

Površinske promjene cakline i dentina nakon korištenja dva sredstva za vitalno izbjeljivanje zubi

Klarić, Eva

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:299390>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Eva Klarić

**POVRŠINSKE PROMJENE CAKLINE I
DENTINA NAKON KORIŠTENJA DVA
SREDSTVA ZA VITALNO IZBJELJIVANJE
ZUBI**

Poslijediplomski specijalistički rad

Zagreb, listopad 2015.

Rad je izrađen na Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Mentor rada: prof. dr. sc. Zrinka Tarle

 Zavod za endodonciju i restaurativnu stomatologiju,
 Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

 Gundulićeva 5.

 10 000 Zagreb

Lektor hrvatskoga jezika: Kristina Dilica, profesorica hrvatskoga jezika

 Augusta Piazzze 5.

 10 000 Zagreb

Lektor engleskog jezika: Dijana Posedi, magistra engleskoga jezika

 Jarunska 8.

 10 000 Zagreb

Rad sadrži: 84 stranice

 13 slika

 3 tablice

 1 CD

ZAHVALA

Zahvaljujem voditeljici rada prof.dr.sc. Zrinki Tarle na mentorstvu i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada.

Hvala inženjeru Marijanu Marciušu i dr.sc. Miri Ristić s Instituta Ruđer Bošković na suradnji u eksperimentalnom dijelu studije.

Istraživanje je obavljeno u sklopu programa Hrvatske zaklade za znanost "Prosudba novih bioaktivnih materijala i postupaka u restaurativnoj dentalnoj medicini".

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. UZROCI NASTANKA DISKOLORACIJA ZUBI	2
1.1.1. Egzogena (ekstrinzična) obojenja zuba	2
1.1.2. Endogena (intrinzična) obojenja zuba	4
1.2. AKTIVNI SASTOJCI (SREDSTVA) ZA IZBJELJIVANJE ZUBI	7
1.2.1. Vodikov peroksid.....	7
1.2.2. Karbamid peroksid	9
1.2.3. Natrij perborat	10
1.3. MEHANIZAM IZBJELJIVANJA ZUBI	11
1.4. VRSTE IZBJELJIVANJA ZUBI.....	13
1.4.1. Izbjeljivanje vitalnih zubi.....	13
1.4.2. Izbjeljivanje avitalnih zubi.....	15
1.5. NUSPOJAVE IZBJELJIVANJA ZUBI	17
1.5.1. Postoperativna preosjetljivost	17
1.5.2. Strukturne, površinske i kemijske promjene tvrdih zubnih tkiva	19
1.6. REMINERALIZACIJA TVRDIH ZUBNIH TKIVA.....	23
1.6.1 Amorfni kalcijev fosfat	25
2. SVRHA RADA.....	27
2.1. RADNE HIPOTEZE	28
3. MATERIJALI I POSTUPCI	29
3.1. SREDSTVA ZA IZBJELJIVANJE I REMINERALIZACIJU.....	30
3.2. UMJETNA SLINA.....	31
3.3. UZORCI	33
3.3.1. Uzorci za mjerenje mikrotvrdoće	33
3.3.2. Uzorci za mjerenje mikromorfologije	35
3.4. POSTUPCI.....	38
3.4.1. Mjerenje mikrotvrdoće.....	38

3.4.2. Promjene u mikromorfologiji cakline i dentina	40
3.4.3. Mjerenje pH gelova za izbjeljivanje i umjetne sline	41
3.5. STATISTIČKE METODE.....	42
4. REZULTATI	44
4.1. MIKROTVRDOĆA.....	45
4.2. SEM ANALIZA	48
5. RASPRAVA	56
5.1. MIKROTVRDOĆA.....	57
5.2. SEM ANALIZA	62
6. ZAKLJUČCI	65
7. SAŽETAK.....	66
8. SUMMARY.....	70
9. LITERATURA.....	73
10. ŽIVOTOPIS.....	83

KAZALO POJMOVA I SKRAĆENICA

Kratica	Značenje
ACP	amorfni kalcijev fosfat
ACP CPP	amorfni kalcijev fosfat - kazein fosfopeptid
CP	karbamid peroksid
CO ₂	ugljik dioksid
HA	hidroksilapatit
HP	vodikov peroksid
HV	Vickersova mikrotvrdoća
SEM	skenirajući elektronski mikroskop

1. UVOD

1.1. UZROCI NASTANKA DISKOLORACIJA ZUBI

Prirodna boja zuba određena je relativnom debljinom dentina i cakline te stupnjem njihove translucencije i mineraliziranosti. Boju zuba određuje i kombinacija prirodnih fenomena povezanih s optičkim svojstvima samog zuba i svjetlosti (1). Glavninu boje određuje debljina i boja dentina (2) kao i prisutnost intrinzičnih i ekstrinzičnih obojenja (3). Unutrašnju boju zuba određuju optička svojstva cakline i dentina i njihova interakcija sa svjetlom (2). Vanjska boja zuba ovisi o apsorpciji kromogena na površinu cakline (4). Svaka promjena u caklini, dentinu ili pulpi zuba može uzrokovati promjenu optičkih svojstava zuba, ponajprije transmisiju svjetlosti (5). Diskoloracija zuba tako ovisi o etiologiji, pojavnosti, lokaciji, ozbiljnosti i afinitetu samog kromogena u odnosu na tvrde zubne strukture (6) i kao takvu diskoloraciju zuba možemo podijeliti na intrinzičnu (endogenu) i ekstrinzičnu (egzogenu) ili kombinaciju ranije navedenih, ovisno o njihovoj lokaciji i etiologiji (7).

1.1.1. Egzogena (ekstrinzična) obojenja zuba

Egzogene diskoloracije su površinske i nastaju zbog odlaganja kromogena iz hrane na površinu cakline ili unutar sloja pelikule, a osim tog direktnog djelovanja kromogena do promjene boje može doći i zbog naknadne

kemijske reakcije na površini zuba. Takve tvari nazivamo prekromogenima (npr. tekućine za ispiranje usta koje sadrže bakrene soli, kationski antiseptici kao što je klorheksidin) (1). Vanjska obojenja nalaze se na površini zuba i mogu se ukloniti čišćenjem zubnim pastama, profesionalnim čišćenjem abrazivnim pastama i pjeskarenjem (Tablica 1). Sklonost kromogena prema zubnoj površini određena je prisustvom elektrostatskih i Van der Waalsovih sila kao i hidrofobnih interakcija, privlačnosti između dipola i vodikovih veza (8). Ove sile privlačnosti omogućavaju kromogenima da se približe zubnoj površini i ovisno o tome zadrže na njoj. Sklonost adheziji kromogena na površinu ovisi o materijalu, ali i o mehanizmu koji određuje snagu same adhezije, no to do danas nije u potpunosti razjašnjeno. Nathoo (9) je klasificirao vanjska (ekstrinzična) obojenja:

- 1. Nathoo tip [N1]** – kromogen (obojena tvar) veže se na površinu zuba i uzrokuje obojenje slično boji kromogena. Caklina ima negativan površinski naboj što rezultira vezanjem pozitivnih iona te se zbog toga na nju adsorbiraju proteini sline preko pozitivnih kalcijevih iona. Tako nastaje Sternov ili hidratacijski sloj na površini cakline u koji se ugrađuju kromogeni iz hrane i pića.
- 2. Nathoo tip [N2]** – pošto se vezao na površinu zuba kromogen mijenja boju. Do toga dolazi zbog daljnje akumulacije ili kemijske modifikacije proteina pelikule. Teže se odstranjuju od N1 tipa.
- 3. Nathoo tip [N3]** – bezbojne tvari (prekromogeni) vežu se na caklinu, a zatim podliježu Maillardovoj reakciji ili neenzimatskoj reakciji tamnjenja čime nastaju kromogeni.

Izvori potencijalnih kromogena jesu: kava, čaj, crno vino, cola-pića, tamni voćni sokovi (cikla, borovnica, višnja) i cigarete. Također, u egzogene diskoloracije ubrajamo i one nastale zbog zubnog karijesa, starih ispuna, mekih i tvrdih naslaga na zubu (zubni plak i kamenac) te traume zuba (posttraumatska hemoragija pulpe i hipoplazija cakline zbog traume zubnog zametka). Postoje i takozvana internalizirana obojenja koja su posljedica prodora kromogena u dentin kroz razvojne ili stečene defekte u caklini (1,3). Klinički je dokazano da s godinama obojenja kromogenima poput čaja i kave postaju teža za uklanjanje s površine zuba (9).

Nekada su se egzogena obojenja zuba klasificirala kao metalna i nemetalna obojenja zuba no takva podjela nailazila je na više problema. Prvo, ona ne objašnjava sam mehanizam obojenja; drugo, granica obojenja je nepostojana i ovisi o brojnim faktorima; treće, svi metali ne uzrokuju vanjsko obojenje zuba (10).

1.1.2. Endogena (intrinzična) obojenja zuba

Endogena obojenja zuba nastaju kao posljedica odlaganja kromogena unutar cakline i dentina, a prema vremenu djelovanja mogu se podijeliti na preeruptivne diskoloracije (nastaju prije nicanja zubi tj. tijekom morfogeneze) i posteruptivne diskoloracije (nastaju nakon nicanja zubi) (11,9). Preruptivna obojenja nastaju kao rezultat povećane koncentracije fluorida tijekom

amelogeneze što dovodi do inhibicije funkcije ameloblasta, a čiji rezultat je hipomineralizacija. Također se pojavljuju kao rezultat promjena u strukturi i debljini cakline i dentina (7), a mogu biti uzrokovane primjenom lijekova kao što su tetraciklini, zbog njihove interakcije s kristalima hidroksilapatita za vrijeme mineralizacije. Nakon svjetlom uzrokovane oksidacije nastaje crveni kinon (4-a,12-aAnhydro-4-oxo-4-dimethyl-amino-tetraciklin). Intenzitet obojenja ovisi o količini i trajanju terapije tetraciklinima. Vrsta boje je uzrokovana odgovarajućim derivatom tetraciklina, pa je tako žuta boja posljedica *Ledermycina*, *Terramycina* ili *Achromycina*, a *Aureomycin* uzrokuje smeđa obojenja. Preeruptivna obojenja nastaju i kao posljedica mliječnih zubi s periapikalnim parodontitisima ili kao posljedica traume trajnog zametka od strane mliječnog zuba, tzv. Turnerov zub (Bailey i sur, 1968;. Schmid, 1998), genetskih poremećaja kao što su *amelogenesis* i *dentinogenesis imperfecta*, sistemnim bolestima u kojima dolazi do inkorporacije pigmenata u strukturu zuba kao što su fetalna eritroblastozna i talasemija (smeđa diskoloracija), žutica (plavo – zelena diskoloracija), kongenitalna porfirija (ljubičasto – smeđa diskoloracija), te starenjem zbog odlaganja sekundarnog i tercijarnog dentina, kao i pulpnih kamenaca (11).

Traumatski događaj za vrijeme rasta i razvoja zuba može biti uzrok preeruptivne diskoloracije (6). Bakterijski, mehanički ili kemijski podražaj na stanice zubne pulpe mogu uzrokovati pojavu nekroze, uzrokujući otpuštanje štetnih produkata koji mogu penetrirati u dentinske tubuluse i na taj način uzrokovati diskoloracije. Ekstirpacija pulpe ili trauma zuba mogu uzrokovati

hemoragiju u području pulpne komore. Krvni produkti ulaze u dentinske tubuluse i uzrokuju diskoloraciju dentina (12). Hemoliza crvenih krvnih stanica slijedi otpuštanjem molekule hemoglobina koji u kontaktu s preostalim pulpnim tkivom stvara molekule željeza. Željezo se zatim u kontaktu s vodikovim sulfatom, koji je produkt bakterija ili proteina iz dentina, pretvara u tamno obojen željezni sulfat koji boji zub sivo. Unutarnje obojenje nastaje i kao posljedica obliteracije peritubularnog dentina i sve većeg odlaganja sekundarnog dentina kao fiziološke posljedice starenja.

Nepotpuno uklanjanje materijala za punjenje korijenskih kanala (13) ili intrakanalnih medikamenata na bazi tetraciklina, kao i materijali za ispune poput amalgama mogu uzrokovati obojenje zuba. Ovi materijali moraju biti u kontaktu s dentinskim tubulusima određeno vrijeme kako bi nastupila diskoloracija, pa iako ne prodiru u caklinu, promjena boje zuba je vidljiva. Mikropropusnost kompozitnog ispuna može uzrokovati tamnu diskoloraciju na rubovima samog ispuna, a stari amalgamski ispuni mogu, otpuštanjem metalnih iona također dovesti do obojenja. Obojenje mogu uzrokovati i metalni intrakanalni kolčići zbog otpuštanja metalnih iona, ali i zbog samog prosijavanja kolčića kroz caklinu. Resorpcija korijena zuba, iako klinički asimptomatska, s vremenom postaje vidljiva kao ružičasto obojenje krune zuba tzv. *pink spot*. Endogeno obojenje zuba može uključivanje kromogene iz čaja, kave ili vina (14).

1.2. AKTIVNI SASTOJCI (SREDSTVA) ZA IZBJELJIVANJE ZUBI

Aktivne sastojke svakog sredstva za izbjeljivanje čine spojevi s peroksidnom skupinom (-O-O-) tako zvani peroksidi. Najčešće korišteni peroksid za izbjeljivanje zubi je vrlo reaktivni vodikov peroksid (H_2O_2), a osim njega koriste se još i karbamid peroksid, natrijev perborati i njihove kombinacije. Najpopularnije sredstvo za izbjeljivanje je 30 – 35% vodik peroksid ili 10 – 16% karbamid peroksid (koji razgradnjom daje vodik peroksid manjeg postotka nego početni spoj i ureu koja daje amonijak i ugljični dioksid) (15).

1.2.1. Vodikov peroksid

Vodikov peroksid (H_2O_2) je bezbojan, tekući spoj vodika i kisika, slabo je topljiv u vodi, alkoholu i etilenglikolu i snažno je oksidacijsko sredstvo. Zbog male molekulske težine difundira u tvrde zubne strukture, caklinu i dentin (15). Vodikov peroksid je nestabilan i razlaže se u vodu i kisik.

Molekula O_2 , koja ima dva nesparena elektrona u vanjskoj ljusci, tijekom oksidacije prima elektron iz površine na koju se aplicira i preko međuprodukta O (superoksid) dalje reagira s vodikovim peroksidom u tzv. Haber-Weiss-ovoj reakciji.

U daljnjoj reakciji nastaju vrlo reaktivni slobodni radikali: perhidroksilni ($HO_2\cdot$) i atom kisika ($O\cdot$). U vodenoj otopini vodikov peroksid je blago kiseo (kako bi se smanjila razgradnja i produžio rok trajanja). Kiseli vodikov peroksid nalazi

se u većini komercijalnih sredstava. U tom slučaju nastaje više slabijeg slobodnog radikala ($O\cdot$). Perhidroksilni (HO_2) slobodni radikal je učinkovitiji i više ga nastaje pri alkalnom pH pa je optimalna učinkovitost pri pH od 9.5 do 10.8. PH vodikova peroksida nakon aplikacije je 3.7, a karbamid peroksida 6.5 (pri koncentraciji od 35%) zbog čega oba sredstva sadrže podjednaku koncentraciju slobodnih radikala. PH se nakon aplikacije diže iznad prirodnih vrijednosti u udlazi i ustima te ostaje visok najmanje dva sata (16). Razlaganje vodikovog peroksida na slobodne radikale ubrzava toplina, dodavanje natrij hidroksida i svjetlo.

1.2.2. Karbamid peroksid

Karbamid peroksid se izvorno koristi u stomatologiji kao oralni antiseptik (Stindt, 1989). Od 80-ih, učinak ove supstance se koristi za izbjeljivanje zubi (15). Karbamid peroksid dolazi u obliku bjelkastih kristala ili praha. Lako je topljiv u vodi. Karbamid peroksid zapravo je "nositelj" koji omogućuje aktivnoj tvari, vodikovom peroksidu, da se oslobodi u kontaktu s ionima vode ili proteinima sline. U procesu izbjeljivanja, karbamid peroksid se raspada na ureu $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$ i vodikov peroksid. Vodikov peroksid prodire u strukturu zuba i nakon uklanjanja vode visoko reaktivni kisikov radikal sudjeluje u izbjeljivanju. Urea se razgrađuje na amonijak $[\text{NH}_3]$ i ugljični dioksid $[\text{CO}_2]$. Raspadom 10 % karbamid peroksida, oslobađa se 3% vodikovog peroksida i 7% uree (17). Jedan gram karbamid peroksida za kućno izbjeljivanje oslobađa raspadom 0,36 grama vodikovog peroksida i ta količina dozvoljena je i od strane *Scientific Committee on Consumers Products* (SCCP, 2005). Matis i sur. (1999) proučavali su *in vivo* raspad 10% karbamid peroksida i zabilježili bieksponecijalan pad koncentracije. Nakon 15 sekundi, jedan sat, dva sata, četiri sata, šest sati i deset sati zabilježena je koncentracija od prosječno 87%, 66%, 53%, 31%, 18% i 6%. Karbamid peroksid prisutan je još uvijek, nakon deset sati od izbjeljivanja, ali u minimalnim koncentracijama (18).

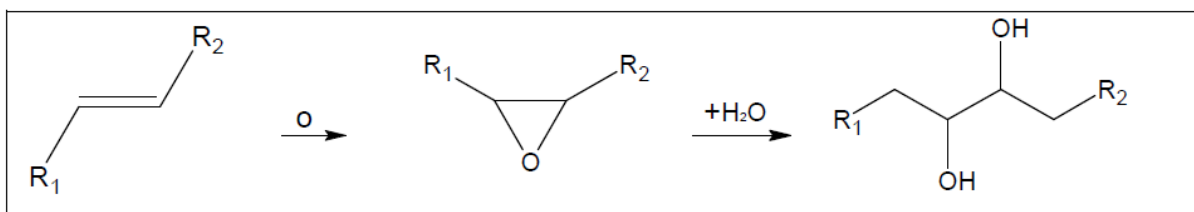
Karbamid peroksid je najčešći aktivni sastojak materijala za izbjeljivanje kod kuće. Dok se za *home bleaching* koristi 10 – 15 % pa čak i 20 % karbamid peroksid, dostupna je i 35% otopina karbamida u preparatima koji se koriste za *in office* izbjeljivanje. Osim za izbjeljivanje koristi se i u druge svrhe. Ima antibakterijsko djelovanje, a može se koristiti i za redukciju plaka. 10% otopina u glicerolu koristi se u terapiji oralnih ulceracija i drugih lezija usne šupljine.

1.2.3. Natrij perborat

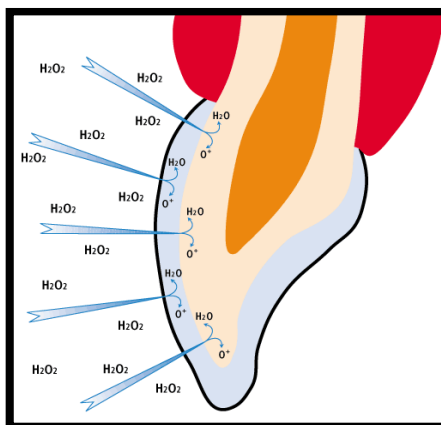
Natrij perborat u kontaktu s vlažnom površinom stvara vodikov peroksid i kisikove komplekse koji su odgovorni za izbjeljivanje. To oslobađanje različitih radikala i iona iz vodikovog peroksida ovisno je o pH, utjecaju svjetlosti, temperaturi i nazočnosti katalizatora. Natrij perborat miješa se s vodom ili 3 – 30% vodik peroksidom. Ako se miješa s vodom učinak izbjeljivanja se postiže nakon dužeg vremena primjene i potrebne su češće izmjene materijala, no učinkovitost izbjeljivanja je jednaka. Kad se natrij perborat pomiješa s 30% vodikovim peroksidom u omjeru 1:2 (g/ml), pH mješavine je bazičan. Ako se doda još peroksida, pH postaje niži (kiselinski). Najveći inicijalni pH ima mješavina perborata s vodom. Porast pH je poželjan jer je učinkovitost puferiranog bazičnog vodikovog peroksida veća od nepuferiranog (19). Osim za izbjeljivanje perborat se još upotrebljava i kao antiseptik i dezinficijens.

1.3. MEHANIZAM IZBJELJIVANJA ZUBI

Točan mehanizam izbjeljivanja zubi još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Vodikov peroksid, koji je aktivni spoj svih sredstava za izbjeljivanje zubi, ima sposobnost stvaranja slobodnih radikala kisika. On se bez djelovanja enzima spontano raspada na slobodne radikale kisika kao što su superoksidni anion, hidroksilni i perhidroksilni radikal. Slobodni radikali kisika su nestabilne molekule i imaju tendenciju reagirati s drugim tvarima da bi postigle svoju stabilnost. Vodikov peroksid, kao i slobodni radikali kisika koji nastaju njegovim raspadom, mogu difundirati kroz tvrda zubna tkiva i pritom reagirati s kromogenim molekulama. To su molekule velike molekulske mase koje sadrže konjugirane dvostruke veze između ugljikovih atoma ($C=C$) i pri relaksaciji emitiraju svjetlost u vidljivom dijelu spektra, što se očituje kao diskoloracija zubi. Slobodni radikali cijepaju te konjugirane dvostruke veze i tako mijenjaju apsorpcijsku energiju kromogenih molekula, koje se razlažu na manje i emitiraju zračenje nižih valnih duljina u nevidljivom dijelu spektra (Slika 1,2). Na samu reakciju izbjeljivanja, utječu i različiti uvjeti u kojima se ona odvija: temperatura, pH, svjetlosna aktivacija, te prisutnost nekih iona. Povećanjem temperature za $10^{\circ}C$ brzina reakcije se dvostruko povećava (6). U kiselom pH stvara se više superoksidnog aniona, a u bazičnom više perhidroksilnog radikala, koji ima jaču oksidirajuću moć. Stoga se u sredstvima za izbjeljivanje nastoji postići bazični (ili barem neutralni) pH.



Slika 1. Cijepanje konjugiranih dvostrukih ugljikovih veza slobodnim radikalima kisika (preuzeto iz 6).



Slika 2. Aktivnost vodikovog peroksida (preuzeto iz 6).

1.4. VRSTE IZBJELJIVANJA ZUBI

Izbjeljivanje zubi je postupak kojim se obrađuju te u određenom stupnju otklanjaju različite diskoloracije zubi. Postupke izbjeljivanja zubi možemo podijeliti na one koje se koriste za izbjeljivanje avitalnih i vitalnih zubi.

1.4.1. Izbjeljivanje vitalnih zubi

Izbjeljivanje vitalnih zubi može se provoditi kod kuće (*at-home bleaching*) i profesionalno (*in-office bleaching*). Razlikujemo pet postupka:

1. Profesionalno izbjeljivanje koje provodi stomatolog (*dentist administered in-office bleaching, power bleaching*) (20) gdje se koriste visoke koncentracije vodikovog peroksida (25 - 50%) ili karbamid peroksida (35 – 40%). Gel za izbjeljivanje nakon završetka postupka uklanja stomatolog. Pri tom je potrebno zaštititi meka tkiva, kao što su usnica, gingiva i jezik od mogućeg kontakta sa sredstvom za izbjeljivanje. Za aktiviranje određenih katalizatora i povećanja snage, sredstvo za izbjeljivanje možemo aktivirati i ubrzati svjetlom ili toplinom. Aplikacija se može ponoviti do postizanja željenog izgleda zuba. Sinonimi za ovu tehniku su još *power bleaching* ili *assisted bleaching*. Najčešće se koriste preparati 30 – 35% vodikovog peroksida i 35% karbamid peroksida uz uporabu aktivatora ili promotora izbjeljivanja - svjetla, topline, ili lasera. Postupak je indiciran za izbjeljivanje pojedinih zuba, skupine zuba ili čitavog zubnog luka.

2. Izbjeljivanje pod nadzorom stomatologa, pri čemu se individualna udlaga napunjena preparatom vodikovog ili karbamid peroksida visoke koncentracije (35 – 40%), postavlja u usta na 30 minuta do 2 sata (*dentist supervised bleaching*).

3. Izbjeljivanje kod kuće (*at-home bleaching, night-guard bleaching*) uveli su 1989. Haywood i Hayman pri čemu pacijent sam primjenjuje individualnu udlagu napunjenu vodikovim peroksidom (najviše do 10%) ili karbamid peroksidom manje koncentracije (5– 22%). Naziva se još i *nightguard vital bleaching* ili *matrix bleaching*. Prednosti ove tehnike su jednostavna primjena, a pacijent ima kontrolu nad postupkom. Relativno je efikasna i financijski pristupačna većini ljudi. Za izbjeljivanje ovom tehnikom najčešće se upotrebljava 10 – 15% karbamid peroksid, a mogu se koristiti i veće koncentracije do 22%. Tijekom terapije moguće je postupno mijenjati koncentraciju, tj. započeti s manjom, a zatim ju povećavati prema kraju terapije. Time postizemo smanjenje osjetljivosti zubi. Rezultati promjene boje su stabilni 6 – 12 mjeseci, a postupak se treba ponoviti kad se uoči promjena u boji zuba (21). Postupak se sastoji od izrade individualne udlage (matrice) u koju se zatim unosi materijal za izbjeljivanje. Obično se izbjeljuje čeljust po čeljust, a ona koja se ne izbjeljuje služi za kontrolu promjene boje. Udlaga se nosi uglavnom 1 – 4 sata dnevno, ali i duže, što ovisi o sustavu za izbjeljivanje koji se koristi. Terapija traje 2 – 6 tjedana tijekom kojih se stanje redovito kontrolira u ordinaciji.

4. Izbjeljivanje koje pacijent samoinicijativno provodi kod kuće pomoću različitih pasta i komercijalno dostupnih (*over-the-counter*) pripravaka za izbjeljivanje temeljenih na vodikovom peroksidu ili karbamid peroksidu različite koncentracije.

1.4.2. Izbjeljivanje avitalnih zubi

Diskoloracija avitalnih zubi najčešće nastaje zbog degeneracije pulpnog tkiva praćene krvarenjem što je često posljedica traume. Promjenu boje mogu također izazvati i ostaci pulpnog tkiva uslijed neadekvatnog endodontskog zahvata, ali i materijali za punjenje korijenskih kanala. Za izbjeljivanje avitalnih zubi rabi se natrij perborat ili vodikov peroksid koji se postavljaju u područje prethodno očišćene pulpne komorice. Postupak se provodi najčešće u ordinaciji direktno, ili se sredstvo za izbjeljivanje privremeno stavlja u kavitet (tzv. *walking bleach*). U ordinaciji se obično primjenjuju sredstva veće koncentracije dok se kao uložak između dvije posjete koriste sredstva niže koncentracije (natrijev perborat i voda ili 3 % vodikov peroksid). Nakon kliničkog pregleda i analize RTG-a (ne smije biti znakova resorpcije korijena, periapikalnog procesa, ni proširenja parodontne pukotine, a kanali moraju biti korektno napunjeni). Nakon toga određuje se boja zuba pomoću ključa boja i fotografira za dokumentaciju. Zatim se zub izolira koferdamom. Ispun korijenskog kanala odstranimo u dubinu 2 – 3 mm ispod caklinsko-cementnog spojišta. Prije se preporučalo jetkanje radi

odstranjivanja zaostatnog sloja da bi se otvorili dentinski tubulusi i omogućila bolja difuzija peroksida. No pokazalo se da je taj korak štetan jer zbog povećane difuzije vodikovog peroksida u okolni parodont može nastati upalna reakcija i cerviksna resorpcija (22). Kavitet se ispere acetonom ili nekim drugim sredstvom da bi se otopila masnoća i omogućila bolja penetracija sredstva za izbjeljivanje u dentin. Zatim se postavlja podloga 2 mm debljine, koja može biti cinkoksifosfatni ili staklenoionomerni cement, a služi kao zaštitna barijera kako sredstvo za izbjeljivanje ne bi djelovalo na punjenje ili difundiralo kroz vrat zuba u okolno potporno tkivo. Slijedi aplikacija materijala za izbjeljivanje. Postupak se ponavlja dok se ne postigne željena nijansa. Uvjeti koji moraju biti ispunjeni za izbjeljivanje avitalnih zubi su zdravo parodontno tkivo te pravilno zabrtvljen korijenski kanal kako bi se spriječio kontakt sredstva za izbjeljivanje s periapeksnim tkivima (23).

1.5. NUSPOJAVE IZBJELJIVANJA ZUBI

Nuspojave se očituju na tvrdim zubnim tkivima, zubnoj pulpi i sluznici usne šupljine.

1.5.1. Postoperativna preosjetljivost

Većina ljudi vrlo dobro podnosi izbjeljivanje zubi. Preosjetljivost povezana s izbjeljivanjem zubi povezuje se s pojavom mikroskopskih caklinskih defekata i podpovršinskih pora s mogućnošću prodora sredstva za izbjeljivanje do pulpe. Ipak, preosjetljivost povezana s izbjeljivanjem zuba može se pojaviti kao problem kod nekih pacijenata. Leonard i sur. su dokazali da mnogi preoperativni događaji mogu potaknuti nastanak preosjetljivosti za vrijeme i nakon izbjeljivanja. Jedan od takvih jest postojanje dentinske preosjetljivosti i prije provođenja postupka izbjeljivanja. Iritacija gingive i mekih tkiva također je česta, ali i prolazna nuspojava. Javlja se pri uporabi veće količine i koncentracije, te kod dugotrajne primjene sredstva za izbjeljivanje kod kuće. Ako dođe do iritacije treba prekinuti izbjeljivanje. Da bismo izbjegli iritacije možemo koristiti manju količinu gela s manjom koncentracijom vodikovog peroksida ili izbjeći kontakt pažljivom izolacijom gingive, izraditi individualnu udlagu, te preporučiti kraće nošenje udlage (24).

Učinak na zubnu pulpu očituje se kao bolna senzacija i preosjetljivost zubi tijekom i nakon izbjeljivanja. Bol i preosjetljivost se objašnjavaju iritirajućim djelovanjem vodikova peroksida na stanice zubne pulpe jer molekula H_2O_2 zbog svoje male molekulske mase može difundirati kroz sloj cakline i dentina sve do zubne pulpe. Tamo uzrokuje blagi reverzibilni pulpitis što se manifestira kao preosjetljivost zuba i intermitentna spontana bol. Incidencija preosjetljivosti i boli ovisi o koncentraciji primijenjenog preparata, odnosno vrsti izbjeljivanja i veća je kod *power bleaching* izbjeljivanja gdje iznosi 67-78% (25). Histološki se u pulpi vidi slaba upalna reakcija, promijenjena morfologija odontoblasta i pojačana dentinogeneza kao odgovor na iritaciju. Ova nuspojava je prolazna i prestaje najkasnije četvrti dan nakon tretmana (26). Schulte i sur. su otkrili da je kod 14% pacijenata ta preosjetljivost bila dovoljno jaka da se prekine sam postupak izbjeljivanja. Ako je preosjetljivost uzrokovana izbjeljivanjem mala ili umjerena, preosjetljivost može biti smanjena prilagođavanjem vremena tretmana, frekvencije i koncentracije sredstva za izbjeljivanje.

Ako je preosjetljivost uzrokovana izbjeljivanjem učestala i jaka, može biti tretirana sredstvima za smanjenje preosjetljivosti. Terapijom za smanjenje dentinske preosjetljivosti zapravo utječemo na smanjenje pomaka dentinske tekućine ili živčanog odgovora koji su pobuđeni postupkom izbjeljivanja. Mnoge desenzibilizirajuće paste sadrže soli kalija. Za njih se smatra da smanjuju odgovor intradentalnih živčanih završetaka. Sredstva u čijem su sastavu kalijeve soli, koje smanjuju živčani odgovor i ekscitaciju, trebale bi biti učinkovitije od sredstva koja

djeluju na principu zatvaranje dentinskih tubulusa. Smatra se da korištenje sredstava na bazi KNO_3 za vrijeme samog postupka izbjeljivanja doprinosi smanjenju dentinske preosjetljivost nekompromitirajući pritom estetske rezultate izbjeljivanja (27). Sredstva za zatvaranje dentinskih tubulusa, poput amornog kalcijevog fosfata (ACP), također su se pokazala korisnim u smanjenju dentinske preosjetljivosti. Ovo sredstvo može povećati gustoću minerala u caklini smanjujući difuziju peroksida do živčanih završetaka (28).

1.5.2. Strukturne, površinske i kemijske promjene tvrdih zubnih tkiva

Većina istraživanja pokazuje male ili nikakve promjene u morfologiji i sastavu cakline i dentina pri izbjeljivanju. Po nekim istraživanjima izbjeljivanje zubi ne utječe na tvrdoću cakline (postupak s mješavinom vodik peroksida i natrij peroksida), a neka pokazuju smanjenje tvrdoće i otpornosti na trošenje.

Utjecaj na caklinu

Istraživanja elektronskim mikroskopom površine cakline nakon izbjeljivanja pokazala su da ona ostaje netaknuta i nepromijenjena nakon primjene nižih koncentracija karbamid peroksida, dok visoke koncentracije i učestala primjena vodikovog i karbamid peroksida dovode do površinskih promjena na caklini koja postaje poroznija i hrapavija. Promjene u caklini, uključujući povećanu poroznost, izgled poput najetkanosti kao i gubitak prizmatske strukture, gubitak kalcija,

smanjenu mikrotvrdoću, a promjene u organskom sastavu iste također su mogu pojaviti kao posljedica izbjeljivanja (29). Izbjeljivanje izravno ne utječe na čvrstoću cakline. Međutim, istraživanje ciklusa izbjeljivanja i remineralizacije pokazalo je da je tretman 10% karbamid peroksidom znatno smanjio tvrdoću cakline i zbog toga se nakon tretmana površina zuba premazuje preparatima fluora. Smanjenje tvrdoće može rezultirati gubitkom minerala iz cakline, što pak može dovesti do smanjenja otpornosti na trošenje, a dolazi i do promjena u elasticitetu cakline, a to dovodi do njezinog bržeg loma (30). Učestala primjena 3, 5, 7 i 12% paste vodikovog peroksida nije utjecala na smanjenje tvrdoće cakline, promjene mikromorfologije ili površinskog nazubljenja. Iako vodik peroksid ima kiseli pH i potencijal da na taj način ošteti caklinu ili uzrokuje cervikalnu resorpciju, to nije zabilježeno. Silva i sur. sudokazali da 35% karbamid peroksid primijenjen kroz 6 sati, 14 dana i nakon pohrane u otopini umjetne sline utječe na smanjenje snage svezivanja kao i na smanjenje tvrdoće (31). Remineralizacijski učinak sline u usnoj šupljini može prevenirati demineralizacijski učinak izbjeljivanja na caklinu.

Zaključno, brojna *in vitro* istraživanja su dokazala da izbjeljivanje vodikovim peroksidom dovodi do povećanja hrapavosti, demineralizacije i slabljenja cakline. Međutim, nedostaju dokazi da su takva zapažanja klinički relevantna, a protektivni učinak sline odgovoran je za potrebnu remineralizaciju demineralizirane cakline. Kratka i kontrolirana upotreba sredstva za izbjeljivanje izbjeći će razvoj mogućih problema. Izbjeljivanje uklanja zaostatni sloj te mijenja svezivanje adhezijskog

sustava i staklenoionomernog cementa na dentin i kolagen (32). Zbog toga bi adhezijsku tehniku trebalo raditi tjedan do dva nakon izbjeljivanja, kada više nema tog efekta. Na tvrdim zubnim tkivima dolazi do smanjenja mikrotvrdoće i promjena površinske morfologije. Mikrotvrdoća je smanjena i u caklini i u dentinu, a površina cakline postaje hrapavija i poroznija s dubljim intraprizmatskim prostorima. Nije u potpunost jasno jesu li te promjene uzrokovane djelovanjem vodikovog peroksida na organske ili anorganske komponente tvrdih zubnih tkiva, ali vjerojatno se radi o kombiniranom učinku. Intenzitet oštećenja ovisi o koncentraciji vodikovog peroksida i o vremenu djelovanja na tvrda zubna tkiva (33). Navedene promjene zapažene su *in vitro* uvjetima i ne smatraju se klinički značajnima.

Utjecaj na dentin

Smanjenje mikrotvrdoće i promjena površinske morfologije zabilježena je i na dentinu nakon primjene sredstva za izbjeljivanje na bazi vodikovog i karbamid peroksida. Ovisno o korištenom sredstvu za izbjeljivanje, dentin pokazuje kratkotrajano smanjenje mikrotvrdoće, a u vremenu nakon izbjeljivanja otopina umjetne sline pokazala je dobar remineralizacijski učinak na izbijeljene površine. Tam i sur. su dokazali da korištenje 10% karbamid peroksida direktno na dentin dovodi do smanjenja modula elastičnosti, dok aplikacija sredstva za izbjeljivanje preko cakline ne dovodi do smanjenja snage sveze i modula elastičnosti (34). Izbjeljivanje može utjecati na vezu između dentina i ispuna, a to može biti

posljedica učinka ostatka vodikovog peroksida i kolagena na granici između dentina i ispuna nakon izbjeljivanja (35). Dva tjedna nakon izbjeljivanja preporuča se izbjegavanje bilo kakvog adhezivnog postupka. Vodikov peroksid ima tendenciju promijeniti kemijsku strukturu površine zuba. Zaostatni kisik na površini zuba inhibira polimerizaciju kompozitne smole. Smanjenje čvrstoće spoja je prolazna faza koja se stabilizira nakon 24 sata i nestaje nakon jednog tjedna. Korištenje topikalnih fluorida i korištenje adheziva na bazi acetona ili alkohola ili zakošenje površine može ublažiti djelovanje peroksida na snagu sveze (36).

Izbjeljivanje zuba dovodi do pojave demineralizacije dentina, smanjenja mikrotvrdoće i modula elastičnosti. Isto, smanjuje se i snaga sveze između dentina i kompozita. Takve pojave najizraženije su nakon direktne primjene sredstva za izbjeljivanje na dentin. Iako peroksid prolazi kroz caklinu do dentina, ne možemo pretpostaviti da indirektan kontakt sredstva za izbjeljivanje i dentina ne bi imao slične posljedice. U kliničkim uvjetima, remineralizacijski potencijal sline smanjiti će sve negativne posljedice sredstva za izbjeljivanje na dentin.

1.6. REMINERALIZACIJA TVRDIH ZUBNIH TKIVA

Remineralizacija je proces obnove najčešće karijesom oštećene cakline. Može biti prirodna ili potaknuta djelovanjem izvana, primjenom različitih fluoridnih preparata u obliku otopina, gelova i pasta za zube ili pak pečatnih ispuna koji otpuštaju fluor. Iako je konačan rezultat sličan, remineralizacija se ne smije poistovjetiti sa sazrijevanjem mlade cakline poslije nicanja zubi, pri čemu nastaje određena pregradnja ili dogradnja i stabilizacija neoštećenih apatitnih kristala vanjske površine. Remineralizacija označava obnovu apatitnih kristala oštećenih karijesom (36). Remineralizacija je zapravo skupni naziv za dva različita procesa:

- rekristalizaciju i
- precipitaciju.

Rekristalizacija je složeni fizikalnokemijski proces pri kojemu se na ispražnjena mjesta iona odstranjenih demineralizacijom u kristalnu rešetku ugrađuju slobodni ioni kalcija, fosfata, fluorida i elemenata u tragovima. Ioni minerala potječu iz tekućina u interkristalnim prostorima, u koju su dospjeli iznutra, iz kristala oštećenih demineralizacijom ili izvana iz sline, plaka ili remineralizacijskih otopina.

Precipitacija je jednostavan fizikalni proces taloženja slobodnih mineralnih iona iz tekućine u interkristalnim prostorima u hidratacijsku ovojnicu ili na površinu

oštećenih kristala. Proces se još naziva i površinsko otvrdnuće, jer da je najizraženiji u površinskoj zoni karijesne lezije (37).

Pri prirodnim lezijama remineralizacija i demineralizacija se izmjenjuju i aktiviraju više puta na dan, u kraćim ili dužim vremenskim intervalima, što karijesu daje obilježje intermitentne bolesti. Opseg demineralizacije, tj. veličina gradijenta slobodnih iona u interkristalnoj tekućini, ali i brzina demineralizacije, bitno utječu na rekristalizaciju i precipitaciju. Što je otapanje kristala sporije, to ima više vremena da se oslobođeni ioni ponovno ugrade ili adsorbiraju u/na druge oštećene kristale. Slobodni ioni iz tekućine mogu se ugraditi u kristalnu rešetku ili samo ući u hidratacijsku ovojnicu. I neoštećeni kristali mogu u svoju hidratacijsku ovojnicu primiti slobodne ione i tako postaju hipermineralizirani.

Glavni izvor slobodnih iona za remineralizaciju izvana su slina i plak sa svojim promjenjivim koncentracijama kalcija, fosfata i fluorida. Novostvoreni sloj kristala obnovljenih rekristalizacijom je relativno tanak jer ioni fluora tako precizno popune mjesta koja su u kristalnoj rešetki zauzimali ioni OH^- da potpuno zakloče daljnje odstranjenje iona OH^- , ujedno i daljnje širenje rekristalizacije u dubinu. Na taj način proces se samoograničava prema dubljim slojevima cakline. Prevladava li u rekristalizaciji ugradnja fluora naspram drugih iona, nastaju fluorapatiti koji su otporniji na djelovanje kiselina (37).

1.6.1. Amorfni kalcijev fosfat

Za remineralizaciju je na dva iona fluora potrebno deset kalcijevih i šest fosfatnih iona ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$). U nedostatku kalcijevih i fosfatnih iona, što je posebno očito kod stanja koja uzrokuju suhoću usta, izostaje i remineralizacija. Zato se danas uz fluoride za remineralizaciju i prevenciju karijesa koriste derivati kazeina. Kazeinofosfopeptid (CPP) je bioaktivni peptid koji ima sposobnost vezanja kalcija tj. stabilizacije kalcij fosfata u otopini kao amorfni kalcij fosfat (ACP). Amorfni kalcij fosfat osigurava fosfatne i kalcijeve ione za remineralizaciju cakline. CPP-ACP se može primjenjivati u žvakaćim gumama, otopinama za ispiranje ili topikalnim kremama kao što je *GC Tooth Mousse* (GC Asia Dental Pte Ltd). Skupina amornih kalcijevih fosfata jedinstvena je u razredu kalcij-ortofosfata, koji su kroz složeni proces biomineralizacije odgovorni za stvaranje unutarnjeg skeleta i zuba kod ljudi. Općenito se smatra da je ACP izravni prekursor u stvaranju hidroksilapatita. Kad se izloži djelovanju vode, ACP otpušta dostatne količine kalcijevih i fosfatnih iona da bi se stvorio hidroksilapatit (38).

Osim poticanja remineralizacije dokazano je da CPP-ACP reducira adheziju nekih bakterija na tvrda zubna tkiva i potiče salivaciju, što će također djelovati antikarijesno. Zbog svih dobrih svojstava, širok je spektar indikacija za njegovo korištenje:

- inicijalna karijesna lezija

- zaštita od karijesa kod kserostomije
- kod preosjetljivosti zubnih vratova, jer potiče taloženje kristala kalcija i fosfata u otvorene dentinske tubuluse
- kao zaštita nakon tretmana izbjeljivanja zuba
- nakon ultrazvučnog čišćenja mekih i tvrdih zubnih naslaga
- u prevenciji karijesa kod osoba koje su u ortodontskoj terapiji (39).

2. SVRHA RADA

Svrha istraživanja je ispitati učinak dva sredstava za vitalno izbjeljivanje zubi na promjenu površinske mikromorfologije te mikrotvrdoće cakline i dentina.

2.1. RADNE HIPOTEZE

- 1.** Korištenje gelova za vitalno izbjeljivanje ne dovodi do povećanog smanjenja mikrotvrdoće cakline i dentina.
- 2.** Umjetna slina i amorfni kalcijev fosfat dovode do remineralizacijskog procesa i povećavaju mikrotvrdoću cakline i dentina nakon postupka izbjeljivanja.
- 3.** Izbjeljivanje gelovima za vitalno izbjeljivanje ne utječe na promjenu površinske mikromorfologije cakline i dentina.

3. MATERIJALI I POSTUPCI

3.1. SREDSTVA ZA IZBJELJIVANJE I REMINERALIZACIJU

U istraživanjima su se koristila komercijalna sredstva za izbjeljivanje temeljena na vodikovom peroksidu različitih koncentracija, a za remineralizaciju je korišteno sredstvo amornog kalcijevog fosfata *ACP Relief Gel* (Tablica 1).

Tablica 1. Korištena sredstva za izbjeljivanje (svi podaci odgovaraju kao podaci navedeni od strane proizvođača), popis aktivnih sastojaka, način primjene, aktivni sastojak za izbjeljivanje.

Proizvod	Proizvođač	Sastojci	Primjena	Aktivni sastojak za izbjeljivanje	%	PH
Zoom 2	Discus Dental, Culver City, SAD	Voda, poloksimer 497, glicerol, propilen glikol, kalijev nitrat, kalijev hidroksid, menta piperita, eugenol, željezni glukonat, vodikov peroksid (25%)	<i>In office</i>	Vodikov peroksid	25	3.20
Boost	Ultradent, South Jordan, UT, SAD	Propilen glikol, vodikov peroksid (38%), 1,1% fluorid, 3% kalijev nitrat	<i>In office</i>	Vodikov peroksid	38	6.75

ACP Relief	Discus Dental, Culver City, SAD	ACP, 5% kalijev nitrat, 0.22% natrijev fluorid, voda, pepermint, kalcijev nitrat, natrijev fosfat, natrijev saharin	<i>In office/at home</i>	Amorfni kalcijev fosfat	-	7.0
------------	---------------------------------	---	--------------------------	-------------------------	---	-----

3.2. UMJETNA SLINA

Od preparata umjetne sline koristilo se 500 ml Glandosane spray (Fresenius Kabi, Velika Britanija) na bazi karboksi-metil celuloze. Budući da je izmjerena pH vrijednost umjetne sline 5,23 (Pinnacle 555 pH / Ion metar, Corning, Tewksbury, SAD) ona je pomiješana s 67,3 g 1% NaOH s pomoću magnetske mješalice s vrućom pločom (Cole Parmer, East Bunker Court Vernon Hills, SAD) i dobivena je otopina umjetne sline s neutralnim pH 7,0) (Tablica 2).



Slika 3. Glandosane sprej.

Tablica 2. Umjetna slina pripremljena od Glandosan spreja i NaOH (svi podaci odgovaraju kao podaci navedeni od strane proizvođača osim pH vrijednost), popis aktivnih sastojaka i pH vrijednost.

Proizvod	Proizvođač	Sastojci	pH
Glandosane Spray	Fresenius KABI, Cheshire, VB	Karboksimetil celuloza, sorbitol, natrij klorid, kalij klorid, magnezij klorid, heksahidrat, kalcij klorid, natrij monohidrogen, monohidrogen	5,23
NaOH	Kemika, Zagreb, Hrvatska	1% NaOH	12

3.3. UZORCI

3.3.1. Uzorci za mjerenje mikrotvrdoće

Dvadeset pet 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 odobren od Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korjenovi zuba odrezani su od krunskog dijela 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. Prije rezenja kruna na pola, zubi su nasumce podijeljeni u dvije grupe. U prvoj grupi (n=20) obje površine su tretirane ZOOM2 (25 % HP) gelom, a u drugoj grupi (n=20) s Opalesence BOOST (38 % HP) gelom za izbjeljivanje kroz 3×15 minuta, pri čemu se nakon svakih 15 minuta stavio novi gel. Dodatna grupa služila je kao kontrola (n=10). Molari koji su korišteni u kontrolnoj grupi su također raspiljeni na dvije polovice kako bi se omogućilo mjerenje na caklini i dentinu, a nakon mjerenja pohranjeni su u umjetnoj slini bez provedenog postupka izbjeljivanja.

Uzorci su nasumično podijeljeni u skupine i pohranjeni u otopinu umjetne sline te pohranjeni na 37 °C (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn) da bi se simulirali intraoralni uvjeti. Koristili smo otopinu umjetne sline Glandosane spray (Fresenius Kabi,VB) na bazi karboksi-metil celuloze. Budući

da je izmjerena pH vrijednost umjetne sline 5,23 (Pinnacle 555 pH / Ion metar, Corning, Tewksbury, SAD) ona je pomiješana s 67,3 g 1% NaOH pomoću magnetske mješalice s vrućom pločom (Cole Parmer, East Bunker Court Vernon Hills, SAD) i dobivena je otopina umjetne sline s neutralnim pH 7,0.

Tijekom eksperimenata zubi su bili pohranjeni u umjetnoj slini osim za vrijeme trajanja izbjeljivanja i vremena potrebnog za mjerenje mikrotvrdoće po Vickersu. Umjetna slina je mjenjana svakodnevno. Za mjerenje mikrotvrdoće svaka kruna zuba je prerezana na pola i uložena u akrilnu smolu (AcryFix Kit; Struers, Balerrup, Danska) s vestibularnim odnosno oralnim plohama okrenutim prema gore i slobodnim od akrilatne smole, te paralelnim sa površinom stola. Nakon toga, uzorci labijalne ili oralne površine su polirane 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). Za mjerenje mikrotvrdoće dentina, krune zuba su prepiljene na pola i uložene svojim oralnim i vestibularnim plohama u akrilatnu smolu dok je unutarnja polovica krune bila izvan akrilatne smole. Površina dentina za mjerenje mikrotvrdoće ispolirana je 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).

Prije izbjeljivanja zubi su izvađeni iz otopine umjetne sline i osušeni pamučnom vatom. Na površinu cakline i dentina zatim je postavljen gel 25% ili 38% vodikovog peroksida pomoću Heidemanove špatule u sloju debelom 2 mm. Izbjeljivanje je trajalo 3×15 minuta, pri čemu se nakon svakih 15 minuta stavio novi gel. Za vrijeme izbjeljivanja zubi su postavljeni na pamučnu vatu natopljenu u umjetnu slinu da ne bi došlo do dehidracije. Nakon izbjeljivanja, gel je uklonjen špatulom, a površina cakline i dentina je isprana deioniziranom vodom. Nakon sušenja, na površinu je postavljen gel za remineralizaciju na bazi amornog kalcijevog fosfata (Relief ACP gel, Discus Dental, USA) u trajanju od 20 minuta, svaki dan kroz 14 dana. Nakon svake aplikacije ACP gela uzorci su vraćeni u otopinu umjetne sline i ostavljeni u inkubatoru na 37°C (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein).

3.3.2. Uzorci za mjerenje mikromorfologije

Dvadeset svježe izvađeni ljudskih, intaktnih trećih kutnjaka očišćeno je i pohranjeno u 1% otopinu kloramina na sobnoj temperaturi neposredno nakon ekstrakcije. Korištenje izvađenih ljudskih zuba je odobreno od Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korjenovi zuba odrezani su od krunskog dijela 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. Uzorci su pohranjeni u otopinu umjetne sline na 37°C (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) da bi se simulirali intraoralni uvjeti. Koristili smo već ranije pripremljenu otopinu umjetne sline.

Tijekom eksperimenata zubi su bili pohranjeni u umjetnoj slini osim za vrijeme trajanja izbjeljivanja i vremena potrebnog za promatranje površinske mikrotvrdoće i promjena u kemijskom sastavu. Umjetna slina je mijenjana svakodnevno. Uzorci za SEM pripremljeni su na način da je kruna zuba prerezana na pola i uložena u akrilnu smolu (AcryFix Kit; Struers, Balerrup, Danska) s vestibularnim, odnosno oralnim plohama okrenutim prema gore i slobodnim od akrilatne smole te paralelnim sa površinom stola. Uzorci labijalne ili oralne površine nisu polirani da bi se sačuvala prirodna struktura. Za mjerenje promjena na površini dentina, krune zuba su prepiljene na pola i uložene svojim oralnim i vestibularnim plohama u akrilatnu smolu dok je unutarnja polovica krune bila izvan akrilatne smole. Površina dentina nije polirana.

Prije izbjeljivanja zubi su izvađeni iz otopine umjetne sline i osušeni pamučnom vatom. Na površinu cakline i dentina zatim je postavljen gel 25% ili 38% vodikovog peroksida pomoću Heidemanove špatule u sloju debelom 2 mm. Izbjeljivanje je trajalo 3×15 minuta, pri čemu se nakon svakih 15 minuta stavio novi gel. Za vrijeme izbjeljivanja zubi su postavljeni na pamučnu vatu natopljenu u umjetnu slinu da ne bi došlo do dehidracije. Nakon izbjeljivanja, gel je uklonjen

špatulom, a površina cakline i dentina je isprana deioniziranom vodom. Nakon sušenja, na površinu je postavljen gel za remineralizaciju na bazi amorfnog kalcijevog fosfata (Relief ACP gel, Discus Dental, USA) u trajanju od 20 minuta, svaki dan kroz 14 dana. Nakon svake aplikacije ACP gela uzorci su vraćeni u otopinu umjetne sline i ostavljeni u inkubatoru na 37° C (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein). Površina cakline i dentina promatrana je pod visokotlačnim SEM mikroskopom (JSM 7000F, JEOL, Japan) prije postupka izbjeljivanja, nakon izbjeljivanja i nakon pohrane uzoraka u otopini umjetne sline i svakodnevnoj aplikaciji amorfnog kalcijevog fosfata u trajanju od 20 minuta kroz 14 dana. Površine uzoraka promatrane su pod različitim povećanjima s maksimumom od 20 000 puta.

Promjene u kemijskom sastavu cakline i dentina zabilježene su prije postupka izbjeljivanja, nakon izbjeljivanja i nakon pohrane uzoraka u otopini umjetne sline i svakodnevnoj aplikaciji amorfnog kalcijevog fosfata u trajanju od 20 minuta kroz 14 dana. Mjerenja su obavljena pomoću EDS uređaja u sklopu SEM mikroskopa.

3.4. POSTUPCI

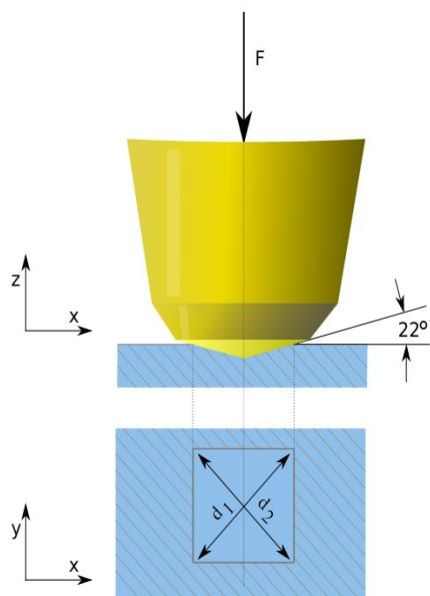
3.4.1. Mjerenje mikrotvrdoće

Tvrdoća je otpornost materijala na prodiranje. Po definiciji, tvrdoća predstavlja otpornost materijala prema prodiranju nekog 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 kutem između stranica od 136° . Ovakav kut nije odabran nasumce, već se utiskivanjem penetratora s tim kutem, 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 i dentina prije i nakon izbjeljivanja aktiviranog izvorom svjetlosti i nakon aplikacije sredstva za remineralizaciju testirala se Vickersovim testom mikrotvrdoće (Leitz Miniload 2 Microhardness Tester, Njemačka) pri čemu se koristila sila od 100 g kroz 10 sekundi. Za mjerenje se koristila dijamantna piramida koja se aplicirala na površinu uzorka. Mjerenja su se izvršila na tri različita mjesta udaljenosti 100 μm i izračunata je srednja vrijednost. Tri mjerenja su obavljena prije izbjeljivanje, tri nakon i tri nakon svakodnevnog 20 minutnog tretmana ACP i pohrane u umjetnoj slini ili deioniziranoj vodi kroz 14 dana.



Slika 4. Uređaj za mjerenje mikrotvrdoće.

3.4.2. Promjene u mikromorfologiji cakline i dentina

Mikromorfologija cakline i dentina prije i nakon postupka izbjeljivanja aktiviranog izvorom svjetlosti, kao i nakon aplikacije sredstva za remineralizaciju proučavane su pretražnim elektronskim mikroskopom JSM 7000F (JEOL, Japan) pri niskom naponu ubrzanja elektrona (1-5 kV) što osigurava promatranje preparata sa znatno manjom vjerojatnosti pojavljivanja artefakata.



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

Mikromorfološka SEM analiza

Tri uzorka od svake skupine su nasumično izabrana i analizirana pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa JSM 7000F (JEOL, Japan) prije izbjeljivanja, neposredno nakon izbjeljivanja i nakon dva tjedna pohrane u otopini umjetne sline i svakodnevnog 20 minutnog tretmana površine gelom ACP. Uzorci su se osušili i fiksirali na aluminijski nosač. Morfologija cakline i dentina je promatrana pod povećanjem do 20 000 puta. Promjene cakline i dentina su klasificirane: bez promjena, umjerene do slabe promjene (umjerene promjene površinske morfologije s iregularnim obilježjima i promjenama) i promijene površine (gubitak površinske strukture i minerala).

3.4.3. Mjerenje pH gelova za izbjeljivanje i umjetne sline

Za mjerenje pH measurement koristio se pH metar (Pinnacle 555 pH/Ion meter, Corning, Tewksbury, USA). PH metar je početno kalibriran i baždaren. Gel za izbjeljivanje je postavljen u plastičnu posudicu veličine 30 ml. Elektroda pH metra je nakon toga postavljena u gel pri čemu se omogućio potpuni i jednaki kontakt sa svim dijelovima nastavka elektrode. Gel je bio u kontaktu sa elektrodom kroz 20 minuta na sobnoj temperaturi (24° C). Elektorda je temeljito isprana i očišćena prije idućeg mjerenja.

3.5. STATISTIČKE METODE

Deskriptivna analiza efekata različitih tretmana na promjenu mikrotvrdoće prikazana je u obliku Box-plot dijagrama. Zabilježene vrijednosti mikrotvrdoće nisu zadovoljile uobičajene pretpostavke o homogenosti varijance i približno normalnoj distribuiranosti te su stoga transformirane prije daljnje analize. Box-Cox test ukazao je na potrebu logaritamske transformacije koja je i provedena. Logaritmirane vrijednosti zabilježenih mjerenja mikrotvrdoće – početnih mjerenja, mjerenja zabilježenih neposredno nakon izbjeljivanja te dva tjedna nakon izbjeljivanja – za različite tretmane uspoređene su mješovitim modelom analize varijance. Različiti uzorci odnosno zubi predstavljali su slučajne efekte u modelu, dok su različiti tretmani modelirani kao fiksni efekti. Pretpostavka normalne distribuiranosti reziduala odabranog modela ispitana je Shapiro-Wilk testom koji je ukazao na približno normalnu distribuiranost. Prije prikaza rezultata isti su antilogaritmirani radi lakše interpretacije, pri čemu su dobivene prosječne vrijednosti prikazane na originalnoj skali i predstavljaju geometrijske sredine. Veličina uzorka ($n = 40$) bila je dovoljna za zadovoljavajuće detektiranje razlika u prosječnoj mikrotvrdoći između različitih tretmana uz razinu statističke snage od 80%. Usporedba efekata različitih gelova za izbjeljivanje zasebno na caklini i dentinu provedena je korištenjem Wilcoxon-ovog testa sume rangova. Sukladno eksploratornom karakteru istraživanja, razina statističke značajnosti postavljena je na 10%, a rezultati su analizirani bez korekcije za višestruke usporedbe.

Analiza je provedena korištenjem programskog paketa SAS System 8.2 (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, SAD).

4. REZULTATI

4.1. MIKROTVRDOĆA

Početna mjerenja površinske mikrotvrdoće cakline i dentina znatno su se razlikovala (Slika 6). Prosječna vrijednost mikrotvrdoće cakline iznosila je 38,20 HV, a dentina 30,14 HV. Izbjeljivanje je imalo štetan učinak na površinsku mikrotvrdoću, koja se nakon postupka izbjeljivanja u prosjeku smanjila za 11.26 HV kod cakline i 11.56 HV kod dentina ($p < 0,001$; Tablica 3). Vrsta gela za izbjeljivanje pokazala se značajnim faktorom smanjenja površinske mikrotvrdoće zabilježene naposredno nakon izbjeljivanja (Mješoviti ANOVA model, $p = 0,005$). Korištenjem ZOOM2 gela ostvareno je značajno veće smanjenje površinske mikrotvrdoće cakline u odnosu na BOOST gel (Wilcoxon Rank Sum test, $p = 0,003$). Medijan smanjenje mikrotvrdoće nakon izbjeljivanja ZOOM2 gelom iznosio je 11.89 HV, a nakon izbjeljivanja BOOST gelom 9.95 HV. Vrsta gela za izbjeljivanje nije imala značajan učinak na smanjenje površinske mikrotvrdoće dentina. Nadalje, intenzitet smanjenja površinske mikrotvrdoće zabilježene na caklini i dentinu neposredno nakon izbjeljivanja značajno se razlikovao samo prilikom korištenja BOOST gela (Wilcoxon Rank Sum test; $p = 0,012$). Pri tome je na caklini zabilježeno manje smanjenje mikrotvrdoće (medijan=9,95) u odnosu na dentin (medijan=11,51).

Nakon dva tjedna u umjetnoj slini, prosječna mikrotvrdoća cakline (37,50 HV) i dentina (30,05 HV) se vratila na razinu početnih vrijednosti. Vrsta gela za

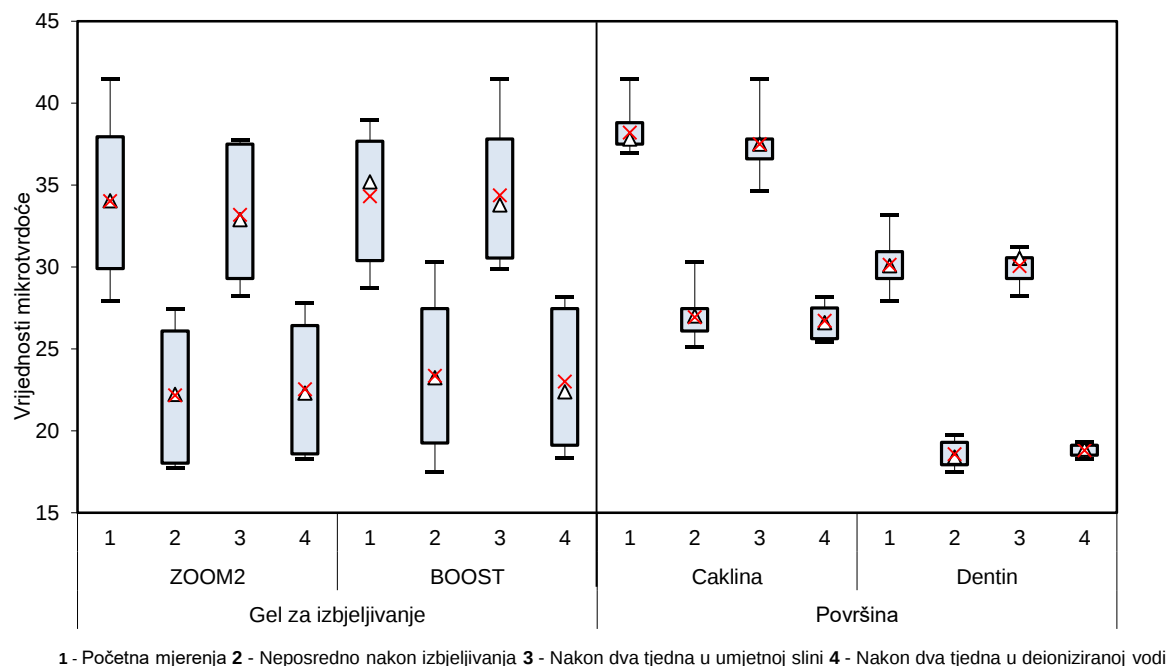
izbjeljivanje nije se pokazala značajnim faktorom utjecaja na površinsku mikrotvrdoću nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini.

Držanje uzoraka u deioniziranoj vodi nakon izbjeljivanja nije dovelo do poboljšanja površinske mikrotvrdoće. U usporedbi s početnim mjerenjima, zabilježeno je značajno smanjenje površinske mikrotvrdoće ($p < 0,001$ za caklinu i dentin). Prosječna mikrotvrdoća cakline (26,71 HV) i dentina (18,82 HV) nakon dvotjednog tretmana u deioniziranoj vodi ostala je na istoj razini kao i neposredno nakon postupka izbjeljivanja.

Tablica 3. Učinak različitih tretmana na površinsku mikrotvrdoću – zasebni rezultati za svaku površinu i svaki gel za izbjeljivanje

Grupa	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. izbjeljivanje	Početno vs. umjetna slina	Početno vs. deionizirana voda	Izbjeljeno vs. umjetna slina	Izbjeljeno vs. deionizirana voda	Umjetna slina vs. deionizirana voda
Sve	Geometrijska sredina	1.52	1.01	1.51	0.66	1.00	1.50
	t-vrijednost	63.0	0.9	50.3	-50.0	-0.5	41.3
	p-vrijednost	< 0.001	NS	< 0.001	< 0.001	NS	< 0.001
Čaklina	Geometrijska sredina	1.43	1.02	1.43	0.71	1.00	1.41
	t-vrijednost	37.9	1.6	31.1	-29.0	0.4	24.6
	p-vrijednost	< 0.001	NS	< 0.001	< 0.001	NS	< 0.001
Dentin	Geometrijska sredina	1.61	1.00	1.59	0.62	0.99	1.60
	t-vrijednost	51.2	-0.3	40.0	-41.8	-1.1	33.9
	p-vrijednost	< 0.001	NS	< 0.001	< 0.001	NS	< 0.001
ZOOM2	Geometrijska sredina	1.55	1.02	1.52	0.66	0.98	1.49
	t-vrijednost	47.3	1.8	36.4	-36.0	-1.4	28.8
	p-vrijednost	< 0.001	0.073	< 0.001	< 0.001	NS	< 0.001
BOOST	Geometrijska sredina	1.49	0.99	1.50	0.67	1.01	1.51
	t-vrijednost	41.9	-0.5	34.7	-34.7	0.7	29.7
	p-vrijednost	< 0.001	NS	< 0.001	< 0.001	NS	< 0.001

Napomena: Rezultati mješovitog ANOVA modela; NS – razlika nije značajna.

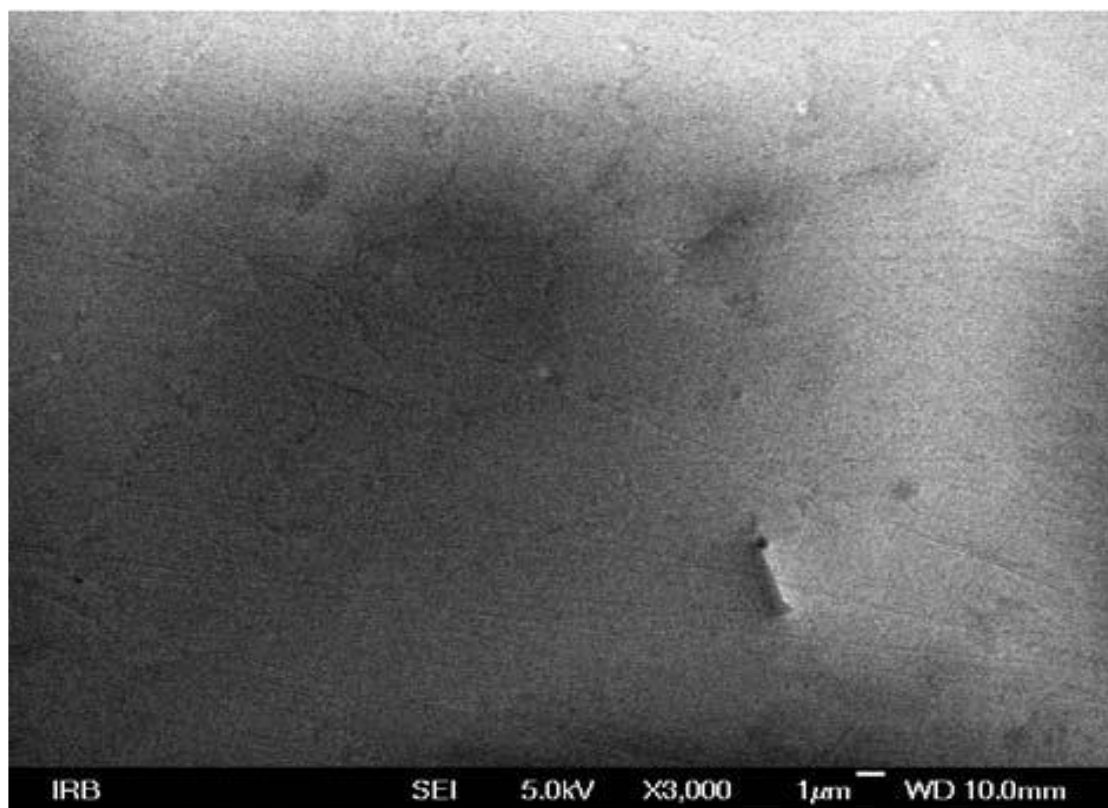


Slika 6. Box-plot diagram vrijednosti mikrotvrdoće

4.2. SEM ANALIZA

Na reprezentativnim slikama polirane površine neizbjeljene cakline nisu zabilježene značajne morfološke promjene cakline (Slika 7) i dentina pri čemu se dentinski tubulusi ostali zatvoreni (Slika 8). Oba korištena gela za izbjeljivanje pokazala su veće promjene i oštećenja na površini cakline uz otapanje pojedinih područja (Slika 9). Nakon izbjeljivanja gelovima 25% i 38% vodikovog peroksida došlo je do otvaranja dentinskih tubulusa (Slika 10, 11). Nakon pohrane u otopini

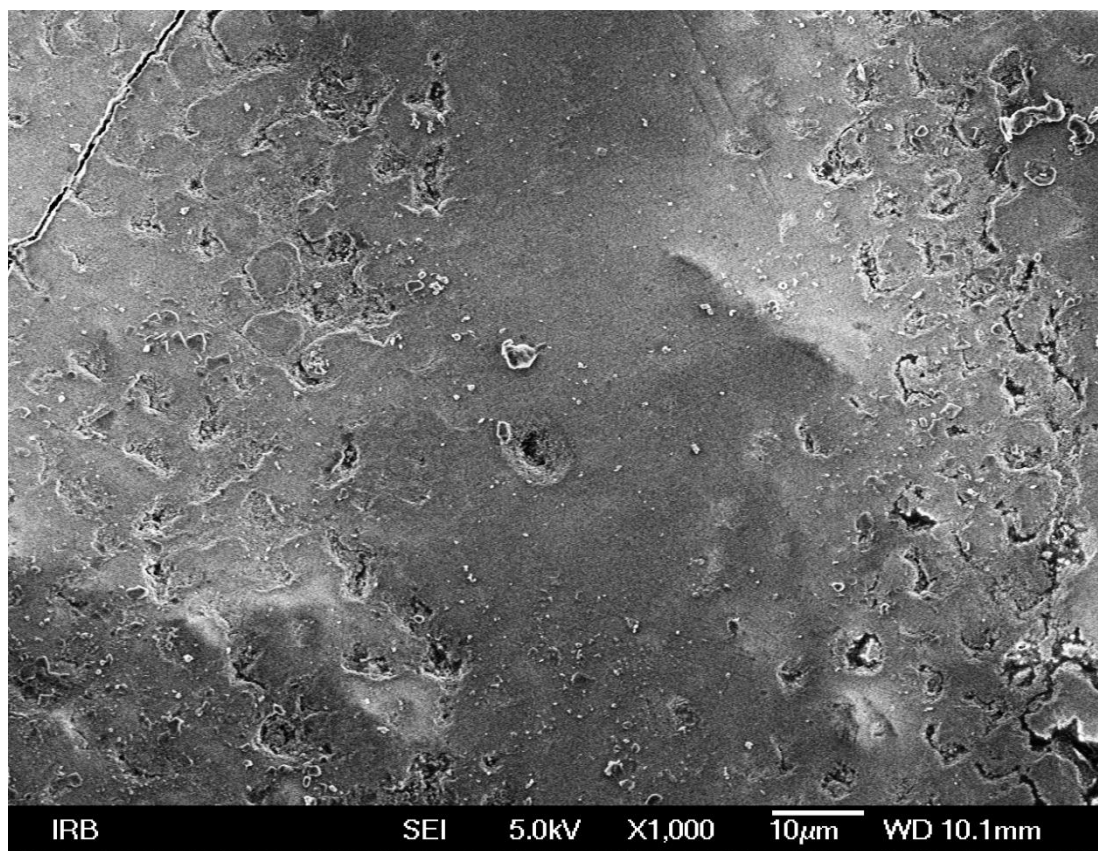
umjetne sline kroz 14 dana i svakodnevne 20 minutne aplikacije ACP gela na površinu cakline i dentina površina cakline pokazala je odlaganje minerala (Slika 12) s inkludiranim, tj. zatvorenim dentinskim tubulusima (Slika 13).



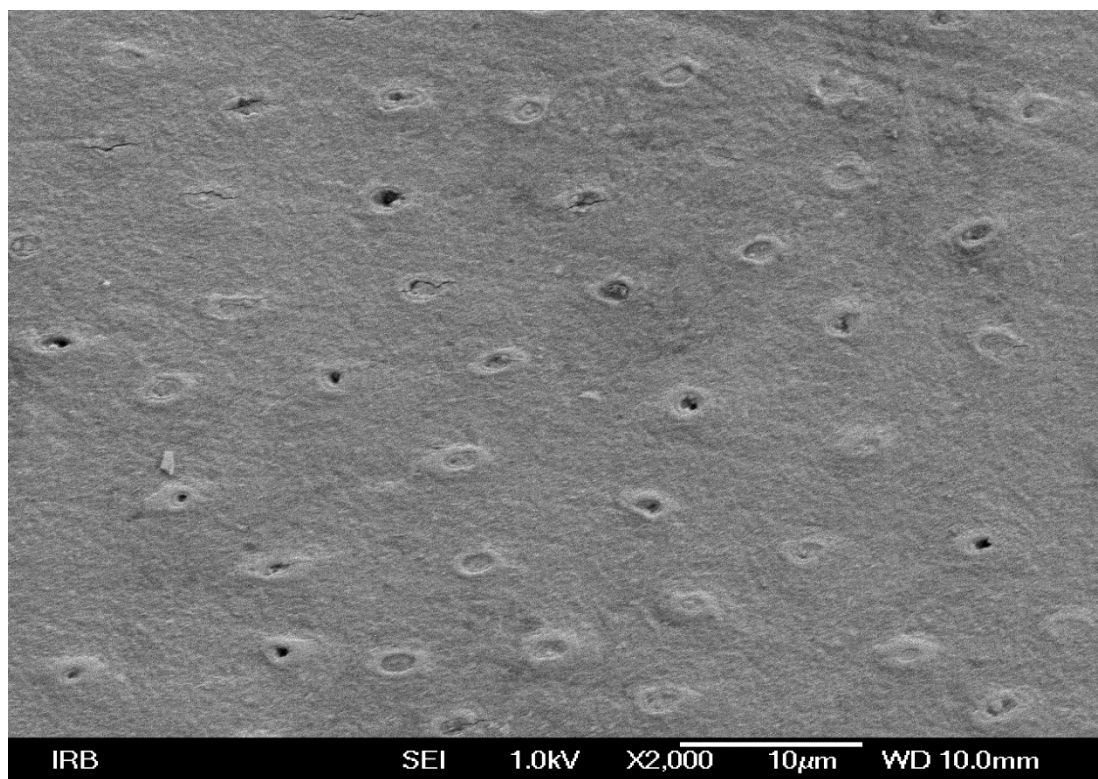
Slika 7. Glatka površina cakline s nekoliko ogrebotina



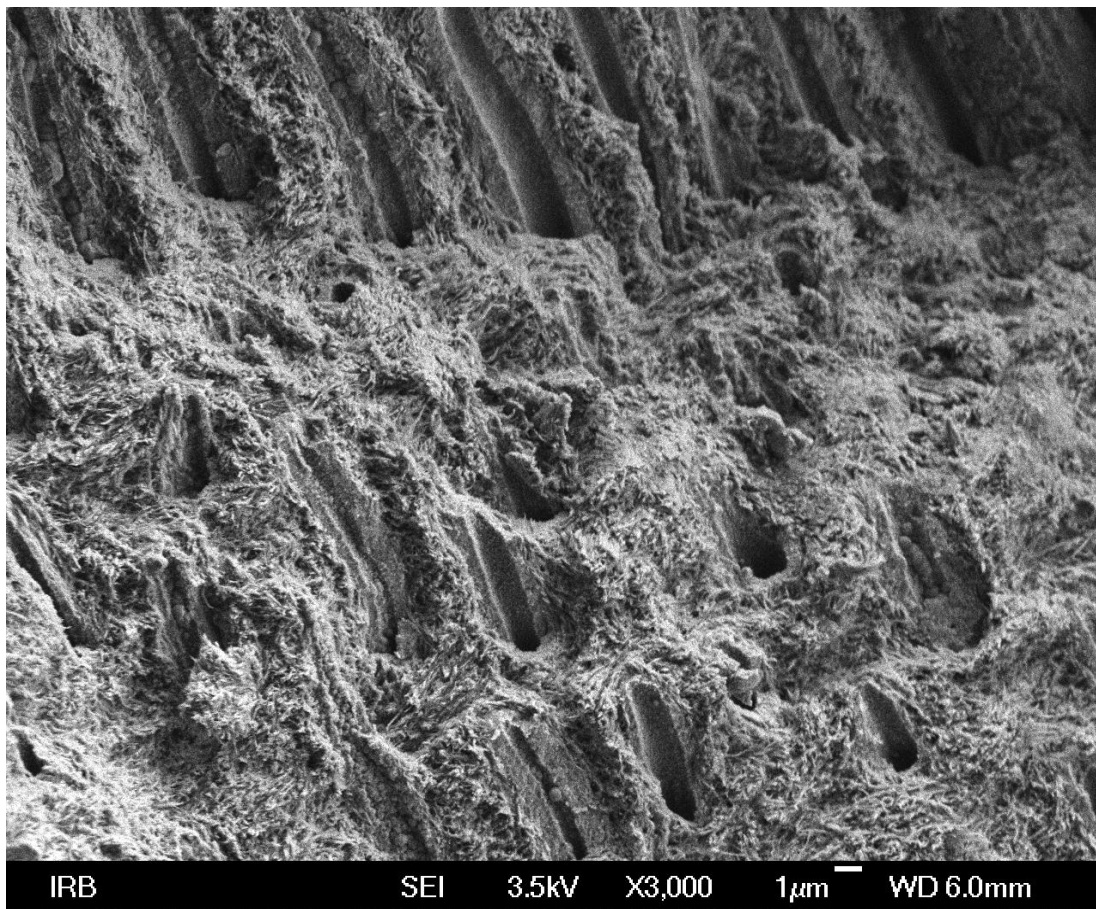
Slika 8. Glatka površina dentina bez otvorenih tubulusa



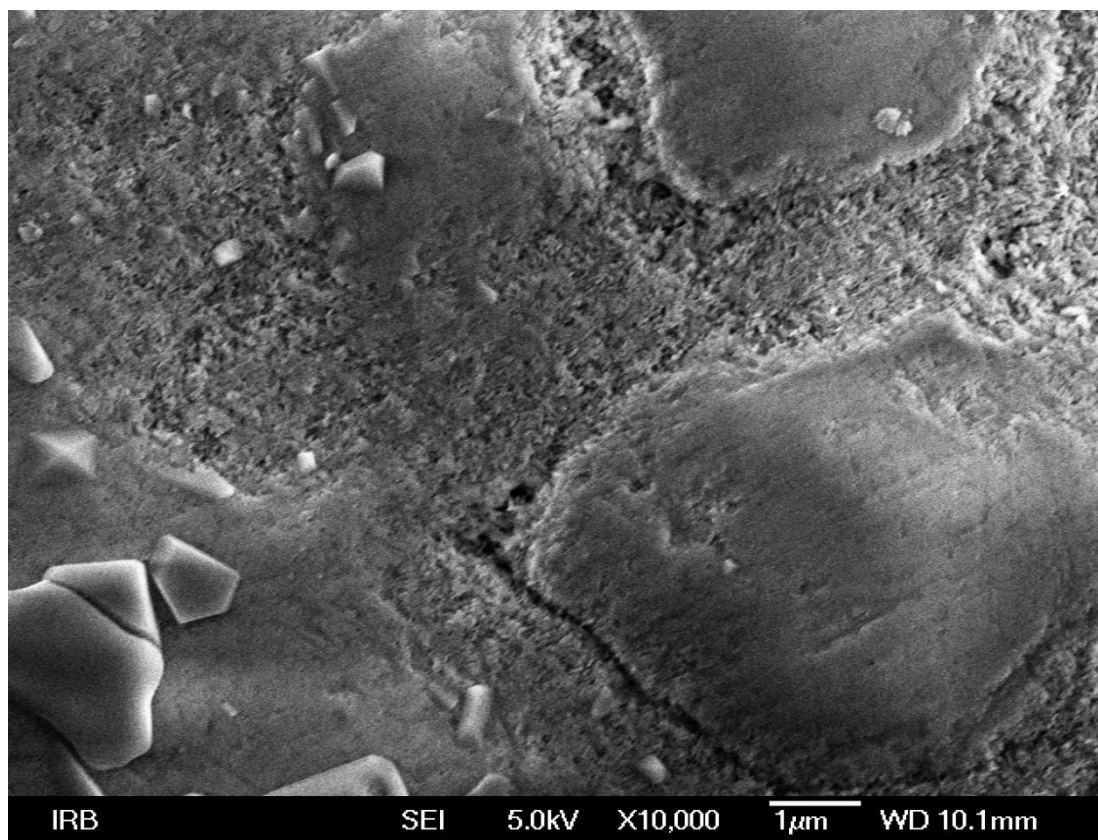
Slika 9. Površina cakline s malim nepravilnostima



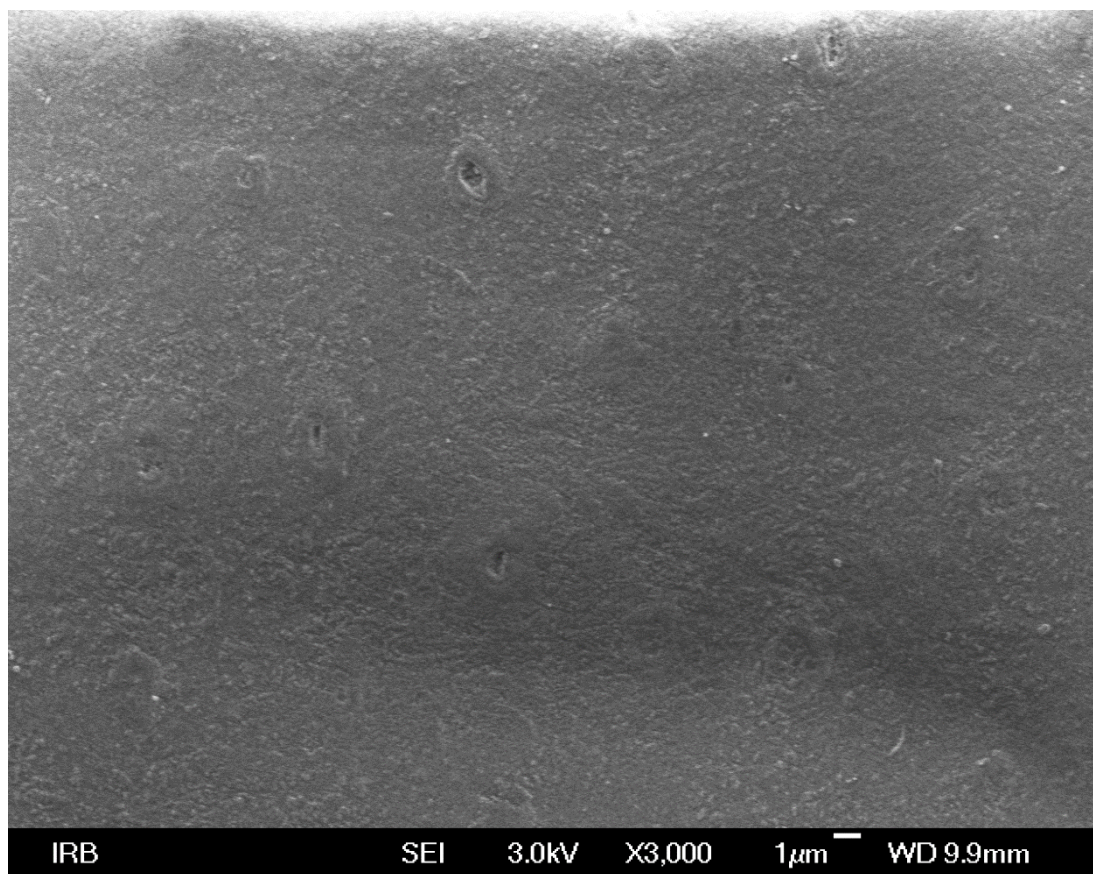
Slika 10. Površina dentina s malim nepravilnostima i otvorenim dentinskim tubulusima



Slika 11. Površina dentina s otvorenim dentinskim tubulusima



Slika 12. Odlaganje kristala ACP-a na površini cakline.



Slika 13. Površina dentina nakon odlaganja ACP-a i zatvoreni dentinski tubulusi.

5. RASPRAVA

5.1. MIKROTVRDOĆA

Izbjeljivanje ima učinak na kemijski sastav kao i mikromorfologiju površine tvrdih zubnih tkiva. Vodikov peroksid je oksidacijsko sredstvo i ima sposobnost otpuštanja snažnih peroksidnih i superoksidnih radikala. Iako je postupak izbjeljivanja složen, osnovni postupak temelji se na reakciji oksidacije, a kao posljedica toga zabilježene su promjene u organskom i anorganskom sastavu, te površini cakline i dentina (40). Vitalno izbjeljivanje zubi je povezano s brojnim nepoželjnim pojavama koje uključuju oštećenja i promjene na površini cakline i dentina, a mogu dovesti do pojave preosjetljivosti koja se može smanjiti korištenjem remineralizacijskih sredstava. Niti jedna dostupna klinička studija nije zabilježila makroskopski i klinički vidljive promjene povezane s vitalnim izbjeljivanjem zubi ili klinički značajno oštećenje zubi. Prisutnost sline, fluorida i ostalih remineralizacijskih sredstava je da održi ravnotežu između demineralizacijskog i remineralizacijskog procesa koji se može dogoditi za vrijeme vitalnog izbjeljivanja zubi (41).

Amorfni kalcijev fosfat (ACP) je jedinstven u klasi kalcijevih fosfata i smatra se direktnim prekursorom biološkog apatita u biomineralizaciji beskrlešnjaka i kralješnjaka. Jedno istraživanje je pokazalo da je uloga ACP olakšavanje nakupljanja nanočestica hidroksilapatita (HA) u visoko uređene strukture ACP inicijalno povezuje HA nanoočestice na način da omogućuje paralelne orijentacije HA nanočestica i inkorporiran je u HA faznom transformacijom kako bi se omogućile više i savršenije formirane strukture koje su karakteristične za HA

biološke strukture (42). ACP otpušta kalcij i fosfatne ione i na taj način osigurava i održava mineralima prezasićenu okolinu koja dovodi do smanjenja demineralizacije i poboljšava remineralizaciju cakline. Primjena CPP-ACP zajedno s preparatima vodikovog peroksida može potaknuti remineralizaciju cakline oslobađajući kalcijeve i fosfatne ione (43).

Promjene u organskom i anorganskom sastavu nakon izbjeljivanja moguće je odrediti testom mikrotvrdoće. U ovome istraživanju koristili smo Vikerov test mikrotvrdoće, dok se kao mogući ostali testovi koriste Knoopov test mikrotvrdoće i test nanotvrdoće. Brojna *in vitro* istraživanja dokazala su promjene na površini cakline nakon izlaganja gelovima vodikovog peroksida koji se koriste za *in-office* izbjeljivanje, pri čemu neka istraživanja pokazuju da te promjene ovise o vrsti i koncentraciji korištenog gela vodikovog ili karbamid peroksida, kao i o njegovoj kiselosti (44). Kiseliji gelovi dovode do većih oštećenja na površini cakline i dentina kao i do većeg smanjenja mikrotvrdoće. Promjene u mikrotvrdoći zabilježene nakon vitalnog izbjeljivanja tako mogu ovisiti o sastavu i pH korištenog gela. Gelovi s niskom pH ponekad mogu biti ispod kritične granice za demineralizaciju cakline $\text{pH} \approx 5.5$ (45).

Iako test mikrotvrdoće ne daje točne podatke o promjeni u sastavu materijala ili tkiva, jedan je od najčešće korištenih testova za dokazivanje promjena na zubnim tkivima nakon dokazivanja demineralizacije i remineralizacije i smatra se pouzdanim za mjerenje i određivanje omekšanja površine cakline i

dentina (46). Mnoga istraživanja bavila su se procjenom koncentracije vodikovog peroksida ili karbamid peroksida i smanjenja mikrotvrdoće cakline i dentina (47, 48). U ovome istraživanju 25% HP i 38% HP gelovi za izbjeljivanje doveli su do značajnog smanjenja površinske mikrotvrdoće cakline i dentina i radna hipoteza da gelovi za izbjeljivanje različite koncentracije dovode do smanjenja površinske mikrotvrdoće je stoga prihvaćena. U skladu s našim istraživanjem, možemo zaključiti da je učinak izbjeljivanja na površinsku mikromorfologiju i mikrotvrdoću povezan s koncentracijom aktivnih sastojaka za izbjeljivanje i izraženiji je za gelove veće koncentracije i kiselosti. Korištenje 38% HP, dovelo je do smanjenja mikrotvrdoće intrakoronarnog dentina (49) što je također zabilježeno i u našem istraživanju. ZOOM2 koji je imao najniži pH (pH=3.20) je pokazao najveće smanjenje površinske mikrotvrdoće u odnosu na BOOST (pH=6.75). Kiseli pH ZOOM2 gela bio je ispod kritične pH vrijednosti 4.5-5.5 ispod koje nastupa demineralizacija cakline, a to se može pripisati niskim koncentracijama kalcija i fosfata i visokim koncentracijama natrija i klora koje mogu dovesti do smanjenja zasićenosti u odnosu na hidroksilapatit (50). BOOST gel imao pH iznad ove kritične vrijednosti, ali je također doveo do demineralizacije. Gelovi za izbjeljivanje s većom kiselosti mogu dovesti do većih promjena u strukturi cakline i dentina te dovesti do većeg smanjenja u mikrotvrdoći, a primjena remineralizacijskih sredstava s kalcijem i fluorom nakon izbjeljivanja može dovesti do povećanja mikrotvrdoće i smanjenja površinskih nepravilnosti (51). Sun i sur. su dokazali da je neutralni 30% HP gel imao jednak učinak na izbjeljivanje i promjenu boje i pri

tome uzrokovao manje promjena na površini cakline nego kiseli 30% HP (52). Slično ovom provedenom istraživanju dokazali su Sa i sur. pri čemu su potvrdili da sredstva za *in-office* izbjeljivanje s niskim pH vrijednostima mogu dovesti do oštećenja cakline i dentina u *in vitro* uvjetima, ali prisutnost prirodne sline može dovesti do smanjenja demineralizacijskog efekta uzrokovanog niskim pH (53).

U nastojanju da se simuliraju intraoralni klinički uvjeti, koji podrazumijevaju prisutnost sline, uzorci su pohranjeni u otopinu umjetne sline prije, za vrijeme i tijekom dva tjedna nakon izbjeljivanja. Također, slina, CPP-ACP, ACP posjeduju važne faktore za remineralizaciju tvrdih zubnih tkiva. Kalcij i fosfor su prirodni gradivni materijal zuba i kada se njihova količina smanji, može doći do razvoja postoperativne preosjetljivosti. Amorfni kalcijev fosfat ima mogućnost regulacije mineralne ravnoteže i povratka izgubljenih minerala i na taj način može smanjiti negativne efekte izbjeljivanja zubi (54,55). SEM analiza post-tretmanom nano-karbonat apatitom (n-CAP) pokazuje da se čestice n-CAP mogu odložiti na oštećenu površinu cakline (56). Također, dodavanje ACP CPP gelu karbamid peroksida može povećati mikrotvrdoću izbjeljivane cakline (57).

U mnogim *in vitro* istraživanjima umjetna slina se koristila kao dobar medij za potencijalnu remineralizaciju tvrdih zubnih tkiva, posebno cakline (58). Post-tretman umjetnom slinom i ACP-om doveo je značajnog povećanja mikrotvrdoće u odnosu na uzorke koji su bili pohranjeni u deioniziranoj vodi. Dva tjedna pohrane uzoraka u otopini umjetne sline nakon i svakodnevnog 20 minutnog tretmana

ACP-om pokazalo je da oba preparata imaju potencijalni remineralizacijski učinak, stoga je hipoteza (3) da umjetna slina i amorfní kalcijev fosfat dovode do remineralizacijskog procesa i povećavaju mikrotvrdoću cakline i dentina nakon postupka izbjeljivanja prihvaćena. Iako se mikrotvrdoća nakon tretmana umjetnom slinom i ACP-om povećala i približila početnim vrijednostima, ovo vrijeme možda nije bilo dovoljno za popravak i reparaciju površinskih oštećenja cakline nakon izbjeljivanja vidljivih na SEM. Dentinski tubulusi su bili zatvoreni što je dobar pokazatelj. Iz studija koje su proučavale remineralizaciju inicijalnih karijesnih lezija u caklini, poznato je da umjetna slina može povratiti izgubljene minerale ili povisiti narušenu mikrotvrdoću. Da Costa Soares i sur. su dokazali da se mikromorfologija i mikrotvrdoća nije oporavila nakon 14 dana tretmana natrijevim fluoridom i primjenom nanohidroksilapatita (59). DE Abreu i sur. su dokazali da preparati vodikovog peroksida i preparati za izbjeljivanje s ACP-om dovode do smanjenja mikrotvrdoće cakline za vrijeme izbjeljivanja dok post-tretman umjetnom slinom kroz 7 i 14 dana dovodi do povećanja mikrotvrdoće prema vrijednostima prije izbjeljivanja (60). Borges i sur. su dokazali da primjena kiselog 35% HP gela za izbjeljivanje značajno smanjuje mikrotvrdoću cakline dok primjena fluora i kombinacije gela kalcija fluora zajedno s umjetnom slinom kroz 15 i 30 dana nakon izbjeljivanja imaju remineralizacijski učinak i dovode do značajnog povećanja mikrotvrdoće (57). Osim preparata ACP CPP preparati fluora su također pokazali pozitivni remineralizacijski učinak. Chen i sur. su zabilježili da dodavanje fluora u sastav gelova za izbjeljivanje može dovesti do neželjenih

interakcija između fluora i karbamid peroksida jer učinak izbjeljivanja CP može biti umanjen stvaranjem sloja kalcija i fluora dok remineralizacijski efekt fluora može biti otežan zbog prisutnosti CP (44). ACP Relief gel osim molekula ACP-a u svom sastavu posjeduje i aktivne čestice natrijevog fluorida.

U kliničkim uvjetima, zubne površine su zaštićene učinkom pelikule i slina pa su demineralizirane površine cakline i dentina nakon izbjeljivanja podložne potencijalnoj remineralizaciji. U *in-vitro* uvjetima, post- tretman ACP-om može poboljšati remineralizaciju i poboljšati površinska oštećenja, osiguravajući kalcijeve i fosfatne ione i stoga se njegova uporaba preporuča nakon postupka izbjeljivanja.

5.2. SEM ANALIZA

Skening elektronska mikroskopija (SEM) se koristi za analizu promjena cakline i dentina nakon mnogih tretmana korištenih u dentalnoj medicini pa tako i za analizu prije i nakon izbjeljivanja zubi. Mnoge studije su zabilježile stvaranje malih udubina, nepravilnosti i povećane površinske poroznosti nakon upotrebe vodikovog ili karbamid peroksida na površini cakline ili dentina, dok neke studije nisu zabilježile nikakve značajnije promjene na površini tvrdih zubnih tkiva, kao i tendenciju tome da površine i dalje ostaju glatke i nepromjenjene kao i prije postupka izbjeljivanja zubi. SEM analiza post-tretmanom nano-karbonat apatitom (n-CAP) pokazuje da se čestice n-CAP mogu odložiti na oštećenu površinu

cakline. Mnoga istraživanja procjenjivala su učinak sredstava HP i CP na površinu cakline i dentina. SEM analiza je pokazala promjene u caklini i dentinu kao što su pojavnost erozija i poroznosti koje mogu biti povezane s produženim djelovanjem sredstva za izbjeljivanje na površinu tkiva, a povezuju se s djelovanjem uree i kisika (58). U ovom istraživanju, oba gela za izbjeljivanje pokazala su male promjene u površinskoj glatkoći i različite stupnjeve oštećenja površine cakline i dentina. Nakon izbjeljivanja gelovima 25% i 38% vodikovog peroksida došlo je do otvaranja dentinskih tubulusa. Radna hipoteza (3) da izbjeljivanje gelovima za vitalno izbjeljivanje ne utječe na promjenu površinske mikromorfologije cakline i dentina je odbačena.

Nakon pohrane u otopini umjetne sline kroz 14 dana i svakodnevne 20 minutne aplikacije ACP gela na površinu cakline i dentina površina cakline pokazala je odlaganje minerala s inkludiranim, tj. zatvorenim dentinskim tubulusima. D'Amario i sur. su SEM analizom dokazali da ne dolazi do bitnih promjena na površini kada se sredstvo za izbjeljivanje koristi jednom ili dva puta dok višestruka primjena dovodi do promjena u prizmatskoj strukturi cakline (62). Pohrana uzoraka u umjetnoj slini kroz 14 dana uz svakodnevnu 20 minutnu aplikaciju ACP-a dovelo je do odlaganja kristala ACP-a na površini izbjeljivane cakline i dentina, pri čemu je došlo do zatvaranja izbjeljivanjem otvorenih dentinskih tubulusa. Slično je pronađeno kod primjene preparata fluora kod kojih dolazi do odlaganja kristala kalcija i fluora na površini i na taj način se smanjuje penetracija peroksida u unutrašnjost cakline. Preparati tretirani fluorom nakon

izbjeljivanja pokazali su da smanjenje erozivnih oštećenje, ali bez odlaganja kristala na površini, pri čemu je došlo do smanjenja mikrotvrdoće (54). Sasaki i sur. su dokazali da poboljšanje mikromorfoloških karakteristika cakline nastupa nakon odlaganja kristala kalcija i fluorida koji pri tome održavaju balans između demineralizacije i remineralizacije (63). Gelovi koji posjeduju ACP dovode do remineralizacije predemineralizirane kravlje cakline bolje nego preparati na bazi fluora (64). U istraživanju de Vasconcelos i sur. (65) preparati koji sadrže ACP CPP u kombinaciji s peroksidom dovode do odlaganja minerala na površini tvrdih zubnih tkiva. U kliničkim uvjetima, površine cakline i dentina su zaštićene djelovanjem pelikule i sline tako da demineralizirane površine tvrdih zubnih tkiva nakon izbjeljivanja mogu podleći prirodnom remineralizacijskom učinku.

U ovome istraživanju je dokazano da su promjene u caklini i dentinu nakon izbjeljivanja najčešće opisane kao blage do umjerene, bez gubitka površinske strukture, ali je bilo teško odrediti jesu li mikroskopski reverzibilne. U *in vitro* uvjetima post-tretman ACP-om se pokazao kao povoljan za smanjenje površinskog oštećenja i poboljšanja remineralizacije tvrdih zubnih tkiva osiguravajući kalcijeve i fosfatne ione i trebao bi ih koristiti nakon postupka vitalnog izbjeljivanja zubi.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Korištenje gelova za izbjeljivanje 25%, 38% vodikovog peroksida dovodi do smanjenja mikrotvrdoće cakline i dentina nakon izbjeljivanja
2. Kiseli preprat za izbjeljivanje ZOOM2 (pH=3.20) doveo je do većeg smanjenja u površinskoj mikrotvrdoći u odnosu na BOOST (pH=6.20)
3. Izbjeljivanje gelovima 25% HP i 38% HP utječe na promjenu površinske mikromorfologije cakline i dentina
4. Korištenje preparata umjetne sline i amorfnog kalcijevog fosfata nakon tretmana izbjeljivanja dovodi do potencijalnog remineralizacijskog učinka i povećanja mikrotvrdoće cakline i dentina nakon postupka izbjeljivanja
5. Strukturne promjene cakline i dentina nakon izbjeljivanja podložne su remineralizacijskom učinku amorfnog kalcijevog fosfata i otopini umjetne sline.

7. SAŽETAK

POVRŠINSKE PROMJENE CAKLINE I DENTINA NAKON KORIŠTENJA DVA SREDSTVA ZA VITALNO IZBJELJIVANJE ZUBI

Sredstva za izbjeljivanje zubi mogu utjecati na kemijska i fizička svojstva, kao i na mikromorfološku strukturu cakline i dentina, na što se mora pripaziti prilikom provođenja ovakve terapije. Svrha ovoga istraživanja je bila procijeniti učinak dvaju sredstava za izbjeljivanje koja sadrže visoke koncentracije vodikovog peroksida na površinu cakline i dentina, kao i potencijalni remineralizacijski učinak gela amorfnog kalcijevog fosfata (ACP). Dvadesetpet ljudskih trećih molara podijeljeno je u dvije skupine, raspiljeno napola i obje površine su zatim tretirane gelom ZOOM2 ili Opalescence BOOST u trajanju od 3×15 minuta. Vickersova mikrotvrdoća cakline i dentina izmjerena je neposredno prije, nakon postupka izbjeljivanja i nakon tretmana umjetnom slinom i gelom ACP-a kroz 2 tjedna ili nakon držanja u deioniziranoj vodi kroz isto razdoblje. Površinske promjene su promatrane SEM mikroskopom. Korišteni su Mješoviti ANOVA model i Wilcoxon Rank Sum test. Oba gela za izbjeljivanje pokazala su značajno smanjenje u površinskoj mikrotvrdoći cakline i dentina ($p < 0,001$ za BOOST i ZOOM2). ZOOM2 koji je imao nižu pH vrijednost je pokazao veće smanjenje površinske mikrotvrdoće ($p = 0,005$) u odnosu na BOOST. Naknadna obrada umjetnom slinom i pripravkom ACP-a pokazla je značajno povećanje površinske mikrotvrdoće ($p < 0,001$). Nakon izbjeljivanja površine cakline i dentina su pokazale blage ili umjerene promjene bez gubitka površinske strukture.

Zaključno, oba sredstva za izbjeljivanje dovela su do smanjenja površinske mikrotvrdoće. Tretman ACP-om nakon izbjeljivanja doveo je do povišenja mikrotvrdoće i smanjio površinska oštećenja poboljšavši remineralizaciju tvrdih zubnih tkiva.

8. SUMMARY

SURFACE CHANGES OF ENAMEL AND DENTIN AFTER TWO DIFFERENT BLEACHING PROCEDURES

Bleaching agents have effect on chemical / physical and morphological structure of enamel and dentine that must be taken into account when this therapy is used. The aim of this *in vitro* study was to evaluate the effects of two bleaching agents containing high concentration of hydrogen peroxide for professional use on human enamel and dentine surface and to evaluate the potential remineralizing effect of amorphous calcium phosphate gel (ACP). Twenty five human third molars were divided into two groups and dissected in half and both surfaces were bleached with either ZOOM2 or Opalescence BOOST for 3×15 minutes. Vickers microhardness of enamel and dentine was measured before, after the bleaching treatment and after treatment with artificial saliva and ACP gel or 2 weeks storage in deionized water. Surface microstructure was evaluated using SEM. Mixed model ANOVA and Wilcoxon Rank Sum test were used. Both bleaching agents showed significant reduction in surface microhardness ($p < 0.001$ for both BOOST and ZOOM2 application). ZOOM2 which had the lower pH value showed larger decrease in surface microhardness ($p = 0.005$) compared to BOOST. Post-treatment with artificial saliva and ACP showed significant increase in surface microhardness ($p < 0.001$). After the bleaching procedure enamel and dentine surface microstructure showed mild or slight alterations with no loss of superficial structure.

Both bleaching agents resulted in a reduction in surface enamel and dentine microhardness. Treatment with ACP demonstrated the increase in surface microhardness, improved surface roughness and enhance the remineralization of the hard dental tissues.

9. LITERATURA

1. Sulieman M. An overview of tooth discoloration: extrinsic, intrinsic and internalized stains. *Dent Update*. 2005;32:463-8.
2. Ten Bosch JJ, Coops JC. Tooth color and reflectance as related to light scattering and enamel hardness. *J Dent Res*. 1995;74:374-80.
3. Watts A, Addy M. Tooth discoloration and staining: a review of the literature. *Br Dent J*. 2001;190:309-16.
4. Joiner A, Jones NM, Raven SJ. Investigation of factors influencing stain formation utilizing an in situ model. *Adv Dent Res*. 1995;9:471-6.
5. Joiner A. Tooth colour: a review of the literature. *J Dent*. 2004;32:3-12.
6. Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching-a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14:292-304.
7. Hattab FN, Qudeimat MA, Al-Rimawi HS. Dental discoloration: an overview. *J Esthet Dent*. 1999;11:291-310.
8. Scannapieco FA, Levine MJ. Saliva and dental pellicles. In: Genco RJ, Goldman HM, Cohen WD. *Contemporary periodontics*. St Louis: Mosby; 1990.
9. Nathoo SA. The chemistry and mechanisms of extrinsic and intrinsic discoloration. *J Am Dent Assoc*. 1997;128:6-10.
10. Gorlin RJ, Goldman HM. Environmental pathology of the teeth. In: Thoma's oral pathology. 6th ed. St Louis: Mosby; 1970.

11. Vogel RI. Intrinsic and extrinsic discoloration of the dentition. J Oral Med. 1975;30:99-104.
12. Attin T, Paque F, Ajam F, Lennon AM. Review of the current status of tooth whitening with the walking bleach technique. Int Endod J. 2003;36:313-29.
13. Van der Burgt TP, Plaesschaert AJM. Tooth discoloration induced by dental materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1985;60:666-9.
14. Zantner C, Derdilopoulou F, Martus P, Kielbassa AM. Randomized clinical trail on the effectiveness of a new bleaching lacquer for self-application. Oper Dent. 2006;31:308-316.
15. Gerlach RW. Vital bleaching with whitening strip: Summary of Clinical Research on Effectiveness and Tolerability. I Contemp Dent Pract. 2001;(2)3:001-16.
16. Lim MY, Lum SOY, Poh RSC, Lee GP, Lim KC. An in vitro comparison of the bleaching efficacy of 35 % carbamide peroxide with established intracoronal bleaching agents. Int Endod J. 2004;37:483-8.
17. Rodrigues JA, Basting RT, Serra MC, Rodrigues Junior AL. Effects of 10% carbamide peroxide bleaching materials on enamel microhardness. Am J Dent. 2001;14:67-71.

18. Matis BA, Gaião U, Blackman D, Schultz FA, Eckert GJ. In vivo degradation of bleaching gel used in whitening teeth. J Am Dent Assoc. 1999;130: 227-235.
19. Wiegand A, Vollmer D, Foitzik M, Attin R, Attin T. Efficacy of different whitening modalities on bovine enamel and dentin. Clin Oral Investig. 2005;9:91-97.
20. Feinmann RA, Goldstein RE, Garber DA. Bleaching teeth. Chicago. Quintessence; 1987.
21. Haywood VB. Nightguard vital bleaching: current concepts and research. J Am Dent Assoc. 1997;128:19-25.
22. Casey LJ, Schindler WG, Murata SM, Burgess JO. The use of dentinal etching with endodontic bleaching procedures. J Endod. 1989;15(11):535-8.
23. Baratieri LN, Ritter AV, Monteiro S, de Andrada MAC, Vieira LCC. Nonvital tooth bleaching: guidelines for the clinician. Quintessence Int. 1995;26:597-608.
24. Leonard RH, Haywood VB, Phillips C. Risk factors for developing tooth sensitivity and gingival irritation associated with nightguard vital bleaching. Quintessence Int. 1997;28:527-534.
25. Fugaro JO, Nordahl I, Fugaro OJ et al. Pulp reaction to vital bleaching. Oper Dent. 2004;29(4):363-368.
26. Reyto R. Laser tooth whitening. Dent Clin North Am 1993;42:755-62.

27. Haywood VB, Cordero R, Wright K, Gendreau L, Rupp R, Kotler M, et al. Brushing with a potassium nitrate dentifrice to reduce bleaching sensitivity. J Clin Dent. 2005;16:17-22.
28. Giniger M, Macdonald J, Ziemba S, Felix H. The clinical performance of professionally dispensed bleaching gel with added amorphous calcium phosphate. J Am Dent Assoc. 2005;136:383–92.
29. Attin T, Vollmer D, Wiegand A, Attin R, Betke H. Subsurface microhardness of enamel and dentin after different external bleaching procedures. Am J Dent. 2005;18:8-12.
30. McCracken MS, Haywood VB, et al. Demineralisation effects of 10 % carbamide peroxide. J Dent. 24:395-8.
31. Silva AP, Oliveira R, Cavalli V, Giannini M. Effect of peroxide based bleaching agents on enamel ultimate tensile strength. Oper Dent. 2005;30:318-24.
32. Della Bona A, Baghi N, Berry TG, Godwin JM. In – vitro bond strength testing of bleached dentine. J Dent Res. 1992;71:659.
33. Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: Biologic adverse effects – a review. Quintessence Int. 2008;39(8)645-59.
34. Tam LE, Abdool R, El-Badrawy W. Flexural strength and modulus properties of carbamide peroxide-treated bovine dentin. J Esthet Restor Dent. 2005;17(6):359-67.

35. Titley KC, Torneck CD, Smith DC, Chernecky R, Adibfar A. Scanning electron microscopy observations on the penetration and structure of resin tags in bleached and unbleached bovine enamel. *J Endod.* 1991;17(2):72-5.
36. Haywood VB. Achieving, maintaining and recovering successful tooth bleaching. *J Esthet Dent.* 1996;8(1):31-8.
37. Staničić T. Fizikalnokemijski procesi tijekom karijesne lezije. U Šutalo i sur. *Patologija i terapija tvrdih zubnih tkiva.* Zagreb: Naklada Zadro; 1994.
38. Dorozhkin SV. Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater.* 2010;44:57-75.
39. Longbottom L, Ekstrand K, Zero D, Kambara M. Novel Preventive Treatment Options. U Pitts N. *Detection, Assessment, Diagnosis and Monitoring of Caries.* Basel: S. Karger AG; 2009.
40. Rodrigues JA1, Basting RT, Serra MC, Rodrigues Júnior AL. Effects of 10% carbamide peroxide bleaching materials on enamel microhardness. *Am J Dent.* 2001 Apr;14(2):67-71.
41. Magalhães JG, Marimoto AR, Torres CR, Pagani C, Teixeira SC, Barcellos DC. Microhardness change of enamel due to bleaching with in-office bleaching gels of different acidity. *Acta Odontol Scand.* 2012;70:122-6.

42. Abouassi T, Wolkewitz M, Hahn P. Effect of carbamide peroxide and hydrogen peroxide on enamel surface: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2011;15:673-80.
43. Markowitz K, Pashley DH. Discovering new treatments for sensitive teeth: the long path from biology to therapy. *J Oral Rehabil.* 2008;35:300-15.
44. Chen HP, Chang CH, Liu JK, Chuang SF, Yang JY. Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel surface properties. *J Dent.* 2008;36:718-25.
45. Tao J, Pan H, Zeng Y, Xu X, Tang R. Roles of amorphous calcium phosphate and biological additives in the assembly of hydroxyapatite nanoparticles. *J Phys Chem. B* 2007;111:13410-8.
46. Manton DJ, Walker GD, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by the use of three commercially available sugar-free gums. *Int J Paediatr Dent.* 2008;18:284–90.
47. Sun L, Liang S, Sa Y, Wang Z, Ma X, Jiang T, Wang Y. Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide. *J Dent.* 2011;686-92.
48. Rodrigues JA, Basting TR, Serra MC, Rodrigues AL. Effect of 10% carbamide peroxide bleaching materials on enamel microhardness. *Am J Dent.* 2001;14:67–71.

49. Majeed A, Grobler SR, Moola MH, Rossouw RJ, van Kotze TJ. Effect of four different opalescence tooth-whitening products on enamel microhardness. SADJ. 2008;63:282-4,
50. Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. Dent Mater. 2005;21:1059-67.
51. Barros-Matoso F, de Souza-Gabriel AE, Furtado-Messias DC, de Sousa-Neto MD, Alfredo E. Microhardness of intracoronal dentin exposed to bleaching and fluoride treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011;112:1-5.
52. Sun L, Liang S, Sa Y, Wang Z, Ma X, Jiang T, Wang Y. Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide. J Dent. 2011;39:686-92.
53. Sa Y, Sun L, Wang Z, Ma X, Liang S, Xing W, Jiang T, Wang Y. Effects of two in-office bleaching agents with different pH on the structure of human enamel: an in situ and in vitro study. Oper Dent. 2013;38:100-10.
54. Attin T, Buchalla W, Gollner M, Hellwig E. Use of variable remineralization periods to improve the abrasion resistance of previously eroded enamel. Caries Res. 2000;34:48–52.
55. de Vasconcelos AA, Cunha AG, Borges BC, Vitoriano Jde O, Alves-Júnior C, Machado CT, dos Santos AJ. Enamel properties after tooth bleaching with

hydrogen/carbamide peroxides in association with a CPP-ACP paste. *Acta Odontol Scand.* 2012;70:337-43.

56. Kim YS, Kwon HK, Kim BI. Effect of nano-carbonate apatite to prevent re-stain after dental bleaching in vitro. *J Dent.* 2011;39:636-42.

57. Borges BC, Borges JS, de Melo CD, Pinheiro IV, Santos AJ, Braz R, Montes MA. Efficacy of a novel at-home bleaching technique with carbamide peroxides modified by CPP-ACP and its effect on the microhardness of bleached enamel. *Oper Dent.* 2011;36:521-8.

58. Meyer-Lueckel H, Umland N, Hopfenmueller W, Kielbassa AM. Effect of mucin alone and in combination with various dentifrices on in vitro remineralization. *Caries Res.* 2004;38:478–83. 24.

59. da Costa Soares MU, Araújo NC, Borges BC, Sales WD, Sobral AP. Impact of remineralizing agents on enamel microhardness recovery after in-office tooth bleaching therapies. *Acta Odontol Scand.* 2013;71:343-30.

60. De Abreu DR, Sasaki RT, Amaral FL, Flório FM, Basting RT. Effect of home-use and in-office bleaching agents containing hydrogen peroxide associated with amorphous calcium phosphate on enamel microhardness and surface roughness. *J Esthet Restor Dent.* 2011;23:158-68.

61. Kim YS, Kwon HK, Kim BI. Effect of nano-carbonate apatite to prevent re-stain after dental bleaching in vitro. *J Dent.* 2011;39:636-42.

62. D'Amario M, D'Attilio M, Baldi M, De Angelis F, Marzo G, Vadini M, Varvara G, D'Arcangelo C. Histomorphologic alterations of human enamel after repeated applications of a bleaching agent. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;25:1021-7.
63. Sasaki RT, Arcanjo AJ, Flório FM, Basting RT. Micromorphology and microhardness of enamel after treatment with home-use bleaching agents containing 10% carbamide peroxide and 7.5% hydrogen peroxide. *J Appl Oral Sci*. 2009;17:611-6.
64. Tschoppe P, Neumann K, Mueller J, Kielbassa AM. Effect of fluoridated bleaching gels on remineralization of predemineralized bovine enamel in vitro. *J Dent*. 2009;37:156–62.
65. de Vasconcelos AA, Cunha AG, Borges BC, Vitoriano Jde O, Alves-Júnior C, Machado CT, dos Santos AJ. Enamel properties after tooth bleaching with hydrogen/carbamide peroxides in association with a CPP-ACP paste. *Acta Odontol Scand*. 2012;70:337-43.

10. ŽIVOTOPIS

Eva Klarić rođena je 8. rujna 1983. godine u Zagrebu gdje je 1998. završila osnovnu školu, a 2002. je maturirala na Zdravstvenom učilištu – smjer zubotehničar. Iste godine upisala je Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu koji apsolvira 2007. godine. Za vrijeme studija nagrađena je Dekanovom nagradom za akademsku godinu 2003/04. i Rektorovom nagradom za akademsku godinu 2006/07., te je bila uvrštena u deset najuspješnije diplomiranih studenata u godini 2007/08. Obavljala je demonstrature na Katedri za fiziologiju i Zavodu za parodontologiju te Zavodu za stomatološku protetiku.

Od svibnja 2009. zaposlena je kao znanstveni novak na projektu prof. dr. sc. Zrinke Tarle "Nanostruktura restorativnih materijala i interakcije s tvrdim zubnim tkivima". 2013. godine doktorirala je na temu "Procjena učinka novih izvora svjetlosti za izbjeljivanje zubi". 2014. godine položila je specijalistički ispit iz endodoncije i restaurativne dentalne medicine. Od 2012. surađuje na projektu "Prosudba novih bioaktivnih materijala i postupaka u restaurativnoj dentalnoj medicini" HRZZ i projektu Poslovno-inovacijske agencije Republike Hrvatske (BICRO).

Autor je nekoliko znanstvenih i stručnih članaka. Od stranih jezika služi se engleskim i njemačkim jezikom. Član je Hrvatske komore dentalne medicine, Hrvatskog endodontskog društva i International Association for Dental Research.