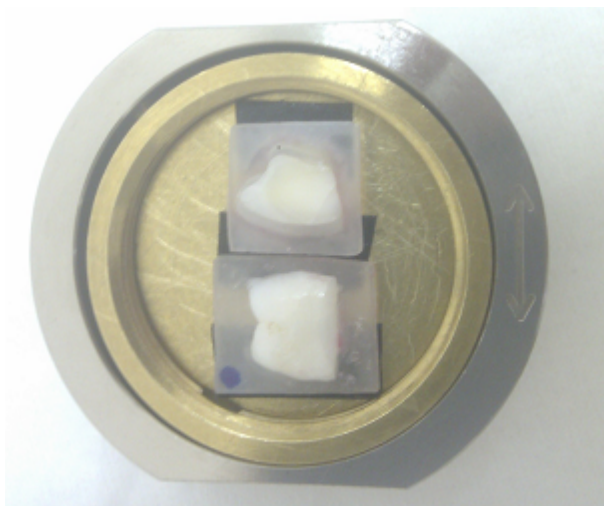
Petnaest svježe izvađenih ljudskih, intaktnih trećih kutnjaka očišćeni su i pohranjeni u 1 % otopinu kloramina na sobnoj temperaturi neposredno nakon ekstrakcije. Korištenje izvađenih ljudskih zuba je odobreno od Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korijenovi zuba odrezani su od krunskog dijela s pomoću dijamantne pile (Isomet, Buehler doo, Lake Bluff, SAD) oko 2 mm ispod caklinskocementnog spojišta. Krune zuba su pohranjene u deioniziranu vodu. Zubi su bili bez karijesa ili ispuna. Pulpna komora je očišćena od preostalog pulpnog tkiva. Za mjerenje mikrotvrdoće kruna zuba je uložena u akrilnu smolu (AcryFix Kit; Struers, Balerrup, Danska) i uzorci su prerezani u aksijalnom smijeru kako bi se od svake krune dobilo po dva zasebna uzorka, na kojima su se proučavale promjene na caklini. Nakon toga, uzorci cakline su polirani pomoću karborudnih diskova uz vodeno hlađenje (Water Proof Silicon Carbide Paper, 4000 grit; Buehler, Dusseldorf, Njemačka) i 1,0 μm, 0,3 i 0,05 μm veličine čestica praha za poliranje (Buehler, Dusseldorf, Njemačka). Uzorci su nasumično podijeljeni u tri skupine (n=10) i pohranjeni u deioniziranoj vodi na 37 °C (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein).

Prvo mjerenje napravljeno je na površini intaktne (polirane) cakline, a nakon toga se uzorak cakline tretirao 37 % ortofosfornom kiselinom (Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn), kroz 2 minute te je nakon toga ponovno izmjerena mikrotvrdoća. Uzorci su tretirani BG, kroz 14 dana, a isto je napravljeno s preparatima koji su tretirani pastom TM ili su samo stajali u DV kroz 14 dana. BG, TM i DV mjenjani su svaki dan. Uzorci su držani u inkubatoru na 37°C (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn). U svakoj se skupini koristilo 10 zasebih uzoraka cakline.



### 3.3.2. Uzorci za mjerenje mikromorfologije i kemijskog sastava

Površina cakline promatrana je pod visokotlačnim SEM mikroskopom (JSM 7000F, JEOL, Japan). Prvo mjerenje napravljeno je na površini intaktne cakline, a nakon toga se uzorak cakline tretirao 37 % ortofosfornom kiselinom kroz 2 minute te je uzorak ponovno snimljen. Uzorci su tretirani BG, kroz 14 dana, a isto je napravljeno s preparatima koji su tretirani pastom TM ili su samo stajali u DV kroz 14 dana. BG, TM i DV mijenjani su svaki dan. Uzorci su držani u inkubatoru na 37°C (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) i nakon toga su snimljeni SEM mikroskopom, a kemijska analiza napravljena je pomoću EDS. Iz svake skupine uzoraka, izabran je jedan uzorak.



Slika 7. Uzorci cakline i dentina za SEM i EDS analizu

### 3.3.3. Uzorci za mjerenje Ramanove spektroskopije

Mjerenja Ramanovom spektroskopijom napravljena su na površini kružna oblika, promjera 0,5 mm i to najprije intaktne cakline, a nakon toga se uzorak cakline tretirao 37 % ortofosfornom kiselinom kroz 2 minute te je uzorak ponovno snimljen. Uzorci su tretirani BG, kroz 14 dana, a isto je napravljeno s preparatima koji su tretirani pastom TM ili su samo stajali u DV kroz 14 dana. BG, TM i DV mijenjani su svaki dan. Uzorci su držani u

inkubatoru na 37°C (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) i nakon toga su ponovno snimljeni Ramanovom spektroskopijom.

### **3.4. Statistička obrada**

Za analizu mjerenja mikrotvrdoće cakline korištena je analiza varijance (ANOVA) za ponovljena mjerenja. Početna mjerenja, mjerenja nakon jetkanja te nakon dvotjednog tretmana uspoređena su zasebno za svaku vrstu tretmana (BG, TM, DV). Promjena mikrotvrdoće cakline nakon dvotjednog tretmana u odnosu na mjerenja nakon jetkanja uspoređena je i između različitih tretmana. Prije analize podaci su transformirani korištenjem logaritamske funkcije. Normalnost podataka ispitana je korištenjem grafičkog prikaza reziduala ANOVA modela te pokazatelja asimetrije i zaobljenosti, koji su ukazali na približno normalnu distribuiranost. Logaritmirani podaci transformirani su natrag na originalnu skalu prigodom prikazivanja rezultata, pri čemu se razlike između specifičnih vrsta mjerenja odnosno tretmana mogu interpretirati kao postotne promjene u mikrotvrdoći cakline. Rezultati su analizirani korištenjem Bonferroni-Holmove metode korekcije za višestruke usporedbe, na razini značajnosti od 0,05. Analiza je provedena korištenjem SAS 8.2 programskog paketa.

## **4. Rezultati**

### **4.1. Mikrotvrdoća**

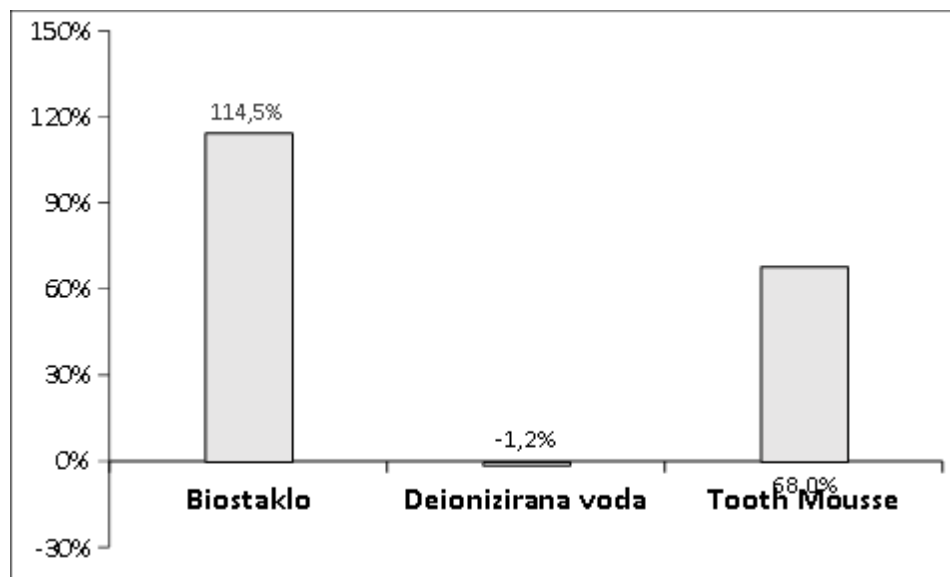
Statistički značajan pad vrijednosti mikrotvrdoće zabilježen je nakon postupka jetkanja ( $p < 0.001$ ). Vrijednosti mikrotvrdoće nakon jetkanja, u prosjeku su bile 1.61 puta manje u odnosu na početna mjerenja. Nakon dvotjednog tretmana BG ili TM zabilježeno je statistički značajno povećanje mikrotvrdoće cakline ( $p < 0.001$  za oba tretmana), koje je u prosjeku bilo statistički značajno veće u odnosu na početna mjerenja na površini intaktne cakline za tretman BG ( $p < 0.001$ ), no to nije zabilježeno kod tretmana TM ( $p = 0.331$ ) (Tablica 1). U suprotnome, dvotjedni tretman tj. držanje uzoraka u DV nije dovelo do povećanja u površinskoj mikrotvrdoći cakline nakon jetkanja ( $p = 0.846$ ) i vrijednosti mikrotvrdoće su ostale statistički značajno manje u odnosu na početna mjerenja.

Tablica 1. Mikrotvrdoća cakline nakon različitih tretmana

Vrsta tretmana	Početno G. Mean (95% CI) A	Jetkanje G. Mean (95% CI) B	Tretman G. Mean (95% CI) C
<b>Biostaklo</b>	445.2 (391.1-506.8) A	304.6 (272.2-340.8) B	653.4 (627.0-681.0) C
<b>Deionizirana voda</b>	589.0 (517.4-670.6) A	299.9 (268.0-335.6) B	296.2 (284.3-308.7) B
<b>Tooth Mousse</b>	479.6 (428.6-536.7) A	324.7 (311.5-338.3) B	545.6 (479.2-621.1) A

*Napomena: U tablici su prikazane geometrijske sredine i 95 %-tni intervali pouzdanosti; različita slova u pojedinom retku označavaju statistički značajne razlike između početnih mjerenja, mjerenja nakon jetkanja ili nakon dvotjednog tretmana.*

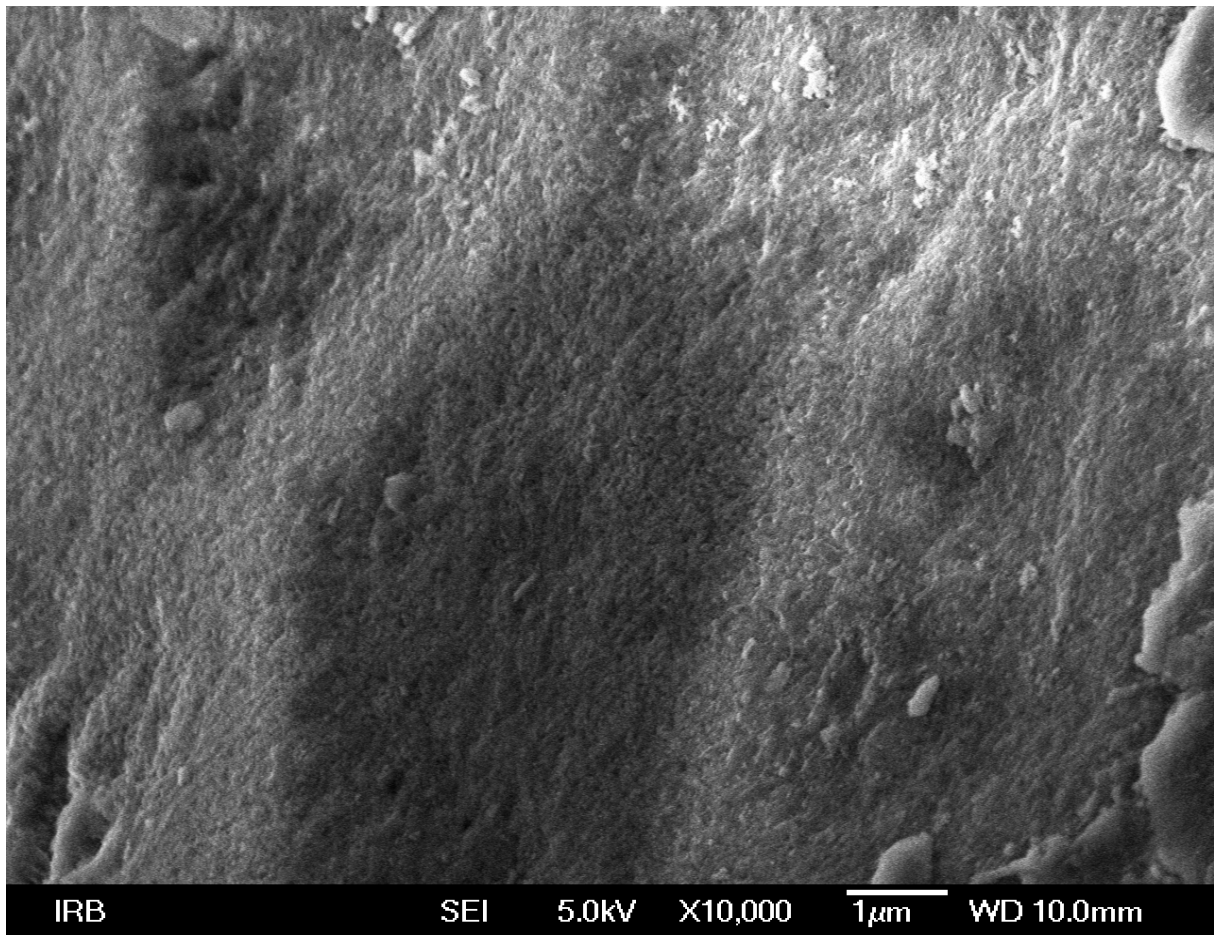
Usporedba između različitih tretmana pokazala je značajne razlike. Dvotjedni tretman BG nakon jetkanja pokazao je 2.15 puta veće vrijednosti površinske mikrotvrdoće, a nakon toga slijedi povećanje mikrotvrdoće nakon tretmana TM s 1.68 puta većim vrijednostima, dok tretman DV nije pokazao značajan učinak u povećanju mikrotvrdoće. Promatrane razlike u različitim tretmanima bile su statistički značajne ( $p=0.037$  za usporedbu učinka BG i TM i  $p<0.001$  za usporedbu učinka između ovih tretmana i učinka DV) (Slika 8).



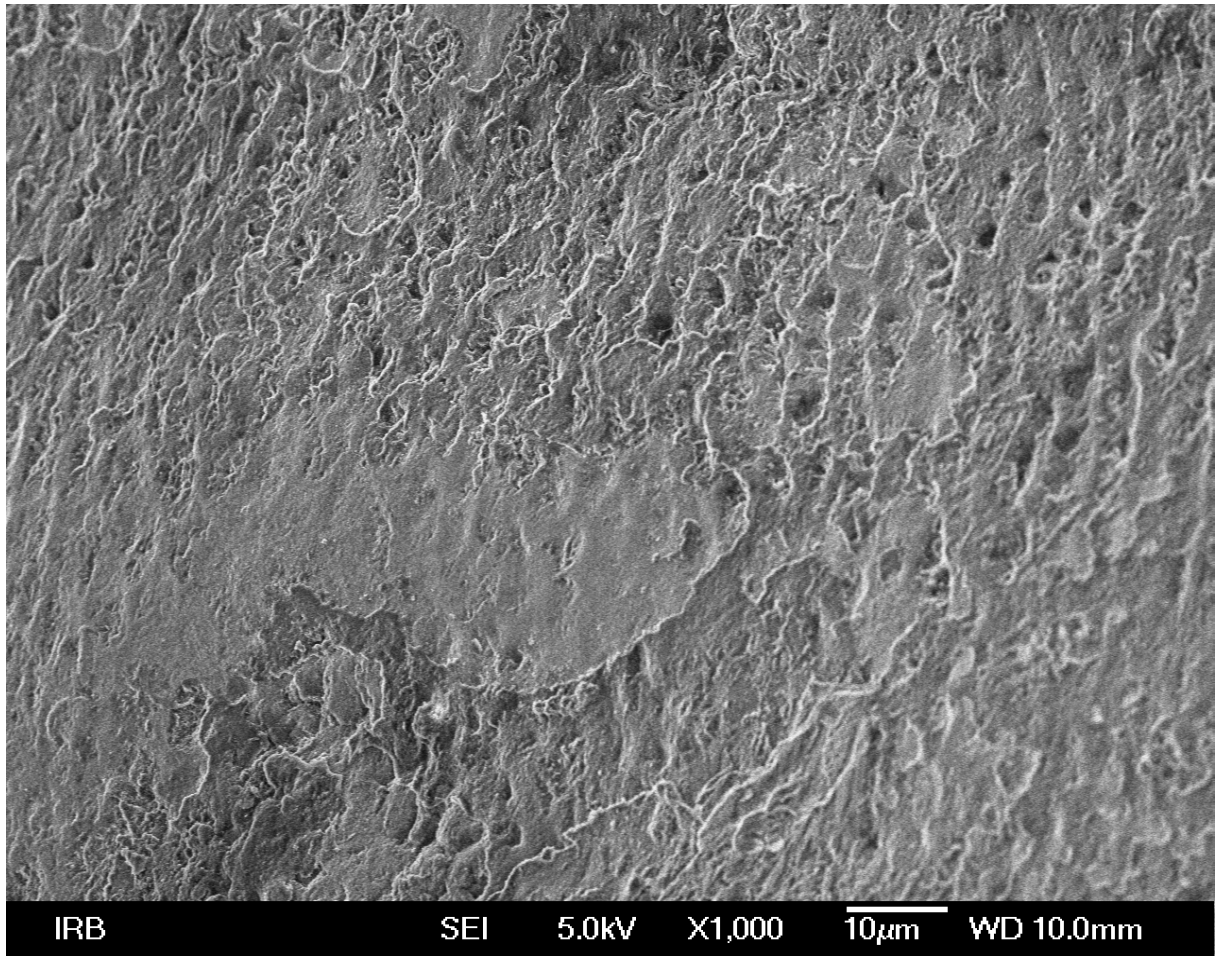
Slika 8. Postotna promjena u mikrotvrdoći cakline nakon dvotjednog tretmana u odnosu na mikrotvrdoću nakon jetkanja prema vrsti tretmana

## 4.2. SEM analiza

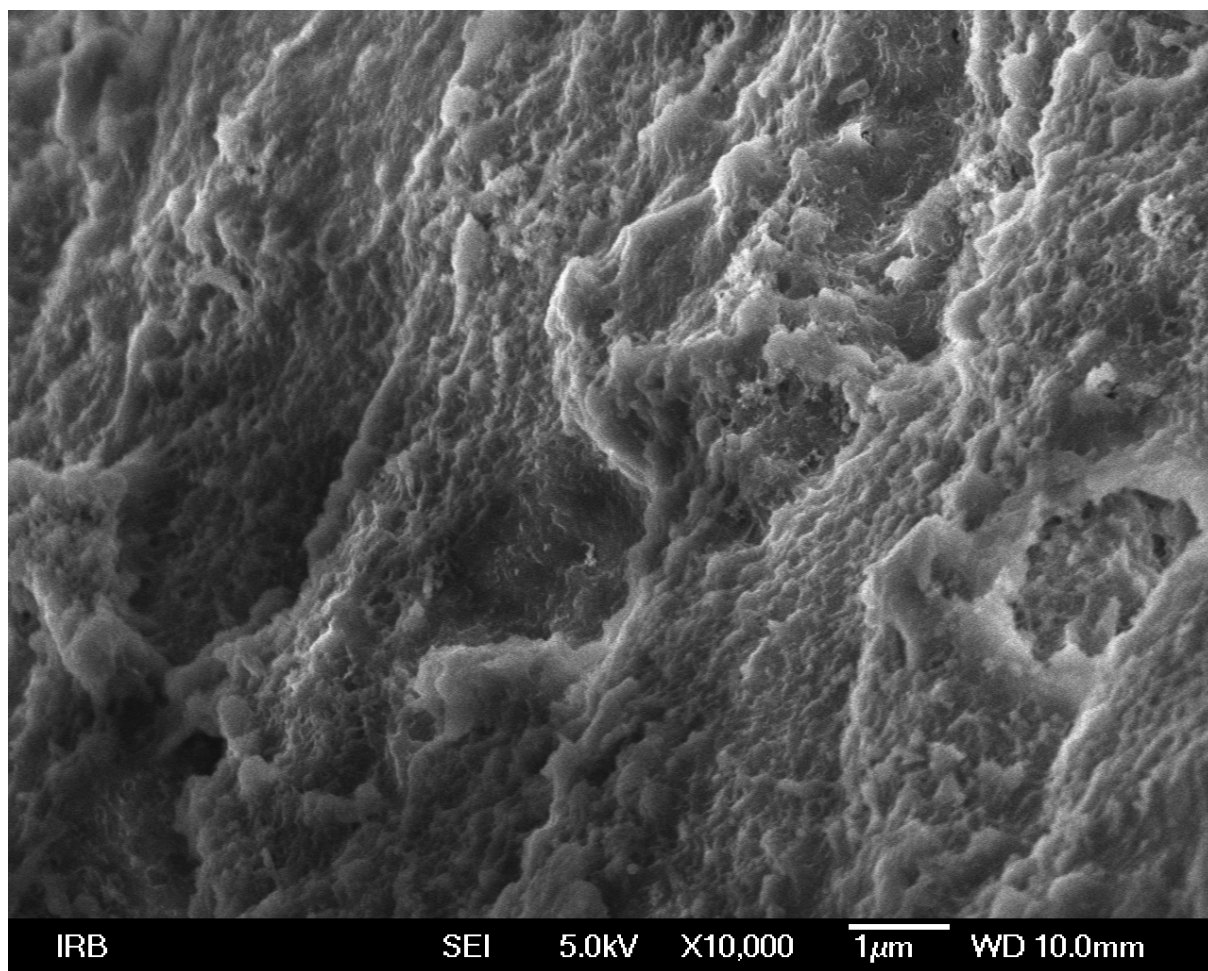
Na reprezentativnim slikama polirane površine cakline nisu zabilježene značajne mikromorfološke promjene cakline (Slika 9). Nakon jetkanja 37 % ortofosfornom kiselinom kroz 2 minute primijećena je promjena u mikromorfologiji cakline u vidu mikro i makro nazubljenosti caklinskih prizmi i povećanju površinske hrapavosti (Slika 10, 11). Nakon dvotjednog tretmana cakline BG, zabilježeno je odlaganje čestica BG u nepravilnim nakupinama na površini cakline (Slika 12, 13) Nakon dvotjednog tretmana cakline TM, zabilježeno je odlaganje kristala na površini cakline (Slika 14).



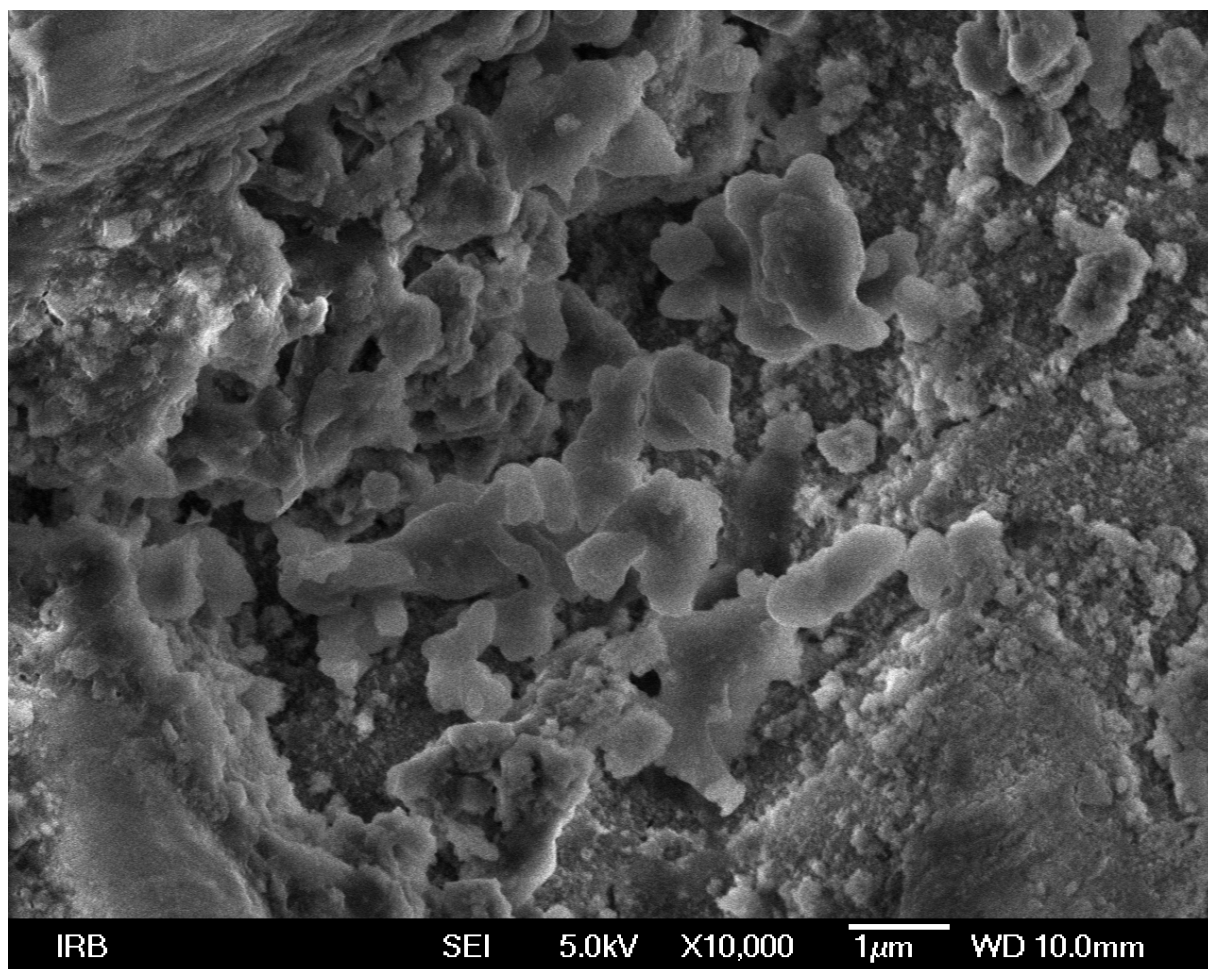
Slika 9. Glatka površina polirane cakline



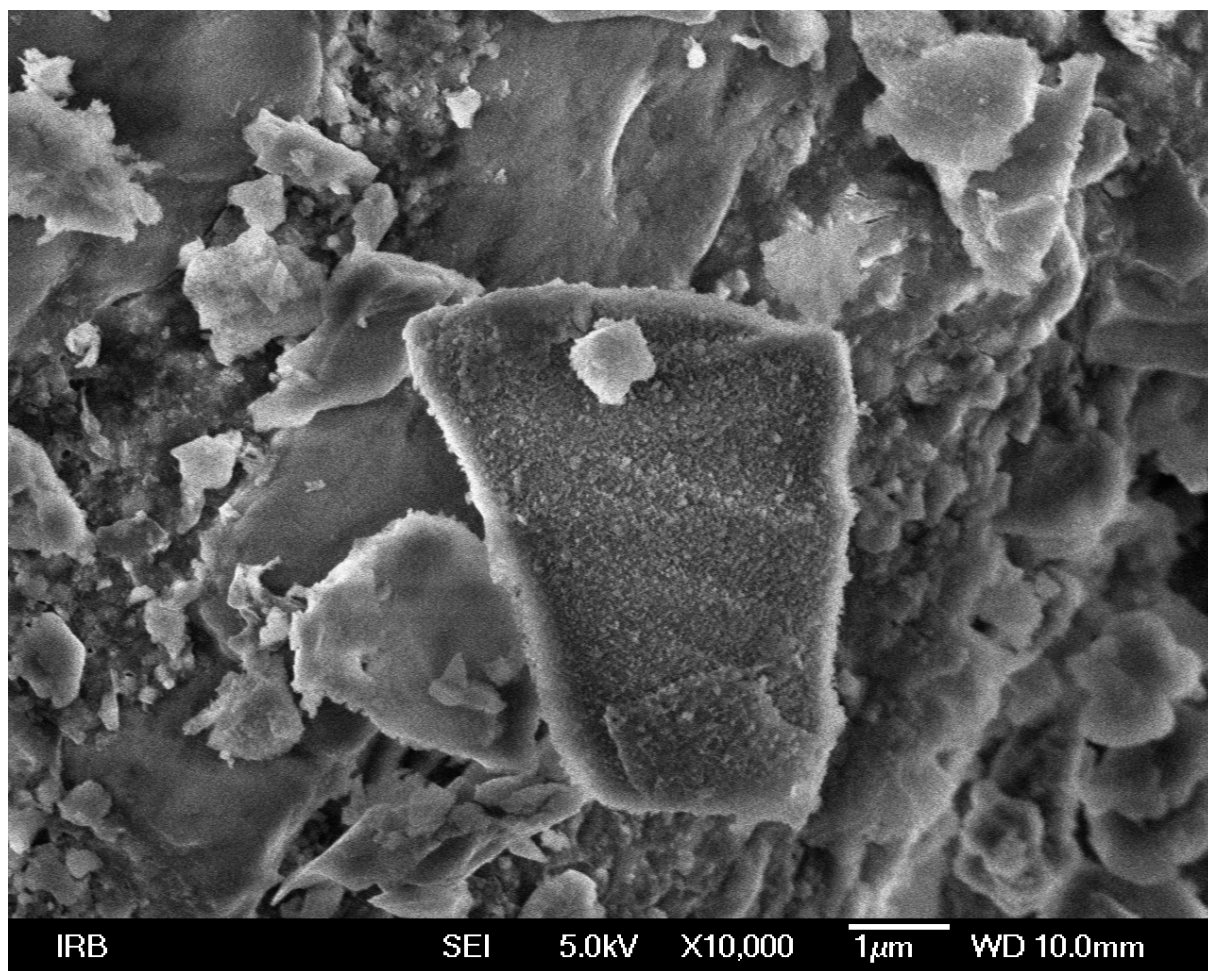
Slika 10. Povećanje površinske hrapavosti nakon jetkanja



Slika 11. Mikro i makro nazubljenosti caklinskih prizmi nakon jetkanja

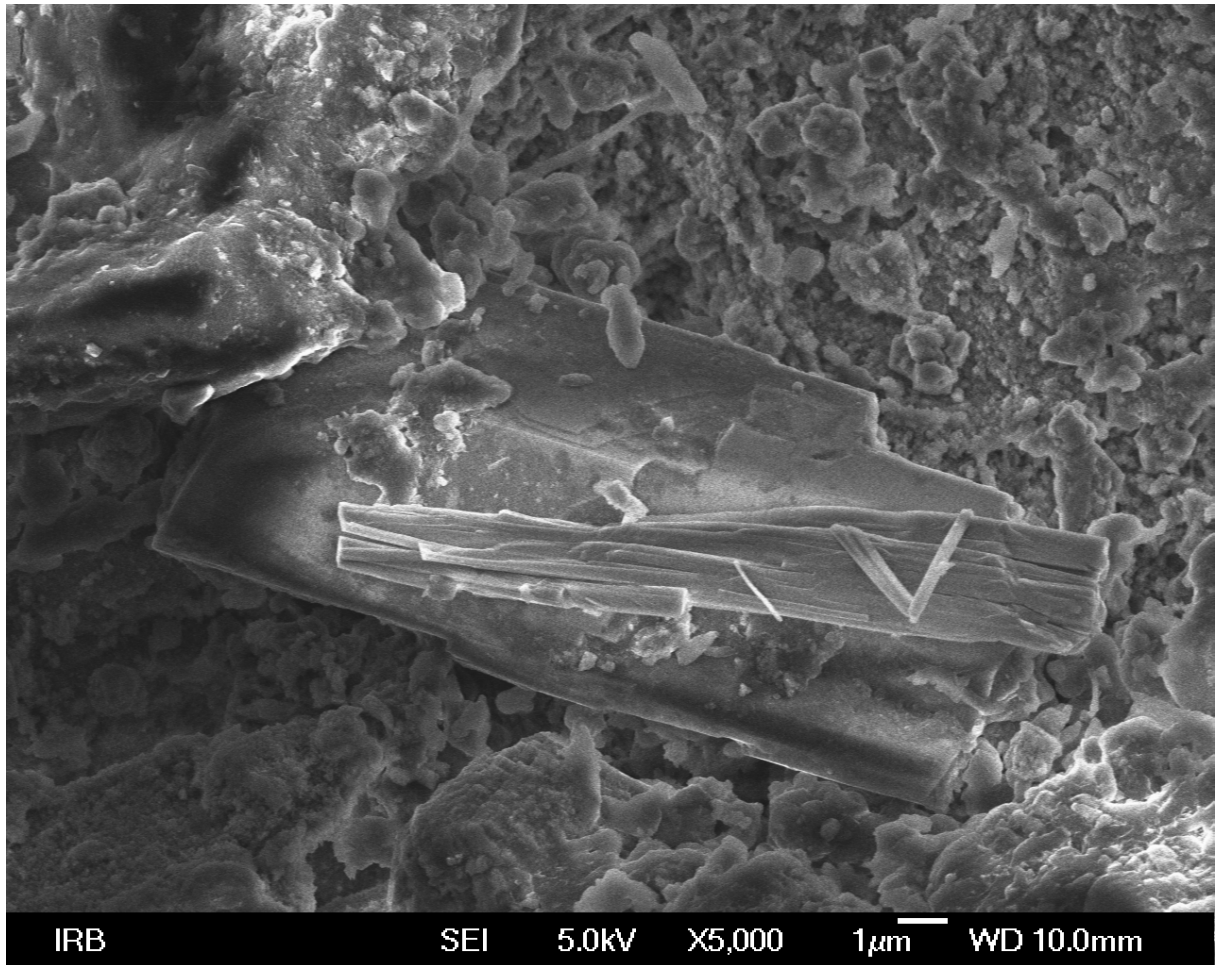


Slika 12. Odlaganje čestica biostakla u nepravilnim nakupinama na površini cakline



Slika 13. Odlaganje čestica BG u nepravilnim nakupinama na površini cakline

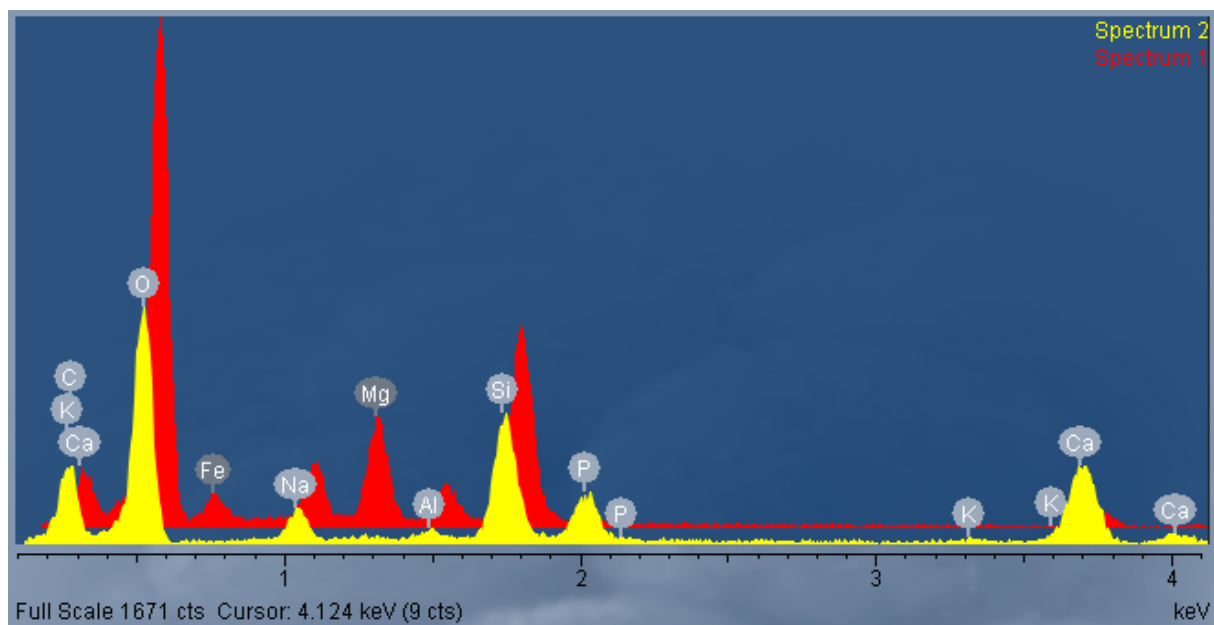




Slika 14. Odlaganje kristala na površini cakline nakon tretmana TM

#### 4.3. EDS analiza

EDS analizom dokazano je smanjenje mineralizacije cakline nakon dvominutnog jetkanja 37 % ortofosfornom kiselinom, dok je nakon tretmana BG zabilježen porast koncentracije kalcija (Ca), natrija (Na), fosfata (P) i silikata (Si) što je dokaz remineralizacije i odlaganja kristala iz bioaktivna stakla (Slika 15).



Slika 15. Razlika u koncentraciji aktivnih elemenata nakon jetkanja (žuto) i nakon tretmana BG (crveno)

#### 4.4. Ramanova spektroskopija

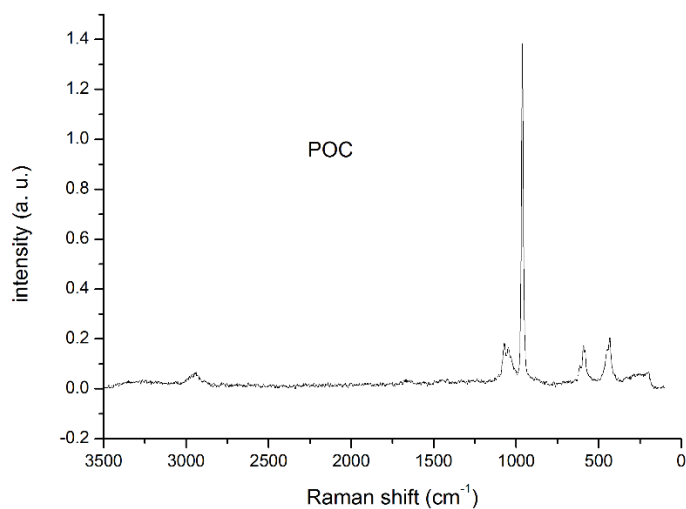
U tablici 2. su navedene vrpce koje pripadaju hidroksiapatitu (HA), pri čemu se 4 od 5 odnosi na različite vibracije fosfatne skupine. U spektrima različitih tretmana (Slike 16-20.) dominiraju navedene vrpce, dok druge nisu vidljive.

Problem u radu s Ramanovom spektroskopijom, kod konkretno ovih mjerenja, bio je taj da se vrijednosti na y-osi nisu mogle međusobno usporediti između različitih uzoraka tj. tretmana, odnosno nismo mogli odabrati jednu vrpcu (za kvantifikaciju HA se uobičajeno uzima najveći pik na cca 960  $\text{cm}^{-1}$ ) i izravno uspoređivati njezin intenzitet između različitih uzoraka. To je zato jer intenzitet Ramanova raspršenja ovisi o geometriji uzorka, pa onda i najmanje promjene oblika uzorka, hrapavosti površine, udaljenosti i kuta pod kojim se postavljaju u instrument utječu na apsolutne vrijednosti intenziteta. Zato se iz apsolutnih intenziteta može dobiti kvantitativna informacija jedino ako postoji i neka referentna vrpca na koju se normira cjelokupni spektar. Navedenom problemu bi se u teoriji moglo doskočiti kad bi se pripremio savršeno ravan uzorak koji bi se u instrumentu pozicionirao savršeno paralelno s osi pomicanja i kad bi se spektri snimali s mjesta koja su međusobno vrlo malo udaljena (nekoliko mikrona). Tada bi se moglo reći da je učinak geometrije eliminiran i da se intenziteti vrpce mogu izravno uspoređivati. Za to je potreban mikroraman, a kontrolni i tretirani dijelovi uzorka bi trebali biti razmaknuti nekoliko mikrona, što je u praksi teško

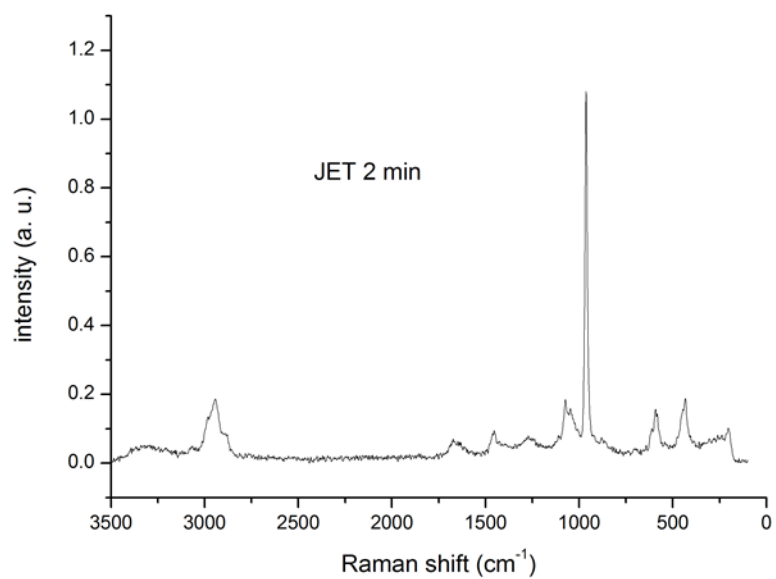
izvedivo, a u našem slučaju je zapravo potpuno neizvedivo, s obzirom da je rezolucija instrumenta jako gruba (cca 0.5 mm).

Tablica 2. Vrpce hidroksiapatita (HA)

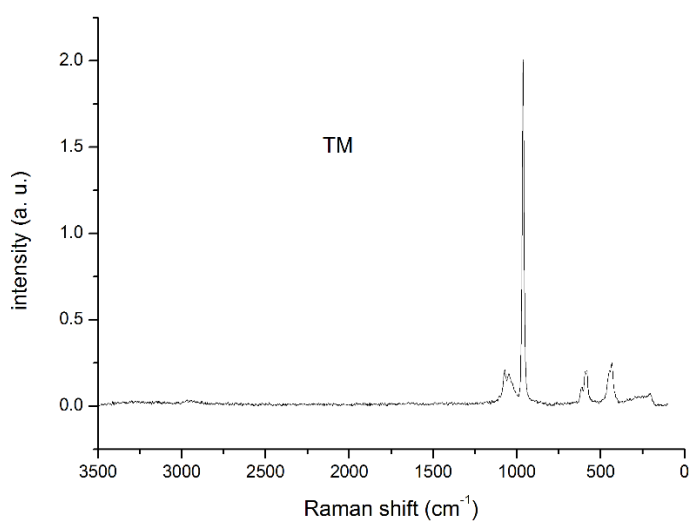
Wavenumber	Assignment and vibrational modes
1,070 $\text{cm}^{-1}$	$\text{CO}_3^{2-}$ (type B) symmetric stretching
1,045 $\text{cm}^{-1}$	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ , asymmetric stretching
961 $\text{cm}^{-1}$	$\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ , symmetric stretching
591 $\text{cm}^{-1}$	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ , asymmetric bending
431 $\text{cm}^{-1}$	$\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$ , symmetric bending



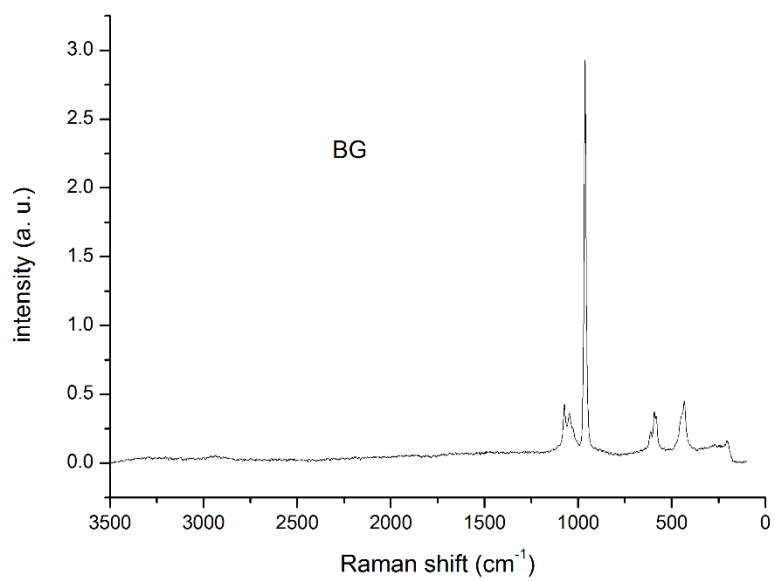
Slika 16. Ramanova spektroskopija intaktne cakline



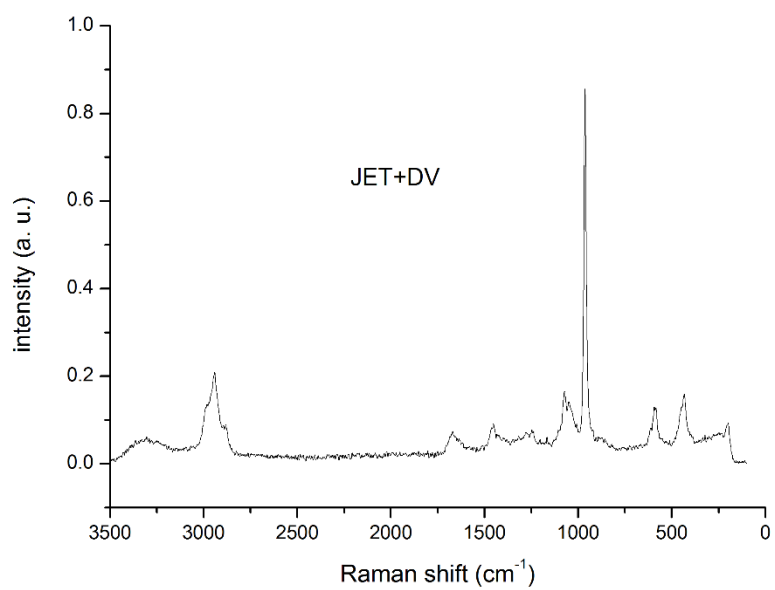
Slika 17. Ramanova spektroskopija cakline nakon tretmana jetkanjem kroz 2 minute



Slika 18. Ramanova spektroskopija cakline nakon jetkanja + TM



Slika 19. Ramanova spektroskopija cakline nakon jetkanja + BG



Slika 20. Ramanova spektroskopija cakline nakon jetkanja + DV

## **5. Rasprava**

Brojne tehnike mjerenja pokazale su se uspješnim za određivanje potencijalnoga remineralizacijskog učinka. Kvalitativno se ono može odrediti korištenjem SEM ili polarizacijskog mikroskopa (57). Mjerenjem površinske mikrotvrdoće možemo na jednostavan i brz način odrediti promjene koje nastaju kao posljedica gubitka minerala. Ova metoda zahtijeva ponovljena mjerenja, te usprkos nedostacima, pokazala se kao korisna tehnika za određivanje promjena koje nastaju kao posljedica demineralizacije i remineralizacije tvrdih zubnih tkiva (58).

Demineralizaciju tvrdih tkiva obilježava proces gubitka minerala iz hidroksiapatitnih kristala. Obzirom da je riječ o reverzibilnom procesu, djelomično demineralizirani kristali se mogu ponovno obnoviti do početne veličine i oblika ako su izloženi oralnoj sredini i uvjetima koji potiču remineralizaciju. Bioaktivno staklo 45S5 koristi se zbog svoje visoke biokompatibilnosti za koštanu remineralizaciju (59,60), a nedavna istraživanja pokazala su njegovu korist i prigodom remineralizacije demineraliziranih tvrdih zubnih tkiva (30,38,61). U provedenom istraživanju proučavan je potencijalni remineralizacijski učinak bioaktivna stakla na površini demineralizirane cakline. Kao kontrolni materijal odnosno sredstvo za remineralizaciju korišten je komercijalni preparat Tooth Mousse, na bazi CPP-ACP-a. Mjerenja mikrotvrdoće Vickersovom piramidom napravljena su neposredno prije, nakon jetkanja 37 % ortofosfornom kiselinom, te nakon tretmana cakline bioaktivnim staklom, Tooth Mousseom i destiliranom vodom kroz 14 dana. Caklina zuba smatra se najtvrdim mineraliziranim biološkim tkivom koje sadrži 96 % minerala, 3 % vode i 1 % organske tvari, a kako su mjerenja napravljena na uzorcima humane cakline, poliranjem je uklonjena površinska prizmatska caklina koja je hipermineralizirana i bogata flourapatitom i time otpornija na demineralizaciju (62).

Statistički značajan pad vrijednosti mikrotvrdoće na površini cakline zabilježen je nakon postupka jetkanja u odnosu na početna mjerenja ( $p < 0.001$ ) što je u skladu s prethodnim istraživanjima (63-66). Balakrishnan i sur. su promatrali remineralizacijski učinak različitih sredstava za demineralizaciju kroz 30 dana te su zabilježili da se remineralizacijski učinak povećava s dužinom trajanja postupka, kao i kontaktom između površine zuba i sredstva (67). Slično je zabilježeno i u studiji Soares i sur. gdje je najveća remineralizacija zabilježena nakon topikalne primjene CPP- ACP, zatim biostakla, a najmanja nakon korištenja

hidroksiapatitna gela obogaćena fluoridima (68). Topikalno korištenje fluorida se pokazalo učinkovitim metodom za remineralizaciju početnih karijesnih lezija. Za svaka dva fluoridna iona, potrebno je deset kalcijevih i šest fosfatnih iona kako bi se formirao jedan kristal hidroksiapatita. Kod topikalne primjene fluorida, može nedostajati određena količina kalcijevih i fosfatnih iona i stoga može izostati potencijalni remineralizacijski učinak. CPP-ACP je pokazao superiorna svojstva *in situ* što se tiče protukarijesne aktivnosti, povećavajući razinu kalcija i fosfata u supragingivnom plaku dovodeći do remineralizacije potpovršinskih karijesnih lezija (69). Sinergistički učinak CPP-ACP i fluorida u redukciji karijesa pripisuje se formaciji CPP stabiliziranog amorfnog kalcijevog fosfata, dovodeći pritom do povećanja razine fluora u plaku s povećanim razinama bioaktivnih kalcijevih i fosfatnih iona (70-72). Reynolds i sur. su dokazali da CPP-ACP uz dodatak fluora ima veći remineralizacijski potencijal od samog CPP-ACP (69).

Bioaktivno staklo je materijal koji se u zadnje vrijeme puno proučava posebno u području tkivnog inženjeringa, regeneracije kosti i remineralizacije zbog svoje velike sposobnosti u formiranju hidroksiapatita (73). Bioaktivno staklo 45S5 dodaje se u sastav zubnih pasti za smanjenje preosjetljivosti, kao i u sastav eksperimentalnih kompozita i stakleno ionomernih cemenata. Iako je dokazano da eksperimentalni materijali bazirani na BG imaju remineralizacijski učinak, samo nekoliko studija mjerilo je stvarni kvalitativni remineralizacijski učinak (74,75). Kad BG dođe u kontakt sa slinom ili nekim vodenim medijem, kalcij, natrij, fosfor i silikati se vežu za površinu cakline s namjerom da pokrenu remineralizacijski učinak. BG u reakciji sa slinom dovodi do otapanja kalcija, fosfata i silikata što dovodi do formacije sloja bogatog silikatima na koji se talože kalcij i fosfati dovodeći do formacije hidroksiapatita (71,74). Soares i sur. zabilježili su značajan porast mikrotvrdoće demineralizirane cakline nakon topikalne primjene bioaktivna stakla 45S5 kroz 30 dana (68) što odgovara mjerenjima dobivenim u ovom istraživanju, gdje se posebno pripremljena pasta BG i komercijalno dostupna pasta TM nanosila na površinu cakline tijekom dva tjedna, te je mijenjana svakodnevno. Nakon dvotjednog tretmana BG ili TM zabilježeno je statistički značajno povećanje mikrotvrdoće cakline ( $p < 0.001$  za oba tretmana), koje je u prosjeku bilo statistički značajno veće u odnosu na početna mjerenja na površini intaktne cakline za tretman BG ( $p < 0.001$ ), no to nije zabilježeno kod tretmana TM ( $p = 0.331$ ). Ova pojava može se pripisati odlaganju i formaciji sloja hidroksiapatita na površini cakline (68), a slično je zabilježeno i u studiji Preethee i sur. koji su izmjerili značajan porast u mikrotvrdoći nakon korištenja bioaktivna stakla na površini demineralizirane cakline (76). Yang i sur. su zabilježili

značajan porast površinske mikrotvrdoće kako se povećavala razina bioaktivna 45S5 stakla u sastavu smole kojom su tretirali demineralizirane lezije (77).

U suprotnome, dvotjedni tretman tj. držanje uzoraka u DV nije dovelo do povećanja u površinskoj mikrotvrdoći cakline nakon jetkanja ( $p=0.846$ ). Promatrane razlike u različitim tretmanima bile su statistički značajne ( $p=0.037$  za usporedbu učinka BG i TM i  $p<0.001$  za usporedbu učinka između ovih tretmana i učinka DV). Na temelju dobivenih rezultata, prva hipoteza da topikalna primjena bioaktivna stakla dovodi do porasta mikrotvrdoće demineralizirane cakline je stoga prihvaćena.

Kvalitativna analiza potencijalnoga remineralizacijskog učinka na površini cakline neposredno prije, nakon jetkanja i nakon tretmana BG, TM i DV napravljena je korištenjem SEM. Analiza je pokazala značajan porast površinske hrapavosti uz pojavu erodiranih caklinskih prizmi nakon postupka jetkanja 37 % ortofosfonom kiselinom tijekom 2 minute. Tretman BG pokazao je nepravilno nakupljanje čestica BG na površini cakline, dok je tretman TM doveo do formacije kristala na površini cakline. Slično je dokazano i u studiji Soares i sur. gdje su SEM snimke netretirane, intaktne cakline pokazale dobro i jasno organizirane caklinske prizme s homogenim kristalima i jasnim rubovima, pri čemu je demineralizirana caklina pokazala određenu disorganizaciju, s gubitkom strukturnih karakteristika specifičnih za njezinu građu, a tretman bioaktivnim staklom doveo je do formiranja raspršenih amorfnih kristala na površini cakline te linija remineralizacije uz rub caklinskih prizmi (69). Yang i sur. su zabilježili očuvanje strukture cakline prigodom topikalnog korištenja smole koja je u svojem sastavu imala bioaktivno staklo 45S5 (78), dok su Rastelli i sur. zabilježili odlaganje staklenih čestica na površini cakline prigodom korištenja bioaktivne staklo-keramike (79). Deng i sur (80). su zabilježili karakteristično odlaganje nakupina čestica bioaktivna stakla, u nepravilnim formacijama na površini cakline, što je potvrđeno i u našem istraživanju.

Kvalitativna analiza razine određenih građivnih elemenata u sastavu cakline neposredno prije, nakon jetkanja i nakon tretmana BG, TM i DV promatrana je korištenjem EDS analize. Gjorgievska i sur. (81) su dokazali da korištenje bioaktivna stakla NovaMin nakon izbjeljivanja zuba, dovodi do formacije zaštitnog sloja na površini cakline, koji se sastoji od depozita bioaktivna stakla, a također je zabilježen i porast razine kalcija i fosfata što je potvrđeno i našim istraživanjem u kojemu je EDS analiza pokazala povećanje u koncentraciji kalcija, fosfata, natrija i silikata nakon tretmana BG.



Temeljem rezultata SEM i EDS analize, možemo zaključiti da topikalna primjena bioaktivna stakla dovodi do formiranja kristala i odlaganja čestica biostakla na površini cakline što dovodi do potencijalnog remineralizacijskog učinka čime je i druga hipoteza prihvaćena. Primjena bioaktivna stakla na površini cakline dovodi do odlaganja slobodnih kalcijevih i fosfatnih iona i nedisociranog bioaktivna stakla što dovodi do formacije zaštitnog kalcij-fosfatnoga bogatog sloja na površini cakline, što ide u prilog remineralizacijskom učinku ovog preprata, a BG 45S5 kao anorganski materijal otpušta u kontaktu s vodenim medijem ione poput  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , and  $\text{PO}^{3-}$  čime pridonosi odlaganju i formaciji kristala apatita (82). Rastelli i sur. također su zabilježili porast razine iona kalcija i fosfora nakon korištenja bioaktivne staklo-keramike na površini cakline (79).

U ovome istraživanju provedeno je i mjerenje Ramanovom spektroskopijom uzoraka cakline neposredno prije, nakon jetkanja i nakon tretmana bioaktivnim staklom i Tooth Mousseom, no ova metoda nije se pokazala učinkovitom za analizu promjena u sastavu cakline. U dobivenim rezultatima, vidljive su samo vrpce koje pripadaju hidroksiapatitu (HA), pri čemu se 4 od 5 odnosi na različite vibracije fosfatne skupine, a to nije dovoljno za jasno tumačenje potrebnih kvalitativnih i kvantitativnih promjena u sastavu cakline. Zbog same pripreme uzorka, u ovom slučaju sitnih, nepravilnih izbrusaka humane cakline, bilo je nemoguće izravno uspoređivati dobivene intenzitete vrpce. Za to je potreban mikroraman, a kontrolni i tretirani dijelovi uzorka bi trebali biti razmaknuti nekoliko mikrona, što je u praksi vrlo teško izvedivo.

Na kraju, potrebno je napomenuti da je u ovome istraživanju bila riječ o *in vitro* studiji te da se remineralizacija ovakva tipa, pod kontroliranim uvjetima, značajno razlikuje od potencijalne remineralizacije u usnoj šupljini, te je za donošenje bilo kakvih zaključaka o eventualnoj klinički značajnoj remineralizaciji potrebno provesti niz daljnjih istraživanja, pri čemu rezultati ove studije mogu poslužiti kao smjernice za naredna istraživanja.

## **6. Zaključci**

U okviru ovog in vitro istraživanja moguće je zaključiti sljedeće:

1. Topikalna primjena bioaktivna stakla 45S5 i Tooth Moussea dovela je do značajnog povećanja mikrotvrdoće nakon postupka demineralizacije.
2. Topikalna primjena bioaktivna stakla 45S5 dovela je do većeg porasta mikrotvrdoće u odnosu na tretman Tooth Mousse-om.
3. Topikalna primjena bioaktivna stakla 45S5 dovela je do nepravilnog nakupljanja čestica stakla na površini cakline, dok je tretman Tooth Mousseom doveo do formacije kristala na površini cakline, rezultirajući time potencijalni remineralizacijski učinak.

## **7. Zahvale**

Zahvaljujem svojoj cijenjenoj mentorici doc. dr. sc. Evi Klarić Sever, dr. med. dent. na prenesenu znanju, strpljenju i optimizmu kojima me je vodila kroz cijelo istraživanje. Posebno sam joj zahvalan na povjerenju i izdvojenom vremenu bez kojih ovaj rad ne bi bio izvediv.

Zahvaljujem i Ivanu Severu na trudu i pomoći pri statističkoj obradi podataka za ovo istraživanje.

Zahvaljujem Marijanu Marciušu, s Instituta Ruđer Bošković, za pomoć pri snimanju uzoraka na SEM-u i EDS analizi.

## **8. Popis literature**

1. Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999;27:31–40.
2. Featherstone JDB. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 2000;131:887–899.
3. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc.* 1989;119:298–304.
4. Mandel IH. Relation of saliva and plaque to caries. *J Dent Res.* 1974;53:246–266.
5. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994;8:263–271.
6. ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralisation and remineralisation of artificial enamel lesions. *Caries Res.* 1982;16:201–210.
7. ten Cate JM, Featherstone JDB. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2:283–296.
8. Berkowitz RJ. Acquisition and transmission of mutans streptococci. *J Calif Dent Assoc.* 2003;31:135–138.
9. Berkowitz RJ, Jordan HV. Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. *Arch Oral Biol.* 1975;20:725–730.
10. Berkowitz RJ, Jordan HV, White G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. *Arch Oral Biol.* 1975;20:171–174.
11. Caufield PW, Childers NK, Allen DN, Hansen JB. Distinct bacteriocin groups correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. *Infect Immun* 1985;48:51–56.
12. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50:353–380.
13. Krasse B. Biological factors as indicators of future caries. *Int Dent J.* 1988;38:219–225.
14. Featherstone JDB, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res.* 1981;15:109–114.
15. Featherstone JDB, Rodgers BE. The effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res.* 1981;15:377–385.
16. Featherstone JDB, Duncan JF, Cutress TW. Crystallographic changes in human enamel during artificial caries formation. *Arch Oral Biol.* 1978;23:405–413.

17. Featherstone JDB, Goodman P, MacLean JD. Electron microscope study of defect zones in dental enamel. *J Ultrastruc Res.* 1979;67:117–123.
18. Featherstone JDB, Nelson DGA, McLean JD. An electron microscope study of modifications to defect regions in dental enamel and synthetic apatites. *Caries Res.* 1981;15:278–288.
19. Featherstone JD. The caries balance: the basis for caries management by risk assessment. *Oral Health Prev Dent.* 2004;2 Suppl 1:259-64.
20. Featherstone JDB, Glena R, Shariati M, Shields CP. Dependence of in vitro demineralization and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res.* 1990;69:620– 625.
21. Lamkin MS, Oppenheim FG. Structural features of salivary function. *Crit Rev Oral Biol. Med* 1993;4:251–259.
22. Arends J, ten Bosch JJ. In vivo de- and remineralization of dental enamel. In: Leach SA, ed. *Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth.* Oxford: IRL Press, 1985:1–11.
23. Featherstone JDB, Zero DT. An in situ model for the simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. *J Dent Res.* 1992;71:804–810.
24. Featherstone JDB, Zero DT. Laboratory and human studies to elucidate the mechanism of action of fluoride-containing dentifrices. In: Emberry G, Rolla R, eds. *Clinical and biological aspects of dentifrices.* Oxford: Oxford University Press, 1992:41–50.
25. Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res.* 1995;9:214–230.
26. Featherstone JDB, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralization in vitro and in vivo. In: Leach SA, ed. *Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth.* Oxford: IRL Press, 1986.
27. Gorton J, Featherstone JDB. In vivo inhibition of demineralization around orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2003;123:10–14.
28. O'Reilly MM, Featherstone JDB. De- and remineralization around orthodontic appliances: an in vivo study. *Am J Orthod.* 1987;92:33–40.
29. ten Cate JM, Exterkate RAM, Rempt HEb. Intra-oral retention of fluoride by bovine enamel from amine fluoride toothpaste and 0.4% amine fluoride liquid application. *J Dent Res.* 1988;67:491– 495.
30. Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 2013;9(1):4457-4486.

31. Rahaman MN, Day DE, Bal BS, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, et al. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011;7(6):2355-2373.
32. Chatzistavrou X, Esteve D, Hatzistavrou E, Kontonasaki E, Paraskevopoulos KM, Boccaccini AR. Sol-gel based fabrication of novel glass-ceramics and composites for dental applications. *Mater Sci Eng.* 2010;30(5):730-739.
33. Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 2013;9(1):4457-4486.
34. Melo MA, Weir MD, Rodrigues LK, Xu HH. Novel calcium phosphate nanocomposite with caries-inhibition in a human in situ model. *Dent Mater.* 2013;29(2):231-240.
35. Khvostenko D, Hilton TJ, Ferracane JL, Mitchell JC, Kruzic JJ. Bioactive glass fillers reduce bacterial penetration into marginal gaps for composite restorations. *Dent Mater.* 2016;32(1):73-81.
36. Gillam DG, Tang JY, Mordan NJ, Newman HN. The effects of a novel Bioglass dentifrice on dentine sensitivity: a scanning electron microscopy investigation. *J Oral Rehabil.* 2002;29(4):305-313.
37. Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, et al. Strong nanocomposites with Ca, PO<sub>4</sub>, and F release for caries inhibition. *J Dent Res.* 2010;89(1):19-28.
38. Wang Z, Jiang T, Sauro S, Wang Y, Thompson I, Watson TF. Dentine remineralization induced by two bioactive glasses developed for air abrasion purposes. *J Dent.* 2011;39(11):746-56.
39. Davis HB, Gwinner F, Mitchell JC, Ferracane JL. Ion release from, and fluoride recharge of a composite with a fluoride-containing bioactive glass. *Dent Mater.* 2014;30(10):1187-1194.
40. Khvostenko D, Hilton TJ, Ferracane JL, Mitchell JC, Kruzic JJ. Bioactive glass fillers reduce bacterial penetration into marginal gaps for composite restorations. *Dent Mater.* 2016;32(1):73-81.
41. Weir MD, Chow LC, Xu HH. Remineralization of demineralized enamel via calcium phosphate nanocomposite. *J Dent Res.* 2012;91(10):979-984.
42. Li F, Wang P, Weir MD, Fouad AF, Xu HH. Evaluation of antibacterial and remineralizing nanocomposite and adhesive in rat tooth cavity model. *Acta Biomater.* 2014;10(6):2804-2813.
43. Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials.* 2001;22(12):1683-1687.

44. Shen P, Cai F, Nowicki A, Vincent J, Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 2001;80(12):2066-2070.
45. Al-Batayneh. The clinical applications of Tooth Mousse and other CPP-ACP products in caries prevention: Evidence-based recommendations. *Smile Dent J.* 2009;4(1):8-12.
46. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res.* 2003;82(3):206-211.
47. Walsh LJ. Contemporary technologies for remineralization therapies: A review. *International dentistry South Africa.* 2009;11(6):6-15.
48. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res.* 1997;76(9):1587-1595.
49. Boskey AL. Amorphous calcium phosphate: the contention of bone. *J Dent Res.* 1997;76:1433–1436.
50. Eanes ED, Gilless49999. en IH, Posner AS. Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite. *Nature.* 1965;208:365–367.
51. Reynolds EC. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Spec Care Dentist.* 1998;18:8–16.
52. Rose RK. Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Arch Oral Biol.* 2000;45:569–575.
53. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res.* 1997;76:1587–1595.
54. Scanning electron microscope. Wikipedia [Internet]. 2018 Apr 17 [cited 2018 Apr 19]. [about 3 p.]. Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning\\_electron\\_microscope](http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope)
55. Energy-dispersive X-ray spectroscopySpectroscopy. Wikipedia [Internet]. 2018 Apr 19 [cited 2018 Apr 19]. [about 1 p.]. Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Energy-dispersive\\_X-ray\\_spectroscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Energy-dispersive_X-ray_spectroscopy)
56. Raman spectroscopy. Wikipedia [Internet]. 2018 Apr 20 [cited 2018 Apr 21]. [about 2 p.]. Available from: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Spektroskopija>
57. Buzalaf M, Hannas A, Magalhães A, Rios D, Honório H, Delbem A. pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci.* 2010;18:316-34.

58. Mehta AB, Kumari V, Jose R, Izadikhah V. Remineralization potential of bioactive glass and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on initial carious lesion: An in vitro pH-cycling study. *J Conserv Dent.* 2014;17:03-07.
59. Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res.* 1973;7(3)25–42.
60. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res.* 1971;5(6):117–141.
61. Vollenweider M, Brunner TJ, Knecht S, Grass RN, Zehnder M, Imfeld T, Stark WJ. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomater.* 2007;3(6):936–943.
62. Kanemura N, Sano H, Tagami J. Tensile bond strength to and SEM evaluation of ground and intact enamel surfaces. *J Dent.* 1999; 27(7): 523–530.
63. Jayarajan J, Janardhanam P, Jayakumar P, Deepika. Efficacy of CPP-ACP and CPP-ACPF on enamel remineralization- An in vitro study using scanning electron and diagnodent. *Indian J Dent Res.* 2011;22:77-82
64. Zhang Q, Zou J, Yang Ran, Zhou X. Remineralization effects of casein phosphopeptide-amorphous on artificial early enamel lesions of primary teeth. *Int J Paediatr Dent.* 2011;21:374-81.
65. Lata S, Varghese NO, Varughese JM. Remineralisation potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phospho peptide on enamel lesions: An in vitro comparative evaluation. *J Conserv Dent.* 2010;13:42-46.
66. Shetty S, Hegde M, Bopanna T. Enamel remineralization assessment after treatment with three different remineralizing agents using surface microhardness: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2014;17:49-52.
67. Balakrishnan A, Jonathan R, Kumar A. Evaluation to determine the caries remineralization potential of three dentifrices: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2013;16:375-79.
68. Soares R, De Ataide IN, Fernandes M, Lambor R. Assessment of Enamel Remineralisation After Treatment with Four Different Remineralising Agents: A Scanning Electron Microscopy (SEM) Study. *J Clin Diagn Res.* 2017 Apr;11(4):ZC136-ZC141.
69. Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, Reynolds C. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 2008;87:344-48.



70. Vanichvatana S, Auychai P. Efficacy of two calcium phosphate pastes on the remineralization of artificial caries: a randomized controlled double-blind in situ study. *Int J Oral Sci.* 2013;5:224-58.
71. Hamba H, Nikaido T, Inoue G, Sadr A, Tagami J. Effects of CPP-ACP with sodium fluoride on inhibition of bovine enamel demineralization: A quantitative assessment using micro-computed tomography. *J Dent.* 2011;39:405-13.
72. Somani R, Jaidka S, Jawa D, Arora V. Remineralizing potential of various agents on dental erosion. *J Oral Biol Craniofacial Res.* 2014;4(2):104-08.
73. Narayana SS, Deepa VK, Ahamed S, Sathish ES, Meyappan R, Kumar KS. Remineralization efficiency of bioactive glass on artificially induced carious lesion an in-vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2014;32:19-25.
74. Jayarajan J, Janardhanam P, Jayakumar P, Deepika. Efficacy of CPP-ACP and CPP-ACPF on enamel remineralization- An in vitro study using scanning electron microscope and diagenodent. *Indian J Dent Res.* 2011;22:77-82.
75. Prabhakar AR, Jibi Paul M, Basappa N. Comparative evaluation of the remineralising effects and surface microhardness of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4): an in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2010;3:69-77.
76. Preethee T, Kandaswamy D, Rosaline H, Arathi G. The effect of casein phosphopeptide - amorphous calcium phosphate fluoride (cpp-acpf) and calcium sodium phosphosilicate (bioactive glass) on hardness of eroded enamel surface - an in vitro. *Amrita J Me.* 2011;7:28-32.
77. Yang SY, Kwon JS, Kim KN, Kim KM. Enamel Surface with Pit and Fissure Sealant Containing 45S5 Bioactive Glass. *J Dent Res.* 2016;95(5):550-7.
78. Rastelli A, Nicolodelli G, Romano R, Milori D, Perazzoli I, Ferreira A, et al. After bleaching enamel remineralization using a bioactive glass-ceramic (BioSilicate). *Biomed. Glasses* 2016; 2:1–9.
79. Deng M, Wen HL, Dong XL, Li F, Xu X, Li H, et al. Effects of 45S5 bioglass on surface properties of dental enamel subjected to 35% hydrogen peroxide. *Int J Oral Sci.* 2013 ; 5(2):103-10.
80. Gjorgievska E, Nicholson JW. Prevention of enamel demineralization after tooth bleaching by bioactive glass incorporated into toothpaste. *Aust Dent J.* 201;56(2):193-200.
81. Burwell AK, Litkowski LJ, Greenspan DC. Calcium sodium phosphosilicate (NovaMin): remineralization potential. *Adv Dent Res.* 2009;21(1):35–39.

## **9. Sažetak**

### **Remineralizirajući učinak bioaktivna stakla 45S5 na površinu cakline**

Bruno Štimac

Svrha rada: Demineralizaciju tvrdih tkiva obilježava proces gubitka minerala iz hidroksiapatitnih kristala. Obzirom da je riječ o reverzibilnom procesu, djelomično demineralizirani kristali se mogu ponovno obnoviti do početne veličine i oblika ako su izloženi oralnoj sredini i uvjetima koji potiču remineralizaciju. Svrha ovoga *in vitro* istraživanja bila je dokazati potencijalni remineralizacijski učinak bioaktivna stakla 45S5 i Tooth Moussea na površini cakline nakon demineralizacije.

Materijali i metode: Trideset caklinskih blokova (n=10) je pripremljeno i nasumično podijeljeno u tri grupe: jetkana caklina tretirana bioaktivnim staklom 45S5, jetkana caklina tretirana Tooth Mousseom, jetkana caklina tretirana deioniziranom vodom. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), spektroskopija karakterističnog X-zračenja (EDS), Vickersova mikrotvrdoća i Raman spektroskopija su napravljeni prije i nakon jetkanja od 2 minute sa 37 % ortofosfornom kiselinom, te nakon različitih tretmana. Model analize varijance s ponovljenim mjerenjima (ANOVA) je korišten za statističku obradu rezultata.

Rezultati: Statistički značajan pad vrijednosti mikrotvrdoće zabilježen je nakon postupka jetkanja ( $p < 0.001$ ). Nakon dvotjednog tretmana bioaktivnim staklom ili Tooth Mousseom zabilježeno je statistički značajno povećanje mikrotvrdoće cakline ( $p < 0.001$  za oba tretmana), koje je u prosjeku bilo statistički značajno veće u odnosu na početna mjerenja na površini intaktne cakline za tretman bioaktivnim staklom ( $p < 0.001$ ), no to nije zabilježeno kod tretmana Tooth Mousseom ( $p = 0.331$ ). U suprotnome, dvotjedni tretman tj. držanje uzoraka u destiliranoj vodi nije dovelo do povećanja u površinskoj mikrotvrdoći cakline nakon jetkanja ( $p = 0.846$ ). Promatrane razlike u različitim tretmanima bile su statistički značajne ( $p = 0.037$  za usporedbu učinka bioaktivna stakla i Tooth Moussea i  $p < 0.001$  za usporedbu učinka između ovih tretmana i učinka destilirane vode). Nakon jetkanja, SEM analiza pokazala je značajan porast u površinskoj hrapavosti uz pojavu erodiranih caklinskih prizmi. Tretman bioaktivnim staklom pokazao je nepravilno nakupljanje čestica stakla na površini cakline, dok je tretman Tooth Mousseom doveo do formacije kristala na površini cakline. EDS analiza pokazala je povećanje u koncentraciji kalcija, fosfata, natrija i silikata nakon tretmana bioaktivnim

staklom. Ramanova spektroskopija nije se pokazala učinkovitom metodom za analizu promjena nakon jetkanja i različitih tretmana.

Zaključak: Dvotjedni tretman bioaktivnim staklom i Tooth Mousseom nakon demineralizacije doveo je do povećanja u mikrotvrdoći cakline, uz odlaganje čestica stakla i minerala na površini, rezultirajući time potencijalni remineralizacijski učinak.

Ključne riječi: bioaktivno staklo, remineralizacija, mikrotvrdoća

## **10. Summary**

### **Remineralizing effect of bioactive glass 45S5 on enamel surface**

Bruno Štimac

**Purpose:** Demineralization is the process of removing minerals from hydroxyapatite crystals of dental hard tissues. Due to its reversibility, partially demineralized crystals in teeth can grow to their original size if exposed to oral environments that favor remineralization. The purpose of this in vitro study was to evaluate the potential remineralizing effect of bioactive glass 45S5 and Tooth Mousse on the enamel surface after demineralization.

**Materials and Methods:** Thirty enamel blocks (n=10) were prepared and randomly divided into three groups: etched enamel treated with bioactive glass, etched enamel treated with Tooth Mousse, etched enamel treated with deionized water. Scanning electron microscopy (SEM) imaging, energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS) and Vickers microhardness tests were performed before and after etching for 2 minutes with 37 % orthophosphoric acid, as well as after different treatment procedures. A repeated measures analysis of variance (ANOVA) model were used for statistical analysis.

**Results:** A statistically significant drop in the enamel microhardness values was observed after etching ( $p < 0.001$ ). Following a two-week treatment in either bioactive glass or Tooth Mousse, significantly higher microhardness values were recorded ( $p < 0.001$  for both treatments), which were on average significantly higher than baseline microhardness measurements for the bioactive glass treatment ( $p < 0.001$ ), but not for the Tooth Mousse treatment ( $p = 0.331$ ). Two-week immersion in deionized water had no effect on enamel microhardness after etching ( $p = 0.846$ ). Differences in treatment effects were statistically significant ( $p = 0.037$  for comparison of the effects of bioactive glass and Tooth Mousse treatments and  $p < 0.001$  for comparisons of the effects of these treatments with the effect of deionized water). After etching, SEM analysis showed increased surface roughness with eroded prisms. Bioactive glass treatment showed disorderly packed glass particles, while Tooth Mousse treatment led to crystal formation of enamel surface. EDS analysis showed an increase in calcium, phosphate, sodium and silicat concentrations after bioactive glass treatment. Raman spectroscopy was not an effective method for measuring changes after etching and after different treatments on enamel surface.

Conclusion: Two-week treatment with bioactive glass and Tooth Mousse after demineralization can lead to increase of enamel microhardness with accumulation of glass particles and crystal formation reflecting a possible remineralizing effect.

Key words: bioactive glass, remineralization, microhardness