

UNIVERZITET U BEOGRADU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Jovana N. Stašić

**UTICAJ NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE  
PLAZME NA POVRŠINSKA SVOJSTVA DENTINA I  
NJEGOVU INTERAKCIJU SA ADHEZIVNIM  
SYSTEMIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Jovana N. Stašić

**EFFECT OF NON-THERMAL ATMOSPHERIC  
PLASMA ON SURFACE PROPERTIES OF DENTIN  
AND ITS INTERACTION WITH UNIVERSAL  
ADHESIVES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

## **MENTORI**

Prof. dr Vesna Miletić, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Maja Miletić, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

## **KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE**

DATUM ODBRANE \_\_\_\_\_

*Posvećujem roditeljima*

# **Uticaj niskotemperaturne atmosferske plazme na površinska svojstva dentina i njegovu interakciju sa adhezivnim sistemima**

## **Sažetak**

### **Uvod**

Mogućnosti ostvarivanja adekvatne adhezivne veze sa dentinom su i dalje predmet istraživanja u restaurativnoj stomatologiji. Aplikacija adheziva po protokolima totalnog- ili samonagrizanja nije u potpunosti rešila problem inicijalne jačine veze i dugotrajne rezistencije na biodegradaciju.

Niskotemperaturna atmosferska plazma (NTAP) poseduje sposobnost promene površinskih svojstava materijala sa kojima reaguje. Ispituje se mogućnost primene NTAP za modifikaciju površine dentalnih implantata, keramičkih materijala, ali i tvrdih zubnih tkiva.

Ciljevi ove doktorske disertacije su (1) ispitivanje uticaja različitih režima NTAP na površinska svojstva (kontaktni ugao i površinsku energiju) dentina, (2) optimizacija režima NTAP za tretman dentina pre aplikacije adheziva, (3) analiza interakcije između plazmom tretiranog dentina i univerzalnih adheziva, kao i (4) ispitivanje atomskih i mikromorfoloških karakteristika dentina nakon različitih tretmana.

### **Materijal i metode**

U istraživanju su korišćena 404 intaktna, humana molara ekstrahovana iz ortodontskih razloga. Kao izvor NTAP primenjena je plazma igla konstruisana na Institutu za fiziku u Centru za neravnotežne procese – Laboratoriji za gasnu elektroniku, Univerziteta u Beogradu, koja se sastojala od centralne elektrode od volframa sa napajanjem na 13,56 MHz, dok su za generisanje plazme korišćeni čist helijum (100% He) ili smeše helijuma i kiseonika (99% He+1% O<sub>2</sub> odnosno 98,5% He+1,5% O<sub>2</sub>). U pilot studiji su termoparovima merene promene temperature u komori pulpe tokom tretmana dentina različitim režimima plazme kojima su varirani snaga i udaljenost vrha igle od tretirane površine. Merenje kontaktnog ugla vršeno je pomoću tri referentne tečnosti (destilovana voda, etilen-glikol, dijud-metan) metodom statične kapi na diskovima dentina debljine 1 mm koji su prethodno 30 s tretirani sledećim plazma režimima: 100% He, 99% He+1% O<sub>2</sub> ili 98,5% He+1,5% O<sub>2</sub> radni gas, 2, 4 ili 8 mm rastojanje vrha plazma igle od površine dentina i 1 ili 3 W snaga predata plazmi. Kontrole su činili uzorci dentina tretirani 15 s ortofosfornom kiselinom (Schotchbond Universal Etchant, 3M ESPE, USA) prema protokolu totalnog nagrizanja i netretirani uzorci prema protokolu samonagrizanja. Površinska energija dentina izračunavana je primenom van Oss-Chaudhury-

Good formule. Univerzalni adhezivi Single Bond Universal (SBU) (3M, ESPE, USA) i Clearfil Universal Bond (CUB) (Kuraray, Japan) aplikovani su na dentin tretiran plazmom (98,5% He+1,5% O<sub>2</sub>, 3W, 4 mm) i kontrole po protokolu totalnog nagrivanja i samonagrivanja. Analiza površinskog sastava (atomske udjele Ca, P, O i N) i mikromorfološka struktura dentina urađena je skenirajućom elektronskom mikroskopijom i energiodisperzionom spektroskopijom (SEM/EDS). Dobijeni podaci statistički su obrađeni primenom deskriptivnih i komparativnih statističkih metoda u softverskom paketu Minitab 16 (Minitab Inc., USA) sa nivoom značajnosti od 0,05.

## **Rezultati**

Sa povećanjem snage NTAP raste i temperatura u komori pulpe. Najveći porast temperature u komori pulpe izmeren je za režim 2 W, 5 mm (48,30±1,15 °C). Nakon NTAP tretmana dentina značajno se smanjivao kontaktni ugao tečnosti (6-30°), a povećavala površinska energija dentina (58-97 mJ/m<sup>2</sup>) u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke (38°-84°; 43±3 mJ/m<sup>2</sup>). Dodatak kiseonika je pojačao efekat plazme na površinska svojstva dentina, ali bez razlike za 1% i 1,5% O<sub>2</sub>. Primenom ortofosforne kiseline takođe se smanjivao kontaktni ugao tečnosti (28°-45°), a povećavala površinska energija dentina (76±4 mJ/m<sup>2</sup>), ali u manjoj meri u poređenju sa tretmanom NTAP. Tretman dentina NTAP i ortofosforom kiselinom doveli su do porasta polarne komponente i Lewis baznog dela površinske energije dentina u odnosu na kontrole. Univerzalni adhezivi aplikovani po protokolu samonagrivanja pokazali su značajno manje vrednosti kontaktnih uglova (SBU\_29,94±1,86°; CUB\_26,56±2,33°) u odnosu na protokol totalnog nagrivanja (SBU\_44,13±8,45°; CUB\_33,04±6,04°). Nakon tretmana NTAP uočen je značajno manji kontaktni ugao CUB (19,95±6,88°) nego SBU (35,68±2,35°). Kontaktni ugao oba adheziva je bio značajno manji nakon NTAP tretmana (SBU\_35,68±2,35°; CUB\_19,95±6,88°) nego u protokolu totalnog nagrivanja (SBU\_44,13±8,45°; CUB\_33,04±6,04°). NTAP tretman dentina doveo je do manje atomske zastupljenosti O, a veće Ca, P i N, dok je ortofosforna kiselina imala suprotan efekat. SEM mikrografije dentina su pokazale da je nakon tretmana NTAP površina dentina slična površini kada se primenjuje protokol samonagrivanja, bez destruktivnih promena. Tretman ortofosforom kiselinom doveo je do uklanjanja razmaznog sloja, eksponiranja kolagenih vlakana i otvaranja dentinskih kanalića.

## **Zaključak**

Primena NTAP na površini dentina poboljšava kvašenje iskazano znatnim smanjivanjem kontaktnih uglova referentnih tečnosti i adheziva, što omogućava bolju distribuciju adheziva. Površinska energija dentina se povećava nakon tretmana NTAP i menja se polarnost (polarna, Lewis bazna površina) što doprinosi daljem načinu interakcije sa adhezivima. Dodatak 1% ili 1,5% O<sub>2</sub> radnom gasu He ima dodatni pozitivan efekat na učinak NTAP u modifikaciji površinskih svojstava dentina pre aplikacije dentalnih adheziva. Mogu se smatrati optimizovanim režimi sa udaljenošću vrha plazma izvora NTAP od površine dentina od 2 do 4 mm, snage 3 W koji se primenjuju u klinički prihvatljivom vremenskom intervalu od 30 s. Optimizovani režim NTAP ne dovodi do destruktivnih promena na površini dentina, a promene u hemijskom sastavu su suprotne od dejstva ortofosforne kiseline.

**Ključne reči:** Niskotemperaturna atmosferska plazma, Dentin, Kontaktni ugao, Površinska energija, Kvašenje, Univerzalni adhezivi

**Naučna oblast:** Stomatološke nauke

**Uža naučna oblast:** Restaurativna odontologija

**UDK broj:**

# **Effect of non-thermal atmospheric plasma on surface properties of dentin and its interaction with universal adhesives**

## **Abstract**

## **Introduction**

Modalities for achieving adequate adhesive bond to dentin are still subject to research in restorative dentistry. "Total-etch" (TE) and "self-etch" (SE) protocols of adhesive application have not completely solved the problems of initial bond strength and long-term resistance to biodegradation.

Non-thermal atmospheric plasma (NTAP) has the capability of changing the surface properties of materials upon interaction. The possibility of NTAP application to modify the surfaces of dental implants, ceramic materials and hard dental tissues is being investigated.

The aims of this doctoral dissertation were to (1) evaluate the effect of different NTAP regimes on surface properties (contact angle and surface energy) of dentin, (2) optimize NTAP regimes for dentin treatment prior to adhesive application, (3) analyze the interaction between plasma treated dentin and universal adhesives, and (4) evaluate the micro-morphological structure and elemental composition of dentin after different treatments.

## **Material and methods**

In this study, 404 human, intact, third molars extracted for orthodontic reason were used. A plasma needle, constructed at the Center for nonequilibrium processes - Laboratory for gaseous electronics, University of Belgrade, was used as the source of NTAP. The plasma needle consisted of a central wolfram electrode with power supply at 13.56 MHz. The pure helium (100% He) and mixtures of helium and oxygen (99% He+1% O<sub>2</sub>; 98.5% He+1.5% O<sub>2</sub>) were used for generating plasma. In a pilot study, thermocouples were used for measuring temperature changes in the pulp chamber during dentin treatment using plasma with different power and tip-to-surface distances. Contact angle measurements were performed using three referent liquids (distilled water, ethylene glycol and diiodmethane) and the sessile drop method on 1 mm thick dentin disks previously treated for 30 s with the following plasma regimes: 100% He, 99% He+1% O<sub>2</sub> or 98.5% He+1.5% O<sub>2</sub> working gas; 2, 4 or 8 mm tip-to-surface distance and 1 or 3 W power. Controls were dentin disks treated with phosphoric acid (Scotchbond Universal Etchant, 3M ESPE, USA) for 15 s according to TE or untreated disks according to SE protocol. Surface free energy of dentin was calculated using van Oss-Chaudhury-Good formula. Single Bond Universal (SBU) (3M, ESPE, USA) and Clearfil

Universal Bond (CUB) (Kuraray, Japan) were applied to plasma-treated dentin using 98,5% He+1,5% O<sub>2</sub>, 3W, 4 mm regime and controls according to TE and SE application protocols. Surface composition (atomic parts of Ca, P, O and N) and micro-morphological structure of dentin were analyzed using scanning electron microscopy and energy-dispersive spectroscopy (SEM/EDS). Data were statistically analyzed using descriptive and comparative statistical methods in the software package Minitab16 (Minitab Inc., USA) at 0.05 level of significance.

## **Results**

Temperature in the pulp chamber increased with increasing input power of NTAP. The highest temperature rise in the pulp chamber was recorded during 2 W, 5 mm regime (48.30±11.5 °C). After NTAP treatment, contact angles of liquids decreased significantly (6-30°) and dentin surface free energy increased (58-97 mJ/m<sup>2</sup>) compared to untreated, control samples (38°-84°; 43±3 mJ/m<sup>2</sup>). Oxygen addition intensified plasma effects on dentin surface properties, with no significant difference between 1% and 1.5% O<sub>2</sub>. Phosphoric acid also decreased contact angles of liquids (28°-45°) and increased dentin surface free energy (76±4 mJ/m<sup>2</sup>), albeit to a lesser extent than NTAP. NTAP and phosphoric treatment of dentin increased polar and Lewis base components of dentin surface free energy compared to untreated, control samples.

Universal adhesives applied according to the SE protocol showed significantly lower contact angle values (SBU\_29.94±1.86°; CUB\_26.56±2.33°) compared to the TE protocol (SBU\_44.13±8,45°; CUB\_33.04±6,04°). After the NTAP treatment of dentin, significantly decreased contact angle of CUB (19.95±6.88°) was noticed compared to SBU (35.68±2.35°). Contact angles of both adhesives were significantly smaller after NTAP treatment (SBU\_44.13±8.45°; CUB\_33.04±6.04°) compared to the TE protocol. NTAP treatment decreased O and increased Ca, P and N in dentin surface while phosphoric acid had an opposite effect. SEM micrographs of NTAP treated dentin showed similarities to the SE protocol of adhesive application, with no destructive changes. The application of phosphoric acid led to the removal of the smear layer, exposure of collagen fibrils and dentinal tubules.

## **Conclusion**

The application of NTAP to dentin surface improves wettability as presented with significantly lower contact angles of reference liquids and adhesives, thereby enabling better adhesive distribution. Dentin surface free energy increases after plasma treatment and the polarity changes (polar and Lewis base component), further contributing to dentin-adhesive interaction. The addition of 1% or 1.5% O<sub>2</sub> to the working gas He has an additional positive

effect to NTAP in modification surface properties of dentin prior to adhesive application. Optimized regimes can be considered those at 2 to 4 mm tip-to-surface distances and 3 W power, applied in clinically relevant time of 30 s. The optimized NTAP treatment does not incur destructive changes of dentin surface and chemical composition changes are opposite to phosphoric acid.

**Keywords:** Non-thermal atmospheric plasma, Dentin, Contact angle, Surface free energy, Wettability, Universal adhesives

**Scientific field:** Dental Sciences

**Specific scientific field:** Restorative odontology

**UDC number:**

## Sadržaj:

UVOD .....	1
1. Plazma .....	1
1.1. Laboratorijske plazme .....	2
1.2. Niskotemperaturna plazma .....	3
Niskotemperaturna plazma na atmosferskom pritisku (NTAP) .....	4
2. Eksperimentalna i klinička primena NTAP u biomedicini .....	4
2.1. Primena NTAP za sterilizaciju i dezinfekciju .....	6
2.2. Primena NTAP u terapiji promena na koži i regeneraciji kože .....	7
2.3. Primena NTAP na ćelije tumora .....	9
2.4. Primena NTAP u cilju koagulacije krvi .....	10
3. Eksperimentalna i klinička primena NTAP u stomatologiji .....	12
3.1. Antimikrobni efekat NTAP .....	12
3.1.1. Karijes.....	13
3.1.2. Gingivitis i parodontopatija .....	14
3.1.3. Periiplantitis.....	15
3.1.4. Infekcija endodoncijuma.....	16
3.2. Interakcija NTAP sa materijalima na bazi smola .....	17
3.2.1. Polimerizacija materijala na bazi smola.....	17
3.2.2. Plazma izvori za svetlosnu polimerizaciju.....	19
3.3. Primena NTAP u postupku beljenja zuba.....	19
3.4. Modifikacija površine materijala i zubnih tkiva primenom NTAP.....	20
3.4.1. Kvašenje i površinska energija.....	23
3.4.2. Modifikacija površine implantata .....	23
3.4.3. Modifikacija površine keramičkih materijala .....	24
3.4.4. Modifikacija površine zubnih tkiva .....	25
3.4.4.1. Dentin i veza sa savremenim adhezivnim sistemima .....	25
3.4.4.2. Modifikacija površine dentina primenom NTAP .....	29
CILJEVI, RADNE HIPOTEZE I ZADACI .....	34
MATERIJAL I METOD .....	36
1. Priprema i sečenje ekstrahovanih zuba .....	36
Priprema uzoraka za merenje temperature u komori pulpe.....	36
Priprema dentinskih diskova za površinski tretman i aplikaciju adheziva .....	37
2. Plazma izvor.....	37
3. Merenje temperature u komori pulpe tokom plazma tretmana: pilot studija .....	39
4. Tretman površine dentina NTAP .....	40
5. Tretman površine dentina ortofosfornom kiselinom .....	41

<b>6. Merenje kontaktnog ugla.....</b>	<b>43</b>
<b>7. Izračunavanje površinske energije .....</b>	<b>45</b>
<b>8. Aplikacija univerzalnih adheziva na dentin .....</b>	<b>46</b>
<b>9. Analiza površinskog sastava i strukture dentina .....</b>	<b>49</b>
<b>10. Statistička analiza.....</b>	<b>49</b>
<b>REZULTATI .....</b>	<b>50</b>
<b>1. Temperatura u komori pulpe tokom tretmana NTAP: pilot studija .....</b>	<b>50</b>
<b>2. Kontaktni ugao .....</b>	<b>53</b>
<b>2.1. Kontaktni ugao nakon tretmana NTAP .....</b>	<b>53</b>
<b>2.2. Kontaktni ugao nakon aplikacije ortofosforne kiseline .....</b>	<b>58</b>
<b>2.3. Kontaktni ugao nakon tretmana NTAP i aplikacije univerzalnih adheziva.....</b>	<b>59</b>
<b>3. Površinska energija dentina nakon tretmana NTAP ili ortofosfornom kiselinom .....</b>	<b>60</b>
<b>3.1. Površinska energija dentina.....</b>	<b>60</b>
<b>3.2. Komponente površinske energije dentina .....</b>	<b>61</b>
<b>4. Elementarni sastav površine dentina nakon tretmana NTAP ili ortofosfornom kiselinom .....</b>	<b>62</b>
<b>5. Površinska struktura dentina nakon NTAP tretmana ili ortofosfornom kiselinom....</b>	<b>63</b>
<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>65</b>
<b>Temperatura u komori pulpe.....</b>	<b>65</b>
<b>Kkontaktni ugao .....</b>	<b>66</b>
<b>Površinska energija .....</b>	<b>69</b>
<b>Efekti različitih NTAP režima na površinska svojstva dentina .....</b>	<b>75</b>
<b>Aplikacija univerzalnih adheziva na plazmom tretirani dentin .....</b>	<b>76</b>
<b>Površinski sastav i struktura dentina .....</b>	<b>79</b>
<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>82</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>83</b>
<b>BIOGRAFIJA.....</b>	<b>96</b>

## **Lista slika**

**Slika 1.** Prikaz uzorka i lokalizacija termopara za merenje temperature u komori pulpe tokom tretmana NTAP.

**Slika 2.** Priprema dentinskih diskova.

**Slika 3.** Shematski prikaz plazma igle konstruisane u Institutu za fiziku u Beogradu.

**Slika 4.** Eksperimentalna postavka plazma igle.

**Slika 5.** Prikaz pozicije plazma igle u odnosu na uzorak dentina.

**Slika 6.** Protokol aplikacije ortofosforne kiseline: (1) aplikacija kiseline pomoću dispenzera; (2) ispiranje kiseline mlazom vode i (3) blago posušivanje pomoću papirnog ubrusa.

**Slika 7.** Referentne tečnosti i pipeta.

**Slika 8.** Izgled kapljice referentne tečnosti (dijod-metan) na površini dentinskog diska.

**Slika 9.** Shematski prikaz postavke za fotografisanje referentne tečnosti na površini uzorka pre merenja kontaktnog ugla.

**Slika 10.** Prikaz merenja kontaktnog ugla u programu Image J.

**Slika 11.** Aplikacija adheziva po protokolu totalnog nagrivanja: (1) aplikacija kiseline pomoću dispenzera; (2) ispiranje kiseline mlazom vode i (3) blago posušivanje pomoću papirnog ubrusa; (4) izgled posušenog dentina; (5) aplikacija adheziva pomoću pipete; (6) izgled univerzalnog adheziva na površini dentina.

**Slika 12.** Aplikacija adheziva po protokolu samonagrivanja: (1) izgled posušene površine dentina (2) aplikacija adheziva pomoću pipete; (3) izgled univerzalnog adheziva na površini dentina.

**Slika 13.** Skenirajući elektronski mikroskop.

**Slika 14.** Prikaz temperatura u komori pulpe tokom NTAP tretmana u realnom vremenu.

**Slika 15.** Prsline na površini dentina.

**Slika 16.** SEM mikrografija dentina nakon tretmana NTAP u režimima sa čistim He, sa dodatkom 1% i 1,5% O<sub>2</sub>.

**Slika 17.** SEM mikrografija netretiranog dentina i dentina nakon nagrivanja 32% ortofosfornom kiselinom.

## **Lista tabela**

**Tabela 1.** Režimi NTAP tretmana za merenje temperature u komori pulpe.

**Tabela 2.** Grupe i podgrupe za tretman NTAP i broj uzoraka u svakoj grupi.

**Tabela 3.** Ortofosforna kiselina i sastav.

**Tabela 4.** Parametri površinske energije referentnih tečnosti.

**Tabela 5.** Adhezivi i njihov sastav.

## **Lista grafikona**

**Grafikon 1.** Vrednosti temperature u komori pulpe tokom tretmana NTAP.

**Grafikon 2.** Vrednosti kontaktnog ugla za sve tri referentne tečnosti nakon tretmana čistom He plazmom.

**Grafikon 3.** Vrednosti kontaktnog ugla za sve tri referentne tečnosti nakon tretmana He plazmom sa dodatkom 1% O<sub>2</sub>.

**Grafikon 4.** Vrednosti kontaktnog ugla za sve tri referentne tečnosti nakon tretmana He plazmom sa dodatkom 1,5% O<sub>2</sub>.

**Grafikon 5.** Vrednosti kontaktnog ugla nakon aplikacije 32% ortofosforne kiseline.

**Grafikon 6.** Vrednosti kontaktnog ugla nakon tretmana NTAP i aplikacije univerzalnih adheziva.

**Grafikon 7.** Vrednosti površinske energije dentina nakon tretmana NTAP ili ortofosfornom kiselinom.

**Grafikon 8.** Komponente (polarne, nepolarne, Lewis kiseli deo, Lewis bazni deo) površinske energije dentina nakon tretmana NTAP ili ortofosfornom kiselinom.

**Grafikon 9.** Atomski procenat N, O, P, Ca na površini dentina nakon različitih tretmana.

## **Koriščene skraćenice:**

**BisGMA** – Bis-fenol-A-glicidil-dimetakrilat

**CHX** – Hlorheksidin

**CQ** – Kamforhinon

**CUB** – Clearfil Universal Bond

**10-MDP** – 10-Metakriloiloksidecil dihidrogen fosfat

**DMAEMA** – Dimetilaminoetil-dimetakrilat

**DMDMA** – Dekametilen-dimetakrilat

**DNK** – Dezoksiribonukleinska kiselina

**EDS** – Energodisperziona spektroskopija

**HaP** – Hidroksiapatit

**HEMA** – Hidroksil-etil metakrilat

**K** – Kelvin

**LED** – Svetlosno emitujuća dioda

**Lucirin TPO** – 2,4,6 trimetilbenzoil difenilfosfin oksid

**MMP** – Matriksna metaloproteinaza

**MRSA** – Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*

**NTAP** – Niskotemperaturna atmosferska plazma

**$r_D$**  – Debajev radijus

**RNS** – Reaktivne azotne čestice

**ROS** – Reaktivne oksidativne čestice

**SBU** – Single Bond Universal

**SEM** – Skenirajuća elektronska mikroskopija

**SEM mikroskop** – Skenirajući elektronski mikroskop

**$T_i$**  – Temperatura teških čestica (jona)

**$T_n$**  – Temperatura neutrala (molekula, atoma, slobodnih radikala)

**$T_e$**  – Temperatura elektrona

**TTP** – Tkivno-tolerantna plazma

**UV zračenje** – Ultravioletno zračenje

**XPS** – Rendgenska fotoelektronska spektroskopija

# UVOD

## 1. Plazma

Plazma čini najveći deo vidljivog univerzuma, a može se stvarati i na Zemlji pod specifičnim okolnostima. Najpoznatiji plazma fenomeni su munja i aurora borealis na severnoj, odnosno, australis na južnoj hemisferi planete Zemlje (Francis, 2003e).

Plazmu je prvi identifikovao William Crookes 1879. godine, međutim sam pojam plazma prvi put je upotrebio Irving Langmuir 1928. godine kako bi opisao ponašanje čestica u jonizovanom gasu u cevi za električno pražnjenje. Plazma ga je podsećala na krvnu plazmu zbog složenosti. On je smatrao da su karakteristike jonskih tečnosti u biologiji i medicini analogne plazmi u fizičkim naukama (Compton, 1930).

U fizici plazma se smatra četvrtim agregatnim stanjem, različitim od čvrstog, tečnog i gasovitog. Čvrsta tela zagrevanjem prvo prelaze u tečnu fazu, a zatim u gasovitu usled povećanja temperature. Zagrevanjem čestice dobijaju energiju, tako da se elektroni odvajaju od atoma ili molekula gasa. Odvajanjem elektrona, gas prelazi u fazu potpuno ili delimično jonizovanog gasa koji predstavlja plazma stanje (Francis, 2003e; Lieberman, 2005).

Skup slobodnih naelektrisanih čestica, neutralnih atoma i molekula koje se slobodno kreću čine plazmu. Izuzetna elektroprovodljivost je jedna od karakteristika ovog medijuma koja proizilazi iz velikog broja slobodnih elektrona i naelektrisanih jona prisutnih u njemu. Elektroprovodljivost plazme je u bliskoj vezi sa plazmenom frekvencijom koja predstavlja vreme koje je potrebno da plazma reaguje na spoljašnje električno promenljivo polje (Labat, 1991). Druga važna karakteristika je kvazineutralnost, odnosno postojanje balansa između koncentracija pozitivno naelektrisanih jona i negativno naelektrisanih čestica (elektrona i negativno naelektrisanih jona) (Francis, 2003c). Jedan od parametara plazme koji karakteriše kvazineutralnost je Debajev radijus ( $r_D$ ), koji predstavlja najmanju dimenziju plazme. Međutim, da bi plazma bila makroskopski neutralna, njene dimenzije moraju biti veće od  $r_D$ . Veći prostor od veličine  $r_D$  je potreban za skup naelektrisanih čestica, kako bi se on smatrao plazmom (Labat, 1991). Za razliku od gasa gde čestice izolovano reaguju jedna sa drugom, kod plazme postoji tzv. kolektivni efekat. U medijumu plazme svaka naelektrisana čestica istovremeno utiče na veći broj čestica u okolini. Prisustvo velikog broja čestica je odgovorno za brojne reakcije koje se odvijaju kroz elastične i neelastične sudare čestica (Bittencourt, 1986) što je čini veoma reaktivnom.

## 1.1. Laboratorijske plazme

Plazma se u laboratorijskim uslovima najčešće generiše električnim pobuđivanjem. Laboratorijski nastale plazme klasifikuju se prema temperaturi i koncentraciji elektrona na visoko- i niskotemperaturne. Temperatura elektrona određena je srednjom energijom različitih čestica plazme (jona, molekula, atoma, slobodnih radikala) i njihovim stepenima slobode. Stepeni slobode definišu se kao kvantni fenomeni prelaska elektrona i mogu biti translacioni, rotacioni, vibracioni i stepen slobode vezan za elektronske ekscitacije (Fridman A, 2008a).

Kako se plazma sastoji od velikog broja različitih čestica, tako i temperature mogu biti različite. Razlika u temperaturi između elektrona i teških čestica proporcionalna je kvadratu odnosa jačine električnog polja ( $E$ ) i pritiska ( $p$ ).

$$\Delta T \sim \left(\frac{E}{p}\right)^2$$

Temperatura teških čestica (jona -  $T_i$ ) i neutrala (molekula, atoma, slobodnih radikala -  $T_n$ ) na nižim pritiscima je znatno manja od temperature elektrona ( $T_e$ ). Usled povećanja pritiska dolazi do porasta broja sudara između elektrona i teških čestica i kinetička energija elektrona se prenosi na teške čestice. Elektroni gube na temperaturi, odnosno dolazi do porasta temperature teških čestica sve dok se ne uspostavi lokalna termodinamička ravnoteža tj. izjednačenje temperatura između čestica plazme ( $T_e = T_i = T_n$ ). Temperatura gasa raste i dostiže vrednost i do nekoliko hiljada Kelvina (K). Ovako formirane plazme nazivamo viskokotemperaturne ili ravnotežne plazme (Fridman A, 2008b).

U laboratorijskim uslovima na različitim pritiscima stvara se i niskotemperaturna (neravnotežna, netermalna) plazma. Karakteriše se nepostojanjem temperaturne ravnoteže između čestica koje je sačinjavaju (elektroni su na višim temperaturama u odnosu na jone, molekule i slobodne radikale koji su na sobnoj temperaturi) (Fridman A, 2008b).

Jedan od glavnih procesa koji se dešava u medijumu plazme je jonizacija (Fridman A, 2008a). Tokom jonizacije dolazi do konverzije neutralnih atoma ili molekula u elektrone i pozitivne jone. Procesi jonizacije mogu biti različiti u raznim sistemima plazmi ali se generalno mogu podeliti u pet grupa: direktna jonizacija elektronskim sudarom, stepenasta jonizacija elektronskim sudarom, jonizacija sudarima sa teškim česticama, fotojonizacija i površinska jonizacija.

Direktna jonizacija elektronskim sudarom je jonizacija neutrala i nepobuđenih atoma, radikala, molekula uz pomoć elektrona čija energija mora biti dovoljno visoka da bi se konverzija odvila tokom jednog sudara. Ovakav tip jonizacije je zastupljen kod hladnih i netermalnih plazmi gde je energija elektrona visoka, a nivo pobuđenih neutralnih čestica nizak.

Stepenasta jonizacija elektronskim sudarom odvija se kod prethodno pobuđenih neutrala. Karakteristična je za termalne plazme gde je stepen jonizacije i nivo pobuđenih neutrala visok.

Jonizacija sudarima sa teškim česticama dešava se tokom jon-molekul ili jon-atom sudara pri čemu ukupna energija sudara prelazi jonizacioni potencijal neutrala. Energija sudara može doprineti jonizaciji kroz proces asocijativne jonizacije.

Fotojonizacija se dešava usled sudara neutrala i fotona. Kao posledica ovog sudara nastaje elektron-jon par. Odvijanje ovog procesa je prisutno kod termalnih plazmi.

Površinska jonizacija karakteriše se jonskim, elektronskim i fotonskim sudarima sa različitim površinama. Usled zagrevanja površine može doći do odvijanja površinske jonizacije (Fridman A, 2008a).

Pored jonizacije, u medijumu plazme, slobodni elektroni vrše disocijaciju molekula. Tada dolazi do stvaranja negativnih jona i slobodnih atoma. Ovakav proces se naziva disocijativno vezivanje i karakterističan je za plazme koje u sebi sadrže molekule koji imaju veliki elektronski afinitet ( $O_2$ , O,  $Cl_2$ , Cl, F) (Francis, 2003a).

Za odvijanje hemijskih procesa u plazmi značajno je i ponašanje pobuđenih atoma i molekula. Proces pobuđivanja može biti elektronski, vibracioni i rotacioni. Da bi došlo do pobuđivanja atoma i molekula bitno je postojanje visokih vrednosti temperatura i energije elektrona (Francis, 2003b). Prilikom pobuđivanja višak energije se oslobađa zračenjem fotona, a kada to nije moguće produžava se životni vek pobuđenog stanja i nastaju metastabilna pobuđena stanja. U tim situacijama energija se predaje tokom brojnih sudara što direktno utiče na plazma kinetiku i hemijske procese.

## **1.2. Niskotemperaturna plazma**

Niskotemperaturna plazma se može stvarati na nižem pritisku i atmosferskom. Temperatura ovih plazmi je niža od temperature elektrona (raspon temperature ide od sobne do nekoliko stotina °C. Između sudara čestica, elektroni dobijaju energiju od električnog polja, tako da

snaga plazme ide prvenstveno njima. Tokom sudara sa teškim česticama, neutralima i jonima elektroni predaju malu količinu energije teškim česticama, neutralima i jonima, ali i zidovima komore (Fridman A, 2008b). Elektroni gube malu količinu energije jer je njihova masa mnogo manja nego masa teških čestica, neutrala i jona. Kinetika plazme se definiše elektronima koji se sudaraju sa različitim česticama. Takođe, elektroni su odgovorni i za produkciju aktivnih vrsta koje učestvuju u različitim vrstama tretmana. Prilikom sudara sa elektronima, stvaraju se joni i slobodni radikali koji imaju značajnu ulogu u odvijanju hemijskih procesa u plazmi i na površini uzorka. Ovako nastale čestice mogu imati različite flukseve i visoke energije. Temperature elektrona kod ovih plazmi su reda 1 eV (10 000 K) (Fridman A, 2008b). Kod neravnotežnih plazmi temperature teških čestica ( $T_i$ ,  $T_n$ ) i temperatura osnovnog gasa približne su sobnoj temperaturi.

### **Niskotemperaturna plazma na atmosferskom pritisku (NTAP)**

Naučno razumevanje plazma fenomena i jedinstvene karakteristike plazma hemije predstavljale su dobar osnov za razvoj plazma tehnologije koja danas nalazi primenu u različitim oblastima, posebno industrije. Zbog raznovrsnosti njihove primene poseban značaj imaju pražnjenja na atmosferskom pritisku jer omogućavaju tretiranje uzoraka van složenih vakuumskih sistema kao i tretman uzoraka koji su osetljivi na visoke temperature. Da bi tretman ovakvih uzoraka bio uspešan neophodno je korišćenje viših frekvencija izvora napajanja i/ili uključenja inertnog gasa (helijum (He), argon (Ar), neon (Ne), kripton (Kr)) koji ima sposobnost proboja već pri radiofrekventnim signalima i nižim naponima (Fridman A, 2004).

NTAP deluje hemijski sa blagim nedestruktivnim efektom. Ove plazme su pogodne za tretman skoro svih osetljivih površina, organskih materija bez termičkih i električnih oštećenja (Stoffels et al, 2002). Niske temperature gasa omogućavaju tretman temperaturno osetljivih uzoraka.

## **2. Eksperimentalna i klinička primena NTAP u biomedicini**

Poslednjih dvadeset godina intenzivno se istražuju mogućnosti primene savremene plazma tehnologije u različitim oblastima medicine i stomatologije. Razumevanje složenih mehanizama delovanja niskotemperaturne plazme na biološke sisteme zahteva interdisciplinarnan pristup i saradnju stručnjaka iz različitih oblasti. Danas se najviše pažnje posvećuje istraživanjima vezanim za potencijalnu primenu ovih plazmi *in vivo*. Brojne studije su pokazale da tokom tretmana dolazi do suptilnog i selektivnog odgovora ćelija i tkiva na

reaktivne čestice koje potiču od NTAP (Petrović et al, 2012). Međutim, za primenu niske temperature plazme *in vivo* neophodno je da se plazma stvara na atmosferskom pritisku sa temperaturom gasa koja je približna sobnoj. Stoga su istraživanja u poslednjoj dekadi bila fokusirana na razvoj pouzdanih i odgovarajućih izvora NTAP koji mogu biti kontrolisani kao i optimizaciji uslova pod kojim se plazma primenjuje kako bi se postigao željeni efekat.

Za *in vivo* primenu u biomedicini najčešće se koriste tri tipa NTAP (Kong et al, 2009):

- a) Direktne – gde tretirana površina predstavlja elektrodu kroz koju protiče struja (Fridman G et al, 2008),
- b) Indirektne – koje nastaju između dve elektrode, a zatim nastali produkti plazme dospevaju na površinu koja se tretira uz pomoć protoka radnog gasa (Cao et al, 2009; Shimizu et al, 2008),
- c) Hibridne – predstavljaju kombinaciju direktnih i indirektnih, a stvaraju se barijernim pražnjenjem u koroni (Morfill et al, 2009).

Kod direktnih plazmi stvara se homogenija plazma i veća koncentracija formiranih reaktivnih čestica. Kao nedostatak ovog tipa plazme, navodi se nemogućnost postizanja istog rastojanja od površine uzorka (površine tela). Održavanje istog rastojanja nije uvek moguće zbog same morfologije tkivnog i koštanog sistema ljudskog tela.

Indirektne plazme su karakteristične zbog raznolikosti sastava. Takođe, mogu da deluju na veće površine i kod ovih tipova plazmi nema prodora struje kroz površinu uzorka. Nedostaci indirektnih plazmi ogledaju se u nedovoljnoj kontroli što je prisutno i kod direktnih plazmi. Zbog svoje geometrije samo niske koncentracije generisanih čestica mogu dostići efekat (Isbary et al, 2013).

Različiti izvori NTAP razvijeni su u laboratorijskim uslovima. Najčešće korišćeni izvori su: plazma mlazovi, plazma igle, razni oblici mikropražnjenja, dielektrična barijerna pražnjenja (Kunhardt, 2010).

U literaturi postoje podaci o potencijalnoj primeni plazma mlazova i plazma igle u cilju inaktivacije različitih mikroorganizama (Du et al, 2013; García-Alcantara et al, 2012; Koban, 2011; Lazović et al, 2010; Miletić M et al, 2014; Rupf et al, 2011; Stoffels et al, 2006; Wang et al, 2011) i modifikacije površine supstrata (Duske et al, 2012; Han et al, 2014; Stoffels et al, 2002).

Da bi se dobili što bolji efekti NTAP potrebno je kvalitetnom analizom i pažljivim odabirom parametara za dobijanje plazme uticati na njen hemijski sastav tj. na sastav hemijski reaktivnih vrsta koje se u njoj nalaze. Generisanje NTAP vrši se pomoću jednosmerne ili naizmjenične pobude signala. Naizmjenične pobude signala mogu biti u velikom opsegu ekscitacionih frekvenci (od nekoliko desetina kiloherca (kHz) do nekoliko gigaherca (GHz) sa primenjenim naponima u sinusoidnom ili pulsnom režimu. Sinusoidni ili pulsni režim kreće se od nekoliko stotina volti do nekoliko kilovolti (kV).

## **2.1. Primena NTAP za sterilizaciju i dezinfekciju**

Tokom procesa sterilizacije osnovni cilj je uništenje svih živih oblika mikroorganizama (virusa, bakterija, gljivica i njihovih spora). Najčešće metode sterilizacije su sterilizacija zasićenom parom pod visokim pritiskom (autoklav), primena etilen oksida i jonizujuće zračenje. Tokom sprovođenja ovih tehnika sterilizacije moguće je oštećenje površina ili medijuma na kojima su prisutni mikroorganizmi. Nakon upotrebe etilen oksida potrebno je duže radno vreme i duža ventilacija kako bi se uklonili rezidualni agensi i materijal pripremio za korišćenje (Steelman, 1992). Primena ovih tehnika je ograničena kod termalno osetljivih materijala i objekata koji su podložni promenama kao što su organski materijali i tečnosti. Potreba za razvojem dodatnih, novih metoda je u usponu. Istraživanja u *in vitro* uslovima ukazuju na potencijalnu primenu NTAP kao alternativne zamene standardnim tehnikama sterilizacije. Za kratko radno vreme i na siguran način moguće je inaktivisati mikroorganizme primenom NTAP. Tokom procesa sterilizacije ili dekontaminacije narušava se strukturalni integritet ili funkcija ćelijske membrane mikroorganizama (Moreau et al, 2008). Tokom tretmana NTAP u eksperimentalnim uslovima mikroorganizmi mogu biti inaktivirani dejstvom jednog ili kombinacijom više faktora (ultravioletno (UV) zračenje, zagrevanje, naelektrisane čestice, neutralne reaktivne vrste). Efekat, kao i širina dejstva ovih faktora zavisi od parametara plazme (snaga, smeša gasova, brzina protoka gasa) (Laroussi, 2004). Svi ovi faktori mogu biti aktivirani/generisani u gasu ili tečnosti bez zagrevanja (Akishev et al, 2008).

Laroussi i saradnici (Laroussi, 2004) ispitivali su efekte navedenih faktora i pokazali su da temperatura i UV zračenje nemaju direktan uticaj na uništavanje mikroorganizama pri određenim režimima NTAP. Utvrdili su da temperatura gasa ne zavisi od snage predate izvoru plazme, ali i da je protok gasa obrnuto proporcionalan vrednostima temperature plazme, tj. da se sa povećanjem protoka gasa (2 l/min; 10 l/min) smanjuje temperatura plazme (330 K; 300 K) (Laroussi, 2004).

Tokom dekontaminacije NTAP, naelektrisane reaktivne čestice ( $O_2$ ,  $O_3$ ,  $OH$ ,  $NO$ ,  $NO_2$ ) mogu uticati na integritet ćelijskih membrana mikroorganizama. Na primer, prisustvo  $OH^-$  jona može kompromitovati funkciju lipida koji predstavljaju barijeru za transport jona i polarnih čestica u/iz ćelija (Montie et al, 2000). NTAP može imati i mehaničko dejstvo na površinu mikroorganizama. Pojava mehaničkog efekta se može objasniti prisustvom  $OH^-$  i  $NO^-$  u plazmi (Benstaali et al, 1988a; Laroussi, 2004) koji bombarduju površinu mikroorganizma. Tada dolazi do pojave lezija na samoj površini i njihovog sledstvenog uništenja. Pored pojave lezija na površini mikroorganizma dolazi i do promena ćelijskog oblika i membrane, oksidativnog oštećenja dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i oksidacije lipidnih membrana (Hong et al, 2009; Joshi et al, 2011; Korachi, 2011). Takođe, plazma tretmani bombardovanjem uništavaju spore bakterija (Moreau et al, 2008).

NTAP moguće je dekontaminisati gljivice kao i njihove spore (Akishev et al, 2008a). Virusi tj. njihova količina se smanjuje nakon 20 s trajanja NTAP tretmana u studiji Yasuda i saradnika (Yasuda et al, 2010). Oni su koristili bakteriofag lambda ( $\lambda$  fag) koji inficira *Escherichia coli*. Autori smatraju da je za nastanak molekularnog oštećenja bakteriofaga odgovoran proces denaturacije i hemijske modifikacije proteina i DNK. Do degradacije DNK došlo je nakon 30 s trajanja plazma tretmana, najverovatnije zbog pojačane kiselosti sredine. Zaključili su da usled dejstva NTAP dolazi do inaktivacije bakteriofaga kao posledica oštećenja proteina i kasnijeg oštećenja DNK (Yasuda et al, 2010). U studiji Alshraiedeh i saradnika (Alshraiedeh et al, 2013) zabeleženo je smanjenje titra virusa bez omotača tokom kratkih tretmana (1-9 min) NTAP. Tokom procesa sterilizacije korišćen je izvor NTAP koji je kao radni gas imao kombinaciju He i  $O_2$  (99-100% He i 0-1%  $O_2$ ). Uočili su da zastupljenost kiseonika u smeši gasa direktno utiče na efekat inaktivacije virusa (Alshraiedeh et al, 2013).

Studija Deng i saradnika (Deng et al, 2007) pokazala je da nakon tretmana NTAP dolazi do delimičnog uklanjanja depozita seruma albuminskog proteina goveđeg porekla sa površina koje su izgrađene od nerđajućeg čelika. Prisustvo proteinskih rezidua može biti izvor unakrsne dekontaminacije (Brown et al, 2000). Međutim, pokazali su da su i pored nepotpunog uklanjanja, preostali proteini podložniji degradaciji nakon tretmana plazmom (Deng et al, 2007).

## **2.2. Primena NTAP u terapiji promena na koži i regeneraciji kože**

Fototerapija, primena lasera, kao i elektrohirurgija uspešno se koriste u terapiji hroničnih dermatoloških oboljenja. Primenom ovih metoda poboljšava se zdravstveno stanje pacijenta. Na osnovu poznatog antimikrobnog efekta razvila se mogućnost primene NTAP u terapiji

različitih dermatoloških oboljenja, hroničnih rana kao i u regenerativnoj terapiji (von Woedtke et al, 2013). Većina dermatoloških oboljenja je praćena prisutvom gljivičnih, bakterijskih infekcija, pa stoga tretman NTAP može biti od pomoći u cilju redukcije mikroorganizama, a dodatna istraživanja su neophodna za primenu u cilju lećenja osnovnih oboljenja (Kong et al, 2009).

*In vivo* ispitivanja efekata NTAP na animalnim modelima (Dobrynin et al, 2011; Wu et al, 2012) kao i na tkivima kadavera (Fridman G et al, 2007b) pokazala su da plazma ne deluje toksično i destruktivno na ispitivanim tkivima. Ova ispitivanja su imala za cilj da procene uslove za potencijalnu primenu NTAP u kliničkim uslovima (von Woedtke et al, 2014).

Efekat primene NTAP na zdravoj i izmenjenoj koži ogleda se u bakterijskoj dekontaminaciji. Primena NTAP na atopičnoj ekcematičnoj koži odraslih pacijenata dovela je do smanjenja svraba i pojave crvenila (Emmert et al, 2013). NTAP koja se još i naziva tkivno-tolerantna plazma (TTP) pokazala se efikasnom u tretmanu površine kože kod različitih promena (Kramer et al, 2013).

U procesu zarastanja rana, veoma značajnu ulogu ima azot-oksidi (NO). Primena NTAP koja sadrži Ar kao radni gas, omogućava formiranje NO<sup>•</sup>. Azot (N<sub>2</sub>) dolazi iz slobodnog atmosferskog vazduha i zajedno sa kiseonikom (O<sub>2</sub>) predstavlja prekursor za stvaranje NO<sup>•</sup> (Weltmann, 2017). Prisustvo bakterijskog biofilma u predelu rane, ukazuje na pojavu zapaljenja. Jedna od najčešćih bakterija koja perzistira u predelima hroničnih rana jeste *Staphylococcus aureus*. U 20-50% slučajeva meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) pronađen je u hroničnim ranama (Werdin et al, 2009). Perzistiranje hroničnih rana dovodi do slabljenja funkcionalne sposobnosti što vodi ka lošem kvalitetu života. Nesanirane hronične rane predstavljaju medicinski, ali i psihološki problem kod pacijenta. Konvencionalni tretmani obrade i terapije ovih rana su dugoročni i u pojedinim zemljama skupi. Tokom tretmana hroničnih rana neophodno je istu očistiti, eliminisati bakterije i nekrotično tkivo. Primena NTAP pokazala se efikasnom u procesu eliminacije bakterija (Brehmer et al, 2015; Isbary et al, 2012) i poboljšanju procesa zarastanja rana (Heinlin et al, 2013; Isbary et al, 2013a), što ukazuje na to da NTAP može potencijalno zameniti antiseptični tretman hroničnih rana (Kramer et al, 2013).

Regeneracija kože primenom NTAP predstavlja inovativnu metodu regeneracije i zasniva se na kontaktu kože i električnog pražnjenja iz plazme. Primena NTAP koja se generiše u azotu, dovodi do blagog oštećenja tkiva koje je minimalno i kontrolisano. Takođe, primenom ovakvog oblika NTAP uočeni su pozitivni efekti na proces regeneracije kože (Bogle et al,

2007). Plazma tretman promoviše znatno brži proces zarastanja i povećanja aktivnosti fibroblasta (Foster et al, 2008).

NTAP našla je svoje mesto u kozmetici u cilju restrukturisanja tkiva i podmlađivanju kože (Bogle et al, 2007). Tokom plazma tretmana, epidermis ostaje netaknut ali isušen i predstavlja prirodnu barijeru. Isušen sloj epidermisa nakon par dana bleđi ostavljajući za sobom novoformirani epidermis. Brži prodor toplote u tkivo kože sa minimalnim termičkim oštećenjima je prisutan tokom plazma tretmana. Unutar tkiva kože usled povećane aktivnosti fibroblasta dejstvom NTAP dolazi do tkivne modifikacije (Foster et al, 2008).

Potter i saradnici (Potter et al, 2007) su koristili izvor NTAP u *in vivo* uslovima u cilju podmlađivanja kože. Azotnom NTAP tretirali su područja finih bora i akni kod jedanaest pacijenata. Tretirana područja su praćena nakon 10 dana, 3 meseca, 6 meseci i dve godine od tretmana NTAP. Uočeno je smanjenje bora za oko 24% i poboljšanje ožiljaka od akni za 23% nakon 6 meseci (Potter et al, 2007). Smanjenje bora za 37% nakon 3 meseca od tretmana NTAP i poboljšanje ukupnog izgleda lica zabeleženo je u studiji Bogle i saradnika (Bogle et al, 2007). Postoperativna pojava eritema je zabeležena u obe studije, ali nije uočena pojava hiper- i hipopigmentacija (Bogle et al, 2007; Potter et al, 2007).

Kao kontraindikacije za primenu NTAP na koži su stanja gde je prisutna predispozicija za razvoj keloida, upotreba lekova na bazi izotretinoina u poslednjih šest meseci (terapija teških oblika akni), prisustvo tamnih pigmentacija i defekata, tamniji tipovi kože i prisustvo infekcija. Takođe, trudnoća i dojenje predstavljaju kontraindikacije (Waltham, 2006). Tokom sprovođenja tretmana NTAP neophodna je zaštita pacijenata i lekara u vidu zaštitnih naočara. Neophodna je obuka izvođača i pripremljenost u slučaju izbijanja požara, kao i prisustvo aparata za gašenje požara (Foster et al, 2008).

Primena NTAP u oblasti podmlađivanja i regeneraciji kože predstavlja tretman koji i posle dužeg vremenskog perioda daje pozitivne rezultate. Dalja istraživanja su neophodna radi utvrđivanja efekata ponavljajućih doziranih režima (Potter et al, 2007).

### **2.3. Primena NTAP na ćelije tumora**

Lečenje tumora podrazumeva sprovođenje tri terapijska modula: hirurški, zračni i hemoterapijski. Sprovođenjem ovih metoda mogu se postići zadovoljavajući rezultati, ali svakako da svaka od ovih metoda može imati neželjene efekte po pacijenta i može uticati na psihološko stanje i kvalitet života.

U literaturi postoje podaci koju ukazuju da brojne reaktivne oksidativne čestice (ROS) i reaktivne azotne čestice (RNS) stvorene od strane NTAP dovode do oštećenja DNK i apoptoze u *in vitro* uslovima kod tumorskih ćelija kože (Fridman G et al, 2007a), jajnika (Utsumi et al, 2013), glave i vrata (Guerrero-Preston et al, 2014). Takođe, zabeleženo je da tumorske ćelije mogu stvarati više reaktivnih čestica nego normalne zdrave ćelije zbog svoje povećane metaboličke aktivnosti. Tumorske ćelije su više osetljivije na reagense koji dovode do pojave reaktivnih čestica, kao što su npr. hemoterapijski lekovi (Utsumi et al, 2014). Izlaganje tumorskih ćelija medijumu koji je prethodno aktiviran dejstvom NTAP, može imati antitumorski efekat upravo zbog prisustva reaktivnih čestica. Ovakav način tretiranja tumorskih ćelija pokazao se kao bolji od dejstva direktnih tretmana NTAP (Ryu et al, 2013) koji dovode do oštećenja ne samo tumorskih već i zdravih ćelija. Torri i saradnici (Torii et al, 2015) su pokazali da medijum aktiviran primenom NTAP ispoljava citotoksičan efekat na ćelije tumora u *in vivo* uslovima i dovodi do apoptoze usled inkorporiranja reaktivnih oksidativnih čestica u same ćelije tumora.

Kao deo palijativnog načina lečenja tumora glave i vrata spominje se tretman NTAP (Metelmann et al, 2015; Schuster et al, 2016). Metelmann i saradnici (Metelmann et al, 2018) su pokazali da plazma tretman u predelu skvamoznog tumora dovodi do uklanjanja detritusa i mikroorganizama i doprinosi zarastanju tkiva. Uočili su smanjenje ulcerisane površine za jednu četvrtinu njene originalne površine (Metelmann et al, 2018). Ovakav vid tretmana NTAP može poboljšati kvalitet života pacijenta i stvoriti pogodnu sredinu za dalje lečenje.

Schuster i saradnici (Schuster et al, 2016) analizirali su efekat NTAP na tumorske ćelije glave i vrata kod pacijenata sa ciljem utvrđivanja potencijalne kliničke primene plazma tretmana. Tumorom zahvaćeni region glave i vrata tretiran je NTAP neposredno pre hirurške intervencije u trajanju od 3 min. Zabeležili su češću pojavu apoptopičnog ubijanja ćelija u delu koji je tretiran NTAP (Schuster et al, 2016).

#### **2.4. Primena NTAP u cilju koagulacije krvi**

Kontrola krvarenja i efikasna hemostaza tokom hirurške intervencije značajno utiču na uspeh same hirurške intervencije. Elektrokauterizacija predstavlja modernu tehniku tokom koje dolazi do zaustavljanja krvarenja. Karakteriše se primenom jednosmerne struje koja generiše toplotu na površini tkiva (Lord et al, 1991). Zagrejane elektrode dolaze u kontakt sa ranom i dovode do pojave pirolize (razlaganja) i isparavanja. Međutim, često prilikom kontakta tkiva i

zagrejanih elektroda dolazi do lepljenja ugljenisanog tkiva za metal elektode i ponovne pojave krvarenja prilikom odvajanja metalne elektrode (Fridman G et al, 2008).

Primena NTAP utiče pozitivno na proces koagulacije krvi bez termalnih efekata na okolna tkiva. Fridman i saradnici (Fridman G et al, 2007b) pokazali su da se tokom NTAP tretmana stvara prirodan proces koagulacije krvi. Uočili su da nakon 15 s trajanja tretmana, krv koaguliše za 1 min. Takođe, uočili su da se nakon plazma tretmana za oko 15 s inicira proces formiranja trombina. Primena NTAP dovela je do porasta u koncentraciji  $Ca^{++}$  putem oksidacionog/redoks mehanizma uz pomoć vodonikovih jona. Vodonikovi joni formiraju se u krvi kao posledica niza jonsko-molekularnih procesa koje indukuju plazma joni (Fridman G et al, 2007b).

U pojedinim studijama dobijeno je da NTAP aktivira prirodni proces koagulacije ali da je tom prilikom otpuštanje  $Ca^{++}$  jona i promena pH beznačajna. Kalghatgi i saradnici (Kalghatgi et al, 2007) su pokazali da tretman NTAP smanjuje vreme koagulacije krvi bez antikoagulanasa, kao i citrirane krvi već nakon 15 s trajanja tretmana. Iako je temperatura NTAP približna sobnoj temperaturi, deo toplote koji se stvara tokom tretmana može se preneti i na uzorak. SEM analizom morfološkog izgleda plazmom tretirane normalne krvi uočene su pseudopode (povećana aktivacija trombocita), kao i povećana agregacija trombocita. Nakon tretmana antikoagulantne krvi pored pojave pseudopoda, agregata trombocita, primetili su i formiranje fibrina. Na osnovu dobijenih podataka u svom eksperimentu, ova grupa autora došla je do zaključka da primena NTAP direktno utiče na pretvaranje fibrinogena u fibrin (Kalghatgi et al, 2007). Choi i saradnici (Choi et al, 2010) analizirali su primenu NTAP *in vitro* i *in vivo* na proces koagulacije krvi zdravih miševa. *In vitro* studija je pokazala da 20 s nakon NTAP tretmana dolazi do potpune koagulacije krvi. Takođe, uočili su da do procesa koagulacije dolazi i u situaciji kada ne postoji direktan kontakt izvora NTAP i uzorka. Zaključili su da ovako aktiviran proces koagulacije nastaje kao rezultat efekta brojnih radikala koji se stvaraju u plazmi i malih termičkih efekata. U *in vivo* studiji koristili su isti izvor NTAP i tretirali ranu na repu miša. Uočili su da je 1 min nakon tretmana NTAP došlo do zaustavljanja krvarenja i sledstvenog stvaranja krvnog ugruška (Choi et al, 2010). Ikehara i saradnici (Ikehara et al, 2013) su na animalnim modelima procenjivali uspeh hemostaze nastale primenom NTAP. Uočili su da nakon NTAP tretmana dolazi do brže koagulacije usled krvarenja iz arterijskog krvnog suda. Histološkom analizom krvnog ugruška zapazili su eozinofilne fibrozne strukture nakon plazma tretmana kao posledicu aktivnosti trombocita i eritrocita. Zaključili su da izvor NTAP koristi krv kao oblogu za povređena područja (Ikehara et al, 2013).

### **3. Eksperimentalna i klinička primena NTAP u stomatologiji**

Biološki efekti NTAP (interakcija sa različitim ćelijama, antimikrobni, regenerativni i antitumorski efekat) u stomatologiji mogu doprineti u rešavanju različitih patoloških stanja (dekontaminacija zubnih struktura, biofilma, dezinfekcija kanala korena, terapija tumora maksilofacijalne regije). Takođe, indukcija polimerizacije i beljenje zuba se može postići tretmanima NTAP.

#### **3.1. Antimikrobni efekat NTAP**

Dentalni plak (biofilm) predstavlja organsku, bakterijsku, opalescentnu meku naslagu koja se akumulira na zubima. Složena zajednica mikroorganizama smeštena u matriks glikoproteina kolonizacijom različitih vlažnih površina čini biofilm (Dimitrijević et al, 2011a). Bakterije u biofilmu proizvode ekstracelularnu polimernu supstancu koja čini najveći deo biofilma (50-95% suve težine). Ekstracelularna polimerna supstanca zadužena je za očuvanje integriteta biofilma, sprečavanje njegovog isušivanja i zaštitu od štetnih agenasa (Lindhe, 1998). Dentalni plak se akumulira na površinama zuba, protetskim radovima, ispunima, u gingivalnom sulkusu, gingivalnim i parodontalnim džepovima (Dimitrijević et al, 2011a). Eliminacija biofilma vrši se mehanički primenom ultrazvučnih instrumenata, posebnih kireta, poliranjem površine zuba, ispuna i protetskih radova.

Pored mehaničkog uklanjanja biofilma, primena antimikrobnih lekova (antibiotika) nekada može biti terapija izbora. Princip delovanja antibiotika ogleda se u pogađanju i inhibiciji esencijalnih procesa u organizmu, usporavanju rasta i smrti ćelija. U situacijama kada su bakterije izložene dejstvu medikamenata čija je doza manja od minimalne baktericidne koncentracije, one mogu mutirati i postati rezistentne (Richardson, 2017). Rezistencija bakterija na antibiotike i druge preparate zavisi od nutritivnog statusa, brzine rasta bakterija, pH, temperature kao i prethodnog izlaganja koncentracijama antimikrobnih lekova (Socransky, 2002). Mikroorganizmi koji se nalaze u zajednici kao što je dentalni plak su otporniji na konvencionalne antibiotike u odnosu na one koje žive planktonski (Gilbert et al, 1997). Kouidhi i saradnici (Kouidhi et al, 2015) ukazuju na nekoliko mehanizama rezistencije biofilma na antibiotike: (a) ograničena penetracija antimikrobnih agenasa usled prisustva ekstracelularne polimerne supstance (Corbin et al, 2011). Takođe, na stepen penetracije mogu uticati veličina molekula lekova (Thurnheer et al, 2003), antimikrobna hidrofobnost (Sandt et al, 2007), interakcija sa komponentama biofilma (Stewart, 2003), elektrostatička interakcija (Ganeshnarayan et al, 2009), apsorpcija (Otten et al, 2012), neutralizacija enzimima (Stewart et al, 2000); (b) indukcija odgovora na stres usled promene pH i dejstva hemijskih agenasa

(Lemos, 2008); (c) smanjena stopa rasta i usporen metabolizam usled ekstremnih promena pH i temperaturnih promena (Kouidhi et al, 2015); (d) povećana ekspresija pumpi rezistentnih na brojne lekove (Lubelski et al, 2007); (e) aktivacija quorum sensing sistema tj. komunikacija mikroorganizama u biofilmu i stvaranje određenih hemijskih signalnih molekula (Pumbwe et al, 2008); (f) promena profila proteina spoljašnje membrane i smanjenje propustljivosti ćelija za prodor antibiotika (Kouidhi et al, 2015).

U našoj zemlji mogućnost primene NTAP, stvorene modifikovanom plazma iglom kao izvorom, za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju ispitivana je od strane Miletić i saradnika (Miletić M, 2013). Sprovedena je opsežna studija u kojoj je izvršena evaluacija antimikrobnog potencijala NTAP na različite Gram pozitivne i Gram negativne bakterije u suspenzijama i bakterijski biofilm. Pokazano je da NTAP deluje snažno antimikrobno na bakterije u suspenziji kao i da efikasnost raste sa povećavanjem snage i vremena izlaganja. Ispitivani Gram-negativni mikroorganizmi (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) su pokazali veću osetljivost na dejstvo NTAP u odnosu na Gram pozitivne mikroorganizme (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) (Miletić M, 2013; Puač et al, 2015). Analizom efekta NTAP na biofilm *Streptococcus mutans* i MRSA utvrđeno je da tretman utiče inhibitorno na formiranje biofilma ali nije postignuta eradikacija već formiranog. Pored definisanja uslova plazma tretmana pod kojim se ostvaruju željeni efekti, za buduću primenu NTAP *in vivo* od presudnog značaja je da ona ne uzrokuje oštećenje tkiva. Toksičnost plazme stvorene modifikovanom plazma iglom ispitivana je na humanim mezenhimalnim matičnim ćelijama izolovanim iz periferne krvi i pokazano je da pod uslovima pod kojim ostvaruje snažan baktericidan efekat, ona ne utiče značajno na vijabilnost i adherenciju ovih ćelija (Lazović et al, 2010).

Zbog povećane rezistencije mikroorganizama dentalnog plaka na antibiotike, antimikrobni efekti NTAP bi mogli biti alternativna zamena. Dalja istraživanja su potrebna radi jasnog definisanja mehanizama baktericidnog efekta NTAP kao i optimizacija režima za primenu na mikroorganizme dentalnog plaka.

### **3.1.1. Karijes**

Karijes predstavlja oboljenje tvrdih zubnih tkiva. Zahvaćena tkiva karakterišu se promenama koje nastaju kao posledica demineralizacije i remineralizacije. Mikroorganizmi dentalnog plaka i ugljeni hidrati iz hrane fermentacijom dovode do formiranja kiselina koje rastvaraju

kristale apatita. Pojava kiselina, kao i anaerobna sredina dentalnog plaka dovodi do pada pH. Koncentracija kiselina je tada dovoljna da dovede do procesa demineralizacije gleđi.

Primena NTAP može biti efikasna u eliminaciji mikroorganizama koji su glavni uzročnici karijesa. U radu Sladek i saradnika (Sladek et al, 2007) analiziran je antimikrobni efekat NTAP na kariogeni mikroorganizam *Streptococcus mutans* i upoređivan efekat NTAP (plazma igle) sa dejstvom 0,2% rastvora hlorheksidina (CHX). Nakon NTAP tretmana uočena je inhibicija rasta *Streptococcus mutans*. Zaključili su da odgovor biofilma na NTAP tretman zavisi od načina primene tretmana i prisustva saharoze. Uočili su da je kod ponavljajućeg plazma tretmana efekat bio slabiji, jer je period od 24 h do drugog ponavljanja isuviše dug i dovoljan da se bakterije koje su preživele oporave. Na podlogama sa saharozom ponovni rast mikroorganizama je bio brži. Tretman 0,2% rastvorom CHX doveo je do potpune inhibicije rasta *Streptococcus mutans* (Sladek et al, 2007).

Tretman NTAP u prisustvu vode može imati baktericidni efekat na streptokokni biofilm koji je lokalizovan na površini zuba jer voda u kombinaciji sa NTAP tretmanom dovodi do stvaranja OH<sup>-</sup> radikala i složenijeg hemijskog sistema (Kovalová et al, 2014). Hemijske reakcije koje se dešavaju tokom NTAP tretmana sa prisustvom vode baziraju se na kiselinsko-baznim reakcijama, reakcijama oksidacije, redukcionim reakcijama i fotohemijskim reakcijama indukovanih od strane UV zračenja iz plazme (Lukes et al, 2012).

Pored streptokoka u karijesno promenjenom dentinu moguća je pojava drugih sojeva mikroorganizama. Studija Yang i saradnika (Yang et al, 2011) pokazala je da se za manje od 90 s trajanja tretmana redukuje soj *Lactobacillus acidophilus*. Rupf i saradnici (Rupf et al, 2010) su pokazali da tretman NTAP u trajanju od 6 s dovodi do inaktivacije *Lactobacillus casei* i *Candida albicans*. Takođe su pokazali da je inaktivacija *Streptococcus mutans* postignuta dužim trajanjem plazma tretmana (12 i 18 s). U istraživanju su ispitivali antimikrobni efekat NTAP na agarnim podlogama i dentinskim diskovima i pokazali su da je efekat NTAP bio slabiji na dentinskim diskovima. Kao objašnjenje za ovakvu pojavu, naveli su mogućnost penetracije mikroorganizama u dentinske tubule pre tretmana plazmom tokom sušenja uzoraka. Takođe, potiskivanje mikroorganizama ka unutrašnjosti dentina usled pritiska od strane gasa može biti još jedan razlog slabijeg efekta NTAP (Rupf et al, 2010).

### **3.1.2. Gingivitis i parodontopatija**

Mikroorganizmi dentalnog plaka mogu dovesti do inflamacije gingive, a daljim napredovanjem procesa dolazi do inflamacije ostalih tkiva parodonticijuma, njihovog razaranja

i formiranja parodontalnog džepa. U terapiji inflamacije koriste se različiti medikamenti (antibiotici, antiseptična sredstva, antiinflamatorni lekovi, analgetici). Pored medikamentozne, neophodno je sprovesti i kauzalnu terapiju (mehaničko uklanjanje supragingivalnog i subgingivalnog kamenca, mekih naslaga, obrada parodontalnih džepova, poliranje površine zuba) primenom različitih instrumenata i aparata. Ukoliko je razaranje tkiva potpornog aparata obimno i uspeh nije zagarantovan sprovođenjem kauzalne faze terapije, neophodno je hirurškim putem ukloniti parodontalni džep i obezbediti uslove za stabilnu remisiju bolesti.

Mogućnost primene NTAP u parodontalnoj terapiji ispitivana je u studiji Miletić i saradnika (Miletić M, 2013). Osnov za ovakva istraživanja predstavljala je sama fizička konstrukcija plazma igle kao izvora koja omogućava lokalizovano i kontrolisano dejstvo kao i dokazi o snažnom antibakterijskom dejstvu (Lazović et al, 2010; Miletić M et al, 2013; Miletić M et al, 2014; Puač et al, 2015). Međutim za buduću kliničku primenu od presudnog značaja je da plazma deluje selektivno antimikrobno pri čemu ne oštećuje okolno zdravo tkivo. Da bi ispitala uticaj plazma tretmana na parodontalno tkivo ova grupa autora ispitivala je efekat NTAP na ćelijske funkcije humanih mezenhimalnih matičnih ćelija izolovanih iz periodoncijuma zuba. Utvrdili su da, primenjena pod uslovima pod kojim deluje antimikrobno ona ne deluje citotoksično na ove ćelije. Dodatno su pokazali da pod istim uslovima plazma povećava aktivnost ranog markera osteogene diferencijacije, zbog čega bi plazma tehnologija u budućnosti, zajedno sa multipotentnim matičnim ćelijama iz periodoncijuma, mogla da nađe primenu u regenerativnoj terapiji i tkivnom inženjeringu.

### **3.1.3. Periimplantitis**

Biofilm može dovesti do pojave zapaljenja periimplantne mukoze. Usled pojave zapaljenja dolazi do destrukcije vezivnog tkiva i patoloških promena koje dovode do odvajanja periimplantnog epitela od površine implantata. Migracija pripojnog epitela i gubitak kosti u apikalnom pravcu dovodi do pojave periimplantnog džepa koji je sličan parodontalnom džepu.

Terapija periimplantnog mukozitisa podrazumeva mehaničko uklanjanje dentalnog plaka plastičnim ručnim instrumentima i ultrazvučnim instrumentima sa posebno dizajniranim plastičnim radnim nastavcima. Neophodna je i obuka i motivacija pacijenata u održavanju oralne higijene, kao i upotreba preparata za hemijsku kontrolu plaka (0,12% rastvor CHX).

Pojava periimplantnog džepa i gubitak kosti oko implantata zahteva primenu hirurških metoda. Hirurška terapija ima za cilj eliminaciju patološki promenjenog periimplantnog tkiva, periimplantnih džepova, defekata i deformiteta u kosti (Dimitrijević et al, 2011b).

Tretman NTAP svojim antimikrobnim dejstvom može inaktivisati mikroorganizme koji mogu biti uzročnici periimplantitisa. Studija Koban i saradnika (Koban, 2011) analizirala je efekte tri različita izvora NTAP na soj *Streptococcus mutans* na titanijumskim pločicama *in vitro* i na uzorcima nestimulisane salive *in vivo*. Kod plazma mlaza koristili su čist Ar i smešu gasova (99% Ar+1% O<sub>2</sub>). Rastojanje vrha plazma mlaza od površine uzorka bilo je 7 mm, a vreme trajanja tretmana 1, 2, 5 i 10 min. Primenom plazma mlaza uočena je redukcija rasta mikroorganizama nakon 1 min trajanja tretmana. Smeša gasova je takođe uticala na efekat redukcije biofilma. Na biofilmu salive tretmani plazma mlazom u trajanju od 1 i 2 min ispoljili su snažne antimikrobne efekte u poređenju sa dejstvom kontrolnog rastvora CHX (Koban, 2011). Rupf i saradnici (Rupf et al, 2011) su koristili izvor NTAP (plazma mlaz) sa vodeno-vazдушnim sprejom u procesu dezinfekcije i uklanjanja *in situ* biofilma sa titanijumskih struktura. Nakon svih plazma tretmana zabeležena je inaktivacija i eliminacija ranog i zrelog biofilma sa titanijumskih površina bez mikrostrukturnih oštećenja površine. Završni tretman izvorom NTAP nakon ispiranja uzoraka uklanja mikroorganizme i ostatke biofilma iz mikrostruktura titanijumskih površina (Rupf et al, 2011).

#### **3.1.4. Infekcija endodoncijuma**

Infekcije u kanalu korena zuba uzrokovane su mikroorganizmima. Endodontski tretman podrazumeva eliminaciju mikroorganizama iz kanala korena zuba, kao i opturaciju kanala korena kako bi se sprečila potencijalna reinfekcija. Konvencionalnim tehnikama kojima se sprovodi endodontski tretman nije moguće u potpunosti uništiti sve mikroorganizme.

Podaci iz literature pokazuju mogućnost inaktivacije *Enterococcus faecalis* upotrebom različitih izvora NTAP (Du et al, 2013; Lu et al, 2009; Ureyen et al, 2014; Wang et al, 2011).

Lu i saradnici (Lu et al, 2009) su koristili izvor NTAP koji je generisan u samom kanalu korena zuba. Kao radni gas korišćen je 100% He, 100% Ar, kao i smeše 80% He+20% O<sub>2</sub> i 80% Ar+20% O<sub>2</sub>. Uzorci su tretirani 4 min, a nakon tretmana vršena je inkubacija 24 h na 37 °C. Zaključili su da tretman NTAP dovodi do eliminacije *Enterococcus faecalis* za nekoliko minuta. Wang i saradnici (Wang et al, 2011) koristili su NTAP (plazma mlaz) sa kombinacijom radnog gasa 98% He i 2% O<sub>2</sub> i udaljenosti vrha NTAP od površine uzorka 5 mm. Nakon instrumentacije u svaki kanal je injektiran *Enterococcus faecalis*. Analizirali su

antimikrobni efekat NTAP u kanalu korena nakon injektiranja mikroorganizma, a zatim i učestalost reinfekcije nakon primene NTAP i različitih medikamenata (formokrezol, kamforfenol, kalcijum-hidroksid). Sa povećanjem dužine trajanja svih tretmana došlo je do efikasnije dezinfekcije kanala korena (98,8% inaktivacije *Enterococcus faecalis* nakon 8 min). Što se reinfekcije tiče, ista nije zabeležena nakon 40 minutnog plazma tretmana i nakon medikacije formokrezolom. SEM analizom pokazano je da nakon 30 minutnog trajanja tretmana bakterije nisu bile prisutne u kanalu korena. Zaključili su da NTAP tretman može biti brzo i efikasno rešenje za endodontski tretman kanala korena zuba.

Efekat NTAP u kombinaciji sa 2% rastvorom CHX na sposobnost inaktivacije *Enterococcus faecalis* i ostalih mikroorganizama iz biofilma kanala korena analizirali su Du i saradnici (Du et al, 2013). Rastvor CHX je sproveden kroz cev kroz koju protiče gas NTAP i time je omogućen zajednički tretman izvora NTAP i CHX. Kao radni gas korišćena je smeša helijuma i kiseonika, a tretmani su trajali 2 i 5 min. Korišćeni su zubi govedeg porekla tako da je polovina uzoraka inficirana sojem *Enterococcus faecalis*, a druga polovina ostalim mikroorganizmima biofilma. Kod eksperimentalnih tretmana (NTAP; NTAP i 2% CHX; NTAP (He+O<sub>2</sub>) i 2% CHX) učestalost ćelijske smrti mikroorganizama bila je 40-80%, dok je kod kontrolnih tretmana (2% CHX odnosno 0,85% fiziološki rastvor) iznosila svega 10-13%. Duži tretman značajno je više redukovao broj mikroorganizama biofilma kod eksperimentalnih grupa. Najefikasnije se pokazao tretman NTAP u kombinaciji sa 2% CHX tokom obe dužine trajanja tretmana. Zaključili su da kombinovana upotreba različitih irigacionih rastvora i/ili NTAP, lasera, ultrazvučnih nastavaka može poboljšati antimikrobni efekat (Du et al, 2013).

Efikasnost antimikrobnog dejstva NTAP po trećinama kanala korena analiziran je od strane Ureyen i saradnici (Ureyen et al, 2014). Pokazali su da je efekat NTAP u trajanju od 5 min bio najefikasniji u koronarnoj u odnosu na srednju i apikalnu trećinu. Razlog za ovakvu pojavu može se objasniti pretpostavkom da je NTAP najefikasnija 5-6 mm ispod plazma igle (Kim et al, 2010).

## **3.2. Interakcija NTAP sa materijalima na bazi smola**

### **3.2.1. Polimerizacija materijala na bazi smola**

Materijali na bazi smola (smolom-modifikovani glas jonomer cementi, dentalni adhezivi, kompomeri, kompoziti) vezuju se procesom polimerizacije koji je po tipu hemijske reakcije slobodna radikalska adicija. Proces polimerizacije dešava se kao posledica ekscitacije

inicijatorskog sistema i stvaranja slobodnih radikala koji zatim reaguju sa molekulima monomera (monomerni radikal) i njihovog pretvaranja u polimere (polimerni radikal). Na kraju procesa polimerizacije dolazi do terminacije polimernih lanaca, odnosno stvaranja nereaktivnih molekula koji se ne mogu dalje polimerizovati (Stamenković et al, 2009b).

Za adekvatnu polimerizaciju neophodno je da se emisijski spektar svetlosnog izvora (lampe) poklapa sa apsorpcionim spektrom fotoinicijatora u materijalu. Postoje dva tipa fotoinicijatora: tip I i tip II. Tipu I pripadaju alternativni fotoinicijatori (2,4,6 trimetilbenzoin difenilfosfin oksid - Lucirin TPO). Najčešće korišćen fotoinicijator je kamforhinon (CQ) koji pripada fotoinicijatorima tipa II. Ovaj fotoinicijator koristi i energiju za formiranje sekundarnog elektron transfera (koinicijatora), koji preuzima ulogu slobodnog radikala. Kod fotoinicijatora tip I nije potrebna dodatna energija za koinicijatore, jer se oni raspadaju na jedan ili više slobodnih radikala pri dobijanju dovoljne energije na tačno određenoj talasnoj dužini (Price, 2017). Apsorpcioni spektar CQ iznosi oko 450-500 nm sa maksimumom apsorpcije na 468 nm (Stansbury, 2000). Kod Lucirin TPO apsorpcioni spektar je pomeren ka UV delu spektra (350-425 nm) sa maksimumom apsorpcije na 380 nm (Miletic V et al, 2013; Miletic, 2012; Santini, 2010).

U laboratorijskim uslovima moguća je primena NTAP za polimerizaciju smola. U radu Chen i saradnika (Chen et al, 2012) ispitivan je uticaj NTAP na indukciju procesa polimerizacije modela adheziva (samonagrizajući adhezivi). Kao izvor NTAP korišćena je plazma četkica sa Ar kao radnim gasom. Na staklenim pločicama koje su prethodno tretirane NTAP u trajanju od 60 s, nanet je model adheziva bez fotoinicijatora. Smeša adheziva i vode postavljena je na staklenu pločicu u tankom sloju a zatim je tanak sloj adheziva tretiran NTAP u trajanju od 40 s. Model adheziva sa fotoinicijatorima polimerizovan je konvencionalnom LED lampom u trajanju od 40 s. Na osnovu visokih vrednosti stepena konverzije i analize infracrvene spektroskopije uočili su da plazma tretman indukuje polimerizaciju samonagrizajućih adheziva (Chen et al, 2012). Do inicijacije reakcije polimerizacije tokom tretmana NTAP dovodi direktan prenos energije od sudara pobuđenih čestica sa monomerima. Ovaj transfer energije dovodi do raskidanja vinil dvostrukih veza i nastajanja radikala koji reaguju sa nereagovanim monomerima i drugim radikalima (Epaillard et al, 1989).

Poznato je da prisutvo vode može negativno uticati na stepen konverzije, tako što porast sadržaja vode za npr. 10% smanjuje stepen konverzije za 14% kod svetlosnopolimerizujućih adheziva koji koriste najčešći fotoinicijatorski sistem kamforhinon-tercijarni amin (Wang et al, 2006). S druge strane, Chen i saradnici (Chen et al. 2012) su utvrdili da kod plazmom

indukovane polimerizacije stepen konverzije ne zavisi od sadržaja vode, već da prisutvo vode može povećati konverziju. Tokom plazma tretmana dolazi do uklanjanja vode protokom gasa, tako da se ovakvim načinom indukcije polimerizacije može ukloniti negativan uticaj vode. Takođe, uočeno je da nakon plazma tretmana može doći do reakcije slobodnih radikala iz adhezivnog sloja sa  $O_2$  i  $H_2O$  iz ambijentalne sredine i formiranja novih kiseoničnih grupa i vodoničnih veza. Prisustvo novih funkcionalnih grupa čini površinu aktivnijom i može poboljšati vezu sa kompozitom (Chen et al, 2012).

### **3.2.2. Plazma izvori za svetlosnu polimerizaciju**

Plazma lampe su ranije korišćene za svetlosnu polimerizaciju materijala na bazi smola. Sastojale su se od dve tungsten elektrode u komori u kojoj se nalazi gas Ar pod visokim pritiskom. Na komori se nalazi sintetski prozor tamno-plave boje kroz koji se emituje svetlost (Rueggeberg, 1999). Izlazna snaga prilikom korišćenja plazma lampe bila je oko  $2000 \text{ mW/cm}^2$  (Rueggeberg, 2011).

Osnovne prednosti plazma lampi su visoka izlazna snaga, talasna dužina od oko 470 nm (Munksgaard et al, 2000) i kraće vreme polimerizacije od LED lampi što omogućava komfor pacijentu i stomatologu i skraćuje klinički rad (Munksgaard et al, 2000). Price navodi da je dovoljno oko 3 do 5 s za polimerizaciju kompozita debljine 2 mm (Price, 2017).

U literaturi postoje podaci da polimerizacija tadašnjim plazma lampama nije bila zadovoljavajuća u dubljim delovima materijala, da je prisutan manji stepen konverzije, otpornost materijala na savitljivost materijala manja, a količina izluženih monomera znatna u odnosu na druge komercijalno dostupne lampe za svetlosnu polimerizaciju (Deb, 2003; Munksgaard et al, 2000; Peutzfeldt et al, 2000).

Zbog robusnosti celokupnog sistema i nemogućnosti premeštanja, buke tokom primene, visoke cene, plazma lampe nisu našle svoje mesto u kliničkoj praksi (Price, 2017; Santini, 2010). Iako se ranije plazma lampe nisu pokazale konkurentnim u odnosu na LED lampe za svetlosnu polimerizaciju materijala na bazi smola, plazma izvor u unapređenoj tehnologiji ima potencijalnu primenu i u ovom segmentu restaurativne stomatologije.

### **3.3. Primena NTAP u postupku beljenja zuba**

Beljenje zuba predstavlja postupak tokom kojeg se želi ukloniti prebojenost na zubima. Najčešće se za ovaj postupak koriste aktivni agensi, vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) i karbamid-peroksid ( $Ch_6N_2O_3$ ). U zavisnosti od tehnika beljenja i indikacije navedeni agensi se koriste u

različitim koncentracijama. Veće koncentracije se koriste za ambulantno beljenje, dok se niže koncentracije koriste za kućnu tehniku beljenja. Aktivacija navedenih agenasa može biti hemijska, toplotna ili svetlosna. U svetlosne izvore za aktivaciju agenasa za beljenje zuba ubrajaju se i plazma izvori. Tokom primene NTAP u procesu beljenja zuba glavni cilj je oslobađanje  $\cdot\text{OH}$  radikala i uklanjanje površinskih proteina (Lee et al, 2009).

Brojne studije su pokazale da kombinacija sredstava za beljenje zuba (vodonik-peroksid/karbamid-peroksid) i NTAP dovodi do promene boje zuba (Claiborne et al, 2014; Lee et al, 2010; Nam et al, 2013). Clairborne i saradnici su koristili vodonik-peroksid u koncentraciji od 36% i tretirali su površinu zuba zajedno sa izvorom NTAP tokom 10, 15 i 20 min (Claiborne et al, 2014). Lee i saradnici (Lee, 2010) su koristili 20% vodonik-peroksid i izvor NTAP za beljenje humanih zuba *in vitro*. Zubi su podeljeni na polovine i jedna polovina je potopljena u kafu, a druga u crveno vino tokom 7 dana. Nakon toga vršeno je beljenje uzoraka, tako da je površina zuba bila izlagana izvoru NTAP i premazivana sa 20  $\mu\text{l}$  rastvora vodonik-peroksida na svakih 30 s tokom 20 min (Lee, 2010). Nam i saradnici (Nam et al, 2013) su u *in vitro* uslovima premazivali bukalne površine krunice zuba sa 15% gela karbamid-peroksida sa dodatkom 4,5% vodonik-peroksida, a zatim izlagane izvoru NTAP u trajanju od 20 min.

Studija Nam i saradnika (Nam et al, 2017) bavila se analizom strukturnih defekata i mineralnog sadržaja gleđi i dentina nakon primene NTAP za beljenje zuba. Primena NTAP u kombinaciji sa 15% vodonik- i karbamid-peroksidom tokom 30 min nije značajno uticala na promenu mikrotvrdoće zubnih tkiva. Zastupljenost minerala (maseni odnos) Ca, P, Na, Cl, Mg, Zn bila je slična kod svih uzoraka. Zaključili su da je kombinovani tretman beljenja zuba (NTAP i vodonik-peroksid ili karbamid-peroksid) bezbedan i da ne utiče na promenu morfologije i hemijskog sastava gleđi i dentina. U drugoj studiji ista grupa autora je pratila temperaturu površine zuba tokom plazma tretmana i utvrdili su da temperatura nije prelazila 37 °C, što ukazuje da tretman NTAP tokom beljenja zuba ne dovodi to termičkih oštećenja zubnih tkiva (Nam et al, 2013).

### **3.4. Modifikacija površine materijala i zubnih tkiva primenom NTAP**

U medicini i stomatologiji biomaterijali (prirodni ili sintetski) se koriste kako bi se poboljšala ili zamenila funkcija tkiva ili organa bez izazivanja neželjenih reakcija (Zhang, 2018). Ponekad i pored stalnog usavršavanja materijala u smislu njihove biokompatibilnosti, pojedini materijali unutar organizma mogu dovesti do pojave neželjenih efekata i do neuspeha implementacije (implantati) (Franz et al, 2011). Promena površinskog sastava materijala može

doprineti poboljšanju osobina materijala i sledstvenog uspeha terapije. Primenom NTAP može se postići promena hemijskog sastava i osobina tretirane površine (biokompatibilnost, hrapavost, kvašenje, površinska energija, adhezija, hemijska inertnost) (Chu et al, 2002). Modifikacija površine polimera dejstvom NTAP odvija se zahvaljujući interakciji elektrona, jona i slobodnih radikala kroz mehanizame kao što su čišćenje „surface cleaning“, nagrizanje „surface etching“, funkcionalizacija površine „surface functionalization“, umrežavanje čestica površine „surface crosslinking“ i hemijska depozicija. Efikasnost modifikacije površine primenom NTAP zavisi od različitih energija plazma čestica (Schmidt, 2005; Wolf, 2002). Dubina dejstva navedenih mehanizama je različita, pa tako tokom nagrizanja dubina dejstva iznosi oko 10-100 nm, dok je kod funkcionalizacije površine dubina ograničena na 1 nm. Promene koje se dešavaju ograničene su na površinski sloj i tek nekoliko molekularnih slojeva dublje, što ukazuje na to da tretman NTAP ne menja unutrašnjost materijala. Dejstvo ovih mehanizama nikad nije odvojeno, već je udruženo tj. jedan ili više mehanizama mogu uzrokovati pojavu ostalih (Zhu et al, 2014).

Čišćenje površine obuhvata niz faza tokom kojih se aktiviraju reaktivne čestice NTAP i dolaze u kontakt sa tretiranom površinom. Interakcijom reaktivnih čestica NTAP i površine uklanjaju se produkti u reaktivnom području plazme. Čišćenje dejstvom NTAP je suvi proces i za razliku od primene vlažnih metoda čišćenja predstavlja ekološku i ekonomičniju alternativu. Tokom odvijanja procesa čišćenja NTAP smanjenja je mogućnost rekontaminacije usled primene adekvatnog protoka gasa i redukcije ambijentalnog vazduha u najvećoj mogućoj meri (Arefi-Khonsari, 2008; Wolf, 2002).

Nagrizanje predstavlja više hemijski u odnosu na primarni fizički proces koji je zastupljen u manjoj meri. Tokom nagrizanja dolazi do reakcije između atoma tretirane površine i atoma NTAP (atomi gasa). Čestice plazme (slobodni radikali, elektroni, joni) bombarduju površinu i raskidaju kovalentne veze kod polimernih materijala. Bombardovanje površine elektronima NTAP dovodi do povećanja aktivnog umrežavanja (crosslinking activity forces) što rezultira značajnim jon bombardovanjem (inicirano od strane pozitivnih jona) i povećanim mikronagrizanjem. Kao rezultat nagrizanja i raskidanja kovalentnih veza stvaraju se niskomolekularno-maseni polimerni lanci. Skraćivanjem lanaca isparljivi oligomeri i monomeri isparavaju i uklanjaju se izduvnim gasom.

Proces nagrizanja površine NTAP sastoji se od nekoliko progresivnih faza koje se ogledaju u formiranju reaktivnih čestica usled generisanja plazme, interakcije reaktivnih čestica sa površinom, adsorpcije prispelih čestica i njihovog hemijskog vezivanja za površinu,

transitorno formiranje novih molekula, njihovo oslobađanje sa površine i uklanjanje. Bombardovanje od strane jona ima direktan uticaj na formiranje reaktivnih čestica, adsorpciju, hemijsko vezivanje čestica za površinu, formiranje novih molekula i njihovo oslobađanje (Francis, 2003d; Wolf, 2002).

Kod niskomolekularno-masениh organskih materijala prisustvo organskog debrisа predstavlja problem za ostvarivanje adekvatne adhezije. Kontaminirani slojevi mogu biti fizički i/ili hemijski vezani za površinu. Primenom kiseonične NTAP može se na efikasan način ukloniti debris preko hemijske reakcije sa kontaminiranim česticama. Kontaminirane čestice isparavaju i uklanjaju se sa površine (Wolf, 2002).

Tokom interakcije NTAP sa površinom dolazi do raskidanja polimera i formiranja slobodnih radikala. Dodatni slobodni radikali nastaju od strane UV fotona sadržanih u NTAP. Formirani slobodni radikali su termodinamički nestabilni i oni reaguju sa drugim slobodno radikalskim česticama koji potiču od površine i formiraju stabilne kovalentno vezujuće atome ili funkcionalne grupe čime se ostvaruje umrežavanje različitih čestica na površini (Arefi-Khonsari, 2008; Wolf, 2002).

Funkcionalizacija površine ogleda se u formiranju visoko reaktivnih slobodnih radikala koji dovode do aktivacije površine. Aktivacija površine visoko homogenom i aktivnom atmosferskom plazmom koja sadrži He kao osnovni gas odvija se na principu vezivanja peroksida iz atmosfere i njegovu inkorporaciju u samu površinu. Na ovaj način povećava se vlažnost tretirane površine (Arefi-Khonsari, 2008; Wolf, 2002).

Visoko reaktivne čestice NTAP dovode do formiranja polarnih funkcionalnih grupa na površini polimera. Usled prisustva polarnih kovalentnih grupa ostvaruju se jake kovalentne veze između tretirane površine i supstrata koji se nanosi. Mogućnost ostvarivanja jakih kovalentnih veza potiče od sposobnosti NTAP da dovede do restrukture površine (Fridman A, 2008d; Wolf, 2002).

Sposobnost spajanja dva različita materijala povezivanjem atoma ili molekula predstavlja adheziju. Sile adhezije deluju na graničnim površinama različitih materijala (gas-čvrsto, tečno-čvrsto, čvrsto-čvrsto). Sposobnost ostvarivanja adhezivne veze zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika adherenta (gleđi, dentina, metalnih legura, keramičkih sistema, kompozita, glas-jonomer cementa) i adhezivnog sredstva.

### 3.4.1. Kvašenje i površinska energija

Kvašenje predstavlja fenomen kojim se opisuje sposobnost penetracije dentalnih adheziva i cemenata koje nastaje kao rezultat balansiranja adhezionih i kohezionih sila. Ovaj fenomen se opisuje metodom određivanja kontaktnog ugla ( $\theta$ ). Kontaktni ugao predstavlja ugao koji u tački dodira tri sredine (gasa, tečnosti i čvrste površine) grade poluravan koja je tangenta na površinu gas/tečnost i poluravan koja je tangenta na površinu tečnost/čvrsta površina. Ovaj ugao određuju koeficijent površinskog napona površine/tečnost, koeficijent površinskog napona površine/gas i koeficijent površinskog napona tečnost/gas (Stamenković et al, 2009a). Do kvašenja površine adherenta (npr. dentina) dolazi kada je vrednost kontaktnog ugla manja od  $90^\circ$ . Ukoliko je ugao referentne tečnosti tup ( $\theta > 90^\circ$ ) kvašenje adherentne površine je minimalno. Vrednosti kontaktnog ugla  $0^\circ/180^\circ$  ukazuju da je došlo do potpunog kvašenja ili odsustva kvašenja ispitivane površine.

Tokom procesa vezivanja poznavanje površinske energije površina je od bitnog značaja za njihovu interakciju. Površinska energija sastoji se od dve komponente: nepolarne ( $\gamma^{LW}$ ) i polarne ( $\gamma^{AB}$ ). Nepolarna komponenta još se naziva i disperziona komponenta i odnosi se na Lifshitz-Van der Waals-ove sile. Ona daje informacije o hidrofobnim aspektima interakcije. Polarne komponente su odgovorne za polarnu, kiselinsko-baznu interakciju i daju informacije o hidrofilnim aspektima interakcije. Ovakvo objašnjenje površinske energije zasnovano je na teoriji o međupovršinskoj interakciji (Fowkes, 1990).

Kiselinsko-bazna (van Oss, Chaudhury, Good) teorija zasniva se na termodinamičkim karakteristikama površine tj. na međupovršinskoj tenziji između reagujuće površine i tečnosti. Van Oss i saradnici (Van Oss et al, 1988; Van Oss, 1987) navode da se polarna komponenta određuje na osnovu Lewisovog modela. Elektron akceptor (Lewis kiselinski deo  $\gamma^+$ ) i elektron donor (Lewis bazni deo  $\gamma^-$ ) predstavljaju delove polarne komponente. Polarna (elektron akceptor-elektron donor) interakcija je asimetrična (Van Oss, 1987), (Van Oss et al, 1988). Na osnovu ovih parametara možemo odlučiti koji ćemo tretman (kiseli ili bazni) primeniti kako bi ostvarili adheziju na ispitivanoj površini (Good, 1992). Merenjima kontaktnog ugla ( $\theta$ ) ispitivane površine upotrebom najmanje tri različite tečnosti moguće je dobiti podatke o vrednostima površinske energije ( $\gamma_S$ ) i njenih komponenti ( $\gamma_S^{LW}, \gamma_S^+, \gamma_S^-$ ).

### 3.4.2. Modifikacija površine implantata

Vlažnost površine implantata tj. hidrofilnost ima veliku ulogu u procesu oseintegracije, potencijalnom regulisanju adsorpcije proteina i ponašanju ćelija. Adsorpcija proteina i kasnije

ponašanje ćelija zavise od fizičko-hemijskih karakteristika površine (površinske energije i naelektrisanja) (Yoshinari et al, 2002), (Yoshinari et al, 2011). Primenom NTAP moguće je povećanje hidrofилnosti tretirane površine i modifikacija oksidativnog sloja koji interaguje sa proteinima i ćelijama okolnog tkiva. Nakon tretmana NTAP može se poboljšati adhezija ćelija i tkiva za površinu u odnosu na netretirane površine (Duske et al, 2012; Zhao et al, 2005).

Duske i saradnici (Duske et al, 2012) analizirali su efekat NTAP na hidrofилnost površine titanijumskih diskova i adherenciju osteoblastnih ćelija. Kao izvor NTAP koristili su plazma mlaz na rastojanju 5 mm od površine uzorka. Kao radni gas koristili su 100% Ar i smeše 99,8% Ar+0,2% O<sub>2</sub>; 99% Ar+1% O<sub>2</sub>. Dužina trajanja tretmana iznosila je 30, 60 i 120 s. Vrednosti kontaktnog ugla bile su značajno manje sa produženim trajanjem tretmana. Tretman sa 1% O<sub>2</sub> bio je značajno efikasniji u odnosu na 0,2% O<sub>2</sub> odnosno doveo je do značajnijeg smanjenja kontaktnog ugla. Vrednosti kontaktnog ugla bile su približne nultoj vrednosti nakon 120 s tretmana primenom 1% O<sub>2</sub> u kombinaciji sa Ar.

U literaturi postoje podaci koji ukazuju na to da hidrofилna površina poboljšava prijanjanje ćelija na implantatima (Horbett et al, 1988; Jimbo et al, 2008). Autori su zapazili fuziju ćelija u trodimenzionalne strukture na površini implantata nakon tretmana NTAP. Tretman NTAP sa malom količinom kiseonika (1% O<sub>2</sub>) može biti efikasan u modifikaciji površine i dovesti do povoljnog ćelijskog odgovora na površini titanijumskih diskova (Duske et al, 2012).

Seo i saradnici (Seo et al, 2014) analizirali su efekat NTAP na površini implantata od titanijumskih (TiO<sub>2</sub>) nanocevčica za koje se smatra da promovišu bolji biološki odgovor (adsorpciju proteina, formiranje krvnih ugrušaka, ponašanje ćelija) (Lavenus et al, 2010) i bolju oseintegraciju (Ellingsen et al, 2004). Nisu registrovali promene u morfologiji i hrapavosti pre i nakon tretmana NTAP. Primenom azota i/ili vazduha kao radnih gasova uočili su značajno smanjenje kontaktnog ugla nakon 2 i 10 min trajanja tretmana sa rastojanjem od 3 mm u odnosu na kontrolu. Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS) je pokazala povećanje količine O-H, a smanjenje C-H i C-C grupa na tretiranim površinama. Ovo smanjene ugljenika nakon NTAP tretmana dovelo je do veće ćelijske prijemčivosti, kao i preživljavanja ćelija. Na osnovu ovih nalaza zaključili su da povećanje hidrofилnosti površine implantata može doprineti osteogenom odgovoru tkiva (Seo et al, 2014).

### **3.4.3. Modifikacija površine keramičkih materijala**

Keramika predstavlja sintetski neorganski materijal sastavljen od metalnih i nemetalnih elemenata koji su povezani kovalentnim i/ili jonskim vezama. Vezivanje nadoknada izrađenih

od keramičkih materijala za dentin zbrušenog zuba ili livenu/kompozitnu nadogradnju podrazumeva pripremu tkiva ili nadogradnje (nagrizanje kiselinama) kako bi se stvorili uslovi za mikromehaničku retenciju. Pored mikromehaničke veze u procesu vezivanja veliku ulogu igra i hemijska veza između slikata u keramici i metakrilnih grupa iz adhezivnog cementa. Primena različitih metoda pripreme površina (adherenta) za vezivanje pomoću adhezivnog sredstva može doprineti dugotrajnosti nadoknade.

Valverde i saradnici (Valverde et al, 2013) analizirali su efekat NTAP na površini itrijum stabilizovane keramike i pojavu morfoloških i hemijskih promena nakon tretmana. Keramički diskovi 4 mm debljine tretirani su izvorom NTAP u trajanju od 10 s sa rastojanja od 5 mm, a kao radni gas korišćen je Ar. Nakon tretmana NTAP vrednosti kontaktnog ugla bile su manje u odnosu na netretirane uzorke i obrnuto proporcionalne vrednostima površinske energije. Analizirajući površinsku energiju, uočili su veću zastupljenosti polarne komponente u odnosu na nepolarnu nakon tretmana NTAP, kao i porast zastupljenosti O, a smanjenja C na površini keramičkih diskova.

Park i saradnici (Park et al, 2017) ispitivali su efekte NTAP na jačinu veze fabričke cirkonijum keramike i adhezivnog cementa. Svi uzorci su tretirani izvorom NTAP sa Ar radnim gasom u trajanju od 30 s, pri rastojanju od 5 mm između površine uzorka i vrha izvora NTAP. Registrovana je značajno jača veza ovako tretirane keramike sa metakriloliksidedil dihidrogen fosfatnim adhezivnim cementom.

### **3.4.4. Modifikacija površine zubnih tkiva**

#### **3.4.4.1. Dentin i veza sa savremenim adhezivnim sistemima**

Dentin je specijalizovano mineralizovano vezivno tkivo koje čini najveću masu zuba. Neorganski sastav dentina (70%) čine kristali hidroksiapatita (HaP) koji se nalaze u obliku soli kalcijuma i fosfora. Organsku komponentu (15-20%) čine kolagen tip I i nekolageni proteini (fosfoproteini, proteoglikani, kiseli glikoproteini, dentin sijaloprotein, koštani morfogenetski protein, insulinu sličan faktor rasta 1 i 2) (Cohen, 2002). Voda je prisutna u količini od 10%. Celom dužinom dentina (od pulpe do gleđi) pružaju se dentinski tubuli. Oni su ispunjeni dentinskom tečnošću i produžecima odontoblasta (Tomasova vlakna).

U restaurativnoj stomatologiji kompoziti su materijali izbora za direktne ispune kojima se nadoknađuju tvrda zubna tkiva izgubljena usled karijesa ili traume. Stomatološki kompozitni materijali predstavljaju kombinaciju organskih smola (monomera) i neorganskih čestica (punilaca) koji su obloženi silanom radi ostvarivanja hemijske veze između monomera i

punilaca. Adekvatna veza kompozita i zubnih tkiva je preduslov za dugoročni uspeh restauracije u uslovima oralne sredine. Osim samoadhezivnih kompozita, sve druge grupe ovih materijala ostvaruju vezu sa zubnim tkivima preko dentalnih adheziva.

Sa aspekata kompozitnih materijala i dentalnih adheziva dentin predstavlja podlogu sa kojom je teško ostvariti optimalnu vezu, zbog svoje kompleksne građe. Veza adheziva sa gleđi smatra se adekvatnom za dugotrajnost kompozitnih ispuna zahvaljujući formiranju mikroretentivne površine dejstvom ortofosforne kiseline (Pashley et al, 2011).

Osnovni cilj dentalnih adheziva je ostvarivanje dobre retencije između dva različita supstrata (kompozitnih materijala i mineralizovanih zubnih tkiva). Oni ostvaruju mikro-mehaničku vezu procesom hibridizacije i hemijsku vezu interakcijom pojedinih monomera i HaP iz zubnih tkiva (dentina i gleđi) (Peumans et al, 2005), (Van Landuyt et al, 2007). Uspeh adhezije zavisi od mogućnosti ostvarivanja intimnog kontakta između adheziva i zubnih tkiva. Za ostvarivanje veze adheziva sa dentinom od bitnog značaja je sposobnost penetracije adheziva u intertubularne i intratubularne prostore i interfibrilarnu mrežu eksponiranih kolagenih vlakana (Pashley, 1997). Nakon kiselinskog nagrizanja dentina, adhezivna sredstva infiltrišu nagrižen dentin i formiraju hibridni sloj (Nakabayashi et al, 1982). Sposobnost kvašenja i stepen penetracije su važni indikatori kvaliteta adhezivne veze (Erickson, 1992).

Za optimalnu adheziju je važno da adhezivna smeša kompletno infiltrira demineralizovanu ili parcijalno demineralizovanu površinu zubnih tkiva. Imajući u vidu sastav i histološku građu gleđi, adhezija sa ovim zubnim tkivom je klinički optimizovana nagrizanjem ortofosforne kiselinom. Dentin se pokazuje kao daleko kompleksniji supstrat od gleđi, zbog kompleksnije građe i većeg udela organske materije i vode.

Savremeni adhezivni sistemi se mogu klasifikovati u totalno-nagrizajuće i samonagrizajuće. Od nedavno su dostupni i univerzalni adhezivi indikovani ne samo za zubna tkiva već i za materijale za indirektno ispunje (metalne legure, cirkoniju, staklo-keramiku). Razvoj univerzalnih adheziva imao je za cilj postojanje istih ili boljih osobina u odnosu na standardne (totalno-nagrizajuće i samonagrizajuće) adhezive. Takođe, razvijeni su sa ciljem da se pojednostavi aplikacija i skрати klinički rad. Još uvek nije razjašnjeno da li bi univerzalne adhezive trebalo smatrati zasebnom grupom u klasifikaciji adheziva (Chen et al, 2015).

Prema pomenutim adhezivima aktuelna su i tri protokola aplikacije: protokol totalnog nagrizanja, samonagrizanja i selektivnog nagrizanja. Protokol totalnog nagrizanja podrazumeva primenu 32-37% ortofosforne kiseline na gleđ i dentin, čime se postiže

uklanjanje razmaznog sloja, demineralizacija površine gleđi i dentina i otvaranje dentinskih tubula (Attal et al, 1994; Pashley et al, 2011). Kod protokola samonagrivanja, kiseli monomeri parcijalno demineralizuju gleđ i dentin (Duarte Jr et al, 2006). Primenom protokola samonagrivanja ne uklanja se razmazni sloj, već se on čini propustljivim i ne uklanjaju se rastvoreni kalcijum-fosfati (Perdigao, 2010; Van Meerbeek et al, 2011). Protokol selektivnog nigrivanja kombinuje nigrivanje gleđi ortofosfornom kiselinom i aplikaciju samonagrivajućih ili univerzalnih adheziva na gleđ i dentin.

Podaci iz meta-analize Rosa i saradnika (Rosa et al, 2015) pokazuju da prethodno nigrivanje ortofosfornom kiselinom doprinosi poboljšanju veze za gleđi, ali ne i za dentin primenom blagih univerzalnih adheziva. Izuzetak je ultra blagi adheziv (All Bond Universal, Bisco, USA) koji nakon kiselinskog nigrivanja ostvaruje adekvatnu vezu sa dentinom (Rosa et al, 2015). Generalni je zaključak da primena univerzalnih adheziva po samonagrivajućem protokolu poboljšava vezu sa dentinom (Manfroi et al, 2016; Marchesi et al, 2014), . Ovim načinom aplikacije univerzalnih adheziva može se smanjiti postoperativna osetljivost, kao i mogućnost degradacije kolagena (Cardoso et al, 2011; Goracci et al, 2013; Marchesi et al, 2014; Van Meerbeek et al, 2005).

Costa i saradnici (Costa et al, 2017) analizirali su *in vitro* uslovima jačinu veze tri univerzalna adheziva (Scotchbond Universal, 3M, ESPE; All-Bond Universal, Bisco, USA i One Coat 7 Universal, Coltène, USA) primenjenih po protokolu samonagrivanja. Kod svih ispitivanih adheziva zabeleženo je u manjoj ili većoj meri slabljenje adhezivne veze nakon artefijelnog starenja. Kako ovi adhezivi sadrže 10-Metakriloiloksidecil dihidrogen fosfat (10-MDP), podložnost degradaciji može biti u vezi sa procentualnom zastupljenošću ovog funkcionalnog monomera u različitim formulacijama adheziva (Costa et al, 2017). 10-MDP reaguje sa  $Ca^{2+}$  iz HaP putem primarne jonske veze i ostvaruje kombinovanu (mikromehaničku i hemijsku) vezu sa dentinom i gleđi (Van Meerbeek et al, 2003). Pored hemijske reakcije sa HaP, 10-MDP ima sposobnost pravilnog raspoređivanja na površini zubnih tkiva, što je fenomen poznat kao "nanoslaganje" (eng. "nanolayering") (Yoshihara et al, 2010). Formirani nanosloj poseduje hidrofobne osobine koje potencijalno štite hibridni sloj od biodegradacije (Breschi et al, 2008). Sposobnost pojedinih monomera u ostvarivanja jonske veze sa zubnim tkivima predstavlja sekundarni mehanizam adhezije.

Muñoz i saradnici (Munoz et al, 2013) ispitivali su jačinu veze kod univerzalnih adheziva primenjenih po protokolima totalnog- i samonagrivanja. Ispitivani materijali bili su Peak Universal Adhesive System, Ultradent Products Inc., USA; Scotchbond Universal Adhesive,

3M ESPE, USA i All Bond Universal, Bisco, USA. Kao kontrola korišćeni su dvokomponentni totalno-nagrizajući Adper Single Bond 2, 3M ESPE, USA i dvokomponentni samonagrizajući Clearfil SE Bond, Kuraray, Japan adhezivi. Najjača veza, slična kontrolnim grupama, zabeležena je kod Peak Universal Adhesive System adheziva aplikovanog i po totalno- i po samonagrizavajućem protokolu. Vrednosti jačine veze kod ova tri adheziva su bile različite (Clearfil SE Bond>Scotchbond Universal Adhesive\_SE>All Bond Universal), što je suprotno očekivanjima. Kao razlog za ovu pojavu, autori su naveli postojanje razlika u sastavu adheziva. Naime, smatrali su da polialkenoidni kiseli polimer ometa vezivanje 10-MDP za dentin kod Scotchbond Universal Adhesive kao i da manja koncentracija 10-MDP monomera negativno utiče na jačinu veze. Razlike u načinu aplikacije adheziva po protokolu samonagrizanja prema uputstvu proizvođača takođe bi mogle uticati na jačinu veze. Naime, All Bond Universal po protokolu samonagrizanja nije bio aktivno aplikovan na dentin, što se pripisuje malim vrednostima jačine veze. Aplikacija adheziva po protokolu totalnog nagrizanja dala je bolju inicijalnu vezu u odnosu na protokol samonagrizanja, što se može pripisati dejstvu ortofosforne kiseline na razmazni sloj (Munoz et al, 2013).

Hidroksil-etil metakrilat (HEMA) favorizuje penetraciju adheziva i predstavlja glavni hidrofilni monomer u dentalnim adhezivima (Toledano et al, 2004; Van Landuyt et al, 2008; Zanchi et al, 2013). Zbog svoje male molekularne težine infiltrira organski matriks dentina (kolagen) i sprečava kolaps kolagenih vlakana (Eick et al, 1993; Nakabayashi et al, 1982; Pashley et al, 1993). HEMA može poboljšati jačinu veze sa dentinom (Hasegawa et al, 1989; Nakaoki et al, 2000).

Hemijski sastav adheziva direktno utiče na sposobnost vezivanja za tvrda zubna tkiva (Perdigao et al, 2013). Kiselost monomera koji ulaze u sastav samonagrizavajućih adheziva utiče na kiselost adheziva, koji se prema tome mogu podeliti u tri grupe: (1)  $\text{pH} > 2,5$  ultra blaga (2)  $\text{pH} \approx 2$  blaga, (3)  $1 < \text{pH} < 2$  umereno jaka i (4)  $\text{pH} \leq 1$  jaka adhezivna sredstva (Van Meerbeek et al, 2011). U zavisnosti od pH, samonagrizajući adhezivi ostvaruju različit stepen površinske demineralizacije gleđi i dentina, koja je uvek znatno slabija od efekata ortofosforne kiseline. Sledstveno je i debljina hibridnog sloja varijabilna od oko  $0,5 \mu\text{m}$  do oko  $2 \mu\text{m}$  za samonagrizajuće (Van Meerbeek et al, 2011), odnosno  $5-8 \mu\text{m}$  za totalno-nagrizajuće adhezive (Pashley et al, 2011).

Istraživanja pokazuju da kiselinsko nagrizanje dentina po pravilu nije praćeno adekvatnom penetracijom adhezivnih monomera, odnosno da se ortofosfornom kiselinom nagriza dublji

sloj dentina od sledstvene penetracije monomera (Santini, 2008). Deo kolagenih vlakana koja su eksponirana kiselinskim nagrivanjem ostaje neinkapsuliran adhezivom i podložan kasnijoj biodegradaciji usled dejstva matriksnih metaloproteinaza (MMP) (Mazzoni et al, 2012).

Marchesi i saradnici (Marchesi et al, 2014) analizirali su jačinu veze i aktivnost MMP nakon aplikacije univerzalnog adheziva (Scotchbond Universal, 3M ESPE, USA). Adheziv je aplikovan prema uputstvu proizvođača po protokolu totalnog- i samonagrivanja na vlažnom i isušenom dentinu. Inicijalno nije bilo značajne razlike u jačini veze primenom različitih tehnika, ali su razlike postojale na različitim supstratima. Najjača veza zabeležena je kod protokola totalnog nagrivanja na isušenom dentinu, a najslabija kod istog protokola na vlažnom dentinu. Vrednosti jačine veze nakon šest meseci i godinu dana bile su značajno manje u odnosu na dobijene vrednosti nakon 24 h, pri čemu je bolja tj. stabilnija veza zabeležena kod protokola samonagrivanja. Povećana aktivnost MMP-2 i MMP-9 dovedena je u vezu sa smanjenjem pH zbog prisustva kiselih monomera u adhezivu što je dovelo do aktiviranja pro formi i njihovog prelaska u aktivne forme MMP.

Faktor koji doprinosi neadekvatnoj penetraciji adheziva u hibridni sloj dentina je fazna separacija monomera u adhezivnoj smeši između hidrofobnih i hidrofilnih monomera, poput Bis-fenol-A-glicidil-dimetakrilata (BisGMA) i HEMA, naročito u slučaju zaostajanja veće količine rezidualne vode u dentinskom supstratu (Ye et al, 2012). Kiselinsko nagrivanje dentina se zato više ne preporučuje u savremenoj adhezivnoj stomatologiji kao optimalan tretman dentina.

#### **3.4.4.2. Modifikacija površine dentina primenom NTAP**

Dosadašnja istraživanja u ovom delu su usmerena na mogućnost primene NTAP radi izmene površinskih karakteristika dentina, ravnomerniju penetraciju adheziva, bolju polimerizaciju i sledstveno bolju i stabilniju vezu adheziva sa dentinom.

Ritts i saradnici (Ritts et al, 2010) su analizirali efekte NTAP na površini dentina, kao i jačinu veze perifernog/centralnog dentina sa kompozitnim materijalom. Prethodno demineralizovana površina dentina (ortofosfornom kiselinom u trajanju od 15 s) je tretirana izvorom NTAP (plazma četkica) pri snazi od 5 W i vremenu izlaganja 30, 100 i 300 s. Nakon tretmana uzorci dentina su navlaženi a 15 s kasnije, aplikovan je adheziv i kompozit prema uputstvu proizvođača. Uočili su da dužina trajanja tretmana utiče na jačinu veze perifernog dentina. Naime, kod tretmana dužih od 30 s jačina veze je opadala. Dužine trajanja tretmana (100 i 300 s) dale su vrednosti jačine veze koje su slične vrednostima kod kontrolnih uzoraka.

Zaključili su da tretman NTAP u trajanju od 30 s može poboljšati mehaničke karakteristike dentinsko-adhezivnog spoja. Poboljšanje veze tokom 30 s trajanja tretmana može se povezati sa boljim umrežavanjem kolagenih vlakana sa adhezivnim slojem. Što se unutrašnjeg dentina tiče, tretman NTAP nije poboljšao jačinu veze. Kao objašnjenje za ovu pojavu navode razlike u građi i kompoziciji dentina. Nakon kiselinskog nagrizanja delovi dentina sa većim promerom dentinskih kanalića i/ili smanjenom količinom organske komponente su dublje demineralizovani. Pojačana demineralizacija i prisustvo vode u hibridnom sloju može umanjiti efekat NTAP jer prisustvo vode može dovesti do fazne separacije adheziva (Ritts et al, 2010).

Koban i saradnici (Koban et al, 2011) su tretirali dentinske uzorke izvorom NTAP sa čistom kompozicijom gasa (Ar) i sa dodatkom O<sub>2</sub> (0,2% O<sub>2</sub>; 1% O<sub>2</sub>) kako bi poboljšali kvašenje. Dužina trajanja tretmana iznosila je 10, 30, 60 i 120 s, a izvor NTAP je bio 3 mm udaljen od površine dentinskog uzorka. Nakon tretmana NTAP meren je kontaktni ugao destilovane vode. Trajanje plazma tretmana od 120 s sa 1% O<sub>2</sub> doveo je do smanjenja vrednosti kontaktnog ugla sa 51,50° na 13,90° ukazujući na značajno povećanje hidrofilnosti površine dentina. Što se tiče atomskog sastava nakon tretmana uočili su porast zastupljenosti atoma O, Ca, P, a smanjenje C. Zaključili su da dodatak kiseonika osnovnoj smeši gasova poboljšava hemijsku reakciju za postizanje hidrofilnosti površine.

Zhang i saradnici (Zhang et al, 2014) su analizirali efekat NTAP na dubinu penetracije i efikasnost polimerizacije adheziva. Kao izvor NTAP koristili su plazma četkicu sa Ar kao radnim gasom. Rastojanje vrha plazma četke od površine dentina bilo je 5-6 mm, a tretman je trajao 30 s. Uzorci su pre NTAP tretmana bili nagrizani 35% ortofosfornom kiselinom u trajanju od 15 s. Nakon tretmana NTAP nanet je eksperimentalni model adheziva (30% BisGMA/70% HEMA) na tretiranu površinu dentina i svetlosno polimerizovan 20 s. Autori su uočili da nakon tretmana NTAP dolazi do zadržavanja veće količine adheziva na spoju dentin-adheziv nego kod netretiranih uzoraka. Kao objašnjenje za ovu pojavu naveli su bolju penetraciju monomera potpomognutu plazma tretmanom. Pokazali su i da plazma tretman može delovati pozitivno na polimerizaciju adheziva (model adheziva), posebno u predelu spoja sa dentinom.

Interakcija HEMA i kolagenih vlakana i uticaj NTAP analiziran je od strane Chen i saradnika (Chen et al, 2014). Oni su koristili plazma četkicu sa Ar kao radnim gasom pri snagama 5, 10 i 15 W. Dužina trajanja tretmana iznosila je 1, 2, 4, 6 i 8 min, a uzorci (dentinska kolagena vlakna i rastvor HEMA) su bili na 5-6 mm udaljenosti od izvora NTAP. Rastvor HEMA sa i

bez prisustva fotoinicijatora i kolagena vlakna prethodno tretirana HEMA rastvorom su tretirani plazmom. Nakon tretmana plazmom uočili su veću zastupljenost HEMA unutar kolagenih vlakana i veće umrežavanje ovog monomera i kolagenih vlakana (Chen et al, 2014).

Chen i saradnici (Chen, 2013) analizirali su efekat NTAP na površini gleđi, dentina i kompozita. Kao radni gas korišćen je Ar, plazma je generisana pri snagama 5 i 10 W, dužina trajanja tretmana iznosila je 5, 10, 30 i 45 s, a rastojanje od uzoraka 2 mm. Tretirali su dentinske, gleđne i kompozitne uzorke (Filtek Z250 i Filtek LS; 3M ESPE). Nakon tretmana plazmom u trajanju od 5 s zabeleženo je značajno smanjenje kontaktnog ugla destilovane vode na površini dentina pri snagama od 5 i 10 W, kao i na površini gleđi i kompozitnih materijala pri snazi od 5 W. Autori su zaključili da se nakon tretmana plazmom dobijaju superhidrofilne površine bez obzira na njihovu prvobitnu hidrofilnost/hidrofobnost. Uočene su i promene u atomskom sastavu tj. smanjenje procentualne zastupljenosti atoma C, N, a povećanje O, Ca i P. Smanjenje atoma C nakon plazma tretmana ukazuje na sposobnost plazme da nagriza površinu i ukloni organske komponente dentina raskidanjem ugljeničnih i ugljovodoničnih veza.

Lehmann i saradnici (Lehmann et al, 2013) koristili su gleđne i dentinske uzorke goveđeg porekla za tretman plazmom. Za tretman plazmom korišćene su dve grupe: grupa sa uzorcima koji su bili tretirani ortofosfornom kiselinom i ispirani vodom i grupa u kojoj su uzorci bili polirani. Kontrolne grupe su činili netretirani polirani i uzorci tretirani ortofosfornom kiselinom i ispirani vodom. Nakon tretmana plazma mlazom uočeno je smanjenje vrednosti kontaktnog ugla za referentne tečnosti i za gleđ i za dentin. Intenzivnije smanjenje je uočeno kod uzorka koji su nagrizeni ortofosfornom kiselinom i ispirani vodom. Nakon nagrivanja ortofosfornom kiselinom na površini gleđi je uočena ravnomerna prizmatična struktura, dok je površina dentina bila nehomogena sa eksponiranim kolagenim vlaknima koja su inhibirala proces kvašenja. Nakon tretmana plazmom uočeni su delimično razgrađeni interprizmatični regioni i nepravilno raspoređene gleđne prizme. Površina dentina nakon tretmana plazmom pokazala je zaobljena intertubularna područja, nekolagena vlakna i iregularno proširene otvore dentinskih kanalića.

Dong i saradnici (Dong et al, 2013) su koristili dentinske uzorke koji su bili sami sebi kontrola (polovina je bila tretirana plazmom, polovina je bila netretirana). Uzorci su demineralizovani ortofosfornom kiselinom u trajanju od 15 s, a zatim su bili tretirani izvorom NTAP u trajanju od 30 s. Nakon tretmana uzorci su nakvašeni vodom i restaurisani

kompozitom. Rezultati su pokazali da je inicijalna veza između dentina i adheziva bila jača nakon NTAP tretmana u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke.

Han i saradnici (Han et al, 2014) su ispitivali efekte plazma tretmana na površini dentina i jačinu veze sa kompozitom, kao i otpornost veze nakon arteficiojnog starenja. Kao izvor NTAP koristili su plazma mlaz aktiviran sinusoidnom ili pulsnom pobudom. Sinusoidnom pobudom generisan je konvencionalni kontinuirani mlaz. Pulsnom pobudom stvoren je pulsni mlaz plazme koji za određeno vreme daje pulsne kretnje. Tokom pulsnoeg režima energija je bila manja nego kod sinusoidnog režima, ali i dalje u okviru nižih vrednosti (1,1 kWh; 21,6 kWh). Kao radni gas korišćen je He, dužina trajanja tretmana iznosila je 30 s, a udaljenost površine uzoraka je bila 5 mm od vrha izvora NTAP. Pre tretmana plazmom, na dentin je aplikovana ortofosforna kiselina u trajanju od 15 s. Po završetku plazma tretmana, na uzorke su naneti prajmer i bond, a po završenoj polimerizaciji sloja adheziva od 10 s, nanet je kompozit i polimerizovan 20 s. Jača veza zapažena je nakon tretmana plazmom tokom oba režima u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu. SEM analiza je pokazala prisustvo mnogobrojnih dužih i vijugavih smolastih produžetaka sa lateralnim projekcijama nakon tretmana plazmom sa sinusoidnom pobudom.

Kim i saradnici (Kim et al, 2016) analizirali su jačinu veze adheziv-dentin nakon tretmana NTAP u kombinaciji sa tzv. "wet/dry" tehnikama nanošenja adheziva. Izvor NTAP je generisan uz pomoć He, dužina trajanja tretmana iznosila je 20 s, a rastojanje izvora plazme u odnosu na uzorke bilo je 5 mm. Uočena je značajno jača veza kod uzoraka kod kojih je nakon tretmana plazmom sprovedena "dry" tehnika aplikovanja adheziva u odnosu na "wet" tehniku.

Hirata i saradnici (Hirata et al, 2015) su koristili NTAP u cilju poboljšanja veze između samonagrizajućih adheziva i dentina. Kao radni gas za generisanje NTAP koristili su Ar, a dužina trajanja tretmana iznosila je 30 s. Za merenje kontaktnog ugla koristili su tri referentne tečnosti (dejonizovanu vodu, etilen-glikol i metilen-jodid). Nakon tretmana NTAP aplikovan je adheziv prema uputstvu proizvođača, a zatim kompozit debljine 6 mm. Na osnovu vrednosti kontaktnog ugla, bolje kvašenje je zabeleženo kod onih uzoraka koji su tretirani izvorom NTAP. Zabeleženo je i smanjenje disperzione (nepolarne) komponente, najverovatnije zbog izmene u hemijskoj kompoziciji dentina. Plazma tretman nije uticao na jačinu veze dvokomponentnog samonagrizajućeg adheziva dok je kod samonagrizajućeg univerzalnog adheziva uočena jača veza. Zanimljiv je rezultat da je kod plazma tretiranih uzoraka došlo do slabljenja veze nakon jedne godine arteficiojnog starenja što nije

zabeleženo kod kontrolnih uzoraka. Slabljenje veze nakon jedne godine kod oba primenjena adheziva može se pripisati degradaciji polimera tokom vremena usled prisustva vode.

Ayres i saradnici (Ayres et al, 2018) ispitivali su jačinu veze dentin-adheziv nakon primene NTAP i aplikacije univerzalnih adheziva. Univerzalni adhezivi su aplikovani na dentin po protokolima totalnog- i samonagrivanja. Za generisanje plazme korišćen je Ar, udaljenost dentinskih diskova od vrha izvora NTAP bila je 10 mm, a dužina tretmana 10 i 30 s. Nakon tretmana plazmom nije došlo do značajnih morfoloških promena na površini dentinskih uzoraka. Što se hemijskih promena tiče, kod uzoraka koji su tretirani NTAP sa ili bez nagrivanja dentina nije došlo do značajnih promena u karbonatnom spektru i spektru kolagena tip I. Međutim, uočeno je smanjenje fosfatnog spektra kod onih uzoraka kod kojih je adheziv bio aplikovan na oba načina i tretiran plazmom u trajanju od 10 s. Nije uočena značajna razlika između protokola aplikovanja adheziva i tretmana kod svih grupa kada je u pitanju jačina veze. Kod plazmom tretiranih uzoraka (30 s) sa oba načina primene adheziva, uočeno je slabljenje veze nakon godinu dana artefijelnog starenja u vodi u odnosu na inicijalni period. Kod simuliranog pulpnog pritiska vrednosti jačine veze bile su niže kod kontrolnih uzoraka u odnosu na sve uzorke tretirane plazmom. U ovom radu je pokazano i da protokol totalnog nagrivanja povećava nepovoljnu enzimsku aktivnost u hibridnom sloju i u dentinskim kanalićima u odnosu na protokol samonagrivanja. Kao interesantan podatak navedeno je da kraći tretman plazmom (10 s) i protokol samonagrivanja dovode do značajnog porasta enzimske aktivnosti, dok duži plazma tretman (30 s) gotovo eliminiše enzimsku aktivnost. Kod protokola totalnog nagrivanja sa produženjem plazma tretmana enzimsku aktivnost se smanjuje.

Prikazani mnogobrojni efekti NTAP u rešavanju različitih indikacija u medicini i stomatologiji ukazuju na multifunkcionalnost plazme. Identifikacija čestica plazme i variranje različitih uslova tokom tretmana (snaga, rastojanje, trajanje tretmana), kao i uslova ambijentalne sredine su neophodni za postizanje određenog biološkog efekta. S toga neophodna su dalja istraživanja u cilju optimizacije režima NTAP kako bi se postigli bezbedni i adekvatni efekti za određenu indikaciju.

## **CILJEVI, RADNE HIPOTEZE I ZADACI**

Osnovni cilj ovog istraživanja je bio da ukaže na mogućnost primene modifikovane plazma igle kao izvora NTAP za tretman dentina pre aplikacije dentalnih adheziva u restaurativnoj stomatologiji. Definisani su sledeći ciljevi, radne hipoteze i zadaci istraživanja.

### **Ciljevi istraživanja**

1. Optimizacija režima plazme za primenu na dentinu za modifikovanu plazma iglu razvijenu i konstruisanu u Institutu za fiziku u Centru za neravnotežne procese – Laboratoriji za gasnu elektroniku, Univerziteta u Beogradu;
2. Ispitivanje uticaja različitih režima NTAP na kontaktni ugao i površinsku energiju dentina;
3. Poređenje uticaja NTAP i standardnih adhezivnih protokola na kontaktni ugao univerzalnih adheziva;
4. Ispitivanje atomskih i mikromorfoloških karakterisika dentina nakon različitih tretmana.

### **Radne hipoteze**

1. NTAP tretman ima povoljniji efekat na površinska svojstva dentina u poređenju sa standardnim tretmanom nagrizanja ortofosfornom kiselinom, odnosno smanjuje kontaktne uglove referentnih tečnosti i povećava površinsku energiju dentina;
2. Smanjenje rastojanja plazma igle od površine uzorka, povećanje snage i dodatak O<sub>2</sub> pojačava efekat NTAP na površinska svojstva dentina;
3. Optimizovani režim plazma tretmana dovodi do smanjenja kontaktnog ugla univerzalnih adheziva aplikovanih na dentin u poređenju sa protokolima totalnog- i samonagrizanja;
4. Optimizovani režim plazma tretmana dovodi do atomskih i mikromorfoloških promena površine dentina.

### **Zadaci istraživanja**

1. Optimizovati parametre NTAP (snaga predata plazmi, rastojanje izvora NTAP od površine uzorka, trajanje tretmana) za tretman nekarijesnog dentina krunice zuba koji neće imati nepovoljne efekte na tkivo (zagrevanje, pojavu mikroprslina, frakturu);
2. Ispitati uticaj dodavanja kiseonika plazmi na kontaktni ugao referentnih tečnosti i površinsku energiju dentina;

3. Uporediti uticaj NTAP i standardne tehnike nagrivanja ortofosfornom kiselinom na površinska svojstva dentina, odnosno stepen kvašenja površine dentina merenjem kontaktnog ugla referentnih tečnosti i izračunavanjem površinske energije dentina;
4. Ispitati uticaj NTAP na interakciju dentina i univerzalnih adheziva aplikovanih po protokolu totalnog nagrivanja i protokolu samonagrivanja merenjem kontaktnog ugla, određivanjem površinske energije dentina;
5. Ispitati uticaj NTAP i standardnih adhezivnih protokola na atomski sastav i mikromorfološke karakteristike površine dentina primenom SEM/EDS.

## MATERIJAL I METOD

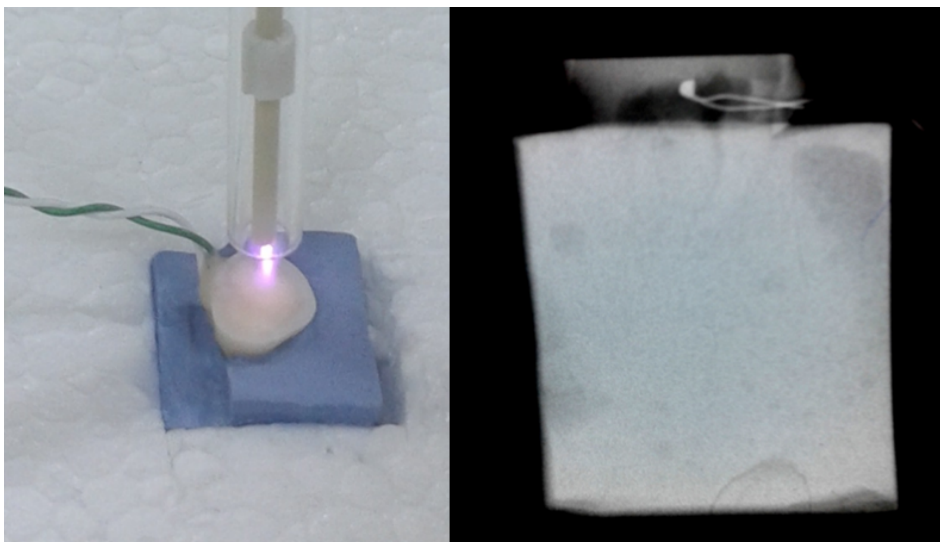
### 1. Priprema i sečenje ekstrahovanih zuba

U istraživanju su korišćena 404 intaktna humana molara, ekstrahovana iz ortodontskih razloga. Korišćenje ekstrahovanih zuba u istraživačke svrhe odobreno je odlukom Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (36/16). Nakon čišćenja od debrisa, zubi su čuvani do početka eksperimenta u 0,2% rastvoru timola u frižideru na temperaturi od +4 °C i bili su iskorišćeni 3 meseca od ekstrakcije.

Svaki zub je uložen korenovima u super-tvrđi gips do cementno-gleđne granice. Po vezivanju gipsa, krunice zuba su presečene u predelu ekvatora zuba dijamantskom linearnom testerom debljine 0,5 mm (Isomet 4000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) kako bi se dobila ravna površina dentina. Pomoću stereomikroskopa (Boeco BSZ-405, Germany) pri uvećanju x40 potvrđeno je da na eksponiranoj površini dentina nema zaostalih gleđnih ostrvaca.

### Priprema uzoraka za merenje temperature u komori pulpe

Za merenje temperature u komori pulpe na lateralnoj strani korena intaktnih, humanih molara dijamantskim okruglim borerom i turbinom urađena je preparacija kružnog oblika, prečnika 3 mm. Plasiran je termopar K-tipa kroz preparaciju kružnog oblika, tako da bude u kontaktu sa krovom komore pulpe i fiksiran je tečnim kompozitom. Lokalizacija termopara je proverena radiografski (**Slika 1.**).



**Slika 1.** Prikaz uzorka i lokalizacija termopara za merenje temperature u komori pulpe tokom tretmana NTAP.

## Priprema dentinskih diskova za površinski tretman i aplikaciju adheziva

Nakon ulaganja u gips i presecanja krunice u predelu ekvatora zuba na već opisan način izvršen je drugi presek apikalnije od eksponirane površine dentina da bi se dobio disk debljine 1 mm (**Slika 2.**). Kako bi se formirao razmazni sloj, svaki dentinski disk je šmirglaan abrazivnim diskom abrazivnosti 600 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) u vlažnim uslovima u trajanju od 30 s.



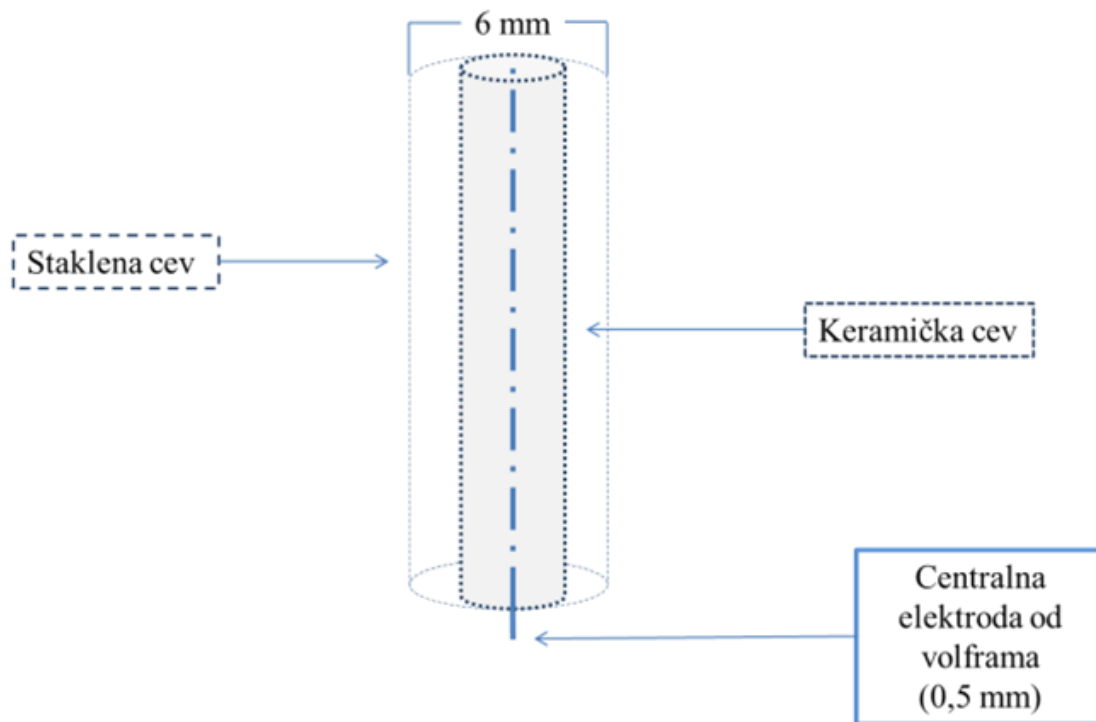
**Slika 2.** Priprema dentinskih diskova.

Dentinski diskovi su čuvani u destilovanoj vodi na temperaturi od +4 °C u frižideru, pre tretmana. Neposredno pre tretmana, dentinski diskovi su blago posušivani tapkanjem papirnim ubrusom.

### 2. Plazma izvor

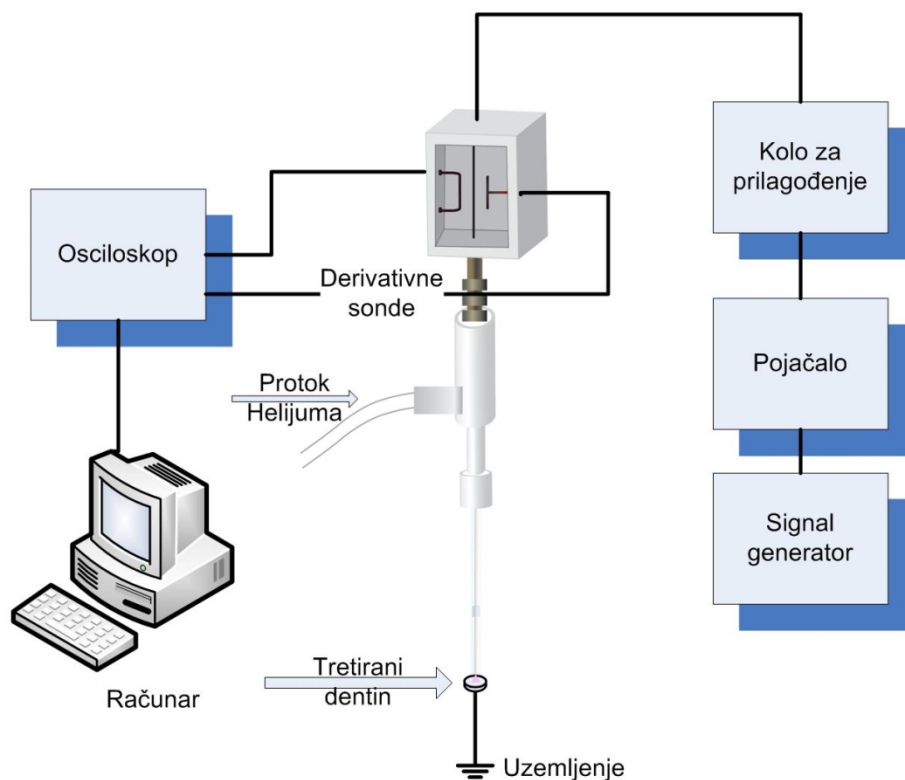
Kao izvor NTAP korišćena je modifikovana plazma igla koja je razvijena i konstruisana u Institutu za fiziku u Centru za neravnotežne procese – Laboratoriji za gasnu elektroniku, Univerziteta u Beogradu. Ovaj model plazma igle sastoji se od centralne elektrode koja je izgrađena od volframa debljine 0,5 mm koja je prekrivena keramičkom cevi i smeštena u staklenoj cevi spoljašnjeg prečnika 6 mm. Keramička cev izoluje volframovu žicu, koja je napajana elektroda, od radnog gasa. Na ovaj način je onemogućeno paljenje pražnjenja unutar tela plazma igle. Da bi se omogućilo paljenje pražnjenja na samom vrhu plazma igle dužina keramičke cevi je za nekoliko milimetara kraća od dužine volframove žice (**Slika 3.**) (Puač, 2007). Centralna elektroda se napaja na 13,56 MHz koristeći signalni generator. Signalni

generator predstavlja sinusoidni naponski signal koji radi na radiofrekvenciji od 13,56 MHz. Za generisanje plazme korišćen je čist He. He protiče između staklene i keramičke cevi, a plazma se generiše na vrhu elektrode.



**Slika 3.** Shematski prikaz plazma igle konstruisane u Institutu za fiziku u Beogradu.

Na **slici 4.** prikazana je eksperimentalna postavka plazma igle. U sredini se nalazi plazma igla koja je postavljena normalno u odnosu na uzorak (dentinski disk). Desna grana eksperimentalne postavke predstavlja deo električnog kola kojim napajamo plazma iglu (signal generator daje RF signal koji se pojačava pomoću pojačivača, a zatim se pomoću kola za prilagođenje snaga predaje plazma igli). Pomoću derivativnih sonde merimo električne karakteristike plazme tako da možemo da kontrolišemo snagu plazme. Sa leve strane su osciloskop i računar pomoću kojih se komunicira sa derivativnim sondama, tj. meri snaga plazme.



**Slika 4.** Eksperimentalna postavka plazma igle.

### 3. Merenje temperature u komori pulpe tokom plazma tretmana: pilot studija

Za merenje temperature u komori pulpe korišćen je termopar K-tipa koji je preko „data-loggera“ (Measurement Computing) bio povezan sa računarom. Merenje temperature urađeno je brzinom od 1 sken/s pomoću programa Tracer Daq. Uzorci su fiksirani u rastresitu podlogu (sunder) i držani u vodenom kupatilu neprekidno tokom trajanja eksperimenta. Merenje je urađeno nakon stabilizacije temperature u komori pulpe u opsegu 36-37 °C.

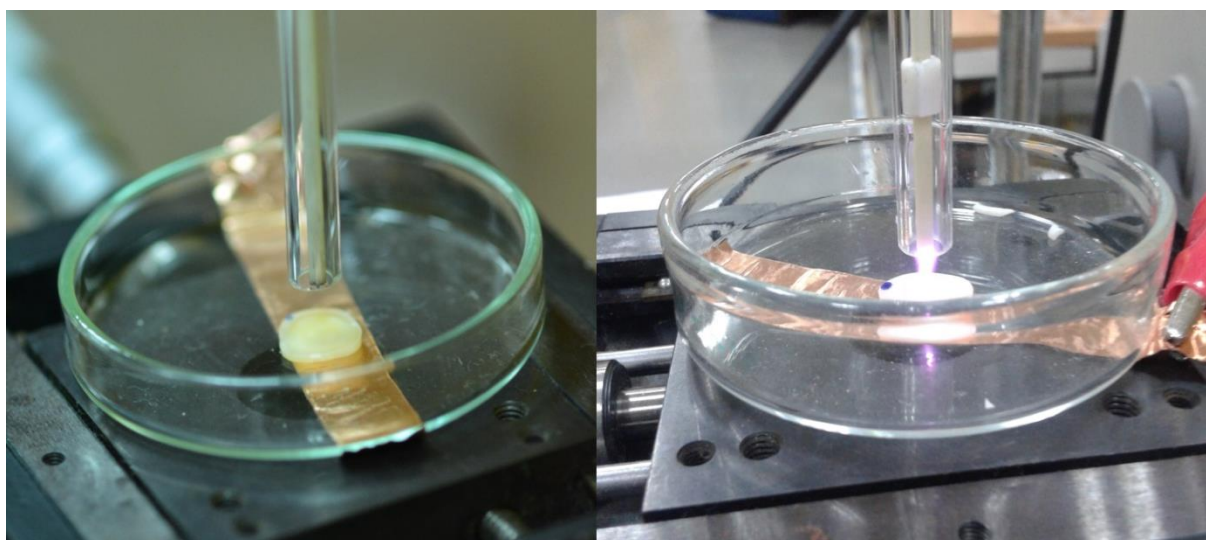
Na osnovu udaljenosti plazma igle od površine dentina (5 mm/10 mm) i snage plazme (0,1; 1 i 2 W) formirane su dve grupe sa po 3 uzorka u svakoj. Dužina tretmana iznosila je 180 s (**Tabela 1.**). Protok gasa tokom trajanja svih NTAP tretmana bio je konstantan i iznosio je 1 slm (standarni litar po minuti). Kao kontrola merena je temperatura u komori pulpe nakon izlaganja LED lampom (LEDition®, Ivoclar Vivadent) intenziteta 600 mW/cm<sup>2</sup> tokom 40 s, koja je bila u kontaktu sa površinom dentina. Intenzitet LED lampe proveren je radiometrom (Demetron, Kerr, Orange, CA, USA).

**Tabela 1.** Režimi NTAP tretmana za merenje temperature u komori pulpe.

Snaga predata plazmi (W)	Udaljenost plazma igle od površine dentina (mm)	Vreme tretmana (s)
0,1	5	180
1		
2		
0,1	10	
1		
2		

#### 4. Tretman površine dentina NTAP

U ovom delu eksperimenta korišćen je prethodno opisan izvor NTAP. Za generisanje plazme korišćen je čist He (100% He) i smeše He i O<sub>2</sub> (99% He+1% O<sub>2</sub> odnosno 98,5% He+1,5% O<sub>2</sub>). Uzorci su bili postavljeni tako da se središnji deo uzorka nalazio ispod vrha plazma igle (**Slika 5.**). Protok gasa tokom trajanja svih NTAP tretmana bio je konstantan i iznosio je 1 slm (standarni litar po minutu).



**Slika 5.** Prikaz pozicije plazma igle u odnosu na uzorak dentina.

Svaka grupa je podeljena u podgrupe koje su formirane na osnovu snage predate plazmi (1 i 3 W) i rastojanja vrha plazma igle od površine uzorka (2, 4 i 8 mm). Svaki plazma tretman trajao je 30 s. Kontrolnu grupu predstavljali su netretirani uzorci dentina. (**Tabela 2.**)

**Tabela 2.** Grupe i podgrupe za tretman NTAP i broj uzoraka u svakoj grupi.

Podgrupe	Tretmani		
	100% He	99% He+1% O <sub>2</sub>	98,5% He+1,5% O <sub>2</sub>
1 W, 2 mm	24	24	24
1 W, 4 mm	24	24	24
1 W, 8 mm	15	/	/
3 W, 2 mm	24	24	24
3 W, 4 mm	24	24	24
3 W, 8 mm	15	/	/

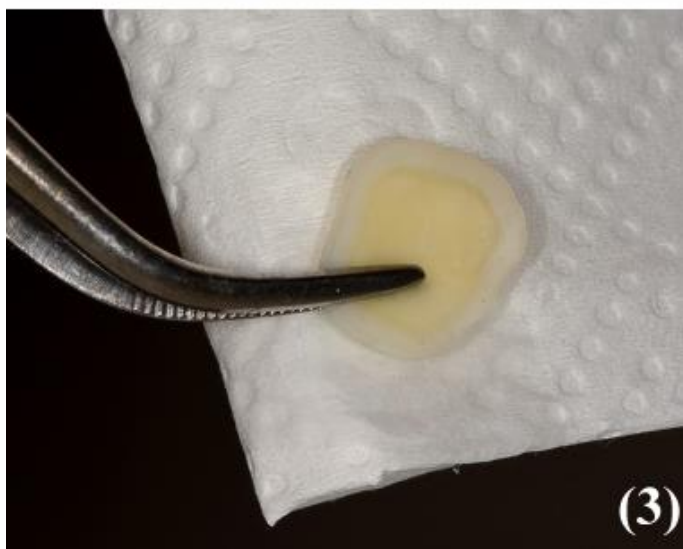
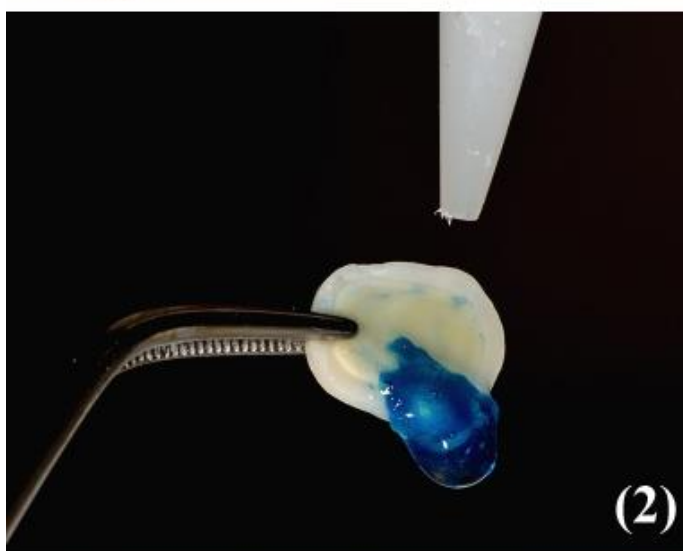
## 5. Tretman površine dentina ortofosfornom kiselinom

Svi eksperimenti obavljani su na ambijentalnoj temperaturi od  $23,3 \pm 0,3$  °C i vlažnosti vazduha od  $34,1\% \pm 1,5\%$ .

Na dentin sa gornje (okluzalne) površine dentinskog diska ravnomerno je naneta 32% ortofosforna kiselina (Scotchbond Universal Etchant, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) (**Tabela 3.**) direktno iz šprica pomoću odgovarajućeg dispenzera i ostavljena da deluje 15 s. Kiselina je zatim ispirana mlazom vode u trajanju od 15 s, a disk blago posušivan papirnim ubrusom, tako da površina ostane sjajna i da se spreči presušivanje. Ukupno je tretirano 15 dentinskih diskova (**Slika 6.**).

**Tabela 3.** Ortofosforna kiselina i sastav.

Naziv	Proizvođač	Sastav
Scotchbond Universal Etchant	3M ESPE St.Paul, MN, USA	Voda (50-65%), fosforna kiselina (30-40%), amorfna sintetička silika (5-10%), polietilen glikol (1-5%), aluminijum oksid (<2%)



**Slika 6.** Protokol aplikacije ortofosforne kiseline: (1) aplikacija kiseline pomoću dispenzera; (2) ispiranje kiseline mlazom vode i (3) blago posušivanje pomoću papirnog ubrusa.

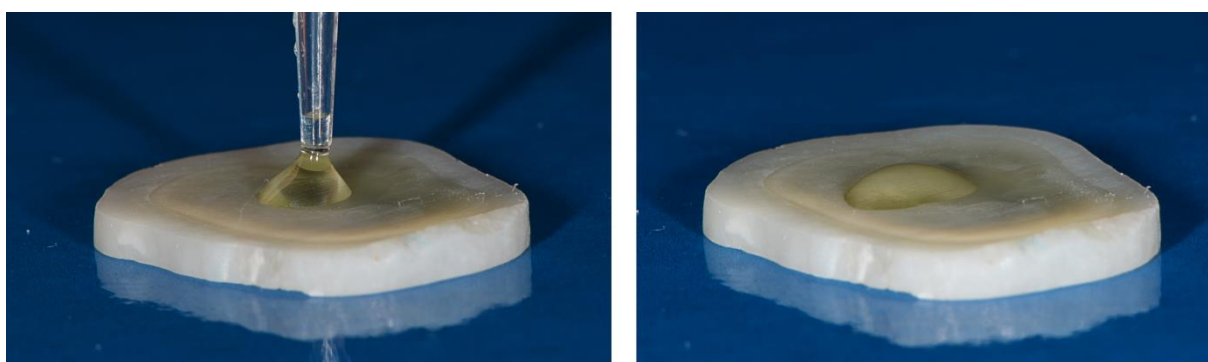
## 6. Merenje kontaktnog ugla

Merenje kontaktnog ugla urađeno je pomoću tri referentne tečnosti: destilovana voda, etilen-glikol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i dijod-metan (Acros Organics, Fairlawn, NJ, USA) (Slika 7.).

Nakon pripreme površine dentina (tretman plazmom/ortofosfornom kiselinom/bez tretmana), uz pomoć pipete (BIOHIT, Biohit Oyj, Helsinki, Finland) istisnuta je kapljica (2  $\mu$ l) referentne tečnosti (Slika 8.).



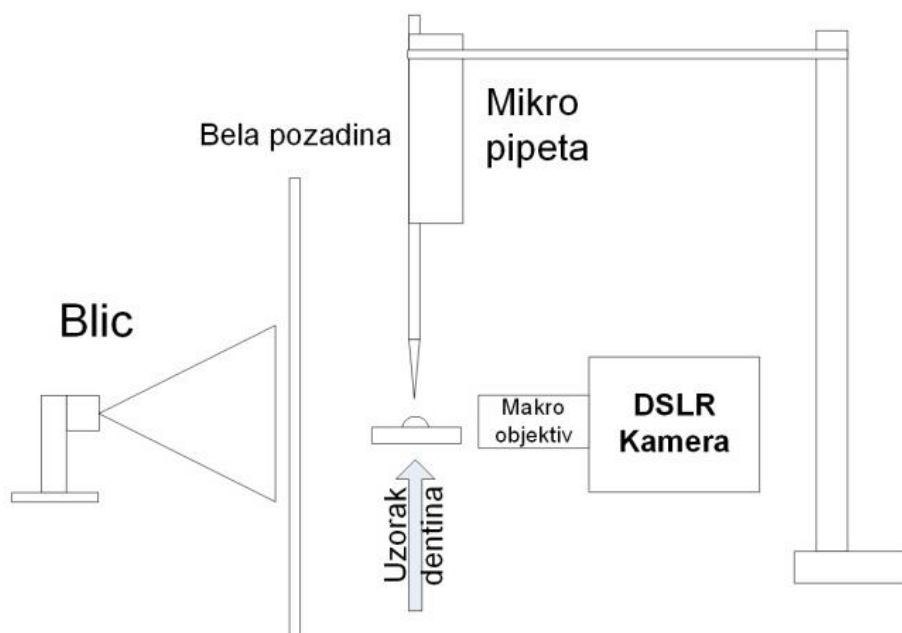
Slika 7. Referentne tečnosti i pipeta.



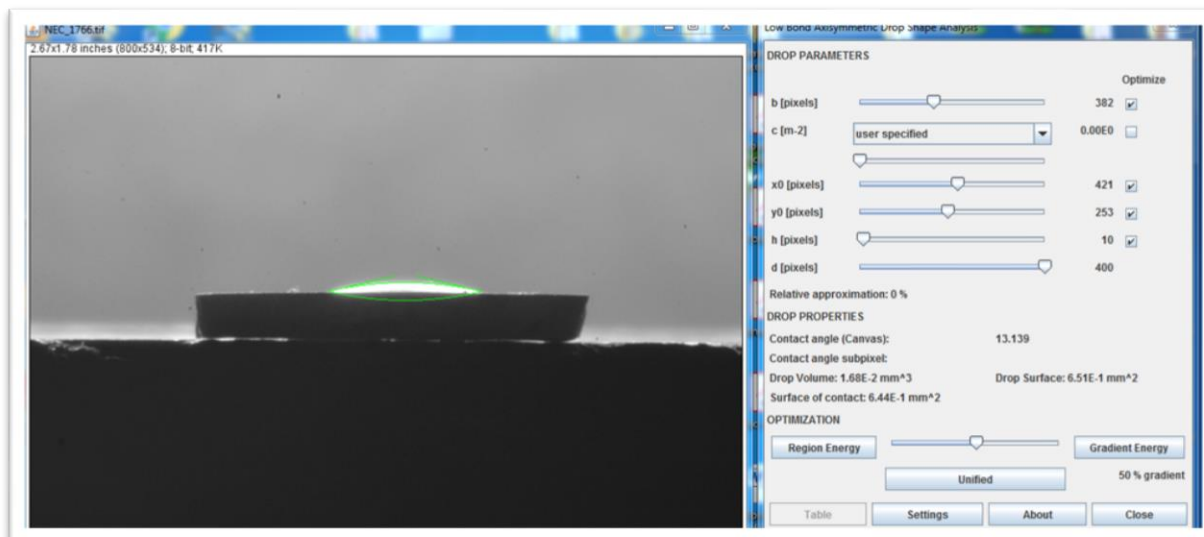
Slika 8. Izgled kapljice referentne tečnosti (dijod-metan) na površini dentinskog diska.

Po istiskivanju tečnosti iz pipete, pomoću fotoaparata (Nikon D7100, Objektiv Nikon 105 mm Macro, Nikon extension ring) i bežičnog blica (Nikon SB700) napravljena je fotografija kapi na površini uzorka. Bežični blic postavljen je iza uzorka i belog papira koji ima ulogu da propusti difuzno svetlo (Slika 9.). Uz pomoć programa Image J (Version 1.42, National

Institute of Health, USA) merenjem ugla koji se formira između površine uzorka i tangente na površini tečnosti, dobija se vrednost kontaktnog ugla (**Slika 10.**).



**Slika 9.** Shematski prikaz postavke za fotografisanje referentne tečnosti na površini uzorka pre merenja kontaktnog ugla.



**Slika 10.** Prikaz merenja kontaktnog ugla u programu Image J.

## 7. Izračunavanje površinske energije

Izračunavanje površinske energije bazirano je na van Oss-Chaudhury-Good termodinamičkom pristupu. Površinska energija dentina ( $\gamma_S$ ) i njene komponente (nepolarna  $\gamma_S^{LW}$ , Lewis kisela  $\gamma_S^+$ , Lewis bazna  $\gamma_S^-$ ) izračunate su na osnovu vrednosti kontaktnog ugla ( $\theta$ ) referentnih tečnosti i njihovih poznatih parametara površinske energije ( $\gamma_L^{LW}$ ,  $\gamma_L^+$  i  $\gamma_L^-$ ) (**Tabela 4.**), prema formuli:

$$(1 + \cos \theta)\gamma_L = 2(\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+})$$

Površinska energija tečnosti jednaka je zbiru nepolarnih (Lifshitz-van der Walsovih) i polarnih (kiselo-baznih) komponenti, prema pravilu aditivnosti:

$$\gamma_L = \gamma_L^{LW} + \gamma_L^{AB}, \text{ pri čemu je } \gamma_L^{AB} = 2\sqrt{\gamma_L^+\gamma_L^-}$$

**Tabela 4.** Parametri površinske energije referentnih tečnosti (Mittal, 2009; Van Oss, 1989).

Referentne tečnosti	Komponente površinske energije (mJ/m <sup>2</sup> )		
	Nepolarna komponenta ( $\gamma_L^{LW}$ )	Polarna komponenta ( $\gamma_L^{AB}$ )	
		Lewis kiseli deo ( $\gamma_L^+$ )	Lewis bazni deo ( $\gamma_L^-$ )
Destilovana voda	21,8	25,5	25,5
Etilen-glikol	29,0	1,9	47,0
Dijod-metan	50,8	0,0	0,0

Površinska energija izračunavana je za uzorke koji su tretirani izvorom NTAP, ortofosfornom kiselinom i za netretirane, kontrolne uzorke.

## 8. Aplikacija univerzalnih adheziva na dentin

U ovom eksperimentu korišćeni su adhezivi koji su dati u **Tabeli 5**. U svakoj eksperimentalnoj grupi bilo je po pet uzoraka.

**Tabela 5.** Adhezivi i njihov sastav.

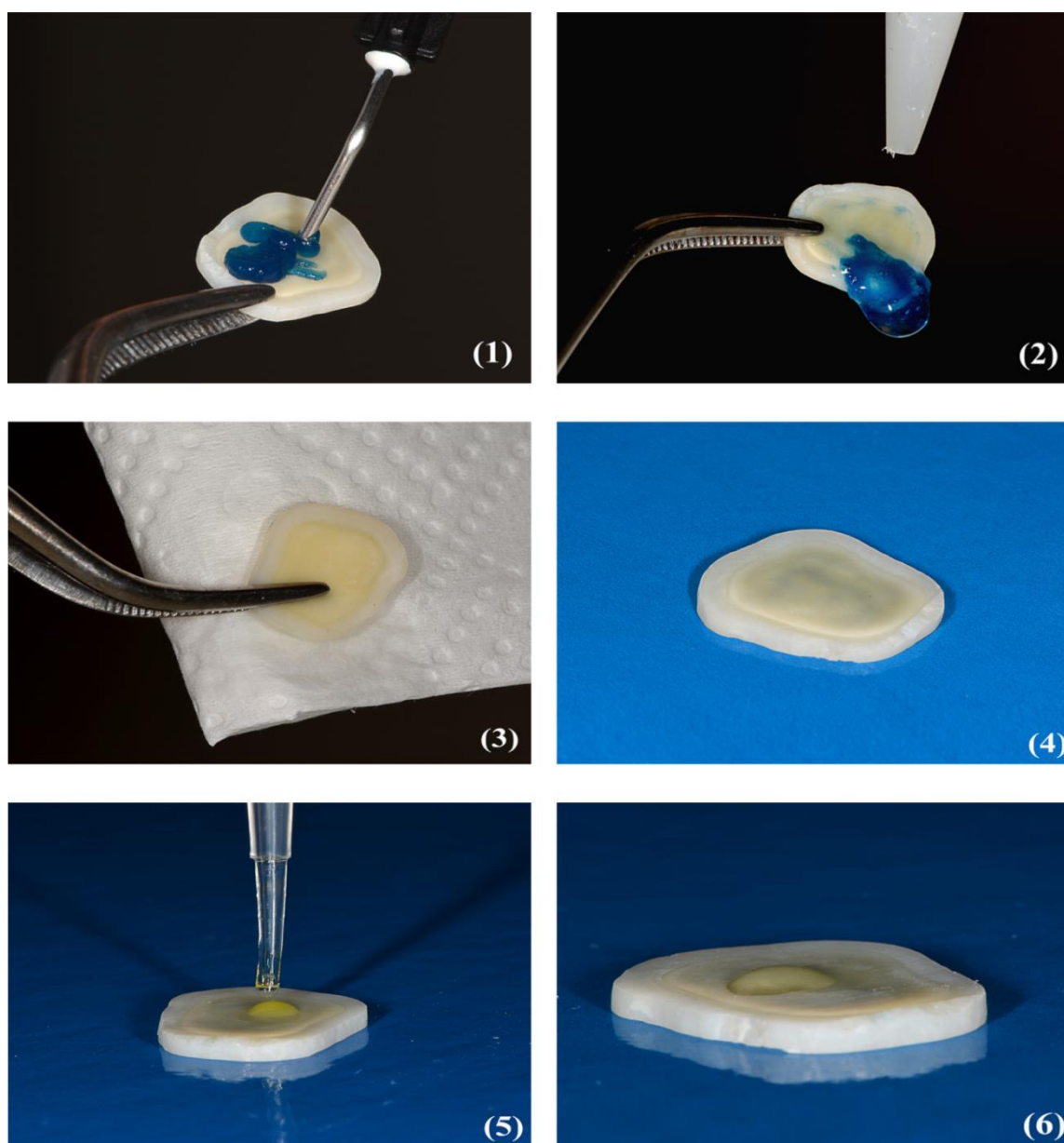
Naziv adheziva	Proizvođač	Sastav adheziva *	Uputstvo proizvođača
Single Bond Universal	3M ESPE St.Paul, MN, USA	BisGMA (15-25%), HEMA (15-25%), DMDMA (5-15%), etanol (10-15%), voda (10-15%), silanizirana silika (5-15%), 1,10-dekanediol metakrilni fosfat (1-10%), kopolimer akrilatne i itakonične kiseline (1-5%), dimetilaminobenzoat (<2%), kamforhinon (<2%), DMAEMA (<2%), metiletilketon (<0,5%)	<i>Totalno-nagrizajući protokol:</i> naneti kiselinu 15 s, ispirati 15 s, posušiti površinu dentina kuglicom vate, naneti adheziv na dentin pomoću aplikatora i tapkati 20 s, nežno raspršiti pusterom u trajanju od 5 s  <i>Samonagrizajući protokol:</i> isprati i posušiti površinu dentina, naneti adheziv na dentin pomoću aplikatora i tapkati 20 s, nežno raspršiti pusterom u trajanju od 5 s
Clearfil Universal Bond	Kuraray Noritake Dental Inc., Okayama, Japan	BisGMA (15-35%), HEMA (10-35%), etanol (<20%), 10-MDP, hidrofilni alifatični dimetakrilat, kolidna silika, kamforhinon, silan, akceleratori, inicijatori, voda	<i>Totalno-nagrizajući protokol:</i> naneti kiselinu 15 s, ispirati 15 s, posušiti površinu dentina kuglicom vate, naneti adheziv na dentin pomoću aplikatora, posušiti ceo kavitet blagim vazduhom iz pustera duže od 5 s  <i>Samonagrizajući protokol:</i> isprati i posušiti površinu dentina, naneti adheziv na dentin pomoću aplikatora, trljati pomoću aplikatora po celom kavitetu, posušiti ceo kavitet blagim vazduhom iz pustera duže od 5 s

\*Prema podacima proizvođača.

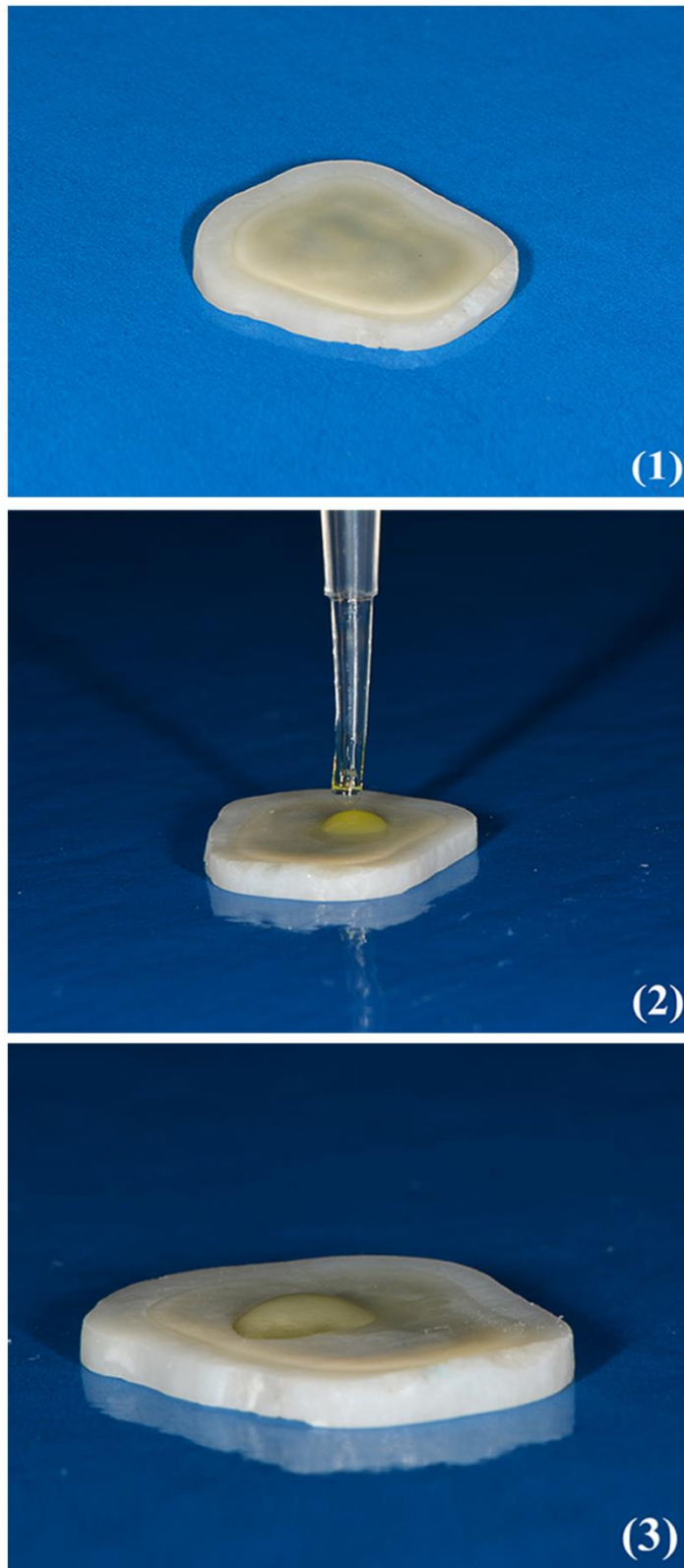
Za tretman dentina NTAP korišćena je snaga od 3 W. Rastojanje vrha plazma igle od površine dentina iznosilo je 4 mm. Nakon tretmana NTAP, dentinski diskovi bili su podeljeni u dve grupe prema vrsti adheziva. Kontrole su predstavljali kontakti uglovi dobijeni korišćenjem tri referentne tečnosti na netretiranom dentinu, dentinu tretiranom ortofosfornom kiselinom, plazma tretiranom dentinu kao i oni dobijeni nakon aplikacije adheziva po odgovarajućim protokolima. Za svaku grupu, pomoću pipete vršeno je istiskivanje adheziva i fotografisanje formirane kapljice na tretiranoj površini dentina neposredno nakon aplikacije. Merenje kontaktnog ugla je urađeno na način kako je opisano u delu 6.

Za protokol totalnog nagrizanja dentinski diskovi su pripremljeni nagrizanjem ortofosfornom kiselinom, kako je opisano u delu 5. Kod protokola samonagrizanja dentinski diskovi su

nakon isecanja i formiranja razmaznog sloja blago posušivani papirnim ubrusom. Adheziv je istisnut na dentinski disk pomoću pipete u količini od 2  $\mu$ l (Slike 11. i 12.). Merenje kontaktnog ugla je izvršeno na isti način kao i u slučaju referentnih tečnosti, kao što je opisano u delu 6. Fotografisanje kapi adheziva na površini dentinskog diska urađeno je neposredno nakon aplikacije, čime je eliminisan rizik od spontane polimerizacije pri sobnom osvetljenju.



**Slika 11.** Aplikacija adheziva po protokolu totalnog nagrizanja: (1) aplikacija kiseline pomoću dispenzera; (2) ispiranje kiseline mlazom vode i (3) blago posušivanje pomoću papirnog ubrusa; (4) izgled posušenog dentina; (5) aplikacija adheziva pomoću pipete; (6) izgled univerzalnog adheziva na površini dentina.



**Slika 12.** Aplikacija adheziva po protokolu samonagrizanja: (1) izgled posušene površine dentina (2) aplikacija adheziva pomoću pipete; (3) izgled univerzalnog adheziva na površini dentina.

## 9. Analiza površinskog sastava i strukture dentina

Mikromorfološka struktura i elementarni sastav površine dentina nakon tretmana plazmom, ortofosfornom kiselinom ili bez tretmana (kontrola) analizirani su SEM/EDS metodama. Ove analize su izvedene u Centru za Elektronsku mikroskopiju, Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Uzorci su prvo isušeni u vakuumu, a zatim napareni Au-Pd prahom. Korišćen je EDS u SEM mikroskopu (JEOL JSM 6460, Tokio, Japan) na 10 keV pri uvećanjima od x500-x5000, a analizirane su promene u atomskom sastavu površine dentina i posmatran je atomski udeo Ca, P, O i N (**Slika 13**).



**Slika 13.** Skenirajući elektronski mikroskop.

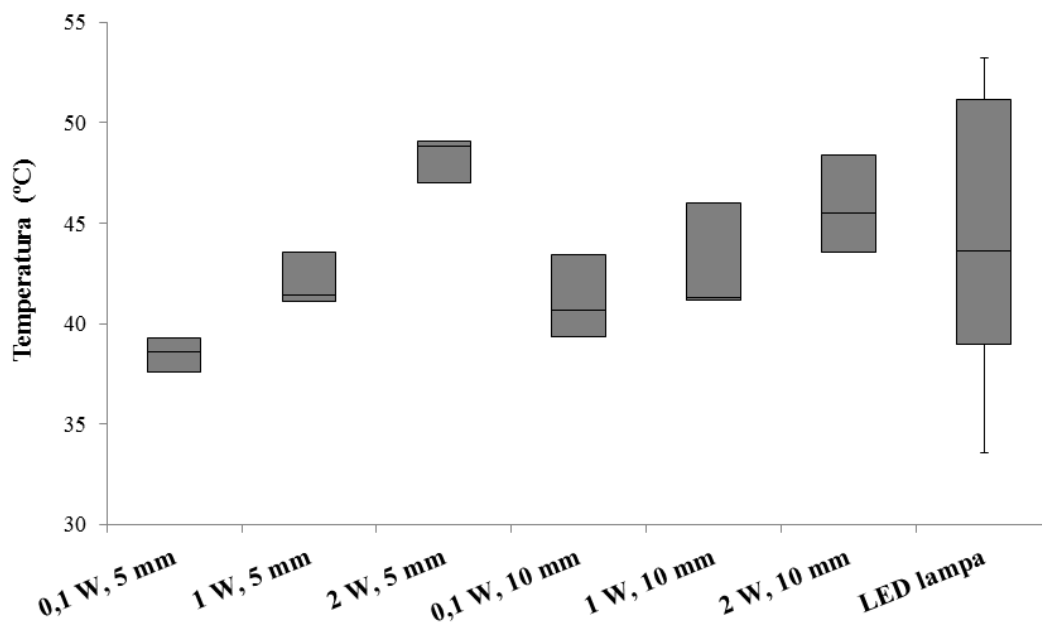
## 10. Statistička analiza

Dobijeni podaci statistički su obrađeni primenom deskriptivnih i komparativnih statističkih metoda. Za potrebe statističke analize korišćen je softverski paket Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, USA). Metode deskriptivne statistike obuhvataju analizu distribucije frekvencija, srednje vrednosti i standardne devijacije, box-and-whisker plotove i identifikaciju ekstremnih ("outlier") vrednosti. Podaci su prikazani tabelarno i grafički. Metode komparativne statistike korišćene su za ispitivanje statističke značajnosti razlika između ispitivanih grupa, i to odgovarajuće analize varijanse (dvofaktorske i jednofaktorske) sa post-hoc testovima međugrupne komparacije. Po potrebi podaci su bili transformisani kako bi bili ispunjeni uslovi parametarskog testiranja (normalna distribucija i jednakost varijanse). Nivo značajnosti u svim testovima bio je 0,05 odnosno 5%.

## REZULTATI

Podaci dobijeni merenjem temperature u komori pulpe tokom tretmana NTAP i nakon tretmana NTAP sa 100% He i smešama gasova (99% He+1% O<sub>2</sub>; 98,5% He+1,5% O<sub>2</sub>), kao i nakon aplikacije ortofosforne kiseline prikazani su box-plot-ovima (**Grafikoni 1-5.**). Box-plot predstavlja dijagram kojim se mogu prikazati podaci i kvartili podataka. Ovim dijagramom može se predstaviti koliko su ekstremne vrednosti udaljene od većine podataka. Box-plot je sastavljen od pet vrednosti: najmanja vrednost, prvi kvartil, medijana (drugi kvartil), treći kvartil i najveća vrednost. Pravougaonog je oblika sa horizontalnom linijom u sredini koja odgovara medijani. Kraće stranice pravougaonika predstavljaju prvi i treći kvartil. Kvartili razdvajaju podatke u četvrtine i predstavljeni su kraćim stranicama pravougaonika. Prvi kvartil predstavlja srednju vrednost donje polovine podataka, a treći kvartil srednju vrednost gornje polovine podataka. Najmanja i najveća vrednost odgovaraju kraju ose. Pravougaonik sadrži 50% podataka i predstavlja interkvartilno rastojanje. Duže stranice pravougaonika nazivaju se whisker-si i odgovaraju 1,5 dužini interkvartilnog rastojanja. Podaci van linija pravougaonika i krajnjih osa predstavljaju ekstremne vrednosti ("outliers") i najčešće su označeni kružićima ili zvezdicama.

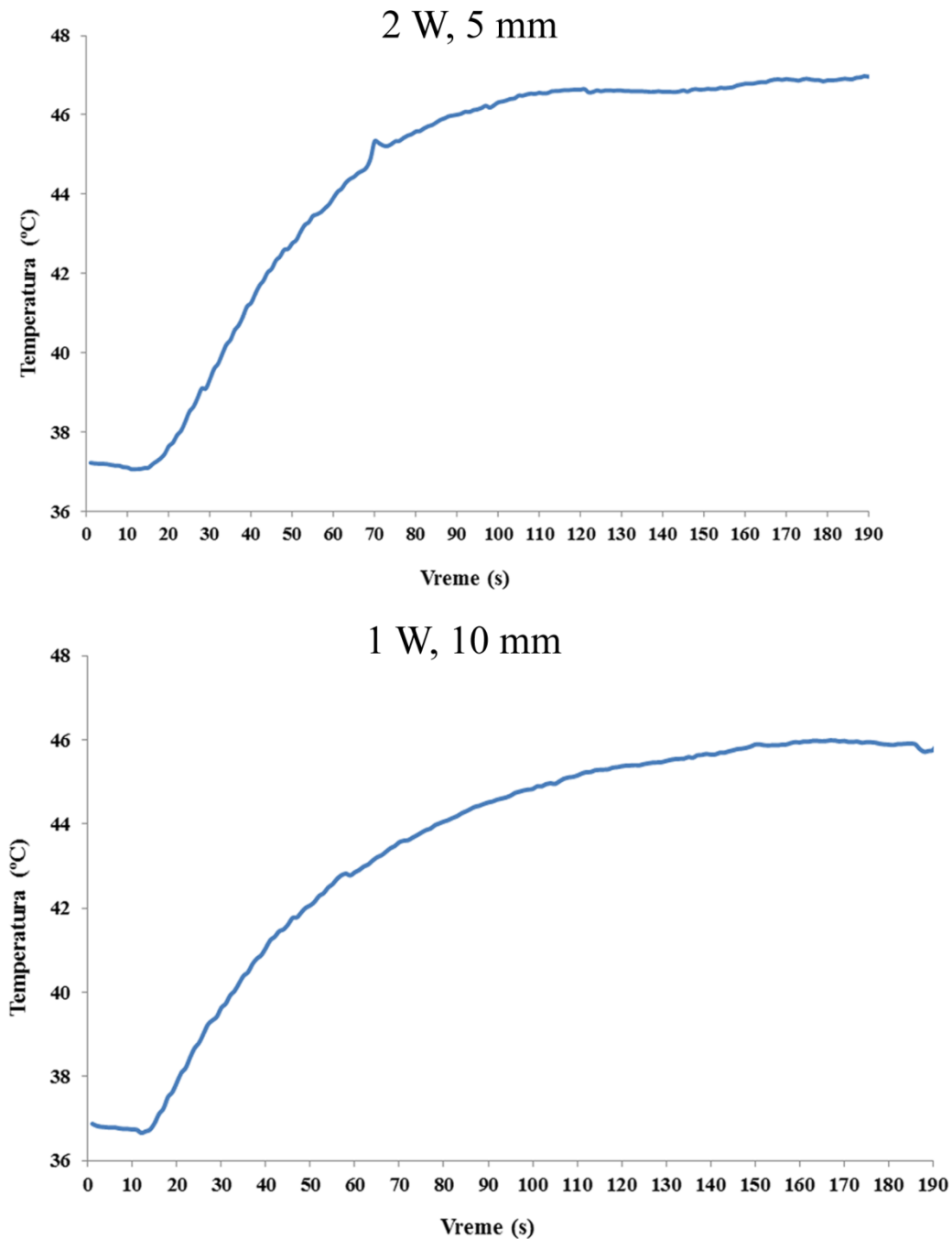
### 1. Temperatura u komori pulpe tokom tretmana NTAP: pilot studija



**Grafikon 1.** Vrednosti temperature u komori pulpe tokom tretmana NTAP.

Vrednosti temperatura u komori pulpe bile su veće u odnosu na kontrolno merenje LED lampom. Tokom 180 s tretmana NTAP uočeno je povećanje temperature sa povećanjem snage. Pri režimu 0,1 W, 5 mm temperatura je iznosila  $38,5 \pm 0,84$  °C, a sa povećanjem snage povećavala se i temperatura ( $48,30 \pm 1,15$  °C). Takođe je i kod većeg rastojanja sa povećanjem

snage došlo do porasta temperature u komori pulpe. Najveća vrednost temperature u komori pulpe bila je pri režimu 2W, 5 mm ( $48,30 \pm 1,15$  °C). Temperatura u komori pulpe tokom prosvetljavanja površine dentina LED lampom iznosila je  $44,20 \pm 7,19$  °C (**Grafikon 1**).

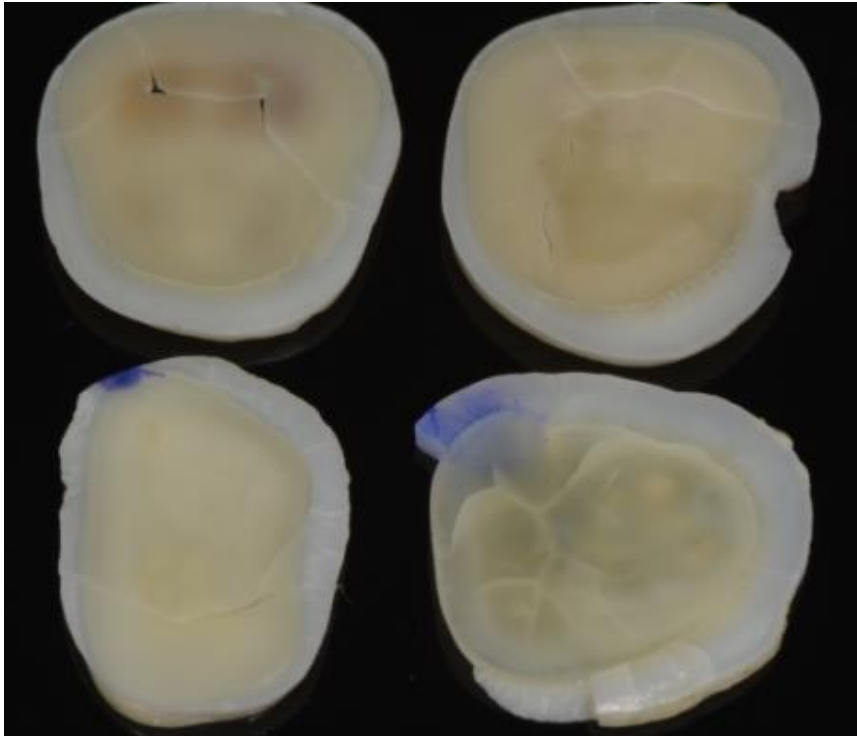


**Slika 14.** Prikaz temperatura u komori pulpe tokom NTAP tretmana u realnom vremenu.

Promena temperature u komori pulpe u realnom vremenu tokom NTAP tretmana prikazana je na **Slici 14**. Reprezentativni grafikoni pokazuju da NTAP tretman dovodi do povećanja temperature iznad graničnih vrednosti ( $42,5$  °C), kao i da snaga i rastojanje NTAP imaju uticaja na porast temperature. Uočen je isti trend porasta temperature u komori pulpe,

nezavisno od režima NTAP. Prikazani NTAP režimi dostižu graničnu vrednost već negde oko 50 s trajanja tretmana.

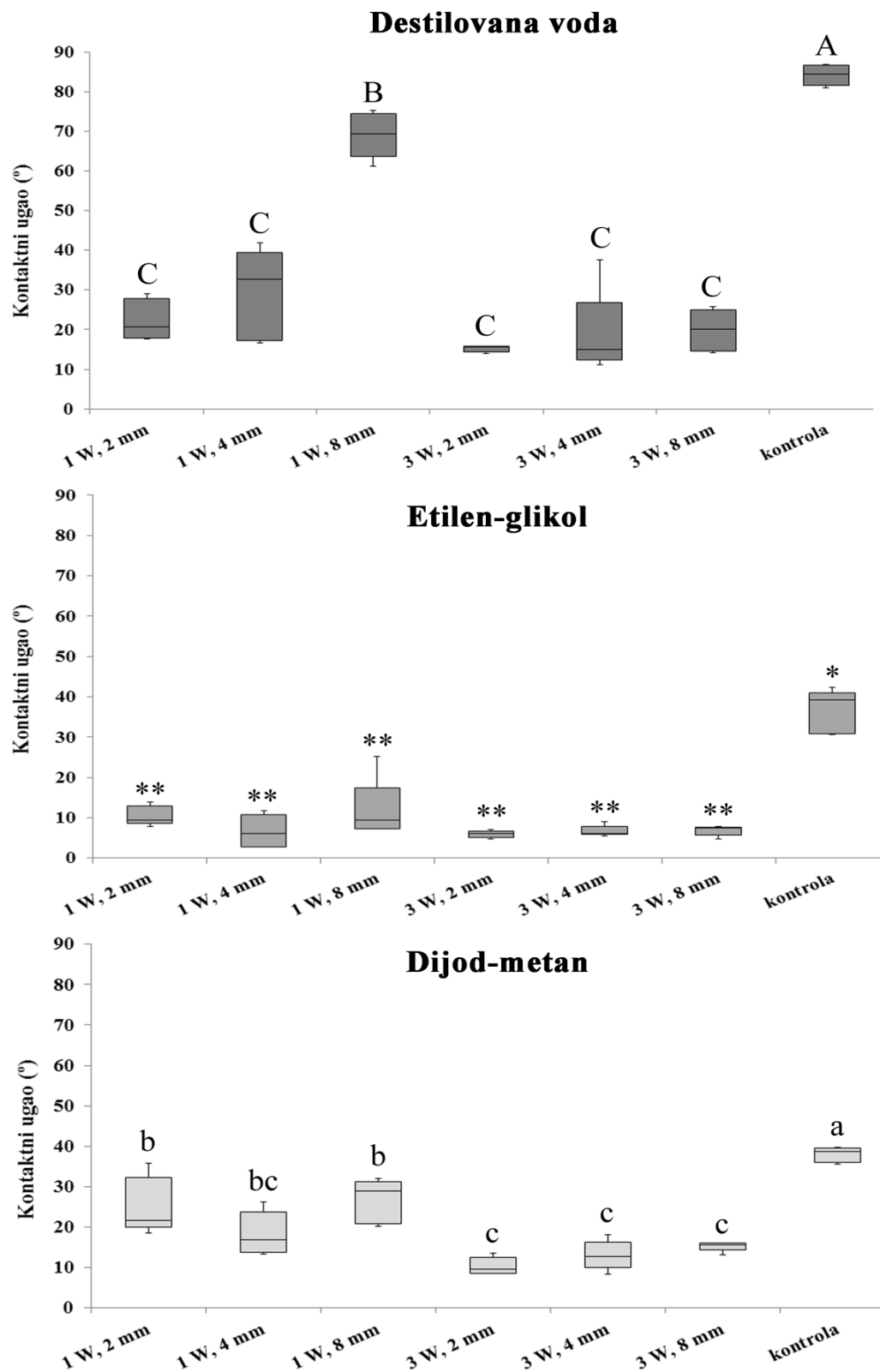
Tokom plazma režima sa većim snagama (2 W) i manjim rastojanjem (5 mm) zabeležena je pojava prslina na površini dentina, ali bez pucanja uzorka (**Slika 15.**). Neposredno pre tretmana NTAP, uzorci su vađeni iz posude sa destilovanom vodom i posušivani papirnim ubrusom.



**Slika 15.** Prslina na površini dentina.

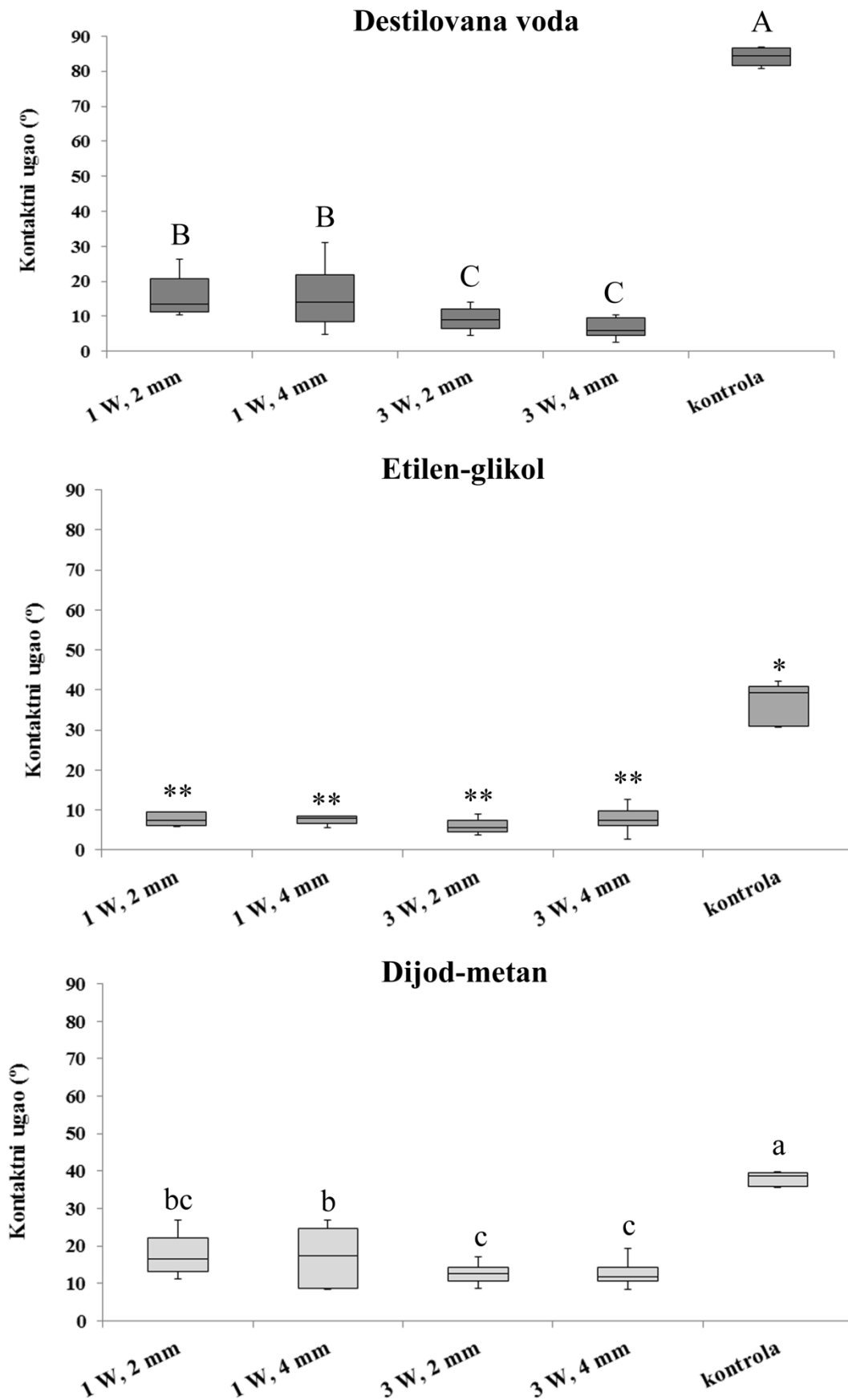
## 2. Kontaktni ugao

### 2.1. Kontaktni ugao nakon tretmana NTAP



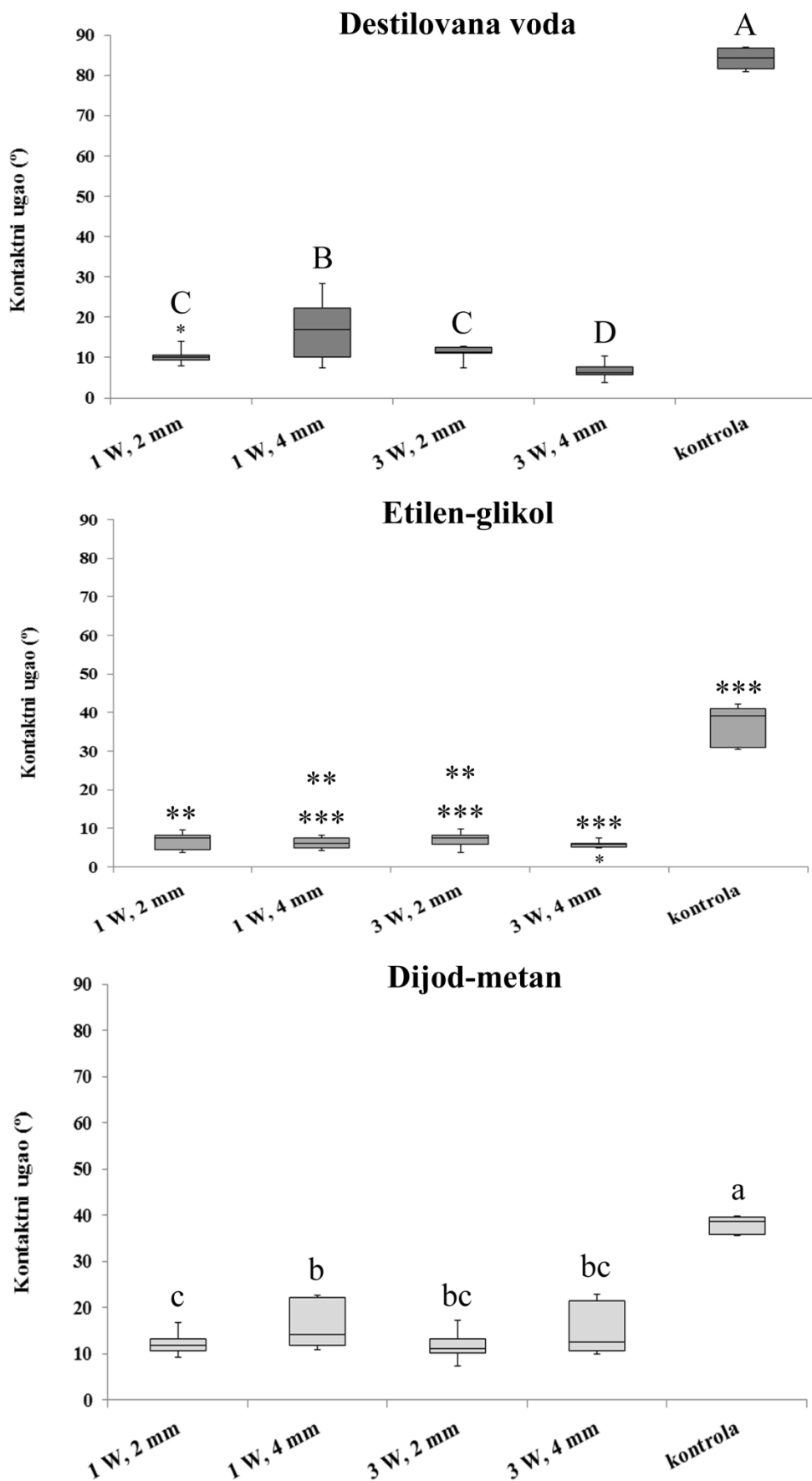
**Grafikon 2.** Vrednosti kontaktnog ugla za sve tri referentne tečnosti nakon tretmana čistom He plazmom; Različita slova/simboli u okviru grupa ukazuju na statističku značajnost ( $p < 0,05$ ). Dužina trajanja svih tretmana iznosila je 30 s.

Vrednosti kontaktnog ugla bile su statistički značajno manje nakon tretmana NTAP sa 100% He u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke kod svih referentnih tečnosti ( $p \leq 0,001$ ). Što se referentnih tečnosti tiče, uočena je značajna razlika u vrednostima kontaktnog ugla, nezavisno od parametara plazme ( $p \leq 0,001$ ). Najveći kontaktni ugao zabeležen je kod destilovane vode ( $69,1 \pm 5,65^\circ$ ) kao referentne tečnosti, a najmanji kod etilen-glikola ( $5,96 \pm 0,82^\circ$ ). U grupi sa destilovanom vodom vrednosti kontaktnog ugla kod uzoraka koji su tretirani NTAP pri režimu 1 W, 8 mm ( $69,1 \pm 5,65^\circ$ ) bile su značajno veće nego kod ostalih tretmana u okviru grupe ( $p \leq 0,001$ ). Vrednosti kontaktnih uglova nisu se značajno razlikovale u grupi sa etilen-glikolom ( $p < 0,08$ ). Kod dijud-metana uočeno je da nakon tretmana NTAP pri snazi od 3 W dolazi do značajnog pada vrednosti kontaktnih uglova u odnosu na tretmane sa 1 W snage ( $p \leq 0,001$ ) (**Grafikon 2.**).



**Grafikon 3.** Vrednosti kontaktnog ugla za sve tri referentne tečnosti nakon tretmana He plazmom sa dodatkom 1% O<sub>2</sub>; Različita slova/simboli u okviru grupa ukazuju na statističku značajnost (p<0,05). Dužina trajanja svih tretmana iznosila je 30 s.

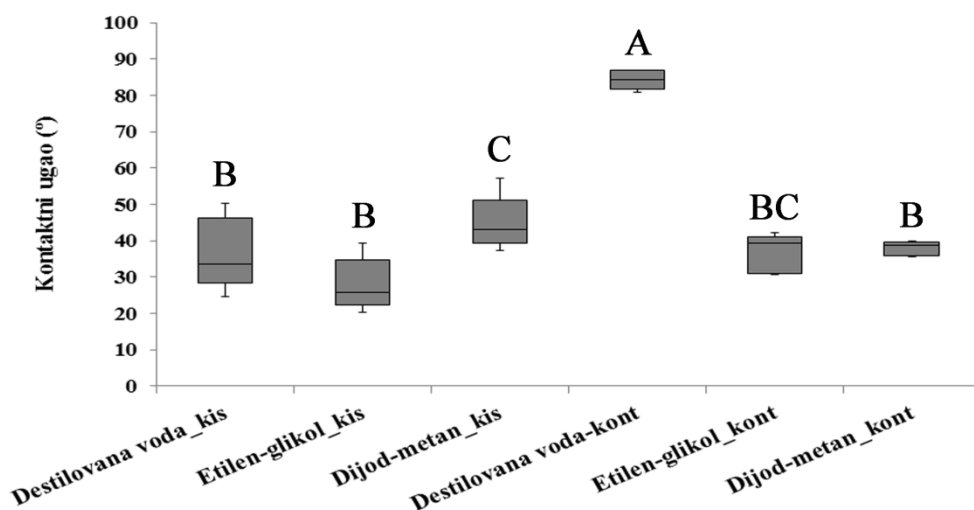
Kod tretmana NTAP sa dodatkom 1% O<sub>2</sub> prisutan je isti trend značajnog smanjenja vrednosti kontaktnog ugla u odnosu na netretirane uzorke kod sve tri referentne tečnosti ( $p \leq 0,001$ ). U grupi sa destilovanom vodom, tretman plazmom pri snazi od 3 W dao je značajno niže vrednosti kontaktnog ugla u odnosu na režime pri snazi od 1 W. Između režima 1 W, 2 mm ( $15,49 \pm 5,83^\circ$ ), 1 W, 4 mm ( $15,14 \pm 8,60^\circ$ ), odnosno 3 W, 2 mm ( $9,17 \pm 3,20^\circ$ ), 3 W, 4 mm ( $6,64 \pm 2,80^\circ$ ) nije bilo značajne razlike u pogledu vrednosti kontaktnog ugla ( $p = 0,068$ ). Kod etilen-glikola kao referentne tečnosti nije zabeležena značajna razlika u vrednostima kontaktnih uglova između plazma tretmana ( $p = 0,183$ ). Grupe sa dijud-metanom pokazale su značajne razlike u vrednostima kontaktnog ugla između režima 1 W, 4 mm ( $17,04 \pm 5,42^\circ$ ) i oba režima pri snazi od 3 W (2 mm\_12,62 $\pm$ 2,64 $^\circ$ ; 4 mm\_12,66 $\pm$ 2,64 $^\circ$ ) ( $p \leq 0,001$ ) (**Grafikon 3.**).



**Grafikon 4.** Vrednosti kontaktnog ugla za sve tri referentne tečnosti nakon tretmana He plazmom sa dodatkom 1,5% O<sub>2</sub>. Različita slova/simboli u okviru grupa ukazuju na statističku značajnost ( $p < 0,05$ ). Dužina trajanja svih tretmana iznosila je 30 s.

Tretman NTAP sa dodatkom 1,5% O<sub>2</sub> takođe je značajno povećao hidrofilnost kod svih tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke, iskazanu kao smanjenje kontaktnog ugla vode ( $p \leq 0,001$ ). Vrednosti kontaktnog ugla bile su značajno veće pri režimu 1 W, 4 mm ( $16,98 \pm 7,12^\circ$ ) u odnosu na ostale režime u grupi sa destilovanom vodom. Najmanje vrednosti zabeležene su posle NTAP tretmana u režimu 3 W, 4 mm ( $6,72 \pm 1,91^\circ$ ). Takođe, u istoj grupi nije bilo značajne razlike u vrednostima kontaktnih uglova posle NTAP tretmana u režimima 1 W, 2 mm ( $10,31 \pm 1,73^\circ$ ) i 3 W, 2 mm ( $11,25 \pm 1,79^\circ$ ). Što se grupe sa etilen-glikolom tiče, razlike u kontaktnim uglovima između režima 1 W, 2 mm ( $6,72 \pm 2,16^\circ$ ) i 3 W, 4 mm ( $5,87 \pm 0,79^\circ$ ) su bile statistički značajne. Grupa sa dijud-metanom pokazala je značajno povećanje hidrofilnosti dentina nakon režima 1 W, 2 mm ( $12,23 \pm 2,25^\circ$ ) u odnosu na režim 1 W, 4 mm ( $16,17 \pm 5,13^\circ$ ). Nakon tretmana plazmom pri snazi od 3 W nije uočena značajna razlika u vrednostima kontaktnog ugla ( $p = 0,454$ ) (**Grafikon 4.**).

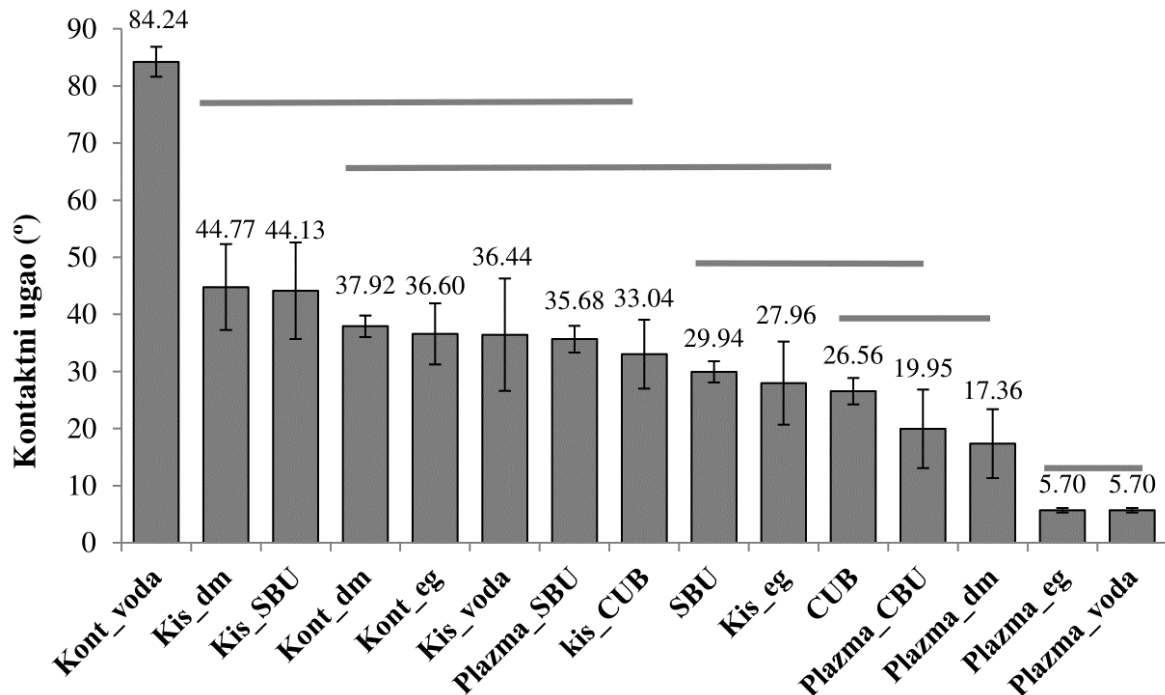
## 2.2. Kontaktni ugao nakon aplikacije ortofosforne kiseline



**Grafikon 5.** Vrednosti kontaktnog ugla nakon aplikacije 32% ortofosforne kiseline; Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike između grupa ( $p < 0,05$ ). Skraćenice: kis - ortofosforna kiselina, kont - kontrola (netretirani uzorci)

Nagrizanje dentina 32% ortofosfornom kiselinom u trajanju od 15 s rezultiralo je značajnim smanjenjem kontaktnog ugla destilovane vode u poređenju sa kontrolnim, netretiranim uzorcima ( $p \leq 0,001$ ). Vrednosti kontaktnog ugla etilen-glikola nisu se značajno promenile u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke, dok je kontaktni ugao dijud-metana povećan. Nakon aplikacije ortofosforne kiseline vrednosti kontaktnog ugla bile su značajno manje kod etilen-glikola ( $27,96 \pm 7,24^\circ$ ) u odnosu na dijud-metan ( $44,77 \pm 7,52^\circ$ ), ( $p = 0,069$ ;  $p = 0,120$ ) (**Grafikon 5.**).

### 2.3. Kontaktni ugao nakon tretmana NTAP i aplikacije univerzalnih adheziva

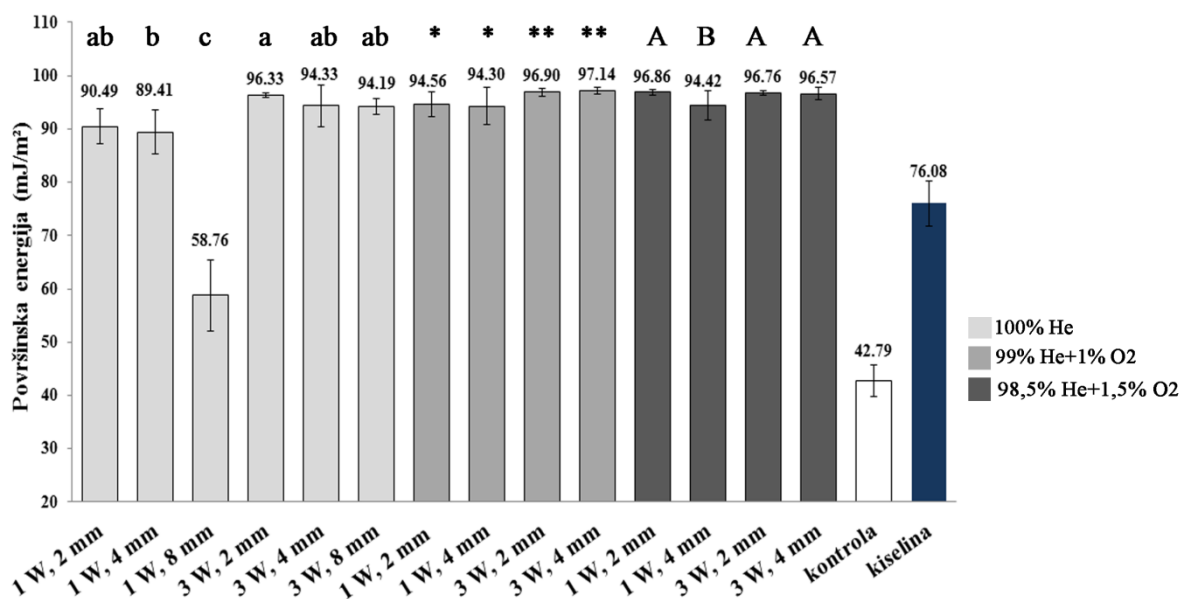


**Grafikon 6.** Vrednosti kontaktnog ugla nakon tretmana NTAP ( $\text{He}+1,5\text{O}_2$ , 3W, 4mm) i aplikacije univerzalnih adheziva; Horizontalne linje ukazuju na odsustvo statistički značajne razlike između grupa. Skraćenice: kis - ortofosforna kiselina, dm - dijud-metan, eg - etilen-glikol, kont - kontrola, SBU - Single Bond Universal, CBU - Clearfil Universal Bond

Kontaktни uglovi univerzalnih adheziva (SBU i CUB) bili su značajno manji od kontaktnog ugla destilovane vode u kontrolnoj grupi. Kontaktни uglovi SBU i CUB aplikovanih po protokolu samonagrizanja ( $\text{SBU}_{29,94 \pm 1,86}^\circ$ ;  $\text{CUB}_{26,56 \pm 2,33}^\circ$ ) bili su značajno manji od kontaktnih uglova istih adheziva aplikovanih po protokolu totalnog nagrizanja ( $\text{SBU}_{44,13 \pm 8,45}^\circ$ ;  $\text{CUB}_{33,04 \pm 6,04}^\circ$ ) ( $\text{SBU } p=0,003$ ,  $\text{CUB } p=0,009$ ). Nakon tretmana NTAP pri režimu 3 W, 4 mm sa 1,5%  $\text{O}_2$  i aplikacije univerzalnih adheziva vrednosti kontaktnog ugla bile su značajno manje kod CUB ( $19,95 \pm 6,88^\circ$ ) u odnosu na SBU ( $35,68 \pm 2,35^\circ$ ) (**Grafikon 6.**).

### 3. Površinska energija dentina nakon tretmana NTAP ili ortofosfornom kiselinom

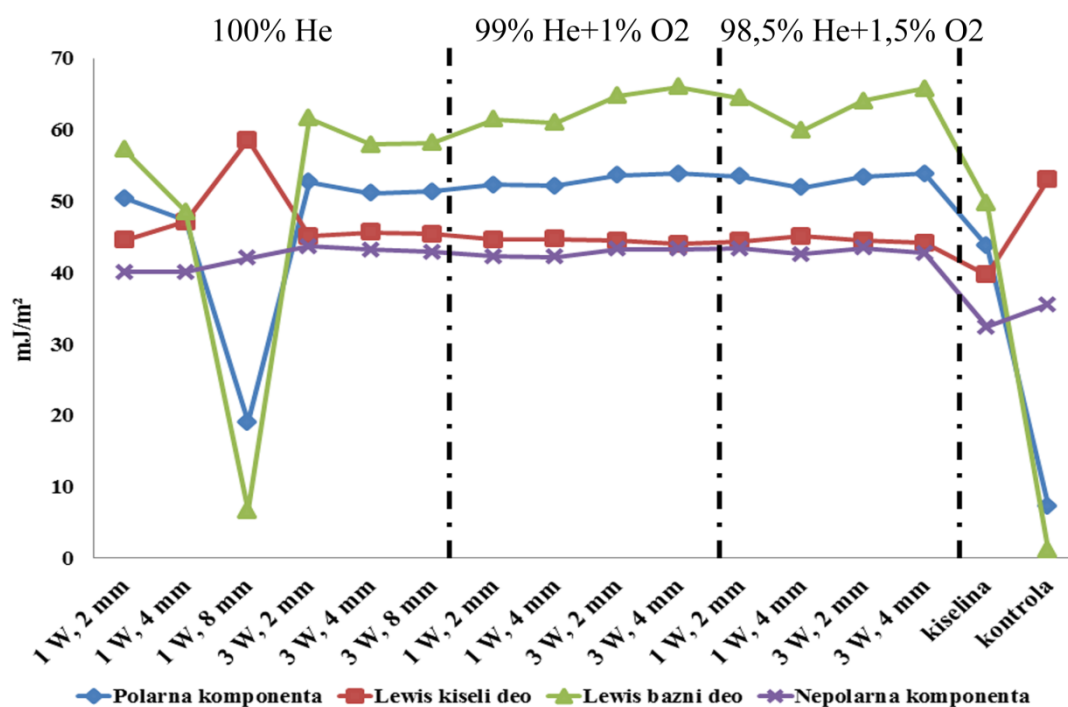
#### 3.1. Površinska energija dentina



**Grafikon 7.** Vrednosti površinske energije dentina nakon tretmana NTAP ili ortofosfornom kiselinom. Različita slova/simboli u okviru grupa ukazuju na statistički značajne razlike.

Vrednosti površinske energije su bile obrnuto proporcionalne vrednostima kontaktnog ugla. Veće vrednosti površinske energije su zabeležene nakon svih tretmana NTAP, kao i nakon nagrizanja dentina ortofosfornom kiselinom u odnosu na netretirane, kontrolne uzorke dentina. U grupama 100% He i 99% He+1% O<sub>2</sub> vrednosti površinske energije bile su značajno veće pri režimima snage 3 W (100% He\_96,33±0,37 mJ/m<sup>2</sup>; 99% He+1% O<sub>2</sub>\_97,14±0,58 mJ/m<sup>2</sup>) u odnosu na 1 W (100% He\_90,49±3,26 mJ/m<sup>2</sup>; 99% He+1% O<sub>2</sub>\_94,30±3,43 mJ/m<sup>2</sup>). Kod plazma tretmana sa dodatkom 1,5% O<sub>2</sub> uočena je neznatno manja vrednost površinske energije kod režima 1 W, 4 mm (94,42±2,75 mJ/m<sup>2</sup>) u odnosu na režim 3 W, 4 mm (96,57±1,14 mJ/m<sup>2</sup>). Statistička značajnost nije zabeležena između tretmana plazme sa dodatkom 1% O<sub>2</sub> i 1,5% O<sub>2</sub> (**Grafikon 7.**).

### 3.2. Komponente površinske energije dentina

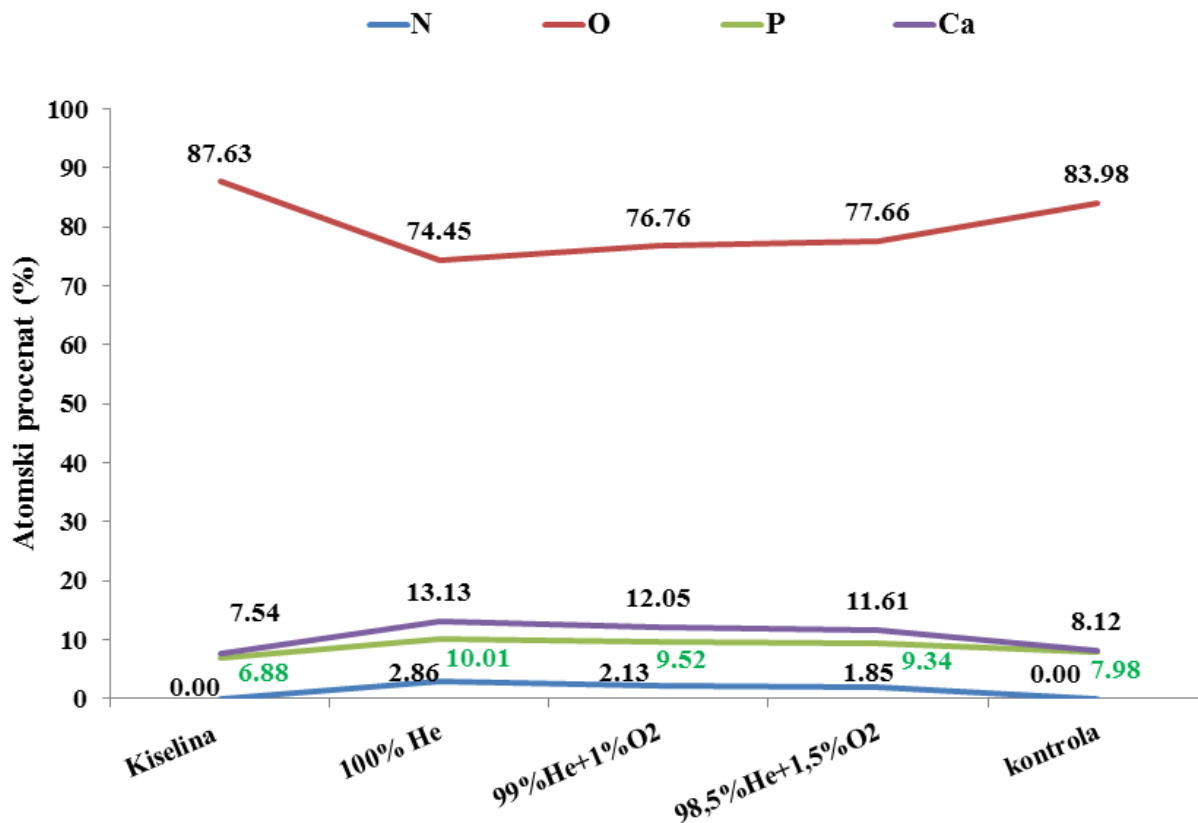


**Grafikon 8.** Komponente (polarne, nepolarne, Lewis kiseli deo, Lewis bazni deo) površinske energije dentina nakon tretmana NTAP ili ortofosfornom kiselinom.

Vrednosti polarne, nepolarne komponente i Lewis baznog dela nakon tretmana NTAP bile su veće u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke. Vrednosti Lewis kiselog dela smanjile su se nakon plazma tretmana.

Nakon nagrizanja dentina ortofosfornom kiselinom došlo je do smanjenja nepolarne komponente i Lewis kiselog dela. Lewis bazni deo i polarna komponenta su se povećali u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke (**Grafikon 8.**).

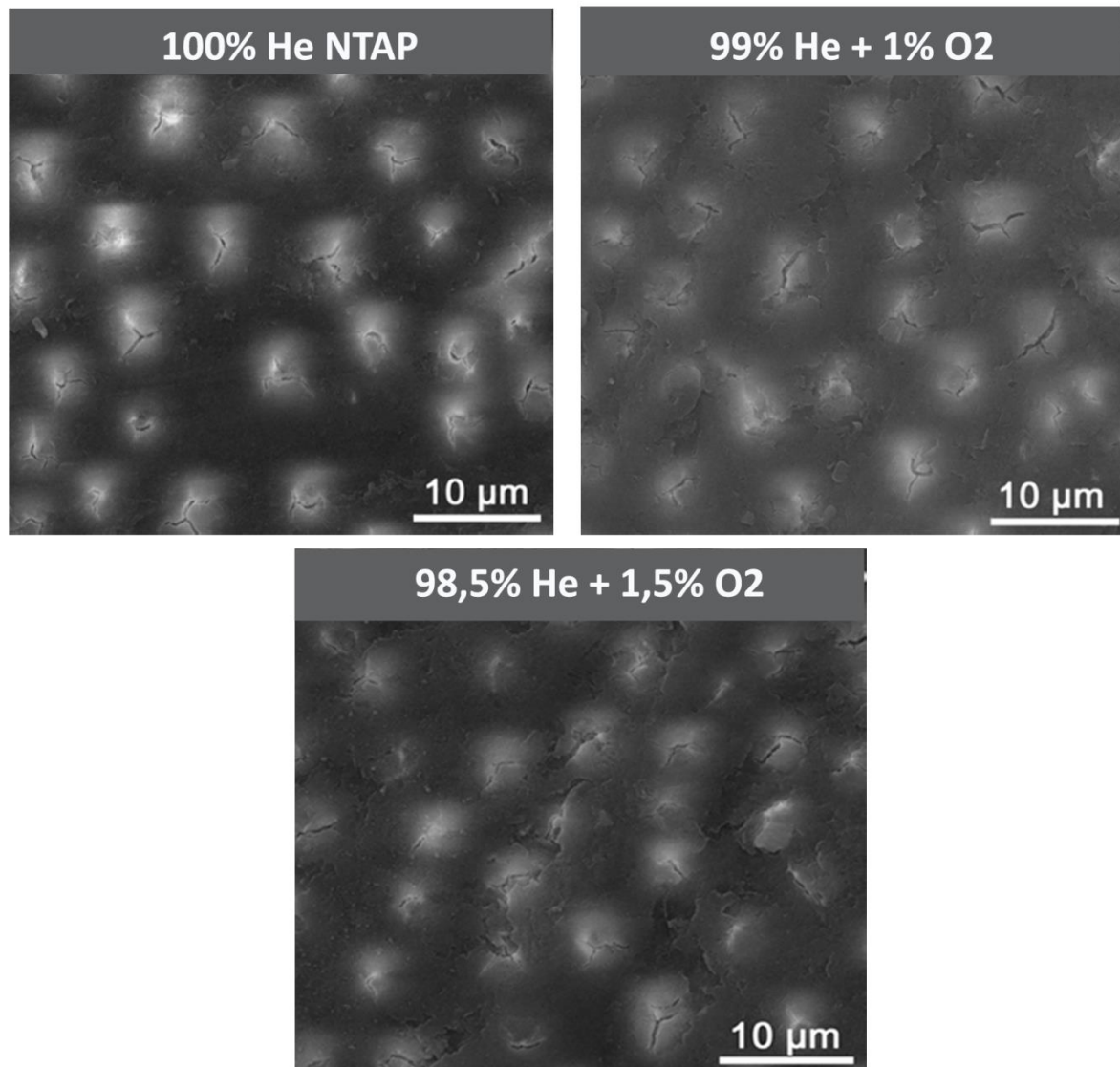
#### 4. Elementarni sastav površine dentina nakon tretmana NTAP ili ortofosfornom kiselinom



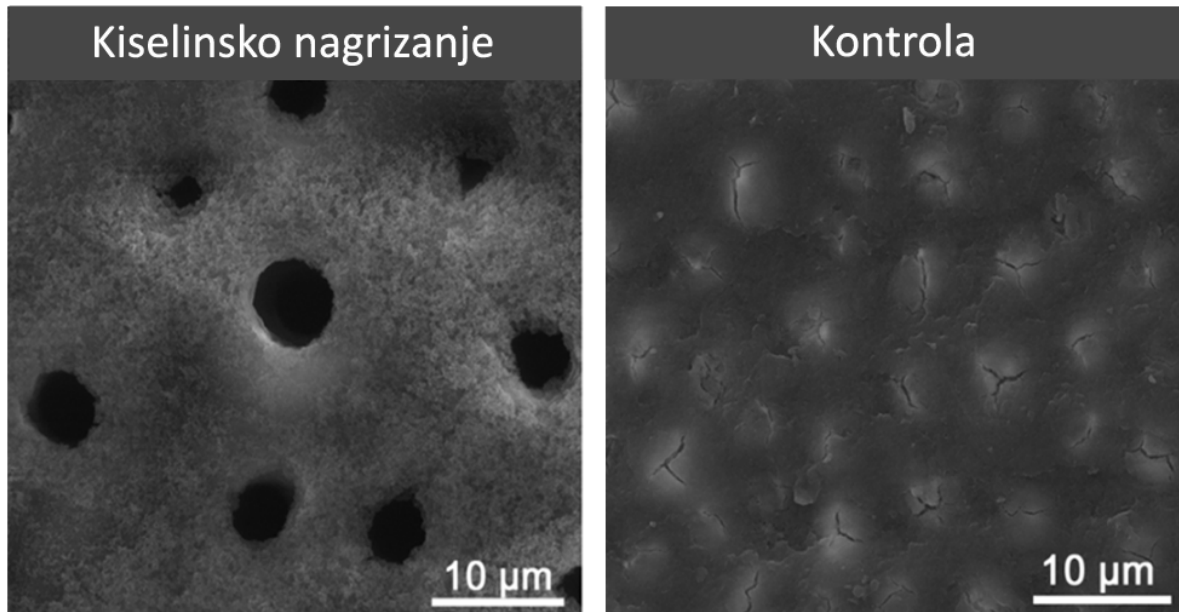
**Grafikon 9.** Atomski procenat N, O, P, Ca na površini dentina nakon različitih tretmana.

EDS analizom je nakon tretmana NTAP u sastavu površinskog dela dentina uočen niži procenat O, a viši procenat Ca, P i N. Suprotan nalaz je zabeležen nakon nagrizanja dentina ortofosfornom kiselinom, kada je registrovan porast O, a smanjenje Ca, P i N u površinskom sastavu dentina (**Grafikon 9.**).

## 5. Površinska struktura dentina nakon NTAP tretmana ili ortofosforanom kiselinom



**Slika 16.** SEM mikrografija dentina nakon tretmana NTAP u režimima sa čistim He i He sa dodatkom 1% i 1,5% O<sub>2</sub>.



**Slika 17.** SEM mikrografija netretiranog dentina i dentina nakon nagrivanja 32% ortofosfornom kiselinom.

Na **slikama 16. i 17.** prikazane su SEM mikrografije dentina nakon tretmana različim režimima NTAP, kao i nakon nagrivanja ortofosfornom kiselinom. Nakon tretmana NTAP nisu uočene mikromorfološke razlike u poređenju sa kontrolnom, netretiranom površinom dentina. Prikazana površina dentina odgovara onoj kada se primenjuje protokol samonagrivanja, tj. kada se površina dentina ne tretira kiselinskim agensima pre aplikacije adheziva. Nagrivanje ortofosfornom kiselinom dovelo je do uklanjanja razmaznog sloja, eksponiranja kolagenih vlakana i otvaranja dentinskih kanalića, što je klasična mikrografija površine dentina koja odgovara protokolu totalnog nagrivanja.

## DISKUSIJA

### Temperatura u komori pulpe

Tokom sprovođenja različitih stomatoloških zahvata na zubima (preparacija kaviteta, poliranje ispuna, brušenje zuba), kao i tokom polimerizacije materijala na bazi smola može doći do povećanja intrapulpne temperature. Takođe, usled hemijskog vezivanja materijala oslobađa se toplota kao posledica egzotermne reakcije. Oslobađanje toplote na ovaj način može dovesti do reverzibilnih promena u pulpnom tkivu. Međutim, porast intrapulpne temperature iznad 5,5 °C može dovesti do ireverzibilnih promena u vezivnog tkivu pulpe (Scheinin, 1958; Zach, 1965).

Tokom različitih tretmana NTAP dolazi do povećanja temperature u komori pulpe. U literaturi se navode različite metode merenja temperature zuba tokom izlaganja izvoru NTAP. Sladek i saradnici (Sladek et al, 2004) merili su temperaturu u komori pulpe tokom plazma tretmana pomoću temperaturnih detektora na bazi platine, dok su Lehmann i saradnici merili temperaturu na površini uzorka pomoći infracrvene kamere (Lehmann et al, 2013).

Sladek i saradnici (Sladek et al, 2004) su plasirali temperaturni detektor kroz distalni kanal i merili temperaturu u komori pulpe tokom 60 s plazma tretmana površine dentina pri rastojanju NTAP izvora od 1 mm. Dobili su da povećanje temperature za 2,3 °C pri tretmanu snage 220 mV (Sladek et al, 2004). Lehmann i saradnici (Lehmann et al, 2013) su merili temperaturu površine dentina tokom plazma tretmana uz pomoć infracrvene kamere. Pri rastojanju NTAP izvora od 2 mm i snazi od 2 W, temperatura površine dentina iznosila je  $32,4 \pm 1,1$  °C.

U pilot studiji za merenje temperature koristili smo termopar K-tipa koji je bio u kontaktu sa krovom komore pulpe. Uzorci su bili fiksirani u sunderu i držani u vodenom kupatilu tokom trajanja tretmana. Početna temperatura u pulpnoj komori bila je u klinički relevantnom opsegu od 36-37 °C. Merenjem temperature u komori pulpe pomoću termopara K-tipa uočeno je da sa porastom snage predate plazmi dolazi i do porasta temperature. Najveći porast temperature u komori pulpe zabeležen je tokom tretmana plazmom u režimu 2 W, 5 mm ( $48,30 \pm 1,15$  °C) u odnosu na temperaturu tokom prosvetljavanja LED lampom ( $44,20 \pm 7,19$  °C). Dobijena apsolutna vrednost temperature u studiji Lehmann i saradnika (Lehmann et al, 2013) je niža nego u našem radu, ali je u njihovoj studiji početna temperatura zuba bila oko 20 °C, dok je u našem radu početna temperatura zuba bila 36-37 °C. Upoređujući porast temperature između 12-13 °C u obe studije može se zaključiti da su dobijeni rezultati komparabilni. Podaci u radu

Sladek i saradnika (Sladek et al, 2004) ukazuju da je merenje temperature u komori pulpe vršeno na sobnoj temperaturi, međutim nije zabeležena vrednost ambijentalnih uslova.

Režim NTAP od 2 W i 5 mm doveo je do pojave prslina na površini dentina. Iako su dentinski uzorci bili hidratizirani, kao potencijalno objašnjenje za pojavu prslina može biti količina toplote koja se prenese na dentin i samo zagrevanje površine dentina.

Svrha ove pilot studije bila je da omogućiti uvid u temperaturne promene u komori pulpe tokom tretmana NTAP nakon primene konkretnog plazma izvora, kako bi se za kasnije eksperimente mogao odrediti opseg parametara kojim su definisani pojedini plazma režimi. U ovom delu istraživanja nije rađena statistička analiza, jer je od većeg značaja klinička relevantnost umesto statističke značajnosti rezultata. Imajući u vidu postojanje granične temperature koja predstavlja potencijalni biološki rizik za pulpno tkivo, od kliničkog značaja je da li i u kom trajanju određeni tretman izaziva porast temperature iznad graničnih vrednosti, a ne da li između tretmana postoji statistički značajna razlika.

U pilot studiji nije simulirana intrapulpna mikrocirkulacija tako da rezultati predstavljaju "najgori scenario" odnosno može se očekivati da su temperaturne promene najviše za date uslove. Rezultati su pokazali da ispitivani početni režimi u prvih 30 s tretmana nisu prouzrokovali porast temperature preko granične vrednosti od 42,5 °C. Maksimalne temperature jesu dostigle znatno više vrednosti, ali tek posle više od 120 s tretmana, dok su granične vrednosti temperature prevaziđene posle 50-60 s tretmana. Zbog toga je odlučeno da u narednoj fazi istraživanja bude korišćen režim NTAP sa 1 W i 3 W i rastojanjima 2 mm do 8 mm, ali da se vreme tretmana skрати na 30 s. Tako je uticaj NTAP na površinska svojstva dentina ispitivan u klinički relevantnom ekspozicionom periodu, pri čemu se očekivalo da toplotni efekti ne pređu gornje granične vrednosti. U daljim eksperimentima nije ispitivan biološki uticaj NTAP na pulpno tkivo, već je istraživanje ograničeno na fizičko-hemijske efekte na dentinu. Uticaj NTAP na vitalno tkivo pulpe bi trebalo ispitati u daljim istraživanjima.

## **Kontaktни ugao**

**Prva hipoteza** je prihvaćena, odnosno došlo je do značajnog smanjenja kontaktnog ugla nakon svih tretmana NTAP u poređenju sa standardnom tehnikom nagrizanja ortofosfornom kiselinom.

Sposobnost kvašenja površine dentina određuje se merenjem kontaktnog ugla. Kontaktni ugao se definiše kao ugao koji u tački dodira tri sredine (gas, tečnost i čvrsta površina) gradi poluravan koja je tangenta na površini gas/tečnost i poluravan koja je tangenta na površini tečnost/čvrsta površina (Stamenković et al, 2009a).

Prema Young (Young, 1805), kontaktni ugao ( $\cos \theta_Y$ ) je pod dejstvom tri međupovršinska napona određen mehaničkom ravnotežom kapljice u jednačini:

$$\gamma_{lv} \cos \theta_Y = \gamma_{sv} - \gamma_{sl},$$

gde  $\gamma_{lv}$ ,  $\gamma_{sv}$  i  $\gamma_{sl}$  predstavljaju tečnost-gas, čvrsta supstanca-gas i čvrsta supstanca-tečnost međupovršinski napon. Ova formula daje podatke o vrednostima kontaktnog ugla i međupovršinskom naponu.

Na osnovu aktuelne terminologije po Marmur i saradnicima (Marmur et al, 2017), kontaktni ugao na ravnoj površini definiše se kao idealan kontaktni ugao. Stabilnost kontaktnog ugla u smislu njegove osetljivosti zavisi od geometrije, stepena kontaminacije, stepena deformacije i hrapavosti površine (Marmur et al, 2017). Neophodna je dobra priprema uzoraka, kako bi vrednosti kontaktnog ugla bile što tačnije. U literaturi postoje podaci o poliranju uzoraka radi dobijanja glatke površine pre merenja kontaktnog ugla (Busscher et al, 1983; Drelich et al, 1997; Vargha-Butler et al, 1986). Tokom pripreme uzoraka u našem radu ravna površina dentina dobijena je pomoću linearne testere, a kasnije i abrazivnim diskom abrazivnosti 600. Površina dentina nije polirana do visokog sjaja, jer rezultati ne bi imali kliničku značajnost. Tretman površine dentina diskovima abrazivnosti 600 predstavlja prihvaćenu metodu dobijanja "razmaznog" sloja koji odgovara kliničkim uslovima preparacije kaviteta (Mine et al, 2014).

Postoje direktne i indirektne metode merenja kontaktnog ugla. U direktne metode ubrajaju se merenje goniometrom, metod zarobljenog mehura (captive bubble), metod nagibne ploče i individualni fiber. Indirektne metode obuhvataju Wilhemov balansni metod, metod kapilarnog povećanja na vertikalnoj ploči, kapilarnu tubu, metod kapilarnog mosta (Yuan, 2013).

Direktno merenje veličine kapljice na ravnoj, horizontalnoj čvrstoj površini predstavlja „sessile drop“ metodu (Young, 1805). Podaci iz literature pokazuju veliku zastupljenost ove metode merenja kontaktnog ugla (Brajkovic et al, 2014; Busscher et al, 1984; Hirata et al, 2015; Ishii et al, 2015; Koban et al, 2011; Silva et al, 2011; Valverde et al, 2013). Pomenuto je da postoje različite metode direktnog merenja, pa tako pored najčešće metode direktnog

merjenja uz pomoć goniometra (Armengol et al, 2003; Chen, 2013; Dong et al, 2014; Dong, 2015; Koban et al, 2011; Lehmann et al, 2013) moguće je istu izvesti uz pomoć pipete koja je fiksirana za stalak. U našem radu, vrh pipete nalazio se na udaljenosti 4 mm od površine uzorka, a fotografisanje kapljice obavljeno je 1 s nakon dodira kapljice sa površinom dentina. U literaturi postoje podaci o vremenu fotografisanja kapljice i ono iznosi 2 s (Busscher et al, 1984), 3 s (Brajkovic et al, 2014), 5 s (Chen, 2013; Dong et al, 2014; Dong, 2015) nakon dodira kapljice sa površinom uzorka. Vreme fotografisanja kapljice je od velike važnosti za standardizaciju rezultata, naročito kod isparljivih referentnih tečnosti, kapljica malih dimenzija i malih kontaktnih uglova.

Izračunavanje vrednosti kontaktnog ugla obavljeno je pomoću softverskog programa Image J (Rasband, 1997-2018.) primenom matematički složene tehnike sadržane u LBADSA (Low Bond Axisymmetric Drop Shape Analysis) plugin-u (Stalder et al, 2010). LBADSA plugin koristi pet varijabli (b, x, y, h i d) za analizu projektovane slike kapljice (Williams et al, 2010).

Nakon svih tretmana NTAP (100% He; 99% He+1% O<sub>2</sub>; 98,5% He+1,5% O<sub>2</sub>) uočeno je značajno smanjenje kontaktnog ugla kod svih referentnih tečnosti u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke. Uopšteno vrednosti kontaktnog ugla nakon tretmana NTAP (100% He) kretale su se od 5,96°-69,1°. Kod plazma tretmana sa dodatkom O<sub>2</sub>, vrednosti kontaktnog ugla su bile u rasponu od 5,96° do 17,35° (1% O<sub>2</sub>), odnosno 5,87-16,98° (1,5% O<sub>2</sub>).

Nakon aplikacije 32% ortofosforne kiseline u trajanju od 15 s vrednosti kontaktnog ugla destilovane vode (36,44±9,85°) su bile značajno manje u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke (84,24±2,61°). Što se ostalih referentnih tečnosti tiče, vrednosti kontaktnog ugla bile su značajno manje kod etilen-glikola (27,96±7,24°) u odnosu na dijud-metan (44,77±7,52°). Vrednosti kontaktnog ugla za destilovanu vodu bile su slične rezultatima Rosales i saradnika (Rosales et al, 1999) koji su tretirali dentin 10% ortofosfornom kiselinom. Dobili su značajno smanjenje kontaktnog ugla prečišćene vode (25±04°) u odnosu na kontrolne uzorke (68±14°) (Rosales et al, 1999).

U radu Lehmann i saradnika (Lehmann et al, 2013) nakon tretmana NTAP došlo je do značajnog smanjenja kontaktnog ugla kod obe referente tečnosti (destilovana voda<10°, etilen-glikol~15°) u odnosu na kontrolne uzorke (>50°). Vrednosti kontaktnog ugla nakon aplikacije 37,5% ortofosforne kiseline bile su manje kod destilovane vode (~35°). Uočili su da je veće kvašenje površine dentina postignuto nakon tretmana NTAP (<10°), nego nakon

aplikacije ortofosforne kiseline (Lehmann et al, 2013). Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima dobijenim u našoj studiji.

Han i saradnici (Han et al, 2014) su merili kontaktni ugao nakon tretmana površine dentina NTAP i nakon aplikacije ortofosforne kiseline. Uočili su da je površina dentina nakon nagrizanja ortofosforom kiselinom postala hidrofiličnija. Nakon tretmana NTAP sa He kao radnim gasom, vrednost kontaktnog ugla je bila manja od 10° (Han et al, 2014). U istraživanju Dong i saradnika (Dong, 2015) dobijeni su slični rezultati. Nakon tretmana NTAP uočeno je bolje kvašenje dentina, tj. vrednost kontaktnog ugla bila je manja (<10°) u odnosu na tretman ortofosforom kiselinom (>30°) (Dong, 2015).

Razlike u ponašanju referentnih tečnosti nakon nagrizanja ortofosforom kiselinom, odnosno izrazito smanjenje kontaktnog ugla destilovane vode, odsustvo promene kod etilen-glikola i čak blago povećanje kontaktnog ugla dijud-metana u odnosu na kontrolne netretirane uzorke ukazuje na značaj ispitivanja kontaktnog ugla više referentnih tečnosti pre zaključivanja o površinskim svojstvima dentina. Ovo je pogotovo bitno pre analize interakcije sa adhezivnim sistemima, imajući u vidu njihov kompleksan sastav i činjenicu da voda predstavlja samo jednu komponentu dok monomerni sistem može bitno odstupati u pogledu polarnosti u odnosu na destilovanu vodu. Za detaljnije objašnjenje uočenih razlika u ponašanju referentnih tečnosti, neophodno je analizirati komponente površinske energije, što je dato u sledećem odeljku.

### **Površinska energija**

Prema Fowkes i saradnicima, površinska energija se sastoji od različitih komponenti koje potiču od brojnih međumolekularnih interakcija (Fowkes, 1972). Oni su analizirali dvofazne sisteme (tečnost, čvrsta supstanca) gde je prisutna samo disperziona (nepolarna) interakcija.

Kao dopunu Fowkes jednačine, Owens i saradnici (Owens, 1969) uvode jednačinu za određivanje i polarne i nepolarne komponente. Prema njima površinska energija predstavlja skup dve različite tečnosti (polarne i nepolarne komponente). Oni koriste metodu geometrijske sredine kao metodu izračunavanja površinske energije:

$$(1 + \cos \gamma_i) \gamma_{Li} = 2 \left( \sqrt{\gamma_{Li}^{LW} \gamma_S^{LW}} + \sqrt{\gamma_{Li}^P \gamma_S^P} \right),$$

gde oznaka  $i$  označava broj tečnosti. Skup vodonikovih, kiselo-baznih i indukovanih interakcija opisuju polarnu komponentu. Napolarna komponenta opisuje snagu intermolekularnih interakcija.

Wu i saradnici (Wu, 1971) za izračunavanje površinske energije uz pomoć dve tečnosti koriste metod harmonijske sredine:

$$(1 + \cos \theta_i) \gamma_{Li} = 4 \left( \frac{\gamma_{Li}^{LW} \gamma_S^{LW}}{\gamma_{Li}^{LW} + \gamma_S^{LW}} + \frac{\gamma_{Li}^P \gamma_S^P}{\gamma_{Li}^P + \gamma_S^P} \right)$$

U svim navedenim formulama,  $\gamma_S$  predstavlja površinsku energiju čvrste supstance, a  $\gamma_L$  površinsku energiju tečnosti.

Van Oss-Chaudhury-Good metod se zasniva na acidno-baznoj teoriji. Ovi autori smatraju da intermolekularne interaktivne veze tečnosti i površine mogu biti dugog dometa (Lifshitz-van der Waals) i kratkog dometa ( $d < 100 \text{Å}$ ) (polarne\_kiselo-bazne). Lifshitz-van der Waals interakcije sadrže komponente koje su bazirane na disperzionim, indukcionim i dipol-dipol interakcijama. Kiselo-bazne interakcije sadrže komponente bazirane na donor-akceptorim, elektrostatičkim, vodoničnim interakcijama. Ovaj metod koristi iste komponente sa razlikom u opisu polarne komponente. Polarna komponenta sastoji se od Lewis baznog (elektron-donor) i Lewis kiselog (elektron-akceptor) dela na osnovu acido-bazne teorije (Van Oss et al, 1988; Van Oss, 1987).

Površinska energija čvrste materije ( $\gamma_S$ ) i njene komponente ( $\gamma_S^{LW}$ ,  $\gamma_S^+$ ,  $\gamma_S^-$ ) izračunavaju se prema formuli:

$$(1 + \cos \theta) \gamma_L = 2 \left( \sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \right),$$

na osnovu vrednosti kontaktnog ugla referentnih tečnosti ( $L \geq 3$ ) i njihovih poznatih parametara površinske energije (Oss et al, 1987), (Van Oss et al, 1988).

U našoj studiji korišćena je van Oss-Chaudhury-Good termodinamička metoda. Na osnovu ove formule mogu se odrediti kiselo-bazna svojstva ispitivane površine i objasniti svojstva međupovršinske interakcije radi boljeg uvida u način mogućeg tretmana za modifikovanje površine. Problemi van Oss-Chaudhury-Good metode izračunavanja površinske energije odnose se na kiselo-bazne komponente. Kao glavne probleme, Volpe i saradnici (Della Volpe, 2000) navode:

- 1) Velika baznost svih površina zbog veće zastupljenosti Lewis baznog dela. Veća prisutnost baznog dela je zbog vrednosti vode koja je polarna. Da bi se prevazišao ovaj problem, moguće je poređenje vrednosti Lewis kiselih delova sa vrednostima kiselih delova drugih površina, jer poređenje Lewis kiselog dela sa baznim delom kod iste površine nema efekta.
- 2) Zavisnost rezultata od pravilnog izbora referentnih tečnosti.
- 3) Negativne vrednosti koje se dobijaju za kvadratne korene kiselo-baznih parametara kao posledica merne nesigurnosti.

Za dobijanje adekvatnih vrednosti površinske energije dentina i njenih komponenti od presudnog je značaja izbor referentnih tečnosti. Kvadratni koren komponenti površinske energije ispitivane površine zavisi od linearnog skupa tri jednačine sa tri varijable. Stoga za pravilni odabir referentnih tečnosti neophodno je izračunavanje broja uslova (condition number\_  $C_n$ ) za svaki triplet tečnosti. Velika vrednost  $C_n$  ukazuje na postojanje veće osetljivosti rezultata na zaokruživanje i greške u podacima, dok se male vrednosti odnose na postojanje tripleta sa čisto polarnim i nepolarnim tečnostima. Zbog hemijskih pojava kao što su bubrenje, nemogućnost apsorpcije sužava se dijapazon tečnosti. Primenom van Oss-Chaudhury-Good formule za izračunavanje površinske energije neophodna je primena referentnih tečnosti sa malim vrednostima  $C_n$  (Della Volpe, 2000).

Hollander i saradnici (Holländer, 1995) navode da kod određenih parova polarnih referentnih tečnosti tokom izračunavanja površinske energije čvrste materije velike promene u vrednostima Lewis baznog i Lewis kiselog dela mogu nastati zbog male eksperimentalne greške. Oni su za svaku referentnu tečnost definisali količinu ( $Q_r$ ).  $Q_r$  predstavlja količnik Lewis baznog i Lewis kiselog dela tečnosti i izračunava se pomoću formule:

$$Q_r = \gamma_L^- / \gamma_L^+$$

Za triplet referentnih tečnosti (dve polarne i jedna nepolarna) neophodno je da vrednost  $Q_r$  bude što veća i da ne bude manja od 3. Veća vrednost  $Q_r$  ukazuje na raznolikost polarnih tečnosti u pogledu kiselosti/baznosti (Holländer, 1995).

Kao referentne tečnosti za merenje kontaktnog ugla u ovom radu su korišćene destilovana voda, etilen-glikol i dijud-metan.  $C_n$  primenjenog tripleta tečnosti iznosi 6,28 (Della Volpe, 2000), a  $Q_r$  vrednost je 9 (Holländer, 1995). Na osnovu vrednosti  $C_n$  i  $Q_r$  može se zaključiti

da je izbor referentnih tečnosti adekvatan za merenje kontaktnog ugla i izračunavanje površinske energije dentina.

Destilovana voda i etilen glikol karakterišu se polarnim osobinama, dok je dijud-metan nepolarna tečnost. Na osnovu vrednosti komponenti površinske energije referentnih tečnosti uočava se da je destilovana voda amfoterna tj. može biti i kiselina i bazna tečnost, dok je etilen-glikol bazna tečnost.

Literaturni podaci ukazuju na ogromnu primenu destilovane vode kao jedine referentne tečnosti za merenje kontaktnog ugla (Dong et al, 2014; Dong, 2015; Koban et al, 2011). Destilovana voda tokom interakcije sa dentinom koji je tretiran NTAP pokazuje smanjenje vrednosti kontaktnog ugla što nam može dati samo prividnu sliku o efektu NTAP (hidrofilnost). Za bolje razumevanje interakcije tretirane površine NTAP i različitih tečnosti neophodna je upotreba dodatnih referentnih tečnosti koje se razlikuju po svojim osobinama.

Površinska energija tečnosti ( $\gamma_L$ ) jednaka je zbiru nepolarnih i polarnih komponenti prema pravilu aditivnosti:

$$\gamma_L = \gamma_L^{LW} + \gamma_L^{AB}, \text{ pri čemu je } \gamma_L^{AB} = 2\sqrt{\gamma_L^+ \gamma_L^-}$$

U našem radu dobijene vrednosti površinske energije su bile obrnuto proporcionalne vrednostima kontaktnog ugla. Uočeno je povećanje vrednosti površinske energije nakon svih tretmana NTAP, kao i nakon aplikacije ortofosforne kiseline na dentin u odnosu na netretirane, kontrolne uzorke. Nakon tretmana sa 100% He plazmom vrednosti površinske energije kretale su se od 58,76 do 96,3 mJ/m<sup>2</sup>. Prisustvo O<sub>2</sub> dovelo je do dodatnog povećanja vrednosti površinske energije (1% O<sub>2</sub> 94,30-97,14 mJ/m<sup>2</sup>; 1,5% O<sub>2</sub> 94,42-96,86 mJ/m<sup>2</sup>) u odnosu na uzorke tretirane čistom He plazmom naročito pri nižoj snazi (90,49±3,26 mJ/m<sup>2</sup>) i kontrolne, netretirane uzorke (42,79±3,01 mJ/m<sup>2</sup>). Statistička značajnost nije zabeležena između tretmana NTAP sa dodatkom 1% O<sub>2</sub> i 1,5% O<sub>2</sub>.

Veće vrednosti površinske energije zabeležene su nakon aplikacije 32% ortofosforne kiseline (76,08±4,24 mJ/m<sup>2</sup>) u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke (42,79±3,01 mJ/m<sup>2</sup>). Ovaj rezultat ukazuje da efekti ortofosforne kiseline doprinose boljim površinskim svojstvima dentina, ali u manjoj meri nego NTAP.

Armengol i saradnici (Armengol et al, 2003) tretirali su površinu dentina 37% ortofosfornom kiselinom. Analizirali su mikromorfološke promene i hemijske karakteristike dentina i uočili da je nakon aplikacije ortofosforne kiseline u trajanju od 15 s došlo do značajnog porasta

površinske energije u odnosu na kontrolne uzorke. Hidrofilnost površine raste nakon tretmana ortofosfornom kiselinom (Armengol et al, 2003). Do suprotnih nalaza su došli Attal i saradnici (Attal et al, 1994). Oni nisu uočili promenu površinske energije dentina nakon primene 37% ortofosforne kiseline (Attal et al, 1994). Različiti rezultati iz aktuelne i pomenutih studija bi se mogli objasniti razlikama u post-kiselinskom tretmanu dentina, odnosno u fazi sušenja. Poznato je da je ova faza kritična nakon kiselinskog nagrivanja dentina zbog mogućeg presušivanja ili nedovoljnog sušenja dentina, pri čemu ne postoji jasan protokol faze sušenja u kliničkoj praksi koji bi se precizno povezao sa određenim stepenom rezidualne vlažnosti. Sa druge strane, presušivanje dentina dovodi do kolapsa kolagenih vlakana usled gubitka rezidualne vode iz interfibrilarnih prostora (Pashley et al, 2011).

Kod uzoraka koji su tretirani 100% He NTAP, tretirane površine su poprimile polarne osobine ( $52,67 \text{ mJ/m}^2$  3 W, 2 mm) i veća je bila zastupljenost Lewis baznog dela ( $61,62 \text{ mJ/m}^2$  3 W, 2 mm). Odstupanje od ovih rezultata prisutno je kod režima 1 W, 8 mm gde je tretirana površina bila nepolarnog karaktera ( $42,04 \text{ mJ/m}^2$ ) i sa većom zastupljenošću Lewis kiselog dela ( $58,59 \text{ mJ/m}^2$ ). Dodatak  $\text{O}_2$  doveo je do povećanja polarne (1%  $\text{O}_2$   $53,87 \text{ mJ/m}^2$ ; 1,5%  $\text{O}_2$   $53,89 \text{ mJ/m}^2$ ) i Lewis bazne komponente (1%  $\text{O}_2$   $65,97 \text{ mJ/m}^2$ ; 1,5%  $\text{O}_2$   $65,80 \text{ mJ/m}^2$ ) u odnosu na čistu He plazmu. Površina kontrolnih, netretiranih uzoraka bila je nepolarna ( $35,51 \text{ mJ/m}^2$ ) i sa izraženom Lewis kiselom komponentom ( $53,10 \text{ mJ/m}^2$ ), što je slično pri režimu 100% He plazme (1 W, 8 mm). Pomenuti režim je pokazao i znatno manji uticaj na kontakni ugao referentnih tečnosti u odnosu na druge tretmane, što je u skladu i sa rezultatima površinske energije. Ovi nalazi ukazuju da režim 1 W, 8 mm predstavlja režim male snage i velike udaljenosti koji ostvaruje veoma limitirani efekat na površinska svojstva dentina.

Aplikacija ortofosforne kiseline dovela je do promene polarosti površine (polarna komponenta  $43,72 \text{ mJ/m}^2$ ; Lewis bazni deo  $49,67 \text{ mJ/m}^2$ ), kao i tretmani NTAP ali su vrednosti bile manje u odnosu na plazma tretmane. Ovi nalazi su u skladu i sa rezultatima kontaktnih uglova referentnih tečnosti koje su pokazale manju promenu nakon kiselinskog nagrivanja u odnosu na plazma tretman.

Površina dentina u kontrolnoj, netretiranoj grupi pokazala je hidrofobni i nepolarni karakter. Imajući u vidu metodologiju sečenja i pripreme, ova grupa se generalno shvata kao analog preparisanom dentinu sa razmaznim slojem. Vrednosti polarne, nepolarne komponente i Lewis baznog dela su se povećale nakon tretmana NTAP, dok je vrednost Lewis kiselog dela opala u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke. Nakon tretmana ortofosfornom kiselinom

povećana je polarna komponenta i njen Lewis bazni deo, dok su smanjene nepolarna komponenta i Lewis kiseli deo polarne komponente.

Hirata i saradnici (Hirata et al, 2015) dobili su podatke koji pokazuju da nakon tretmana NTAP u trajanju od 30 s dolazi do značajnog porasta površinske energije i polarne komponente u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke (Hirata et al, 2015), što je u skladu i sa našim rezultatima. Za izračunavanje površinske energije Hirata i saradnici (Hirata et al, 2015) su koristili Owens-Wendt formulu koja daje podatke samo o polarnim i nepolarnim karakteristikama. Naša studija za proračun/izračunavanje površinske energije koristi van Oss-Chaudhury-Good formulu koja daje dodatne informacije o polarnoj komponenti (acido-bazne karakteristike).

U radu Silva i saradnika (Silva et al, 2011) nakon tretmana površine titanijuma i cirkonijuma izvorom NTAP došlo je do sličnih promena površinske energije kao u našem radu i u radu Hirata i saradnika (Hirata et al, 2015). Nakon tretmana NTAP u trajanju od 5, 10 i 20 s uočen je značajan porast površinske energije i njene polarne komponente u odnosu na kontrolne, netretirane površine (Silva et al, 2011). Slične podatke po pitanju promene komponenti (značajni porast polarne komponente) dobili su Valverde i saradnici (Valverde et al, 2013) koji su izvorom NTAP tretirali površinu itrijum stabilizovane keramike. U ovim studijama (Silva et al, 2011), (Valverde et al, 2013) korišćena je formula za izračunavanje polarnih i nepolarnih komponenti površinske energije (Owens-Wendt formula) bez dobijanja informacija o kiselu/baznim karakteristikama.

Nepolarna komponenta površinske energije daje podatke o nepolarnim interakcijama između molekula ispitivane površine i referentne tečnosti. Ona je određena hrapavošću, neravninama i razgranatošću površine polimera. Polarna komponenta suprotno nepolarnoj karakteriše se polarnim interakcijama između ispitivane površine i referentne tečnosti. Zastupljenost polarne komponente zavisi od prisustva polarnih grupa, električnih naboja i slobodnih radikala na ispitivanoj površini. Kod tretmana NTAP sa dodatkom O<sub>2</sub> povećava se polarna komponenta (Fridman A, 2008c), što je uočeno i u našem radu.

Smanjenje kontaktnih uglova sve tri referentne tečnosti nakon NTAP tretmana može se objasniti povećanjem udela i polarne i nepolarne komponente površinske energije dentina čime je facilitirana interakcija i polarnih i apolarnih referentnih tečnosti sa odgovarajućim molekulskim grupama na površini dentina. S druge strane, kiselinsko nagrizanje značajno je smanjilo kontaktni ugao destilovane vode ali ne i etilen-glikola, iako su obe tečnosti polarne. Razlike između destilovane vode i etilen-glikola mogu se objasniti nesto višim udelom

nepolarne komponente površinske energije etilen-glikola (**Tabela 4.**) u odnosu na destilovanu vodu, zbog čega je smanjenje nepolarne komponente površinske energije dentina u izvesnoj meri neutralisalo uticaj povećanog Lewis baznog dela na ukupnu promenu kontaktnog ugla etilen-glikola. Nesto veći kontaktni ugao apolarnog dijud-metana na kiselinom nagriženom dentinu može se objasniti smanjenjem nepolarne komponente površinske energije dentina. To znači da je kvašenje dentina za apolarne tečnosti lošije nakon kiselinskog nagrizanja što može imati uticaj na interakciju sa adhezivima koji u svom sastavu imaju takve monomere.

Attal i saradnici (Attal et al, 1994), dobili su podatke da je nakon aplikacije 37% ortofosforne kiseline površina dentina zadržala iste osobine u odnosu na kontrolu (dentin prekriven razmaznim slojem). Kod obe površine dentina prisutna je veća zastupljenost nepolarne komponente površinske energije i Lewis baznog dela polarne komponente. Veću zastupljenost Lewis bazne komponente pripisali su prisustvu  $\text{NH}_2$  grupa iz dentinskih tubula, kao i prisustvu atmosferskog kontaminiranog sloja. Ovaj zaključak se slaže sa navodima Congard i saradnika (Congard, 1987) koji baznost površine dentina koji je prekriven razmaznim slojem povezuju sa hemijskim sastavom dentina i prisustvom atmosferskog kontaminiranog sloja.

Da do polarnosti površine dentina dolazi nakon aplikacije ortofosforne kiseline (37%) dokazali su Armengol i saradnici (Armengol et al, 2003). Oni su kao metod za izračunavanje površinske energije koristili Owens-Wendt formulu koja daje informacije o polarnoj i nepolarnoj komponenti bez prisustva kiselo-baznih podataka (Armengol et al, 2003).

### **Efekti različitih NTAP režima na površinska svojstva dentina**

Smanjenjem rastojanja plazma igle od površine uzorka, povećanjem snage i dodatkom  $\text{O}_2$  pojačava se efekat NTAP na površinska svojstva dentina, čime je **druga hipoteza** prihvaćena.

Nakon tretmana sa 100% He kao gasom, pri režimu 1 W, 8 mm vrednosti kontaktnog ugla bile su značajno veće u odnosu na ostale plazma režime. Ove vrednosti ( $69,1 \pm 5,65^\circ$ ) su bile približne vrednostima kontaktnog ugla kod kontrolnih, netretiranih uzoraka ( $84,24 \pm 2,61^\circ$ ).

Što se tiče rastojanja između površine dentinskog diska i vrha plazma igle, kao i snage pokazali smo da je kod 100% He plazme u grupi sa destilovanom vodom došlo do značajnog smanjenja kontaktnog ugla sa povećanjem snage (3 W).

Za plazma tretmane na tvrdim zubnim tkivima najčešće primenjivani režimi bili su pri snagama od 2 W do 5 W (Dong et al, 2014; Dong, 2015; Lehmann et al, 2013; Ritts et al, 2010; Šantak et al, 2017; Zhang et al, 2014). U literaturi postoje podaci i o primeni većih

snaga pri tretmanima NTAP na dentinu (Chen et al, 2014; Chen, 2013; Hirata et al, 2015; Ritts et al, 2010).

Šantak i saradnici (Šantak et al, 2017) analizirali su efekat NTAP na tvrdnim zubnim tkivima tokom različitog trajanja tretmana. Nakon 30 s trajanja tretmana, uočili su smanjenje kontaktnog ugla ( $9\pm 3^\circ$ ) u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke ( $<75^\circ$ ). Međutim, nakon 24 h došlo je do povećanja kontaktnog ugla za oko tri puta ( $24^\circ$ ). Kod dužih plazma tretmana zabeležena je stabilnija površinska modifikacija, odnosno manji naknadni porast kontaktnog ugla (Šantak et al, 2017).

Sa dodatkom 1%  $O_2$  u grupama sa destilovanom vodom i dijud-metanom uočeno je da povećanje snage dovodi do smanjenja kontaktnog ugla.

Dodatak  $O_2$  je doveo do još izrazitijeg smanjenja kontaktnog ugla i povećanja površinske energije u odnosu na čistu He plazmu. Međutim, između različitih procentualnih zastupljenosti  $O_2$  u smešama gasova (1% i 1,5%) nije bilo značajne razlike u pogledu vrednosti kontaktnog ugla.

U radu Koban i saradnika (Koban et al, 2011) korišćen je izvor NTAP sa Ar kao radnim gasom i smešama gasova ( $Ar+0,2\% O_2$ ;  $Ar+1\% O_2$ ) za tretman površine dentina. Dodatak 1%  $O_2$  doveo je do boljeg kvašenja površine dentina u odnosu na 0,2%  $O_2$  i čistu Ar plazmu (Koban et al, 2011). Ovaj rezultat ukazuje da bi za dalja ispitivanja trebalo koristiti vrednosti koje su jednake ili veće od 1%  $O_2$ , kao što je primenjeno u našem radu.

Pozitivan uticaj  $O_2$  na efekte plazme ogleda se u formiranju većeg broja reaktivnih molekulskih grupa na površini dentina poput OH, CO grupa (Lehmann et al, 2013; Ritts et al, 2010). Pozitivan efekat  $O_2$  ogleda se i u većoj površinskoj energiji dentina i porastu Lewis baznog dela polarne komponente. Povećanjem površinske energije i većim brojem interaktivnih zona povećava se i reaktivnost dentina nakon tretmana dentina kiseonikom obogaćenom plazmom pa bi optimizovani režimi plazme obavezno trebalo da sadrže i 1-1,5%  $O_2$ .

### **Aplikacija univerzalnih adheziva na plazmom tretirani dentin**

Korišćeni adhezivni sistemi (SBU i CUB) predstavljaju univerzalne adhezive bazirane na vodi i etanolu koji sadrže još i BisGMA, HEMA i 10-MDP. CUB sadrži kisele visoko-hidrofilne amidne monomere koji poboljšavaju kvašenje i penetraciju adheziva.

Pomenuto je da 10-MDP ostvaruje hemijsku vezu sa  $\text{Ca}^{2+}$  iz HaP, površinski izvlači kalcijum iz kristala HaP i formira MDP-Ca soli koje se pravilno raspoređuju u nanoslojeve (Fukeygawa et al, 2006).

Pored 10-MDP, SBU sadrži hidrofilni poliakenoidni kopolimer (Vitrebond<sup>TM</sup>) koji ostvaruje hemijsku vezu sa  $\text{Ca}^{2+}$  iz HaP. Prisustvo HEMA i kopolimera dovodi do redukcije nanosloja izgrađenog od 10-MDP-Ca soli, zbog potencijalnog nadmetanja navedenih komponenti sa 10-MDP. Yoshida i saradnici (Yoshida et al, 2012) navode da prisustvo HEMA u minimalnoj koncentraciji od 8% značajno ometa hemijsku reakciju između 10-MDP i HaP, ali ne dovodi do sprečavanja reakcije. Objašnjenje za ovu pojavu leži u međumolekularnim reakcijama između 10-MDP i HEMA koje ometaju nukleaciju i rast MDP-Ca soli. Drugo moguće objašnjenje je prisustvo vode u adhezivnom sistemu. HEMA kao hidrofilni monomer može vezati svu vodu i time onemogućiti interakciju 10-MDP i HaP (Yoshida et al, 2012).

Vrednosti kontaktnog ugla nakon tretmana NTAP (98,5% He+1,5% O<sub>2</sub>\_3 W, 4 mm) i aplikacije univerzalnih adheziva bile su značajno manje kod CUB (19,95±6,88°) u odnosu na SBU (35,68±2,35°). Ovaj rezultat se može objasniti prisustvom visoko-hidrofilnog monomera u CUB adhezivu, kako navodi proizvođač, iako tačna hemijska formula nije dostupna.

Nakon aplikacije SBU i CUB po protokolu totalnog nagrizanja vrednosti kontaktnog ugla (SBU\_44,13±8,45°; CUB\_33,04±6,04°) bile su značajno veće u odnosu na grupe u kojima su SBU i CUB aplikovani po protokolu samonagrizanja (SBU\_29,94±1,86°; CUB\_26,56±2,33°) ili nakon tretmana NTAP (SBU\_35,68±2,35°; CUB\_19,95±6,88°).

Aplikacija adheziva po protokolu totalnog nagrizanja podrazumeva primenu ortofosforne kiseline. Nakon aplikacije ortofosforne kiseline dolazi do poboljšanja hidrofilnosti površine dentina, ali ne i do bolje distribucije adheziva u odnosu na protokol samonagrizanja. Mogući razlog je prisustvo hidrofobnih monomera, kao što je BisGMA, u sastavu adheziva. BisGMA je relativno hidrofoban monomer i kao takav ne infiltriše u potpunosti vlažna kolagena vlakna (Spencer, 2002; Wang, 2002). Prisustvo vode može dovesti do fazne separacije između hidrofobnih i hidrofilnih monomera u adhezivima koji sadrže BisGMA i HEMA. Za razliku od BisGMA, HEMA je hidrofilan monomer i kao takav može prodrći između kolagenih vlakana (Spencer, 2002). Zhang i saradnici (Zhang et al, 2016) navode da aplikacija adhezivnih sistema koji u svom sastavu sadrže 10-MDP po protokolu totalnog nagrizanja može dovesti do neravnomerne/nekonzistentne raspodele monomera u demineralizovani dentin. Nakon aplikacije ortofosforne kiseline povećava se polarna komponenta površinske

energije, kao i Lewis bazni deo. Smanjenje nepolarne komponente ukazuje na smanjenu interakciju između nepolarnih komponenti adheziva i površine dentina.

Aplikacija adheziva po protokolu samonagrizanja i nakon tretmana NTAP daje manje vrednosti kontaktnih uglova, s tim što je bolje kvašenje zabeleženo kod CUB adheziva. Bolje kvašenje površine dentina nakon tretmana NTAP može se objasniti boljom infiltracijom BisGMA i HEMA u plazma-tretiran dentin. Zhang i saradnici (Zhang et al, 2014) navode da nakon NTAP tretmana površine dentina dolazi do bolje penetracije u demineralizovani dentin ne samo HEMA, već i BisGMA iz eksperimentalnog modela adheziva. Mikrografije SEM u radu Ayres i saradnika (Ayres et al, 2018) pokazuju intenzivnu penetraciju adheziva i formiranje dugačkih smolastih produžetaka nakon tretmana NTAP u trajanju od 30 s.

Protokol samonagrizanja podrazumeva aplikaciju adheziva bez prethodnog kiselinskog nagrizanja na površinu gleđi i dentina. Kiseli funkcionalni monomeri ne uklanjaju razmazni sloj, već ga čine propustljivim (Perdigao, 2010; Van Meerbeek et al, 2011) i svojim fosfornim, karboksilnim, fosfitnim grupama ostvaruju hemijsko vezivanje sa  $Ca^{2+}$  iz HaP dentina (Yoshida et al, 2004; Yoshida et al, 2001). Podaci iz literature pokazuju da primena univerzalnih adheziva po protokolu samonagrizanja poboljšava vezivanje adheziva za dentin (Manfroi et al, 2016; Marchesi et al, 2014).

Primena CUB po protokolu samonagrizanja i nakon tretmana NTAP je dala bolje rezultate u odnosu na SBU u pogledu vrednosti kontaktnog ugla. CUB pored hidrofilnog monomera HEMA, sadrži i hidrofilni amidni monomer. Prisustvo ova dva monomera može doprineti boljem kvašenju i penetraciji adheziva u dentin.

Rezultati naše studije pokazuju da je površina dentina prekrivena razmaznim slojem nepolarna i sadrži veću količinu Lewis kiselog dela. Nakon aplikacije ortofosforne kiseline i tretmana NTAP došlo je do promene osobina tretirane površine tj. površina dentina je postala polarna i sa većom zastupljenošću Lewis baznog dela. Primenjeni adhezivni sistemi spadaju u grupu blago kiselih adheziva (SBU\_pH 2,7; CUB\_2,3) i njihova aplikacija na nepolarnoj (protokol samonagrizanja) i polarnoj (protokol totalnog nagrizanja) površini može rezultirati različitim stepenom kvašenja i odnosom polarne/nepolarne komponente.

Pored pozitivnih efekata NTAP na penetraciju adheziva i poboljšanje stepena kvašenja, ne treba isključiti faktore koji ograničavaju penetraciju adheziva u hibridni sloj. Studija Zhang i saradnika (Zhang et al, 2014) pokazala je da pojedine komponente adheziva u različitom stepenu prolaze u hibridni sloj u zavisnosti od njihove hidrofobnosti/hidrofilnosti. Sposobnost

NTAP da poveća penetraciju hidrofilne HEMA, a u manjoj meri hidrofobne BisGMA umanjuje navedene pozitivne efekte NTAP. Kao posledica povećane penetracije hidrofilnih monomera usled fazne separacije može doći do veće sorpcije i difuzije vode, kao i rastvorljivosti smole (Malacarne-Zanon et al, 2009; Tanaka et al, 1999). Univerzalni adhezivi nakon polimerizacije mogu se ponašati kao semi-permeabilne membrane i omogućavati difuziju vode u predelu adhezivnog sloja (Tay et al, 2002). Tretman NTAP poboljšava penetraciju adheziva u hibridni sloj i jačinu veze između adheziva i dentina, ali starenjem tokom vremena usled biodegradacije dolazi do slabljenja efekta NTAP na jačinu veze.

Više studija navodi inicijalno poboljšanje adhezivne veze nakon tretmana NTAP (Ayres et al, 2018; Dong, 2015; Han et al, 2014; Hirata et al, 2016). Međutim, za dugotrajnost ispuna bitnija je stabilnost nego inicijalna jačina adhezivne veze sa dentinom. Han i saradnici (Han et al, 2014), kao i Dong i saradnici (Dong, 2015) uočili su da i nakon artefijalnog starenja vrednosti jačine veze ostaju veće u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke kod kojih je uočeno smanjenje jačine veze. Za razliku od ovog nalaza, u radovima Ayres i saradnika (Ayres et al, 2018) i Hirata i saradnika (Hirata et al, 2016; Hirata et al, 2015) došlo je do smanjenja jačine veze nakon godinu dana artefijalnog starenja.

### **Površinski sastav i struktura dentina**

Na osnovu vrednosti kontaktnih uglova i površinske energije dentina posle tretmana NTAP, došli smo do zaključka da režim 3 W, 4 mm sa dodatkom 1,5% O<sub>2</sub> predstavlja režim koji u pogledu snage, rastojanja i smeše gasova daje najbolje rezultate. Kako je ranije navedeno, najbolje kvašenje tj. najmanje vrednosti kontaktnog ugla upravo su zabeležene pri pomenutom režimu plazma tretmana ( $6,72 \pm 1,91^\circ$ ).

Zbog dobijenih podataka o kvalitetu kvašenja površine dentina, izabran je režim 3 W, 4 mm sa dodatkom 1,5% O<sub>2</sub> radi poređenja efekata plazme sa aplikacijom ortofosforne kiseline na površinske karakteristike univerzalnih adheziva. Radi dobijanja kompletne slike o stepenu modifikacije površine dentina nakon tretmana NTAP analizirani su i površinski sastav i struktura dentina primenom SEM/EDS.

Nakon tretmana NTAP uočen je pad O, a porast Ca, P, N u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke. Porast Ca i P je očekivan jer su ovi elementi sastojci HaP dentina i nakon plazma tretmana usled uklanjanja organske komponente bivaju dodatno eksponirani na površini dentina (Chen, 2013; Koban et al, 2011; Šantak et al, 2017). Porast N je takođe očekivan, jer NTAP korišćena u našem radu na osnovu rezultata masene spektroskopije ima najviše N.

Veće prisustvo N u dentinu nakon plazma tretmana može se objasniti formiranjem azotnih funkcionalnih grupa (ROH ili NO<sup>-</sup>) (Malović et al, 2010). Najveća razlika u padu atomske zastupljenosti O prisutna je kod NTAP sa 100% He (74,45%) u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke (83,98%). Kod plazmi sa dodatkom O<sub>2</sub> vrednosti O su bile slične i to kod NTAP sa dodatkom 1% O<sub>2</sub> procentualna zastupljenost O je iznosila 76,76%, dok je kod NTAP sa 1,5% O<sub>2</sub> zastupljenost O bila 77,66%.

Prisutan je isti trend porasta atomske zastupljenosti Ca i P i to najviše kod plazme sa 100% He, a zatim kod plazmi sa dodatkom O<sub>2</sub>. Za razliku od kontrolnih, netretiranih uzoraka, kod uzoraka koji su tretirani NTAP uočeno je prisustvo N (1,85-2,86%).

Nakon aplikacije ortofosforne kiseline došlo je do porasta atomskog procenta O, a smanjenja Ca, P u odnosu na kontrolne, netretirane uzorke. Kao i kod kontrolnih uzoraka, prisustvo N je bilo u tragovima ili nije bio detektovan. Smanjenje Ca i P se može objasniti površinskom demineralizacijom HaP dentina, dok se prisustvo N objašnjava delimičnom eksponiranošću kolagenih vlakana nakon kiselinskog nagrizanja.

Šantak i saradnici (Šantak et al, 2017) analizirali su tretiranu površinu dentina nakon dejstva NTAP pomoću XPS. Uočili su porast Ca, P, O. Vrednost O nakon tretmana NTAP bila je 49±7% u odnosu na kontrolne uzorke (39±4%). Kao objašnjenje za porast O, autori navode da kao proizvod reakcije između metastabilnog He i atmosferskog vazduha nastaju radikali kiseonika, koji kasnije ostvaruju brojne reakcije sa elementima dentina (Šantak et al, 2017). U istraživanju Chen i saradnika (Chen, 2013) takođe je uočen porast O, Ca i P, a smanjenje atomskog procenta C i N. Kao razlog za smanjenje C i N, Chen i saradnici navode mogućnost uklanjanja proteina plazma tretmanom. Rezultati Koban i saradnika (Koban et al, 2011) analizom EDS pokazuju da nakon tretmana površine dentina NTAP dolazi do porasta O, Ca i P i smanjenja C. Koban i saradnici navode da je poboljšanje hidrofilnosti površine povezano sa formiranjem novih grupa koje u sebi sadrže O ( $-OH$ ,  $-OOH$ ). Postojanje ovih grupa je bazirano na prisustvu ugljenika i delova neorganskog matriksa (Koban et al, 2011).

Analizom mikrografija SEM uočili smo da tretmani NTAP nisu doveli do pojava mikromorfoloških razlika u poređenju sa kontrolnom, netretiranom površinom dentina. Isti nalazi dobijeni su u studijama (Chen, 2013; Dong, 2015; Koban et al, 2011). Takođe, uočeno je da različiti plazma tretmani ne dovode do destruktivnih promena na površini dentina/gleđi (Chen et al, 2013; Koban et al, 2011; Lehmann et al, 2013).

Površina dentina nakon nagrizanja ortofosfornom kiselinom bila je bez razmaznog sloja, sa eksponiranim kolagenim vlaknima i otvorenim dentinskim kanalićima. Ovaj nalaz je uobičajen za površinu dentina nakon nagrizanja ortofosfornom kiselinom u klinički predviđenom trajanju od 15 s. Ortofosforna kiselina, kao jaka kiselina, potpuno razlaže amorfni, mineralni razmazni sloj, ali i demineralizuje površinski sloj dentina u debljini od nekoliko mikrometara. Kako ortofosforna kiselina nema organolitičko dejstvo, to izostaje i njen efekat na organsku komponentu dentina, kolagena vlakna, koja ostaju eksponirana na površini kiselinom nagriženog dentina.

Lehmann i saradnici (Lehmann et al, 2013) uočili su prisustvo glatkih intertubularnih polja kod poliranih, netretiranih dentinskih uzoraka analizom SEM. Nakon tretmana NTAP došlo je do pojave blago zaobljenih intertubularnih područja, odsustva kolagenih vlakana. Takođe, uočavaju se iregularno prošireni otvori dentinskih kanalića. Kod uzoraka kod kojih je aplikovana ortofosforna kiselina došlo je do pojave nehomogenih i eksponiranih kolagenih vlakana (Lehmann et al, 2013).

Rezultati dobijeni u ovoj i u drugim studijama ukazuju na pozitivne aspekte plazma tretmana površine dentina. Međutim, neophodna su dalja istraživanja u cilju prevazilaženja ograničavajućih faktora kako bi dobra inicijalna adhezivna veza bila dugoročno stabilnija.

Tretman NTAP na dentinu dovodi do poboljšanja hidrofилnosti i promene osobina same površine. Poznavanjem površinske energije i njenih komponenti tretirane površine dobijaju se podaci o izboru vrste dentalnih adheziva i načinu njihove aplikacije. Ortofosforna kiselina modifikuje površinska svojstva dentina tako da omogućava prodor adhezivnih monomera u interfibrilarne prostore hibridnog sloja. Međutim, zbog biodegradacije usled dejstva MMP aktuelni preporučeni protokol u kliničkoj praksi isključuje primenu ortofosforne kiseline na dentinu. Primena NTAP i ispitivanje njenih efekata na površinska svojstva tvrdih zubnih tkiva su još uvek na bazičnom nivou, ali izneti rezultati ukazuju na mogućnost NTAP da modifikuje površinska svojstva dentina, u prvom redu kvašenje i površinsku energiju, bez destruktivnih promena u strukturi dentina. Režimi NTAP definisani u ovom radu snagom, udaljenošću i vremenom tretmana poboljšavaju distribuciju adheziva i interakciju sa dentinom, što je osnovni preduslov adekvatne adhezivne veze.

## ZAKLJUČAK

Tretman NTAP dovodi do modifikacije površine i promene u hemijskom sastavu dentina. Površina dentina nakon dejstva plazme postaje hidrofilnija, polarna i sa predominantnom prisutnošću Lewis baznog dela. Povećanje površinske energije dentina nakon tretmana NTAP može pozitivno uticati na distribuciju adheziva na površini dentina i u zoni hibridnog sloja.

Generalno gledano, dodatak O<sub>2</sub> pojačava efekat plazme na ispitivana površinska svojstva dentina pri režimima snage 1 W, 3 W i rastojanju 2 mm i 4 mm.

Pod optimizovanim plazma tretmanima na dentinu mogu se smatrati tretmani pri snazi od 3 W i rastojanjima 2 do 4 mm. Dužina trajanja tretmana od 30 s predstavlja klinički prihvatljivo vreme. Izabrani optimizovani režim NTAP pri snazi 3 W, 4 mm sa 1,5% He u trajanju od 30 s pre aplikacija adheziva omogućio je bolju distribuciju adheziva u poređenju sa kiselinskim nagrivanjem. Efekat navedenog optimizovanog režima NTAP (3 W, 4 mm) je bio slabiji u odnosu na aplikaciju adheziva po samonagrizajećem protokolu.

Razlike u hemijskom sastavu dentina nakon tretmana ortofosfornom kiselinom i tretmana NTAP pokazuju da je plazmom tretirana površina aktivnija i sa više reaktivnih grupa koje mogu doprineti boljem adhezivnom spoju.

Optimizovani tretman NTAP menja površinsku strukturu dentina i ne dovodi do destruktivnih promena površine. Mikromorfološki izgled plazmom tretiranog dentina je sličan dentinu kod koga se primenjuje samonagrizaćući protokol, tj. protokol bez kiselinskog nagrivanja.

## LITERATURA

- Akischev, Y., Grushin, M., Dyatko, N., Kochetov, I., Napartovich, A. & Trushkin, N, et al. (2008a) Studies on cold plasma–polymer surface interaction by example of pp- and pet-films. *J Phys D Appl Phys*, 41(23), 235203.
- Akischev, Y., Grushin, M., Karalnik, V., Trushkin, N., Kholodenko, V., Chugunov, V., Kobzev, E., Zhirkova, N., Irkhina, I. & Kireev, G. (2008) Atmospheric-pressure, nonthermal plasma sterilization of microorganisms in liquids and on surfaces. *Pure Appl. Chem.*, 80(9), 1953–1969.
- Alshraiedeh, N. H., Alkawareek, M. Y., Gorman, S. P., Graham, W. G. & Gilmore, B. F. (2013) Atmospheric pressure, nonthermal plasma inactivation of MS2 bacteriophage: effect of oxygen concentration on virucidal activity. *J Appl Microbiol*, 115(6), 1420-6.
- Arefi-Khonsari, F., Tatouliau, M. (2008) Plasma Processing of Polymers by a Low-Frequency Discharge with Asymmetrical Configuration of Electrodes, in d'Agostino, R., Favia, P., Kawai, Y., Ikegami, H., Sato, N. & Arefi-Khonsari, F. (eds), *Advanced Plasma Technology*. Weinheim, Germany: Wiley, 137-174.
- Armengol, V., Laboux, O., Weiss, P., Jean, A. & Hamel, H. (2003) Effects of Er:YAG and Nd:YAP laser irradiation on the surface roughness and free surface energy of enamel and dentin: an in vitro study. *Oper Dent*, 28(1), 67-74.
- Attal, J. P., Asmussen, E. & Degrange, M. (1994) Effects of surface treatment on the free surface energy of dentin. *Dent Mater*, 10(4), 259-64.
- Ayres, A. P., Bonvent, J. J., Mogilevych, B., Soares, L. E. S., Martin, A. A., Ambrosano, G. M., Nascimento, F. D., Van Meerbeek, B. & Giannini, M. (2018) Effect of non-thermal atmospheric plasma on the dentin-surface topography and composition and on the bond strength of a universal adhesive. *Eur J Oral Sci*, 126(1), 53-65.
- Benstaali, B., Moussa, D., Addou, A. & Brisset, J. L. (1988a) Plasma treatment of aqueous solutes: some chemical properties of gliding arc in humid air. *Eur Phys J Appl 4*, 171-9.
- Bittencourt, J. A. (1986) Introduction, in Bittencourt, J. A. (ed), *Fundamentals of Plasma Physics*. Amsterdam: Pergamon, 1-32.
- Bogle, M. A., Arndt, K. A. & Dover, J. S. (2007) Evaluation of plasma skin regeneration technology in low-energy full-facial rejuvenation. *Arch Dermatol*, 143(2), 168-74.
- Brajkovic, D., Antonijevic, Dj., Milovanovic, P., Kisic, D., Zelic, K., Djuric, M. & Rakocevic, Z. (2014) Surface characterization of the cement for retention of implant supported dental prostheses: In vitro evaluation of cement roughness and surface free energy. *Applied Surface Science*, 311, 131-138.
- Brehmer, F., Haenssle, H. A., Daeschlein, G., Ahmed, R., Pfeiffer, S., Gorlitz, A., Simon, D., Schon, M. P., Wandke, D. & Emmert, S. (2015) Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm((R)) VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 29(1), 148-55.
- Breschi, L. , Mazzoni, A. , Ruggeri, A. , Cadenaro, M. , Di Lenarda, R. & De Stefano Dorigo, E. (2008) Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*, 24(1), 90-101.
- Brown, P., Preece, M., Brandel, J. P., Sato, T., McShane, L., Zerr, I., Fletcher, A., Will, R. G., Pocchiari, M., Cashman, N. R., d'Aignaux, J. H., Cervenakova, L., Fradkin, J., Schonberger, L. B. & Collins, S. J. (2000) Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology*, 55(8), 1075-81.
- Busscher, H. J., Van Pelt, A. W. J., De Jong, H. P. & Arends, J. (1983) Effect of spreading pressure on surface free energy determinations by means of contact angle measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*, 95(1), 23-27.
- Busscher, H. J., Weerkamp, A. H., van der Mei, H. C., van Pelt, A. W., de Jong, H. P. & Arends, J. (1984) Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and environmental microbiology*, 48(5), 980-983.

- Cao, Z., L., Walsh J. & G., Kong M. (2009) Atmospheric plasma jet array in parallel electric and gas flow fields for three-dimensional surface treatment. *Appl Phys Lett*, 94, 021501.
- Cardoso, M. V., de Almeida Neves, A., Mine, A., Coutinho, E., Van Landuyt, K., De Munck, J. & Van Meerbeek, B. (2011) Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J*, 56 Suppl 1, 31-44.
- Chen, C., Niu, L. N., Xie, H., Zhang, Z. Y., Zhou, L. Q., Jiao, K., Chen, J. H., Pashley, D. H. & Tay, F. R. (2015) Bonding of universal adhesives to dentine--Old wine in new bottles? *J Dent*, 43(5), 525-36.
- Chen, M., Zhang, Y., Dusevich, V., Liu, Y., Yu, Q. & Wang, Y. (2014) Non-thermal atmospheric plasma brush induces HEMA grafting onto dentin collagen. *Dent Mater*, 30(12), 1369-77.
- Chen, M., Zhang, Y., Yao, X., Li, H., Yu, Q. & Wang, Y. (2012) Effect of a non-thermal, atmospheric-pressure, plasma brush on conversion of model self-etch adhesive formulations compared to conventional photo-polymerization. *Dent Mater*, 28(12), 1232-9.
- Chen, M., Zhang, Y., Sky Driver, M., Caruso, A. N., Yu, Q., Wang, Y. (2013) Surface modification of several dental substrates by non-thermal, atmospheric plasma brush. *Dent Mater*, 29(8), 871-80.
- Choi, J., Mohamed, A. H., Kang, S. K., Woo, K. C., Kim, K. T. & Lee, J. K. (2010) 900-MHz Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma Jet for Biomedical Applications. *Plasma Processes Polym*, 7, 258-263.
- Chu, P. K., Chen, J. Y., Wang, L. P. & Huang, N. (2002) Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 36(5), 143-206.
- Claiborne, D., McCombs, G., Lemaster, M., Akman, M. A. & Laroussi, M. (2014) Low-temperature atmospheric pressure plasma enhanced tooth whitening: the next-generation technology. *Int J Dent Hyg*, 12(2), 108-14.
- Cognard, J. (1987) La couche atmosphérique : « approche de la surface réelle des solides ». *J. Chim. Phys.*, 84, 357-362.
- Cohen, S., Burns, R. C. (2002) *Pathways of the pulp*. St. Louis, Missouri, USA: 8th edition.
- Compton, K. T., Langmuir, I. (1930) Electric discharges in gases, Part I. Survey of fundamental processes, *Rev Mod Phys*. Lancaster, Pennsylvania: American Physical Society 123-242.
- Corbin, A., Pitts, B., Parker, A. & Stewart, P. S. (2011) Antimicrobial Penetration and Efficacy in an In Vitro Oral Biofilm Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3338.
- Costa, D. M., Somacal, D. C., Borges, G. A. & Spohr, A. M. (2017) Bond Capability of Universal Adhesive Systems to Dentin in Self-etch Mode after Short-term Storage and Cyclic Loading. *Open Dent J*, 11, 276-283.
- Deb, S., Sehmi, H. (2003) A comparative study of the properties of dental resin composites polymerized with plasma and halogen light. *Dent Mater*, 19(6), 517-22.
- Della Volpe, C., Siboni, S. (2000) Acid-base surface free energies of solids and the definition of scales in the Good-van Oss-Chaudhury theory. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 14(2), 235-272.
- Deng, X., J., Shi & M., Kong (2007) Protein destruction by a helium atmospheric pressure glow discharge: capability and mechanisms. *J Apply Phys*, 101, 074701.
- Dimitrijević, B., Leković, V., Zelić, O., Janković, Lj., Ursu-Magdu, I., Čakić, S., Đukanović, D., Janković, S. & Aleksić, Z. (2011a) Etiologija parodontopatija, in Dimitrijević, Božidar (ed), *Klinička parodontologija*. Beograd: Zavod za udžbenike 160-206.
- Dimitrijević, B., Leković, V., Zelić, O., Janković, Lj., Ursu-Magdu, I., Čakić, S., Đukanović, D., Janković, S. & Aleksić, Z. (2011b) Oralna implantologija, in Dimitrijević, Božidar (ed), *Klinička parodontologija*. Beograd: Zavod za udžbenike, 494-519.
- Dobrynin, Danil, Wasko, Kimberly, Friedman, Gary, Fridman, Alexander A. & Fridman, Gregory (2011) Cold Plasma Sterilization of Open Wounds: Live Rat Model. *Plasma Medicine*, 1(2), 109-114.
- Dong, X., Chen, M., Wang, Y. & Yu, Q. (2014) A Mechanistic study of Plasma Treatment Effects on Demineralized Dentin Surfaces for Improved Adhesive/Dentin Interface Bonding. *Clinical plasma medicine*, 2(1), 11-16.

- Dong, X., Li, H., Chen, M., Wang, Y., Yu, Q. (2015) Plasma treatment of dentin surfaces for improving self-etching adhesive/dentin interface bonding. *Clin Plasma Med*, 3(1), 10-16.
- Dong, X., Ritts, A. C., Staller, C., Yu, Q., Chen, M. & Wang, Y. (2013) Evaluation of plasma treatment effects on improving adhesive-dentin bonding by using the same tooth controls and varying cross-sectional surface areas. *Eur J Oral Sci*, 121(4), 355-62.
- Drelich, J., Laskowski, J. S., Pawlik, M. & Veeramasuneni, S. (1997) Preparation of a coal surface for contact angle measurements. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 11(11), 1399-1431.
- Du, T., Shi, Q., Shen, Y., Cao, Y., Ma, J., Lu, X., Xiong, Z. & Haapasalo, M. (2013) Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms in vitro. *J Endod*, 39(11), 1438-43.
- Duarte Jr, S., Perdigao, J. & Lopes, M. M. (2006) Effect of dentin conditioning time on nanoleakage. *Oper Dent*, 31(4), 500-11.
- Duske, K., Koban, I., Kindel, E., Schroder, K., Nebe, B., Holtfreter, B., Jablonowski, L., Weltmann, K. D. & Kocher, T. (2012) Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. *J Clin Periodontol*, 39(4), 400-7.
- Eick, J. D., Robinson, S. J., Chappell, R. P., Cobb, C. M. & Spencer, P. (1993) The dentinal surface: its influence on dentinal adhesion. Part III. *Quintessence Int*, 24(8), 571-82.
- Ellingsen, J. E., Johansson, C. B., Wennerberg, A. & Holmen, A. (2004) Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 19(5), 659-66.
- Emmert, S., Brehmer, F., Hänble, H., Helmke, A., Mertens, N., Ahmed, R., Simon, D., Wandke, D., Maus-Friedrichs, W., Daeschlein, G., Schön, M. P. & Viöl, W. (2013) Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more. *Clin Plasma Med*, 1, 24-29.
- Epaillard, F., Brosse, J. C. & Legeay, G. (1989) Plasma-induced polymerization. *Journal of Applied Polymer Science*, 38(5), 887-898.
- Erickson, R. L. (1992) Surface interactions of dentin adhesive materials. *Oper Dent*, Suppl 5, 81-94.
- Foster, K. W., Moy, R. L. & Fincher, E. F. (2008) Advances in plasma skin regeneration. *J Cosmet Dermatol*, 7(3), 169-79.
- Fowkes, F. M. (1972) Donor-Acceptor Interactions at Interfaces. *The Journal of Adhesion*, 4(2), 155-159.
- Fowkes, F. M. (1990) Quantitative characterization of the acid-base properties of solvents, polymers, and inorganic surfaces. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 4(1), 669-691.
- Francis, F. C., Chang, J. P. (2003a) Electron Collisions with Molecules, in Chen F.F., Chang J.P. (ed), *Lecture Notes on Principles of Plasma Processing*. Boston MA: Springer, 140-142.
- Francis, F. C., Chang, J. P. (2003b) Molecular Energy Levels, in Chen F.F., Chang J.P. (ed), *Lecture Notes on Principles of Plasma Processing*. Boston MA: Springer, 137-139.
- Francis, F. C., Chang, J. P. (2003c) Plasma Fundamentals, in Chen F.F., Chang J.P. (ed), *Lecture Notes on Principles of Plasma Processing*. Boston MA: Springer, 3-10.
- Francis, F. C., Chang, J. P. (2003d) Plasma Surface Kinetics, in Francis F. Chen, Jane P. Chang (ed), *Lecture Notes on Principles of Plasma Processing*. Boston MA: Springer US, 167-169.
- Francis, F. C., Chang, J. P. (2003e) What is a Plasma?, in Chen F.F., Chang J.P. (ed), *Lecture Notes on Principles of Plasma Processing*. Boston MA: Springer 1-3.
- Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D. & Simon, J. C. (2011) Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*, 32(28), 6692-709.
- Fridman A (2008a) Elementary Plasma-Chemical Reactions, in Fridman, Alexander (ed), *Plasma Chemistry*. Cambridge: Cambridge University Press, 12-91.
- Fridman A (2008b) Introduction to Theoretical and Applied Plasma Chemistry, in Fridman, Alexander (ed), *Plasma Chemistry*. Cambridge: Cambridge University Press, 1-11.
- Fridman A (2008c) Organic and Polymer Plasma Chemistry, in Fridman, Alexander (ed), *Plasma Chemistry*. Cambridge: Cambridge University Press, 589-675.

- Fridman A (2008d) Plasma-Surface Processing of Inorganic Materials: Micro- and Nano-Technologies, in Fridman, Alexander (ed), *Plasma Chemistry*. Cambridge: Cambridge University Press, 499-588.
- Fridman A, Kennedy L. A. (2004) Nonequilibrium Cold Atmospheric Pressure Plasmas: Corona, Dielectric Barrier, and Spark Discharges, in Alexander A. Fridman, Lawrence A. Kennedy (ed), *Plasma Physics and Engineering*. New York: Taylor & Francis, 555-590.
- Fridman G, A., Shereshevsky, M., Jost M., D., Brooks A., A., Fridman, A., Gutsol, V., Vasilets & G., Friedman (2007a) Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chem Plasma Process* 27, 163-176.
- Fridman G, Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A. B., Vasilets, V. N. & Fridman, A. (2008) Applied plasma medicine. *Plasma Process Polym.*, 5, 503-533.
- Fridman G, Peddinghaus, M., Balasubramanian, M., Ayan, H., Fridman, A., Gutsol, A., Brooks, A. & Friedman, G. (2007b) Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 27(1), 113-114.
- Fukegawa, D., Hayakawa, S., Yoshida, Y., Suzuki, K., Osaka, A. & Van Meerbeek, B. (2006) Chemical interaction of phosphoric acid ester with hydroxyapatite. *J Dent Res*, 85(10), 941-4.
- Ganeshnarayan, K., Shah, S. M., Libera, M. R., Santostefano, A. & Kaplan, J. B. (2009) Poly-N-Acetylglucosamine Matrix Polysaccharide Impedes Fluid Convection and Transport of the Cationic Surfactant Cetylpyridinium Chloride through Bacterial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1308-1314.
- García-Alcantara, E., López-Callejas, R., Peña-Eguiluz, R., Lagunas-Bernabé, S., Valencia-Alvarado, R., Mercado-Cabrera, A., Barocio, S. R., Muñoz-Castro, A. E., Rodríguez-Méndez, B. G. & de la Piedad-Beneitez, A. (2012) Time effect and aliquot concentration in *Streptococcus mutans* elimination by plasma needle. *Journal of Physics: Conference Series*, 370(1), 012018.
- Gilbert, P., Das, J. & Foley, I. (1997) Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*, 11(1), 160-7.
- Good, R. J. (1992) Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 6(12), 1269-1302.
- Goracci, C., Rengo, C., Eusepi, L., Juloski, J., Vichi, A. & Ferrari, M. (2013) Influence of selective enamel etching on the bonding effectiveness of a new "all-in-one" adhesive. *Am J Dent*, 26(2), 99-104.
- Guerrero-Preston, R., Ogawa, T., Uemura, M., Shumulinsky, G., Valle, B. L., Pirini, F., Ravi, R., Sidransky, D., Keidar, M. & Trink, B. (2014) Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med*, 34(4), 941-6.
- Han, G. J., Kim, J. H., Chung, S. N., Chun, B. H., Kim, C. K., Seo, D. G., Son, H. H. & Cho, B. H. (2014) Effects of non-thermal atmospheric pressure pulsed plasma on the adhesion and durability of resin composite to dentin. *Eur J Oral Sci*, 122(6), 417-23.
- Hasegawa, T., Manabe, A., Itoh, K. & Wakumoto, S. (1989) Investigation of self-etching dentin primers. *Dent Mater*, 5(6), 408-10.
- Heinlin, J., Zimmermann, J. L., Zeman, F., Bunk, W., Isbary, G., Landthaler, M., Maisch, T., Monetti, R., Morfill, G., Shimizu, T., Steinbauer, J., Stolz, W. & Karrer, S. (2013) Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites. *Wound Repair Regen*, 21(6), 800-7.
- Hirata, R., Sampaio, C., Machado, L. S., Coelho, P. G., Thompson, V. P., Duarte, S., Ayres, A. P. & Giannini, M. (2016) Short- and Long-term Evaluation of Dentin-Resin Interfaces Formed by Etch-and-Rinse Adhesives on Plasma-treated Dentin. *J Adhes Dent*, 18(3), 215-22.
- Hirata, R., Teixeira, H., Ayres, A. P., Machado, L. S., Coelho, P. G., Thompson, V. P. & Giannini, M. (2015) Long-term Adhesion Study of Self-etching Systems to Plasma-treated Dentin. *J Adhes Dent*, 17(3), 227-33.
- Holländer, A. (1995) On the Selection of Test Liquids for the Evaluation of Acid-Base Properties of Solid Surfaces by Contact Angle Goniometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 169(2), 493-496.

- Hong, Y. F., Kang, J. G., Lee, H. Y., Uhm, H. S., Moon, E. & Park, Y. H. (2009) Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. *Lett Appl Microbiol*, 48(1), 33-7.
- Horbett, T. A., Waldburger, J. J., Ratner, B. D. & Hoffman, A. S. (1988) Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disc apparatus. *J Biomed Mater Res*, 22(5), 383-404.
- Ikehara, Y., Sakakita, H., Shimizu, N., Ikehara, S. & Nakanish, H. (2013) Formation of membrane-like structures in clotted blood by mild plasma treatment during hemostasis. *J Photopolym Sci Technol*, 26, 555-557.
- Isbary, G., Heinlin, J., Shimizu, T., Zimmermann, J. L., Morfill, G., Schmidt, H. U., Monetti, R., Steffes, B., Bunk, W., Li, Y., Klämpfl, T., Karrer, S., Landthaler, M. & Stolz, W. (2012) Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*, 167(2), 404-10.
- Isbary, G., Stolz, W., Shimizu, T., Monetti, R., Bunk, W., Schmidt, H. U., Morfill, G. E., Klämpfl, T. G., Steffes, B., Thomas, H. M., Heinlin, J., Karrer, S., Landthaler, M. & Zimmermann, J. L. (2013a) Cold atmospheric argon plasma treatment may accelerate wound healing in chronic wounds: Results of an open retrospective randomized controlled study in vivo. *Clin. Plasma Med.*, 1, 25-30.
- Isbary, G., Zimmermann, J. L., Shimizu, T., Li, Y. F., Morfill, G. E., Thomas, H. M., Steffes, B., Heinlin, J., Karrer, S. & Stolz, W. (2013) Non-thermal plasma—More than five years of clinical experience. *Clinical Plasma Medicine*, 1(1), 19-23.
- Ishii, R., Tsujimoto, A., Takamizawa, T., Tsubota, K., Suzuki, T., Shimamura, Y. & Miyazaki, M. (2015) Influence of surface treatment of contaminated zirconia on surface free energy and resin cement bonding. *Dent Mater J*, 34(1), 91-7.
- Jimbo, R., Sawase, T., Baba, K., Kurogi, T., Shibata, Y. & Atsuta, M. (2008) Enhanced initial cell responses to chemically modified anodized titanium. *Clin Implant Dent Relat Res*, 10(1), 55-61.
- Joshi, S. G., Cooper, M., Yost, A., Paff, M., Ercan, U. K., Fridman, G., Friedman, G., Fridman, A. & Brooks, A. D. (2011) Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(3), 1053-62.
- Kalghatgi, S. U., Fridman, G., Cooper, M., Nagaraj, G., Peddinghaus, M., Balasubramanian, M., Vasilets, V. N., Gutsol, A. F., Fridman, A. & Friedman, G. (2007) Mechanism of Blood Coagulation by Nonthermal Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 35(5), 1559-1566.
- Kim, J. H., Han, G. J., Kim, C. K., Oh, K. H., Chung, S. N., Chun, B. H. & Cho, B. H. (2016) Promotion of adhesive penetration and resin bond strength to dentin using non-thermal atmospheric pressure plasma. *Eur J Oral Sci*, 124(1), 89-95.
- Kim, S. J., H., Chung T. & H., Bae S. (2010) Striation and plasma bullet propagation in an atmospheric pressure plasma jet. *Physics of Plasmas*, 17(5), 053504.
- Koban, I., Duske, K., Jablonowski, L., Schröder, K., Nebe, B., Sietmann, R., Weltmann, K. D., Hübner, N. O., Kramer, A. & Kocher, T. (2011) Atmospheric Plasma Enhances Wettability and Osteoblast Spreading on Dentin In Vitro: Proof-of-Principle. *Plasma Processes and Polymers*, 8(10), 975-982.
- Koban, I., Holtfreter, B., Hubner, N. O., Matthes, R., Sietmann, R., Kindel, E., Weltmann, K. D., Welk, A., Kramer, A., Kocher, T. (2011) Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment. *J Clin Periodontol*, 38(10), 956-65.
- Kong, M. G., Kroesen, G. M. W., Morfill, G. E., Nosenko, T., Shimizu, T., van Dijk, J. & Zimmermann, J. (2009) *Plasma medicine: An introductory review*, 11.
- Korachi, M., Aslan, N. (2011) The Effect of Atmospheric Pressure Plasma Corona Discharge on pH, Lipid Content and DNA of Bacterial Cells. *Plasma Science and Technology*, 13(1), 99.
- Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A. & Chaieb, K. (2015) Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microbial Pathogenesis*, 80, 39-49.

Kovalová, Z., Zahoran, M., Zahoranová, A. & Machala, Z. (2014) Streptococci biofilm decontamination on teeth by low-temperature air plasma of dc corona discharges. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(22), 224014.

Kramer, A., Lademann, J., Bender, C., Sckell, A., Hartmann, B., Münch, S., Hinz, P., Ekkernkamp, A., Matthes, R., Koban, I., Partecke, I., Heidecke, C. D., Masur, K., Reuter, S., Weltmann, K. D., Koch, S. & Assadian, O. (2013) Suitability of tissue tolerable plasmas (TTP) for the management of chronic wounds. *Clin. Plasma Med.*, 1, 11-18.

Kunhardt, E. E. (2010) Generation of large-volume, atmospheric-pressure, nonequilibrium plasmas. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28(1), 189 - 200.

Labat, J. (1991) Samostalno pražnjenje, in Labat, Jaroslav (ed), *Fizika jonizovanih gasova*. Beograd: Fizički fakultet, 66-118.

Laroussi, M. Leipold, F. (2004) Evaluation of the roles of reactive species, heat and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrom*, 233, 81-6.

Lavenus, S., Louarn, G. & Layrolle, P. (2010) Nanotechnology and Dental Implants. *International Journal of Biomaterials*, 2010, 915327.

Lazović, S., Puač, N., Miletić, M., Pavlica, D., Jovanović, M., Bugarski, D., Mojsilović, S., Maletić, D., Malović, G., Milenković, P. & Petrović, Z. (2010) The effect of a plasma needle on bacteria in planktonic samples and on peripheral blood mesenchymal stem cells. *New Journal of Physics*, 12.

Lee, H. W., Nam, S. H., Mohamed, Abdel-Aleam H., Kim, G. C. & Lee, Jae Koo (2010) Atmospheric Pressure Plasma Jet Composed of Three Electrodes: Application to Tooth Bleaching. *Plasma Processes and Polymers*, 7(3-4), 274-280.

Lee, H. W., Kim, G. J., Kim, J. M., Park, J. K., Lee, J. K. & Kim, G. C. (2009) Tooth bleaching with nonthermal atmospheric pressure plasma. *J Endod*, 35(4), 587-91.

Lee, H. W., Nam, S. H., Abdel-Aleam H. M., Kim, G. C., Lee, J. K. (2010) Atmospheric Pressure Plasma Jet Composed of Three Electrodes: Application to Tooth Bleaching. *Plasma Processes and Polymers*, 7(3-4), 274-280.

Lehmann, A., Rueppell, A., Schindler, A., Zylla, I. M., Seifert, H. J., Nothdurft, F., Hannig, M. & Rupf, S. (2013) Modification of Enamel and Dentin Surfaces by Non-Thermal Atmospheric Plasma. *Plasma Process. Polym.*, 10, 262-270.

Lemos, J. A., Burne, R. A. (2008) A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 154(11), 3247-3255.

Lieberman, M. A., Lichtenberg, A. J. (2005) Introduction, in Lichtenberg, M. A. Lieberman and A. J. (ed), *Principles of Plasma Discharges and Materials Processing* Wiley, 1-22.

Lindhe, J. (1998) Clinical Periodontology and implant dentistry book. *Copenhagen: Munksgaard*.

Lord, M. J., Maltry, J. A. & Shall, L. M. (1991) Thermal injury resulting from arthroscopic lateral retinacular release by electrocautery: report of three cases and a review of the literature. *Arthroscopy*, 7(1), 33-7.

Lu, X., Cao, Y., Yang, P., Xiong, Q., Xiong, Z., Xian, Y. & Pan, Y. (2009) Plasma Device for Sterilization of Root Canal of Teeth. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 37(5), 668-673.

Lubelski, J., Konings, W. N. & Driessen, A. J. M. (2007) Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 463.

Lukes, P., Locke, B. R. & Brisset, J. (2012) Aqueous-Phase Chemistry of Electrical Discharge Plasma in Water and in Gas-Liquid Environments, in eds V. I. Parvulescu, M. Magureanu and P. Lukes (ed), *Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids*.

Malacarne-Zanon, J., Pashley, D. H., Agee, K. A., Foulger, S., Alves, M. C., Breschi, L., Cadenaro, M., Garcia, F. P. & Carrilho, M. R. (2009) Effects of ethanol addition on the water sorption/solubility and percent conversion of comonomers in model dental adhesives. *Dent Mater*, 25(10), 1275-84.

Malović, G., Puač, N., Lazović, S. & Petrović, Z. (2010) Mass analysis of an atmospheric pressure plasma needle discharge. *Plasma Sources Science and Technology*, 19(3), 034014.

- Manfroi, F. B., Marcondes, M. L., Somacal, D. C., Borges, G. A., Junior, L. H. & Spohr, A. M. (2016) Bond Strength of a Novel One Bottle Multi-mode Adhesive to Human Dentin After Six Months of Storage. *Open Dent J*, 10, 268-77.
- Marchesi, G., Frassetto, A., Mazzoni, A., Apolonio, F., Diolosa, M., Cadenaro, M., Di Lenarda, R., Pashley, D. H., Tay, F. & Breschi, L. (2014) Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-year in vitro study. *J Dent*, 42(5), 603-12.
- Marmur, A., Della Volpe, C., Siboni, S., Amirfazli, A. & Drelich, J. (2017) *Contact Angles and Wettability: Towards Common and Accurate Terminology*, 5.
- Mazzoni, A., Nascimento, F. D., Carrilho, M., Tersariol, I., Papa, V., Tjaderhane, L., Di Lenarda, R., Tay, F. R., Pashley, D. H. & Breschi, L. (2012) MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res*, 91(5), 467-72.
- Metelmann, H. R., Nedrelow, D. S., Seebauer, C., Schuster, M., von Woedtke, T., Weltmann, K. D., Kindler, S., Metelmann, P. H., Finkelstein, S. E., Von Hoff, D. D. & Podmelle, F. (2015) Head and neck cancer treatment and physical plasma. *Clinical Plasma Medicine*, 3(1), 17-23.
- Metelmann, H. R., Seebauer, C., Rutkowski, R., Schuster, M., Bekeschus, S. & Metelmann, Ph. (2018) Treating cancer with cold physical plasma: On the way to evidence-based medicine. *Contributions to Plasma Physics*, 58(5), 415-419.
- Miletić M (2013) *Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme in vitro na bakterije i mezenhimalne matične ćelije (doktorska disertacija)* Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet.
- Miletić M, Mojsilović, S., Okić Đorđević, I., Maletić, D., Puač, N., Lazović, S., Malović, G., Milenković, P., Petrović, Z. LJ. & Bugarski, D. (2013) Effects of non-thermal atmospheric plasma on human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 46(34).
- Miletić M, Vuković, D., Živanović, I., Dakić, I., Soldatović, I., Maletić, D., Lazović, S., Malović, G., Petrović, Z. LJ. & Puač, N. (2014) Inhibition of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by a plasma needle. *Central European Journal of Physics*, 12(3), 160-167.
- Miletic V, Pongprueksa, P., De Munck, J., Brooks, N. R. & Van Meerbeek, B. (2013) Monomer-to-polymer conversion and micro-tensile bond strength to dentine of experimental and commercial adhesives containing diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide or a camphorquinone/amine photo-initiator system. *Journal of Dentistry*, 41(10), 918-926.
- Miletic, V., Santini, A. (2012) Optimizing the concentration of 2,4,6-trimethylbenzoyldiphenylphosphine oxide initiator in composite resins in relation to monomer conversion. *Dent Mater J*, 31(5), 717-23.
- Mine, A., De Munck, J., Cardoso, M. V., Van Landuyt, K. L., Poitevin, A., Van Ende, A., Matsumoto, M., Yoshida, Y., Kuboki, T., Yatani, H. & Van Meerbeek, B. (2014) Dentin-smear remains at self-etch adhesive interface. *Dent Mater*, 30(10), 1147-53.
- Mittal, K. L. (2009) *Contact angle, wettability and adhesion*. Leiden: Koninklijke Brill NV.
- Montie, T. C., Kelly-Wintenberg, K. & Roth, J. R. (2000) An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28(1), 41-50.
- Moreau, M., Orange, N. & Feuilloley, M. G. (2008) Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnol Adv*, 26(6), 610-7.
- Morfill, G. E., Kong, M. G. & Zimmermann, J. L. (2009) Focus on plasma medicine. *New J Phys*, 11, 115011-115019.
- Munksgaard, E. C., Peutzfeldt, A. & Asmussen, E. (2000) Elution of TEGDMA and BisGMA from a resin and a resin composite cured with halogen or plasma light. *European Journal of Oral Sciences*, 108(4), 341-345.
- Munoz, M. A., Luque, I., Hass, V., Reis, A., Loguercio, A. D. & Bombarda, N. H. (2013) Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent*, 41(5), 404-11.
- Nakabayashi, N., Kojima, K. & Masuhara, E. (1982) The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*, 16(3), 265-73.
- Nakaoki, Y., Nikaido, T., Pereira, P. N., Inokoshi, S. & Tagami, J. (2000) Dimensional changes of demineralized dentin treated with HEMA primers. *Dent Mater*, 16(6), 441-6.

- Nam, S. H., Hong, J. W., Lee, H. J., Jeon, Y. C. & Kim, G. C. (2017) Safety of nonthermal atmospheric pressure plasma for tooth bleaching evaluated in terms of microhardness and mineral content. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 50(34), 345402.
- Nam, S. H., Lee, H. W., Cho, S. H., Lee, J. K., Jeon, Y. C. & Kim, G. C. (2013) High-efficiency tooth bleaching using non-thermal atmospheric pressure plasma with low concentration of hydrogen peroxide. *J Appl Oral Sci*, 21(3), 265-70.
- Oss, C. J., Good, R. J. & Chaudhury, M. K. (1987) Determination off the Hydrophobia Interaction Energy-Application to Separation Processes. *Separation Science and Technology*, 22(1), 1-24.
- Otten, M. P. T., Busscher, H. J., Abbas, F., van der Mei, H. C. & van Hoogmoed, C. G. (2012) Plaque-left-behind after brushing: intra-oral reservoir for antibacterial toothpaste ingredients. *Clinical Oral Investigations*, 16(5), 1435-1442.
- Owens, K. J. D. Wendt, R. C. J. (1969) Owens, D. K. & Wendt, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 13, 1741-1747, 13.
- Park, C., Yoo, S. H. , Park, S. W. , Yun, K. D. , Ji, M. K. , Shin, J. H. & Lim, H. P. (2017) The effect of plasma on shear bond strength between resin cement and colored zirconia. *The Journal of Advanced Prosthodontics*, 9(2), 118-123.
- Pashley, D. H., Ciucchi, B., Sano, H. & Horner, J. A. (1993) Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int*, 24(9), 618-31.
- Pashley, D. H., Tay, F. R., Breschi, L., Tjaderhane, L., Carvalho, R. M., Carrilho, M. & Tezvergil-Mutluay, A. (2011) State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*, 27(1), 1-16.
- Pashley, D. H. Carvalho, R. M. (1997) Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent*, 25(5), 355-72.
- Perdigao, J. (2010) Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater*, 26(2), e24-37.
- Perdigao, J., Sezinando, A. & Monteiro, P. C. (2013) Effect of substrate age and adhesive composition on dentin bonding. *Oper Dent*, 38(3), 267-74.
- Petrović, Z. LJ., Puač, N., Malović, G., Lazović, S., Maletić, D., Miletić, M., Mojsilović, S., Milenković, P. & Bugarski, D. (2012) Application of non-equilibrium plasmas in medicine. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(12).
- Peumans, M., Kanumilli, P., De Munck, J., Van Landuyt, K., Lambrechts, P. & Van Meerbeek, B. (2005) Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. *Dent Mater*, 21(9), 864-81.
- Peutzfeldt, A., Sahafi, A. & Asmussen, E. (2000) Characterization of resin composites polymerized with plasma arc curing units. *Dent Mater*, 16(5), 330-6.
- Potter, M. J., Harrison, R., Ramsden, A., Bryan, B., Andrews, P. & Gault, D. (2007) Facial acne and fine lines: transforming patient outcomes with plasma skin regeneration. *Ann Plast Surg*, 58(6), 608-13.
- Price, R. B. T. (2017) Light Curing in Dentistry. *Dent Clin North Am*, 61(4), 751-778.
- Puač, N. (2007) *Razvoj, dijagnostika i primene mikrotalasnih i radiofrekventnih plazma reaktora (doktorska disertacija)* Univerzitet u Beogradu, Fizički fakultet.
- Puač, N., Miletić, M., Mojović, M., Popović-Bijelić, A., Vuković, D., Miličić, B., Maletić, D., Lazović, S., Malović, G. & Petrović, Z. LJ. (2015) Sterilization of bacteria suspensions and identification of radicals deposited during plasma treatment *Open Chemistry*, 13(1), 332–338.
- Pumbwe, L., Skilbeck, C. A. & Wexler, H. M. (2008) Presence of Quorum-sensing Systems Associated with Multidrug Resistance and Biofilm Formation in *Bacteroides fragilis*. *Microbial Ecology*, 56(3), 412-419.
- Rasband, W.S. (1997-2018.) ImageJ U. S. National Institutes of Health, 1997-2018. Available online: <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- Richardson, L. A. (2017) Understanding and overcoming antibiotic resistance. *PLOS Biology*, 15(8), e2003775.

Ritts, A. C., Li, H., Yu, Q., Xu, C., Yao, X., Hong, L. & Wang, Y. (2010) Dentin surface treatment using a non-thermal argon plasma brush for interfacial bonding improvement in composite restoration. *Eur J Oral Sci*, 118(5), 510-6.

Rosa, W. L., Piva, E. & Silva, A. F. (2015) Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *J Dent*, 43(7), 765-76.

Rosales, J. I., Marshall, G. W., Marshall, S. J., Watanabe, L. G., Toledano, M., Cabrerizo, M. A. & Osorio, R. (1999) Acid-etching and hydration influence on dentin roughness and wettability. *J Dent Res*, 78(9), 1554-9.

Rueggeberg, F. (1999) Contemporary issues in photocuring. *Compend Contin Educ Dent Suppl*(25), S4-15; quiz S73.

Rueggeberg, F. A. (2011) State-of-the-art: Dental photocuring—A review. *Dental Materials*, 27(1), 39-52.

Rupf, S., Idlibi, A. N., Marrawi, F. A., Hannig, M., Schubert, A., von Mueller, L., Spitzer, W., Holtmann, H., Lehmann, A., Rueppell, A. & Schindler, A. (2011) Removing Biofilms from Microstructured Titanium Ex Vivo: A Novel Approach Using Atmospheric Plasma Technology. *PLOS ONE*, 6(10), e25893.

Rupf, S., Lehmann, A., Hannig, M., Schafer, B., Schubert, A., Feldmann, U. & Schindler, A. (2010) Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. *J Med Microbiol*, 59(Pt 2), 206-12.

Ryu, Y. H., H., Kim Y., Y., Lee J., B., Shim G., S., Uhm H., G., Park & H., Choi E. (2013) Effects of background fluid on the efficiency of inactivating yeast with non-thermal atmospheric pressure plasma. *PLoS One* 8, e66231.

Sandt, Christophe, Gagnon, Marc-André, Lafleur, Michel & Barbeau, Jean (2007) Role of the ammonium group in the diffusion of quaternary ammonium compounds in *Streptococcus mutans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(6), 1281-1287.

Šantak, V., Vesel, A., Zaplotnik, R., Biščan, M. & Milošević, S. (2017) Surface Treatment of Human Hard Dental Tissues with Atmospheric Pressure Plasma Jet. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 37(2), 401-413.

Santini, A. (2010) Current Status of Visible Light Activation Units and the Curing of Light-activated Resin-based Composite Materials. *Dent Update*, 37(4), 214-6, 218-20, 223-7.

Santini, A., Miletic, V. (2008) Quantitative micro-Raman assessment of dentine demineralization, adhesive penetration, and degree of conversion of three dentine bonding systems. *Eur J Oral Sci*, 116(2), 177-83.

Scheinin, A. (1958) Microscopic Observations on Living Dental Pulp II. The Effect of Thermal Irritants on the Circulation of the Pulp in the Lower Rat Incisor AU - Pohto, Mauri. *Acta Odontologica Scandinavica*, 16(3), 315-327.

Schmidt, M. (2005) Surface treatment, in K. Becker, U. Kogelschatz, K. Schoenbach, R. Barker (ed), *Non-Equilibrium Air Plasmas at Atmospheric Pressure*. Bristol: Institute of Physics Publishing, 597-621.

Schuster, M., Seebauer, C., Rutkowski, R., Hauschild, A., Podmelle, F., Metelmann, C., Metelmann, B., von Woedtke, T., Hasse, S., Weltmann, K. D. & Metelmann, H. R. (2016) Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 44(9), 1445-1452.

Seo, H. Y., Kwon, J. S., Choi, Y. R., Kim, K. M., Choi, E. H. & Kim, K. N. (2014) Cellular Attachment and Differentiation on Titania Nanotubes Exposed to Air- or Nitrogen-Based Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma. *PLOS ONE*, 9(11), e113477.

Shimizu, T., Steffes, B., Pompl, R., Jamitzky, F., Bunk, W., Ramrath, K., Georgi, M., Stolz, W., Schmidt, H. U., Urayama, T., Fujii, S. & Morfill, G. E. (2008) Characterization of microwave plasma torch for decontamination. *Plasma Process Polym*, 5, 577-582.

Silva, N. R., Coelho, P. G., Valverde, G. B., Becker, K., Ihrke, R., Quade, A. & Thompson, V. P. (2011) Surface characterization of Ti and Y-TZP following non-thermal plasma exposure. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 99(1), 199-206.

- Sladek, R. E., Filoche, S. K., Sissons, C. H. & Stoffels, E. (2007) Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. *Lett Appl Microbiol*, 45(3), 318-23.
- Sladek, R. E. J. , Stoffels, E., Walraven, R., Tielbeek, P. J. A. & Koolhoven, R. A. (2004) Plasma treatment of dental cavities: a feasibility study. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 32(4), 1540-1543.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, 28, 12-55.
- Spencer, P., Wang, Y. (2002) Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res*, 62(3), 447-56.
- Stalder, A. F., Melchior, T., Müller, M., Sage, D., Blu, T. & Unser, M. (2010) Low-Bond Axisymmetric Drop Shape Analysis for Surface Tension and Contact Angle Measurements of Sessile Drops. 364(1-3), 72–81. Available online: [Accessed 2010].
- Stamenković, D., Obradović-Đuričić, K., Ivanović, V., Vulicević, Z. R., Marković, D., Todorović, A., Raić, K., Pavlović, G., Popović, G. & Velicković, S. (2009a) Medjumolekulske sile i principi adhezije, in Stamenkovic, Dragoslav (ed), *Stomatoloski materijali. Knjiga 1*. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Stomatoloski fakultet, 67-84.
- Stamenković, D., Obradović-Đuričić, K., Ivanović, V., Vulicević, Z. R., Marković, D., Todorović, A., Raić, K., Pavlović, G., Popović, G. & Velicković, S. (2009b) Hemijska svojstva stomatoloskih materijala, in Stamenkovic, Dragoslav (ed), *Stomatoloski materijali. Knjiga 1*. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Stomatoloski fakultet, 85-122.
- Stansbury, J. W. (2000) Curing Dental Resins and Composites by Photopolymerization. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 12(6), 300-308.
- Steelman, V. M. (1992) Ethylene oxide. The importance of aeration. *Aorn j*, 55(3), 773-5, 778-9, 782-3 passim.
- Stewart, Ph. S. (2003) Diffusion in Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1485.
- Stewart, Ph. S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J. G., Lewandowski, Z., Ochsner, U. A. & Hassett, D. J. (2000) Effect of Catalase on Hydrogen Peroxide Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 836-838.
- Stoffels, E., Flikweert, A. J., Stoffels, W. W. & Kroesen, G. M. W. (2002) Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials. *Plasma Sources Science and Technology*, 11(4), 383.
- Stoffels, E., Kieft, I. E., Sladek, R. E. J. , van den Bedem, L. J. M. , van der Laan, E. P. & Steinbuch, M. (2006) Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. *Plasma Sources Science and Technology*, 15(4), S169.
- Tanaka, J., Ishikawa, K., Yatani, H., Yamashita, A. & Suzuki, K. (1999) Correlation of dentin bond durability with water absorption of bonding layer. *Dent Mater J*, 18(1), 11-8.
- Tay, F. R., Pashley, D. H., Suh, B. I., Carvalho, R. M. & Itthagarun, A. (2002) Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent*, 30(7-8), 371-82.
- Thurnheer, T., Gmür, R., Shapiro, S. & Guggenheim, B. (2003) Mass Transport of Macromolecules within an In Vitro Model of Supragingival Plaque. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1702.
- Toledano, M., Osorio, R., Moreira, M. A., Cabrerizo-Vilchez, M. A., Gea, P., Tay, F. R. & Pashley, D. H. (2004) Effect of the hydration status of the smear layer on the wettability and bond strength of a self-etching primer to dentin. *Am J Dent*, 17(5), 310-4.
- Torii, K., Yamada, S., Nakamura, K., Tanaka, H., Kajiyama, H., Tanahashi, K., Iwata, N., Kanda, M., Kobayashi, D., Tanaka, C., Fujii, T., Nakayama, G., Koike, M., Sugimoto, H., Nomoto, S., Natsume, A., Fujiwara, M., Mizuno, M., Hori, M., Saya, H. & Kodera, Y. (2015) Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells. *Gastric Cancer*, 18(3), 635-43.
- Ureyen, K. B., Kececi, A. D., Guldaz, H. E., Cetin, E. S., Ozturk, T., Oksuz, L. & Bozduman, F. (2014) Efficacy of endodontic applications of ozone and low-temperature atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Lett Appl Microbiol*, 58(1), 8-15.

- Utsumi, F., Kajiyama, H., Nakamura, K., Tanaka, H., Hori, M. & Kikkawa, F. (2014) Selective cytotoxicity of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma against ovarian clear-cell carcinoma. *Springerplus*, 3, 398.
- Utsumi, F., Kajiyama, H., Nakamura, K., Tanaka, H., Mizuno, M., Ishikawa, K., Kondo, H., Kano, H., Hori, M. & Kikkawa, F. (2013) Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One*, 8(12), e81576.
- Valverde, G. B., Coelho, P. G., Janal, M. N., Lorenzoni, F. C., Carvalho, R. M., Thompson, V. P., Weltemann, K. D. & Silva, N. R. (2013) Surface characterisation and bonding of Y-TZP following non-thermal plasma treatment. *J Dent*, 41(1), 51-9.
- Van Landuyt, K. L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., Coutinho, E., Suzuki, K., Lambrechts, P. & Van Meerbeek, B. (2007) Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, 28(26), 3757-85.
- Van Landuyt, K. L., Snauwaert, J., Peumans, M., De Munck, J., Lambrechts, P. & Van Meerbeek, B. (2008) The role of HEMA in one-step self-etch adhesives. *Dent Mater*, 24(10), 1412-9.
- Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., Van Landuyt, K., Lambrechts, P. & Vanherle, G. (2003) Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*, 28(3), 215-35.
- Van Meerbeek, B., Van Landuyt, K., De Munck, J., Hashimoto, M., Peumans, M., Lambrechts, P., Yoshida, Y., Inoue, S. & Suzuki, K. (2005) Technique-sensitivity of contemporary adhesives. *Dent Mater J*, 24(1), 1-13.
- Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, A., De Munck, J. & Van Landuyt, K. L. (2011) State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*, 27(1), 17-28.
- Van Oss, C. J., Chaudhury, M. K. & Good, R. J. (1988) Interfacial Lifshitz-van der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems. *Chem Rev*, 88, 927-41.
- Van Oss, C. J., Chaudhury, M. K., Good, R. J. (1987) Monopolar surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 28, 35-64.
- Van Oss, C. J., Ju, L., Chaudhury, M. K., Good, R. J. (1989) Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. *Journal of Colloid and Interface Science*, 128(2), 313-319.
- Vargha-Butler, E. I., Kashi, M., Hamza, H. A. & Neumann, A. W. (1986) Direct Contact Angle Measurements on Polished Sections of Coal. *Coal Preparation*, 3(2), 53-75.
- von Woedtke, Th, Reuter, S., Masur, K. & Weltmann, K. D. (2013) Plasmas for medicine. *Physics Reports*, 530(4), 291-320.
- von Woedtke, Th., Metelmann, H.-R. & Weltmann, K.-D. (2014) Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of in Vivo Application of Cold Atmospheric Plasma. *Contributions to Plasma Physics*, 54(2), 104-117.
- Waltham, MA (2006) Portrait® PSR3 System User Manual USA and Canada. *Rhytec Inc.*
- Wang, R., Zhou, H., Sun, P., Wu, H., Pan, J., Zhu, W., Zhang, J. & Fang, J. (2011) The Effect of an Atmospheric Pressure, DC Nonthermal Plasma Microjet on Tooth Root Canal, Dentinal Tubules Infection and Reinfection Prevention, 1(2), 143-155.
- Wang, Y., Spencer, P., Yao, X. & Ye, Q. (2006) Effect of coinitiator and water on the photoreactivity and photopolymerization of HEMA/camphoquinone-based reactant mixtures. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 78(4), 721-728.
- Wang, Y., Spencer, P. (2002) Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res*, 59(1), 46-55.
- Weltmann, K. D., von Woedtke, T. (2017) Plasma medicine—current state of research and medical application. *Plasma Phys. Control. Fusion*, 59, 014031.
- Werdin, F., Tennenhaus, M., Schaller, H. E. & Rennekampff, H. O. (2009) Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Eplasty*, 9, e19.
- Williams, D. T., Kuhn, A. A., Amann, M. B., Hausinger, M. M., Konarik, M. I. & Nesselrode, E. (2010) *Computerized Measurement of Contact Angles*, 101.

- Wolf, R. A. (2002) Atmospheric Plasma Surface Modification Effects, in R.A., Wolf (ed), *Atmospheric Pressure Plasma for Surface Modification*.
- Wu, A. S., Kalghatgi, S., Dobrynin, D., Sensenig, R., Cerchar, E., Podolsky, E., Dulaimi, E., Paff, M., Wasko, K., Arjunan, K. P., Garcia, K., Fridman, G., Balasubramanian, M., Ownbey, R., A Barbee, K., Fridman, A., Friedman, G., Joshi, S. & Brooks, A. (2012) *Porcine intact and wounded skin responses to atmospheric nonthermal plasma*, 179.
- Wu, S. (1971) Calculation of interfacial tension in polymer systems. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*, 34(1), 19-30.
- Yang, B., Chen, J. H., Yu, Q., Li, H., Lin, M., Mustapha, A., Hong, L. & Wang, Y. (2011) Oral Bacterial Deactivation Using a Low-Temperature Atmospheric Argon Plasma Brush. *Journal of dentistry*, 39(1), 48-56.
- Yasuda, H. , Miura, T., Kurita, H. , Takashima, K. & Mizuno, A. (2010) Biological evaluation of DNA damage in bacteriophages inactivated by atmospheric pressure cold plasma. . *Plasma Processes Polym*, 7(301-8).
- Ye, Q., Park, J., Parthasarathy, R., Pamatmat, F., Misra, A., Laurence, J. S. , Marangos, O. & Spencer, P. (2012) Quantitative analysis of aqueous phase composition of model dentin adhesives experiencing phase separation. *J Biomed Mater Res Part B*, 100B, 1086-1092.
- Yoshida, Y., Nagakane, K., Fukuda, R., Nakayama, Y., Okazaki, M., Shintani, H., Inoue, S., Tagawa, Y., Suzuki, K., De Munck, J. & Van Meerbeek, B. (2004) Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res*, 83(6), 454-8.
- Yoshida, Y., Van Meerbeek, B., Nakayama, Y., Yoshioka, M., Snauwaert, J., Abe, Y., Lambrechts, P., Vanherle, G. & Okazaki, M. (2001) Adhesion to and decalcification of hydroxyapatite by carboxylic acids. *J Dent Res*, 80(6), 1565-9.
- Yoshida, Y., Yoshihara, K., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Okihara, T., Matsumoto, T., Minagi, S., Osaka, A., Van Landuyt, K. & Van Meerbeek, B. (2012) HEMA inhibits interfacial nano-layering of the functional monomer MDP. *J Dent Res*, 91(11), 1060-5.
- Yoshihara, K., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Fukegawa, D., Hayakawa, S., Mine, A., Nakamura, M., Minagi, S., Osaka, A., Suzuki, K. & Van Meerbeek, B. (2010) Nano-controlled molecular interaction at adhesive interfaces for hard tissue reconstruction. *Acta Biomater*, 6(9), 3573-82.
- Yoshinari, M., Matsuzaka, K. & Inoue, T. (2011) Surface modification by cold-plasma technique for dental implants—Bio-functionalization with binding pharmaceuticals. *Japanese Dental Science Review*, 47(2), 89-101.
- Yoshinari, M., Matsuzaka, K., Inoue, T., Oda, Y. & Shimono, M. (2002) Bio-Functionalization of Titanium Surfaces for Dental Implants. *Materials Transactions*, 43(10), 2494-2501.
- Young, T. (1805) An Essay on the Cohesion of Fluid. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 95, 65-87.
- Yuan, Y., Lee, T. R. (2013) *Contact Angle and Wetting Properties*. , 51. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Zach, L., Cohen, G. (1965) Pulp response to externally applied heat. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 19(4), 515-530.
- Zanchi, C. H., Munchow, E. A., Ogliari, F. A., de Carvalho, R. V., Chersoni, S., Prati, C., Demarco, F. F. & Piva, E. (2013) Effects of long-term water storage on the microtensile bond strength of five experimental self-etching adhesives based on surfactants rather than HEMA. *Clin Oral Investig*, 17(3), 833-9.
- Zhang, Y. S., Yao, J. (2018) Imaging Biomaterial–Tissue Interactions. *Trends in Biotechnology*, 36(4), 403-414.
- Zhang, Y., Yu, Q. & Wang, Y. (2014) Non-thermal atmospheric plasmas in dental restoration: improved resin adhesive penetration. *J Dent*, 42(8), 1033-42.
- Zhang, Z. Y., Tian, F. C., Niu, L. N., Ochala, K., Chen, C., Fu, B. P., Wang, X. Y., Pashley, D. H. & Tay, F. R. (2016) Defying ageing: An expectation for dentine bonding with universal adhesives? *J Dent*, 45, 43-52.

Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D. L. & Boyan, B. D. (2005) High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*, 74(1), 49-58.

Zhu, W., Becker, K., Fang, J., Zhang, J. & Pan, J. (2014) Dental Applications of Atmospheric-Pressure Low-Temperature Plasmas, 455-486.

## BIOGRAFIJA

Dr Jovana N. Stašić rođena je u Kruševcu 1988. godine. Stomatološki fakultet, Univerziteta u Beogradu upisala je 2007. godine, a diplomirala 2013. godine sa prosečnom ocenom 8,94. Pripravnički staž obavila je na Stomatološkom fakultetu u trajanju od godinu dana i uspešno položila pripravnički ispit maja 2014. godine. Doktorske akademske studije je upisala na istom fakultetu 2013. godine. Položila je sve ispite koji su predviđeni planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00. Autor je ili koautor jednog poglavlja u međunarodnoj monografiji (rad u tematskom zborniku) kategorije M14, 2 rada kategorije M21a i M21, po 1 rada iz kategorija M22 i M23, 1 rada kategorije M51 i 1 rad kategorije M52, 2 rada u stručnom časopisu i 11 radova kategorije M34 i 5 radova kategorije M64. Tokom osnovnih studija nagrađena je za najbolji naučni rad iz grupacije fakulteta medicinskih nauka 2011. godine, pod nazivom “Sorpcija i rastvorljivost eksperimentalnih kompozitnih materijala” od strane Univerziteta u Beogradu. Učestvovala je kao demonstrator na Festivalu nauke koji je održan decembra 2015. godine. Član je istraživačke grupe DentalNet. Živi u Beogradu.

## Bibliografija

### Poglavlje u monografiji (rad u tematskom zborniku)

**Stasic Jovana N** and Miletic Vesna. Surface Modification of Dental Materials and Hard Tissues Using Nonthermal Atmospheric Plasma. In Mitrovic N, Milosevic M, Mladenovic G (Editors). Computational and Experimental Approaches in Materials Science and Engineering, Proceedings of the International Conference of Experimental and Numerical Investigations and New Technologies, CNNTech 2019, LNNS 90. Springer Nature Switzerland AG 2020 pp: 119-138. DOI: 10.1007/978-3-030-30853-7\_8

### Radovi u časopisima

**Jovana N. Stasic**, Nenad Selaković, Nevena Puač, Maja Miletić, Gordana Malović, Zoran Lj. Petrovič, Djordje N. Veljović, Vesna Miletić. Effects of non-thermal atmospheric plasma treatment on dentin wetting and surface free energy for application of universal adhesives. *Clinical Oral Investigations* 2019; 23(3): 1383-1396. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2563-2> (**M21; IF 2,386**)

Miletic V, Marjanovic J, Veljovic DN, **Stasic JN**, Petrovic V. Color stability of bulk-fill and universal composite restorations with dissimilar dentin replacement materials. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2019, In Press, doi: 10.1111/jerd.12529 (**M22; IF 1,716**)

Petrovic V, **Stasic JN**, Komlenic V, Savic-Stankovic T, Latkovic M, Miletic V. Temperature changes in the pulp chamber induced by polymerization of resin-based dental restoratives following simulated direct pulp capping. *Hemijska industrija* 2019;73:239-248 <https://doi.org/10.2298/HEMIND190504020P> (**M23; IF 0,566**)

Jovana Marjanovic, Djordje N. Veljovic, **Jovana N. Stasic**, Tatjana Savic-Stankovic, Branka Trifkovic, Vesna Miletic. Optical properties of composite restorations influenced by dissimilar dentin restoratives. *Dent Mater* 2018; 34(5): 737-745. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.01.017> (M21a; IF 4,070)

Vanja Opačić Galić, **Jovana N. Stašić**. Efficacy of different irrigation techniques on calcium hydroxide removal from the root canal. *Stom Glas S* 2018; 65(3): 148-152. <http://doi.org/10.2478/sdj-2018-0015>

Miletic V, Savic Stankovic T, Stasic J. Sensitivity of composite materials to ambient light and clinical working time. *Stom Glas S* 2012; 59(4): 190-197. <https://doi.org/10.2298/SGS1204190M>

**Stošić J**, Matić O, Jovanović S, Stamatović L. Mogućnosti kliničke primene “bulk fill” kompozita. *Stomatolog* 2017; 23(3-4): 40-45.

**Stošić J**, Komlenić V, prevodioci. Saopštenje Evropskog udruženja endodontologa: upotreba antibiotika u endodonciji (Segura-Egea J et al. Antibiotics in Endodontics: a review. *International Endodontic Journal*, 2017; 50(12): 1169–1184). *Stomatolog*, 2018; 24(1):37-43.

### Saopštenja sa kongresa

**Stasic JN**, Kuzmanovic P, Pficer J, Milicic B, Miletic V. Effects of Nonthermal Atmospheric Plasma on Adhesive-Dentin Bond Strength: Meta-Analysis. 2019 CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, Madrid, Spain, September 19-21, 2019. (poster prezentacija)

Miletic V, **Stasic JN**, Komlenic V. Multifactorial Analysis of Discoloration of Sculptable Universal Composites. 2019 CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, Madrid, Spain, September 19-21, 2019. (poster prezentacija)

Komlenic V, **Stasic JN**, Miletic V. Effect of Preheating and Modelling Instrument Temperature on Composite Cooling. 2019 CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, Madrid, Spain, September 19-21, 2019. (poster prezentacija)

**Jovana N. Stasic**, Vesna Miletic. Temperature changes during light curing of conventional and “bulk-fill” dental composites. Seventeen young researchers’ conference materials science and engineering. Beograd, December 2018. godine. (usmena prezentacija)

**Jovana Stašić**, Vojislav Komlenić, Tatjana Savić-Stanković, Marina Latković, Violeta Petrović. „Promena temperature u komori pulpe tokom simulirane procedure direktnog prekrivanja pulpe“. 17 Kongres stomatologa Srbije-međunarodni kongres, Beograd, septembar 2018. godine. (usmena prezentacija)

Vojislav Komlenić, Danica Bajuk-Bogdanović, **Jovana Stašić**, Vesna Miletic. „Stepen konverzije tečnog kompozita u uslovima odstupanja od kliničkog protokola aplikacije kompozita“. 17 Kongres stomatologa Srbije-međunarodni kongres, Beograd, septembar 2018. godine. (usmena prezentacija, koautor)

Miletic V, Peric D, **Stasic J**, Levic S, Ruzic J. Polymer and mechanical characteristics of bulk-fill, low-shrinkage and hybrid composites. *J Dent Res* 96 (Spec Iss B): 181

(CED-IADR), 2017. (www.iadr.com) CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, Vienna, Austria, September 21-23, 2017. (usmena prezentacija, koautor)

Dejan Perić, **Jovana Stasic**, Steva Lević, Vesna Miletic. „Effect of ethanol storage on the degree of conversion of bulk-fill, low-shrinkage and conventional composites“. 15th young researchers' conference materials science and engineering, Beograd, December 2016. godine. (usmena prezentacija)

Milica Antonov, Nikola Jovanović, Miroslav D. Dramićanin, **Jovana Stašić**, Ivana Zeković, Dragica Manojlović. „Discoloration of resin-based dental composites from different manufacturers“. 15th young researchers' conference materials science and engineering, Beogradu, December 2016. godine. (usmena prezentacija, koautor)

Tatjana Savic-Stankovic, Marko Zivkovic, **Jovana Stasic**, Jovan Cabunac, Vesna Miletic. „Effect of bleaching systems on composite bond strength to dentin“. International Dental Journal (Spec Iss): 66: p.89. 104th FDI World Dental Congress, Poljska, September 2016. godine. (poster prezentacija)

Nenad Selaković, **Jovana Stasic**, Nevena Puač, Maja Miletić, Vesna Miletic, Gordana Malovića, Zoran Lj. Petrović. „Modification of the dentin surface of human teeth by atmospheric pressure plasma needle“. 23rd Europhysics Conference on Atomic and Molecular Physics of Ionized Gases, Bratislava, July, 2016. godine. str. 257-258. ISBN: 979-10-96389-02-5 (poster prezentacija)

**Jovana Stasic**, Dragica Manojlovic, Ivana Cvijovic-Alagic, Maja Lezaja, Tatjana Savic-Stankovic, Vesna Miletic. „Mechanical properties of experimental composites containing a low-shrinkage monomer and monoacylphospine oxide photoinitiator“. 13th young researchers' conference materials science and engineering, Beograd, December 2014. godine. (usmena prezentacija)

**Jovana Stašić**, Nenad Selaković, Maja Miletić, Nevena Puač, Vesna Miletić. „Uticaj niskotemperaturne atmosferske plazme na površinska svojstva dentina“. 16. Kongres stomatologa Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, septembar 2017. godine. (usmena prezentacija)

**Jovana Stašić**, Luka Stamatović. „Zbrinjavanje preloma krunice zuba „bulk fill“ kompozitom nakon endodontskog lečenja“. I simpozijumu iz restaurativne stomatologije, Beogradu, jun 2017. godine. (poster prezentacija)

Marko Zivkovic, Iva Mijailovic, **Jovana Stasic**. „The influence of different in-office bleaching systems on the shear bond strength of composite to dentin: an in vitro study“. 3<sup>rd</sup> Global Students' Conference of Biomedical Sciences. Belgrade, oktobar 2016. godine. (usmena prezentacija, koautor)

**Jovana Stasic**, Nenad Selaković, Maja Miletić, Nevena Puač, Gordana Malović, Zoran Petrović, Vesna Miletic. „Uticaj niskotemperaturne atmosferske plazme na promenu temperature u komori pulpe“. Naučni skup povodom obeležavanja 67. Godišnjice Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Dostignuća i stremjenja u stomatologiji), Beograd, jun 2015. godine. (poster prezentacija)

Прилог 1.

## **Изјава о ауторству**

Потписана **Јована Сташић**

број индекса 4006/2013

### **Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Утицај нискотемпературне атмосферске плазме на површинска својства дентина и његову интеракцију са адхезивним системима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора **Јована Сташић**

Број индекса **4006/2013**

Студијски програм **Базична и клиничка истраживања у стоматологији**

Наслов рада Утицај нискотемпературне атмосферске плазме на површинска својства дентина и његову интеракцију са адхезивним системима

Ментори **проф др Весна Милетић**

**доц. др Маја Милетић**

Потписана **Јована Сташић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Утицај нискотемпературне атмосферске плазме на површинска својства дентина и његову интеракцију са адхезивним системима**

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство – некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_