Učinak novih izvora svjetlosti za izbjeljivanje zuba

Klarić, Eva

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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:127:047946

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository

Sveučilište u Zagrebu
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Eva Klarić

UČINAK NOVIH IZVORA SVJETLOSTI ZA IZBJELJIVANJE ZUBA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Eva Klarić

EFFECT OF NEW LIGHT SOURCES FOR TEETH BLEACHING

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.

Sveučilište u Zagrebu
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Eva Klarić

UČINAK NOVIH IZVORA SVJETLOSTI ZA IZBJELJIVANJE ZUBA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Zrinka Tarle

Zagreb, 2013.

University of Zagreb

SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Eva Klarić

EFFECT OF NEW LIGHT SOURCES FOR TEETH BLEACHING

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

prof. dr. sc. Zrinka Tarle

Zagreb, 2013.

Rad je izrađen na Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, Laboratoriju za femtosekundnu lasersku spektroskopiju Instituta za Fiziku u Zagrebu i Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Istraživanje je obavljeno u sklopu projekta "Nanostruktura restaurativnih materijala i interakcije s tvrdim zubnim tkivima" (065-0352851-0410) finaciranog od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH, te programa Hrvatske zaklade za znanost "Prosudba novih bioaktivnih materijala i postupaka u restaurativnoj dentalnoj medicini".

Voditelj rada: **prof. dr. sc. Zrinka Tarle**
Zavod za endodonciju i restaurativnu stomatologiju
Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Gundulićeva 5.
10 000 Zagreb

Lektor hrvatskog jezika: **Mijo Ilijašević, prof.**
Đakovačka 3.
10 000 Zagreb

Lektor engleskog jezika: **mr. sc. Lidija Štefić, prof.**
Poljanička 8.
10 000 Zagreb

Rad sadrži:
216 stranica
47 tablica
101 slika
1 CD

Zahvaljujem voditelju rada prof.dr.sc. Zrinki Tarle na mentorstvu i stručnom vodstvu tijekom studija te nesebičnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije. Zahvaljujem joj na stvaranju poticajne radne sredine, prenošenju znanja i iskustava, a sve u svrhu izrade kvalitetnog istraživanja i znanstvenog usavršavanja.

Hvala inžinjerima Mariju Rakiću sa Instituta za fiziku i Marijanu Marciušu sa Instituta Ruđer Bošković na suradnji u eksperimetalnom dijelu i odgovorima na sva moja pitanja.

Zahvalnost i radost zbog dovršetka ovog doktorskog rada dijelim sa svojom obitelji i prijateljima kojima zahvaljujem na ljubavi, bezuvjetnoj podršci i neizmjernoj vjeri u moj uspjeh.

Svojim roditeljima Kazimiru i Slavici posvećujem svaki svoj uspjeh, kao i ovaj doktorski rad.

Najveću zahvalnost želim izraziti Ivanu na riječima podrške, strpljenju, razumijevanju i pomoći za vrijeme istraživačkog rada i pisanja doktorske disertacije.

SAŽETAK

Izbjeljivanje zubi je postupak kojim se tretiraju te u određenom stupnju otklanjaju različite diskoloracije zubi. Aktivni spoj svih sredstava za izbjeljivanje je vodikov peroksid. Mehanizam reakcije vodikovog peroksida nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da je proces oksidacije, gdje se velike pigmentirane molekule razlažu u manje, odgovoran za izbjeljivanje. Izvori svjetlosti mogu poboljšati izbjeljivanje tako što fotokatalitički ili termokatalitički ubrzavaju aktivni raspad molekula vodikovog peroksida.

U ovome istraživanju ispitivao se učinak novih izvora svjetlosti: LED405, OLED i femtosekundnog lasera, a kao kontrolni izvor svjetlosti koristio se ZOOM2. Od komercijalnih sredstva za izbjeljivanje koristili su se 10%, 16% i 30% gel karbamid peroksida te 25% i 38% gel vodikovog peroksida.

Povišenje temperature pulpne komore iznad kritične vrijednost od 5.5 º C zabilježeno je prilikom korištenja fokusiranog femtosekundnog lasera i ZOOM2 izvora svjetlosti, dok nefokusirani femtosekundni laser, LED405 i OLED nisu pokazali značajan porast temperature u pulpnoj komori i na površini. Aktivacija gelova za izbjeljivanje ranije navedenim izvorima svjetlosti nije pokazala veća oštećenja površine cakline i dentina, kao i pojačano smanjenje mikrotvrdoće, nego kada su se koristili smo gelovi za izbjeljivanje bez svjetlosne aktivacije. U kemijskom sastavu cakline i dentina nakon izbjeljivanja također su zabilježene promjene u kvantitativnom omjeru elemenata specifičnih za ova tvrda zubna tkiva dok su se preparatima amorfnog kalcijevog fosfata ili boravkom u umjetnom slini sve ranije navedene strukturne, kemijske i morfološke promjene vratile na približno početne vrijednosti, odnosno došlo je i do značajnog porasta određenih kemijskih elemenata odgovornim za remineralizaciju i potencijalni karijesprotektivni učinak (Ca, F).

Novi izvori svjetlosti LED405 i femtosekundni laser, u kombinaciji s gelovima za izbjeljivanje, doveli su do značajnog poboljšanja u promjeni boje obojanih pastila hidroksilapatita u odnosu na OLED i mjerenja pri kojima smo koristili samo gelove bez svjetlosne aktivacije.

Zaključno, sredstava za izbjeljivanje, korištena u kontroliranim kliničkim uvjetima pokazala su potencijalni genotoksični i karcinogeni učinak na stanice oralne sluznice. Genom stanica pri tome je narušen, ali ne do vrijednosti koja bi bila klinički značajna.

Ključne riječi: izbjeljivanje zubi, svjetlost, karbamid peroksid, vodikov peroksid, mikrotvrdoća, mikrostruktura, temperatura, amorfni kalcijev fosfat, genotoksičnost

EXTENDED SUMMARY

The purpose

Tooth whitening is becoming one of the most popular esthetic and corrective treatments for discolored teeth. Bleaching can be performed internally on non-vital teeth or externally on vital teeth by applying hydrogen peroxide, sodium perborate or carbamide peroxide, the most common agents used for bleaching. For acceleration or more effective tooth whitening, different light sources may be used. When the bleaching agent is activated under the influence of light, some amount of light is absorbed and the resulting energy is converted into heat. This can be perceived as a possible side effect during this type of tooth whitening. Therefore, light sources can have photothermal effects which are then associated with the chemical effect of the bleaching materials. In light-activated tooth bleaching procedures, there is a great concern about the heat generated by the light source, which may cause pulp irritation or severe damage such as necrosis. One of the purposes of the present study was to evaluate the surface and intrapulpal temperature changes after bleaching treatment with different gels of hydrogen peroxide (in further text HP) and carbamide peroxide (in further text CP) subjected to different sources of light activation (LED405, OLED, focused and unfocused femtosecond laser and ZOOM2).

Also, one of the aims was to evaluate the influence of five bleaching agents on surface microstructure, change in chemical structure and microhardness of human tooth enamel and dentine as well as the change in color of stained specimens before and after the bleaching with different bleaching agents supported by new light sources. Finally, a possible genotoxic effect of two bleaching gels with high concentration of hydrogen peroxide on oral mucosa was investigated.

Materials and methods

Light sources used in this study were: LED405, OLED, femtosecond laser and ZOOM2. Each experimental group was treated with one of the following: 25% and 38% HP gel and 10%, 16% and 30% CP bleaching gels. For intrapulpal and surface temperature measurements, K-type thermocouple and infrared thermometer were used to repeatedly measure the temperature increase. Tooth surface was treated with five bleaching agents and vaseline which served as a control. For temperature measurements, we used extracted human maxillary central incisors and canines. Vickers microhardness was measured with a load of

100 g for 10 seconds at the baseline, after the last bleaching treatment and after 2 weeks storage in artificial saliva and surface treatment with amorphous calcium phosphate gel (in further text ACP) or 2 weeks storage in deionized water. Enamel and dentine surface morphology was observed under scanning electron microscopy (SEM) while structural and chemical changes were evaluated using energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). For microhardness as well as SEM and EDS measurements, extracted human third molars were used.

Change in color was determined by RGB colorimeter and UV VIS NIS spectrophotometer. For color measurement, specially made pastilles of hydroxyapatite were used. Genotoxic effect of two bleaching agents was analyzed using micronucleus test and the research was conducted on 22 human subjects.

Results

The average increases in the pulp chamber and tooth surface temperatures for LED405, OLED and unfocused femtosecond laser were below the critical temperature threshold of 5.5°C, contrary to the treatments involving ZOOM2 and focused femtosecond laser, regardless of bleaching gel application. All bleaching agents showed significant reduction in surface microhardness. ZOOM2, which had the lower pH value (pH=3.20), showed larger decrease in surface microhardness compared to BOOST (pH=6.75) and 30 %, 16% and 10 % CP (pH=7.0). The treatment with ACP and artificial saliva can increase microhardness and reduce the mineral loss after bleaching treatment.

After the bleaching procedure with highly concentrated HP and CP gels, enamel and dentine surface microstructure showed mild or slight alterations with no loss of superficial structure, while low concentration CP gels show no change in morphological structure of tested hard dental tissue. A statistically significant increase in Ca and F ions was found after the bleaching treatment and after the additional treatment with ACP and artificial saliva.

The change in color before and after the whitening treatment with different light sources was measured using RGB and UV VIS NIR spectral analysis. After 30 minutes of bleaching treatment with LED405, there was a statistically significant increase in RGB index in comparison to OLED and without light activation for 10% CP, 16% CP, 30% CP, 25 % HP and 38 % HP gels. For femtosecond laser, a statistically significant increase in RGB index was found only when 16 % CP and 38 % HP were used. Finally, the difference between LED405 and femtosecond laser was statistically significant only when 25 % HP gel was used.

Both of the tested bleaching agents (25% HP and 38 % HP) demonstrated a potential genotoxic effect. Statistically significant increase of genotoxicity markers was relatively small in amount.

Significance

Focused femtosecond laser and ZOOM2 produced a large temperature increase in the pulp chamber and at the tooth surface. Caution is advised when using these types of light activation, whereas LED405, OLED and unfocused femtosecond laser could be safely used. Although the application of the bleaching agents reduced temperature variability, the type of the bleaching agent applied was largely irrelevant, indicating similar insulating properties of different gels of HP and CP.

All of the used bleaching agents resulted in a reduction of surface enamel and dentine microhardness. The application of ACP remineralizing agents in combination with artificial saliva can cause an increase in surface microhardness. A change in chemical structure of enamel and dentine after bleaching with different bleaching gels and after ACP treatment was found for Ca and F ions which can be a sign of possible remineralization.

In combination with the used bleaching agents, LED 405 showed the best effect in color change, followed by femtosecond laser. OLED light showed the weakest effect in color change.

Regarding the genotoxic effect of bleaching agents used in this study, it is important to say that oral mucosa cells have a short lifespan and a one-time exposure to such mild genotoxic noxa has probably a negligible carcinogenic potential. Therefore, bleaching can affect the genome of mucosal cells to a certain extent; however, it is difficult to assess clinical significance of these findings.

Key words

Light-activated bleaching, carbamide peroxide, hydrogen peroxide, microhardness, microstructure, temperature, amorphous calcium phosphate, genotoxicity test

Popis oznaka i kratica

Kratica	Značenje
ACP	amorfni kalcijev fosfat
ACP CPP	amorfni kalcijev fosfat - kazein fosfopeptid
CP	karbamid peroksid
CO_2	ugljik dioksid
DNA	deoksi ribonukleinska kiselina
HA	hidroksilapatit
HP	vodikov peroksid
HV	Vickerova mikrotvrdoća
EDS	spektroskopija karakterističnog X-zračenja
IR	infracrveno
LED	visokosjajna svjetleća dioda
Na2EDTA	dinatrijev etilendiaminotetraacetat
NaCl	natrijev klorid
MN	mikronukleus
OLED	organska visokosjajna svjetleća dioda
PAC	plazma luk
QTH	kvarc tungsten halogen
RGB	crveno zeleno plavo
SAD	Sjedinjene Američke Države
SEM	skenirajući elektronski mikroskop
Tris-HCl	tris hidroklorid
UV/VIS NIR	ultra ljubičasto vidljivo blizu infracrvenog

SADRŽAJ

1. UVOD..... 1
1.1. POVIJEST IZBJELJIVANJA ZUBI.....2
1.2. UZROCI NASTANKA DISKOLORACIJA ZUBI..... 3
1.2.1. Egzogena (ekstinzična) obojenja zuba..... 5
1.2.2. Endogena (intrinzična) obojenja zuba.....5
1.3. BOJA ORGANSKIH SPOJEVA..... 8
1.3.1. Karakteristike boja.....9
1.3.2. Optička svojstva zuba.....10
1.3.3. Određivanje boje zubi.....13
1.4. AKTIVNI SASTOJCI (SREDSTVA) ZA IZBJELJIVANJE ZUBI.....14
1.4.1. Vodik peroksid..... 15
1.4.2. Karbamid peroksid..... 16
1.4.3. Natrijev perborat..... 17
1.5. MEHANIZAM IZBJELJIVANJA ZUBI..... 18
1.5.1. Reakcije oksidacije i redukcije (redoks reakcije)..... 19
1.6. VRSTE IZBJELJIVANJA ZUBI..... 20
1.6.1. Izbjeljivanje vitalnih zubi..... 20
1.6.2. Izbjeljivanje avitalnih zubi..... 21
1.6.3. Kombinirani postupci..... 22
1.7. NUSPOJAVE IZBJELJIVANJA ZUBI 23
1.7.1. Postoperativna preosjetljivost..... 23
1.7.2. Strukturne, površinske i kemijske promjene tvrdih zubnih
tkiva i restorativnih materijala nakon izbjeljivanja..... 24
1.7.3. Genotoksični i citotoksični učinak sredstava za izbjeljivanje..... 30
1.8. UTJECAJ IZVORA SVJETLOSTI NA IZBJELJIVANJE ZUBI..... 33
1.8.1. LED izvori svjetlosti..... 33
1.8.2. OLED izvori svjetlosti..... 34
1.8.3. Laserski izvori svjetlosti..... 35
1.8.4. ZOOM2 izvor svjetlosti..... 37
1.9. REMINERALIZACIJA TVRDIH ZUBNIH TKIVA..... 38
1.9.1. Amorfni kalcijev fosfat..... 39

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA..... 41
2.1. SVRHA ISTRAŽIVANJA..... 42
2.2. RADNE HIPOTEZE..... 42

3. MATERIJALI I POSTUPCI..... 43
3.1. SREDSTVA ZA IZBJELJIVANJE..... 44
3.2. UMJETNA SLINA..... 45
3.3. SREDSTVO ZA REMINERALIZACIJU..... 46
3.4. SREDSTVO ZA BOJANJE..... 47
3.5. IZVORI SVJETLOSTI..... 48
3.6. UZORCI..... 51
3.6.1. Uzorci za mjerenje temperaturnog porasta..... 51
3.6.2. Uzorci za mjerenje mikrotvrdoće..... 51
3.6.3. Uzorci za mjerenje mikromorfologije i kemijskog sastava..... 53
3.6.4. Uzorci za određivanje promjene boje..... 54
3.6.5. Ispitanici korišteni u kliničkom dijelu studije..... 55
3.7. POSTUPCI..... 56
3.7.1. Mjerenje temperaturnog porasta..... 56
3.7.2. Mjerenje mikrotvrdoće..... 58
3.7.3. Promjene u mikromorfologiji, kvantitativne i kvalitativne promjene u kemijskom sastavu cakline i dentina..... 59
3.7.4. Učinak na promjenu boje..... 63
3.7.5. Istraživanje genotoksičnosti mikronukleus testom..... 69
3.8. STATISTIČKE METODE..... 77

4. REZULTATI..... 81
4.1. PORAST TEMPERATURE ZA VRIJEME IZBJELJIVANJA..... 82
4.2. MIKROTVRDOĆA..... 88
4.3. SEM ANALIZA..... 117
4.4. EDS ANALIZA..... 123
4.5. PROMJENA BOJE..... 149
4.6. GENOTOKSIČNOST..... 161
5. RASPRAVA..... 166

5.1. PORAST TEMPERATURE ZA VRIJEME IZBJELJIVANJA..... 167
5.2. MIKROTVRDOĆA..... 171
5.3. SEM ANALIZA..... 175
5.4. EDS ANALIZA..... 176
5.5. PROMJENA BOJE..... 179
5.6. GENOTOKSIČNOST..... 184

6. ZAKLJUČCI..... 187

7. LITERATURA..... 190

8. ŽIVOTOPIS..... 212
8.1. Popis objavljenih radova..... 214

1. UVOD

1.1. POVIJEST IZBJELJIVANJA ZUBI

Prvi pokušaji izbjeljivanja, najprije avitalnih, a kasnije i vitalnih zubi zabilježeni su polovicom 19. stoljeća, korištenjem brojnih agresivnih kemijskih sredstava (1). U početku se koristio aluminij klorid, oksalna kiselina i sredstva kao što su klorne smjese i otopine, natrijev peroksid, natijev hipoklorit, vodikov dioksid, klorno vapno, kalijev cijanid ili mješavine 25% vodikovog peroksida i alkohola (*pyrozone*). Ti materijali primarno su se koristili za izbjeljivanje nevitalnih zubi (2-5). Korištenje vodikovog peroksida za postupke izbjeljivanja zubi prvi puta se spominje 1884. godine (6), a posebno pripremljenu smjesu *superoxola* (30% vodikov peroksid) primijenio je prvi puta Abbot 1918. (7), a od 1924. godine primjenjuje se grijana otopina *superoxola* i natrijevog perborata za čišćenje pulpnog kaviteta (8). Preparati za izbjeljivanje kategorizirani su prema učinku uklanjanja boje. Elementi željeza uklonjeni su oksalnom kiselinom, mrlje srebra i bakra klorom, a mrlje joda amonijakom. Kalijevi cijanidi uklonili bi promjene nastale metalnim obojenjem, ali se nisu koristili jer je riječ o aktivnom otrovu (9). Natrijev perborat u obliku monohidrata, trihidrata ili tetrahidrata koristio se kao sredstvo otpuštanja vodikovog peroksida. Prvi puta se počeo primjenjivati 1907. godine kao sredstvo za izbjeljivanje zbog snažnog oksidacijskog djelovanja i to u kombinaciji s vodom ili vodikovim peroksidom (10).

U izvornoj tehnici izbjeljivanja nevitalnih zubi sredstvo se topikalno stavljalo na bukalnu površinu zuba i očekivalo je da ono kroz caklinu prodre do dentina. Uspjeh takve tehnike bio je ograničen pa se sredstvo za izbjeljivanje počelo stavljati izravno u pulpnu komoricu (Pearson, 1985.). Na taj način se otkrilo da sredstvo bolje penetrira i posvjetljuje zube (Goldstein i Garber, 1995). Spasser (1961.) opisuje metodu zalijevanja cijele pulpne komore mješavinom natrijevog perborata i vode koja ondje ostaje tjedan dana. Ta tehnika postala je poznata kao *walking bleach techinque*. Nutting i Poe (1963., 1967.) opisali su izmijenjenu tehniku koja je obuhvaćala mješavinu 30% vodikovog peroksida i natrijevog perborata i poslužila je kao predložak ostalim tehnikama. Visoke, ujedno i opasnije, koncentracije sredstva za izbjeljivanje počele su se koristiti već 1918., no prvi pravi pokušaj zabilježen je korištenjem 35% vodikovog peroksida uz zagrijavanje svjetlom, što se smatra početkom postupaka izbjeljivanja pod kontrolom stomatologa (Zack i Cohen, 1965.) (11). Brojni autori spominju korištenje svjetla, topline ili struje kako bi ubrzali postupak izbjeljivanja (12-18). Predstavljanje izbjeljivanja koje se aktivira svjetlom kao brzog i sigurnog načina izbjeljivanja zubi populariziralo je primjenu te tehnike. Mnogi izvori svjetlosti ne stvaraju toplinu, ali izazivaju kemijsku reakciju u preparatima za izbjeljivanje. Ti

preparati su obično većih koncentracija (35% vodikov peroksid ili 35% karbamid peroksid u odnosu na preparate za izbjeljivanje kod kuće (10-16% karbamid peroksid) (11).

1.2. 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 (19). Glavninu boje određuje debljina i boja dentina (20) kao i prisutnost intrinzičnih i ekstrinzičnih obojenja (21). Unutrašnju boju zuba određuju optička svojstva cakline i dentina i njihova interakcija sa svjetlom (22). Vanjska boja zuba ovisi o apsorpciji kromogena na površinu cakline (23). Svaka promjena u caklini, dentinu ili pulpi zuba može uzrokovati promjenu optičkih svojstava zuba, ponajprije transmisiju svjetlosti (24). Diskoloracija zuba tako ovisi o etiologiji, pojavnosti, lokaciji, ozbiljnosti i afinitetu samog kromogena u odnosu na tvrde zubne strukture (25) i kao takvu diskoloraciju zuba možemo podijeliti na intrinzičnu (endogenu) i ekstrinzičnu (egzogenu) ili kombinaciju ranije navedenih, ovisno o njihovoj lokaciji i etiologiji (26).

1.2.1. 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 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) (19). 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 (27). 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 (28) 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 (post-traumatska 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 (19,29,30). Klinički je dokazano da s godinama obojenja kromogenima poput čaja i kave postaju teža za uklanjanje s površine zuba (28).

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 (31).

Tablica 1. Egzogena obojenja zuba (preuzeto i modificirano iz 32).

Boja	Mogući uzrok obojenja	Primjer
Smeđa	hrana vodice za ispiranje usta	kava, čaj, crno vino (tanin) klorheksidin
Crna	hrana metalne prašine sredstva za dezinfekciju	voće (ribizl) željezo (Fe), mangan (Mn) srebro (Ag)
Smeđe-crna	duhan gram pozitivne bakterije	katran "crne mrlje"
Zelena	profesionalna izloženost metalu	bakar (Cu), nikal (Ni)
Tamnozelena	kromogene bakterije	"zelene mrlje"
Ljubičasta	hrana	bobičasto voće
Narančasta	industrijski proizvodi kromogene bakterije	kromna kiselina "narančaste mrlje"

1.2.2. Endogena (intrinzična) obojenja zuba

Endogena obojenja zuba (Tablica 2) 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 (33,28). 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 (34), a mogu biti uzrokovane primjenom lijekova kao što su tetraciklini, zbog njihove interakcije s kristalima hidroksilapatita za vrijeme mineralizacije te primjenom visokih koncentracija fluorida (više od 1 mg/L u vodi za piće) (35). 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 boje poslijedica *Ledermycina*, *Terramycina* ili *Achromycina*, a *Aureomycin* uzrokuje smeđa obojenja.

Preeruptivna obojenja nastaju i kao posljedica mliječnih zubi s periapikalnim parodontitisima ili kao poslijedica traume trajnog zametka od strane mliječnog zuba, tzv. Turnerov zub (Bailey i sur, 1968;. Eder 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 eritroblastoza 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 (36).

Traumatski događaj za vrijeme rasta i razvoja zuba može biti uzrok preeruptivne diskoloracije (33). 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 (37). Ekstripacija pulpe ili trauma zuba mogu uzrokovati hemoragiju u području pulpne komore. Krvni produkti ulaze u dentinske tubuluse i uzrokuju diskoloraciju dentina (38). Hemoliza crvenih krvnih stanica slijedi otpuštanjem molekule hemoglobina koji u kontaktu s preostalim pulpnim tkivom stvara molekule željeza (39). 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 (40-44) ili intrakanalnih medikamenata na bazi tetraciklina, kao i materijali za ispune poput amalgama (45) 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 (36). 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 (46). Resorpcija korijena zuba, iako klinički asimptomatska, s vremenom postaje vidljiva kao ružičasto obojenje krune zuba tzv. *pink spot* (30). Endogeno obojenje zuba može uključivanje kromogene iz čaja, kave ili vina (47).

Tablica 2. Endogena obojenja zuba (preuzeto i modificirano iz 48).

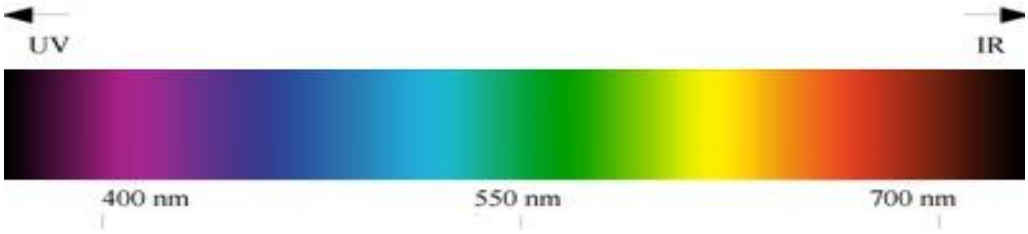
Boja	Mogući uzrok	Primjer
Smeđa	jaka fluoroza	fluor (F)
Žuto-smeđa	Turnerov sindrom lijekovi amelogenesis imperfecta tetraciklin (tip 2)	jod (I) *Ledermycin*
Žuta	srednje izražena fluoroza tetraciklin (tip 1) starenje	obliteracija pulpe
Crveno-smeđa	hemoragija pulpe kongenitalna porfirija	trauma hematoporfirin
Zelenoplava	fetalna eritroblastoza talasemija	biliverdin bilirubin
Zeleno crna	materijali za punjenje korijenskih kanala materijali za ispune	amalgam
Smeđe-crna	jatrogeni uzroci	srebrni nitrat
Opakno bijela	lokalni uzroci	flouroza, poremećaji razvoja
Crna	materijali za punjenje kanala sulfonamidi	srebrni kolčići

1.3. BOJA ORGANSKIH SPOJEVA

Za boju organskih spojeva odgovorna je apsorpcija svjetlosti vidljivog dijela spektra od 380 do 750 nanometara (nm). Apsorpcija (lat. *absorptio* = apsorpcija) je upijanje različitih vrsta zračenja. Neka tijela apsorbiraju samo određene frekvencije elektromagnetnog zračenja. Svjetlost nosi energiju koju predmeti apsorbiraju. Boja koju vidimo nije u predmetima nego u svjetlosti pomoću koje ih vidimo.

Ljudsko oko reagira samo na vrlo ograničeni raspon valnih duljina, na vidljivu svjetlost. Međutim, ono odlično raspoznaje i vrlo male razlike unutar tog raspona. Te male razlike nazivamo boje. Boje su dakle male frekvencijske razlike u području vidljive svjetlosti. Najkraću valnu duljinu imaju ljubičasta i plava svjetlost, a najdulju crvena svjetlost.

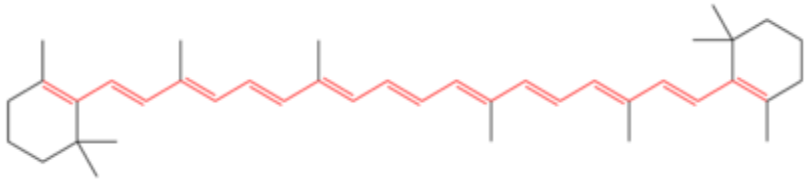
Spektar vidljivog zračenja čine: ljubičasta boja (najveća frekvencija, najkraća valna duljina) plava boja, zelena boja, žuta i narančasta boja, crvena boja (najniža frekvencija, najdulja valna duljina). Bijela svjetlost sastavljena je od kontinuiranog niza svih boja vidljivog spektra. Pod bojom nekog tijela možemo smatrati boju koju tijelo reflektira kada je osvijetljeno bijelom svjetlošću, tj. tijelo će biti obojeno nekom bojom ako mu površina apsorbira bijelu svjetlost samo na određenom valnom području. Boja ovisi o frekvenciji reflektiranog zračenja (Slika 1). Bijela površina je ona koja u jednakoj mjeri reflektira sva valna područja bijele svjetlosti. Crna površina je ona koja u potpunosti apsorbira bijelu svjetlost. Siva površina u jednakoj mjeri reflektira sva valna područja bijele svjetlosti, ali ih i djelomično apsorbira. Bijela, crna i siva su akromatske boje, a sve ostale boje su kromatske (22,23,49,50).



Slika 1. Spektar boja i pripadajuće valne duljine (preuzeto iz 50).

Najveći dio organskih boja ubrajaju se u takozvane aromatske spojeve, jer u svom sastavu posjeduju benzolove prstene ili kondenzirane sustave koji su nastali iz benzolovih jezgara. Selektivna je apsorpcija svjetlosti u vezi s nezasićenošću molekula. Prema tome je i boja ugljikovih spojeva zavisna o djelomično slabije vezanim elektronima u nezasićcnim spojevima. Već su Graebe i Liebermann (1868) primijetili da obojeni spojevi gube svoju boju kada reduciranjem prelaze u zasićene spojeve. Apsorpcija je u vidljivom dijelu spektra uvjetovana nekim određenim i posebnim nezasićenim atomskim skupinama u molekuli. Takve je skupine nazvao O. N. Wilt (1876) kromofornim skupinama. Kromofori (nositelji boje) uzrokuju pomak apsorpcije u vidljiv dio spektra. Najvažniji su kromofori etilenske skupine (-CH=CH-), karbonil (=C=O), nitrozo (--N=O), nitro (-N02), azo (-N=N-) i dr.

Organske spojeve s kromofornim skupinama zovemo kromogenima (stvartelji boje), a njih nalazimo u strukturi cakline i dentina i to je skupina koja je odgovorna za obojenost tvari (zuba) i apsorbira svjetlost u vidljivom dijelu spektra (50,51,52).



Slika 2. Kemijska struktura beta karotena. Jedanaest konjugiranih veza koji oblikuju kromofor obojane su crveno (preuzeto iz 51).

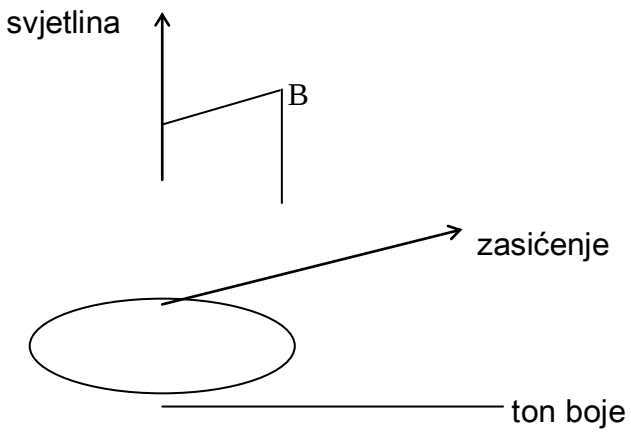
1.3.1. Karakteristike boja

Psihofizičke karakteristike:

Ton je način na koji vidimo boju zahvaljujući njenoj valnoj duljini i predstavlja veličinu kuta φ, a ona je određena udaljenošću radijus vektora od polarne osi.

Zasićenje je stupanj odstupanja boje od akromatske boje iste svjetline i predstavlja udaljenost na tom radijus vektoru od akromatske osi (što je dalje to je zasićenija).

Svjetlina je karakteristika koja pokazuje razliku boje od niza akromatskih boja (od crne do bijele) ili udio crne boje u nekoj boji. Ona predstavlja vertikalnu projekciju od točke B na os svjetline i vertikalnu projekciju od O (crne boje) (52).



Slika 3. Cilindrični koordinatni sustav boja (preuzeto iz 52).

1.3.2. Optička svojstva zuba

Boja zuba određena je kombinacijom intrinzičnih i ekstrinzičnih obojenja (30). Unutarnja boja zuba je povezana s raspršenjem svjetlosti i apsorpcijskim svojstvima cakline i dentina (22) dok je vanjska boja povezana s apsorpcijom kromogenih tvari (npr. čaj, crveno vino, klorheksidin, željezove soli) na caklinu, a posebno pelikulu, što u konačnici uzrokuje vanjska obojenja zuba (23). Fenomen boje psihofizički je odgovor na fizičku interakciju svjetlosne energije s objektom, a subjektivni je doživljaj pojedinca, tj. promatrača (52).

Faktori koji mogu utjecati na percepciju boje su prvenstveno izvori svjetlosti, koji mogu emitirati energiju zračenja u rasponu određenih valnih duljina, koje karakterizira relativna količina energije emitirana na valnoj duljini u vidljivom spektru. Izvor svjetla koji svijetli (iluminira) utječe na percepciju boja, dok spektralna refleksija (prozirnost, transparencija) objekta karakterizira boju objekta. Na primjer, crveni predmet izgleda crveno ponajprije zato što reflektira svjetlost crvene valne duljine više od zelene i plave. Konačno, promatračev vizualni sustav oka i mozga na kraju utječu na ukupnu percepciju boje (53).

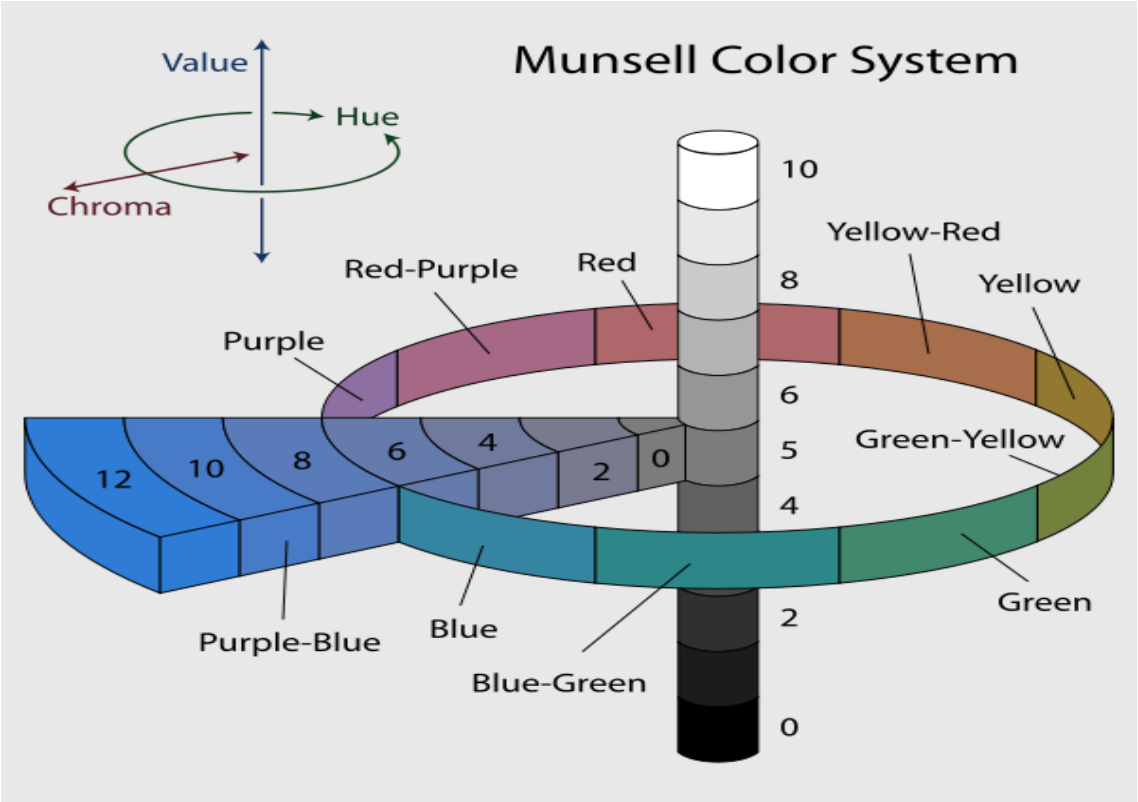
Boja se može opisati prema Munsellovom sistemu ili "prostoru" boja sa: *hue* (boja) *value* (svjetloća) i *chroma* (čistoća) boje. *Hue* je osnova boje koja omogućuje čovjeku razliku između različitih osnova boja npr. crvene, plave i zelene boje. *Value* ili vrijednost određuje svjetloću boje u rasponu od čiste crne do bijele, a *chroma* je stupanj zasićenja i opisuje snagu, intenzitet ili "živost" boje (54).

Internationale de l'E'clairage (CIE), organizacija posvećena standardizaciji u područjima kao što su boja i izgled, definirala je 1931. godine standardni izvor svjetla, koji uz standardiziranog promatrača omogućuje izračun vrijednosti boje tj. način na koji reagira ljudsko oko na zadanu boju. Godine 1976. CIE usvaja CIE Lab sistem, koji se bazira na teoriji percepcije temeljenoj na postojanju tri receptora za boje u ljudskome oku (crvena, zelena i plava). Ovaj "trodimenzionalni prostor" formiraju tri osi: L *, a *, b * .

U tom prostoru L* označava svjetlinu i počinje od 0 (crno) do 100 (bijelo), a smješten je na y-osi koordinatnog sustava. Vrijednosti a* (x-os) i b* (z-os) su koordinate kromatičnosti +a* je smjer crvene, a -a* je smjer zelene, + b* je smjer žute, a - b* je smjer plave. Centar je bezbojan: kada se a* i b* vrijednost povećaju i točka se kreće iz centra, kromatičnost boje se povećava. L*a* i b* vrijednosti kvantitativne su mjere i zato se mogu izračunati brojčane razlike između dviju točaka boje. Ekvilibrijska udaljenost između njih procjenjuje se kao Delta E i može se izračunati formulom:

$$\Delta Eab=[(\Delta L^*)2+(\Delta a^*)2+(\Delta b^*)2]1/2 \text{ (54).}$$

L*C*h prostor boja koristi isti dijagram kao L*a*b sustav, ali koristi cilindrične koordinate umjesto pravokutnih. U ovom prostoru boja L* (*luminance, value*) označava svjetlinu od bijelog (L=100) do crnog (L=0) i isti je kao L* u L*a*b prostoru boja. C* (*chroma*) je zasićenost ili intenzitet, a predstavlja razliku između boje i sivog tona iste svjetline, mjereno kao odstupanje od neutralne osi. Vrijednost h *(hue*) je nijansa ili ton (kut) tj. ono što obično nazivamo bojom (crvena, žuta, zelena, plava). Vrijednosti boje C* je 0 u sredini i povećava se prema udaljenosti od centra. Kut tona je definiran početno na +a* (crveno), 90 stupnjeva bi bila +b* (žuta), 180 stupnjeva bi bila -a* (zelena), 270 stupnjeva bi bila b* (plava) (54).



Slika 4. Munsellov sustav boja (preuzeto iz 54).

Boja zuba određena je kombinacijom njegovih optičkih svojstava.

Četiri pojave povezane su s interakcijom svjetlosti i površine zuba:

1. transmisija svjetlosti
2. refleksija i difuzna refleksija
3. apsorpcija
4. rasap svjetlosti (55,56,57).

Vaarkamp i sur. su mjerili propagaciju svjetlosti kroz 0,85 mm cakline i dentina. Za caklinu je time dokazano da kristali hidroksilapatita značajno doprinose raspršenju svjetlosti, dok su u dentinu dentinski tubulusi dominantan uzrok raspršenja svjetlosti (58). Također je dokazano da demineralizacija povećava raspršenje svjetlosti za vrijednost faktora od otprilike 3 (57). Ten Bosch i sur. (59,60) su mjerili refleksiju cakline zuba goveda i ljudske zubne cakline na valnim duljinama između 220 i 700 nm. Mjerenja su izvršena spektrofotometrom i

najveća apsorpcija je zabilježena na 270 nm, što je izvan ljudskom oku vidljive svjetlosti (380 - 780 nm). Boja zuba prvenstveno ovisi o boji dentina, pri čemu caklina doprinosi samo rasapu svjetlosti u području valnih duljina plave boje (20). Brojna istraživanja provedena su i u području luminiscencije cakline i dentina (florescencija i fosforescencija). Dentin tako ima ekscitacijske pikove na 300, 325, 380 i 410 nm s odgovarajućim maksimumima na 350, 400, 450 i 520 nm. Caklina ima ekscitacijske pikove na 285 i 330 nm s odgovarajućim maksimumima na 360 i 410 nm (61-63).

1.3.3. Određivanje boje zubi

Boju zubi možemo odrediti vizualno - subjektivnim metodama tzv. ključem boja i posebnim instrumentalnim tehnikama pomoću spektrofotometra, kolorimetra i računalnom analizom slike. Određivanje boje pomoću ključa boja je subjektivan proces u kojem se zub i sama boja zuba promatraju istovremeno pod istim svjetlosnim uvjetima. Vrijednosti kao što su vanjski uvjeti, svjetlost, iskustvo, dob i umor ljudskog oka te potencijalne fiziološke osobitosti promatrača kao što je daltonizam, može dovesti do nedosljednosti i pristrasnosti. (64).

Boja određena pomoću ključa boja ne može se kvantificirati pomoću CIE Lab sustava boja (65-71), a glavnina komercijalno dostupnih ključeva boja nisu identični (72,73) Instrumenti poput spektrofotometra i kolorimetra su dosada korišteni u industrijskim i ostalim granama istraživanja za određivanje boje širokog raspona materijala i supstrata (74). Spektrofotometar mjeri po jednu valnu duljinu za vrijeme refleksije ili propuštanja svjetlosti kroz promatrani objekt, a u stomatologiji su našli primjenu za mjerenje boje vitalnih i ekstrahiranih zuba (75-77).

Tung i sur. su dokazali da je uporaba spektrofotometra u stomatološkim istraživanja i kliničkim uvjetima ograničena zbog složenosti i visoke cijene same opreme, te otežanom mjerenju u *in vivo* uvjetima. Kolorimetri posjeduju filtere koji približno odgovaraju spektralnim mogućnostima ljudskog oka i mjere boju u CIE Lab vrijednostima (78). Mjerenja kolorimetrom uspoređena su s onima spektrofotometra i pokazala su se pouzdanima i preciznim pri određivanju boje u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (79). Loše strane kolorimetra su da je on prvenstveno namijenjen mjerenju boja na glatkim i ravnim površinama, a površina zuba je rijetko takva, no nedostaci u smislu sistemske pogreške i dalje su prisutni i teško ih je ukloniti unatoč stupnju preciznosti (80).

Još jedan moderan način određivanja boje je računalna analiza slike (80-83).

Poznato je da su gornji prednji zubi prirodno tamniji od donjih prednjih zuba, a gornji centralni sjekutić svjetliji od gornjeg lateralnog sjekutića i očnjaka. Nema jasne razlike u boji prirodnih zuba između žena i muškaraca (84). Zubi s godinama imaju tendenciju postati žuti i manje svjetliji (85,86), a incizalna trećina ima sve naglašeniju smeđkastu boju zbog izražene okluzalne atricije. Promjena boje zuba s godinama ovisi o nekoliko faktora. Prvi je povlačenje pulpe i odlaganje sekundarnog dentina, dok okolni dentin postaje sve tvrđi i manje propustan, a ioni i pigmenti organskog i anorganskog podrijetla prodiru kroz caklinu do caklinsko dentinske granice, zadržavajući se u dentinu (87). Dentinska *chroma* tj. čistoća boje postaje zasićenija, a *value* ili svjetloća boje sve manje izražena. Caklina zuba je sve tanja i boja dentina postaje dominantna.

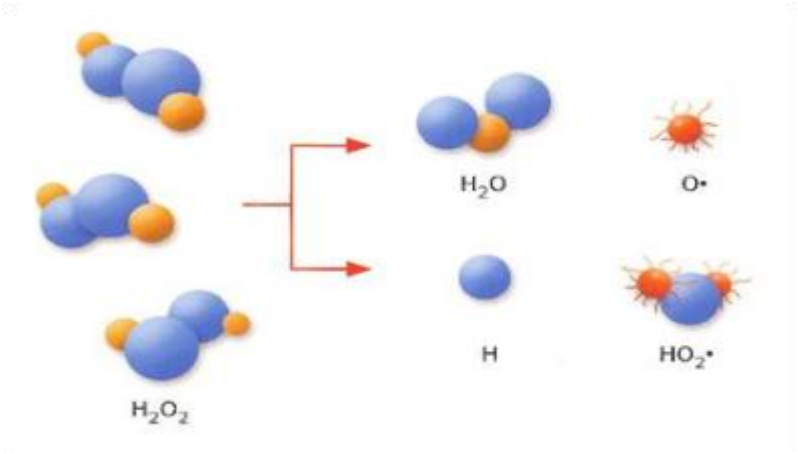
Sekundarna optička svojstva poput translucencije, opaciteta, iridescencija ili "prelijevanje u duginim bojama", površinski sjaj i florescencija doprinose ukupnoj boji zuba. Refleksija svjetlosti tako ovisi o površini zuba, pa je kod neravne površine više izražena difuzna refleksija, a kod ravne spektralna (88,89,90).

1.4. 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) (91). Spojevi peroksida počinju se raspadati nakon nanošenja na površinu zuba (Slika 5).

a) $H_2O_2 \longrightarrow 2HO^{\cdot}$

b) $HO^{\cdot} + H_2O_2 \longrightarrow H_2O_2 + HO_2^{\cdot}$



Slika 5. Raspad vodikovog peroksida na a) hidroksilini i b) perhidroksilni radikal (preuzeto iz 11).

1.4.1. 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 structure, caklinu i dentin (92). Vodikov peroksid je nestabilan i razlaže se u vodu i kisik:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

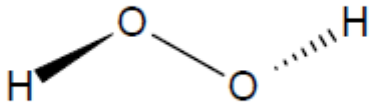
Molekula O_2, koja ima dva nesparena elektrona u vanjskoj ljusci, tijekom oksidacije prima elektron iz površine na koju se aplicira i preko međuprodukta O (superoksid) dalje reagira s vodikovim peroksidom u tzv. Haber-Weiss-ovoj reakciji:

$$O2 + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH- + OH$$

U daljnjoj reakciji nastaju vrlo reaktivni slobodni radikali: perhidroksilni (HO_2.) i atom kisika (O.). 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.). 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 (92). 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 (93). Razlaganje vodikovog peroksida na slobodne radikale ubrzava toplina, dodavanje natrij hidroksida i svjetlo.

Al-qunaian i sur. su u svom istraživanju proučavali kinetiku raspada 3% vodikovog peroksida *in vivo*. Oni su otkrili da je koncentracija vodikovog peroksida u sastavu sredstva za izbjeljivanje brzo pala u prvih deset minuta. Nakon deset minuta, zabilježen je umjereniji eksponencijalni pad koncentracije vodikovog peroksida. Nakon 5, 10, 20, 30, 45 i 60 minuta zabilježene koncentracije bile su: 61%, 56%, 49%, 44%, 38% i 32% (94).

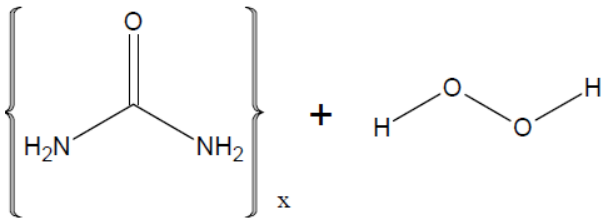


Slika 6. Strukturna formula vodikovog peroksida (preuzeto iz 94).

1.4.2. 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 (95). 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 (96). U procesu izbjeljivanja, karbamid peroksid se raspada na ureu [$CO(NH_2)2$] 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 [NH_3] i ugljični dioksid [CO_2]. Raspadom 10 % karbamid peroksida, oslobađa se 3% vodikovog peroksida i 7% uree (97). 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 bieksponencijalan 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 (98).



Slika 7. Strukturna formula molekule karbamid peroksida (preuzeto iz 98).

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 (37).

1.4.3. Natrij perborat

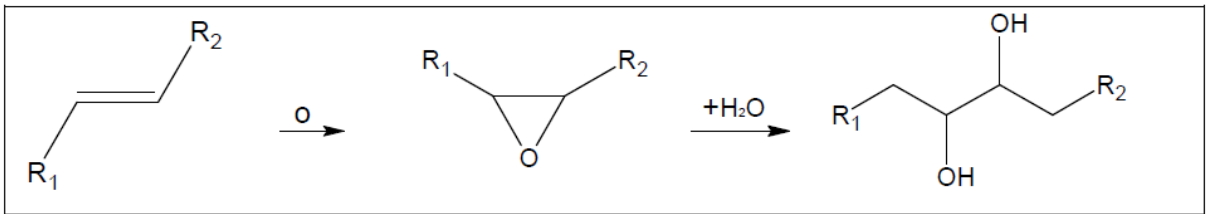
Natrij perborat u kontaktu s vlažnom površinom stvara vodikov peroksid i kisikove komplekse koji su odgovorni za izbjeljivanje. To oslobađanje različitih radikala i iona iz vodikovog peroksida ovisno je o pH, utjecaju svjetlosti, temperaturi i nazočnosti katalizatora (99). Natrij perborat miješa se s 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 (100). Osim za izbjeljivanje perborat se još upotrebljava i kao antiseptik i dezinficijens.

Raspadom natrijevog perborata nastaju natrijev hidrogen borat i vodikov peroksid:

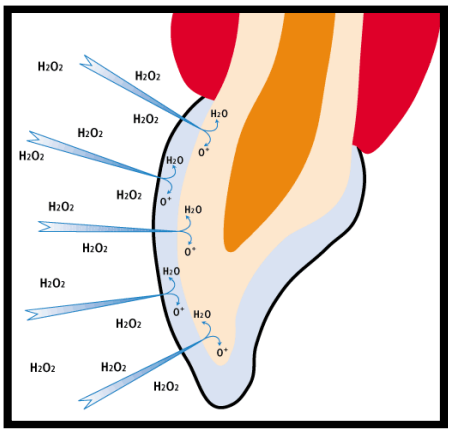
$$Na_2[B_2(O_2)_2(OH)_4] + 2H_2O \rightarrow 2NaBO_3 + 2H_2O_2.$$

1.5. 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 8,9). 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˚C brzina reakcije se dvostruko povećava (24). 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 8. Cijepanje konjugiranih dvostrukih ugljikovih veza slobodnim radikalima kisika (preuzeto iz 24).



Slika 9. Aktivnost vodikovog peroksida (preuzeto iz 11).

1.5.1. Reakcije oksidacije i redukcije (redoks reakcije)

Mehanizam izbjeljivanja zubi na molekularnoj razini temelji se na kaskadi niza metaboličkih procesa. Glavni mehanizam temelji se na principu reakcija oksidacije i redukcije (redoks reakcije). U daljnjem tekstu iznesene su ukratko osnove redoks reakcija koje su preduvjeti za daljnju raspravu o mehanizmu izbjeljivanja zubi.

Povijesno gledano, reakcije oksidacije i redukcije prvi je zabilježio Antoine Laurent de Lavoisier. On je opisao oksidaciju kao reakciju između kemijskih elemenata i spojeva s kisikom (lat. *oxygenium*) pri čemu nastaju spojevi naziva oksidi. Redukcije je opisao kao raspad oksida na početni tj. izvorni kemijski element i kisik. Poslije se značenje tih pojmova proširilo tako što se pod oksidacijom razumijevalo i oduzimanje vodika, a pod redukcijom i primanje. Danas se u kemijskom smislu oksidacijom naziva otpuštanje, a redukcijom primanje negativnog električnog naboja, što se ostvaruje prijelazom valentnih elektrona s atoma, iona ili molekule druge tvari (redukcija), bilo izravno, bilo na elektrodama galvanskoga članka ili elektrolitske ćelije. Prema tome kisik i vodik ne moraju uopće biti sudionici tih reakcija. Mehanizam izbjeljivanja zubi temelji se tako na indukciji oksidacijskih procesa pri čemu dolazi do promjena u molekularnoj strukturi organskih mrlja, tj. obojenja na zubima.

1.6. 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.

1.6.1. 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*) (101) 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 (102). Sinonimi za ovu tehniku su još *power bleaching* ili *assisted belaching*. Najčešće se koriste preparati 30 – 35% vodikovog peroksida i 35% karbamid peroksida uz uporabu aktivatora ili promotora izbjeljivanja - svjetla, topline, ili lasera (103-105). 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 postižemo smanjenje osjetljivosti zubi. Rezultati promjene boje su stabilni 6 – 12 mjeseci, a postupak se treba ponoviti kad se uoči promjena u boji zuba (105,37). 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 (101,106,107).

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 (102).

Izbjeljivanje vitalnih zubi je indicirano na trajnim zubima, a najčešće se provodi zbog diskoloracija zubi endogenog ili egzogenog podrijetla te u okviru većih restaurativnih i protetskih radova u ustima ili zbog estetskih zahtijeva pacijenta. Kontraindikacije za izbjeljivanje zubi jesu: dob ispod 12 godina, trudnoća i dojenje, mnogostruki opsežni ispuni, površinska obojenja koja se mogu lako ukloniti, velike pulpne komorice u mlađih pacijenata, taurodontizam, preosjetljivost zubi zbog eksponirane površine korijena, opsežan gubitak cakline, fraktura zuba, nesanirani karijes, parodontna bolest, alergija na materijale za izbjeljivanje, nesigurnost pacijenta u odluku, nemotivirani pacijenti s lošim navikama (pušenje, pijenje kave, crnog vina).

1.6.2. 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 (108,109). 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 (110).

1.6.3. Kombinirani postupci

Jednostavnije diskoloracije najčešće se mogu izbijeliti tretmanom u ordinaciji dok je kod složenijih promijena boje često potrebno kombinirati tu tehniku s izbjeljivanjem pomoću individualne matrice kod kuće. Takav pristup je obično potreban kod diskoloracija nakon traumatske ozljede (kombinacija tehnika ovisi o težini stanja) i kod generaliziranih stanja genetske etiologije. Postupak počinjemo izbjeljivanjem u ordinaciji s 35 – 50% vrlo zasićenim vodikovim peroksidom. Slijedi izrada matrice i izbjeljivanje kod kuće s nižom koncentracijom vodikovog ili karbamid peroksida. Matrica se nosi 30 – 40 minuta navečer svaki drugi dan nakon početnog tretmana u ordinaciji, a zatim jednom tjedno dok ne postignemo stabilizaciju boje. Materijal treba mijenjati svakih 20 minuta kako bi bio svjež cijelo vrijeme izbjeljivanja. Ovim postupkom stabiliziramo rezultate postignute u ordinaciji, a u kraćem roku postižemo uspješnije rezultate (107,111,112).

1.7. NUSPOJAVE IZBJELJIVANJA ZUBI

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

1.7.1. 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 (113). 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 (114).

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 (116) 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% (117). Histološki se u pulpi vidi slaba upalna reakcija, promijenjena morfologija odontoblasta i pojačana dentinogeneza kao odgovor na iritaciju (25). Ova nuspojava je prolazna i prestaje najkasnije četvrti dan nakon tretmana (118). Schulte i sur. su otkrili da je kod 14% pacijenata ta preosjetljivost bila dovoljno jaka da se prekine sam postupak izbjeljivanja (119). 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 (120). 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 dentiskih tubulusa. Smatra se da korištenje sredstava na bazi KNO_3 za vrijeme samog postupka izbjeljivanja doprinosi smanjenju dentinske preosjetljivost nekompromitirajući pritom estetske rezultate izbjeljivanja (121-122). Sredstva za zatvaranje dentinskih tubulusa, poput amorfnog 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 (123).

1.7.2. Strukturne, površinske i kemijske promjene tvrdih zubnih tkiva i restorativnih materijala nakon izbjeljivanja

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 (124).

Utjecaj na caklinu

Istraživanja elektronskim mikroskopom površine cakline nakon izbjeljivanja pokazala su da ona ostaje netaknuta i nepromijenjena nakon primjene nižih koncentacija 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 (125). Izbjeljivanje izravno ne utječe na čvrstoću cakline (126). 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 (127). Učestala primjena 3, 5, 7 i 12% paste vodikovog peroksida nije utjecala na smanjenje

tvrdoće cakline, promjene mikromofrologije ili površinskog nazubljenja. Iako vodik peroksid ima kiseli pH i potencijal da na taj način ošteti caklinu ili uzrokuje cervikalnu resorpciju, to nije zabilježeno (128). U istraživanju Efeoglua i sur. se pokazalo da korištenje 10% karbamid peroksida u trajanju od dva tjedna dovodi do demineralizacije površinskog dijela cakline od 50 μm koji odgovara demineralizaciji uzrokovanom konzumacijom kola pića (129). 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 (130). Justino i sur. su proučavali učinak 10 % karbamid peroksida i uočili smanjenje mikrotvrdoće i gubitak kalcija nakon 14 dana korištenja. Remineralizacijski učinak sline u usnoj šupljini može prevenirati demineralizacijski učinak izbjeljivanja na caklinu (131).

Tretiranje površinskog sloja cakline može dovesti do gubitka organskih komponenata, najčešće ugljika, ugljikovodika i tercijarnih aminogrupa koje zamjenjuju kisik, kalcij i fosfor. Omjer kalcija i fosfora znatno je promjenjen i smanjen korištenjem 30% vodikovog i 10% karbamid peroksida, što su u svojem istraživanju dokazali Rotstein i sur. (132). Također, zubi izloženi karbamid peroksidu su za šest sati izgubili u prosjeku 1,06 $\mu g/mm^2$ kalcija (133). Međutim taj odnos je zanemariv i ne mora biti klinički značajan. Za usporedbu ispijanjem jedne čaše kola pića gubi se oko 1 $\mu g/mm^2$ kalcija. Ti rezultati dobiveni su nakon dvominutne izloženosti cakline gaziranoj koli, soku od naranče, soku od jabuke ili dijetnoj koli (134). Gjorgivska i sur. su dokazali da nakon primjene 16 % karbamid peroksida i nakon korištenja remineralizacijske paste dolazi do porasta količine kalcija i fluora vraćajući time stanje cakline na početne vrijednosti (135).

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 (136). 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 (137). 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 (138). 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 (139). Basting i sur. su dokazali da uporaba 10% karbamid peroksida smanjuje mikrotvrdoću zdravog i demineraliziranog dentina (140). Dentinska veza može biti izmijenjena nakon izbjeljivanja, a kolageni sloj može biti uklonjen (136). 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 (141). Dva tjedna nakon izbjeljivanja preporuča se izbjegavanje bilo kakvog adhezivnog postupka. Miguel i sur. su dokazali da primjena 10 % karbamid peroksida također slabi snagu svezivanja između dentina i kompozitnog ispuna (142) dok su Cadanero i sur. dokazali da je stupanj konverzije četiri različita adheziva bio smanjen nakon aplikacije na prethodno izbjeljivani dentin, a produljena polimerizacija doprinosi povećanju stupnja konverzije (143). Vodikov peroksid ima tendeciju promijeniti kemijsku strukturu površine zuba. Zaostatni kisik na površini zuba inhibira polimerizaciju kompozitne smole (145). Smanjenje čvrstoće spoja je prolazna faza koja se stabilizira nakon 24 sata i nestaje nakon jednog tjedna (136). Korištenje topikalnih fluorida i korištenje adheziva na bazi acetona ili alkohola ili zakošenje površine može ublažiti djelovanje peroksida na snagu sveze (145).

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.

Iritacija gingive

Visoke koncetracije vodikovog peroksida mogu djelovati jako kaustično na sluznicu i alveolarnu mukozu. Kontakt može biti izbjegnut pažljivom izolacijom gingive tijekom postupka izbjeljivanja da bi se izbjegle opekotine i izbjeljivanje gingive. Uz preparate za izbljeljivanje u ordinaciji dolazi i sredstvo za zaštitu gingive koje je potrebno pravilno i jednoliko rasporediti duž gingivnih sulkusa i prileježeće gingive (Slika 10). Područje obraza, usnica i jezika također moramo zaštiti pamučnim gazama (Slika 11). Niske koncentracije vodikovog peroksida ili karbamid peroksida koje se koriste za kućno izbjeljivanje mogu uzrokovati blagu iritaciju gingive, ali je mehanička iritacija prilikom prilagodbe individualno oblikovane ili konfekcijske udlage češći uzročnik gingivne iritacije. 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 (123). Djelovanje na sluznicu ovisi o koncentraciji vodikovog peroksida. Visoke koncentracije (25-50%) korištene kod *power-bleaching* izbjeljivanja su kaustične i uzrokuju kemijske opekline sluznice s kojom dođu u kontakt. Niže koncentracije uzrokuju oštećenje epitela i upalnu reakciju u submukoznom vezivnom tkivu. Ova nuspojava je česta kod *night-guard* izbjeljivanja, jer udlage ne mogu u potpunosti spriječiti kontakt preparata za izbjeljivanje s gingivom.

Od ostalih nuspojava mogu se javiti promijenjeni okus (nestaje u roku nekoliko sati), te promijene oralne flore (rijetko i to kod dugotrajne primjene veće koncentracije).

Eksterna resorpcija korijena

Vanjska resorpcija korijena se može javiti kod interne primjene većih koncentracija vodikovog peroksida (124). On difundira kroz dentinske tubuluse do cerviksnog dijela paradontnog ligamenta te izaziva nekrozu i upalnu resorpciju (Slika 12). Sličan se proces javlja nakon traume i replantacije zuba nakon avulzije. Cerviksnu resorpciju možemo

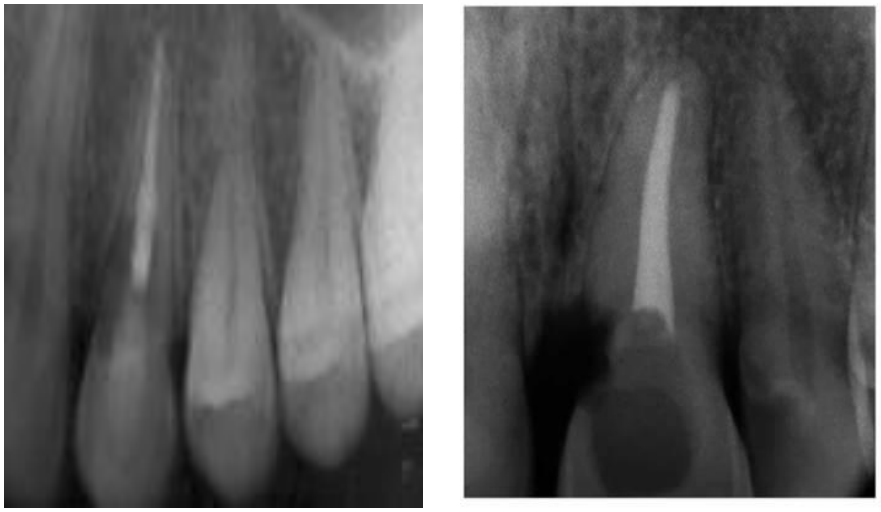
spriječiti postavljanjem podloge od staklenoionomernog, cinkoksifosfatnog cementa ili kompozita (117).



Slika 10. Postavljenje gingivne zaštite.



Slika 11. U potpunosti postavljena zaštita gingive i sluznice.



Slika 12. Eksterna cerviksna resorpcija korijena.

Učinci na ispunima i restoracijama

Kod amalgamskih ispuna zabilježeno je povećano otpuštanje žive iz dentalnih amalgama izloženih djelovanju karbamid peroksida kroz dulje vrijeme. Količina otpuštene žive varira ovisno o vrsti amalgama i sredstva za izbjeljivanje. Kod kompozitnih ispuna površinska mikrotvrdoća, izgled, struktura te boja kompozitnih ispuna ostaje gotovo nedirnuta i nenarušena nakon izbjeljivanja, dok je kod staklenih ionomera i drugih cemenata za vrijeme i nakon izbjeljivanja zabilježena povećana topljivost. Keramika i ostale keramičke restoracije kao i zlato, generalno ne pokazuju nikakve promjene nastale za vrijeme izbjeljivanja (146). Jedna od mogućih pogrešaka je i izrada kompozitnog ispuna neposredno nakon provedenog postupka izbjeljivanja. Ono reverzibilno slabi vezu adhezijskog sustava za dentin i caklinu Uzrok te slabije veze je rezidualni kisik koji inhibira polimerizaciju kompozita. Zbog toga bi s izradom ispuna trebalo pričekati do 2 tjedna. Topikalnom primjenom fluorida, primjenom adhezijskih sustava na bazi acetona ili alkohola ili uklanjanjem površinskog sloja cakline možemo poništiti taj učinak inhibicije te odmah izraditi ispun. Izbjeljivanje nema utjecaja na kompozitne ispune (147).

1.7.3. Genotoksični i citotoksični učinak sredstava za izbjeljivanje

Sam vodikov peroksid ne oštećuje DNA. Međutim, u stanici on dolazi u kontakt s metalnim ionima (bakar i željezo) i kroz Fentonovu reakciju daje slobodne radikale kisika: superoksidni anion, hidroksilni radikal i perhidroksilni radikal (148). Ovi slobodni radikali mogu oštetiti mnoge stanične tvorbe i makromolekule, uključujući i DNA. Slobodni radikali kisika mogu kemijski promijeniti dušične baze u DNA, što dovodi do pucanja vodikovih veza izmedu baza ili do krivog sparivanja baza te lomova jednog ili oba lanca DNA. Na taj način slobodni radikali kisika sudjeluju u patogenezi tumora, razvoju kroničnih degenerativnih bolesti te procesima starenja. Kako bi se spriječile štetne posljedice takvih oštećenja DNA, stanica posjeduje razne mehanizme popravka, ovisne o vrsti oštećenja. Ukoliko se radi o promjeni jedne ili nekoliko baza, postoji mogućnost izrezivanja takvih, kemijski promijenjenih baza. Lomovi cijelih lanaca DNA mogu se popraviti na dva načina. Jedan od načina je popravak homolognom rekombinacijom pri čemu se molekula DNA s lomom rekombinira s neoštećenom homolognom DNA molekulom. Pri tome lanci homologne DNA služe kao kalup za sintezu kojom se ispunjava dvolančani lom.

Žive stanice i tkiva zaštićeni su od mogućeg oštećenja slobodnim radikalima. Slobodni radikali nastaju svakodnevno u organizmu u mnogim metaboličkim procesima, kao što je oksidativna fosforilacija (149). Oštećenja ipak ne nastaju jer organizam ima snažne mehanizme zaštite protiv "fizioloških koncentracija" slobodnih radikala. Jedan od mehanizama zaštite je vezivanje slobodnih radikala na ligandne molekule kao što su antioksidansi. U takve prirodne antioksidanse ubrajamo: vitamine K, A, C, E, koenzim Q, tiolne molekule (cistein, cistamin, metionin, glutation), ubikinon te glukozu. Drugi način eliminacije slobodnih radikala iz organizma su enzimske reakcije u kojima se oni pretvaraju u manje toksične ili netoksične molekule. Enzimi koji sudjeluju u tim reakcijama su: superoksid-dismutaza koja pretvara superoksidni anion u vodikov peroksid te katalaza koja pretvara vodikov peroksid u vodu i kisik. Ovi prirodni mehanizmi zaštite iznimno su učinkoviti pri fiziološkim količinama slobodnih radikala u organizmu. Svaka veća koncentracija endogenih ili egzogenih slobodnih radikala predstavlja potencijalnu opasnost za organizam, povećava mogućnost nastanka oštećenja DNA, a time i mogućnost nastanka mutacija u stanicama.

Dosadašnja su klinička istraživanja većinom bila usmjerena na nuspojave izbjeljivanja poput preosjetljivosti i iritacije gingive, dok podaci o genotoksičnosti i karcinogenosti nedostaju (150). Dosadašnja istraživanja genotoksičnosti vodikova peroksida rađena su u *in vitro* uvjetima na kulturama stanica i *in vivo* na animalnim modelima. Genotoksičnost vodikova peroksida je dokazana u kulturama bakterijskih stanica (151-154) i u kulturama nekih eukariotskih stanica (156,156). Međutim, dodatkom katalaze spriječen je genotoksični učinak u staničnoj kulturi (157). Genotoksično djelovanje vodikova peroksida *in vivo* je dvojbeno – brojne studije pokazale su da on nema genotoksično, karcinogeno niti promotorsko djelovanje (158-160) dok je u nekoliko studija (nakon dugotrajne oralne ingestije) zabilježena povećana incidencija duodenalne hiperplazije i njena zloćudna preobrazba (161,162). Razlike u rezultatima *in vivo* i *in vitro* istraživanja objašnjavaju se različitim uvjetima kojima su eksperimentalne stanice bile izložene. Naime, stanice *in vitro* dolaze u direktan kontakt s visokim koncentracijama vodikovog peroksida, a uz to im nedostaju zaštitni mehanizmi (katalaza i antioksidansi). DNA bakterijske stanice smještena u citoplazmi puno je podložnija oštećenju slobodnim radikalima nego eukariotska DNA koja je zaštićena jezgrinom membranom, a posjeduje i učinkovite mehanizme popravka. Nadalje, stanice *in vivo* ne dolaze u direktan kontakt s toliko visokim koncentracijama vodikova peroksida, a imaju i veću aktivnost enzima koji neutraliziraju slobodne radikale. Zbog svega

navedenog stanice su u svojem prirodnom, *in vivo* okruženju, puno sposobnije oduprijeti se genotoksičnom učinku slobodnih radikala nego one u kulturi.

Budući da je incidencija karcinoma lokaliziranog na gingivi u općoj populaciji manja od 1:100.000, Munro i sur. smatraju da bi se eventualni karcinogeni učinak preparata za izbjeljivanje očitovao kao zamjetno povećanje incidencije karcinoma u posljednjem desetljeću, uzevši u obzir da je u to vrijeme višestruko porasla njihova primjena. Takav porast incidencije nije zapažen, a do danas ne postoje klinički izvještaji koji bi povezali pojavljivanje karcinoma usne šupljine s primjenom sredstava za izbjeljivanje (150). Nije dokazan niti promotorski učinak vodikova peroksida na karcinogenezu u pušača i osoba koje konzumiraju veće količine alkohola (163).

Dosadašnja malobrojna klinička istraživanja nisu pokazala genotoksični, odnosno karcinogeni učinak vodikova peroksida iz preparata za izbjeljivanje. U vezi s dostupnim podacima o genotoksičnosti i karcinogenosti vodikova peroksida *International Agency for Research on Cancer (IARC)* 1999. donosi sljedeće zaključke:

1. postoje ograničeni dokazi o genotoksičnosti i karcinogenosti dobiveni na eksperimentalnim životinjama;
2. postoje neadekvatni dokazi o genotoksičnosti dobiveni na ljudima.

Sukladno tome, IARC vodikov peroksid klasificira u skupinu 3 – *not classifiable as to its carcinogenicity to humans* (nemoguće ga je klasificirati prema karcinogenosti za ljude) (163).

1.8. UTJECAJ IZVORA SVJETLOSTI NA IZBJELJIVANJE ZUBI

Preparati vodene otopine vodikovog peroksida i karbamid peroksida različitih koncentracija koristili su se godinama za izbjeljivanje zubi, ali je takav način izbjeljivanja zahtjevao višestruke odlaske i posjete stomatologu. Svjetlost i toplina su se koristili empirijski u pokušaju ubrzavanja katalitičkog raspada vodikovog peroksida i na taj način ubrzaju i potaknu postupak izbjeljivanja zubi (164). Različiti izvori svjetlosti korišteni su kako bi ubrzali postupak izbjeljivanja vitalnih zubi (165,166). Pri tome su korišteni koherentni ili nekoherentni izvori svjetlosti (167) kao halogene polimerizacijske lampe i diodni laseri (168). Kvarc-tungsten-halogen lampe (QTH), plazma lampe, metal halogene lampe i laserski izvori svjetlosti različitih valnih duljina kao i LED izvori svjetlosti predlagani su kao aktivacijski sustav prilikom vitalnog izbjeljivanja zubi (169). Laserski uređaj u dentalnoj medicini imaju široku primjenu i između ostalog primjenjuju se pri operativnim zahvatima na mekim i tvrdim tkivima, obradi i sterilizaciji korijenskih kanala (170). LED uređaji su jeftiniji od lasera i trebaju manje energije za produkciju svjetlosti (171) dok u usporedbi s halogenim lampama proizvode manje topline (172). Kada se sredstvo za izbjeljivanje aktivira pod utjecajem svjetla, mala količina se apsorbira, a nastala energija se pretvara u toplinu. Ovo se smatra glavnim mehanizmom djelovanja kod svih svjetlosno aktiviranih postupaka izbjeljivanja. S namjerom povećanja apsorpcije svjetlosti i time pretvorbom u toplinu, neka sredstva za izbjeljivanje u svom sastavu imaju obojene čestice kao što je karoten. Narančasto-crvena boja karotena povećava na taj način apsorpciju plavog svjetla (171).

1.8.1. LED izvori svjetlosti

Svjetleća dioda (engl. LED-*light-emitting diode*) je poluvodička dioda koja emitira inkoherentno svjetlo uskog spektralnog područja kada je njezin p-n spoj električki propusno polariziran (engl. *forward bias*). Ovaj je efekt poznat kao jedan od oblika elektroluminiscencije. LED je uglavnom izvor male emisijske površine, često opremljen dodatnim optičkim elementima koji se dodaju čipu da bi se moglo utjecati na oblik slike koju stvara zračenje. Veliku ulogu u njihovoj uporabi ima istaknuto svojstvo svjetlećih dioda da mogu zračiti svijetlost različitih boja, dakle moguće je pri njihovoj proizvodnji utjecati na to u kojem će dijelu spektra (vidljivog i nevidljivog ljudskom oku) zračiti odabrana dioda. Pri tome boja emitirane svijetlosti ovisi o kompoziciji i stanju poluvodičkog materijala korištenog

za izradu same diode, te može biti u infracrvenom, vidljivom, blisko - ultraljubičastom te ultraljubičastom dijelu spektra.

Sastoje se od poluvodiča obično napravljenog od kristala alumij galij arsenida, a danas se koristi i niz drugih elemenata. Elektroluminiscencija nastaje kao posljedica spajanja poluvodiča s izvorom struje tj. anodom sa p-krajem na kojemu se nalaze slobodni prostori za elektrone koji ih onda popunjavaju dolazeći sa n-kraja poluvodiča koji je spojen na katodu. Prilikom popunjavanja rupa elektronima dolazi do spontane emisije svjetlosti u obliku fotona.

Današnji LED uređaji emitiraju svjetlost u vidljivom, UV i infracrvenom djelu spektra. Plave visokosjajne svjetleće diode koriste se u stomatologiji kao izvor svjetlosti za polimerizaciju. Rade u uskom dijelu spektra od 450 do 470 nm koji odgovara apsorpcijskom spektru kamforkinona i zato rade uz napajanje malom energijom i to svega 9 mW/cm^2. One se mogu spajati u konvergentne snopove koji iznose od 100 do 300 mW. LED diode uzrokuju minimalno zagrijavanje, visok stupanj konverzije i manje polimerizacijsko skupljanje. Tisuće sati rada, bez oštećivanja oka isključivanjem UV zračenja, kao i prihvatljiva cijena čine ih vrlo dostupnima. Najčešće korištene svjetleće diode su InGaN (Indij-Galij-Nitrid) svjetleće diode (173).

1.8.2. OLED izvori svjetlosti

Jednostavno fizikalno objašnjenje rada svjetleće diode počinje, kao i kod bilo koje druge diode, činjenicom da se OLED sastoji od čipa načinjenog od poluvodičkog materijala koji je impregniran određenim nečistoćama da bi nastao p-n spoj. Sličnost s ostalim diodama je ta da struja neometano teče od p-strane, ili anode, prema n-strani ili katodi, dok je razlika u tome da je tok u suprotnom smjeru kod svjetleće diode zabranjen. Time nosioci naboja, elektroni i šupljine, stižu do spoja s elektrodom koje imaju različite vrijednosti potencijala. Konačno, kada elektron naiđe na šupljinu, on time pada na nižu energijsku razinu, te pri tome uzrokuje oslobađanje energije u formi fotona. Već napomenuta valna duljina emitirane svjetlosti, a time i njezina boja, ovisi o vrsti materijala korištenih za izradu p-n spoja, tj. preciznije rečeno, valna duljina ovisi o energiji odnosno prirodi energijskog procijepa (engl. *band gap*) materijala koji čine p-n spoj (174). OLED izvori se danas koriste u televizorima, mobitelima i sličnim elektroničkim uređajima. Kao uređaji za izbjeljivanje zubi nisu do sada korišteni.

1.8.3. Laserski izvori svjetlosti

Laser (akronim engleskih riječi *Light Amplification of the Stimulated Emission of Radiation*) se smatra jednim od najvećih dostignuća dvadesetog stoljeća i neposredno nakon otkrića načela rada lasera pojavljuje se i u stomatološkim istraživanjima već 1962./63. godine. Laser je mehanička naprava koja koristi određene fizikalne zakone i stvara zraku svjetla koja se može koordinirano prenositi kroz prostor bez rasapa i gubitka snage. Svjetlo je sinonim za elektromagnetsku energiju vidljivog ili nevidljivog dijela spektra, a lasersko svjetlo je monokromatično, koherentno i kolimirano (175).

Za stvaranje laserske zrake neophodni su: aktivni medij, ekscitacijski mehanizam i optički rezonator. Postoje tri agregatna stanja medija koji proizvode laserske zrake, a u medicini se najčešće rabe:

1. **plinski medij** (CO2 laser valne duljine 10,6 nm, IC; He-Ne laser crvene boje valne duljine 632 nm; argon laser zeleno - plave boje valne duljine 488 i 515 nm; vodikov fluorid laser valne duljine 2.950 nm, IC);
2. **kruti medij** (Nd-YAG laser valne duljine 1.064 nm i 1.320 nm, IC; galij- arsenid laser valne duljine 904 nm);
3. **tekući medij** (promjenljivi laser crvene i žute boje valne duljine 630 i 577 nm).

Laser s plinovitim medijem sadrži plin u niskoj koncentraciji, jer većinu medija čini plin koji dobro provodi toplinu, primjerice helij. Tekući medij čine uglavnom alkoholne otopine različitih organskih boja ili otopine anorganskih spojeva rijetkih elemenata (europij, samarij, terbij). Kruti medij čini kristal koji dobro provodi toplinu, kao itrij aluminij garnet, (eng. *yttrium aluminium garnet*, YAG), a u koji su dodani ioni ili molekule kao izvor laserske zrake. YAG je složeni kristal kemijskog sastava Y3Al5O12 kojem se tijekom rasta mogu dodati u malom postotku različiti ioni. Izvor laserske zrake u krutom mediju najčešće su sljedeći ioni: iterbij (Yb), erbij (Er), neodimij (Nd), holmij (Ho), krom (Cr) i titan (Ti) (176).

Kod poluvodičkih lasera aktivni medij je poseban kristal koji je podijeljen u dva dijela: p-strana sa šupljinama koje predstavljaju nedostatak elektrona i n-strana s viškom elektrona (177). Laserska zraka nastaje protokom velike gustoće struje preko pn-spoja. Aktivni medij poluvodičkih lasera najčešće su galij arsenid (GaAs), galij aluminij arsenid

(GaAlAs) i indij galij aluminij fosfor (InGaAlP) (178). Aktivni medij se nalazi u laserskoj šupljini koja ima oblik tubusa i omeđena je ogledalima na svakom kraju. Vrsta aktivnog medija određuje vrstu lasera i valnu duljinu laserske zrake. Ekscitacijski mehanizam je izvor primarne energije koji pobuđuje aktivni medij i omogućuje nastanak laserske zrake. Mogući izvori energije u laseru su: ksenonska ili kriptonska lampa, lučni izvori svjetla, diodni laser ili elektomagnetska zavojnica. Samo se 3-10% energije iskoristi za stvaranje laserske zrake, ostatak energije oslobađa se kao toplina (178).

Laseri mogu proizvoditi: kontinuirane, isprekidane i pulsne valove. Ova podjela odnosi se na razlike u laserskom zračenju tijekom vremena. Kod kontinuiranih valova (engl. *continuous wave,* CW) nema promjena u energiji laserske zrake tijekom rada lasera. Od trenutka aktiviranja lasera do prestanka rada kontinuirano lasersko zračenje ima jednak intenzitet i svojstva (197). Isprekidani pulsevi (engl. *chopped, gated* CW) nastaju ako se lasersko zračenje prekida električnim, mehaničkim, elektro-optičkim ili akustično-optičkim načinom. Ova vrsta pulsa mijenja energiju laserske zrake ovisno o frekvenciji, a traje od 0,1 do 0,5 s (178).

Kod pulsnih valova energija se skuplja unutar laserske šupljine u određenom vremenu, a onda otpušta u mnogo kraćem vremenu, stvarajući puls koji ima svoju vršnu vrijednost energije. Pulsnim načinom rada lasera mogu se postići mnogo više vršne energije nego kontinuiranim laserskim valovima. Prednost pulsnih valova je i u vremenu koje ciljno tkivo ima za hlađenje između pojedinih pulseva, čime se smanjuje mogućnost termičkog oštećenja tkiva (178).

Primijenjena laserska energija može proći kroz tkivo bez učinka (transmisija), odbiti se s površine tkiva bez učinka (refleksija), rasipati se u dodiru s tkivom izazivajući sporedne učinke (disperzija) i može se upiti u tkivo izazivajući neposredan učinak (apsorpcija). Samo apsorbirana i dispergirana energija djeluju na ciljanom mjestu, a valna duljina laserske zrake i optička svojstva tkiva uvjetuju sposobnost upijanja u određenom tkivu (178).

Femtosekundni laseri emitiraju niz pulseva vremenskog trajanja nekoliko desetaka femtosekundi. Femtosekundni puls matematički se potpuno opisuje izgledom električnog polja koje ga sačinjava. Električno polje sastoji od brzo oscilirajućeg vala nosioca i sporo oscilirajuće ovojnice toga vala koja za prikazani puls ima oblik Gausove funkcije. Četiri su

osnovna parametra koja određuju izgled fs pulsa: vrijeme trajanja pulsa (τ), jakost električnog polja (Eo), frekvencija vala nosioca (ωc) i faza pulsa (Φ). Osnovni dijelovi femtosekundnog lasera su: optička pumpa, medij koji stvara lasersku akciju i rezonator (179, 180).

Zaključno, femtosekundni laser je pulsni laser koji emitira pulseve vremenskog trajanja nekoliko desetaka femtosekundi i prosječne snage od 1W. Cijeli sustav femtosekundnog lasera korištenog u ovome istraživanju sastoji se od pumpnoga zelenog lasera (Millenia, Spectra Physics) i Tsunami oscilatora (Ti: safir laser) u kojem se generiraju femtosekundni pulsevi. Laseru se može mijenjati valna duljina u području 770-950 nm.

1.8.4. ZOOM2 izvor svjetlosti

ZOOM2 izvor svjetlosti korišten je kao kontrolni izvor svjetlosti obzirom na svoju komercijalnu primjenu. Izvor svjetlosti predstavlja metal halogenu živinu lampu. Emitira ljubičastu svjetlost valne duljine između 350-400 nm. Ova jedinica posjeduje filtar infracrvenog zračenja koji smanjuje količinu topline kojoj su zubi izloženi za vrijeme izbjeljivanja(181).

1.9. 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 (182). 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 (182,183).

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 zakoče 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 (182,183).

1.9.1 Amorfni kalcijev fosfat

Za remineralizaciju je na dva iona fluora potrebno deset kalcijevih i šest fosfatnih iona ($Ca_{10}(PO_4)_6F_2$). 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 reminearlizaciju 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) (184). 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 amorfnih 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 (185).

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 (184).

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

2.1. SVRHA ISTRAŽIVANJA

Svrha istraživanja je ispitati učinak sredstava za izbjeljivanje pod utjecajem novih izvora svjetlosti na pastilama kalcijevog hidroksilapatita, caklini, dentinu i mekim tkivima.

2.2. RADNE HIPOTEZE

1. Novi izvori svjetlosti (LED405, OLED, femtosekundni laser) u usporedbi s kontrolnim izvorom svjetlosti (ZOOM2) s ili bez različitih gelova za izbjeljivanje ili vazelina ne dovode do porasta temperature.
2. Korištenje gelova za izbjeljivanje s i bez svjetlosne aktivacije novim izvorima svjetlosti ne dovodi do povećanog smanjenja mikrotvrdoće cakline i dentina.
3. Umjetna slina i amorfni kalcijev fosfat dovode do remineralizacijskog procesa i povećavaju mikrotvrdoću cakline i dentina nakon postupka izbjeljivanja.
4. Izbjeljivanje gelovima s i bez svjetlosne aktivacije ne utječe na promjenu površinske mikromorfologije i kemijskog sastava cakline i dentina.
5. Sredstava za izbjeljivanje aktivirana novim izvorima svjetlosti mogu ubrzati i poboljšati optički učinak izbjeljivanja.
6. Sredstava za izbjeljivanje, korištena u kontroliranim kliničkim uvjetima, ne pokazuju genotoksični i karcinogeni učinak na stanice oralne sluznice.

3. MATERIJALI I POSTUPCI

3.1. SREDSTVA ZA IZBJELJIVANJE

U istraživanjima su se korstila komercijalna sredstva za izbjeljivanje temeljena na karbamid peroksidu i vodikovom peroksidu različitih koncentracija (Tablica 3).

Tablica 3. 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	%
Zoom 2	Discus Dental, Culver City, SAD	Voda, poloksimer 497, glicerin, propilen glikol, kalijev nitrat, kalijev hidroksid, menta piperita, eugenol, željezni glukonat, vodikov peroksid (25%	*In office*	Vodikov peroksid	25
Boost	Ultradent, South Jordan, UT, SAD	Propilen glikol, vodikov peroksid (38%), 1,1% fluorid, 3% kalijev nitrat	*In office*	Vodikov peroksid	38
Viva Style 30	Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn	Propilen glikol, karbamid peroksid (30%), voda, karbomer, ulje pepermita	*At home*	Karbamid peroksid	30
Viva Style 16	Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn	Glicerol, karbamid peroksid (16%), voda, karbomer, ulje pepermita	*At home*	Karbamid peroksid	16
Viva Style 10	Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn	Glicerol, karbamid peroksid (10%), voda, karbomer, ulje pepermita	*At home*	Karbamid peroksid	10

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 4).



Slika 13. Glandosane sprej.

Tablica 4. 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. SREDSTVO ZA REMINERALIZACIJU

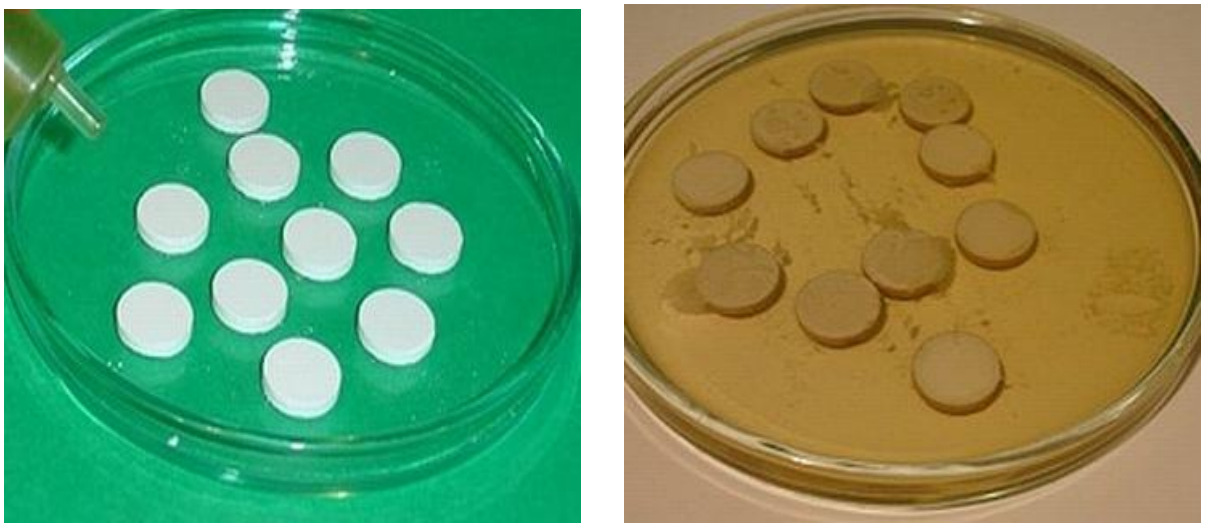
Za remineralizaciju cakline i dentina i posljedične promjene u mikrotvrdoći kao i morfološkom izgledu površine koristio se gel amorfnog kalcijevog fosfata ACP Relief (Discus Dental, SAD).



Slika 14. Preparat amorfnog kalcijevog fosfata (ACP).

3.4. SREDSTVO ZA BOJANJE

Pastile hidroksilapatita obojane su otopinom zelenog čaja (Zeleni čaj Fannings, Cedevita doo, Hrvatska) koja se pripremila na način da su se 2 g čaja ostavila u 1 dl tople vode 5 min. Nakon toga otopina se u potpunosti ohladila i prelila preko pastila hidroksilapatita.



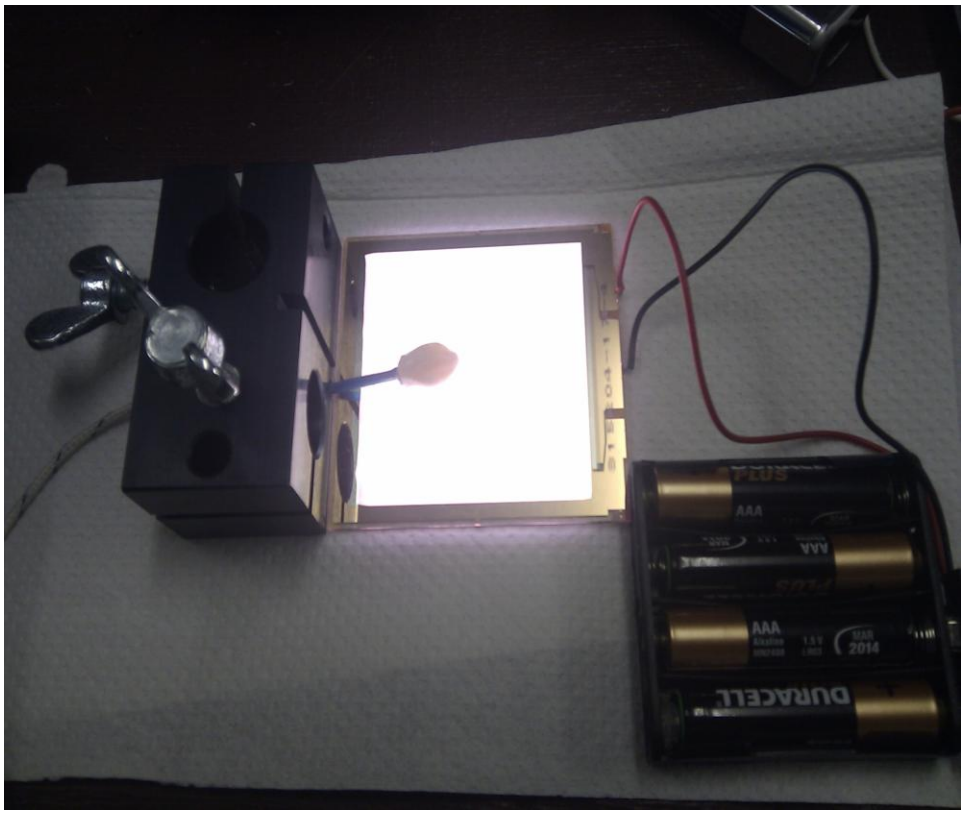
Slika 15. Bojenje pastila hidroksilapatita u zelenom čaju.

3.5. IZVORI SVJETLOSTI

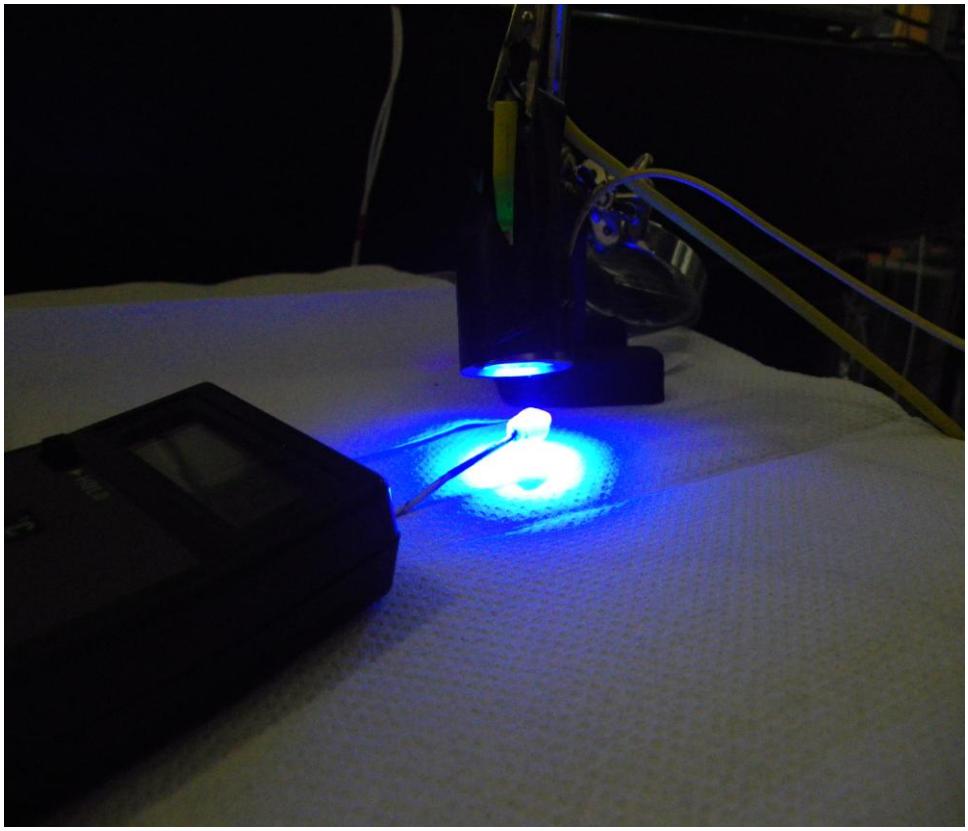
Od izvora svjetlosti koristili su se: LED405 (LED Engin Inc, San Jose, SAD), OLED (PPML, Pescara, Italija) i femtosekundni laser (Millenia, Spectra Physics, SAD), a kao kontrolni izvor svjetlosti koristio se ZOOM2 (Discus Dental, SAD) izvor svjetlosti (Tablica 5).

Tablica 5. Korištena izvori svjetlosti (svi podaci odgovaraju kao podaci navedeni od proizvođača) i vremena aplikacije.

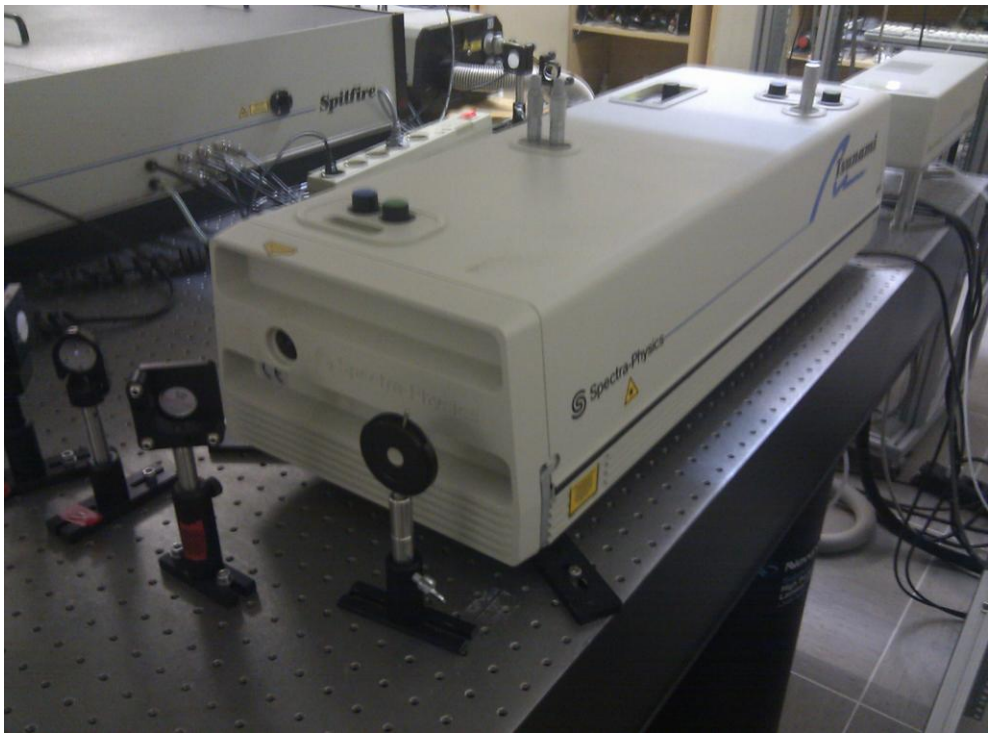
Proizvod	Proizvođač	Vrsta svjetla	Snaga	Vrijeme aplikacije (min)
LED	LED Engin Inc, San Jose, SAD	LED λ 405 nm	400 mW/cm2	15, 30
PPML OLED KIT engineering prototype	PPML, Pescara, Italija	OLED λ 400-760 nm	200 mW/cm2	15, 30
Millenia	Millenia, Spectra Physics, SAD	Femtosekundni laser λ 770 nm	800 mW/cm2	15, 30
Zoom 2	Discus Dental, Culver City, SAD	Živina metal halogena lampa λ 350-400 nm	2000 mW/cm2	15, 30



Slika 16. OLED izvor svjetlosti (PPML, Pescara, Italija).



Slika 17. LED izvor svjetlosti (LED Engin Inc, San Jose, SAD).



Slika 18. Femtosekundni laser (Millenia, Spectra Physics, SAD).



Slika 19. ZOOM2 izvor svjetlosti (Discus Dental, SAD) (preuzeto s www.discus-dental.com).

3.6. UZORCI

3.6.1. Uzorci za mjerenje temperaturnog porasta

Pedeset svježe izvađeni ljudskih, intaktnih zubi (gornji sjekutići i očnjaci) je očišćeno i pohranjeno u 1% otopinu kloramina na sobnoj temperaturi neposredno nakon ekstrakcije. Korištenje izvađenih ljudskih zuba je odobren od strane Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korijenovi 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 i proširena je pomoću Gates Glidden svrdla broj 6 i 8 (DENTSPLY Maillefer, Tulsa, SAD) da bi se povećao prostor za unošenje termočlanka. Labijalne površine su očišćene i osušene komprimiranim zrakom. Za bolje provođenje temperature koristila se silikonska termovodljiva pasta (FujiPoly, Milton Keynes, VB). Termočlanak se postavio u pulpnu komoru što bliže labijalnoj površini zuba. Na površinu cakline zatim je postavljen gel 25%, 38% vodikovog peroksida i 16%, 10% i 30% karbamid peroksida te vazelina pomoću Heidemanove špatule u sloju debelom 2 mm. Izbjeljivanje je trajalo 30 minuta uz svjetlosnu aktivaciju LED405, OLED, fokusiranim i nefokusiranim femtosekundnim laserom, te 15 minuta ZOOM2 izvorom svjetlosti. U kontrolnoj skupini bez korištenja gela za izbjeljivanje i vazelina, izbjeljivanje je trajalo 15 minuta za ZOOM2 izvor svjetlosti i 30 minuta za LED405, OLED, fokusirani i nefokusirani femtosekundni laser. U svakoj skupini korišteno je pet gornjih sjekutića i 5 očnjaka.

3.6.2. Uzorci za mjerenje mikrotvrdoće

Šezdeset 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.

Uzorci su nasumično podijeljeni u skupine i pohranjeni u otopinu umjetne sline te pohranjeni na 37 ^{0}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 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). 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%, 38% vodikovog peroksida i 16%, 10% i 30% karbamid peroksida s pomoću Heidemanove špatule u sloju debelom 2 mm. Izbjeljivanje je trajalo 15 i 30 minuta uz svjetlosnu aktivaciju LED405, OLED i femtosekundnim laserom. U kontrolnoj skupini izbjeljivanje je trajalo 15 i 30 minuta bez svjetlosne aktivacije. 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 ostavljene u inkubatoru na 37°C

(Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein). U svakoj skupini koristilo se 5 uzoraka cakline i 5 dentina.

3.6.3. Uzorci za mjerenje mikromorfologije i kemijskog sastava

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 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. Uzorci su pohranjeni u otopinu umjetne sline na 37 ^{0}C (Cultura Incubator, Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn) da bi se simulirali intraoralni uvjeti. Koristili smo već ranije pripremljenu otopinu umjetne sline.

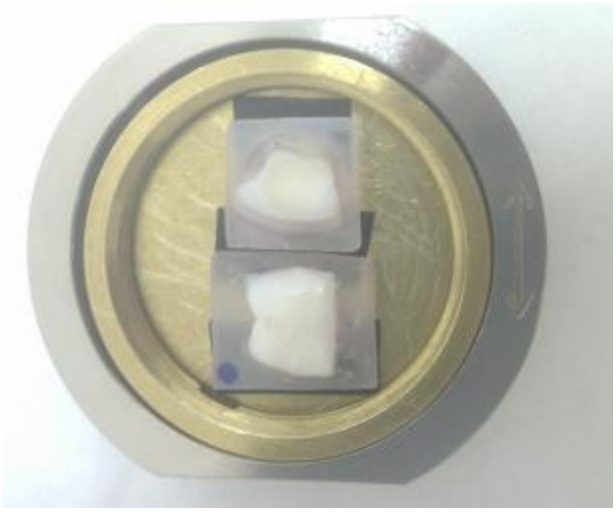
Tijekom eksperimenata zubi su bili pohranjeni u umjetnoj slini osim za vrijeme trajanja izbjeljivanja i vremena potrebnog za promatranje površinske mikrotvrdoće i promjena u kemijskom sastavu. Umjetna slina je mijenjana svakodnevno. Uzorci za SEM pripremljeni su na načina da je kruna zuba prerezana na 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 i u kemijskom sastavu 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%, 38% vodikovog peroksida i 16%, 10% i 30% karbamid peroksida pomoću Heidemanove špatule u sloju debelom 2 mm. Izbjeljivanje je trajalo 30 minuta uz svjetlosnu aktivaciju LED405, OLED i femtosekundnim laserom. U kontrolonoj skupini izbjeljivanje je trajalo 30 minuta bez svjetlosne aktivacije. 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, SAD) 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.

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.



Slika 20. Uzorci cakline i dentina za SEM i EDS analizu.

3.6.4. Uzorci za određivanje promjene boje

Dvjesto pastila hidroksilapatita izrađene su od posebno pripremljenog praha hidroksilapatita za laboratorijska istraživanja (Hydroxylapatite for analysis, ACROS ORGANICS, Lot A0229866, SAD). Svaka pastila sadrži 400 mg praha hidroksilapatita

odvaganog (Mettler PM200, Švicarska) i zatim prešanog (Univerzal GP1, Banja Luka, 1990) pod tlakom od 20 bara. Nakon izrade sve pastile zapečene su u sušioniku (Instrumentaria, ST-01/02, Tvornica medicinskih instrumenata, aparata i šprica, Zagreb, 1989) na temperaturi od 150 ° C u trajanju 2 sata radi dobivanja na čvrstoći.

Na površinu obojane pastile zatim je postavljen gel 25%, 38% vodikovog peroksida i 16%, 10% i 30% karbamid peroksida pomoću Heidemanove špatule u sloju debelom 2 mm. Izbjeljivanje je trajalo 15 i 30 minuta uz svjetlosnu aktivaciju LED405, OLED i femtosekundnim laserom. U kontrolnoj skupini izbjeljivanje je trajalo 15 i 30 minuta bez svjetlosne aktivacije.



Slika 21. Priprema pastila hidroksilapatita.

3.6.5. Ispitanici korišteni u kliničkom dijelu studije

Klinički dio istraživanja genotoksičnosti materijala za izbjeljivanje proveden na 22 ispitanika. Svi ispitanici su se na temelju informiranog pristanka uključivali u studiju. Ispitanike su činili osobe muškog i ženskog spola, pripadnici mlađe dobne skupine (18 – 25 godina), s dobrom oralnom higijenom, bez bolesti parodonta i gingivitisa, sa zdravim i nekarijesnim zubima bez velikih restoracija i cerviksnih lezija. Svi ispitanici bili su nepušači. Iz studije su isključeni: trudnice ili dojilje, pacijenti s jakim obojenjima zubi (tetraciklinska obojenja, flouroza, endodontski zahvati) i pacijenti s prethodno provedenim tretmanom izbjeljivanja. Ispitanici su prije istraživanja potpisali informirani pristanak odobren od Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Postupci izbjeljivanja provodili

su se u jutarnjim satima, na Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta.

Ispitanici su nasumično rasporedjeljeni u dvije skupine ovisno o preparatu koji će se koristiti za izbjeljivanje zubi. U prvoj skupini sudjelovalo je deset ispitanika (pet muških i pet ženskih ispitanika) i primjenio se preparat 25% vodikovog peroksida tvorničkog imena ZOOM2 (Discus Dental, SAD) uz svjetlosnu aktivaciju izvorom svjetlosti istoga proizvođača. U drugoj skupini (četiri muška i sedam ženskih ispitanika) primijenio se 38% vodikov peroksid tvorničkog imena Opalescence Boost (Ultradent, SAD) bez svjetlosne aktivacije. Svakom ispitaniku su se u dva odvojena brisa uzeli uzorci stanica s područja gingive (prvi bris) i sluznice unutarnje strane gornje usnice (drugi bris). Brisovi su se uzimali tri puta: neposredno prije, neposredno nakon, te 72 sata nakon postupka izbjeljivanja zubi. Za uzimanje brisa oralne sluznice koristile su se sterilne četkice za uzimanje uzoraka (Cytobrush Plus, Medscand AB, Švedska), a stanice su se pohranile u Eppendorf tubu (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka) u kojoj se nalazi pufer (0,1M Na2EDTA, 0,02M NaCl, 0,01M Tris-HCl; pH 7,0) ohlađen na +4 °C. ZOOM2 skupinu činilo je šest muških i pet ženskih ispitanika, dok je u Boost grupi bilo četiri muška i sedam ženskih ispitanika. Jedan ispitanik isključen je iz daljnjeg istraživanja zbog pojave iznimne preosjetljivosti već na početku tretmana preparatom Boost.

3.7. POSTUPCI

3.7.1. Mjerenje temperaturnog porasta

Stupanj temperaturnog porasta na površini zuba za vrijeme izbjeljivanja aktiviranog izvorima svjetlosti određen je pomoću infracrvenog termometra (NIMEX NI 8010, SAD), dok se za mjerenje porasta temperature unutar pulpne komore koristio K-tip termočlanka (Termopar Digital Multimeter, Tektronix DMM 916, SAD) i slikonska pasta (FujiPoly, Milton Keynes, Velika Britanija). Temperaturni porast je mjeren na površini i u pulpnoj komori. Udaljenost između izvora svjetlosti i zuba je postavljena na 10 mm. Sredstvo za izbjeljivanje je naneseno na površinu zuba u debljini od 2 mm. Novi sloj gela je korišten za svako iduće mjerenje. Temperatura je mjerena kroz 30 minuta za sve izvore svjetlosti osim za ZOOM2 (samo 15 minuta). Prije nanošenja gela na površinu zuba u prostor pulpne komore se

postavila silikonska termovodljiva pasta kako bi poboljšala termovodljivost. Termočlanak se postavio u unutrašnjost zuba, pri čemu je vrh bio postavljen što bliže vanjskoj površini zuba. Nakon toga zub i termočlanak su fiksirani. Mjerenje utjecaja svakog izvora svjetlosti na površinsku i temperaturu u pulpi obavljeno je pri sobnoj temperaturi (24 ºC). Temperatura sobe mjerena je također pomoću termočlanka.

Temperatura površine zuba mjerena je pomoću infracrvenog termometra pri čemu se zraka termometra usmjerila na površinu zuba. Temperature su zabilježene u 5 točki mjerenja: prije, 5, 10, 15 i 30 minuta tijekom izbjeljivanja. Rezultati su mjereni u realnom vremenu.



Slika 22. Infracrveni termometar za površinsko mjerenje temperature (NIMEX NI8010, SAD).



Slika 23. Digitalni termometar (Termopar Digital Multimeter, Tektronix DMM 916, USA).

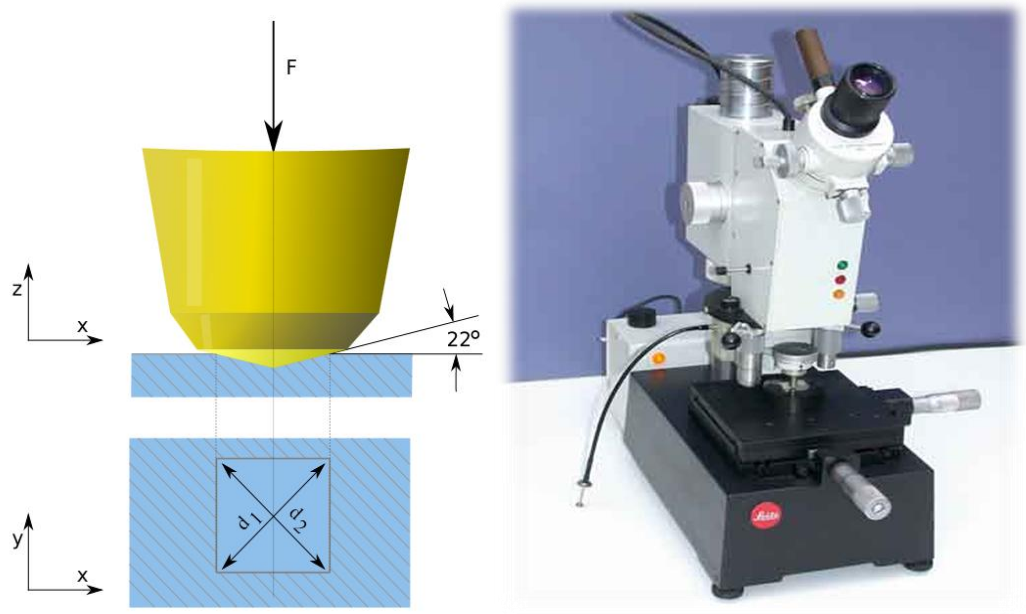
3.7.2. Mjerenje mikrotvrdoće

Tvrdoća je otpornost materijala na prodiranje. Po definiciji, tvrdoća predstavlja otpornost materijala prema prodiranju nekog drugog znatno tvrđeg tijela. Vickers je svojom metodom uklonio glavne nedostatke Brinell-ove metode, pa je po ovoj metodi moguće mjeriti i najtvrđe materijale, a nadalje kod Vickersa tvrdoća nije ovisna o primijenjenoj sili. Prvi nedostatak uklonjen je primjenom najtvrđeg 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 mekanih 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 (d1, d2) baze piramide otisnute u materijalu, a tvrdoća se određuje prema izrazu :

$$HV = Fx\ 0{,}189/\ d^2$$

gdje je F primijenjena sila u N, d aritmetička srednja vrijednost dijagonala baze piramide u mm (d=(d1+d2)/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 Microhardnes 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 obavljenja prije izbjeljivanje, tri nakon i tri nakon svakodnevnog 20 minutnog tretmana ACP i pohrane u umjetnoj slini ili deioniziranoj vodi kroz 14 dana.



Slika 24. Uređaj za mjerenje mikrotvrdoće.

3.7.3. Promjene u mikromorfologiji, kvantitativne i kvalitativne promjene u kemijskom sastavu 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.

Kvantitativne i kvalitativne promjene u kemijskom satavu cakline i dentina prije i nakon izbjeljivanja aktiviranog izvorom svjetlosti i nakon aplikacije sredstva za remineralizaciju određene su spektroskopijom karakterističnog X-zračenja, EDS spektrometar, INCA-350 (Oxford Instruments, Engleska).



Slika 25. Pretražni elektronski mikroskop JSM 7000F (JEOL, Japan) sa spektroskopom karakterističnog X-zračenja INCA-350 (Oxford Instruments, Engleska).

Elektronski mikroskop

Elektronske mikroskope nalazimo u dva osnovna oblika: **transmisijski elektronski mikroskop** (TEM) i **skenirajući elektronski mikroskop** (SEM). Transmisijski i skenirajući elektronski mikroskopi su slični po tome što oba primjenjuju zraku elektrona, no za stvaranje slike koriste posve različite mehanizme. Kao što samo ime govori, TEM sliku oblikuje pomoću elektrona koji se odašilju kroz preparat. SEM skenira površinu preparata te sliku oblikuje otkrivajući elektrone koji se odbijaju od vanjske površine preparata. Skenirajuća elektronska mikroskopija je napose neobična tehnika zbog dojma dubine koji se stječe promatranjem prikazanih bioloških struktura (186).

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 – 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.

Priprema uzoraka za SEM

Uzorci moraju biti pripremljeni za proučavanje u visokom vakuumu, te veličine koja odgovara veličini komore za smještaj uzoraka gdje su oni vrlo rigidno smješteni. Za konvencionalne SEM uzorak mora biti električno provodljiv i to barem njegova površina te posjedovati uzemljenje da bismo prevenirali nakupljanje električnog naboja na površini uzorka. Uzorci napravljeni od metala ne zahtijevaju veliku pretpripremu, nego samo površinsko čišćenje. Električno nevodljivi uzorci se pune tijekom osvjetljavanja električnom zrakom što uzrokuje pojavu greški i artefakata. Da bi se to smanjilo ili u potpunosti otklonilo, potrebno je takve uzroke presvući slojem metala koji je električni vodljiv te ujedno pojačava signal i rezoluciju površine. Najčešće se kao takvo koristi zlato koje se nanosi vakumskom evaporacijom. Osim zlata, koristi se zlato - paladij legura, platina, iridij, krom ili grafit.

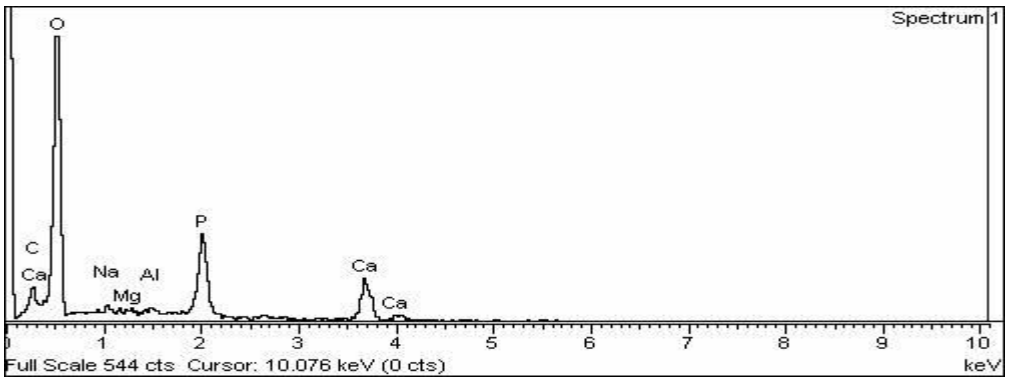
Završno, u elektronskom mikroskopu uzorak se ozračuje elektronima. Elektroni pored korpuskularne posjeduju i valnu narav, a valne duljine elektrona su znatno kraće od valnih duljina vidljive svjetlosti. Zbog toga se elektronskim mikroskopom mogu postići puno veća povećanja i znatno bolja rezolucija nego sa svjetlosnim mikroskopom. Kod klasičnog pretražnog elektronskog mikroskopa izvor elektrona je žarna nit, a kod pretražnog elektronskog mikroskopa s efektom polja kao izvor elektrona koristi se na primjer kristal lantanovog heksaborida (LaB6) koji je užaren na ~1500 ^{o}C. Primjenom pozitivnog električnog napona (anoda) elektroni se ubrzavaju, a primjenom elektromagnetskih leća se kolimiraju u uski snop. Nakon što elektroni udare u uzorak odbijaju se od površine uzorka i tako odražavaju njegovu morfologiju (186).

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).

Spektroskopija karakterističnog X-zračenja (EDS, EDX)

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 rentgenskim 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 ovositi o smjeru promatranja kristala. Za proučavanje bioloških makromolekula uobičajeno se koriste X- zrake valne duljine oko 0,1 nm proizvedene sinkotronskom radijacijom (187).



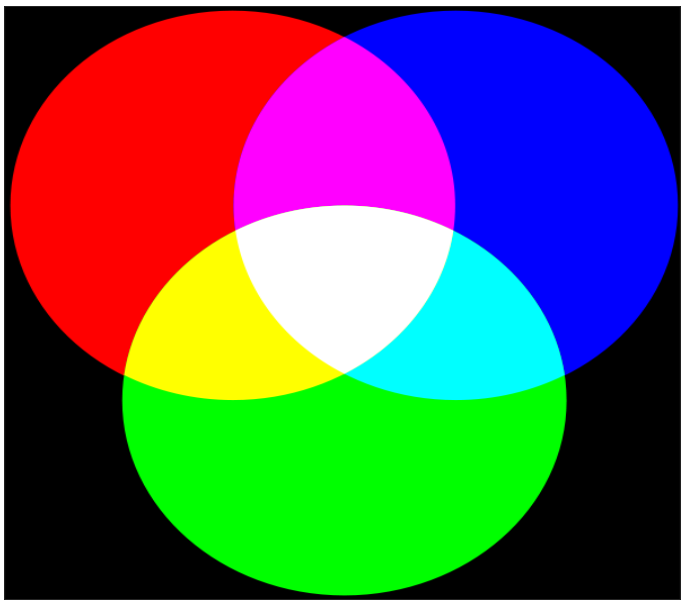
Slika 26. Prikaz mjerenja EDS analizom.

3.7.4. Učinak na promjenu boje

Mjerenje boje, način rada kolorimetra i RGB indeks

Mjerenje boje može se provesti na više načina: vizualno pomoću ključa boja, spektrofotometrijski, kolorimetrijski i kompjutorskom analizom digitalnih fotografija. Većina autora smatra da je mjerenje boje kolorimetrom adekvatan i pouzdan način određivanja boje zuba *in vitro* i *in vivo* uvjetima (3,13,15). Boja pastila mjerena je kolorimetrom (PCE RGB2 Color analyzer, PCE Group, Njemačka) i to po 5 uzastopnih mjerenja 3 puta: nakon izrade pastila, nakon bojanja pastila u čaju i nakon tretmana određenim postupkom izbjeljivanja.

Za potrebe istraživanja korišten je kolorimetar (PCE RGB2 Color analyzer, PCE Group, Njemačka), a boja pastila prikazana je RGB indeksom (RED-GREEN-BLUE). RGB indeks predstavlja udio osnovnih triju boja - crvene, zelene i plave. One, u većoj ili manjoj mjeri, čine sastavni dio svake boje (ukupna boja). Zbog specifičnog postupka mjerenja optičkih spektara čvrstih uzoraka za ova mjerenja koristili smo posebno pripremljene pastile hidroksilapatita. Početna boja određena je nakon same izrade pastila (čiste, bijele pastile), nakon bojanja u zelenom čaju kroz 8 sati i nakon tretmana izbjeljivanja ponovno je izmjerena promjena boje.



Slika 27. Prikaz raspodjele boje RBG indeksima (preuzeto iz 15).

Raspon u kojemu kolorimetar mjeri vrijednosti (udio) tih triju boja kreće se od 0 do 1023. Veće vrijednosti RGB indeksa pokazuju svjetlije nijanse. Prema tome bijela boja ima

maksimalan udio crvene, zelene i plave boje odnosno R=1023, G=1023, B=1023. S druge strane, crna boja nema udio ni crvene, ni zelene, ni plave pa joj je RGB indeks R=0, G=0, B=0. Sve ostale boje, primjerice žuta, smeđa, siva i druge, nastat će kombinacijom osnovnih triju boja - crvene, zelene i plave (Tablica 6).

Tablica 6. Raspodjela crvene, zelene i plave boje unutar ukupne boje.

R	**G**	**B**	**BOJA**	**OBJAŠNJENJE**
1023	1023	1023		Maksimalno bijela boja u sebi sadrži maksimalan udio sve tri boje
0	0	0		Crna boja ne sadrži udio ni crvene, ni zelene, ni plave boje
1023	0	0		Maksimalno crvena boja u sebi sadrži maksimalan udio crvene boje, a ne sadrži udio zelene i plave
0	1023	0		Maksimalno zelena boja u sebi sadrži maksimalan udio zelene boje, a ne sadrži udio crvene i plave
0	0	1023		Maksimalno plava boja u sebi sadrži maksimalan udio plave boje, a ne sadrži udio crvene i zelene



Slika 28. Kolorimetar (PCE RGB2 Color analyzer, PCE Group, Njemačka).

Spektroskopijska mjerenja

Zbog specifičnog postupka mjerenja optičkih spektara čvrstih uzoraka za ova mjerenja koristili smo posebno pripremljene pastile hidroksilapatita. Početna boja određena je nakon same izrade pastila (čiste, bijele pastile), nakon bojanja u zelenom čaju kroz 8 sati i nakon tretmana izbjeljivanja ponovno je izmjerena promjena boje.

Spektroskopija je znanost koja proučava interakciju elektromagnetskog zračenja i materije. Spektroskopija se koristi u mnogim granama prirodnih znanosti jer daje informacije o građi i sastavu tvari, njezinoj temperaturi, tlaku. Spektroskopija može dati informacije o dinamici promatranog sustava. Vjerojatno najšira upotreba spektroskopije je u analitičke svrhe. Spektroskopija se najčešće dijeli prema spektralnom području, a to često ovisi o grani znanosti koja koristi dotičnu spektroskopiju. Spektroskopijske metode osnivaju se na spoznajama o strukturi tvari i osobinama elektromagnetskog zračenja, a prema fenomenu koji izaziva sprezanje elektromagnetskog zračenja može se podijeliti na:

• emisijsku spektroskopiju
• apsorpcijsku spektroskopiju
• interferencijsku spektroskopiju

Rezultat spektroskopijskih mjerenja jest spektar, emisijski, apsorpcijski ili interferencijski. Iznosi mjerenih parametara nose uporabljive biološke informacije, a tada iz interpretacije spektra možemo saznati o strukturi i dinamici molekula ili njezinih dijelova. Razina na kojoj proučavamo sistem primarno ovisi o energiji elektromagnetskog zračenja kojom ga obasjavamo, pa spektroskopijske metode dijelimo na temelju tih energija. Za razumijevanje spektara nužno je definirati osnovno i uzbuđeno (ekscitirano) stanje molekule. Osnovno energijsko stanje molekule jest stanje najmanje dopuštene energije za promatranu molekulu. Pritom energiju molekule određuje zbroj energija elektronskih, vibracijskih i rotacijskih stanja. Svako stanje molekule s većom energijom uzbuđeno je stanje molekule.

U spektroskopijskim istraživanjima bioloških molekula pretežno rabimo apsorpcijsku spektroskopiju. Izvori su podataka apsorpcijski spektri. Apsorpcijski je spektar raspodjela intenziteta transmitiranog elektromagnetskog zračenja po valnim duljinama fotona. Frekvencije spektralnih linija karakteristične su za molekulu i nose informacije o razlikama

energija između pojedinih energijskih stanja u molekuli, a intenzitet linije govori o ostvarenom broju mogućih prelazaka s danom energijom (188).

Elektromagnetski val prikazujemo kao udruženo električno i magnetsko polje koja osciliraju međusobno okomito i okomito na smjer širenja. Interakcija s molekulama određena je električnom komponentom, a da bi se elektromagnetski val apsorbirao moraju biti zadovoljena dva uvjeta. Prvi da je energija kvanta jednaka energiji prelaska između dvaju stanja sistema i drugi, da komponenta oscilirajućeg elektroničkog polja elektromagnetskog vala stimulira oscilacije električnog dipola u molekuli. To znači da se spektroskopijske tehnike osnivaju na karakterističnim interakcijama kvanta iz različitih područja elektromagnetskog zračenja s atoma i molekulama tvari. Interakcija je moguća ako električno ili magnetsko polje elektromagnetskog zračenja može promijeniti neku električnu ili magnetsku karakteristiku promatrane molekule.

Svi fenomeni koji se promatraju u spektroskopiji, objašnjavaju se s nekoliko mogućih pojava interakcije elektromagnetskog zračenja i materije. Sustav koji stupa u interakciju s elektromagnetskim zračenjem mora sadržavati diskretne energijske razine. Po Bohrovom uvjetu, razlika između energijskih razina sustava mora biti jednaka energiji fotona elektromagnetskog zračenja koji stupa u interaciju sa sustavom.

Tablica 7. Područja spektroskopije (preuzeto iz 188).

Metoda	ν/Hz	λ	Mjerene promjene
Nuklearna magnetska rezonancija (nmr)	3x10 – 3x10	100 m – 1 m	spinskog stanja jezgre
Elektronska spinska rezonancija (esr)	3x10 – 3x10	1 m – 10 cm	spinskog stanja elektrona
Mikrovalna spektroskopija	3x10 – 3x10	1 cm – 100 μm	rotacijskih stanja molekula
Infracrvena spektroskopija	3x10 – 3x10	100 μm - 1 μm	vibracijskih stanja molekule
Optička i uv-spektroskopija	3x10 – 3x10	1 μm – 10 nm	elektronskih stanja u molekule
X- spektroskopija	3x10 – 3x10	10 nm - 100 pm	raspodjela elektrona u molekuli
γ- spektroskopija	veća od	100 pm – 1 pm	raspodjela nukleona u jezgri

Spektroskopija vidljivog i ultraljubičastog područja (UV/VIS NIR)

Spektroskopija vidljivog zračenja koristi vidljivu svjetlost kao medij proučavanja. Vidljivo zračenje uzrokuje pobuđenje elektrona unutar atoma, molekula, kristalnih tvari ili amorfnih tvari. Spektroskopijom vidljivog zračenja se proučavaju efekti prouzrokovani promjenom elektronske strukture atoma ili molekula te njihova elektronska struktura, kao i elektronska struktura kristaliničnih i amorfnih tvari. Vidljivo zračenje emitiraju objekti čija je toplinska energija atoma ili molekula jednaka ili veća energiji pobuđenja njihovih elektrona.

Energije kvanta iz vidljivog i ultraljubičastog područja, od 1 do 100 eV odgovaraju energijama pobude vanjskih elektrona u atomima i valentnih elektrona u molekulama. Interakcija elektromagnetskog vala s molekulom promijenit će oblik elektronskog oblaka i time uzrokovati promjenu električnog dipolnog momenta molekule. Spektroskopijski mjerimo takvu promjenu. Spektroskopija u vidljivom području govori o strukturi molekula.

U kemiji ova spektroskopija obuhvaća i **blisko ultraljubičasto zračenje**, jer se za to optičko područje koriste iste tehnike i isti materijali, a instrumenti često mogu snimati spektre u oba spektralna područja. Takva spektroskopija se označava kraticom **UV-VIS** (eng. UltraViolet-VISible) i koristi se za kvantitativno određivanje prijelaznih metala i organskih komponenti u otopini. Otopina s ionima prijelaznih metala može biti obojena (tj. apsorbirati vidljivi dio spektra) zato što elektroni iz d-orbitala mogu biti pobuđeni iz jednog energetskog stanja u drugo. Boja otopine ovisi o prisustvu drugih vrsta kao što su određeni anioni ili ligandi organske komponente apsorbiraju svjetlost u vidljivom i UV dijelu spektra koncentracija analizirane vrste određuje se preko Beer-Lambertovog zakona:

$$A=-\log(I/I0)=ecL$$

A-apsorbancija, I0-intenzitet upadnog svjetla, I-intenzitet propuštenog svjetla, e-konstanta (molarna apsortivnost), c-tražena koncentracija, L-promjena valne duljine pri prolasku kroz uzorak (188).

Spektrofotometar

Karakteristike reflektiranog spektra i optičke karakteristike pastila hidroksilapatita mjerene su između 300 i 800 nm valne duljine pomoću UV/Vis/NIR (ultraviolet-visible near infrared) (UV 3600, Shimadzu, Tokyo, Japan) spektrofotometra opremljenog s integrirajućom sferom. Spektrofotometar mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak (I) te ga uspoređuje s intenzitetom upadnog svjetla (I_0). Osnovni dijelovi spektrofotometra su izvor svjetlosti, držač uzorka, monokromator i detektor. Ovaj spektrofotometar također posjeduje i četvrtasti kartonski okvir (4 x 4 cm) s otvorom od 10 mm u koji je postavljena pastila ispred držača sfere. Podaci su zabilježeni pomoću kompjutora i pripadajućeg softvera UV Probe software (Shimadzu, Tokyo, Japan) pri čemu su dobiveni grafovi svjetlosne refleksije s površine pastila u vidljivom djelu spektra.



Slika 29. UV/VIS NIR spektrofotometar (3600, Shimadzu, Japan).

Kao izvori zračenja koriste se volframove žarulje, halogene žarulje, ksenonske žarulje. U ultraljubičastom području koriste se deuterijske lampe. Kao izvor zračenja može poslužiti i laser čija se valna duljina može ugađati. U slučaju lasera nije potreban monokromator, jer laser emitira zračenje točno određene valne duljine, koja je puno bolja od svjetlosti koja izlazi iz monokromatora. Spektroskopija koja koristi laser se naziva spektroskopija visokog razlučivanja (188).

3.7.5. Istraživanje genotoksičnosti mikronukleus testom

Mikronukleus test

Mikronukleus test je minimalno invazivan i relativno jednostavan postupak kojim se mogu detektirati oštećenja DNA *in vivo* uzrokovana različitim genotoksičnim čimbenicima. Mikronukleusi su male kromatinske strukture koje nalikuju jezgri, a smještene su unutar interfazne citoplazme (189,190). Nastaju uslijed lomova kromosoma i kondenzacije acentričnih kromosomskih ulomaka ili kromosoma zaostalih u anafazi (191). Prisutnost mikronukleusa pokazatelj je postojanja aberacija u prethodnoj diobi stanice (192) te se stoga učestalost mikronukleusa može koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma u stanicama, u uvjetima *in vitro* i *in vivo* pod utjecajem različitih

genotoksičnih tvari (193). Broj MN po stanici varira, ovisno o težini oštećenja DNA, a rezultati se mogu razlikovati i među pojedinim laboratorijima, ovisno o kriteriju brojanja. Smatra se da je za dostatnu preciznost ovog postupka potrebno uzeti u obzir barem 2000 stanica po uzorku. Ovaj test može se primijeniti na različite vrste stanica: leukocite, eritrocite, fibroblaste (194) i stanice bazalnog sloja epitela. Uz broj MN određuju se i drugi markeri genotoksičnosti (nukleoplazmatski mostovi, jezgreni pupovi, binuklearne stanice) i citotoksičnosti (karioreksa, karioliza). Određivanjem ovih dodatnih markera moguće je preciznije kvantificirati oštećenja DNA te razlikovati genotoksični od citotoksičnog učinka istraživane tvari. U novije vrijeme (posljednjih 20-ak godina) MN test sve je više korišten i prihvaćen kao pouzdana i osjetljiva metoda za procjenu oštećenja DNA (1975 196). Nastanak mikronukleusa mogu potaknuti genotoksične tvari u stanicama izloženog organizma na dva načina:

Aneugeni učinak – nakon što stanica uđe u diobu zbog oštećenja i nefunkcionalnosti mikrotubula diobenog vretena, onemogućeno je putovanje jednog ili više kromosoma na pol stanice. Nakon citokineze zaostali kromosomi u citoplazmi stanice kćeri tvore mikronukleuse.

Klastogeni učinak – mikronukleus nastaje od acentričnih ulomaka kromosoma (ulomci kromatida i kromosoma) nastalih uslijed loma kromosoma. Spontanom nastanku mikronukleusa doprinose: a) mutacije kinetohornih proteina, centromera i diobenog vretena koje mogu izazvati nejednaku raspodjelu kromosoma ili gubitak čitavih kromosoma tijekom anafaze i b) nepopravljeni kromosomski lomovi koji dovode do stvaranja acentričnih ulomaka, a nastaju djelovanjem endogenih čimbenika ili pod vanjskim utjecajem (197). Povećani broj mikronukleusa može ukazivati i na općenitu genetičku nestabilnost. Stanice s nestabilnim kariotipom imaju sklonost uklanjanja kromosoma, što se barem djelomično zbiva putem stvaranja mikronukleusa. Dokazano je da oko 50% spontano nastalih mikronukleusa sadrži čitave kromosome, a ostali nastaju od acentričnih ulomaka. Mikronukleusi koji sadrže čitave kromosome češće se nalaze u starijih nego u mladih ispitanika (198).

Mikronukleus test brži je i jednostavniji od analize strukturnih aberacija kromosoma, podjednako je osjetljiv u otkrivanju oštećenja diobenog vretena i aberacija kromosoma, te je uključen u standardnu "bateriju" testova genotoksičnosti.

Citotoksičnost označava toksičnost određenog stranog tijela ili supstrata prema stanici. Za vrijeme rasta i razvoja organa stanična smrt igra važnu ulogu u održavanju homeostaze. Homeostatska kontrola broja stanica rezultat je ravnoteže izmedu proliferacije i smrti. Poznata su tri oblika stanične smrti; apoptoza (fiziološka, prirodna ili programirana smrt stanice), autofagija i nekroza (slučajna, sporedna ili toksična smrt stanice). Stanična smrt može se podijeliti u tri funkcionalno različite faze:

a) faza indukcije; ovisna o okidaču koji pokreće staničnu smrt;

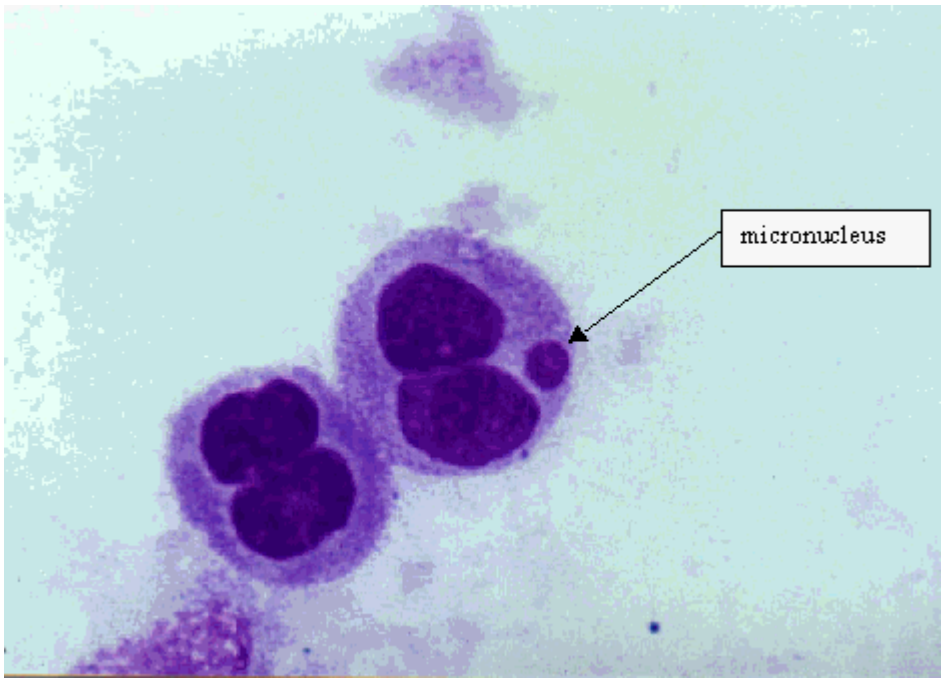
b) izvršna faza;

c) faza smrti stanice; dolazi do raspada jezgre i kromatinske fragmentacije.

Reaktivni radikali kisika sudjeluju kao izravni ili neizravni pokretači apoptoze i imaju značajnu ulogu za vrijeme indukcijske faze, povećvaju propusnost mitohondrijske membrane te vode konačnoj smrti stanice.

Apoptoza (grč. apoptosis znaci opadanje) je kontrolirani oblik stanične smrti koja služi kao molekularna točka regulacije fizioloških procesa. Stanična selekcija apoptozom javlja se tijekom normalnih fizioloških funkcija, kao i u slučajevima toksičnosti i bolesti. Proces kontrolirane stanične smrti poznat je već jedno stoljeće i opisan kao "genima regulirana stanična smrt" jer predstavlja genetički reguliran proces samoubojstva. Najranije promjene, vidljive elektronskim mikroskopom u procesu apoptoze su gubljenje konformacije plazmatske opne, gubitak mikrovila i veza izmedu stanica. Volumen stanice se smanjuje zbog skupljanja citoplazme i jezgre. Promjene se javljaju brzo (unutar nekoliko sati), a većina morfoloških i biokemijskih promjena nastaje u jezgri. Kromatin formira guste polumjesečaste nakupine na unutrašnjoj stijenci jezgrine opne, nakon čega dolazi do segmentacije jezgre. Citoplazmatski volumen se i dalje smanjuje zbog gubitka unutarstanične tekućine. U apoptozi su stanične organele sačuvane i ne dolazi do izlijevanja staničnog sadržaja u okolno tkivo, tako da uklanjanje apoptotičkih stanica izaziva upalnu reakciju. Umiranje stanice apoptozom posljedica je različitih faktora u i izvan stanice, ali između ostalog i oštećenja genetičkog materijala i oksidacijskog stresa u stanici izazvanog porastom koncentracije reaktivnih vrsti kisika (ROS) u citoplazmi (199).

Nekroza ili "slučajna" smrt stanice nastaje kao odgovor na široku skupinu štetnih čimbenika i toksičnih spojeva (199). Nekroza se nikada ne javlja unutar fizioloških uvjeta, ona je slijed letalnih patoloških oštećenja stanice, promjena u mitohondrijskom obliku i funkciji, kao i naglog nastanka nesposobnosti održavanja stanične homeostaze. Udružena je s masivnim tkivnim oštećenjima. Najranije promjene stanica u nekrozi su bubrenje citoplazme i organela, naročito mitohondrija, a uzrok tome je povećanje Ca2+ i Na+ što dovodi do Donnanovog učinka. Rano mitohondrijsko bubrenje je osobitost preletalne faze stanice, a nastaje aktivacijom mitohondrijskih fosfolipaza što dovodi do promjena sastava i permeabilnosti stanične opne. Zbog promijenjene aktivnosti ionskih pumpi na plazmatskoj opni i izravnog oštećenja opne dolazi do prsnuća stanične opne, sekundarnog gubitka stanične energije i gubitka organela (198).



Slika 30. Formiranje mikronukleusa.

Broj binuklearnih stanica koristi se kao indikator toksičnog djelovanja na proteinske strukture u stanici, prvenstveno citoskelet, u slučaju kojeg se zbog nemogućnosti pravilnog odvijanja citokineze pojavljuju stanice s dvije jezgre (198).

Nukleoplazmatski mostovi i jezgreni pupovi predstavljaju aberantne oblike organizacije interfaznog kromatina te upućuju na specifičnosti u genotoksičnom djelovanju agensa. Nukleoplazmatski mostovi u kemijskoj genotoksičnosti najčešće nastaju fuzijom oštećenih kromosoma u telomernim regijama, čime je onemogućeno njihovo pravilno raspoređivanje u

anafazi i predstavljaju značajnije narušavanje integritita genoma (promjene strukture i organizacije kromosoma i mehanizama popravka).
Jezgreni pupovi su morfološka manifestacija izdvajanja amplificiranog ili teško oštećenog dijela genoma iz jezgre. Pupanjem karioteke formira se pup koji u sebi sadrži izdvojen dio genetičkog materijala, pup se odvaja od jezgre i formira se mikronukleus koji putuje ka staničnoj membrani i ponovnim procesom pupanja izlučuje se iz stanice (199).

Genotoksični učinak sredstva za izbjeljivanje na epitelne stanice oralne sluznice

Potencijalni genotoksični učinak sredstva za izbjeljivanje na epitelne stanice oralne sluznice analiziran je mikronukleus testom. Ovaj test je minimalno invazivan i relativno jednostavan postupak kojim se mogu detektirati oštećenja DNA *in vivo* uzrokovana različitim genotoksičnim čimbenicima. U stanici koja je pretrpjela oštećenja genetskog materijala, tijekom mitoze nastaju tvorbe nazvane mikronukleusi (MN). MN nastaju tijekom metafaze i anafaze, a ostaju vidljivi i u interfazi. Mogu ih činiti cijeli kromosomi ili dijelovi acentričnih kromosoma koji nisu migrirali na suprotne polove stanica tijekom anafaze. Takve promjene nastaju zbog prekomjerne izloženosti stanice genotoksičnim tvarima te pogreškama koje se javljaju tijekom mitoze ili popravka DNA. Smatra se da je za dostatnu preciznost ovog postupka potrebno uzeti u obzir barem 2000 stanica po uzorku. Ovaj test može se primijeniti na različite vrste stanica: leukocite, eritrocite, fibroblaste i stanice bazalnog sloja epitela. Uz broj MN određuju se i drugi markeri genotoksičnosti (nukleoplazmatski mostovi, jezgreni pupovi, binuklearne stanice) i citotoksičnosti (karioreksa, karioliza). Određivanjem ovih dodatnih markera moguće je preciznije kvantificirati oštećenja DNA te razlikovati genotoksični od citotoksičnog učinka istraživane tvari.

Mikronukleus je kromatinska tvorevina koja je morfološki vidljiva u citoplazmi interfazne stanice. Mikronukleus čini dio genetičkog materijala na koji se nisu vezale niti diobenog vretena ili su one oštećene te je u anafazi diobe ostao u prijašnjoj metafaznoj ravnini neraspoređen između polova stanice. U telofazi dolazi do despiralizacije i dekondenzacije zaostalog genetičkog materijala te sinteze ovojnice oko njega. Novonastala kromatinska struktura fizički je odvojena od jezgre. Po završetku diobe mikronukleus zaostaje u jednoj od novonastalih stanica. Ta stanica postaje triploidna za dio genoma sadržan u mikronukleu, dok je sestrinska stanica deficijentna za taj dio genetičke upute (198). Budući da formiranje mikronuklea, kao morfološke manifestacije oštećenja genoma, zahtijeva diobu stanice da

bismo primjenom te tehnike mogli ispitati genotoksično djelovanje nekog agensa potrebno je nakon izlaganja tkiva, a prije uzimanja uzorka ostaviti stanicama dovoljno vremena da one prođu barem jedan stanični ciklus. Stoga su nakon izbjeljivanja uzimana dva uzorka tkiva: prvi neposredno po postupku, kao kontrolni uzorak i drugi, 72 sata nakon postupka izbjeljivanja, da bi se stanicama sluznice omogućio prolazak kroz diobu (196,197).
U stanicama sluznice praćena je i prisutnost morfoloških promjena jezgre koje bi upućivale na pokretanje molekularnih mehanizama umiranja stanica. Karioreksija se smatra citološkim markerom apoptoze. Nastaje kao posljedica djelovanja aktiviranih endonukleza, a morfološki je vidljiva kao „pupanje“ hiperkondenziranog kromatina pri čemu dolazi do pojave piknotičkih nuklearnih fragmenata. Karioliza je morfološka manifestacija nekroze (195) Također je posljedica djelovanja oslobođenih DNAza, ali nakon nje ne slijedi nastanak piknotičkih tjelešaca niti pupanje stanice. Povećani broj karioreksija upućuje na indukciju apoptoze u stanicama obrisa (196). U kroničnoj izloženosti toksičnim agensima povećanje broja apoptotičnih stanica može upućivati na pojačani proces keratinizacije sluznice zbog povećane iritacije (197).

Prva skupina

Postupak izbjeljivanja 25% vodikovim peroksidom (ZOOM2) potpomognut je svjetlosnom aktivacijom. Prije uzimanja brisa, ispitanici su isprali usta vodom. Zatim je sterilnom gazom uklonjen površinski, odumrli sloj stanica s gingive u području prednjih zubi te je sterilnom citološkom četkicom uzet bris. Uzorak je pohranjen u sterilnu Eppendorf tubu u kojoj se nalazio pufer (0,1M Na2EDTA, 0,02M NaCl, 0,01M Tris-HCl; pH 7,0) ohlađen na +4 °C. Eppendorf tube s uzorcima pohranjene su na temperaturu od +4°C do transporta na Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada. Na isti način uzet je bris sluznice s unutarnje strane usnice. Zubi su očišćeni profilaktičkom pastom Proxyt (RDA 7) (Ivoclar-Vivadent, Liechtenstein), nakon čega su usta temeljito isprana vodom. Postavljen je retraktor, zubi su osušeni zrakom iz pustera, a gingiva je izolirana zaštitnim Liquidam gelom (Discus Dental, SAD) koji je osvijetljen pomoću polimerizacijskog uređaja (Bluephase, Ivoclar-Vivadent, Lihtenštajn). Na labijalne plohe zubi 14-24 i 34-44 nanesen je sloj gela debljine 1-2 mm, pomoću kista iz originalnog pakiranja. Zubi su osvijetljeni izvorom svjetlosti tijekom 15 minuta. Nakon osvjetljavanja gel je uklonjen Heidemannovim instrumentom 5/6 i svicima staničevine. Postupak nanošenja gela je ponovljen tri puta, u trajanju od 15 minuta svaki, koliko traje jedan tretman preparatom ZOOM2. Po završetku izbjeljivanja uklonjen je zaštitni

gel i retraktor, a usta su isprana vodom. Ponovno su uzeti brisovi s gingive i sluznice unutarnje strane usnice. Ispitanici su naručeni za tri dana, kada su im još jednom uzeti brisovi s istih mjesta.



Slika 31. Uklanjanje površinskog sloja stanica stanica sterilnom gazom s usnice.



Slika 32. Uklanjanje površinskog sloja sterilnom gazom s gingive.



Slika 33. Uzimanje brisa s usnice.



Slika 34. Uzimanje brisa s gingive.

Druga skupina

Postupak izbjeljivanja 38% vodikovim peroksidom (Opalescence BOOST) bez svjetlosne aktivacije. Prvi bris s gingive i usnice uzet je na isti način kao i u prethodnoj skupini. Zubi su očišćeni profilaktičkom pastom Proxyt (RDA 7) (Ivoclar-Vivadent, Lihtenštajn), nakon čega su usta temeljito isprana vodom. Postavljen je retraktor, zubi su osušeni pusterom, a gingiva je izolirana zaštitnim Opaldam gelom (Ultradent, SAD) koji je osvijetljen pomoću polimerizacijskog uređaja (Bluephase, Ivoclar-Vivadent, Lihtenštajn). Prema uputi proizvođača pomiješan je osnovni gel (38% vodikov peroksid) s aktivatorom. Tako zamiješani gel nanesen je originalnim nastavkom za aplikaciju na labijalne plohe zubi

14-24 i 34-44, u sloju debljine 0.5-1 mm. Nakon 15 minuta gel je uklonjen Heidemannovim instrumentom 5/6 i svicima staničevine. Postupak nanošenja gela je ponovljen tri puta, u trajanju od 15 minuta svaki, koliko traje jedan tretman preparatom Opalescence Boost. Po završetku izbjeljivanja uklonjen je zaštitni gel i retraktor, a usta su isprana vodom. Ponovno su uzeti brisovi s gingive i sluznice unutarnje strane usnice. Ispitanici su naručeni za tri dana, kada su im još jednom uzeti brisovi s istih mjesta.



Slika 35. Nanošenje ZOOM2 gela.



Slika 36.Nanošenje Opalescence BOOST gela.

Postupak tretiranja uzoraka stanica

Na dan uzimanja brisa uzorci su dostavljeni na Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Po dostavi na Institut centrifugirani su na 2000 okretaja 4 minute. Supernatant je uklonjen, a talog stanica resuspendiran u svježem puferu istog sastava. Postupak centrifugiranja i ispiranja ponovljen je dva puta. Resuspendirani talog stanica nanesen je na predmetna mikroskopska stakla ugrijana na 37 ^{o}C. Preparati su sušeni na 37 ^{o}C tijekom 15 minuta te potom fiksirani u metanolu (80% v/v) na +4 oC 20 minuta. Fiksirani preparati, osušeni na sobnoj temperaturi, bojani su 5% otopinom citološke boje Giemsa kroz 10 minuta. Obojeni preparati analizirani su svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 1000X. U stanicama se utvrđuje broj mikronuklea. Broje se stanice s jednim, dva i više od tri MN-a. U obzir dolaze stanice u kojima je MN odvojen od jezgre u potpunosti ili je dotiče, ali se jasno nazire rub jezgre, također da je promjer MN manji od 1/3 promjera jezgre, te da se boji isto kao i jezgra. Za svako uzorkovanje analizirano je 2000 stanica. U analizu nisu bile

uključene oštećene stanice i stanice s morfološkim promjenama jezgre. Takve stanice bilježene su zasebno.

3.8. STATISTIČKE METODE

Temperaturni porast za vrijeme izbjeljivanja

Temperaturni porast unutar svake promatrane skupine, formirane u ovisnosti o primijenjenom gelu za izbjeljivanje odnosno izvoru svjetlosti, prikazan je aritmetičkim sredinama i pripadajućim standardnim devijacijama. Zabilježena mjerenja temperature obuhvatila su samo cjelobrojne vrijednosti. Shapiro-Wilk test test ukazao je da podaci nisu normalno distribuirani, a Box-Cox test na nehomogenost varijance. Ponavljana mjerenja zabilježena tijekom procesa izbjeljivanja ukazala su na nelinearni porast temperature. Sukladno prethodnim značajkama temperaturnog porasta, za usporedbu prosječnog porasta temperature između pojedinih izvora svjetlosti/gelova za izbjeljivanje korišten je Generalized Estimating Equations (GEE) model zasnovan na Poissonovoj regresiji s logaritamskom transformacijom i autoregresivnoj korelacijskoj matrici. Logaritam vremena korišten je kao varijabla pomaka (offset varijabla) tako da se porast temperature odnosio na porast u minuti, odnosno u izračunavanju prosjeka temperaturnog porasta ranijim mjerenjima dane su veće težine da bi se obuhvatila brzina promjene temperature.

Za potrebe ovog dijela istraživanja formirana su dva GEE modela: jedan je uključivao mjerenja tijekom 15-minutnog tretmana izvorom svjetlosti, a drugi se koristio za promatranje promjena temperature za vrijeme 30-minutnog postupka izvorom svjetlosti. Prvi model je korišten prilikom rada sa ZOOM2 izvorom svjetlosti s obzirom da su mjerenja zabilježena samo kroz 15 minuta jer se stroj automatski gasi nakon toliko vremena. Drugi model se koristio za mjerenje i usporedbu temperaturnog porasta prilikom korištenja ostalih izvora svjetlosti i gelova za izbjeljivanje, a koji nisu uključivali korištenje ZOOM2 izvora svjetlosti, odnosno koristio se za sva mjerenja u trajanju od 30 minuta.

Mikrotvrdoća

Distribucija mjerenja površinske mikrotvrdoće nakon različitih tretmana prikazana je Box-plot dijagramima, a za pojedina mjerenja mikrotvrdoće na caklini i dentinu prikazana je i aritmetička sredina (±standardna devijacija). Prije provođenja inferencijalne analize, podaci su transformirani s ciljem povećanja homogenosti varijance i normalne distribuiranosti promatranih mjerenja. Box-Cox test je ukazao na primjerenost logaritamske transformacije mjerenja, što je ujedno bilo i preporučljivo za usporedbu površinske mikrotvrdoće zbog razlike u početnim vrijednostima mikrotvrdoće između cakline i dentina. Usporedba ponovljenih mjerenja (početnih, odmah nakon izbjeljivanja i dva tjedna nakon izbjeljivanja) provedena je pomoću analize varijance korištenjem mixed model ANOVA-e i zasnivala se na usporedbi geometrijskih sredina, kao posljedica transformacije podataka i razlike u početnim vrijednostima mikrotvrdoće između cakline i dentina. Na osnovi minimizacije Akaike informacijskog kriterija (AIC), Huynh-Feldt struktura kovarijance je odabrana kao prikladna struktura u modelu analize varijance. Reziduali su bili približno normalno distribuirani pri čemu je normalnost testirana Shapiro-Wilk testom i grafičkim prikazom distribucije reziduala. Nadalje, za usporedbu smanjenja mikrotvrdoće nakon izbjeljivanja različitim vrstama gelova, a zasebno za caklinu i dentin korišteni su Kruskal-Wallis i egzaktni Wilcoxon Rank Sum test (za višestruke usporedbe). Kruskal-Wallis test korišten je i za usporedbu smanjenja površinske mikrotvrdoće nakon uporabe različitih izvora svjetlosti.

EDS analiza

Distribucija vrijednosti opaženih kemijskih elemenata na caklini i dentinu prije i nakon različitih tretmana prikazana je Box-plot dijagramima. Varijabilnost mjerenja bila je općenito previsoka (koeficijent varijabilnosti veći od 30%) da bi se aritmetička sredina mogla smatrati reprezentativnom pa je kao mjera srednje vrijednosti korišten medijan. Normalna distribuiranost mjerenja testirana je Shapiro-Wilk testom i grafičkim prikazom njihove distribucije. Početna mjerenja, kao i mjerenja nakon izbjeljivanja te dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz primjenu ACP-a, nisu bila približno normalno distribuirana pa su u analizi korišteni neparametarski testovi. Za usporedbu ponavljanih mjerenja korišteni su Friedmanov test i Wilcoxon Signed Rank test, kao post-hoc test za usporedbe parova zavisnih mjerenja. Testiranje razlike u promjeni koncentracije elemenata na caklini odnosno dentinu nakon

izbjeljivanja u odnosu na početna mjerenja između različitih gelova za izbjeljivanje provedeno je pomoću Kruskal-Wallis testa i egzaktnog Wilcoxon Rank Sum testa, za usporedbe parova skupina.

Promjena boje

Radi lakše interpretacije podataka analiza se zasnivala na RGB indeksu koji je dobiven kao suma vrijednosti pojedinačnih boja (R+G+B) prije bojanja, nakon bojanja te nakon određenog tretmana izbjeljivanja. Distribucija vrijednosti RGB indeksa nakon različitih tretmana prikazana je Box-plot dijagramima. Za procjenu homogenosti svojstva odnosno za usporedbu varijabiliteta pojedinih mjerenja izračunati su koeficijenti varijabilnosti. Uz deskriptivnu statistiku, prikazani su i pripadajući intervali pouzdanosti. Prije provođenja daljnje inferencijalne analize, testirana je normalnost mjerenja. Početne vrijednosti RGB indeksa (na neobojanim pastilama), kao i vrijednosti nakon tretmana čajem te nakon izbjeljivanja nisu bile normalno distribuirane. Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilk testom i grafičkim prikazom distribucije mjerenja. Pošto reziduali ANOVA modela s ponavljanim mjerenjima nisu bili normalno distribuirani, za usporedbu ponavljanih mjerenja korišteni su Friedmanov test i Wilcoxon Signed Rank test, kao post-hoc test za usporedbe parova grupa. Testiranje razlike u vrijednostima RGB indeksa nakon izbjeljivanja između različitih izvora svjetlosti, kao i različitih gelova za izbjeljivanje odnosno različitog trajanja procesa izbjeljivanja, provedeno je pomoću Kruskal-Wallis testa i egzaktnog Wilcoxon Rank Sum testa, za usporedbe parova grupa.

Genotoksičnost

Deskriptivna analiza obuhvatila je izračun aritmetičkih sredina i pripadajućih standardnih devijacija. Prije provođenja inferencijalne analize, a uslijed izražene nehomogenosti varijance, podaci su transformirani. Box-Cox test ukazao je na potrebu logaritamske transformacije podataka u svrhu stabilizacije varijance. Učinak izbjeljivanja na promjenu vrijednosti markera genotoksičnosti analiziran je na transformiranim podacima korištenjem analize varijance (ANOVE) za ponavljana mjerenja. Ukoliko pretpostavka sfericiteta nije bila zadovoljena, provedena je Huynh-Feldt-ova korekcija značajnosti univarijatnih efekata. Normalnost reziduala testirana je Shapiro-Wilk testom i grafičkim prikazom njihove distribucije. Ako je distribucija reziduala značajno odstupala od normalne,

umjesto ANOVE korišteni su Friedmanov test i Wilcoxon Signed Rank test, kao post-hoc test za usporedbe parova ponavljanih mjerenja.

Razlike u promjeni vrijednosti markera genotoksičnosti između gingive i usnice analizirane su egzaktnim Wilcoxon Rank Sum testom.

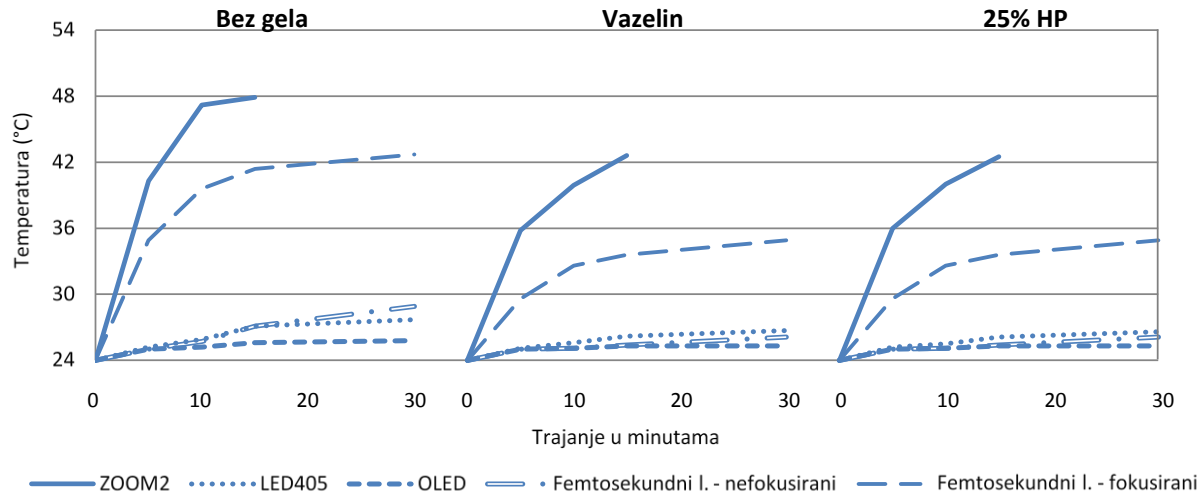
U skladu s eksplorativnim karakterom ovog istraživanja, rezultati su analizirani bez korekcije za višestruke usporedbe na razini značajnosti od 0,05. Analiza je provedena korištenjem SAS 8.2 programskog paketa.

4. REZULTATI

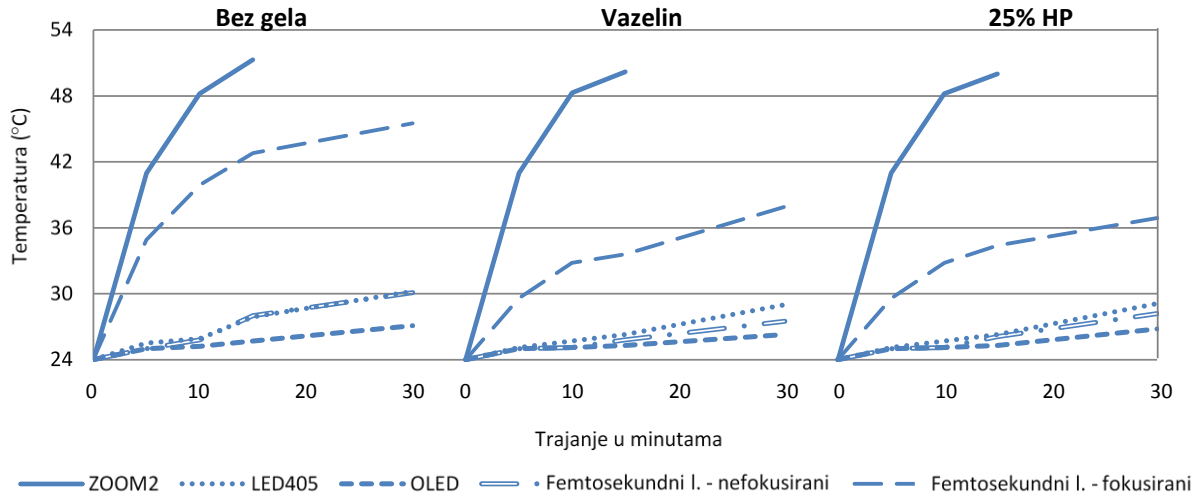
4.1. PORAST TEMPERATURE ZA VRIJEME IZBJELJIVANJA

Najbrži i najveći temperaturni porast u pulpnoj komori i na površini zuba zabilježen je za vrijeme izbjeljivanja ZOOM2 izvorom svjetlosti, unatoč kraćem vremenu izbjeljivanja od 15 minuta u odnosu na 30-minutno izbjeljivanje drugim izvorima svjetlosti (Slika 37). Slijedila je primjena fokusiranog femtosekundnog lasera te, sa znatno manjim ostvarenim porastom temperature, nefokusiranog femtosekundnog lasera, LED405 i OLED izvora svjetlosti.

a) Pulpna komora



b) Površina zuba



Slika 37. Porast temperature u pulpnoj komori i na površini zuba tijekom procesa izbjeljivanja bez gela, s vazelinom i 25%-tnim vodikovim peroksidom.

Bez uporabe gela za izbjeljivanje ili vazelina, bazna temperatura od 24 °C nakon izbjeljivanja ZOOM2 izvorom svjetlosti u prosjeku je porasla za 23,9 °C u pulpnoj komori i 27,3 °C na površini zuba. Prosjekom mjerenja u trima vremenskim točkama tijekom procesa izbjeljivanja zabilježen je porast od 21,1 °C u pulpnoj komori i 22,8 °C na površini zuba (Tablica 8). Aplikacijom različitih gelova za izbjeljivanje ili vazelina taj porast je u prosjeku smanjen do 16 °C u pulpnoj komori, dok toliki izolacijski efekt nije zabilježen na površini zuba, gdje je prosječan porast temperature bio neznatno manji. Izbjeljivanje fokusiranim femtosekundnim laserom uzrokovalo je sporiji i u konačnici manji temperaturni porast od ZOOM2 izvora svjetlosti koji je bez uporabe gela iznosio 18,7 °C na pulpi i 21,5 °C na površini zuba. Prosjek mjerenja nakon 5, 10, 15 i 30 minuta takvog izbjeljivanja iznosio je 15,7 °C na pulpi i 16,8 °C na površini zuba. Primjena različitih gelova za izbjeljivanje i vazelina smanjila je temperaturni porast tijekom izbjeljivanja femtosekundnim laserom do prosječno 9 °C u pulpnoj komori i 10 °C na površini zuba. LED405 i nefokusirani femtosekundni laser potaknuli su znatno manji temperaturni porast u pulpnoj komori (maksimalno do 4 °C odnosno 5 °C s prosjekom višestrukih mjerenja temperaturnog porasta tijekom izbjeljivanja do 3 °C) i na površini zuba (maksimalno do 6 °C s prosjekom višestrukih mjerenja do 4 °C), dok su najniže vrijednosti temperaturnog porasta zabilježene prilikom izbjeljivanja OLED-om, s prosječnim porastom temperature u pulpnoj komori odnosno na površini zuba do 2 °C.

Tablica 8. Prosječni porast temperature tijekom procesa izbjeljivanja različitim izvorima svjetlosti i gelovima za izbjeljivanje – prosjek mjerenja nakon 5, 10, 15 i 30 minuta*.

Izvor svjetlosti/gel za izbjeljivanje	Prosječni porast temperature u pulpnoj komori (°C)	Prosječni porast temperature na površini zuba (°C)
ZOOM2, bez gela	21,1 (3,55)	22,8 (4,52)
ZOOM2, vazelin	15,4 (2,93)	22,5 (4,13)
ZOOM2, 25% HP	15,5 (2,81)	22,4 (4,06)
ZOOM2, 38% HP	15,5 (3,05)	22,4 (3,94)
ZOOM2, 30% CP	15,5 (2,93)	22,5 (3,96)
ZOOM2, 16% CP	15,6 (2,75)	22,5 (4,00)
ZOOM2, 10% CP	15,6 (2,93)	22,7 (3,84)
LED405, bez gela	2,5 (1,13)	3,4 (2,01)
LED405, vazelin	1,9 (0,78)	2,5 (1,60)
LED405, 25% HP	1,9 (0,80)	2,6 (1,63)
LED405, 38% HP	1,8 (0,90)	2,6 (1,76)
LED405, 30% CP	1,8 (0,82)	2,5 (1,57)
LED405, 16% CP	1,9 (0,80)	2,5 (1,62)
LED405, 10% CP	1,8 (0,81)	2,5 (1,54)
OLED, bez gela	1,4 (0,50)	1,8 (0,93)
OLED, vazelin	1,2 (0,38)	1,4 (0,81)
OLED, 25% HP	1,2 (0,38)	1,6 (0,85)
OLED, 38% HP	1,2 (0,36)	1,5 (0,75)
OLED, 30% CP	1,2 (0,38)	1,6 (0,90)
OLED, 16% CP	1,2 (0,38)	1,4 (0,75)
OLED, 10% CP	1,2 (0,38)	1,6 (0,96)
Femtosekundni l. - nefokusirani, bez gela	2,7 (1,62)	3,2 (2,09)
Femtosekundni l. - nefokusirani, vazelin	1,4 (0,55)	1,9 (1,10)
Femtosekundni l. - nefokusirani, 25% HP	1,4 (0,55)	2,1 (1,50)
Femtosekundni l. - nefokusirani, 38% HP	1,4 (0,53)	2,0 (1,42)
Femtosekundni l. - nefokusirani, 30% CP	1,4 (0,54)	2,1 (1,45)
Femtosekundni l. - nefokusirani, 16% CP	1,4 (0,53)	2,1 (1,65)
Femtosekundni l. - nefokusirani, 10% CP	1,4 (0,54)	2,2 (1,63)
Femtosekundni l. - fokusirani, bez gela	15,7 (3,05)	16,8 (4,03)
Femtosekundni l. - fokusirani, vazelin	8,7 (2,04)	9,5 (3,07)
Femtosekundni l. - fokusirani, 25% HP	8,7 (2,04)	9,4 (2,78)
Femtosekundni l. - fokusirani, 38% HP	8,8 (2,13)	9,6 (2,95)
Femtosekundni l. - fokusirani, 30% CP	8,7 (2,10)	9,5 (2,86)
Femtosekundni l. - fokusirani, 16% CP	8,8 (2,01)	9,7 (3,12)
Femtosekundni l. - fokusirani, 10% CP	8,6 (2,07)	9,4 (2,84)
Bez izvora svjetlosti, 25% HP	0,6 (0,50)	0,7 (0,65)
Bez izvora svjetlosti, 38% HP	0,6 (0,54)	0,9 (0,77)
Bez izvora svjetlosti, 30% CP	0,5 (0,51)	0,9 (0,88)
Bez izvora svjetlosti, 16% CP	0,5 (0,51)	0,9 (0,77)
Bez izvora svjetlosti, 10% CP	0,5 (0,51)	0,7 (0,65)

* Prosječni porast temperature za ZOOM2 odnosi se na 15-minutni proces izbjeljivanja, dok su za ostale izvore svjetlosti mjerenja bilježena tijekom 30 minuta.
Napomena: U tablici su prikazane aritmetičke sredine i pripadajuće standardne devijacije.

Učinak gela za izbjeljivanje

Upotreba gela za izbjeljivanje imala je izolacijski efekt u odnosu na izbjeljivanje bez gela, kojim je u pravilu postignut značajno veći porast temperature (Slika 38). Vrsta gela nije imala značajan utjecaj na promjenu temperature. Izolacijski efekt gela je bio najslabije izražen prilikom korištenja OLED-a, kojim je u prosjeku ostvaren i najmanji porast temperature. Najveći izolacijski efekt zabilježen je u pulpnoj komori prilikom izbjeljivanja ZOOM2 izvorom svjetlosti, zatim u pulpnoj komori i na površini zuba za vrijeme izbjeljivanja fokusiranim i nefokusiranim femtosekundnim laserom te na površini zuba tijekom izbjeljivanja LED405 izvorom svjetlosti (Tablica 8). Korištenje gela za izbjeljivanje ili vazelina kod ZOOM2 tretmana u prosjeku je dovelo do približno 1,3 puta sporijeg porasta temperature u pulpnoj komori u usporedbi s mjerenjima bez gela ($p<0,001$ za svaku usporedbu). Korištenjem gelova za izbjeljivanje ili vazelina za vrijeme tretmana fokusiranim femtosekundnim laserom u prosjeku je približno 1,7 puta usporen rast temperature i u pulpnoj komori i na površini zuba u odnosu na mjerenja bez korištenja gela ($p<0,001$ za svaku usporedbu). Tretman nefokusiranim femtosekundnim laserom bez aplikacije gela doveo je do 1,4 do 1,8 puta bržeg porasta temperature u pulpnoj komori i na površini zuba (približno 0,2 °C u minuti) u odnosu na mjerenja s gelom za izbjeljivanje odnosno vazelinom ($p\leq0,001$ za svaku usporedbu). Aplikacija sredstva za izbjeljivanje ili vazelina na površinu zuba za vrijeme tretmana LED405 izvorom svjetlosti dovela je do 1,3 puta manjeg prosječnog porasta temperature u usporedbi s mjerenjima bez korištenja gela ($p\leq0,001$ za svaku usporedbu).

a) Pulpna komora

Izvor svjetlosti	Gel za izbjeljivanje: Bez gela	Vazelin	25% HP	38% HP	30% CP	16% CP	10% CP
ZOOM2	A	B	B	B	B	B	B
LED405	C	I	I	I	I	I	I
OLED	D	D, J	D, J	J	D, J	D, J	D, J
Femtosekundni laser - nefokusirani	N	E	E	E	E	E, J	E
Femtosekundni laser - fokusirani	F	G	G	G	G	G	G
Bez izvora svjetlosti	-	-	H	H	H	H	H

Napomena: Razlika u prosječnom porastu temperature između gelova s istim slovom u retku odnosno izvora svjetlosti s istim slovom u stupcu nije statistički značajna.

b) Površina zuba

Izvor svjetlosti	Gel za izbjeljivanje: Bez gela	Vazelin	25% HP	38% HP	30% CP	16% CP	10% CP
ZOOM2	A	A, I	I	I	I	I	A, I
LED405	B	C	C	C	C	C	C
OLED	D	J	D, J	J	D, J	J	D, J
Femtosekundni laser - nefokusirani	B	E	E, K	E, K	K, C	E, C	K, C
Femtosekundni laser - fokusirani	F	G	G	G	G	G	G
Bez izvora svjetlosti	-	-	H	H	H	H	H

Napomena: Razlika u prosječnom porastu temperature između gelova s istim slovom u retku odnosno izvora svjetlosti s istim slovom u stupcu nije statistički značajna.

Slika 38. Statistička značajnost razlike u prosječnom porastu temperature između korištenih izvora svjetlosti odnosno gelova za izbjeljivanje.

Učinak izvora svjetlosti

Rezultati ovog dijela istraživanja su pokazali da vrsta izvora svjetlosti ima utjecaj na porast temperature na površini zuba i u pulpnoj komori (Slika 38). Najveći temperaturni porast zabilježen je tijekom tretmana ZOOM2 izvorom svjetlosti. Tretman pulpne komore i površine zuba ovim izvorom svjetlosti bez korištenja gela za izbjeljivanje ili vazelina u prosjeku je rezultirao 1,5 puta bržim porastom temperature u odnosu na fokusirani femtosekundni laser i više od 8 puta bržim porastom u odnosu na ostale izvore svjetlosti – LED405, OLED i nefokusirani femtosekundni laser ($p<0,001$ za svaku usporedbu). Razlike su bile značajne i u slučaju aplikacije gela za izbjeljivanje ili vazelina ($p<0,001$ za svaku usporedbu). Tijekom 30-minutnog procesa izbjeljivanja, kod primjene fokusiranog femtosekundnog lasera zabilježen je veći prosječni porast temperature u odnosu na ostale izvore svjetlosti (koji nisu uključivali ZOOM2) i to za sve vrste korištenih gelova ($p<0,001$ za svaku usporedbu). Korištenje ovog izvora svjetlosti u prosjeku je dovelo do više od tri puta bržeg porasta temperature na površini zuba i u pulpnoj komori, a najveća razlika zabilježena je u usporedbi s OLED izvorom svjetlosti. Uporaba LED405 izvora svjetlosti u odnosu na nefokusirani femtosekundni laser nije ukazala na značajne razlike u porastu temperature na površini zuba osim u slučaju korištenja vazelina ($p<0,001$) te 25% HP gela ($p=0,029$) i 38% HP gela ($p=0,002$) kada je LED405 uzrokovao 1,2 do 1,3 puta brži porast temperature. Primjenom OLED izvora svjetlosti ostvaren je najsporiji rast temperature u odnosu na ostale izvore svjetlosti (otprilike 0,1 °C u minuti), neovisno o korištenom gelu za izbjeljivanje.

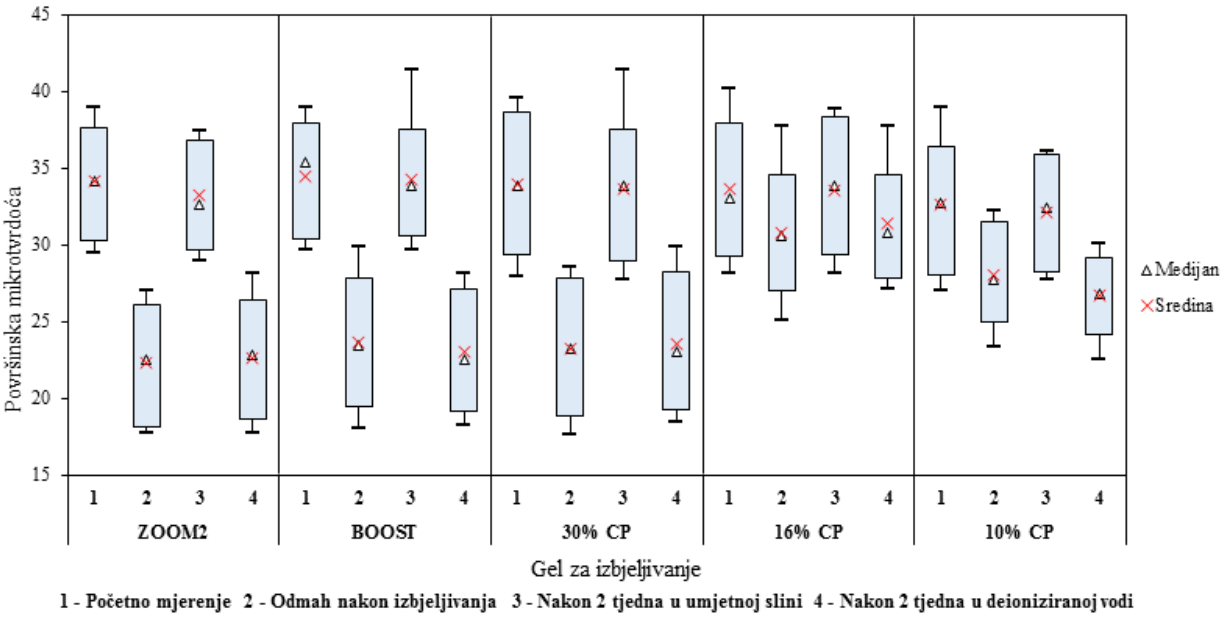
Usporedba temperature u pulpnoj komori i na površini zuba

Statistički značajne razlike između porasta temperature u pulpnoj komori i na površini zuba zabilježene su neovisno o vrsti/korištenju gela za izbjeljivanje, i to za vrijeme izbjeljivanja svim izvorima svjetlosti – ZOOM2, LED405, nefokusiranim i fokusiranim femtosekundnim laserom te OLED izvorom svjetlosti. Brzina porasta temperature bila je veća na površini zuba u odnosu na mjerenja u pulpnoj komori. U ovisnosti o izvoru svjetlosti i gelu za izbjeljivanje na površini zuba ostvaren je 1,1 do 1,6 puta brži porast temperature tijekom izbjeljivanja.

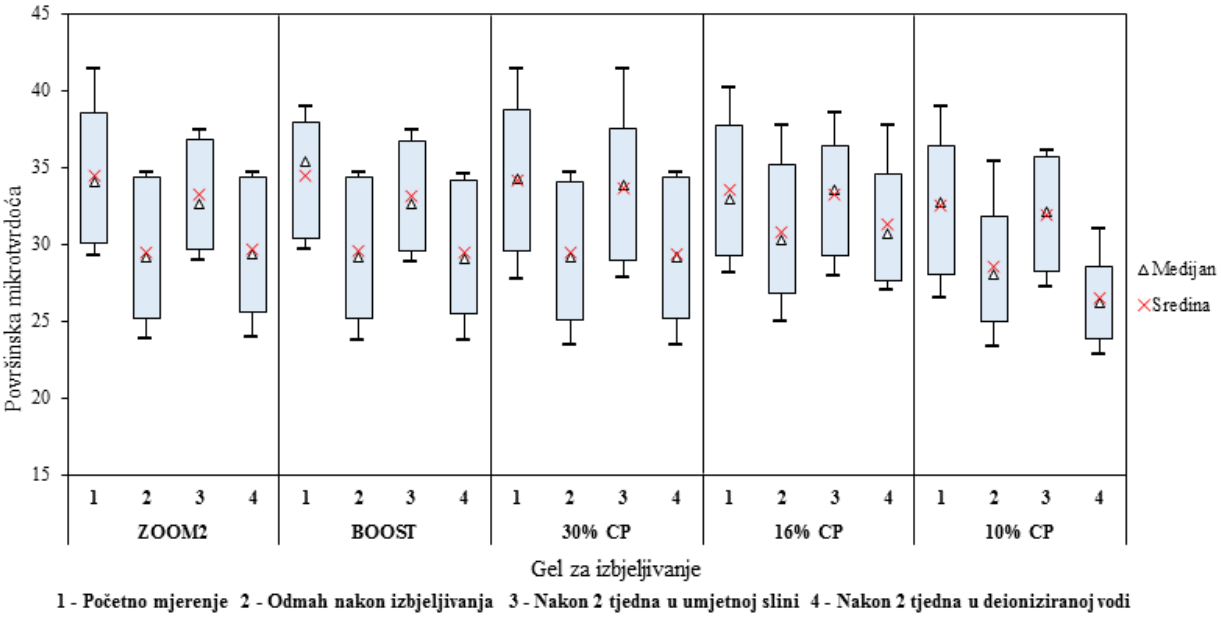
4.2. MIKROTVRDOĆA

LED405 izvor svjetlosti

Distribucija mjerenja mikrotvrdoće ukazala je na tendenciju njenog smanjenja nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Slika 39). Daljnji dvotjedni tretman u slini pozitivno je djelovao na distribuciju vrijednosti mikrotvrdoće, za razliku od tretmana u deioniziranoj vodi. Pri kraćem postupku izbjeljivanja od 15 minuta, promjene u distribuciji vrijednosti površinske mikrotvrdoće bile su znatno slabije izražene prilikom uporabe ZOOM2, BOOST i 30% CP gela za izbjeljivanje (Slika 40).

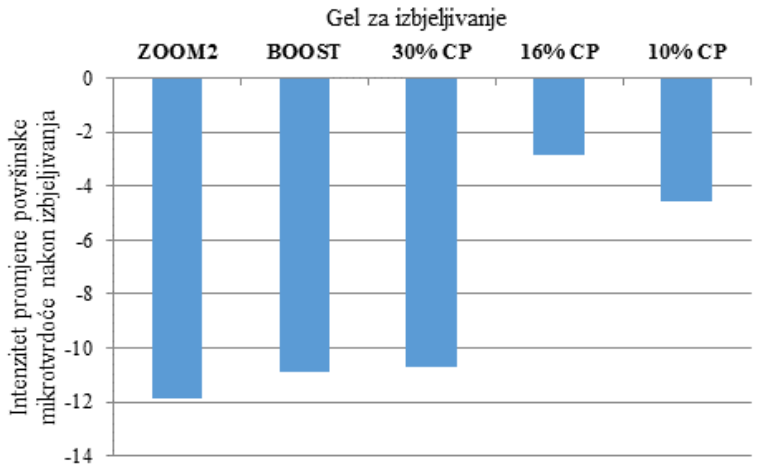


Slika 39. Box-plot dijagrami vrijednosti mikrotvrdoće nakon različitih tretmana – uporaba LED405 izvora svjetlosti u ukupnom trajanju od 30 minuta.

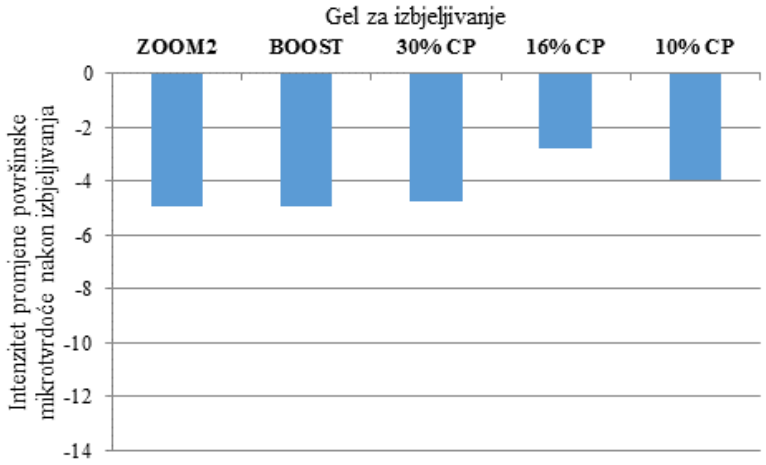


Slika 40. Box-plot dijagrami vrijednosti mikrotvrdoće nakon različitih tretmana – uporaba LED405 izvora svjetlosti u ukupnom trajanju od 15 minuta.

U prosjeku, najveći pad mikrotvrdoće zabilježen je prilikom nanošenja ZOOM2 gela za izbjeljivanje (na caklini s 37,84±0,80 na 26,30±0,53; na dentinu s 30,46±0,80 na 18,31±0,51), a slijedi primjena BOOST (na caklini s 38,06±0,72 na 27,91±0,79; na dentinu s 30,92±1,24 na 19,32±0,59), 30% CP (na caklini s 38,52±0,91 na 27,77±0,46; na dentinu s 29,42±0,90 na 18,76±0,64), 10% CP (na caklini s 36,98±1,33 na 31,12±1,01; na dentinu s 28,28±0,91 na 24,97±0,93) i 16% CP gela za izbjeljivanje (na caklini s 38,07±1,15 na 34,58±1,83; na dentinu s 29,16±0,61 na 26,97±1,48), kojim je u prosjeku ostvaren najmanji pad mikrotvrdoće (Slika 41). Pad mikrotvrdoće nakon 15 minuta bio je u prosjeku znatno manji nego nakon 30 minuta izbjeljivanja prilikom korištenja ZOOM2, BOOST i 30% CP gela, ali još uvijek veći nego u slučaju korištenja 16% CP i 10% CP gela (Slika 42).



Slika 41. Prosječno smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja LED405 lampom prema vrsti gela.



Slika 42. Prosječno smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 15-minutnog izbjeljivanja LED405 lampom prema vrsti gela.

Vrsta gela za izbjeljivanje pokazala se značajnim faktorom promjene mikrotvrdoće i cakline (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$) i dentina (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$) nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja. Usporedba gelova na caklini ukazala je na statistički značajno različito smanjenje mikrotvrdoće prilikom usporedbe svih gelova osim ZOOM2 i BOOST gela s 30% CP gelom (Tablica 9). Najveće prosječno smanjenje mikrotvrdoće na caklini zabilježeno je kod uporabe ZOOM2 gela (medijan=11,52), a najmanje kod 16% CP gela (medijan=3,54). Usporedba gelova na dentinu ukazala je na podjednak učinak ZOOM2 i BOOST gela, kao i BOOST i 30% CP gela te 16% CP i 10% CP gela na smanjenje površinske mikrotvrdoće

dentina (Tablica 9). I na dentinu najveće prosječno smanjenje zabilježeno je uporabom ZOOM2 gela (medijan=11,97), a najmanje uporabom 16% CP gela (medijan=1,95).

Tablica 9. Usporedba smanjenja mikrotvrdoće na caklini i dentinu odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja LED405 lampom između različitih vrsta gelova za izbjeljivanje.

Površina	Usporedba gelova	Medijani smanjenja mikrotvrdoće nakon izbjeljivanja		p-vrijednost
Caklina	ZOOM2 vs. BOOST	11,52	9,96	0,036
	ZOOM2 vs. 30% CP	11,52	10,72	NS
	ZOOM2 vs. 16% CP	11,52	3,54	< 0,001
	ZOOM2 vs. 10% CP	11,52	5,25	< 0,001
	BOOST vs. 30% CP	9,96	10,72	NS
	BOOST vs. 16% CP	9,96	3,54	< 0,001
	BOOST vs. 10% CP	9,96	5,25	< 0,001
	30% CP vs. 16% CP	10,72	3,54	< 0,001
	30% CP vs. 10% CP	10,72	5,25	< 0,001
	16% CP vs. 10% CP	3,54	5,25	0,043
Dentin	ZOOM2 vs. BOOST	11,97	11,65	NS
	ZOOM2 vs. 30% CP	11,97	11,03	0,002
	ZOOM2 vs. 16% CP	11,97	1,95	< 0,001
	ZOOM2 vs. 10% CP	11,97	3,15	< 0,001
	BOOST vs. 30% CP	11,65	11,03	NS
	BOOST vs. 16% CP	11,65	1,95	< 0,001
	BOOST vs. 10% CP	11,65	3,15	< 0,001
	30% CP vs. 16% CP	11,03	1,95	< 0,001
	30% CP vs. 10% CP	11,03	3,15	< 0,001
	16% CP vs. 10% CP	1,95	3,15	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Rank Sum testa; NS – nije značajno.

U odnosu na 30-minutni proces izbjeljivanja, 15-minutno izbjeljivanje cakline nije ukazalo na statistički značajne razlike u smanjenju mikrotvrdoće između različitih gelova za izbjeljivanje, za razliku od mjerenja na dentinu (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$). U prosjeku, najveće smanjenje mikrotvrdoće dentina nakon 15 minuta izbjeljivanja zabilježeno je kod BOOST gela (medijan=4,96) i nije bilo statistički značajno različito od ZOOM2 i 30% CP gela, dok je značajno manje smanjenje zabilježeno kod 16% CP gela (medijan=2,00) i 10% CP gela (medijan=2,80).

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini imao je pozitivan učinak na površinsku mikrotvrdoću koja se, usprkos smanjenju uzrokovanom 30-minutnim izbjeljivanjem, približila razini početnih mjerenja (Slika 39). Odabir vrste gela za izbjeljivanje nije imao značajan utjecaj na obnovu mikrotvrdoće nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini, koja je kod primjene svake vrste

gela dostigla razinu početnih vrijednosti odnosno razlike među tim mjerenjima nisu bile statistički značajne (Tablica 10).

Tablica 10. Učinak različitih tretmana na površinsku mikrotvrdoću prilikom uporabe LED405 izvora svjetlosti (30 minuta) prema vrsti gela.

Gel za izbjeljivanje	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. nakon izbjeljiva-nja	Početno vs. nakon umjetne sline	Početno vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon umjetne sline	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon umjetne sline vs. nakon deionizi-rane vode
ZOOM2	Omjer*	1,547	1,028	1,522	0,664	0,984	1,481
	t-vrijednost	35,8	1,7	26,1	-25,7	-1,0	18,9
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
BOOST	Omjer*	1,477	1,005	1,513	0,680	1,024	1,505
	t-vrijednost	32,0	0,3	25,7	-24,2	1,5	19,7
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
30% CP	Omjer*	1,475	1,008	1,457	0,683	0,988	1,446
	t-vrijednost	31,9	0,5	23,4	-23,9	-0,8	17,7
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
16% CP	Omjer*	1,092	0,983	1,090	0,900	0,998	1,109
	t-vrijednost	7,2	-1,1	5,4	-6,6	-0,1	5,0
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
10% CP	Omjer*	1,160	1,019	1,208	0,878	1,042	1,186
	t-vrijednost	12,2	1,2	11,8	-8,1	2,5	8,2
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**0,012**	**< 0,001**

* Omjer geometrijskih sredina, nakon kontrole za vrstu gela i vrstu površine.
Napomena: Rezultati Mixed-model ANOVE; NS – nije značajno.

Dvotjedni tretman deioniziranom vodom nije potaknuo obnovu mikrotvrdoće (Slika 39), već su njene vrijednosti ostale statistički značajno različite od početnih mjerenja (Tablica 10). Mikrotvrdoća je uglavnom ostala na istoj razini kao i nakon 30-minutnog izbjeljivanja. Usporedba mjerenja zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja i nakon dvotjednog tretmana u deioniziranoj vodi nije ukazala na statistički značajne razlike u mikrotvrdoći, osim kod upotrebe 10% CP gela za izbjeljivanje (p=0,012). Mikrotvrdoća nakon izbjeljivanja 10% CP gelom uz korištenje LED405 lampe bila je za otprilike 4% veća nego nakon dvotjednog tretmana u deioniziranoj vodi, što znači da je ovakav tretman imao negativan učinak na površinsku mikrotvrdoću.

Posebna analiza mikrotvrdoće na caklini i dentinu ukazala je na podjednak učinak procesa izbjeljivanja, te tretmana u umjetnoj slini i deioniziranoj vodi na mikrotvrdoću i cakline i dentina. Nakon izbjeljivanja došlo je do značajnog pada mikrotvrdoće koja se nakon dvotjednog tretmana umjetnom slinom vratila na razinu početnih mjerenja, dok u slučaju tretmana deioniziranom vodom nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na vrijednosti zabilježene odmah nakon procesa izbjeljivanja (Tablica 11).

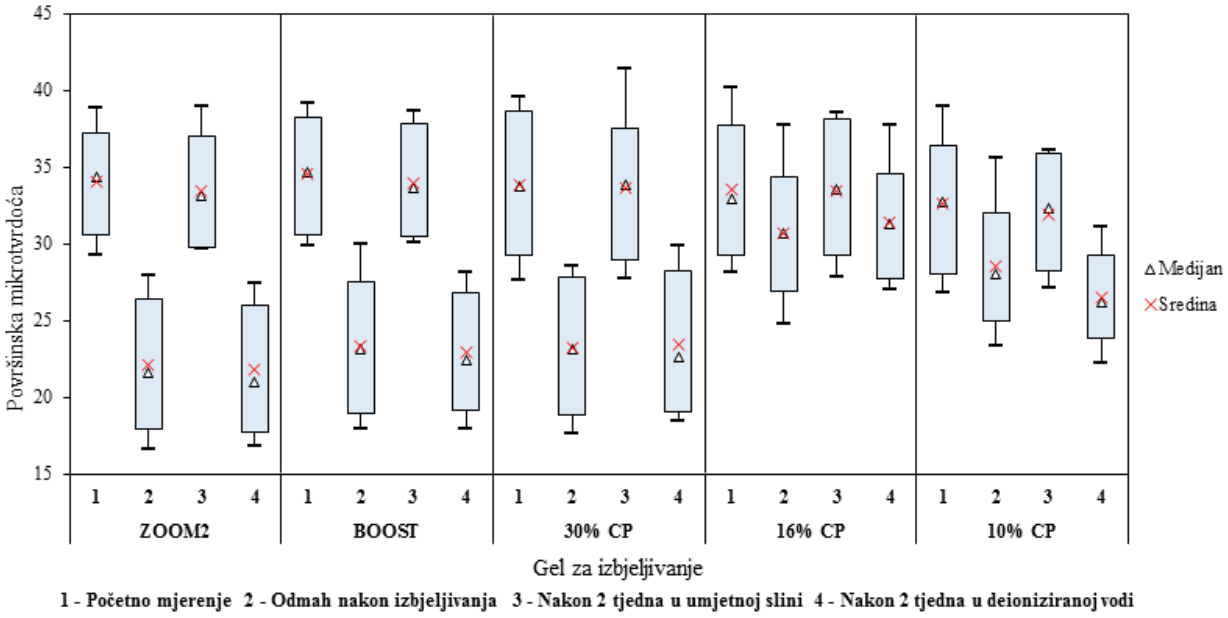
Tablica 11. Učinak različitih tretmana na mikrotvrdoću cakline i dentina prilikom uporabe LED405 izvora svjetlosti (30 minuta).

Površina	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. nakon izbjeljiva-nja	Početno vs. nakon umjetne sline	Početno vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon umjetne sline	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon umjetne sline vs. nakon deionizi-rane vode
Caklina	Omjer*	1,289	1,013	1,311	0,786	1,017	1,294
	t-vrijednost	32,9	1,3	26,6	-23,9	1,6	19,6
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
Dentin	Omjer*	1,386	1,004	1,382	0,724	0,997	1,377
	t-vrijednost	42,3	0,4	31,8	-32,0	-0,3	24,3
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**

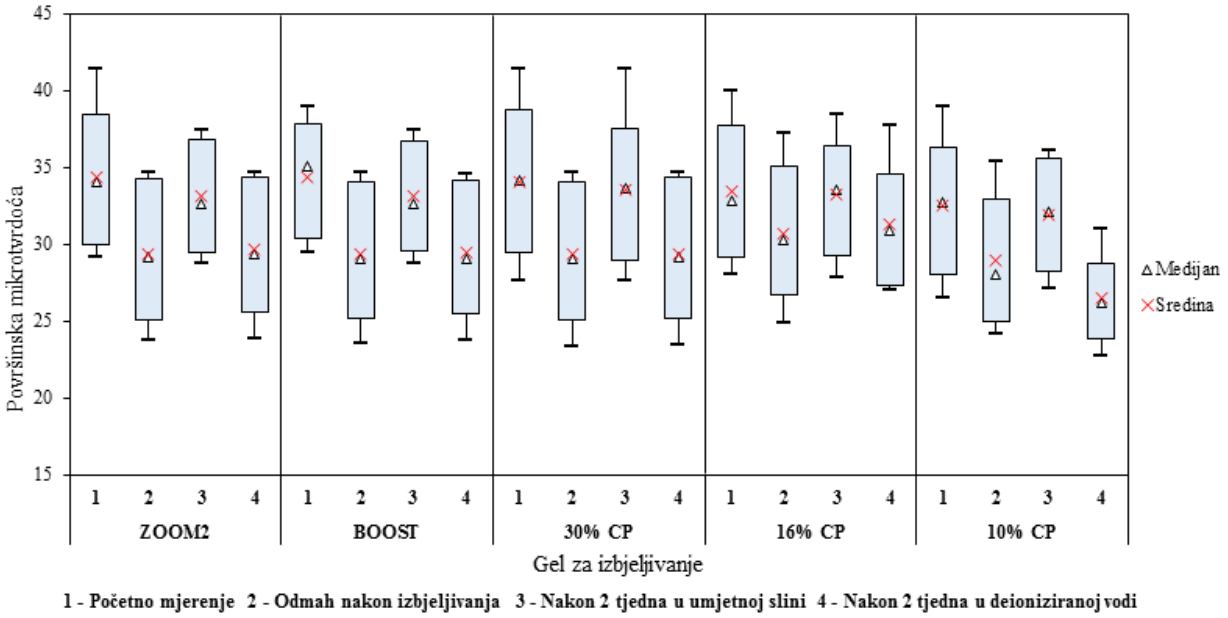
* Omjer geometrijskih sredina, nakon kontrole za vrstu gela i vrstu površine.
Napomena: Rezultati Mixed-model ANOVE; NS – nije značajno.

OLED izvor svjetlosti

Distribucija mjerenja mikrotvrdoće uz uporabu OLED izvora svjetlosti ukazala je na tendenciju njenog smanjenja nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Slika 43). Daljnji dvotjedni tretman u slini pozitivno je djelovao na distribuciju vrijednosti mikrotvrdoće, za razliku od tretmana u deioniziranoj vodi. Pri kraćem postupku izbjeljivanja od 15 minuta, promjene u distribuciji vrijednosti površinske mikrotvrdoće bile su znatno slabije izražene prilikom uporabe ZOOM2, BOOST i 30% CP gela za izbjeljivanje (Slika 44).



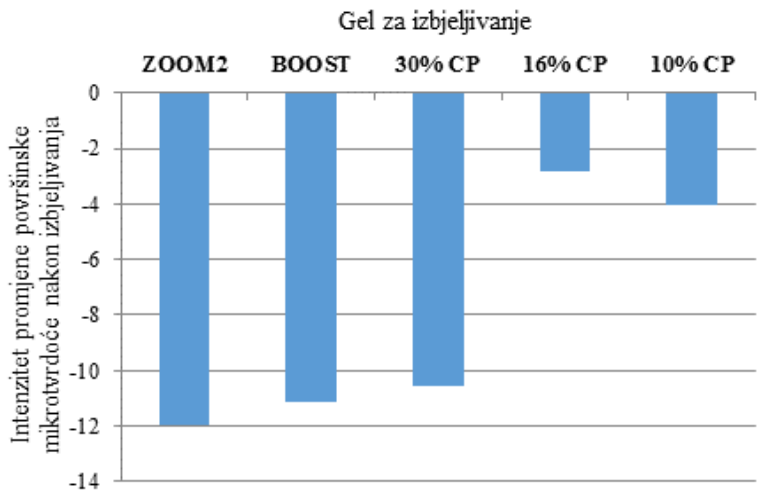
Slika 43. Box-plot dijagrami vrijednosti mikrotvrdoće nakon različitih tretmana – uporaba OLED izvora svjetlosti u ukupnom trajanju od 30 minuta.



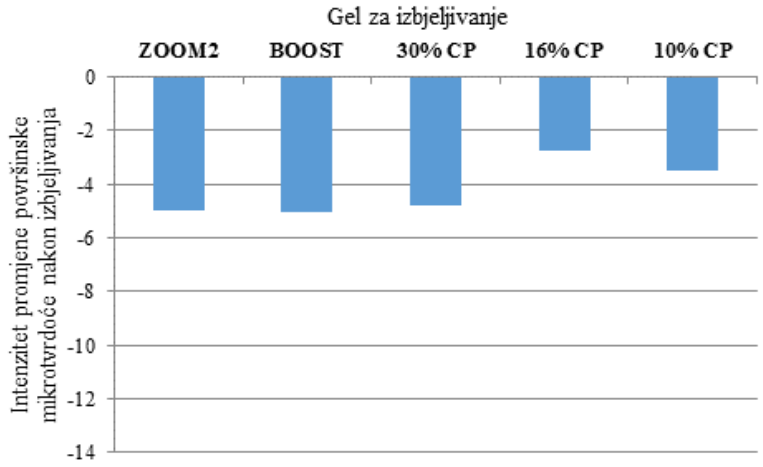
Slika 44. Box-plot dijagrami vrijednosti mikrotvrdoće nakon različitih tretmana – uporaba OLED izvora svjetlosti u ukupnom trajanju od 15 minuta.

U prosjeku, najveći pad mikrotvrdoće zabilježen je prilikom nanošenja ZOOM2 gela za izbjeljivanje (na caklini s 37,32±1,27 na 26,29±1,48; na dentinu s 30,73±1,35 na 17,88±0,86),

a slijedi primjena BOOST (na caklini s 38,09±1,00 na 27,82±1,28; na dentinu s 30,98±1,13 na 18,96±0,68), 30% CP (na caklini s 38,42±1,04 na 27,75±0,48; na dentinu s 29,23±0,98 na 18,75±0,65), 10% CP (na caklini s 36,93±1,27 na 32,22±1,65; na dentinu s 28,24±0,93 na 24,92±0,85) i 16% CP gela za izbjeljivanje (na caklini s 37,88±1,23 na 34,49±1,77; na dentinu s 29,16±0,58 na 26,90±1,57), kojim je u prosjeku ostvaren najmanji pad mikrotvrdoće (Slika 45). Pad mikrotvrdoće nakon 15 minuta bio je u prosjeku znatno manji nego nakon 30 minuta izbjeljivanja pri korištenju ZOOM2, BOOST i 30% CP gela, ali još uvijek veći nego u slučaju korištenja 16% CP gela i 10% CP gela (Slika 46).



Slika 45. Prosječno smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja OLED lampom prema vrsti gela.



Slika 46. Prosječno smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 15-minutnog izbjeljivanja OLED lampom prema vrsti gela.

Vrsta gela za izbjeljivanje pokazala se značajnim faktorom promjene mikrotvrdoće i cakline (Kruskal-Wallis test, p<0,001) i dentina (Kruskal-Wallis test, p<0,001) nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja. Usporedba gelova na caklini ukazala je na statistički značajno različito smanjenje mikrotvrdoće prilikom usporedbe ZOOM2, BOOST i 30% CP gela sa 16% CP i 10% CP gelom, čijom je upotrebom ostvaren statistički značajno manji pad mikrotvrdoće cakline (Tablica 12). Usporedba gelova na dentinu ukazala je na podjednak učinak ZOOM2 i BOOST gela te 16% CP i 10% CP gela na smanjenje površinske mikrotvrdoće dentina (Tablica 12). Najveće prosječno smanjenje mikrotvrdoće dentina zabilježeno je uporabom ZOOM2 gela (medijan=12,41), a najmanje uporabom 16% CP gela (medijan=1,77).

Tablica 12. Usporedba smanjenja mikrotvrdoće na caklini i dentinu odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja OLED lampom između različitih vrsta gelova za izbjeljivanje.

Površina	Usporedba gelova	Medijani smanjenja mikrotvrdoće nakon izbjeljivanja		p-vrijednost
Caklina	ZOOM2 vs. BOOST	11,29	10,59	NS
	ZOOM2 vs. 30% CP	11,29	10,54	NS
	ZOOM2 vs. 16% CP	11,29	3,24	< 0,001
	ZOOM2 vs. 10% CP	11,29	4,85	< 0,001
	BOOST vs. 30% CP	10,59	10,54	NS
	BOOST vs. 16% CP	10,59	3,24	< 0,001
	BOOST vs. 10% CP	10,59	4,85	< 0,001
	30% CP vs. 16% CP	10,54	3,24	< 0,001
	30% CP vs. 10% CP	10,54	4,85	< 0,001
	16% CP vs. 10% CP	3,24	4,85	NS
Dentin	ZOOM2 vs. BOOST	12,41	12,09	NS
	ZOOM2 vs. 30% CP	12,41	10,74	0,003
	ZOOM2 vs. 16% CP	12,41	1,77	< 0,001
	ZOOM2 vs. 10% CP	12,41	3,09	< 0,001
	BOOST vs. 30% CP	12,09	10,74	0,023
	BOOST vs. 16% CP	12,09	1,77	< 0,001
	BOOST vs. 10% CP	12,09	3,09	< 0,001
	30% CP vs. 16% CP	10,74	1,77	< 0,001
	30% CP vs. 10% CP	10,74	3,09	< 0,001
	16% CP vs. 10% CP	1,77	3,09	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Rank Sum testa; NS – nije značajno.

U odnosu na 30-minutni postupak izbjeljivanja, 15-minutno izbjeljivanje cakline nije ukazalo na statistički značajne razlike u smanjenju mikrotvrdoće između različitih gelova za izbjeljivanje, za razliku od mjerenja na dentinu (Kruskal-Wallis test, p<0,001). U prosjeku,

najveće smanjenje mikrotvrdoće dentina nakon 15 minuta izbjeljivanja zabilježeno je kod BOOST gela (medijan=4,99) i nije bilo statistički značajno različito od ZOOM2 i 30% CP gela, dok je najmanje smanjenje zabilježeno kod 16% CP gela (medijan=2,09) i 10% CP gela (medijan=2,79).

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini imao je pozitivan učinak na površinsku mikrotvrdoću koja se, usprkos smanjenju uzrokovanom 30-minutnim izbjeljivanjem, približila razini početnih mjerenja (Slika 43). Odabir vrste gela za izbjeljivanje nije imao značajan utjecaj na obnovu mikrotvrdoće nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini koja je kod svake vrste gela dostigla razinu početnih vrijednosti odnosno razlike među tim mjerenjima nisu bile statistički značajne (Tablica 13).

Tablica 13. Učinak različitih tretmana na površinsku mikrotvrdoću prilikom uporabe OLED izvora svjetlosti (30 minuta) prema vrsti gela.

Gel za izbjeljivanje	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. nakon izbjeljiva-nja	Početno vs. nakon umjetne sline	Početno vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon umjetne sline	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon umjetne sline vs. nakon deionizi-rane vode
ZOOM2	Omjer*	1,563	1,016	1,583	0,650	1,013	1,558
	t-vrijednost	34,1	0,9	27,0	-25,1	0,8	20,2
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
BOOST	Omjer*	1,496	1,012	1,525	0,677	1,019	1,506
	t-vrijednost	30,8	0,7	24,8	-22,8	1,1	18,6
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
30% CP	Omjer*	1,469	1,002	1,456	0,682	0,991	1,453
	t-vrijednost	29,4	0,1	22,1	-22,3	-0,5	17,0
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
16% CP	Omjer*	1,092	0,982	1,083	0,899	0,992	1,104
	t-vrijednost	6,8	-1,1	4,7	-6,2	-0,5	4,5
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
10% CP	Omjer*	1,140	1,028	1,214	0,901	1,065	1,182
	t-vrijednost	10,0	1,6	11,4	-6,1	3,7	7,6
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**

* Omjer geometrijskih sredina, nakon kontrole za vrstu gela i vrstu površine.
Napomena: Rezultati Mixed-model ANOVE; NS – nije značajno.

Dvotjedni tretman deioniziranom vodom nije potaknuo obnovu mikrotvrdoće (Slika 43), već su njene vrijednosti ostale statistički značajno različite od početnih mjerenja (Tablica 13). Mikrotvrdoća je uglavnom ostala na istoj razini kao i nakon 30-minutnog izbjeljivanja.

Usporedba mjerenja zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja i nakon dvotjednog tretmana u deioniziranoj vodi ukazala je na statistički značajne razlike u mikrotvrdoći samo kod upotrebe 10% CP gela za izbjeljivanje ($p<0,001$), pri čemu se mikrotvrdoća dodatno smanjila za otprilike 7% nakon tretmana deioniziranom vodom.

Zasebna analiza mjerenja mikrotvrdoće na caklini i dentinu ukazala je na podjednak učinak procesa izbjeljivanja i tretmana u umjetnoj slini, nakon čega se vrijednosti mikrotvrdoće nisu statistički značajno razlikovale od početnih mjerenja (Tablica 14). Kod tretmana deioniziranom vodom, vrijednosti mikrotvrdoće dentina nisu bile značajno različite u odnosu na mjerenja zabilježena odmah nakon procesa izbjeljivanja, dok su na caklini vrijednosti mikrotvrdoće nakon izbjeljivanja bile za otprilike 3% više ($p=0,012$).

Tablica 14. Učinak različitih tretmana na mikrotvrdoću cakline i dentina prilikom uporabe LED405 izvora svjetlosti (30 minuta).

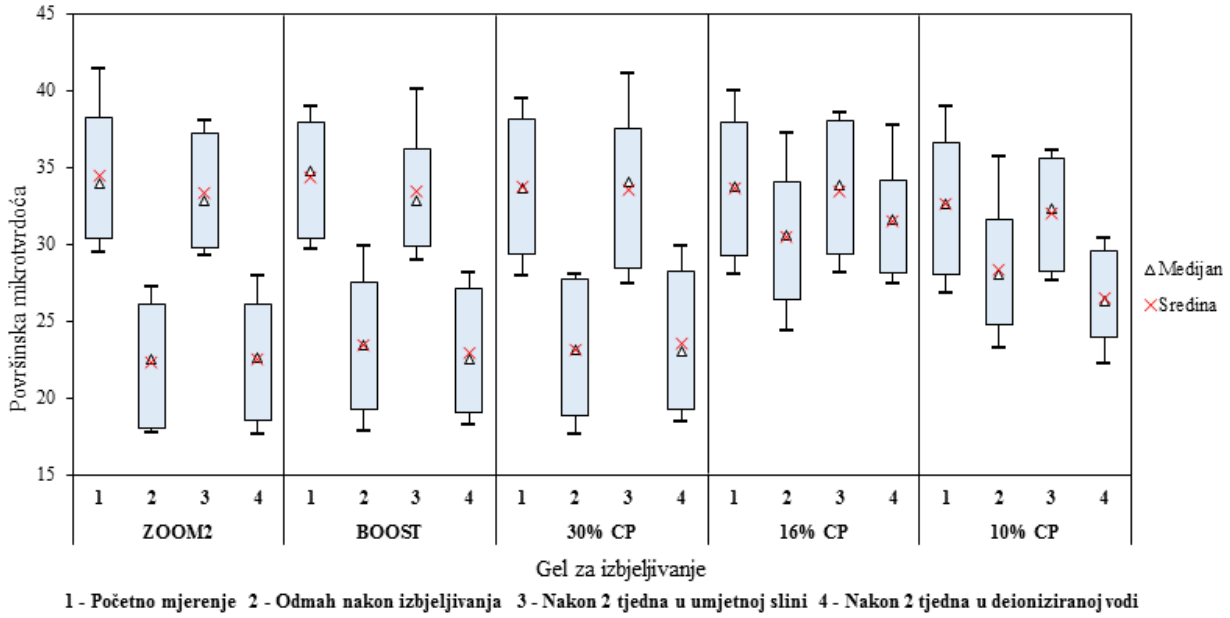
Površina	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. nakon izbjeljiva-nja	Početno vs. nakon umjetne sline	Početno vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon umjetne sline	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon umjetne sline vs. nakon deionizi-rane vode
Caklina	Omjer*	1,277	1,016	1,312	0,795	1,028	1,292
	t-vrijednost	29,6	1,4	25,3	-21,1	2,5	18,4
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**0,012**	**< 0,001**
Dentin	Omjer*	1,400	1,000	1,406	0,714	1,004	1,406
	t-vrijednost	40,7	0,0	31,7	-31,1	0,4	24,5
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**

* Omjer geometrijskih sredina, nakon kontrole za vrstu gela i vrstu površine.
Napomena: Rezultati Mixed-model ANOVE; NS – nije značajno.

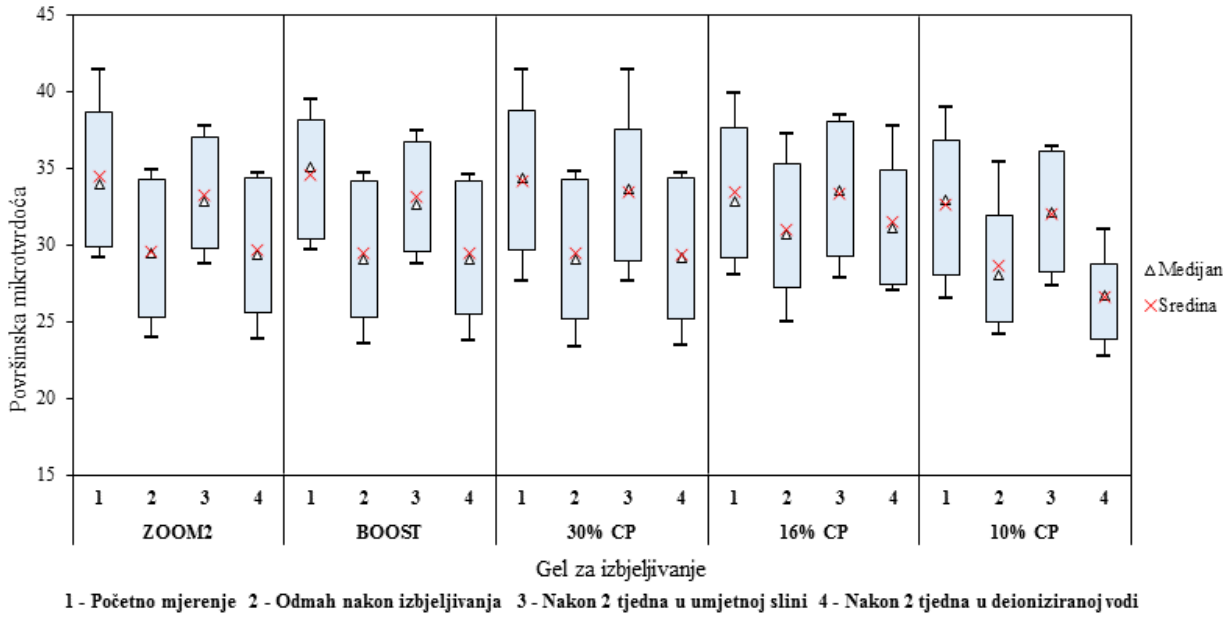
FEMTOSEKUNDNI LASER kao izvor svjetlosti

Distribucija mjerenja mikrotvrdoće uz uporabu femtosekundnog lasera ukazala je na tendenciju njenog smanjenje nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Slika 47). Daljnji dvotjedni tretman u slini pozitivno je djelovao na distribuciju vrijednosti mikrotvrdoće, za razliku od tretmana u deioniziranoj vodi. Pri kraćem postupku izbjeljivanja od 15 minuta, promjene u distribuciji vrijednosti površinske

mikrotvrdoće bile su znatno slabije izražene prilikom uporabe ZOOM2, BOOST i 30%-tnog CP gela za izbjeljivanje (Slika 48).

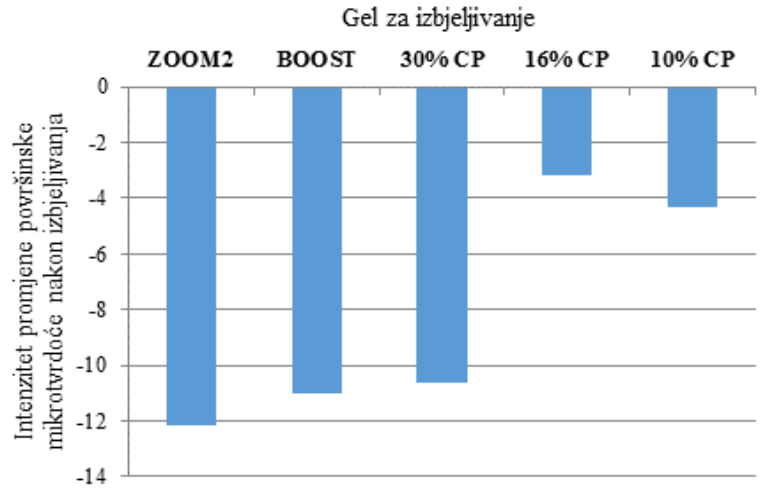


Slika 47. Box-plot dijagrami vrijednosti mikrotvrdoće nakon različitih tretmana – uporaba femtosekundnog lasera u ukupnom trajanju od 30 minuta.

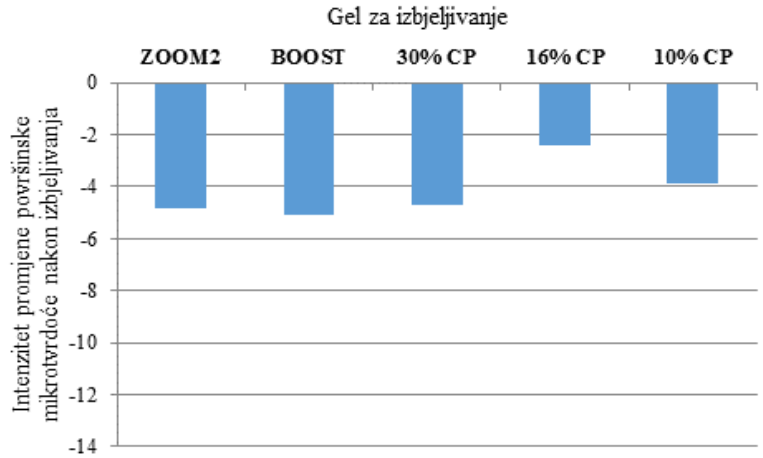


Slika 48. Box-plot dijagrami vrijednosti mikrotvrdoće nakon različitih tretmana – uporaba femtosekundnog lasera u ukupnom trajanju od 15 minuta.

U prosjeku, najveći pad mikrotvrdoće zabilježen je pri nanošenju ZOOM2 gela za izbjeljivanje (na caklini s 38,41±1,44 na 26,27±0,59; na dentinu s 30,47±0,59 na 18,33±0,65), a slijedi primjena BOOST (na caklini s 37,97±0,97 na 27,69±0,85; na dentinu s 30,85±1,22 na 19,16±0,64), 30% CP (na caklini s 38,22±0,94 na 27,57±0,50; na dentinu s 29,31±0,97 na 18,69±0,60), 10% CP (na caklini s 36,93±1,23 na 31,74±1,59; na dentinu s 28,25±0,95 na 24,86±0,90) i 16% CP gela za izbjeljivanje (na caklini s 37,98±1,11 na 34,21±1,77; na dentinu s 29,34±0,86 na 26,71±1,86), kojim je u prosjeku ostvaren najmanji pad mikrotvrdoće (Slika 49). Pad mikrotvrdoće nakon 15 minuta bio je u prosjeku znatno manji nego nakon 30 minuta izbjeljivanja prilikom korištenja ZOOM2, BOOST i 30% CP gela, ali još uvijek veći nego u slučaju korištenja 16% CP gela i 10% CP gela (Slika 50).



Slika 49. Prosječno smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja femtosekundnim laserom prema vrsti gela.



Slika 50. Prosječno smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 15-minutnog izbjeljivanja femtosekundnim laserom prema vrsti gela.

Vrsta gela za izbjeljivanje pokazala se značajnim faktorom promjene mikrotvrdoće i cakline (Kruskal-Wallis test, p<0,001) i dentina (Kruskal-Wallis test, p<0,001) nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja. Usporedba gelova na caklini ukazala je na statistički značajno različito smanjenje mikrotvrdoće prilikom usporedbe svih gelova osim BOOST i 30% CP gela te 16% i 10% CP gela (Tablica 15). Najveće prosječno smanjenje mikrotvrdoće na caklini zabilježeno je kod uporabe ZOOM2 gela (medijan=11,97), a najmanje kod 16% CP gela (medijan=3,88). S druge strane, usporedba gelova na dentinu ukazala je na podjednak učinak ZOOM2 i BOOST gela, kao i BOOST i 30% CP gela te 16% CP i 10% CP gela na smanjenje površinske mikrotvrdoće dentina (Tablica 15). I na dentinu najveće prosječno smanjenje zabilježeno je kod uporabe ZOOM2 gela (medijan=11,96), a najmanje kod 16% CP gela (medijan=2,27).

Tablica 15. Usporedba smanjenja mikrotvrdoće na caklini i dentinu odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja femtosekundnim laserom između različitih vrsta gelova za izbjeljivanje

Površina	Usporedba gelova	Medijani smanjenja mikrotvrdoće nakon izbjeljivanja		p-vrijednost
Caklina	ZOOM2 vs. BOOST	11,97	10,64	0,008
	ZOOM2 vs. 30% CP	11,97	10,78	0,027
	ZOOM2 vs. 16% CP	11,97	3,88	< 0,001
	ZOOM2 vs. 10% CP	11,97	4,95	< 0,001
	BOOST vs. 30% CP	10,64	10,78	NS
	BOOST vs. 16% CP	10,64	3,88	< 0,001
	BOOST vs. 10% CP	10,64	4,95	< 0,001
	30% CP vs. 16% CP	10,78	3,88	< 0,001
	30% CP vs. 10% CP	10,78	4,95	< 0,001
	16% CP vs. 10% CP	3,88	4,95	NS
Dentin	ZOOM2 vs. BOOST	11,96	11,38	NS
	ZOOM2 vs. 30% CP	11,96	10,99	0,004
	ZOOM2 vs. 16% CP	11,96	2,27	< 0,001
	ZOOM2 vs. 10% CP	11,96	3,11	< 0,001
	BOOST vs. 30% CP	11,38	10,99	NS
	BOOST vs. 16% CP	11,38	2,27	< 0,001
	BOOST vs. 10% CP	11,38	3,11	< 0,001
	30% CP vs. 16% CP	10,99	2,27	< 0,001
	30% CP vs. 10% CP	10,99	3,11	< 0,001
	16% CP vs. 10% CP	2,27	3,11	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Rank Sum testa; NS – nije značajno.

U odnosu na 30-minutni postupak izbjeljivanja, kod 15-minutnog izbjeljivanja cakline zabilježen je statistički značajno manji pad mikrotvrdoće u slučaju korištenja 16% CP gela (medijan=2,50) u odnosu na ZOOM2 (p=0,007), BOOST (p=0,029), 30% CP (p=0,004) te 10% CP gel (p=0,007). U prosjeku, najveće smanjenje mikrotvrdoće cakline ostvareno je uporabom 30% CP gela (medijan=4,84) i nije bilo statistički značajno različito od promjene uzrokovane uporabom ZOOM2, BOOST ili 10% CP gela. S druge strane, najveće prosječno smanjenje mikrotvrdoće dentina nakon 15 minuta izbjeljivanja zabilježeno je prilikom uporabe BOOST gela (medijan=4,97), pri čemu se nije statistički značajno razlikovalo od uporabe ZOOM2 i 30% CP gela. Najmanje smanjenje mikrotvrdoće dentina ostvareno je uporabom 16% CP gela (medijan=1,99), ali se nije značajno razlikovalo od smanjenja uzrokovanog uporabom 10% CP gela (medijan=2,80).

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini imao je pozitivan učinak na površinsku mikrotvrdoću koja se, usprkos smanjenju uzrokovanom 30-minutnim izbjeljivanjem, približila razini početnih mjerenja (Slika 47). Odabir vrste gela za izbjeljivanje nije imao značajan utjecaj na obnovu mikrotvrdoće nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini, koja je kod svake vrste gela dostigla razinu početnih mjerenja (Tablica 16).

Tablica 16. Učinak različitih tretmana na površinsku mikrotvrdoću pri uporabi femtosekundnog lasera (30 minuta) prema vrsti gela.

Gel za izbjeljivanje	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. nakon izbjeljiva-nja	Početno vs. nakon umjetne sline	Početno vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon umjetne sline	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon umjetne sline vs. nakon deionizi-rane vode
ZOOM2	Omjer*	1,559	1,031	1,543	0,661	0,989	1,497
	t-vrijednost	36,1	1,9	26,7	-26,0	-0,7	19,4
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
BOOST	Omjer*	1,486	1,028	1,518	0,692	1,022	1,476
	t-vrijednost	32,2	1,8	25,8	-23,1	1,3	18,7
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
30% CP	Omjer*	1,474	1,005	1,448	0,682	0,982	1,441
	t-vrijednost	31,6	0,3	22,8	-24,0	-1,1	17,5
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
16% CP	Omjer*	1,106	0,988	1,087	0,894	0,983	1,100
	t-vrijednost	8,2	-0,8	5,2	-7,1	-1,0	4,6
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
10% CP	Omjer*	1,150	1,021	1,212	0,888	1,053	1,187
	t-vrijednost	11,4	1,3	11,9	-7,5	3,2	8,2
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**0,002**	**< 0,001**

* Omjer geometrijskih sredina, nakon kontrole za vrstu gela i vrstu površine.
Napomena: Rezultati Mixed-model ANOVE; NS – nije značajno.

Dvotjedni tretman deioniziranom vodom nije potaknuo obnovu mikrotvrdoće (Slika 47), već su njene vrijednosti ostale statistički značajno različite od početnih mjerenja (Tablica 16). Nadalje, mikrotvrdoća je uglavnom ostala na istoj razini kao i nakon 30-minutnog izbjeljivanja. Usporedba mjerenja zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja i nakon dvotjednog tretmana u deioniziranoj vodi nije ukazala na statistički značajne razlike u mikrotvrdoći, osim kod upotrebe 10% CP gela za izbjeljivanje (p=0,002). Mikrotvrdoća nakon izbjeljivanja 10% CP gelom uz korištenje femtosekundnog lasera bila je za otprilike 5% veća nego nakon dvotjednog tretmana u deioniziranoj vodi, što znači da je ovakav tretman imao negativan učinak na površinsku mikrotvrdoću.

Zasebna analiza mjerenja mikrotvrdoće na caklini i dentinu ukazala je na podjednak učinak procesa izbjeljivanja nakon kojeg su vrijednosti mikrotvrdoće cakline i dentina bile značajno niže (p<0,001 za obje površine; Tablica 17). Tretmanom u umjetnoj slini obnovljena je mikrotvrdoća dentina, dok su na caklini početne vrijednosti mikrotvrdoće bile za otprilike 2% više u odnosu na mjerenja nakon izbjeljivanja i dvotjednog tretmana u umjetnoj slini

(p=0,038). Kod tretmana deioniziranom vodom, vrijednosti mikrotvrdoće i cakline i dentina nisu bile statistički značajno različite u odnosu na mjerenja zabilježena odmah nakon procesa izbjeljivanja.

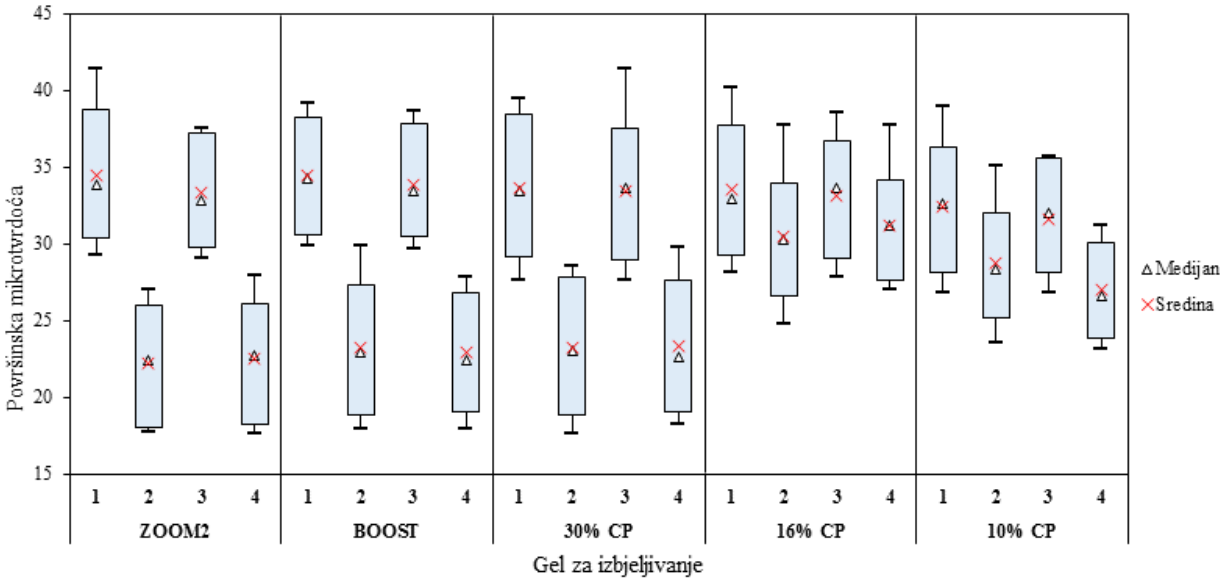
Tablica 17. Učinak različitih tretmana na mikrotvrdoću cakline i dentina pri uporabi femtosekundnog lasera (30 minuta).

Površina	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. nakon izbjeljiva-nja	Početno vs. nakon umjetne sline	Početno vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon umjetne sline	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon umjetne sline vs. nakon deionizi-rane vode
Caklina	Omjer*	1,291	1,021	1,317	0,791	1,020	1,290
	t-vrijednost	32,9	2,1	26,9	-23,3	1,9	19,3
	p-vrijednost	< **0,001**	**0,038**	< **0,001**	< **0,001**	**NS**	< **0,001**
Dentin	Omjer*	1,393	1,008	1,382	0,723	0,992	1,371
	t-vrijednost	42,7	0,8	31,5	-32,1	-0,8	23,9
	p-vrijednost	< **0,001**	**NS**	< **0,001**	< **0,001**	**NS**	< **0,001**

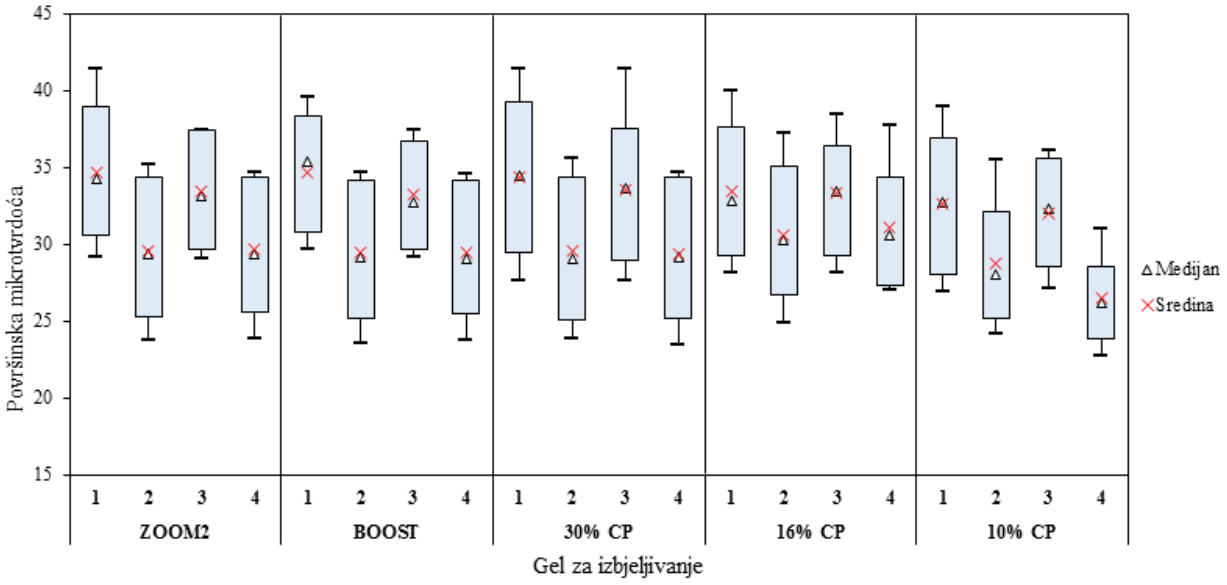
* Omjer geometrijskih sredina, nakon kontrole za vrstu gela i vrstu površine.
Napomena: Rezultati Mixed-model ANOVE; NS – nije značajno.

ZOOM2 izvor svjetlosti

Distribucija mjerenja mikrotvrdoće uz uporabu ZOOM2 izvora svjetlosti ukazala je na tendenciju njenog smanjenja nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Slika 51). Daljnji dvotjedni tretman u slini pozitivno je djelovao na distribuciju vrijednosti mikrotvrdoće, za razliku od tretmana u deioniziranoj vodi. Pri kraćem postupku izbjeljivanja od 15 minuta, promjene u distribuciji vrijednosti površinske mikrotvrdoće bile su znatno slabije izražene pri uporabi ZOOM2, BOOST i 30% CP gela za izbjeljivanje (Slika 52).



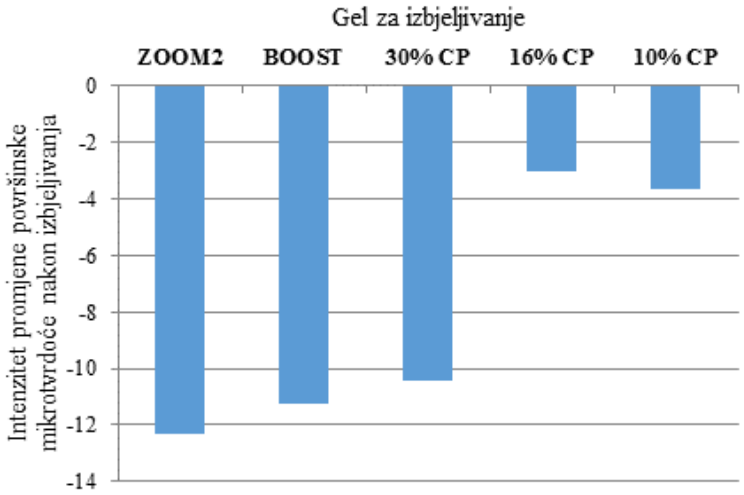
Slika 51. Box-plot dijagrami vrijednosti mikrotvrdoće nakon različitih tretmana – uporaba ZOOM2 izvora svjetlosti u ukupnom trajanju od 30 minuta.



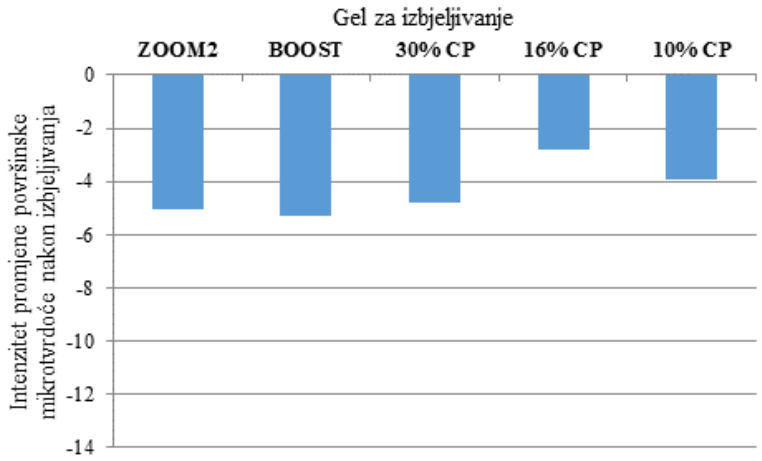
Slika 52. Box-plot dijagrami vrijednosti mikrotvrdoće nakon različitih tretmana – uporaba ZOOM2 izvora svjetlosti u ukupnom trajanju od 15 minuta.

U prosjeku, najveći pad mikrotvrdoće zabilježen je pri nanošenju ZOOM2 gela za izbjeljivanje (na caklini s 38,66±1,37 na 26,21±0,52; na dentinu s 30,33±0,65 na 18,21±0,49), a slijedi primjena BOOST (na caklini s 38,04±1,05 na 27,63±1,29; na dentinu s 30,92±1,03 na 18,85±0,66), 30% CP (na caklini s 38,23±1,02 na 27,71±0,56; na dentinu s 29,09±0,98 na

18,73±0,64), 10% CP (na caklini s 36,64±1,06 na 32,45±1,36; na dentinu s 28,20±0,93 na 25,06±0,84) i 16% CP gela za izbjeljivanje (na caklini s 37,88±1,17 na 34,33±1,72; na dentinu s 29,14±0,56 na 26,71±1,38), kojim je u prosjeku ostvaren najmanji pad mikrotvrdoće (Slika 53). Pad mikrotvrdoće nakon 15 minuta bio je u prosjeku znatno manji nego nakon 30 minuta izbjeljivanja prilikom korištenja ZOOM2, BOOST i 30% CP gela, ali još uvijek veći nego u slučaju korištenja 16% CP i 10% CP gela (Slika 54).



Slika 53. Prosječno smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja femtosekundnim laserom prema vrsti gela.



Slika 54. Prosječno smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 15-minutnog izbjeljivanja femtosekundnim laserom prema vrsti gela.

Vrsta gela za izbjeljivanje pokazala se značajnim faktorom promjene mikrotvrdoće i cakline (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$) i dentina (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$) nakon 30-minutnog

procesa izbjeljivanja. Usporedba gelova na caklini ukazala je na različito smanjenje mikrotvrdoće prilikom usporedbe svih gelova osim BOOST i 30% CP gela te 16% CP i 10% CP gela (Tablica 18). Najveće prosječno smanjenje mikrotvrdoće na caklini zabilježeno je kod uporabe ZOOM2 gela (medijan=12,52), a najmanje kod 16% CP gela (medijan=3,58). Usporedba gelova na dentinu ukazala je na podjednak učinak ZOOM2 i BOOST gela te 16% CP i 10% CP gela na smanjenje površinske mikrotvrdoće dentina (Tablica 18). Na dentinu najveće prosječno smanjenje zabilježeno je kod uporabe BOOST gela (medijan=12,06), a najmanje kod 16% CP gela (medijan=2,07).

Tablica 18. Usporedba smanjenja mikrotvrdoće na caklini i dentinu odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja ZOOM2 izvorom svjetlosti između različitih vrsta gelova za izbjeljivanje.

Površina	Usporedba gelova	Medijani smanjenja mikrotvrdoće nakon izbjeljivanja		p-vrijednost
Caklina	ZOOM2 vs. BOOST	12,52	10,66	0,015
	ZOOM2 vs. 30% CP	12,52	10,39	0,004
	ZOOM2 vs. 16% CP	12,52	3,58	< 0,001
	ZOOM2 vs. 10% CP	12,52	4,29	< 0,001
	BOOST vs. 30% CP	10,66	10,39	NS
	BOOST vs. 16% CP	10,66	3,58	< 0,001
	BOOST vs. 10% CP	10,66	4,29	< 0,001
	30% CP vs. 16% CP	10,39	3,58	< 0,001
	30% CP vs. 10% CP	10,39	4,29	< 0,001
	16% CP vs. 10% CP	3,58	4,29	NS
Dentin	ZOOM2 vs. BOOST	11,84	12,06	NS
	ZOOM2 vs. 30% CP	11,84	10,62	0,001
	ZOOM2 vs. 16% CP	11,84	2,07	< 0,001
	ZOOM2 vs. 10% CP	11,84	2,83	< 0,001
	BOOST vs. 30% CP	12,06	10,62	0,007
	BOOST vs. 16% CP	12,06	2,07	< 0,001
	BOOST vs. 10% CP	12,06	2,83	< 0,001
	30% CP vs. 16% CP	10,62	2,07	< 0,001
	30% CP vs. 10% CP	10,62	2,83	< 0,001
	16% CP vs. 10% CP	2,07	2,83	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Rank Sum testa; NS – nije značajno.

U odnosu na 30-minutni postupak izbjeljivanja, kod 15-minutnog izbjeljivanja cakline zabilježen je statistički značajno manji pad mikrotvrdoće u slučaju korištenja 16% CP gela (medijan=2,75) u odnosu na ZOOM2 (p=0,019), 30% CP (p=0,012) te 10% CP gel (p=0,029).

Prosječno je najveće smanjenje mikrotvrdoće cakline ostvareno uporabom 30% CP gela (medijan=5,39) i nije bilo statistički značajno različito od promjene uzrokovane uporabom ZOOM2, BOOST ili 10% CP gela. Najveće prosječno smanjenje mikrotvrdoće dentina nakon 15 minuta izbjeljivanja zabilježeno je prilikom uporabe BOOST gela (medijan=5,36), pri čemu se nije statistički značajno razlikovalo od uporabe ZOOM2 i 30% CP gela. Najmanje smanjenje mikrotvrdoće dentina ostvareno je uporabom 16% CP gela (medijan=2,16), i nije bilo statistički značajno različito od smanjenja uzrokovanog uporabom 10% CP gela (medijan=2,79).

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini imao je pozitivan učinak na površinsku mikrotvrdoću koja se, usprkos smanjenju uzrokovanom 30-minutnim izbjeljivanjem, približila razini početnih mjerenja (Slika 51). Nakon 30 minuta izbjeljivanja ZOOM2 lampom uz korištenje BOOST te 30% CP, 16% CP i 10% CP gela te dvotjednog tretmana u umjetnoj slini, površinska mikrotvrdoća je dostigla razinu početnog mjerenja (Tablica 19). S druge strane, primjena ZOOM2 gela, nakon koje je u prosjeku zamijećen najveći pad mikrotvrdoće, ukazala je na statistički značajne razlike između početnih mjerenja i mjerenja dobivenih nakon 30-minutnog izbjeljivanja i dvotjednog tretmana u umjetnoj slini ($p=0,036$). Početna mjerenja bila su u prosjeku za 3% veća.

Tablica 19. Učinak različitih tretmana na površinsku mikrotvrdoću prilikom uporabe ZOOM2 izvora svjetlosti (30 minuta) prema vrsti gela.

Gel za izbjeljivanje	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. nakon izbjeljiva-nja	Početno vs. nakon umjetne sline	Početno vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon umjetne sline	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon umjetne sline vs. nakon deionizi-rane vode
ZOOM2	Omjer*	1,567	1,033	1,551	0,659	0,989	1,501
	t-vrijednost	38,1	2,1	28,3	-27,2	-0,7	20,4
	p-vrijednost	**< 0,001**	**0,036**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
BOOST	Omjer*	1,503	1,015	1,525	0,675	1,014	1,502
	t-vrijednost	34,6	1,0	27,2	-25,6	0,9	20,4
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
30% CP	Omjer*	1,464	1,002	1,461	0,684	0,998	1,458
	t-vrijednost	32,3	0,1	24,4	-24,7	-0,1	18,9
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
16% CP	Omjer*	1,098	0,995	1,090	0,906	0,993	1,096
	t-vrijednost	8,0	-0,3	5,6	-6,4	-0,5	4,6
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
10% CP	Omjer*	1,127	1,025	1,192	0,909	1,057	1,163
	t-vrijednost	10,2	1,6	11,3	-6,2	3,6	7,6
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**

* Omjer geometrijskih sredina, nakon kontrole za vrstu gela i vrstu površine.
Napomena: Rezultati Mixed-model ANOVE; NS – nije značajno.

Dvotjedni tretman deioniziranom vodom nije potaknuo obnovu mikrotvrdoće (Slika 51), već su njene vrijednosti ostale statistički značajno različite od početnih mjerenja (Tablica 19). Nadalje, mikrotvrdoća je uglavnom ostala na istoj razini kao i nakon 30-minutnog izbjeljivanja. Usporedba mjerenja zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja i nakon dvotjednog tretmana u deioniziranoj vodi nije ukazala na statistički značajne razlike u mikrotvrdoći, osim kod upotrebe 10% CP gela za izbjeljivanje ($p<0,001$). Mikrotvrdoća nakon izbjeljivanja 10% CP gelom uz korištenje femtosekundnog lasera bila je za otprilike 6% veća nego nakon dvotjednog tretmana u deioniziranoj vodi, što znači da je ovakav tretman imao negativan učinak na mikrotvrdoću.

Zasebna analiza mjerenja mikrotvrdoće na caklini i dentinu ukazala je na podjednak učinak procesa izbjeljivanja, nakon kojeg su vrijednosti mikrotvrdoće cakline i dentina bile značajno niže ($p<0.001$ za obje površine; Tablica 20). Tretmanom u umjetnoj slini obnovljena je mikrotvrdoća dentina, dok su na caklini početna mjerenja mikrotvrdoće bila za otprilike 2%

viša u odnosu na mjerenja nakon 30-minutnog izbjeljivanja i dvotjednog tretmana u umjetnoj slini (p=0,016). Kod tretmana deioniziranom vodom, vrijednosti mikrotvrdoće dentina nisu bile statistički značajno različite u odnosu na mjerenja zabilježena odmah nakon procesa izbjeljivanja, dok je na caklini mikrotvrdoća nakon izbjeljivanja bila za otprilike 3% viša nego nakon tretmana deioniziranom vodom (p=0,014).

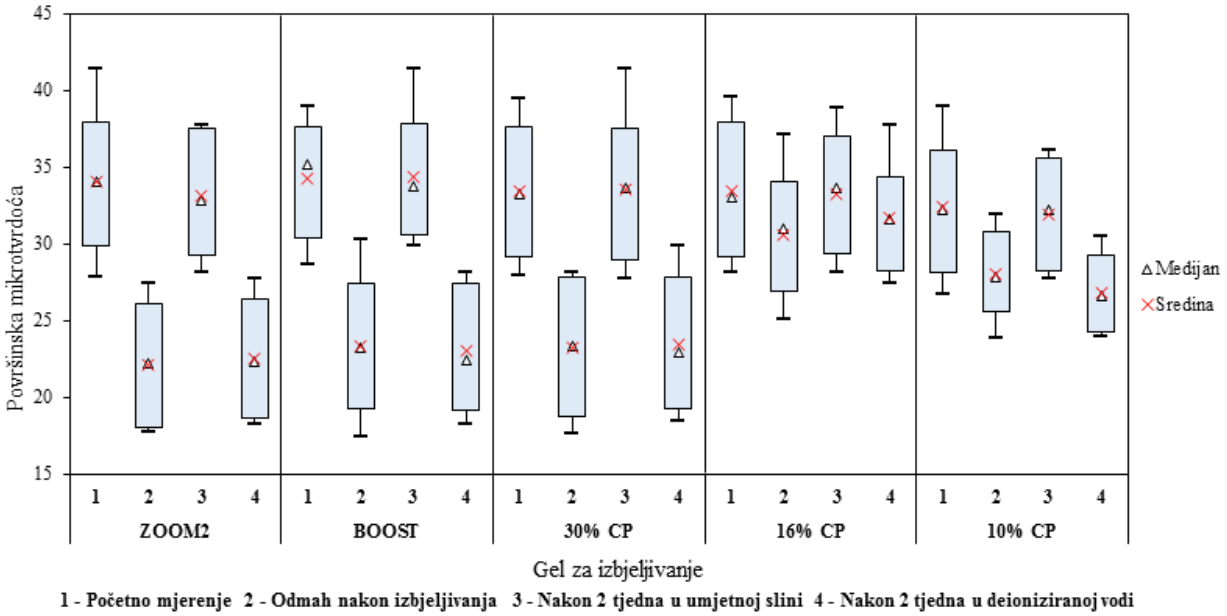
Tablica 20. Učinak različitih tretmana na mikrotvrdoću cakline i dentina prilikom uporabe ZOOM2 izvora svjetlosti (30 minuta).

Površina	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. nakon izbjeljiva-nja	Početno vs. nakon umjetne sline	Početno vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon umjetne sline	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon umjetne sline vs. nakon deionizi-rane vode
Caklina	Omjer*	1,284	1,024	1,316	0,797	1,025	1,285
	t-vrijednost	33,6	2,4	28,0	-23,4	2,5	19,9
	p-vrijednost	**< 0,001**	**0,016**	**< 0,001**	**< 0,001**	**0,014**	**< 0,001**
Dentin	Omjer*	1,391	1,004	1,385	0,721	0,995	1,380
	t-vrijednost	44,3	0,4	33,2	-33,7	-0,5	25,5
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**

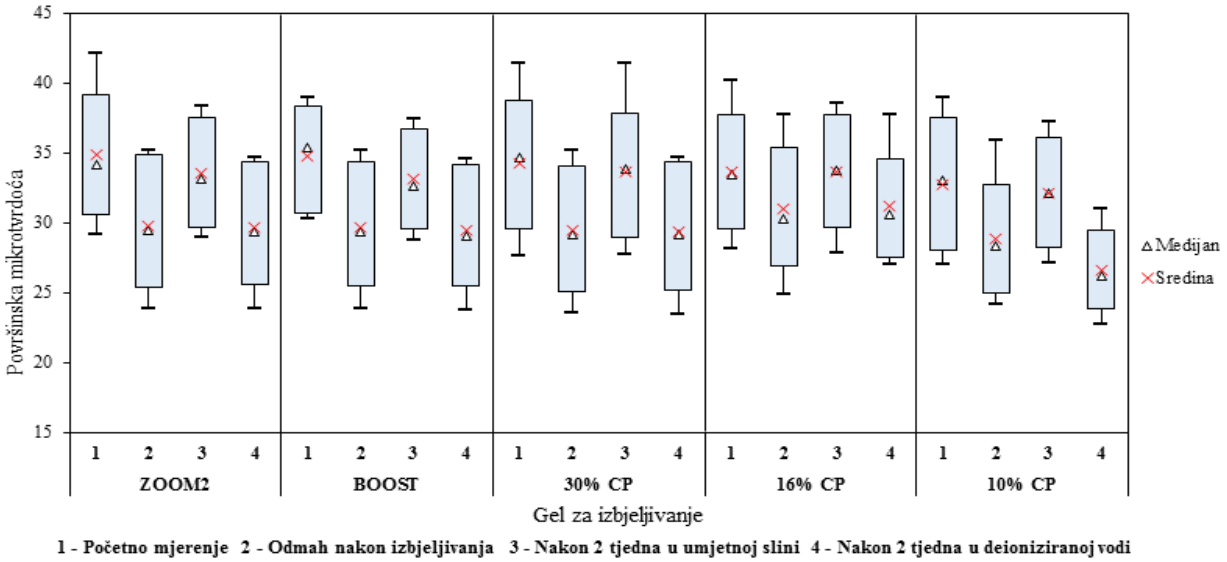
* Omjer geometrijskih sredina, nakon kontrole za vrstu gela i vrstu površine.
Napomena: Rezultati Mixed-model ANOVE; NS – nije značajno.

KONTROLA (izbjeljivanje bez izvora svjetlosti)

Distribucija mjerenja mikrotvrdoće bez uporabe izvora svjetlosti ukazala je na tendenciju njenog smanjenja nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Slika 55). Daljnji dvotjedni tretman u slini pozitivno je djelovao na distribuciju vrijednosti mikrotvrdoće, za razliku od tretmana u deioniziranoj vodi. Pri kraćem postupku izbjeljivanja od 15 minuta, promjene u distribuciji vrijednosti površinske mikrotvrdoće bile su znatno slabije izražene pri uporabi ZOOM2, BOOST i 30% CP gela za izbjeljivanje (Slika 56).



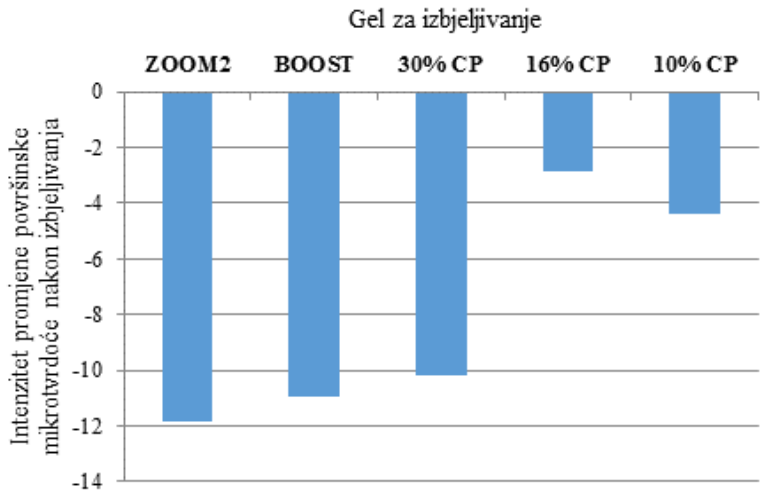
Slika 55. Box-plot dijagrami vrijednosti mikrotvrdoće nakon različitih tretmana – 30-minutno izbjeljivanje bez uporabe izvora svjetlosti.



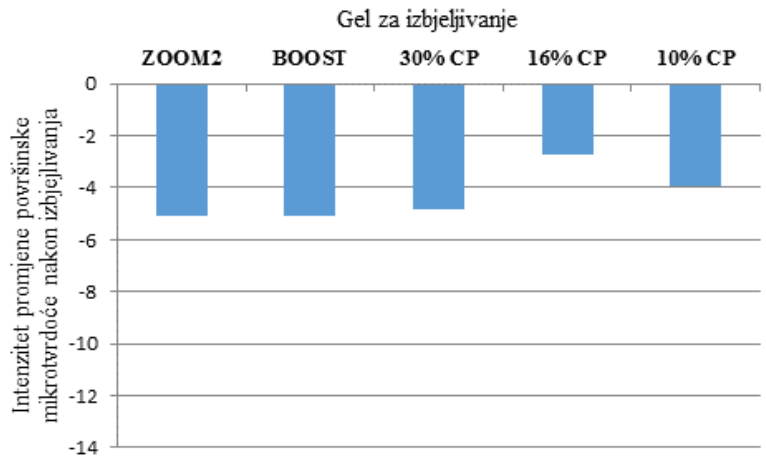
Slika 56. Box-plot dijagrami vrijednosti mikrotvrdoće nakon različitih tretmana – 15-minutno izbjeljivanje bez uporabe izvora svjetlosti.

Prosječno je najveći pad mikrotvrdoće zabilježen pri nanošenju ZOOM2 gela za izbjeljivanje (na caklini s 38,49±1,42 na 26,15±0,70; na dentinu s 29,56±1,05 na 18,19±0,47), a slijedi primjena BOOST (na caklini s 37,91±0,66 na 27,74±0,95; na dentinu s 30,72±1,28 na 18,97±0,74), 30% CP (na caklini s 37,76±1,12 na 27,75±0,27; na dentinu s 29,08±0,89 na

18,72±0,57), 10% CP (na caklini s 36,74±1,42 na 30,78±0,94; na dentinu s 28,22±1,02 na 25,35±0,87) i 16% CP gela za izbjeljivanje (na caklini s 37,87±1,13 na 34,31±1,67; na dentinu s 29,11±0,62 na 26,90±1,66), kojim je u prosjeku ostvaren najmanji pad mikrotvrdoće (Slika 57). Pad mikrotvrdoće nakon 15 minuta bio je u prosjeku znatno manji nego nakon 30 minuta izbjeljivanja prilikom korištenja ZOOM2, BOOST i 30% CP gela, ali još uvijek veći nego u slučaju korištenja 16% CP i 10% CP gela (Slika 58).



Slika 57. Prosječno smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja bez uporabe izvora svjetlosti prema vrsti gela.



Slika 58. Prosječno smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 15-minutnog izbjeljivanja bez uporabe izvora svjetlosti prema vrsti gela.

Vrsta gela za izbjeljivanje pokazala se značajnim faktorom promjene mikrotvrdoće i cakline (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$) i dentina (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$) nakon 30-minutnog

postupka izbjeljivanja bez uporabe izvora svjetlosti. Usporedba gelova na caklini ukazala je na različito smanjenje mikrotvrdoće prilikom usporedbe svih gelova osim BOOST i 30% CP gela (Tablica 21). Najveće prosječno smanjenje mikrotvrdoće na caklini zabilježeno je kod uporabe ZOOM2 gela (medijan=11,89), a najmanje kod 16% CP gela (medijan=3,65). S druge strane, usporedba gelova na dentinu ukazala je na podjednak učinak ZOOM2 i BOOST gela, kao i ZOOM2 i 30% CP gela te 16% CP i 10% CP gela na smanjenje površinske mikrotvrdoće dentina (Tablica 21). Na dentinu najveće prosječno smanjenje zabilježeno je kod uporabe BOOST gela (medijan=11,51), a najmanje kod 16% CP gela (medijan=2,44).

Tablica 21. Usporedba smanjenja mikrotvrdoće na caklini i dentinu odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja bez uporabe izvora svjetlosti između različitih vrsta gelova za izbjeljivanje.

Površina	Usporedba gelova	Medijani smanjenja mikrotvrdoće nakon izbjeljivanja		p-vrijednost
Caklina	ZOOM2 vs. BOOST	11,89	9,95	0,003
	ZOOM2 vs. 30% CP	11,89	10,14	0,004
	ZOOM2 vs. 16% CP	11,89	3,65	< 0,001
	ZOOM2 vs. 10% CP	11,89	5,63	< 0,001
	BOOST vs. 30% CP	9,95	10,14	NS
	BOOST vs. 16% CP	9,95	3,65	< 0,001
	BOOST vs. 10% CP	9,95	5,63	< 0,001
	30% CP vs. 16% CP	10,14	3,65	< 0,001
	30% CP vs. 10% CP	10,14	5,63	< 0,001
	16% CP vs. 10% CP	3,65	5,63	0,023
Dentin	ZOOM2 vs. BOOST	11,38	11,51	NS
	ZOOM2 vs. 30% CP	11,38	10,55	NS
	ZOOM2 vs. 16% CP	11,38	2,44	< 0,001
	ZOOM2 vs. 10% CP	11,38	2,77	< 0,001
	BOOST vs. 30% CP	11,51	10,55	0,004
	BOOST vs. 16% CP	11,51	2,44	< 0,001
	BOOST vs. 10% CP	11,51	2,77	< 0,001
	30% CP vs. 16% CP	10,55	2,44	< 0,001
	30% CP vs. 10% CP	10,55	2,77	< 0,001
	16% CP vs. 10% CP	2,44	2,77	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Rank Sum testa; NS – nije značajno.

U odnosu na 30-minutni postupak izbjeljivanja, 15-minutno izbjeljivanje cakline ukazalo je na značajno manji pad mikrotvrdoće kod primjene 16% CP gela (medijan=2,34) u odnosu na ZOOM2 (medijan=4,60; p=0,012), BOOST (medijan=3,73; p=0,043) i 30% CP gel za

izbjeljivanje (medijan=5,27; p=0,004). Kod mjerenja zabilježenih na dentinu najveće smanjenje mikrotvrdoće nakon 15 minuta izbjeljivanja bez izvora svjetlosti zabilježeno je kod BOOST gela (medijan=5,27) i nije bilo statistički značajno različito od ZOOM2 gela (medijan=4,89), dok je najmanje smanjenje zabilježeno prilikom primjene 16% CP gela (medijan=1,90) i nije bilo statistički značajno različito od primjene 10% CP gela (medijan=3,08).

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini imao je pozitivan učinak na površinsku mikrotvrdoću koja se, usprkos smanjenju uzrokovanom 30-minutnim izbjeljivanjem, približila razini početnih mjerenja (Slika 55). Odabir vrste gela za izbjeljivanje nije imao značajan utjecaj na obnovu mikrotvrdoće nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini koja je kod primjene svake vrste gela dostigla razinu početnih vrijednosti (Tablica 22).

Tablica 22. Učinak različitih tretmana na površinsku mikrotvrdoću nakon 30-minutnog izbjeljivanja bez uporabe izvora svjetlosti prema vrsti gela.

Gel za izbjeljivanje	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. nakon izbjeljiva-nja	Početno vs. nakon umjetne sline	Početno vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon umjetne sline	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon umjetne sline vs. nakon deionizi-rane vode
ZOOM2	Omjer*	1,547	1,022	1,530	0,661	0,989	1,496
	t-vrijednost	34,2	1,4	25,2	-25,5	-0,7	18,5
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
BOOST	Omjer*	1,488	0,999	1,519	0,671	1,021	1,521
	t-vrijednost	31,1	-0,1	24,8	-24,5	1,3	19,3
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
30% CP	Omjer*	1,454	0,997	1,444	0,686	0,993	1,449
	t-vrijednost	29,3	-0,2	21,8	-23,3	-0,4	17,0
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
16% CP	Omjer*	1,094	0,994	1,079	0,909	0,986	1,085
	t-vrijednost	7,1	-0,4	4,5	-5,9	-0,8	3,8
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
10% CP	Omjer*	1,152	1,013	1,195	0,879	1,037	1,180
	t-vrijednost	11,1	0,8	10,6	-7,9	2,2	7,6
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**0,031**	**< 0,001**

* Omjer geometrijskih sredina, nakon kontrole za vrstu gela i vrstu površine.
Napomena: Rezultati Mixed-model ANOVE; NS – nije značajno.

Dvotjedni tretman deioniziranom vodom nije potaknuo obnovu mikrotvrdoće (Slika 55), već su njene vrijednosti ostale statistički značajno različite od početnih mjerenja (Tablica 22).

Nadalje mikrotvrdoća je uglavnom ostala na istoj razini kao i nakon 30-minutnog izbjeljivanja. Usporedba mjerenja zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja i nakon dvotjednog tretmana u deioniziranoj vodi nije ukazala na statistički značajne razlike u mikrotvrdoći, osim kod upotrebe 10% CP gela za izbjeljivanje (p=0,031). Mikrotvrdoća nakon izbjeljivanja 10% CP gelom bez izvora svjetlosti bila je za otprilike 4% veća nego nakon dvotjednog tretmana u deioniziranoj vodi, što znači da je ovakav tretman imao negativan učinak na mikrotvrdoću.

Zasebna analiza mikrotvrdoće na caklini i dentinu ukazala je na podjednak učinak procesa izbjeljivanja, te tretmana u umjetnoj slini i deioniziranoj vodi na mikrotvrdoću i cakline i dentina. Nakon izbjeljivanja došlo je do značajnog pada mikrotvrdoće koja se nakon dvotjednog tretmana umjetnom slinom vratila na razinu početnih mjerenja, dok u slučaju tretmana deioniziranom vodom nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na vrijednosti zabilježene odmah nakon procesa izbjeljivanja (Tablica 23).

Tablica 23. Učinak različitih tretmana na mikrotvrdoću cakline i dentina prilikom 30-minutnog izbjeljivanja bez uporabe izvora svjetlosti.

Površina	Statistika	Usporedba mjerenja					
		Početno vs. nakon izbjeljiva-nja	Početno vs. nakon umjetne sline	Početno vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon umjetne sline	Nakon izbjeljiva-nja vs. nakon deionizi-rane vode	Nakon umjetne sline vs. nakon deionizi-rane vode
Caklina	Omjer*	1,293	1,014	1,312	0,785	1,015	1,294
	t-vrijednost	31,8	1,4	25,5	-23,6	1,4	18,7
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**
Dentin	Omjer*	1,376	0,996	1,369	0,724	0,995	1,375
	t-vrijednost	39,6	-0,4	29,5	-31,5	-0,4	23,1
	p-vrijednost	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**	**< 0,001**	**NS**	**< 0,001**

* Omjer geometrijskih sredina, nakon kontrole za vrstu gela i vrstu površine.
Napomena: Rezultati Mixed-model ANOVE; NS – nije značajna

Usporedba izvora svjetlosti

Vrsta izvora svjetlosti tijekom 15-minutnog i 30-minutnog procesa izbjeljivanja nije imala značajan učinak na promjenu površinske mikrotvrdoće bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje. Nadalje, promjena mikrotvrdoće u procesu izbjeljivanja potpomognutog

izvorom svjetlosti nije bila statistički značajno različita od promjene nastale nakon izbjeljivanja bez uporabe izvora svjetlosti (Tablica 24).

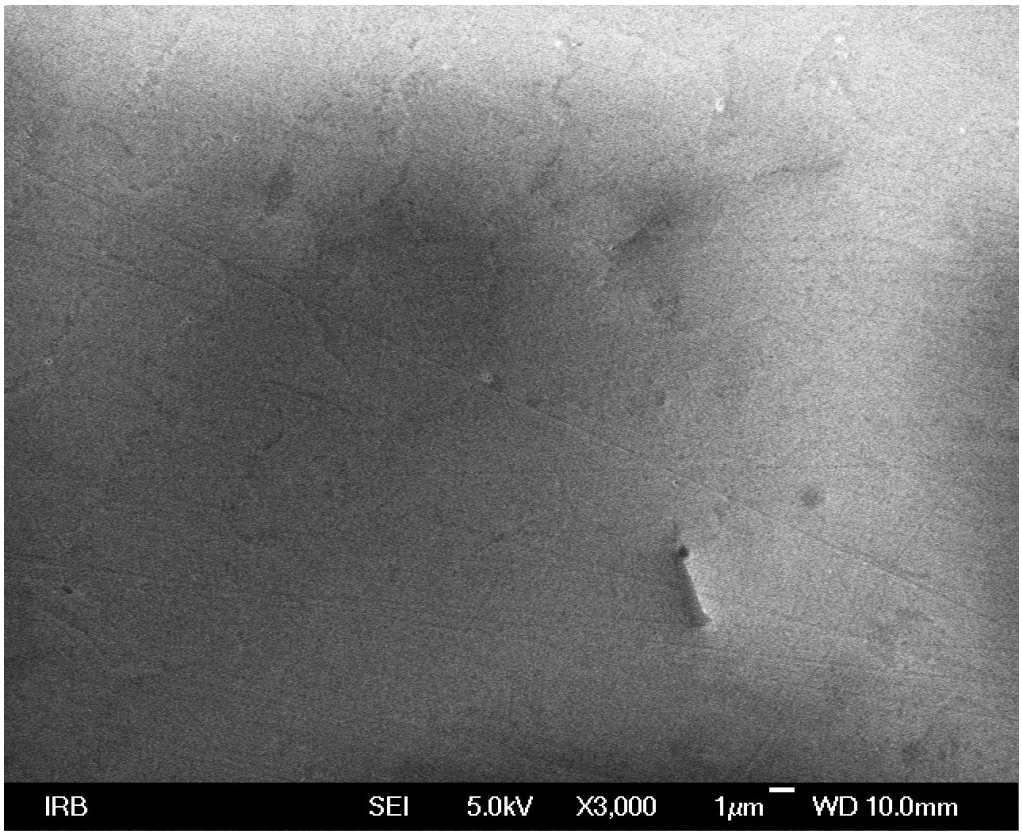
Tablica 24. Učinak izvora svjetlosti na smanjenje površinske mikrotvrdoće odmah nakon 30-minutnog izbjeljivanja prema vrsti gela za izbjeljivanje.

Gel za izbjeljivanje	Izvor svjetlosti	Medijan smanjenja mikrotvrdoće nakon izbjeljivanja	p-vrijednost
ZOOM2	LED405	11,90	NS
	OLED	11,61	
	Femtosekundni laser	11,97	
	ZOOM2	12,18	
	Kontrola (bez izvora svjetlosti)	11,69	
BOOST	LED405	11,00	NS
	OLED	11,56	
	Femtosekundni laser	10,84	
	ZOOM2	11,81	
	Kontrola (bez izvora svjetlosti)	11,04	
30% CP	LED405	10,92	NS
	OLED	10,62	
	Femtosekundni laser	10,86	
	ZOOM2	10,62	
	Kontrola (bez izvora svjetlosti)	10,30	
16% CP	LED405	2,63	NS
	OLED	2,83	
	Femtosekundni laser	2,92	
	ZOOM2	2,83	
	Kontrola (bez izvora svjetlosti)	2,90	
10% CP	LED405	4,37	NS
	OLED	4,14	
	Femtosekundni laser	4,44	
	ZOOM2	3,93	
	Kontrola (bez izvora svjetlosti)	4,28	

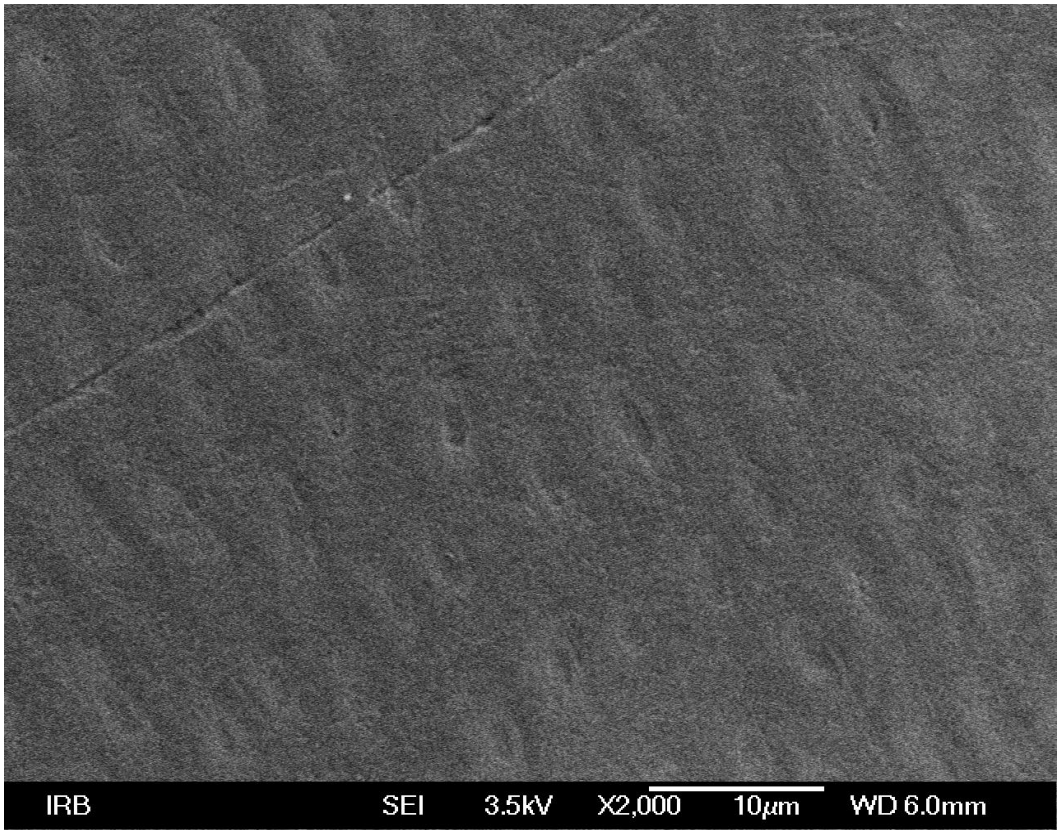
Napomena: Rezultati Kruskal-Wallis testa; NS – nije značajno.

4.3. SEM ANALIZA

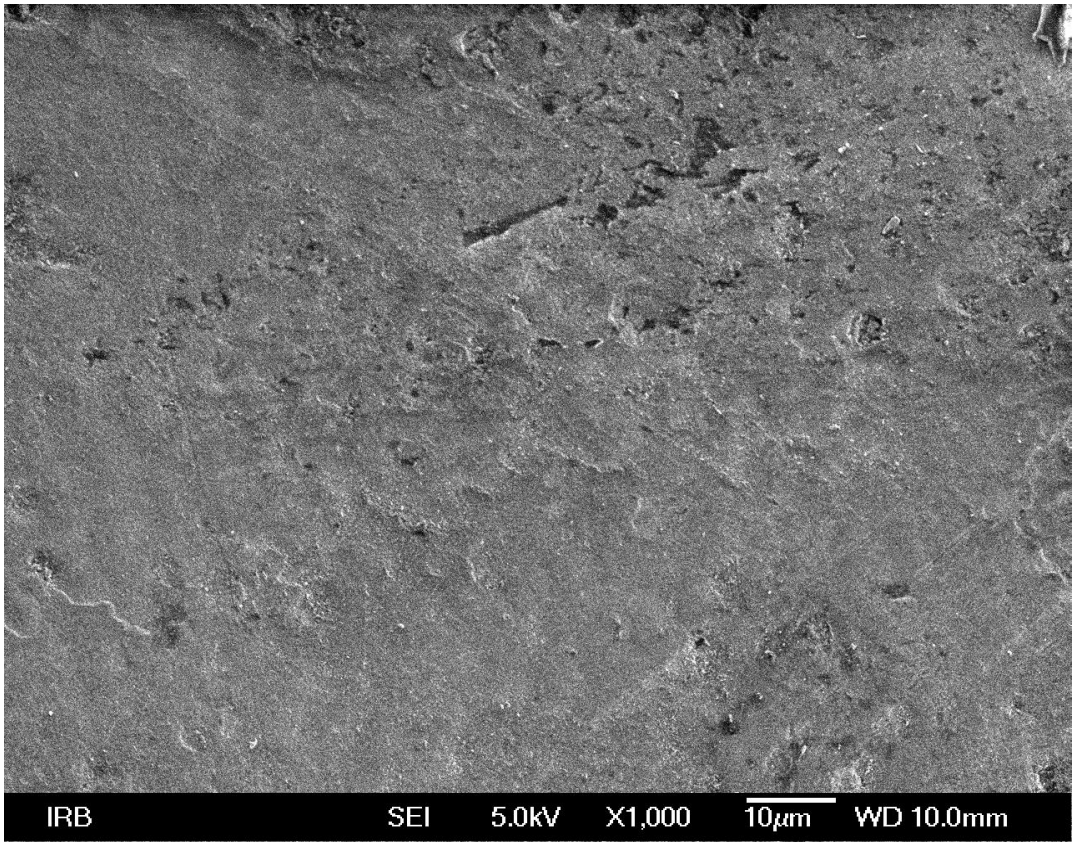
Na reprezentativnim slikama polirane površine neizbjeljene cakline nisu zabilježene značajne morfološke promjene cakline (Slika 59) i dentina pri čemu se dentinski tubulusi ostali zatvoreni (Slika 60). Svi korišteni gelovi za izbjeljivanje pokazali su male promjene u površinskoj glatkoći i različite stupnjeve oštećenja površine cakline i dentina, pri čemu su gelovi 25% i 38% vodikovog peroksida pokazali veće promjene i oštećenja na površini cakline uz otapanje pojedinih područja (Slike 61,62,63) u odnosu na gelove 10%, 16% i 30% karbamid peroksida. Nakon izbjeljivanja gelovima 25% i 38% vodikovog peroksida došlo je do otvaranja dentinskih tubulusa (Slike 64,65). 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 66) s inkludiranim, tj. zatvorenim dentinskim tubulusima (Slika 67).



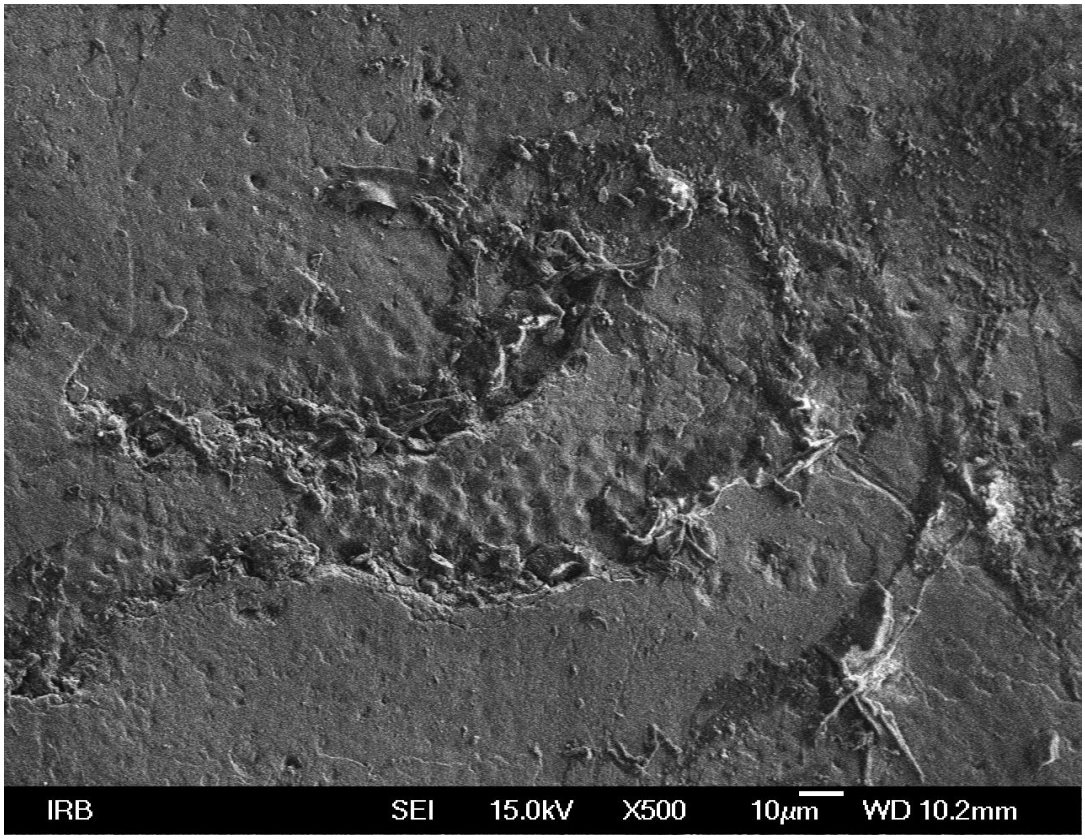
Slika 59. Glatka površina cakline s nekoliko ogrebotina.



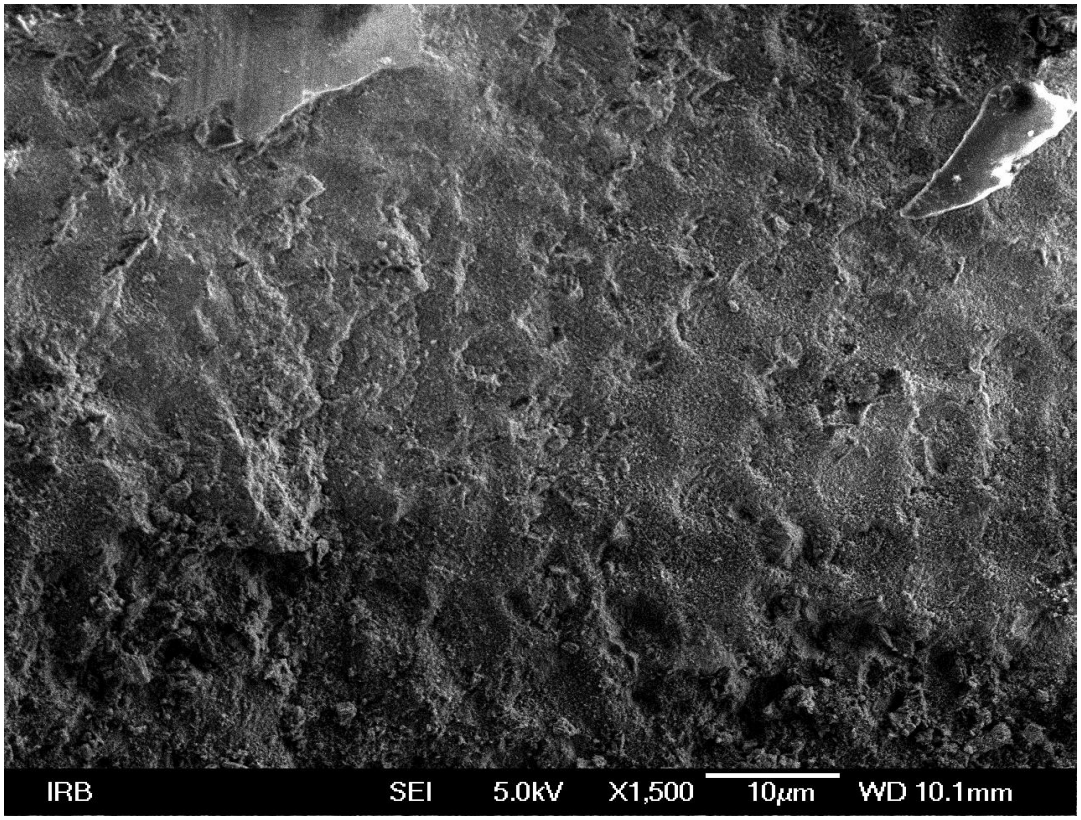
Slika 60. Glatka površina dentina bez otvorenih tubulusa.



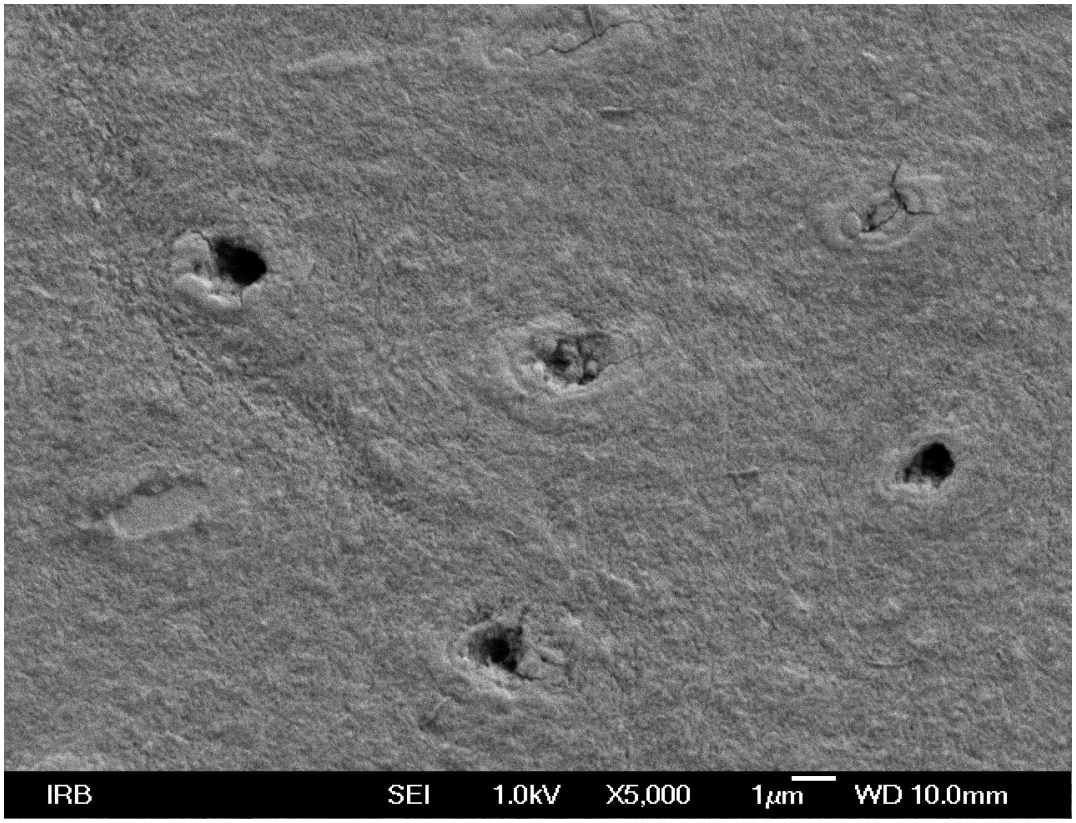
Slika 61. Površina cakline s malim nepravilnostima.



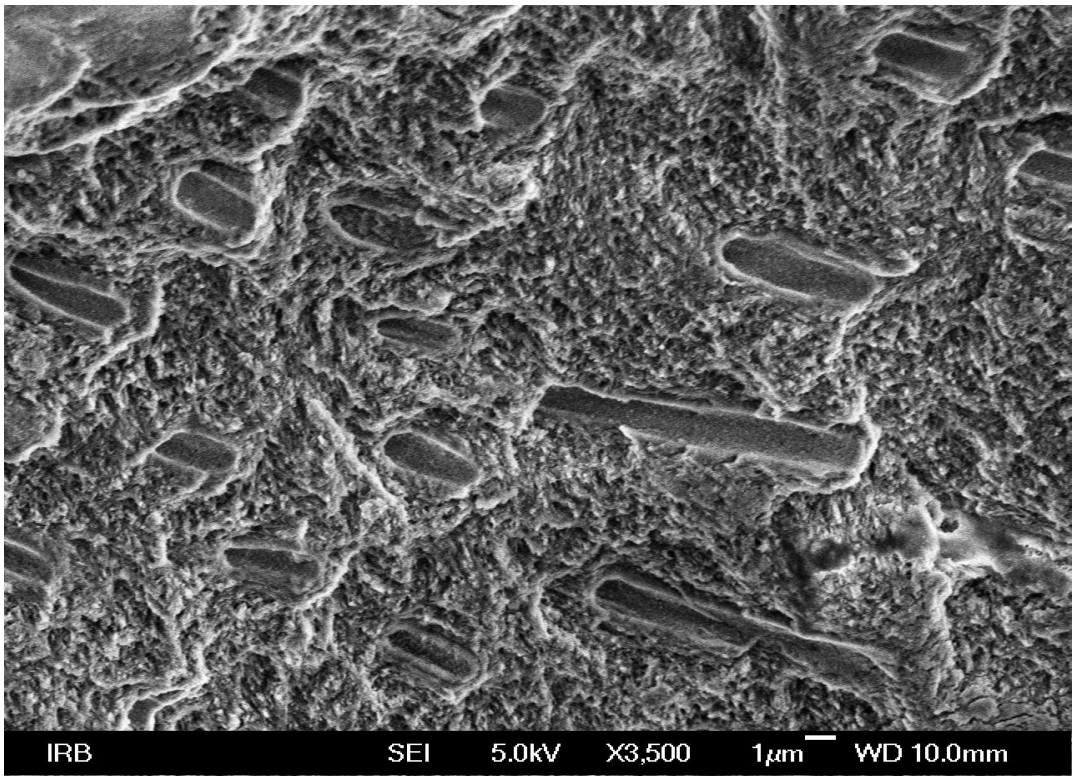
Slika 62. Površina cakline s većim nepravilnostima.



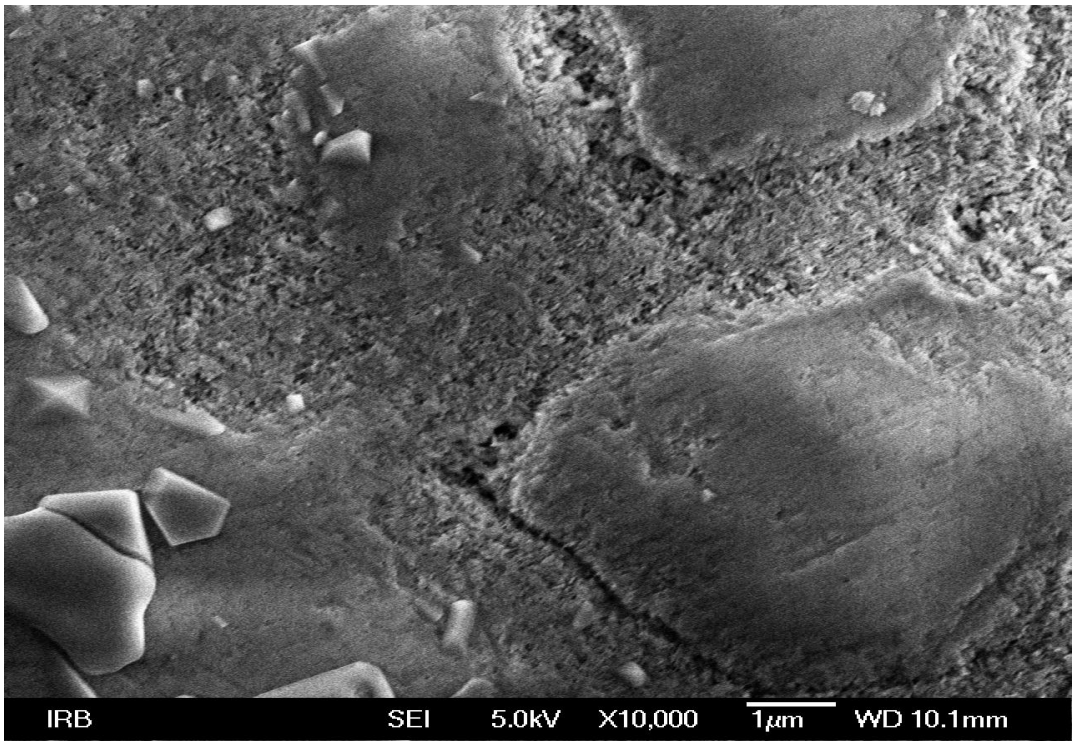
Slika 63. Površina cakline s većim nepravilnostima.



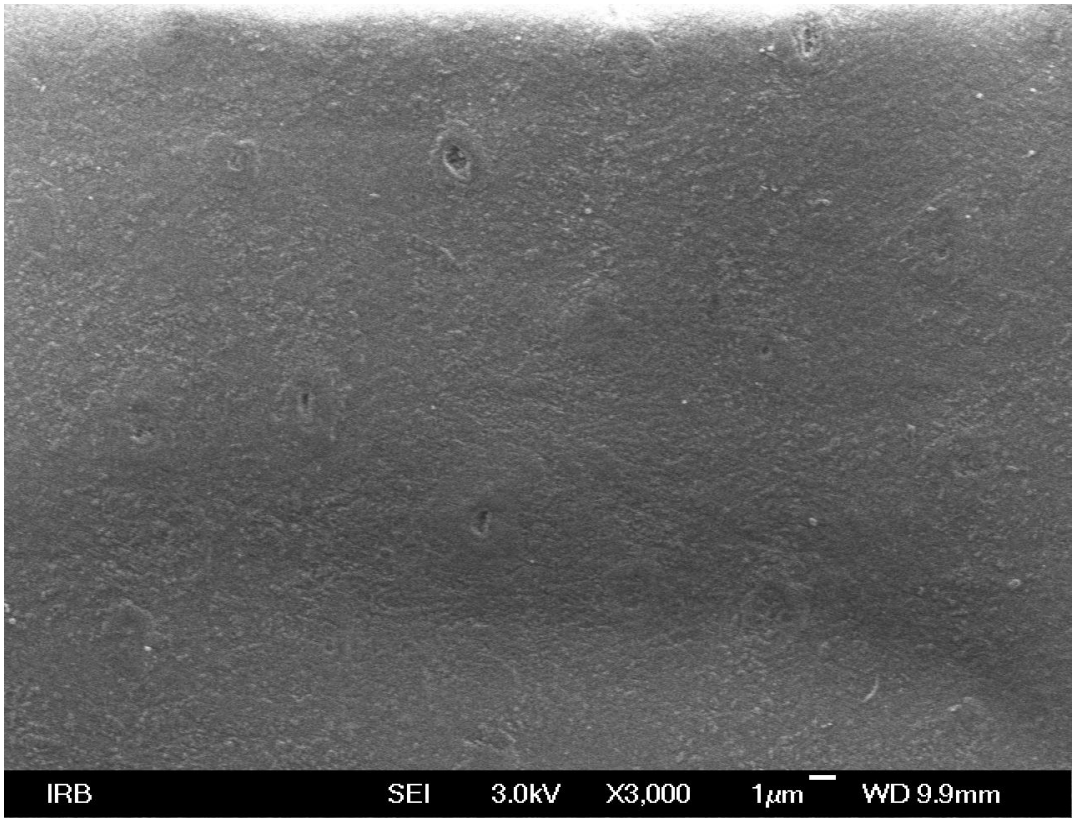
Slika 64. Površina dentina s malim nepravilnostima i otvrenim dentinskim tubulusima.



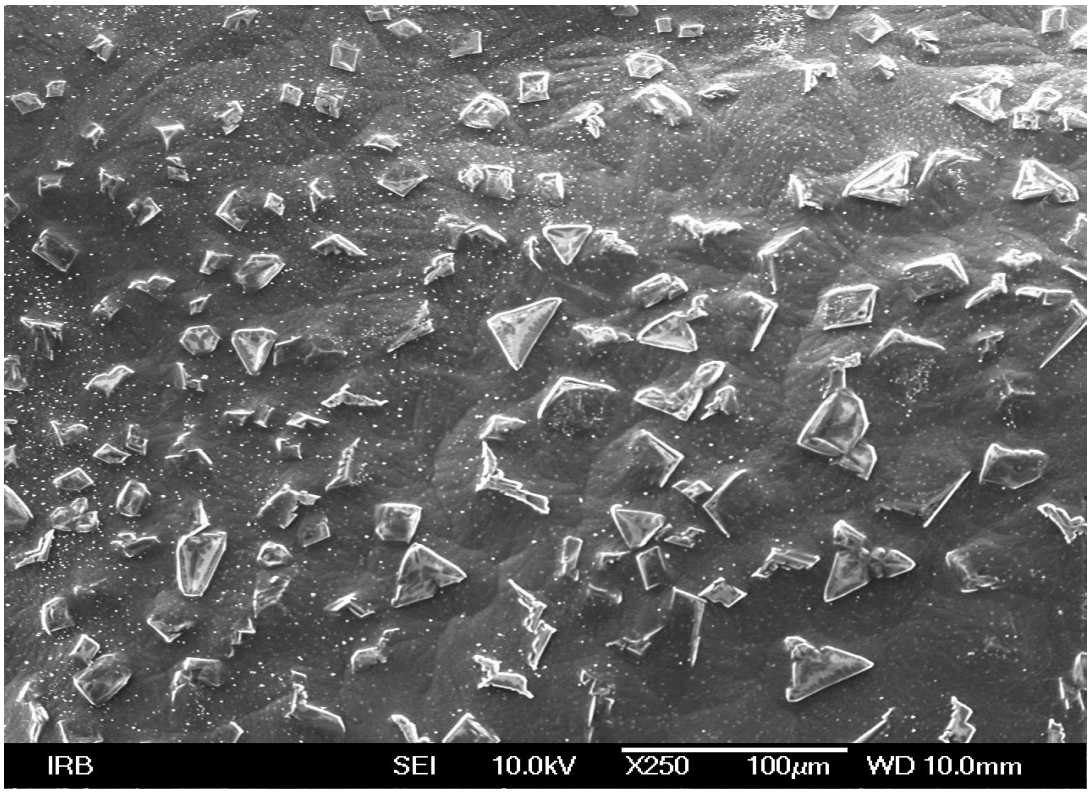
Slika 65. Površina dentina s malim nepravilnostima i otvrenim dentinskim tubulusima.



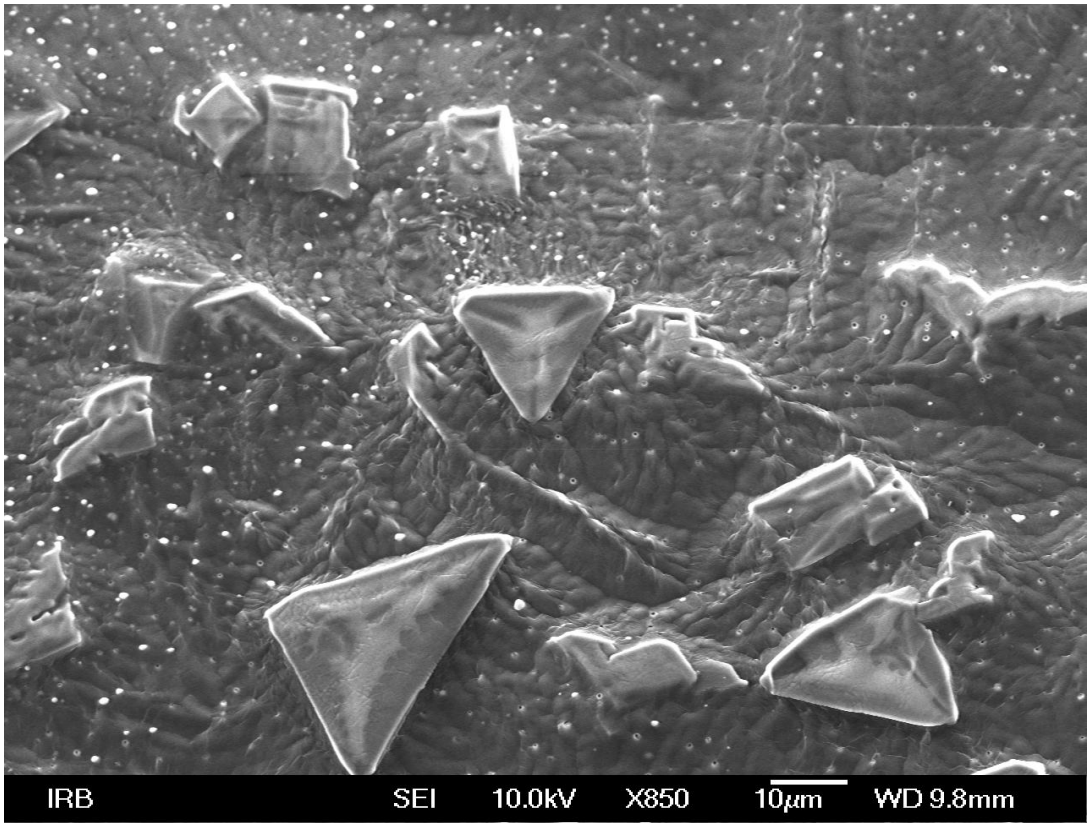
Slika 66. Odlaganje kristala ACP-a na površini cakline.



Slika 67. Površina dentina nakon odlaganja ACP-a i zatvoreni dentinski tubulusi.



Slika 68. Kristali amorfnog kalcijevog fosfata.



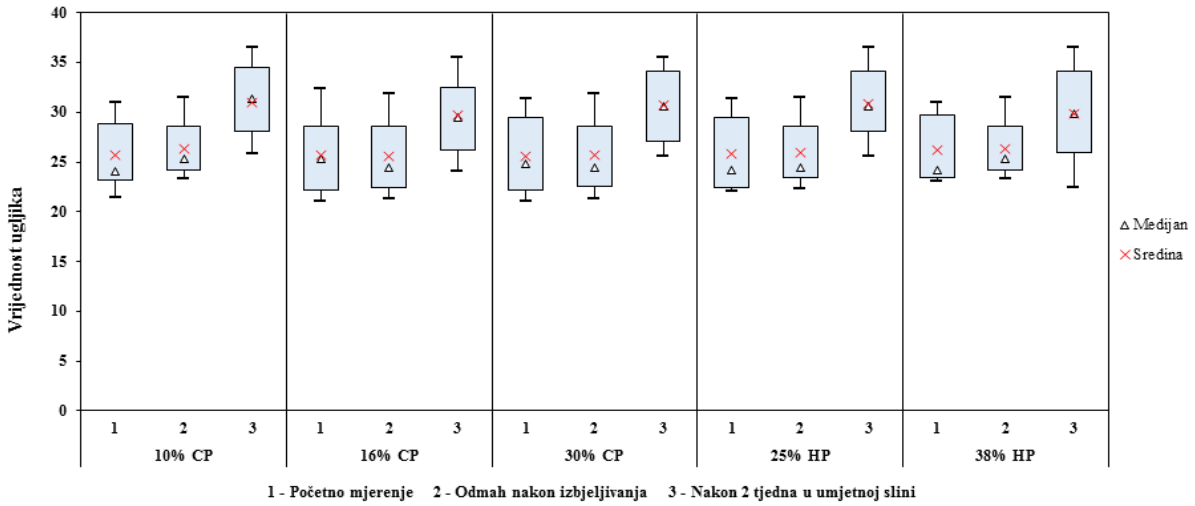
Slika 69. Kristali amorfnog kalcijevog fosfata.

4.4. EDS ANALIZA

Rezultati za caklinu

Ugljik

Medijan početnih mjerenja vrijednosti ugljika na caklini iznosio je 24,84, a ostao je na približno istoj razini i nakon izbjeljivanja različitim gelovima (Slika 70). Daljnji dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a povećao je srednju vrijednost ugljika (medijan=30,03).



Slika 70. Box-plot dijagrami vrijednosti ugljika na caklini nakon različitih tretmana.

Friedmanov test ukazao je na statistički značajne razlike u distribuciji početnih vrijednosti ugljika, vrijednosti zabilježenih nakon izbjeljivanja i/ili nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a ($p<0,001$). No, usporedba početnih i vrijednosti ugljika zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja nije ukazala na značajnu promjenu distribucije vrijednosti ugljika, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Tablica 25).

Tablica 25. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti ugljika na caklini.

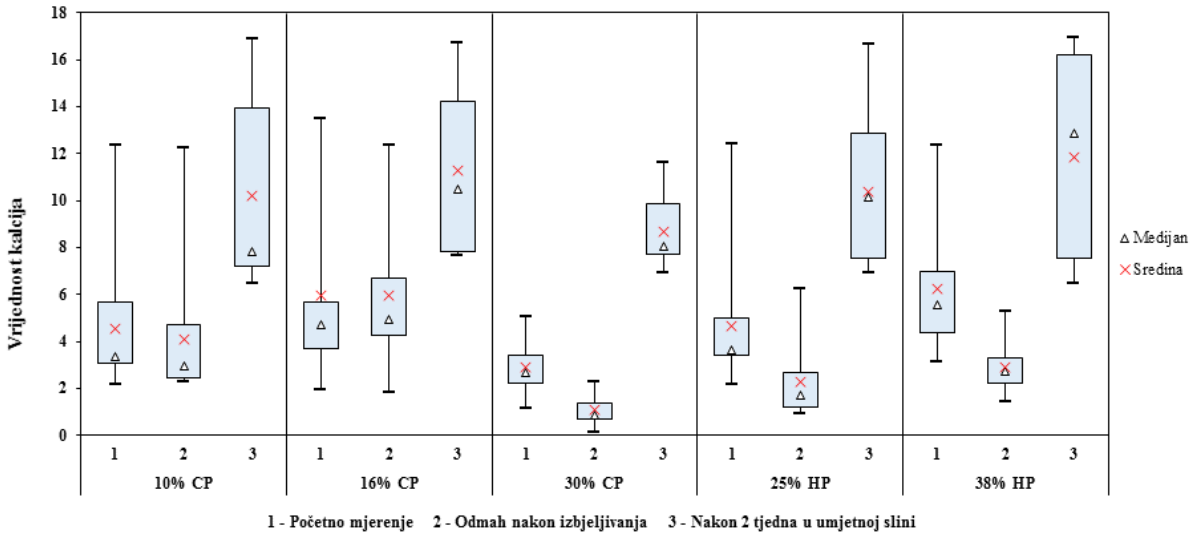
Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani	p-vrijednost	
Ugljik	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	24,12	25,38	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	25,35	24,49	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	24,85	24,49	NS
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	24,25	24,49	NS
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	24,20	25,38	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a imao je pozitivan učinak na vrijednosti ugljika, koje su značajno porasle (Wilcoxon Signed Rank test, p<0,001).

Kalcij

Distribucija izmjerenih vrijednosti kalcija na caklini ukazala je na promjene u njegovoj vrijednosti nakon procesa izbjeljivanja, a posebice nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a (Slika 71).



Slika 71. Box-plot dijagrami vrijednosti kalcija na caklini nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti kalcija među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, p<0,001). Usporedba početnih i vrijednosti zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja ukazala je na značajan pad vrijednosti kalcija nakon izbjeljivanja 10% CP i 30% CP gelom te 25% HP i 38% HP gelom (Tablica 26).

Tablica 26. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti kalcija na caklini.

Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Kalcij	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	3,36	2,99	0,006
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	4,71	4,95	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	2,67	0,86	0,002
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	3,64	1,74	0,002
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	5,59	2,74	0,002

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Odabir vrste gela za izbjeljivanje pokazao se značajnim faktorom promjene vrijednosti kalcija (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$). Izbjeljivanje 10% CP i 16% CP gelom uzrokovalo je značajno manji pad/promjenu vrijednosti kalcija na caklini u usporedbi s 30% CP te 25% HP i 38% HP gelom (Tablica 27). Najveći pad vrijednosti kalcija ostvaren je uporabom 38% HP gela (medijan=3,42), a bio je značajno veći i prilikom usporedbe s 30% CP gelom ($p=0,036$), ali ne i 25% HP gelom.

Tablica 27. Usporedba promjene vrijednosti kalcija na caklini nakon izbjeljivanja različitim gelovima za izbjeljivanje.

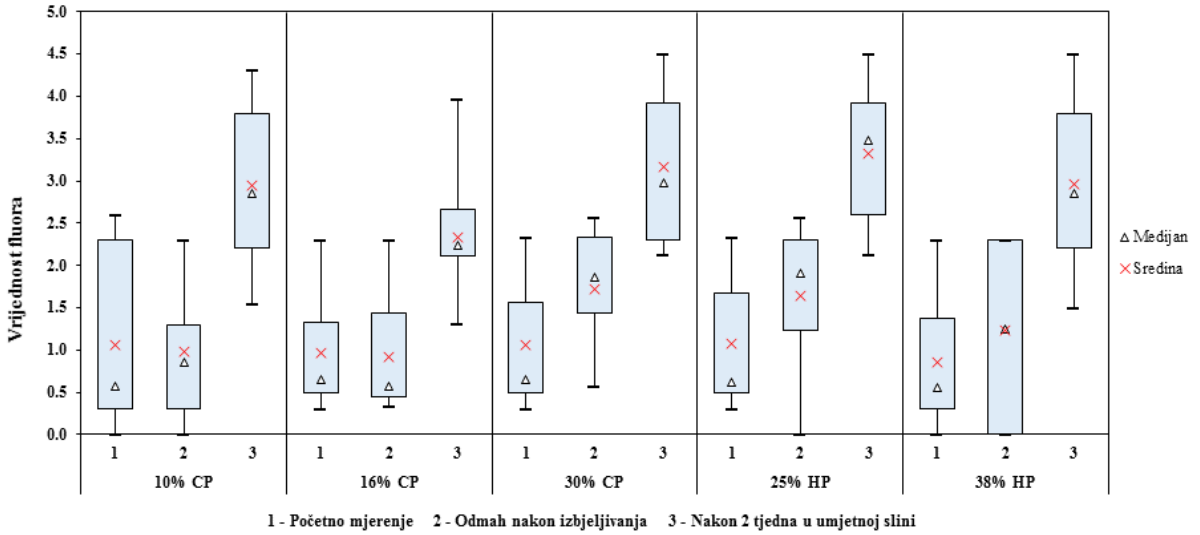
Element	Varijabla	Usporedba gelova	Medijani promjene vrijednosti kalcija nakon izbjeljivanja		p-vrijednost
Kalcij	Početno - nakon izbjeljivanja	10% CP vs. 16% CP	0,42	-0,09	NS
		10% CP vs. 30% CP	0,42	1,88	< 0,001
		10% CP vs. 25% HP	0,42	2,08	< 0,001
		10% CP vs. 38% HP	0,42	3,42	< 0,001
		16% CP vs. 30% CP	-0,09	1,88	< 0,001
		16% CP vs. 25% HP	-0,09	2,08	< 0,001
		16% CP vs. 38% HP	-0,09	3,42	< 0,001
		30% CP vs. 25% HP	1,88	2,08	NS
		30% CP vs. 38% HP	1,88	3,42	0,036
		25% HP vs. 38% HP	2,08	3,42	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Rank Sum testa; NS – nije značajno.

S druge strane, dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a imao je pozitivan učinak na vrijednosti kalcija čije su se vrijednosti značajno povećale (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$). Ovisno o vrsti korištenog gela za izbjeljivanje, medijan vrijednosti kalcija odmah nakon izbjeljivanja nalazio se u rasponu vrijednosti od 0,86 do 4,95, dok se nakon daljnjeg dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a nalazio u rasponu vrijednosti od 7,84 do 12,85. Nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini vrijednosti kalcija bile su značajno više i od početnih vrijednosti (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$).

Fluor

Najveći učinak na distribuciju vrijednosti fluora imao je dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a nakon kojeg su se vrijednosti fluora zamjetno povećale (Slika 72). Promjena vrijednosti fluora odmah nakon izbjeljivanja nije bila toliko izražena.



Slika 72. Box-plot dijagrami vrijednosti fluora nakon različitih tretmana cakline.

Razlika u distribuciji vrijednosti fluora među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, $p<0,001$). No usporedba početnih i mjerenja zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja nije ukazala na značajnu promjenu distribucije vrijednosti fluora, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Tablica 28).

Tablica 28. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti fluora na caklini.

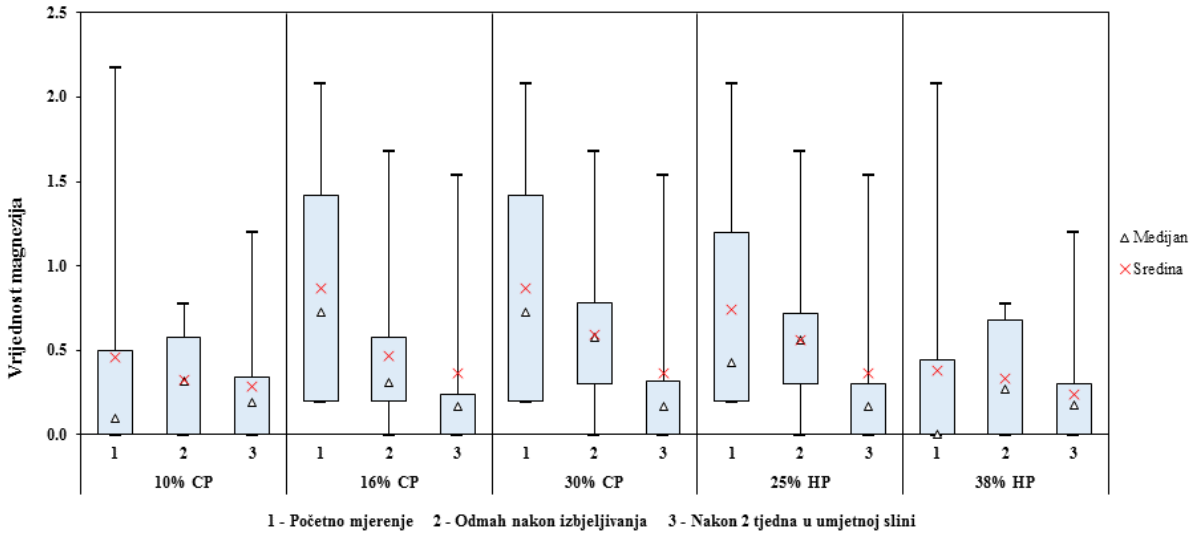
Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Fluor	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,57	0,86	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,65	0,58	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,65	1,87	NS
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,62	1,92	NS
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,56	1,25	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a imao je pozitivan učinak na vrijednosti fluora čije su vrijednosti značajno porasle (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$).

Magnezij

Distribucija vrijednosti magnezija zabilježenih tijekom eksperimenta ukazala je na tendenciju smanjenja koncentracije ovog elementa na caklini nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a (Slika 73).



Slika 73. Box-plot dijagrami vrijednosti magnezija na caklini nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti magnezija među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, $p<0,001$). No usporedba početnih i vrijednosti zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja nije ukazala na značajnu promjenu vrijednosti magnezija (Tablica 29).

Tablica 29. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti magnezija na caklini.

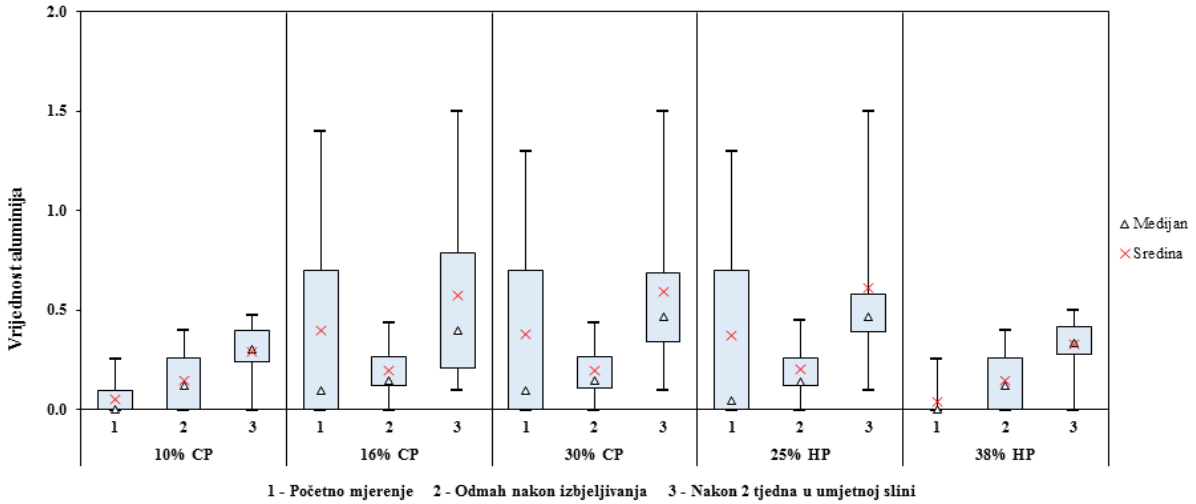
Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Magnezij	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,10	0,32	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,73	0,31	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,73	0,58	NS
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,43	0,56	NS
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,00	0,27	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a značajno je smanjio vrijednosti magnezija (Wilcoxon Signed Rank test, p=0,002). Medijan vrijednosti magnezija nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a iznosio je 0,18.

Aluminij

Aluminij često nije detektiran tijekom početnih mjerenja. Medijan izmjerenih vrijednosti aluminija na caklini u ukupnim početnim mjerenjima bio je jednak nuli (Slika 74). Zanemarujući vrstu gela korištenu tijekom procesa izbjeljivanja, medijan zabilježenih vrijednosti aluminija nakon izbjeljivanja iznosio je 0,15, dok se nakon daljnjeg dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a povećao na 0,40.



Slika 74. Box-plot dijagrami vrijednosti aluminija na caklini nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti aluminija među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, p<0,001). No, usporedba početnih i vrijednosti zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja nije ukazala na značajnu promjenu vrijednosti aluminija, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Tablica 30).

Tablica 30. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti aluminija na caklini.

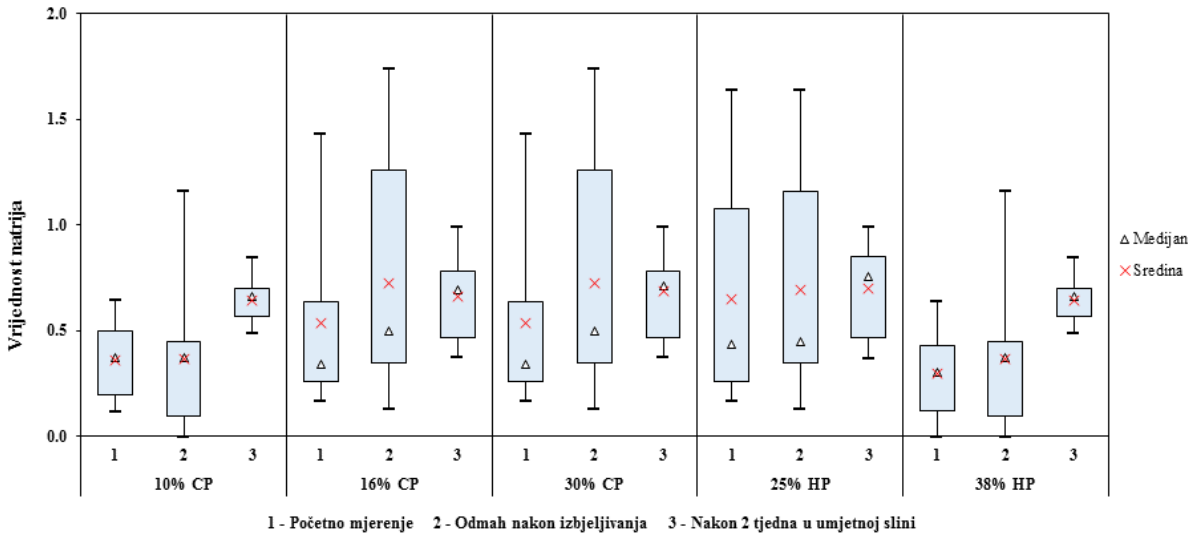
Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Aluminij	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,00	0,13	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,10	0,15	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,10	0,15	NS
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,05	0,14	NS
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,00	0,13	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

S druge strane, dvotjednim tretmanom u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a značajno se povećala koncentracija aluminija na caklini (Wilcoxon Signed Rank test, p<0,001).

Natrij

Medijan početnih mjerenja vrijednosti natrija na caklini iznosio je 0,36, a ostao je na podjednakoj razini i nakon izbjeljivanja (0,40; Slika 75). Nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a, medijan izmjerenih vrijednosti natrija iznosio je 0,70.



Slika 75. Box-plot dijagrami vrijednosti natrija na caklini nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti natrija među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna, ali samo pri uporabi 10% CP gela (Friedman test, p=0,025) i 38% HP gela

(Friedman test, p=0,025). Usporedba početnih i vrijednosti zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja nije ukazala na značajnu promjenu vrijednosti natrija, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Tablica 31).

Tablica 31. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti natrija na caklini.

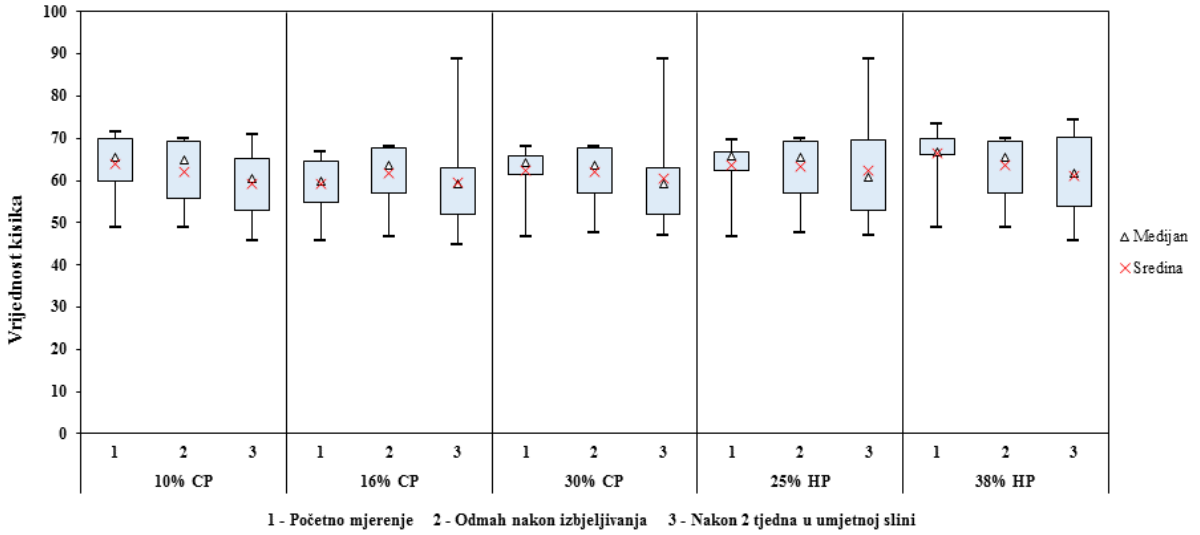
Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Natrij	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,38	0,38	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,34	0,50	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,34	0,50	NS
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,44	0,45	NS
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,31	0,38	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a povećao je koncentraciju natrija nakon izbjeljivanja 10% CP gelom (Wilcoxon Signed Rank test, p=0,049) i 38% HP gelom (Wilcoxon Signed Rank test, p=0,049).

Kisik

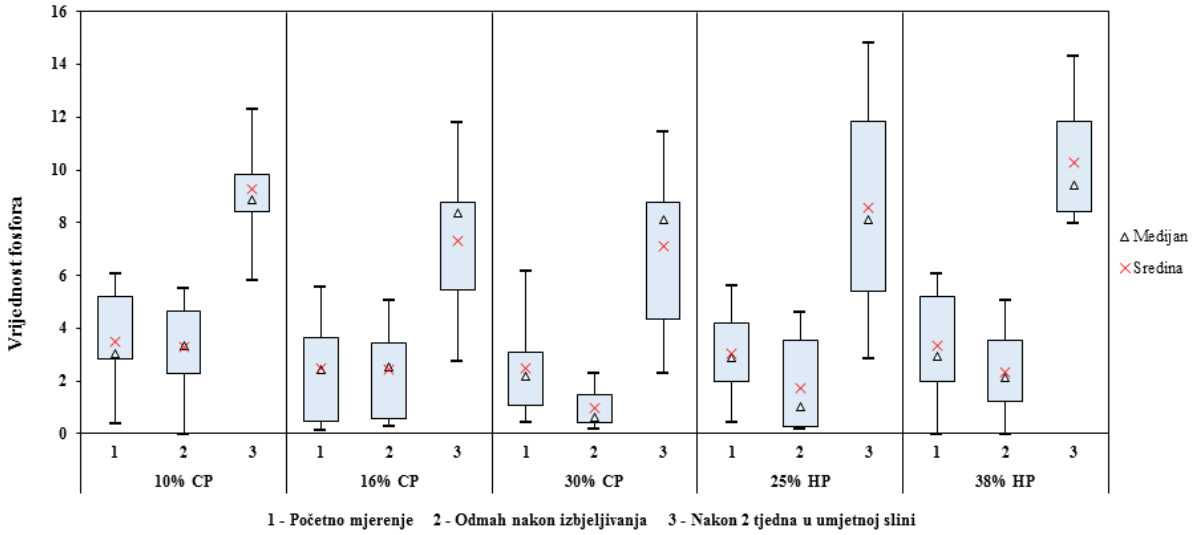
Distribucija vrijednosti kisika zabilježenih nakon izbjeljivanja nije ukazala na zamjetnije razlike u odnosu na početna mjerenja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Slika 76). Medijan početnih mjerenja iznosio je 65,53, a ostao je na podjednakoj razini i nakon izbjeljivanja (65,01). Nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a, medijan izmjerenih vrijednosti kisika iznosio je 59,93. Izbjeljivanje i dvotjedni tretman umjetnom slinom uz korištenje ACP-a nisu značajno utjecali na koncentraciju kisika pri korištenju 10% CP, 16% CP i 30% CP gela te 25% HP i 38% HP gela (Friedman test).



Slika 76. Box-plot dijagrami vrijednosti kisika na caklini nakon različitih tretmana.

Fosfor

Distribucija izmjerenih vrijednosti fosfora na caklini ukazala je na znatne promjene nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a, dok proces izbjeljivanja nije uzrokovao bitne promjene u koncentraciji fosfora na caklini ili su one bile slabije izražene (Slika 77).



Slika 77. Box-plot dijagrami vrijednosti fosfora na caklini nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti fosfora među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, $p<0,001$). Usporedba početnih i vrijednosti zabilježenih odmah

nakon izbjeljivanja ukazala je na značajan porast koncentracije fosfora nakon izbjeljivanja 30% CP gelom te 25% HP i 38% HP gelom (Tablica 32).

Tablica 32. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti fosfora na caklini.

Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Fosfor	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	3,06	3,37	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	2,45	2,53	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	2,19	0,63	0,002
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	2,92	1,05	0,012
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	2,92	2,16	0,004

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Odabir vrste gela za izbjeljivanje pokazao se značajnim faktorom promjene vrijednosti fosfora na caklini (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$). Izbjeljivanje 10% CP i 16% CP gelom uzrokovalo je značajno manji pad vrijednosti fosfora na caklini u usporedbi s 30% CP te 25% HP i 38% HP gelom (Tablica 33). Najveći pad vrijednosti fosfora ostvaren je uporabom 25% HP gela (medijan=1,51), i nije se značajno razlikovao od učinka 30% CP gela i 38% HP gela.

Tablica 33. Usporedba promjene vrijednosti fosfora na caklini nakon izbjeljivanja različitim gelovima za izbjeljivanje.

Element	Varijabla	Usporedba gelova	Medijani promjene vrijednosti fosfora nakon izbjeljivanja		p-vrijednost
Fosfor	Početno - nakon izbjeljivanja	10% CP vs. 16% CP	0,10	0,09	NS
		10% CP vs. 30% CP	0,10	1,39	0,003
		10% CP vs. 25% HP	0,10	1,51	0,010
		10% CP vs. 38% HP	0,10	0,85	0,007
		16% CP vs. 30% CP	0,09	1,39	< 0,001
		16% CP vs. 25% HP	0,09	1,51	0,007
		16% CP vs. 38% HP	0,09	0,85	< 0,001
		30% CP vs. 25% HP	1,39	1,51	NS
		30% CP vs. 38% HP	1,39	0,85	NS
		25% HP vs. 38% HP	1,51	0,85	NS

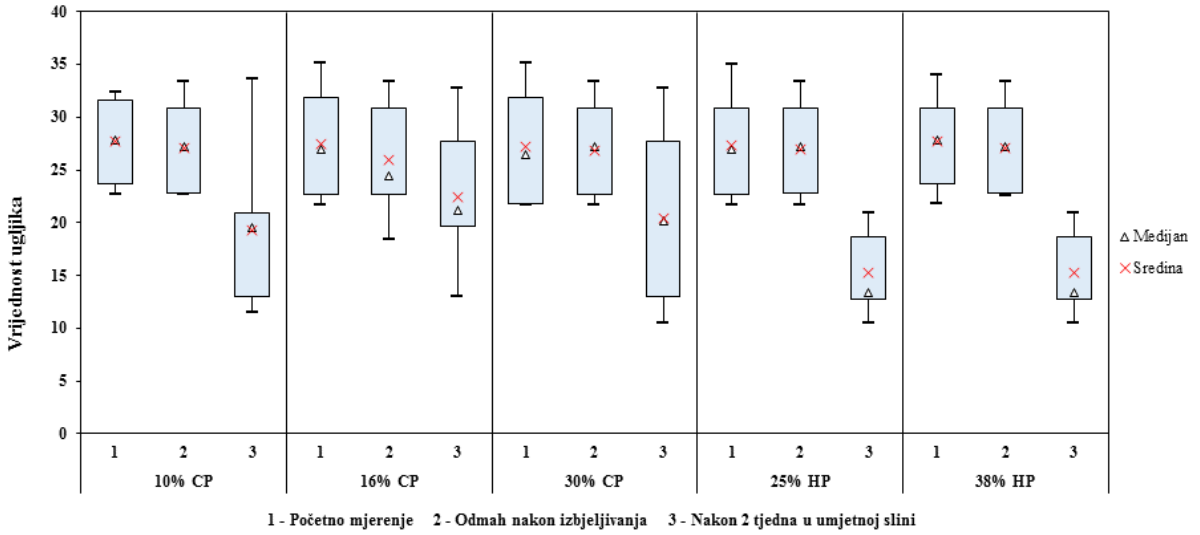
Napomena: Rezultati Wilcoxon Rank Sum testa; NS – nije značajno.

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a imao je pozitivan učinak na koncentraciju fosfora, čija su se vrijednosti značajno povećale (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$). Medijan vrijednosti fosfora nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a iznosio je 8,71. Nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini, vrijednosti fosfora bile su značajno više i od vrijednosti početnih mjerenja (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$).

Rezultati za dentin

Ugljik

Distribucija vrijednosti ugljika zabilježena nakon izbjeljivanja nije ukazala na zamjetnije razlike u odnosu na početna mjerenja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Slika 78). Medijan početnih mjerenja iznosio je 26,46, a ostao je na podjednakoj razini i nakon izbjeljivanja (26,21). Nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a, medijan izmjerenih vrijednosti ugljika iznosio je 18,64.



Slika 78. Box-plot dijagrami vrijednosti ugljika na dentinu nakon različitih tretmana.

Friedmanov test ukazao je na statistički značajne razlike u distribuciji početnih vrijednosti ugljika, vrijednosti zabilježenih nakon izbjeljivanja i/ili nakon dvotjednog tretmana u slini ($p<0,001$), ali usporedba početnih i vrijednosti ugljika zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja nije ukazala na znatnu promjenu distribucije vrijednosti ugljika, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Tablica 34).

Tablica 34. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti ugljika na dentinu.

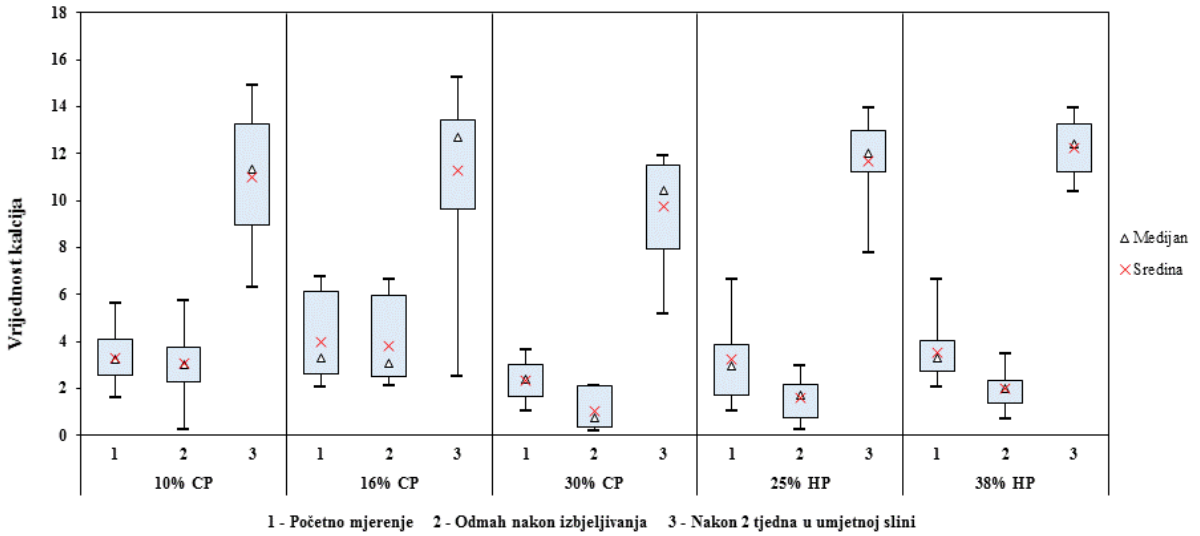
Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Ugljik	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	27,87	27,24	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	26,93	24,51	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	26,43	27,24	NS
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	26,93	27,24	NS
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	27,87	27,24	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

S druge strane, dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a značajno je smanjio vrijednosti ugljika na dentinu (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$).

Kalcij

Distribucija vrijednosti kalcija na dentinu ukazala je na postojanost ili pad koncentracije kalcija nakon procesa izbjeljivanja (Slika 79). Dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a imao je veći utjecaj na vrijednosti kalcija koje su se zamjetno povećale nakon takvog tretmana.



Slika 79. Box-plot dijagrami vrijednosti kalcija na dentinu nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti kalcija među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, $p<0,001$). Usporedba početnih i vrijednosti zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja ukazala je na značajan pad vrijednosti kalcija na dentinu nakon izbjeljivanja 30% CP gelom te 25% HP i 38% HP gelom (Tablica 35).

Tablica 35. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti kalcija na dentinu.

Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Kalcij	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	3,24	3,02	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	3,29	3,07	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	2,42	0,78	0,002
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	3,00	1,73	0,002
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	3,29	2,02	0,002

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Odabir vrste gela za izbjeljivanje pokazao se značajnim faktorom promjene vrijednosti kalcija (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$). Izbjeljivanje 10% CP i 16% CP gelom uzrokovalo je značajno manji pad vrijednosti kalcija na dentinu u usporedbi s 30% CP gelom te 25% HP i 38% HP gelom (Tablica 36). Usporedba 30% CP gela, 25% HP i 38% HP gela nije ukazala na značajne razlike u promjeni koncentracije kalcija na dentinu nakon izbjeljivanja ovim gelovima.

Tablica 36. Usporedba promjene vrijednosti kalcija na dentinu nakon izbjeljivanja različitim gelovima za izbjeljivanje.

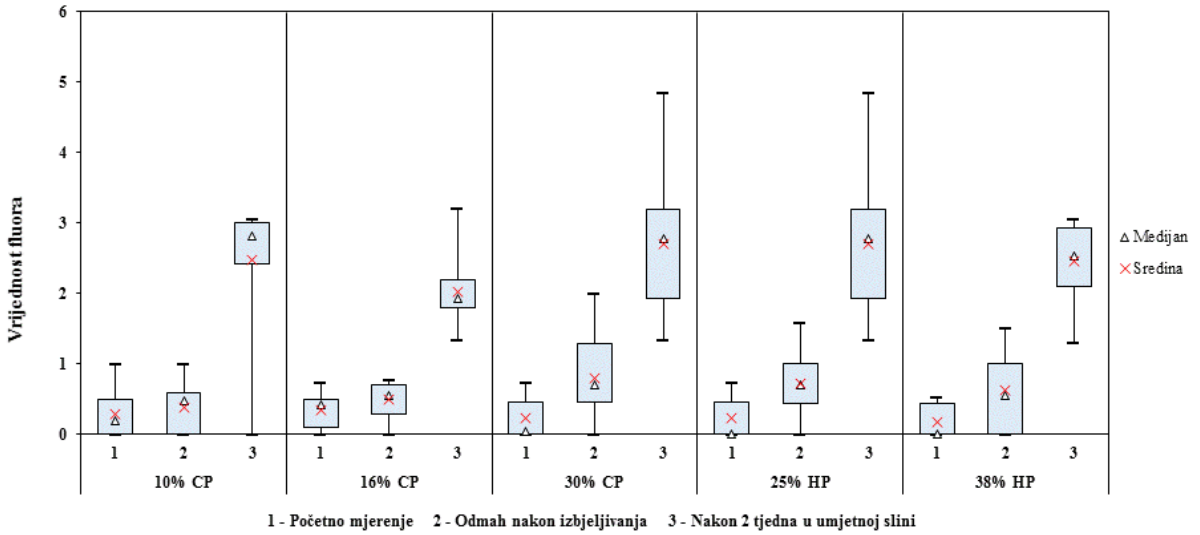
Element	Varijabla	Usporedba gelova	Medijani promjene vrijednosti kalcija nakon izbjeljivanja		p-vrijednost
Kalcij	Početno - nakon izbjeljivanja	10% CP vs. 16% CP	0,20	0,27	NS
		10% CP vs. 30% CP	0,20	1,34	< 0,001
		10% CP vs. 25% HP	0,20	1,34	< 0,001
		10% CP vs. 38% HP	0,20	1,30	< 0,001
		16% CP vs. 30% CP	0,27	1,34	< 0,001
		16% CP vs. 25% HP	0,27	1,34	< 0,001
		16% CP vs. 38% HP	0,27	1,30	< 0,001
		30% CP vs. 25% HP	1,34	1,34	NS
		30% CP vs. 38% HP	1,34	1,30	NS
		25% HP vs. 38% HP	1,34	1,30	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Rank Sum testa; NS – nije značajno.

S druge strane, dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a imao je pozitivan učinak na vrijednosti kalcija na dentinu, čije su se vrijednosti značajno povećale nakon takvog tretmana (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$). Nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini, vrijednosti kalcija bile su značajno više i od početnih vrijednosti (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$).

Fluor

Najveći učinak na koncentraciju fluora na dentinu imao je dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a nakon kojeg su se vrijednosti fluora zamjetno povećale (Slika 80). Promjena vrijednosti fluora odmah nakon izbjeljivanja nije bila toliko izražena.



Slika 80. Box-plot dijagrami vrijednosti fluora na dentinu nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti fluora među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, p<0,001). Usporedba početnih i mjerenja zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja ukazala je na značajno povećanje vrijednosti fluora nakon izbjeljivanja 30% CP gelom (p=0,012), 25% HP gelom (p=0,008) i 38% HP gelom (p=0,016), dok uporaba 10% CP i 16% CP gela nije uzrokovala značajnu promjenu u koncentraciji fluora (Tablica 37).

Tablica 37. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti flora na dentinu.

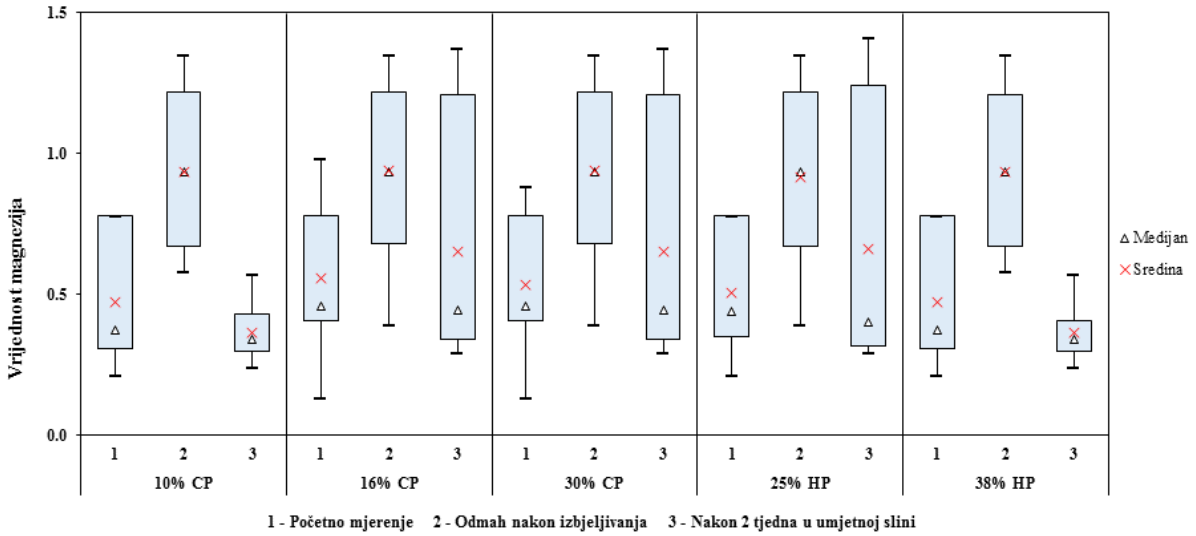
Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Fluor	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,20	0,48	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,43	0,55	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,05	0,70	0,012
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,00	0,70	0,008
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,00	0,55	0,016

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a vrijednosti flora na dentinu značajno su porasle u odnosu na vrijednosti zabilježene odmah nakon procesa izbjeljivanja (Wilcoxon Signed Rank test, p<0,001), kao i u odnosu na početne vrijednosti (Wilcoxon Signed Rank test, p<0,001).

Magnezij

Bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanja proces izbjeljivanja imao je zamjetan utjecaj na koncentraciju magnezija (Slika 81). Medijan početnih mjerenja vrijednosti magnezija iznosio je 0,43, a nakon izbjeljivanja povećao se na 0,94. Nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a medijan izmjerenih vrijednosti magnezija smanjio se otprilike na razinu početnih mjerenja te je iznosio 0,36.



Slika 81. Box-plot dijagrami vrijednosti magnezija na dentinu nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti magnezija među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, $p<0,001$). Usporedba početnih i vrijednosti zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja ukazala je na značajnu promjenu vrijednosti magnezija na dentinu, prilikom uporabe svih gelova za izbjeljivanje (Tablica 38).

Tablica 38. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti magnezija na dentinu.

Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Magnezij	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,38	0,94	0,004
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,46	0,94	0,020
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,46	0,94	0,012
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,44	0,94	0,004
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,38	0,94	0,004

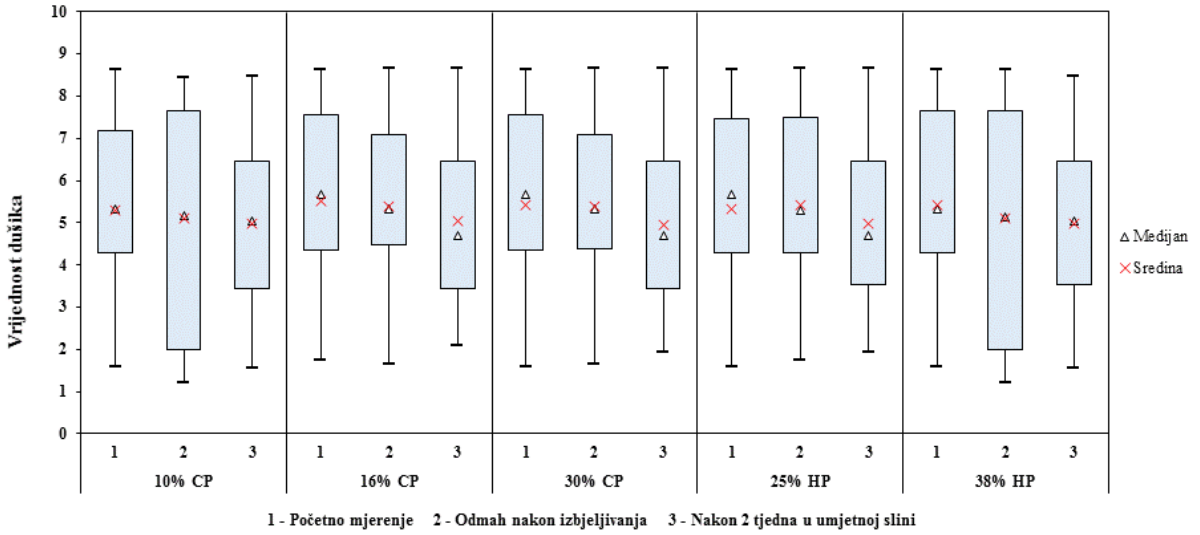
Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Odabir vrste gela za izbjeljivanje nije se pokazao značajnim faktorom promjene vrijednosti magnezija (Kruskal-Wallis test, NS).

S druge strane, dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a značajno je smanjio vrijednosti magnezija na dentinu (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$) te one nisu bile statistički značajno različite od početnih vrijednosti.

Dušik

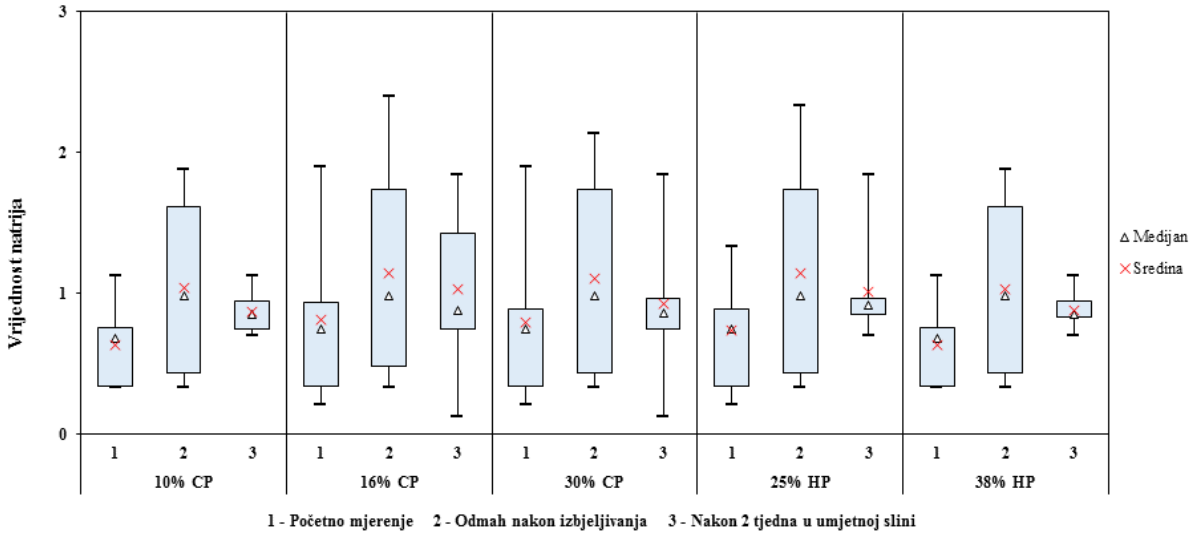
Distribucija vrijednosti dušika zabilježena nakon izbjeljivanja nije ukazala na zamjetnije razlike u odnosu na početna mjerenja (Slika 82). Medijan početnih mjerenja iznosio je 5,64, a nakon izbjeljivanja 5,29. Nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a, medijan izmjerenih vrijednosti dušika iznosio je 4,83. Izbjeljivanje i dvotjedni tretman umjetnom slinom uz korištenje ACP-a nisu značajno utjecali na koncentraciju dušika pri korištenju 10% CP, 16% CP i 30% CP gela te 25% HP i 38% HP gela (Friedman test).



Slika 82. Box-plot dijagrami vrijednosti dušika na dentinu nakon različitih tretmana.

Natrij

Medijan početnih mjerenja vrijednosti natrija na dentinu iznosio je 0,74 (Slika 83). Nakon izbjeljivanja medijan je porastao na 0,99, dok je nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a iznosio 0,87.



Slika 83. Box-plot dijagrami vrijednosti natrija na dentinu nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti natrija među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, $p<0,001$). Usporedba početnih i vrijednosti zabilježenih odmah

nakon izbjeljivanja ukazala je na značajan porast vrijednosti natrija, kod svih vrsta gelova za izbjeljivanje (Tablica 39).

Tablica 39. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti natrija na dentinu.

Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Natrij	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,68	0,99	0,039
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,75	0,99	0,039
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,75	0,99	0,043
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,75	0,99	0,031
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	0,68	0,99	0,039

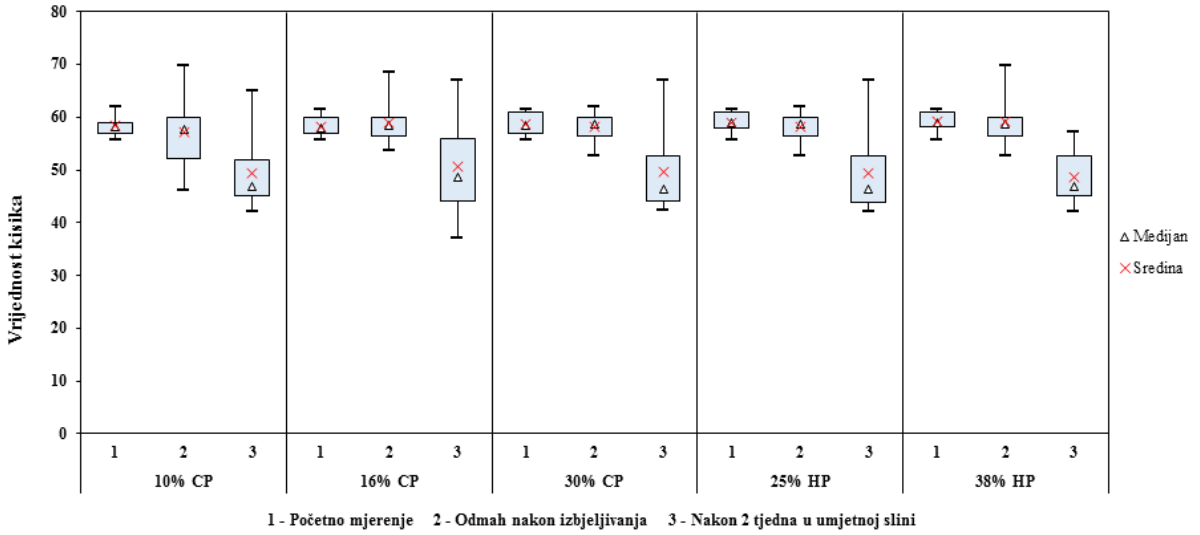
Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Odabir vrste gela za izbjeljivanje nije se pokazao značajnim faktorom promjene vrijednosti natrija na dentinu (Kruskal-Wallis test, NS).

Dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a nije značajno utjecao na koncentraciju natrija na dentinu koja je ostala na približno istoj razini kao i odmah nakon izbjeljivanja (Wilcoxon Signed Rank test, NS).

Kisik

Distribucija vrijednosti kisika zabilježena nakon izbjeljivanja nije ukazala na zamjetnije razlike u odnosu na početna mjerenja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Slika 84). Medijan početnih mjerenja iznosio je 58,89, a ostao je na podjednakoj razini i nakon izbjeljivanja (58,65). Dvotjedni tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a u pravilu je smanjio koncentraciju kisika na dentinu (medijan=46,77).



Slika 84. Box-plot dijagrami vrijednosti kisika na dentinu nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti kisika među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, $p<0,001$). No, usporedba početnih i vrijednosti zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja nije ukazala na značajnu promjenu vrijednosti kisika izmjerenih na dentinu, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje (Tablica 40).

Tablica 40. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti kisika na dentinu.

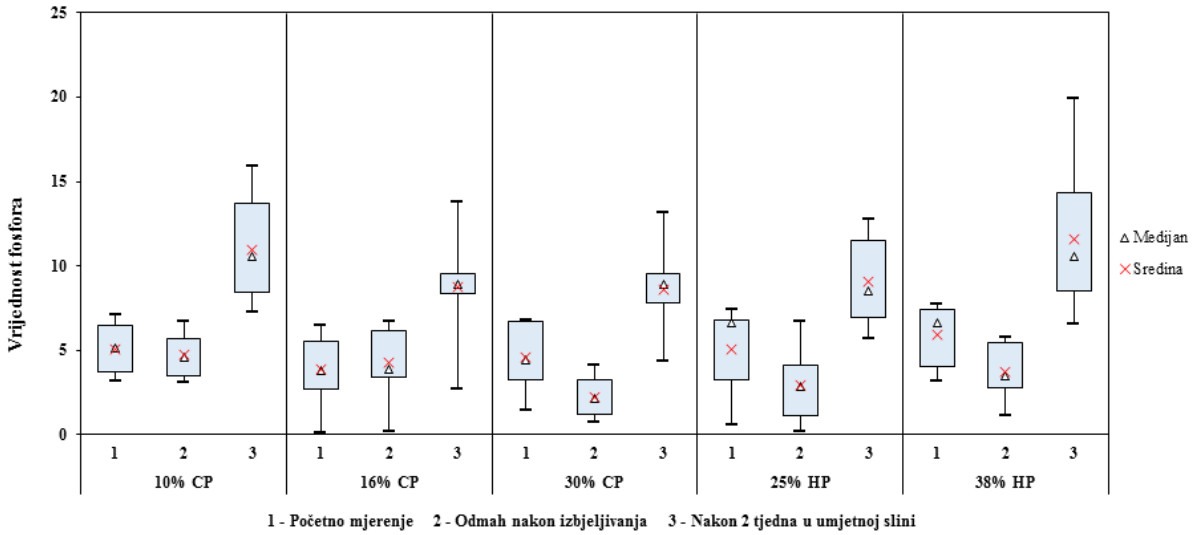
Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Kisik	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	58,11	57,77	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	57,93	58,51	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	58,43	58,77	NS
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	58,89	58,77	NS
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	58,93	58,77	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

S druge strane, nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a došlo je do statistički značajnog smanjenja vrijednosti kisika na dentinu u odnosu na mjerenja zabilježena odmah nakon izbjeljivanja (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$) i početna mjerenja (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$).

Fosfor

Distribucija vrijednosti fosfora na dentinu ukazala je na postojanost ili smanjenje koncentracije fosfora na dentinu nakon procesa izbjeljivanja (Slika 85). Dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a pozitivno je djelovao na vrijednosti fosfora koje su se zamjetno povećale.



Slika 85. Box-plot dijagrami vrijednosti fosfora na dentinu nakon različitih tretmana.

Razlika u distribuciji vrijednosti fosfora među ponovljenim mjerenjima bila je statistički značajna (Friedman test, $p<0,001$). Usporedba početnih i vrijednosti zabilježenih odmah nakon izbjeljivanja ukazala je na značajno smanjenje koncentracije fosfora na dentinu nakon izbjeljivanja 30% CP gelom te 25% HP i 38% HP gelom, dok uporaba 10% CP i 16% CP gela nije imala značajan utjecaj na koncentraciju fosfora na dentinu (Tablica 41).

Tablica 41. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti fosfora na dentinu.

Element	Gel	Usporedba mjerenja	Medijani		p-vrijednost
Fosfor	10% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	5,11	4,63	NS
	16% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	3,78	3,86	NS
	30% CP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	4,47	2,16	0,002
	25% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	6,61	2,87	0,002
	38% HP	Početno vs. nakon izbjeljivanja	6,62	3,46	0,002

Napomena: Rezultati Wilcoxon Signed Rank testa; NS – nije značajno.

Odabir vrste gela za izbjeljivanje pokazao se značajnim faktorom promjene vrijednosti fosfora (Kruskal-Wallis test, p<0,001). Izbjeljivanje 10% CP i 16% CP gelom uzrokovalo je značajno manji pad/promjenu vrijednosti fosfora na dentinu u usporedbi s izbjeljivanjem primjenom 30% CP gela te 25% HP i 38% HP gela (Tablica 42). Najveći pad vrijednosti fosfora ostvaren je uporabom 30% CP gela (medijan=2,78), i nije se značajno razlikovao od učinka 25% HP i 38% HP gela.

Tablica 42. Usporedba promjene vrijednosti fosfora na dentinu nakon izbjeljivanja različitim gelovima za izbjeljivanje.

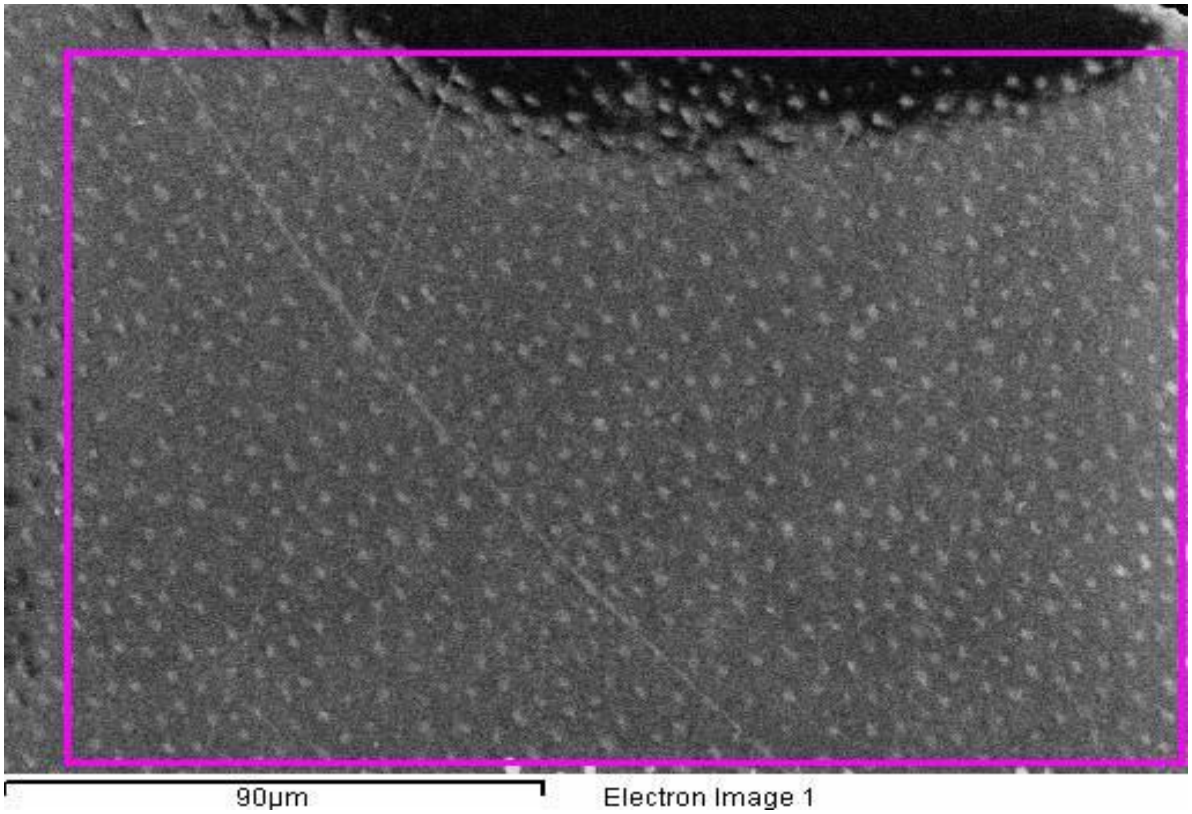
Element	Varijabla	Usporedba gelova	Medijani promjene vrijednosti fosfora nakon izbjeljivanja		p-vrijednost
Fosfor	Početno - nakon izbjeljivanja	10% CP vs. 16% CP	0,15	-0,06	NS
		10% CP vs. 30% CP	0,15	2,78	< 0,001
		10% CP vs. 25% HP	0,15	1,98	< 0,001
		10% CP vs. 38% HP	0,15	2,07	< 0,001
		16% CP vs. 30% CP	-0,06	2,78	< 0,001
		16% CP vs. 25% HP	-0,06	1,98	< 0,001
		16% CP vs. 38% HP	-0,06	2,07	< 0,001
		30% CP vs. 25% HP	2,78	1,98	NS
		30% CP vs. 38% HP	2,78	2,07	NS
		25% HP vs. 38% HP	1,98	2,07	NS

Napomena: Rezultati Wilcoxon Rank Sum testa; NS – nije značajno.

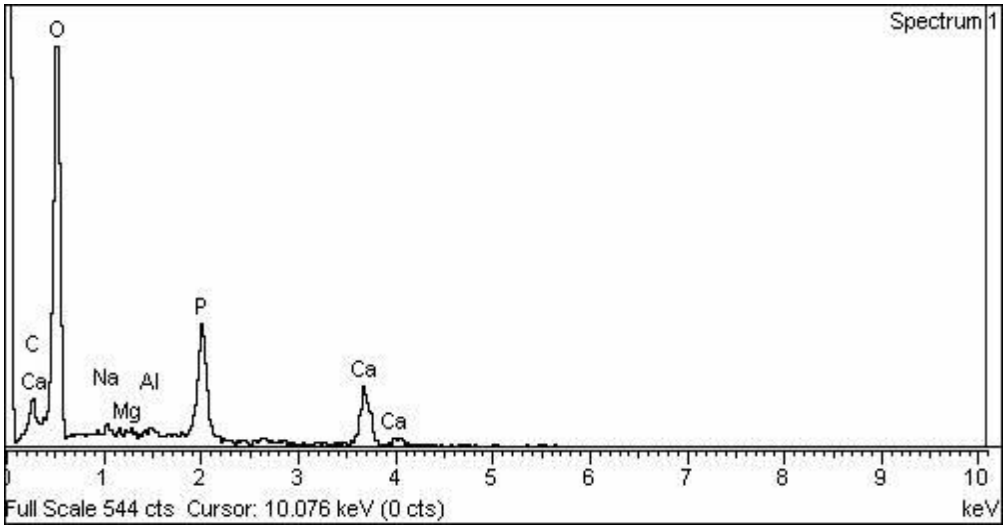
Dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a imao je pozitivan učinak na koncentraciju fosfora na dentinu, čije su se vrijednosti značajno povećale (Wilcoxon Signed Rank test, p<0,001). Medijan vrijednosti fosfora nakon izbjeljivanja i dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a iznosio je 9,32. Nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini vrijednosti fosfora na dentinu bile su značajno više i od početnih vrijednosti (Wilcoxon Signed Rank test, p<0,001).



Slika 86. EDS analiza površine cakline.



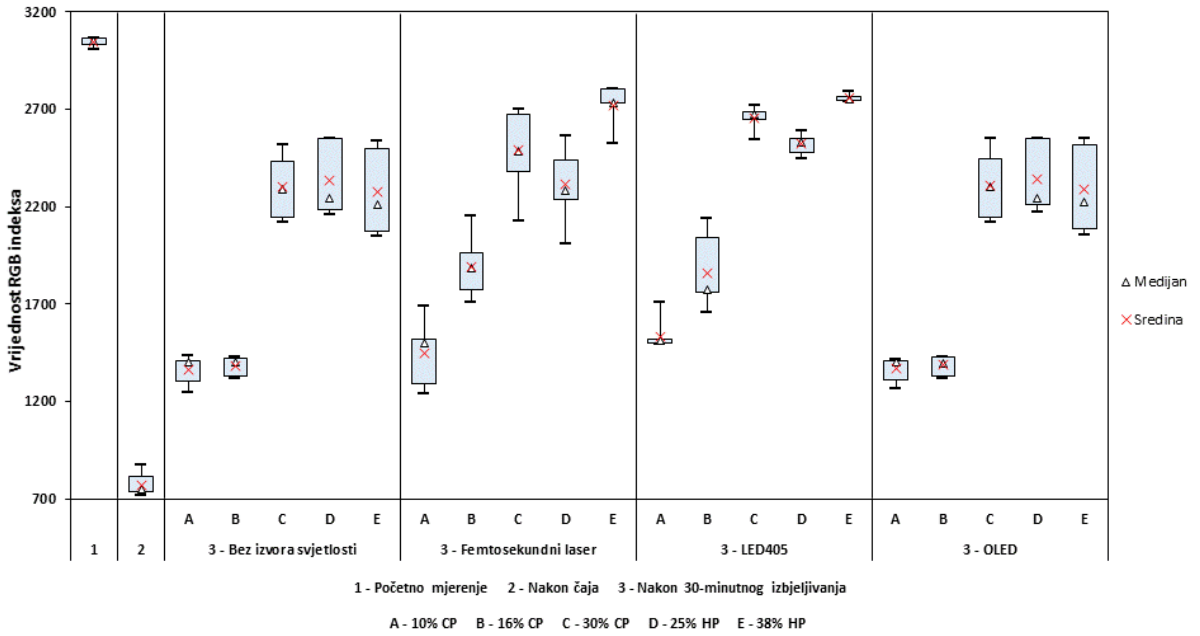
Slika 87. EDS analiza površine dentina.



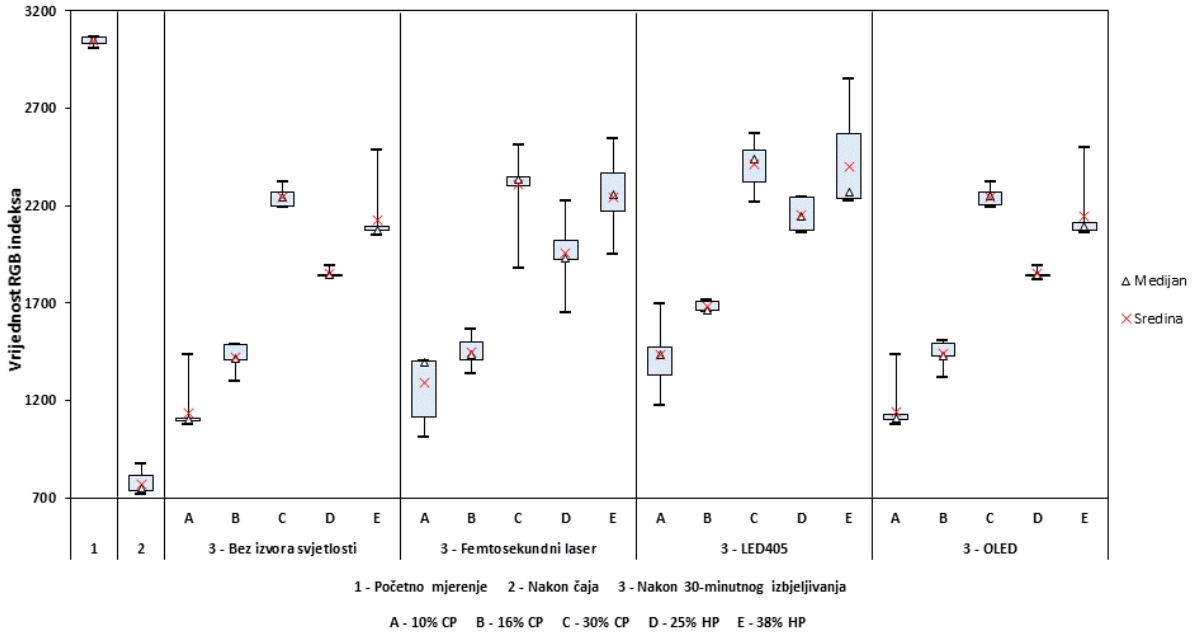
Slika 88. EDS analiza površine cakline, dentina.

4.5. PROMJENA BOJE

Distribucija vrijednosti RGB indeksa nakon različitih tretmana ukazala je na znatno smanjenje vrijednosti indeksa nakon bojanja odnosno tretmana čajem te tendenciju rasta RGB indeksa nakon procesa izbjeljivanja (Slika 89). Do porasta vrijednosti indeksa došlo je već nakon 15-minutnog procesa izbjeljivanja (Slika 90).



Slika 89. Box-plot dijagrami vrijednosti RGB indeksa nakon različitih tretmana u 30-minutnom procesu izbjeljivanja.



Slika 90. Box-plot dijagrami vrijednosti RGB indeksa nakon različitih tretmana u 15-minutnom procesu izbjeljivanja.

Zabilježena je niska varijabilnost mjerenja, a niti kod jednog tretmana koeficijent varijabilnosti nije prelazio 30%, upućujući na zadovoljavajuću reprezentativnost aritmetičke sredine (Tablica 43). Prosječna vrijednost RGB indeksa prije bojanja pastila iznosila je 3046,0±18,4 (95% CI: 3043,4 - 3048,6). Bojanjem u čaju vrijednost je značajno pala (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$), u prosjeku na 772,8±47,1 (95% CI: 766,2 - 779,4). Nakon procesa 30-minutnog izbjeljivanja vrijednost RGB indeksa je porasla prilikom uporabe svih testiranih izvora svjetlosti i gelova za izbjeljivanje.

Tablica 43. Dekriptivna analiza vrijednosti RGB indeksa nakon različitih tretmana u 30-minutnom procesu izbjeljivanja.

Mjerenje	Izvor svjetlosti	Gel	N	Sredina	SD	CV	95% CI	
Početno	-	-	200	3046,0	18,4	0,6	3043,4	3048,6
Nakon čaja	-	-	200	772,8	47,1	6,1	766,2	779,4
Nakon izbjeljivanja	Bez svjetla	10% CP	10	1365,1	64,5	4,7	1318,9	1411,3
		16% CP	10	1385,8	44,3	3,2	1354,1	1417,5
		30% CP	10	2300,3	163,9	7,1	2183,0	2417,6
		25% HP	10	2332,2	173,0	7,4	2208,5	2455,9
		38% HP	10	2273,6	217,1	9,5	2118,3	2428,9
	Femtosekundni laser	10% CP	10	1447,2	153,6	10,6	1337,3	1557,1
		16% CP	10	1892,6	142,3	7,5	1790,8	1994,4
		30% CP	10	2490,6	187,3	7,5	2356,6	2624,6
		25% HP	10	2315,3	163,8	7,1	2198,1	2432,5
		38% HP	10	2720,4	105,4	3,9	2645,0	2795,8
	LED405	10% CP	10	1530,3	65,8	4,3	1483,3	1577,4
		16% CP	10	1859,7	169,7	9,1	1738,3	1981,1
		30% CP	10	2657,5	55,3	2,1	2617,9	2697,1
		25% HP	10	2521,4	46,8	1,9	2487,9	2554,9
		38% HP	10	2758,9	16,5	0,6	2747,1	2770,7
	OLED	10% CP	10	1368,5	54,9	4,0	1329,2	1407,8
		16% CP	10	1387,2	47,2	3,4	1353,4	1421,0
		30% CP	10	2308,4	169,4	7,3	2187,2	2429,6
		25% HP	10	2341,8	165,2	7,1	2223,6	2460,0
		38% HP	10	2291,9	217,5	9,5	2136,3	2447,5

Napomena: SD – standardna devijacija, CV – koeficijent varijabilnosti, CI – interval pouzdanosti.

Bez obzira na korišteni izvor svjetlosti gel za izbjeljivanje i trajanje procesa izbjeljivanja, zabilježena je statistički značajna razlika u vrijednostima RGB indeksa prije bojanja, nakon bojanja i nakon procesa izbjeljivanja (Friedmanov test, $p<0,001$ kod svakog tretmana izbjeljivanja). Nakon procesa izbjeljivanja, kod svakog korištenog izvora svjetlosti i gela za izbjeljivanje, vrijednosti RGB indeksa bile su značajno više od vrijednosti zabilježenih nakon bojanja u čaju (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$ kod svakog tretmana izbjeljivanja), ali statistički značajno niže od početnih vrijednosti, zabilježenih kod neobojanih pastila (Wilcoxon Signed Rank test, $p<0,001$ kod svakog tretmana izbjeljivanja).

Analiza učinka gela za izbjeljivanje

Vrsta gela za izbjeljivanje pokazala se značajnim faktorom promjene RGB indeksa bez obzira na vrstu/korištenje izvora svjetlosti pri izbjeljivanju (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$). Nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja prethodno obojenih pastila bez korištenja izvora svjetlosti, kao i uz korištenje OLED lampe, primjenom 10% CP i 16% CP gela ostvaren je statistički značajno manji porast RGB indeksa u odnosu na 30% CP gel te 25% HP i 38% HP gel (Tablica 44.). Razlike u promjeni RGB indeksa kod međusobne usporedbe 10% CP i 16% CP gela te 30% CP gela, 25% HP i 38% HP gela nisu bile statistički značajne. Korištenjem femtosekundnog lasera i LED405 izvora svjetlosti, otkrivena je značajna razlika u distribuciji vrijednosti RGB indeksa između svih testiranih gelova za izbjeljivanje. Najmanji porast u odnosu na vrijednosti RGB indeksa obojanih pastila zabilježen je prilikom primjene 10% CP gela, a slijedi primjena 16% CP gela, 25% HP gela, 30% CP gela i 38% HP gela, kojim je ostvaren najveći porast RGB indeksa, za više od 1,200 jedinica veći nego prilikom primjene 10% CP gela.

Tablica 44. Usporedba porasta vrijednosti RGB indeksa obojenih pastila nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja različitim gelovima za izbjeljivanje.

Usporedba gelova	Izvor svjetlosti							
	Bez svjetlosti		Femtosekundni laser		LED405		OLED	
	Diff.*	p-vrijednost	Diff.*	p-vrijednost	Diff.*	p-vrijednost	Diff.*	p-vrijednost
10% CP vs. 16% CP	-20,7	NS	-445,4	< 0,001	-329,4	< 0,001	-18,7	NS
10% CP vs. 30% CP	-935,2	< 0,001	-1043,4	< 0,001	-1127,2	< 0,001	-939,9	< 0,001
10% CP vs. 25% HP	-967,1	< 0,001	-868,1	< 0,001	-991,1	< 0,001	-973,3	< 0,001
10% CP vs. 38% HP	-908,5	< 0,001	-1273,2	< 0,001	-1228,6	< 0,001	-923,4	< 0,001
16% CP vs. 30% CP	-914,5	< 0,001	-598,0	< 0,001	-797,8	< 0,001	-921,2	< 0,001
16% CP vs. 25% HP	-946,4	< 0,001	-422,7	< 0,001	-661,7	< 0,001	-954,6	< 0,001
16% CP vs. 38% HP	-887,8	< 0,001	-827,8	< 0,001	-899,2	< 0,001	-904,7	< 0,001
30% CP vs. 25% HP	-31,9	NS	175,3	0,043	136,1	< 0,001	-33,4	NS
30% CP vs. 38% HP	26,7	NS	-229,8	0,007	-101,4	0,006	16,5	NS
25% HP vs. 38% HP	58,6	NS	-405,1	< 0,001	-237,5	< 0,001	49,9	NS

* Razlika u prosječnom porastu RGB indeksa prethodno obojenih pastila nakon izbjeljivanja različitim gelovima.
Napomena: Rezultati Wilcoxon Rank Sum testa.

Analiza učinka izvora svjetlosti

Vrsta korištenog izvora svjetlosti pri izbjeljivanju pokazala se značajnim faktorom promjene RGB indeksa. Porast RGB indeksa obojanih pastila značajno se razlikovao među izvorima svjetlosti prilikom primjene svih gelova za izbjeljivanje: 10% CP gela (Kruskal-Wallis test, $p=0,003$), 16% CP gela (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$), 30% CP gela (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$) 25% HP gela (Kruskal-Wallis test, $p=0,021$) te 38% HP gela (Kruskal-Wallis test, $p<0,001$).

Nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja prethodno obojenih pastila bez izvora svjetlosti i korištenjem OLED lampe ostvaren je statistički značajno manji porast RGB indeksa u odnosu na LED405 lampu, i to prilikom korištenja svih gelova: 10% CP gela ($p<0,001$), 16% CP gela ($p<0,001$), 30% CP gela ($p<0,001$) 25% HP gela ($p=0,019$) te 38% HP gela ($p<0,001$) (Tablica 45). Primjenom 16% CP gela i 38% HP gela došlo je do značajno većeg porasta RGB indeksa i kod izbjeljivanja femtosekundnim laserom u odnosu na izbjeljivanje bez izvora svjetlosti ($p<0,001$) i OLED lampom ($p<0,001$). Razlika u porastu RGB indeksa između femtosekundnog lasera i LED405 lampe bila je statistički značajna samo kod primjene 25% HP gela ($p=0,003$), pri čemu je veći porast ostvaren uporabom LED405 lampe. Usporedba izbjeljivanja bez izvora svjetlosti i OLED lampom nije ukazala na značajne razlike u porastu RGB indeksa, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje.

Tablica 45. Usporedba porasta vrijednosti RGB indeksa obojenih pastila nakon 30-minutnog procesa izbjeljivanja različitim izvorima svjetlosti.

Usporedba izvora svjetlosti	Gel za izbjeljivanje					
	10% CP		16% CP		30% CP	
	Diff.*	p-vrijednost	Diff.*	p-vrijednost	Diff.*	p-vrijednost
Bez svjetlosti vs. Femtosekundni laser	-82,1	NS	-506,8	< 0,001	-190,3	NS
Bez svjetlosti vs. LED405	-165,2	< 0,001	-473,9	< 0,001	-357,2	< 0,001
Bez svjetlosti vs. OLED	-3,4	NS	-1,4	NS	-8,1	NS
Femtosekundni laser vs. LED405	-83,1	NS	32,9	NS	-166,9	NS
Femtosekundni laser vs. OLED	78,7	NS	505,4	< 0,001	182,2	NS
LED405 vs. OLED	161,8	< 0,001	472,5	< 0,001	349,1	< 0,001

Usporedba izvora svjetlosti	Gel za izbjeljivanje			
	25% HP		38% HP	
	Diff.*	p-vrijednost	Diff.*	p-vrijednost
Bez svjetlosti vs. Femtosekundni laser	16,9	NS	-446,8	< 0,001
Bez svjetlosti vs. LED405	-189,2	0,019	-485,3	< 0,001
Bez svjetlosti vs. OLED	-9,6	NS	-18,3	NS
Femtosekundni laser vs. LED405	-206,1	0,003	-38,5	NS
Femtosekundni laser vs. OLED	-26,5	NS	428,5	< 0,001
LED405 vs. OLED	179,6	0,019	467	< 0,001

* Razlika u prosječnom porastu RGB indeksa prethodno obojenih pastila nakon izbjeljivanja različitim izvorima svjetlosti.

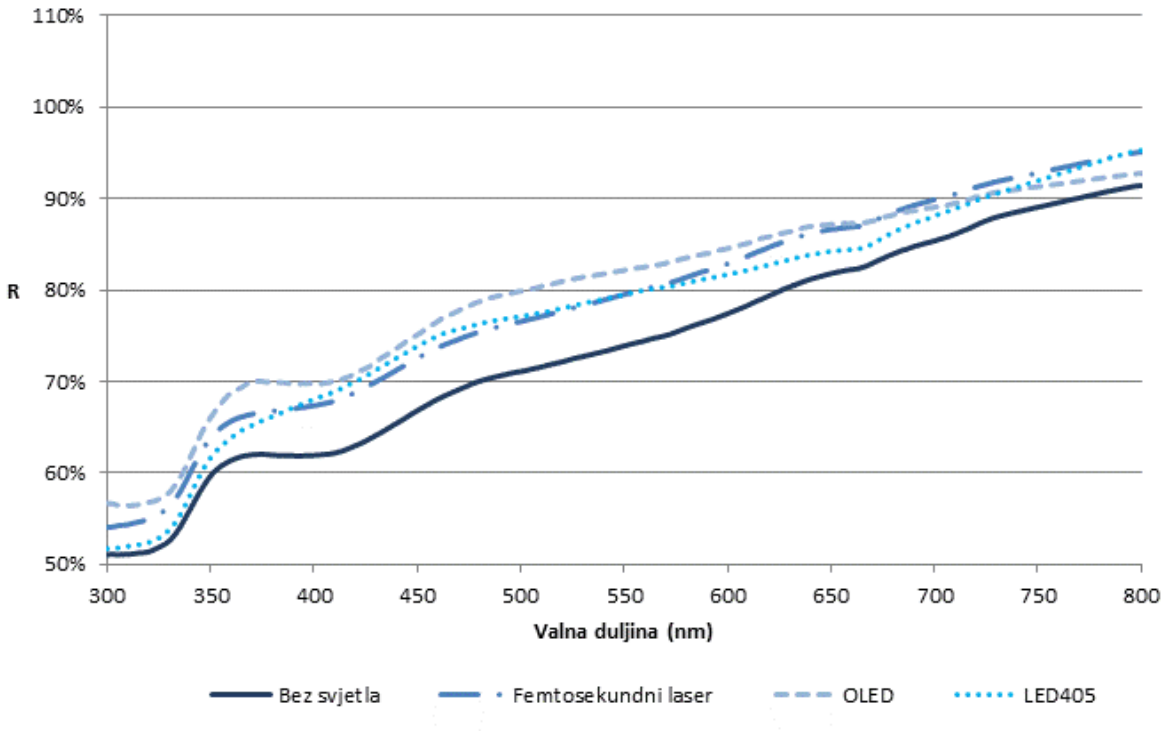
Analiza učinka duljine izbjeljivanja

Trajanje izbjeljivanja imalo je značajan učinak na promjenu vrijednosti RGB indeksa, ali samo kod određenih tretmana (Tablica 46). Tijekom 30-minutnog procesa izbjeljivanja obojenih pastila bez izvora svjetlosti, kao i uz korištenje OLED lampe, ostvaren je značajan porast RGB indeksa u odnosu na 15-minutno izbjeljivanje samo kod primjene 10% CP gela ($p<0,001$) i 25% HP gela ($p<0,001$). Primjenom 16% CP i 30% CP gela te 38% HP gela porast RGB indeksa nakon 15 minuta izbjeljivanja nije se značajno razlikovao od vrijednosti indeksa nakon 30-minutnog izbjeljivanja. Porast RGB indeksa kod izbjeljivanja femtosekundnim laserom i LED405 lampom bio je značajno veći nakon 30-minutnog izbjeljivanja u odnosu na izbjeljivanje u trajanju od 15 minuta kod svih gelova za izbjeljivanje, osim 10% CP gela.

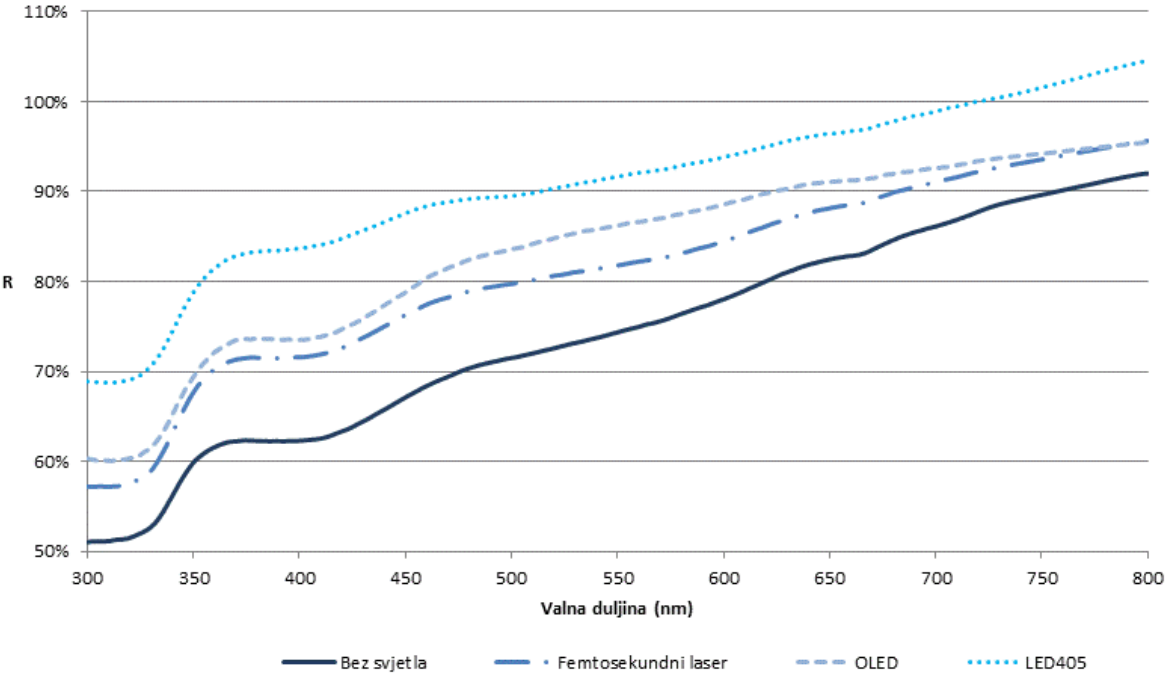
Tablica 46. Učinak duljine izbjeljivanja na porast vrijednosti RGB indeksa obojenih pastila.

Gel za izbjeljivanje	Trajanje izbjeljivanja (min)	Izvor svjetlosti							
		Bez svjetla		Femtosekundni laser		LED405		OLED	
		Diff.*	p-vrijednost	Diff.*	p-vrijednost	Diff.*	p-vrijednost	Diff.*	p-vrijednost
10% CP	30 vs. 15	230,8	< 0,001	152,9	NS	97,3	NS	223,7	< 0,001
16% CP	30 vs. 15	-39,2	NS	442,7	< 0,001	178,3	0,006	-53,1	NS
30% CP	30 vs. 15	57,6	NS	179,9	0,025	243,9	< 0,001	63,2	NS
25% HP	30 vs. 15	477,8	< 0,001	361,1	< 0,001	367,3	< 0,001	491,2	< 0,001
38% HP	30 vs. 15	149	NS	478,1	< 0,001	358,4	0,004	143,6	NS

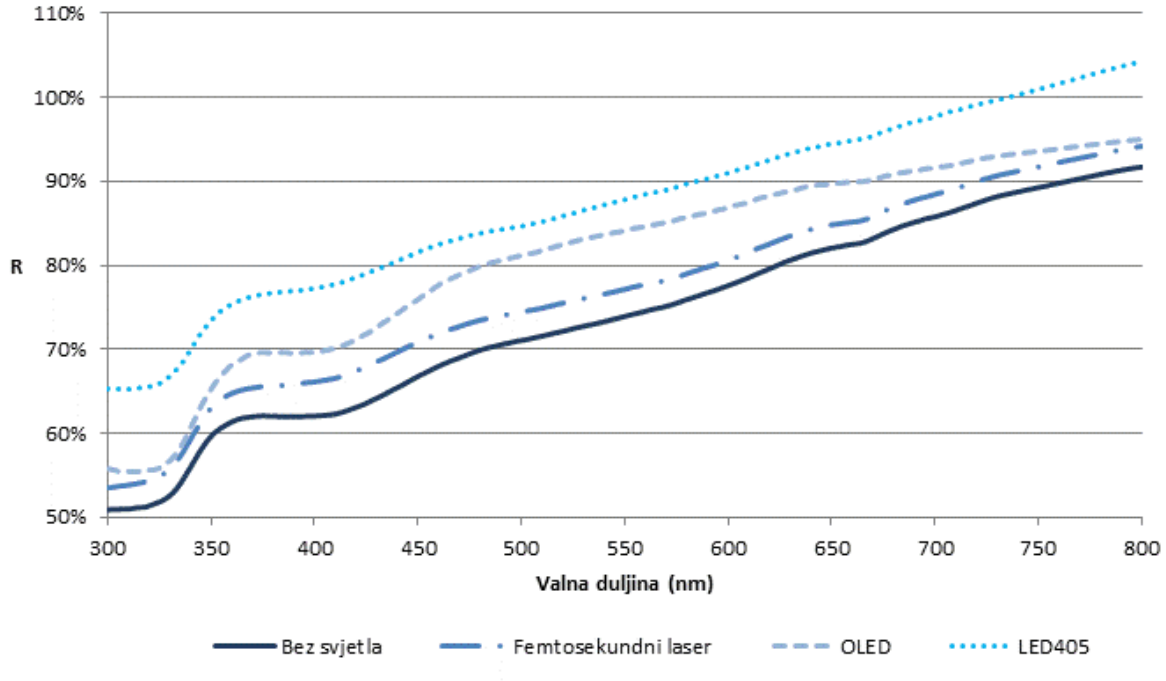
* Razlika u prosječnom porastu RGB indeksa prethodno obojenih pastila između 30-minutnog i 15-minutnog procesa izbjeljivanja.



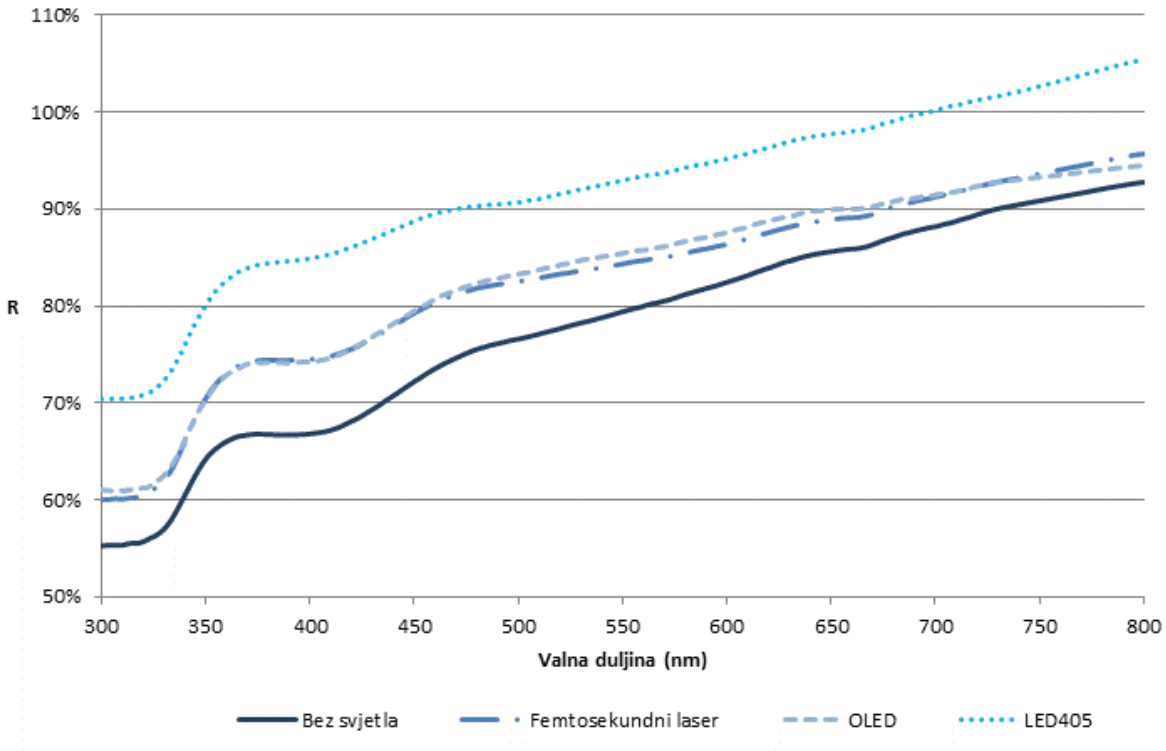
Slika 90. Spektrofotometrijska analiza promjene boje za 10% CP kroz 15 minuta.



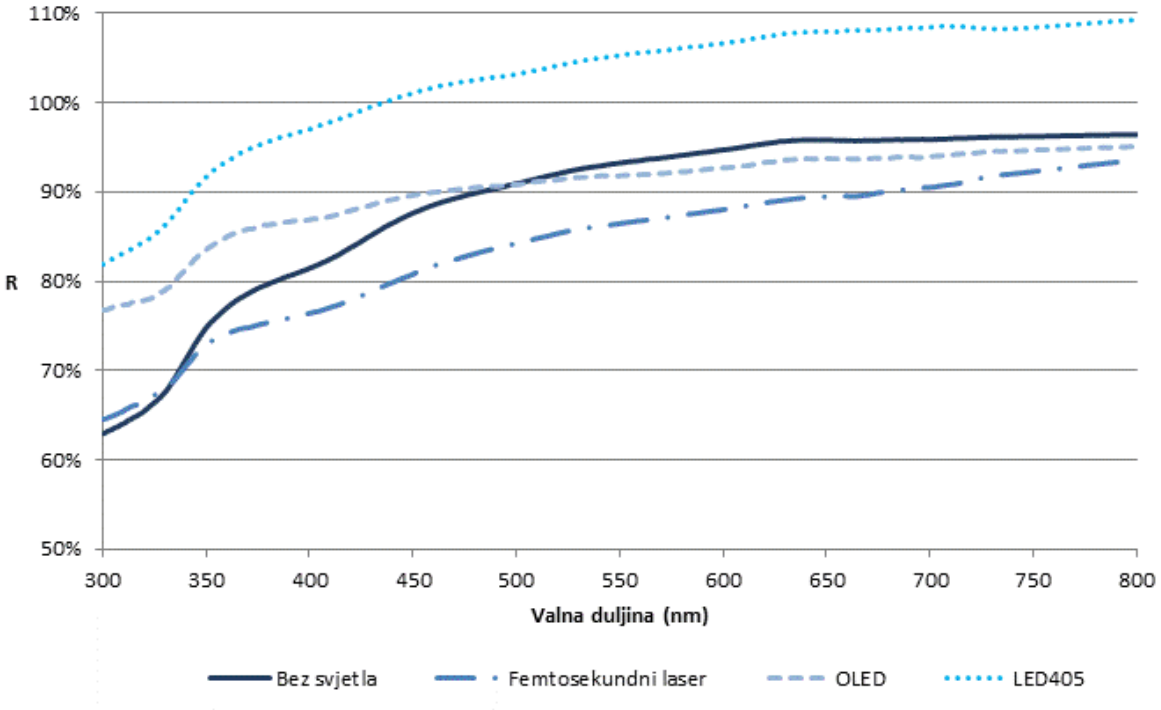
Slika 91. Spektrofotometrijska analiza promjene boje za 10% CP kroz 30 minuta.



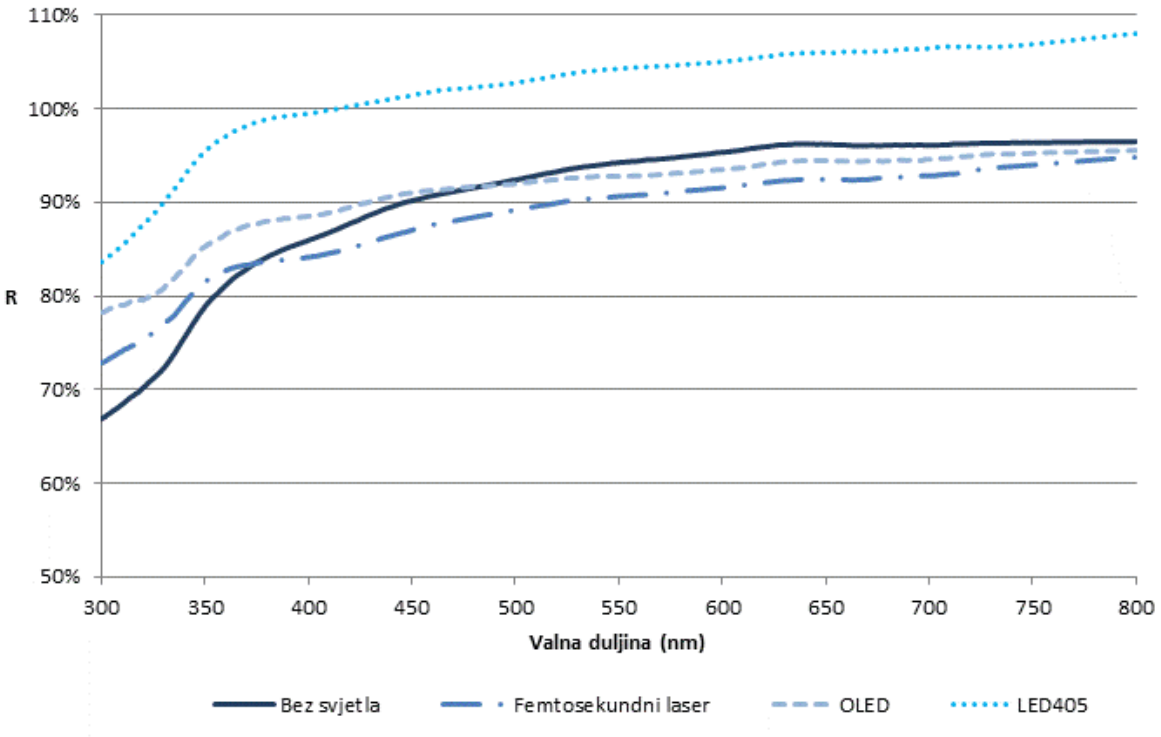
Slika 92. Spektrofotometrijska analiza promjene boje za 16% CP kroz 15 minuta.



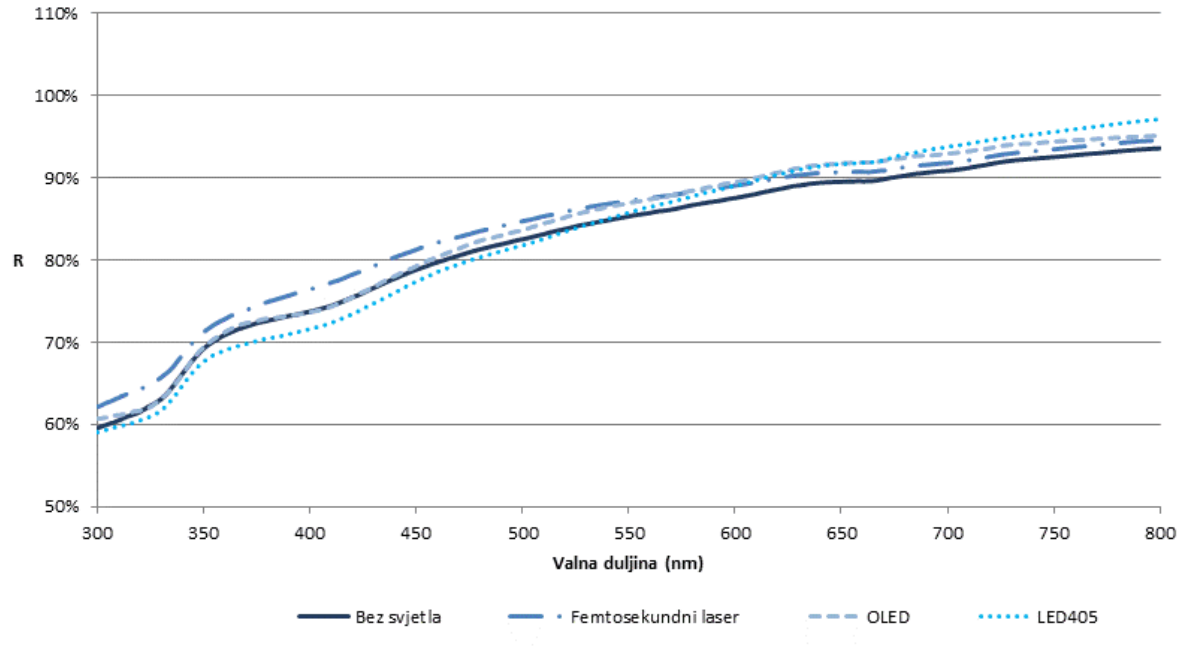
Slika 93. Spektrofotometrijska analiza promjene boje za 16% CP kroz 30 minuta.



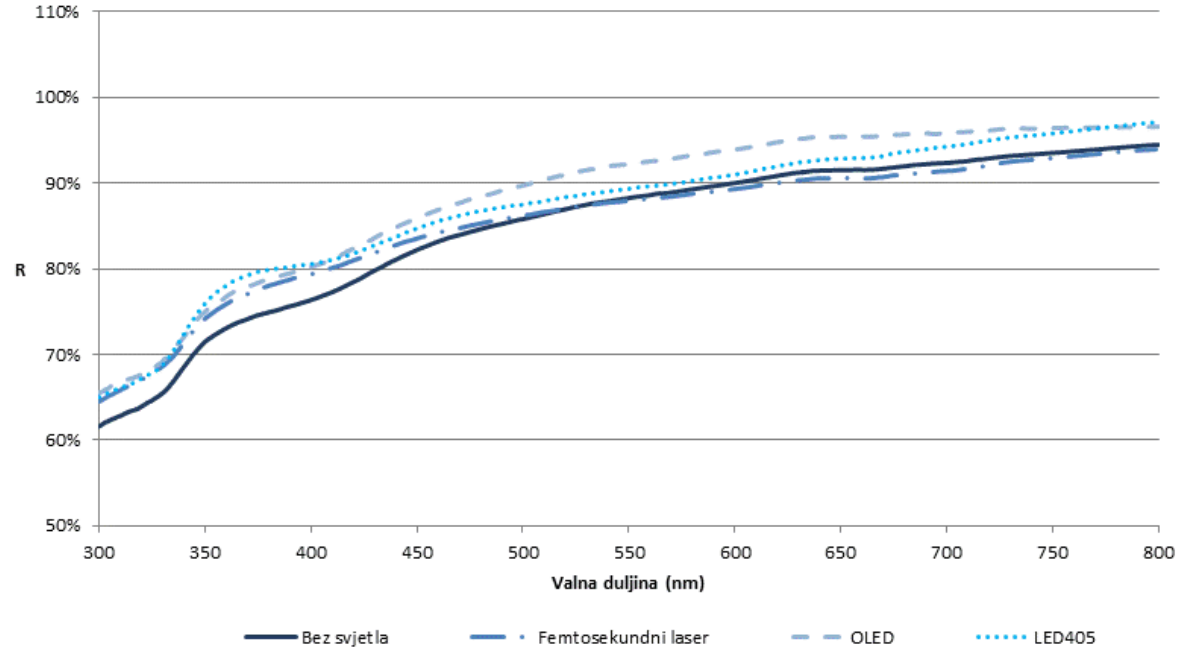
Slika 94. Spektrofotometrijska analiza promjene boje za 30% CP kroz 15 minuta.



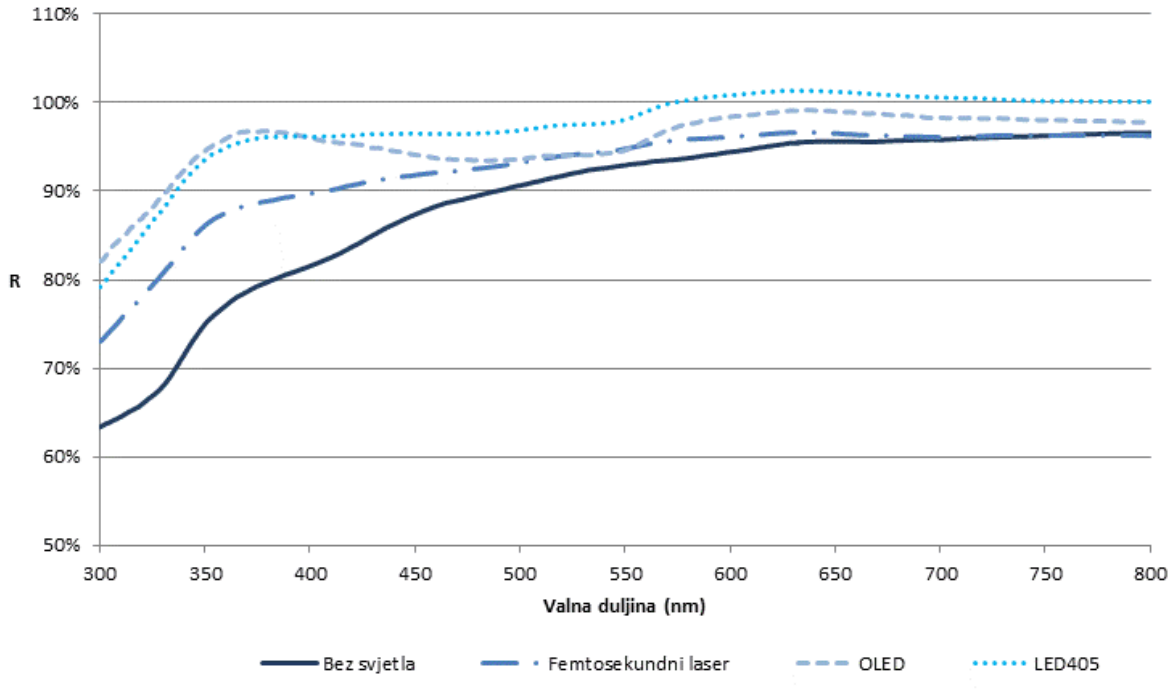
Slika 95. Spektrofotometrijska analiza promjene boje za 30% CP kroz 30 minuta.



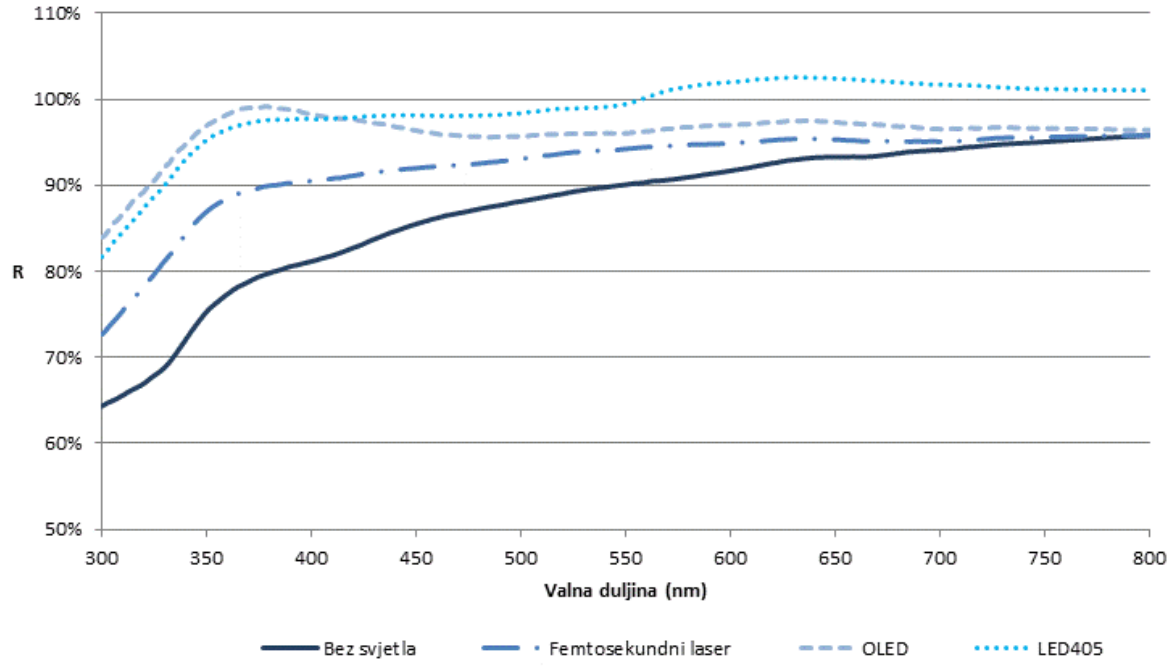
Slika 96. Spektrofotometrijska analiza promjene boje za 25% HP kroz 15 minuta.



Slika 97. Spektrofotometrijska analiza promjene boje za 25% HP kroz 30 minuta.



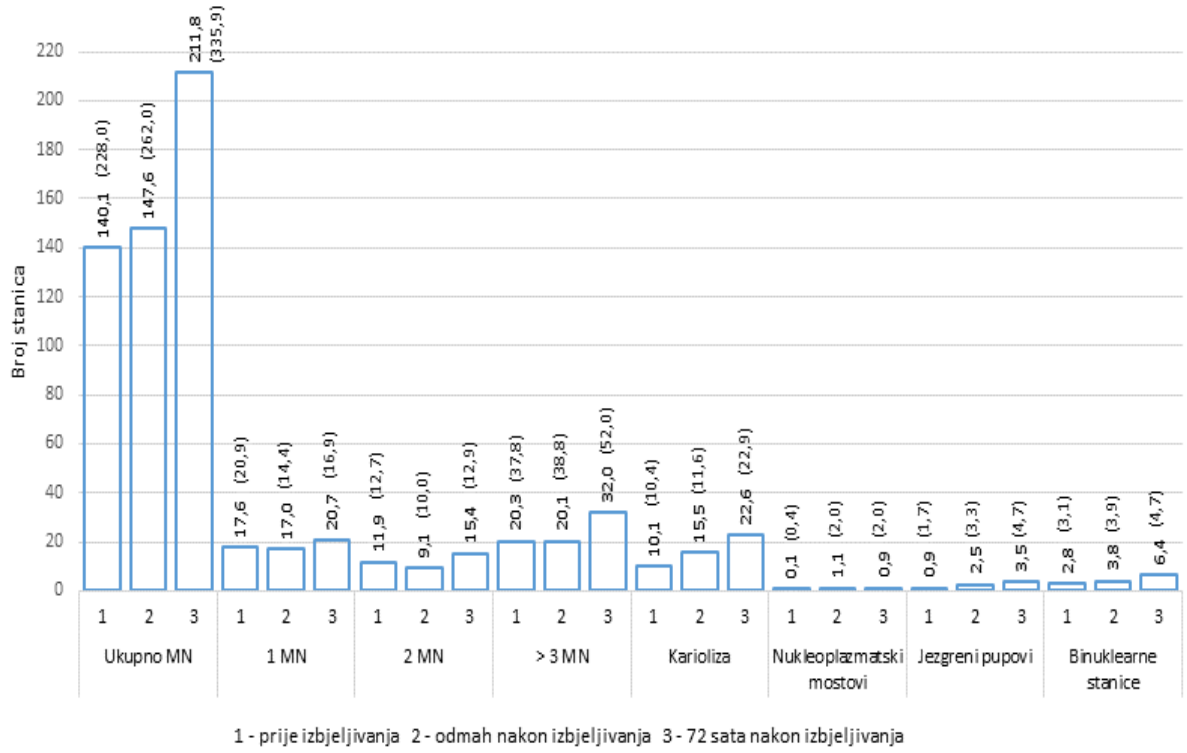
Slika 98. Spektrofotometrijska analiza promjene boje za 38% HP kroz 15 minuta.



Slika 99. Spektrofotometrijska analiza promjene boje za 38% HP kroz 30 minuta.

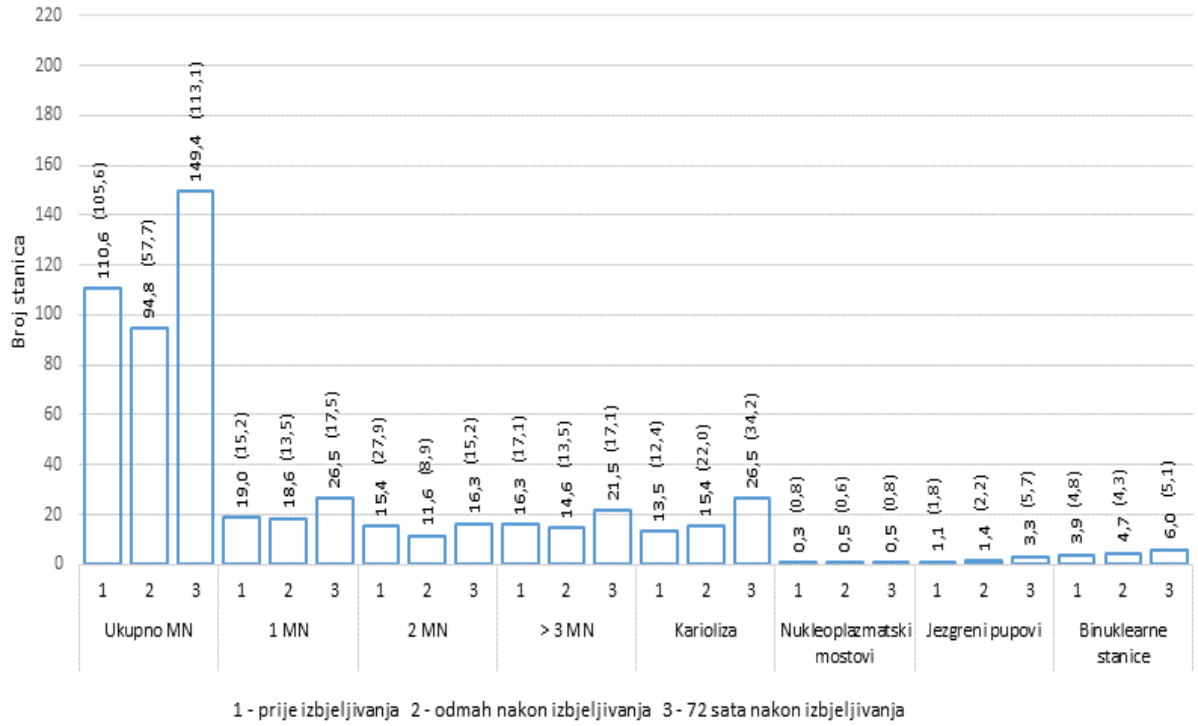
4.6. GENOTOKSIČNOST

Rezultati deskriptivne analize ukazali su na povećanje vrijednosti markera genotoksičnosti odmah nakon izbjeljivanja i/ili 72 sata nakon izbjeljivanja BOOST i ZOOM2 preparatom (Slika 100,101).



Slika 100. Prosječna promjena vrijednosti markera genotoksičnosti nakon izbjeljivanja BOOST preparatom.

Napomena: Za svako mjerenje prikazana je aritmetička sredina i standardna devijacija.



Slika 101. Prosječna promjena vrijednosti markera genotoksičnosti nakon izbjeljivanja ZOOM2 preparatom.

Napomena: Za svako mjerenje prikazana je aritmetička sredina i standardna devijacija.

Izbjeljivanje BOOST gelom imalo je statistički značajan učinak na vrijednost svih promatranih markera genotoksičnosti (Tablica 47). Prosječan broj ukupnih MN stanica, kao i stanica s 1 MN, 2 MN te 3+ MN nije se značajno promijenio odmah nakon izbjeljivanja BOOST preparatom. No 72 sata nakon izbjeljivanja ovim preparatom prosječne vrijednosti ukupnih MN stanica i stanica s 1 MN, 2 MN te 3+ MN bile su statistički značajno veće nego u mjerenjima zabilježenim odmah nakon izbjeljivanja (ukupno MN: $p<0,001$; 1 MN: $p=0,036$; 2 MN: $p<0,001$; 3+ MN: $p=0,007$) i prije izbjeljivanja (ukupno MN: $p<0,001$; 1 MN: $p=0,012$; 2 MN: $p=0,007$; 3+ MN: $p<0,001$). Iste razlike opažene su i u broju binuklearnih stanica čije su vrijednosti bile statistički značajno veće 72 sata nakon izbjeljivanja u usporedbi s vrijednostima zabilježenim odmah nakon izbjeljivanja ($p=0,002$) odnosno prije izbjeljivanja ($p<0,001$). Značajno povećanje stanica s kariolizom ($p=0,005$), nukleoplazmatskim mostovima ($p=0,008$) i jezgrenim pupovima ($p=0,007$) uslijedilo je odmah nakon izbjeljivanja BOOST preparatom, a vrijednosti ovih markera bile su statistički značajno veće od početnih mjerenja i 72 sata nakon izbjeljivanja ($p<0,001$; $p=0,043$; $p=0,003$).

Uporabom ZOOM2 preparata, značajno je povećan prosječan broj ukupnih MN stanica, stanica s 1 MN, kariolizom, jezgrenim pupovima, kao i binuklearnih stanica, ali tek 72 sata

nakon izbjeljivanja (Tablica 47.). S druge strane, izbjeljivanje ZOOM2 preparatom nije ukazalo na značajnu promjenu u broju stanica s 2 MN i 3+ MN te nukleoplazmatskim mostovima. Broj stanica s 1 MN i kariolizom bio je statistički značajno veći 72 sata nakon izbjeljivanja u odnosu na vrijednosti zabilježene odmah nakon izbjeljivanja (1 MN: $p=0,013$; karioliza: $p<0,001$) i prije izbjeljivanja (1 MN: $p=0,007$; karioliza: $p=0,018$). Ukupan broj MN stanica bio je značajno veći 72 sata nakon izbjeljivanja u odnosu na mjerenja zabilježena odmah nakon izbjeljivanja ($p=0,016$), dok je prosječan broj stanica s jezgrenim pupovima i binuklearnih stanica bio značajno veći 72 sata nakon izbjeljivanja u odnosu na početna mjerenja (jezgreni pupovi: $p=0,016$, binuklearne stanice: $p=0,033$).

Tablica 47. Učinak izbjeljivanja na vrijednosti markera genotoksičnosti.

Varijabla	Gel za izbjeljivanje			
	BOOST		ZOOM2	
	p-vrijednost[a]	Diff.[b]	p-vrijednost[a]	Diff.[b]
Ukupan broj MN stanica	< 0,001	(3) > (2) (3) > (1)	0,045	(3) > (2)
Broj stanica s 1MN	0,021	(3) > (2) (3) > (1)	0,009	(3) > (2) (3) > (1)
Broj stanica s 2MN	0,001	(3) > (2) (3) > (1)	NS	-
Broj stanica s >3MN	< 0,001	(3) > (2) (3) > (1)	NS	-
Broj stanica s kariolizom	< 0,001	(3) > (1) (2) > (1)	0,017	(3) > (2) (3) > (1)
Broj stanica s nukleoplazmatskim mostovima[c]	0,017	(3) > (1) (2) > (1)	NS	-
Broj stanica s jezgrenim pupovima[c]	0,005	(3) > (1) (2) > (1)	0,046	(3) > (1)
Broj binuklearnih stanica	< 0,001	(3) > (2) (3) > (1)	0,045	(3) > (1)

[a] Statistička značajnost razlike u broju stanica među ponovljenim mjerenjima – prije izbjeljivanja, odmah nakon izbjeljivanja i/ili 72 sata nakon izbjeljivanja.

[b] Rezultati post hoc testova između parova grupa; u stupcu su prikazana mjerenja sa značajnom razlikom u broju zabilježenih stanica: (1) – prije izbjeljivanja, (2) – odmah nakon izbjeljivanja i (3) - 72 sata nakon izbjeljivanja.

[c] Umjesto ANOVE za ponavljana mjerenja korišten Friedmanov test/Wilcoxon Signed Rank test zbog znatnog odstupanja od normalnosti.

Usporedbom povećanja broja stanica s 1 MN zabilježenim 72 sata nakon izbjeljivanja BOOST preparatom u odnosu na početna mjerenja ustanovljena je statistički značajna razlika između mjerenja na gingivi i usnici (p=0,049). Medijan povećanja vrijednosti markera 72 sata nakon izbjeljivanja bio je 8,0 na usnici i 1,0 na gingivi. Na usnici je također zamijećen značajno veći porast stanica s 2 MN odmah nakon izbjeljivanja BOOST preparatom u usporedbi s mjerenjima na gingivi (p=0,022). Medijan povećanja vrijednosti stanica s 2 MN odmah nakon izbjeljivanja bio je 2,0 na usnici i -3,0 na gingivi. Izbjeljivanje ZOOM2 preparatom ukazalo je na statistički značajno različitu promjenu u broju stanica s kariolizom između usnice i gingive. Promjena broja takvih stanica od početnog mjerenja do 72 sata nakon izbjeljivanja ZOOM2 preparatom bila je statistički značajno veća (p=0,030) na gingivi

(medijan=8,5) nego usnici (medijan=1,0), kao i promjena od završetka izbjeljivanja do 72 sata nakon izbjeljivanja (p=0,015).

5. RASPRAVA

5.1. PORAST TEMPERATURE ZA VRIJEME IZBJELJIVANJA

Za vrijeme izbjeljivanja potpomognutog djelovanjem izvora svjetlosti, postoji velika zabrinutost oko porasta temperature inducirane od izvora svjetlosti, koji može uzrokovati iritaciju ili upalu pulpe pa i teža oštećenja kao što je npr. nekroza. Za ubrzanje postupka izbjeljivanja ili za povećanje učinkovitosti samog procesa mogu se koristiti brojni izvori svjetlosti kao što su kvarc-tungsten-halogene lampe (QTH), plazma izvori svjetlosti, LED diode ili različite vrste lasera. Kada se sredstvo za izbjeljivanje aktivira pod utjecajem svjetla, jedan dio energije se apsorbira i pretvara u toplinu što se može promatrati kao potencijalna štetna neželjena pojava. Također, izvor svjetlosti može rezultirati fototermalnim učinkom koji onda može potaknuti i ubrzati samu kemijsku reakciju sredstva za izbjeljivanje. Neki autori stoga smaraju da je to glavni i odgovorni mehanizam ovakvog, svjetlosno aktivirajućeg, načina izbjeljivanja zubi (164). Zach i Cohen (200) su zaključili da porast temperature u pulpnoj komori od 5.5 °C može uzrokovati ireverzibilna oštećenja pulpe u 15 % zubi, dok temperaturni porast od 11.2 °C uzrokuje nekrozu u 60% zubi. Porast temperature uzrokuje koagulaciju protoplazme, širenje tekućine unutar pulpe i dentinskih tubulusa i ujedno povećava protok tekućine kroz njih (201) dok su Baldissara i sur. dokazali da porast temperature u pulpnoj komori za 8.9 °C i 14.7 °C ne dovodi do patoloških promjena u pulpi kod ljudi i da je uzrok postoperativne preosjetljivosti rezultat svojevrsnih promjena u dentinu (202). Još se ne zna točan mehanizam djelovanja sredstava za izbjeljivanje i stoga neki autori smatraju da izvori svjetlosti mogu poboljšati i ubrzati postupak izbjeljivanja tako što apsorbiraju energiju svjetlosti i pretvaraju je u toplinu (203,204), a to ujedno može dovesti do porasta temperature pulpe iznad već ranije navedenih kritičnih vrijednosti koje su opasne za vitalnost same pulpe. Molekula hidrogen peroksida raspada se na reaktivne ione koji složene lance kromogenih organskih molekula cijepaju u jednostavne. Cohen je u svome istraživanju dokazao da vodikov peroksid i toplina kod vitalnog izbjeljivanja ne utječu na nastanak promjena u pulpi (205). S druge strane, neka istraživanja potvrđuju zaštitni tj. izolacijski učinak gela za izbjeljivanje pri čemu je ovaj način izbjeljivanja siguran za pulpu (206). Mjerenje temperaturnog porasta za vrijeme svjetlosno aktiviranog vitalnog izbjeljivanja pokazalo je da diodni laseri uzrokuju najviši stupanj zagrijavanja u usporedbi s halogenom lampom visokog intenziteta, konvencionalnom halogenom lampom i LED lampom (207) tj. svjetlosno i toplinom aktivirano sredstvo za izbjeljivanje uzrokuje porast temperature u pulpnoj komori (208). Adrian je dokazao lokaliziranu upalnu reakciju u pulpi na mjestu gdje je Nd:YAG laser došao u kontakt s dentinom. Ostatak pulpe nije bio promijenjen (209).

Stelzel i sur. su dokazali slično prilikom korištenja lasera u dubinskim djelovima dentina (210). Seale i sur. su dokazali postojanje reverzibilnih histoloških promjena nakon 60 dana na zubima pasa zbog djelovanja vodikovog peroksida samog i pod utjecajem svjetlosti. Oni su dokazali postojanje histološki vidljivih promjena odontoblastičnog sloja, gustog upalnog infiltrata u području ispod djelovanja vodikovog peroksida (211). Robertson i Melfi su dokazali da su te promjene u pulpi reverzibilnog karaktera (212) dok su Eldeniz i sur. zaključili da je najveći temperaturni porast zabilježen nakon uporabe diodnog lasera kroz 10 sekundi. Temperaturni porast bio je najmanji za vrijeme aktivacije sredstva za izbjeljivanje LED izvorom svjetlosti, što je dokazano i u ovoj studiji u odnosu na konvencionalnu i halogenu lampu visokog intenziteta (164,213,214). Prema Carrascu i sur. halogena lampa pokazala je najviši stupanj zagrijavanja, dok su LED izvor svjetlosti i LED laseri pokazali najmanji stupanj zagrijavanja. LED izvori svjetlosti u usporedbi sa QTH lampama uzrokuju znatno manji stupanj zagrijavanja (214). Sulieman i sur. su dokazali da diodni laser uzrokuje najveći temperaturni porast i time najveće oštećenje pulpe. Izvor svjetlosti poput plazma luka i ksenon halogena lampa pokazuju mali porast temperature na površini cakline 0.4–2.7°C pri čemu gel za izbjeljivanje služi kao izolator i također pridonosi smanjenju temperaturnog porasta na površini cakline i u pulpnoj komori (203).

Snaga izvora svjetlosti značajno utječe na porast temperature u pulpnoj komori. Torres i sur. su dokazali da infracrveni diodni laseri niske snage (100–500 mW) ne uzrokuju porast temperature do kritične vrijednosti od 5.5°C kao što to uzrokuju halogene lampe. (215). Ovim istraživanjem je dokazano da izvori svjetlosti s niskom snagom djelovanja kao što su LED405 (400 mW/cm^2) i OLED (200 mW/cm^2) ne uzrokuju porast temperature iznad kritične vrijednosti do 5.5°C, u odnosu na snažne izvore svjetlosti kao što je ZOOM2 (2000 mW/cm^2) i femtosekundni laser (800 mW/cm^2). Tretman ZOOM2 lampom dovodi do porasta temperature iznad spomenutog praga, bez obzira na istovremeno korištenje gela za izbjeljivanje ili vazelina na površini zuba. Fokusirani femtosekundni laser također dovodi do porasta temperature iznad 5.5 °C, ali je unutar vrijednosti koje spominju Baldissara i sur. Radna hipoteza (1) da izbjeljivanje pod utjecajem novih izvora svjetlosti ne dovodi do porasta temperature unutar pulpne komore i na površini zuba je prihvaćena.

U istraživanju Luk i sur. (216) korištenje infracrvenog lasera, $C0_2$ lasera, halogene lampe i argon lasera u kombinaciji s 35% HP gelom i 10% CP dovodi do značajnog porasta temperature na površini i u pulpnoj komori. IR laser i $C0_2$ laser uzrokuju najveći temperaturni porast. Prema Baik i sur. (207) PAC i QTH izvori svjetlosti koji su se koristili za izbjeljivanje

doveli su do većeg porasta u pulpnoj komori nego argonski laser. Michida i sur. (217) su zaključili da je u skupini u kojoj je korišten Nd:YAG laser (4.3 °C) bio značajno veći porast temperature, nego kod korištenja halogen izvora svjetlosti (1.8 °C) i LED izvora svjetlosti (0.9 °C). Vandewalle i sur. (218) nisu zabilježili značajnu razliku u emisiji topline između LED i QTH izvora svjetlosti, dok su Asmussen i Peutzfeldt (219), Torres i sur. (215), Coelho i sur. (220) i Kabbach i sur. (221) zaključili da QTH uzrokuje veći porast u pulpnoj komoru u odnosu na LED. Nadalje, u studiji Eldeniz i sur. (172) zabilježeno je da diodni laser uzrokuje značajno viši porast temperature nego bilo koji drugi korišteni izvor svjetlosti za polimerizaciju (11.7°C), dok LED uzrokuje najmanji porast (6.0 °C). Ostale studije (215,222,223) su također pokazale da LED izvor svjetlosti oslobađa najmanje topline za vrijeme polimerizacije kompozitnog materijala. Ova istraživanja su u skladu s rezultatima dobivenim u ovome istraživanju za LED405 i OLED izvor svjetlosti.

Prema postojećoj literaturi uporaba gela za izbjeljivanje uz aktivaciju svjetlosti dovodi do višeg temperaturng porasta u pulpi. To upućuje na fototermalni učinak izvora svjetlosti kada se koristi u kombinaciji s gelom za izbjeljivanje (215,218-220). Uporaba ZOOM2 izvora svjetlosti u kombinaciji s 25% HP je dovela do značajno većeg porasta temperature, nego kada je korišten samo izvor svjetlosti (224). Nasuprot tome, gel za izbjeljivanje, kada se koristi u kombinaciji s izvorom svjetlosti, može poslužiti kao izolator. Sulieman i sur. (206) su zabilježili da je porast temperature bez korištenja gela za izbjeljivanje na površini zuba za diodni laser bio između 37 °C (1W) do 86°C (3W) bez gela za izbjeljivanje, dok je u pulpi iznosio 4 °C (1W) to 16 °C (3W). Uporaba gela za izbjeljivanje dovela je do smanjenja temperaturnog porasta promatranog na površini zuba i u pulpnoj komori. U ovom dijelu istraživanja zabilježene su značajne razlike između porasta temperature na površini i u pulpnoj komori. Aplikacija svih gelova za izbjeljivanje ili vazelina dovela je do smanjenja srednje vrijednosti temperature u pulpnoj komori za ZOOM2, nefokusirani i fokusirani femtosekundni laser. Ovo nije pronađeno kod LED405 i OLED izvora svjetlosti. Kod mjerenja temperature na površini zuba LED405, fokusirani i nefokusirani femtosekundni laser doveli su do značajnog smanjenja temperature prilikom korištenja gela na površini zuba, dok takav nalaz nije zabilježen kod ZOOM2 i OLED. Kabbach i sur. su zabilježili statistički značajnu razliku između porasta temperature u pulp i na površini zuba između različitih gelova HP (221). Luk i sur. (216) su također primjetili jednu drugu nuspojavu koja se pojavljuje tijekom ovakvog načina izbjeljivanja, a to je dehidracija izbjeljenih tvrdih zubnih tkiva koji može omogućiti efekt hlađenja koji nastupa kao posljedica evaporacije. Gelovi za

izbjeljivanje na bazi vodikovog peroksida omogućuju manju transmisiju energije što rezultira smanjenjem vrijednosti topline koja ulazi u zub i dolazi do pulpe te manje postoperativne preosjetljivosti (225), što nije potvrđeno u našem istraživanju. Razlika između HP i CP gelova korištenih za izbjeljivanje nije bila značajna.

Također je bitno napomenuti da termalno oštećenje pulpe može nastupiti kao posljedica korištenja ultrazvučnih nastavaka (226) termalnog uklanjanja ortodontskih bravica (227) polimerizaciji kompozita pomoću LED i QTH izvora svjetlosti (228) i tijekom različitih načina *in-office* izbjeljivanja (215). Učinak pulpne cirkulacije također je odgovoran za uklanjanje dijela topline prije nego što dođe do oštećenja (229). Baik i sur. su proučavali promjene temperature u pulpnoj komori za vrijeme izbjeljivanja uz pomoć svjetla koristeći model kojim je simuliran protok krvi tj. cirkulacija u zubu (207).

Ovaj *in vitro* model nije bio u mogućnosti simulirati cirkulaciju krvi i zato je moguće da su velike temperature u pulpnoj komori koje su zabilježene za ZOOM2 i fokusirani femtosekundni laser u stvarnosti manje i ispod temperaturnog praga nakon kojeg nastupaju irevezibilne ozljede stanica pulpe. Temperatura u pulp i na površini također ovisi i o vremenu aplikacije izvora svjetlosti. Uglavnom, duže vrijeme aplikacije dovodi do većeg porasta temperature, jer se više svjetlosne energije pretvara u toplinsku (230), ali je ZOOM2 izvor svjetlosti kroz 15 minuta uzrokovao veći porast temperature u pulpi i na površini nego ostali izvori svjetlosti kroz 30 minuta.

Ovaj dio istraživanja ima nekoliko ograničenja koja se ne pojavljuju u *in vivo* istraživanjama kao što je protok krvi ili priodnih pomaka pulpne tekućine koji je odgovoran za uklanjanje toplne. Histološke promjene nisu bile promatrane. Potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se procijenio potencijalni štetan učinak LED405, OLED i femtosekundnog lasera, kao izvora svjetlosti za izbjeljivanje, na stanice pulpe kao i izradu sigurnosnih parametara za ovakve izvore svjetlosti. Također, potrebno je saznati i kako izvor svjetlosti djeluje u kombinaciji s gelom za izbjeljivanje i odrediti vremensku granicu za osjetljivije grupe zubi kao što su maksilarni i mandibularni središnji sjekutići.

5.2. MIKROTVRDOĆA

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 remineralizacijsikih 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 remineralizacijski sredstava je da održi ravnotežu između demineralizacijskog i remineralizacijskog procesa koji se može dogoditi za vrijeme vitalnog izbjeljivanja zubi (231).

Amorfni kalcijev fosfat (ACP) je jedinstven u klasi kalcijevih fosfata i smatra se direktnim prekursorom biološkog apatita u biomineralizaciji beskralješnjaka i kralješnjaka (185). 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 (232). 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 (233).

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 (234). Kiseliji gelovi dovode do većih oštećenja na površini cakline i dentina kao i do većeg smanjenja mikrotvrdoće. Promjene u mikrotrvdoći zabilježene nakon vitalnog izbjeljivanja tako mogu ovisiti o sastavu i pH korišteog gela. Gelovi s niskom pH ponekad mogu biti ispod kritične granice za demineralizaciju cakline pH ≈ 5.5 (235).

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 (236,237). Mnoga straživanja bavila su se procjenom koncentracije vodikovog peroksida ili karbamid peroksida i smanjenja mikrotvrdoće cakline i dentina (238-240). U ovome istraživanju 25% HP, 38% HP i 30% CP gelovi za izbjeljivanje doveli su do značajnog smanjenja površinske mikrotvrdoće cakline i dentina u odnosu na 10% i 16% CP i radna hipoteza (2) da gelovi za izbjeljivanje različite koncentracije s ili bez aktvacije izvorom svjetlosti utječu na smanjenje mikrotvrdoće nije u potpunosti odbačena. Dodatna aktivacija gelova za izbjeljivanje izvorom svjetlosti ne pridonosi povećanom smanjenju mikrotvrdoće u odnosu kada se koriste samo gelovi za izbjeljivanje. 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 (241). Korištenje 38% HP, uz svjetlosnu aktivaciju ili bez, dovelo je do smanjenja mikrotvrdoće intrakoronarnog dentina (242) 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) i sve korištene VivaStyle gelove (pH=7.0) 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 (243). BOOST i VivaStyle gelovi su imali pH iznad ove kritične vrijednosti, ali su također doveli 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 (244,245). 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 (246). 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 (247).

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 (248-250). SEM analiza post-tretmanom nano-karbonat apatitom (n-CAP) pokazuje da se čestice n-CAP mogu odložiti na oštećenu površinu cakline (251). Također, dodavanje ACP CPP gelu karbamid peroksida može povećati mikrotvrdoću izbjeljivane cakline (252).

U mnogim *in vitro* istraživanjima umjetna slina se koristila kao dobar medij za potencijalnu remineralizaciju tvrdih zubnih tkiva, posebno cakline (253). 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 amorfni 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 flouridom i primjenom nanohidroksilapatita (254). 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 (255). Borges i sur. su dokazali da primjena kiselog 35% HP gela za izbjeljivanje značajno smanjuje mikrotvrdoću cakline dok primjena fluora i kombinacije gela kalicija floura zajedno s umjetnom slinom kroz 15 i 30 dana nakon izbjeljivanja imaju remineralizacijski učinak i dovode do značajnog povećanja mikrotvdoće (252). Primjena izvora svjetlosti u kombinaciji s gelom za izbjeljivanje dovodi do zagrijavanja ili ubrzavanja raspada molekula vodikovog peroksida, pojačavajući na taj način razlaganje vodikovog peroksida i poboljšanje rezultata izbjeljivanja. Slično ovome dijelu istraživanja Araujo i sur. su istraživali učinak promjene mikrotvrdoće nakon primjene 35% vodikovog peroksida u kombinaciji s LED, halogenom lampom i argon laserom te su zaključili da primjena gela za izbjeljivanje dovodi do smanjenja mikrotvrdoće nakon 14 dana, a učinak svjetlosti ne doprinosi povećanju te vrijednosti.

Korišteni izvori svjetlosti ubrzavaju proces izbjeljivanja povećavajući oslobađanje kisika – iona odgovornog za učinak izbjeljivanja. Također, primjena umjetne sline kroz 14 dana dovodi do povećanja vrijednosti mikrotvrdoće što je također u skladu s rezultatima dobivenim u ovom dijelu istraživanja (241). Berger i sur. su također dokazali da 35% vodikov peroksid utječe na smanjenje površinske mikrotvrdoće pri čemu korištenje izvora svjetlosti (LED/diodni laser i halogena lampa) u kombinaciji s gelom ne dovodi do statistički značajnog smanjenja mikrotvrdoće (256) dok su Gomes i sur. dokazali da primjena 35% gela HP dovodi do smanjenja mikrotvrdoće u odnosu na 15% gel HP, a dodatna aktivacija *plasma arch* izvorom svjetlosti i LED izvorom svjetlosti ne pridonosi značajno većem smanjenju mikrotvrdoće (257). Marcondes i sur. su također dokazali da primjena HP u kombinaciji s LED izvorom svjetlosti i Nd:YAG laserom ne dovodi do smanjenja površinske mikrotvrdoće cakline (258). Zhang i sur. su dokazali da LED i diodni laser sami nisu doveli do smanjenja mikrotvrdoće cakline (259). Ovakvi nalazi potvrđeni su i u ovom dijelu istraživanja pri čemu izbjeljivanje eksperimentalnim izvorima svjetlosti – LED405, OLED i femtosekundni laserom u kombinaciji s svim navedenim gelovima za izbjeljivanje nisu pokazali pojačano smanjenje mikrotvrdoće, nego kada su korišteni samo gelovi za izbjeljivanje bez svjetlosne aktivacije. Zaključno, primjena izvora svjetlosti u kombinaciji s različitim sredstvima za izbjeljivanje ne pridonosi povećanom smanjenju površinske mikrtvrdoće.

Kombinacija hidroksilapatita s vodikovim peroksidom može smanjiti gubitak minerala i mikrotvrdoće (260) kao i dodavanje fluora i kalcija u sastav gelova za izbjeljivanje (261). 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 (234). ACP Relief gel osim molekula ACP-a u svom sastavu posjeduje i aktivne čestice natrijevog fluorida.

5.3. 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 (262-264). 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 (265,266). U ovom istraživanju, svi korišteni gelovi za izbjeljivanje pokazali su male promjene u površinskoj glatkoći i različite stupnjeve oštećenja površine cakline i dentina, pri čemu su gelovi 25% i 38% vodikovog peroksida pokazali veće promjene i oštećenja na površini cakline uz otapanje pojedinih područja u odnosu na gelove 10%, 16% i 30% karbamid peroksida. Nakon izbjeljivanja gelovima 25% i 38% vodikovog peroksida došlo je do otvaranja dentinskih tubulusa. Također, izbjeljivanje eksperimentalnim izvorima svjetlosti LED405, OLED i femtosekundni laserom u kombinaciji s svim navedenim gelovima za izbjeljivanje nisu pokazali nastanak većih i značajnijih promjena i oštećenja na površini izbjeljivane cakline i dentina, nego kada su korišteni samo gelovi za izbjeljivanje bez svjetlosne aktivacije. Radna hipoteza (4) da primjena gelova za izbjeljivanje u kombinaciji s novim izvorima svjetlosti ne utječe na promjenu površinske mikromorfologije cakline i dentina je stoga djelomično prihvaćena. 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 (267). 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 (248). Sasaki i sur. su dokazali da poboljšanje mikromorfoloških karakteristika cakline nastupa nakon odlaganja kristala kalcija i flourida koji pri tome održavaju balans između demineralizacije i remineralizacije (268). Gelovi koji posjeduju ACP dovode do remineralizacije predemineralizirane kravlje cakline bolje nego preparati na bazi floura (269). U istraživanju de Vasconcelos i sur. (270) 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 posttretman 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.

5.4. EDS analiza

Tvrda zubna tkiva sastoje se od anorganskog i organskog dijela, koji se u svakom od tih tkiva pojavljuju u različitim omjerima. Glavninu anorganskog dijela čine biološki kalcij-fosfati, a u organskim sastojcima pretežu kolagen i netopljivi protein. Svi ostali elementi nalaze se u tvdom zubnom tkivu u vrlo malom postotku razmješteni u kristalnoj rešetki ili izvan nje. Kemijskim analizama ustanovljeno je pet vrsta ili oblika bioloških kalcij-fosfata, od kojih je u zubnim tkivima najzastupljeniji kalcij-hidroksilapatit. Molni omjeri kalcija u sastavu cakline iznosi 36.40, a u dentinu 25.10. fosfora 17.40 u caklini i 18.50 u dentinu, dok su magnezij, natrij, kalij i klor te fluor zastupljeni u puno nižim molnim omjerima. Magnezija tako ima 0.40 u caklini i 0.85 u dentinu, natrija 0.66 u caklini i 0.54 u dentinu, kalija 0.03 u caklini i 0.019 u dentinu, te fluora tek oko 0.01 u caklini, dok u dentinu nije prisutan, a ostali elementi poput aluminija, antimona, bora, željeza i drugih su zastupljni u vrlo malim

tragovima. Najzastupljenije ‘’onečišćenje’’ u kristalnoj rešetki su karbonati, koji su mjesta nastanka početnog otapanja cakline (182).

Distribucija vrijednosti ugljika zabilježena nakon izbjeljivanja u caklini i dentinu nije ukazala na zamjetnije razlike u odnosu na početna mjerenja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje, kao i nakon aplikacije ACP-a i tretmana u umjetnoj slini. Izbjeljivanje 10% i 16% CP gelom uzrokovalo je značajno manji pad/promjenu vrijednosti kalcija na caklini u usporedbi s 30% CP te 25% i 38% HP gelom. Najveći pad vrijednosti kalcija ostvaren je uporabom 38% HP gela, a bio je značajno veći i prilikom usporedbe s 30% CP gelom, ali ne i 25% HP gelom. U dentinu, izbjeljivanje 10% i 16% CP gelom uzrokovalo je značajno manji pad vrijednosti kalcija na dentinu u usporedbi s 30% CP gelom te 25% i 38% HP gelom. Dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a imao je pozitivan učinak na vrijednosti kalcija, čija su se vrijednosti značajno povećale. Najveći učinak na distribuciju vrijednosti fluora u caklini i dentinu imao je dvotjedni tretman u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a, nakon kojeg su se vrijednosti fluora zamjetno povećale. Promjena vrijednosti fluora odmah nakon izbjeljivanja nije bila toliko izražena. Magnezij i aluminij u caklini nisu doživjeli bitne pomjene nakon izbjeljivanja i tretmana u umjetnoj slini i ACP-u, dok u se u dentinu magnezij povećao nakon izbjeljivanja, a smanjio nakon tretmana u umjetnoj slini i ACP-u. U dentinu, izbjeljivanje i dvotjedni tretman umjetnom slinom uz korištenje ACP-a nisu značajno utjecali na koncentraciju dušika prilikom korištenja 10%, 16% i 30% CP gela te 25% i 38% HP gela.

Distribucija vrijednosti kisika zabilježenih u caklini nakon izbjeljivanja nije ukazala na zamjetnije razlike u odnosu na početna mjerenja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje. Izbjeljivanje i dvotjedni tretman umjetnom slinom uz korištenje ACP-a nisu značajno utjecali na koncentraciju kisika prilikom korištenja 10%, 16% i 30% CP gela te 25% i 38% HP gela. Distribucija vrijednosti kisika zabilježena u dentinu nakon izbjeljivanja nije ukazala na zamjetnije razlike u odnosu na početna mjerenja, bez obzira na vrstu korištenog gela za izbjeljivanje. Dvotjedni tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a u pravilu je smanjio koncentraciju kisika. Distribucija izmjerenih vrijednosti fosfora na caklini ukazala je na znatne promjene nakon dvotjednog tretmana u umjetnoj slini uz korištenje ACP-a, dok proces izbjeljivanja nije uzrokovao bitne promjene u koncentraciji fosfora na caklini. Distribucija vrijednosti fosfora na dentinu ukazala je na postojanost ili smanjenje koncentracije fosfora na dentinu nakon procesa izbjeljivanja. Dvotjedni tretman u umjetnoj

slini uz korištenje ACP-a pozitivno je djelovao na vrijednosti fosfora koje su se zamjetno povećale.

Zaključno, nakon postupka izbjeljivanja može doći do smanjenja i gubitka minerala, pri čemu utjecaj izvora svjetlost ne doprinosi dodatno promjenama u kemijskom sastavu cakline i dentina. Slično dobivenim rezultatima, ranija istraživanja dokazuju da tretiranje površinskog sloja cakline može dovesti do gubitka organskih komponenata, najčešće ugljika, ugljikovodika i tercijarnih aminogrupa koje zamjenjuju kisik, kalcij i fosfor. Hipoteza (4) da izbjeljivanje gelovima (25%, 38% vodikov peroksid i 30 %, 16%, 10% karbamid peroksid) ne utječe na promjenu kemijskog sastava cakline i dentina je odbačena, pri čemu aktivacija izvorom svjetlosti ne pridonosi većim promjenama u kemijskom sastavu nego kada je korišten samo gel za izbjeljivanje bez svjetlosne aktivacije. Slično odobivenim rezultatima zamjetili su Rotstein i sur. pri čemu se omjer kalcija i fosfora znatno smanjio nakon korištenja 30% vodikovog peroksida i 10% karbamid peroksida (132). U istraživanju McCrackena i sur. zubi izloženi karbamid peroksidu su za šest sati izgubili u prosjeku 1,06 $\mu g/mm^2$ kalcija. Međutim taj odnos je zanemariv i ne može biti klinički značajan. Za usporedbu ispijanjem jedne čaše kole gubi se oko 1 $\mu g/mm^2$ kalcija. Ti rezultati dobiveni su nakon dvominutne izloženosti cakline gaziranoj koli, soku od naranče, soku od jabuke ili dijetnoj koli (127). Gjorgivska i sur. su dokazali da nakon primjene 16% karbamid peroksida i nakon korištenja remineralizacijske paste dolazi do porasta količine kalcija i floura vraćajući stanje cakline na početno (135). Cakir i sur. su dokazali da se nakon uporbe 10, 20 i 35% karbamid peroksida razina kalcija, fosfora i kalija smanjila, a količina natrija, fluora i kisika je porasla, dok SEM analiza nije pokazala promjenu mikropovršine dentina (134).

Takav prolazni gubitak minerala se smatra reverzibilnim nakon nekoliko dana boravka u umjetnoj slini ili korištenja flouridiranih pasti ili drugih sredstava za remineralizaciju (269,270) što je dokazano i u ovome istraživanju gdje je nakon 14 dana držanja u umjetnoj slini i 20 minutnog svakodnevnog tretmana preparatom ACP-a došlo do povišenja koncentracije kalcijevih, fosfatnih i iona floura, a koncentracije preostalih gradivnih kemijskih elemenata vratile su se u vrijednosti prije izbjeljivanja. Precipitacija salivarnih komponenti, kao što su kalcij i fosfati, bilo iz umjetne sline ili iz preparata korištenih za remineralizaciju mogu pridonijeti značajnom oporavku tvrdih zubnih tkiva nakon izbjeljivanja (269,270). Također, ovakav nalaz može se promatrati kroz potencijalni karijes protektivni učinak. Zaključno, ovakve ireverzibilne promjene u kemijskom sastavu cakline i dentina ne smatraju se klinički značajnim, ali je za potpuni i brzi oporavak tvrdih zubnih tkiva nakon

tretmana izbjeljivanja potrebno koristiti sredstvo za remineralizaciju u trajanju od najmanje 14 dana (271).

5.5. PROMJENA BOJE

Kada svjetlost dolazi u kontakt s površinom zuba, jedna količina svjetlosti se reflektira kao rezultat refraktornog indeksa i površine zuba. Reflektirana tj. transmitirana boja s površine pastile tako je rezultat interakcije s pigmentiranim molekulama i količina apsorbirane svjetlosti ovisi o količini pigmentiranih molekula. Ako je veća količina pigmentiranih molekula, povećava se apsorpcija svjetlosti i time smanjuje refleksija s površine. Valna duljina apsorbirane svjetlosti je suprotna vidljivoj valnoj duljini boje zuba.

Instrumenti kao što su spektrofotometri i kolorimetri se koriste danas za mjerenje boje raznih materijala. Spektrofotometri mjere jednu valnu duljinu refleksije ili transmitancije objekta i zato se koriste za mjerenje vidljivog spektra ekstrahiranih vitalnih zubi (272). Široka uporaba spektrofotometara u svakodnevnom kliničkom radu je ograničena zbog složenosti i visoke cijene opreme. Iz tog razloga se danas češće za određivanje boje koriste kolorimetri. Oni posjeduju filtere koji mjere promjene boje u X, Y i Z kordinatama ili u CIE Lab vrijednostima, stoga su se kolorimetri koristili u brojnim studijama određivanja boje zubi (273-275). Kolorimetrijska i spektrofotometrijska mjerenja su također uspoređivana i oba načina mjerenja su se pokazala preciznima i pouzdanima kod određivanje boje zubi u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima (276). Oba načina mjerenja imaju i svojih nedostataka. Kolorimetri su tako namijenjeni za mjerenje ravnih i glatkih površina, a površine zubi su uglavnom zaobljene i često s brojnim nepravilnostima. Također, mjerenje boje kolorimetrima podliježe i sistemskoj pogreški koja se javlja prilikom određivanja boje (276). Razlike u mjerenjima kolorimetrima i spektrofotometrima se također razlikuju kod kliničkih mjerenja i mjerenja u *in vitro* uvjetima jer su zabilježene razlike između zapažanja ljudskim okom i kompjutorske analize digitalne slike (276). Konačno određivanje boje zubi kod izbjeljivanja ponajviše ovisi o vremenu tijekom kojega je provedeno izbjeljivanje, a tek potom o koncetraciji korištenog sredstva za izbjeljivanje. Sredstva s višim koncentracijama aktivnih sastojaka dovode do bržeg i jačeg efekta izbjeljivanja u kratkom vremenu, ali korištenje nižih koncentracija kroz duže vrijeme doprinosi stabilnosti postignute boje (273).

Do sada korišteni izvori svjetlosti uglavnom su dovodili do pretjeranog zagrijavanja koje bi onda poboljšalo sami učinak gela za izbjeljivanje. Prema Goldstein i Garberu najučinkovita temperatura za zagrijavanje gela za izbjeljivanje tako je iznosila između 46 do

60 °C (277). Današnji korišteni izvori svjetlosti dovode do kontroliranog zagrijavanja gela za izbjeljivanje kao šo su LED izvori, CO_2 laseri, diodni laseri, plasma arc izvori svjetlosti ili halogene lampe, no i dalje se raspravlja o pravom fotodinamskom, a manje termodinamskom učinku takvih izovra svjetlosti. Li i sur. (278) Tavares i sur. (279), Luk i sur. (216) Wong i sur. (280) su dokazali da korištenje halogene lampe u kombinaciji s gelovima za izbjeljivanje dovodi do statistički zanačajnog poboljšanja boje u odnosu kada se koristi samo gel bez aktivacije svjetlosti. S druge strane, Papathanasiou i sur. (281) te Hein i sur. (164) su dokazali da korištenje halogene lampe u kombinaciji s gelom za izbjeljivanje ne dovodi do poboljšanja učinka izbjeljivanja. Ploeger i sur. (282) su dokazali da korištenje svjetlosti ne doprinosi dekompoziciji vodikovog peroksida do mjere koja bi bila vidljiva i važna u kliničkom radu. Također, za poboljšanje učinka izbjeljivanja koristila se i energija LED izvora svjetlosti i to prvenstveno na plavim i zelenim valnim duljinama koje ne proizvode valne duljine infracrvenog spektra i na taj način ne dovode do zagrijavanja (283). No kada se gelovi za izbjeljivanje koji u svojem sastavu imaju crveni ili narančasti pigment izlože djelovanju ranije navedenih LED izvora, može doći do pretjeranog zagrijavanja. Poboljšani učinak gelova za izbjeljivanje pod utjecajem LED izvora svjetlosti ostaje u literature i dalje nedokazan (284). Kombinacija LED izvora svjetlosti s diodnim laserima niskog intenzitata blizu infracrvenog spektra također se danas koriste jer se smatra da pridonose smanjenju temperaturnog porasta i nastanka postoperativne preosjetljivosti, a pri tome potiču biostimulaciju. Točan učinak na pobojšanje učinka promjene boje nije dokazan. Torres i sur. su dokazali da infracrveni diodni laser može dovesti do pojačanog učinka na oslobađanje kisika (285), a izbjeljivanje uz pomoć halogene lampe, zajedno plave LED (1000 mW/470 nm) i lasera (120 mW/795 nm), te zajedno plave LED (800 mW/470 nm) i lasera (500 mW/830 nm) zatim samo uz djelovanje plave LED (800 mW), ili uz djelovanje zelene LED (600mW/530 nm) i lasera (120mW/795 nm) pokazal su statistički značajan bolji činak nego samo korištenje gela za izbjeljivanje dok izbjeljivanje uz pomoć zelene LED (600mW) nije dovelo do značajnog poboljšanja, no i dalje nije moguće dokazati radi li se ovdje, kao i u ranije navedenim studijama, o fototermalnom učinku pri čemu dolazi do pojačanog raspada vodikovog peroksida (202) pri čemu je važno naglasiti da su sve korištene LED diode proizvodile radijaciju uskog spektra s maksimumom od 450-470 nm, pri čemu je LED izvro korišten u ovome istraživanju djelovao na 405 nm (400 mW) što je blisko ultraljubičastom području. Potencijalni učinak LED405 izvora svjetlosti može se objasniti jednadžbom $H_2O_2 + h\nu \rightarrow 2HO\bullet$ (h = Planckova konstanta) u kojoj je svjetlosti određene frekvencije (ν) apsorbirano pri čemu dolazi do raspada veza unutar H_2O_2 na dva hidroksilna radikala. Ova vrsta energije može se ostvariti jedino pomoću izvora

svjetlosti visoke frekvencije valnih duljina od 400 nm i nižim (UV), no one su dosta ograničene za primjenu u usnoj šupljini (206).

Ideja je koristiti izvore svjetlosti s niskom energijom između ≈ 100 to 500mW koje ne dovode do razvoja visokih temperatura i s druge strane dovode do potencijalnog biostimulacijskog učinka na tvrda i meka tkiva. U našem istraživanju korišteni izvori svjetlosti ne dovode do razvoja visoke temperature pa se pojačani učinak izbjeljivanja može pripisati potencijalnom fotodinamskom učinku. Wiegand i sur. su dokazali da je pojačani učinak izbjeljivanja povezan s boljom i bržom penetracijom vodikovog peroksida u dentin što se može pripisati toplinskom učinku izvora svjetlosti (100). Pojačan učinak na izbjeljivanje pod djelovanjem izvora svjetlosti koji ne dovode do povišenja temperature može se pripisati fotokemijskom učinku ili fotolizi tj. fotodisocijaciji. Fotoni mogu dovesti do elektronskog pobuđenja i/ili vibracije u molekuli, dovodeći do pucanja određenih kemijskih veza, podjednako intra i inter molekularnih. Promjene u vibracijskom stanju molekula zahtjevaju depoziciju velikih količina energije koje omogućuju fotoni visokih energija i to može dovesti do pojačanog raspada vodikovog peroksida (177). Uspoređujući izvore svjetlosti korištene u ovome istraživanju možemo reći da neki od njih pridonose boljem efektu izbjeljivanja u kombinaciji s određenim gelovima za izbjeljivanje i u određenom vremenu.

U ovome istraživanju promjena boje na pastilama hidroksilapatita mjerena je RGB kolorimetrom i UV VIS NIR spektrofotometrom, pri čemu se refleksija svjetlosti s površine pastila mjerila po 10 nm u intervalu od 300 do 800 nm. Nakon 30 minuta izbjeljivanja s LED405 izvorom svjetlosti, zabilježena je statistički značajna razlika u porastu RGB indeksa i spektrofotometrijskih mjerenja koja su pokazala bolju refleksiju u vidljivom djelu spektra koja je bila bliže svjetlijim bojama tj. bijeloj boji, u usporedbi s OLED izvorom svjetlosti i mjerenjima kada se koristio samo gel za 10% CP, 16% CP, 30% CP, 25% HP i 38% HP gelove. Femtosekundni laser je pokazao statistički značajan porast RGB indeksa i spektrofotometrijskih mjerenja koja su pokazala bolju refleksiju u vidljivom djelu spekra koja je bila bliže svjetlijim bojama tj. bijeloj boji, kada se koristio 16% CP i 38% HP. Konačno, razlike između LED405 i femtosekundnog lasera su zabilježene samo kada je korišten 25 % HP gel. Hipoteza (5) da sredstava za izbjeljivanje aktivirana novim izvorima svjetlosti mogu ubrzati i poboljšati optički učinak izbjeljivanja je stoga djelomično prihvaćena.

Različita su mišljenja o tome poboljšava li izvor svjetlosti učinak gela ili ne. Kako bi pojačali učinak gelova za izbjeljivanje i izvora svjetlosti, proizvode se gelovi s određenim pigmentima koji pojačavaju apsorpciju određenog svjetla i pretvaraju ga u toplinu. Gelovi s crvenom bojom u svom sastavu tako su komplementarni sa zelenim bojama, a narančasti s

plavim (286). U istraživanju Torresa i sur. kombinacija crvenog pigmenta i zelenog izvora svjetlosti nije dovela do poboljšanja u učinku izbjeljivanja. Bolji učinak je zabilježen pri korištenju plavog svjetla no to se može pripisati slabijoj snazi zelenog izvora svjetlosti. Tako izvori svjetlosti veće snage dovode do jačeg zagrijavanja gela i do njegovog pojačanog učinka na izbjeljivanje. Također, halogeni izvori svjetlosti nisu pridonjeli poboljšanom učinku na izbjeljivanje u odnosu na LED izvore u kombinaciji s laserom (287). S obzirom da ne dovode do pretjeranog zagrijavanja i potencijalnog oštećenja pulpe LED su se pokazali kao bolji u odnosu na lasere i halogene izvore svjetlosti ili njihove kombinacije, što je dokazano i u ovome istraživanju. Diodi laseri niske energije u infracrvenom dijelu spektra ne doprinose poboljšanju učinka gelova za izbjeljivanje, a stabilizacija boje nastupa nakon 14 dana i 12 mjeseci i bolje je nego nakon mjerenja neposredno nakon izbjeljivanja (287).

Učinak lasera na izbjeljivanje zubi ovisi o snazi, valnoj duljini i radijaciji te pulsnom radu. Luk i sur. su dokazali da halogeno svjetlo i infracrveno svjetlo u kombinaciji s 35 % gelom za izbjeljivanje dovode do poboljšanja učinka izbjeljivanja u odnosu na CO_2 i argon laser, pri čemu su svi izvori svjetlosti doveli do značajnog povećanja temperature u pulpnoj komori (216). Wetter i sur su dokazali da diodni laser u kombiaciji s 35 % HP dovodi do poboljšanja boje nego kombinacija gela i LED lampe (223). Većina istraživanja dokazala je da korištenje izvora svjetlosti u kombinaciji s gelovima za izbjeljivanje ne dovode do poboljšanja učinka izbjeljivanja prilikom korištenja lasera (288) ili ostalih izvora svjetlosti (285,286,287), nego jedino do štetnog povišenja temperature u pulpnoj komori. Femtosekundni laser korišten u ovome istraživanju posjeduje središnju valnu duljinu od 770 nm. Apsorpcijska svjetlosti u tkivu zuba je vrlo važna kada se procjenjuje učinka lasera za izbjeljivanje zubi. Valne duljine s visokim apsorpcijskim koeficijentom u vodi i zubu se smjesta apsorbiraju u tkivu zuba pri čemu se svjetlost pretvara u toplini. Te valne duljine oko 3000 nm blizu su granice infracrvenog spektra i teško prodru dublje u tvrda zubna tkiva i ne dovode do oštećenja pulpe (206). Laserski sustavi za izbjeljivanje zubi posjeduju široki nastavak za istovremeno osvjetljavanje svih zubi. Svjetlosti u crvenom i blizu infracrvenog spektra kao svjetlost lasera korištena u ovome istraživanju imaju sasvim drugačija svojstva. Svjetlost ovih valnih duljina bolje prodiru u biološka tkiva, ali dovode do temperaturnog porasta koji može oštetiti pulpu. Također, femtosekundni laser djeluje u pulsevima koji se emitiraju u trajanju od stotinu femtosekundi s prosječnom snagom od 1W, pa se taj modus djelovanja smatra sigurnosnim tj. zaštitinim djelovanjem jer omogućuje hlađenje između pulseva. Učinak izbjeljivanja također može biti pojačan zbog dehidracije zubi ili uzoraka i prava stabilna boja postiže se nakon njihove rehidracije u određenom vremenskom periodu.

U ovom dijelu istraživanja najbolji rezultati izbjeljivanja postignuti su primjenom svih korištenih gelova uz osvjetljavanje LED405, a slijede osvjetljavanje 16% CP i 38% HP gela fentosekundnim laserom, osvjetljavanje OLED-om i primjena samo gelova, bez svjetlosne aktivacije pri čemu je učinak izbjeljivanja bio proporcionalan trajanju tretmana. Premda se u literaturi navodi da je primjena 10% do 15% gela karbamid-peroksida najadekvatnija za izbjeljivanje kod kuće (288), za potrebe ovog istraživanja uporabljeni su gelovi nižih i viših koncentracija aktivvnih sastojaka jer je istraživanje rađeno na pastilama, a ne na vitalnim zubima pa nije postojala opasnost od preosjetljivosti ili oštećenja cakline, što se može dogoditi pri višim koncentracijama gela.

Iako su u uvjetima *in vitro* postignuti najbolji rezultati gelom, mora se uzeti u obzir da ne mogu reprezentirati situaciju *in vivo* u kojoj je prisutan i učinak sline. Naime, slina razrjeđuje koncentraciju gela i mijenja idealni pH potreban za proces izbjeljivanja (između 9,5 i 10,8), a u kojemu gel ostvaruje maksimalni učinak (289). U dostupnoj literaturi nisu nađeni podaci o istraživanjima za izvor svjetlosti korištene u ovome istraživanju i tako dobivene rezultate nije bilo moguće usporediti s rezultatima drugih autora. U istraživanju Paliske i sur. (290) primijenjen je femtosekundni laser uz 30% gel karbamid-peroksida pri valnoj duljini od 780 nm. Iako femtosekundni laser naizgled daje slabije rezultate u odnosu prema drugim ispitanim postupcima izbjeljivanja, treba uz valnu duljinu uzeti u obzir i druge parametre, kao što su vrsta i koncentracija gela te duljina tretmana. Laserska zraka koja je djelovala na pastilu nije pokrila cijelu njezinu površinu, nego je bila nešto uža jer se trebala postići veća snaga lasera, što je također moglo utjecati na konačni rezultat. U ovome istraživanju koristili smo sustav leća kako bismo povećali promjer laserske zrake i ona je obasjavala cijelu površinu pastille stoga je učinak lasera bio izraženiji.

Također, najbolji učinak u kombinaciji s izvorima svjetlosti postignut je djeljovanjem 25% i 38% vodikovog peroksida što se može pripisati visokoj koncentraciji aktivnog sredstva za izbjeljivanje kao i nižoj pH koja nakon mješanja postaje neutralna i pri tome dolazi do bržeg razlaganja i jačeg učinka slobodnih radikala kisika (206). Kako u dostupnoj literaturi nema podataka o primjeni femtosekundnog lasera, OLED-a i LED405 izvora svjetlosti u stomatologiji i njegovim učincima u postupcima izbjeljivanja zuba, potrebna su daljnja istraživanja, uz primjenu različitih valnih duljina te različitih vrsta i koncentracija gelova i trajanja tretmana, kao i istraživanja na zubima.

5.6. GENOTOKSIČNOST

Oba korištena gela za izbjeljivanje pokazala su potencijalni genotoksični učinak. 72 sata nakon izbjeljivanja, u uzorcima uzetih s gingive (ZOOM2) i u uzorcima s gingive i usnice (BOOST) zabilježen je statistički značajan porast stanica s ukupnim brojem MN dok je u uzorcima s gingive (BOOST) zabilježen porast stanica s više od 3+ MN. Uzorci s usnice (ZOOM2) nisu pokazali statistički značajan porast markera genotoksičnosti. Sredstava za izbjeljivanje, korištena u kontroliranim kliničkim uvjetima, ne pokazuju genotoksični i karcinogeni učinak na stanice oralne sluznice. Gledajući cjelokupne rezultate, ukupan broj statistički značajnih porasta markera genotoksičnosti je bio relativno mali. Radna hipoteza (6) da dva korištena sredstva za izbjeljivanje ne pokazuju genotoksični učinak na stanice oralne mukoze je odbačena. Također, nije zabilježena razlika između dva gela za izbjeljivanje.

Brisovi stanica oralne mukoze uzeti su nakon izbjeljivanja: prvi neposredno nakon izbjeljivanja i drugi 72 sata nakon izbjeljivanja. Taj vremenski razmak dozvoljava stanicama da prođu mitozu i da se potencijalni genotoksični efekt ispolji tj bude vidljiv u smislu porasta broja stanica s MN. Za formaciju MN kao morfološke manifestacije oštećenja genoma, stanica mora proći barem jedan ciklus. Uzorci uzeti neposredno nakon postupka izbjeljivanja korišteni su kao kontrola jer su uzeti nakon otprilike sat vremana od izbjeljivanja. To vrijeme nije dovoljno za razvoj MN kao znakova oštećenja genoma. Prema tome, eventualni porast u broju MN je bilo moguće očekivatiu uzorcima uzetim nakon 72 sata od izbjeljivanja, dok u uzorcima uzetim neposredno nakon izbjeljivanja takav porast nije bio za očekivati. Morfološke promjene u staničnoj jezgri, karioreksija i karioliza ukazuju na iniciranje molekularnih mehanizama stanične smrti. Karioreksija se smatra markerom apoptotične stanične smrti, a karioliza je morfološka manifestacija nekroze (195). Treba obratiti pažnju da nekroza djelomično može biti inducirana mehaničkim ozljedama stanice tijekom uzimanja brisova. Stanična smrt apoptozom može biti uzrokovana brojnim unutarstaničnim i vanstaničnim faktorima, a može nastati i kao posljedica oštećenja uzrokovanog oksidativnim stresom. Nadalje, oksidativni stres može dovesti do oštećenja genoma. Povećan broj stanica s apoptozom, kao i porast broja MN ukazuju da oksidativni stres i oštećenje genoma nastupaju nakon izbjeljivanja. Broj binuklearnih stanica koje se pojavljuju mogu se pripisati indikatorima toksičnosti za stanične proteine kao što je citoskelet. Oštećenje citoskeleta utječe na citokinezu i normalnu migraciju kromosoma. Kao znak poremećaja citokineze pojavljuju se stanice s dvije jezgre (197). Povećani broj binuklearnih stanica ukazuje da oštećenje također zahvća microtubule mitotičkog vretena, kao i ostale intracelularne proteinske

strukture. Nukleoplazmatski mostovi se najčešće pojavljuju kao fuzija kromosoma oštećenih u području telomera i njihova pojava ukazuje na značajan poremećaj integriteta genoma. Kako niti jedan uzorak nakon izbjeljivanja nije pokazao porast struktura nukleoplazmatskih mostova, struktura genoma nije bila ozbiljno narušena. Nukleoplazmatski pupovi su morfološke manifestacije pojačanog odvajanja ili jakog oštećenja dijelova genoma od jezgre (198). Statistički značajan porast u broju nuklearnih pupova nije zabilježen niti u jednom uzorku. Zabilježeni genotoksični učinak na gingivi može biti posljedica potencijalnog direktnog kontakta gela za izbjeljivanje zbog neadekvatno postavljene tkivne zaštite ili kao posljedica naknadnog otpuštanja vodikovog peroksida iz tvrdih zubnih tkiva (291). Zadnje navedeno se u ovom slučaju čini izglednije s obzirom da za vrijeme izbjeljivanja niti nakon njega, nije zabilježeno ‘’curenje’’ kroz gingivnu zaštitu.

Nadalje, moguće je da je sama aplikacija gela za tkivnu zaštitu rezultirala porastom broja MN. Svjetlosno polimerizirajuća smola koja se koristi u gelu za tkivnu zaštitu sadrži metakrilatne monomer koji mogu imati potencijalni genotoksični učinak (292). Kako se smola nikada ne polimerizira u potpunosti (293) mala količina monomer ostaje u kontaktu s gingivom za vrijeme cijelog postupka izbjeljivanja. Citotoksični efekt smola u sastavu kompozita opisan je na različitim tkivima i stanicama (294,295).

Ovaj dio istraživanja ima nekoliko ograničenja i zamjerki: već same početne velike razlike koje su prisutne u sva tri uzimanja uzoraka (neposredno prije, neposredno nakon i 72 sata nakon izbjeljivanja), mali broj ispitanika koji je glani razlog pojavljivanja velikih standardnih devijacija.

Kao i u brojnim kliničkim istraživanjima, dnevni unos različite hrane i pića, kao i higijenske navike pacijenta nisu u potpunosti kontrolirane. Pri takvim procjenama, oslanjalo se prvenstveno na subjektivnu procjenu ispitanika. Promatrana varijabilnost je vjerojatno rezultat izlaganja različitim genotoksičnim faktorima u svakodnevnom životu, koja je zbog znatne osjetljivosti samog mikronukleus testa rezultirala porastom markera genotoksičnosti. Ceppi i sur. (191) su analizirali 63 studije koje su koristile mikronukleus test za određivanje genotoksičnog učinka izloženosti različitih kemikalija u svakodnevnom profesionalnom radu, te prilikom slučajne izloženosti istima. Ionizirajuće zračenje je također bitno kao metoda liječenja brojnih neoplazmi i pojedine studije su također koristile MN test na perifernim limfocitima i stanicama obrazne sluznice kod pacijenata na radioterapiji u regiji glave i vrata. Porast frekvencije MN zabilježen je ubrzo nakon primjene radioterapije (296-298). Svakodnevne životne navike te one loše poput pušenje, konzumacije alkohola, ali i različiti tipovi prehrane također mogu rezultirati porastom frekvencije MN (299,300). Danas,

mikronukleus test na stanicama obrazne sluznice se prvenstveno koristi za rano otkrivanje potencijalnih preneoplastičnih lezija i pojava koje možemo otkriti na temelju prikupljenih stanica zahvaćenog tkiva. Takvi mikronukleusi mogu predvidjeti rizik za nastanak oralnog karcinoma kao i karcinoma gornjeg dijela zračnog i probavnog trakta, uključujući premaligne lezije kao što su oralna leukoplakija ili eritroplakija, a one se često mogu pojaviti i kod pacijenata s diabetesom melitusom (301,302).

Kako prigodom pisanja ove rasprave nisu pronađene studije koje su se bavile evaluacijom genotoksičnosti sredstava za izbjeljivanje u kliničkoj primjeni, ovi rezultati se ne mogu uspoređivati s nalazima ostalih autora koji su se bavili sličnim problemom. U kontroloj skupini ovoga istraživanja postoje velike razlike i odstupanja između samih ispitanika i srednje vrijednosti MN su bile značajno različite između individualnih mjerenja. Velike razlike u početnim mjerenjima posljedica različitosti samih ispitanika pogotovo jer su značajne razlike zabilježene već u bazalnim uvjetima. Kako nije moguće smanjiti varijabilnost potencijalnih genotoksičnih markera između subjekata u kliničkom ispitivanju, za daljne rezultate i zaključke po pitanju genotoksičnosti bilo bi potrebno povećati broj ispitanika. Zaključno, postupci vitalnog izbjeljivanja zubi mogu dovesti do potencijalnog oštećenja genoma stanica oralne mukoze, ali u ovom trenutku nije moguće procijeniti njihov stvarni genotoksični potencijal. Promatrani marker genotoksičnosti su, iako statistički značajni, bili sveukupno mali, s obzirom na visoku individualnu varijabilnost koja postoji u bazalnim uvjetima. Kako stanice oralne sluznice imaju kratki životni vijek, jednokratna ekspozicija blagim genotoksičnim faktorima i noksama najvjerojatnije nema zamjetan i značajan genotoksični potencijal. Potrebana su naredna istraživanja kako bi se procijenio potencijalni genotoksični i karcinogeni učinak sredstava za izbjeljivanje korištenih u kliničkom radu. Ovaj dio istraživanja baziran je na malom broju od 21 ispitanika i zato su potrebna daljnja istraživanja na većem broju ispitanika kako bi se dokazao mogući genotoksični i karcinogeni učinak sredstava za izbjeljivanje. Ove rezultate potrebno je tumačiti kao pokazatelj mogućeg stanja, prije nego kao definitivni rezulat i stoga je potreban oprez u donošenju konkretnih zaključaka.

6 . ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. LED405, OLED i nefokusirani femtosekundni laser su doveli do manjeg temperatunog porasta na površini i u pulpnoj komori (ispod kritične vrijednosti od 5.5 °C) u odnosu na ZOOM2 i fokusirani femtosekundni laser.

2. Porast temperature na površini je veći od porasta temperature u pulpnoj komori za vrijeme izbjeljivanja novim izvorima svjetlosti

3. Nema razlike između korištenih gelova za izbjeljivanje i vazelina za vrijeme porasta temperature na površini i u pulpnoj komori za vrijeme izbjeljivanja novim izvorima svjetlosti

4. Korištenje gela za izbjeljivanje i vazelina (kontrola) u kombinaciji s izvorima svjetlosti dovelo je do značajnog smanjenja temperaturnog porasta na površini i u pulpnoj komori.

5. Korištenje gelova za izbjeljivanje 25%, 38% vodikovog peroksida i 30% karbamid peroksida dovodi do smanjenja mikrotvrdoće cakline i dentina nakon izbjeljivanja pri čemu učinak izvora svjetlosti ne pridonosi smanjenju mikrotvrdoće.

6. Korištenje gelova za izbjeljivanje 16% i 10% karbamid peroksida ne dovodi do smanjenja mikrotvrdoće cakline i dentina nakon izbjeljivanja pri čemu učinak izvora svjetlosti ne pridonosi smanjenju mikrotvrdoće.

7. Kiseliji preprat za izbjeljivanje ZOOM2 (pH=3.20) doveo je do većeg smanjenja u površinskoj mikrotvrdoći u odnosu na alkalični BOOST (pH=6.20) i neutralne VivaStyle gelove 10%, 16%, 30% karbamid peroksid (pH=7.0).

8. Izbjeljivanje gelovima 25% HP, 38% HP i 30% CP utječe na promjenu površinske mikromorfologije i kemijskog sastava cakline i dentina. Izbjeljivanje eksperimentalnim izvorima svjetlosti – LED405, OLED i femtosekundnim laserom u kombinaciji s 25% HP 38% HP 30% CP gelovima za izbjeljivanje nisu pokazali

pojačane promjene u površinskoj morfologiji i kemijskom sastavu cakline i dentina, nego kada su korišteni samo gelovi za izbjeljivanje bez svjetlosne aktivacije.

9. Izbjeljivanje gelovima 10% i 16% karbamid peroksida ne utječe na promjenu površinske mikromorfologije i kemijskog sastava cakline i dentina. Izbjeljivanje eksperimentalnim izvorima svjetlosti – LED405, OLED i femtosekundni laser u kombinaciji s 10% i 16% gelovima karbamid peroksida nisu pokazali pojačane promjene u mikromorfološkom i kemijskom sastavu cakline i dentina, nego kada su korišteni samo gelovi za izbjeljivanje bez svjetlosne aktivacije

10. 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.

11. Strukturne i kemijske promjene cakline i dentina nakon izbjeljivanja podložne su remineralizacijskom učinku amorfnog kalcijevog fosfata i otopini umjetne sline.

12. Sredstava za izbjeljivanje pod djelovanjem LED405 i femtosekundnog lasera svjetlosti dovode do značajnog poboljšanja učinka izbjeljivanja na pastilama hidroksilapatita u usporedbi s OLED izvorom svjetlosti i mjerenjima kada se koristio samo 10% CP, 16% CP, 30% CP, 25% HP i 38% HP gel za izbjeljivanje bez svjetlosne aktivacije novim izvorima svjetlosti.

13. Sredstava za izbjeljivanje, korištena u kontroliranim kliničkim uvjetima dovode do potencijalnog genotoksičnog i karcinogenog učinka na stanice oralne sluznice. Genom stanica pri tome je narušen, ali ne do vrijednosti koja bi bila klinički značajna.

14. Nije zabilježena razlika u genotoksičnom ili karcinogenom učinku između dva korištena sredstva za izbjeljivanje.

7. LITERATURA

1. Truman J. Bleaching of non-vital discoloured anterior teeth. Dent Times. 1864;1:69-72.
2. Atkinson CB. Hints and queries. Dental Cosmos. 1879;21:471.
3. Harlan AW. The dental pulp, it's destruction, and methods of treatment of teeth discolored by its retention in the pulp chamber or canals. Dental Cosmos. 1891;33:137-41.
4. Kirk EC. Hints, queries, and comments: sodium peroxide. Dental Cosmos. 1893;35:1265-7.
5. Messing JJ. Bleaching. J Br Endod Soc. 1971;5:84-88.
6. Harlan AW. The removal of stains from teeth caused by administration of medical agents and the bleaching of pulpless tooth. Am J Dent Sci. 1885;18:521.
7. Abbot CH. Bleaching discoloured teeth by means of 30 per cent perhydrol and the electric light rays. J Allied Dent Society. 1918;13:259.
8. Prinz H. Recent improvements in tooth bleaching. A clinical syllabus. Dental Cosmos. 1924;66:558-60.
9. Andreasen FM. Transient apical breakdown and its relation to colour and sensibilitychanges after luxation injuries to teeth. Endod Dent Traumatol. 1986;2:9-19.
10. Ari H, Ungor M. In vitro comparison of different types of sodium perborate used for intracoronal bleaching of discolored teeth. Int Endod J. 2002;35:433-6.
11. Greenwall L. Bleaching techniques in restorative dentistry—an illustrated guide. London: Martin Dunitz Ltd; 2001.
12. Andreasen FM. Transient apical breakdown and its relation to colour and sensibility changes after luxation injuries to teeth. Endod Dent Traumatol. 1986;2:9-19.
13. Merrell JH. Bleaching of discoloured pulpless tooth. J Can Dent Assoc. 1954;20:380.
14. Stewart GG. Bleaching discoloured pulpless teeth. J Am Dent Assoc. 1965;70:325-8.
15. Caldwell CB. Heat source for bleaching discolored teeth. Ariz Dent J. 1967;13:18-9.
16. Hodosh M, Mirman M, Shklar G, Povar M. A newmethod of bleaching discolored teeth by the use of a solid state direct heating device. Dent Dig. 1970;76:344-6.
17. Kirk EC. The chemical bleaching of teeth. Dental Cosmos. 1889;31:273-83.
18. Westlake A. Bleaching teeth by electricity. Am J Dent Sci. 1895;29:101.
19. Sulieman M. An overview of tooth discoloration: extrinsic, intrinsic and internalized stains. Dent Update. 2005;32:463-8.
20. Ten Bosch JJ, Coops JC. Tooth color and reflectance as related to light scattering and enamel hardness. J Dent Res. 1995;74:374-80.

21. Watts A, Addy M. Tooth discoloration and staining: a review of the literature. Br Dent J. 2001;190:309-16.
22. Ten Bosch JJ, Coops JC. Tooth color and reflectance as related to light scattering and enamel hardness. J Dent Res. 1995;74:374-80.
23. Joiner A, Jones NM, Raven SJ. Investigation of factors influencing stain formation utilizing an in situ model. Adv Dent Res. 1995;9:471-6.
24. Joiner A. Tooth colour: a review of the literature. J Dent. 2004;32:3-12.
25. Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching-a critical review of the biological aspects. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14:292-304.
26. Hattab FN, Qudeimat MA, Al-Rimawi HS. Dental discoloration: an overview. J Esthet Dent. 1999;11:291-310.
27. Scannapieco FA, Levine MJ. Saliva and dental pellicles. In: Genco RJ, Goldman HM, Cohen WD. Contemporary periodontics. St Louis: Mosby; 1990.
28. Nathoo SA. The chemistry and mechanisms of extrinsic and intrinsic discoloration. J Am Dent Assoc. 1997;128:6-10.
29. Hattab FN, Qudeimat MA, Al-Rimawi HS. Dental discoloration: an overview. J Esthet Dent. 1999;11:291-310.
30. Watts A, Addy M. Tooth discoloration and staining: a review of the literature. Br Dent J. 2001;190:309-16.
31. Gorlin RJ, Goldman HM. Enviromental pathology of the teeth. In: Thoma's oral pathology. 6th ed. St Louis: Mosby; 1970.
32. Abbot PV. Aesthetic considerations in endodontics: internal bleaching. Pract Periodont Aesthetic Dent. 9(7):833-40.
33. Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching-a critical review of the biological aspects. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14:292-304.
34. Hattab FN, Qudeimat MA, Al-Rimawi HS. Dental discoloration: an overview. J Esthet Dent. 1999;11:291-310.
35. Belkhir MS, Douki N. An new concept for removal of dental fluorosis stains. J Endod. 1991;17:288-92.
36. Vogel RI. Intrinsic and extrinsic discoloration of the dentition. J Oral Med. 1975;30:99-104.
37. 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.
38. Arens D. The role of bleaching in esthetics. Dent Clin North Am. 1989;33:319-36.

39. Guldener PHA, Langeland K. Endodontologie. 3rd ed. Stuttgart, New York: Georg ThiemeVerlag; 1993.
40. Van der Burgt TP, Plaesschaert AJM. Tooth discoloration induced by dental materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1985;60:666-9.
41. Van der Burgt TP, Plaesschaert AJM. Bleaching of tooth discoloration caused by endodontic sealers. J Endod. 1986;12:231-4.50.
42. Van der Burgt TP, Eronat C, Plaesschaert AJM. Staining patterns in teeth discolored by endodontic sealers. J Endod. 1986;12:187-91.
43. Van der Burgt TP, Mullaney TP, Plaesschaert AJM. Tooth discoloration induced by endodontic sealers. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1986;61:84-9.
44. Davis MC, Walton RE, Rivera EM. Sealer distribution in coronal dentin. J Endod. 2002;28:464–6.
45. Kim ST, Abbot PV, McGinley P. The effects of Ledermix paste on discolouration of mature teeth. Int Endod J. 2000;33:227-32.
46. Rostein I. Tooth discoloration and bleaching. In: Ingle JI, Bakland LK, eds. Endodontics. 5th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc; 2002.
47. Zantner C, Derdilopoulou F, Martus P, Kielbassa AM. Randomized clinical trail on the effectiveness of a new bleaching lacquer for self-application. Oper Dent. 31:308-316.
48. Abbot PV. Aesthetic considerations in endodontics: internal bleaching. Pract Periodont Aesthetic Dent. 9(7):833-40.
49. Luiz Narciso Baratieri, E. M., Jr. Aruajo, S., Jr. Monteiro. Composite Restoration in Anterior Teeth: Fundamentals And Possibilities. Quintessence Pub; 2005.
50. Bridgeman I. The nature of light and its interaction with matter. Colour physics for industry. Huddersfield: H. Charlesworth & Co Ltd; 1987.
51. Hill AR. How we see colour. Colour physics for industry. Huddersfield: H. Charlesworth & Co Ltd; 1987.
52. McLaren K. Colour space, colour scales and colour difference. Colour physics for industry. Huddersfield: H. Charlesworth & Co Ltd; 1987.
53. Smith T, Guild J. The C.I.E colorimetric standards and their use. Transactions of the Optical Society. 1932;33:73-130.
54. Kuehni RG. The early development of the Munsell system. Color Res Appl. 2002;27:20-7.
55. Seghi RR, Hewlett ER, Kim J. Visual and instrumental colorimetric assessments of small color differences on translucent dental porcelain. J Dent Res. 1989;68(12):1760-4.

56. O'Brien WJ, Hemmendinger H, Boenke KM, Linger JB, Groh CL. Color distribution of three regions of extracted human teeth. Dent Mater. 1997;13:179-185
57. Jahangiri L, Reinhardt SB, Mehra RV, Matheson PB. Relationship between tooth shade value and skin color: an observational study. J Prosth Dent. 2002;87: 149-152.
58. Vaarkamp J, Ten Bosch JJ, Verdonschot EH. Propagation of light through human dental enamel and dentine. Car Res. 1995;29:8-13.
59. Ten Bosch JJ, Zijp JR. Optical properties of dentin. In: Thylstrup A, Leach SA, Qvist V, editors. Dentine and dentine reactions in the oral cavity. Oxford, England: IRL Press; 1987.
60. Spitzer D, Ten Bosch JJ. The absorption and scattering of light in bovine and human enamel. Calcif Tissue Res. 1975;17:129-137.
61. Ko CC, Tantbirojn D, Wang T, Douglas WH. Optical scattering power for characterization of mineral loss. J Dent Res. 2000;79:1584-89.
62. Hefferren JJ, Hall JB, Bennett E. Luminescence as a tool to study enamel interactions. Tooth enamel II. Bristol: John Wright; 1971.
63. Perry A, Biel M, DeJongh O, Hefferren JJ. A comparative study of the native fluorescence of human dentine and bovine skin collagens. Arch Oral Bio. 1969;14: 1193-1211.
64. Booij M, Ten Bosch JJ. A fluorescent compound in bovine dental enamel matrix compared with synthetic dityrosine. Arch Oral Bio. 1982;27:417-421.
65. Van der Burgt TP, Ten Bosch JJ, Borsboom PCF, Kortsmit WJPM. A comparison of new and conventional methods for quantification of tooth color. J Prosth Dent. 1990;63:155-162.
66. Schwabacher WB, Goodkind RJ. Three-dimensional color coordinates of natural teeth compared with three shade guides. J Prosth Dent. 1990;64:425-431.
67. Goodkind RJ, Keenan K, Schwabacher WB. Use of a fiberoptic colorimeter for an in vivo color measurement of 2830 anterior teeth. J Prosth Dent. 1987;58:535-542.
68. Rubino M, Barcia JA, Jimenez del Barco L, Romero J. Colour measurement of human teeth and evaluation of a colour guide. Color Res Appl. 1994;19:19-22.
69. Miller LL. Shade matching. J Esthet Dent. 1993;5:143-153.
70. Donahue JL, Goodkind RJ, Schwabacher WB, Aeppli DP. Shade color discrimination by men and women. J Prosth Dent. 1991;65:699-703.
71. Van der Burgt TP, Ten Bosch JJ, Borsboom PCF, Flasschaert AJM. A new method for matching tooth color standards. J Dent Res. 1985;64:837-841.

72. Miller L. Organizing color in dentistry. J Am Dent Assoc. 1987;26-40.
73. Yap AUJ. Color attributes and accuracy of vita-based manufacturers' shade guides. Oper Dent. 1998; 28:266-271.
74. McDonald R. Instruments for the measurement of the colour of transparent and opaque objects. Colour physics for industry. Huddersfield: H. Charlesworth & Co Ltd; 1987.
75. Macentee M, Lakowski R. Instrumental color measurement of vital and extracted human teeth. J Oral Rehab. 1981;7:203-208.
76. Russell MD, Gulfraz M, Moss BW. In vivo measurement of colour changes in natural teeth. J Oral Rehab. 2000;27:786-792.
77. Hasegawa A, Motonomi A, Ikeda I, Kawaguchi S. Color of natural tooth crown in Japanese people. Color Res Appl. 2000;25:43-48.
78. Tung FF, Goldstein GR, Jang S, Hittelman E. The repeatability of an intraoral dental colorimeter. J Prosth Dent. 2002;88:585-590.
79. Amaechi BT, Higham SM. Development of a quantitative method to monitor the effect of a tooth whitening agent. J Clin Dent. 2002;13:100-103.
80. Douglas RD. Precision of in vivo colorimetric assessments of teeth. J Prosth Dent. 1997;77:464-470.
81. Gerlach RW, Barker ML, Sagel PA. Objective and subjective whitening response of two self-directed bleaching systems. Am J Dent. 2002;15:7-12.
82. Gerlach RW, Gibb RD, Sagel PA. A randomized clinical trial comparing a novel 5.3% hydrogen peroxide bleaching strip to 10%, 15% and 20% carbamide peroxide tray-based bleaching systems. Compend Cont Educ Dent. 2000;21:22-28.
83. Bentley C, Leonard RH, Nelson CF, Bentley SA. Quantitation of vital bleaching by computer analysis of photographic images. J Am Dent Assoc. 1999;130:809-816.
84. McCaslin AJ, Haywood VB, Potter BJ, Dickinson GL, Russell CM. Assessing dentin color changes from nightguard vital bleaching. J Am Dent Assoc. 1999; 130:1485-1490.
85. Lath DL, Guan YH, Lilley TH. Comparis on of colorimetry and image anlysis for quantifying tooth whiteness—a preliminary study. Dental Morphology 2001. Sheffield, England: Academic Press; 2001.
86. Hasegawa A, Motonomi A, Ikeda I, Kawaguchi S. Color of natural tooth crown in Japanese people. Color Res Appl. 2000;25:43-48.
87. Hasegawa A, Ikeda I, Kawaguchi S. Color and translucency of in vivo natural central incisors. J Prosth Dent. 2000;83:418-423.

88. Hassan AK. Effect of age on colour of dentition of Baghdad patients. East Mediterr Health J. 2000;6:511-513.
89. Morley J. The esthetics of anterior tooth aging. Curr Opin Cosmet Dent.1997;4:35-39.
90. Brewer JD, Wee A, Seghi R. Advances in color matching. Dent Clin North Am. 2004;48(2):341-58.
91. Gerlach RW. Vital bleaching with whitening strip: Summary of Clinical Research on Effectiveness and Tolerability. I Contemp Dent Pract. 2001;(2)3:001-16.
92. Lee GP, Lee MY, Lum SOY, Poh RSC & Lim KC. Extraradicular difusion of hydrogen peroxide and pH changes associated with intracoronal bleaching of discoloured teeth using diferent bleaching agents. Int Endod J. 2004;37:500-6.
93. 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 Endond J. 2004;37:483-8.
94. Al-Qunaian TA, Matis BA, Cochra MA. In vivo kinetics of bleaching gel with threepercent hydrogen peroxide within the first hour. Oper Dent. 28:236-24.
95. Stindt DJ, Quenette L. An overview of Gly-Oxide liquid in controll and prevention of dental disease. Compend Contin Educ Dent. 10:514-519.
96. Cherry DV, Bowers DE, Thomas L, Redmond AF. Acute toxicological effects of ingested tooth whiteners in female rats. J Dent Res. 72:1298-1303.
97. Rodrigues JA, Basting RT, Serra MC, Rodrigues Junior AL. Effects of 10% carbamide peroxide bleaching materials on enamel microhardness. Am J Dent. 14:67-71.
98. Matis BA, Gaiao U, Blackman D, Schultz FA, Eckert GJ. In vivo degradation of bleaching gel used in whitening teeth. J Am Dent Assoc. 130: 227-235.
99. Baratir LN, Ritter AV, Monteiro S. Nonvital tooth bleaching: Guidelines for the clinician. Quintessence Int. 1995;26:597-608.
100. Wiegand A, Vollmer D, Foitzik M, Attin R, Attin T. Efficacy of different whitening modalities on bovine enamel and dentin. Clin Oral Investig. 9:91-97.
101. Feinmann RA, Goldstein RE, Garber DA. Bleaching teeth. Chicago.Quintessence; 1987.
102. Auschill TM, Hellweg E, Schmidale S, Sculean A, Arweiler NB. Efficacy, side-effects and patients' acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). Oper Dent. 30:156-163.
103. Garber DA. Dentist-monitored bleaching: a discussion of combination and laser bleaching. J Am Dent Assoc. 1997;128: 26-30.

104. Heymann HO. Bleaching of Vital Teeth. Quintessence Int.1997;28:420-7.
105. Haywood VB. Nightguard vital bleaching: current concepts and research. J Am Dent Assoc.1997;128:19-25.
106. Kwon SR, Ko SH, Greenwall LH. Tooth whitening in esthetic dentistry: principles and technique. London: Quintessence Pub; 2009.
107. Joiner A. The bleaching of teeth: A review of the literature. J Dent. 2006;34:412-9.
108. Casey LJ, Schindler WG, Murata SM, Burgess JO. The use of dentinal etching with endodontic bleaching procedures. J Endod. 1989;15(11):535-8.
109. Friedman S. Internal bleaching: long-term outcomes and complications. J Am Dent Assoc. 1997;128: 51-5.
110. Baratieri LN, Ritter AV, Monteiro S, de Andrada MAC, Vieira LCC. Nonvital tooth bleaching: guidelines for the clinician. Quintessence Int. 1995;26:597-608.
111. Garber DA. Dentist-monitored bleaching: a discussion of combination and laser bleaching. J Am Dent Assoc. 1997;128:26-30.
112. Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L. Laser application in tooth bleaching: an update review. Min Stom. 2011;60(4):167-78.
113. Heymann HO. Bleaching of Vital Teeth. Quintessence Int.1997;28:420-7.
114. Leonard RH, Haywood VB, Phillips C. Risk factors for developing tooth sensitivity and gingical irritation associated with nightguard vital bleaching. Quintessence Int. 1997;28:527-534.
115. Klarić E, Par M, Profeta I, Matošević D, Tarle Z. Postoperativna preosjetljivost nakon uporabe dvaju sredstava za profesionalno izbjeljivanje zuba. Acta Stomatol Croat. 2011;45(2):100-9.
116. Gerlach RW, Zhou X. Vital Bleaching with Whitening Strips: Summary of Clinical Research on Effectivenes and Tolerability. J Contemp Dent Pract. 2001;3(2):1-16.
117. Fugaro JO, Nordahl I, Fugaro OJ et al. Pulp reaction to vital bleaching. Oper Dent. 2004;29(4):363-368.
118. Reyto R. Laser tooth whitening. Dent Clin North Am 1993;42:755-62.
119. Schulte JR, Morrissette DB, Gasior EJ, Cazajewski MV. The effects of bleaching application time on dental pulp. J Am Dent Assoc. 1994;125:1330-1335.
120. Haywood VB. Treating sensitivity during tooth whitening. Compend Contin Educ Dent. 2005;26(3):11–20.
121. Tay LY, Kose C, Loguercio AD, Reis A. Assessing the effect of a desensitizing agent used before in-office tooth bleaching. J Am Dent Assoc. 2009;140:1245–51.

122. 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.
123. 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.
124. Ernst CP, Marroquin BB, Willershausen B. Effect of hydrogen peroxide-containing bleaching agents on the morphology of human enamel. Quintessence Int. 1996;27:53-6.
125. 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.
126. Kellehr MGD, Roe FJC. The safety- in-use of 10 % carbamide peroxide (Opalesence) for bleaching teeth under the supervision of a dentist. Br Dent J. 187(4):190-4.
127. McCracken MS, Haywood VB, et al. Demineralisation effects of 10 % carbamide peroxide. J Dent. 24:395-8.
128. Pugh G Jr, Zaidel L, Lin N, Stranick M, Bagley D. High levels of hydrogen peroxide in overnight tooth-whitening formulas: effects on enamel and pulp. J Esthet Restor Dent. 2005;17(1):40-5.
129. Efeoglu N, Wood D, Efeoglu C. Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel. J Dent. 2005;33(7):561-7.
130. 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.
131. Justino LM, Tames DR, Demarco FF. In situ and in vitro effec of bleaching with carbamide peroxide on human enamel. Oper Dent 2004;29:219-25.
132. Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. J Endod. 1996;22(1):23-5.
133. Grobler SR, Senekal PJC, Laubscher JA. Clin Prevent Dent. 1990;12(5):5-9.
134. Cakir FY, Korkmaz Y, Firat E, Oztas S, Gurgan S.Chemical Analysis of Enamel and Dentin Following the Application of Three Different At-home Bleaching Systems. Oper Dent 2011;36(5):529-36.
135. Gjorgievska ES, Nicholson JW. A preliminary study of enamel remineralization by dentifrices based on Recalden (CPP-ACP) and Novamin (calcium-sodium-phosphosilicate). Acta Odontol Latinoam. 2010;234:9-23.
136. Della Bona A, Baghi N, Berry TG, Godwin JM. In – vitro bond strength testing of bleached dentine. J Dent Res. 1992;71:659.

137. Minoux M, Serfaty R. Vital tooth bleaching: Biologic adverse effects – a review. Quintessence Int. 2008;39(8)645-59.
138. de Freitas PM, Turssi CP, Hara AT, Serra MC. Dentin microhardness during and after whitening treatments. Quintessence Int. 2004;35(5):411-7.
139. 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.
140. Basting RT, Rodrigues AL Jr, Serra MC. The effect of 10% carbamide peroxide, carbopol and/or glycerin on enamel and dentin microhardness. Oper Dent. 2005 Sep-Oct;30(5):608-16.
141. 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.
142. Miguel LC, Baratieri LN, Monteiro S Jr, Ritter AV. In situ effect of 10% carbamide peroxide on resin-dentin bond strengths: a novel pilot study. J Esthet Restor Dent. 2004;16(4):235-41.
143. Cadanero M, Breschi L, Antoniolli F, Mazzoni A, Di Renarda R Iluence of whitening on the degree of conversion of dental adhesives on dentin. Eur J Oral Sci. 2006;114:257-62.
144. McGuckin RS, Thurmond BA, Osovitz S. In vitro enamel shear bond strengths following vital bleaching. J Dent Res. 1991;70:377.
145. Haywood VB. Achiving, maintaining and recovering successful tooth bleaching. J Esthet Dent. 1996;8(1):31-8.
146. Yu H, Li Q, Hussain M, Wang Y. Effects of bleaching gels on the surface microhardness of tooth-colored restorative materials in situ. J Dent. 2008;36(4):261-7.
147. Garcia EJ, Mena-Serrano A, de Andrade AM, Reis A, Grande RH, Loguercio AD. Immediate bonding to bleached enamel treated with 10% sodium ascorbate gel: a case report with one-year follow-up. Eur J Esthet Dent. 2012;(2):154-62.
148. Waris G, Haseeb A. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. J Carcinogen. 2006;5:14-21.
149. Gamulin S, Marušic M, Kovac Z et al. Patofiziologija. 6th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2005.
150. Munro IC, Williams GM, Heymann HO, Kroes R. Tooth whitening products and the risk of oral cancer. Food Chem Tox 2006;44:301-15.

151. Levin DE, Hollstein M, Christman MF, Schwiers EA, Ames BN. A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. Proc Natl Acad Sci. 1982;79:7445-9.
152. DeFlora S, Camoirano, A, Zanacchi P, Bennicelli C. Mutagenicity testing with TA97 and TA102 of 30 DNA-damaging compounds, negative with other Salmonella strains. Mutat. Res. 1984;134:159-65.
153. Glatt H. Mutagenicity spectra in Salmonella typhimurium strains of glutathione, L-cysteine and active oxygen species. Mutagenesis 1989;4:221-7.
154. Ziegler-Skylakakis K, Andrae U. Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells. Mutat Res 1987;192:65-7.
155. Kruszewski M, Green MHL, Lowe JE, Szumiel I. DNA strand breakage, cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4^0C and 37^0C in L5178Y sublines. Mutat Res. 1994;308:233-41.
156. Tsuda H. Chromosomal aberrations induced by hydrogen peroxide in cultured mammalian cells. Jpn J Genet. 1981;56:1-8.
157. Li Y, Noblitt T, Zhang A, Origel A, Kafrawy A, Stookey G. Effect of long-term exposure to a tooth whitener. J Dent Res. 1993;72:248.
158. Regnier JF, Clare C, de Gerlache J, Malinverno G, Mayr W, Weiner ML, Trochimowicz H. Ex vivo and in vitro unscheduled DNA synthesis (UDS) assays in rat liver with hydrogen peroxide (H2O2). Mutat Res. 1997;379:168-9.
159. Regnier JF, Molinier B, Bentley KS, de Gerlache J, Malinverno G, Mayr W, Weiner ML, Trochimowicz H, Brock W. Micronucleus tests in mice with hydrogen peroxide. Fund Appl Toxicol Suppl. 1996;30:233.
160. Ito A, Naito M, Watanabe H. Implication of chemical carcinogenesis in the experimental animal - tumorigenic effect of hydrogen peroxide in mice. Nenpo 1981;22:147-58. Ito A, Watanabe H, Naito M, Naito Y. Induction of duodenal tumors in mice by oral administration of hydrogen peroxide. GANN. 1981;72:174-5.
161. Ito A, Naito M, Naito Y, Watanabe H. Induction and characterization of gastro-duodenal lesions in mice given continuous oral administration of hydrogen peroxide. GANN. 1982;73:315-22.
162. Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers (SCCNFP). Hydrogen peroxide and hydrogen peroxide releasing substances in oral health products. 1999; SCCNFP/0058/98.

163. International Agency on Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. 1999;71.
164. Hein DK, Ploeger BJ, Hartup JK, Wagstaff RS, Palmer TM, Hansen LD. In-office vital tooth bleaching — what do lights add? Compend Contin Educ Dent. 2003;24:340-352.
165. Tam L, Hubert M. Effect of light energy on peroxide tooth bleaching. J Am Dent Assoc. 2004;135:194-201.
166. Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. J Aust Dent. 2003;48:146-155.
167. Sun G. The role of lasers in cosmetic dentistry. Dent Clin North Am. 2000;44:831-850.
168. Baik JW, Rueggeberg FA, Liewehr FR. Effect of light-enhanced bleaching on in vitro surface and intrapulpal temperature rise. J Esthet Restor Dent. 2001;13:370-8.
169. Lin S, Caputo AA, Eversole LR, Rizoiu I. Topographical characteristics and shear bond strength of tooth surfaces cut with a laser-powered hydrokinetic system. J Prosthet Dent. 1999;82:451-455.
170. Kurachi C, Tuboy AM, Magalhaes DV, Bagnato VS. Hardness evaluation of a dental composite polimerized with experimental LED-based devices. Dent Mater. 2001;17:309-15.
171. Yap AU, Soh MS. Thermal emission by different lightcuring units. Operative Dentistry 2003;28:260-6.
172. Eldeniz AU, Usumez A, Usumez S, Ozturk N. Pulpal temperature rise during light-activated bleaching. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005;72:254-9.
173. Nakamura, S., Fasol, G.; The Blue Laser Diode: GaN Based Light Emitters and Lasers, Springer-Verlag, Berlin; 1997.
174. Preuzeto iz http://en.wikipedia.org/wiki/OLED
175. Nelson DGA, Wefel JS, Jongebloed WL, Featherstone JDB. Morphology, histology and crystallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser radiation. Caries Res. 1987;21:411-26.
176. Moritz A. Oral laser application. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH; 2006.
177. Csele M. Fundamentals of light sources and laser. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.
178. Parker S. Introduction, history of lasers and laser light production. Br Dent J. 2007;202:21-31.
179. D. Aumiler, T. Ban, H. Skenderović, G. Pichler: Phys. Rev. Lett. 2005;95:233001.

180. T. Ban, D. Aumiler, H. Skenderović, S. Vdović, N. Vujičić, G. Pichler; Phys. Rev. 2007;76:043410.
181. Preuzeto iz www.discus – dental.com
182. Staničić T. Fizikalnokemijski procesi tijekom karijesne lezije. U Šutalo i sur. Patologija i terapija tvrdih zubnih tkiva. Zagreb: Naklada Zadro; 1994.
183. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E.A.M. Clinical and histological manifestations of dental caries. U Dental Caries – The Disease and its Clinical Management. Blackwell Munksgaard; 2003.
184. 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.
185. Dorozhkin SV. Amorphous calcium (ortho)phosphates. Acta Biomater. 2010;4457-75.
186. Preuzeto iz http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope
187. Preuzeto iz http://en.wikipedia.org/wiki/Energy-dispersive_X-ray_spectroscopy
188. Brnjas Kraljević J, Krilov D. Fizika za studente medicine. Zagreb. Medicinska naklada; 2012.
189. Holland N, Bolognesi C, Kircsh-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmüller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. Mutat Res. 2008;659:93-108.
190. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat Res. 2003;534(1-2):65-75.
191. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. Mutat Res: Rev Mutat Res. In press, 2010, doi: 10.1016/j.mrrev. 2009. 11. 001.
192. Sarto F, Tomanin R, Giacomelli L, Canova A, Raimondi F, Ghiotto C, Fiorentino MV. Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antiblastic therapy. Mutat Res. 1990;228:157-69.
193. Karahalil B, Karakaya AE, Burgaz S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutat Res. 1999;442:29-35.

194. Mayer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage in chemopreventive trials. Mutat Res. 2001;489:147-72.
195. Majno G, Joris I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis - An Overview of Cell Death. Am J Pathol. 1995;146(1):16-9.
196. Cerqueira EMM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, Machado-Santelli GM. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. Mutat Res. 2004;562:111-7.
197. Thomson PJ, Potten CS, Appleton DR. In vitro labelling studies and the measurement of epithelial cell proliferative activity in the human oral cavity. Arch. Oral Biol. 2001;46:1157-1165.
198. Gillespie GM. Renewal of buccal epithelium. Oral Surg. 1960;27:83–89.
199. de Almeida Reis SA, do Espírito Santo AR, Setúbal Andrade MG, Sadigursky M. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. Braz Oral Res 2006;20(2):97-102.
200. Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology 1965;19(1):515-30.
201. Seale NS, Wilson CF. Pulpal response to bleaching of teeth in dogs. Pediatric Dentistry 1985;7(3):209-14.
202. Baldissara P, Catapano S, Scotti R. Clinical and histological evaluation of thermal injury thresholds in human teeth: preliminary study. Journal of Oral Rehabilitation 1997;24(11): 791-801.
203. Sulieman M, Addy M, Rees JS. Surface and intra-pulpal temperature rises during tooth bleaching: an in vitro study British Dental Journal 2005;199(1)37-40.
204. Cohen SC. Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth. J Endod 1979;5:135–138.
205. Sulieman M, Rees JS, Addy M. Surface and pulp chamber temperature rises during tooth bleaching using a diode laser: a study in vitro British Dental Journal 2006;200(11):631-4.
206. Buchalla W, Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser - a systematic review. Dent Mater 2007;23(5):586-96.
207. Baik JW, Rueggeberg FA, Liewehr FR. Effect of light-enhanced bleaching on in vitro surface and intrapulpal temperature rise. J Esthet Restor Dent 2001;136:370 –378.

208. Adrian JC. Pulp effects of neodymium laser. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1977;44:301–305.
209. Stelzel M, Hammer F, Flores-de-Jacoby L. Reaktion der pulpa auf eine subgingivale Nd:YAG Laserbehandlung. Dtsch Zahnarztl Z 1999;54:78–82.
210. Seale NS, McIntoch JE, Taylor AN. Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. J Dent Res 1981;60:948 –953.
211. Robertson WD, Melfi RC. Pulpal response to vital bleaching procedures. J Endod 1980;6:645– 649.
212. Hofmann N, Hugo B, Klaiber B. Effect of irradiation type (LED or QTH) on photo-activated composite shrinkage strain kinetics, temperature rise, and hardness. Eur J Oral Sci 2002;110:471–479.
213. Usumez A, Ozturk N. Temperature rise during resin cement polymerization under a ceramic restoration: effect of type of curing units. Int J Prosthodont 2004;17:200 –204.
214. Carrasco TG, Carrasco-Guerisoli LD, Fröner IC. In vitro study of the pulp chamber temperature rise during light-activated bleaching. J Appl Oral Sci. 2008;16(5):355-9.
215. Torres CR, Caneppele TM, Arcas FC, Borges AB. In vitro assessment of pulp chamber temperature of different teeth submitted to dental bleaching associated with LED/laser and halogen lamp appliances. General Dentistry 2008;56(5):481-6.
216. Luk K, Tam L, Hubert M. Effect of light energy on peroxide tooth bleaching. Journal of American Dental Association 2004;135(2):194-201.
217. Michida SM, Passos SP, Marimoto AR, Garakis MC, de Araújo MA. Intrapulpal temperature variation during bleaching with various activation mechanisms. Journal of Applied Oral Science 2009;17(5):436-9.
218. Vandewalle KS, Roberts HW, Tiba A, Charlton DG. Thermal emission and curing efficiency of LED and halogen curing lights. Operative Dentistry 2005;30(2):257-64.
219. Asmussen E, Peutzfeldt A. Temperature rise induced by some light emitting diode and quartz-tungsten-halogen curing units. European Journal of Oral Science 2005;113(1):96-8.
220. Coelho RA, Oliveira AG, Souza-Gabriel AE, Silva SR, Silva-Sousa YT, Silva RG. Ex-vivo evaluation of the intrapulpal temperature variation and fracture strength in teeth subjected to different external bleaching protocols. Brazilian Dental Journal 2011;22(1):32-6.

221. Kabbach W, Zezell DM, Pereira TM, Albero FG, Clavijo VR, de Andrade MF. A thermal investigation of dental bleaching in vitro. Photomedicine and Laser Surgery 2007;26(5):489-93.
222. Weerakoon AT, Meyers IA, Symons AL, Walsh LJ. Pulpal heat changes with newly developed resin photopolymerization systems Australian Endodontic Journal 2002;28(3):108 –111.
223. Wetter NU, Barroso MC, Pelino JE. Dental bleaching efficacy with diode laser and LED irradiation: an in vitro study. Lasers in Surgery and Medicine 2004;35(4):254-8.
224. Yazici AR, Khanbodaghi A, Kugel G. Effects of an in-office bleaching system (ZOOM) on pulp chamber temperature in vitro. Journal of Contemporary Dental Practice 2007;8(4:19-26.
225. Coutinho DS, Silveira L Jr, Nicolau RA, Zanin F, Brugnera A. Comparison of temperature increase in in vitro human tooth pulp by different light sources in the dental whitening process. Lasers in Medical Science 2009;24(2):179-85.
226. Gluskin AH, Ruddle CJ, Zinman EJ. Thermal injury through intraradicular heat transfer using ultrasonic devices: precautions and practical preventive strategies. Journal of American Dental Association 2005;136(9):1286–93.
227. Uysal T, Eldeniz AU, Usumez S, Usumez A. Thermal changes in the pulp chamber during different adhesive clean-up procedures. The Angle Orthodontics 2005;75(2):220–5.
228. Knezevic A, Tarle Z, Meniga A, Utalo J, Pichler G. Influence of light intensity from different curing units upon composite temperature rise. Journal of Oral Rehabilitation 2005;32(5):362-70.
229. Goodis H E, White J E, Andrews J, Wanatabe L G. Measurement of temperature generated by visible light cure lamps in an in vitro model. Dental Materials 1989;5(4):230-234.
230. Batista RG, Barcellos DC, Borges AB, Gomes Tores CR. Analysis of the Pulp Chamber Temperature of Teeth Submitted to Light Activation with and without Bleaching Gel. World Journal of Dentistry 2011;2(1):23-7.
231. 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.
232. 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.

233. Markowitz K, Pashley DH. Discovering new treatments for sensitive teeth: the long path from biology to therapy. J Oral Rehabil 2008;35:300-15.
234. 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.
235. 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.
236. 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.
237. 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.
238. 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.
239. Ryge G, Foley DE & Fairhurst CW. Micro-indentation hardness. Journal of Dental Research 1961;40(6):1116-1127.
240. Featherstone JDB, ten Cate M, Shariati M & Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Research 1983;17(5):385-391.
241. Araujo Fde O, Baratieri LN, Araújo E. In situ study of in-office bleaching procedures using light sources on human enamel microhardness. Oper Dent 2010;35:139-46.
242. 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,
243. 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.
244. 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 201;112:1-5.
245. Borges AB, Yui KC, D'Avila TC, Takahashi CL, Torres CR, Borges AL. Influence of remineralizing gels on bleached enamel microhardness in different time intervals. Oper Dent 2010;35:180-6.

246. 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.
247. 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.
248. 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.
249. 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.
250. Bayrak S, Tunc ES, Sonmez IS, Egilmez T, Ozmen B. Effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) application on enamel microhardness after bleaching. Am J Dent 2009;22:393-6.
251. Kim YS, Kwon HK, Kim BI. Effect of nano-carbonate apatite to prevent re-stain after dental bleaching in vitro.m J Dent 2011;39:636-42.
252. 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.
253. Meyer-Lueckel H, Umland N, Hopfenmu¨ llerW, Kielbassa AM. Effect of mucin alone and in combination with various dentifrices on in vitro remineralization. Caries Res 2004;38:478–83. 24.
254. 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. Acta Odontol Scand 2013;71:343-30.
255. 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.
256. Berger SB, Cavalli V, Ambrosano GM, Giannini M. Changes in surface morphology and mineralization level of human enamel following in-office bleaching with 35% hydrogen peroxide and light irradiation. Gen Dent. 2010;58(2):74-9.

257. Gomes MN, Francci C, Medeiros IS, De Godoy Froes Salgado NR, Riehl H, Marasca JM, Muench A. Effect of light irradiation on tooth whitening: enamel microhardness and color change. J Esthet Restor Dent. 2009;21(6):387-94.
258. Marcondes M, Paranhos MP, Spohr AM, Mota EG, da Silva IN, Souto AA, Burnett LH Jr. The influence of the Nd:YAG laser bleaching on physical and mechanical properties of the dental enamel. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009;90(1):388-95.
259. Zhang C, Wang X, Kinoshita J, Zhao B, Toko T, Kimura Y, Matsumoto K. Effects of KTP laser irradiation, diode laser, and LED on tooth bleaching: a comparative study. Photomed Laser Surg. 2007;(2):91-5.
260. Jiang T, Ma X, Wang Z, Tong H, Hu J, Wang Y. Beneficial effects of hydroxyapatite on enamel subjected to 30% hydrogen peroxide. J Dent 2008;36:907-14.
261. Borges AB, Samezima LY, Fonseca LP, Yui KC, Borges AL, Torres CR. Influence of potentially remineralizing agents on bleached enamel microhardness. Oper Dent 2009;34:593-7.
262. Moraes RR, Marimon JLM, Schneider LFJ, Sobrinho LC, Camacho GB, Bueno M. Carbamide peroxide bleaching agents: effects on surface roughness of enamel, composite and porcelain. Clinical Oral Investigations 2006;10:23–8.
263. Metz MJ, Cochran MA, Matis BA, Gonzalez C, Platt JA, Pund MR. Clinical evaluation of 15% carbamide peroxide on the surface microhardness and shear bond strength of human enamel. Operative Dentistry 2007;32:427–36.
264. Ferreira SS, Araújo JL, Morhy ON, Tapety CM, Youssef MN, Sobral MA. The effect of fluoride therapies on the morphology of bleached human dental enamel. Microsc Res Tech 2011;74:512–16.
265. Kim YS, Kwon HK, Kim BI. Effect of nano-carbonate apatite to prevent re-stain after dental bleaching in vitro.m J Dent 2011;39:636-42.
266. Markovic L, Jordan RA, Lakota N, Gaengler P. Micromorphology of enamel surface after vital tooth bleaching. J Endod 2007;33:607-10.
267. 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.
268. 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.

269. 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.
270. 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.
271. Attin T, Kielbassa AM, Schwanenberg M & Hellwig E. Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel Journal of Oral Rehabilitation 1997;24(4):282-286.
272. Jarad FD, Russell MD, Moss BW. The use of digital imaging for colour matching and communication in restorative dentistry. Br Dent J. 2005;199(1):43-9.
273. Okubo SR, Kanawati A, Richards MW, Childress S. Evaluation of visual and instrument shade matching. Journal of Prosthetic Dentistry 1998;80:642–648.
274. Tung G.R. Goldstein S. Jang, E. Hittelman. The repeatability of an intraoral dental colorimeter. Journal of Prosthetic Dentistry 2002;88:585–590.
275. Hindle JP, Harrison A. Tooth colour analysis by a new optoelectronic system. European Journal of Prosthodontic Restorative Dentistry 2000;8:57–61.
276. Douglas RD. Precision of in vivo colorimetric assessments of teeth. Journal of Prosthetic Dentistry 1997;77:464–470.
277. Goldstein RE; Garber DA. Complete dental bleaching. Chicago, IL: Quintessence Books; 1995.
278. Li Y, Cartwright S, Lezama M, Zhang W, Feller R. Effect of light application on an in-office bleaching gel. J Dent Res 2001;80:147.
279. Tavares M, Stultz J, Newman M, Smith V, Kent R, Carpino E, et al. Light augments tooth whitening with peroxide. J Am Dent Assoc 2003;134:67–75.
280. Wong R, Ling XF, Tan YY. Effect of halogen light and repeated bleaching on tooth whitening. J Dent Res 2004;83.
281. Papathanasiou A, Kastali S, Perry RD, Kugel G. Clinical evaluation of 35% hydrogen peroxide in-office whitening system. Comp Cont Educ Dent 2002;23:335–46.
282. Ploeger BJ, Palmer TM, Christensen RP. Does heat &/or light enhance vital tooth bleaching? J Dent Res 2002;81:A–398.
283. Torres CR, Batista GR, César PD, Barcellos DC, Pucci CR, Borges AB. Influence of the quantity of coloring agent in bleaching gels activated with LED/laser appliances on bleaching efficiency. Eur J Esthet Dent 2009;4:178–86.
284. Jones AH, Diaz-Arnold AM, Vargas MA, Cobb DS. Colorimetric assessment of laser and home bleaching techniques. J Esthet Dent 1999;11:87–94.

285. Torres CR, Barcellos DC, Batista GR, Borges AB, Cassiano KV, Pucci CR. Assessment of the effectiveness of light-emitting diode and diode laser hybrid light sources to intensify dental bleaching treatment. Acta Odontol Scand. 2011;69(3):176-81.
286. Bengel WM. Digital photography and assessment of therapeutic results after bleaching procedures. J Esthet Rest Dent 2003;15:S21–32.
287. Torres CRG, Borges AB, Kubo C, Gonçalves S, Araújo R, Celaschi S, et al. Dental bleaching with LED/LASER hybrid sources. São Paulo, Brazil: Ed Santos; 2007.
288. Mokhlis GR, Matis BA, Cochran MA, Eckert GJ. A clinical evaluation of carbamide peroxide and hydrogen peroxide whitening agents during daytime use. J Am Dent Assoc. 2000;131(9):1269-77.
289. Price RB, Sedarous M, Hiltz GS. The pH of tooth-whitening products. J Can Dent Assoc. 2000 Sep;66(8):421-6.
290. Paliska J, Stipetić A, Tarle Z, Ristić M, Ban T, Vujičić N, Pichler G. Colorimetric Assessment of Different Tooth Whitening Procedures. Acta Stomatol Croat. 2011;45(4):258-267.
291. Lai SC, Tay FR, Cheung GS, Mak YF, Carvalho RM, Wei SH et al. Reversal of compromised bonding in bleached enamel. J Dent Res 2002;81(7):477-81.
292. Knezevic A, Zeljezic D, Kopjar N, Tarle Z. Cytotoxicity of composite materials polymerized with LED curing units. Oper Dent. 2008;33(1):23-30.
293. Imazato S, McCabe JF, Tarumi H, Ehara A & Ebisu S. Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. Dent Mater 2001;17(2):178-183.
294. Bouillaguet S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC & Krejci I. Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. J Oral Rehabil 2002;29(1):7-13.
295. Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF & Sullivan IO. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. Int Endod J 2002;35(1):47-55.
296. Minicucci EM, Kowalski LP, Maia MA, Pereira A, Ribeiro LR, de Camargo JL, et al. Cytogenetic damage in circulating lymphocytes and buccal mucosa cells of head-and-neck cancer patients undergoing radiotherapy. J Radiat Res 2005;46(2):135-42.
297. Cao J, Liu Y, Sun H, Cheng G, Pang X, Zhou Z. Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy. Mutat Res 2002;504 (1-2):85-90.
298. Bindu L, Balaram P, Mathew A, Remani P, Bhattathiri VN, Nair MK. Radiationinduced changes in oral carcinoma cells-a multiparametric evaluation. Cytopathology 2003;14(5):287-93.

299. Van Schooten FJ, Besaratinia A, De Flora S, D'Agostini F, Izzotti A, Camoirano A, et al. Effects of oral administration of N-acetyl-l-cysteine: A multibiomarker study in smokers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002;11(2):167-75.
300. Nair U, Obe G, Nair J, Maru GB, Bhide SV, Pieper R, et al. Evaluation of frequency of micronucleated oral mucosa cells as a marker for genotoxic damage in chewers of betel quid with or without tobacco. Mutat Res 1991;261(3):163-8.
301. Bloching M, Hofmann A, Lautenschlager C, Berghaus A, Grummt T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. Oral Oncol 2000;36(6):550-5.
302. Zuniga-Gonzalez GM, Batista-Gonzalez CM, Gomez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez AL, Munoz-Magallanes T, et al. Micronuclei in diabetes: Folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. Mutat Res 2007;634(1-2):126-34.

8. 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., Rektorovom nagradom za rad "Ekstrakcije zuba kod pacijenata na antikoagulantnoj terapiji" pod mentorstvom prof.dr.sc. Irine Filipović – Zore za akademsku godinu 2006/07., te je bila uvrštena u deset najuspješnije diplomiranih studenata u godini 2007/08. s prosjekom ocjena 4,56. 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". U prosincu iste godine položila je državni ispit i upisala poslijediplomski doktorski studij dentalne medicine, a u prosincu 2010. godine započela je i s poslijediplomskim specijalističkim studijem. U listopadu 2010. godine započela je sa specijalizacijom 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.

8.1. Popis objavljenih radova

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

Eva Klarić, Mario Rakić, Ivan Sever, Tarle Zrinka.
Temperature Rise During Experimental Light-Activated Bleaching.// Lasers in Medical Science (2013) 10.1007/s10103-013-1366-6 (članak prihvaćen za objavljivanje)
Marović, Danijela; Pandurić, Vlatko; Tarle, Zrinka; Ristić, Mira; Šariri, Kristina; Demoli, Nazif; **Klarić, Eva**; Janković, Bernard; Prskalo, Katica.
Degree of conversion and microhardness of dental composite resin materials. // Journal of Molecular Structure 1044 (2013) 299–302.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

Marović D, Matić S, Kelić K, **Klarić E**, Rakić M, Tarle Z. Time dependent accuracy of dental radiometers. Acta Clinica Croatica (2012) (prihvaćen za objavljivanje).
Janković B. **Klarić E**, Prskalo K, Marović D, Pandurić V, Tarle Z. Antimikrobni učinak ozona u korijenskim kanalima. Acta Stomatologica Croatica (2013) (u prijelomu).
Klarić E, Par M, Profeta I, Matošević D, Tarle Z. Postoperativna preosjetljivost nakon uporabe dvaju sredstava za profesionalno izbjeljivanje zuba. Acta Stomatologica Croatica.2011;45(2):100-109.
Matošević D, Pandurić V, Janković B, Knežević A, **Klarić E**, Tarle Z. Light Intensity of Curing Units in Dental Offices in Zagreb, Croatia. Acta Stomatologica Croatica. 2011;45(1):31-40.

Ostali radovi u drugim časopisima

Profeta I, Par M, **Klarić E**, Tarle Z. Genotoksični učinak sredstava za izbjeljivanje na oralnu sluznicu. Sonda : list studenata Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2010;20:69-73.
Klarić E, Filipović-Zore I. Ekstrakcija zuba kod pacijenata na antikoagulantnoj terapiji.

Sonda: list studenata Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2009;19:28-32.

Klarić E, Janković B. Najčešće pogreške prilikom izbjeljivanja zubi. Sonda: list studenata Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2012;23:30-33.

Klarić E, Marović D. Izvori svjetlosti za polimerizaciju. Hrvatski vjesnik dentalne medicine. 2013.

Repić D, Pejda S, **Klarić E**, Pelivan I. Suvremene metode izbjeljivanja zubi. Medix 98/99 2012.

Klarić E, Repić D, Marović D, Šaban Ž. Nekarijesne lezije zubi kod plivača. Medix 103. 2013.

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu

Klarić E, Par M, Profeta I, Kopjar N, Želježić D, Kašuba V, Rozgaj R, Tarle Z. Genotoksični učinak preparata za izbjeljivanje zubi na oralnu sluznicu. Journal of Dental research Vol. 90, Special Issue B. 2011.

Janković B, Negovetić Mandić V, Pandurićn V, Prskalo K, Marović D, **Klarić E**. DMFT Index in School Children 16 Years After the War. Journal of Dental Research, Vol. 91, Special Issue C. 2012.

Klarić E, Rakić M, Vujičić N, Janković B, Negovetić Mandić V, Tarle Z. Temperature Rise During Experimental Light-Activated Bleaching . Journal of Dental Research, Vol. 91, Special Issue C. 2012.

Negovetić Mandić V, Demoli N, Šariri K, Pandurić V, **Klarić E**, Tarle Z. Holographic Assesment Of Stress During Adhesive Post Cementation. Journal of Dental Research, Vol. 91, Special Issue C. 2012.

Prskalo K, Spajić J, Šariri K, Demoli N, Janković B, **Klarić E**, Tarle Z. Laser Interferometry Measuring of Glass Ionomer Dimensional Changes. Journal of Dental Research, Vol. 91, Special Issue C. 2012.