

## Dentalni kompoziti zasnovani na amorfnome kalcij fosfatu

Drago Škrtić

Istraživački centar Paffenbarger, Fundacija američke udruge zubara  
Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, Gaithersburg, MD 20899, SAD  
Autor za korespondenciju: Drago Škrtić  
Paffenbarger Research Center, American Dental Association Foundation  
National Institute of Standards and Technology, 100 Bureau Drive Stop 8456, Gaithersburg, MD 20899, USA  
Tel: 301 975 3541 E-mail: drago.skrtic@nist.gov

Pregledni članak  
UDK 6161.314-74:615.463  
Prispjelo: lipanj 2010.

Značenje bioaktivnih polimernih kompozita zasnovanih na amorfnome kalcij fosfatu (ACP) kao dentalnih materijala proizlazi iz njihovoga potencijala za sprječavanje demineralizacije zubnih struktura i biokompatibilnosti. U posljednjih desetak godina, u našoj su grupi sustavno istraživani odnosi strukture, sastava i svojstava ACP kompozita s ciljem da se što ravnomjernijom raspodjelom ACP-a u organskoj matrici poboljšaju fizičko-kemijska svojstva materijala, posebice otpuštanje mineralnih iona i mehanička čvrstoća. Opsežna fizičko-kemijska, mehanička i biološka ispitivanja opisana u ovome radu pokazuju kako molekularna struktura monomera i polimera, te međudjelovanja ACP punila s organskom komponentom kompozita utječu na kritična svojstva tih materijala.

**Ključne riječi:** Amorfnj kalcij fosfati; Biokompatibilni materijali; Zubni materijali; Remineralizacija zubi; Polimeri

### 1. UVOD

Zubni karijes je posljedica složenih međudjelovanja zubnoga minerala i biofilma uvjetovanih prehranom, funkcijom žlijezda slinovnica i genetičkim čimbenicima. Usprkos značajnom napretku u razumijevanju mehanizma nastajanja karijesa, posebice u drugoj polovici prošloga stoljeća, on je i danas jedna od globalno najrasprostranjenijih bolesti. Pojednostavljeno gledano, lokalizirano propadanje zubnoga tkiva posljedica je fermentacije ugljikohidrata (porast koncentracije organskih kiselina uzrokuje otapanje zubnoga minerala) koju pospješuju bakterije iz zubnoga plaka. Zubi su neprekidno izloženi cikličkim promjenama tijekom kojih prevladavaju demineralizacija (oralni je pH nizak i zubni mineral se otapa) odnosno remineralizacija (neutralni ili bazični pH kada se zubni mineral obnavlja). Ovisno o tome koji od dva navedena procesa prevladava u oralnom mediju, zubni karijes će se razviti i napredovati, razviti i potom stagnirati ili, u rijetkim slučajevima, mineral će se spontano obnoviti. Glavni je cilj kliničke intervencije sačuvati zubnu strukturu i spriječiti širenje karijesa kako bi se izbjegla potreba za restoracijom zuba. Strategijski, prevencija je karijesa usmjerena na sljedeće: 1) redukciju rasta bakterija, 2) neutralizaciju oralnih kiselina i 3) uporabu različitih remineralizacijskih tvari. Remineralizacijski pristup temelji se na uspostavi potrebnih koncentracija mineralnih iona u oralnom mediju što se u praksi pokušava postići uporabom zubnih pasti, guma za žvakanje i tekućina za ispiranje usta koje sadrže kalcij i fosfat, te fluoridizacijom. Zbog vrlo niske topljivosti kalcij fos-

fata, posebno u prisutnosti fluorida, njihovoga minimalnog ugrađivanja u zubni plak, te nedostatnoga lokaliziranja na površini zuba, uporaba remineralizacijskih otopina najčešće ne polučuje zadovoljavajuće kliničke rezultate. Pojednostavljeno rješenje problema je dodatak fluorida u zubne materijale. Fluoridni ioni difundiraju u oštećenu caklinu i ugrađuju se u zubni mineral kao fluoroapatit ili fluoridom-obogaćeni hidroksiapatit (1-4). Materijali na bazi fluorida nisu jednako učinkoviti u obnovi oštećenoga dentina (5, 6). Tijekom posljednjih petnaestak godina je posebna pozornost posvećena novim remineralizacijskim pristupima koji se temelje na kazein-fosfopeptidnom kompleksu s amorfnim kalcij fosfatom (ACP; 7-9) i polimernim kompozitima temeljenim na ACP-u (10-12). U ovome je radu opisan dizajn polimernih ACP remineralizacijskih kompozita, s posebnim naglaskom na strukturu monomera, sastav smola i fizičko-kemijske osobine materijala namijenjenih za različite primjene u zubarstvu.

#### 1.1. Amorfnj kalcij fosfat (ACP): kemija i značenje u zubarstvu

Kalcijevi fosfati (CP) su od posebnoga značenja u zubarstvu kao sastavna komponenta normalnoga razvoja zubnih tkiva, patološke mineralizacije (zubni kalkulus) i demineralizacije (zubni karijes). ACP je jedinstven među CP-ima zbog svoje nekristaliničnosti (**Tablica 1**).

TABLICA 1.  
 Kemijska formula, Ca/P molarni omjer i topljivost kalcij fosfatnih (CP) minerala  
 TABLE 1.

Chemical formula, Ca/P molar ratio and solubility of calcium phosphate (CP) minerals

Kalcij fosfat Calcium Phosphate (CP)	Formula	Skraćenica Acronym*	Ca/P	Topljivost Solubility <sup>#</sup> (25 °C)
Amorfni kalcij fosfat Amorphous calcium phosphate	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}^{**}$	ACP	1,2 - 2,2**	-
Dikalcij fosfat Dicalcium phosphate	$\text{CaHPO}_4$	DCP	1,00	6,90
Dikalcij fosfat dihidrat Dicalcium phosphate dihydrate	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DCPD	1,00	6,59
Trikalcij fosfat ( $\alpha$ - ili $\beta$ -oblik) Tricalcium phosphate ( $\alpha$ - or $\beta$ -form)	$\alpha$ - ili $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $\alpha$ - or $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\alpha$ -TCP $\beta$ -TCP	1,50 1,50	25,5 28,9
Oktakalcij fosfat pentahidrat Octacalcium phosphate pentahydrate	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	OCP	1,33	96,6
Hidroksiapatit Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	HAP	1.67	116,8
Fluoroapatit Fluoroapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	FAP	1.67	120,0

\* Skraćenice su izvedene iz engleskih naziva. \*\* Približna formula, omjer Ca/P je promjenljiv; topljivost se ne može precizno izmjeriti (14). <sup>#</sup>Topljivost odgovara neg. logaritmu ionskoga produkta za danu kemijsku formulu (-log ( $K_{sp}$ )); koncentracije su izražene u mol/l.

\* Acronyms are derived from English names. \*\* Approximate formula, Ca/P ratio is variable; solubility can not be precisely determined (14). <sup>#</sup>Solubility corresponds to the negative logarithm of the ionic product for the given chemical formula (-log ( $K_{sp}$ )); concentrations are given in mol/L.

CP-i s definiranom kristalnom strukturom imaju različite molarne omjere kalcij/fosfat (Ca/P) i razlikuju se po morfologiji i topljivosti. Sustavna istraživanja sintetičkih CP-a upućuju na to da u različitim koncentracijskim područjima, temperaturi i pH, nastaju različiti CP-i, a stabilnost im je definirana upravo tim parametrima. ACP, koji taloži spontano iz prezasićenih otopina kalcijevih ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i fosfatnih ( $\text{PO}_4$ ) iona kod bazičnoga pH, smatra se prekursorom u nastajanju hidroksiapatita (HAP; 13, 14). HAP je termodinamički stabilan oblik CP-a u neutralnim i bazičnim otopinama. Brzina i stupanj pretvorbe ACP-a u HAP prvenstveno su ovisni o

kemijskom sastavu mikrookoline (prisutnost anorganskih kationa i aniona te organskih molekula, koji se adsorbiraju na površini ACP-a, ugrađuju u njegovu strukturu ili pak sutalože s ACP-om).

CP materijali namijenjeni za regeneraciju čvrstih tkiva atraktivni su prije svega zbog visokoga stupnja biokompatibilnosti. ACP je dodatno zanimljiv jer može održati dugotrajni dotok  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4$  iona nužnih za obnovu oštećenih mineralnih struktura i tako usporiti razvoj ili spriječiti nastanak karijesa. Zbog tih osobina, bioaktivni ACP kompoziti nalaze

TABLICA 2.  
Potencijalna primjena bioaktivnih, remineralizacijskih ACP kompozita u zubarstvu  
TABLE 2.

Potential application of bioactive, remineralizing ACP composites in dentistry

Dentalno područje Dental Field	Primjena Application
Preventivno zubarstvo Preventive dentistry	Sprječavanje opetovane pojave karijesa na međupovršini restorativni materijal/zubna struktura; posebice prikladan u pacijenata sklonih karijesu kao posljedici radioterapije ili uzimanja lijekova koji uzrokuju suhoću usta Preventing caries development at the interphase restorative material/tooth structure; especially suitable for patients prone to caries formation due to radio-therapy and/or patients taking medications that cause dry mouth
Ortodoncija Orthodontics	Adhezivni cement koji može spriječiti demineralizaciju cakline ispod ortodontskih pomagala Adhesive cement capable of preventing demineralization under orthodontic brackets
Endodoncija Endodontics	Biokompatibilni material za ispunjavanje korijena zubi Biocompatible material for root canal treatments

primjenu u prevenciji demineralizacije. Njihova uporaba u restorativne svrhe ograničena je zbog neodgovarajućih mehaničkih svojstava u usporedbi s biostabilnim kompozitnim materijalima (Tablica 2). Razlike između biostabilnih i bioaktivnih zubnih materijala pojašnjene su u Tablici 3.

### 1.2. Dentalni kompoziti: povezanost strukture i svojstava

Dentalne kompozite čine polimerna matrica (najčešće metakrilati) i punilo (staklo, keramički oksidi ili, u našem slučaju, ACP). Kompozit je rezultat inter-atomskih ili molekulskih međudjelovanja sastavnih komponenata. Da bi se poboljšala sprega između organske i anorganske komponente, u kompozite se često dodaju tvari koje stabiliziraju međupovršinu punilo/organska matrica. Da bi se bolje razumjelo, i eventualno uspješno predvidjelo moguća međudjelovanja komponenata kompozita s oralnim medijem, nužno je barem minimalno razumijevanje kemije tih komponenata. Također je potrebno razmotriti moguće produkte biodegradacije, kao i moguća međudjelovanja sa zubnim strukturama. Razgradnja, koju pospješuju enzimi u slini obično rezultira dobro definiranim kemijskim produktima (15), koji pak mogu utjecati na biološku aktivnost stanica i oralnih bakterija u neposrednom dodiru s restorativnim materijalom.

Tipična dentalna smola sadrži relativno viskozni bazični monomer, te jedan ili više ko-monomera manje viskoznosti. Temeljna uloga bazičnog monomera je da svojim relativno

velikom molekularnim volumenom kompenzira skupljanje smole prilikom polimerizacije i povećava modul elastičnosti polimera. Komonomeri koji imaju manji molekularni volumen i veću fleksibilnost nego bazični monomer, olakšavaju rukovanje materijalom i pridonose većem stupnju konverzije vinilnih funkcionalnih skupina pri polimerizaciji (16). Najčešće upotrebljavani bazični monomer, 2-bis(p-2'-hidroksi-3'-metakriloksi)propilfenil-propan (poznat pod kraticom Bis-GMA u engleskoj literaturi), vrlo se često "razrjeđuje" s trietilen glikol dimetakrilatom (engl. kratica TEGDMA). Hidroksilne skupine Bis-GMA i etilen-oksidni segmenti TEGDMA pospješuju adsorpciju vode (engl. kratica WS) Bis-GMA/TEGDMA ko-polimera (17). Ukoliko je udio Bis-GMA u smoli visok, stupanj konverzije vinilnih funkcionalnih skupina (degree of vinyl conversion; DVC) bit će relativno nizak. Skupljanje pri polimerizaciji (polymerization shrinkage; PS), uz relativno nisku efikasnost polimerizacije i "plastifikacija" ko-polimera u kontaktu s oralnim tekućinama značajno ograničavaju primjenu i vijek trajanja Bis-GMA/TEGDMA kompozita. Zbog toga se intenzivno istražuju alternativni bazični monomeri i komonomeri kao zamjene za Bis-GMA, odnosno TEGDMA. Primjerice, polimeri koji sadrže etoksilirani bisfenol A dimetakrilat (EBPADMA), relativno hidrofobni, fleksibilniji i manje viskozni analog of Bis-GMA, u pravilu postižu viši DVC i manje PS u usporedbi s Bis-GMA smolama (18). Monomeri i sustavi za iniciranje polimerizacije koji će biti diskutirani u ovome radu navedeni su u Tablici 4.

TABLICA 3.  
 Razlike u funkciji biostabilnih i bioaktivnih dentalnih materijala  
 TABLE 3.  
 Functional differences between biostable and bioactive dental materials

Vrsta materijala Material Type	Sastavne komponente i funkcija Components and Function
Biostabilan Biostable	<p>Metakrilatni monomeri + sustav za iniciranje polimerizacije koji čine polimernu matricu</p> <p>Silanizirano staklo ili keramičko punilo koje poboljšava mehanička svojstva kompozita</p> <p>Methacrylate monomers + polymerization initiators forming polymer matrix</p> <p>Silanized glass or ceramic filler that improves mechanical properties of composites</p>
Bioaktivan Bioactive	<p><u>Ionomeri na bazi stakla ili modificirane smole</u></p> <p>Poli-alkenoati koji čine polielektrolitnu matricu</p> <p>Stakleno punilo koje otpušta F<sup>-</sup> ione koji mogu taložiti FAP ili CaF<sub>2</sub></p> <p><u>ACP kompozit</u></p> <p>Metakrilatni monomeri + sustav za iniciranje polimerizacije koji čine polimernu matricu</p> <p>ACP punilo oslobađa ione Ca<sup>2+</sup> i PO<sub>4</sub> ione potrebne za regeneraciju zubnog minerala</p> <p><u>Glass ionomers or resin-modified ionomers:</u></p> <p>Poly-alkenoates forming the polyelectrolyte matrix</p> <p>Glass filler capable of releasing F<sup>-</sup> ions and precipitating FAP or CaF<sub>2</sub></p> <p><u>ACP composite:</u></p> <p>Methacrylate monomers + polymerization initiators forming polymer matrix</p> <p>ACP filler capable of releasing Ca and PO<sub>4</sub> ions needed to regenerate tooth mineral</p>

Mehanička svojstva polimernih kompozita ovise prije svega o stanju međupovršine anorgansko punilo/organska smola. Osnovni preduvjet za mehaničku stabilnost kompozita u destruktivnom oralnom mediju jest homogena raspodjela punila u organskoj matrici, tj. što intimniji kontakt punilo/polimer i, posljedično, što manji broj lokaliteta gdje prevladava ili samo punilo ili pak smola. Homogenost kompozita neposredno određuje WS kao i kinetiku otpuštanja iona te produkata razgradnje.

U pravilu se mehanička svojstava kompozita poboljšavaju s povećanjem DVC-a i umrežavanjem polimera. Međutim, porast DVC-a u pravilu prati i klinički nepoželjni porast PS, uslijed kojega rastu napetosti unutar kompozita. Zbog porasta napetosti unutar kompozita slabe adhezivne i/ili kohezivne veze što onda omogućuje da tekućine, bakterije, ioni,

molekule ili pak zrak prodru u međupovršinu restorativnoga materijala i zubnoga tkiva (u engleskoj se literaturi taj fenomen naziva micro-leakage). U takvom se mikrookolišu lako razvija sekundarni karijes, koji s vremenom dovodi u pitanje biostabilnost materijala (19).

Iz bioaktivnoga ACP punila umiješanog u polimeriziranu metakrilatnu smolu u vodenom se mediju postupno oslobađaju Ca<sup>2+</sup> i PO<sub>4</sub> ioni i njihove koncentracije dostižu razinu potrebnu za nastajanje stabilnoga HAP minerala (11,12,20,21). Općeniti problem s dentalnim kompozitima je da zbog neodgovarajuće čvrstoće i slabe otpornosti na stres koji nastaje pri žvakanju vrlo lako napuknu. U slučaju ACP kompozita, nekontrolirana agregacija ACP čestica (22) uzrokuje slabljenje veza na međupovršinama ACP/smola i dodatno slabi mehanička svojstva materijala. Zbog toga su

TABLICA 4.  
 Metakrilatni monomeri i komponente sustava za iniciranje polimerizacije  
 TABLE 4.  
 Methacrylate monomers and the components of the photoinitiator systems

Sastojak Component	Kemijsko ime Chemical name	Skraćenica Acronym
Bazični monomeri  Base monomers	2,2-bis(p-2'-hidroksi-3'-metakriloksipropoksi)fenil-propan 2,2-bis(p-2'-hydroxy-3'-methacryloxypropoxy)phenyl-propane Etoksilirani bisfenol A dimetakrilat Ethoxylated bisphenol A dimethacrylate Uretan dimetakrilat Urethane dimethacrylate	Bis-GMA  EBPADMA  UDMA
Komonomeri Co-monomers	2-hidroksietil metakrilat 2-hydroxyethyl methacrylate Uretan dimetakrilat s ugrađenim poli(etilen glikolom) Poly(ethylene glycol) extended urethane dimethacrylate Trietilen glikol dimetakrilat Triethyleneglycol dimethacrylate	HEMA  PEG-U  TEGDMA
Adhezivni monomeri  Adhesive monomers	Metakriloiloksietil ftalat Methacryloyloxyethyl phtalate Piromelitični glicerol dimetakrilat Pyromellitic glycerol dimethacrylate Cirkonil dimetakrilat Zirconyl dimethacrylate	MEP  PMGDMA  ZrDMA
Komponente sustava za iniciranje polimerizacije Components of the photoinitiator systems	Benzoil peroksid Benzoyl peroxide Kamforkinon Camphorquinone 2,2'-Dihidroksietil-p-toluidin 2,2'-Dihydroxyethyl-p-toluidine Etil-4-N,N-dimetilamino benzoat Ethyl-4-N,N-dimethylamino benzoate Bis(2,6-dimetoksibenzoil)-2,4,4-trimetilpentil fosfin oksid & 1- hidroksicikloheksil fenil keton Bis(2,6-dimethoxybenzoyl)-2,4,4-trimethylpentyl phosphine okside & 1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone	BPO  CQ  DHEPT  EDMAB  IRGACURE 1850*

\*Komerrijalno ime/Commercial name.

mehaničke karakteristike ACP kompozita lošije od komercijalnih kompozita koji koriste punila na bazi stakla s homogenom raspodjelom čestica. Naša su istraživanja usmjerena na poboljšavanje svojstava

međupovršine ACP/smola kroz bolju kontrolu veličine čestica ACP-a i njegovih površinskih svojstava (modifikacijom površine ili mljevenjem), te na prilagođavanje sastava metakrilatnih smola (21,23). Od kompozita s homogenijom

raspodjelom ACP-a očekuje se i viši DVC, što bi im trebalo dodatno poboljšati biokompatibilnost. Pored dizajniranja novih remineralizacijskih kompozita s poboljšanim fizičko-kemijskim, mehaničkim i biološkim svojstvima, cilj nam je i bolje razumjeti vezu između kemijske strukture, stupnja konverzije i umrežavanja polimera, te mehaničkih i termodinamičkih svojstava ACP kompozita.

### 1.3. Citotoksičnost ACP kompozita

Osnovna kvaliteta biomaterijala temeljenih na CP-ima je njihova biokompatibilnost i osteokonduktivnost (24-27). Biokompatibilnost CP-a proizlazi iz sličnosti njihovoga kemijskog sastava s anorganskom komponentom čvrstih tkiva. CP-i čija topljivost nadilazi topljivost HAP-a reaktivni su i pospješuju regeneraciju čvrstih tkiva kroz sudjelovanje  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4$  iona u metaboličkim procesima (27,28). Međutim, točan mehanizam kojim topljiviji CP-i pospješuju osteogenezu još nije razjašnjen (29-33). Naša ispitivanja upućuju na to da kopolimeri (smole bez ACP-a) koji postižu visok DVC zadržavaju visok DVC i u ACP kompozitima (21,22), pa se stoga DVC koristi kao posredni pokazatelj potencijalne biokompatibilnosti materijala.

U većini naših eksperimenata, ACP je sintetiziran u prisutnosti cirkonij klorida ( $\text{ZrOCl}_2$ ) kako bi se poboljšala stabilnost ACP-a u vodenom mediju (34). Takav ACP (označen kao Zr-ACP) sadrži u prosjeku ( $8.6 \pm 1.4$ ) % cirkonija (11). CP materijali u pravilu nastaju iz otopina koje sadrže ione kalcija, fosfata, natrija i/ili kalija. Uloga izvanstaničnoga kalcija u reguliranju specifičnih staničnih procesa tek je nedavno opisana (32,33). Utvrđeno je nadalje da osteoblasti utječu na transport fosfata što je također jedan od preduvjeta za mineralizaciju čvrstih tkiva (35). Identificirani su specifični receptori za kalcij, odnosno fosfat (32,36), ali ne i za silicij koji također utječe na metabolizam kostiju (33,35). U ovom trenutku nema podataka o mogućoj ulozi cirkonija u procesu mineralizacije. Ne može se, međutim, potpuno isključiti mogućnost da cirkonij također utječe na stanične procese.

Budući da polimerizacija dentalnih kompozita nikad nije potpuna, bilo koja od sastavnih komponenata smole može se teorijski naći u ekstraktima polimeriziranih materijala (37,38). Neki od tih nopolimeriziranih (neizreagiranih) monomera mogu izazvati različite biološke efekte uključujući i genetičke mutacije *in vitro*. Takav je učinak utvrđen za TEGDMA, ali ne i HEMA odnosno UDMA (39). Za EBPADMA, bazični monomer korišten u nizu eksperimentalnih formulacija u našoj grupi, za sada ne postoje publicirani podaci. Citotoksičnost UDMA, TEGDMA i HEMA u pojednostavljenim modelnim sustavima (izražena kao koncentracija potrebna da se aktivnost mitohondrija smanji na 50 % početne aktivnosti) opada u sljedećem nizu: UDMA > TEGDMA > HEMA (40).

Kemijska struktura i koncentracija sastavnih komponenata smole, vrsta i koncentracija inicijatora polimerizacije te postignuti DVC važni su čimbenici koji utječu na stanične procese. Citotoksičnost kompozita neposredna je posljedica

difuzije neizreagiranih monomera i/ili produkata degradacije u oralni medij. I dok rutinska ispitivanja DVC-a i citotoksičnosti mogu biti dobar pokazatelj biokompatibilnosti materijala, za potpunije razumijevanje uzročno-posljedičnih veza citotoksičnosti i stupnja polimerizacije bit će nužno odrediti vrstu i količinu organskih komponenata koje s vremenom difundiraju iz kompozita.

## 2. EKSPERIMENTALNE METODE

Metode i tehnike koje se koriste za procjenu ACP punila, kopolimera i ACP kompozita, te slijed eksperimentalnih postupaka u njihovom dizajniranju i karakterizaciji prikazani su u **Tablici 5** (navedene skraćenice izvedene su od engleskih naziva), odnosno **Slici 1**.

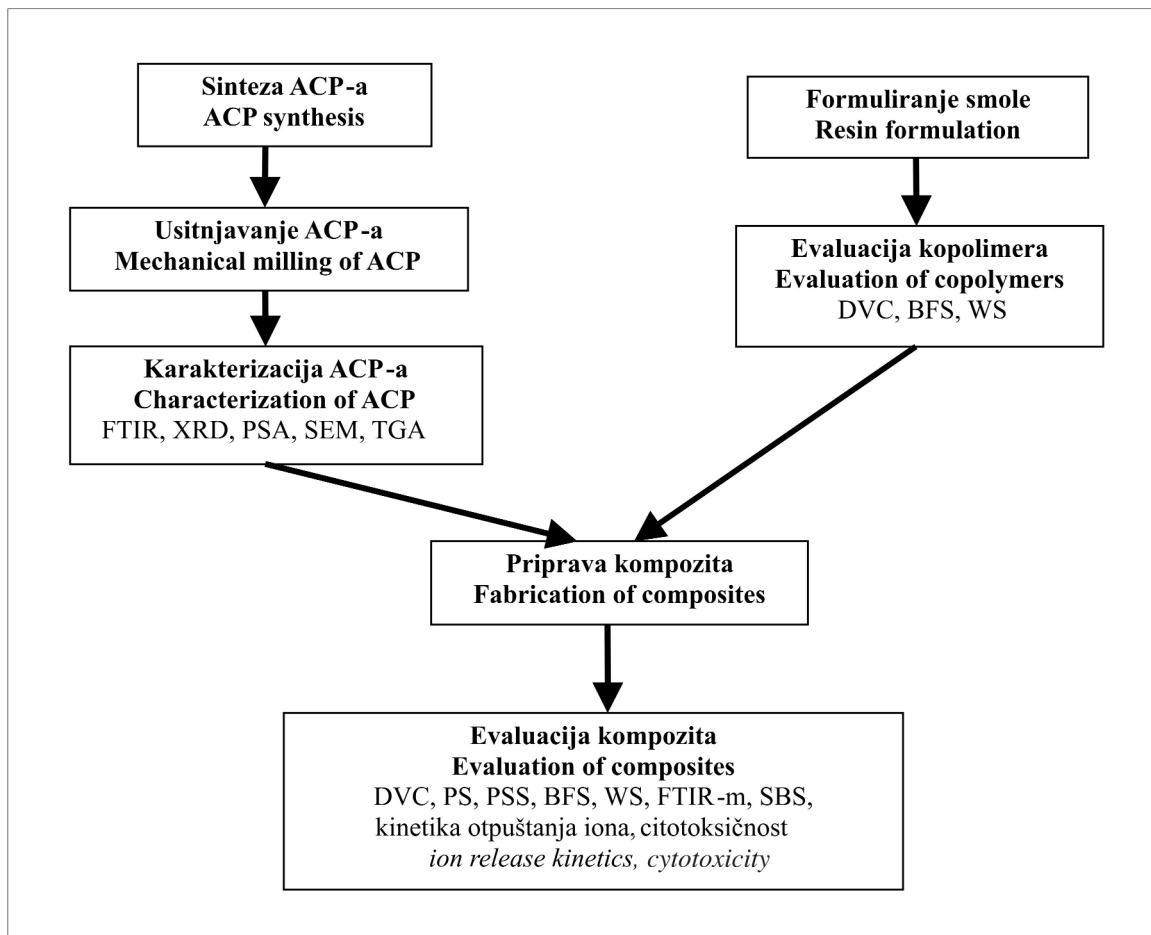
### 2.1. Sinteza i mehaničko usitnjavanje ACP-a

Sinteza ACP-a detaljno je opisana u radovima (10-12). ACP taloži spontano na sobnoj temperaturi ( $23^\circ\text{C}$ ) nakon dodavanja, uz stalno miješanje, otopine  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (80 mmol/l) otopini  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (54 mmol/l) koja sadrži 2 mol %  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (stabilizator ACP-a). Različiti aditivi se mogu dodati paralelno s otopinom  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  uz održavanje pH reakcije između 8.5 i 9.0. Suspenzija se potom filtrira, talog se ispire ledeno-hladnom amonijaknom vodom, zatim acetonom, te napoljetku liofilizira. Suhi se ACP koristi bez daljnje obrade (u radovima je označen kao am-ACP: od engleske riječi *as-made*) ili se usitnjava mljevenjem (m-ACP; 41,42). ACP se uvijek drži pod vakuumom u eksikatoru kako bi se spriječio dodir s vlagom i njegova preuranjena transformacija u HAP (voda katalizira proces pretvorbe ACP-a).

Mehaničko mljevenje ACP-a provodi se na slijedeći način: u reaktorskoj posudi pomiješa se am-ACP prah s kuglicama  $\text{ZrO}_2$  (promjer 3 mm; proizvođač: Glen Mills Inc., Clifton, NJ, USA) u masenom omjeru 1:25, doda se 150 ml izopropilnoga alkohola analitičke čistoće, reaktor se hermetički zatvori i uloži u mlin (planetarni mlin PM 100, Retch Inc., Newton, PA, USA). Nakon balansiranja mlina, ACP se usitnjava 2 sata uz programiranu promjenu smjera vrtnje svakih 15 minuta i broj okretaja od 42 rad/s. Po završetku mljevenja, ACP se uklanja s kuglica prosijavanjem i ispiranjem u izopropilnom alkoholu (preostali alkohol ispari se zagrijavanjem m-ACP-a na  $70^\circ\text{C}$  kroz 24 sata u vakuumu (Squaroid Labline, Melrose Park, IL, USA).

TABLICA 5. (Stranica 7.)  
Metode/tehnike za karakterizaciju ACP-a, kopolimera i ACP kompozita  
TABLE 5. (Page 7)  
Methods/techniques for characterization of ACP, copolymers and ACP composites

Metoda Method	Svojstvo Property
Analiza veličine čestica Particle size analysis (PSA)	Raspodjela veličine čestica ACP-a Size distribution of ACP particles
Dilatometrija Dilatometry	Volumno skupljanje kompozita pri polimerizaciji Polymerization shrinkage (PS) of composites
Fourier-transform infracrvena spektroskopija Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy	Struktura monomera, ACP-a i kompozita; stupanj konverzije vinilnih skupina u kopolimerima i kompozitima Structure of the monomers, ACP and composites; degree of vinyl conversion (DVC) attained in copolymers and composites
Gravimetrija Gravimetry	Adsorpcija vode u kopolimerima i kompozitima Water sorption (WS) in copolymers and composites
Kolorimetrija Colorimetry	Stanična aktivnost u ekstraktima kopolimera i/ili kompozita Cell viability in extracts of copolymers and composites
Mehanička svojstva Mechanical properties	Dvoosna savojna čvrstoća kopolimera i kompozita; smična čvrstoća vezanja kompozita Biaxial flexure strength (BFS) of copolymers and composites; shear bond strength (SBS) of the composites
Mehaničko mljevenje Mechanical milling	De-aglomeracija čestica ACP-a De-agglomeration of ACP particles
Mikroradiografija Microradiography	Gustoća zubnog minerala Density of tooth mineral
Optička mikroskopija optical microscopy	Morfologija stanica u ekstraktima kopolimera i kompozita Cell morphology in the extracts of copolymers and composites
Pretražna elektronska mikroskopija Scanning electron microscopy (SEM)	Morfologija/površinske karakteristike ACP-a i kompozita Morphology/topology of ACP filler and ACP composites
UV/VIS spektrofotometrija UV/VIS spectrophotometry	Sastav ACP-a; kinetika oslobađanja $Ca^{2+}$ i $PO_4$ iona iz kompozita ACP composition; kinetics of $Ca^{2+}$ i $PO_4$ ion release from composites
Termogravimetrija Thermogravimetry (TGA)	Sadržaj vode i termička stabilnost ACP-a Water content and thermal stability of ACP
Tenziometrija Tensometry	Unutarkompozitne napetosti uzrokovane polimerizacijom Intracomposite stress development due to polymerization
Rentgenska analiza X-ray diffraction (XRD) analysis	Struktura ACP-a i transformacija u vodenom mediju Structure of ACP and its transformation in aqueous medium



SLIKA 1.  
Slijed eksperimentalnih postupaka pri dizajniranju i procjeni ACP kompozita

FIG. 1.  
Experimental steps involved in design and evaluation of ACP composites

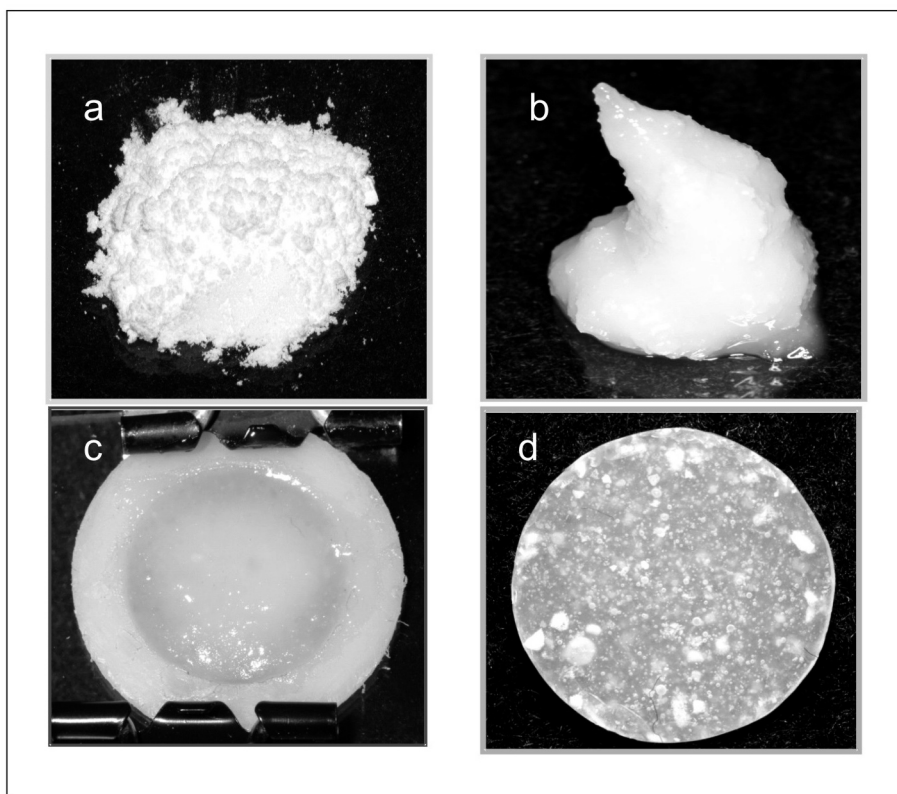
## 2.2. Formuliranje smola; priprava kopolimera i kompozita

Eksperimentalne smole priređuju se miješanjem komercijalnih monomera u željenom omjeru masa. U formulacijama koje se aktiviraju svjetlom, koristi se smjesa CQ i EDMAB ili IRGACURE 1850, koji se dodaju monomerima i magnetski miješaju (38 rad/s; pod žutim svjetlom da se spriječi preuranjena fotopolimerizacija) na 23°C do homogeniziranja smjese. Ako se polimerizacija inicira kemijskom reakcijom, početna smjesa monomera podijeli se u dva ekvivalentna dijela, potom se u jedan doda BPO, a u drugi DHEPT. Svaki se dio zasebno homogenizira i drži odvojeno do priprave kopolimera, odnosno kompozita.

ACP prah, kompozitna pasta i tipični uzorak (disk prije i nakon polimerizacije) prikazani su na Slici 2. Slika 3 ilustrira razlike u volumnoj raspodjeli veličina čestica tipičnoga Zr-ACP-a prije i nakon mljevenja te kontrolnoga Sr stakla.

Kompozitne paste priređuju se ručnim miješanjem aktivirane smole (60% mase) i ACP-a (40% mase). Nakon homogeniziranja, paste se drže pod umjerenim vakuumom (2,7 kPa) preko noći kako bi se uklonio zrak što se unosi u pastu tijekom miješanja, a koji može znatno usporiti polimerizacijski proces. Svjetlom polimerizirana pasta potom se utisne u kalup načinjen od Teflona [uzorci su valjkastoga oblika ( $15,0 \pm 0,5$ ) mm promjera i ( $1,5 \pm 0,2$ ) mm visine za mehaničko testiranje; te ( $5,3 \pm 0,1$ ) mm promjera i ( $3,1 \pm 0,1$ ) mm visine za testove citotoksičnosti]. Obje strane kalupa pokriju se najprije Mylar filmom, potom mikroskopskim stakalcem i učvrste elastičnom oprugom. Uzorci se foto-polimeriziraju izlaganjem svake strane kalupa vidljivom svjetlu u trajanju od 120 sekundi (Triad 2000, Dentsply International, York, PA, USA). Paste koje sadrže BPO, odnosno DHEPT (kemijski inicirana polimerizacija) pomiješaju se u omjeru masa 1:1, smjesa se homogenizira i potom utisne u kalup kao što je prethodno opisano. Kod dvojne (svjetlosna + kemijska) aktivacije, kemijski polimerizirani uzorci dodatno se izlažu svjetlu. Bez obzira na način polimerizacije, svi se uzorci drže na zraku 24 sata pri sobnoj temperaturi, prije nego što se



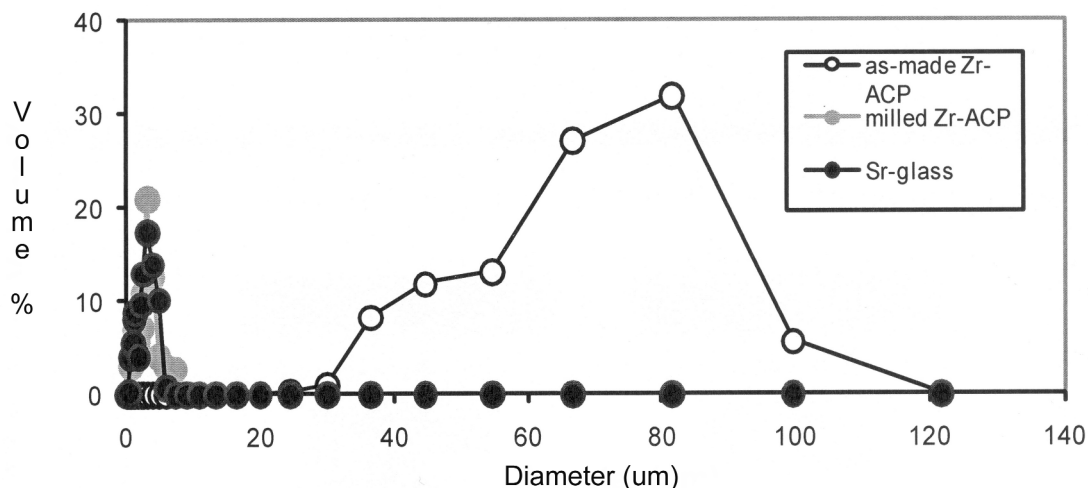


SLIKA 2.

Zr-ACP prah (a), kompozitna pasta (b), i uzorak prije (c) i nakon foto polimerizacije (d). Heterogena raspodjela ACP unutar kompozita jasno je vidljiva na slici 2d

FIG. 2.

Zr-ACP powder (a), composite paste (b), and sample before (c) and after photopolymerization (d). Heterogeneous distribution of ACP within the composite is clearly seen in Fig. 2d



SLIKA 3.

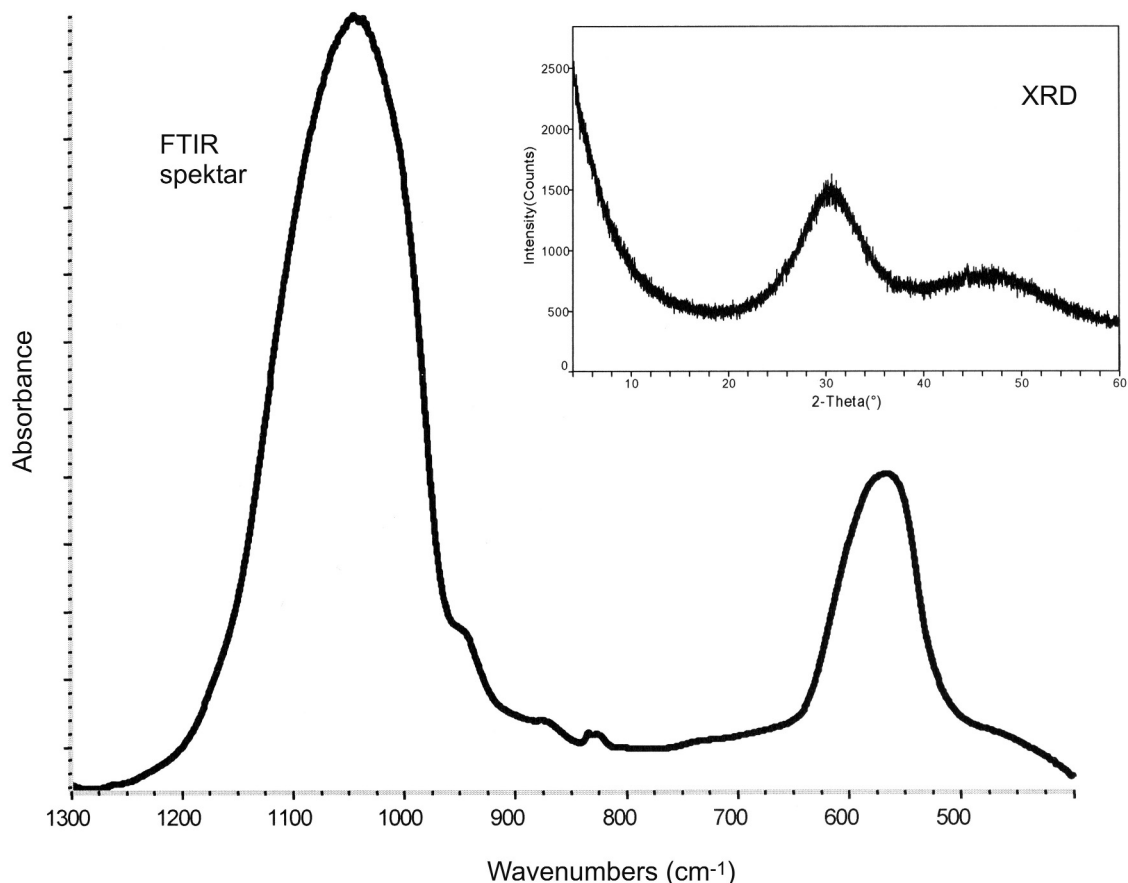
Tipična raspodjela veličina čestica am-ACP-a, m-ACP-a i Sr stakla

FIG. 3.

Particle size distributions typical of am-ACP-a, m-ACP-a and Sr glass

nasumice odabiru za mehaničko testiranje, mjerenje Ca i PO<sub>4</sub> u vodenim otopinama ili određivanje citotoksičnosti. Dijelovi uzoraka skupljenih nakon određivanja mehaničke čvrstoće u suhom stanju koriste se za mjerenje sorpcije vode.

Kopolimerni uzorci priređuju se analogno kompozitnim uzorcima. Ukoliko se komercijalni materijali koriste kao kontrolna skupina, uzorci se pripremaju prema uputama proizvođača.



SLIKA 4.  
Tipični FTIR spektar i XRD (umetak) ACP punila  
FIG. 4.  
Typical FTIR and XRD (inset) spectra of ACP filler

### 2.3. Fizičko-kemijske karakteristike ACP-a, kopolimera i kompozita

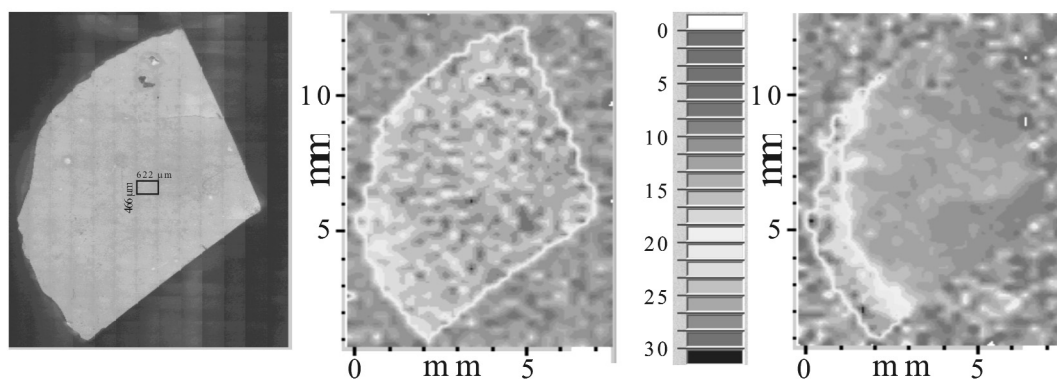
Nekristaliničnost ACP punila utvrđuje se rentgenskom difrakcijskom analizom (XRD; DMAX 2000 difraktometar, Rigaku/USA Inc., Danvers, MA, USA) i Fourier-transform infracrvenom spektroskopijom (FTIR: Nicolet Magna-IR FTIR 550 spektrofotometar, Nicolet Instrumentation Inc., Madison, WI, USA; (10,11,20,23). XRD spektar bilježi se u području  $4^\circ$  do  $60^\circ$   $2\theta$  koristeći  $\text{CuK}\alpha$  radijaciju ( $\lambda = 0,154$  nm) kod 40 kV i 40 mA. Uobičajeni uvjeti XRD mjerenja su ovi: interval od  $0,010^\circ$   $2\theta$  pri brzini skeniranja od 1.000 stupanj/minuta. Uzorci za FTIR spektroskopska mjerenja ( $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ ) priređuju se KBr tehnikom (0,8 mg to 1,0 mg ACP/400 mg KBr). Spektar smole obično se mjeri tehnikom tankoga filma između KBr pločica. FTIR i XRD spektar karakterističan za ACP prikazan je na Slici 4.

Za utvrđivanje stupnja konverzije pri polimerizaciji (DVC) kopolimera i kompozita koriste se rutinska FTIR mjerenja (mid-FTIR ili near-IR-NIR). DVC na temelju mid-FTIR mjerenja (prije i nakon polimerizacije - obično 5 sati i 24 sata određuje se iz smanjenja površine apsorpcijske vrpce vinilne skupine ( $1637\text{ cm}^{-1}$ ) u odnosu na aromatsku vrpce ( $1538$

$\text{cm}^{-1}$ ; unutarnji standard) koja se pri polimerizaciji ne mijenja. DVC vrijednosti NIR metodom (16) izračunavaju se kao % promjene metakrilat= $\text{CH}_2$  apsorpcije kod  $6165\text{ cm}^{-1}$  između polimeriziranog uzorka (polimer) i nepolimeriziranih monomera. Kod NIR metode površina apsorpcijske vrpce normalizira se dijeljenjem s debljinom uzorka, a ne koristi se unutarnji standard.

FTIR-mikrospektroskopija (FTIR-m; Nicolet Magna-IR 550 FTIR spektrofotometar opremljen s video kamerom, Hg-Cd teluridnim detektorom i "mapping" programom: Omnic® Atlas™ software, Spectra-Tech Inc., Shelton, CT, USA) koristi se za morfološku i strukturnu analizu vanjskih površina kopolimera i kompozita i njihovih presjeka prije i nakon izlaganja vodenom mediju. FTIR-m posebno je prikladna metoda za određivanje raspodjele organske komponente i ACP punila (detaljno opisana u radu (22); primjer je dan na Slici 5).

Za analizu raspodjele veličina čestica (PSA) ACP-a koristi se laserski analizator (CIS-100, Ankersmid, Metropolitan Computing Corporation, E. Hanover, NJ, USA). Mjerenja se provode u suhom stanju ili se ACP prah rasprši u izo-

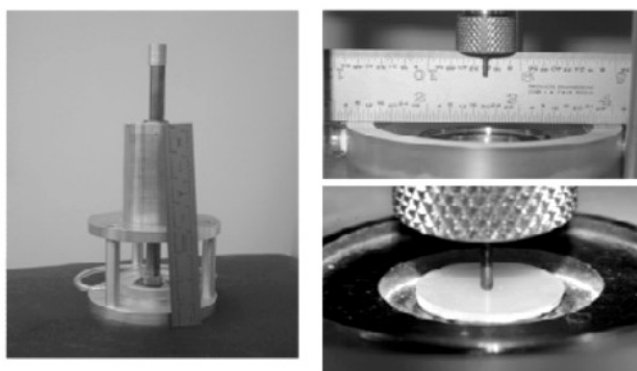


SLIKA 5.

Rezultati FTIR-m analize tipičnoga ACP kompozita nakon određivanja mehaničke čvrstoće mokroga uzorka: vizualna mapa, C=O mapa, indikator intenziteta boja i PO<sub>4</sub> mapa. Koncentracija organske komponente (C=O), odnosno ACP-a (PO<sub>4</sub>) opada u nizu: plavo > zeleno > žuto > narančasto > crveno. Dok je smola prilično ravnomjerno raspoređena (C=O mapa), osim uskoga rubnog područja (lijeva strana PO<sub>4</sub> mape) s najvećega dijela površine diska ACP je skoro potpuno nestao

FIG. 5.

Results of FTIR-m analysis of a typical ACP composite following determination of the mechanical toughness of wet sample: visual map, C=O map, indicator of colour intensity and PO<sub>4</sub> map. Concentration of the organic component (C=O) and ACP (PO<sub>4</sub>), respectively, decrease as follows: blue > green > yellow > orange > red. Resin is distributed rather homogeneously (C=O map), exception is a narrow border area (left side of PO<sub>4</sub> map), while ACP almost totally disappeared from the disc surface



SLIKA 6.

Mjerna ćelija za određivanje dvoosne savojne čvrstoće (uvećano su prikazani potporni krug i klip kojim se prenosi sila na uzorak kompozita)

FIG. 6.

Measuring cell for the biaxial flexural strength determination. Enlarged are the views of the piston on three ball loading arrangement

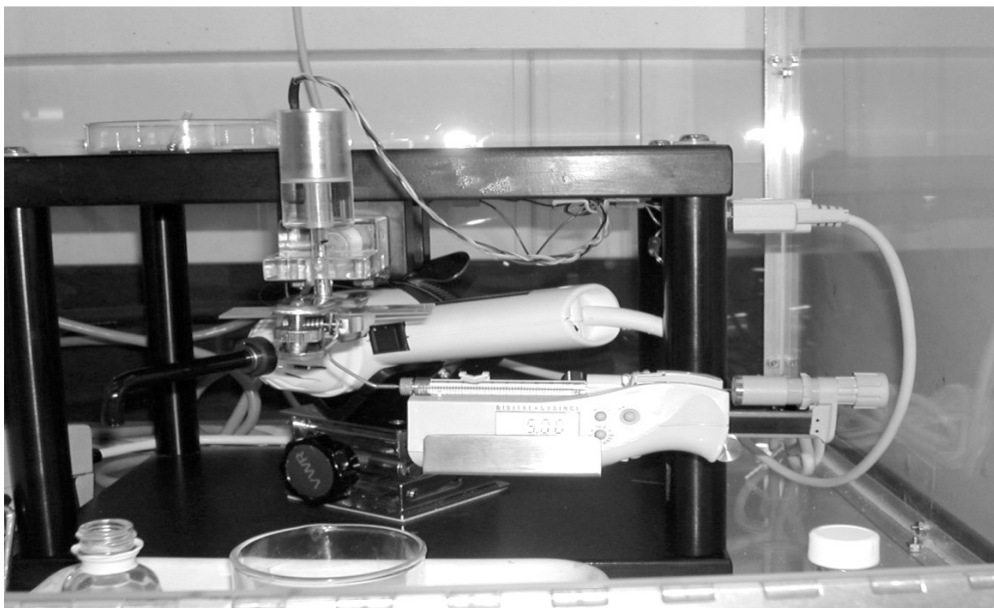
propanolu i podvrgne ultrazvučnom djelovanju 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Na temelju PSA podataka izračuna se srednji promjer (median diameter -  $d_m$ ) uzorka koji je primarni pokazatelj stupnja aglomeracije ACP čestica (41-43).

Morfološke/topološke karakteristike ACP-a određuju se pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM; JEOL 35C instrument, JEOL, Inc., Peabody, MA, USA).

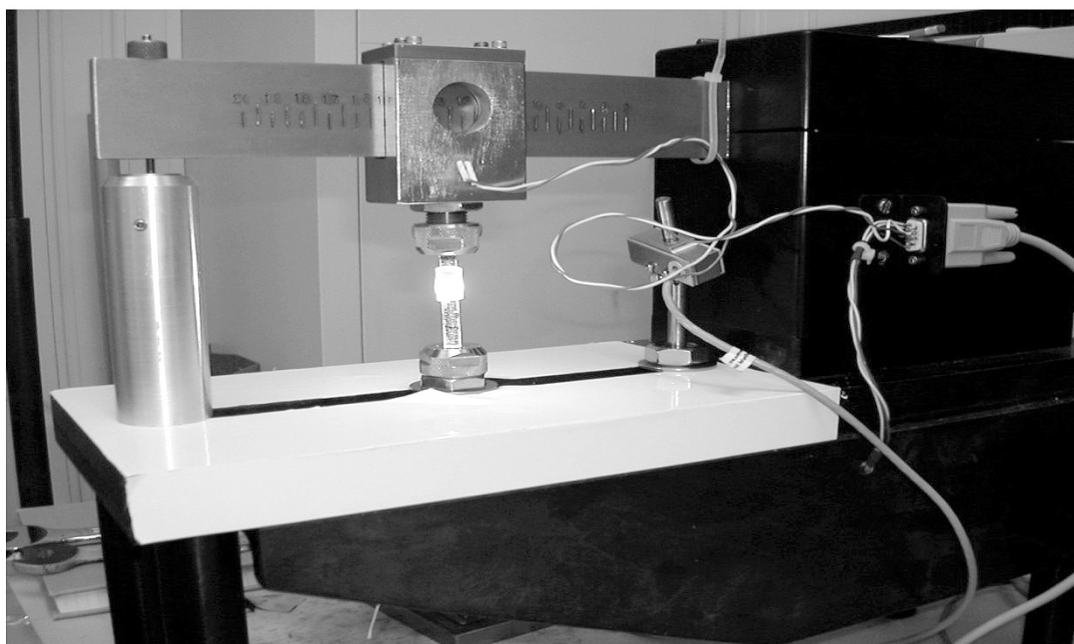
Termički raspad ACP-a ispituje se termogravimetrijskom analizom (TGA; 7 Series Thermal Analysis System, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). U tu se svrhu 5 do 10 mg ACP-a zagrijava u zraku kontroliranom brzinom od 20°/min u tem-

peraturnom području (30 do 600°C). Iz krivulja gubitka mase određuje se sveukupni sadržaj vode (maseni %) te omjer površinski vezane vlage i vode ugrađene u strukturu ACP-a.

Dvoosna savojna čvrstoća (BFS) suhih (24 sata na zraku kod 23°C) i mokrih (uronjenih u otopinu NaCl (pH=7.4) na 23°C ili 37°C najmanje mjesec dana) kopolimernih i kompozitnih uzoraka određuje se prema ASTM F394-78 specifikaciji (44; Slika 6). Za mjerenja se koristi Universal Testing Machine (Instron 5500R, Instron Corp., Canton, MA, USA) opremljena s Testworks 4 software-om.



SLIKA 7.  
 Mjerenje polimerizacijskoga skupljanja pomoću živinog dilatometra  
 FIG. 7.  
 Measurement of polymerization shrinkage using mercury dilatometer



SLIKA 8.  
 Mjerenje napreznja uzrokovanoga polimerizacijom  
 Fig. 8.  
 Measurement of polymerization stress

Vrijednost BFS izračuna se prema formuli:

$$BFS = A.L/t^2 \quad (1)$$

Gdje  $A = -[3/4\pi(X-Y)]$ ,  $X = (1+v).ln(r_1/r_s)^2 + [(1-$

$v)/2].(r_1/r_s)^2$ ,  $Y = (1+v).[1 + ln(r_{sc}/r_s)^2]$ ,  $v$  je Poisson omjer (u računanju se koristi vrijednost 0.24 u skladu s publiciranim podacima za elastična svojstva kompozita na bazi smola; (45),  $r_1$  je polumjer klipa kojim se primjenjuje sila na kontaktnoj površini,  $r_{sc}$  je polumjer potpornoga kruga,  $r_s$  je

polumjer uzorka, L je sila kod koje uzorak puca i t je debljina uzorka.

Sorpcija vode (WS) kopolimera i kompozita određuje se na sljedeći način: nakon što se uzorci suše izlaganjem bezvodnom  $\text{CaSO}_4$  sve dok se ne postigne stalna masa ( $\pm 0.1$  mg), uranjaju se u otopinu NaCl (kao kod BFS mjerenja). Promjene mase uzoraka bilježe se u zadanim vremenskim intervalima. WS pojedinačnog uzorka u bilo kojem vremenskom intervalu (t), izražena kao % početne mase, izračunava se prema izrazu:

$$WS = [(W_t - W_o)/W_o] \times 100 \quad (2)$$

u kojem je  $W_t$  masa uzorka u vremenu t, a  $W_o$  početna masa suhoga uzorka.

WS podaci koriste se za izračunavanje koeficijenta difuzije (D) u skladu s teorijom difuzije (46) koristeći pojednostavljen Fickov model (47-49) koji vrijedi za vremenski interval u kojem je  $W_t/W_{eq} \leq 0.6$ . U izrazu

$$W_t/W_{eq} = (2/L) \cdot (Dt/\pi)^{1/2} \quad (3)$$

$W_t$  je masa uzorka u vremenu t,  $W_{eq}$  je masa uzorka u stanju ravnoteže, a L je debljina uzorka. D se određuje iz nagiba pravca  $W_t/W_{eq}$  naspram  $t^{1/2}$ .

WS eksperimenti alternativno se rade u zraku pri 75% relativne vlage (RH). Uzorci kopolimera, odnosno kompozita drže se iznad prezasićene suspenzije NaCl u vodi, u zatvorenom sistemu kod 23°C. Gravimetrijske promjene bilježe se na istovjetan način kao kod eksperimenata u vodenoj otopini NaCl (jedn.); (2). Na WS kod 75 % RH ne utječe na otapanje ACP-a niti otpuštanje vodotopljivih monomernih komponenata i/ili degradacijskih produkata kao što je slučaj s uzorcima koji su uronjeni u vodenu otopinu NaCl.

Skupljanje pri polimerizaciji (PS) kompozitnih uzoraka mjeri se dilatometrijski (kompjuterski-kontroliran živin dilatometer konstruiran u Paffenbarger Research Center; American Dental Association Foundation, Gaithersburg, MD, USA; **Slika 7.**)

Paste se polimeriziraju izlaganjem vidljivom svjetlu 60 sekundi i PS mjeri 60 minuta. Potom se uzorak dodatno polimerizira 30 sekundi i PS mjeri 30 minuta. PS uzorka korigira se za varijacije u temperaturi tijekom mjerenja i prikazuje kao funkcija vremena. PS (volumni %) izračunava se na temelju poznate mase uzorka (50–100 mg) i gustoće koja se određuje na temelju Arhimedova principa koristeći specijalni dodatak za mikro-vagu (Sartorius YDK01, Sartorius, Goettingen, Njemačka).

Naprezanje izazvano polimerizacijom (PSS) mjeri se pomoću kompjuteriziranoga tenziometra također konstruiranog u Paffenbarger Research Centru (**Slika 8**). Instrument je baziran na

pretpostavci da vlačne sile koje nastaju pri vezanju polimeriziranoga uzorka uzrokuju savijanje konzole (proste grede) prema formuli (50):

$$\epsilon/F = 2a^2(3L-a)/Ebd^3 \quad (4)$$

U jednadžbi (4),  $\epsilon$  savijanje je izraženo u  $\mu\text{m}$ , E je Young's modul grede (MPa); F je sila (N) koja uzrokuje savijanje  $\epsilon$ ; L je ukupna dužina grede (cm); a je udaljenost između točke gdje se primjenjuje sila i kraja grede (cm); b je širina a d visina grede (obje u cm). Detaljan opis tehnike dan je u ref. (50, 51).

Smična čvrstoća vezanja (SBS; Slika 9) na dentin testira se na uzorcima ljudskoga dentina učvršćenim u polikarbonatne kalupe/držače. Foto-aktivirani PMGTMA u acetonu se upotrebljava da bi se uspostavio adhezivni sloj između dentina i kompozita koji se oblikuje pomoću brončanoga prstena promjera 4 mm i debljine 1.2 mm. Teflonska traka debljine 0.3 mm s otvorom koji odgovara otvoru prstena stavlja se između prstena i dentina kako bi se spriječila adhezija prstena na dentin. Otvor u prstenu ispuni se kompozitom, koji se potom polimerizira, te se cijeli sklop uranja u destiliranu vodu kod 37°C gdje se drži do mjerenja SBS. SBS se izračunava prema izrazu:

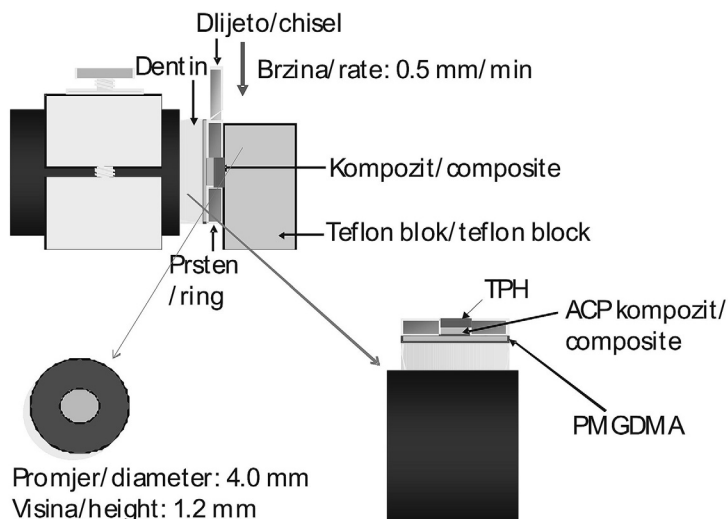
$$SBS = 4F/\pi d^2 \quad (5)$$

gdje je F sila kod koje se sklop raspada, a d je promjer polimeriziranoga kompozita (definiran unutarnjim promjerom prstena). Za mjerenja se koristi isti uređaj kao i za BFS (Instron 5500R, Instron Corp., Canton, MA, USA). Neposredno nakon mjerenja stereomikroskopom (Leica MZ16 Optical Stereomicroscope, Wetzlar, Njemačka) analiziraju se površine zuba, odnosno kompozita kako bi se utvrdila vrsta i mjesto prijeloma (52).

Otpuštanje iona iz kompozita prati se kinetički u otopini NaCl (pH = 7,4; 23°C; magnetsko miješanje; 100 ml NaCl/uzorak kompozita). Promjene koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , odnosno  $\text{PO}_4$  mjere se spektroskopski (UV/VIS spektrofotometar Carey Model 219; Varian Analytical Instrumentats, Palo Alto, CA, USA); (11,12,21,34). Rezultati se korigiraju za varijacije u površini uzoraka koristeći jednostavni izraz za danu površinu, P: normalizirana vrijednost = mjerena vrijednost x (500/P).

#### 2.4. Mikro-radiografija: kvantitativna procjena učinkovitosti remineralizacije

Učinkovitost remineralizacijskih ACP kompozita provjerava se u modelnim sustavima kvantitativno mjereći promjenu sadržaja zubnoga minerala u caklini prije i nakon primjene kompozita. Sadržaj minerala određuje se digitalnom analizom kontaktnih mikroradiografija zubnih uzoraka izloženih cikličkim promjenama pH koje odgovaraju promjenama kiselosti oralnoga medija.



SLIKA 9.

Shema uređaja za mjerenje posmične čvrstoće vezanja na dentin.

FIG. 9.

Schematic of a device for measuring shear bond strength.

Modelna ispitivanja remineralizacije cakline mogu se provesti koristeći govede ili ljudske zubne uzorke. U oba slučaja zubi se najprije moče u dezinfekcijskoj otopini (0,005 % promodin), očiste od ostataka mekih tkiva i čuvaju do korištenja u hladnjaku u destiliranoj vodi koja sadrži 0,1 % timola. Da bi se simuliralo karijes na govedim uzorcima, zubi premazani voskom s otvorenom labijalnom površinom izloženi su demineralizacijskoj otopini koja sadrži mliječnu kiselinu (pH = 4,0) kroz vremenski period od tri dana na 37°C (5 ml otopine/zub; uz magnetsko miješanje). Ljudski se zubi demineraliziraju koristeći otopinu koja je sadržavala 0.001 mmol/l NaF (40 ml otopine/zub; 3 dana na 37°C; bez miješanja); (53). Nakon demineralizacije zubi su izrezani u tanke segmente (približno 200 µm debljine; cirkularna dijamantska pila; Isomet, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) koji su potom ispolirani na mokrom “šmirgl” papiru (debljina ispoliranih segmenata varira između 150 i 180 µm).

Kontaktne mikroradiografije zubnih segmenata načinjene su na Kodak SO434 filmu (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) ili holografskom filmu (Integraf LLC, Kirkland, WA, USA) eksponiranih 13 min ili 30 min (CuK $\alpha$  radijacija (40 kV, 3 mA; Faxitron Model #43855A, Hewlett Packard, McMinnville, OR, USA). Filmovi su razvijeni prema uputama proizvođača. Mineralna gustoća cakline je utvrđena za svaki pojedini segment koristeći tehniku koja je detaljno opisana u radovima (53, 54). Segmenti su potom nasumice grupirani i pojedinačno složeni u višeslojni “sandwich” sljedećim redom: mikroskopsko stakalce – parafilm – zubni segment – parafilm – mikroskopsko stakalce. Cijeli sklop je potom uvijen u parafilm kako bi se spriječilo da tijekom cikličkoga tretmana otopine prodiru do zubnoga segmenta sa strane. Na jedini preostali “otvoreni” (parafilmom nepokriveni) rub gdje se nalazi demineralizirani uzorak nanosi se cca 1 mm sloj eksperimentalnoga ACP kompozita,

komercijalnoga materijala ili se demineralizirani segment ostavlja netaknut (kontrolna skupina). Nakon polimerizacije kompozita, uzorci se izlažu cikličkim promjenama (37 °C, magnetsko miješanje; (38 rad/s), uranjanjem u demineralizacijsku (DS: 3,0 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1,8 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 mol/l mliječne kiseline, 1 % karboksimetilceluloze, pH = 4,0); (53), odnosno remineralizacijsku otopinu (RS: 1,2 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 0,72 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,6 µmol/l F, 50 mmol/l HEPES, pH = 7,0; (55)). U eksperimentima s govedim zubima, uzorci su alternativno uranjani u DS (0,5 sata) i RS (11,5 sata) kroz vremensko razdoblje od 14 dana (15 ml DS ili RS/uzorak). U eksperimentima s ljudskim zubima, ciklički je postupak promijenjen na DS (1 sat) i RS (23 sata) u vremenskom razdoblju od 30 dana (20 ml DS ili RS/uzorak) osim vikenda kada su uzorci držani u destiliranoj vodi.

Promjene u mineralnom profilu zubnih segmenata prije i nakon DS/RS tretmana utvrđene su na temelju kvantitativne analize odgovarajućih mikroradiografija koristeći digitalni sustav Bioquant IV (R&M Biometrics Inc., Nashville, TN, USA) povezan s optičkim mikroskopom (Leitz, Ortholux, Germany) za eksperimente s govedim zubima, odnosno Scion Image – release Alpha 4.0.3.2 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) povezan s optičkim mikroskopom (Olympus BX50F; Olympus Optical Co., Ltd., Japan) i digitalnom kamerom (RGB/YC/NTSC; Microimage Video Systems, Boyerstown, PA, USA) u eksperimentima s ljudskim zubima. Osnovni principi metode, prikupljanje podataka i njihova interpretacija detaljno su opisani u ref. (53-56). Promjene u dubini lezije i mineralnoga sadržaja ( $\Delta Z$ ; niža  $\Delta Z$  vrijednost = viši sadržaj minerala) uspoređeni su za odabrane regije svakoga zubnoga segmenta prije i nakon tretmana. Razlika u zbroju  $\Delta Z$  vrijednosti, tj. relativna promjena sadržaja minerala ( $\Delta(\Delta Z)$  u %) izračunata je prema jednadžbi:

$$\Delta(\Delta Z) = \{(\Delta Z_{\text{prije}} - \Delta Z_{\text{poslije}}) / \Delta Z_{\text{prije}}\} \cdot 100 \quad (6)$$

Pozitivne  $\Delta(\Delta Z)$  vrijednosti odgovaraju povećanju mineralnoga sadržaja u zubnim segmentima (remineralizacija lezija), dok negativne  $\Delta(\Delta Z)$  vrijednosti indiciraju daljnju demineralizaciju kao rezultat cikličkog pH tretmana.

## 2.5. *In vitro* procjena citotoksičnosti

Međudjelovanja stanica i ekstrakata eksperimentalnih kopolimera i ACP kompozita istraživane su koristeći faznu kontrastnu mikroskopiju i enzimatsku analizu (aktivnost mitohondrijske dehidrogenaze – Wst-1).

Stanična kultura (osteoblastima-slične MC3T3-E1 stanice) (Riken Cell Bank, Hirosaka, Japan) održavana je u  $\alpha$ -modifikaciji Eagle's medija (Biowhittaker, Walkerville, MD, USA) koji sadrži 10 vol. % goveđega seruma (Gibco-BRL-Life Technologies, Rockville, MD, USA) i 60 mg/l kanamicin sulfata (Sigma, St Louis, MO, USA) u atmosferi potpune vlažnosti s 5 vol % CO<sub>2</sub> pri 37 °C. Medij se mijenjao dva puta tjedno, a stanice su tretirane s otopinom tripsina (0,25 %; Gibco, Rockville, MD, USA) koja sadrži 2 mmol/l EDTA jednom tjedno.

Prije ekstrakcijskih eksperimenata, uzorci kopolimera i kompozita sterilizirani su s 70% etanolom. Svaki je disk najprije uronjen u 2 ml medija gdje je držan 60 minuta, a potom je dodan svježi medij za ekstrakciju preko noći u staničnom inkubatoru. Uz uzorke kopolimera i kompozita priređene su i dvije kontrolne skupine: pozitivna kontrolna skupina - medij s površinski aktivnom tvari (0,1% Triton X-100; Res. Prod. International, Elk Grove Village, IL, USA) i negativna kontrolna skupina – medij bez ikakvih dodataka. Paralelno s ekstrakcijskim uzorcima u inkubatoru priređen je i odgovarajući broj uzoraka s 10 000 stanica u 2 ml medija. Sljedeći dan medij u uzorcima sa stanicama zamijenjen je s 2 mL ekstrakcijskoga medija ispitivanih kopolimera, kompozita i kontrola. Stanice su potom inkubirane u ekstrakcijskom mediju 72 sata i digitalno fotografirane (invertni fazno-kontrastni mikroskop Nikon TE300, Melville, NY, USA).

Kolorimetrijsko mjerenje aktivnosti stanične dehidrogenaze (Wst-1 analiza) provedeno je na sljedeći način (58): stanicama izloženim ekstraktima i onim iz kontrolnih skupina dodana je puferirana otopina Wst-1 (mononatrijeva sol 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazoliuma; Dojindo, Gaithersburg, MD, USA). Uzorci su potom inkubirani 120 minuta na 37 °C i analizirani na čitaču (apsorpcija kod 450 nm; Wallac 1420 Victor<sup>2</sup>, Perkin Elmer Life Sciences, Gaithersburg, MD, USA).

## 2.6. Statistička metodologija

Broj uzoraka za testiranje odabran je tako da se omogući statistički pouzdana detekcija minimalnih razlika između eksperimentalnih skupina (59). Procjena varijance u pravilu se temelji na rezultatima prethodnih ispitivanja ili su naprav-

ljeni probni eksperimenti kako bi se došlo do podataka nužnih za pravilni statistički dizajn. Takvim pristupom omogućuje se usporedba podataka u slučaju kada se istovremeno istražuje više čimbenika.

Grafička analiza podataka, analiza varijanci (ANOVA) i drugi relevantni testovi (60, 61) korišteni su u procjeni eksperimentalnih podataka. U slučajevima kada su ANOVA-om utvrđeni statistički značajni efekti, provedeni su dodatni testovi kako bi se ustanovilo postoje li statistički značajne razlike između specifičnih skupina. Za statističke su analize korišteni Microsoft Office Excel 2007, NISTDataplot (Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, Gaithersburg, MD, USA), SYSTAT9 ili SigmaStat verzija 2.03 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 3. REZULTATI I DISKUSIJA

### 3.1. Modificiranje površine ACP-a

Nekontrolirana aglomeracija ACP čestica i neravnomjerna raspodjela aglomerata u polimeriziranoj organskoj matrici uzrokuje mehaničku nestabilnost i relativno visoku WS ACP kompozita u vodenom mediju (22). Da bismo ispitali može li se uvođenjem aditiva pri sintezi ACP-a smanjiti stupanj aglomeracije i poboljšati hidrolitička stabilnost ACP-a, testirano je sljedeće: (a) kationi - srebro, željezo (II i III), cink, aluminij, silicij i cirkonij; (b) površinski aktivne tvari - neionski [alkil aril polietar alkohol (TRITON-100), poli(oksietilen) sorbitan monolaureat (TWEEN-80), ZONYL FSN] i anionski (ZONYL FSP), te (c) polimeri – [poli(etilen oxide); PEO] and [poli(akrilična kiselina); PAA]. Cilj je bio utvrditi strukturu i stabilnost čvrstih faza koje nastaju u prisutnosti spomenutih aditiva, te odrediti DVC i mehanička svojstva kompozita formuliranih s modificiranim ACP-om. Veličine čestica i sadržaj vode modificiranih ACP-a, te DVC i BFS njihovih kompozita dani su u **Tablici 6** (11,12,62).

U kationskoj seriji,  $d_m$  opada u nizu: (Si-ACP, Zr-ACP) > (Ag-, Fe(II)-, Al-, Fe(III)-ACP) > Zn-ACP. U prisutnosti Fe(II) i Fe(III) ubrzana je konverzija ACP- a u apatit (FTIR i XRD podaci) i mijenja se boja taloga uslijed sutaloženja netopljivih Fe soli. Za Ag-ACP također je karakteristična promjena boje, najvjerojatnije izazvana sutaloženjem Ag-soli. BFS kationskih ACP kompozita pokazuje sljedeći trend: (Zr-, Zn-ACP) > Si-ACP > Al-ACP > (Ag-, Fe(II)-, Fe(III)-ACP; BFS = 0, tj. uzorci uronjeni u otopinu NaCl raspali su se prije mjerenja). Osim najviše vrijednosti BFS, Zr-ACP kompoziti su postigli i najviši DVC. Dodatak površinski aktivne tvari i/ili polimera generalno nije polučio željeno poboljšanje svojstava. Minimalno smanjenje  $d_m$  pri uporabi anionske površinski aktivne tvari, Zonyl FSP, nije rezultiralo promjenom BFS kompozita. Zbog toga u sustavima s površinski aktivnim tvarima nije mjeren DVC kompozita. Zanimljiva je, ali i nerazjašnjena činjenica da ukupni sadržaj vode u modificiranom ACP-u (u prosjeku  $15,8 \pm 1,7$  %) ne ovisi o vrsti aditiva. Na temelju početne evaluacije u kojoj je Zr-ACP pokazao najbolje DVC i BFS vrijednosti, Zr-ACP

TABLICA 6.

Utjecaj različitih aditiva na veličinu čestica i sadržaj vode (TGA podaci) modificiranih ACP-a te DVC (24 sata po polimerizaciji) i BFS (30 dana u otopini natrijeva klorida) kompozita. Navedne su srednje vrijednosti i standardna devijacija rezultata u zagradi

TABLE 6.

Effect of different additives on particle size and water content (TGA results) of the modified ACPs, and DVC (24 h post-cure) and BFS (after 30 days in NaCl solution) of the composites. Indicated are mean values with standard deviation given in parenthesis.

Smola/resin: <sup>a</sup>EBPADMA/PMGTMA, <sup>b</sup>Bis-GMA/TEGDMA and <sup>c</sup>Bis-GMA/TEGDMA/HEMA/ZrDMA.  
 nm – nije mjereno (not measured)

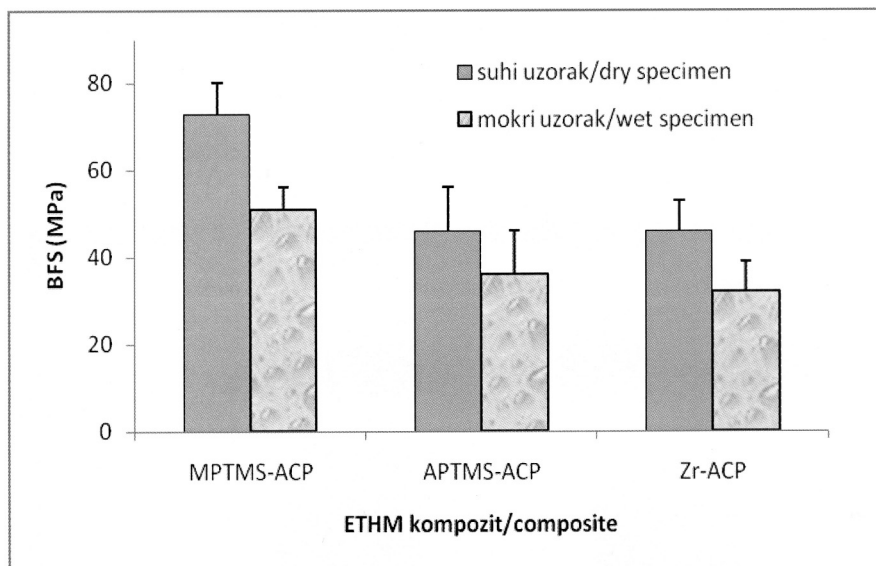
Aditiv/Additive	d <sub>m</sub> (µm)	Sadržaj vode/ Water content (% mase/mass %)	DVC (%)	BFS (MPa)
<b>Kationi/Cations</b>				
Ag <sup>+</sup>	3,5 (1,9)	14,0 (2,2)	63,3 (1,9)	0
Fe <sup>2+</sup>	3,8 (1,8)	15,4 (1,2)	65,7 (1,8)	0
Zn <sup>2+</sup>	1,4 (0,5)	16,6 (2,5)	63,7 (2,6)	48,4 (5,3)
Al <sup>3+</sup>	2,2 (1,3)	14,1 (2,3)	56,0 (3,3)	19,8 (4,7)
Fe <sup>3+</sup>	2,1 (0,6)	16,8 (2,8)	56,7 (2,6)	0
Si <sup>4+</sup>	5,8 (1,6)	14,1 (1,2)	72,5 (2,5)	40,0 (9,0)
Zr <sup>4+</sup>	6,7 (1,9)	16,1 (2,0)	80,1 (3,3)	53,4 (12,0)
<b>Površinski aktivne tvari/Surfactants</b>				
TRITON-100 <sup>b</sup>	8,3 (1,4)	16,3 (1,2)	nm	27,7 (3,3)
TWEEN-80 <sup>b</sup>	8,9 (2,1)	16,9 (0,9)	nm	32,4 (10,8)
ZONYL FSN <sup>b</sup>	6,5 (1,2)	17,4 (1,1)	nm	28,1 (2,5)
ZONYL FSP <sup>b</sup>	4,1 (0,4)	17,6 (2,1)	nm	31,9 (10,4)
<b>Polimeri/Polymers</b>				
PEO <sup>b</sup>	14,1 (4,7)	14,7 (1,2)	nm	23,4 (4,3)
PAA <sup>b</sup>	9,2 (1,9)	15,8 (1,0)	nm	34,1 (9,9)

odabran je kao standardno punilo i korišten je u svim ostalim experimentima opisanim u ovom radu.

Da bismo ustanovili stabilizira li silanizacija ACP punila međufazu, ACP/polimer, 3-aminopropiltrimetoksi silan (APTMS) i metakriloksioksipropiltrimetoksi silan (MPTMS) dodani su pojedinačno u Zr-ACP u koncentraciji od 2% obzirom na početnu masu ACP-a. MPTMS je dodan kao vodeno/alkoholna otopina (5%/95 vol %; pH=5.5) podešen dodatkom octene kiseline sa svrhom da se katalizira hidroliza metoksilnih funkcionalnih skupina. S APTMS-om zakiseljavanje nije potrebno jer njegova amino skupina autokatalizira reakciju hidrolize/kondenzacije. Nakon objedinjavanja ACP-a i silana te 30-minutnoga miješanja, smjesa je ostavljena da odstojii još 5 minuta kako bi se kompletirala hidroliza. pH MPTMS/ACP smjese potom je podešen na 10,0 dodatkom

otopine KOH čime se željelo pospješiti kondenzaciju i nastajanje siloksanola. Nakon filtriranja i sušenja na 23°C, silanizirani je ACP zagrijan na 100°C kroz vremensko razdoblje od 30 minuta kako bi se dodatno poticalo nastajanje sekundarnih polisiloksanskih struktura. Neizreagirani silan potom je ispran etanolom i silanizirani ACP (nakon što je struktura provjerena XRD i FTIR analizom) čuvan je u eksikatoru do uporabe u kompozitima. **Na Slici 10.** prikazana je BFS kompozitnih uzoraka pripremljenih s EBPADMA/TEGDMA/HEMA/MEP (ETHM) smolom i silaniziranih ACP punila u usporedbi s nesilaniziranim Zr-ACP-om. U suhom i mokrom stanju (nakon 30 dana u otopini NaCl na 23°C), BFS MPTMS-ACP kompozita znatno nadilazi BFS APTMS-ACP kompozita i Zr-ACP kontrolne skupine. Činjenica da su i u mokrom stanju MPTMS-ACP kompoziti približno 60% čvršći od Zr-ACP kompozita sug-





SLIKA 10.

Utjecaj silanizacije ACP-a na BFS (srednja vrijednost od najmanje pet uzoraka u svakoj eksperimentalnoj skupini; standardna devijacija je označena prečkom) kompozita u suhom stanju i nakon 30 dana u otopini NaCl

FIG. 10.

Effect of ACP silanization on BFS (mean value of at least five samples in each experimental group) of composite in dry state and after 30 days in NaCl solution (standard deviation is denoted by bar)

erira da se silanizacija ne smije zanemariti pri dizajniranju ACP kompozita s poboljšanim mehaničkim svojstvima.

### 3.2. Utjecaj mehaničkoga mljevenja na svojstva ACP-a i kompozita

Mehaničkim mljevenjem ACP-a pokušalo se smanjiti veličinu aglomerata bez modificiranja površine ACP-a, postići što intimniji kontakt ACP-a i smole te poboljšati raspršenje bioaktivnoga punila u kompozitnoj pasti. Cilj eksperimenata s foto-aktiviranom EBPADMA/TEGDMA/HEMA (ETH smola), odnosno EBPADMA/TEGDMA/HEMA/MEP; (ETHM smola) bio je pripremiti kompozite s nemljevenim (am-ACP) i mljevenim (m-ACP) punilom i usporediti njihova mehanička svojstva, WS i kinetiku otpuštanja iona. Radna je pretpostavka da će m-ACP kompoziti biti mehanički stabilniji, ali je otvoreno pitanje u kojoj mjeri će niža WS utjecati na proces transformacije ACP-a, odnosno koncentraciju mineralnih iona u otopini. Rezultati su sažeti u **Tablici 7**.

Prosječni promjer ACP čestica mljevenjem je smanjen cca 85 % (sa  $(6,4 \pm 0,7) \mu\text{m}$  na  $(0,9 \pm 0,2) \mu\text{m}$ ) a da pri tome nije došlo do strukturnih promjena (FTIR i XRD spektar). Promjene u veličini čestica dodatno su potvrđene SEM-om. Kao posljedica boljšeg dispergiranja m-ACP u smoli, povećana je BFS m-ACP kompozita, posebice nakon imerzije u vodenim otopinama. I s m-ACP kompozitima postignuta je zadovoljavajuća prezasićenost vodenih otopina obzirom na HAP. Termodinamička stabilnost tih otopina izražena je kao Gibbs-ova slobodna energija (63):

$$\Delta G^0 = -2,303(RT/n)\ln(IAP/K_{sp}) \quad (7)$$

gdje IAP predstavlja ionski aktivitetni produkt za HAP,  $K_{sp}$  je odgovarajuća konstanta produkta topljivosti HAP-a, R je idealna plinska konstanta, T je apsolutna temperatura i n je broj iona u IAP (n=18). Mikro-FTIR analizom (22) pokazano je da je smanjena WS u m-ACP kompozitima rezultat daleko manjega broja površinskih defekata (praznina) u usporedbi s am-ACP kompozitima.

### 3.3. Utjecaj sastava smola na fizičko-kemijska svojstva kopolimera i kompozita

Utjecaj sastava organske matrice na DVC, WS, BFS, PS i remineralizacijski potencijal ispitano je u kompozitima koji su načinjeni od smola s molarnim omjerom EBPADMA:TEGDMA između 0,50 i 0,13 uz molarni omjer HEMA:MEP=4,28 (ETHM0.50, ETHM0.33, ETHM0.25 i ETHM0.13; fotoinicijator IRGACURE 1850), te od smola s molarnim omjerom EBPADMA:TEGDMA između 0,50 i 1,35 uz molarni omjer HEMA:MEP=8.26 i am-ACP, odnosno m-ACP (ETHM0.50\*, ETHM0.85 and ETHM1.35: sustav za iniciranje foto-polimerizacije CQ i 4EDMAB). Rezultati su sažeti na **Slici 11 (a-e)**. Promjena sastava smola temeljenih na EBPADMA nije značajno utjecala na DVC, WS i BFS kompozita. Neovisno o formulaciji smole, prezasićenost otopina (remineralizacijski potencijal) u svim je sustavima bila značajno viša od termodinamičkoga minimuma potrebnog za taloženje HAP-a ( $\Delta G^0 < 0$ ). PS ETHM kompozita pokazuje trend porasta sa smanjenjem molarnoga omjera EBPADMA/TEGDMA u smoli, što upućuje na to da je PS najvjerojatnije kontroliran relativnim sadržajem visoko-molekularnoga EBPADMA monomera u smjesi. U kompozitima s m-ACP-om izmjereno je viši DVC i BFS

TABLICA 7.

Rezultati analize veličina čestica am-ACP-a i m-ACP-a, BFS nakon 30 dana imerzije u otopini NaCl, WS pri 75 % relativne vlage i remineralizacijski potencijal kompozita. Navedene su srednje vrijednosti i standardno odstupanje (u zagradi). Broj uzoraka  $n \geq 7$  ( $d_m$ , SSA, BFS i WS), te  $n=3$  (IAP,  $\Delta G^0$ ). Smola: <sup>a</sup>ETH; <sup>b</sup>ETHM

TABLE 7.

Particle size, BFS after 30 days of immersion in NaCl solution, WS at 75 % relative humidity and remineralization potential of the composites. Indicated are mean values with standard deviation (in parenthesis). Number of specimens  $n \geq 7$  ( $d_m$ , SSA, BFS and WS), and  $n=3$  (IAP,  $\Delta G^0$ ). Resin: <sup>a</sup>ETH; <sup>b</sup>ETHM.

Parametar	am-ACP	m-ACP
Područje veličina čestica/particle size range ( $\mu\text{m}$ )	0,3 – 80,0	0,2 – 3,0
$d_m$ ( $\mu\text{m}$ )	6,4 (0,7)	0,9 (0,2)
Specifična površina čestica/specific surface area, SSA ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	0,5 (0,1)	3,8 (1,0)
BFS (MPa)	45,3 (5,4) <sup>a</sup> 47,0 (11,9) <sup>b</sup>	59,3 (7,6) <sup>a</sup> 73,0 (11,7) <sup>b</sup>
Ionski aktivitetni product/ion activity product, IAP	99,3 (0,7) <sup>a</sup>	101,2 (1,0) <sup>a</sup>
$\Delta G^0$ (kJ/mol)	-5,7 (0,2) <sup>a</sup>	-5,1 (0,3) <sup>a</sup>
WS (mass %)	2,2 (0,2) <sup>b</sup>	1,7 (0,1) <sup>b</sup>

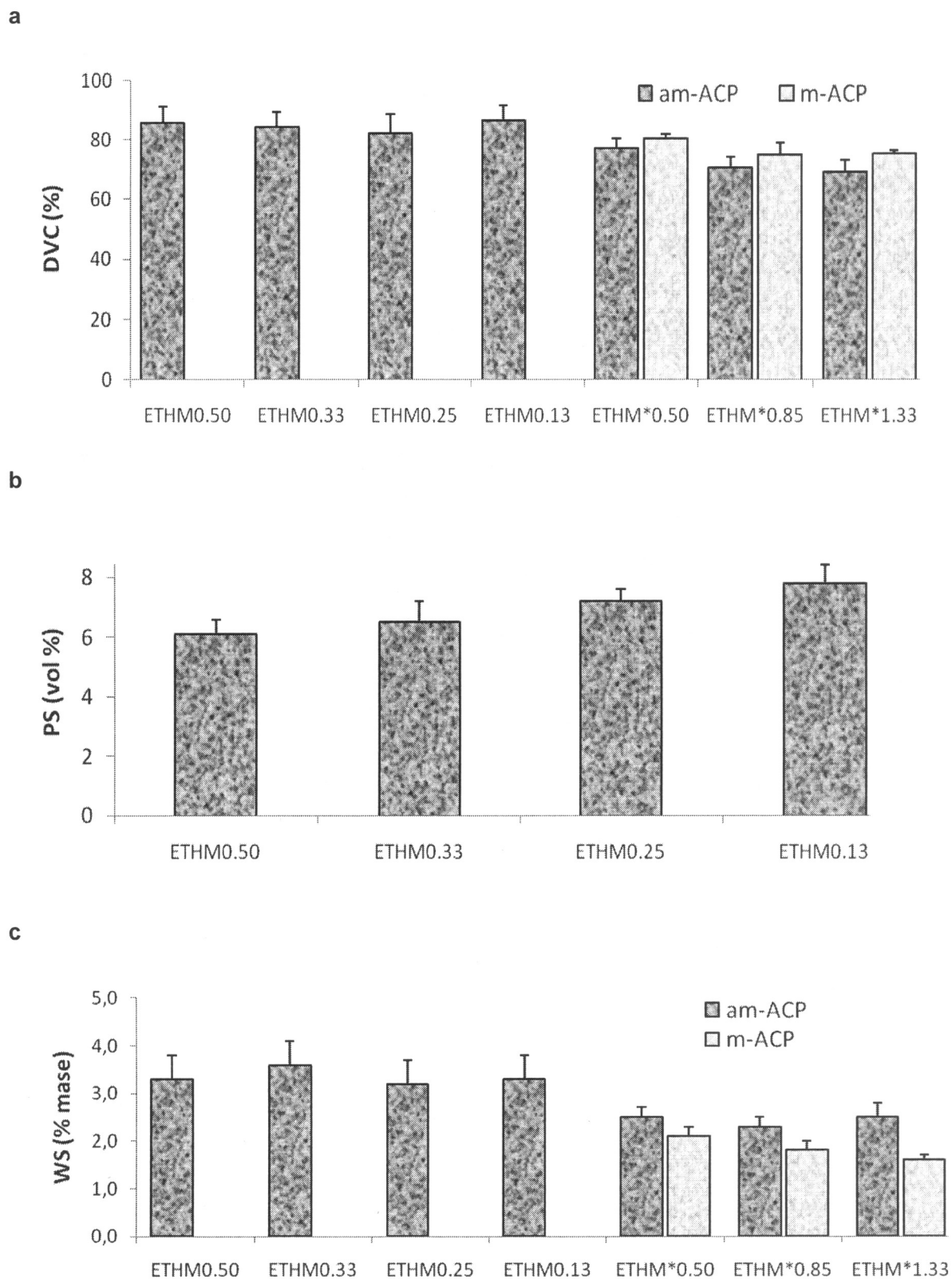
(ETHM0.50\* - ETHM0.85\* – ETHM1.35\* niz). Poboljšanje svojstava i u ovom je slučaju posljedica homogenije raspodjele m-ACP u kompozitu (22).

DVC se koristi kao posredni pokazatelj vjerojatnosti ispuštanja neizreagiranih monomera i degradacijskih produkata u oralni medij. Eksperimentalne smole u kojima su Bis-GMA, EBPADMA i/ili UDMA korišteni kao bazični monomeri (11, 12, 20, 64, 65) u pravilu postižu DVC od 70 % ili više. Tipične vrijednosti DVC-a najčešće upotrebljivanih Bis-GMA/TEGDMA smjesa su od 55% do (vrlo rijetko) 75% (66). U tro-komponentnim i četvero-komponentnim formulacijama s HEMA monomerom (11,12,62,63,67), visoke DVC vrijednosti pripisuju se visokoj difuzivnosti HEMA monomera (efekt raste s porastom sadržaja HEMA u smoli). Očekivani porast DVC-a u UDMA formulacijama (zbog manje viskoznosti i veće fleksibilnosti UDMA molekula i smanjenoga nastajanja vodikovih veza) nije zabilježen u usporedbi s Bis-GMA smolama (11,12). Značajno je, međutim, da je u UDMA formulacijama smanjenje DVC-a u kompozitima u usporedbi s kopolimerima bitno manje ( $\leq 5\%$ ) negoli u Bis-GMA and EBPADMA formulacijama ( $\leq 14\%$ ).

Budući je PS direktno proporcionalno DVC-u, nije iznenađujuće da u ACP kompozitima u kojima DVC doseže skoro 87% PS istovremeno naraste i do 8 vol %. Nepoželjna posljedica tako visokoga PS-a jesu promjene u mikro-strukturi kompozita koje dovode do porasta unutarkompozitnih napetosti, deformacija na međupovršini kompozit/zub i, u konačnici, propusnosti restoracije. PS vrijednosti eksperimen-

talnih ACP kompozita na gornjoj su granici PS vrijednosti komercijalnih “tekućih” kompozita (engl. flowable composites) i koincidiraju s donjom granicom PS adhezivnih smola (6,0%, odnosno 6,7%; (68). Gledajući samo PS vrijednosti, nameće se potreba reformuliranja smola s ciljem da se smanji njihovo skupljanje pri polimerizaciji. Jedan od mogućih alternativnih pristupa bilo bi korištenje monomera koji nemaju metakrilatnu strukturu (69) i/ili uporaba cikličkih monomera koji se pri polimerizaciji otvaraju (70). Privlačna je također i potencijalna uporaba organskih aditiva koji induciraju nastajanje gel struktura u nizu organskih monomera, odnosno polimera. Efekt jednog takvog organogelatora, dibenziliden sorbitola (DBS), testiran je u EBPADMA smolama (71). Pokazano je da se ugradnjom DBS-a zaista može značajno smanjiti PS bez da se istovremeno negativno utječe na DVC, odnosno smanjuje biokompatibilnost smola.

U svim smolama s relativno visokim sadržajem HEMA problem je negativan efekt tog monomera niske molekulske mase na PS i PSS. Rješavanju tog problema pristupilo se dvojako: 1) zamjenom HEMA s oligomernim UDMA/poli(etilen glikol)-UDMA (PEG-U) ko-monomerom u UDMA smolama, te 2) zamjenom HEMA s izomerom etil  $\alpha$ -hidroksimetilakrilatom (EHMA) u Bis-GMA smolama. Ugradnjom PEG-U u UDMA smole povećan je DVC bez negativnoga utjecaja na PS, PSS i BFS. S druge strane, smole s EHMA imaju manju sorpciju vode uz nepromijenjeni DVC i kinetiku otpuštanja iona u suporedbi s HEMA formulacijama. Stoga se oba monomera (PEG-U i EHMA) mogu koristiti kao pogodna zamjena za HEMA u dentalnim materijalima (72).

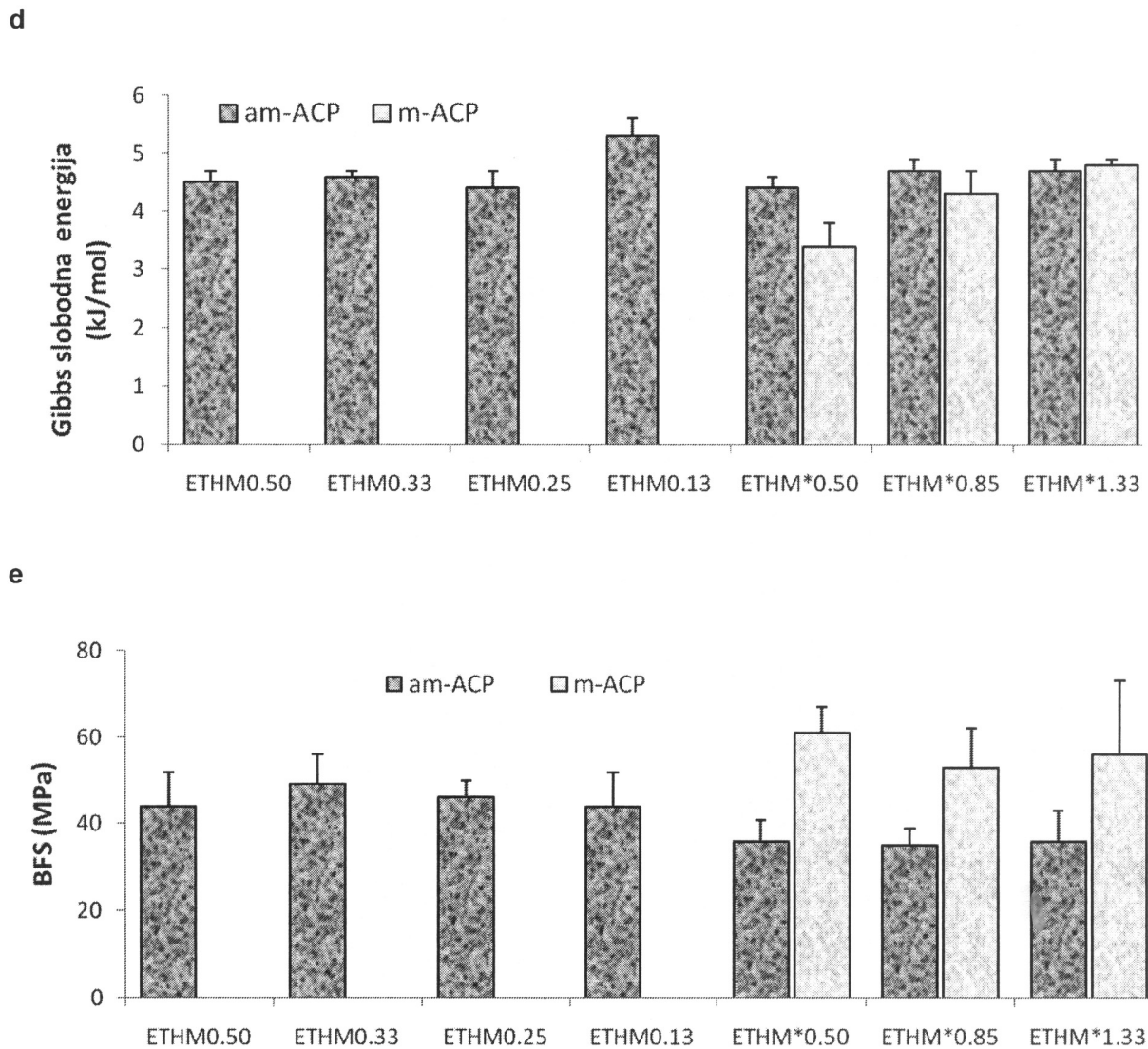


SLIKA 11. a, b, c

DVC (a), PS (b) i WS (c) kompozita, prezasićenost vodenih otopina ( $\Delta G^0$ ; d) i mehanička svojstva mokrih uzoraka (BFS; e). Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardno odstupanje. Broj uzoraka: n = 3 (PS), n = 4 ( $\Delta G^0$ ), n = 5 (WS, BFS) i  $\geq$  6 (DVC)

FIG. 11. a, b, c

DVC (a), PS (b) and WS (c) of composites, saturation of the aqueous solutions ( $\Delta G^0$ ; d) and the mechanical properties of wet samples (BFS; e). Presented are mean values  $\pm$  standard deviation. Number of samples: n = 3 (PS), n = 4 ( $\Delta G^0$ ), n = 5 (WS, BFS) and  $\geq$  6 (DVC)



SLIKA 11. d, e

DVC (a), PS (b) i WS (c) kompozita, prezasićenost vodenih otopina ( $\Delta G^0$ ; d) i mehanička svojstva mokrih uzoraka (BFS; e). Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardno odstupanje. Broj uzoraka: n = 3 (PS), n = 4 ( $\Delta G^0$ ), n = 5 (WS, BFS) i  $\geq$  6 (DVC)

FIG. 11. d, e

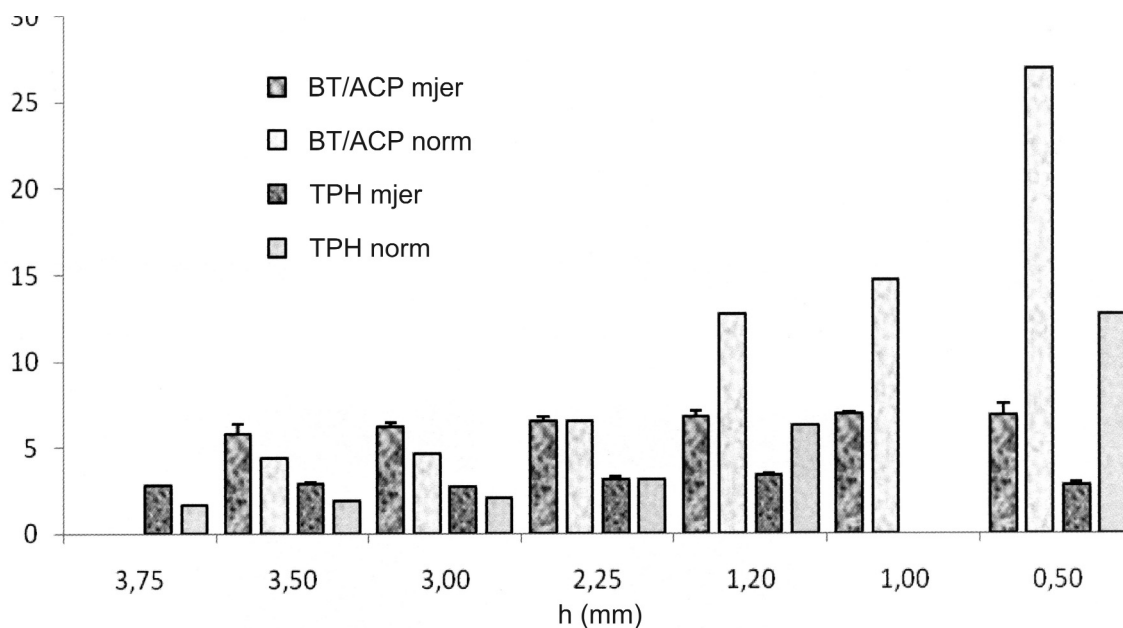
DVC (a), PS (b) and WS (c) of composites, saturation of the aqueous solutions ( $\Delta G^0$ ; d) and the mechanical properties of wet samples (BFS; e). Presented are mean values  $\pm$  standard deviation. Number of samples: n = 3 (PS), n = 4 ( $\Delta G^0$ ), n = 5 (WS, BFS) and  $\geq$  6 (DVC)

Uz materijalne faktore (vrsta i sadržaj punila, vrsta i sastav smole, način polimerizacije) na PS, modul elastičnosti i PSS kompozitnih materijala utječe i način na koji se materijal procesira. Iako je PSS foto-polimeriziranih dimetakrilatnih sustava opsežno istraživano (68,73-79), razumijevanje kinetike PS-a i PSS-a još uvijek je nepotpuno. Jedan od parametara koji neposredno utječe na stabilnost restoracije je faktor konfiguracije šupljine (engl. cavity configuration ili C factor; (80-82). Da bismo ispitali dovodi li povećanje kontaktne površine (manji C faktor) do smanjenja PSS-a kroz povećanje plastične deformacije za vrijeme polimerizacije prije nego što se postigne točka geliranja (81), proučavan je utjecaj C faktora na PSS u eksperimentalnom ACP kompozitu i tipičnom komercijalnom kompozitu punjenom staklom (TPH).

Visina (h) nepolimeriziranih cilindričnih uzoraka kompozita varirana je od 0,5 mm do 3,75 mm što odgovara vrijednostima C faktora od 6,0 do 0,8. Za kvarcni štapić promjera 2r i visinu uzorka h, C faktor izračunat je kao omjer vezane površine kompozita (silanizirani krajevi štapića = baze cilindra) i nevezane površine (oplošje cilindra bez baza) prema izrazu:

$$C \text{ factor} = \frac{2r^2\pi}{2rh\pi} = \frac{r}{h} \quad (8)$$

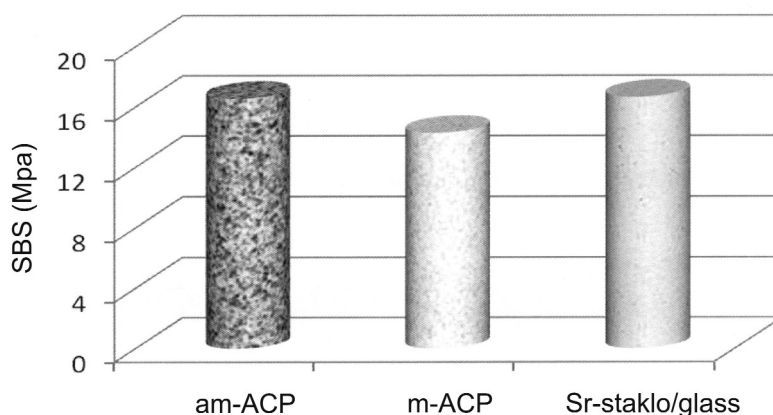
Kompozitni uzorci su polimerizirani svjetlom i PSS je mjereno nakon 60 min. Izmjerene PSS vrijednosti ( $PSS_{mjer}$ ) za uzorke različite visine su normalizirane ( $PSS_{norm}$ ) obzirom na masu kontrolnoga sustava s h = 2,25 mm (C faktor = 1.33) prema izrazu:



SLIKA 12.

$PSS_{mjer}$  (srednja vrijednost + SD;  $n = 3$ ) te odgovarajuće  $PSS_{norm}$  za BT/ACP i TPH kompozite kao funkcija visine uzorka, h  
 FIG. 12.

$PSS_{meas}$  (mean value + SD;  $n = 3$ ) and the corresponding  $PSS_{norm}$  for BT/ACP and TPH composites as a function of sample high, h



SLIKA 13.

Smična čvrstoća vezanja (SBS) am-ACP-a i m-ACP-a Bis-GMA/TEGDMA/HEMA/ZrDMA (BTHM smola) kompozita u usporedbi s kontrolnim kompozitom punjenim sa Sr staklom. Uzorci uronjeni 30 dana u otopinu NaCl. Standardna devijacija rezultata:  $\leq 4,43$  MPa,  $\leq 6,21$  MPa  $\leq 4,04$  MPa za uzorke s am-ACP-om, m-ACP-om odnosno Sr-staklom.

FIG. 13.

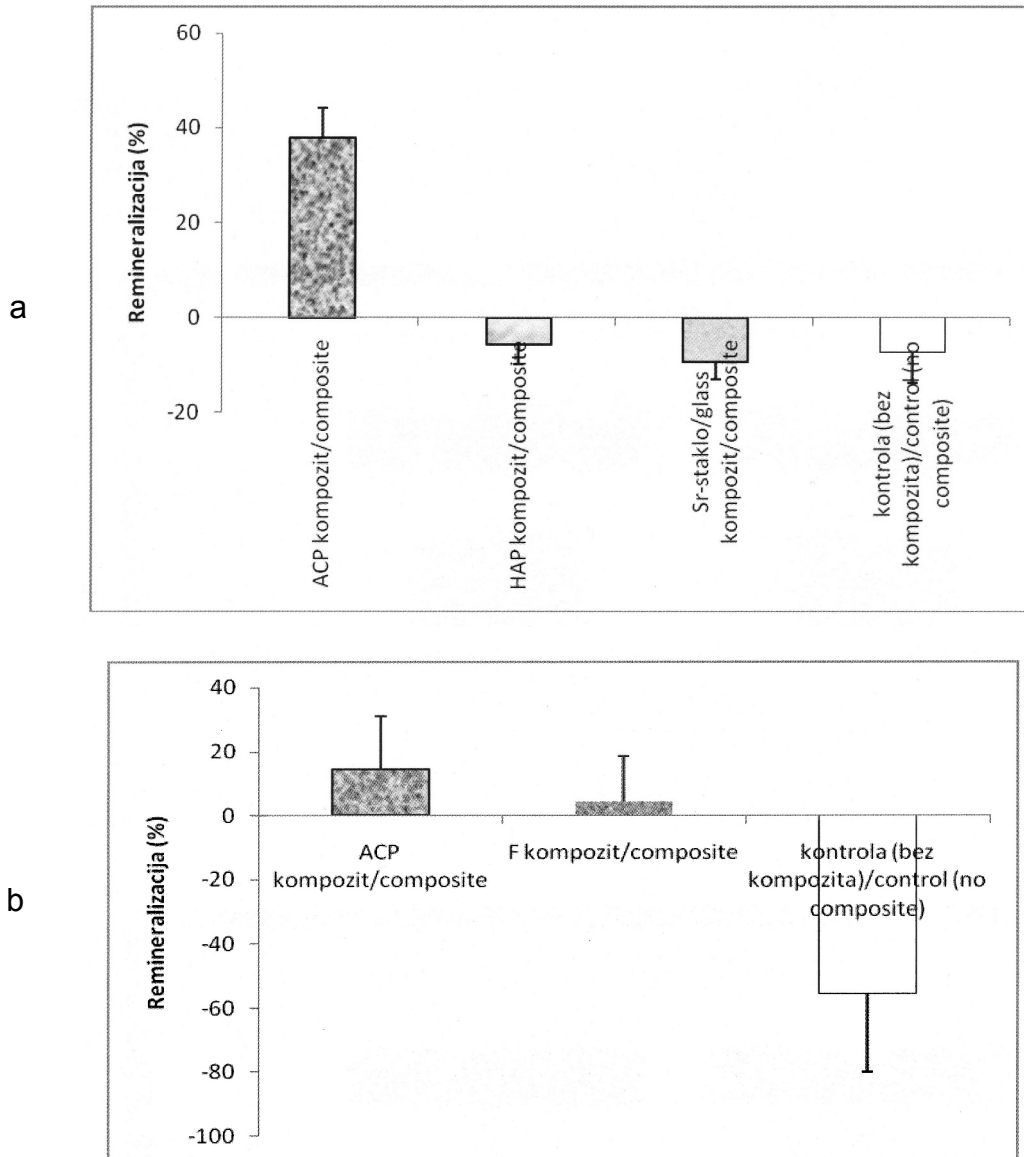
Shear bond strength (SBS) of am- and m-ACP Bis-GMA/TEGDMA/HEMA/ZrDMA (BTHM resin) composites in comparison with the control composite filled with Sr glass. Samples were immersed for 30 days in NaCl solution. Standard deviation of results: 4.43 MPa,  $\leq 6.21$  MPa  $\leq 4.04$  MPa for the samples with am-ACP, m-ACP and Sr-glass, respectively.

$$PSS_{norm} = PSS_{mjer} \cdot (h_{kontrol}/h_{varijabla}) \quad (9)$$

$PSS_{mjer}$  i  $PSS_{norm}$  podaci za Bis-GMA/TEGDMA (BT)/ACP i TPH kompozit prikazani su na Slici 12.

U ispitivanom području C faktora (0,8 – 6,0), vrijednosti

$PSS_{mjer}$  za BT/ACP kompozit [(5,80 – 6,96) MPa] bile su približno dvostruko više od  $PSS_{mjer}$  za TPH kompozit [(2,78 – 3,37) MPa]. Rasipanje rezultata bilo je znatno manje za TPH u usporedbi s BT/ACP uzorcima [SD (0,05 – 0,19) MPa prema (0,06 – 0,68) MPa]. Dok se  $PSS_{mjer}$  ne može korelirati s visinom uzorka kompozita,  $PSS_{norm}$  opada s porastom visine uzorka prema izrazima ( $R^2$  je koeficijent korelacije):



SLIKA 14.

Remineralizacija (pozitivne vrijednosti  $\Delta(\Delta Z)$ ; %) ili gubitak minerala (demineralizacija = negativne vrijednosti  $\Delta(\Delta Z)$ ; %) u uzorcima goveđih (a), odnosno ljudskih zuba (b) tretiranih s različitim kompozitima i u kontrolnim skupinama (bez kompozita) nakon cikličkih promjena pH (vidi sekciju 2,4.). Prikazane su srednje vrijednosti + standardno odstupanje rezultata.

Broj analiziranih uzoraka u eksperimentalnim skupinama:  $51 \leq n \leq 68$  (a) i  $8 \leq n \leq 30$  (b)

FIG. 14.

Remineralization (positive values  $\Delta(\Delta Z)$ ; %) or mineral loss (demineralization = negative values  $\Delta(\Delta Z)$ ; %) in bovine (a) and human (b) teeth specimens treated with different composites and in the control group (without composite) after cyclic pH changes (see section 2,4). Presented are mean values + standard deviation of the results. Number of analyzed samples in experimental groups:  $51 \leq n \leq 68$  (a) i  $8 \leq n \leq 30$  (b)

$$(ACP \text{ kompozit}) \text{ PSS}_{\text{norm}} = 28,3 \cdot e^{-0,58h} \quad (R^2 = 0,9542) \quad (10)$$

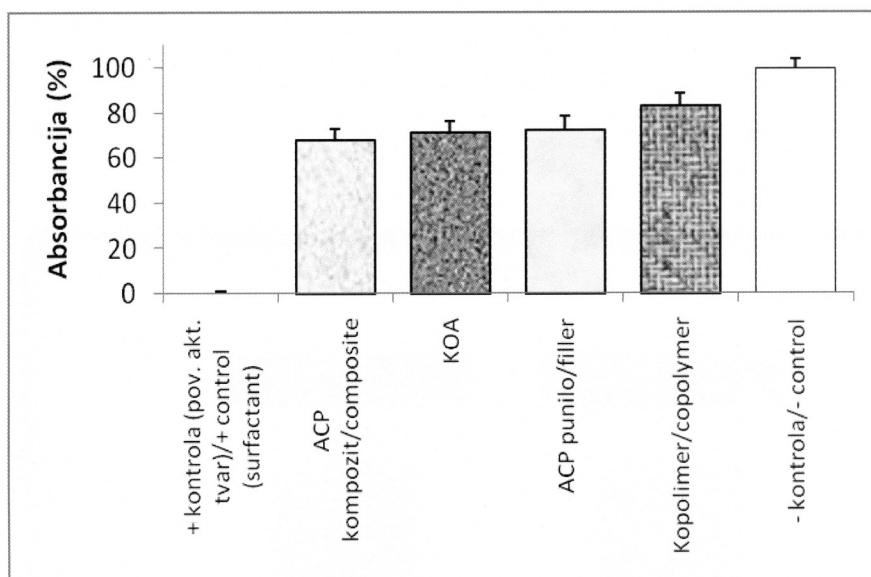
$$(ACP \text{ kompozit}) \text{ PSS}_{\text{norm}} = 4,28 \times C \text{ factor} + 1,05 \quad (R^2 = 0,9923) \quad (12)$$

$$(TPH \text{ kompozit}) \text{ PSS}_{\text{norm}} = 14,5 \cdot e^{-0,61h} \quad (R^2 = 0,9680). \quad (11)$$

$$(TPH \text{ kompozit}) \text{ PSS}_{\text{norm}} = 2,13 \times C\text{-factor} + 0,20 \quad (R^2 = 0,9903). \quad (13)$$

$\text{PSS}_{\text{norm}}$  i C faktor pokazuju linearnu ovisnost prema jednadžbama:

Rezultati jasno pokazuju da je pri razmatranju PSS u kompozitnim materijalima nužno uzeti u obzir utjecaj C faktora te koliko pri tome mogu biti korisna tenziometrijska mjerenja.



SLIKA 15.

Životna aktivnost stanica (Wst-1 analiza; srednja vrijednost + standardno rasipanje) izloženih ekstraktima ACP kompozita, komercijalnog adheziva, ACP-a i kopolimera, u usporedbi s negativnom i pozitivnom kontrolnom skupinom (0,1 % površinski aktivne tvari). Broj uzoraka u grupi n = 6

FIG. 15.

Viability of cells (Wst-1 analysis; mean value + standard deviation) exposed to extracts of ACP composite, commercial adhesive, ACP filler and copolymer in comparison with the negative and positive control group (0.1 % surfactant). Number of samples n = 6/group

### 3.4. Adhezivnost eksperimentalnih ACP kompozita

Da bi se ispitaio utjecaj vodenoga medija na adhezivnost eksperimentalnih ACP kompozita, Bis-GMA/TEGDMA/HEMA/ZrDMA smola je pomiješana s am-ACP, m-ACP, odnosno Sr staklom. Smična čvrstoća vezanja (SBS) na dentin kompozitnih uzoraka mjerena je nakon 24 sata, 14 dana i 30 dana stajanja u vodenom mediju. Odstupanje SBS vrijednosti ACP kompozita u usporedbi s kontrolnim kompozitima punjenim Sr staklom [(16,6 ± 4,4) MPa i (14,3 ± 6,2) MPa prema (16,7 ± 4,0) MPa] (Slika 13); (83) statistički nije značajno.

SBS test na uzorcima ljudskoga dentina korišten je i da bi se provjerila adhezivnost am-ACP-a i m-ACP-a eksperimentalnih kompozita formuliranih s *ETHMI.35\** smolom. Uzorci su bili uronjeni u umjetnu slinu na 37°C i tako držani 6 mjeseci. SBS vrijednosti eksperimentalnih ortodontskih adheziva i nakon 6 mjeseci bile su usporedive sa SBS vrijednostima komercijalnoga adheziva (84).

### 3.5. In vitro remineralizacija s ACP kompozitima

Remineralizacijska efikasnost am-ACP/Bis-GMA/TEGDMA/HEMA/ZrDMA (BTHZ), odnosno am-ACP/EBPADMA/TEGDMA/HEMA/MEP (*ETHMI.35\**) kompozita testirana je u dva odvojena istraživanja s uzorcima cakline govedih, odnosno ljudskih zubi. Rezultati su prikazani na Slici 14 (a, b). Obje ACP formulacije pokazale su se efikasnijim od kontrolnih skupina. S ACP/BTHZ kompozitom obnovljeno je približno 40% minerala dok je u kon-

trolnim skupinama zabilježena daljnja demineralizacija [(5,7 – 9,4)%]. S ACP/ETHM kompozitom (namijenjen za ortodontsku uporabu) također je obnovljeno više minerala (14,4%) nego s kontrolnim kompozitom (4,4%). U kontrolnoj skupini (bez remineralizacijskoga kompozita) dodatni gubitak minerala iznosio je 55%. Posebno je značajan podatak da remineralizacijsko djelovanje ACP kompozita nije bilo ograničeno na relativno usko područje ispod površine cakline, već se proteže kroz cijelu leziju (53).

### 3.6. Citotoksičnost eksperimentalnoga ACP adheziva

Citotoksičnost eksperimentalnoga EBPADMA/UDMA/TEGDMA/HEMA kopolimera, m-ACP kompozita i m-ACP punila uspoređena je s citotoksičnošću komercijalnoga ortodontskog adheziva (KOA) metodom ekstrakcije (57). Dok stanice u međudjelovanju s ekstraktima ACP punila, kopolimera, kompozita, KOA i negativne kontrolne skupine (bez ekstrakata) nisu pokazale nikakve morfološke promjene, u prisutnosti površinski aktivnih tvari (pozitivna kontrolna skupina) nađeni su tek stanični ostaci. Približno jednak broj stanica u sustavima izloženim ekstraktima ACP-a, kopolimera, ACP kompozita i KOA upućuje na njihovu podjednaku citotoksičnost. Kolorimetrijsko mjerenje aktivnosti stanične dehidrogenaze (apsorbancija pri 450 nm) proporcionalna je aktivnosti hidrogenaze u stanici; Slika 15. to potvrđuje.

Umjereno smanjenje stanične aktivnosti u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom u ekstraktima ACP kompozita, KOA i ACP-a [(27-32)%; razlike između te tri skupine nisu

statistički značajne], te kopolimera (17%) najvjerojatnije je posljedica djelovanja neizreagiranih monomera i/ili komponenta sustava za foto-polimerizaciju. Ne smije se, međutim, zanemariti ni potencijalni utjecaj iona kalcija (plus eventualno cirkonija) i fosfata (oslobođenih iz ACP punila i ACP kompozita), odnosno fluorida (oslobođenih iz KOA) na staničnu aktivnost. Za potpunije razumijevanje međudjelovanja između eksperimentalnih (i komercijalnih) kompozita i stanica ubuduće će biti nužno identificirati i kvantificirati organske i anorganske ione/molekule u ekstraktima tih materijala.

#### 4. ZAKLJUČCI/SMJERNICE

Sustavna fizičko-kemijska karakterizacija ACP kompozita nužna je kako bi se potpunije razumjelo složene odnose između strukture ACP punila i sastavnih komponenta smola te njihov utjecaj na svojstva kompozita. Buduća istraživanja bit će usmjerena na formulaciju novih remineralizacijskih materijala za endoncijsku primjenu koji bi osim zadovoljavajuće mehaničke stabilnosti trebali imati i poboljšanu biokompatibilnost. Pri tome će specijalan naglasak biti na procjeni bioloških rizika što potječu od toksičnosti individualnih komponenta (neposredni bio-rizik), odnosno mikrobiološke propusnosti restoracije (posredni bio-rizik). Planiranim kliničkim ispitivanjima, prethodit će opsežna testiranja citotoksičnosti u okviru kojih će se pored morfološke karakterizacije i životne aktivnosti odrediti i integritet staničnih membrana i nekroza stanica u prisutnosti ACP kompozita.

#### Opovrgnuće

Komercijalni materijali i instrumenti identificirani u ovome članku navedeni su isključivo u svrhu pojašnjenja eksperimentalnih postupaka. Njihovo identificiranje ni u kom slučaju ne znači da su upravo ti materijali, odnosno uređaji najbolji za opisana istraživanja niti ih Američko dentalno udruženje i Nacionalni institut za standarde i tehnologiju u te svrhe izričito preporučuju.

#### Disclaimer

Certain commercial materials and equipment are identified in this article for adequate definition of the experimental procedures. In no instance does such identification imply recommendation or endorsement by the American Dental Association Foundation or the National Institute of Standards and Technology or that the material and the equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

#### Zahvala

Autor zahvaljuje na financijskoj potpori Nacionalnom institutu za dentalna i kraniofacijalna istraživanja, Bethesda, Maryland, SAD (istraživački projekt DE 13169), Američkom dentalnom udruženju, Nacionalnom institutu za standarde i tehnologiju, te tvrtkama "Esstech", Essington, Pennsylvania, SAD i "Dentsply Caulk", Milford, Delaware, SAD na poklonjenim monomerima, odnosno TPH i Sr-staklu.

#### Acknowledgement

The reported studies were supported by the National Institute of Dental and Craniofacial Research (grant DE 13169), by the American Dental Association Foundation and by the National Institute of Standards and Technology. Author would like to thank Esstech, Essington, PA, USA, for donation of monomers and Dentsply Caulk, Milford, DE, USA, for donation of TPH and Sr-glass.

#### LITERATURA

1. Ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand.* 1999;57:325-9.
2. Kashet S. Historical review of remineralization research. *J Clin Dent.* 1999;10:56-64.
3. Gonzales-Cabezas C, Fontana C, Dunipace M, Li AJ, Fischer GM, Proskin HM, Stokey GK. Measurement of enamel remineralization using microradiography and confocal microscopy. *Caries Res.* 1998;32:385-92.
4. Schemehorn BR, Orban JC, Wood GD, Fischer GM. Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. *J Clin Dent.* 1999;10:13-6.
5. Chow LC, Vogel GL. Enhancing remineralization. *Oper Dent.* 2001;6:27-38.
6. Ten Cate JM. Remineralization of caries lesions extending into dentin. *J Dent Res* 2001;80(5):1407-11.
7. Reynolds EC, Black CL, Cai F, Cross KJ, Eakins D, Huq NL, Morgan MV, Nowicki A, Perich JW, Riley PF, Shen P, Talbo G, Webber F. Advances in enamel remineralization: casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Clin Dent.* 1999;10(2):86-8.
8. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res.* 2003;82(3):206-11.
9. Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, Reynolds C. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 2008;87(4):344-8.
10. Antonucci JM, Skrtic D, Hailer AW, Eanes ED. Bioactive polymeric composites based on hybrid amorphous calcium phosphate. U: Ottenbrite RM, Kim SW, urednici. *Polymeric drugs & drug delivery systems.* Lancaster: Technomics Publ; 2000. str. 301-10.
11. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED. Amorphous calcium phosphate-based bioactive polymeric composites for mineralized tissue regeneration. *J Res Natl Inst Stands Technol.* 2003;108(3):167-82.
12. Antonucci JM, Skrtic D. Physicochemical properties of bioactive polymeric composites: effects of resin matrix and the type of amorphous calcium phosphate filler. U: Shalaby SW, Salz U, urednici. *Polymers for dental and orthopedic applications.* Boca Raton: CRC Press; 2007. str. 217-42.
13. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials.* 2009;2:339-498.
14. Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chem Rev.* 2008;108:4628-69.
15. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(2):136-51.
16. Stansbury JW, Dickens SH. Network formation and compositional drift during photo-initiated copolymerization of dimethacrylate monomers. *Polyme.* 2001;42:6363-9.
17. Antonucci JM, Stansbury JW. Molecularly designed dental polymers. U: Arshady R, urednik. *Desk reference of functional polymers syntheses and applications.* Washington : ACS; 1997. str. 719-38.
18. Antonucci JM, Liu DW, Stansbury JW. Synthesis of hydrophobic oligomeric monomers for dental applications. *J Dent Res.* 1993;72:369.



19. Kidd EAM, Beighton D. Prediction of secondary caries around tooth-colored restoration: a clinical and microbiological study. *J Dent Res.* 1996;75:1942-6.
20. Skrtić D, Antonucci JM, Eanes ED, Eichmiller FC, Schumacher GE. Physicochemical evaluation of bioactive polymeric composites based on hybrid amorphous calcium phosphates. *J Biomed Mater Res.* 2000;53:381-91.
21. Antonucci JM, Skrtić D. Matrix resin effects on selected physicochemical properties of amorphous calcium phosphate composites. *J Bioact Comp Polym.* 2005;20:29-49.
22. Skrtić D, Antonucci JM, Eanes ED, Eidelman N. Dental composites based on hybrid and surface-modified amorphous calcium phosphates - A FTIR microspectroscopic study. *Biomaterials.* 2003;25:1141-50.
23. Skrtić D, Antonucci JM. Effect of bifunctional co-monomers on mechanical strength and water sorption of amorphous calcium phosphate and silanized glass-filled bis-GMA-based composites. *Biomaterials.* 2003;24:2881-8.
24. Yuan H, Li Y, DeBruijn JD, DeGroot K, Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials.* 2000;21:1283-90.
25. Oonishi H, Kushitani S, Iwaki H, Saka K, Ono H, Tamura A, Sugihara T, Hench LL, Wilson J, Tsuji E. Comparative bone formation in several kinds of bioceramic granules. *Bioceramics.* 1995;8:137-44.
26. Drissen FCM, Boltong MG, Zapatero M, Verbeeck RMH, Bonfield W, Bermudez O, Fernandez E, Ginebra MP, Planell JA. In vivo behavior of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med.* 1995;6:272-8.
27. Nakamura T. Bioceramics in orthopedic surgery. *Bioceramics.* 1996;9:31-4.
28. Koshino T, Kubota W, Morii T. Bone formation as a reaction to hydraulic hydroxyapatite thermal decomposition product used as bone cement in rabbits. *Biomaterials.* 1996;16:125-8.
29. Barrere F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomed.* 2006;1(3):317-32.
30. Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schiltze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P. Degradation characteristics of a and b tri-calcium phosphate in minipigs. *J Biomed Mater Res.* 2002;63:115-21.
31. Ehara A, Ogat K, Imazato S, Ebisu S, Nakano T, Umakoshi Y. Effects of a-TCP and tetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization. *Biomaterials.* 2003;24:831-6.
32. Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Butters RR Jr, Sugimoto T, Brown EM. Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>) sensing receptor and its antagonists stimulate chemotaxis and proliferation of M3CT3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1998;13:1530-8.
33. Hynos I, Edgar AJ, BATTERY LDK, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res.* 2001;55:151-7.
34. Skrtić D, Antonucci JM, Eanes ED, Brunworth RT. Silica and zirconia-hybridized amorphous calcium phosphate. Effect on transformation to hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 2002; 59(4):597-604.
35. Keeting PE, Oursler M, Wiegand KE, Bonde SK, Spelsberg TC, Riggs BL. Zeolite a increases proliferation, differentiation and transforming growth factor beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *J Bone Miner Res.* 1992;7:1281-9.
36. Beck GR Jr, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *PNAS.* 2000;97:8452-7.
37. Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent.* 1998;26:137-45.
38. Pelka M, Distle R, Peshelt A. Elution parameters and HPLC-detection of single components from resin composite. *Clin Oral Invest.* 1999;3:194-200.
39. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res.* 2001;80(7):1615-20.
40. Ratanasthien S, Wataha J, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res.* 1995;74:1602-6.
41. O'Donnell JNR, Antonucci JM, Skrtić D. Amorphous calcium phosphate composites with improved mechanical properties. *J Bioact Compat Polym.* 2006;21(3):169-84.
42. O'Donnell JNR, Antonucci JM, Skrtić D. Illuminating the role of agglomerates on critical physicochemical properties of amorphous calcium phosphate composites. *J Comp Mater.* 2008;42(21):2231-46.
43. Lee SY, Regnault WF, Antonucci JM, Skrtić D. Effect of particle size of an amorphous calcium phosphate filler on the mechanical strength and ion release of polymeric composites. *J Biomed Mater Res.* 2007;80(B):11-7.
44. ASTM F394-78 (re-approved 1991): standard test method for biaxial strength (modulus of rupture) of ceramic substrates.
45. O'Donnell JNR, Langhorst SE, Fow MD, Skrtić D, Antonucci JM. Light-cured dimethacrylate-based resins and their composites: comparative study of mechanical strength, water sorption and ion release. *J Bioact Compat Polym.* 2008;23(5):207-26.
46. Vieth WR. Diffusion in and through polymers: principles and applications. New York: Hanser; 1991.
47. Palin WM, Fleming GJP, Burke FJT, Marguis PM, Randall RC. The influence of short and medium-term water immersion on the hydrolytic stability of novel low-shrink dental composites. *Den Mater.* 2005;21(9):852-63.
48. Sideriou I, Achilias D, Spyroudi C, Karabela M. Water sorption characteristics of light-cured dental resins based on bis-EMA/PCDMA. *Biomaterials.* 2004;25(2):367-76.
49. Asaoka H, Hirano S. Diffusion coefficient of water through dental composite resin. *Biomaterials.* 2003;23(8):1897-904.
50. Lu H, Stansbury JW, Dickens SH, Eichmiller FC, Bowman CN. Probing the origins and control of shrinkage stress in dental resin-composites: I. shrinkage stress characterization technique. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15:1097-103.
51. Lu H, Stansbury JW, Dickens SH, Eichmiller FC, Bowman CN. Probing the origins and control of shrinkage stress in dental resin-composites: II. novel method of simultaneous measurement of polymerization shrinkage stress and conversion. *J Biomed Mater Res Appl Biomater.* 2004;71(B):206-14.
52. O'Donnell JNR, Schumacher GE, Antonucci JM, Skrtić D. Adhesion of amorphous calcium phosphate composites bonded to dentin: a study in failure modality. *J Biomed Mater Res Appl Biomater.* 2009; 90(B):238-49.
53. Langhorst SE, O'Donnell JN, Skrtić D. In vitro remineralization of enamel by polymeric ACP composite: quantitative microradiographic study. *Dent Mater.* 2009;26:884-91.
54. Chow LC, Takagi S, Tung W, Jordan TH. Digital image analysis assisted microradiography - measurement of mineral content of caries lesions in teeth. *J Res Natl Inst Stand Technol.* 1991;96:203-14.
55. Damato FA, Strang R, Stephen KW. Comparison of solution- and gel-prepared enamel lesions - an in vitro pH-cycling study. *J Dent Res.* 1988;67:1122-5.
56. Dickens SH, Flaim GM, Takagi S. Mechanical properties and biochemical activity of remineralizing resin-based Ca-PO<sub>4</sub> cements. *Dent Mater.* 2003;19:558-66.
57. Simon CG Jr, Antonucci JM, Liu DW, Skrtić D. In vitro cytotoxicity of amorphous calcium phosphate composites. *J Bioact Compat Polym.* 2005;20(5):279-95.
58. Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi H, He PG. A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem Pharm Bull.* 1993;41:1405-12.
59. Snedecor GE, Cochran GW. Statistical methods. 8. izd. Iowa: State Univ. Press; 1989.

60. Montgomery DC. Design and analysis of experiments. 2. izd. New York: John Wiley & Sons; 1984. str. 209.
61. Neter G, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied linear statistical models. 4. izd. Boston: WCB/McGraw-Hill; 1996. str. 683-791.
62. Antonucci JM, Liu DW, Skrtic D. Amorphous calcium phosphate based composites: effect of surfactants and poly(ethylene) oxide on filler and composite properties. *J Disp Sci Technol.* 2007;28(5):819-24.
63. Antonucci JM, Skrtic D, Eanes ED. Bioactive polymeric materials based on amorphous calcium phosphate - effect of coupling agents. U: *Hydrogels and biodegradable polymers for bioapplications.* Ottenbrite R, Huang S, Park K. urednici. Washington: ACS Symposium Series 627; 1996. str. 243-54.
64. Skrtic D, Stansbury JW, Antonucci JM. Volumetric contraction and methacrylate conversion in light-polymerized amorphous calcium phosphate/methacrylate composites. *Biomaterials.* 2003;24(14):2443-9.
65. Skrtic D, Antonucci JM, Liu DW. Ethoxylated bisphenol A methacrylate-based amorphous calcium phosphate composites. *Acta Biomaterialia.* 2006; 2(1):85-94.
66. Lovell LG, Stansbury JW, Syrpes DC, Bowman CN. Effects of composition and reactivity on the reaction kinetics of dimethacrylate/dimethacrylate copolymerizations. *Macromolecules.* 1999;32(12):3913-21.
67. Skrtic D, Antonucci JM. Dental composites based on amorphous calcium phosphate - resin composition/physicochemical properties study. *J Bioma Appl.* 2007;21:375-93.
68. Labella R, Lambrechts P, VanMeerbeek B, Vanherle G. Polymerization shrinkage and elasticity of flowable composites and filled adhesives. *Dent Mater.* 1999;15:128-37.
69. Guggenberger R, Weinmann W. Exploring beyond methacrylates. *Am J Dent.* 2002; 15(2):128-37.
70. Tilbrook DA, Clarke RL, Howle NE, Braden M. Photocurable epoxy-polyol matrices for use in dental composites. *Biomaterials.* 2000;21:1743-53.
71. Wilder EA, Wilson KS, Quinn JB, Skrtic D, Antonucci JM. Effect of an organogelator on the properties of dental composites. *Chem Mater.* 2005;17(11):2946-52.
72. Antonucci JM, Fowler BO, Weir MD, Skrtic D, Stansbury JW. Effect of ethyl-a-hydroxymethylacrylate on selected properties of copolymers and ACP resin composites. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(10):3263-71.
73. Ferracane JL. Developing a more complete understanding of stresses produced in dental composites during polymerization. *Dent Mater.* 2005;21:36-42.
74. Kinomoto Y, Torii M. Photoelastic analysis of polymerization contraction stresses between self- and light-cured composites. *J Dent.* 1998;26:165-71.
75. Venhoven BAM, de Gee AJ, Davidson CL. Light initiation of dental resins: dynamics of the polymerization. *Biomaterials.* 1996;176:2313-8.
76. Braga RR, Ferracane JL. Contraction stress related to degree of conversion and reaction kinetics. *J Dent Res.* 2002;81:114-8.
77. Calheiros FC, Braga RR, Kawano Y, Ballester RY. Relationship between contraction stress and degree of conversion in restorative composites. *Dent Mater.* 2004;20:939-46.
78. Stansbury JW, Trujillo-Lemon M, Lu H, Ding X, Lin Y, Ge J. Conversion-dependent shrinkage stress and strain in dental resins and composites. *Dent Mater.* 2005;21:56-67.
79. Kleverlaan CJ, Feilzer AJ. Polymerization shrinkage and contraction stress of dental resin composites. *Dent Mater.* 2005;21:1150-7.
80. Choi KK, Ruy GJ, Choi SM, Lee MJ, Park SJ, Ferracane JL. Effects of cavity configuration on composite restoration. *Oper Dent.* 2004;29:462-9.
81. Feilzer AJ, de Gee AJ, Davidson CL. Quantitative determination of stress reduction by flow in composite restorations. *Dent Mater.* 1990;6:167-71.
82. Uno S, Tanaka T, Inoue S, Sano S. The influence of configuration factors on cavity adaptation in compomer restorations. *Dent Mater.* 1999;18:19-31.
83. Schumacher GE, Antonucci JM, O'Donnell JNR, Skrtic D. The use of amorphous calcium phosphate composites as bioactive basing materials. Their effect on the strength of the composite/adhesive/dentin bond. *JADA.* 2007; 138:1476-84.
84. Leung WH, Darvell BW. Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. *J Dent.* 1997;25:457-84.

## Dodatak/Appendix

Popis kratica, izvedenih iz engleskih naziva, koje su korištene u članku

List of acronyms used throughout the manuscript

- ACP = amorfni kalcij fosfat; amorphous calcium phosphate
- am-ACP = izvorni ACP; as made ACP
- ANOVA = analiza varijance; analysis of variance
- APTMS = 3-aminopropiltrimetoksi silan; 3-aminopropyl trimethoxy silane
- BFS = dvoosna savojna čvrstoća; biaxial flexural strength
- Bis-GMA = 2,2-bis[p-(2-hidroksi-3-metakriloksipropoksi)fenil] propan; 2,2-bis[p-(2-hidroksi-3-metacriloksi)propoxy]phenyl]propane
- BPO = benzoil peroksid; benzoyl peroxide
- BTHZ = Bis-GMA/TEGDMA/HEMA/Zr-DMA resin; Bis-GMA/TEGDMA/HEMA/Zr-DMA smola
- C-factor = faktor konfiguracije šupljine; cavity configuration factor;
- CP = kalcij fosfat; calcium phosphate
- CQ = kamforkinon; camphorquinone
- DCP = dikalcij fosfat; dicalcium phosphate
- DCPD = dikalcij fosfat dihidrat; dicalcium phosphate dihydrate
- DHEPT = 2,2'-dihidroksietil-p-toluidin; 2,2'-dihydroxyethyl-p-toluidine
- $d_m$  = srednji promjer; median diameter
- DS = demineralizacijska otopina; demineralizing solution
- DVC = stupanj konverzije vinilnih funkcionalnih skupina; degree of vinyl conversion
- EBPADMA = etokisilirani bisfenol A dimetakrilat; ethoxylated bisphenol A dimethacrylate
- EDMAB = etil-4-N,N-dimetilamino benzoate; ethyl-4-N,N-dimethylamino benzoate
- EDTA = etilendiaminotetraoctena kiselina; ethylenediaminetetraacetic acid

- EHMA = etil- $\alpha$ -hidroksimetakrilat; ethyl- $\alpha$ -hydroxymethacrylate
- ETH = EBPADMA/TEGDMA/HEMA smola; EBPADMA/TEGDMA/HEMA resin
- ETHM = EBPADMA/TEGDMA/HEMA/MEP smola; EBPADMA/TEGDMA/HEMA/MEP resin
- EUTH = EBPADMA/UDMA/TEGDMA/HEMA smola; EBPADMA/UDMA/TEGDMA/HEMA resin
- FAP = fluorapatit; fluoroapatite
- FTIR = Fourier-transform infracrvena spektroskopija; Fourier-transform infrared spectroscopy
- FTIR-m = FTIR mikrospektroskopija; FTIR microspectroscopy
- $\Delta G^0$  = Gibbsova slobodna energija; Gibbs free energy
- HAP = hidroksiapatit; hydroxyapatite
- HEMA = 2-hidroksietil metakrilat; 2-hydroxyethyl methacrylate
- HEPES = 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonska kiselina; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
- IAP = ionski aktivitetni produkt; ion activity product
- IRGACURE 1850 = komercijalni fotoinicijator; commercial photoinitiator system
- KOA = komercijalni ortodontski adheziv; commercial orthodontic adhesive
- m-ACP = usitnjeni ACP; milled ACP
- MEP = metakriloloksietil ftalat; methacryloyloxyethyl phthalate
- MPTMS = metakriloksipropil trimetoksi silan; methacryloxypropyl trimethoxy silane
- NIR = spektroskopija u bliskom infracrvenom području; near infrared spectroscopy
- OCP = oktakalcij fosfat; octacalcium phosphate
- PAA = poli(akrilna kiselina); poly(acrylic acid)
- PEG-U = uretan dimetakrilat s ugrađenim poli(etilen glikolom); poly(ethylene glycol) extended urethane dimethacrylate
- PEO = poli(etilen oksid); poly(ethylene oxide)
- PMGDMA = piromelitični glicerol dimetakrilat; pyromellitic glycerol dimethacrylate
- PS = skupljanje pri polimerizaciji; polymerization shrinkage
- PSA = analiza veličine čestica; particle size analysis
- PSS = napetost uzrokovana polimerizacijom; polymerization stress
- RH = relativna vlažnost; relative humidity
- RS = remineralizacijska otopina; remineralizing solution
- SBS = smična čvrstoća vezanja; shear bond strength
- SEM = pretražna elektronska mikroskopija; scanning electron microscopy
- SD = standardno odstupanje; standard deviation
- SSA = specifična površina; specific surface area
- TCP = trikalcij fosfat; tricalcium phosphate
- TEGDMA = tri(etilenglikol) dimetakrilat; tri(ethyleneglycol) dimethacrylate
- TGA = termogravimetrijska analiza; thermogravimetric analysis
- TPH = komercijalni kompozit s punilom na bazi stakla; commercial glass-filled composite
- TRITON-100 = komercijalna neionska površinski aktivna tvar; commercial nonionic surfactant
- TWEEN-80 = komercijalna neionska površinski aktivna tvar; commercial nonionic surfactant
- UDMA = uretan dimetakrilat; urethane dimethacrylate
- UPHM = UDMA/PEG-U/HEMA/MEP smola; UDMA/PEG-U/HEMA/MEP resin
- WS = adsorpcija vode; water sorption
- XRD = rentgenska difrakcija ; X-ray diffraction
- $\Delta Z$  = sadržaj minerala u leziji; mineral content of the lesion
- ZrDMA = cirkonil dimetakrilat; zirconyl dimethacrylate
- ZONYL FSN = komercijalna neionska površinski aktivna tvar; commercial nonionic surfactant
- ZONYL FSP = komercijalna anionska površinski aktivna tvar; commercial anionic surfactant

## DENTAL COMPOSITES BASED ON AMORPHOUS CALCIUM PHOSPHATE

Drago Škrtić

Paffenbarger Research Center, American Dental Association Foundation,  
National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899, USA  
Review

### ABSTRACT

Bioactive, polymeric dental composites containing amorphous calcium phosphate (ACP) have tremendous appeal due to (1) their potential to arrest demineralization and/or even remineralize defective tooth structures and, (2) their biocompatibility. For the last decade our group has systematically investigated structure/composition/property relationships of ACP-filled polymeric composites in order to develop strategies that better control dispersion of ACP in polymer matrices and increase our understanding of how the structure of the polymer and filler phases, especially the complex interaction(s) occurring at the ACP/organic matrix interphase, affect such critical properties of these composites as ion release and mechanical strength. The extensive physicochemical, mechanical and biological studies of ACP composite materials described in this review illustrate how monomer/polymer molecular structure and filler/matrix interactions affect critical properties and the overall performance of these materials.

**Key words:** Amorphous calcium phosphates; Biocompatible materials; Dental materials; Tooth remineralization; Polymers