



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI  
MEDICINSKI FAKULTET  
BANJA LUKA

UNIVERSITY OF BANJALUKA  
FACULTY OF MEDICINE  
BANJA LUKA



**UNIVERZITET U BANJOJ LUCI  
MEDICINSKI FAKULTET  
STUDIJSKI PROGRAM STOMATOLOGIJA  
UŽA NAUČNA OBLAST  
PREVENTIVNA I DJEĆIJA STOMATOLOGIJA**

**ĐORĐE MIRJANIĆ**

**EFIKASNOST PRIRODNIH ZASLAĐIVAČA U  
ZAŠTITI ZUBNE GLEĐI OD GAZIRANIH NAPITAKA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

Banja Luka, 2017



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI  
MEDICINSKI FAKULTET  
BANJA LUKA

UNIVERSITY OF BANJALUKA  
FACULTY OF MEDICINE  
BANJA LUKA



**UNIVERSITY OF BANJA LUKA  
FACULTY OF MEDICINE  
STUDY PROGRAM DENTISTRY  
SPECIAL TOPICS  
PREVENTIVE AND CHILDREN DENTISTRY**

**ĐORĐE MIRJANIĆ**

**EFFICIENCY OF NATURAL SWEETENERS IN  
PROTECTION OF DENTAL ENAMEL FROM  
CARBONATED BEVERAGES**

**DOCTORAL DISSERTATION**

Banja Luka, 2017

## *Zahvalnica*

*Ovom prilikom želim izraziti zahvalnost svojim profesorima koji su me tokom redovnih i postdiplomske studija, sa velikim strpljenjem i prijateljskim pristupom, učili struci i nauci.*

*Veliku zahvalost dugujem mentoru prof. dr Jovanu Vojinoviću, koji je, i pored svih svojih obaveza, izdvojio vrijeme da me dragocjenim savjetima uputi u srž problema i tako mi omogući da disertaciju uspješno privедем kraju. Njegovo znanje, iskustvo i spremnost da pomogne pri izradi ovog rada bili su mi neprocjenjivi.*

*Takođe, zahvaljujem se prof. dr Mirjani Ivanović i prof. dr Dubravki Marković na korisnim sugestijama.*

*Iskrenu zahvalnost upućujem svojoj porodici koja mi je svesrdno pomagala tokom čitavog mog školovanja.*

**MENTOR:** Dr Jovan Vojinović, redovni profesor, uža naučna oblast Preventivna i dječja stomatologija, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

## **EFIKASNOST PRIRODNIH ZASLAĐIVAČA U ZAŠTITI ZUBNE GLEĐI OD GAZIRANIH NAPITAKA**

**Cilj istraživanja** u ovoj disertaciji je bio da se utvrdi dejstvo prirodnih zaslađivača (ksilotola i stevie) u zaštiti i oporavku gleđi zuba uslijed dejstva gaziranih napitaka. Ciljevi istraživanja bi bili usmjereni u sljedećim pravcima: 1) Ispitati u kojoj mjeri prirodni zaslađivač tipa ksilitola i stevie mogu da zaštite i oporave površinu gleđi od oštećenja izazvanih agresivnim gaziranim napitkom Coca Colom. 2) Da se uporede rezultati gleđne strukture i ultrastrukture dobijeni sa SEM-om i AFM tehnologijom. 3) Da se ispita mogućnost korišćenja parametara krive nosivosti u analizi promjena u površinskim slojevima gleđi i 4) Da se ispita tip mineralne akumulacije u prisustvu vještačkih zaslađivača u poređenju sa vještačkom pljuvačkom. **Metode.** Istraživanje će se sprovoditi na zubima čovjeka izvađenim iz ortodontskih razloga koji su prikupljeni u skladu sa etičkim protokolom koji je odobren od strane Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci. Ukupno je odabранo 96 zuba podijeljenih u tri grupe, u kojima je od svake grupe uzeto po 32 uzorka gleđi veličine (3 mm x 2 mm x 2 mm). Ti uzorci su pripremljeni za analizu prema standardnoj proceduri. Poslije tretiranja odgovarajućim, za tu vrstu istraživanja, izvršena je njihova priprema za analizu pomoću Skening elektronskog mikroskopa (SEM) i Mikroskopa međuatomskih sila (AFM). Polovina u svakoj grupi će biti ispitivana sa Skening elektronskim mikroskopom (SEM), a druga polovina sa Mikroskopom međuatomskih sila (Atomic force microscopy (AFM)). Analiza je vršena na SEM tipa *SEM JEOL T220*. **Rezultati.** Na više površina, različitih zuba dejstvo ksilitola i stevije je upoređivano sa kontrolnom grupom koja je bila izložena samo dejству rastvora vještačke pljuvačke. Kod ispitivanja pomoću SEM-a, kod stevie analizom mineralizovanih masa uočeno je da su kristali manji i usmjereniiji. U

dubljim dijelovima gdje očigledno nije bilo jačeg korozivnog uticaja Coca Cole naziru se osnovne strukture prizmi. Osim toga, uočene kristalne strukture se razvijaju iz sfrenih globula na površini. Usmjereno se primjećuje u dubljim slojevima gdje se dešava prelazak iz amorfne mase u kristalnu. Kod ksilotola u mineralizovanoj masi je otkriven veći broj već formiranih kristala veće veličine koji su nepovoljniji za dobro upakivanje i remineralizaciju gleđi. Kod AFM ispitivanja hrapavosti površina gleđi praćeno je devet parametara grupisanih u tri grupe: Kontrolna grupa, Stevija i Ksilitol. U svakoj od grupa praćena su tri parametra: Rk core, Rpk i Rvk. Za svaki od parametara izvršeno je 32 mjerenja. Tako je minimalna izmjerena hrapavost u grupi Stevija za Rpk je 1634, a maksimalna 1804 nm. Medijana je 1730.50, a prosječno izmjerena hrapavost je 1728.50 nm, dok je standardna devijacija 51.301 nm. U grupi Ksilitol za Rk core minimalna izmjerena hrapavost je 44, a maksimalna 70 nm. Medijana je 57, a prosječno izmjerena hrapavost je 57.09 nm, dok je standardna devijacija 6.962 nm. Jednofaktorskom analizom varianse istraživana je razlika hrapavosti [nm] triju grupa (Kontrolna, Stevija i Ksilitol). Utvrđena je visoko statistički značajna razlika ( $p < 0.01$ ) hrapavosti [nm] u rezultatima triju grupa:  $F (2, 93) = 29884.272$ ,  $p = 0.000$ . Stvarna razlika između srednjih vrijednosti grupa je velika ( $\eta = 0.9984$ ). **Zaključak.** Prisustvo zubne gleđi u kontaktu sa ksilitolom u in vitro uslovima pokazuje manje izraženu hrapavost nastalu pod korozivnim svojstvima Coca Cole što je potvrđeno i AFM i SEM. AFM analiza površine zuba tretiranog Steviom u in vitro uslovima pokazuje površinsku izraženiju hrapavost, ali organizovaniju kristalnu strukturu u pravcu formiranja apatita što takođe upućuje na moguću zaštitnu ulogu pogotovo u fazi preparacije postojećih oštećenja. Ksilitol i stevia pokazuju potencijal da kao zaslađivači u Cola napitcima mogu da preveniraju razvoj demineralizacije gleđi i potpomažu njen opravak.

**Ključne riječi:** prirodni zaslađivači, nagrizanje gleđi, ksitol, stevia, atomska mikroskopija (AFM, SEM), remineralizacioni potencijal stevie i ksilitola.

**Naučna oblast:** preventivna i dječja stomatologija

**Naučno polje:** stomatologija

**Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrarniku:** B002

**Tip odabrane licence Kreativne zajednice:** Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima.

**MENTOR:** Dr. Jovan Vojinović, Full Professor, Special Field of Study: Preventive and Children Dentistry, Faculty of Medicine, University of Banja Luka

## **EFFICIENCY OF NATURAL SWEETENERS IN PROTECTION OF DENTAL ENAMEL FROM CARBONATED BEVERAGES**

In this dissertation, the aim of research was to determine the effect of natural sweeteners (xylitol and stevia) in protection and recover of tooth enamel as consequence of action of carbonated beverages. Therefore, the aims of the research were oriented in following directions:

- 1) examine to which degree natural sweeteners may protect and recover tooth enamel from damages caused by aggressive Coca Cola soda drink;
- 2) compare results of enamel structure and ultrastructure obtained by application of SEM and AFM technology;
- 3) examine possibility of using parameters of load curves in analysis of changes of enamel surface layers and
- 4) examine type of mineral accumulation in presence of artificial sweeteners in comparison to artificial saliva.

**Methods.** The research was performed on human teeth, extracted because of orthodontic reasons, which were collected according to the ethical procedure and verified by Faculty of Medicine, University of Banja Luka. In total, 96 teeth were chosen, divided into three groups, where 32 samples of enamel were taken from each group (3 mm x 2 mm x 2 mm sized). The samples were prepared for analysis according to the standard procedure. After appropriate treatment for that kind of research, their preparation for analysis was conducted with application of Skenning Electronic Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM). In each group, a half of samples were examined with Skenning

Electronic Microscopy (SEM) application, and the other half with Atomic Force Microscopy (AFM). Analysis was performed using SEM, type *SEM JEOL T220*. Results On most surfaces of different teeth, the effects of xylitol and stevia were compared to control group. The control group was exposed to effect of artificial saliva solution only. In testing with SEM, at stevia, using analysis of mineralised masses, it was detected that crystals were smaller and more directed. In deeper parts, where obviously stronger corrosive Coca Cola impact did not occur, the basic structure of the prisms emerged. Beside that, observed crystal structures develop from spherical globules on surface. Orientation was notable in deeper layers, where transition of amorphous mass to crystal occurred. At xylitol in mineralised mass, a greater number of already formed crystals of larger size was detected, and the crystals were less appropriate for good packaging and remineralisation of enamel. With AFM examination of tooth enamel roughness, nine parameters were followed, sorted in three groups: Control group, Stevia and Xylitol. In each group, three parameters were followed: Rk core, Rpk and Rvk. For each parameter, 32 measures were performed. Thus, minimal measured roughness in Stevia group for Rpk was 1634, and maximal 1804. Medial was 1730.50, approximately measured roughness 1728.50 nm, while standard deviation was 51.301 nm. In Xylitol group, minimal measured roughness was 44 for Rk core, and maximal 70 nm. Medial was 57, and average measured roughness was 57.09 nm, while the standard deviation 6.962 nm. Difference of roughness between three groups (Control, Stevia and Xylitol) was examined with one-factor analysis of variance. Statistically, a highly significant difference of roughness was found ( $p < 0.01$ ) [nm] in results of three groups:  $F (2, 93) = 29884.272$ ,  $p = 0.000$ . Real difference between medial values of groups was great ( $\eta = 0.9984$ ).

**Conclusion.** In vitro conditions, presence of tooth enamel in contact with xylitol shows less expressed roughness occurred under corrosive properties of Coca Cola. This was proved after using AFM and SEM. AFM analysis of tooth surface treated with Stevia in vitro conditions showed a more notable surface roughness, but more organized crystal structure in direction of forming apatite, which also referred to a possible protective role of stevia, especially in the phase of preparation of existing damage. Xylitol and Stevia, as sweeteners in Cola drinks, reveal their potential to prevent development of demineralization of tooth enamel, and support its recover.

**Key words:** natural sweeteners, enamel erosion, xylitol, stevia, atomic microscopy, (AFM, SEM), remineralization potential of stevia and xylitol

**Scientific area:** Preventive and children dentistry

**Scientific field:** Dentistry

**Classification code for Scientific Area according to CERIF codebook:** B002

**Type of chosen license:** Creative Common: Attribution Non-Commercial No  
**Derivatives.**

# S A D R Ž A J

1. UVOD .....	11
1.1. Struktura površine zuba.....	11
1.2 Mehanizam gubitka zubne strukture .....	16
1.3. Mjerenje gubitka zubne strukture.....	19
1.3.1 Parametri za mjerenje gubitka zubne strukture .....	23
1.4. Reparacija oštećenja na zubnoj gleđi .....	31
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	37
3. HIPOTEZA .....	38
4. MATERIJAL I METODE .....	39
5. REZULTATI.....	45
5.1. Ispitivanja pomoću SEM-a.....	45
5.1.1. Kontrolna grupa.....	45
5.1.2. Stevija grupa.....	48
5.1.3. Ksilitol grupa .....	51
5.2. Ispitivanje hrapavosti pomoću AFM mikroskopa.....	53
5.2.1. Kontrolna grupa.....	53
5.2.2. Stevija grupa.....	58
5.2.3. Ksilitol grupa .....	62
5.2.4. Poređenje između grupa .....	66
6. DISKUSIJA .....	69
7. ZAKLJUČAK .....	91
8. LITERATURA .....	92
9. PRILOZI .....	116

## **1. UVOD**

Primjena gaziranih napitaka je u neprekidnom porastu širom svijeta. Pojedine novije studije pokazuju da ih sve više konzumiraju i djeca mlađa od 5 godina, a da je sve veći broj osoba koji unose i po više puta dnevno pa čak i količine preko 1 litra. Jedna studija u Kaliforniji je utvrdila da je 43% ispitivanih petogodišnjaka pilo najmanje jedno gazirano piće dnevno, dok je 4% pilo 4 i više. I to je u skladu sa ranijom velikom studijom [1] koja je pokazale da Kaliforniji preko 40% djece uzrasta 2-11 godina pije najmanje 1 gazirano piće dnevno. Kao mogući opšti poremećaji spominju se gojaznost, povećana agresivnost i drugi oblici poremećanog ponašanja [2, 3, 4].

Gazirani napitci isto tako pokazuju nepovoljne uticaje i na zubnu gled [5, 6, 7, 8]. To su pokazala i naša istraživanja sprovedena u toku 2011 god. [9]. Tada smo otkrili postojanje agresivnih uticaja prilikom in vitro izlaganja zubne gleđi u gaziranom napitku. Oni su se ogledali u narušenom integritetu kristalne rešetke ispitivanom pomoću AFM-a koji se primjećuje već poslije 5 minuta držanja gleđi u rastvoru Coca Cole.

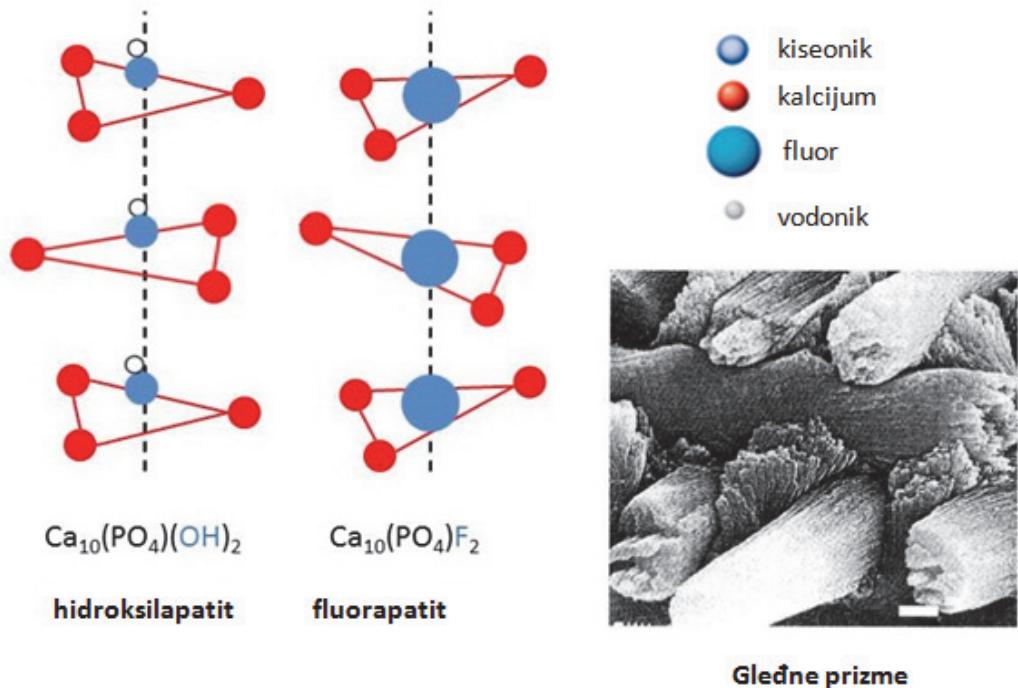
Gubitak zubne strukture inače predstavlja značajan klinički problem savremenog čovjeka i sve veći broj istraživanja je usmjeren ka otkrivanju faktora koji utiču na biohemijske reakcije na površini gleđi [10].

### **1.1. Struktura površine zuba**

Zub je izgrađen od dva veoma kompleksna visokomineralizovana tkiva, gleđi i dentina. Gleđni omotač postoji oko dentinske mase zuba kao zaštita od habanja; dentin posjeduje elastičnost i otporan je na prelome, dok inače krta gleđ posjeduje izuzetnu čvrstoću [11]. Kod sisara se debljina zubne gleđe kreće od 0,05 mm do 5 mm kod nekih rijetkih vrsta majmuna. Prosječna debljina zubne gleđe čovjeka se kreće oko 1 mm–1,5 mm, najizraženija je na krvžicama mladih molara, ali su izražene različite varijacije [12]. Zubna gleđ je

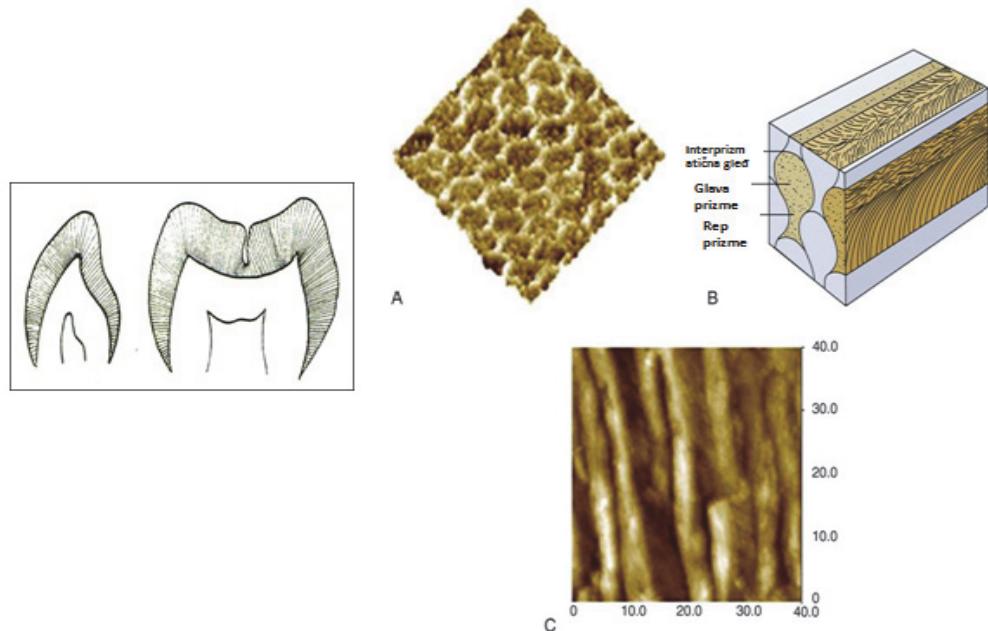
najčvršće mineralizovano tkivo u životinjskom svijetu. Preračunavanja na osnovu trodimenzionalne rekonstrukcije su pokazala da su humani zubi u stanju da podnesu opterećenje od preko 700 N, dok se kod nekih biljojeda može da kreće i do 7000 N [13, 14, 15].

Po sastavu, kako volumenski tako i težinski zubna gleđ najviše sadrži kristalni oblik kalcijum apatit (96-98% w/v), koji se sreće u više oblika. Najvećim dijelom se radi o hidroksil apatitom koji je više ili manje karboniziran, a manjim dijelom fluoriziranom apatitu, a najmanje čistoj formi fluorapatita (slika 1.1).



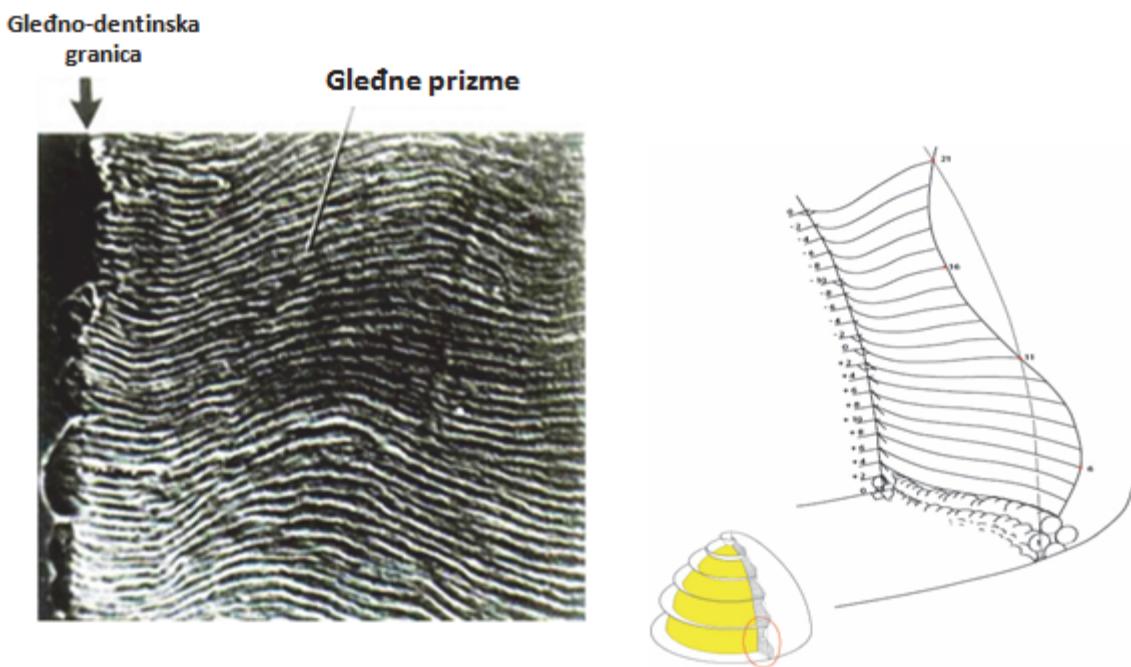
Slika 1.1. Apatitna struktura mineralne faze zubne gleđi

Apatitni kristali su sabijeni u cilindrične strukture koje se pružaju cijelom debljinom gleđi i nazivaju se gleđne prizme (slika 1.1 i 1.2.). Između cilindara prizmi, kod kojih se razlikuju glava i rep, nalaze se kristali sabijeni u drugačijem pravcu koji čine tzv. interprizmatičnu gleđ, koja je po sastavu slična prizmatičnoj [11, 13].



Slika 1.2. Struktura gleđne prizme koja predstavlja sabijene kristale apatita

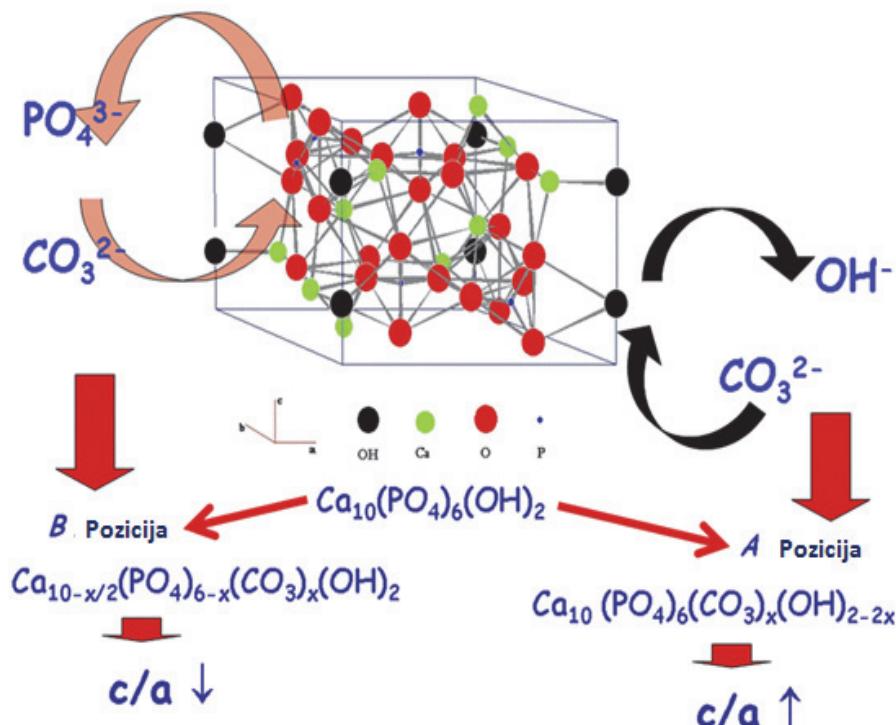
Prizme se ne pružaju pravolinijski kroz debljinu gleđi već prave krivine i u horizontalnoj i vertikalnoj ravni, i time povećavaju mehaničku otpornost gleđi (slika 1.3) [11, 13].



Slika 1.3. Pravac pružanja gleđnih prizmi

Mineralnom strukturom gleđe češće dominira karbonizirana varijanta apatita od čega zavisi i njena otpornost. Karbonizirani apatit nastaje zamjenom OH grupe hidroksila apatita

sa karboksilnom grupom (slika 1.4.) Mineralna faza zubne gleđi se smanjuje u dubljim strukturama, bliže gleđno-dentinskoj granici, gdje se povećava sastav proteina i vode [11, 13].



Slika 1.4. Karbonizirani hidroksil apatit koji čine veliki dio sastava mineralne faze gleđi

Gleđne prizme se inače formiraju posebnim sekretornim aktivnostima, ektodermalnih ćelija ameloblasta. One proizvode gleđne proteine (prije svega amelogenina i enamelina) koji formiraju mrežu pomoću koje se usmjerava položenje i orijentacija osnovnih kristala apatita. Svoju funkciju ameloblasti obavljaju tako što se na njihovom proksimalnom dijelu prema površini na kojoj se stvara dentin stvaraju jedan protoplazmatični nastavak označen kao **Tomesov nastavak**. Povlačenje ćelije suprotno od fronta formirajućeg denitna i postavljanje nastavka određuje i pravac izlučivanja i položenja kristala apatita. Tomesov nastavak se gubi na samoj površini gleđi i tu se više ne stvaraju prizme već se minerali polože u jedan homogeni sloj označen kao aprizmatična gleđ [11].

Svaka gleđna prizma je oko 5 μm široka i 9 μm dugačka. Prektivena je sa, oko nanometar debljine, slojem proteina enamelina i ona sadrži oko milion pojedinačnih kristala

hidroksil apatita. Apatit se taloži u osnovnim jedinicama nanokristala koje nisu veće od 100 nm, mjerena su pokazale oko prosječno 70 nm dužine i između 25-40 nm debljine [11, 13].

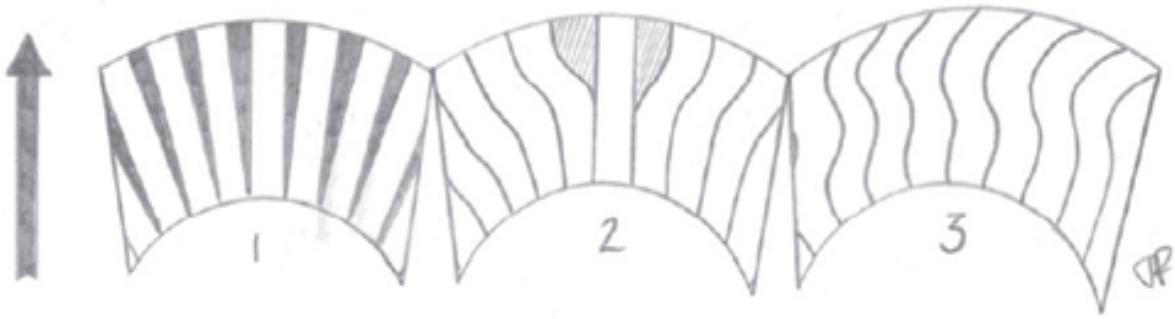
Gledne prizme se obično opisuju da imaju izgled ključaonice ili riblje krljušti i da se razlikuje tijelo, glava i rep (slika 1.4.) [15].

Zubna gleđ je značajno čvršća (posjeduje veću otpornost na deformacije) duž uzdužne ose same prizme u odnosu na poprečni dio, mada dolazi i do ukrštanja prizmi (slika 1.1 i 1.3). To je posebno značajno kod preloma. Takva slika je posebno zastupljena u predijelu gleđno-dentinske granice. U odnosu na incizo-apikalni (dentinski) pravac, prizme su postavljene u odnosu na gleđno-dentinsku granicu pod uglom od  $70^0$  da bi u predijelu vrata zuba iznosio i čitavih  $90^0$  (slika 1.3), što je od izuzetnog značaja za preparaciju zuba. Pravac pružanja prizmi ima isto tako značaja kod gubitka gleđne substance, jer se pokazalo da su otpornije na poliranje prizme postavljene pod pravim uglom, u odnosi na one koje su paralelne prema površini [16, 17].

Zanimljiv je fenomen da je periferna površina gleđi i do 30% veća nego unutrašnja prema gleđno-dentinskoj granici. Za to postoji nekoliko objašnjenja [18, 19]:

1. povećanje interprizmatične gleđi kako se prizme pružaju više periferno.
2. izgradnja ili grnanje novih prizmi prema površini u cilju da se popuni prostor
3. promjena ugla pružanja prizmi prema periferiji što rezultuje u povećanju volumena na zakriviljenoj površini.

Na slici 1.5. su prikazane ove teorije:



*Slika 1.5. Teorije koje objašnjavaju zašto je površina gleđi veća na okluzalnoj površini u odnosu na predio gleđno-dentinske granice odakle polazi preuzeto od Fielda [20]. 1) povećanje interprizmatične substance; 2) širenje novih prizmi; 3) promjene ugla pružanja prizmi sa zaobljenim prikazom na površini.*

Poslednjih godina vršena su nanoispitivanja površine gleđi sa ciljem definisanja njene tvrdoće i modula elastičnosti. Vrijednosti tvrdoće gleđi se određuju pomoću indentera koji se pokreće preko površine uzorka na koju vrše pritisak definisanim silom i mjeri u jedinici vremena. Koriste se dva osnovna tipa jedinica tvrdoće prema tzv Knoop-ovoj i Vikers-ovoj skali, pri čemu se prva češće koristi kod krtih materijala ili tankih sekcija uzorka zbog njihovog plitkog zubca [21]. Pojedini istraživači su protivnici primjene metričkog utvrđivanja tvrdoće, jer preračunavanje iz Vikers-ove skale podrazumijeva podjednaki kontakt vrha indenta sa površinom uzorka, a provjere pomoću SEM sonde pokazuju da ne postoji potpuno jasna površina i često nije jasno definisana sila kod ispitivanja gleđi [22]. Ipak utvrđene su vrijednosti prema Knoop-ovoj skali u rasponu od 272 do 440 za humanu gleđ pri čemu se tvrdoća povećava u spoljašnjim slojevima [23].

## 1.2. Mehanizam gubitka zubne strukture

Danas se opisuju tri vrste gubitka zubne strukture: atricija, abrazija i abrifikacija [24, 25, 26].

1. Atricija, poznata i kao trošenje uslijed kontakta dva tijela, je posljedica međusobnih kontakata dva zuba. To se najprije događa na incizalnim ivicama donjih sjekutića, pa zatim na okluzalnim površinama bočnih zuba.

2. Abrazija nastaje kada se pored dva zuba koja su u međusobnom kontaktu pojavljuje treće strano tijelo na površini zuba. Tipičan primjer za to je četkica za zube ili zubna pasta sa abrazivnim česticama. To mogu da budu i predmeti koji se drže između zuba, na primjer keramička lula, olovka, spajalica i sl.

3. Erozije nastaju kao posljedica dejstva korozivnih materija, prije svega različitih kiselina nebakteriskog porijekla, po čemu se razlikuju od dentalnog karijesa. One su uglavnom lokalizovani proces u kome zubne strukture ulaze u sredinu sa poremećenom ravnotežom demineralizacije i remineralizacije.

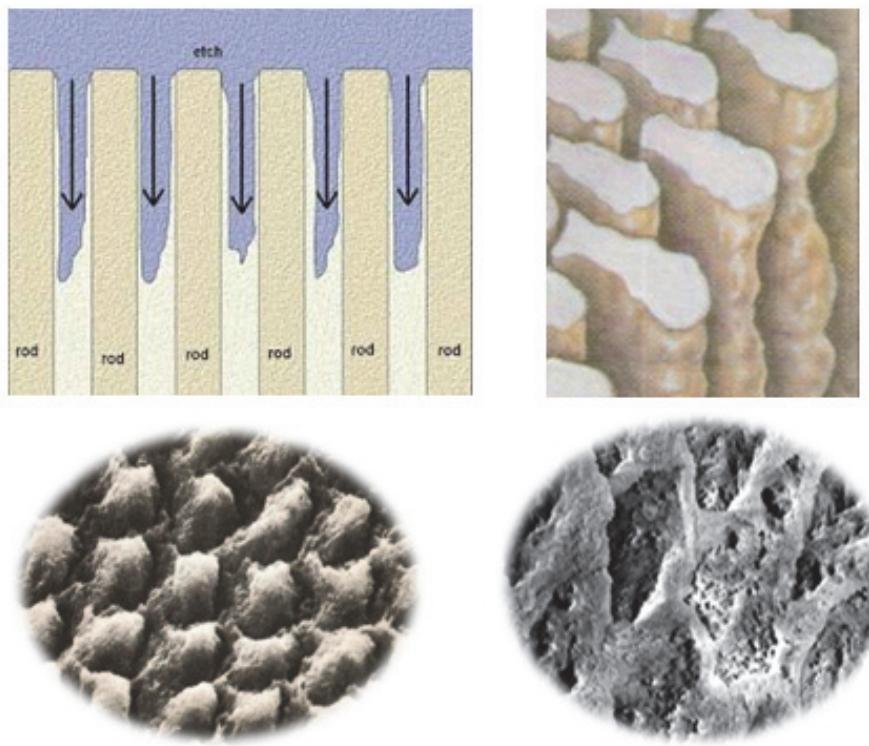
4. Abfrakcija je četvrti tip gubitka zubne substance koji označava gubitak tvrdih zubnih tkiva u cervikalnom predijelu zuba. Smatra se da je uzrok neprekidni ciklus opterećenja i rasterećenja kroz koje Zub prolazi tokom žvakanja, ali za to još nema dovoljnih naučnih dokaza.

Danas se uglavnom koristi naziv gubitak površine zuba jer nekadašni termin „trošenje zuba“ upućuje na prisustvo neke abrazivne komponente. U stvarnosti u gubitku zubne substance najčešće učestvuje više različitih komponenti, a ne samo mehanički abrazivni faktori [23].

Kada je riječ o erozijama, najčešće se misli na dejstvo kiselina, mada postoje nalazi oštećenja zubne gledi i pod dejstvom jakih alkalnih materija [27].

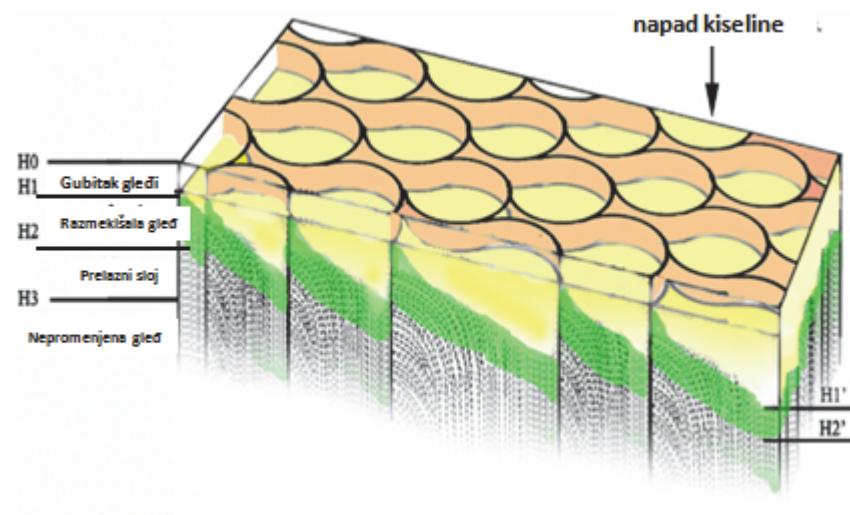
Pod dejstvom kiselina dolazi do rastvaranja mineralne faze (apatita) u gledi što rezultuje u slabijoj, mekšoj površini, koja je osjetljivija na fizičke iritacije. SEM istraživanja su pokazala da prvo započinje atak na same prizme i njihove rubove, pa tek zatim na interprizmatični dio. To dovodi do izgleda pčelinjeg saća. Sam erozivni proces je centripetalan, kreće se od spoljašnjih dijelova prizme prema unutra. U početku je bez uočljivog gubitka tkivne mase [28, 29, 30].

Karakteristike erodirane površine zavise od oblika dejstva kiselog faktora. Kod izražene brzine prodora niskoviskozne tečnosti sužavaju se obodi prizmi, a površina gleđi je uglavnom ravnija. Kod manje brzine prodora, udružene sa pokretanjem i dužim zadržavanjem, demineralizovani obod prizmi je širi i korodirana površina pokazuje veći defekt [20, 31] (Slika 1.6.).



*Slika 1.6. Dejstvo kiseline na površinu prizme u zavisnosti od viskoziteta i brzine prodora [28, 29, 30].*

Samо dejstvo kiseline počinje od površine i napada bočne dijelove prizmi, odvajanjem nano blokova apatita veličine maksimalno do 100 nm. Ispod skinutih slojeva se nalazi zona razmekšale gleđi i prelazne gleđi koja ne pokazuje značajne mahaničke promjene, ali se uočava veća poroznost (Slika 1.7).



*Slika 1.7. Mehanizam dejstva kiseline na površini gleđi (pozajmljeno od Chenga i sar. [31])*

SEM studije pokazuju određene razlike u erozivnom procesu u cervikalnoj gleđi, ali ne postoje dokazi o razlikama između pojedinih vrsta humanih zuba [32].

Kada je riječ o dejstvu alkalnog agensa, proces nastanka erozivnog oštećenja je drugačiji u odnosu na kiseline. Tu prvo započinje razgradnja organskih komponenti gleđi koje podupiru apatitnu masu. Njihovom razgradnjom praktično dolazi do kolapsa prizmi [33].

### 1.3. Mjerenje gubitka zubne strukture

Mineralizovana biološka tkiva spadaju u kompleksnu grupu različitih kombinacija organskih i neorganskih molekula na nanonivou, koje određuju njihove biološke i mehaničke osobine, zbog čega je značajna mogućnost njihovog kvantitativnog i kvalitativnog mjerena [34].

In vivo klinička i eksperimentalna vizuelizacija je veoma neprecizna i površna za mjerenje nivoa oštećene gleđi. Klasične mikroskopske tehnike omogućavaju identifikaciju površinskih promjena, ali ne i njihovu kvantifikaciju. Kako sva oštećenja krunice zuba počinju od njene površine neophodno je poznavati istraživačke i dijagnostičke metode koje bi egzaktno pratile stepen oštećenja, oporavka mineralne faze i omogućile ranu dijagnozu. Do sada je, prije svega u istraživačke svrhe, sa više ili manje preciznosti primijenjeno više metoda praćenja promjena na površini gleđi [20].

Najčešće primjenjivane metode se mogu podijeliti u dvije grupe:

1. direktna tehnika i
2. mikro i nanoskopske tehnike.

*Direktne tehnike* vizuelnog posmatranja ne mogu i pored određenih optičkih uvećanja (stereoimagerija) da otkriju početne promjene i gubitak minerala prije pojave defekta u gleđi (bijela mrlja, kavitet, erozija). Čak i ako se otkriju one nisu u stanju da razluče površinske osobine preostalog tkiva i njenu čvrstoću [38, 39].

*Mikroskopske i nanoskopske tehnike* koje se primjenjuju za praćenje površinske strukture i oštećenja zubne gleđi su [5, 20, 36]:

- Polarizacioni svjetlosni mikroskop (PLM),
- Interferometrija bijele svjetlosti (WLI),
- Laserski indukovana fluorescencija (QLF/LIF),
- Mikroradiografija,
- Skening elektronski mikroskop (SEM),
- Optička koherentna tomografija (OCT),
- Kumulativno oslobađanje kalcijuma (CCR),
- Nanourezivanje (Nanoindentation),
- Propustljivost koda,
- Konofokalni skening laser mikroskopija (CSLM),
- Površinska profilometrija,
- Mikroskop međuatomskih sila (Atomic force microscopy – AFM).

Dvije metode danas dominiraju u istraživačkom opusu promjena na zubnoj gleđi.

*Skening elektronska mikroskopija* (SEM) je jedna od prvo uvedenih i još uvijek najčešće korišćenih tehnika za ispitivanje površine i resorpcije tvrdih zubnih tkiva. Ova tehnika se zasniva na prikupljanju elektrona odbijenih refleksijom sa površine zuba i na osnovu tog signala se formira topografija. Dobija se 3-D slika visoke rezolucije. Da bi se elektroni odbijali od površine neophodno je da se ona presvuče elektroprovodljivim materijalom, najčešće zlatnom parom ili osmijumom. Postoji i varijanta gdje se biološka površina ne presvlači već se skenira ne pripremljena u posebnim komorama pod pritiskom

koje sprečavaju elektrostatičko nanelektrisanje. Nepovoljnost ove tehnike je što se ispitivani uzorak nepovratno uništava [44].

Većina navedenih tehnika se bazira na kvantifikaciji količine izgubljenog tkiva zuba, dok je vrlo malo onih koje pokušavaju da opišu karakteristike preostale površine. To su omogućili tek savremena ostvarenja *nanotehnologija*. Nanotehnologije omogućavaju detektovanje promjena na nanoskali od 1 do 100 nm. Pomoću specijalnih istraživačkih nanosondi danas je moguće mjeriti rezolucije i pomjeranja na nivou nanometara i pikomolara [45]. To omogućava i precizno registrovanje i fizičkih svojstava zdrave – nepromijenjene gleđi, dentina i cementa korjena zuba, kao i sprovođenje takvih analiza hemijskih procesa i bioloških transformacija koje do sada nije bilo moguće izvršiti [44, 45].

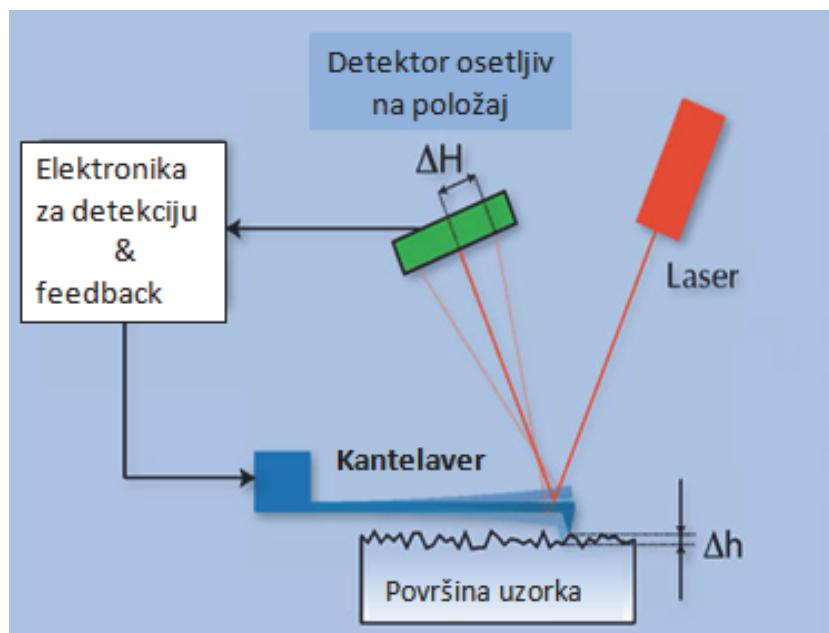
Poseban napredak u analizi nanostruktura različitih površina ostvaren je razvojem mikroskopa atomskih i magnetnih sila (Atomic Force Microscopy – AFM i Magnetic Force Microscopy – MFM). Ovaj sofisticirani aparat baziran je na visokoj rezoluciji svoje sonde koja može da detektuje frakcije u nanometrima i to mnogo bolje (1000 puta preciznije) nego što je granica optičkog prelamanja [5, 44].

Tvorci ove tehnologije su naučnici Gerd Binning i Heinrich Rohrer iz IBM istraživačke laboratorije u Rüschlikonsu u Švajcarskoj. Oni su 1981. godine sa pronalaskom *skening tunel mikroskopije* ostvarili vjekovni san naučnika – mogućnost posmatranja pojedinačnih molekula i atoma, zbog čega im je i dodijeljena Nobelova nagrada 1986. godine [44].

Osnovni princip rada AFM-a se ne razlikuje mnogo od funkcionalnosti nekadašnjih gramofona, kod kojih je oštra igla u gramofonskoj glavi prelazila i skenirala vinilnu gramofonsku ploču, prenosila mehaničke promjene u električni signal i reprodukciju zvuka. AFM ne „vidi“ atome već ih praktično „osjeća“ tako što se ispitivana površina skenira pomoću veoma oštrog konusa od silikona ili silikon nitrida. Konus se nalazi na kraju

fleksibilne konzole – „*kantilevera*“ koji može da prati čak i najmanje detalje na površini. Kada se vrh konusa, koji se sastoji od pojedinačnog atoma približi površini uzorka on se pomjera pod dejstvom sila između njih. To može da bude mehanička sila, van der Waalsova sila, kapilarna sila, hemijska veza, elektrostatička sila, magnetna sila, Casimirova sila, i druge u zavisnosti od vrste uzorka. Ovo sićušno pomjeranje se mjeri pomoću mudrog trika (slika 10). Laserski snop se usmjerava na vrh kantilevera, od koga se snop odbija prema detektoru osjetljivom na poziciju. Promjene položaja laserskog snopa u odnosu na detektor (na slici označene sa  $\Delta H$ ) kao posljedica pomjeranja kantilevera (na slici označeno kao  $\Delta h$ ) je proporcionalna razlici između detektora i kantilevera.

Ukoliko je ta razlika dovoljno velika, čak i minimalna pomjeranja mogu da se registruju, čime se omogućava ispitivanje promjene strukture površine u visini atoma. Aparat predstavlja mikroskope (nanoskop) najveće moći rezolucije. Na osnovu toga može da se formira mapa ispitivane površine [47].



Slika 1.8. Princip funkcionisanja AFM

Za AMF analizu nije potrebna priprema površine uzorka, ali se mora računati i na postojanje artefakata kao posledica nečistoća ili zatupljenosti vrha kantelavera. Uglavnom se koristi konstantno prisustvo sile na vrhu, mada kod mekših uzoraka se prelazi na naizmjenični mod. AFM je veoma zastupljen u ispitivanju erozija na humanoj gleđi i pokazao se kao vrlo koristan instrument za registrovanje početnih stadijuma demineralizacije [48].

Posljednjih godina su predložene i neke nove tehnike za određivanje debljine gleđi poput fokusiranog ultrazvuka ili „stereoimaging“ koje nešto preciznije kvantifikuju gubitak zubnog tkiva, ali ne i tačnu karakteristiku površnog oštećenja [35, 36].

Naše istraživanje [5] je pokazalo da se pomoću AFM mogu uspješno pratiti promjene na površini gleđi, tumačiti ultrastruktura konfiguracija kristalne faze i oštećenje nastalo pod uticajem različitih spoljašnjih faktora. Slične zaključke su donijele i druge studije u kojima su promjene na površini gleđi registrovani pomoću AFM-a [47, 48]. Pojedini istraživači su naveli određene prednosti u analiziranju površinskih promjena na gleđi pomoću SEM-a [44, 45, 47–51].

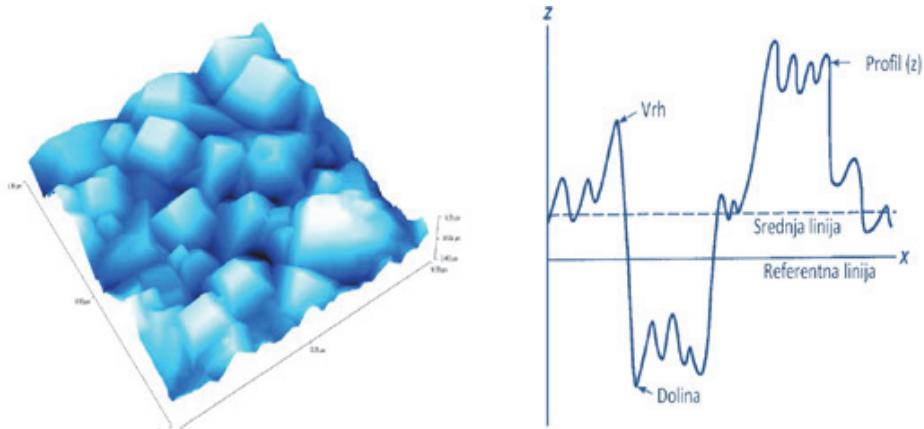
### 1.3.1 Parametri za mjerjenje gubitka zubne strukture

Promjene na nekoj površini se označavaju kao hrapavost, a nauka koja to izučava se naziva **tribologija**. Tačna definicija tribologije je: „nauka koja proučava događanja na površinama dva tijela u dodiru ili relativnim kretnjama (označavaju se kao triboelementi)“. Najšeće promjene su trenje i trošenje, i prije svega je zastupljena u mašinstvu i drugim inžinjerskim naukama, ali se prenosi i na biološke čvrste strukture.

U prirodi, površine značajno ostupaju od idealnog stanja, kako po obliku, tako i po hemijskom sastavu i strukturi, što je od izuzetnog značaja za praćenje njihovog stanja u homeostazi kao i predviđanje daljih promjena ili terapijskih intervencija.

Svaki dio površine gleđi sačinjen je od teksture i hrapavosti, koja pak varira u odnosu na histološku građu i lokalizaciju. Na svakoj površini razlikujemo njenu topografiju i profil.

U početnim tribološkim praćenjima se veća pažnja posvećivala dvodimenzionalnoj komponenti (2D), danas se sve više pažnje posvećuje topografiji površine. Parametri za mjerjenje profila se označavaju kao 2D parametri, a za mjerjenje topografije kao 3D. Na slici 1.9. je prikazano prevođenje jedne površine u dvodimenzionalnu ravan [53].

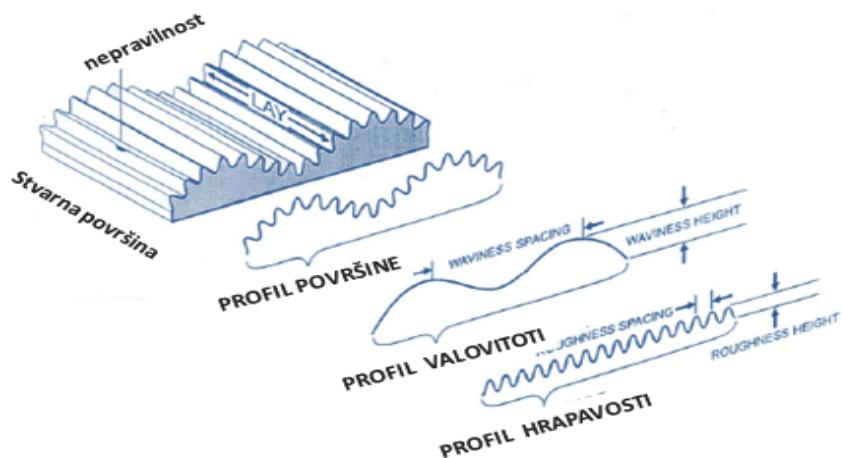


Slika 1.9. Topografija jedne površine predstavljena u presjeku. Pozajmljeno od Mitrovića [53].

Najzančajniji pojmovi koji se koriste u tribologiji definisani su prema standardima ISO 4287 [54]:

**Površinska hrapavost:** skup mikrogeometrijskih nepravilnosti na površini predmeta koje su mnogo manje od veličine samog predmeta. Ove nepravilnosti na gledi mogu da nastanu pod uticajem mehaničkih ili hemijskih agenasa.

**Profil površine:** presjek stvarne površine sa određenom ravni, što je najbolje predstavljeno na slici 1.10.



Slika 1.10. Komponente 2D profilometrije. Modifikovano od Mitrovića [53]

**Profil valovitosti:** profil koji prikazuje nepravilnosti većih talasnih dužina(nepravilnosti koje se nalaze na većem rastojanju). Dobija se iz osnovnog profila primjenom profilnih filtera  $\lambda_f, \lambda_c$ .

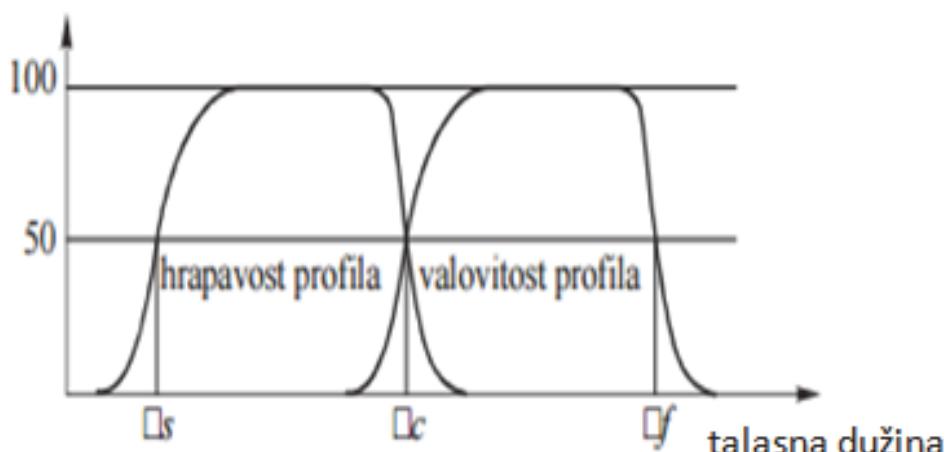
**Profil hrapavosti:** prikazuje nepravilnosti manjih talasnih dužina(koje se nalaze na manjem rastojanju). Dobija se se iz osnovnog profila zanemarivanjem komponenti većih talasnih dužina, a korišćenjem drugačijeg filtera  $\lambda_c$ .

**Profilni filter** razdvaja osnovni profil na kratke talasne dužine (hrapavost) i velikih talasne dužine (valovitost) i definisan je ISO standardom 11562 [55, 56]. Suština filtera je izražena preko Gaussianovove formule:

$$S_{1D}(i) = \frac{1}{\alpha\lambda} e^{-\pi(\frac{i}{\alpha\lambda})^2}, \alpha = \sqrt{\frac{\ln(2)}{\pi}} = 0.4697$$

gde je  $\lambda$  prekid talasne dužine.

Postoje tri filtera koji se koriste u uređajima kojima se mjeri hrapavost, valovitost i primarni profil  $\lambda_c, \lambda_f, \lambda_s$  (slika 1.11) i sve imaju isti prenosni značaj definisan u ISO standardu 1156-2, ali različite granične talasne dužine. Sve pojave se inače analiziraju u pravougaonom koordinatnom sistemu u kome su ose x i y smještene na promatranoj površini, a osa z usmjerena prema susjednom medijumu. Osa x je pri tome usmjerena u smjeru profila hrapavosti.



Slika 1.11. Prenosne karakteristike profila valovitosti i hrapavosti

**Srednja linija profila** se definiše posebno za svaki profil (osnovni, valovitosti i hrapavosti). Za osnovni profil se dobija metodom najmanjih kvadrata, tada srednja linija profila dijeli profil tako da je unutar neke dužine  $l$  zbir kvadrata svih odstupanja od profila  $Z$  od te linije najmanji(slika 1.9.). U slučaju profila valovitosti i profila hrapavosti upotrebljavaju se profilni filteri  $\lambda_c$  i  $\lambda_f$ .

Pošto je hrapavost odraz površinske strukture, ona utiče i na način na koji se ta površina troši. Osnovna kvantifikacija se vrši na osnovu vertikalnih odstupanja površine od njene idealne forme. Trebalo bi da što je to odstupanje veće da je površina neravnija, ali način na koji se to interpretira može da dovodi do pogrešnog tumačenja stvarnog stanja površine. Na slici 1.12 su prikazana dva profila koja pokazuju istu prosječnu hrapavost, a suštinski se međusobno značajno razlikuju u odnosu na realni izgled površine. Zbog toga je od uvođenja internacionalnih standarda(ISO) 1984 godine, razvijeno preko 100 različitih parametara za mjerjenje hrapavosti [20, 57].



*Slika 1.12. Dva profila sa istom Ra vrijednosti, ali sa značajno različitim površinskim karakteristikama. Crveno označena površina određuje „idealni“ oblik površine. Profili imaju istu vrijednost parametra Ra jer je odstupanje od idealne forme iste veličine [20].*

Najpoznatiji 2D (dvodimenzionalni) parametri za prikazivanje hrapavosti su [20, 57, 63]:

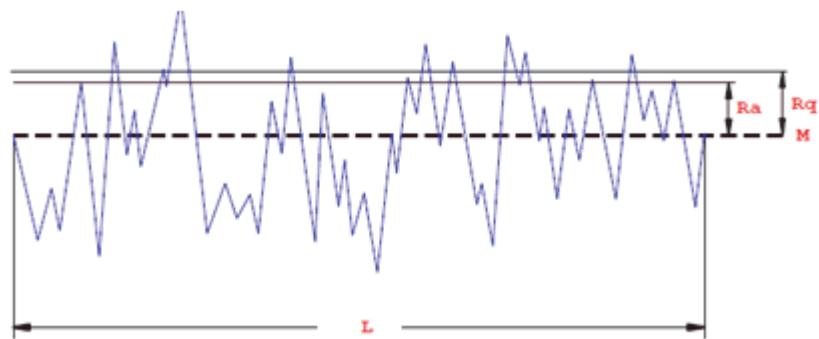
1. **Prosječna hrapavost Ra** predstavlja aritmetičku sredinu odstupanja profila od srednje linije. I ona se izračunava prema formuli:

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |Z(x)| dx$$

2. **Srednja vrijednost kvadratnog odstupanja  $Rq$  (rms)** predstavlja prosječnu vrijednost kvadratnog odstupanja profila od srednje linije. Izračinava se prema formuli:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L Z^2(x) dx}$$

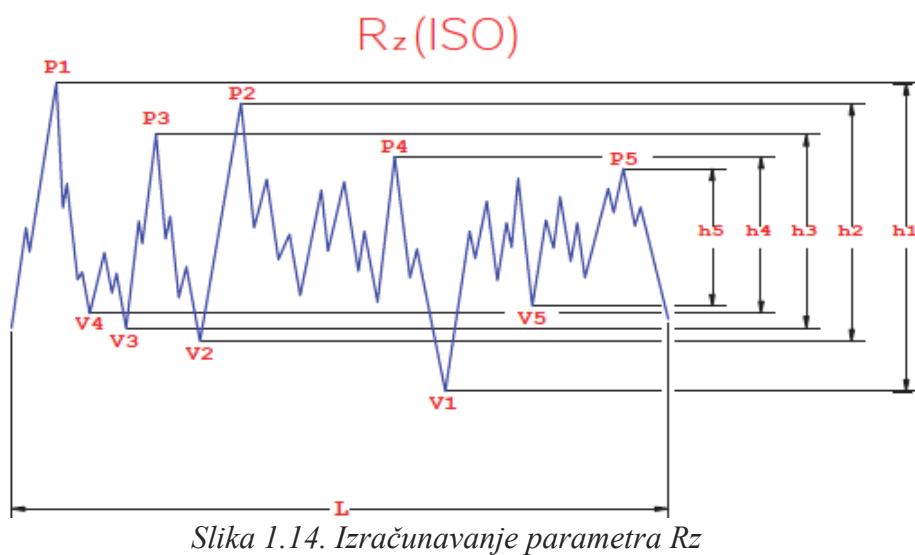
Na slici 1.13. je grafički prikazano porijeklo parametara  $Ra$  i  $Rq$ .



*Slika 1.13. Parametri  $Ra$  i  $Rq$ .  $L$  (valuaciona dužina) predstavlja dužina profila na kojoj se vрšilo ispitivanje hrapavosti.  $M$  (srednja linija) je referentna linija oko koje dolazi do devijacije*

3. **Srednja vrijednost rastojanja između najviše i najniže tačke profila  $Rz$ (ili  $R_{10z}$ )** definiše se kao prosječna vrijednost rastojanja pet najviših i pet najnižih tačaka profila (slika 1.14.). Izračunava se prema formuli:

$$R_z = \frac{P_1 + P_2 + \dots + P_5 - V_1 - V_2 - \dots - V_5}{5}$$



*Slika 1.14. Izračunavanje parametra  $Rz$*

Danas je usavršen veći broj tehnika koje mogu da izvrše 3D mjerjenja većih zona jedne površine. Tu spadaju npr. optička profilometrija sa bijelom svjetlošču, i različita laserska mjerjenja gdje spadaju i AFM tehnike. Moderni uređaji omogućavaju karakterizaciju površine od 50 kvadratnih milimetara u jednom mjerenu i mogu se detektovati detalji u rasponu od 0,1 nm do 8 mm. Na osnovu takvih 3D mjerena mogu se donositi mnogo precizniji zaključci o stanju površine nego sa dvodimenzionalnim tumačenjima. U početku su se pri 3D mjerjenjima koristili isti gore navedeni parametri samo što im je umjesto oznake R dodavana oznaka S (Sa, Sq, Sz). Za razliku od parametara R koji se odnose samo na jednu liniju, S parametri se odnose na cijelu površinu [20, 53, 57, 58, 63].

Kasnije se uvode parametri koji mogu da opisuju funkcionalne karakterizacije površine koje su od velikog značaja za odnose sa okolnim medijima. Ovi funkcionalni parametri su izvedeni iz tzv. **krive nosivosti** (bearing curve) koja se još označava i kao Abbe-Fajerstonova kriva (Abott-Firestone curve), po autorima koji su je prvi opisali. Prvobitna namjena je bila da se ovaj princip koristi za testiranje novobrađenih površina [58]. Kriva nosivosti fizički predstavlja udio noseće površine(dio površine koja nosi opterećenje) na različitim visinama(od najvišeg vrha do najniže doline). Kriva nosivaosti i izvođenje funkcionalnih parametara se vrši prema ISO 13565 standardu što je predstavljeno na (slici 1. 15). Povlači se horizontalna linija za vrijednosti udjela noseće površine 5% i 80%, neki ove linije obilježavaju sa  $Z_{0.05}$  i  $Z_{0.8}$ . Nastale zone nazivaju se zone pikova, centralna zona(zona jezgra) i zona dolina [20, 59–63].



Slika 1.15. Formiranje krive nosivosti prema Miletiću [53]

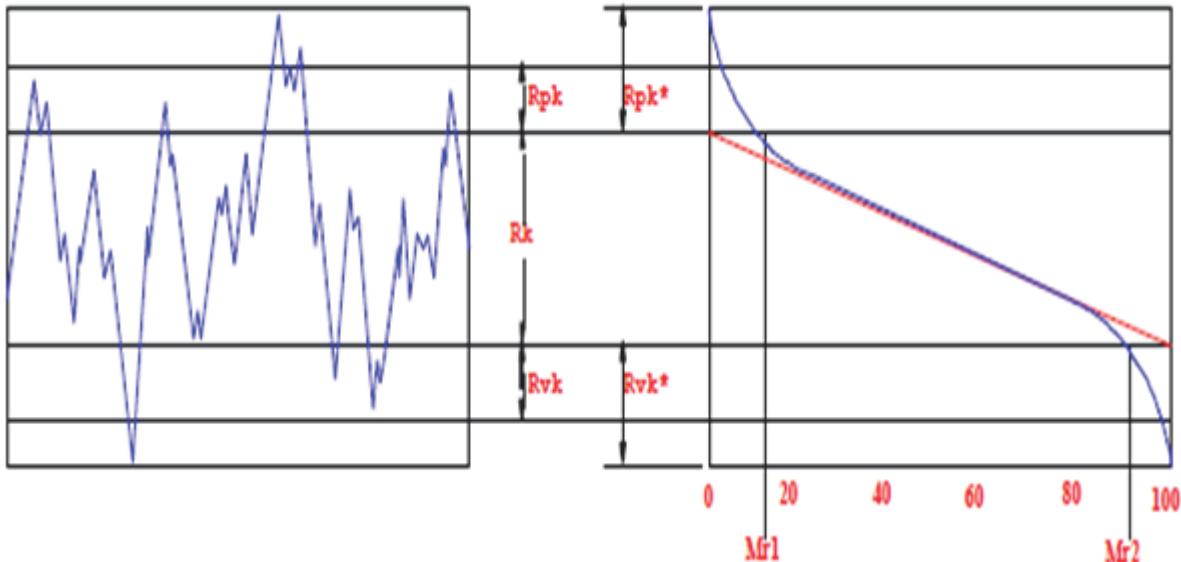
U osnovi kriva zone nosivosti predstavlja zbirnu distribuciju dužina pojedinačnih platoa koja bi nastala ukoliko bi površina bila abradirana do nivoa ravni na toj visini. Kriva prati nivo ravni od najvišeg pika do najniže doline, na svakom nivou profila. Količina materijala obuhvaćenog presjekom se prikazuje kao proporcija (dio) cijelokupne površine (slika 1.16.).

**Indeks nosivosti površine (Sbi)** pokazuje koji dio gornje zone površine učestvuje u habanju. On predstavlja odnos RMS devijacije i visine  $Z_{0.05}$  koja odgovara 5% udjelu noseće površine. Izračunava se prema formuli:

$$Sbi = \frac{Sq}{Z_{0.05}} = \frac{1}{h_{0.05}}$$

Na osnovu krive nosivosti se određuju funkcionalni parametri. Prvo se traži segment krive nosivosti koji ima najmanji nagib, pa se zatim metodom najmanjeg kvadrata određuje prava linija koja prolazi kroz pomenuti segment. Veličina segmenta mora biti 40% od veličine krive nosivosti. U tačkama presjeka nastale linije i vertikalnih linija na pozicijama 0% i 100% x ose, ucrtavaju se horizontalne linije. Zatim se ucrtava linija sa početkom u tački presjeka krive nosivosti i gornje horizontalne linije i krajem na vertikalnoj liniji 0%. Položaj

krajnje tačke treba da je takav da površina oformljenog trougla odgovara površini između krive nosivosti i gornje horizontalne linije. Na sličan način se ucrtava linija od donje horizontalne linije do vertikalne linije 100% (slika 1.16.) [20, 57, 59–63].



Slika 1.16. Funkcionalni parametri proistekli iz krive nosivosti

Najznačajniji parametri proistekli iz krive nosivosti, a definisani prema ISO 13565-2[61-63] su:

**R<sub>k</sub> (hrapavost u srednjoj zoni – “Core Roughness”)** je mjera nominalne hrapavosti, odnosno rastojanja od najviše do najniže tačke koja bi nastala nakon uklanjanja dominantnih vrhova i dolina. Predstavlja hrapavost površine koja nosi opterećenja nakon početnog uklanjanja vrhova. On se određuje na Y osi postavljanjem 40% linije na krivu nosivosti na minimalnoj tački pada i presjekom sa produženim linijama 0% i 100% (slika 1.16.).

**R<sub>pk</sub> (redukovana visina vrhova)** predstavlja mjeru visine vrhova koji se nalaze iznad nominalne hrapavosti površine, odnosno vrhova koji izviru iznad glavnog platoa površine. Pokazatelj je materijal koji se prvi uklanja pri mehaničkom dejstvu. Više vrijednosti R<sub>pk</sub> ukazuju da je površina kontakta mala zbog visokih vrhova. U većini slučajeva je

potrebna niža vrijednost Rpk kako bi se smanjio broj čestica nastalih prilikom trenja. Određuje se na osnovu šeme prikazane na (slici 1.16). Predstavlja visinu desnog trougla na Y osi od 0% do tačke M1.

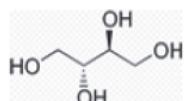
**Rvk (redukovana dubina doline)** predstavlja mjeru dubine doline ispod nominalne hrapavosti, tj. doline ispod glavnog platoa površine. Najviše se koristi za procjenu sposobnosti zadržavanja fluida i zarobljavanja čestica habanja. Određuje se isto na osnovu (slike 1.16.) i to kao visina lijevog trougla. Osnovica nastalog trougla se često označava i kap Sr2-. Razlika 100-Mr1 predstavlja udio površine koju sačinjavaju najdublje doline.

#### **1.4. Reparacija oštećenja na zubnoj gledi**

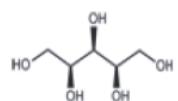
Malo je istraživanja do sada koja su imala za cilj da ispitaju mogućnost i stepen reparacije oštećenog tkiva gleđi poslije dejstva gaziranog napitka. Uglavnom su ispitivane pojedine zubne paste sa fluoridima, argininom i kazein-fosfopeptidom u amorfnom kalcijum fosfatu (CPP-ACP) [64, 65]. Stepen oporavka gleđi je bio različitog intenziteta i najviše izražen kod arginina i CPP-ACP. Nismo pronašli studije koje bi ispitivale u kojoj mjeri prethodni tretman sa pojedinim preparatima smanjuje intenzitet promjena [65, 66].

U poslednje vrijeme se sve više spominje uloga polalkohola(poliola) Ksiliola(Xyilitol), ne samo u inhibiciji razvoja kariogenih mikroorganizama (*S. mutans*), već i u remineralizaciji zubne gleđi. Ksilitol spada u aciklične polialkohole koji predstavljaju takođe grupu ugljenih hidrata, ali za razliku od šećera slabije se razlažu i absorbuju znatno sporije u digestivnom traktu. Hemijski se polioli još nazivaju i šećerni alkoholi jer predstavljaju jedinjenja slična ugljenim hidratima kod kojih je karboksilna grupa zamijenjena sa reaktivnom hidroksilnom. Dijele se u dvije velike grupe aciklične alkohole ALDITOLE i ciklične poliole (slika 1.17.).

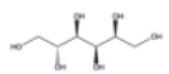
**ALDITOLI(glycitoli)**  
*Aciklična jedinjenja*



**Eritritol**  
**4 C atoma**



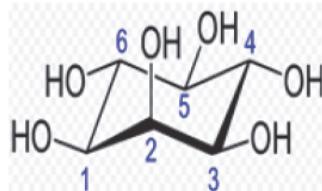
**Xylitol**  
**5 C atoma**



**Sorbitol**  
*D-glucitol*  
**6 C atoma**

**CIKLIČNI POLIOLI**

**Inositol**



*Slika 1.17. Polioli (preuzeto od Vojinović i sar. [71])*

Polioli se nalaze u laguminozama, pojedinom voću (šljive), pečurkama, žitaricama i drugim namirnicama bogatim sa vlaknima. U hrani obično zamjenjuju šećere u odnosu 1:1. Imaju slabiji uticaj na podizanje glukoze u krvi i stvaraju od 0 (eritrol) do 3 kcal/g. Bakterije usne duplje, posebno kariogene iz oralnog biofilma, ne mogu ili minimalno razlažu poliole, a samim tim ne stvaraju kiseline uzročnike gleđne demineralizacije. Ksilitol je uveden u stomatologiju 70-tih godina prošloga vijeka i brojne studije su ukazale na sposobnost smanjenja karijesa [67, 68].

Ksilitol (sinonimi: xylitol, xylit, Kylit, newtol, Klinit; kannit, eutrit, Meso-X, E967) spada u grupu alditoala sa 5 ugljenikovih atoma. Izolovan je još davne 1881. god. nezavisno od nijemca Fisher-a (iz kore breze) i francuza Bertrand-a (iz slame pšenice i ovsu). Ipak tek 1950. godine biohemičar Touster otkriva da ksilitol predstavlja regularni sastojak metaboličkog procesa kod čovjeka (pentozni šant) [69, 71].

Osnovna svojstva ksilitola su (Slika 1.18.):

Hemisjke osobine		Fizičke osobine	
CB broj	CB4353243	Rastvorljivost u vodi	169g/100ml na 20 °C
Formula	C4H12O5	Tačka topljenja	92 °C
Gustina	1,52 g/cm <sup>3</sup>	Tačka ključanja	216 °C
Hemisjke osobine		Fizičke osobine	
Molarna masa	152.15 g/mol	Optička aktivnost	nema
MOL file	87-88-0 mom	Ne rastvara se u:	dioxinu, dietiletru, estrima, alkalnim halogenima ugljovodonicima, propanolu, butanolu
Slatkoća	1,6 glukoze		
Energija	2,4 kca/g		

*Slika 1.18. Osobine ksilitola*

Pored zamjene za šećere kod dijabetičara, ksilitol je imao i druge manje ili više uspješne medicinske primjene posebno u prevenciji infekcija srednjeg uha, mada još uvek nema dovoljno, na dokazima zasnovanih studija, da to i potvrde [72–75].

Pojedine eksperimentalne i kliničke studije su ukazale na sposobnost ksilitola da vrši remineralzaciju kariozne lezije [69, 70].

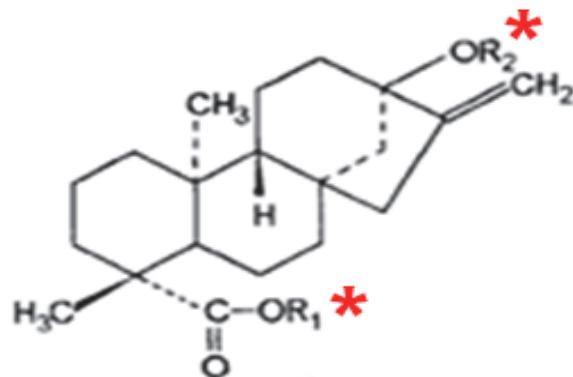
Stevia je nova vrsta prirodnog nepoliolonog zasladičivača koji pokazuje čitav niz pozitivnih svojstava na zdravlje organizma. Stevija je rod od oko 240 biljnih vrsta iz porodice suncokreta (familja Asteraceae/Compositae) porijeklom iz tropskih predijela sjeverne i Južne Amerike (najviše Brazil i Paragvaj). Vrsta Stevia rebaudiana je poznata i kao slatki ili šećerni (medni) list (slika 1.19.). Iz biljke se izdvaja aktivni ingredijent u obliku kristalne substance koji se već vjekovima koristi kao zasladičivač kod domorodaca Južne Amerike [76, 87].



Slika 1.19. Biljka *Stevia rebundiana* u cvijetu. List je osnovni nosilac aktivnih principa

Slatkoča stevijnih listova je intenzivnija i dugotrajnija (i do 300 puta veća) od saharoze. I pored hiljadugodišnjeg korišćenja postojala je do skora sumnja u vezi njene masovne primjene, bazirana na nekim eksperimentima na životinjama. Ipak u Japanu se koristi već decenijama, u SAD je dozvoljena kao dodatak ishrani, u EU je dozovljena od 2010 godine [80, 87].

Hemijska jedinjenja odgovorna za prirodnu slatkoču, ali i sva ostala dejstva, je raznolika grupa glikozoida koji nose zajedničko ime **steviol glukozoidi**. Svi oni nose zajedničko osnovno **steviol jezgro** (slika 1.20.) [76, 77].

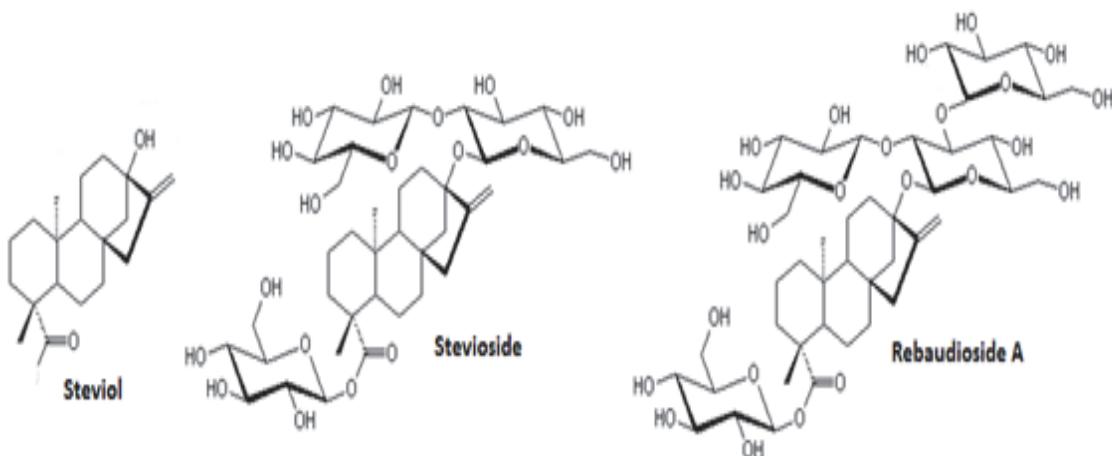


Slika 1.20. Steviol jezgro. Na označenim mestima sa zvjezdicom karboksilne grupe (R1) i hidroksilne grupe (R2) se vezuje jedan ili više molekula monosaharida

Za osnovno jezgro se na određenim mjestima (Slika 1.20.) vezuju molekuli glukoze i u zavisnosti od njihovog broja imamo razaličite glikozide. U ekstraktu iz biljke Stevia rebundiana se nalazi nekoliko ključnih glikozida. Najvažniji su (u zagradama je navedena njihova procentalna zastupljenost) [75, 76, 77]:

- Stevioside (5–10%)
- Rebaudioside A (2–4%)
- Rebaudioside C (1–2%)
- Dulcoside A (0.5–1%)
- Rebaudioside B
- Rebaudioside D
- Rebaudioside E

Steviosid posjeduje vezane dvije molekule glukoze na mjestu hidroksil grupe (R2 na slici 1.20), dok rebadioside A posjeduje tri molekula glukoze gdje se veza ostvaruje preko sa srednjom u nizu (slika 1.21.). Ostali stevioli se nalaze u tragovima [75, 76, 77]:



Slika 1.21. Osnovni glikozidi koji daju biohemijiska svojstva ekstraktu stevie rebundiane

Raniji rezultati ispitivanja slatkoće su pokazali da su rebaudiosid A 150 do 320 puta, steviosid 10-270 puta, rabaudiosid C 40-60 puta i dulcosid 30 puta sladji od glukoze. Noviji nalazi pak ukazuju da su te vrijednosti nešto manje i iznose za rebaudioside A 240 puta, a steviozid 140 puta veću slatkoću. Rebaudiosid A pokazuje najmanju naknadnu gorčinu. Relativna slatkoća inače varira u zavisnosti od koncentracije, pri čemu je mješavina svih

stevioil glukozoida koja se nalazi u prirodnom ekstraktu oko 150 puta slaća od 3% rastvora saharoze, ali samo 10 puta slaća ako se poređi sa 10% rastvorom [79, 82, 87].

Steviol glikozoidi su rastvorljivi u vodi, posjeduju temperaturnu i pH stabilnosti i ne podliježu fermentaciji. Iako izazivaju izraženu slatkoću ne dovode do glikemičnog odgovora kada se progutaju, zbog čega su zanimljivi kod osoba sa glikemičnim poremećajima. Preporučena dnevna doza unosa (ADI) se kreće oko 4 mg/kg težine [87].

Poslednjih godina više studija ukazuju da pored svoje ključne uloge kao zamjene za šećer i uloge u regulisanju hiperglikemije, steviosidi iz biljke stevie rebundiane mogu da imaju i dodatna terapeutска dejstva. Spominju se još i antiinflamatorni, antimikrobni, antioksidativni, antiviralni, imunomodulatorni, diuretički, gastroprotektivni, pa čak i antitumorski efekti [76, 80, 82, 83, 86].

U postojećim bazama podataka vrlo je malo objavljenih istraživanja o dejstvu steviosida na oralne strukture i njihovom potencijalnom uticaju na oralno zdravlje. Glikozoidi ne pokazuju kariogene potencijale već naprotiv, postoje određeni podatci o kariostatskim efektima. Pokazano je da ekstrakti iz stevije mogu da djeluju na kariogene bakterije iz roda *S. mutans* i *S. sobrinus* i da utiču na smanjenje produkcije kiselina u dentalnom plaku [80, 83, 84]. Nismo uspijeli da pronađemo istraživanja o uticaju steviozida na procese remineralizacije zubne gleđi.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Osnovni cilj istraživanja je utvrditi dejstvo ksilotola i stevie u zaštiti i oporavku gleđi zuba uslijed dejstva gaziranih napitaka. Brojne studije u svijetu, kao i naše istraživanje su nedvosmisleno pokazale dejstvo gaziranih napitaka, posebno kola tipa na površinsku strukturu gleđi. Isto tako potrošnja kola napitaka je u sve većem porastu, posebno kod mladih, pa pojedine ankete bilježe da ih koriste čak i djeca od 2 godine. Zbog toga je značajno da se preispitaju sve mogućnosti dodatne zaštite gleđi zuba.

Ciljevi istraživanja bi bili:

1. Ispitati u kojoj mjeri prirodni zaslađivači ksilitol i stevia mogu da zaštite i oporave površinu gleđi od oštećenja izazvanih agresivnim gaziranim napitkom Coca Colom.
2. Da se uporede rezultati gleđne strukture i ultrastrukture dobijeni sa SEM-om i AFM tehnologijom.
3. Da se ispita mogućnost korišćenja parametara krive nosivosti u analizi promjena u površinskim slojevima gleđi.
4. Da se ispita tip mineralne akumulacije pod uticajem vještačkih zaslađivača u poređenju sa vještačkom pljuvačkom.

### **3. HIPOTEZA**

Prirodni zaslađivači ksilitol i stevia imaju značajne zaštitne efekte smanjujući ostećenja gleđi pod dejstvom gaziranog napitka i kao takva mogu da se preporuče kao preventivna svakodnevna sredstva bez potencijalnih štetnih efekata.

#### **4. MATERIJAL I METOD**

Istraživanje je sprovedeno na zubima čovjeka izvađenim iz ortodontskih razloga, dobijenim uz saglasnost pacijenta iz Međunarodnog centra za stomatološku edukaciju, konsultativno-konzilijarne analize i savjetodavno stručnu pomoć u sudskomedicinskim sporovima iz oblasti stomatologije u Novom Sadu.

Zubi su prikupljeni u skladu sa etičkim protokolom koji je odobren od strane Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci. Prije vađenja, sa zuba su uklonjene meke naslage i naslage kalkulusa. Pomoću dijamantske šajbne, primjenjujući mali broj obrtaja, uz hlađenje vodom, razdvojen je korijen zuba od krunice. Zatim su zubi stavljeni u sterilni fiziološki rastvor na temperaturi od 4 °C.

Ukupno je odabранo 96 zuba podijeljenih u tri grupe, u kojima je od svake grupe uzeto po 32 uzorka gleđi veličine (3 mm x 2 mm x 2 mm). Ti uzorci su pripremljeni za analizu prema standardnoj proceduri.

Svaki uzorak je fiksiran za nosač mikroskopa pomoću cijanoakrilatnog adheziva. Zubi su podijeljeni u 3 grupe sa po 32 zuba u svakoj gdje će jedna biti treirana 10% rastvorom ksilitola praha (Miradent<sup>R</sup>, Njemačka Hager & Werken GmbH & Co. KG, Duisburg, proizvodni broj 35015031904), druga 10% rastvorom prirodnog praha Stevia rebaudiana (Njemačka, Krüger GmbH & Co. KG, Bergisch Gladbach, proizvodni broj 046746708530) i treća eksperimentalna bez dejstva bilo kakvog sredstva.

Prva grupa je tretirana 24h u 10% rastvoru ksilitola, druga u 10% rastvoru stevie rebaudiana, a treća držana u rastvoru vještačke pljuvačke. Poslije toga perioda su sve grupe držane u rastvoru Coca Cole na temperaturi od 37 C u trajanju od 12h što je u literaturi [5] pokazalo kao period kada počinju najizraženija oštećenja. Poslije toga su zubi ponovo vraćeni u prvobitne rastvore.

Kao vještačka pljuvačka koriščen je rastvor napravljen prema formuli datoj od strane Shellisa-a [167]:

Sastojci	Koncentracija(mg/l)
Amonijm hlorid	233
Kalcijum hlorid dehidrata	210
Magnezijum hlorid heksahidrat	43
Kalijum hlorid	1162
Kalijum dihidrogen ortofosfat	354
Kalijum tiocijanat	222
Natrijum citrat	13
Natrijum vodonik karbonat	535
Dinatrijum vodonik ortofosfat	375
pH	6,8

– Poslije tretiranja odgovarajućim, gore navedenim agensima, izvršena je njihova priprema za analizu pomoću Skening elektronskog mikroskopa (Scanning Electron Microscopy SEM) i Mikroskopa međuatomskih sila (Atomic force microscopy AFM). Polovina u svakoj grupi je ispitivana sa Skening elektronskim mikroskopom (SEM), a druga polovina sa Mikroskopom međuatomskih sila (Atomic force microscopy (AFM)).

Anliza je vršena na SEM tipa *SEM JEOL T220 koji se sastoji i od Naprašivača BLAZERS SDC-050.*

Navedena analiza izvršena je u NanoLab, Biomedicinsko inženjerstvo na Univerzitetu u Beogradu.

Da bi se pojedinačni uzorak mogao skenirati elektronskim mikroskopom mora biti električno provodljiv. Ovo je važno zbog što manje distorzije dobijene slike, što boljeg prijema snopa elektrona na površinu uzorka kao i postizanje bolje emisije sekundarnih elektrona. Površine uzoraka koje po prirodi nisu provodljive, pomoću ovog uređaja moraju biti naprašene prikladnim električnim provodljivim slojem. Uslov za naprašivanje je da uzorak bude čist a dodatno se tretira argonom pod pritiskom 0.05-0.1 mbara da bi se

odstranili kondenzovani gasovi, posebno vodena para. Nanošenje tanke provodljive prevlake se vršilo naparavanjem u vakumskim uslovima zbog što preciznije prevlake visoko strukturiranih uzoraka. Naprašivanje se vršilo ne samo metalno provodljivim slojem zlata, nego se prevlaka na površini uzorka načinila karbonskim vlaknom. Visina topa naprašivača od uzorka je bila optimalno 5cm, a naprašivanje zlatom se vršilo pri naponu 300V i optimalno traje 40 sekundi pri struji 40mA za provodljivi sloj zlata debljine 10nm. Zatim se sa iste radne distance sa argonom, naprašio uzorak, slojem zlata, pri struji od 60mA, debljina sloja je 33nm po minuti.

Veličina uzorka koju se može skenirati je bila prečnika od 10-32mm i visine do 10mm. Rezolucija snimka je maksimalno 5nm, moguće uvećanje je u rasponu od 15 do 200 000 puta, napon akceleracije: 0.5-30 kV. Mikroskop troši 2L u minuti rashladne vode i snage iz mreže 100 V AC 50/60Hz 2kW, stalne struje 20A, gdje je struja pokretanja mikroskopa 60A.

Korišćen je sledeći protokol za naprašivanje: Priprema dvoslojne ljepljive folije i stavljanje na nosač – stub; postavljanje pripremljenog uzorka zuba na nosač; gašenje naprašivača kad je vakum pumpa dovoljno zagrijana; ventiliranje konzole za naprašivanje i otvaranje kupole naprašivača; postavljanje uzorka zuba u kupolu za naprašivanje; pritiskom na SPUTTERING ubacujemo argon za što bolju pripremu uzorka i što bolje izvlačenje vlage pod vakuum pumpe (pritisnut nekoliko puta u razmacima od 30 sec).

Protokol za skeniranje je bio: postavljanjem stubića sa uzorcima zuba na nosač stubića; ventiliranje elektronskog topa mikroskopa i postavljanje konzole sa uzorcima; pokretanje vakum pumpe mikroskopa sa PUMP DOWN; aktivitanje topa sa potenciometrom H Voltage do maksimalne vrijednosti i Filamenta do pozicije označene linijom; prikaz uzorka pomoću osnovnih komandi mikroskopa (SPOT SIZE, BRIGHTNES, CONTRAST, FOCUS, FILE FOCUS, MAGNIFICATION itd); pokretanje programa za prikaz slike mikroskopa na

računaru ORION; podešavanje dijela uzorka koji se posmatra po svim osama pomoću komandi na elektronskom topu mikroskopa ,fokusiranje dijela uzorka FOCUS i snimanje slike u Photo modu na uvećanju koje je prethodno namješteno SHUTTLE i pohranjivanje na lokalni računar.

Za AFM ispitivanje je korišćen nanotehnološki uređaj JSPM-5200. Radi se o integrисаном nanosistemu sa više radnih modova kod kojeg je moguće realizovati sljedeće funkcije: STM, AFM, MFM, ECSPM. JSPM-5200 se sastoji od AFM baze, anti-vibracionog stola, AFM pojačivača, SPM kontrolora, računara, i opcionih komponenti kao što su mikroskopski sistem sa CCD kamerom, vakuum sistem itd. Ovaj sofisticirani aparat baziran je na visokoj rezoluciji svoje sonde koja može da detektuje frakcije u nanometrima i to mnogo bolje (1000 puta preciznije) nego što je granica optičkog prelamanja.

Analiza slike vršena je sa upotreбом programa WinSPM (Processing). Ovaj programski paket omogućava korisniku obavljanje različitih funkcija za obradu, kako bi se poboljšao kvalitet slike dobijene programom za skeniranje. Te funkcije uključuju: nивелисање slike, прilagođавање освјетљености и контраста, примјену разних филтера itd. Анализа профила на слици скениране површине може се радити на више начина: Single, Multi, Extra и Multiple Images. Kod Single анализе једна произволјна линија може бити постављена у било ком смјеру унутар слике, а мјере се удаљености између две тачке и висинска разлика између до три паре маркера. Kod Multi анализе може бити постављено до пет произволјних линија у било ком смјеру унутар слике. Kod Extra анализе се унутар постављене правougластима мјери храпавост скениране површине и код Multiple Images анализе могу бити постављене до три слике, а профил се анализира на истој линији. Овдје је коришћена Multi анализа профила.

Ovaj програм, WinSPM (Processing), omogućava и генерирање тродимензионалних слика скениране површине (птичија перспектива). Параметри који се могу подесавати су Position (смјер приказа), Zoom (висина по Z-оси) и Centering (центрирање површине у односу на екран).

Korišćena je funkcija kreiranja izvještaja, koja se koristi za prikazivanje slika, mjerenja, profila i 3D slika u obliku izvještaja za štampanje koji će biti prikazani u rezultatima istraživanja. Podrazumijeva se da je format stranice A4 u vertikalnom položaju. Mogu biti prikazani podaci o mjerenu za izabranu 2 D sliku.

Pošto se pomoću AFM-a mogu mjeriti različite sile, primjena te tehnologije je veoma široka i popularna među različitim naučnim istraživanjima i to ne samo u biološkim naukama i tehničkim naukama (ispitivanjima materijala). U svim slučajevima, sila koja izaziva pomjeranje je tanana i proporcionalna udaljenosti vrha od površine. Kada se ispituje površina uzorka neophodno je da sila bude nepromijenjena, što se označava kao „*constance force mod*“. Istovremeno se kao posljedica torzione fleksije (torziono savijanje) dobijaju i informacije o friкционim svojstvima (trenje) ispitivane površine. Ipak, za veoma meke površine, frikcioni efekti nisu poželjni tako da je uveden i pulsirajući režim kantilevera – *tepping mode*. Ovo stanje se izaziva pomoću oscilirajućeg piezo kristala koji frikcione efekte pretvara u električne oscilacije.

Ispitivanja nanoureza (nanoindentation) pomoću AFM-a je vrlo selektivna i nedestruktivna metoda za izračunavanje tvrdoće i modula elastičnosti. U stomatologiji, čiji je razvoj velikim dijelom uslovjen poznavanjem i praćenjem bioloških i mehaničkih karakteristika tvrdih (mineralizovanih) tkiva, tek su posljednjih godina započeta istraživanja sa ovom preciznom tehnikom. Rezultati tih analiza tkiva usne duplje uvela su i stomatološku nauku u nanoeru.

Slike su rađene sa veoma usporenim skeniranjem na površini od svakih  $25,0 \mu\text{m}^2$ , frekvencijom skeniranja od 0,1 Hz sa 256 linija po uzorku, kako bi se izbjegla oštećenja sonde.

Softer samo aparata je izbacivao obrađene podatke krive nosivosti ispitivanog profila sa analizom trodimenzionalnih parametara Rk, Rpk i Rvk.

Statistička obrada dobijenih parametara krive nosivosti je vršena pomoću SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Izračunavane su vrijednosti Deskriptivna statistika na osnovu minimalno i maksimalno dobijenih vrijednosti poput raspona, aritmetičke sredine, medijane, standardne devijacije i koeficijanta varijacije.

Za testiranje međusobnog odnosa korišćeni su sljedeći testovi Kolmogorov-Smirn-ov test, a pri graničnim vrijednostima korišćen je Shapiro-Wilk's-ov test. Pri nivou značajnosti većem od 0.05 prihvata se nulta hipoteza da obilježje potiče iz normalne distribucije.

Korelacija je određivana sa Pearson-ovog koeficijenta korelacije, a značajnost sa One-Sample Test (t – test za jedan uzorak).

Međuzavisnost dobijenih parametara je određivana pomoću analize varijanse (ANOVA) i Tukey-ev HSD test za istraživanje razlika između nivoa.

## 5. REZULTATI

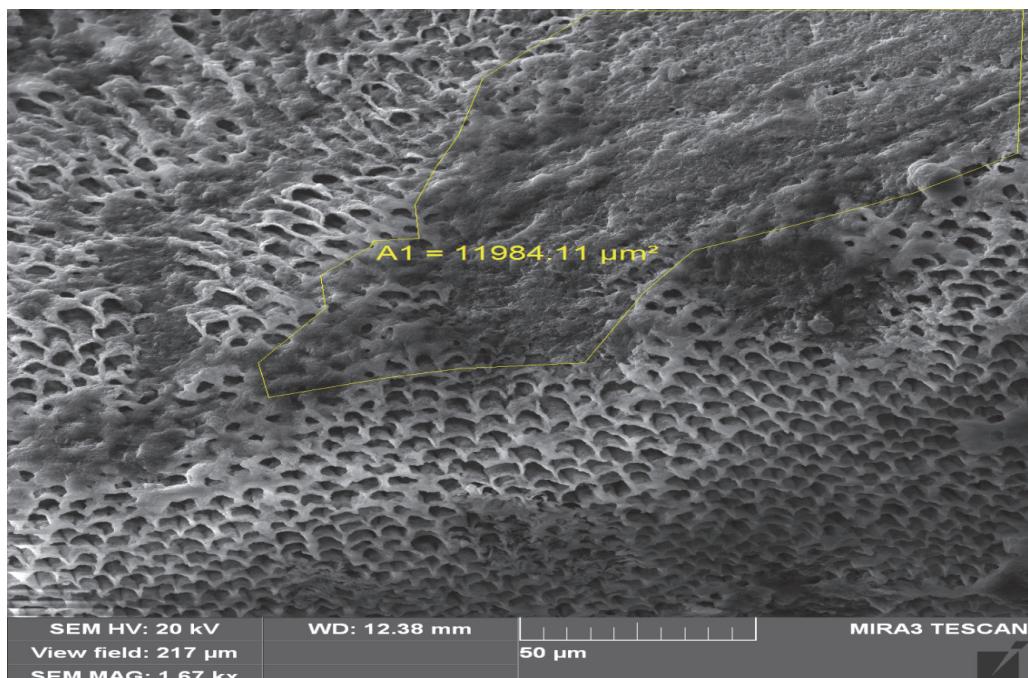
Ispitivanje je sprovedeno u dva dijela. Skening elektronska mikroskopija je imala za cilj da ukaže na osnovne kvalitativne promjene površine gleđi prije svega u smislu postojanja kalcificiranih depozita i erozivnih polja, dok je AFM trebalo da kvantifikuje stepen hrapavosti.

### 5.1. Ispitivanja pomoću SEM-a

Na više površina, različitih zuba dejstvo ksilitola i stevije je upoređivano sa kontrolnom grupom koja je bila izložena samo dejstvu rastvora vještacke pljuvačke.

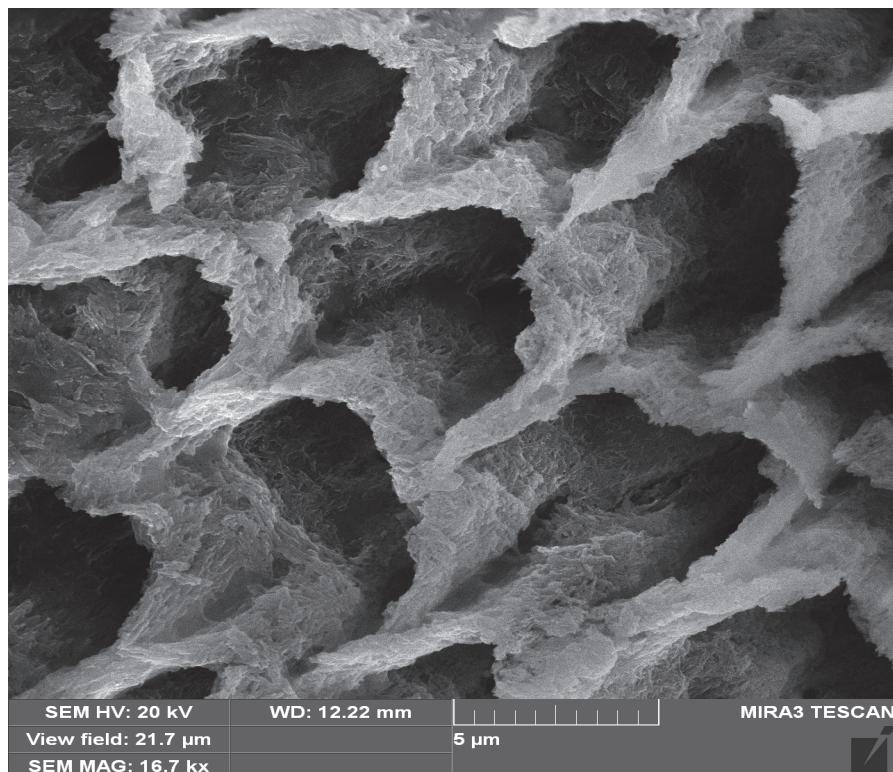
#### 5.1.1. Kontrolna grupa

Na slici 5.1. je prikazana uobičajena slika površine zuba koji je bio izložen dejstvu Coca-Cole i zatim izložen rastvoru vještacke pljuvačke. Primjećuju se oštire naznačeni rubovi gleđnih prizmi kao znaci početne demineralizacije.



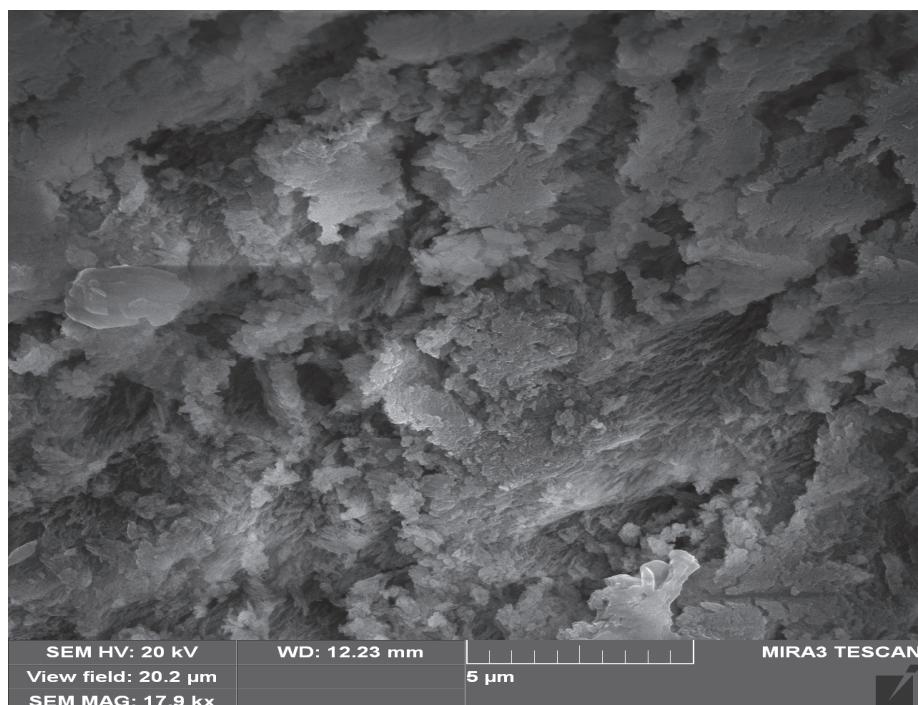
Slika 5.1. Površina gleđi kontrolnog uzorka

Slika br 5.2. prikazuje veće uvećanje djelimično demineralizovanog otvora prizmi.

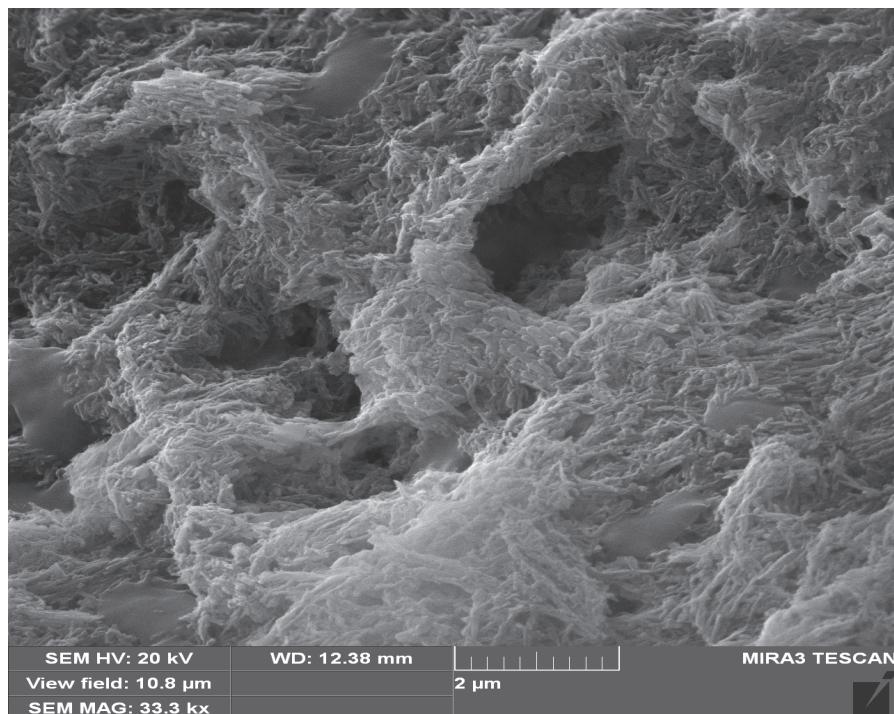


*Slika 5.2 Demineralizovani završetci gleđnih prizmi*

Na pojedinim mjestima su izraženi depoziti amorfne mineralizovane mase (Slika 5.3. i 5. 4.)

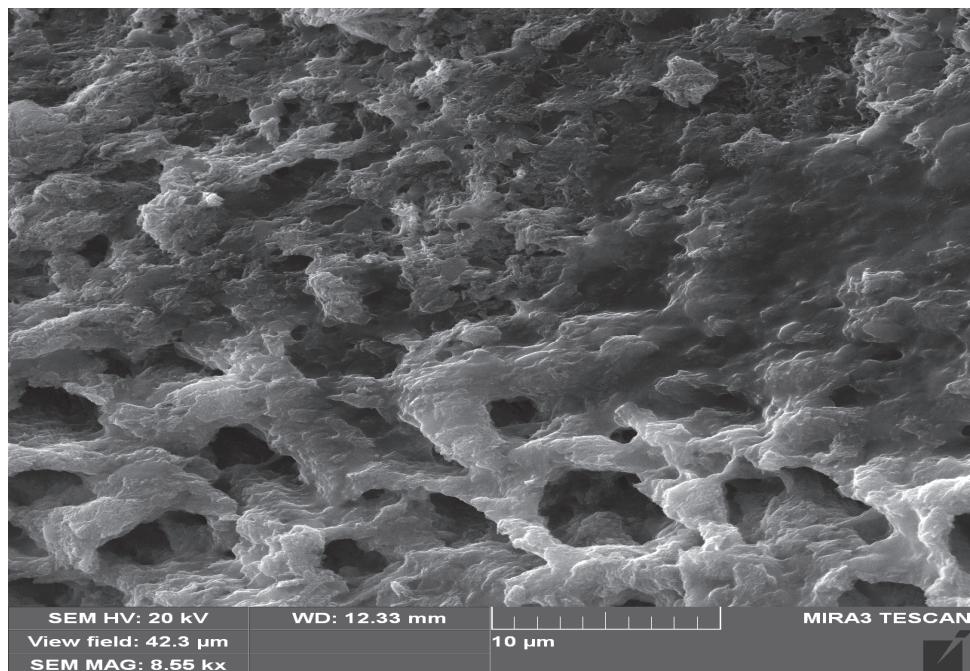


*Slika 5.3. Mineralizovani depoziti na površini gleđi*



Slika 5.4. Amorfni mineralni depoziti na površini gleđi kontrolne grupe

Mineralni depoziti se skupljaju na obodu prizmi popunjavajući djelimično defekte nastale korozivnim dejstvom gaziranog napitka (sl.5. 5.).

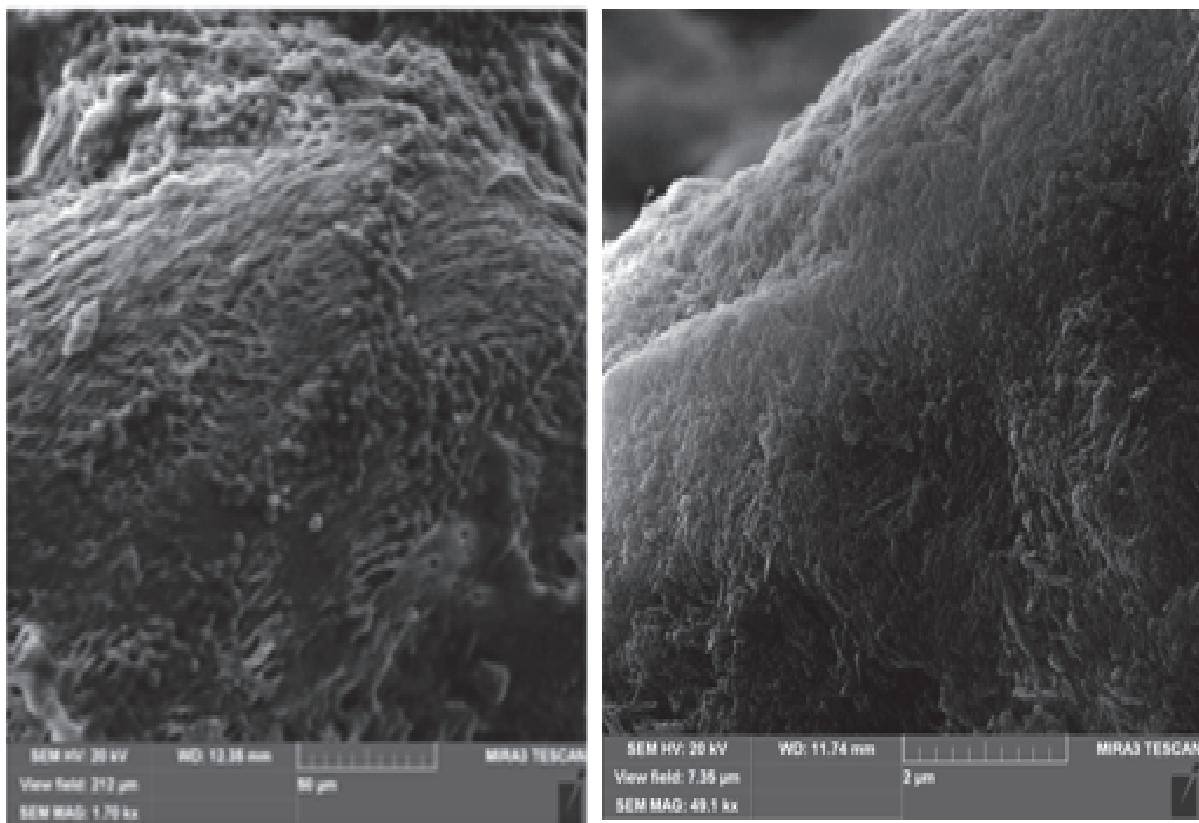


Slika 5.5. Kontrolna grupa. Mineralni depoziti na rubovima gleđnih prizmi

Depoziti nisu usmjereni i više su formirani u zrelijе kristalne forme.

### 5.1.2. Stevija grupa

Generalno se primjećuje na površini više amorfne mase u početnim fazama kristalizacije, sa više organskih komponenti i sa manje prostora između u odnosu na kontrolnu grupu (slika 6.6.).

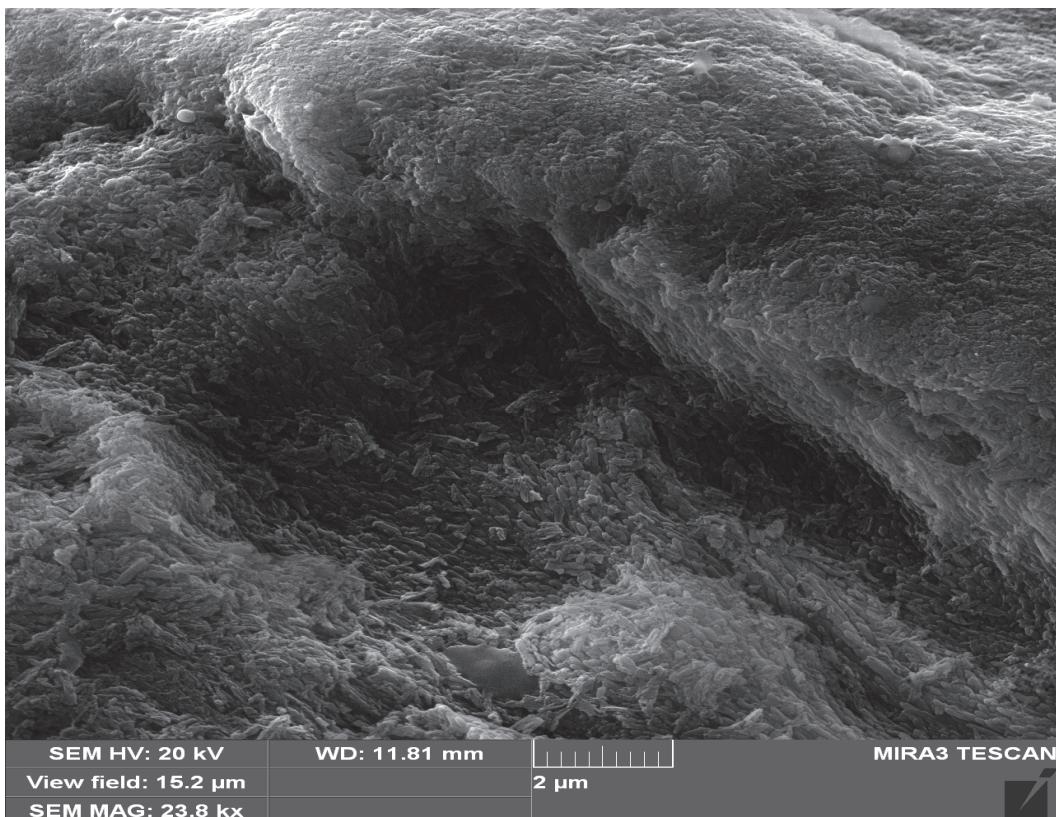


Kontrolna

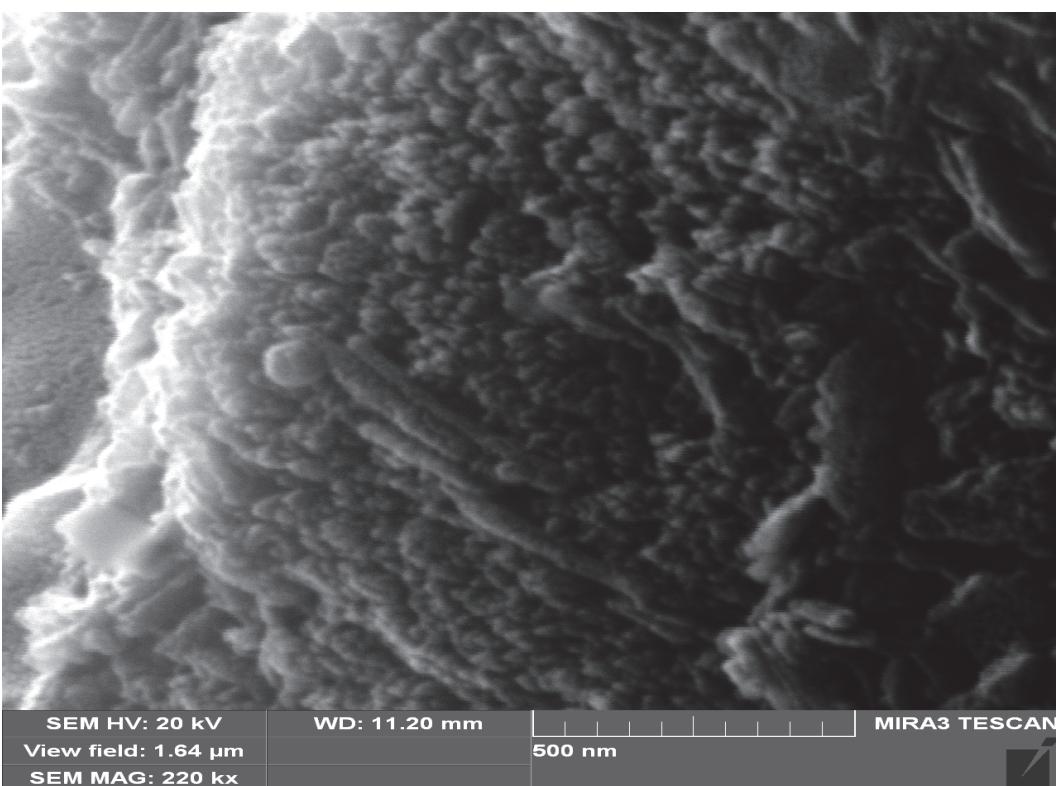
Stevia

*Slika 5.6. Amorfne mineralizovane mase na površini*

Analizom mineralizovanih masa uočeno je da su kristali manji i usmjereniji. U dubljim dijelovima gdje očigledno nije bilo jačeg korozivnog uticaja Coca Cole naziru se osnovne strukture prizmi (slika 5.7.).

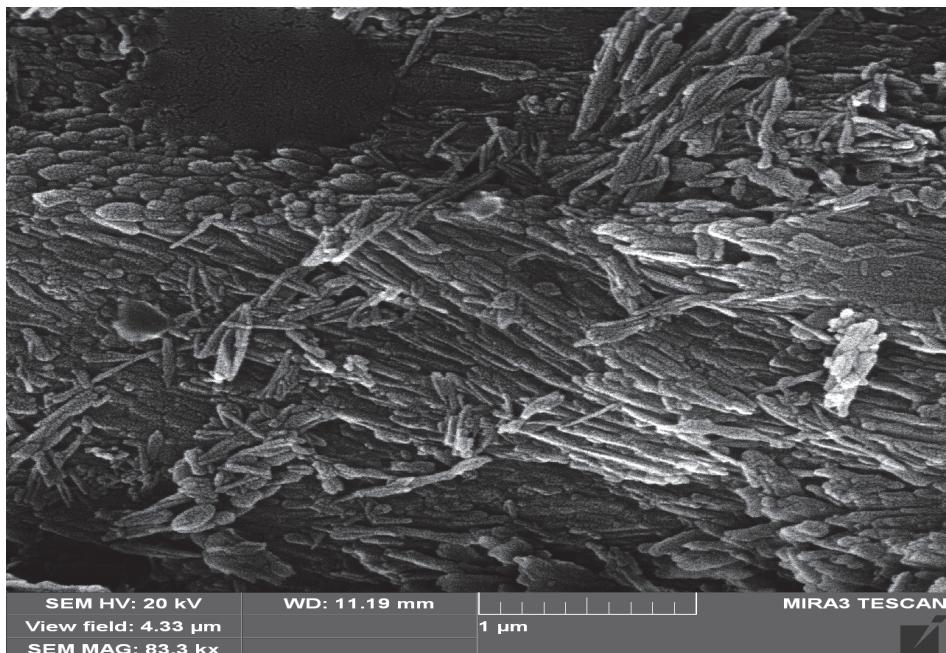


*Slika 5.7. Usmjerene kristalne mase*

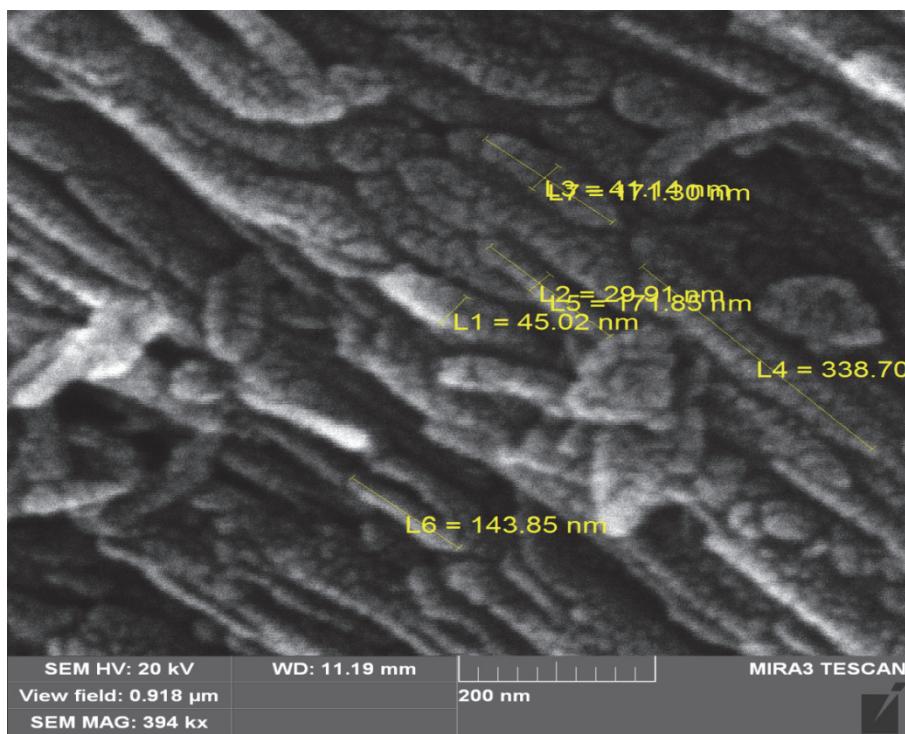


*Slika 5.8. Usmjerena kristalizacija kod prisustva stevije*

Veličina početnih kristala u amorfnoj formi mineralnog pokrivača poslije dejstva stevije ne prelazi 100 nm što bi moglo da odgovara nanoapatitima. Isto tako se uočava prisustvo pravilnih vlakana ispod te površine (slika 5.9. a i b).

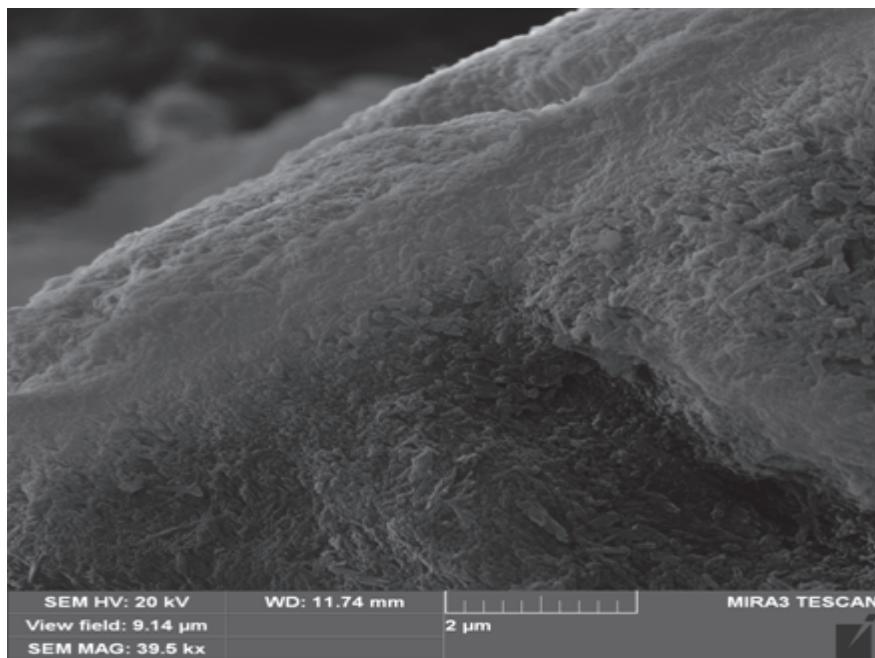


Slika 5.9.a Nanoapatitne strukture početnih kristala u amorfnom prekrivaču



Slika 5.9 b Veličina usmjerenih kristalnih struktura

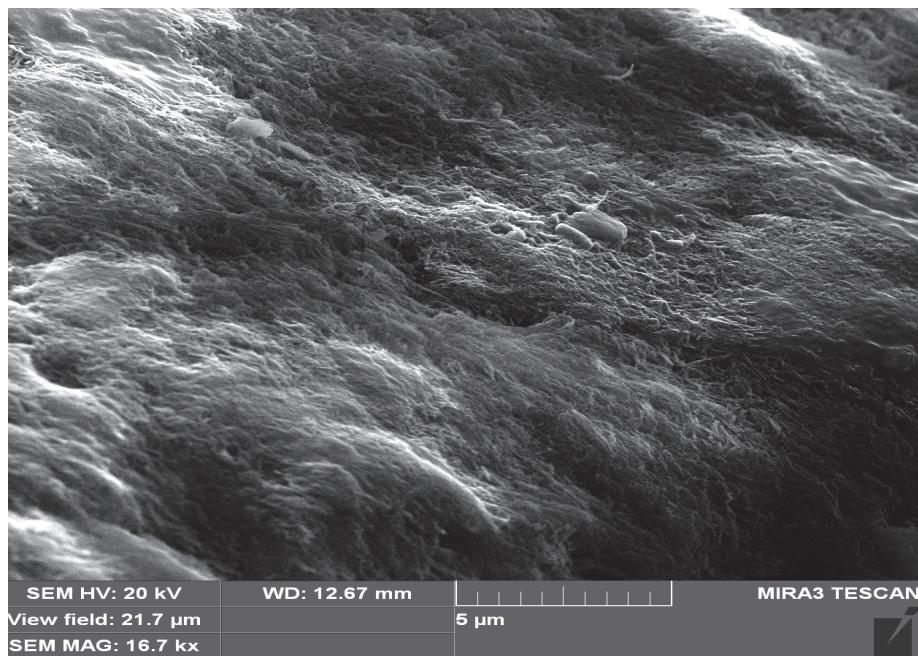
Uočene kristalne strukture se razvijaju iz sfrenih globula na površini. Usmjereno se primjećuje u dubljim slojevima gdje se dešava prelazak iz amorfne mase u kristalnu.



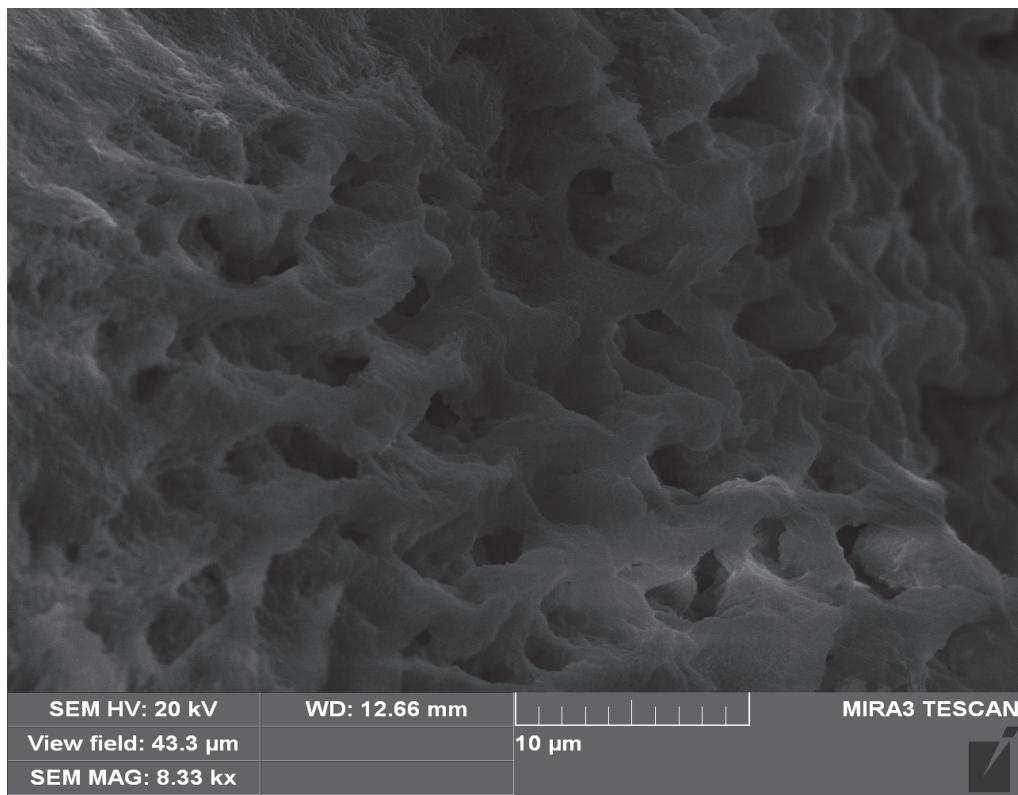
Slika 5.10. Prelazak amorfne mase u usmjerenu

### 5.1.3. Ksilitol grupa

Na površini se nalazi tanji sloj mineralizovane mase što je bliže nalazu kod kontrolne grupe (slika 5.11.). Uočljiviji su dijelovi demineralizovanih prizmi (slika 5.12.).

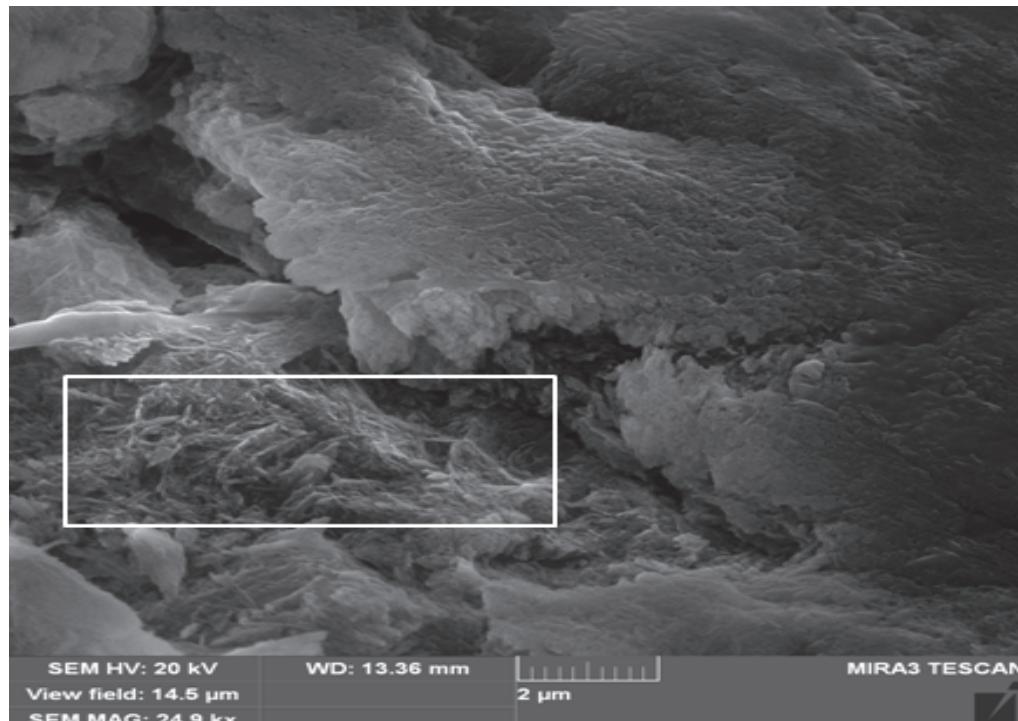


Slika 5.11. Mineralne mase na površini gleđi tretirane ksilitolom

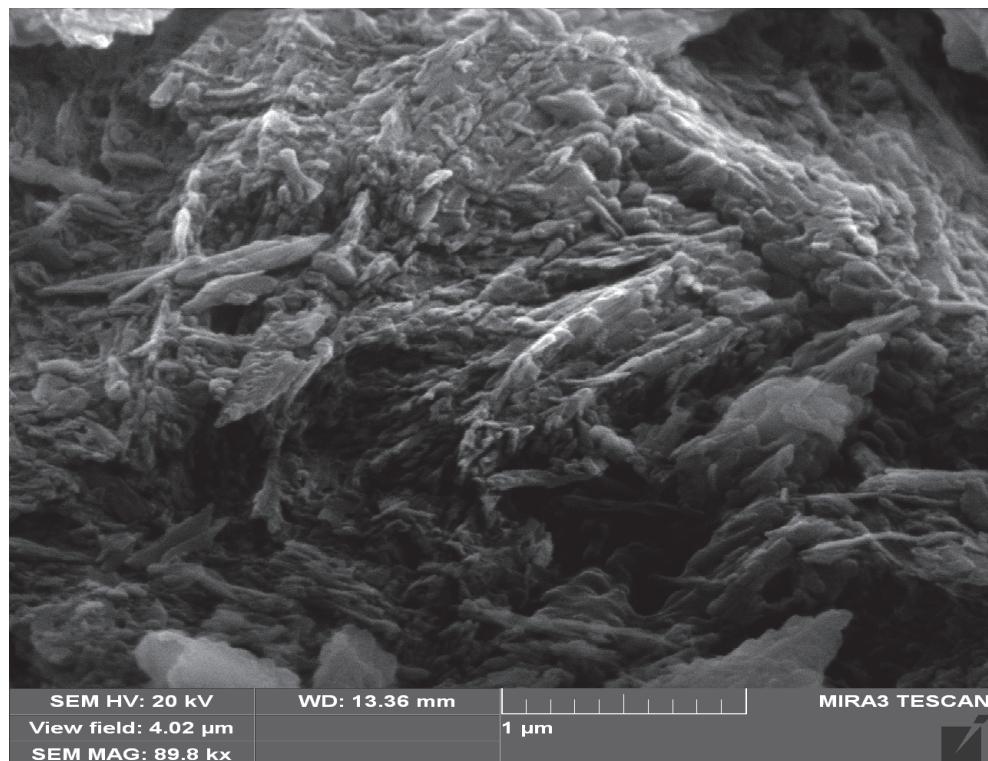


Slika 5.12. Prekrivene demineralizovane prizme

U mineralizovanoj masi je otkriven veći broj već formiranih kristala veće veličine koji su nepovoljniji za dobro upakivanje i remineralizaciju gleđi (slika 5.13.).



Slika 5.13.a Površina gleđi tretirana ksilitolom



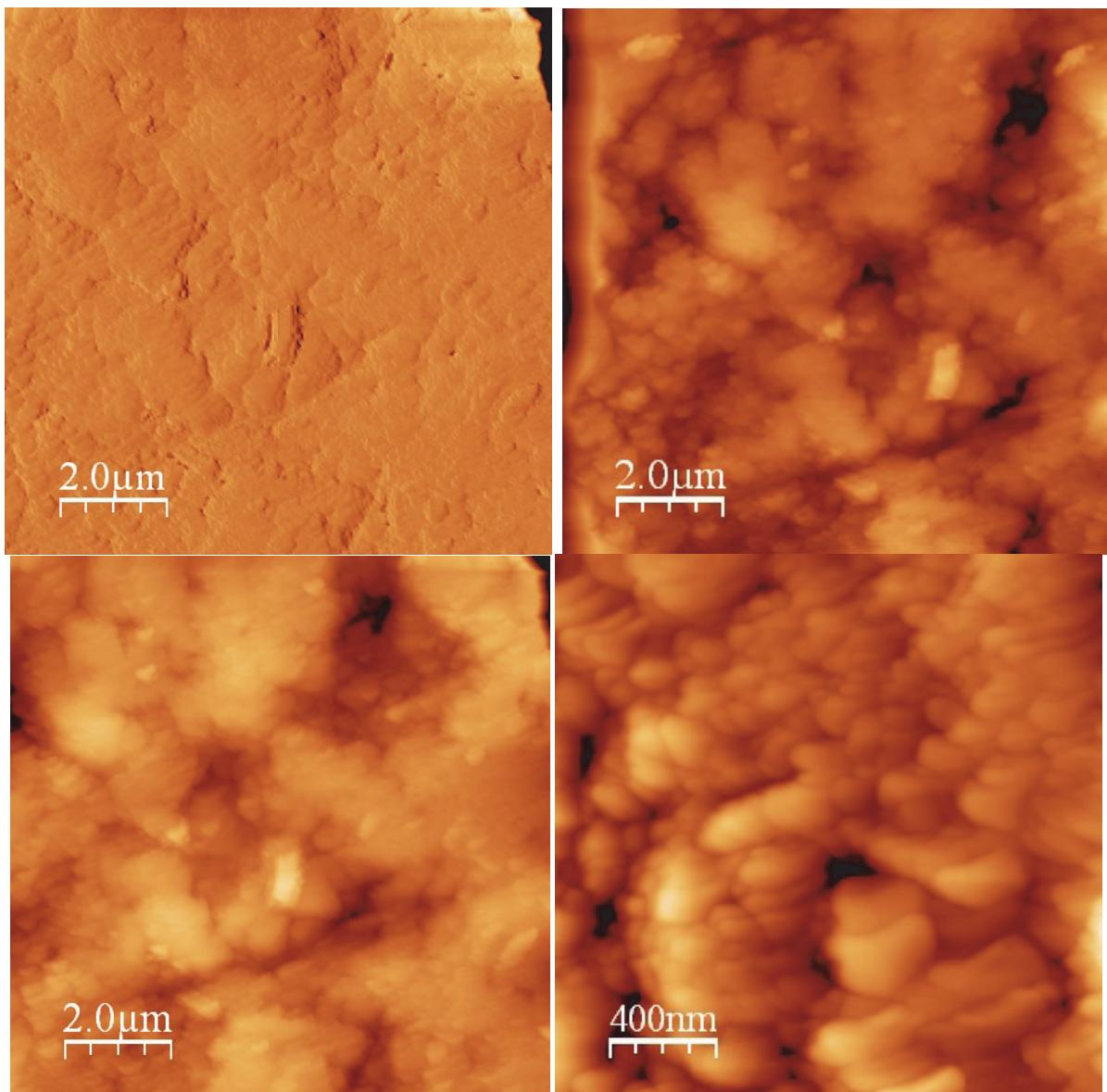
Slika 5.13.b Formirana kristalna površina tretirana ksilitolom

## 5.2. Ispitivanje hrapavosti pomoću AFM mikroskopa

Tokom istraživanja praćeno je devet parametara grupisanih u tri grupe: Kontrolna grupa, Stevija i Ksilitol. U svakoj od grupa praćena su tri parametra: Rk core, Rpk i Rvk. Za svaki od parametara izvršeno je 32 mjerenja.

### 5.2.1. Kontrolna grupa

Na kontrolnim površinama se uočavaju zone demineralizacije kao udubljenja u predijelu glave prizmi, prekriveni sa amorfnom masom. Veća uvećanja pokazuju da se radi o globularnim tvorevinama (slika 5.14.).

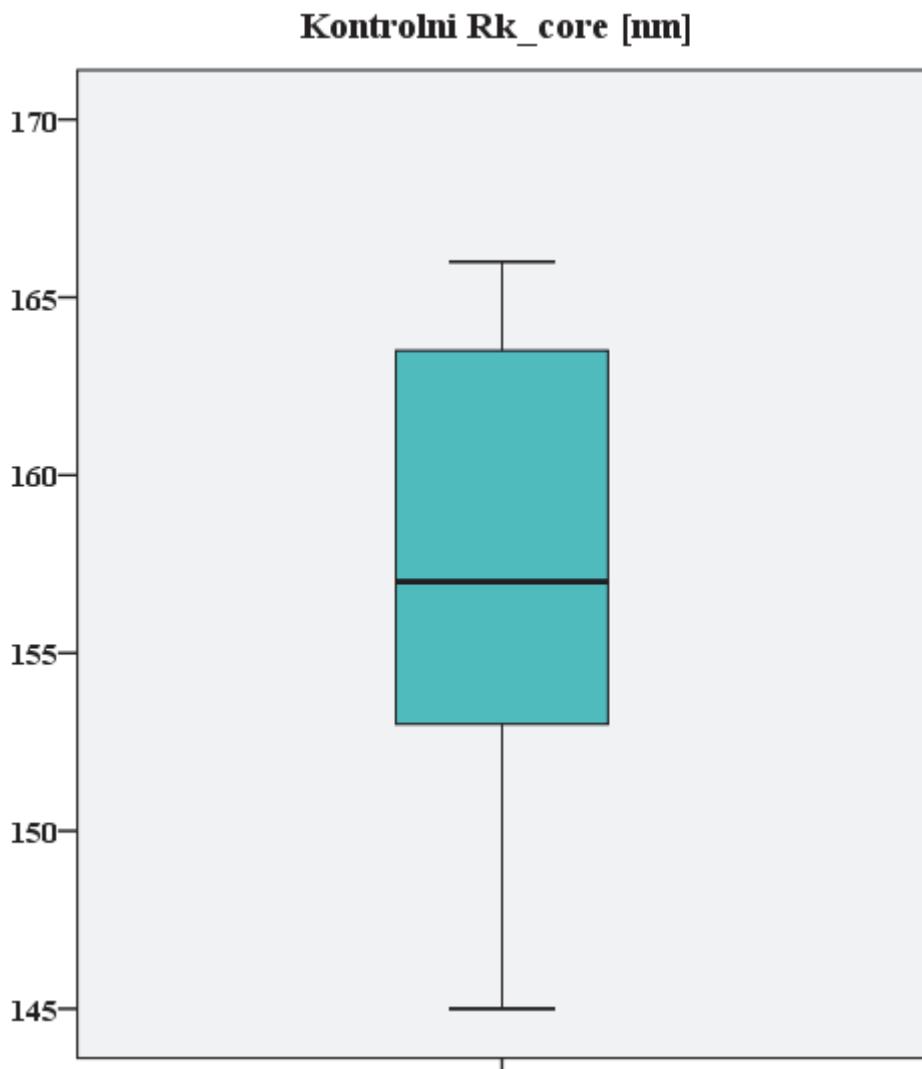


*Slika 5.14. AFM prikaz površine kontrolnih zuba*

U kontrolnoj grupi za Rk core minimalna izmjerena hrapavost je 145, a maksimalna 166 nm. Medijana je 157, a prosječno izmjerena hrapavost je 157.66 nm, dok je standardna devijacija 6.136 nm.

Kontrolni Rk core [nm]

N	Minimum	Maksimum	Raspon	Medijana	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
32	145	166	21	157.00	157.66	6.136



Primjenom One-Sample Test-a dobijena je statistički značajna razlika hrapavosti ( $t = -2.161$ ,  $p = 0.039$ ) za kontrolni Rk\_core [nm] u odnosu na referentnu vrijednost (160 nm) uz napomenu da je prosječna vrijednosti hrapavosti posmatranog uzorka za kontrolni Rk\_core [nm] niža od referentne vrijednosti.

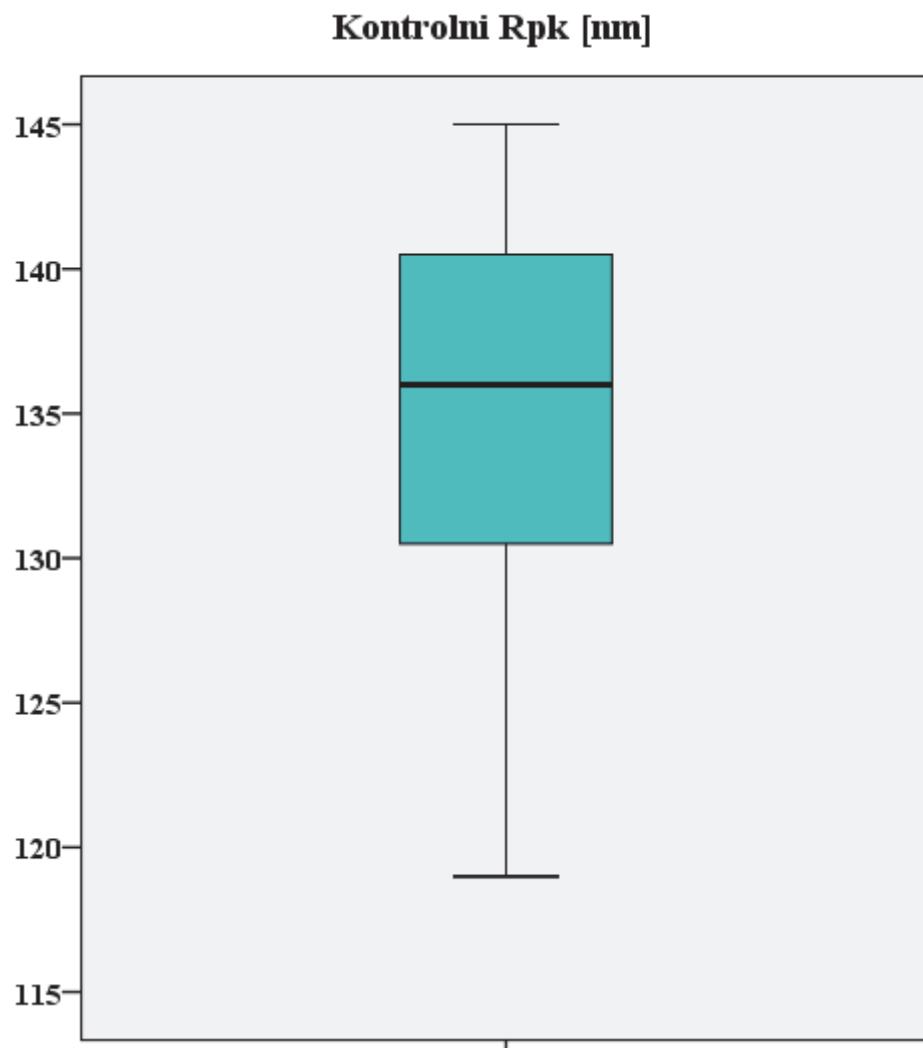
#### One-Sample Test

	Testna vrijednost = 160					
	t	df	S.Z. (dvostrana)	Srednje odsupanje	95% Razlika intervala pouzdanosti	
					Donji	Gornji
hrapavost	-2.161	31	.039	-2.344	-4.56	-.13

Minimalna izmjerena hrapavost u kontrolnoj grupi za Rpk je 119, a maksimalna 145 nm. Medijana je 136, a prosječno izmjerena hrapavost je 134.91 nm, dok je standardna devijacija 7.541 nm.

Kontrolni Rpk [nm]

N	Minimum	Maksimum	Raspon	Medijana	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
32	119	145	26	136.00	134.91	7.541



Primjenom One-Sample Test-a dobijena je visoko statistički značajna razlika hrapavosti ( $t = 2.930$ ,  $p = 0.006$ ) za kontrolni Rpk [nm] u odnosu na referentnu vrijednost (131 nm) uz napomenu da je prosječna vrijednosti hrapavosti posmatranog uzorka za kontrolni Rpk [nm] viša od referentne vrijednosti.

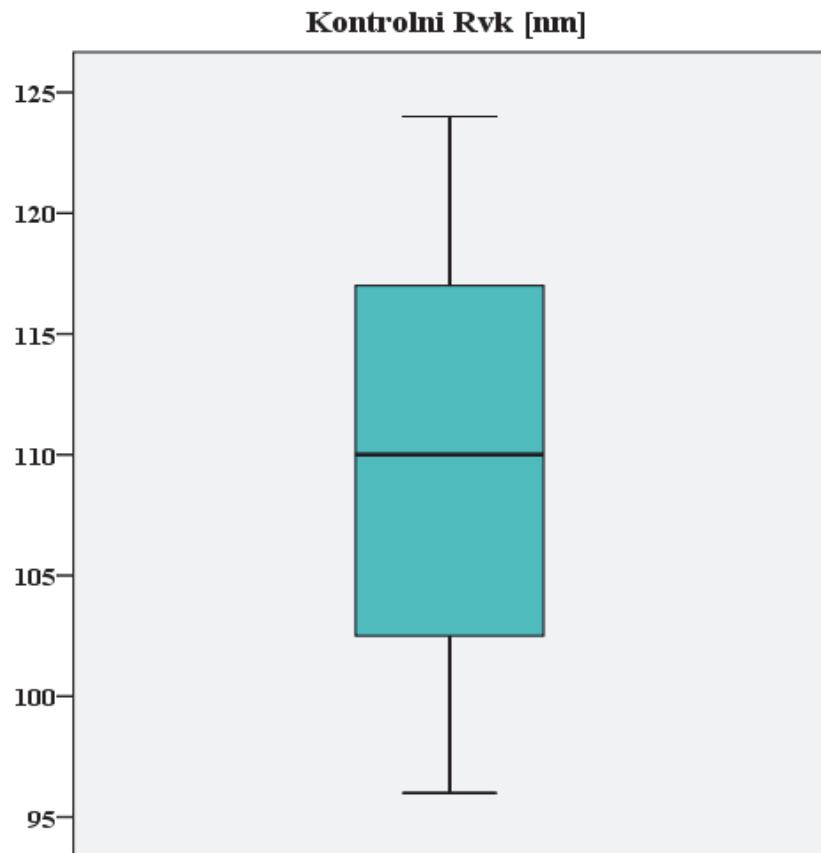
#### One-Sample Test

	Testna vrijednost = 131					
	t	df	S.Z. (dvostрана)	Srednje odstupanje	95% Razlika intervala pouzdanosti	
					Donji	Gornji
hrapavost	2.930	31	.006	3.906	1.19	6.62

Maksimalna izmjerena hrapavost u kontrolnoj grupi za Rvk je 124, a minimalna 96 nm. Medijana je 110, a prosječno izmjerena hrapavost je 109,63 nm, dok je standardna devijacija 8.702 nm.

Kontrolni Rvk [nm]

N	Minimum	Maksimum	Raspon	Medijana	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
32	96	124	28	110.00	109.63	8.702



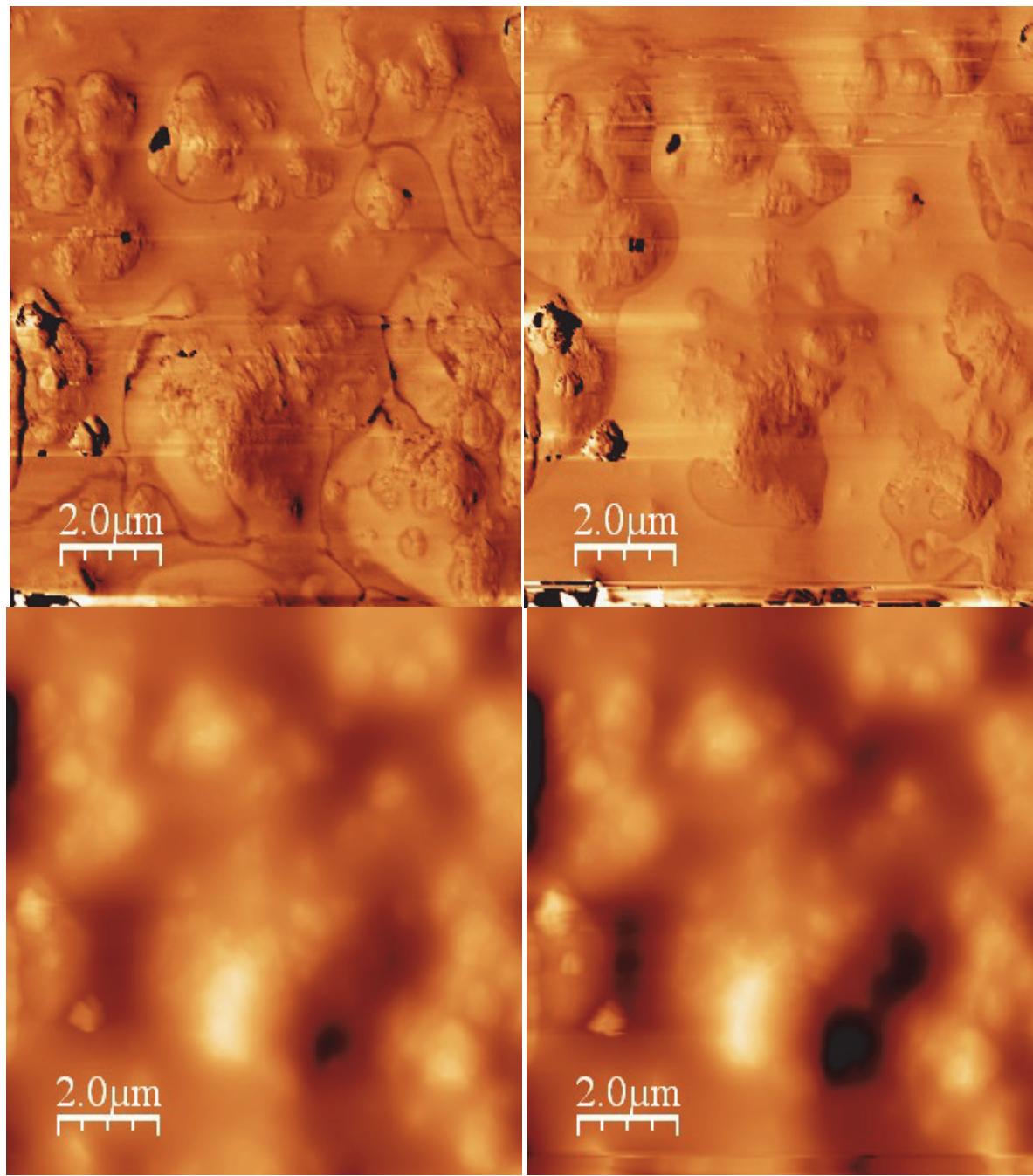
Primjenom One-Sample Test-a dobijena je visoko statistički značajna razlika hrapavosti ( $t = 2.930$ ,  $p = 0.006$ ) za kontrolni Rpk [nm] u odnosu na referentnu vrijednost (131 nm) uz napomenu da je prosječna vrijednosti hrapavosti posmatranog uzorka za kontrolni Rpk [nm] niža od referentne vrijednosti.

#### One-Sample Test

	Testna vrijednost = 110					
	t	df	S.Z. (dvostrana)	Srednje odstupanje	95% Razlika intervala pouzdanosti	
					Donji	Gornji
hrapavost	-.244	31	.809	-.375	-3.51	2.76

### 5.2.2. Stevija grupa

Stevija grupa pokazuje manje izražene doline i prekrivenost prizmatičnih udubljenja sa debljim slojem mase nešto organizovanije strukture(slika 5.15.).

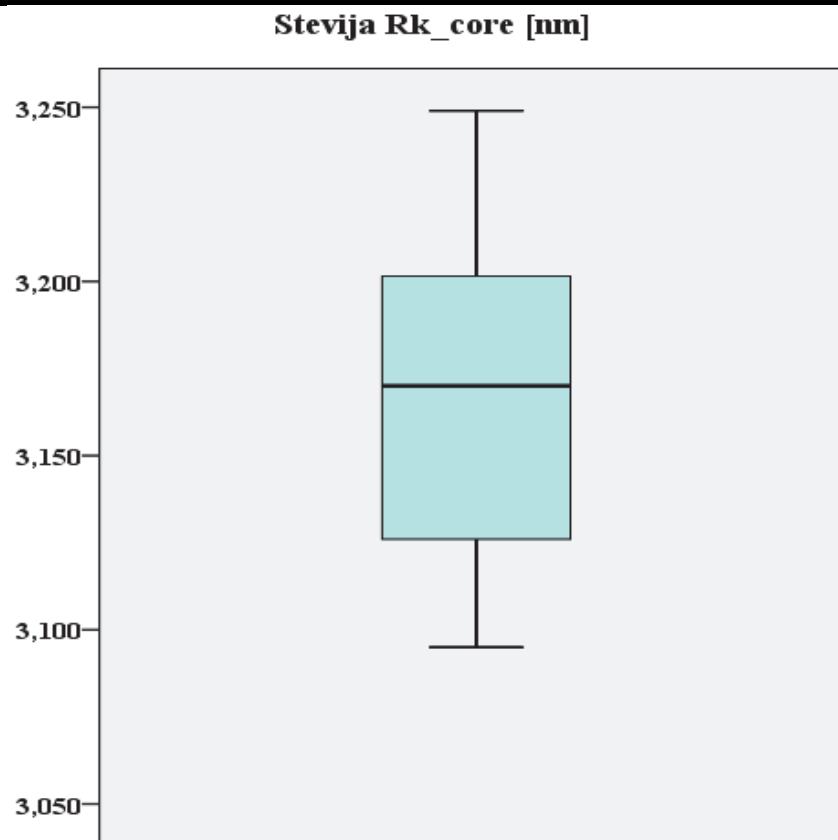


*Slika 5.15. Stevija grupa AFM snimci*

U grupi Stevija za Rk core minimalna izmjerena hrapavost je 3095, a maksimalna 3249 nm. Medijana je 3170, a prosječno izmjerena hrapavost je 3165.28 nm, dok je standardna devijacija 43.774 nm.

Stevija Rk\_core [nm]

N	Minimum	Maksimum	Raspon	Medijana	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
32	3095	3249	154	3170.00	3165.28	43.774



Primjenom One-Sample Test-a nije dobijena statistički značajna razlika hrapavosti ( $t = 1.458$ ,  $p = 0.155$ ) za Stevija Rk core [nm] u odnosu na referentnu vrijednost (3154 nm).

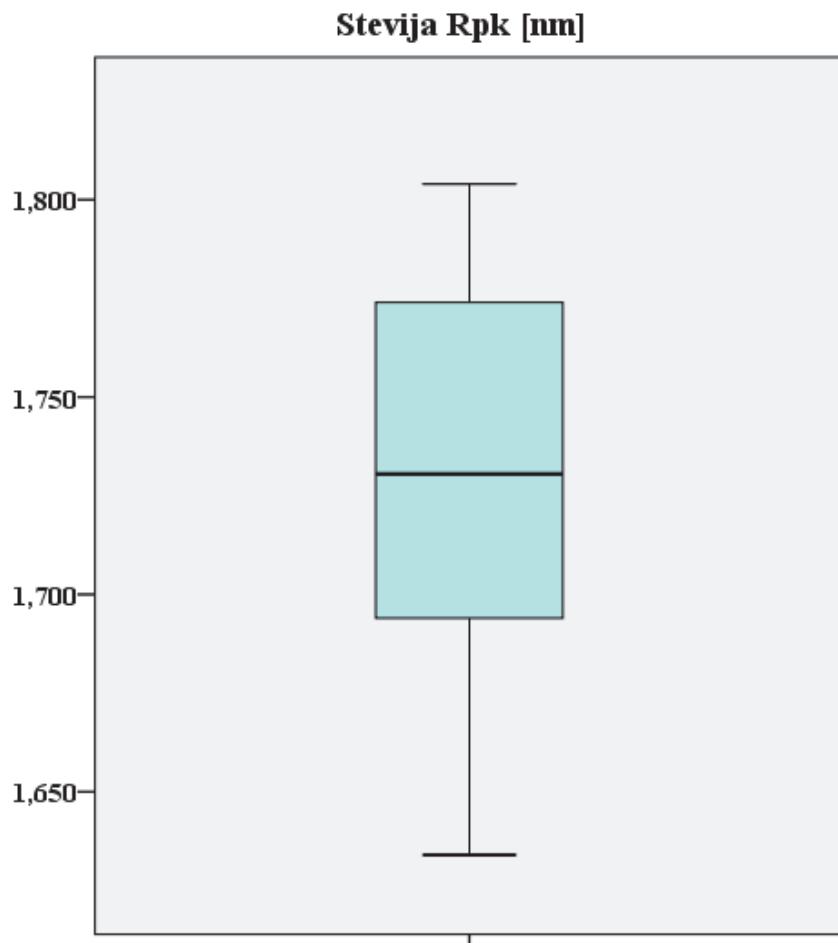
#### One-Sample Test

	Testna vrijednost = 3154					
	t	df	S.Z. (dvostrana)	Srednje odstupanje	95% Razlika intervala pouzdanosti	
					Donji	Gornji
hrapavost	1.458	31	.155	11.281	-4.50	27.06

Minimalna izmjerena hrapavost u grupi Stevija za Rpk je 1634, a maksimalna 1804 nm. Medijana je 1730.50, a prosječno izmjerena hrapavost je 1728.50 nm, dok je standardna devijacija 51.301 nm.

Stevija Rpk [nm]

N	Minimum	Maksimum	Raspon	Medijana	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
32	1634	1804	170	1730.50	1728.50	51.301



Primjenom One-Sample Test-a nije dobijena statistički značajna razlika hrapavosti ( $t = -0.055$ ,  $p = 0.956$ ) za Stevija Rpk [nm] u odnosu na referentnu vrijednost (1729 nm).

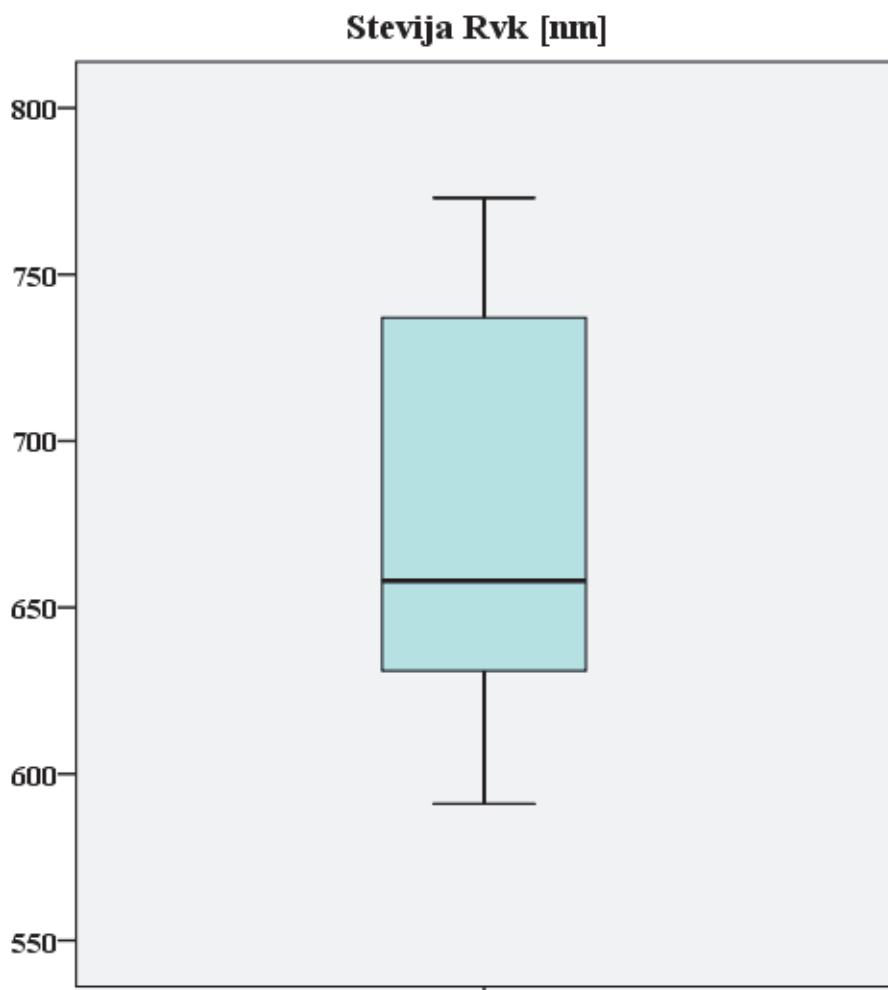
#### One-Sample Test

	Testna vrijednost = 1729					
	t	df	S.Z. (dvostrana)	Srednje odstupanje	95% Razlika intervala pouzdanosti	
					Donji	Gornji
hrapavost	-.055	31	.956	-.500	-19.00	18.00

Maksimalna izmjerena hrapavost u grupi Stevija za Rvk je 773, a minimalna 591 nm. Medijana je 658, a prosječno izmjerena hrapavost je 674,78 nm, dok je standardna devijacija 61.556 nm.

#### Stevija Rvk [nm]

N	Minimum	Maksimum	Raspon	Medijana	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
32	591	773	182	658.00	674.78	61.556



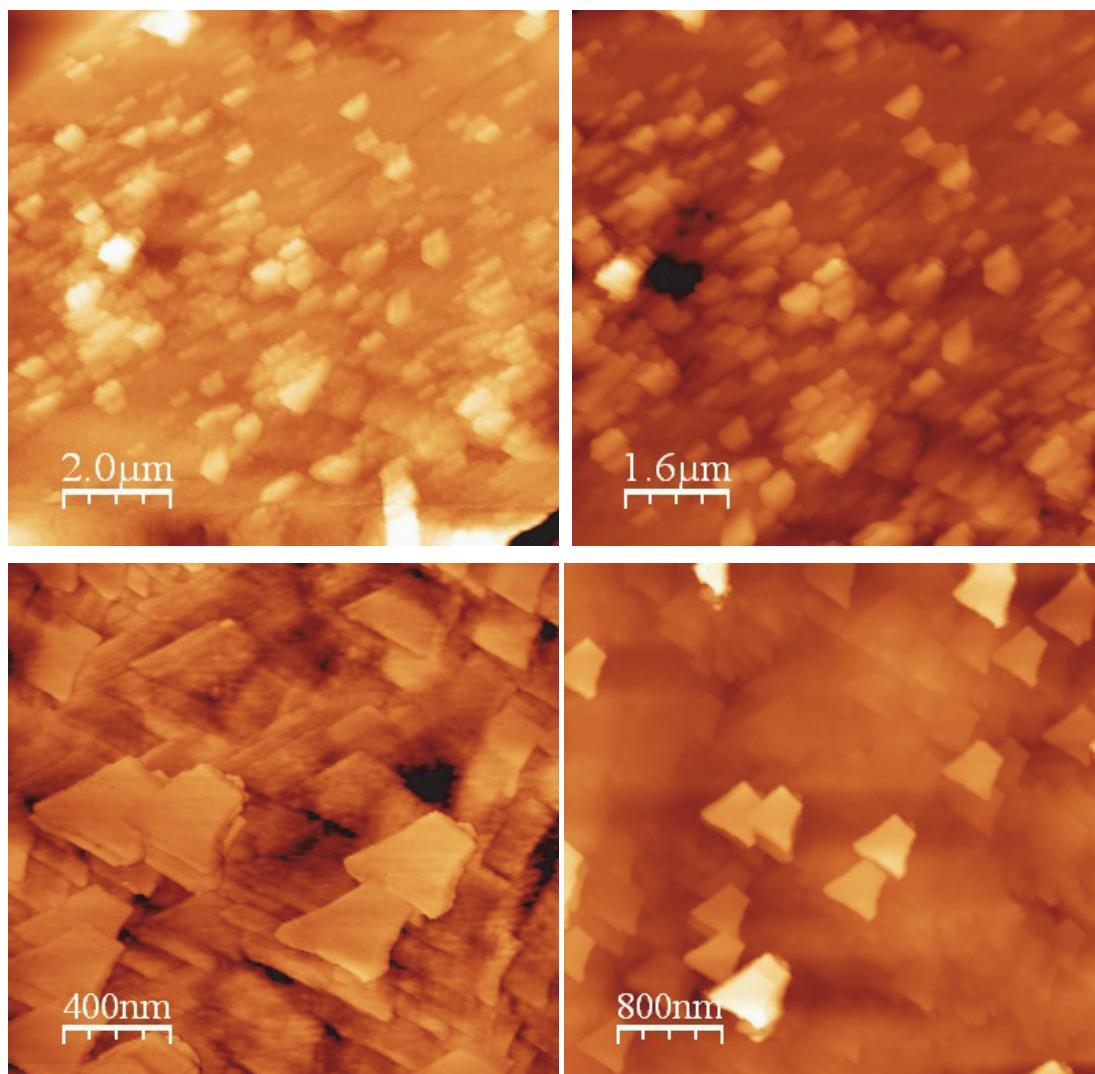
Primjenom One-Sample Test-a nije dobijena statistički značajna razlika hrapavosti ( $t = -0.847$ ,  $p = 0.403$ ) za Stevija Rvk [nm] u odnosu na referentnu vrijednost (684 nm).

#### One-Sample Test

	Testna vrijednost = 684					
	t	df	S.Z. (dvostrana)	Srednje odstupanje	95% Razlika intervala pouzdanosti	
					Donji	Gornji
hrapavost	-.847	31	.403	-9.219	-31.41	12.97

### 5.2.3. Ksilitol grupa

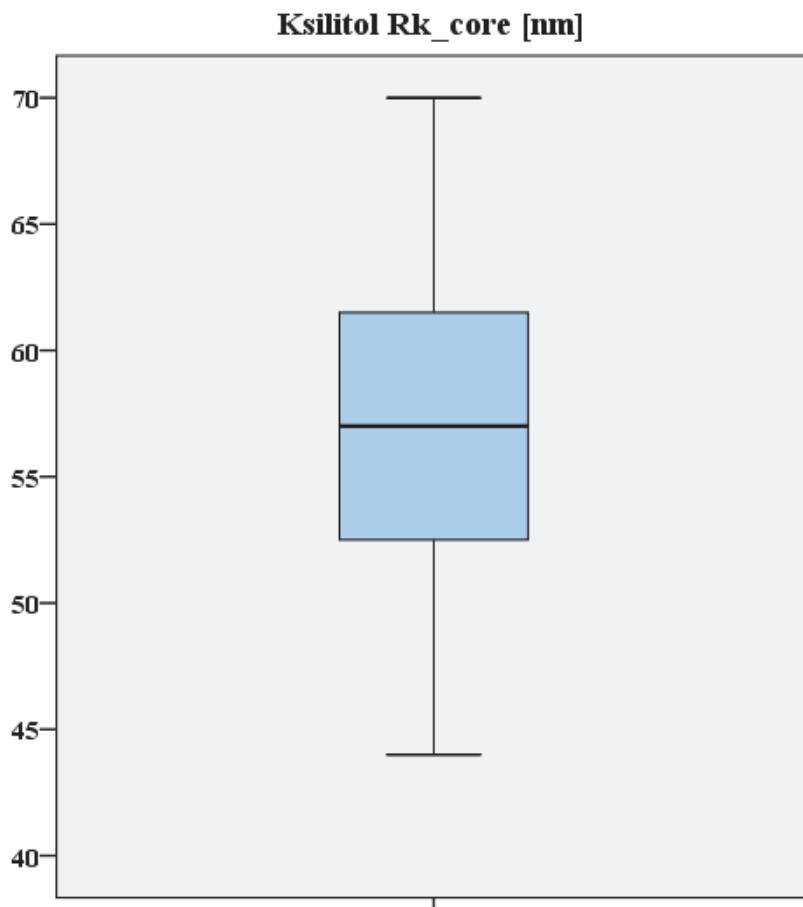
Amorfna masa je tanja i u njoj se nalaze brojne kristalne tvorevine koje potiču samo od ksilitola.



U grupi Ksilitol za Rk core minimalna izmjerena hrapavost je 44, a maksimalna 70 nm. Medijana je 57, a prosječno izmjerena hrapavost je 57.09 nm, dok je standardna devijacija 6.962 nm.

Ksilitol Rk core [nm]

N	Minimum	Maksimum	Raspon	Medijana	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
32	44	70	26	57.00	57.09	6.962



Primjenom One-Sample Test-a nije dobijena statistički značajna razlika hrapavosti ( $t = 0.889$ ,  $p = 0.381$ ) za Ksilitol Rk core [nm] u odnosu na referentnu vrijednost (56 nm).

#### One-Sample Test

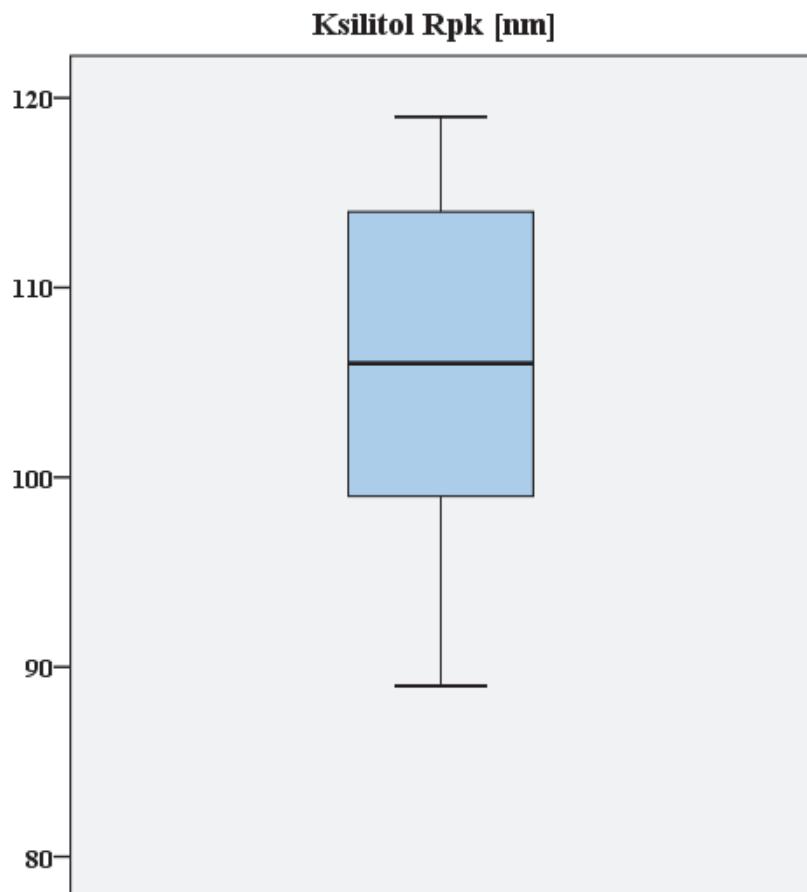
	Testna vrijednost= 56					
	t	df	S.Z. (dvostrana)	Srednje odstupanje	95% Razlika intervala pouzdanosti	
					Donji	Gornji
hrapavost	.889	31	.381	1.094	-1.42	3.60

Minimalna izmjerena hrapavost u grupi za Rpk je 89, a maksimalna 119 nm.

Medijana je 106, a prosječno izmjerena hrapavost je 105.78 nm, dok je standardna devijacija 9.019 nm.

Ksilitol Rpk [nm]

N	Minimum	Maksimum	Raspon	Medijana	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
32	89	119	30	106.00	105.78	9.019



Primjenom One-Sample Test-a nije dobijena statistički značajna razlika hrapavosti ( $t = 1.117$ ,  $p = 0.272$ ) za Ksilitol Rpk [nm] u odnosu na referentnu vrijednost (104 nm).

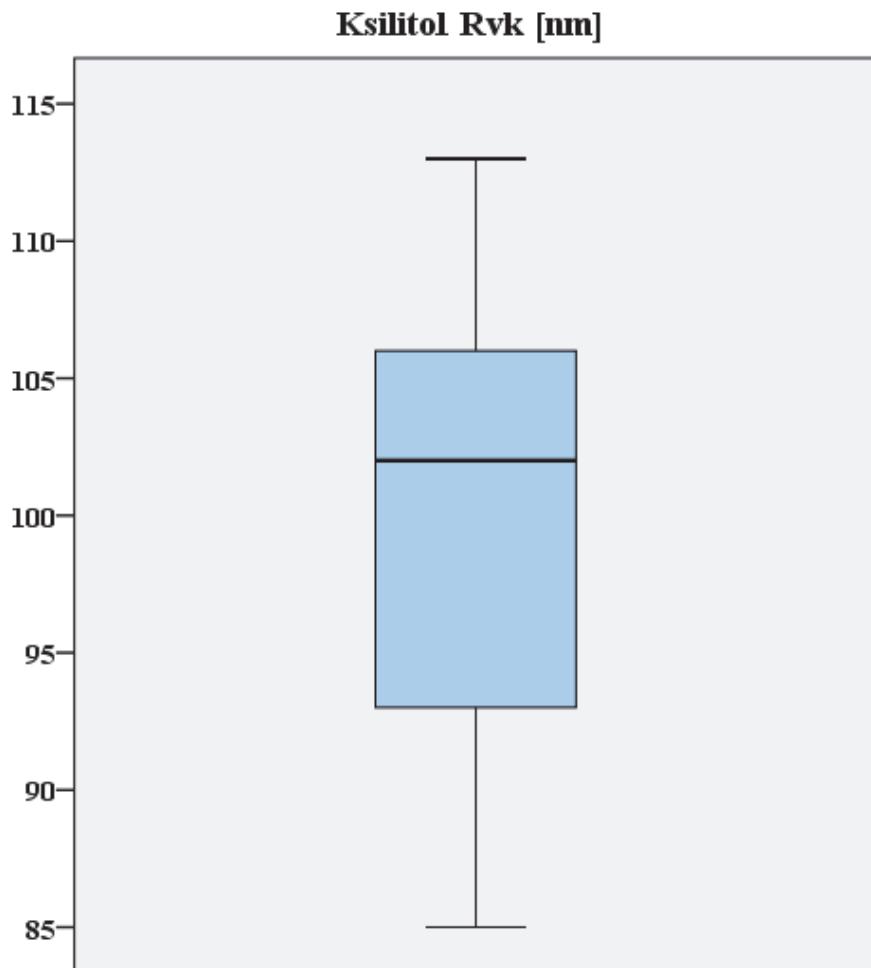
#### One-Sample Test

	Testna vrijednost = 104					
	t	df	S.Z. (dvostrana)	Srednje odstupanje	95% Razlika intervala pouzdanosti	
					Donji	Gornji
hrapavost	1.117	31	.272	1.781	-1.47	5.03

Maksimalna izmjerena hrapavost u grupi Ksilitol za Rvk je 113, a minimalna 985 nm. Medijana je 102, a prosječno izmjerena hrapavost je 99,78 nm, dok je standardna devijacija 8,404 nm.

### Ksilitol Rvk [nm]

N	Minimum	Maksimum	Raspon	Medijana	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
32	85	113	28	102.00	99.78	8.404



Primjenom One-Sample Test-a nije dobijena statistički značajna razlika hrapavosti ( $t = -0.147$ ,  $p = 0.884$ ) za Ksilitol Rvk [nm] u odnosu na referentnu vrijednost (100 nm).

### One-Sample Test

	Testna vrijednost = 100					
	t	df	S.Z. (dvostрана)	Srednje odstupanje	95% Razlika intervala pouzdanosti	
					Donji	Gornji
hrapavost	-.147	31	.884	-.219	-3.25	2.81

### 5.2.4. Poređenje između grupa

#### *Rk core*

Jednofaktorskom analizom varijanse istraživana je razlika hrapavosti [nm] triju grupa (Kontrolna, Stevija i Ksilitol). Utvrđena je visoko statistički značajna razlika ( $p < 0.01$ ) hrapavosti [nm] u rezultatima triju grupa:  $F (2, 93) = 149564.161$ ,  $p = 0.000$ . Stvarna razlika između srednjih vrijednosti grupa je velika ( $\eta = 0.9997$ ).

#### ANOVA

hrapavost

	Zbir kvadrata	df	Sredina kvadrata	F	S.Z.
Između grupe	199645338.583	2	99822669.292	149564.161	.000
Unutar grupe	62070.406	93	667.424		
Ukupno	199707408.990	95			

Naknadno poređenje uz pomoć Tukey-evog HSD testa ukazuje da se srednje vrijednosti sve tri grupe visoko statistički značajno razlikuju ( $p = 0.000$ ) u sva tri poređenja: između Kontrolne grupe ( $M = 157.66$ ,  $SD = 6.136$ ) i Stevije ( $M = 3165.28$ ,  $SD = 43.774$ ); Kontrolne grupe i Ksilitol ( $M = 57.09$ ,  $SD = 6.962$ ) i Stevije i Ksilitola.

#### Višestruka poređenja

Tukey HSD test

(I) Grupa	(J) Grupa	Srednje odstupanje (I-J)	Stand. greška	S.Z.	95% Interval pouzdanosti	
					Donja Granica	Gornja Granica
Kontrolni Rk core [nm]	Stevija Rk core [nm]	-3007.625*	6.459	.000	-3023.01	-2992.24
	Ksilitol Rk core [nm]	100.563*	6.459	.000	85.18	115.95
	Kontrolni Rk core [nm]	3007.625*	6.459	.000	2992.24	3023.01
Stevija Rk core [nm]	Ksilitol Rk core [nm]	3108.188*	6.459	.000	3092.80	3123.57
	Kontrolni Rk core [nm]	-100.563*	6.459	.000	-115.95	-85.18
Ksilitol Rk core [nm]	Stevija Rk core [nm]	-3108.188*	6.459	.000	-3123.57	-3092.80

\* Srednje odstupanje je značajno i iznosi 0.05.

### **Rpk**

Jednofaktorskom analizom varijanse istraživana je razlika hrapavosti [nm] triju grupa (Kontrolna, Stevija i Ksilitol). Utvrđena je visoko statistički značajna razlika ( $p < 0.01$ ) hrapavosti [nm] u rezultatima triju grupa:  $F (2, 93) = 29884.272$ ,  $p = 0.000$ . Stvarna razlika između srednjih vrijednosti grupa je velika ( $\eta = 0.9984$ ).

### **ANOVA**

hrapavost

	Zbir kvadrata	df	Sredina kvadrata	F	S.Z.
Između grupe	55185124.771	2	27592562.385	29884.272	.000
Unutar grupe	85868.188	93	923.314		
Ukupno	55270992.958	95			

Naknadno poređenje uz pomoć Tukey-evog HSD testa ukazuje da se srednje vrijednosti sve tri grupe visoko statistički značajno razlikuju u sva tri poređenja: između Kontrolne grupe ( $M = 134.91$ ,  $SD = 7.541$ ) i Stevije ( $M = 1728.50$ ,  $SD = 51.301$ ),  $p = 0.000$ ; Kontrolne grupe i Ksilitol ( $M = 105.78$ ,  $SD = 9.019$ ),  $p = 0.001$  i Stevije i Ksilitol,  $p = 0.000$ .

### **Višestruka poređenja**

Tukey HSD test

(I) Grupa	(J) Grupa	Srednje odstupanje (I-J)	Stand. greška	S.Z.	95% Interval pouzdanosti	
					Donja Granica	Gornja Granica
Kontrolni Rpk [nm]	Stevija Rpk [nm]	-1593.594*	7.597	.000	-1611.69	-1575.50
	Ksilitol Rpk [nm]	29.125*	7.597	.001	11.03	47.22
	Kontrolni Rpk [nm]	1593.594*	7.597	.000	1575.50	1611.69
Stevija Rpk [nm]	Ksilitol Rpk [nm]	1622.719*	7.597	.000	1604.63	1640.81
	Kontrolni Rpk [nm]	-29.125*	7.597	.001	-47.22	-11.03
Ksilitol Rpk [nm]	Stevija Rpk [nm]	-1622.719*	7.597	.000	-1640.81	-1604.63

\*. Srednje odstupanje je značajno i iznosi 0.05.

### **Rvk**

Jednofaktorskom analizom varijanse istraživana je razlika hrapavosti [nm] triju grupa (Kontrolna, Stevija i Ksilitol). Utvrđena je visoko statistički značajna razlika ( $p < 0.01$ )

hrapavosti [nm] u rezultatima triju grupa:  $F (2, 93) = 2643.116$ ,  $p = 0.000$ . Stvarna razlika između srednjih vrijednosti grupa je velika ( $\eta = 0.9827$ ).

## ANOVA

hrapavost

	Zbir kvadrata	df	Sredina kvadrata	F	S.Z.
Između grupe	6934650.521	2	3467325.260	2643.116	.000
Unutar grupe	122000.438	93	1311.833		
Ukupno	7056650.958	95			

Naknadno poređenje uz pomoć Tukey-evog HSD testa ukazuje da se srednje vrijednosti Kontrolne grupe ( $M = 109.63$ ,  $SD = 8.702$ ) i Stevije ( $M = 674.78$ ,  $SD = 61.556$ ) visoko statistički značajno razlikuju ( $p = 0.000$ ), kao i Stevije i Ksilitola ( $M = 99.78$ ,  $SD = 8.404$ ),  $p = 0.000$ , dok se srednje vrijednosti Kontrolne grupe i Ksilitola statistički ne razlikuju ( $p = 0.524$ ).

## Višestruka poređenja

Tukey HSD Test

(I) Grupa	(J) Grupa	Srednje odstupanje (I-J)	Stand. greška	S.Z.	95% Interval pouzdanosti	
					Donja Granica	Gornja Granica
Kontrolni Rvk [nm]	Stevija Rvk [nm]	-565.156*	9.055	.000	-586.72	-543.59
	Ksilitol Rvk [nm]	9.844	9.055	.524	-11.72	31.41
Stevija Rvk [nm]	Kontrolni Rvk [nm]	565.156*	9.055	.000	543.59	586.72
	Ksilitol Rvk [nm]	575.000*	9.055	.000	553.43	596.57
Ksilitol Rvk [nm]	Kontrolni Rvk [nm]	-9.844	9.055	.524	-31.41	11.72
	Stevija Rvk [nm]	-575.000*	9.055	.000	-596.57	-553.43

\* Srednje odstupanje je značajno i iznosi 0.05.

## **6. DISKUSIJA**

Odabrana tema istraživanja ima izuzetni značaj, jer povećana primjena gaziranih napitaka pokazuje rastući trend. Pojedine novije studije pokazuju da ih sve više konzumiraju i djeca mlađa od 5 godina, a da je sve veći broj osoba koji unose i po više puta dnevno pa čak i količine preko 11. U jednoj studiji u Kaliforniji utvrđeno je da je 43% ispitivanih petogodišnjaka pilo najmanje jedno gazirano piće dnevno, dok je 4% pilo 4 i više. I to je u skladu sa ranijom velikom studijom [1] koja je pokazale da u Kaliforniji preko 40% djece uzrasta 2-11 godina pije najmanje 1 gazirano piće dnevno. Kao mogući opšti poremećaji spominju se gojaznost, povećana agresivnost i drugi oblici poremećanog ponašanja [2, 4]. Isto tako su objavljene studije koje povezuju konzumaciju gaziranih napitaka sa kardiovaskularnim oboljenjima, prije svega infarktom miokarda i moždanim insultom [6, 7, 88]. Prema istraživanju tima sa Harvarda iz 2015 godine dvije boćice gaziranog napitka dnevno povećavaju rizik za dobijanje infarkta za 1/3 i šloga 1/6. Pri tome slična korealcija nije zabilježena kod drugih napitaka poput sa kofeinom poput crnog i zelenog čaja [88, 89]. Švedska studija iz 2012 godine, koja 15 godina pratila osobe koje su pili najmanje 300 ml. gaziranih pića dnevno, registruje za 40% veći rizik od razvoja kancera prostate. Isto tako pojedine studije ukazuju na uticaj gaziranih pića na fertilitet [90, 91, 92].

Značaj postavljenih ciljeva su u skladu sa novijim nalazima koji pokazuju da su neinfektivna (karijes) oštećenja zuba (erozije) u porastu posebno u industrijalizovanim sredinama. Novije epidemiološke studije pokazuju prevalencu koja se kreće od 2% do 57% [95]. Posebno su značajna oštećenja gleđi u adolescenciji koja pokazuju tendenciju porasta prevalence za tri godine (od 11 do 14 godine) kod istih osoba sa 1,8% na 23,8% [96]. Larsen i sardnici objavjuju da 14 do 15% 17 godišnjaka ima više od 3 površine zuba sa erozijama, a da je najčešće zahvaćena lingvalna površina u gornjoj vilici [97]. Veoma su zabrinjavajući podatci da i u uzrastu od 2-7 godina je zabilježena prevalanca gleđnih erozija od čak 32%

[98]. Ispitivanja u Velikoj Britaniji su kod više od 50% 5-6- godišnjaka otkrila značajna oštećenja gleđi, prije svega povezana sa konzumiranjem kiselih napitaka. Studija iz 2015 godine bilježi i povećani rad u opštoj anesteziji kod male djece kao posljedica konzumacije napitaka [99–101]. Najnovija studija u SAD takođe bilježi porast oboljenja tvrdih zubnih tkiva, kako karijesa tako i erozija, i to do 79% kao posljedicu konzumacije voćnih i kola napitaka [102]. Veoma izraženu zastupljenost erozija jačeg stepena (preko 89%) kod 15-ogodišnjaka bilježi i najnovija studija u Kini, Japanu i Indiji [103–105].

Kod izazivanja promjena na gleđi najvećeg uticaja imaju pH, vrsta kiseline i titrovane kiselost i koncentracija jon kalcijuma fosfata i fluorida koji određuju stepen zasićenosti mineralima u okruženje. Ukoliko je stepen veći smanjanje sila izvlačenja jona (demineralizacija). U većem broju studija sprovedenih in vitro pokazano je da je nezavisno od vrste kiseline koja je ispitivana(limunska, maleična, mlečna, fosforna) postoji sličan odnos predstavljen krivom korelacije između povećanja pH i stepena erozije, ali da ta povezanost nije i isključiva, već da su uključeni i neki drugi faktori [106]. Značajnu ulogu tu svakako igraju vrsta napitka koji se konzumira, način na koji se unosi i svakako učestalost unošenja. Pojedina istraživanja su pokazala da pojačano „mućkanje“ napitka u ustima može da pojača i sam proces rastvaranja minerala u zubnoj gleđi [106, 107]. Pojedini lijekovi, koji utiču na smanjenje lučenje pljuvačke posebno ingalaciona sredstva protiv astme), koja je inače ključna u puferском sistemu doprione stepenu demineralizacije. Patogenesa dentalnih erozija je direktno povezana sa puferkim kapacitetom i stepenom sekrecije salive [108, 109].

Kod izazivanja promjena na gleđi najvećeg uticaja imaju pH, vrsta kiseline i titrovane kiselost i koncentracija jon kalcijuma fosfata i fluorida koji određuju stepen zasićenosti mineralima u okruženje. Ukoliko je stepen veći smanjanje sila izvlačenja jona (demineralizacija). U većem broju studija sprovedenih in vitro pokazano je da je nezavisno od vrste kiseline koja je ispitivana (limunska, maleična, mliječna, fosforna) postoji sličan

odnos predstavljen krivom korelacije između povećanja pH i stepena erozije, ali da ta povezanost nije i isključiva, već da su uključeni i neki drugi faktori [106, 110, 111].

Neki autori su pokazali da ne postoji direktna povezanost sa pH, već da značajnu ulogu može da igra i prisustvo komponente gaziranosti u vidu CO<sub>2</sub>. Ona može da povećava puferske kapacitete u smislu stvaranja produženog pada pH, što je veći puferski kapacitet napitka, duže je potrebno salivi da neutrališe kiselost. To pojačava proces rastvaranja jona, jer je potrebno više jona minerala da zasiti slobodne hidroksilne jone. Smatra se da kada sadrže polibazične kiseline (one koje imaju dva ili više H<sup>+</sup> jona koji mogu da se oslobođe) duže se zadražva kisela sredina i veća je mogućnost demineralizacije. Ovakve kiseline mogu da grade tri vrste soli, **dihidrogen** (zamjenom jednog vodonikovog atoma metalom, npr. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), **hidrogen** (zamenom dva vodonikova atoma metalom, npr. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) i **neutralne** soli (zamjenom sva tri vodonikova atoma metalom, mpr. Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) [112, 113].

Zbog toga Jensdóttir i sar [114] smatraju da gazirani napitci, sportska i energetska pića se lakše neutrališu i pored toga što im je pH niži u odnosu na voćne sokove. Smatraju da je ukupna tzv. titrativan kiselost (suma svih vezanih i isparljivih kiselina prisutnih u napitku, koja se određuje procesom titracije) presudniji faktor za izazivanje oštećenja na površini gleđi od samoga pH. U prilog tome govore i neka novija istraživanja [115].

S obzirom da erozivni gubitak zuba, postaje sve više zabrinjavajući problem ukupne dentalne patologije, sve veći broj istraživanja se usmjerava ka njihovoј prevenciji u najranijem stadijumu. Poslednjih godina se intenzivno proučavaju mogućnost neutralisanja erozivnih oštećenja izazvanih gaziranim napitcima, pomoću različitih agenasa [116–120]. Sva ona su pokazala da su početna oštećenja gleđi značajno izraženija od početne kariozne lezije koja je isto tako izazivano hroničnim dejstvom organskih kiselina iz dentalnog biofilma (plaka) [118]. Podsticanje remineralizacije preparatima na bazi fluora, arginina, kazeinskih kompleksa (CPP-ACP), samo djelimično vrše oporavak gleđne strukture. Chunmuang i sar.

[118] zaključuje da prisustvo fluorida ili ksilitola, bilo da je kombinovan sa napitkom ili se zubi ispiraju sa njim poslije napitka ne može da sprječi demineralizaciju, ali može da je umanji. Lam i sar. [119] su ispitivali uticaj različitih zubnih pasta na površinu gleđi i registrovali sa SEM istraživanjem neznatne promjene na početne promjene gleđi. Poggio i sar. [120] su pokazali da zubna pasta koja pored fluorida sadrži i arginin stvara homogenu mineralizovanu strukturu bez jasnijih naznaka prizmi, a kod CPP-ACP paste prizmatične strukture se naziru i smatraju da se formira globularnim taloženjem mineralne substance. U našem istraživanju smo se opredijelili za ispitivanje uticaja ksilitola i stevije, kao potencijalnih zamjena za šećere u gaziranim napitcima (posebno stevia). Ksilitolu se poslednjih godina pridaju i određene remineralizacione sposobnosti i vršena su određena ispitivanja u vezi sa oporavkom zubne gleđi poslije dejstva kiselog napitka [117, 119], dok je stevia tek počela da se ispituje u dentalnim istraživanjima, i pregledom najvažnijih baza podataka nismo uspijeli da pronađemo radove koji obrađuju uticaj na procese remineralizacije.

U odabiru tehnologije ispitivanja promjena na zubnoj gleđi smo se opredijelili za primjenu AFM kao metode koja poslednjih godina sve više dominira u studijama zubnih mineralizovanih tkiva [120, 121, 122]. Ovom tehnikom je moguće analizirati topografske aspekte površinskih dijeova uzorka. Pošto su promjene u kristalnoj rešetci na nano nivou, ovo je i jedina tehnika koja omogućava direktno praćenje površinskih promjena i složene mineralne građe kristala gleđnih prizmi. Ni jedna od brojnih pojedinačnih tehnika koje se koriste nije pružala sveobuhvatni prikaz preostale površine zuba, i svaka ima svoje nedostatke (bilo da se radi o uništavanju uzorka, nemogućnosti da se zabilježe određene površinske karakteristike ili teškoće u tumačenju rezultata). Za ono što je od najvećeg kliničkog značaja, kako će se površinska promjena mijenjati u budućnosti, podaci su uglavnom nejasni. Kako se promjene u kristalnoj rešetci dešavaju na nanonivoima, do skora

nije bilo tehnoloških mogućnosti da se one skeniraju u potpunosti, pa je i tumačenje bilo indirektnog tipa koja nisu mogla da nam ukažu koji su dijelovi gledne strukture najpodložniji rastvaranju [5].

Na površini zuba se događaju složeni procesi koji se mogu mjeriti na više načina. Ni jedna od brojnih pojedinačnih tehniki koje se koriste nije pružala sveobuhvatni prikaz preostale površine zuba, i svaka ima svoje nedostatke (bilo da se radi o uništavanju uzorka, nemogućnosti da se zabilježe određene površinske karakteristike ili teškoće u tumačenju rezultata). Za ono što je od najvećeg kliničkog značaja, kako će se površinska promjena mijenjati u budućnosti, podaci su uglavnom nejasni. AFM ima nekoliko značajnih prednosti za ispitivanje dentalnih tkiva u odnosu na druge tehnike, a posebno SEM (Scanning Electron Microscopy), a osnovna je mogućnost dobijanja trodimenzionalnog profila ispitivane površine [20, 123]. AFM obezbeđuje mnogo veća uvećanja i može se porediti sa uvećanjima koje daje TEM (transmisiona elektronska mikroskopija). Velika prednost je i da uzorci ne zahtijevaju bilo kakav prethodni tretman i pripremu pa je dobijena slika biološkog materijala najpričližnija realnoj. AFM sasvim dobro funkcioniše u prisustvu vazduha i vode pa ga čini pogodnim čak i za izučavanje živih organizama in vivo [124]. AFM je pogodno za praćenje strukture gleđi od pojedinačnih kristala do prizmi (nano do mikro nivoa). Na nižim uvećanjima pokazuje gledne prizme kao duboka udubljenja. Individualni kristali su postavljeni paralelno i pokazuju izduženu ravan hidroksilapatita. Površine kristala su neravnomjerno zbijene formirajući na taj način hrapavost gledne površine. Na većim uvećanjima kristali pokazuju karakterističan heksagonalni izgled međusobno postavljeni pod ugлом od 60 stepeni [124].

Postoje dve vrste AFM skeniranja, kontaktni i vibrirajući (tapping) mod, od kojih se za ispitivanja gleđi uglavnom primjenjuje ovaj drugi kod koga je omogućena blaga pokretljivost kantalavera [126]. Zbog velike rezolucije koja se ispoljava na nanonivou, za

razliku od mehaničkih metoda profilometrije omogućena je kvantifikacija gubitka gleđnog tkiva [127]. AFM nanoindentifikacija omogućava i registrovanje promjena površinske čvrstoće, i registrovanje neravnina nivoa manjih od 100 nm što je na nivou veličine gleđnih kristala. Zbog toga su pojedine studije uspješno registrovale i mehanička svojstva razmekšale zubne gleđi u veoma ranim stadijumima razvoja erozija [128, 129].

Upravo rezultati istraživanja koja se sprovode sa AFM nanoindentifikacijonom metodologijom stiču sve veću primjenu u pokušaju razvoja gaziranih i negaziranih napitaka sa smanjenim erozivnim potencijalom [127, 130].

Pojedine studije ukazuju i na određene nedostatke AFM tehnike ispitivanja površinskih primjena na zubnoj gleđi. Vitkov i sar [125] smatraju na osnovu svojih ispitivanja nagrizanja površine gleđi sa kiselinom da sama AFM slika u pojedinim slučajevima ne odražava u potpunosti morfologiju promjenjene gleđne površine zbog visoke strmine gleđnih kristala što utiče na stvaranje torzije, što pak može da vodi do lažnog prikazivanja (umanjenja) profilometričkih parametara. Zbog toga preporučuju koršćenje i SEM analize da bi se dočarale prave vrijednosti. Isto tako i drugi autori ukazuju da je kombinacija različitih profilometričkih metoda preporučljiva u ovakvim osjetljivim praćenjima [20].

SEM metodologija omogućava subjektivno i kvalitativno opisivanje površine i takođe se često primjenjuje u istraživanju površinskih promjena na gleđi izloženoj različitim agresivnim atacima. Pošto se, radi omogućavanja odbijanja snopa elektrona, ispitivana površina se mora prekriti (napariti) sa slojem provodnika, uglavnom se radi o zlatu, tako da se uzorak ne može dalje upotrebljavati. Ovako tretirane površine se ne mogu podvrgnuti kvantitativnim mjeranjima nivoa promjena. Sa SEM-om se uglavnom prate morfološke strukture depozita, kao i oblik i raspored kristala i njihovih prekurzora, čiju veličinu je moguće odrediti [129, 131].

Zbog toga smo pored AFM ispitivanja uključili i SEM ispitivanje.

Iako je većina studija u tumačenju površinskih promjena na gleđi koristila dvodimenzionalne parametre, u ovome istraživanju smo se opredijelili za trodimenzionalna tumačenja izvedena iz krive nosivosti. U tribološkim istraživanjima površinskih promjena na razliitim materijalima i mehaničkim uređajima glavni problem kod primjene osnovnih dvodimenzionalnih parametara je složeni odnos između najviših vrhova i najnižih udubljenja odgovarajućeg profila. Neiskusni istraživači mogu da imaju teškoća u tumačenju podataka u tabelarnom obliku [20, 132]. U istraživanjima koja su ispitivala površinske promjene na dentalnim tkivima i stomatološkim materijalima, detaljnim pregledom dostupnih baza podataka smo utvrdili da je dominantno korišćeni parameter bio Ra (prosječna površinska hrapavost) i Rq (srednja vrijednost kvadratnog odstupanja). Oba parametra mjere visinska odstupanja profila od srednje linije koja prolazi duž njega, pri čemu Ra predstavlja aritmetički prosjek hrapavosti, a Rq geometrijski prosjek. Svaka vrijednost koristi iste pojedinačne mjere visine vrhova i dolina na profile, pri čemu pojedinačno jako izraženi vrhovi koji odskaču mogu da utiću na rezultat u smislu podizanja vrijednosti i to više kod Rq nego Ra [132]. Istraživanja koje je sproveo Mirjanić [5] prateći uticaj Coca Cole na površinu gleđi registrujući dvodimenzionalne parametre Ra, Rq i Rz su pokazala značajno povećanu hrapavost sa dominacijom Rq parametara.

Pawlus i Grabon [133] takođe ističu da je najveći nedostatak dvodimenzionalnog parametara (Ra) što ne pruža informacije o direktno teksturnim odlikama površine, a samim tim i sklonosti ka trošenju u budućnosti kao i otporu prema trošenju ili potencijalu površine da zadržava tečnosti (važno kod podmazivanja). Sve to značajno ograničava utvrđivanje kvalitativnih osobina površine i svodi na kvalitativni opis. Zbog toga je i uvedena i nova mogućnost, trodimenzionalnog praćenja profilnih karakteristika, koje mogu da budu ubjedljivije kvalitativno i kvantitativno upoređivana između različitih površina. Ti parametri

se nazivaju parametri nosivosti koji se izvode iz krive tzv. Abbott i Firestonove krive nosivosti [20, 63, 132]. Ovaj pristup opisa profila zasniva se na predstavljanju površinskih pojedinačnih karakteristika u krivoj funkcije koja se kao takva može porebiti sa drugim profilima. Prema Abbott i Firestone [58–62] ova kriva predstavlja kumulativnu distribuciju visina pojedinačnih platoa koja bi se postigla kada bi se površina abradirala do tog nivoa. Osnova je da se profil ispituje na nivou ravni od najvišeg vrha do najnižeg udubljenja na svakom nivou profila, a količina materijala koja se nađe u tome presjeku se prikazuje kao proporcija (odnos) u odnosu na ukupnu površinu. Ova kriva se usklađuje sa utvrđivanjem totalne dužine. Funkcija ovog odnosa sa visinom uzorka predstavlja tzv krivu nosivosti iz koje se izvlače njeni prametri. Abbott i Firestone su postavili krivu nosivosti kako bi ispitivali novobrušene površine u industriji mašina. To je bilo važno jer ima uticaja na međusobno oštećenja površina u prvočitnim kontaktima. Štreći vrhovi koji predstavljaju rani gubitak materijala se uklanjaju sa ciljem da obrade površinu i ostave više predvidivu i otporniju strukturu mašine. Isto tako površina predstavljena ovom krivom prikazuje raspored primarnih udubljenje(dolina) koje mogu da predstavljaju rezervoare za lubrikante ili zadržavanje fluida [20, 132].

Field i sar [132] smatraju da kriva nosivosti ne može da ima istovjetnu ulogu u opisu površine zuba u smislu njegovog direktnog trošenja. Ali ukoliko bi se određivala poslije dejstva agresivnog faktora na površinu, može da obezbijedi mnogo detaljnije objašnjenje koliko je površina gleđi bila napadnuta i kakvu tendenciju će imati da se mijenja tokom budućih erozivnih, abrazivnih ili mješovitih izazova. To se posebno odnosi na trajanje površine zuba kod ranih gubitaka, obezbjeđivanja trajnije otpornosti i sposobnosti da zadržava tečne komponente pod uslovima različitih opterećenja, kako poslije mehaničkih tako i hemijskih faktora.

Pawlus and Grabon [133] takođe smatraju da su parametri krive nosivosti povoljniji od Ra vrijednosti za opisivanje površina koje su izložene različitim opterećenjima. Drugi autori [134, 135] smatraju da u realnim odnosima između površina dolazi do uklanjanja ispuštenja (vrhova), ali da se na novo uspostavljenom platou mogu stvarati dodatne strukture pri čemu se ne remete izraženija udubljena, ali da vijrednost Ra to ne može registrovati dovoljno efikasno takva iskrivljenja. Tako se dobija tzv „multi-slojevita“ površina.

Korišćene krive nosivosti nije potpuno novo u medicinskim istraživanjima, posebno kod praćenja oštećenja zglobova kuka [136].

Kaidonis i sar. [137] smatraju da je kriva nosivosti pogodna za tumačenje površinskih promjena na zubnoj gleđi jer može da prikazuje mješovite uticaje poput erozija i abrazija. Ova kriva je u stanju da prikaže bi-faznu trend gubitka površine gleđi. Whitehead i sar. [138] su među prvima koristili krivu nosivosti za tumačenje erozivnih promjena na vestibularnim površinama frontalnih zuba. Las Cases i sar. [139] su opisali mogućnost primjene krive nosivosti kod vizuelnih poređenja nativne površine zuba.

Sama kriva nosivosti inače proistiće iz tzv. Amplitude Distributivne funkcije (ADF) koja spada u grupu funkcija vjerovatnoće i prikazuje vjerovatnoću da odgovarajući profil posjeduje određenu visinu  $z$ , na bilo kojoj poziciji  $x$ . ADF posjeduje karakteristični oblik zvona, kao većina funkcija vjerovatnoće i govori nam koji dio profila se nalazi na određenoj visini prikazano u vidu histograma. Kriva nosivosti je integralni dio ADF (od vrha na dolje) i odgovara kumulativnim distribucijama vjerovatnoća. Ona praktično se matematički izvodi kao integral amplitude distribucije funkcije jer predstavlja kumulativnu distribuciju vjerovatnoće. Uobičajeno se integral izvodi od najvišeg vrha pa na dolje, tako da svaka tačka ove krive ima i svoj fizički značaj jer pokazuje koja linearna frakcija ispitivanog profila leži iznad određene visine. ADF pak govori koji deo površine leži na određenoj visini [57, 58, 133]. U našim istraživanjima smo koristili parametre izvede iz same krive nosivosti. Svi

proračuni su direktno obezbijeđeni sa programom povezanim sa AFM čitačem. Ti parametri se nazivaju  $R_k$  parametri (slika 1.16.).

Postoji značajna količina podataka izraženih u obliku krive nosivosti za površinu. Nedavno uloženi napor u završnoj obradi pokušali su da sažmu te podatke u nekoliko parametara.  $R_k$  parametri predstavljaju jednostavan pristup u kome je kriva nosivosti koljenastog oblika približena skupom pravih linija.

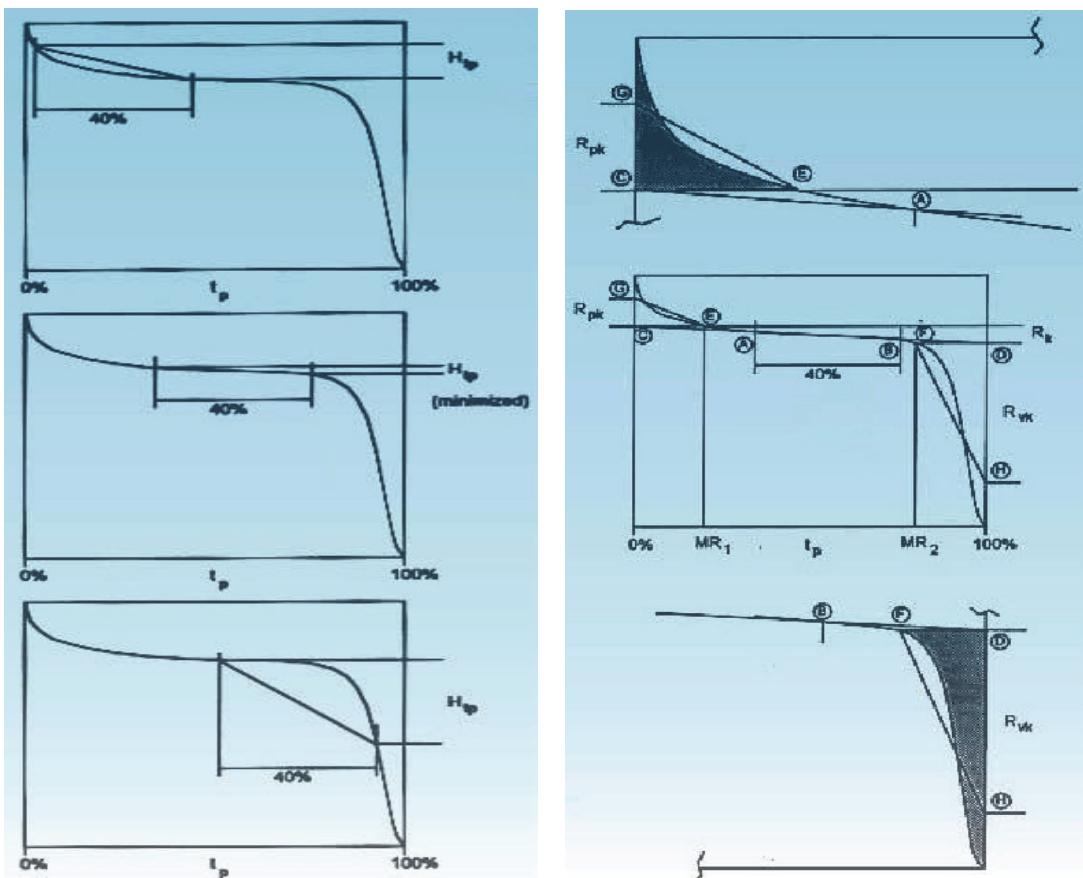
$R_k$  konstrukcija je kreirana da krivu nosivosti podijeli u tri dijela: male vrhove iznad glavnog platoa, platoi, i duboke doline između platoa.

Prvi korak jeste kliziti „prozorom“ preko krive nosivosti tražeći minimalnu sekantu nagiba. Prozor je 40% tp širine. Kako prozor klizi preko krive siječe dvije tačke na istoj. Cilj je pronaći položaj gdje je nagib između dvije tačke minimalan, ili obzirom da prozor ima konstantnu širinu, gdje je visina  $H_{tp}$  između dvije tačke minimalna. U daljem tekstu su predstavljena 3 koraka u ovom procesu.

Kada se pronađe prozor sa minimalnom sekantom nagiba, počinje prilično komplikovana konstrukcija. Na slici ispod pronašli smo prozor sa minimalnim nagibom i tačke A i B gdje prozor siječe krivu nosivosti. Zatim treba povući liniju kroz ove dvije tačke kako bi pronašli presjecanja na 0% i 100%, tačke C i D. Najveća visina između C i D je prvi parametar,  $R_k$ . Zatim treba povući horizontalnu liniju od tačke C do krive nosivosti, tačke E. Pronaći površinu ispod krive nosivosti i iznad linije CE, koja je osjenčena u gornjem dijelu slike. Dalje, izračunati  $R_{pk}$  kao visinu trougla CEG koji ima isti prostor kao i osjenčeni dio. Za doline povući horizontalnu liniju od tačke D do tačke F na krivoj. Izračunati površinu preostalog prostora ispod linije DF i iznad krive nosivosti (koji je osjenčen u donjem dijelu slike). Zatim izračunati visinu  $R_{vk}$ , trougla DFH koji ima istu površinu kao i osjenčeni dio.

Parametar  $R_k$ , je najveća visina između lijevog i desnog presjecanja – linije koja ide kroz krajeve minimuma  $H_{tp}$  40% prozora.

$R_k$  se poklapa sa dubinom radnog dijela površine, ravnim dijelom krive nosivosti. Nakon početnog perioda razrade (tj. nakon što se vrhovi predstavljeni sa  $R_{pk}$ smanje), ovaj dio površine nosi teret i najbliži je odgovarajućoj površini. Ponekad se ovaj dio površine naziva „jezgro hrapavosti“ ili „kernel“ (otuda slovo *k* u subskriptu).



Slika 1.16. Napredna statistička analiza hrapavosti – Bearing Ratio roughness

Parametar  $R_{pk}$  procjena malih vrhova iznad glavnog platoa površine. Ovi vrhovi tipično nestaju (ili se smanje) tokom pripremnog perioda u prvom dijelu razrade. Uopšteno, poželjno je da je ovaj  $R_{pk}$  parametar prilično mali.

Parametar  $R_{vk}$  je procjena dubine dolina koje zadržavaju analizirane i tretirane površine u svom funkcionalnom dijelu.

Pojedini autori smatraju da kriva nosivosti posjeduje i određene nedostatke, prvenstveno u tome jer ne opisuje prostorne situacije koje se odnose na broj izolovanih udubljenja i vrhova. Udubljenja ili praznine, kombinovane sa dužinom svojih ivica mogu da

imaju uticaja na ponašanje prilikom trenja o drugu površinu, da utiču i na samu ukupnu hrapavost, tok tečnosti i povezanost između vrhova, ali se to može korigovati sa izračunavanjem tzv Eulerovih karakteristika namijenjenih za izolovane vrhove i doline. Ipak tolika preciznost nije neophodna kod praćenja erozivnih promjena na zubnoj gleđi [20, 140].

U različitim in vitro modelima ispitivanja izlaganje erozivnom agensu je bilo prilično raznoliko i uglavnom se kretalo oko nekoliko minuta [101]. Novije studije govore da izlaganje kiselini je dovoljno da bude i 30 sekundi da bi se primetile početne destrukcije gleđi [141–143]. U našem istraživanju smo se opredelili da zube podvrgnemo erozivnom dejstvu Coca Cole u trajanju od 12h, jer se taj period pokazao sa najvećim oštećenjima u našim prethodnim istraživanjima [5, 92].

Uzorci zdrave humane gleđi su čuvani u rastvoru vještačke pljuvačke, jer istraživanja pokazuju da odlaganje uzorka gleđi i dentina u dekonizovnoj vodi ili kiselim rastvorima u toku 24h mogu značajno da umanju mehaničku otpornost, a u dužem periodu smanjuje i do polovine orginalne vijrednosti. Zbog toga je i preporučeno odlaganje u balansiranom mineralnom rastvoru koji ima osobine pljuvačke i podržava ravnotežu minerala [144]. Humana saliva je inače najznačajniji zaštitni faktor u usnoj duplji i izvor svih remineralizacionih mehanizama. Ona može da ispira, rastvara i djeluje puferski na agresivne, korozivne komponente, ali potpomaže i remineralizaciju prije svega kao izvor jona kalcijum, fosfata i fluorida [145, 146]. Da je mineralna faza u salivi veoma značajna za remineralizacione procese potvrđuje više istraživanja u kojima je postignut djelimičan oporavak erozivnih lezija sa mineralnim rastvorima vještačke pljuvačke [20, 147, 148]. Ipak nikada nije registrovana kompletna remineralizacija u ovakvim rastvorima [149].

Pored neorganskog dijela pljuvačke, smatra se da i njena organska komponenta predstavljena sa mucinima može da ima značajnu ulogu u zaštiti zubne gleđi. Sijalomucini se talože na površinu zuba stvarajući dentalnu pelikulu. To se događa odmah po čišćenju

površine zuba i veza proteina (sijalomucija) se ostvaruje višestruko preko, jonskih, hidrofobnih i van der Waals-ovihs sila i u njemu učestvuju samo određena grupa salivarnih proteina, posebno slatherini i proteini bogati u kiselom prolinu [150]. Ove grupe proteina koje lako vezuju kalcijum, ne samo da omogućavaju povezivanje sa površinom gleđi, već mogu vezivati slobodne jone kalcijuma i držati ih kao rezervoar za potrebe remineralizacije. Na taj način pelikla se ponaša kao selektivna membrana između zuba i salive koja reguliše mineralnu homeostazu na pvršini gleđi [145, 148–150]. Istraživanja su potvrdila djelimičnu sposobnost pelikle da zaštiti oštećenja gleđi pri dejstvu kiseline, ali je to njen preventivno svojstvo ipak ograničeno i dosta zavisno od individualnog sastava pelikle [150–153]. Više različitih studija je pokazalo da je zaštitno i remineralizaciono dejstvo izraženije kod kompletne pljuvačke sa punim mineralnim sastavom, za razliku od dijalizirane gde su uklonjeni joni [145, 150–153]. Pojedina ispitivanje strukture pelikle kod pacijenata sa izraženim erozijama su pokazale da ona sadrži manje količine kalcijuma i proteina iz grupe sthaterina povezanih za transport kalcijuma [151]. Isto tako postoje i suprotni nalazi koji nisu mogli da dokažu povezanost između osjetljivosti na erozivne atake i sadržaja jona kalcijuma u salivi [145, 149]. Batista i sar. [155] su pokazali da se u in vivo eksperimentima gubi značajnije manje kalcijuma nego u in vitro (gdje nisu otkrili veće razlike imedju raznih oblika medija) i smatraju da bez obrzira da li se koristi vještačka ili sakupljena humana saliva kao medij in vitro eksperiment ne može u potpunosti odraziti stvarno stanje. U najnovijoj studiji Baumann i sar. [145] su pokazali da značaja u zaštiti Zubne gleđi od erozivnih dejstava imaju i proteinska i mineralna komponenta, ali da nije uočena značajnija razlika i prednost kod bilo koje komponente kao medijuma za čuvanje uzoraka gleđi prilikom in vitro ispitivanja. Na osnovu takvih razmišljanja opredijelili smo se da naše uzorke čuvamo u formulu vještačke pljuvačke koja sadrži samo mineralne jone slične njenom nativnom sastavu.

Rezultati AFM analize pokazuju značajni opseg izmijerenih vrijednosti pojedinih hrapavosti unutar svakoga uzorka, sa značajno višim vrijednostima pikova u odnosu na udubljenja, što ide u prilog, nalazu zabilježenom sa SEM-om o dominantnijim demineralizacijama unutar centralnih dijelova prizmi, sa manjim gubitkom interprizmatičnog dijela. Slične nalaze su dobili i drugi autori u tumačenju erozivnih efekata kiseline na površinske slojeve zubne gleđi [6, 128, 173, 174].

Prema Lussi i sar. [176] erozija se odigrava sa kontinuiranim uklanjanjem sloja po sloja kristala vodeći prvo do razmekšavanja gleđi, a zatim i gubitka integriteta tkiva. AFM upravo omogućava kvantifikaciju tog gubitka, a ne samo bilježenje topografskog izgleda sa veoma visokim rezolucijama.

Darceli i sar. [174] su u svojim AFM analizama promjena na gleđi pod dejstvom hlorovodinične kiseline, što se javlja kod pacijenata sa GERD sindromom (učestala povraćanja) su pokazali da se najveće promjene događaju već u periodu između 30-40 sekundi, a da se kasnije, se stepen gubitka tkiva beznačajno smanjuje. Oni smatraju da je ovakav trend posljedica prisustva većeg broja kristala hidroksil apatita malog dijametra u gleđnim prizmama koji obezbjeđuju veću kontaktну površinu sa agresivnom noksom. Kada se u prvom napadu uklone manji kristali, preostaju oni većih dimenzija sa većim prostorom između njih čime je smanjena kontaktna površina i stepen demineralizacije. Pojedini autori takođe smatraju da su ovaki kristali većih dimenzija dijelom i otporniji na kiseline [177, 178]. Tu se takođe spominje i heterogenost gleđnih kristala, kao i njhova različita usmjerenost u prizmatičnom i interprizmatičnom dijelu [179, 180]. Ovakvi nalazi ukazuju da je sam proces demineralizacije cikličan i da se usporava u odnosu na početni zamah. Ipak, po uklanjanju većih kristala dolazi do ponovnog ubrzavanja procesa.

Poggio i sar. [64] su pronašili da se vrijednosti početnih demineralizacija kreću u opsegu od 148–261 nm, što je slično našim nalazima gde je kod kontrolnih uzoraka zabilježena vrijednost od 145–166 nm.

Lippert i sar [204] su ispitivali pomoću AFM tehnologije reakcije na površini demineralizovane gleđi poslije njenog izlaganja vještačkoj pljuvačci. Njihovi rezltati se podudaraju sa našima, jer su zabilježili naglašenu prizmatičnu strukturu sa granuliranim površinom. Poslije izlaganja vještačkoj pljuvačci pojavljuju se haotično orjentisani depoziti meineralne faze.

Dobijeni rezultati AFM analize površine gleđi izlagane rastvoru ksilitola prije i poslije dejstva Coca Cole pokazuju značajno manje vrijednosti parametara hrapavosti izvedenih iz krive nosivosti u poređenju sa dejstvom vještačke salive. To se posebno odnosi na vrijednosti  $R_k$  kao pokazatelja srednje vrijednosti neravnina, dok su najmanje izražene razlike u udubljenjima, ali ipak pokazuju statističku značajnost.

Ksilitol se već duže vreme ispituje i kao remineralizacioni agens. Više novijih kliničkih i laboratorijskih studija je pokazalo da pojedini, tzv. šećerni alditoli ili alkoholi (prije svega sorbitol i ksilitol) pokazuju povezanost sa očvršćavanjem vještački ili prirodno izazvane kariozne lezije. Ranije studije koje su povezivale ksilitol sa smanjenjem incidence karijesa nisu spominjale takvu mogućnost već su se prije svega koncentrisali na njihove antimikrobne efekte. Posljednjih godina se pojavljuju i rezultati vezani i za trećeg zastupnika ove grupe eritrol [183].

Remineralizaciona svojstva ksilitola se opisuju kao posljedica pasivnog i aktivnog dejstva. Kao najznačajnije pasivno dejstvo se spominje povećanje salivacije, kao i uklanjanje izvora stvaranja kiselina u dentalnom plaku, poput rastvorljivih monosaharida. Kao posljedica toga dolazi do inhibicije razvoja kariogenih mikroorganizama i produkcije elemenata sazrijevanja plaka poput dekstrana i levana [183].

Naučna literatura ima sve više podataka i o tzv. aktivnom dejstvu ksilitola na procese remineralizacije. Već čuvena Turky studija, koja je prva pokazala da korišćenje ksilitola dovodi do smanjenja razvoja karijesa je zabilježila kariostatičke efekte ksilitol žvakaće gume i u prisustvu povećanih količina heksoza (glukoza i fruktoza). Žvakaća guma sa ksilitolom i bez njega izaziva povećano lučenje pljuvačke, ali je samo kod prve zabilježena značajno manja incedenca karijesa [184]. Slični zaključci su izvedeni i iz drugih istorijski poznatih longitudinalnih studija u vezi primene ksilitola u prevenciji karijesa [185], ali i u eksperimentima izvedenim na životinjama. U svim tim studijama je pokazano da ksilitol umanjuje razvoj karijesa i pored snažnih kariogenih izazova, i da je dejstvo ksilitola izraženije od sorbitola [186, 187].

Moguće mehanizme, kojima polioli ili šećerni alkoholi kojima pripada i ksilitol, mogu da podstiču procese remineralizacije na zubnoj gleđi je detaljno opisao Mäkinen [183]. Oni obuhvataju:

1. Odsustvo redukcionih karbonil grupa što ih čini manje hemijski reaktivnim. Zbog toga se smatra da transportni mehanizmi kariogenih bakterija ne prepoznaju ksilitol [188].
2. Šećerni alkoholi posjeduju dodatnu broj hidrogenih jona koji mogu da se vezuju sa drugim metabolitima kao što su na primjer različiti koenzimi (npr. NADP i NAD) ili drugim donorima i tako stvaraju hemijski redukovane produkte i intermediarne metabolite. Kao posljedica toga neznatno utiču na kiselost u dentalnom plaku [183].
3. Stvaranje kompleksa zahvaljujući polioksi strukturi ksilitola i tridentatnim vezama (H-C-OH). Na taj način mogu da vezuju različite metalne jone i oksi-acide. Za remineralizaciju su posebno značajni kompleksi sa dvovalentnim Ca, kao mogućim rezervoarima za potrebe ugradnje toga minerala u kristalnu rešetku [183]. Kao nosač kalciumovih jona kompleks omogućava njihovo prodor u dublje slojeve demineralizovane gleđi [198].

4. Hidrofilnost kao posljedica velikog broja hidroksilnih grupa, čini većinu šećernih alkohola (alditol ili poliola) rastvorljivih u salivi. Hidrofilni molekuli alditola su u kompeticiji sa molekulima vode za hidratacioni sloj bio-molekula (npr. proteini i metalni katjoni). Posljedica toga može da bude i jačanje hidrofobnih interakcija između molekula proteina što se manifestuje u zaštiti proteina od termalnih i drugih denaturacionih ili destrukcionih procesa. To može da se odnosi i na stabilizaciju salivarnog Ca fosfatnog sistema koji predstavlja osnovu za uspješnu remineralizaciju. Ovom mehanizmu doprinosi i stvaranje kompleksa sa molekulom ksilitol [183].

5. Kao posljedica relativno niske molekularne težine i hidrofilne prirode alkoholnih šećera mogu da poseduju osmoregulatornu ulogu u različitim biološkim sistemima [189].

6. Ksilitol i neki drugi šećerni alkoholi poseduju sposobnost „čišćenja“ slobodnih radikala u biološkim i eksperimentalnim sistemima [190].

Gore navedena „Turku studija“ [184, 191] je prva pokazala sposobnost ksilitola da vrši oporavak postojećih početnih karioznih lezija, što je potvrđeno i nizom drugih kliničkih istraživanja. Remineralizacija početnih karioznih lezija je zabeležena kako na bukalnim tako i na aproksimalnim površinama zuba. Ovi rezultati su podstakli vlasti u Finskoj i nekim azijskim zemljama da se zvanično preporuči unošenje 6.7 g ksilitola dnevano kao preventivna mjera [183, 192, 193].

Leach i sar. [194] su pokazali slične remineralizacione efekte na okluzalnim površinama kod pacova.

Featherstone [195] je registrovao remineralizaciju eksperimentalnog karijesa pomoću rastvora koji je sadržao 2,5% ksilitola uz ostale sastojke poput 0.6 mM NaF i soli K, Ca, Sr, i Zn. U poređenju sa grupe sa salivom, kod koje je tokom 14 dana došlo do očvršćavanja samo 20 mikrona unutrašnjeg sloja, kod ksilitola je remineralizovano 40-50 mikrona lezije debljine 160 mikrona.

Vissink i sar. [196] su ispitivali remineralizacione sposobnosti različitih vrsta salive, mjereći mikrotvrdoću prethodno razmekšale gleđi. Najbolji oporavak je postignut sa 2% rastvorom ksilitola u niskoviskoznoj zamjeni za pljuvačku u kojoj je bilo i mucina ili karboksilmetilceluloze.

Arends i sar. [197] su vršili in vitro ispitivanja kombinovanog uticaj fluorida i ksilitola na govedođoj gleđi. Ona je bila izlagana mlijekojoj kiselini u puferu na demineralizacionom pH od 4,5. Ksilitol i fluoridi su pokazali sličnu moć redukcije lezije. Slični rezultati su zabilježeni od strane Miake i sar. [199].

Scheinin i sar. [200] su uzorke goveđe gleđi ugrađene u posebnu protezu postavljali u usta djece sa progresivnim karijesom. Jedna grupa djece je imala do tada uobičajenu ishranu dok su druga uzimala po 20 g ksilitola u obliku bombona. Unošenje ksilitola je značajno očvršćavalo gleđ što je potvrđivano testiranjem mikročvrstoće.

Više studija je pokazalo da prisustvo ksilitola u zubnoj pasti može da podstiče procese remineralizacije gleđi [201–203]. Ipak postoje i drugačiji nalazi koji govore da prisustvo samo ksilitola nema efekta [204, 205]. Hicks i sar. [198] smatraju da su ovakvi konfliktni rezultati posljedica same postavke eksperimenta (in vitro ili in vivo), vrste eksperimentalnog substrata (humana ili goveđa gleđ), same koncentracije ksilitola koje se u različitim eksperimentima kreću od 10% pa sve do 70%, ali i tehnike kojom se prate remineralizaciono-demineralizacioni procesi (polarizacioni mikroskop, SEM, mikroradiografija, AFM). U njihovom istraživanju dejstva kombinovanih zubnih pasti pronašli su da koncentracija ksilitola preko 10% može da pokazuje remineralizacione efekte, smatrajući da prisustvo ksilitola može da potpomaže iskoristljivost fluorida i zahvatanja kalcijuma i fosfata iz salive, a time omogućava pojačani stepen remineralizacije erodiranih površina.

Amaechi i sar. [203, 204] su upoređivali efikasnost ksilitola i natrijum fluorida u remineralizaciji erozija na površini gleđi nastalih pod dejstvom soka od pomorandže. Uzorci

goveđe gleđi su potapani 6 puta u toku 24 h u trajnju od 5 minuta u čist sok od pomorandže, sok sa 25% ksilitola, sa prisustvom 0,5 ppm natrijum fluorida i kombinovanim prisustvom ksilitola i fluorida. Mjerenja gubitka minerala su pokazala da kombinacija ksilitola i fluorida ispoljava sinergičko dejstvo u redukciji erozija. Isti autori su takođe dokazali da samo prisustvo ksilitola ne pokazuje značajna antidemineralizaciona svojstva. U sličnoj studiji Chunmuang i sar. su pokazali da dodatak ksilitola, fluorida ili kombinacije ksilitola i fluorida može da umanji stepen erozije izazvane sokom od pomorandže, ali ne i da je u potpunosti spriječi [210].

Više različitih studija je pratilo kristalografske promjene tokom procesa remineralizacije u prisustvu ksilitola [183]. Yanagisawa i sar. [207] su pratili u acetatnom puferu (pH 4,0) demineralizovane uzorke humane gleđi. Oni su zatim potapani tokom dvije nedelje u remineralizacionom rastvoru koji je sadržavao kalcijum, fosfate i 20% ksilitol. Remineralizacioni rastvor kontrolne grupe nije sadržavo ksilitol. Kontaktna mikroradiografija je pokazala da se u odsustvu ksilitola, remineralizacija događa pretežno u površinskim slojevima, dok je u prisustvu ksilitola remineralizacija nešto slabija u najpovršnjim slojevima, ali je izrazita u srednjim i dubljim ispod 10 mikrona. Ovakvi rezultati su potvrđeni i analizom slike multiporoznosti. Mike i Yanagisawa [208] na osnovu tog zaključuju da ksilitol djeluje kao nosač kalcijuma, održavajući konstantan nivo njegove koncentracije, preuzimajući minerale iz površinske zone koja je zbog toga slabije remineralizovana. Takahashi i sar. [209] su pokazali da ksilitol posjeduje najsnažniju ulogu nosača u odnosu na ostale polialkohole poput sorbitola, eritrola, maltitola.

Uticaj ksilitola u zaštiti zubne gleđi od erozivnih dejstava ispitivala je i najnovija studija Kabil i sar. [211]. Oni su pomoću SEM-a konstatovali da je u odnosu na agresivno dejstvo hlorisane vode prisustvo fluorida više efikasno u prevenciji oštećenja, ali da ksilitol

povoljnije oporavlja zubnu gleđ po nastanku početnih oštećenja. Povšina gleđi je ravnija, što je potkrijepljeno statističkom obradom rezultata EDXA jonske analize.

Dobijeni rezultati AFM analize površine gleđi izložene ksilitolu poslije erozivnog dejstva Coca Cole su slični studijama koje su ispitivale druge remineralizacione agense, posebno nosioce kalcijuma kao što je CPP-ACF [64, 212–215].

Kada je riječ o rezultatima uticaja stevie u našem istraživanju dobijeni su kontradiktorni nalazi između SEM i AFM analize. SEM analiza bilježi veoma usmjerenu akumulaciju novih kristala sličnih hidroksil apatitu, za razliku od više amorfnih formi kod ksilitola i kontrolne grupe. S druge strane AMF upućuje na značajno izraženiju hrapavost u svim parametrima, koja je i više desetina puta veća od zabilježene kod ksilitola i kontrolne grupe. Najizraženije vrijednosti Rk, kao i veće vrijednosti pikova (Rpk) ipak ukazuju da se vjerovatno radi o većim naslagama samog pokrivača gleđi, koji vjerovatno predstavlja depozite same stevie i odražava njenu sposobnost prekrivanja površine u debljim slojevima.

Ovakvi rezultati nisu do sada zabilježeni u literaturi, ondosno nismo uspijeli da pronademo istraživanje koje je pratilo remineralizacione efekte stevie, odnosno njenih aktivnih principa steviosida. Većina dosadašnjih istraživanja uticaja stevie je bila usmjerena prema njenom antimikrobnom dejству [80, 84, 216].

Ferrazzano i sar. [84] u svojoj preglednoj studiji iznijeli veliki broj dokaza objavljenih u posljednjih 10 godina o direktnom uticaju različitih steviosida koje se nalaze u ekstraktu biljke stevie rebaudioside na inhibiciju razvoja kariogenih i drugih mikrororganizama u usnoj duplji.

Singh i sar. [218] ističu prednosti stevie kao zaslađivača koji praktično ne posjeduje kalorijske vrijednosti, a ima baktericidna svojstva koja imaju koristi po oralno zdravlje. Ekstrakti stevije i svih njegovih sekundarnih metabolita steviosida (steviol, isosteviol, stevioside i rebaudio-side A, B, C i E) nisu kariogeni i ne izazivaju erozivne promjene na

gleđi. Suprotno tome je pronađeno da inhibiraju agregaciju mikroorganizama potpomognutu od strane glukana u dentalnom plaku.

Rezaei-Soufi i sar. [220] smatraju da biljka stevija ima sposobnost da usporava karijes na više načina, prije svega smanjujući produkciju kiselina u ustima pod uticajem kariogenih mikroorganizama; smanjujući hidrofobnost bakterijskih ćelija što utiče na njihovu agregaciju na površini gleđi i sazrijevanje zubnog plaka inhibirajući stvaranje ekstracelularnih polisaharida, ali o onemogućavanjem bakterija za vezivanje za same produkte biljke. Antimikrobni efekti su povezani sa koncentracijom, ali da je uticaj stevijinih polifenolnih ekstrakata (steviozida) uglavnom izraženiji i da djeluje i na mikroorganizme poput *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, i *Vibrio cholera*. Isto tako Ajaanovor i sar navode da vodeni ekstrat stevie ima najslabije dejstvo u odnosu na etanolski, acetatni ili heksanski rastvor. [214].

Istraživanja su isto tako pokazala da je prosječna dubina demineralizacije na površini gleđi koja je bila izložena ekstraktu stevije bila značajno manja od onih koje u eksperimentalnom in vitro karijes modelu izazivaju glukoza i fruktoza [220].

Ipak, do sada objavljena istraživanja se nisu bavila samim procesom remineralizacije, kao što je bio slučaj sa ksilitolom i čitavim nizom drugih sredstava, pa na osnovu pregleda literature teško možemo da objasnimo nalaz usmjerene i uznapredovane kristalizacije kod stevijinih uzoraka. Utoliko je ovaj nalaz zanimljiviji jer u našem eksperimentu nisu bili prisutni mikroorganizmi kao ni pelikla.

Donekle analogiju bi mogli da pronađemo u istraživanju Saeki i sar. [221]. Oni su ispitivali remineralizacione sposobnosti funorana (polisaharida iz ekstrakta morske trave *Gloipeltis furcata*). Njegovo prisustvo u kombinaciji sa ksilitolom i hidrogenfosfatom je pokazivao značajno veće remineralizacione sposobnosti od pojedinačnih komponenti, što

može da govori u prilog i određenog usmjeravajućih efekata. Inače funoran pokazuje dokazane efekte u inhibiciji agregacije streptokoka [222].

Poggio i sar. [64] su ispitivali uticaj zubnih pasti sa argininom i kalcijum karbonatom i CPP-ACP kompleksa gdje kod drugoga, prije dolazi do taloženja mineralnih globula i popunjavanja erodiranih dijelova prizmi, dok se kod argininskog kompleksa stvara više kompaktni i usmjereni sloj.

Ne postoje objavljeni podatci o sličnom dejstvu stevizada na formiranje i organizaciju kristala hidroksil apatita. To se donekle uklapa i u tumačenja Vitkov i sar. [223] koji su upoređivali nalaze AFM sondiranja hrapavosti površine i SEM sliku topografije. Njihovi rezultati govore da AFM slika ne može precizno da prikaže kiselinom nagrizanu površinu gleđi, i to prije svega zbog izražene strnosti gleđnih kristala koja može da utiču na stvaranje zakrivljene slike. Ona pak može da vodi do značajnog potcjenjivanja profilometrijskih parametara. Zbog svega toga ovi nalazi zahtijevaju dodatna ispitivanja o mogućem uticaju stevie na procese remineralizacije gleđi.

U svakom slučaju dodatna ispitivanja su neophodna kako bi se prihvatali brojni pokušaji da se umanje erozivna svojstva pojedinih gaziranih i negaziranih napitaka dodavanjem remineralizacionih sredstava [223, 224]. Stevia je tu posebno zanimljiva kao zaslađivač, zamjena za šećere, ali i sve više optuživane vještačke zaslađivače poput saharina i aspartama. Zanimljivost stevie je beznačajna kalorijska vrijednost i prirodno porijeklo, a naravno antikariogeni i remineralizacioni efekti bi još više učvrstili njenu kandidaturu [219].

## **7. ZAKLJUČAK**

Na osnovu postavljenih ciljeva, provedenog istraživanja i izvršene analize dobijenih rezultata možemo da dovedemo sljedeće zaključke:

1. AMF i SEM analiza pokazuju da je zubna gleđ u in vitro uslovima izložena ksilitolu otpornija na dejstvo Coca Cole i pokazuje manju površinsku hrapavost.
2. AFM analiza površine zuba tretiranog steviom u in vitro uslovima pokazuje površinsku izraženiju hrapavost, ali organizovaniju kristalnu strukturu u pravcu formiranja apatita što takođe upućuje na moguću zaštitnu ulogu pogotovo u fazi preparacije postojećih oštećenja.
3. Tumačenje samo AFM nalaza u objašnjavanju promjena na površini gleđi, pogotovu kod demineralizaciono-remineralizacionih mehanizama nije uvijek dovoljno pa je poželjnije kombinovati više metoda sa uključivanjem SEM analize kristalne strukture.
4. Nalazi potvrđuju remineralizacione potencijale ksilitola, povezanih sa sposobnosti vezivanja jona kalcijuma i stvaranja njegovih rezervoara koji učestvuju u mineralizaciji.
5. Stevioidi učestvuju u usmjeravanju akumulacije i organizovanja kristala hidroksil-apatita, koja do sada nisu zabilježena. Neophodna su dodatna suptilnija ispitivanja radi potvrđivanja ovakve hipoteze.
6. Primjena trodimenzionalnih parametara krive nosivosti može da se uspješno primjenjuje u analizi površinskih promjena na gleđi u odnosu na dvodimenzionalne.
7. Ksilitol i stevia pokazuju potencijal da kao zaslađivači u Cola napitcima mogu da preveniraju razvoj demineralizacije gleđi i potpomažu njen opravak.

## **8. LITERATURA**

1. NCHS: Consumption of Sugar Drinks in the United States, 2005–2008, NCHS Data Brief, 2011.
2. Suglia, SF, Sara Solnick, S., Hemenway D, "Soft Drinks Consumption Is Associated with Behavior Problems in 5-Year-Olds" *The Journal of Pediatrics* ([www.jpeds.com](http://www.jpeds.com)), DOI 10.1016/j.jpeds.2013.06.023.
3. Robert Murray, Barbara Frankowski, Howard Taras, Are soft drinks a scapegoat for childhood obesity? *The Journal of Pediatrics*, 2005; 146 (5): 586 DOI:10.1016/j.jpeds.2004.12.018.
4. Vartanian LR, Schwartz MB, Brownell KD, Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *Am J Public Health*. 2007; 97: 667–75.
5. Mirjanić Đ, Atomska mikroskopija nanostrukture gleđi, magistarski rad, Medicinski Fakultet Banja Luka, 2012.
6. Barbour ME, Lussi A, Shellis RP, Screening and prediction of erosive potential. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:24-32. doi: 10.1159/000325917. Epub 2011 May 31.
7. Agrawal N, Shashikiran ND, Singla S, Ravi KS, Kulkarni VK, Atomic force microscopic comparison of remineralization with casein-phosphopeptide amorphous calcium phosphate paste, acidulated phosphate fluoride gel and iron supplement in primary and permanent teeth: An in-vitro study. *Contemp Clin Dent.* 2014 Jan;5(1):75-80. doi: 10.4103/0976-237X.128672.
8. Sari ME, Erturk AG, Koyuturk AE, Bekdemir Y, Evaluation of the effect of food and beverages on enamel and restorative materials by SEM and Fourier transform infrared spectroscopy. *Microsc Res Tech.* 2014 Jan;77(1):79-90. doi: 10.1002/jemt.22315. Epub 2013 Nov 12.

9. Sener Y, Botsali MS, Kucukyilmaz E, Tosun G, Altunsoy M, Influence of soft drinks on dental enamel: An *in vitro* study. *J Pediatr Dent [serial online]* 2013 [cited 2015 Apr 18];1:42-5. Available from: <http://www.jpediatrdent.org/text.asp?2013/1/2/42/117445>.
10. Barbour, M. E. and Rees, J. S, 'The laboratory assessment of enamel erosion: a review', *Journal of Dentistry*, 2004, 32, (8), pp. 591-602. doi: 10.1097/EDE.0b013e31824cbaac.
11. Nancy A et al. Ten Cate's Oral Histology, 8th Edition, Mosby 2014, ISBN: 978-0-323-07846-7.
12. Mahoney, P, 'Two-dimensional patterns of human enamel thickness on deciduous (dm1, dm2) and permanent first (M1) mandibular molars', *Archives of Oral Biology*, 2010, 55, (2), pp. 115–126.
13. Berkovitz, B. K. B., Holland, G. R. and Moxham, B. J, *A colour atlas and textbook of oral anatomy histology and embryology* 2ed: Mosby-Wolfe.1999.
14. Wroe, S, Ferrara, TL, McHenry, CR, Curnoe, D, and Chamoli, U, 'The craniomandibular mechanics of being human', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010, 277, (1700): 3579–3586.
15. Hagberg, C, Assessment of bite force: a review, *Journal of craniomandibular disorders : facial & oral pain*, 1987, 1, (3). 162–169.
16. Low, I. M, Duraman, N. and Mahmood, U, 'Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth', *Materials Science and Engineering: 2008, C*, 28, (2): 243–247.
17. Osborn, J. W, 'The nature of the Hunter-Schreger bands in enamel', *Archives of Oral Biology*, 1965, 10, (6): 929–933.
18. Boyde, A. 'Enamel', in Oksche A, V. L.(ed), *Handbook of microscopic anatomy*. Vol. 6 'Teeth' 1989, Berlin: Springer-Verlag, pp. 309–473.

19. Radlanski, R. J., Seidl, W. and Steding, G, Prism arrangement in human dental enamel', in Moggi-Cecchi, J.(ed), *Aspects of Dental Biology: Palaeontology, Anthropology and Evolution*. International Institute for the Study of Man, 1995, pp. 33–49.
20. Field JC, The investigation of enamel subjected to early erosive and abrasive challenges, Doktorska teza, Newcastle University, 2012.
21. Low, I. M., Duraman, N. and Mahmood, U, Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth', *Materials Science and Engineering: C*, 2008, 28, (2):243–247.
22. Brennecke, J. and Radlanski, R. J, Is Vickers hardness test applicable for enamel hardness determination? A scanning electron microscopic evaluation', *10th International symposium on Dental morphology*. Berlin, September 6-10 1995.
23. He, B., Huang, S., Jing, J. and Hao, Y, Measurement of hydroxyapatite density and Knoop hardness in sound human enamel and a correlational analysis between them', *Archives of Oral Biology*, 2010, 55, (2):134–41.
24. Soames, J. V, and Southam, J. C, *Oral Pathology*.3rd ed Oxford: Oxford University Press. 1998.
25. Moss, S. J, Dental erosion', *International Dental Journal*, 1998, 48, (6): 529-539.
26. Michael, J. A, Townsend, G. C, Greenwood, L. F, and Kaidonis, J. A, (2009) 'Abfraction: Separating fact from fiction', *Australian Dental Journal*, 2009, 54, (1), pp. 2–8.
27. Taube, F, Ylmén, R, Shchukarev, A, Nietzsche, S, and Norén, J. G, Morphological and chemical characterization of tooth enamel exposed to alkaline agents', *Journal of Dentistry*, 2010, 38, (1):72–81.
28. Eisenburger, M, Degree of mineral loss in softened human enamel after acid erosion measured by chemical analysis', *Journal of Dentistry*, 2009, 37, (6): 491–4.

29. Eisenberger, M, Shellis, R. P, and Addy, M, Scanning electron microscopy of softened enamel', *Caries Research*, 2004, 38:67–74.
30. Xiao, F, Zheng, J, Zhou, Z, R. and Qian, F, In-vitro erosion of human tooth enamel', *Tribology*, 2009, 29, (2):163–167.
31. Cheng, R, Yang, H, Shao, M, Hu, T, and Zhou, X, Dental erosion and severe tooth decay related to soft drinks: a case report and literature review', *University SCIENCE B*, 2009, 10, (5):395–399.
32. Hobson, R. S, Crotty, T, Thomason, J. M, and Jepson, N. J, A quantitative study of enamel acid etch patterns on surfaces used for retention of resin-bonded fixed prostheses', *European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry*, 2005, 13, (3):123–128.
33. Taube, F, Ylmén, R, Shchukarev, A, Nietzsche, S, and Norén, J. G, Morphological and chemical characterization of tooth enamel exposed to alkaline agents', *Journal of Dentistry*, 2010, 38, (1), pp. 72–81.
34. Ebenstein, D. M, and Pruitt, L. A, Nanoindentation of biological materials, 2010 *Nanotoday*, 1, (3): 26.
35. Nirmala, S. V, and Subba Reddy, V. V, A comparative study of pH modulation and trace elements of various fruit juices on enamel erosion: An *in vitro* study', *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 2011, 29, (3):205–215.
36. Hughes, D. A, Girkin, J. M, Poland, S, Longbottom, C, Button, T. W, Elgoyhen, J, Hughes, H, Meggs, C, and Cochran, S, Investigation of dental samples using a 35 MHz focussed ultrasound piezocomposite transducer', *Ultrasonics*, 2009, 49, (2):212–218.
37. Hua, J, Chen, S. K, and Kim, Y, Refining enamel thickness measurements from B-mode ultrasound images, *Institute of Electrical and Electronics Engineers - Medicine and Biology Society Conference*. 2009, pp. 440–443.

38. Hooper SM, *Development of a new toothwear index* [MSc]; 1995.
39. Grenness MJ, Tyas MJ, Osborn JE, *Mapping a non-carious cervical lesion using stereolithography and dental casts incorporating optical texture*. Journal of Dentistry 2009;37:191–7.
40. Freitas RA, Jr. *Nanodentistry*. J. Am. Dent. Assoc. 2000;131:1559–1565.
41. Holme B, Hove, LH, Tveit AB, *Using white light interferometry to measure etching of dental enamel*. Measurement. 2005;38:137–147.
42. Humphris ADL, Miles MJ, Hobbs JK, *A mechanical microscope: High-speed atomic force microscopy*. Appl. Phys. Lett. 2005;86:281–288.
43. Schmid T, Burkhard J, Yeo BS, Zhang W, Zenobi R, *Towards chemical analysis of nanostructures in biofilms I: Imaging of biological nanostructures*. Anal. Bioanal. Chem. 2008;391:1899–1905.
44. Kakaboura A, Fragouli M, Rahiotis C, Silikas N, *Evaluation of surface characteristics of dental composites using profilometry, scanning electron, atomic force microscopy and gloss-meter*. J Mater Sci Mater Med. 2007;18:155–163.
45. Bozec L, de Groot J, Odlyha M, Nicholls, B Horton, MA, *Mineralised tissues as nanomaterials: Analysis by atomic force microscopy*. IEEE Proc. Nanobiotechnol. 2005; 152:183–186.
46. JSPM-5200http://www.jeol.com/ RESOURCES/ ProductPresentations/ JSPM 5200 ProductOverview/tabid/405/Default.aspx.
47. Higham SM, Pender N, de Josselin de Jong E, Smith PW, *Application of biophysical technologies in dental research*. Journal of Applied Physics 2009;105:102048.
48. Marshall, G. W, Marshall, S. J, Balooch, M, and Kinney, J. H, Evaluating demineralisation and mechanical properties of human dentin with AFM<sup>1</sup>, *Methods in Molecular Biology*, 2004, 242:141–159.

49. Kemaloglu H, Atalayin C, Tezel H, Scanning Electron Microscopy Investigation of Enamel Surface Treated with Different Bleaching Agents. Dentistry, 2012 4: 222. doi:10.4172/2161-1122.1000222.
50. Pollyana S. Castro1, Luiza M. F. Dantas1, Alexander C. Nishida, Carlos E. Francci, and Mauro Bertotti, Probing the Enamel Topography After Acid Erosion by Scanning Electrochemical MicroscopyInt. J. Electrochem. Sci., 7 (2012) 12720–12729
51. Sauro S, Mannocci F, Piemontese M, Mongiorgi R, In situ enamel morphology evaluation after acidic soft drink consumption: protection factor of contemporary toothpaste. Int J Dent Hyg. 2008 Aug;6(3):188–92.
52. Schmidlin PR, Gohrinng TN, Schug J, Lutz F, Histological, morphological, profilometric and optical changes of human tooth enamel after microabrasion. *American Journal of Dentistry*, 2003;16:4A–8A.
53. Miletić A, Morfologija površine, vežbe iz inžinerstva površine, skripte, Tehnološki fakultet Zvornik, Univerzitet Istočno Sarajevo, 2015.
54. ISO 4287:1997, [http://www.iso.org/iso/catalogue\\_detail.htm?csnumber=10132](http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=10132).
55. ISO 11562:1996, [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_ics/-catalogue\\_detail\\_ics.htm?csnumber=21977](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/-catalogue_detail_ics.htm?csnumber=21977).
56. ISO standard filters [http://www.imagemet.com/WebHelp6/Default.htm#-ImFilter/ISO\\_Standard\\_filters.htm](http://www.imagemet.com/WebHelp6/Default.htm#-ImFilter/ISO_Standard_filters.htm).
57. Stachowiak, G. W, Batchelor, A. W, and Stachowiak, G. B, *Experimental methods in tribology*.44 ed Amsterdam, Oxford: Elsevier, 2004.
58. Abbott, E. J, and Firestone, F. A, Specifying surface quality', *Mechanical Engineering*, 1933, 59:569–572.

59. International Standards Organisation. Geometrical Product Specifications (GPS). Surface texture: Profile method; Measurement standards. Geometric product specifications (GPS). Surface texture. Profile method calibration. Measurement standards. BS EN ISO 5436-1:2001.
60. International Standards Organisation. (1975) Instruments for the measurement of surface roughness by the profile method – Contact (stylus) instruments of consecutive profile transformation – Contact profile meters, system M. 3274.
61. International Standards Organisation. (1984) *Glossary of surface roughness terms. Measurement of surface roughness parameters* 4287–2.
62. International Standards Organisation. (1996) *Geometrical product specifications (GPS) - surface texture: profile method; surfaces having stratified functional properties - Part 2: height characterisation using the linear material ratio curve.* 13565–2.
63. Pawlus P, and Grabon W, The method of truncation parameters measurement from material ratio curve', *Precision Engineering*, 2008, 32, (4):342–347.
64. Poggio C et al. Impact of two toothpastes on repairing enamel erosion produced by a soft drink: an AFM in vitro study. *Journal of Dentistry* 2010, 38(11): 868-874. doi: 10.1016/j.jdent.2010.07.010.
65. Lombardini M, Ceci M, Colombo M, Bianchi S, Poggio C, Preventive effect of different toothpastes on enamel erosion: AFM and SEM studies. *Scanning*. 2014 Jul-Aug;36(4):401-10. doi: 10.1002/sca.21132. Epub 2013 Dec 11.
66. Rezvani MB, Karimi M, Akhavan Rasoolzade R, Haghgoor R, Comparing the Effects of Whey Extract and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate (CPP-ACP) on Enamel Microhardness.J Dent (Shiraz). 2015 Mar;16(1):49–53.
67. Mäkinen KK, Suger alcohol, caries incidence and remineralization of caries lesions: a literature review, *Int. J. of Dent.*, 2010, doi: 10.1155/2010/981072.

68. Silva TC, i sar. The use of xylitol as a strategy for prevention of dental caries. Rev.odonto cience. 2009, 24:205–212.
69. Mäkinen KK, Biochemical principles of the use of xylitol in medicine and nutritionwith special consideration of dental aspects. Birkhäuser Verlag, Basel, 1971.
70. Mäkinen KK, Suger alcohols, caries incidence and remineralization of caries lesions: a literature review, Int. J. of Dent., 2010, doi: 10.1155/2010/981072.
71. Vojinović J, Dolić, O, Obradović, M. Sukara, S, Primena poliola u prevenciji i lečenju karijesa, Zbornik radova sa Simpozijuma Savremeni Materijali, ANURS, 2015 R.
72. Vasilescu i sar. *Sweeteners and metabolic diseases: xylitol as a new player*, Proc. Rom. Acad. 2–B (2011) 125–128A.
73. Azarpazhooh H, Limeback H. P, Lawrence P. S, Shah, *Xylitol for preventing acute otitis media in children up to 12 years of age*, Cochrane Database of Systematic Reviews 11 (2011), Art. No.: CD007095. DOI: 10.1002/1465-1858.CD007095.pub2.
74. Mäkinen KK, *Suger alcohol sweeteners as alternatives to suger with special consideration to xylitol*, Med princ Pract. 20 (2011) 303–320.
75. Y. Yin, H. J. Kim, *Protective Effect of Dietary Xylitol on Influenza A Virus Infection*, PLoS ONE 9–1 (2014), e84633, doi:10.1371/journal.pone.-0084633.
76. Ceunen S, Geuns JM, "Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function". *Journal of Natural Products*. 2013, **76** (6): 1201–28. doi:10.1021/np400203b.
77. J. E. Brandle and P. G, Telmer Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, volume 2007, 68:1855-1863. PMID 17397883 doi:10.1016/j.phytochem.2007.02.010.
78. Brandle, J. E, Starratt, A. N, Gijzen, M, *Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties*. Canadian Journal of Plant Science.1998, 78 (4): 527–536. doi:10.4141/P97-114.

79. M.A.B, Cardello, M.A.P.A, Da Silva, M.H. Damasio, "Measurement of the relative sweetness of stevia extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations". *Plant Foods for Human Nutrition* 1999, 54(2): 119–129. doi:10.1023/A:1008134420339.
80. Ferrazzano GF i sar. Is Stevia rebaudiana Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? A Review., *Molecules* 2016, 21, 38; doi:10.3390/molecules21010038.
81. Raji Akintunde Abdullateef, Mohamad Osman, "Studies on effects of pruning on vegetative traits in Stevia rebaudiana Bertoni (Compositae)". *International Journal of Biology* 2012, 4 (1). doi:10.5539/ijb.v4n1p146.
82. Koyama, E., et al. "In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora." *Food and Chemical Toxicology* 41.3 (2003) 359–374.
83. Chatsudhipong, V, Muanprasat, C, "Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness". *Pharmacol Ther* 2009, 121 (1): 41–54. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.09.007.
84. Brambilla E, Cagetti M.G, Ionescu A, Campus G, Lingström P, An in vitro and in vivo Comparison of the Effect of *Stevia rebaudiana* Extracts on Different Caries-Related Variables: A Randomized Controlled Trial Pilot Study, *Caries Res* 2014;48:19–23 (DOI:10.1159/000351650).
85. Pawar RS, Krynnitsky AJ, Rader JI, Sweeteners from plants--with emphasis on Stevia rebaudiana (Bertoni) and Siraitia grosvenorii (Swingle). *Anal Bioanal Chem*. 2013 May;405(13):4397-407. doi: 10.1007/s00216-012-6693-0. Epub 2013 Jan 23.
86. Brahmachari G, Mandal LC, Roy R, Mondal S, Brahmachari AK, Stevioside and related compounds – molecules of pharmaceutical promise: a critical overview. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2011 Jan;344(1):5-19. doi: 10.1002/ardp.201000181. Epub 2010 Nov 25.

87. Sirshendu De, Mondal S, Banerjee S, Stevioside technology, application and health Wiley-Blackwell, 2013, ISBN 978-1-118-35066-9.
88. de Koning L, Malik VS, Kellogg MD, Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sweetened beverage consumption, incident coronary heart disease, and biomarkers of risk in men. *Circulation*. 2012;125:1735–41, S1.
89. Yanping Li, Adela Hruby, Adam M. Bernstein, Sylvia H. Ley, Dong D, Wang, Stephanie E. Chiuve, Laura Sampson, Kathryn M, Rexrode, Eric B, Rimm, Walter C, Willett, Frank B. Hu, Saturated Fats Compared With Unsaturated Fats and Sources of Carbohydrates in Relation to Risk of Coronary Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 2015; 66 (14): 1538 DOI: 10.1016/j.jacc.2015.07.055.
90. Drake i sar. : Dietary intakes of carbohydrates in relation to prostate cancer risk: a prospective study in the Malmö Diet and Cancer cohort, Am J Clin Nutr December 2012 96:6 1409–1418.
91. Hatch EE i sar. Caffeinated Beverage and Soda Consumption and Time to pregnancy Epidemiology. 2012, 23(3): 393–401, doi: 10.1097/EDE.0b013e31824cbaac.
92. Mirjanić Đ, Mirjanić V, Vojinović J, Testing the effect of aggressive beverage on the damage of enamel structure Contemporary Materials, 2015, VI–1:55–61.
93. Park S, Lin M, Onufrek S, Li R, Association of Sugar-Sweetened Beverage Intake during Infancy with Dental Caries in 6-year-olds. *Clin Nutr Res*. 2015 Jan;4(1):9-17. doi: 10.7762/cnr.2015.4.1.9. Epub 2014 Dec 8.
94. Bassiouny MA, Effect of sweetening agents in acidic beverages on associated erosion lesions. *Gen Dent*. 2012 Jul-Aug;60(4):322-30; quiz 331–2.
95. Ferrazzano GF, Coda M, Cantile T, Sangiananton G, Ingenito A, SEM investigation on casein phosphopeptides capability in contrasting cola drinks enamel erosion: an in vitro preliminary study European Journal of Paediatric Dentistry vol. 13/4-2012.

96. El Aidi H, Bronkhorst EM, Huysmans MC, Truin GJ, Dynamics of tooth erosion in adolescents: a 3-year longitudinal study. *J Dent* 2010;38(2):131–7.
97. Larsen MJ, Poulsen S, Hansen I, Erosion of the teeth: prevalence and distribution in a group of Danish school children. *Eur J Paediatr Dent*. 2005 Mar;6(1):44–7.
98. Wiegand A, Müller J, Werner C, Attin T, Prevalence of erosive tooth wear and associated risk factors in 2-7-year-old German kindergarten children. *Oral Dis* 2006;12(2):117–24.
99. Nunn J, Gordon P, Morris A, Pine C, Walker A, Dental erosion – changing prevalence? A review of British National childrens' surveys. *Int J Paediatr Dent*. 2003;13(2):98–105.
100. Daly B, Newton TJ, Fares J, et al. Dental tooth surface loss and quality of life in university students. *Prim Dent Care*. 2011;18(1):31–35.
101. Ali Abou Neel E. i sar. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone *Int. J Nanomedicine*. 2016; 11: 4743–4763.. doi: 10.2147/IJN.S107624.
102. Okunseri C, Wong MC, Yau DT, McGrath C, Szabo A, The relationship between consumption of beverages and tooth wear among adults in the United States. *J Public Health Dent*. 2015;75(4):274–281.
103. Zhang J, Du Y, Wei Z, Tai B, Jiang H, Du M, The prevalence and risk indicators of tooth wear in 12- and 15-year-old adolescents in Central China. *BMC Oral Health*. 2015;15(1):120.
104. Kannan A, Adil Ahmed MA, Duraisamy P, Manipal S, Adusumil-lil P. Dental hard tissue erosion rates and soft drinks – a gender based analysis in Chennai city, India. *Saudi J Dental Res*. 2014;5(1):21–27.

105. Kitasako Y, Sasaki Y, Takagaki T, Sadr A, Tagami J, Age-specific prevalence of erosive tooth wear by acidic diet and gastroesophageal reflux in Japan. *J Dent.* 2015;43(4):418–423.
106. Bamisea CT, Kolawolb, KA Oloyedec, EO, The deerminants and control of soft drinks-incited dentl erosion. *REV CLÍN PESQ ODONTOL.* 2009 MAIO/AGO;5(2):141–154.
107. Shellis RP, Finke M, Eisenburger M, Parker DM, Addy M, Relationship between enamel erosion and liquid flow rate. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(3):232–238.
108. Sivasithamparam K, Young WG, Jirattanasopa V, et al. Dental erosion in asthma: a case-control study from south east Queensland. *Aust Dent J.* 2002;47(4):298–303.
109. Meurman JH, ten Cate J, Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(Pt 2):199–206.
110. Hughes JA, West NX, Parker DM, van den Braak MH, Addy M, Effects of pH and concentration of citric, malic and lactic acids on enamel, in vitro. *J Dent.* 2000; 28(2): 147–52.
111. Lissera RG, Luna Maldonado ER, Battellino LJ, In vitro erosive capacity of some fruit juices and soft or low alcoholic strength beverages on human teeth. *Acta OdontolLatinoam.* 1998;11(1):55–71.
112. Edwards M, Creanor SL, Foye RH, Gilmour WH, Buffering capacities of soft drinks: the potential influence on dental erosion. *J Oral Rehabil.* 1999;26(12):923–27.
113. Davani R, Walker J, Qian F, Wefel JS, Measurement of viscosity, pH, and titratable acidity of sport drinks. *J Dent Res.* 2003;82(Special Issue A).
114. Jensdóttir T, Thornórðsdóttir I, Arnadóttir IB, Holbrook WP, Erosive drinks on the icelandic market. *Laeknabladid.* 2002;88(7/8):569–72.30.
115. Jain P, Nihill P, Sobkowski J, Agustin MZ, Commercial soft drinks: pH and in vitro dissolution of enamel. *Gen Dent.* 2007;55 (2):150–4.

116. Cerci BB, Guariza-Filho LS, Camargo ES, Tanaka OM, Dental enamel roughness with different acid etching times: Atomic force microscopy study. European Journal of General Dentistry. 2012;1(3):187–191.
117. Kabil NS, Reham Magdy R, Protective & corrective efficacy of xylitol versus fluoride on primary teeth enamel subjected to in vitro demineralization by chlorinated pool water. Int J Dent & Oral Heal. 2016, 2:5, 108–115
118. Chunmuang S i sar. Effect of xylitol and fluoride on enamel erosion in vitro. Journal of Oral Science 2008, 49(4):293–7.
119. Lam T, Ho J, Anbarani AG, Liaw LH, Takesh T, et al. (2016) Effects of a Novel Dental Gel on Enamel Surface Recovery from Acid Challenge. Dentistry 6: 397. doi:10.4172/2161-1122.1000397.
120. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Lombardini M, Colombo M, Atomic force microscopy study of enamel remineralization Ann Stomatol (Roma). 2014 Jul-Sep; 5(3): 98–102.
121. De-Deus G, Paciornik S, Pinho Mauricio MH, Prioli R, Realtime atomic force microscopy of root dentin during demineralization when subjected to chelating agents. Int Endod J. 2000;39:683–92.
122. dos Reis Derceli J, Faraoni JJ, Pereira-da-Silva MA Regina Guenka Palma-Dibb, Analysis of the Early Stages and Evolution of Dental Enamel Erosion, Braz. Dent. J. , 2016, 27:313–317.
123. Agrawal N, Shashikiran ND, Singla S, Ravi KS, Kulkarni VK, Atomic force microscopic comparison of remineralization with casein-phosphopeptide amorphous calcium phosphate paste, acidulated phosphate fluoride gel and iron supplement in primary and permanent teeth: An in-vitro study. Contemp Clin Dent. 2014 Jan;5(1):75-80. doi: 10.4103/0976-237X.128672.

124. Schaad P, Paris E, Cuisinier FJ, Voegel JC *Atomic force microscopy study of human tooth enamel surfaces*. Scanning Microscopy (1993), 7, Issue: 1149–1152.
125. Vitkov L, Kastner M, Kienberger F, Hinterdorfer P, Schilcher K, Grunert I, Dumfahrt H, Krautgartner WD, Correlations between AFM and SEM imaging of acid-etched tooth enamel. Ultrastruct Pathol. 2008, 32(1):1-4. doi: 10.1080/01913120701808065.
126. Santos NC, Castanho MARB An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. BiophysChem 2004, 107: 133–149.
127. Jandt KD, Probing the future in functional soft drinks on the nanometer scale – towards tooth friendly soft drinks. Trends in Food Science & Technology 2006, 17: 263–271.
128. Barbour ME, Finke M, Parker DM, Hugles JA, Allen GC, et al. The relationship between enamel softening and erosion caused by soft drinks at a range of temperatures. J Dent 2006, 34: 207–213.
129. Passos VF, Santiago SL, Methodologies to Analyze the Micromorphological Alterations of Enamel Subjected to Abrasion/Erosion. Dentistry 2014, 4:255. doi: 10.4172/2161-1122.1000255.
130. Wang CP, Huang SB, Liu Y, Li JY, Yu HY, The CPP-ACP relieved enamel erosion from a carbonated soft beverage: An in vitro AFM and XRD study. Arch Oral Biol 2014, 59: 277–282.
131. Sari ME, Erturk AG, Koyuturk AE, Bekdemir Y, Evaluation of the effect of food and beverages on enamel and restorative materials by SEM and Fourier transform infrared spectroscopy. Microsc Res Tech. 2014, 77(1):79-90. doi: 10.1002/jemt.22315. Epub 2013 Nov 12.
132. Field J, German M, Waterhouse P, Using bearing area parameters to quantify early erosive tooth surface changes in enamel: a pilot study. J Dent. 2013 Nov;41(11):1060-7. doi: 10.1016/j.jdent.2013.08.015.

133. Pawlus,P, and Grabon,W, 'The method of truncation parameters measurement from material ratio curve', *Precision Engineering*, 2008, 32, (4), pp. 342–347.
134. Bačová V, and Draganovská D, Analyses of the Quality of Blasted Surfaces', *Materials Science*, 2004, 40, (1), pp. 125–131.
135. Thomas, T.R, *Rough Surfaces*.2 ed London: Imperial College Press. 1999.
136. Howell, J. R, Blunt, C. D, Hooper, R. M, Lee, A. J. C, and Ling, R. S. M, *In Vivo* surface wear mechanisms of femoral components of cemented total hip arthroplasties', *The Journal of Arthroplasty*, 2004, 19, (1), pp. 88.
137. Kaidonis, J. A, Richards, L. C, Townsend, G. C, and Tansley, G. D, (1998) 'Wear of human enamel: a quantitative *in vitro* assessment', *Journal of Dental Research*, 1998, 77, pp. 1983–1990.
138. Whitehead, S. A, Lo, L. Y, Watts, D. C, and Wilson, N. H, Changes of surface texture of enamel *in vivo*', *Journal of Oral Rehabilitation*, 1997, 24, (6), pp. 449–453.
139. Las Casas, E. B, Bastos, F. S, Godoy, G. C. D, and Buono, V. T. L, 'Enamel wear and surface roughness characterization using 3D profilometry', *Tribology International*, 2008, 41, (12), pp. 1232–1236.
140. Schmähling J, and Hamprecht F. A, (2007) 'Generalizing the Abbott-Firestone curve by two new surface descriptors', *Wear*, 262, (11-12), pp. 1360–1371.
141. Hooper SM, Newcombe RG, Faller R, Eversole S, Addy M, West NX, The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: studies *in situ* and *in vitro*. *J Dent.* 2007;35(6):476–481.
142. O'Sullivan E, Milosevic A, Diagnosis, prevention and management of dental erosion. *R Coll Surg*. 2007;14:1–17.

143. Mann C, Ranjitkar S, Lekkas D, et al. Three-dimensional profilometric assessment of early enamel erosion simulating gastric regurgitation. *J Dent.* 2014;42(11):1411–1421.
144. Habelitz S, Marshall Jr G. W, Balooch M. and Marshall S. J, 'Nanoindentation and storage of teeth', *Journal of Biomechanics*, 2002, 35, (7), pp. 995–998.
145. T. Baumann T, Kozik, J, Lussi, A, Carvalho TS, Erosion protection conferred by whole human saliva, dialysed saliva, and artificial saliva *Scientific Reports* 2016, 6: 34760 doi:10.1038/srep34760.
146. Hara A. T. & Zero D. T, *The potential of saliva in protecting against dental erosion. Monographs in oral science*, 2014 25:197–205.
147. Eisenburger M., Addy M., Hughes J. A. & Shellis R. P, *Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. Caries research* 2001, 35:211–215.
148. Ionta F. Q, i sar. *In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. Journal of dentistry* 2014, 42, 175–179.
149. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C, Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45 Suppl 1:2-12. doi: 10.1159/000325915. Epub 2011 May 31.
150. Hannig M, & Hannig C, *The pellicle and erosion. Monographs in oral science* 25, 2014, 206–214.
151. Carpenter, G. et al. Composition of Enamel Pellicle from Dental Erosion Patients. *Caries research* 2014, 48:361–367.
152. Jager D. H, et al. Effect of salivary factors on the susceptibility of hydroxyapatite to early erosion. *Caries research* 2011, 45:532–537.

153. Brevik, S. C, Lussi, A, & Rakhmatullina, E, A new optical detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer. *Journal of dentistry* 2013;41, 428–435 doi: 10.1016/j.jdent.2013.02.011.
154. Wiegand A, Müller J, Werner C, & Attin T, Prevalence of erosive tooth wear and associated risk factors in 2–7-year-old German kindergarten children. *Oral diseases* 2006, 12:117–124, doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01167.x.
155. Batista G.R, Torres C.R.G, Sener B, Attin T, Wiegand A, Artificial Saliva Formulations versus Human Saliva Pretreatment in Dental Erosion Experiments Caries Res 2016;50:78-86 (DOI:10.1159/000443188).
156. Jameel RA, Khan SS, Zubaidah Hj Abdul Rahim, i sar. Analysis of dental erosion induced by different beverages and validity of equipment for identifying early dental erosion, in vitro study JPMA 66: 843; 2016.
157. Lippert F, Parker DM, Jandt KD, Toothbrush abrasion of surface softened enamel studied with tapping mode AFM and AFM nanoindentation. *Caries Res* 2004, 38: 464-472.
158. Joshi M, Joshi N, Katharya R i sar. Techniques to Evaluate Dental Erosion: A Systematic Review of Literature J Clin Diagn Res. 2016 Oct; 10(10): ZE01–ZE07. doi: 10.7860/JCDR/2016/17996.8634.
159. Ali Abou Neel E, i sar. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11: 4743–4763.. doi: 10.2147/IJN.S107624.
160. Leventouri T, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V, Crystal structure studies of human dental apatite as a function of age. *Int J Biomater*. 2009;2009:698547.

161. Cummins D, The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for everyday use in the prevention and treatment of dental caries. *J Dent.* 2013;41(2):S1–S11.
162. Shellis RP, Featherstone JD, Lussi A, Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:163-79. doi: 10.1159/000359943. Epub 2014 Jun 26.
163. Higham S [webpage on the Internet] Caries Process and Prevention Strategies: Demineralization/Remineralization. [Accessed June 23, 2016]. Available from: <https://www.dentalcre.com/en-us/professional-education/ce-courses/ce372>.
164. Wiegand A, Attin T, Occupational dental erosion from exposure to acids – a review. *Occup Med (Lond)* 2007;57(3):169–176.
165. Lussi A, Von Salis-Marincek M, Ganss C, Hellwig E, Cheaib Z, Jaeggi T, Clinical study monitoring the pH on tooth surfaces in patients with and without erosion. *Caries Res.* 2012;46(6):507–512.
166. Torres-Gallegos I, Zavala-Alonso V, Patiño-Marín N, Martínez-Castañón GA, Anusavice K, Loyola-Rodríguez JP, Enamel roughness and depth profile after phosphoric acid etching of healthy and fluorotic enamel. *Aust Dent J.* 2012;57(2):151–156.
167. Finke M, Jandt KM, Parker DM, The early stages of native enamel dissolution studied with atomic force microscopy. *J Colloid Interface Sci.* 2000;232:156–64.
168. Bryman, Alan; Cramer, Duncan (2011). Quantitative Data Analysis with IBM SPSS 17, 18 and 19: A Guide for Social Scientists. New York: Routledge. ISBN 978-0-415-57918-6.
169. Erić-Marinković J, Dotlić R, Janošević S, Kocev N, Gajić M, Ille T, Stanisljević D, Babić D, Statistika za istraživače u oblasti medicinskih nauka, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2001.

170. Rohaček A, Osnove statistike, Radničko sveučilište "Moše Pijade", Zagreb, 1965.
171. Jandt Klaus D, Probing the future in functional soft drinks on the nanometre scale-towards tooth friendly soft drinks Trends in Food Science & Technology 2006, 17:263–271.
172. Aykut-Yetkiner A, Wiegand A, Bollhalder A, i sar. Effect of Acidic Solution Viscosity on Enamel Erosion J Dent Res 2013, 92(3):289–294.
173. Poggio C, Ceci M, Beltrami R i sar. Atomic force microscopy study of enamel remineralization. Ann Stomatol (Roma). 2014 Jul-Sep; 5(3): 98–102.
174. Derceli JR, Faraoni JJ, Pereira-da-Silva MA, Palma-Dibb RG, Analysis of the Early Stages and Evolution of Dental Enamel Erosion. Braz. Dent. J. 2016, 27: 313–317.
175. Sari ME, Erturk AG, Koyuturk AE, Bekdemir Y, Evaluation of the effect of food and beverages on enamel and restorative materials by SEM and Fourier transform infrared spectroscopy. Microsc Res Tech. 2014, 77(1):79-90. doi: 10.1002/jemt.22315. Epub 2013 Nov 12.
176. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C, Dental erosion - an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. Caries Res 2011;45:2–12.
177. Pan H, Tao J, Yu X, Fu L, Zhang J, Zeng X, et al. Anisotropic demineralization and oriented assembly of hydroxyapatite crystals in enamel: Smart Structures of Biominerals. J Phys Chem 2008;112:7162–7165.
178. Robinson C, Simon C, Kirkham J, Brookes SJ, Shore R, Smith A, Dental enamel-a biological ceramic: regular substructures in enamel hydroxyapatite crystals revealed by atomic force microscopy. J Mater Chem 2004;14:2242–2248.

179. Pan H, Tao J, Yu X, Fu L, Zhang J, Zeng X, et al. Anisotropic demineralization and oriented assembly of hydroxyapatite crystals in enamel: Smart Structures of Biominerals. *J Phys Chem* 2008;112:7162–7165.
180. Lu C, Nakamura T, Korach CS, Effective property of tooth enamel: Monoclinic behavior. *J Biomech* 2012;45:1437–1443.
181. Lam T, Ho J, Anbarani AG, Liaw LH, Takesh T, i sar. Effects of a Novel Dental Gel on Enamel Surface Recovery from Acid Challenge. *Dentistry* 2016, 6:397. doi:10.4172/2161-1122.1000397.
182. Strnada G, Bukab I, Effect of acid erosion followed by remineralization process on microhardness of dental enamel. *Procedia Technology* 12 ( 2014 ) 308–315.
183. Mäkinen KK Sugar Alcohols, Caries Incidence, and Remineralization of Caries Lesions: A Literature Review, *International Journal of Dentistry* 2010 , Article ID 981072, 23 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2010/981072>.
184. A. Scheinin and K. K. Mäkinen, “Turku sugar studies I-XXI,” *Acta Odontologica Scandinavica*, 1975, 33(70):1–351.
185. K. K. Mäkinen, C. A. Bennett, P. P. Hujioel, et al., “Xylitol chewing gums and caries rates: a 40-month cohort study,” *Journal of Dental Research*, 1995, 74:1904–1913.
186. S. A. Leach and R. M. Green, “Effect of xylitol-supplemented diets on the progression and regression of fissure caries in the albino rat,” *Caries Research*, 1980, 14:16–23.
187. R. Havenaar, J. H. J. Huis in't Veld, J. D. de Stoppelaar, and O. Backer Dirks, Anti-cariogenic and remineralizing properties of xylitol in combination with sucrose in rats inoculated with *Streptococcus mutans*, *Caries Research*, 1984:269–277.
188. G. A. Scangos and A. M. Reiner, “Acquisition of ability to utilize xylitol: disadvantages of a constitutive catabolic pathway in *Escherichia coli*,” *Journal of Bacteriology*, 1978, 134:501–505.

189. R. M. Corrales, L. Luo, E. Y. Chang, and S. C. Pflugfelder, "Effects of osmoprotectants on hyperosmolar stress in cultured human corneal epithelial cells," *Cornea*, 2008, 27:574–579.
190. P. de Cock and C.-L. Bechert, "Erythritol. Functionality in noncaloric functional beverages," *Pure and Applied Chemistry*, 2002, 74: 1281–1289.
191. Scheinin A., K. K. Makinen, E. Tammisalo, and M. Rekola, "Turku sugar studies XVIII. Incidence of dental caries in relation to 1-year consumption of xylitol chewing gum," *Acta Odontologica Scandinavica*, 1975, 33:307–316.
192. Rekola M, "Changes in buccal white spots during 2-year consumption of dietary sucrose or xylitol," *Acta Odontologica Scandinavica*, 1986, 44: 285–290.
193. Rekola M, "Approximal caries development during 2-year total substitution of dietary sucrose with xylitol," *Caries Research*, 1987, 21: 87–94.
194. Leach SA, and Green RM, "Effect of xylitol-supplemented diets on the progression and regression of fissure caries in the albino rat," *Caries Research*, 1980, 14: 16–23.
195. Featherstone J. D. B, Cutress T. W, Rodgers, B. E, and Dennison, P. J, "Remineralization of artificial caries-like lesions in vivo by a self-administered mouthrinse or paste," *Caries Research*, vol. 16, pp. 235–242, 1982.
196. Vissink V, E. J. S'Gravenmade, T. B. F. M, Gelhard, A. K, Panders, and M. H, Franken, "Properties of mucin- or CMCcontaining saliva substitutes on softened human enamel," *Caries Research*, 1985, 19:212–218.
197. Arends J, M. Smits, J. L. Ruben, and J. Christoffersen, "Combined effect of xylitol and fluoride on enamel demineralization in vitro," *Caries Research*, 1990, 24: 256–257.
198. Hicks J, Wu J, Flaitz CM Effect of Xylitol and Fluoride Dentifrices on Human Enamel Surfaces Following Acid-Etching: Scanning Electron Microscopic Study. *Pediatr Dent Care* 2016, 1: 127.

199. Miake Y, Saeki Y, Takahashi M, Yanagisawa T, (2003) Remineralization effects of xylitol on demineralized enamel. *J Electron Microsc* (Tokyo) 52: 471–476.
200. Scheinin A, E. Soderling, U. Scheinin, R. L. Glass, and M. L. Kallio, “Xylitol-induced changes of enamel microhardness paralleled by microradiographic observations,” *Acta Odontologica Scandinavica*, 1993, 51:241–246.
201. Garcia-Godoy F, Kao LM, Flaitz CM, Hicks J Fluoride dentifrice containing xylitol: in vitro root caries formation. *Am J Dent* 2013, 26: 56–60.
202. Flaitz CM, Hicks MJ, (1994) Role of the acid-etch technique in remineralization of caries-like lesions of enamel: a polarized light and scanning electron microscopic study. *J Dent Child* 1994, 61: 21–28.
203. Amaechi BT, S. M. Higham, and W. M. Edgar, “The influence of xylitol and fluoride on dental erosion in vitro,” *Archives of Oral Biology*, 1998, 43:157–161.
204. Amaechi BT, S.M. Higham, and W.M. Edgar, “Caries inhibiting and remineralizing effect of xylitol in vitro,” *Journal of Oral Science*, 1999, 41:71–76, 1999.
205. Ekambaram M, Itthagaran A, King NM, (2011) Comparison of the remineralizing potential of child formula dentifrices. *Int J Paediatr Dent* 21: 132–140.
206. Lippert F, Parker DM, Jandt KD (2004) Toothbrush abrasion of surface softened enamel studied with tapping mode AFM and AFM nanoindentation. *Caries Res* 38: 464–472.
207. Yanagisawa T, Miake Y, Saeki Y, and Takahashi M, “Remineralization in enamel caries and restoration of carious lesions by enhanced remineralization induced by saliva and xylitol,” *Dentistry in Japan*, 2003, 39: 208–215.
208. Miake Y, and Yanagisawa T, “Effects of xylitol on remineralization of artificial demineralized enamel,” *Japanese Journal of Oral Biology*, 2000, vol. 42:580–589.

209. Takahashi M, Saeki, Y, Miake Y, and Yanagisawa T, "Effects of sugar alcohols and calcium compounds on remineralization," *Shikwa Gakuho*, 2000, 100:755–762, 2000.
210. Chunmuang S, Jitpukdeebodintra SS, Chuenarrom C, and Benjakul P, "Effect of xylitol and fluoride on enamel erosion in vitro," *Journal of Oral Science*, 2007, 49:293–297.
211. Noha Samir Kabil et al. Protective & corrective efficacy of xylitol versus fluoride on primary teeth enamel subjected to in vitro demineralization by chlorinated pool water. *Int J Dent & Oral Heal.* 2016, 2:5, 108–115.
212. Wang CP, Huang SB, Liu Y, Li JY, Yu HY, The CPP-ACP relieved enamel erosion from a carbonated soft beverage: an in vitro AFM and XRD study. *Arch Oral Biol.* 2014 Mar;59(3):277-82. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.11.018. Epub 2013 Dec 8.
213. Goswami S, Remineralize early demineralized enamel structure. *SRM J Res Dent Sci [serial online]* 2016 [cited 2017 Feb 12];7:231-4. Available.
214. Kensche A, Pötschke S, Hannig C, i sar. Influence of Calcium Phosphate and Apatite Containing Products on Enamel Erosion The Scientific World Journal 2016, Article ID 7959273, 12 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7959273>.
215. Visveswaraiah PM, and Prasad D, Effect of Water Soluble Carboxymethyl Chitosan and Chitosan Lactate on Enamel Demineralisation- An SEM Study. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2016, 7:427–433.
216. Shreya H, Roma M, Shetty D, Non-Fluoridated Remineralization Agents in Dentistry. *Pharm. Sci. & Res.* 2016, 8(8):884-887.
217. Ajagannanavar SL, Shamarao S, Battur H, Tikare S, Al-Kheraif AA, and Esawy Al Sayed MS, Effect of aqueous and alcoholic *Stevia (Stevia rebaudiana)* extracts against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine:

An *in vitro* study, J Int Soc Prev Community Dent. 2014 Dec; 4(Suppl 2): S116–S121.  
doi: 10.4103/2231-0762.146215.

218. Singh A, Singh K, Singh P, Singh MP, Medicinal prospective and fluorial biology of candy leaf(*Stevia rebaudiana* Bertoni), International Journal of Advanced Research , 2015, 3:628–636.
219. Prakash I, Avetik Markosyan A, Bunders C, Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M. Foods 2014, 3, 162-175; doi:10.3390/foods3010162.
220. Rezaei-Soufi L, i sar. Comparison the effect of stevia extract with glucose and fructose on dental enamel caries formation. Journal of chemical and pharmaceutical science, 2016, 9:685–689.
221. Saeki Y, Takahashi M, Kamikawa S, i sar. “Remineralization effect of xylitol chewing gum containing *Gloipeltis furcata* extract and calcium hydrogenphosphate on initial caries-like enamel lesions,” Japanese Journal of Oral Biology, vol. 42, pp. 590–600, 2000.
222. Saeki Y, Kato T, Naito Y, Takazoe I, and Okuda K, “Inhibitory effects of funoran on the adherence and colonization of mutans streptococci,” Caries Research, vol. 30, no. 2, pp. 119–125, 1996.
223. Poggit C, Lombardini M, Vigorelli P, Ceci M, Analysis of Dentin/Enamel Remineralization by a CPP-ACP Paste: AFM and SEM Study. SCANNING 2013;1:9 9 (2013)© Wiley Periodicals, Inc.
224. Stefanski T, Postek-Stefanska L, Possible ways of reducing dental erosive potential of acidic beverages Australian Dental Journal 2015; 59:280–288.

## BIOGRAFIJA AUTORA

### Biografija

#### Đorđe Mirjanić

Datum i mjesto rođenja: 23.11.1983. godine Banja Luka

Adresa: Ranka Miličevića 26, Banja Luka

Mobilni telefon: 065/222-444

E-mail: [djordjemirjanic@gmail.com](mailto:djordjemirjanic@gmail.com)

#### Obrazovanje:

- Ekonomski fakultet Univerzitet u Banjoj Luci, završio 2003. godine;
- Magistar stomatoloških nauka, Medicinski fakultet Univerzitet u Banjoj Luci, završio 14.11.2012. godine;
- Specijalizaciju iz preventivne dječje stomatologije, Medicinski fakultet Univerzitet u Banjoj Luci, završio 2.11.2015. godine;
- Postdiplomske studije iz stomatologije, Medicinski fakultet Univerzitet u Banjoj Luci, završio 2012. godine.

#### Poznavanje jezika:

- engleski i
- ruski

#### Rad sa računarom

Microsoft Office: Microsoft Word, Microsoft Excel, MicrosoftPower Point, internet.

#### Radno iskustvo:

- Dom zdravlja Banja Luka
  - ✓ 2008-2016, doktor stomatologije
  - ✓ 2016 – Zdravstveni Republički inspektor

Član je Komore doktora stomatologije Republike Srpske;

Autor je više naučnih i stručnih radova.

Izjavljujem  
da je doktorska disertacija

EFIKASNOST PRIRODNIH ZASLAĐIVAČA U ZAŠTITI ZUBNE GLEĐI OD  
GAZIRANIH NAPITAKA

EFFICIENCY OF NATURAL SWEETENERS IN PROTECTION OF DENTAL ENAMEL  
FROM CARBONATED BEVERAGES

- Rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- Da doktorska disertacija, u cijelini, ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- Da su rezultati korektno navedeni i
- Da nisam koristio autorska prava i intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, mart 2017. godine

Potpis doktoranta

Mirjalić Đorđe

## Izjava 2

### Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod nazivom

#### EFIKASNOST PRIRODNIH ZASLAĐIVAČA U ZAŠTITI ZUBNE GLEĐI OD GAZIRANIH NAPITAKA

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilozima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

- Autorstvo
- Autorstvo – nekomercijalno
- Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
- Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima**
- Autorstvo – bez prerade
- Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, mart 2017, godine

Potpis doktoranta

Miodrag Đorđević

### Izjava 3

#### Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: Đorđe Mirjanić

Naslov rada:  
ZASLADIVĀČA  
EFIKASNOST PRIRODNIH  
U ZAŠTITI ZUBNE GLEĐI  
OD GAZIRANIH NAPITAKA

Ime i prezime: Dr Jovan Vojinović

Izjavljujem da jem štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predao za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, mart 2017, godine

Potpis doktoranta



UNIVERZITETU U BANJOJ LUCI  
PODACI O AUTORU ODBRANJENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Ime i prezime autora disertacije

**Đorđe Mirjanić**

Datum, mjesto i država rođenja autora

**23.11.1983.**

Naziv završenog fakulteta/Akademije autora i godina diplomiranja

**Medicinski fakultet Banja Luka 2008 godine.**

Datum odbrane master/magistarskog rada autora

**14.11.2012. godine**

Naslov master/magistarskog rada autora

Atomska mikroskopija nanostrukture gleđi

Akademska titula koju je autor stekao odbranom master/magistarskog rada

**Magistar medicinskih nauka**

Akademska titula koju je autor stekao odbranom doktorske disertacije

doktor stomatoloških nauka

Naziv fakulteta/Akademije na kome je doktorska disertacija odbranjena

Medicinski fakultet,Banja Luka

Naziv doktorske disertacije i datum odbrane

Naučna oblast disertacije prema CERIF šifrarniku

**B002**

Imena mentora i članova komisije za odbranu doktorske disertacije

**Mentor: dr Jovan Vojinović**

Komisija:

1. Prof. dr Mirjana Ivanović, redovni profesor, ужа научна област Превентивна и дјеција стоматологија, Универзитет у Београду, Стоматолошки факултет, предсједник комисије;
2. Prof dr Jovan Vojinović, redovni profesor, ужа научна област Preventivna i dječija stomatologija, Univerzitet u Banjoj Luci, Medicinski fakultet, član i mentor;
3. Prof. dr Dubravka Marković, redovni profesor, ужа научна област Protetika, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, član.

U Banjoj Luci, dana \_\_\_\_\_ 2017, godine

Dekan