

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Stefan V. Vulović

**ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA POVRŠINE
MAŠINSKI OBRADIVIH DENTALNIH
MATERIJALA I NJIHOVOG UTICAJA NA
ADHEZIJU MIKROORGANIZAMA IZ USNE
DUPLJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Stefan V. Vulović

**STUDY ON THE SURFACE
CHARACTERISTICS OF DENTAL CAD/CAM
MATERIALS AND THEIR INFLUENCE ON
MICROBIAL ADHESION IN THE ORAL CAVITY**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024.

MENTOR

Prof. dr Aleksandra Milić Lemić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Prof. dr Aleksandar Todorović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

Prof. dr Ivica Stančić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

Prof. dr Nataša Nikolić Jakoba, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

Doc. dr Milena Radunović, docent
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

Prof. dr Aleksandar Vencel, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Mašinski fakultet

DATUM ODBRANE

ZAHVALNICA

Najveću i neizrecivu zahvalnost dugujem svom mentoru, Prof. dr Aleksandri Milić Lemić koja svojom posvećenošću, zalaganjem, požrtvovanjem i nesebičnim prenošenjem pozamašnog znanja i iskustva pruža ogromnu podršku i predstavlja inspiraciju i uzor u svim aspektima naučne i stručne karijere.

Takođe, veliko hvala i Prof. dr Aleksandru Todoroviću na prenetom izuzetnom znanju, posvećenom vremenu i dragocenim sugestijama u realizaciji ove doktorske disertacije.

Zahvalio bih se i Prof. dr Ivici Stančiću na entuzijizmu, ljubaznosti i pravim smernicama u cilju prevazilaženja problema u toku procesa izrade ove doktorske disertacije.

Srdačno hvala i Prof. dr Nataši Nikolić Jakobi bez čijih konstruktivnih predloga disertacija ne bi bila ovakva kakva jeste.

Ogromnu zahvalnost dugujem i Doc. dr Mileni Radunović na korisnim savetima i pomoći u vezi sa mikrobiološkim aspektom ove doktorske disertacije.

Neizmerno hvala i Prof. dr Aleksandru Venclu na podršci i nesebičnoj pomoći od samog početka mog dosadašnjeg naučnog usavršavanja.

Hvala i mojim saradnicima, Ass. dr Sanji Petrović, Ass. dr Bošku Toljiću i dr Tamari Vlajić Tovilović koji su pokazali izuzetnu stručnost i kolegijalnost prilikom izvođenja eksperimenata ove doktorske disertacije.

Ovim putem bih se zahvalio i kolegama iz stomatološke ordinacije „Aleksić Dental Centar’’, Zlati Ćukić, dr Zoranu D. Aleksiću, Prof. dr Zoranu M. Aleksiću i Prof. dr Jugoslavu Iliću koji od početka moje naučne i stručne karijere predstavljaju ogromnu podršku i vetar u leđa.

Zahvaljujem se brojnim prijateljima na ogromnoj moralnoj podršci i veri u mene od malih nogu.

Beskrajno hvala devojci Teodori na neiscrpnom izvoru energije, radosti, pažnje i ljubavi koji su mi bili pokretačka snaga za izradu ove doktorske disertacije.

Najzad, hvala majci Mari, ocu Vitomiru i sestri Nataši na безусловnoj ljubavi, podršci, veri, razumevanju i strpljenju koje su mi pružili tokom svih godina školovanja u svojoj želji da se ostvarim u naučnom i stručnom svetu.

Doktorsku disertaciju posvećujem majci Mari.

dr Stefan V. Vulović

ISPITIVANJE KARAKTERISTIKA POVRŠINE MAŠINSKI OBRADIVIH DENTALNIH MATERIJALA I NJIHOVOG UTICAJA NA ADHEZIJU MIKROORGANIZAMA IZ USNE DUPLJE

SAŽETAK

UVOD: Mašinski obradivi dentalni materijali zauzimaju važnu ulogu u stomatologiji. Izrada zubnih nadoknada od ovih materijala zasniva se na digitalnom otiskivanju vilice upotrebom intraoralnog skenera ili digitalnom otiskivanju radnog modela, dobijenog na osnovu uzetog otiska vilice na konvencionalan način upotrebom intraoralnog ili ekstraoralnog skenera. Na osnovu snimka se na monitoru kompjutera dobija trodimenzionalni prikaz vilice na kom se vrši digitalno planiranje nadoknade koje se zatim izrezuju iz pripremljenih blokova ili diskova materijala. Uvođenjem sistema mašinske obrade materijali su unapred pripremljeni pod kontrolisanim uslovima čime je u procesu izrade nadoknade eliminisana zavisnost od manuelnih veština. Zahvaljujući tome, nadoknade odlikuju odlična mehanička i estetska svojstva, biokompatibilnost i preciznost naleganja na oralna tkiva. Uprkos brojnim prednostima, nijedan od ovih materijala primenjen u oralnoj sredini nije pošteđen adhezije mikroorganizama na svojoj površini što je od značaja za dugotrajnost nadoknade i očuvanje zdravlja. Glavni etiološki faktor u nastanku infekcija usne duplje poput karijesa, infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva, kao i infekcija oralne sluzokože izazvanih protezom predstavljaju mikroorganizmi. Na njihovo prisustvo utiču karakteristike površine materijala od kojeg je zubna nadoknada izrađena (površinska hrapavost i površinska slobodna energija), hemijski sastav materijala, površinska slobodna energija mikroorganizama, prisustvo pljuvačke, prisustvo drugih mikroorganizama i stanje oralnih tkiva.

RADNA HIPOTEZA/CILJEVI: Radna hipoteza disertacije je da mašinski obradivi dentalni materijali, iako na isti način pripremljeni, završno mehanički obrađeni i ispolirani prema uputstvu proizvođača, ispoljavaju različitosti u karakteristikama površine koje dovode do povećane sklonosti ka adheziji mikroorganizama na površini jednog materijala u poređenju s drugim. Ciljevi istraživanja su bili da se ispituju i uporede karakteristike površine materijala, da se ispita i uporedi formiran biofilm na površinama materijala u *in vitro* i *in situ* uslovima, kao i da se ispita povezanost između karakteristika površine materijala i formiranog biofilma u *in vitro* i *in situ* uslovima.

MATERIJALI I METODE: U istraživanje je uključeno pet mašinski obradivih dentalnih materijala iz kojih je formirano šest grupa: kompozit na bazi smole (KBS), poli (metil metakrilat) (PMMA), poli (etar etar keton) (PEEK), cirkonija polirana (CP), cirkonija glazirana (CG) i kobalt-hrom legura (CoCr). Za svaku grupu pripremljeno je po 79 uzoraka ($n = 79$), ukupno 474 uzorka, oblika diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm. U prvom delu studije ispitivane su karakteristike površine materijala, merenjem površinske hrapavosti, kontaktnih uglova i izračunavanjem površinske slobodne energije, kao i analizom površinske morfologije u 3D upotrebom mikroskopa atomskih sila (engl. *atomic force microscope (AFM)*) i u 2D upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (engl. *scanning electron microscope (SEM)*). Drugi deo je podrazumevao ispitivanje formiranog monomikrobnog biofilma šest mikroorganizama (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* i *Candida albicans*) na površinama materijala u *in vitro* uslovima, metodom brojanja formiranih kolonija (engl. *colony forming units (CFU)*), testom vijabilnosti ćelija mikroorganizama (engl. *cell viability assay*) i vizuelizacijom biofilma na površinama materijala u 2D upotrebom SEM. U trećem delu istraživanja izvršeno je ispitivanje ukupno formiranog biofilma na površinama materijala u *in situ* uslovima nakon nošenja uzoraka materijala pomoću intraoralnih splintova od strane dvadeset zdravih učesnika u trajanju od 24 h. Najpre je izvršeno određivanje broja bakterija na površinama materijala metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)*), nakon čega je analiza dopunjena vizuelizacijom biofilma na površinama materijala u 2D upotrebom SEM.

REZULTATI: CG grupa je pokazala značajno više vrednosti srednjeg aritmetičkog odstupanja (Ra) i najveće visine neravnina profila merenja površinske hrapavosti (Rz), kao i najizraženiju razliku u vrhovima (engl. *peaks*) i dolinama (engl. *valleys*) profila merenja u poređenju sa drugim grupama. AFM i SEM snimci demonstrirali su konusne formacije okružene ravnom površinom. Grupe CP i PMMA su pokazale značajno niže vrednosti Ra i Rz i manje strme profile merenja u poređenju sa drugim grupama dok su AFM i SEM snimci prikazali homogene površine sa granulastim strukturama. Između grupa je uočena značajna razlika u vrednostima kontaktnih uglova destilovane vode (KUV), etilen glikola (KUE) i dijudmetana (KUD), kao i vrednosti površinske slobodne energije (engl. *surface free energy (SFE)*). Najviše vrednosti KUV i KUE pokazala je PEEK grupa dok je najviša vrednost KUD zabeležena u grupi CoCr, te su za PEEK i CoCr izračunate najniže vrednosti SFE. CG grupa je demonstrirala najniže vrednosti KUV i KUE, kao i najvišu vrednost SFE. Između grupa postoji značajna razlika u broju i vijabilnosti mikroorganizama na njihovim površinama u *in vitro* uslovima. Najviše vrednosti su otkrivene u grupi CG, nasuprot grupama CP i KBS koje su demonstrirale najniže vrednosti što je potvrđeno i na SEM mikrografima. Uočena je slaba do umerena pozitivna povezanost između Ra i CFU/ml dok između SFE i CFU/ml mikroorganizama na površinama materijala u *in vitro* uslovima nije ustanovljena povezanost. Rezultati *real-time* PCR kao dela *in situ* analize pokazali su značajno veći broj bakterija na površinama uzoraka grupa CG i PEEK, suprotno od uzoraka grupa CoCr, CP i KBS koji su posedovali nizak afinitet ka istim što je potvrđeno i analizom SEM mikrografa. Između Ra i broja bakterija zabeležena je slaba pozitivna povezanost dok između SFE i broja bakterija na površinama materijala u *in situ* uslovima nije uočena povezanost.

ZAKLJUČCI: Glazirana cirkonija poseduje hrapaviju površinu u poređenju sa drugim ispitivanim mašinski obradivim dentalnim materijalima. U poređenju sa drugim materijalima, nižu vrednost površinske slobodne energije i hidrofobniji karakter površine pokazuju poli (etar etar keton) i kobalt-hrom legura dok višu vrednost površinske slobodne energije i hidrofilniji karakter površine pokazuje glazirana cirkonija. Hrapavije površine ispitivanih materijala poseduju više vrednosti površinske slobodne energije i veću hidrofilnost. Glazirana cirkonija i poli (etar etar keton) pokazuju najveću sklonost ka adheziji mikroorganizama u *in vitro* i *in situ* uslovima dok najmanju podložnost istom pokazuju polirana cirkonija i kompozit na bazi smole. Na hrapavijim površinama ispitivanih materijala javlja se povećana akumulacija mikroorganizama u *in vitro* i *in situ* uslovima. Ne uočava se direktan uticaj površinske slobodne energije i hidrofilnosti površine ispitivanih materijala na adheziju mikroorganizama na njihovim površinama u *in vitro* i *in situ* uslovima. Adhezija mikroorganizama usne duplje na površinama ispitivanih materijala u *in situ* uslovima ne pokazuje zavisnost isključivo od karakteristika materijala, već i od individualnih osobina svakog pojedinca.

Ključne reči: Mašinski obradivi dentalni materijali; Površinska hrapavost; Kontaktni ugao; Površinska slobodna energija; Mikroskop atomskih sila; Skenirajući elektronski mikroskop; Broj formiranih kolonija; Test vijabilnosti ćelija; Reakcija lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu.

Naučna oblast: Stomatološke nauke

Uža naučna oblast: Stomatološka protetika

UDK broj:

STUDY ON THE SURFACE CHARACTERISTICS OF DENTAL CAD/CAM MATERIALS AND THEIR INFLUENCE ON MICROBIAL ADHESION IN THE ORAL CAVITY

ABSTRACT

INTRODUCTION: Computer-aided design/computer-aided manufacturing (CAD/CAM) materials play an important role in dentistry. The fabrication of dental restorations made of these materials is based on digital jaw impression using the intraoral scanner or digital impression of the stone master cast, obtained after conventional jaw impression using intraoral or extraoral scanner. Thereafter, a 3D view of the jaw is displayed on the computer, which enables digital planning of the restoration, followed by its cutting procedure from prepared materials blocks or discs. Introduction of CAD/CAM system led to material preparation in advance under the controlled conditions, eliminating the dependence on manual skills during the fabrication of dental restoration. Thanks to this the restorations are characterized with excellent mechanical and esthetic properties, biocompatibility and marginal adaptation to the oral tissues. Despite numerous advantages, neither of these materials applied in the oral environment is repulsive to microbial adhesion on its surface, which is important for the restoration durability and health maintenance. The main etiological factor in the occurrence of the oral infections, such as caries, periodontal and peri-implant infections, as well as denture-related oral mucosal infections are microorganisms. Their presence is influenced by the restoration material's surface characteristics (surface roughness and surface free energy), material's chemical composition, surface free energy of microorganisms, the presence of saliva, the presence of other microorganisms and the condition of the oral tissues.

HYPOTHESIS/AIMS: The dissertation hypothesis is that CAD/CAM dental materials, although prepared in the same way, finished and polished according to the manufacturer's instructions, exhibit differences in surface characteristics that lead to an increased microbial adhesion on the surface of one material, compared to another. The aims were to analyse and compare materials surface characteristics, to analyse and compare biofilm formation on materials surfaces under *in vitro* and *in situ* conditions, as well as to analyse the correlation between surface characteristics and biofilm formation on materials surfaces under *in vitro* and *in situ* conditions.

MATERIALS AND METHODS: The research included five CAD/CAM dental materials, from which six groups were created: resin-based composite (RBC), poly (methyl methacrylate) (PMMA), poly (ether ether ketone) (PEEK), zirconia polished (ZP), zirconia glazed (ZG) and cobalt-chromium alloy (CoCr). For each group 79 ($n = 79$) disc-shaped specimens, with 5 mm diameter and 2 mm thickness were prepared, resulting in a total of 474 specimens. In the first part of the study, the materials surface characteristics were analysed, by measuring the surface roughness, contact angles and calculating the surface free energy, as well as by analysing the surface morphology in 3D using atomic force microscope (AFM), and in 2D using scanning electron microscope (SEM). The second part included the examination of the single-species biofilm of six microorganisms (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans*) formed on the materials surfaces under *in vitro* conditions using the colony forming units (CFU) and cell viability assay analyses, supported with the SEM 2D visualization of biofilm formed on materials surfaces. In the third part of the research, the examination of the biofilm formed on the materials surfaces was performed under *in situ* conditions after 24 h of wearing of the intraoral splints with materials specimens by twenty healthy participants. First, the determination of the bacterial number on the specimens surfaces was performed using the real-time polymerase chain reaction (real-time PCR), then the analysis was complemented with the SEM 2D visualization of the biofilm formed on the materials surfaces.

RESULTS: ZG group presented significantly higher values of the mean arithmetic deviation (Ra) and the highest distance between unevenness of the surface roughness measurement profile (Rz), as well as the most pronounced difference between the peaks and valleys in the measurement profile, compared to the other groups. AFM and SEM demonstrated conical formations surrounded by a flat surface. ZP and PMMA groups revealed significantly lower Ra and Rz values and less steep measurement profiles, compared to the other groups, while AFM and SEM displayed homogeneous surfaces with granular structures. There is a significant difference among groups in the values of the contact angles of distilled water (CAW), ethylene glycol (CAE) and diiodomethane (CAD), as well as the surface free energy (SFE). The highest CAW and CAE values were revealed in PEEK group, while the highest CAD value was recorded in the CoCr group. Consequently, the lowest SFE values were calculated in PEEK and CoCr groups. ZG group demonstrated the lowest values of CAW and CAE and the highest value of calculated SFE. Among groups a significant difference was recorded regarding the number and viability of microorganisms on their surfaces under *in vitro* conditions. The highest values disclosed ZG group, contrary to the ZP and RBC groups that demonstrated the lowest values, which was also confirmed by SEM 2D micrographs. There is a weak to moderate positive correlation between Ra and CFU/ml, while no correlation was found between SFE and CFU/ml of microorganisms on materials surfaces under *in vitro* conditions. The *in situ* real-time PCR results revealed a significantly higher number of bacteria on the surfaces of the ZG and PEEK specimens, while CoCr, ZP and RBC specimens possessed less susceptibility to them, which was also confirmed by the SEM 2D micrographs. A weak positive correlation was observed between Ra and the number of bacteria, while no correlation was disclosed between SFE and the number of bacteria on the materials surfaces under *in situ* conditions.

CONCLUSIONS: Glazed zirconia possess a rougher surface, compared to the other tested CAD/CAM dental materials. In comparison with the other materials, poly (ether ether ketone) and cobalt-chromium alloy show a lower value of surface free energy and a more hydrophobic surface, while glazed zirconia reveals a higher surface free energy value and a higher surface hydrophilicity. Rougher surfaces of the tested materials possess higher values of surface free energy and higher surface hydrophilicity. Glazed zirconia and poly (ether ether ketone) show the greatest tendency towards microbial adhesion under both *in vitro* and *in situ* conditions, contrary to the polished zirconia and resin-based composite that show the least susceptibility to it. Rougher surfaces of the tested materials accumulate more microorganisms under both *in vitro* and *in situ* conditions. There is no direct influence of the surface free energy and surface hydrophilicity of the tested materials on the microbial adhesion on their surfaces under both *in vitro* and *in situ* conditions. Microbial adhesion on the surfaces of the tested materials under *in situ* conditions is not only material-dependent, but also individual-specific.

Keywords: CAD/CAM dental materials; Surface roughness; Contact angle; Surface free energy; Atomic force microscope; Scanning electron microscope; Colony forming units; Cell viability assay; Real-time polymerase chain reaction.

Scientific field: Dental sciences

Scientific subfield: Prosthodontics

UDC number:

SPISAK SKRAĆENICA

2D	-	Dvodimenzionalni
3D	-	Trodimenzionalni
AFM	-	Mikroskop atomskih sila (engl. <i>atomic force microscope</i>)
CAD/CAM	-	Kompjuterski potpomognuto dizajniranje/kompjuterski potpomognuta izrada (engl. <i>computer-aided design/computer-aided manufacturing</i>)
CFU	-	Brojanje formiranih kolonija (engl. <i>colony forming units</i>)
CG	-	Cirkonija glazirana
CoCr	-	Kobalt-hrom legura
CP	-	Cirkonija polirana
DS	-	Dubina sondiranja
ILZ	-	Indeks labavljenja zuba
KBS	-	Kompozit na bazi smole
KNP	-	Indeks krvarenja gingive na provokaciju
KUD	-	Kontaktni ugao dijudmetana
KUE	-	Kontaktni ugao etilen glikola
KUV	-	Kontaktni ugao destilovane vode
MTT	-	3-(4,5-dimetiltiazol)-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NIG	-	Nivo ivice gingive
NPE	-	Nivo pripojnog epitela
OD	-	Optička gustina (engl. <i>optical density</i>)
PBS	-	Sterilni fiziološki rastvor puferovan fosfatom (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PMMA	-	Poli (metil metakrilat)
PEEK	-	Poli (etar etar keton)
PI	-	Plak indeks
PCR	-	Lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
SEM	-	Skenirajući elektronski mikroskop (engl. <i>scanning electron microscope</i>)
SFE	-	Površinska slobodna energija (engl. <i>surface free energy</i>)
Tris-HCl	-	Tris-(hidroksimetil)-aminometan hidrohlorid
Y-TZP	-	Itrijumom-stabilizovani tetragonalni cirkonijum polikristal (engl. <i>yttrium-stabilized tetragonal zirconia polycrystal</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Sistem mašinske obrade u izradi zubnih nadoknada	3
1.2 Mašinski obradivi dentalni materijali	5
1.2.1 Mašinski obradivi kompozit na bazi smole	5
1.2.2 Mašinski obradivi poli (metil metakrilat)	6
1.2.3 Mašinski obradivi poli (etar etar keton)	6
1.2.4 Mašinski obradiva cirkonijum-dioksidna keramika (cirkonija)	7
1.2.5 Mašinski obradiva kobalt-hrom legura	8
1.3 Formiranje oralnog biofilma na površini zubne nadoknade	8
1.4 Infekcije usne duplje izazvane mikroorganizmima oralnog biofilma	10
1.4.1 Karijes	10
1.4.2 Infekcije parodontalnih i peri-implantatnih tkiva	11
1.4.3 Infekcije sluzokože usne duplje izazvane prisustvom mobilne zubne nadoknade	14
1.5 Faktori koji utiču na formiranje oralnog biofilma na površini zubne nadoknade	14
1.5.1 Uticaj površinske hrapavosti materijala za izradu zubne nadoknade	14
1.5.2 Uticaj kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i površinske slobodne energije materijala za izradu zubne nadoknade	15
1.5.3 Uticaj hemijskog sastava materijala za izradu zubne nadoknade	15
1.5.4 Uticaj površinske slobodne energije mikroorganizama	16
1.5.5 Uticaj prisustva pljuvačke	16
1.5.6 Uticaj prisustva drugih mikroorganizama	17
1.5.7 Uticaj stanja oralnih tkiva	17
2. RADNA HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19
2.1 Radna hipoteza	21
2.2 Ciljevi istraživanja	21
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1 Etički standard	25
3.2 Priprema uzoraka	25
3.2.1 Priprema uzoraka od kompozita na bazi smole	26
3.2.2 Priprema uzoraka od poli (metil metakrilata)	28
3.2.3 Priprema uzoraka od poli (etar etar ketona)	29
3.2.4 Priprema uzoraka od cirkonijum-dioksidne keramike (cirkonije)	30
3.2.5 Priprema uzoraka od kobalt-hrom legure	33
3.2.6 Čišćenje uzoraka	34
3.3 Ispitivanje karakteristika površine materijala	35
3.3.1 Merenje površinske hrapavosti	35
3.3.2 Merenje kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i izračunavanje površinske slobodne energije	36
3.3.3 Analiza površinske morfologije upotrebom mikroskopa atomskih sila	38
3.3.4 Analiza površinske morfologije upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa	39
3.4 Ispitivanje formiranog biofilma na površinama materijala u <i>in vitro</i> uslovima	39
3.4.1 Formiranje biofilma	39
3.4.2 Brojanje formiranih kolonija mikroorganizama	41

3.4.3 Test vijabilnosti (održivosti) ćelija mikroorganizama	42
3.4.4 Analiza formiranog biofilma upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa	43
3.5 Ispitivanje formiranog biofilma na površinama materijala u <i>in situ</i> uslovima	44
3.5.1 Anamneza, klinički pregled i izbor učesnika	44
3.5.2 Izrada individualnog intraoralnog splinta i njegovo nošenje	46
3.5.3 Određivanje ukupnog broja bakterija metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu	48
3.5.4 Analiza formiranog biofilma upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa	49
3.6 Statistička analiza podataka	49
4. REZULTATI	51
4.1 Rezultati ispitivanja karakteristika površine materijala	53
4.1.1 Rezultati merenja površinske hrapavosti	53
4.1.2 Rezultati merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i izračunavanja površinske slobodne energije	55
4.1.3 Rezultati analize površinske morfologije upotrebom mikroskopa atomskih sila	57
4.1.4 Rezultati analize površinske morfologije upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa	58
4.2 Rezultati ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u <i>in vitro</i> uslovima	60
4.2.1 Rezultati brojanja formiranih kolonija mikroorganizama	60
4.2.2 Rezultati testa vijabilnosti (održivosti) ćelija mikroorganizama	63
4.2.3 Rezultati analize formiranog biofilma upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa	65
4.3 Rezultati ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u <i>in situ</i> uslovima	71
4.3.1 Rezultati određivanja ukupnog broja bakterija metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu	71
4.3.2 Rezultati analize formiranog biofilma upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa	72
5. DISKUSIJA	75
5.1 Analiza rezultata merenja površinske hrapavosti	78
5.2 Analiza rezultata merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i izračunavanja površinske slobodne energije	81
5.3 Analiza povezanosti (korelacije) rezultata merenja površinske hrapavosti i rezultata merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i izračunavanja površinske slobodne energije	81
5.4 Analiza rezultata ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u <i>in vitro</i> uslovima	82
5.5 Analiza povezanosti (korelacije) rezultata merenja površinske hrapavosti i rezultata ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u <i>in vitro</i> uslovima	85
5.6 Analiza povezanosti (korelacije) rezultata merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i površinske slobodne energije i rezultata ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u <i>in vitro</i> uslovima	87
5.7 Analiza rezultata ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u <i>in situ</i> uslovima	89

5.8 Analiza povezanosti (korelacije) rezultata merenja površinske hrapavosti, kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i površinske slobodne energije i rezultata ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u <i>in situ</i> uslovima	91
5.9 Klinički značaj istraživanja	91
6. ZAKLJUČCI	93
7. LITERATURA	97
8. PRILOZI	123
Prilog 1 - Obrazac obaveštenja o učešću u naučnom istraživanju	125
Prilog 2 - Istraživački karton	127
Prilog 3 - Obrazac informisanog pristanka za učešće u naučnom istraživanju	130
9. BIOGRAFIJA AUTORA	131

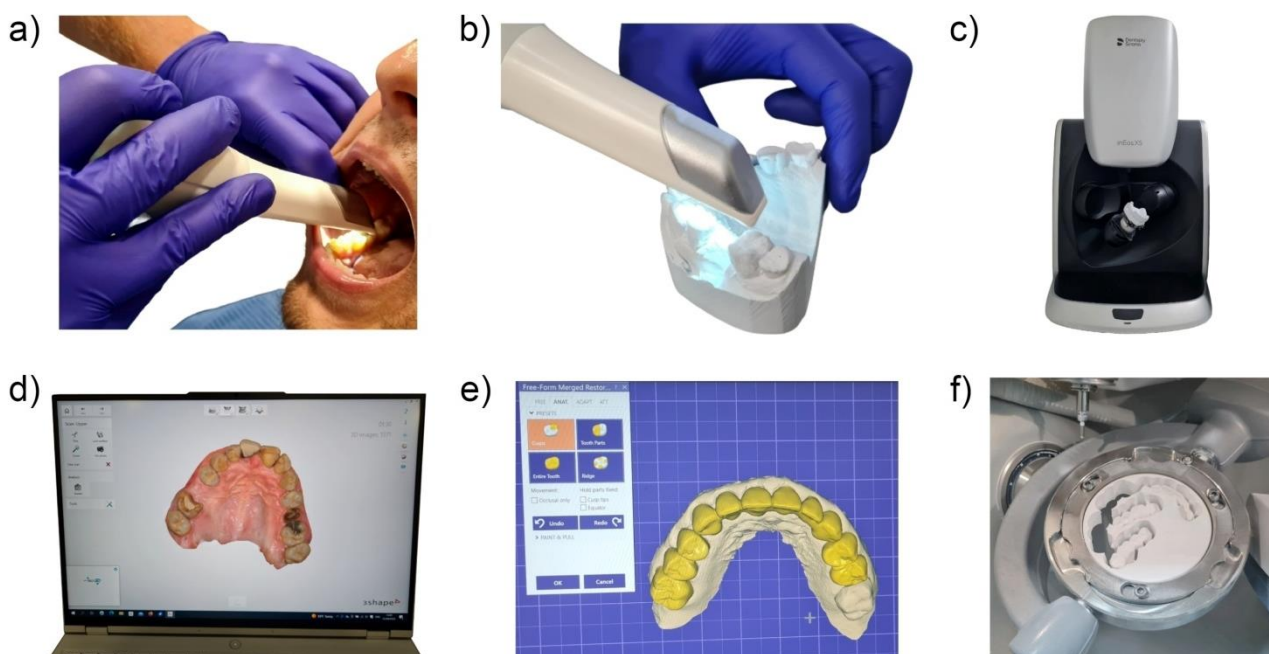
1. UVOD

1.1 Sistem mašinske obrade u izradi zubnih nadoknada

Mašinski obradivi dentalni materijali zauzimaju sve značajniju ulogu u savremenoj stomatologiji. Postupak izrade zubnih nadoknada od navedene grupe materijala podrazumeva upotrebu tehnike kompjuterski potpomognutog dizajniranja/kompjuterski potpomognute izrade (engl. *computer-aided design/computer-aided manufacturing (CAD/CAM)*).

CAD/CAM tehnologija prvobitno je razvijena 60-ih godina prošlog veka za upotrebu u automobilske i vazduhoplovne industrije, a tek dve decenije kasnije rađa se ideja za njenu primenu u medicinskom sektoru (Goodacre i sar., 2012). Prvi put u svet stomatologije zvanično je uvedena 1985. godine od strane Mörmann & Brandestinni u Nemačkoj sa ciljem brze, efikasne i jednoseansne izrade zubnih nadoknada (Mörmann, 2006) dok svoju ekspanziju i izuzetnu popularnost CAD/CAM tehnologija ostvaruje pre svega u poslednjih nekoliko godina.

Princip izrade zubnih nadoknada upotrebom sistema mašinske obrade zasniva se na digitalnom otiskivanju vilice pacijenta upotrebom intraoralnog skenera (Slika 1.1a) ili digitalnom otiskivanju prethodno izrađenog radnog modela, dobijenog na osnovu uzetog otiska vilice pacijenta na konvencionalan način upotrebom intraoralnog skenera (Slika 1.1b) ili ekstraoralnog skenera (Slika 1.1c). Na osnovu napravljenog snimka se na monitoru kompjutera dobija trodimenzionalni (3D) prikaz vilice pacijenta (Slika 1.1d) koji omogućava digitalno planiranje zubne nadoknade (Slika 1.1e). Nakon završene faze planiranja, zubna nadoknada se izrezuje iz prethodno pripremljenih blokova ili diskova mašinski obradivih materijala upotrebom tehnika glodanja (engl. *milling*), brušenja (engl. *grinding*) ili bušenja (engl. *drilling*) (Miyazaki i sar., 2009) (Slika 1.1f).



Slika 1.1. Princip izrade zubnih nadoknada sistemom mašinske obrade: (a) Digitalno otiskivanje vilice pacijenta upotrebom intraoralnog skenera. (b) Digitalno otiskivanje prethodno izrađenog radnog modela, dobijenog na osnovu uzetog otiska vilice pacijenta na konvencionalan način upotrebom intraoralnog skenera. (c) Digitalno otiskivanje prethodno izrađenog radnog modela, dobijenog na osnovu uzetog otiska vilice pacijenta na konvencionalan način upotrebom ekstraoralnog skenera. (d) Trodimenzionalni (3D) prikaz vilice pacijenta na monitoru kompjutera. (e) Digitalno planiranje zubne nadoknade. (f) Izrezivanje zubne nadoknade iz prethodno pripremljenog diska mašinski obradivog materijala.

Za potrebe primene u izradi zubnih nadoknada upotrebom CAD/CAM sistema materijali su unapred pripremljeni, na standardizovan način i u prisustvu tačno određenog visokog pritiska i temperature. Na taj način eliminisana je zavisnost od manuelnih veština koje su od značaja prilikom konvencionalnog načina izrade zubne nadoknade. To se prvenstveno odnosi na odsustvo mešanja polimernog praha i monomerne tečnosti u izradi nadoknada od dentalnih polimernih materijala, mešanja keramičkog praha i tečnosti prilikom izrade nadoknada od keramičkih sistema, kao i modelovanja u vosku ili postupaka livenja nadoknada ili delova nadoknada izrađenih od legura metala (Van Noort, 2012).

Zahvaljujući tome, omogućena je izrada zubnih nadoknada koje se odlikuju odličnim mehaničkim svojstvima, pružajući adekvatan odgovor na funkcionalne zahteve pacijenata. Brojni literaturni podaci pokazali su da CAD/CAM nadoknade poseduju veću čvrstoću (Alt i sar., 2011), veću otpornost na savijanje (Aguirre i sar., 2020) i smanjen rizik od poroznosti (Stawarczyk i sar., 2015), pri čemu ne oštećuju u većem iznosu gleđ antagonističkih zuba prilikom okluzije u poređenju s konvencionalno izrađenim nadoknadama (Stawarczyk i sar., 2013b).

Usled optimizacije procesa izrade, navedena grupa materijala poseduje i odlične biološke karakteristike. Prethodne studije na mašinski obradivim polimernim i keramičkim materijalima prikazale su nizak potencijal istih za razvoj alergijske reakcije i nisku citotoksičnost prema humanim fibroblastima čime se nameću kao rešenje u izradi dugotrajnih zubnih nadoknada (Grenade i sar., 2016).

Osim toga, nisu zanemarljive ni estetske osobine mašinski obradivih materijala. Pokazano je da ova grupa materijala poseduje izrazitu stabilnost boje i očuvanje sjaja nakon dužeg vremena prisustva u oralnoj sredini gde su nadoknade konstantno izložene dejstvu brojnih hemijskih agenasa poput onih unetih putem hrane i pića (Al-Qarni i sar., 2020).

Između ostalog, zubne nadoknade izrađene od ove vrste materijala pokazuju i izrazitu preciznost. Naime, digitalnim planiranjem omogućeno je kasnije pozicioniranje nadoknade na čvrsta ili meka tkiva usne duplje u idealnom položaju, te je između njih moguće uspostaviti harmoničan odnos što pacijentu omogućava laku adaptaciju na njeno prisustvo (Boitelle i sar., 2014).

Takođe, kao činjenica koja prevashodno favorizuje CAD/CAM sistem uzima se i nezanemarljiva ušteda vremena u radu. Zubne nadoknade izrađene na ovaj način, u zavisnosti od njihovog obima i složenosti, mogu biti izrađene u samo jednoj poseti pacijenta uz adekvatnu saradnju lekara i zubnog tehničara. Eliminirano je vreme neophodno za laboratorijske faze izrade poput izlivanja modela, modelovanja nadoknade i višesatnog livenja, hlađenja ili polimerizacije nadoknade (Kattadiyil i sar., 2015). Kao još jedan od primera može se uzeti i redukcija vremena neophodnog za dostavljanje otisaka od lekara do zubnog tehničara ukoliko zubni tehničar ne boravi u istoj prostoriji gde i lekar, zahvaljujući mogućnosti slanja digitalnog snimka vilice pacijenta putem interneta neposredno nakon skeniranja.

Upotreba sistema mašinske obrade u današnje vreme zapažena je u svim granama stomatologije. U stomatološkoj protetici se s velikim uspehom koristi u izradi fiksnih nadoknada, mobilnih nadoknada, implantatno-nošenih nadoknada i implantatnih suprastruktura (Alghazzawi, 2016).

1.2 Mašinski obradivi dentalni materijali

U mašinski obradivom obliku dostupan je niz materijala, pokrivajući širok spektar indikacija u savremenoj stomatologiji. Među najčešće korišćene ubrajaju se dentalni polimerni materijali poput kompozita na bazi smole, poli (metil metakrilata) i poli (etar etar ketona), keramički materijali poput cirkonijum-dioksidne keramike (cirkonije), kao i legure metala poput kobalt-hrom legure.

1.2.1 Mašinski obradivi kompozit na bazi smole

Kao jednog od najzastupljenih materijala u stomatologiji karakteristike kompozita na bazi smole (KBS) se iz godine u godinu značajno unapređuju. Ovaj materijal se zahvaljujući povoljnim estetskim i mehaničkim svojstvima i lakoj pristupačnosti nameće kao odlično rešenje u izradi zubnih nadoknada.

Ipak, pojedini nedostaci konvencionalno izrađenih KBS motivisali su naučnu zajednicu da u proteklim godinama posegne za usavršavanjem karakteristika ovog materijala. Među njegovim negativnim karakteristikama izdvaja se kontrakcija tj. dimenziono skupljanje materijala tokom procesa polimerizacije (očvršćavanja). Kao posledica, u samom materijalu nastaju unutrašnji naponi koji mogu dovesti do formiranja mikropukotina na površini zubne nadoknade izrađene od ovog materijala ili na spoju nadoknade i zubnog tkiva što predstavlja predisponirajuće mesto za kolonizaciju mikroorganizama (Kim EJ i sar., 2016). Takođe, nakon svetlosne polimerizacije kompozitne nadoknade pokazano je da se svega 50-70% monomera polimerizuje, ostavljajući preostale nepolimerizovane (rezidualne) monomere da isure iz nadoknade u oralnu sredinu pacijenta (Michelsen i sar., 2012).

Osim toga, nadoknade izrađene od ranijih KBS pokazivale su neadekvatne mehaničke osobine, podložnost abraziji i pucanje usled okluzalnih sila nakon određenog vremena prisustva u usnoj duplji (Krämer i sar., 2009). Kao posledica toga, ali i uticaja hemijskih agenasa iz hrane i pića brzo je dolazilo do oštećenja njihove površinske morfologije sa posledičnim negativnim uticajem na estetske karakteristike poput gubitka sjaja i apsorpcije boje i pigmenata (Ferracane, 2011).

Ekspanzija mikro- i nanotehnologije u oblasti stomatoloških materijala dovela je do razvoja modernih kompozita koji se odlikuju prisustvom čestica mikro- i nanometarske veličine. Čestice ovih dimenzija omogućile su pre svega unapređenje mehaničkih svojstava materijala poput veće čvrstoće (Mitra i sar., 2003) i pružile su mogućnost lakše procedure završne mehaničke obrade i poliranja, a time i unapređenje bioloških i estetskih karakteristika materijala (Yadav i sar., 2016).

Paralelno sa razvojem mikro- i naotehnologije, ekspanzija sistema mašinske obrade dovela je do stvaranja materijala sa značajno unapređenim karakteristikama. Zahvaljujući optimizovanom procesu polimerizacije sa minimalizovanim iznosom kontrakcije, CAD/CAM KBS pokazuje veću čvrstoću i niži stepen abrazije u poređenju sa konvencionalno izrađenim predstavnicima (Ruse i Sadoun, 2014). Međutim, uopšteno stanovište je da ovaj materijal još uvek nije dorastao mehaničkim i estetskim svojstvima drugih materijala poput predstavnika keramičkih sistema (Ling i sar., 2021).

U današnje vreme mašinski obradivi KBS se uspešno primenjuje u stomatološkoj protetici u izradi privremenih fiksnih nadoknada, a pojedini proizvođači preporučuju svoje proizvode i za izradu inleja (engl. *inlay*), onleja (engl. *onlay*), overleja (engl. *overlay*), pa čak i krunica i mostova manjeg raspona (Marchesi i sar., 2021; Miyazaki i sar., 2009).

1.2.2 Mašinski obradivi poli (metil metakrilat)

Poli (metil metakrilat) (PMMA) je u prošlosti široko istražen i definisan kao odlično rešenje u izradi zubnih nadoknada zahvaljujući pristupačnosti, niskoj ceni i jednostavnoj reparaturi nadoknada izrađenih od ovog materijala.

Uvođenjem sistema mašinske obrade karakteristike materijala značajno su poboljšane, najviše zahvaljujući činjenici da je materijal prethodno pripremljen na standardizovan način i uz strogu kontrolu uslova. Time je, kao što je ranije objašnjeno, eliminisano ručno mešanje polimernog praha i monomerne tečnosti čime se u toku rada kao rezultat oslobađa znatno manja količina rezidualnog monomera u poređenju sa konvencionalnim oblikom i stvaraju uslovi za bolje fizičke i hemijske osobine samog materijala (Steinmassl i sar., 2017).

Ipak, primena CAD/CAM PMMA je i dalje ograničena u kliničkoj praksi zahvaljujući podložnosti habanju i lomu (Rodriguez i sar., 2013) i otežanom postupku završne mehaničke obrade i poliranja što posledično dovodi do poroznosti, nemogućnosti postizanja zadovoljavajuće površinske morfologije i afinitetu ka apsorpciji vlage i pigmenta (De Oliveira Limirio i sar., 2021).

Mašinski obradivi PMMA zauzima važnu ulogu u mobilnoj stomatološkoj protetici u izradi totalnih, parcijalnih i implantatno-nošenih proteza (Goodacre i sar., 2012), kao i u fiksnoj stomatološkoj protetici u izradi privremenih zubnih nadoknada (Huettig i sar., 2016).

1.2.3 Mašinski obradivi poli (etar etar keton)

Velika potražnja pacijenata i lekara za izradom zubnih nadoknada koje u sebi ne sadrže legure metala motivisala je istraživače i firme stomatoloških materijala da razviju materijal koji predstavlja alternativu istim, istovremeno ispunjavajući zahteve sa mehaničkog i estetskog aspekta (Ruchika i sar., 2019). To je dovelo do razvoja poli (etar etar ketona) (PEEK), biokompatibilnog, sintetičkog, termoplastičnog polimera koji se decenijama koristi kao biomaterijal u ortopediji (Toth i sar., 2006) dok je popularnost u svetu stomatologije stekao u poslednjih nekoliko godina (Liebermann i sar., 2016).

Uvođenjem raznorodnih čestica punilaca u njegov osnovni sastav materijal je stekao zadovoljavajuće mehaničke karakteristike, od kojih se izdvajaju modul elastičnosti u skladu sa prirodnom kosti i nizak stepen oštećenja gleđi antagonističkih zuba (Diken Türksayar i sar., 2022). Takođe, njegova biokompatibilnost, hemijska inertnost, stabilnost pri visokim temperaturama, izuzetna otpornost na koroziju i druge biohemijske procese u oralnoj sredini, kao i nizak alergeni potencijal nameću se kao odlučujuće u izboru ovog materijala za izradu brojnih zubnih nadoknada (Jin i sar., 2019).

Međutim, i pored brojnih prednosti materijal se s mehaničkog aspekta i dalje karakteriše kao inferioran u poređenju sa keramičkim sistemima. Osim toga, zapažene su i poteškoće u postizanju optimalnih estetskih svojstava materijala zahvaljujući njegovoj biserno-beloj, neprozirnoj boji i niskoj translucenciji zbog čega je njegova primena u izradi monolitnih restauracija i dalje ograničena. Ipak, PEEK pokazuje izuzetnu vezu sa visokoestetskim materijalima poput predstavnika keramičkih sistema, te se zadovoljavajuća estetska svojstva nadoknada koje u sebi sadrže PEEK mogu postići kombinovanjem substrukture izrađene od ovog materijala koja se zatim fasetira (prekriva) keramičkim materijalom (Najeeb i sar., 2016).

Mašinski obradivi PEEK se nameće kao rešenje u implantoprotetici u izradi implantatnih suprastruktura, zahvaljujući sposobnosti odlične apsorpcije okluzalnih sila i prenošenja istih preko implantata do alveolarne kosti (Zhao X i sar., 2020). Takođe, koristi se i u izradi privremenih ili definitivnih fiksnih nadoknada u vidu pojedinačnih (solo) kruna ili mostova manjeg raspona (Stawarczyk i sar., 2013a), a nije zanemarljiva ni njegova uloga u mobilnoj protetici gde se upotrebljava u izradi totalnih i parcijalnih proteza (Costa-Palau i sar., 2014), kao i substruktura implantatno-nošenih proteza koje se zatim fasetiraju kompozitom na bazi smole ili poli (metil metakrilatom) (Jin i sar., 2019; Maló i sar., 2018).

1.2.4 Mašinski obradiva cirkonijum-dioksidna keramika (cirkonija)

Brojni keramički sistemi poput cirkonijum-dioksidne (ZrO_2) keramike (cirkonije) uvedeni su u stomatologiju kao materijali u kojima su objedinjene izvanredne mehaničke i estetske karakteristike. Konkretno, materijal koji se koristi za izradu zubnih nadoknada predstavlja itrijumom-stabilizovani tetragonalni cirkonija polikristal (engl. *yttrium-stabilized tetragonal zirconia polycrystal (Y-TZP)*).

Naime, cirkonija se u prirodi može naći u tri različita oblika (faze). Na sobnoj temperaturi javlja se nestabilna monoklinička faza. Ukoliko bi došlo do zagrevanja materijala do $1170\text{ }^{\circ}\text{C}$ došlo bi do njegove transformacije iz nestabilne monokliničke u stabilnu tetragonalnu fazu dok bi eventualnim daljim zagrevanjem do $2370\text{ }^{\circ}\text{C}$ materijal prešao iz tetragonalne u kubičnu fazu. Postupkom hlađenja materijala do sobne temperature materijal se transformiše unazad, najpre iz kubične u tetragonalnu pa iz tetragonalne u monokliničku fazu. Prilikom vraćanja u nestabilnu monokliničku fazu dolazi do povećanja zapremine materijala za oko 5%, kao i nastanka i širenja mikropukotina u njemu usled temperaturnih varijacija. Kako bi se to sprečilo, materijalu se dodaje itrijum-trioksid (Y_2O_3) čime se na sobnoj temperaturi omogućava zadržavanje materijala u stabilnoj tetragonalnoj fazi, u kojoj do pomenutih promena neće doći (Chevalier i sar., 2006; Denry i Kelly, 2008).

Ovakvo stabilno jedinjenje odlikuju izuzetne mehaničke karakteristike od kojih se izdvaja visoka čvrstoća. Međutim, zubne nadoknade od cirkonije neretko dovode do abrazije i pucanja gleđi antagonističkih zuba, kao i zubnih nadoknada u suprotnoj vilici izrađenih od drugog materijala (Passos i sar., 2014). Cirkoniju odlikuje i dobra biokompatibilnost, te je pokazana niska toplotna provodljivost i visoka otpornost na koroziju i druge hemijske procese u usnoj duplji (Manicone i sar., 2007). Zahvaljujući mlečno-belom boji, materijal je godinama važio kao neprihvatljiv za izradu zubnih nadoknada u vidljivom sektoru zbog čega je prekrivan (fasetiran) estetski prihvatljivijim keramičkim materijalom poput feldspatne keramike. Međutim, odlamanje (engl. *chipping*) sloja fasetne keramike javljalo se u sve većoj učestalosti, te poslednjih godina dolazi do ekspanzije monolitnog oblika cirkonije iz kojih se mogu izraditi zubne nadoknade adekvatnih estetskih osobina bez potrebe za kombinovanjem sa drugim materijalima (Guess i sar., 2012).

Izrada nadoknada od cirkonije podrazumeva upotrebu prethodno pripremljenih presinterovanih blokova i diskova koji su mekani i trošni i samim tim pogodni za manipulaciju nakon čega svoj definitivni oblik i čvrstoću dobijaju procesom sinterovanja. Retko se koriste već sinterovani (očvrslili) diskovi čija bi obrada bila teška uz potencijalno izazivanje ponovne transformacije materijala iz tetragonalne u monokliničku fazu i nastanak mikropukotina i drugih defekata u njemu (Al-Amleh i sar., 2010).

Mašinski obradiva cirkonija upotrebljava se u stomatološkoj protetici u izradi fiksnih nadoknada, substruktura implantatno-nošenih mobilnih i fiksnih nadoknada, implantatnih suprastruktura, pa čak i samih implantata (Limmer i sar., 2014).

1.2.5 Mašinski obradiva kobalt-hrom legura

Značajno povećanje cene zlata 70-ih godina prošlog veka podstaklo je razvoj alternativnih, baznih legura metala poput kobalt-hrom (CoCr) legure (Niinomi, 2008). Uvođenjem sistema mašinske obrade karakteristike CoCr legure su optimizovane, a materijal, slično poput drugih legura metala, pokazuje visok modul elastičnosti koji mu obezbeđuje potrebnu čvrstoću u tankom sloju. Na ovaj način omogućena je izrada zubnih nadoknada adekvatnih mehaničkih osobina bez potrebe za povećanjem njenih dimenzija i težine što je od enormnog značaja kada je ograničen prostor za izradu iste (Delucchi i sar., 2021).

Osim prednosti s mehaničkog aspekta, CoCr legura pokazuje i dobre biološke osobine, te je pokazano skoro potpuno odsustvo razvoja alergijske reakcije na njeno prisustvo čime je potisnuta upotreba alergene nikl-hrom (NiCr) legure iz stomatologije (Al Jabbari i sar., 2014). Međutim, iako u poređenju sa konvencionalno izrađenim materijalom CAD/CAM CoCr legura poseduje manju sklonost ka biohemijskim procesima u oralnoj sredini, prisustvo galvanske korozije zubne nadoknade izrađene od ovog materijala i posledično oslobađanje jona metala u usnu duplju i dalje postoji (Bechir i sar., 2021). Ova pojava, zajedno sa drugim nedostacima poput poteškoće u postupcima završne mehaničke obrade i poliranja i dalje karakteriše CoCr leguru kao manje poželjnu u poređenju sa plemenitim legurama metala (Cevik i sar., 2022).

Mašinski obradiva CoCr legura u današnje vreme predstavlja odličan izbor u izradi metalo-keramičkih fiksnih zubnih nadoknada, delova dvostrukih kruna i substrukture implantatno-nošenih mobilnih nadoknada koje se zatim fasetiraju kompozitom na bazi smole, poli (metil metakrilatom) ili keramičkim materijalom (Barazanchi i sar., 2020; Kalra i sar., 2015; Kamada i sar., 2017).

1.3 Formiranje oralnog biofilma na površini zubne nadoknade

Uprkos brojnim prednostima u poređenju sa konvencionalno izrađenim materijalima, nijedan od pomenutih mašinski obradivih dentalnih materijala primenjen u oralnoj sredini nije pošteđen adhezije mikroorganizama na svojoj površini.

U dinamičnom okruženju usne duplje adekvatna temperatura, visoka vlažnost i obilje hranljivih materija doprinose formiranju složene organizovane mikrobne zajednice, poznate kao oralni biofilm (Dewhirst i sar., 2010). S obzirom da su mikroorganizmi skloni akumulaciji kako na površinama mekih i čvrstih tkiva usne duplje, tako i na površini zubne nadoknade, neosporna je činjenica da je otpornost materijala za izradu zubne nadoknade na adheziju mikroorganizama od izuzetnog značaja za njenu dugotrajnost i očuvanje oralnog i opšteg zdravlja.

U fiziološkim uslovima, prisustvo raznovrsnih mikroorganizama u oralnom biofilmu formira harmoničan odnos sa tkivima domaćina i površinom zubne nadoknade ograničavajući rast patogenih sojeva. Međutim, poremećaj ove ravnoteže može dovesti do prelaska iz fiziološkog u patološko stanje, biorazgradnje materijala, narušavanja integriteta zubne nadoknade i olakšavanja razvoja oralnih bolesti (Kumar i Mason, 2015).

Prisustvo oralnog biofilma predstavlja nedvosmisleno presudan etiološki faktor u etiopatogenezi infekcija usne duplje. Njegovo formiranje na površini zubne nadoknade predstavlja proces koji se odvija u nekoliko faza (Slika 1.2).

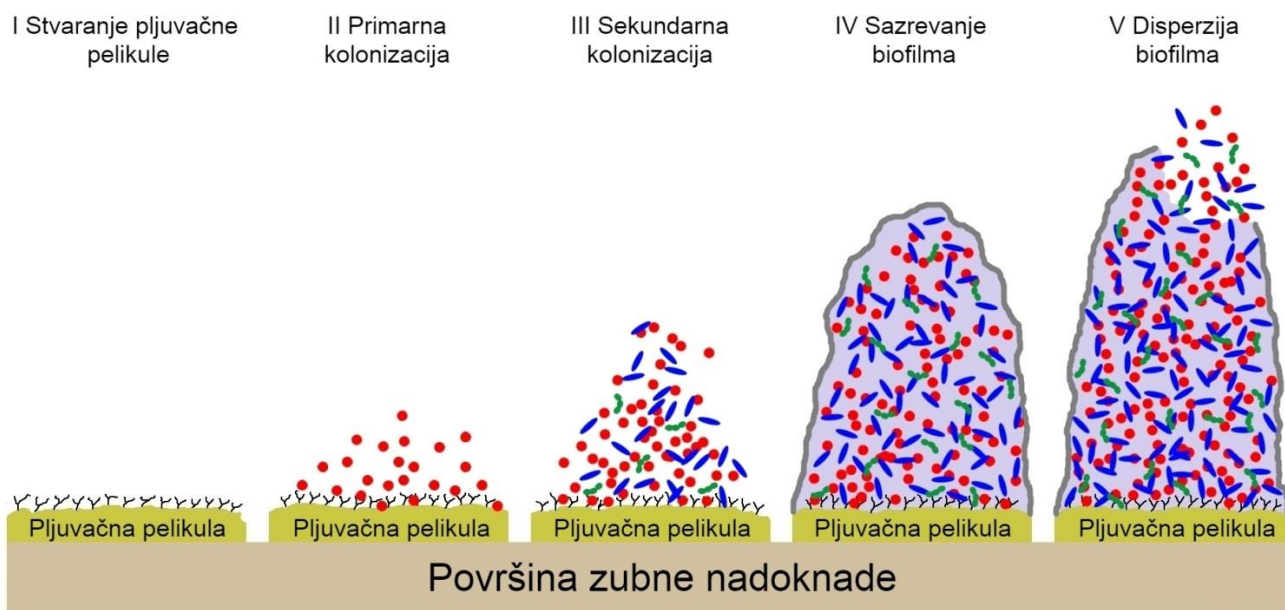
Prva faza podrazumeva stvaranje pljuvačne pelikule. Naime, neposredno nakon unošenja zubne nadoknade u usnu duplju njena površina biva prekrivena pljuvačnom pelikulom. Pljuvačnu pelikulu čini sloj organskih molekula poreklom iz pljuvačke poput glikoproteina, enzima i lipida koji predstavljaju receptorska mesta za koje će se adherirati primarni kolonizatori (Marsh i sar., 2016).

Nedugo zatim započinje primarna kolonizacija mikroorganizama za površinu zubne nadoknade obloženu pljuvačnom pelikulom. U ovu grupu mikroorganizama svrstavaju se Gram-pozitivne bakterije poput predstavnika roda *Streptococcus*, kao što su *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* i *Streptococcus gordonii* i predstavnika roda *Actinomyces*, kao što su *Actinomyces viscosus* i *Actinomyces naeslundii*. Pomenute bakterije pokazuju izuzetan afinitet ka pojedinim molekulima u sastavu pljuvačne pelikule među kojima se izdvajaju prolinom bogati proteini, α - amilaza i sijalična kiselina (Fiorillo, 2020; Foster i Kolenbrander, 2004). U početku, veza primarnih kolonizatora sa ovim molekulima zasniva se na slabim, vodoničnim, hidrofobnim, van der Valsovim, kiselo-baznim ili elektrostatičkim interakcijama. Međutim, kako vreme odmiče veza mikroorganizama za receptorska mesta pljuvačne pelikule, kao i međusobna veza između samih mikroorganizama postaje sve jača (Hannig C i Hannig M, 2009).

Nakon formiranja inicijalnog biofilma na površini zubne nadoknade, ukoliko ne dođe do njegovog mehaničkog uklanjanja pravilnim sprovođenjem oralne higijene dolazi do razvoja i umnožavanja prethodno adheriranih primarnih kolonizatora i istovremene adhezije novih, sekundarnih kolonizatora. Sekundarni kolonizatori predstavljaju mikroorganizme koji poseduju sposobnost vezivanja za polisaharide ili proteine na površinama primarnih kolonizatora što je poznato kao mikrobiološka koagregacija (Kolenbrander i sar., 2010). Prethodne studije pokazale su da postoji najmanje 18 rodova mikroorganizama iz usne duplje koji mogu biti okarakterisani kao sekundarni kolonizatori pokazujući neki oblik koagregacije. Od predstavnika se mogu izdvojiti rodovi *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Tannerella* i *Aggregatibacter* (Foster i Kolenbrander, 2004; Kolenbrander i sar., 2002).

U četvrtoj fazi dolazi do sazrevanja biofilma. Naime, mikroorganizmi u oralnom biofilmu luče pojedine produkte čime stvaraju ekstracelularni matriks, heterogenu strukturu u kojoj su prisutni idealni uslovi za razvoj, razmnožavanje i dalju međusobnu koagregaciju mikroorganizama (Wang i sar., 2014). U ovoj fazi mikroorganizmi unutar biofilma ne funkcionišu više kao nezavisni entiteti već kao koordinisana, dobro organizovana, metabolički aktivna zajednica. Osim toga, izuzev količine menja se i sastav mikroorganizama u samom biofilmu pa je u prethodnim studijama pokazano da u zrelom biofilmu preovlađuju uglavnom Gram-negativne bakterije (Valen i Scheie, 2018).

U poslednjoj fazi formiranja biofilma javlja se fenomen disperzije biofilma. Naime, u nedostatku hranljivih materija na mestu formiranja oralnog biofilma na površini zubne nadoknade određen broj mikroorganizama prinuđen je da napusti biofilm u potrazi za novim mestom u usnoj duplji. Svemu tome doprinosi i spirajući efekat pljuvačke što posledično ograničava nekontrolisano povećanje volumena oralnog biofilma (Kaplan, 2010).



Slika 1.2. Faze formiranja oralnog biofilma na površini zubne nadoknade.

1.4 Infekcije usne duplje izazvane mikroorganizmima oralnog biofilma

1.4.1 Karijes

Karijes predstavlja lokalizovanu, ireverzibilnu destrukciju tvrdih zubnih tkiva i smatra se najčešće zastupljenim oboljenjem u stomatologiji i primarnim uzrokom gubitka zuba tokom života. U zavisnosti od stepena destrukcije bolest može biti okarakterisana prisustvom plitkih ili dubokih lezija, beličastih promena na površini gleđi ili širokih, braon ili crnih polja razmekšale gleđi i dentina, kao i odsustvom ili prisustvom bola na nadražaje različitog intenziteta (Pitts i sar., 2017).

Iako se smatra multifaktorijalnom bolešću, kao glavni etiološki faktor uzima se prisustvo supragingivalnog biofilma na površinama tvrdih zubnih tkiva u kom dominiraju uglavnom aerobne ili fakultativno-anaerobne Gram-pozitivne bakterije. Od kariogenih bakterija kao predstavnici se izdvajaju pripadnici roda *Streptococcus*, kao što su *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus*, kao i bakterije roda *Lactobacillus*, poput *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus paracasei* (Loesche, 1986; Marsh, 2010). Kariogene bakterije u oralnom biofilmu poseduju sposobnost fermentacije ugljenih hidrata unetih putem hrane i pića čime se kao proizvod njihovog metabolizma luče razne organske kiseline. Te kiseline zatim utiču na snižavanje lokalne pH vrednosti u oralnoj sredini ispod granične vrednosti pri kojoj dolazi do nastanka procesa demineralizacije i destrukcije tvrdih zubnih tkiva (Featherstone, 2000).

Izuzev nastanka karijesa na intaktnim zubnim tkivima, od velike je važnosti i dobra kontrola stvaranja sekundarnog (rekurentnog) karijesa. Sekundarni karijes predstavlja karijes koji se razvija na zubnim tkivima na kojima je prethodno izrađena zubna nadoknada. S obzirom da je najčešće u vezi sa neadekvatno izrađenom zubnom nadoknadom ili nadoknadom sačinjenom od materijala sa visokim afinitetom ka adheziji kariogenih bakterija, od ključnog značaja je poznavanje prirode korišćenog dentalnog materijala sa mikrobiološkog aspekta.

1.4.2 Infekcije parodontalnih i peri-implantatnih tkiva

Pored karijesa, najvažnija i najzastupljenija oboljenja u usnoj duplji predstavljaju infekcije parodontalnih tkiva, kao što su gingivitis i parodontitis i infekcije peri-implantatnih tkiva poput peri-implantatnog mukozitisa i peri-implantitisa.

Gingivitis predstavlja lokalizovano, reverzibilno, inflamatorno oboljenje gingive koje karakteriše prisustvo nekoliko, najčešće bezbolnih, simptoma poput otoka gingive, crvenila i prisustva krvarenja gingive na blagu provokaciju. Uslovljen je prisustvom mikroorganizama u gingivalnom sulkusu čijom akumulacijom dolazi do formiranja subgingivalnog biofilma. Zahvaljujući reverzibilnom karakteru, ukoliko se adekvatno sprovedu mere oralne higijene gingivitis se može izlečiti čime se sprečava dalje napredovanje bolesti (Murakami i sar., 2018).

Ukoliko ne dođe do uklanjanja biofilma iz gingivalnog sulkusa sledi širenje infekcije u druga tkiva parodonticijuma kao što su periodoncijum, cement i alveolarna kost i sledstvenog razvoja parodontitisa. Parodontitis se pored znakova inflamacije gingive odlikuje i prisustvom parodontalnih džepova čija dubina zavisi od stadijuma bolesti i obima resorpcije alveolarne kosti. Osim prisustva parodontalnih džepova, bolest može pratiti i labavljenje zuba u određenom stepenu, kao i eventualna pojava gnojnog eksudata često praćena neprijatnim zadahom. Parodontitis je ireverzibilnog karaktera, te se uspostavljanjem adekvatne oralne higijene ne mogu povratiti izgubljena parodontalna tkiva pa je ponekad u terapiji neophodna i primena hirurških procedura (Tonetti i sar., 2018).

Oko ugrađenih implantata se takođe može javiti infekcija mekih i čvrstih tkiva koja ga okružuju. Slično poput oboljenja parodontalnih tkiva oko prirodnih zuba razlikuju se dve vrste infekcije, poznate kao peri-implantatni mukozitis i peri-implantitis. Peri-implantatni mukozitis predstavlja inflamatorno oboljenje mekih tkiva oko ugrađenog implantata koje nalik na gingivitis oko prirodnih zuba karakterišu simptomi poput otoka sluzokože, crvenila i prisustva krvarenja sluzokože na blagu provokaciju (Mombelli i sar., 2012).

Takođe, ukoliko se peri-implantatni mukozitis ne izleči, bolest može napredovati u peri-implantitis, bolest koja se odlikuje prisustvom inflamacije kako u mekim tkivima, tako i u alveolarnoj kosti oko ugrađenog implantata. U uznapredovalim stadijumima bolesti može doći i do gubitka ugrađenog implantata, te se peri-implantitis može smatrati i ekvivalentnim parodontitisu oko prirodnih zuba (Lafaurie i sar., 2017).

Razvoj subgingivalnog biofilma može takođe poteći i od prethodne kolonizacije mikroorganizama na površini zubne nadoknade. Iz ovog razloga je u cilju razumevanja, sprečavanja i kontrole infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva od vitalnog značaja poznavanje karakteristika materijala za izradu zubnih nadoknada i ugrađenih implantata s aspekta njihove prijemčivosti ka kolonizaciji mikroorganizama. Izuzev toga, u cilju prevencije infekcija peri-implantatnih tkiva od izuzetne važnosti je i formiranje izlaznog profila zubne nadoknade izrađene na implantatu čiji bi dizajn trebalo da onemogući zadržavanje mikroorganizama i akumulaciju biofilma u subgingivalnom regionu kojem je teško pristupiti prilikom sprovođenja oralne higijene (Ahn i sar., 2019).

Brojni literaturni podaci pokazali su da infekcije parodontalnih i peri-implantatnih tkiva poseduju zajedničke etiološke faktore i faktore rizika za nastanak dok su rezultati pojedinih studija demonstrirali visok rizik nastanka infekcija peri-implantatnih tkiva kod prethodno parodontalno kompromitovanih pacijenata čime ukazuju na dodatan oprez prilikom planiranja implantološke terapije u takvim slučajevima (Baelum i Ellegaard, 2004; Olmedo-Gaya i sar., 2016).

Glavni etiološki faktor predstavljaju mikroorganizmi oralnog biofilma koji u skladu s prisustvom određenih faktora rizika i pod određenim uslovima iniciraju nastanak ovih bolesti. Za razliku od etiologije karijesa gde je uzrok bolesti supragingivalni plak sačinjen od uglavnom aerobnih ili fakultativno-anaerobnih Gram-pozitivnih bakterija, u etiologiji infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva glavnu ulogu igra prisustvo subgingivalnog biofilma akumuliranog u gingivalnim sulkusima, parodontalnim džepovima ili peri-implantatnim prostorima. Brojna istraživanja još iz prošlog veka pokazala su da više od 800 različitih vrsta mikroorganizama može biti prisutno u subgingivalnom plaku sa dominacijom fakultativno- ili striktno-anaerobnih Gram-negativnih bakterija, a u manjem procentu i spiroheta, pa čak i virusa (Listgarten, 1976; Listgarten, 1994).

Ipak, konkretnu klasifikaciju bakterija izazivača infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva pružio je Socransky (Socransky i Haffajee, 2005) koji je bakterije u odnosu na osobine, faktore virulencije koje poseduju i prema prisustvu u parodontalnim džepovima svrstao u različite komplekse označene bojama (Slika 1.3).

Bakterije subgingivalnog biofilma koje pripadaju žutom kompleksu poseduju slabiji patogeni potencijal. Međutim, ove bakterije su odgovorne za inicijalnu kolonizaciju površina tkiva, a budući da je razumevanje njihove interakcije sa tkivom domaćina ili površinom zuba i/ili zubne nadoknade od krucijalnog značaja za kontrolu razvoja biofilma i stopu preživljavanja zubnih nadoknada, poznavanje pripadnika ovog kompleksa je od velike važnosti (Hao i sar., 2018). Iz žutog kompleksa se mogu izdvojiti predstavnici roda *Streptococcus*, kao što su *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* i *Streptococcus gordonii*.

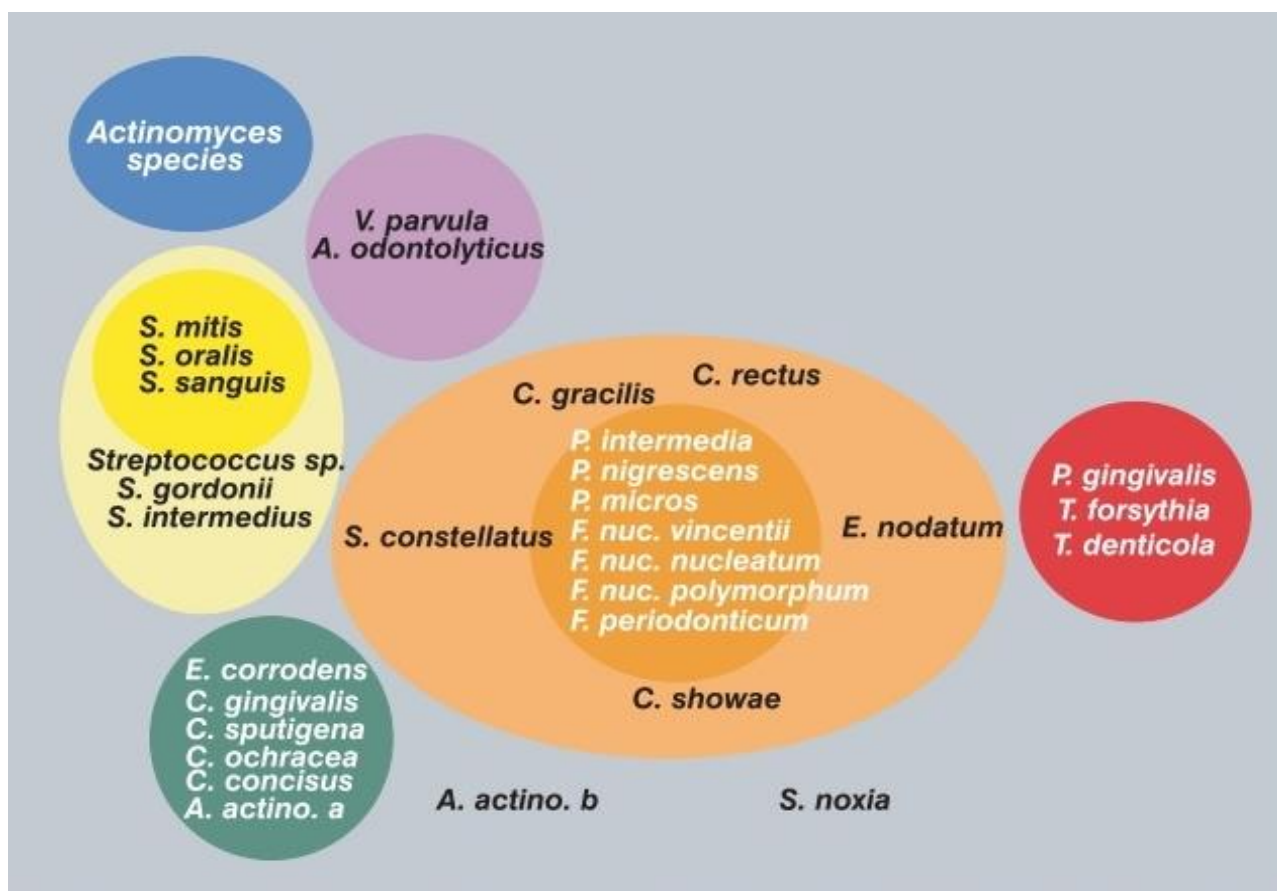
Pomenute bakterije žutog kompleksa, ali i druge Gram-pozitivne fakultativno-anaerobne bakterije poput predstavnika plavog kompleksa, kao što je *Actinomyces naeslundii*, odgovorne su za direktnu inicijalnu adheziju za parodontalna i peri-implantatna tkiva, kao i površinu zubne nadoknade prekrivenu pljuvačnom pelikulom. Obezbeđujući prvi kontakt, stvaraju poželjne uslove za adheziju drugih patogenih sojeva, te nedugo zatim dolazi do sekundarne kolonizacije, mikrobne koagregacije i sazrevanja biofilma (Kolenbrander i sar., 2010; Palmer i sar., 2007).

Bakterije ljubičastog kompleksa poput *Veillonella parvula*, kao i zelenog kompleksa poput *Eikenella corrodens* i pripadnika roda *Capnocytophaga* takođe zauzimaju važnu ulogu u subgingivalnom plaku uzrokujući nastanak infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva. Posebno se izdvaja *V. parvula*, Gram-negativna striktno-anaerobna bakterija koja učestvuje u formiranju biofilma u ulozi sekundarnog kolonizatora. Ova bakterija poseduje sposobnost adhezije za prethodno prisutne primarne kolonizatore od kojih se posebno izdvaja njihova brza i laka koagregacija sa prisutnim streptokokama poput *Strep. oralis* (Whittaker i sar., 1996).

Među pripadnicima narandžastog kompleksa izdvajaju se Gram-negativne striktno-anaerobne bakterije poput *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* i *Eubacterium nodatum*. *F. nucleatum* ispoljava možda i najvažniju ulogu u formiranju subgingivalnog biofilma i patogenezi infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva, služeći kao most za povezivanje primarnih kolonizatora, kao što su predstavnici roda *Streptococcus* sa sekundarnim kolonizatorima, kao što je *Porphyromonas gingivalis* (Kolenbrander i sar., 2002). Epitet organizatora biofilma ova bakterija duguje svom izduženom obliku koji joj pruža mogućnost lake komunikacije sa drugim mikroorganizmima (Brennan i Garrett, 2019). Takođe, *F. nucleatum* poseduje sposobnost lučenja brojnih adhezina, molekula koji obezbeđuju direktnu vezu sa sličnim molekulima na površini druge bakterije. Među njima se izdvaja RadD adhezin, poznat po direktnoj vezi za SpaP adhezinom *Strep. mutans* čime se ostvaruje direktna čvrsta veza ove dve bakterije u biofilmu (Guo i sar., 2017).

Osim toga, za razliku od drugih bakterija poput predstavnika rodova *Prevotella*, *Veillonella* ili *Capnocytophaga* koje unutar biofilma imaju sposobnost koagregacije isključivo za pripadnike sojeva *Streptococcus* ili *Actinomyces*, *F. nucleatum* pokazuje afinitet ka svim drugim oralnim bakterijama, kao i gljivicama poput *Candida albicans* (Wu i sar., 2015). Pored uloge mosta u povezivanju bakterija unutar biofilma, *F. nucleatum* poseduje i sinergističko dejstvo sa drugim bakterijama od kojih se posebno izdvaja njegova funkcija u pojačavanju invazivnog potencijala *P. gingivalis* (Metzger i sar., 2009).

Bakterije crvenog kompleksa opisane su kao vrste koje pokazuju najveći patogeni potencijal u nastanku infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva zahvaljujući prisustvu ovih bakterija u velikom broju u dubokim parodontalnim džepovima (Kamma i sar., 1995; Kigure i sar., 1995). U članove ove grupe ubrajaju se Gram-negativne striktno-anaerobne bakterije poput *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia*. Ove tri bakterije direktno su zavisne jedna od druge zahvaljujući činjenici da svaka od njih luči određene faktore rasta koji stimulišu rast i razvoj druge dve. S tim u vezi, prethodna istraživanja demonstrirala su jako sinergističko dejstvo između *P. gingivalis* i *T. denticola* (Grenier, 1992; Nilius i sar., 1993), kao i to da je bakterija *P. gingivalis* skoro uvek prisutna u parodontalnim džepovima u kojima je već uočena prethodna kolonizacija *T. forsythia* (Gmür i sar., 1989). Od pomenutih bakterija izdvaja se *P. gingivalis*, kasni kolonizator koji pokazuje sposobnost lučenja velikog broja faktora virulencije zbog čega se smatra glavnim etiološkim agensom u nastanku teškog oblika hroničnog parodontitisa (How i sar., 2016). Takođe, pojava ove bakterije u tkivima oko ugrađenog implantata dovodi do ubrzanog nastanka inflamacije u okolnoj alveolarnoj kosti i posledične inhibicije oseointegracije ugrađenog implantata što predstavlja glavni razlog nastanka peri-implantitisa i neuspeha implantološke terapije (Größner-Schreiber i sar., 2009).



Slika 1.3. Klasifikacija mikroorganizama izazivača infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva (Preuzeto iz Socransky i Haffajee, 2005).

1.4.3 Infekcije sluzokože usne duplje izazvane prisustvom mobilne zubne nadoknade

Izuzev prethodno opisanih bolesti, sa aspekta stomatologije od krucijalnog značaja je i razumevanje infekcija sluzokože usne duplje izazvanih prisustvom mobilne zubne nadoknade. Pod ovim pojmom podrazumeva se najčešće protezni stomatitis koji se javlja kod čak dve trećine nosilaca mobilnih zubnih nadoknada (Sadig, 2010). Bolest karakteriše inflamacija delova oralne sluzokože koji su u kontaktu sa bazom proteze dok se od simptoma najčešće javljaju crvenilo i blagi otok uz retku pojavu svraba i peckanja sluzokože (Wilson, 1998).

Iako je, slično poput karijesa i infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva više činilaca uključeno u etiopatogenezu ove bolesti, smatra se da je prisustvo gljivične vrste *Candida albicans* kojoj doprinosi neadekvatno čišćenje proteze uz njeno kontinuirano nošenje presudno za nastanak proteznog stomatitisa (Gendreau i Loewy, 2011).

U fiziološkim uslovima, *C. albicans* predstavlja sastavni deo oralne flore dok njeno prisustvo u usnoj duplji za razliku od brojnih drugih mikroorganizama ne zavisi od prisustva zuba što je od izuzetne važnosti za bezube pacijente (Yigit i sar., 2011). Međutim, u patološkim uslovima i stanju imunosupresije dolazi do ubrzanog razmnožavanja ove gljivice i njenog oportunističkog dejstva koje podrazumeva da je *C. albicans* u velikoj meri povezana i sa drugim infekcijama usne duplje, kao što su hronični parodontitis (Suresh Unniachan i sar., 2020) i peri-implantitis (Arabiah i sar., 2019).

Takođe, *C. albicans* se s lakoćom akumulira na površini mobilne zubne nadoknade, te usled konstantne ekspozicije nadoknade sluzokoži usne duplje jednostavno može inicirati njenu inflamaciju (Kumamoto i Vines, 2005). Iz tog razloga, pored adekvatnog čišćenja proteze od izuzetne važnosti je i razumevanje materijala od kojeg je izrađena, pogotovo s aspekta afiniteta njegove površine ka kolonizaciji pomenute gljivične vrste.

1.5 Faktori koji utiču na formiranje oralnog biofilma na površini zubne nadoknade

1.5.1 Uticaj površinske hrapavosti materijala za izradu zubne nadoknade

Na formiranje biofilma na površini zubne nadoknade u usnoj duplji utiče niz faktora. Kao najvažniji izdvaja se hrapavost površine materijala od kojeg je nadoknada izrađena.

Naime, primarna kolonizacija mikroorganizama započinje na nepravilnostima morfologije površine zubne nadoknade koje se mogu kretati od sitnih pukotina do krupnih obimnih defekata vidljivih golim okom poput rascepa i žlebova (Teughels i sar., 2006). Pomenute neravnine dovode do povećanja ukupne površine zubne nadoknade koja je na raspolaganju mikroorganizmima za kolonizaciju. Takođe, nepravilnosti površine pružaju idealne uslove za njihov rast i razvoj, uzimajući u obzir da su mikroorganizmi unutar tih nesavršenosti sakriveni i samim tim zaštićeni od hidrodinamičkih procesa ispiranja i čišćenja prilikom sprovođenja oralne higijene.

U ovom stadijumu veza mikroorganizama i površine zubne nadoknade prekrivene pljuvačnom pelikulom je slabog reverzibilnog karaktera, te ju je moguće prekinuti adekvatno sprovedenom oralnom higijenom. Međutim, usled nepristupačnosti tim mestima najčešće je to teško izvesti, pa je samim tim mikroorganizmima omogućen neometan razvoj i učvršćivanje veze sa površinom zubne nadoknade obezbeđujući sekundarnim kolonizatorima uslove za koagregaciju i kasnije sazrevanje biofilma (Quirynen i Bollen, 1995).

1.5.2 Uticaj kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i površinske slobodne energije materijala za izradu zubne nadoknade

Drugi važan faktor koji utiče na adheziju mikroorganizama na površini zubne nadoknade predstavljaju kontaktni ugao (ugao kvašenja) i površinska slobodna energija (engl. *surface free energy (SFE)*) materijala od kojeg je nadoknada izrađena.

Kontaktni ugao (ugao kvašenja) materijala predstavlja ugao izmeren između kapi određene tečnosti i površine materijala neposredno nakon njihovog dodira. Površine materijala sa vrednostima kontaktnih uglova različitih tečnosti nižim od 90° pokazuju povišene vrednosti SFE, te se mogu okarakterisati kao hidrofilne (sa većim kvašenjem) dok površine sa izmerenim kontaktnim uglovima višim od 90° ukazuju na niže vrednosti SFE i hidrofobni karakter (sa manjim kvašenjem) (Law, 2014).

U prethodnim studijama na konvencionalno izrađenim dentalnim materijalima pokazano je da su s mikrobiološkog aspekta kontaktni ugao i SFE materijala od podjednakog značaja kao i hrapavost njegove površine (De-la-Pinta i sar., 2019). Međutim, mišljenja na koji način utiču na adheziju mikroorganizama na površini materijala su podeljena.

Rezultati brojnih istraživanja demonstrirali su da hidrofilni materijali sa povišenim vrednostima SFE imaju veću sklonost ka kolonizaciji bakterija na svojoj površini (Hao i sar., 2018; Teughels i sar., 2006), suprotno od druge grupe autora koja tvrdi da materijali sa hidrofobnim svojstvom površine i nižim vrednostima SFE omogućavaju bolje uslove za adheziju mikroorganizama iz usne duplje (Song i sar., 2015). Treća grupa autora, ipak, konstatuje da su površine sa umereno hidrofilnim ili hidrofobnim ponašanjem sposobnije da vežu bakterije u poređenju sa ekstremno hidrofobnim ili hidrofilnim površinama (Sterzenbach i sar., 2020; Zhang X i sar., 2013).

1.5.3 Uticaj hemijskog sastava materijala za izradu zubne nadoknade

Opšte prihvaćena tvrdnja je da je postupak završne mehaničke obrade i poliranja od presudnog značaja prilikom postizanja glatke i sjajne topografije površine materijala. Međutim, čak i savršeno ispolirani materijali takođe mogu ispoljiti nepravilnosti u površinskoj morfologiji čime su skloni većem prisustvu mikroorganizama na svojoj površini.

Kao glavni razlog za pomenutu tvrdnju uzima se indirektan ili direktan uticaj komponenti hemijskog sastava materijala na adheziju mikroorganizama na njegovoj površini. Indirektan uticaj predstavlja činjenicu da se stomatološki materijali, pogotovo dentalni polimeri, sastoje od brojnih sastojaka poput različitih vrsta organskog matriksa i dodatih neorganskih punila u vidu smole, keramičkih čestica, fluora ili metalnih jona. Oni zatim, kombinovani u različitim procentima, stvaraju manje ili više heterogenu površinu materijala koju je izuzetno teško potpuno zaravniti i uglačati prilikom postupaka završne mehaničke obrade i poliranja (Ozel i sar., 2017; Sarac i sar. 2006).

Pod direktnim uticajem podrazumevaju se uslovi oralne sredine u kojoj se u prisustvu pljuvačke adhezija mikroorganizama zasniva na fizičko-hemijskim interakcijama između mikroorganizma i površine zubne nadoknade, kao i da svaki sastojak materijala od kojeg je nadoknada izrađena može na neki način favorizovati ili inhibirati formiranje oralnog biofilma na njenoj površini (Cazzaniga i sar., 2017; Souza i sar., 2016).

Kao jedan od primera opisuje se se tzv. fenomen začaranog kruga. Naime, karakteristike pojedinih komponenti materijala za izradu zubne nadoknade, kao što su kompoziti na bazi smole, mogu doprineti adheziji mikroorganizama. Potom, sazrevanjem biofilma produkti bakterija biofilma poput enzima esteraza prodiru u strukturu kompozitnog materijala i utiču na razgradnju njegovih delova, te između ostalog dovode i do promena karakteristika površine materijala i favorizovanja dodatne akumulacije mikroorganizama na istim (Delaviz i sar., 2014).

Takođe, legure metala pokazuju afinitet ka pojedinim bakterijama poput predstavnika roda *Streptococcus* koji poseduju sposobnost lučenja kiselih supstanci, kao što su sulfidi i amonijak. Pomenuti produkti njihovog metabolizma zatim doprinose snižavanju pH vrednosti u usnoj duplji što izaziva koroziju legure metala i oslobađanje oksida sa površine metalne zubne nadoknade u usnu duplju. Kao posledica toga, izuzev ugrožavanja oralnog i opšteg zdravlja dolazi i do oštećenja površine same nadoknade sa posledičnom povećanom akumulacijom mikroorganizama (Lu i sar., 2017; Zhang S i sar., 2016).

Osim toga, kao što je ranije naglašeno, važan uticaj na hemijski sastav materijala i samim tim na karakteristike njegove površine i prijemčivost ka mikroorganizmima ispoljava i način pripreme materijala. Poređenjem konvencionalno izrađenih i mašinski obradivih materijala pokazano je da je uvođenje sistema mašinske obrade omogućilo izradu nadoknada čije su površine homogenije, manje porozne i posledično manje podložne adheziji mikroorganizama (Al-Fouzan i sar., 2017, Bidra i sar., 2013).

1.5.4 Uticaj površinske slobodne energije mikroorganizama

Osim površinske slobodne energije materijala za izradu zubne nadoknade, u pogledu njenog afiniteta ka adheziji mikroorganizama od izuzetne važnosti je i navedena karakteristika površine samog mikroorganizma.

Opšte je poznato da mikroorganizmi sa hidrofilnim površinama preferiraju površine zubnih nadoknada sa hidrofilnim karakterom dok oni sa hidrofobnim svojstvima površine pokazuju veću sklonost ka adheziji na hidrofobnim površinama zubnih nadoknada. Dakle, što su međusobno približnije vrednosti površinskih slobodnih energija materijala i mikroorganizma, veća je verovatnoća njihovog spoja (An i Friedman, 1998).

Kao razlog se ovu konstataciju pojedini autori navode činjenicu da ukoliko je površina materijala hidrofilna, na njoj će se lakše zadržavati sloj tečnosti čime je posledično otežan direktan kontakt između te površine i mikroorganizma sa hidrofobnim karakterom površine (Dal Piva i sar., 2018).

1.5.5 Uticaj prisustva pljuvačke

Kada se testira sklonost zubne nadoknade ka adheziji mikroorganizama bez prisustva pljuvačke, karakteristike površine materijala u njenom sastavu nedvosmisleno poseduju najveći uticaj u tom procesu. Međutim, u dinamičkom okruženju usne duplje prisustvo pljuvačke ispoljava jednaku, ako ne i važniju ulogu u formiranju biofilma na površini zubne nadoknade.

Uticaj pljuvačke može biti dvojak. S jedne strane, kao što je ranije objašnjeno, pojedini organski molekuli u sastavu prethodno formirane pljuvačne pelikule na površini zubne nadoknade ispoljavaju receptorsku ulogu u adheziji mikroorganizama čime favorizuju nastanak oralnog biofilma.

Međutim, pljuvačka poseduje i odbrambenu ulogu. Rezultati prethodnih studija demonstrirali su uticaj lizozima, specifičnih enzima pljuvačke, u razlaganju ćelijskog zida bakterija, kao i ulogu laktoferina, glikoproteina u njenom sastavu, koji poseduje sposobnost vezivanja jona Fe u usnoj duplji oduzimajući ga mikroorganizama za čiji je rast esencijalan (Dawes i sar., 2015). Dalje, specifični pozitivno naelektrisani peptidi u sastavu pljuvačke, kao što su defenzini, histatini i staterini, poseduju sposobnost direktne veze za negativno naelektrisanu površinu membrane mikroorganizma formirajući pore na istoj čime dovode do fatalnog izlaska vitalnih sastojaka iz ćelije mikroorganizma (Mochon i Liu, 2008). Osim toga, pokazano je da pljuvačka poseduje i sposobnost menjanja nanotopografije površine materijala čime do određene mere može popuniti nepravilnosti površine poput mikropukotina i žlebova, te indirektno dovesti i do smanjenja zadržavanja mikroorganizama (Hannig i Hannig, 2009). Takođe, dobro je poznato i spirajuće dejstvo pljuvačke u eliminaciji biofilma sa površine zubne nadoknade. Međutim, ova uloga nije efikasna ukoliko se površina odlikuje izuzetnim nepravilnostima u kojima su mikroorganizmi zaštićeni od uticaja pljuvačke (Dawes i sar., 2015).

1.5.6 Uticaj prisustva drugih mikroorganizama

Na adheziju pojedinih mikroorganizama za površinu materijala zubne nadoknade značajno utiče i komunikacija sa drugim prisutnim mikroorganizama u usnoj duplji. Kao primer se može uzeti *P. gingivalis*, sekundarni kolonizator koji je veoma osetljiv na pH vrednost usne duplje nižu od 6,5. Međutim, u prisustvu *F. nucleatum* i *P. intermedia* koji poseduju sposobnost fermentacije aminokiselina u amonijak i organske kiseline, kiselost sredine usne duplje se smanjuje, te se stvara neutralno okruženje pogodno za rast i razvoj *P. gingivalis* (Takahashi N, 2003). Osim toga, *F. nucleatum* luči i CO₂ koji obezbeđuje neophodne kapnofilne uslove za rast *P. gingivalis* (Diaz i sar., 2002) dok metabolizam *P. gingivalis* u subgingivalnom plaku može biti prilično ubrzan i u prisustvu *V. parvula* zahvaljujući lučenju vitamina K od strane pomenute bakterije (Marcotte i Lavoie, 1998).

S druge strane, nekoliko istraživanja na oralnim streptokokama pokazalo je značajnu inhibitornu aktivnost *Strep. mutans* ka drugim predstavnicima roda *Streptococcus*, kao što su *Strep. gordonii*, *Strep. mitis*, *Strep. sanguinis* i *Strep. oralis*. Razlog za ovo opažanje pripisuje se kompeticiji tj. konkurenciji više različitih vrsta streptokoka za jedno receptorsko mesto i činjenici da će *Strep. mutans* inhibirati adheziju drugih streptokoka ukoliko prvi kolonizuje pljuvačnu pelikulu na površini zubne nadoknade (Becker i sar., 2002). Osim toga, jedni od proizvoda metabolizma *Strep. mutans* su mlečna kiselina i mutacin koji inhibiraju rast i razvoj *Strep. sanguinis* (Kreth i sar., 2005) dok zauzvrat *Strep. sanguinis* i *Strep. gordonii* u velikim količinama produkuju H₂O₂, na čije prisustvo je *Strep. mutans* izrazito osetljiv (Baldeck i Marquis, 2008).

1.5.7 Uticaj stanja oralnih tkiva

Uzimajući u obzir faktore koji utiču na formiranje oralnog biofilma na površini zubne nadoknade u usnoj duplji, ne bi trebalo izostaviti i uticaj stanja oralnih tkiva. Prethodno prisustvo infekcija oralnih tkiva i imunokompromitovano stanje u usnoj duplji smatraju se rizikom za nastanak određenih bolesti.

Konkretno, pacijent koji poseduje veliki broj aktivnih karijesnih lezija na zubnim tkivima imaće veći rizik za nastanak karijesa na drugim zubima zahvaljujući obimnom prisustvu kariogenih bakterija u usnoj duplji dok će pacijenti sa kompromitovanim parodontalnim statusom biti pacijenti rizika za nastanak hroničnih infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva.

2. RADNA HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Problematika definisanja mašinski obradivog dentalnog materijala sa zadovoljavajućim karakteristikama koje mu omogućavaju harmoničan odnos sa čvrstim i mekim tkivima usne duplje uz ograničavanje adhezije mikroorganizama na svojoj površini podstakla je ideju sprovođenja ovakve vrste istraživanja.

Do današnjeg dana nije obavljena studija koja bi se fokusirala na karakteristike površine mašinski obradivih dentalnih materijala i uticaj istih na adheziju mikroorganizama nakon završne mehaničke obrade i poliranja materijala prema uputstvu proizvođača.

Opseg istraživanja obuhvatio je ispitivanje karakteristika površine različitih mašinski obradivih dentalnih materijala, ispitivanje formiranog biofilma različitih mikroorganizama na površinama navedenih materijala u *in vitro* uslovima, kao i ispitivanje ukupno formiranog biofilma mikroorganizama usne duplje na površinama navedenih materijala u *in situ* uslovima.

2.1 Radna hipoteza

Mašinski obradivi dentalni materijali, iako na isti način pripremljeni, završno mehanički obrađeni i ispolirani prema uputstvu proizvođača, ispoljavaju različitosti u karakteristikama površine koje dovode do povećane sklonosti ka adheziji mikroorganizama na površini jednog materijala u poređenju s drugim.

2.2 Ciljevi istraživanja

1. Ispitati i uporediti karakteristike površine (površinska hrapavost, kontakti ugao i površinska slobodna energija) različitih mašinski obradivih dentalnih materijala (kompozit na bazi smole, poli (metil metakrilat), poli (etar etar keton), cirkonija polirana, cirkonija glazirana i kobalt-hrom legura).
2. Ispitati povezanost karakteristika površine različitih mašinski obradivih dentalnih materijala.
3. Ispitati i uporediti između različitih mašinski obradivih dentalnih materijala formiran monomikrobni biofilm različitih mikroorganizama usne duplje (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans*) na njihovim površinama u *in vitro* uslovima.
4. Ispitati povezanost karakteristika površine različitih mašinski obradivih dentalnih materijala i formiranog monomikrobnog biofilma različitih mikroorganizama usne duplje na njihovim površinama u *in vitro* uslovima.
5. Ispitati i uporediti između različitih mašinski obradivih dentalnih materijala ukupno formiran biofilm mikroorganizama usne duplje na njihovim površinama u *in situ* uslovima.
6. Ispitati povezanost karakteristika površine različitih mašinski obradivih dentalnih materijala i ukupno formiranog biofilma mikroorganizama usne duplje na njihovim površinama u *in situ* uslovima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Etički standard

Istraživanje je sprovedeno na Klinici za stomatološku protetiku i u Laboratoriji za bazična istraživanja Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Fizičkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, kao i na Rudarsko-geološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Svi sprovedeni postupci bili su u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije iz 1964. godine i njenim kasnijim izmenama koji se odnose na istraživanja koja uključuju humane subjekte. Izvođenje studije odobrio je Etički odbor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj odobrenja 36/18).

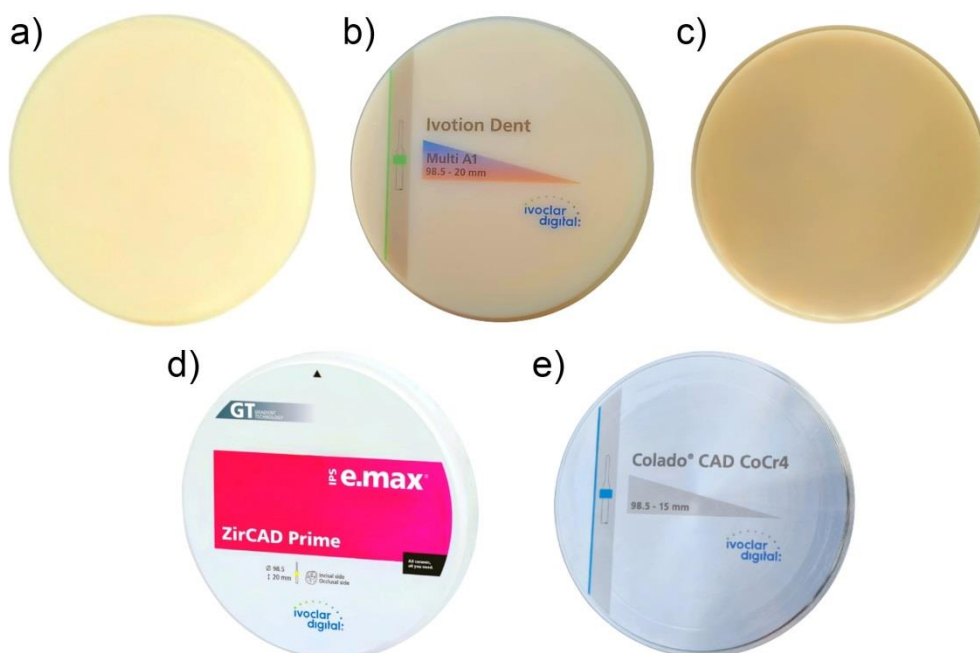
3.2 Priprema uzoraka

U istraživanje je uključeno pet različitih mašinski obradivih dentalnih materijala: kompozit na bazi smole, poli (metil metakrilat), poli (etar etar keton), cirkonijum-dioksidna keramika (cirkonija) i kobalt-hrom legura. Za svaki ispitivani materijal formirana je po jedna grupa uzoraka izuzev cirkonije koja je podeljena u dve grupe, cirkonija polirana i cirkonija glazirana, dajući ukupan broj od šest grupa uzoraka korišćenih u studiji. Za svaku grupu pripremljeno je po 79 uzoraka ($n = 79$), ukupno 474 uzorka oblika diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm. Kompletan opis materijala korišćenih u studiji, kao i njihov raspored po grupama predstavljen je u tabeli 3.1, sa prikazom materijala datim na slici 3.1.

Tabela 3.1. Mašinski obradivi dentalni materijali korišćeni u studiji.

Materijal	Grupa	Hemijski sastav	Naziv produkta	Proizvođač
Kompozit na bazi smole	KBS	27% neorganskih punilaca u polimernom matriksu	Structur CAD	VOCO, Kukshaven, Nemačka
Poli (metil metakrilat)	PMMA	Dvostruko umreženi poli (metil metakrilat)	Ivotion dent	Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn
Poli (etar etar keton)	PEEK	20% keramičkih punilaca, veličina čestica 0,3 - 0,5 μm	breCAM.BioHPP	Bredent group, Zenden, Nemačka
Cirkonijum-dioksidna keramika (cirkonija)	CP	88 - 95,5% ZrO_2 4,5 - 7% Y_2O_3 < 5% HfO_2	IPS e.max ZirCAD Prime	Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn
	CG	< 1% Al_2O_3 < 1,5% drugi oksidi		
Kobalt-hrom legura	CoCr	63% Co 29% Cr 6% Mo < 2% Fe, Mn, Si, Nb	Colado CAD CoCr Type 4	Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn

KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.



Slika 3.1. Mašinski obradivi dentalni materijali korišćeni u studiji: (a) Kompozit na bazi smole (Structur CAD, VOCO, Kukshaven, Nemačka). (b) Poli (metil metakrilat) (Ivotion dent, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn). (c) Poli (etar etar keton) (breCAM.BioHPP, Bredent group, Zenden, Nemačka). (d) Cirkonijum-dioksidna keramika (cirkonija) (IPS e.max ZirCAD Prime, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn). (e) Kobalt-hrom legura (Colado CAD CoCr Type 4, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn).

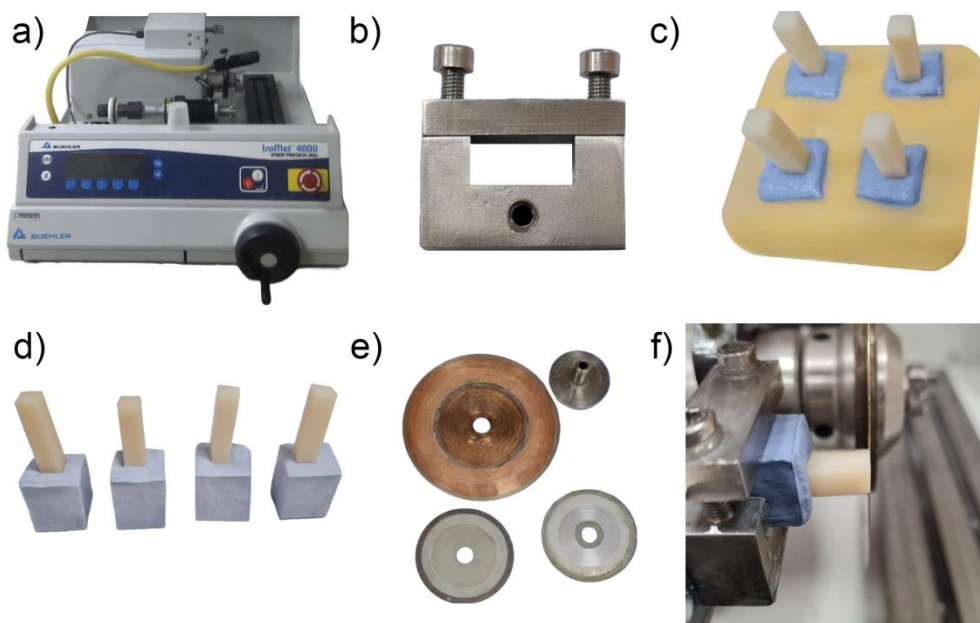
3.2.1 Priprema uzoraka od kompozita na bazi smole

Priprema uzoraka od kompozita na bazi smole (KBS) odvijala se u tri koraka:

- Priprema KBS materijala za sečenje;
- Izrada preliminarne KBS uzoraka;
- Izrada definitivnih KBS uzoraka.

Prvi korak u izradi podrazumevao je pripremu KBS materijala za sečenje u specijalno dizajniranoj mašini (Isomet 4000, Linear Precision Saw, Buehler, Lejk Blaf, Illinois, SAD) (Slika 3.2a). Naime, KBS disk (Structur CAD, VOCO, Kukshaven, Nemačka), prečnika 98,5 mm i debljine 20 mm (Slika 3.1a), najpre je isečen u uređaju za frezovanje (Dental laboratory saw A5601 CUT, Dentralfarm, Torino, Italija) do oblika štapića, poprečnog preseka 5 mm × 5 mm i debljine 20 mm. Za potrebe sečenja u mašini tako pripremljeni štapići najpre su morali biti pričvršćeni u metalnu stegu (Slika 3.2b). U cilju postavljanja u stegu, štapićima je prethodno napravljeno postolje od tvrdog gipsa (Tvrđi gips tip IV, Galenika, Beograd, Srbija) tako što je u gotove gumene kalupe oblika kvadra uliven pripremljen tvrdi gips, te su u tako ispunjene kalupe za vreme radne faze vezivanja tvrdog gipsa upravno uronjeni KBS štapići tako da gipsano postolje prekriva najmanje 5 mm dužine štapića (Slika 3.2c). Nakon završene definitivne faze vezivanja tvrdog gipsa (1 h kasnije), KBS štapići sa gipsanim postoljem pažljivo su prstima istisnuti iz kalupa (Slika 3.2d).

U drugom koraku izvršena je izrada preliminarnih KBS uzoraka. Prethodno pripremljeni KBS štapići sa gipsanim postoljem postavljani su u stegu i pričvršćeni u mašini za sečenje. Prilikom sečenja korišćeno je sečivo sa dijamantskim vrhom debljine 0,5 mm (15LC, Buehler, Lejk Blaf, Illinois, SAD) (Slika 3.2e) dok je sam proces sečenja obavljen brzinom 2500 obrtaja/min i u prisustvu konstantnog hlađenja vodenim mlazom. Prvi presek izvršen je kako bi se dobila potpuno ravna površina vrha štapića i kako bi se ustanovio početni položaj mašine za sečenje (Slika 3.2f). Naime, položaj sečiva u mašini za sečenje moguće je menjati okretanjem ručice. Mašina je kalibrisana tako da pet punih krugova prilikom okretanja ručice iznosi 2 mm pomeranja sečiva. Na taj način omogućeno je da svaki preliminarni KBS uzorak bude debljine tačno 2 mm, te su kao rezultat drugog koraka dobijeni preliminarni KBS uzorci bili oblika kvadra, poprečnog preseka 5 mm $\times$ 5 mm i debljine 2 mm.



Slika 3.2. Priprema uzoraka od kompozita na bazi smole: (a) Mašina za sečenje (Isomet 4000, Linear Precision Saw, Buehler, Lejk Blaf, Illinois, SAD). (b) Metalna stega. (c) Štapići materijala uronjeni u gumene kalupe sa tvrdim gipsom. (d) Štapići materijala sa gipsanim postoljem. (e) Sečivo sa dijamantskim vrhom debljine 0,5 mm (15LC, Buehler, Lejk Blaf, Illinois, SAD). (f) Proces sečenja uzoraka.

Treći korak u pripremi uzoraka KBS grupe podrazumevao je izradu definitivnih KBS uzoraka. Prethodno pripremljeni preliminarni KBS uzorci podlegli su najpre procesu završne mehaničke obrade čime su preoblikovani iz oblika kvadra u željeni oblik diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm. Proces završne mehaničke obrade i poliranja obavljen je prema uputstvu proizvođača. Prva faza je podrazumevala upotrebu gumice za poliranje (Politip Polisher Refill Flame, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn) (Slika 3.3a) pričvršćene za kolenjak (Alegra WE-56 LED G, W & H Dentalwerk International, Burmoos, Salcburg, Austrija), koristeći kružne pokrete, pri brzini 20000 obrtaja/min i bez prisustva hlađenja vodenim mlazom. Nakon toga, usledilo je završno poliranje četkicom od kozje dlake (Polishing Brush 110 104 190 White/5, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn) (Slika 3.3b) pričvršćene za nasadnik (Alegra HE-43, W & H Dentalwerk International, Burmoos, Salcburg, Austrija), koristeći takođe kružne pokrete, pri brzini 20000 obrtaja/min, bez prisustva hlađenja vodenim mlazom i u kombinaciji sa pastom za poliranje (Universal Polishing Paste, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn) (Slika 3.3c). Kao krajnji rezultat napravljeno je 79 definitivnih uzoraka KBS grupe ($n = 79$) oblika diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm.



Slika 3.3. Instrumenti i materijali za završnu mehaničku obradu i poliranje uzoraka od kompozita na bazi smole: (a) Gumica za poliranje (Politip Polisher Refill Flame, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn). (b) Četkica od kozje dlake (Polishing Brush 110 104 190 White/5, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn). (c) Pasta za poliranje (Universal Polishing Paste, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn).

3.2.2 Priprema uzoraka od poli (metil metakrilata)

Priprema uzoraka od poli (metil metakrilata) (PMMA) odvijala se takođe u tri koraka:

- Priprema PMMA materijala za sečenje;
- Izrada preliminarne PMMA uzoraka;
- Izrada definitivnih PMMA uzoraka.

Prvi i drugi korak u izradi bili su u potpunosti identični onima prilikom izrade uzoraka KBS grupe. Najpre je PMMA materijal pripremljen za sečenje u mašini. PMMA disk (Ivotion dent, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn), prečnika 98,5 i debljine 20 mm (Slika 3.1b), upotrebljen je za izradu PMMA štapića koji su bili istih dimenzija i na isti način pripremljeni poput prethodno opisanih KBS štapića. Usledila je zatim izrada preliminarne PMMA uzoraka sečenjem štapića u mašini, koristeći identično sečivo, brzinu sečenja, prisustvo konstantnog hlađenja vodenim mlazom i identičnu kalibraciju mašine poput procedure sečenja KBS štapića. Kao rezultat drugog koraka dobijeni su preliminarni PMMA uzorci koji su takođe bili oblika kvadra, poprečnog preseka 5 mm × 5 mm i debljine 2 mm.

Poslednji korak u pripremi uzoraka ove grupe podrazumevao je izradu definitivnih PMMA uzoraka. Prethodno pripremljeni preliminarni PMMA uzorci podlegli su najpre procesu završne mehaničke obrade prema uputstvu proizvođača, upotrebom rotirajućih instrumenata pričvršćenih za nasadnik, koristeći kružne pokrete, istu brzinu sečenja i odsustvo hlađenja vodenim mlazom kao poput izrade definitivnih KBS uzoraka. Prva faza je podrazumevala grubu mehaničku obradu upotrebom četkice od kože (Polishing Brush 140 104 220 Grey Leather/5, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn) (Slika 3.4a), praćenu finom mehaničkom obradom upotrebom abrazivne gumice srednje gruboće čestica (Abraso-Gum Acrylic Polisher Medium, Bredent group, Zenden, Nemačka) (Slika 3.4b). Proces poliranja PMMA uzoraka započet je upotrebom četke za struganje (Polishing Brush B27 Wood Center 207-0027, Rite Dent, Sialkot, Pakistan) (Slika 3.4c) u kombinaciji sa prahom plovuća (PoloDent Pumice Powder, Polo MB, Oistervijk, Holandija) (Slika 3.4d). Naposletku, poliranje do visokog sjaja obavljeno je upotrebom četkice od pamuka (Polishing Brush 150 104 220 Cotton White/5, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn) (Slika 3.4e) u kombinaciji sa, ranije pomenutom, pastom za poliranje (Slika 3.4f). Kao krajnji rezultat napravljeno je 79 definitivnih uzoraka PMMA grupe ($n = 79$) oblika diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm.



Slika 3.4. Instrumenti i materijali za završnu mehaničku obradu i poliranje uzoraka od poli (metil metakrilata): (a) Četkica od kože (Polishing Brush 140 104 220 Grey Leather/5, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn). (b) Abrazivna gumica srednje gruboće čestica (Abraso-Gum Acrylic Polisher Medium, Bredent group, Zenden, Nemačka). (c) Četka za struganje (Polishing Brush B27 Wood Center 207-0027, Rite Dent, Sialkot, Pakistan). (d) Prah plovućca (PoloDent Pumice Powder, Polo MB, Oistervijk, Holandija). (e) Četkica od pamuka (Polishing Brush 150 104 220 Cotton White/5, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn). (f) Pasta za poliranje (Universal Polishing Paste, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn).

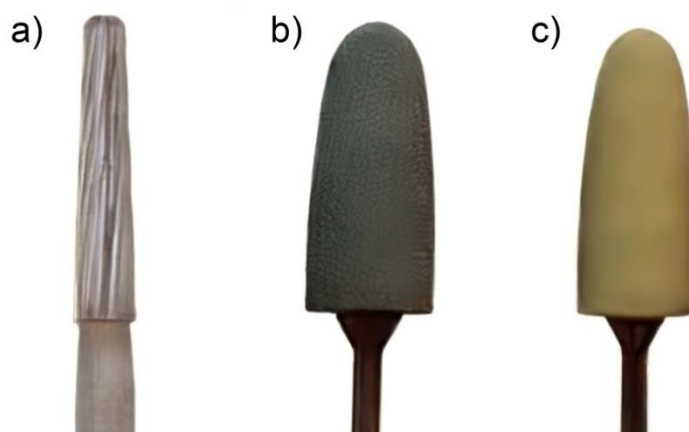
3.2.3 Priprema uzoraka od poli (etar etar ketona)

Priprema uzoraka od poli (etar etar ketona) (PEEK) odvijala se u tri koraka, slično poput pripreme KBS i PMMA uzoraka:

- Priprema PEEK materijala za sečenje;
- Izrada preliminarnih PEEK uzoraka;
- Izrada definitivnih PEEK uzoraka.

Na identičan način kao prilikom pripreme KBS i PMMA uzoraka obavljena su prva dva koraka u izradu uzoraka PEEK grupe. Iz PEEK diska (breCAM.BioHPP, Bredent group, Zenden, Nemačka), prečnika 98,5 mm i debljine 20 mm (Slika 3.1c), napravljeni su najpre PEEK štapići, dimenzija poput KBS i PMMA štapića. Štapići su zatim upotrebljeni za sečenje u mašini, koristeći potpuno iste uslove sečenja. Na taj način dobijeni su preliminarni PEEK uzorci koji su poput preliminarnih KBS i PMMA uzoraka takođe bili oblika kvadra, poprečnog preseka 5 mm × 5 mm i debljine 2 mm.

Treći korak u izradi uzoraka PEEK grupe podrazumevao je izradu definitivnih PEEK uzoraka. U prvoj fazi, pripremljeni preliminarni PEEK uzorci završno su mehanički obrađeni prema uputstvu proizvođača. Proces je podrazumevao upotrebu volfram karbidnog svrdla (HM cutter 2.3 mm Ø with conical round, Bredent group, Zenden, Nemačka) (Slika 3.5a) pričvršćenog za visokoturažnu mašinu (Alegra TE-97, W & H Dentalwerk International, Burmoos, Salzburg, Austrija), koristeći kružne pokrete, pri brzini 40000 obrtaja/min i uz prisustvo konstantnog hlađenja vodenim mlazom. Prilikom procedure završnog poliranja upotrebljena je abrazivna gumica velike gruboće čestica (Abraso-Gum Acrylic Polisher Rough, Bredent group, Zenden, Nemačka) (Slika 3.5b), praćena upotrebom, ranije pomenute, abrazivne gumice srednje gruboće čestica (Slika 3.5c), obe pričvršćene za nasadnik, koristeći istu brzinu sečenja i odsustvo hlađenja vodenim mlazom, kao prilikom izrade KBS i PMMA uzoraka. Kao krajnji rezultat napravljeno je 79 definitivnih uzoraka PEEK grupe ($n = 79$) oblika diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm.



Slika 3.5. Instrumenti za završnu mehaničku obradu i poliranje uzoraka od poli (etar etar ketona): (a) Volfram karbidno svrdlo (HM cutter 2.3 mm Ø with conical round, Bredent group, Zenden, Nemačka). (b) Abrazivna gumica velike gruboće čestica (Abraso-Gum Acrylic Polisher Rough, Bredent group, Zenden, Nemačka). (c) Abrazivna gumica srednje gruboće čestica (Abraso-Gum Acrylic Polisher Medium, Bredent group, Zenden, Nemačka).

3.2.4 Priprema uzoraka od cirkonijum-dioksidne keramike (cirkonije)

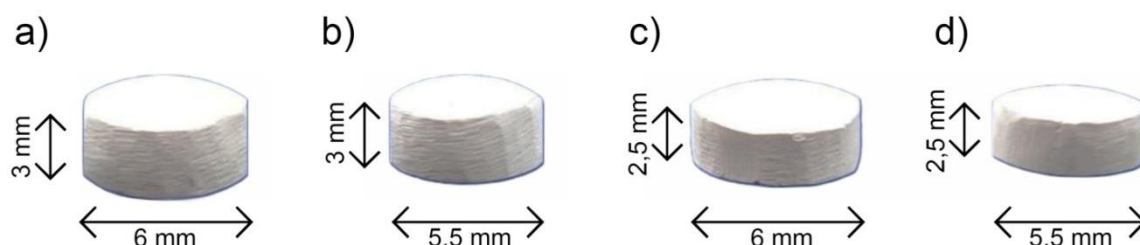
Priprema uzoraka od cirkonijum-dioksidne keramike (cirkonije) odvijala se u četiri koraka:

- Izrada presinterovanih probnih uzoraka cirkonije;
- Priprema presinterovanog materijala cirkonije za sečenje;
- Izrada presinterovanih preliminarnih uzoraka cirkonije;
- Izrada definitivnih uzoraka cirkonije.

Kao što je ranije objašnjeno, zbog izuzetne čvrstoće i skoro nemoguće mehaničke obrade sinterovane (očvrsla) cirkonije, u cilju izrade uzoraka ovog materijala korišćena je presinterovana (neočvrsla) cirkonija nakon čega su uzorci podlegli procesu sinterovanja, te na taj način poprimili konačan oblik i karakteristike. Presinterovana cirkonija predstavlja materijal slabijih mehaničkih osobina i podesan je za obradu, međutim podleže određenom stepenu kontrakcije nakon procesa sinterovanja. Iz navedenog razloga, prvi korak u izradi uzoraka od cirkonije podrazumevao je izradu presinterovanih probnih uzoraka cirkonije različitih dimenzija. Njihova svrha bila je da se utvrdi tačan iznos kontrakcije cirkonije nakon procesa sinterovanja. Na taj način bi se definisale dimenzije presinterovanih uzoraka koji bi se nakon sinterovanja kontrahovali tačno do željenog oblika diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm.

Disk presinterovane cirkonije (Ivotion IPS e.max ZirCAD Prime, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn), prečnika 98,5 mm i debljine 20 mm (Slika 3.1d), najpre je kao prilikom izrade KBS, PMMA i PEEK uzoraka isečen u uređaju za frezovanje do štapića oblika kvadra, poprečnog preseka 6 mm × 6 mm i debljine 20 mm. Takođe, za potrebe sečenja u mašini napravljeni štapići sa gipsanim postoljem morali su biti pričvršćeni u metalnu stegu. Međutim, za razliku od sečenja KBS, PMMA i PEEK štapića, mašina je ovoga puta bila kalibrisana da iseče dva probna uzorka debljine 3 mm što je iznosilo sedam krugova okretanja ručice na mašini i dva probna uzorka debljine 2,5 mm što je iznosilo šest i po krugova okretanja ručice na mašini. Nakon sečenja, izvršena je mehanička obrada uzoraka pomoću freze (Tungsten Carbide Cutter HM251FX Fine, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn) pričvršćene za nasadnik, koristeći kružne pokrete, pri brzini 20000 obrtaja/min i bez prisustva hlađenja vodenim mlazom čime su napravljena četiri probna uzorka cirkonije različitih dimenzija (Slika 3.6):

- Uzorak 1, prečnika 6 mm i debljine 3 mm (Slika 3.6a);
- Uzorak 2, prečnika 5,5 mm i debljine 3 mm (Slika 3.6b);
- Uzorak 3, prečnika 6 mm i debljine 2,5 mm (Slika 3.6c);
- Uzorak 4, prečnika 5,5 mm i debljine 2,5 mm (Slika 3.6d).



Slika 3.6. Probni uzorci cirkonije različitih dimenzija: (a) Uzorak 1, prečnika 6 mm i debljine 3 mm. (b) Uzorak 2, prečnika 5,5 mm i debljine 3 mm. (c) Uzorak 3, prečnika 6 mm i debljine 2,5 mm. (d) Uzorak 4, prečnika 5,5 mm i debljine 2,5 mm.

Uzorci su zatim podvrgnuti procesu sinterovanja u peći (Standard program for sintering of IPS e.max ZirCAD Prime, Programat S1/S1 1600, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn), nakon čega su podlegli kontrakciji stekavši nove dimenzije:

- Uzorak 1, prečnika 5 mm i debljine 2,5 mm;
- Uzorak 2, prečnika 4,5 mm i debljine 2,5 mm;
- Uzorak 3, prečnika 5 mm i debljine 2 mm;
- Uzorak 4, prečnika 4,5 mm i debljine 2 mm.

Na osnovu navedenih podataka moglo se uočiti da je nakon sinterovanja kontrakcija svakog uzorka iznosila oko 20%. Probni uzorak 3, početnog prečnika 6 mm i debljine 2,5 mm, nakon sinterovanja podlegao je kontrakciji stekavši nove dimenzije, prečnik 5 mm i debljinu 2 mm, što je predstavljalo željenu dimenziju svih uzoraka materijala korišćenih u istraživanju. Na taj način utvrđene su početne dimenzije presinterovanih uzoraka cirkonije.

Drugi i treći korak u izradi uzoraka cirkonije bili su, kao što je prethodno opisano prilikom izrade probnih uzoraka, identični izradi KBS, PMMA i PEEK uzoraka s jedinom razlikom u dimenzijama štapića cirkonije koji su bili oblika kvadra, poprečnog preseka 6 mm × 6 mm i debljine 20 mm. Procedura sečenja štapića u mašini podrazumevala je identično sečivo, brzinu sečenja i prisustvo konstantnog hlađenja vodenim mlazom. Međutim, za razliku od izrade uzoraka drugih materijala, prilikom sečenja štapića cirkonije mašina je bila kalibrisana na šest i po krugova okretanja ručice tj. na sečenje uzoraka debljine 2,5 mm izrezujući na taj način uzorke oblika kvadra, poprečnog preseka 6 mm × 6 mm i debljine 2,5 mm. Nakon toga, na isti način kao prilikom izrade probnih uzoraka izvršena je mehanička obrada, te su uzorci oblika kvadra preoblikovani u presinterovane preliminarne uzorke cirkonije oblika diska, prečnika 6 mm i debljine 2,5 mm.

Četvrti i poslednji korak u izradi podrazumevano je izradu definitivnih uzoraka cirkonije. Preliminarni presinterovani uzorci cirkonije najpre su sinterovani u peći po istom programu poput sinterovanja probnih uzoraka, nakon čega su podlegli kontrakciji dostižući željene dimenzije, prečnik 5 mm i debljinu 2 mm. Nakon procesa sinterovanja, uzorci su podlegli procesu završne mehaničke obrade i poliranja prema uputstvu proizvođača. Prva faza podrazumevala je upotrebu dijamantskog svrdla (Diamond Cylinder 881F Fine/5, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn) (Slika 3.7a) pričvršćenog za visokoturažnu mašinu, koristeći kružne pokrete, pri brzini 40000 obrtaja/min i uz prisustvo konstantnog hlađenja vodenim mlazom. Nakon toga, usledilo je poliranje uzoraka gumicom (Jota Zirconflex Grinder, Jota, Ruti, Švajcarska) (Slika 3.7b), pričvršćenom za nasadnik, koristeći takođe kružne pokrete, pri brzini 20000 obrtaja/min i bez prisustva hlađenja vodenim mlazom.

Uzorci su zatim podeljeni u dve grupe, cirkonija polirana (CP) i cirkonija glazirana (CG). Na uzorcima CP grupe nisu sprovedeni dalji postupci u vezi sa njihovom završnom obradom. S druge strane, uzorci grupe CG premazani su po čitavoj površini tankim slojem glazure nastalim usled mešanja glazurne paste (IPS Ivocolor Glaze Paste FLUO, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn) i tečnosti (IPS Ivocolor Mixing Liquid longlife, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn) (Slika 3.7c), nakon čega su uzorci kristalizovani u peći (Stains and Glaze firing program, Programat P142, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn). Kao krajnji rezultat napravljeno je 158 definitivnih uzoraka cirkonije, po 79 definitivnih uzoraka CP ($n = 79$) i CG grupe ($n = 79$) oblika diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm.



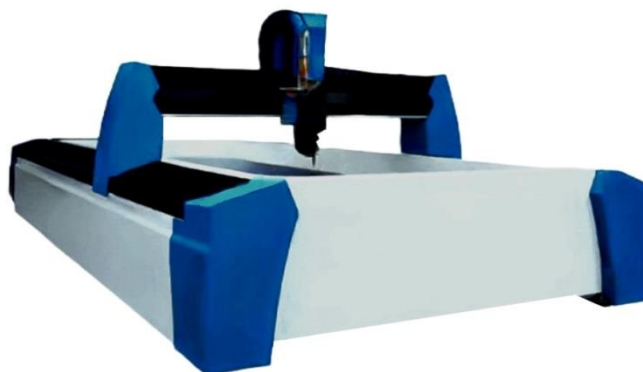
Slika 3.7. Instrumenti i materijali za završnu mehaničku obradu i poliranje uzoraka od cirkonije: (a) Dijamantsko svrdlo (Diamond Cylinder 881F Fine/5, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn). (b) Gumica za poliranje (Jota Zirconflex Grinder, Jota, Ruti, Švajcarska). (c) Nanošenje sloja glazure po površini uzorka cirkonije.

3.2.5 Priprema uzoraka od kobalt-hrom legure

Priprema uzoraka od kobalt-hrom legure (CoCr) odvijala se u dva koraka:

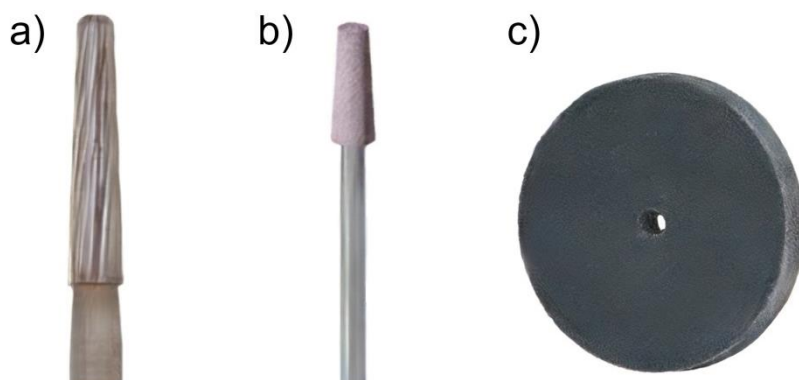
- Izrada preliminarne CoCr uzoraka;
- Izrada definitivnih CoCr uzoraka.

Prvi korak u izradi CoCr uzoraka podrazumevao je izradu preliminarne CoCr uzoraka. CoCr disk (Colado CAD CoCr Type 4, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn), prečnika 98,5 mm i debljine 15 mm (Slika 3.1e), najpre je isečen pomoću mašine za sečenje upotrebom vodenog mlaza (Water Jet 5X 3080, Knuth Machine Tools, Vazbek/Nojminster, Nemačka) (Slika 3.8), pri brzini 20000 mm/min. Kao rezultat dobijeni su preliminarni CoCr uzorci oblika diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm.



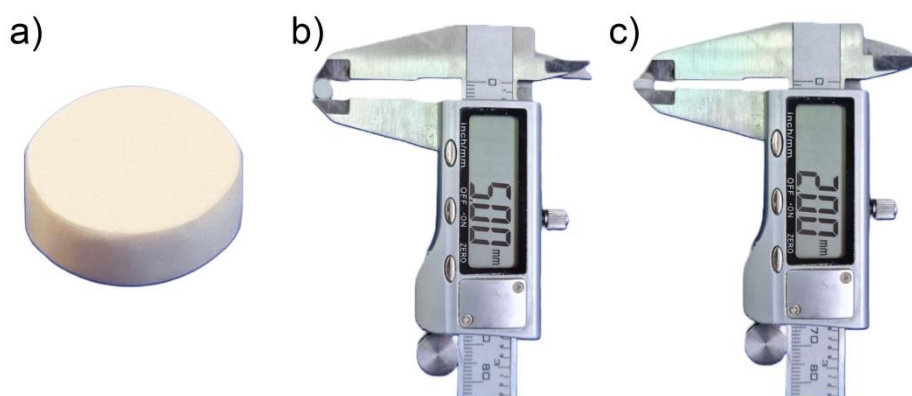
Slika 3.8. Mašina za sečenje upotrebom vodenog mlaza (Water Jet 5X 3080, Knuth Machine Tools, Vazbek/Nojminster, Nemačka).

Nakon izrade preliminarne CoCr uzoraka pristupilo se završnoj mehaničkoj obradi i poliranju istih prema uputstvu proizvođača. Prva faza u tom procesu podrazumevala je upotrebu, ranije pomenutog, volfram karbidnog svrdla (Slika 3.9a) pričvršćenog za visokoturažnu mašinu, pri brzini 40000 obrtaja/min i uz prisustvo konstantnog hlađenja vodenim mlazom. Međutim, za razliku od izrade uzoraka drugih grupa ispitivanih materijala, prilikom završne mehaničke obrade CoCr uzoraka korišćeni su pokreti u jednom pravcu prateći uputstva proizvođača. Nakon toga, usledilo je poliranje CoCr uzoraka upotrebom kamenčića (Diamond Polisher 9734G Medium, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn) (Slika 3.9b) i gumice za poliranje (Finopol Polisher Wheel Medium Ø 22.0 x 3.0 mm, Fino, Bad Boklet, Nemačka) (Slika 3.9c), pri čemu su oba instrumenta bila pričvršćena za nasadnik, pri brzini 20000 obrtaja/min i bez prisustva hlađenja vodenim mlazom. Kao krajnji rezultat napravljeno je 79 definitivnih uzoraka CoCr grupe ($n = 79$) oblika diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm.



Slika 3.9. Instrumenti za završnu mehaničku obradu i poliranje uzoraka od kobalt-hrom legure: (a) Volfram karbidno svrdlo (HM cutter 2.3 mm Ø with conical round, Bredent group, Zenden, Nemačka). (b) Kamenčić za poliranje (Diamond Polisher 9734G Medium, Meisinger, Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn). (c) Gumica za poliranje (Finopol Polisher Wheel Medium Ø 22.0 x 3.0 mm, Fino, Bad Boklet, Nemačka).

Kompletna procedura pripreme, završne mehaničke obrade i poliranja uzoraka prema uputstvu proizvođača izvršena je od strane iste osobe. Kao krajnji rezultat pripremljeno je 474 uzoraka, po 79 uzoraka od svake od šest grupa materijala ($n = 79$). Svaki pripremljeni uzorak (Slika 3.10a) bio je oblika diska, prečnika 5 mm i debljine 2 mm. Provera konačnih dimenzija uzoraka izvršena je upotrebom digitalnog instrumenta za merenje (Lukas Tools Digital Caliper, Vogel, Kevelaer, Nemačka) (Slike 3.10b i 3.10c).



Slika 3.10. Krajnji rezultat pripreme uzoraka materijala: (a) Pripremljeni uzorak. (b) i (c) Merenje prečnika i debljine uzoraka upotrebom digitalnog instrumenta za merenje (Lukas Tools Digital Caliper, Vogel, Kevelaer, Nemačka).

3.2.6 Čišćenje uzoraka

Pripremljeni uzorci očišćeni su u ultrazvučnom kupatilu (BK-3A Ultrasonic cleaner, Baku, Gvangžu, Kina), u prisustvu 70% etanola u trajanju od 5 min, kao i u prisustvu destilovane vode u trajanju od dodatnih 5 min. Očišćeni uzorci zatim su osušeni u prisustvu vazduha na sobnoj temperaturi, nakon čega je svaka od dve strane uzorka izložena prisustvu ultraljubičastog zračenja na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min (Condò i sar., 2021; D'Ercole i sar., 2020; Fang i sar., 2016; Silva i sar., 2018; Souza i sar., 2016). Tako pripremljeni uzorci čuvani su u sterilnim plastičnim bočicama do dalje upotrebe.

3.3 Ispitivanje karakteristika površine materijala

3.3.1 Merenje površinske hrapavosti

Merenje površinske hrapavosti obavljeno je na svih 79 uzoraka svake grupe ispitivanih materijala ($n = 79$) upotrebom kontaktnog profilometra (Surface Roughness Tester TR200, Beijing TIME High Technology, Peking, Kina) (Slika 3.11a).

Princip merenja zasniva se postavljanju specijalne sonde sa dijamantskim vrhom na deo površine uzorka, nakon čega se sonda kreće po površini uzorka konstantnom brzinom (Slika 3.11b). Tom prilikom hrapavost površine uzorka izaziva pomeranje vrha sonde u pravcu upravnom na pravac kretanja sonde čime se generiše analogni signal na izlaznom kraju fazno osetljivog ispravljača, proporcionalan hrapavosti površine. Prikupljeni analogni podaci obrađuju se zatim digitalnim filtriranjem i izračunavanjem parametara pomoću čipa digitalnog signalnog procesora (engl. *digital signal processor*), nakon čega se rezultat merenja očitava na ekranu uređaja.

Merenja su izvršena pri sledećim podešenim parametrima uređaja (International Organization for Standardization (ISO) 4288:1996):

- Poluprečnik dijamantskog vrha mernog instrumenta (engl. *diamond tip*) $5\text{ }\mu\text{m}$;
- Dužina jednog segmenta merenja (engl. *sampling length/cut off*) $0,25\text{ mm}$;
- Ukupna dužina jednog merenja (engl. *total length*) $1,25\text{ mm}$;
- Brzina merenja (engl. *sampling speed*) $0,135\text{ mm/s}$;
- Opseg merenja (engl. *pick-up measuring range*) $\pm 40\text{ }\mu\text{m}$;
- Tačnost očitavanja (engl. *resolution*) $0,02\text{ }\mu\text{m}$;
- Gausov filter raspodele podataka.

Rezultat površinske hrapavosti uzoraka materijala bitno se razlikuje u zavisnosti od toga da li su merenja izvršena u pravcu paralelnom sa pravcem upotrebe instrumenata prilikom procedure završne mehaničke obrade i poliranja ili pod određenim uglom u odnosu na isti. Iz tog razloga, na svakom uzorku izvršena su tri merenja u tri različita pravca kako bi se dobili verodostojni rezultati nezavisni od pravca završne mehaničke obrade i poliranja. Prva dva pravca merenja međusobno su zaklapala ugao od 90° dok je treći pravac merenja zaklapao 45° sa preostala dva pravca merenja (Slika 3.11c).



Slika 3.11. Merenje površinske hrapavosti uzoraka materijala: (a) Kontaktni profilometar (Surface Roughness Tester TR200, Beijing TIME High Technology, Peking, Kina). (b) Princip merenja površinske hrapavosti postavljanjem specijalne sonde sa dijamantskim vrhom na deo površine uzorka materijala. (c) Pravci merenja površinske hrapavosti uzoraka.

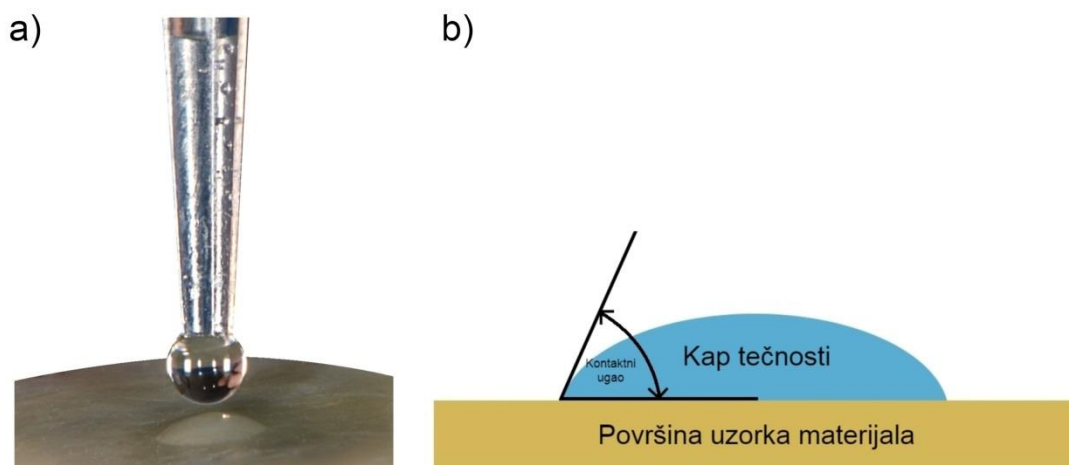
U rezultatima su analizirani srednje aritmetičko odstupanje (Ra) i maksimalna visina datog profila merenja (Rz). Ra predstavlja srednju aritmetičku vrednost rastojanja svih tačaka datog profila merenja od srednje linije u granicama referentne dužine tj. srednju vrednost apsolutnih visina svih vrhova (engl. *peaks*) i dubina svih dolina (engl. *valleys*) izmerenog profila. Rz predstavlja maksimalno rastojanje između gornje i donje linije datog profila merenja tj. najveće rastojanje između najvišeg vrha (engl. *highest peak*) i najdublje doline (engl. *deepest valley*) izmerenog profila. Iz tri merenja izračunata je srednja vrednost Ra i Rz za svaki pojedinačni uzorak dok su, izuzev numeričkih vrednosti, prilikom svakog merenja dati i dijagrami koji slikovito u dvodimenzionalnom prostoru (2D) pružaju informacije o hrapavosti površine uzorka materijala.

3.3.2 Merenje kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i izračunavanje površinske slobodne energije

Izračunavanje vrednosti površinske slobodne energije (engl. *surface free energy (SFE)*) i ocena hidrofilnosti površine grupa ispitivanih materijala izvršeni su upotrebom metode merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja). Vrednosti kontaktnih uglova destilovane vode, etilen glikola (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) i dijudmetana (Acros Organics, Fer Lon, Nju Džerzi, SAD) merene su na 15 uzoraka svake grupe materijala ($n = 15$), po pet uzoraka za svaku od tečnosti, primenom metode ispuštanja kapi tečnosti iz mikropipete na površinu uzorka (Stasić i sar., 2019).

Sva merenja su izvršena u prisustvu istih uslova okoline: sobna temperatura $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ i vlažnost vazduha $40\% \pm 2\%$. Nakon pažljivog nanošenja kapi ($2\text{ }\mu\text{l}$) tečnosti pomoću mikropipete (BIOHIT, Biohit Oyj, Helsinki, Finska) na površinu uzorka pod uglom od 90° i sa rastojanja od 4 mm (Slika 3.12a), fotografije su napravljene 1 s nakon njihovog dodira pomoću fotoaparata (Nikon D5200, Nikon, Minato, Tokio, Japan) sa montiranim objektivom (AF-S DKS Micro Nikkor 85 mm f/3.5G ED VR, Nikon, Minato, Tokio, Japan) i blicem (Sigma EM-140 DG, Kawasaki, Kanagava, Japan). Prilikom svakog fotografisanja položaj kamere na stalku bio je u ravni sa stolom na kom je bio postavljen uzorak obezbeđujući kasnije idealan položaj za merenje kontaktnog ugla.

Na dobijenim fotografijama izmeren je kontaktni ugao tj. ugao tangente između kapi tečnosti i površine materijala (Slika 3.12b) pomoću kompjuterskog programa (ImageJ Software Version 1.42, National Institute of Health, Betesda, Merilend, SAD). Na svakom uzorku su za određenu referentnu tečnost obavljena dva merenja kontaktnog ugla iz kojih je zatim izračunata srednja vrednost.



Slika 3.12. Merenje kontaktnog ugla (ugla kvašenja): (a) Ispuštanje kapi tečnosti na površinu uzorka materijala iz mikropipete (BIOHIT, Biohit Oyj, Helsinki, Finska). (b) Šematski prikaz merenja kontaktnog ugla.

Nakon toga, upotrebom *Van Oss-Chaudhury-Good* formule termodinamičkog pristupa za tri različite tečnosti izračunata je vrednost SFE za svaku grupu ispitivanih materijala (Van Oss i sar., 1988). Naime, formula se zasniva na činjenici da na spoju tečnosti sa čvrstom supstancom, kao što je uzorak ispitivanog materijala, vladaju nepolarne i polarne interakcije, te da se SFE kako tečnosti, tako i čvrstog uzorka sastoji iz dve komponente, nepolarne i polarne (Stašić i sar., 2019; Van Oss i sar., 1988).

Nepolarne interakcije se javljaju između dva nepolarna jedinjenja i poznate su kao *Lifshitz-Van der Waals* interakcije. Samim tim, nepolarna komponenta SFE poznata je i kao *Lifshitz-Van der Waals* komponenta (γ^{LW}). S druge strane, polarne interakcije se baziraju na vodoničnoj vezi tj. interakciji između primaoca i davaoca elektrona između dva polarna jedinjenja što je poznato kao *Lewis* kiselinsko - bazna interakcija. Uzimajući u obzir da je ova reakcija asimetrična, polarna komponenta SFE (γ^{AB}) podeljena je na dve potkomponente, *Lewis* kiselinu (γ^+) i *Lewis* bazu (γ^-) (Stašić i sar., 2019; Van Oss i sar., 1988).

Vrednosti SFE grupa ispitivanih materijala (γ_S) i njenih komponenti (γ^{SLW} , γ^{S+} i γ^{S-}) izračunate su na osnovu izmerenih vrednosti kontaktnih uglova (θ) tri referentne tečnosti. S obzirom da formula zahteva da jedna od tri tečnosti bude nepolarna dok dve moraju biti polarne, kao nepolarna referentna tečnost korišćen je dijudmetan dok su kao dve polarne tečnosti u studiju uključene destilovana voda i etilen glikol. Navedenim tečnostima vrednosti komponenti SFE (γ_L) (γ^{LW} , γ^{L+} i γ^{L-}) su unapred poznate (Tabela 3.2) (Van Oss i sar., 1988; Van Oss i sar., 1989).

Tabela 3.2. Referentne tečnosti korišćene u studiji sa prikazanim vrednostima komponenti površinske slobodne energije (Van Oss i sar., 1989).

Referentna tečnost	SFE (γ_L) (mN/m)		
	γ^{LW}	$\gamma^{L^{AB}}$	
		γ^{L^+}	γ^{L^-}
Destilovana voda	21,80	25,50	25,50
Etilen glikol	29,00	1,90	47,00
Dijodmetan	50,80	0,00	0,00

SFE (γ_L) - površinska slobodna energija (engl. *surface free energy*); γ^{LW} - nepolarna *Lifshitz-Van der Waals* komponenta SFE; $\gamma^{L^{AB}}$ - polarna komponenta SFE; γ^{L^+} - *Lewis* kiselina; γ^{L^-} - *Lewis* baza; mN - milinjutn; m - metar.

Prikazane vrednosti komponenti SFE referentnih tečnosti (γ_L^{LW} , γ_L^+ i γ_L^-) najpre su iskorišćene kako bi se izračunala vrednost SFE samih tečnosti (γ_L) na osnovu sledeće formule:

$$\gamma_L = \gamma_L^{LW} + \gamma_L^{AB} = \gamma_L^{LW} + 2\sqrt{\gamma_L^+ \gamma_L^-}$$

Naposletku, znajući vrednosti SFE svake tečnosti, kao i njenih komponenti, izračunata je vrednost SFE grupa ispitivanih materijala (γ_S) i njenih komponenti (γ_S^{LW} , γ_S^+ i γ_S^-) na sledeći način (Van Oss i sar., 1988):

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

3.3.3 Analiza površinske morfologije upotrebom mikroskopa atomskih sila

U cilju karakterizacije morfologije površine materijala u trodimenzionalnom prostoru (3D), jedan uzorak svake grupe materijala ($n = 1$) sniman je na jednom, nasumično odabranom polju upotrebom mikroskopa atomskih sila (engl. *atomic force microscope (AFM)*) (Veeco Bruker DI Dimension Hybrid XYZ Scanning Probe Microscope Head/AFM, Veeco Instruments, Plejnvju, Njujork, SAD) (Slika 3.13).

Proces snimanja nije zahtevao posebnu pripremu uzoraka, te je izveden u prisustvu vazduha, na sobnoj temperaturi i pri sledećim podešenim parametrima uređaja (D'Ercole i sar., 2020; Fano i sar., 2005):

- Povremeno dodirujući (engl. *tapping*) režim snimanja;
- Površina jednog snimka $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$;
- Tačnost očitavanja snimka (engl. *resolution*) 512×512 piksela;
- Brzina snimanja 1 Hz.

Analiza AFM snimaka izvršena je zatim pomoću kompjuterskog softvera (Nanoscope analysis 1.40, Bruker, Bilerika, Masačusets, SAD).



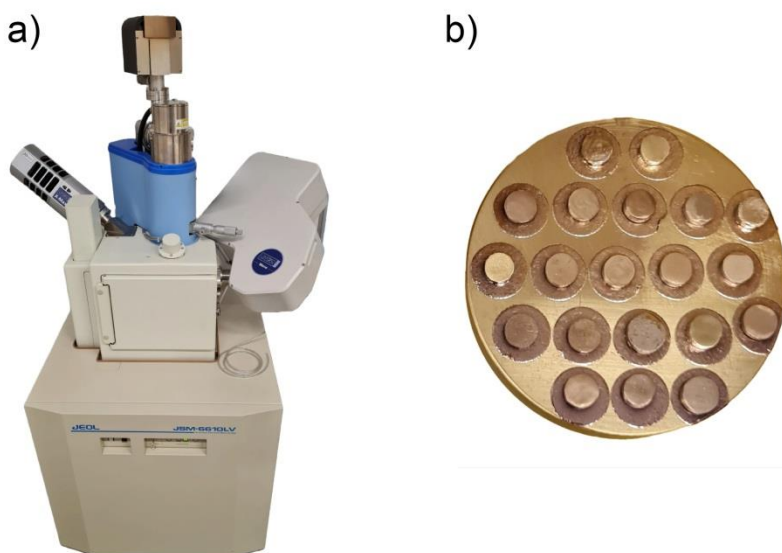
Slika 3.13. Mikroskop atomskih sila (Veeco Bruker DI Dimension Hybrid XYZ Scanning Probe Microscope Head/AFM, Veeco Instruments, Plejnvju, Njujork, SAD).

3.3.4 Analiza površinske morfologije upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa

S namerom prikaza morfologije površine materijala u 2D, jedan uzorak svake grupe materijala ($n = 1$) sniman je na jednom, nasumično odabranom polju upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (engl. *scanning electron microscope (SEM)*) (JEOL JSM-6610LV, Jeol, Akišima, Tokio, Japan) (Slika 3.14a).

U cilju očuvanja strukture i provodljivosti elektrona, sprečavanja nakupljanja električnog naboja u uzorcima materijala prilikom procesa snimanja, kao i poboljšanja kvaliteta i rezolucije slike bez prisustva artefakata, uzorci su pre samog procesa snimanja obloženi (napareni) raspršenim slojem zlata u debljini 20 nm, u trajanju od 2 min (Slika 3.14b). Pozlaćeni uzorci su potom umetnuti u komoru uređaja, nakon čega je izvršeno snimanje pri sledećim podešenim parametrima (Barkarmo i sar., 2019; Giti i sar., 2021; Poole i sar., 2020):

- Napon snimanja 20 kV;
- Uglovi nagiba snimanja od 10° do 45°;
- Uveličanja slike $\times 500$ i $\times 3500$.



Slika 3.14. Analiza površinske morfologije upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa: (a) Skenirajući elektronski mikroskop (JEOL JSM-6610LV, Jeol, Akišima, Tokio, Japan). (b) Uzorci materijala obloženi (napareni) raspršenim slojem zlata u debljini 20 nm, u cilju pripreme za proces snimanja.

3.4 Ispitivanje formiranog biofilma na površinama materijala u *in vitro* uslovima

3.4.1 Formiranje biofilma

Za potrebe istraživanja korišćeni su referentni sojevi šest različitih mikroorganizama: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus oralis* ATCC 6249, *Veillonella parvula* ATCC 10790, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 332787 i *Candida albicans* ATCC 10231 (Microbiologics KWIK-STIK, Manasas, Virdžinija, SAD). U cilju formiranja monomikrobnog biofilma svakog navedenog mikroorganizma, referentni sojevi su aktivirani na različitim čvrstim podlogama za rast i pri odgovarajućim uslovima, prikazanim u tabeli 3.3 (Al-Fouzan i sar., 2017; D'Ercole i sar., 2020; Di Giulio i sar., 2016; Fiore i sar., 2022; Giti i sar., 2021; Meza-Siccha i sar., 2019).

Tabela 3.3. Aktivacija referentnih sojeva mikroorganizama korišćenih u studiji.

Referentni soj	Čvrsta podloga za rast	Vreme aktivacije	Temperatura aktivacije	Uslovi aktivacije
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<i>Mutans-Sanguis</i> agar (HiMedia, Mumbai, Indija)	24 h	37 °C	Anaerobni
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 6249	<i>Columbia</i> agar obogaćen sa 5% ovčije krvi (ProReady, Kikinda, Srbija)	24 h	37 °C	Anaerobni
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	<i>Brain Heart Infusion</i> agar obogaćen sa 5% ovčije krvi (HiMedia, Mumbai, Indija)	24 h	37 °C	Anaerobni
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	<i>Brucella</i> agar obogaćen sa 5% ovčije krvi, heminom i vitaminom K1 (Becton, Dickinson and Company, Frenklin Lejks, Nju Džerzi, SAD)	24 h	37 °C	Anaerobni
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 332787	<i>Brucella</i> agar obogaćen sa 5% ovčije krvi, heminom i vitaminom K1 (Becton, Dickinson and Company, Frenklin Lejks, Nju Džerzi, SAD)	24 h	37 °C	Anaerobni
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Sabouraud</i> agar (HiMedia, Mumbai, Indija)	24 h	37 °C	Aerobni

Nakon aktivacije referentnih sojeva, pristupilo se procesu formiranja biofilma. Tri do četiri kolonije svakog mikroorganizma prebačene su u specifične tečne podloge (bujone). Kolonije *Strep. mutans*, *Strep. oralis* i *V. parvula* prebačene su u *Brain Heart Infusion* bujon (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indija), kolonije *F. nucleatum* i *P. gingivalis* u *Schaedler* bujon obogaćen heminom i vitaminom K1 (Becton, Dickinson and Company, Frenklin Lejks, Nju Džerzi, SAD) dok su kolonije *C. albicans* prebačene u *Sabouraud* bujon (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indija). Mikroorganizmi su inkubirani u bujonima pod istim uslovima, prethodno navedenim prilikom aktivacije referentnih sojeva na čvrstim podlogama (Tabela 3.3).

Dobijene suspenzije bakterija i gljivica podlegle su procesu centrifugiranja u trajanju od 10 min, pri brzini od 3000 obrtaja/min (D1008 Palm Micro Centrifuge, DLAB, Šunji, Peking, Kina). Nakon toga, supernatant je odbačen, a talog razblažen sterilnim fiziološkim rastvorom puferovanim fosfatom (engl. *phosphate-buffered saline (PBS)*). Na taj način dobijena je zamućenost od 1,0 McFarland standarda što predstavlja približno 10^8 CFU/ml za bakterije i 10^6 CFU/ml za *C. albicans* (DEN-1 densitometer, Biosan, Riga, Letonija).

U cilju postizanja konačnog broja mikroorganizama, suspenzije su razblažene tečnim podlogama. Suspenzije *Strep. mutans*, *Strep. oralis* i *V. parvula* razblažene su pomoću *Brain Heart Infusion* bujona, suspenzije *F. nucleatum* i *P. gingivalis* pomoću *Schaedler* bujona obogaćenog heminom i vitaminom K1 dok je suspenzija *C. albicans* razblažena pomoću *Roswell Park Memorial Institute* 1640 medijuma obogaćenog sa 2% glukozom (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD).

Biofilm je formiran na 42 uzorka svake grupe materijala ($n = 42$), po sedam uzoraka za svaki od šest mikroorganizama uključenih u studiju. Uzorci su pre mikrobioloških analiza bili podvrgnuti identičnom postupku čišćenja, kao pre merenja karakteristika površine ispitivanih materijala. Tako pripremljeni, uzorci materijala postavljeni su u mikrotitarske ploče sa 96 bunarića (engl. *well plates*), nakon čega je u svaki bunarić dodato 150 μ l sterilne veštačke pljuvačke (Apoteka Beograd, Beograd, Srbija) sa ciljem formiranja pljuvačne pelikule na površini uzoraka materijala. Nakon inkubacije u trajanju od 24 h, na 37 °C, pljuvačka je eliminisana iz svakog bunarića u koje je zatim dodato 200 μ l prethodno opisane bakterijske/gljivične suspenzije. Bunarići sa uzorcima materijala i suspenzijom određenog mikroorganizma inkubirani su zatim pod sledećim uslovima: *Strep. mutans* i *Strep. oralis* su inkubirani u trajanju od 24 h, na 37 °C i u prisustvu anaerobnih uslova sredine, *V. parvula*, *F. nucleatum* i *P. gingivalis* su inkubirani 5 dana, na 37 °C, u anaerobnim uslovima dok je inkubacija *C. albicans* trajala 48 h, na 37 °C i u prisustvu aerobnih uslova sredine.

3.4.2 Brojanje formiranih kolonija mikroorganizama

Količina formiranog biofilma nakon perioda inkubacije određena je metodom brojanja formiranih kolonija (engl. *colony forming units (CFU)*) mikroorganizama po mililitru tečnosti na 18 uzoraka svake grupe materijala ($n = 18$), po tri uzorka za svaki od šest ispitivanih mikroorganizama (Fiore i sar., 2022; Souza i sar., 2016).

Sa ciljem eliminacije ćelija bakterija/gljivica koje nisu čvrsto adherirale za površinu uzoraka materijala, uzorci su najpre nežno isprani pomoću sterilnog PBS, nakon čega su prebačeni u sterilne tube za mikrocentrifugiranje u koje je prethodno sipano 1 ml sterilnog PBS. Svaka tuba je najpre tretirana u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 1 min, na 40 kHz, a zatim i u uređaju za mućkanje (Varioshake VS 15B, Lauda, Lauda-Kenigshofen, Nemačka) u trajanju od 5 min, na 37 °C i pri brzini od 900 obrtaja/min.

Serijska desetostruka razblaženja PBS iz tuba zasejana su potom na odgovarajuće čvrste podloge, slične onim prethodno korišćenim za aktivaciju referentnih sojeva mikroorganizama (Tabela 3.3). Nakon perioda inkubacije na 37 °C, u trajanju od 24 h (za *Strep. mutans*, *Strep. oralis* i *C. albicans*) ili 5 dana (za *V. parvula*, *F. nucleatum* i *P. gingivalis*), u prisustvu anaerobnih (za *Strep. mutans*, *Strep. oralis*, *V. parvula*, *F. nucleatum* i *P. gingivalis*) ili aerobnih uslova (za *C. albicans*), usledilo je brojanje formiranih kolonija i ekspresija broja ćelija mikroorganizama u vidu CFU/ml (Slika 3.15).



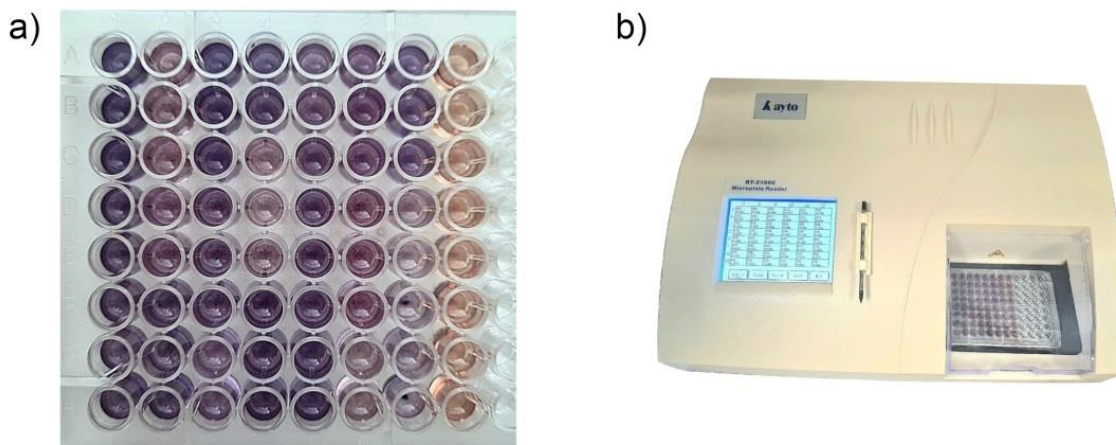
Slika 3.15. Izgled formiranih kolonija mikroorganizama nakon određenog perioda inkubacije.

3.4.3 Test vijabilnosti (održivosti) ćelija mikroorganizama

Test vijabilnosti (održivosti) ćelija mikroorganizama (engl. *cell viability assay*) u biofilmu formiranom na površinama uzoraka grupa ispitivanih materijala izvršen je na 18 uzoraka svake grupe ($n = 18$), po tri uzorka za svaki od šest mikroorganizama. Analiza je podrazumevala merenje sposobnosti mitohondrijalnih enzima vijabilnih mikroorganizama da redukuju MTT (3-(4,5-dimetiltiazol)-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid) u formazan, ljubičast proizvod čija je vrednost optičke gustine (engl. *optical density (OD)*) tj. vrednost odnosa intenziteta upadnog i propuštenog zraka kroz uzorak mereno spektrofotometrom proporcionalna količini vijabilnih ćelija mikroorganizama u biofilmu formiranom na površini uzorka materijala (International Organization for Standardization (ISO) 10993-5:2009) (Cazzaniga i sar., 2017; Dal Piva i sar., 2018; Giti i sar., 2021).

Nakon formiranja biofilma, slično kao prilikom pripreme za CFU analizu uzorci su najpre nežno isprani pomoću sterilnog PBS sa ciljem eliminacije ćelija bakterija/gljivica koje nisu čvrsto adherirale za površinu uzoraka materijala. Uzorci su potom prebačeni u nove bunariće, nakon čega je u svaki bunarić sa prisutnim uzorkom dodato 100 μ l MTT rastvora razblaženog odgovarajućim bujonom (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD). Uzorci okruženi MTT rastvorom u bunarićima inkubirani su bez prisustva svetlosti, tokom 3,5 h, na 37 °C i u prisustvu anaerobnih (za *Strep. mutans*, *Strep. oralis*, *V. parvula*, *F. nucleatum* i *P. gingivalis*) ili aerobnih uslova (za *C. albicans*).

Po završetku perioda inkubacije, u bunariće sa uzorcima i rastvorom MTT dodato je 100 μ l dimetil sulfoksida, nakon čega su bunarići tretirani u uređaju za mućkanje, bez prisustva svetlosti, u trajanju od 15 min, na 37 °C i pri brzini 250 obrtaja/min. Novonastali rastvor iz svakog bunarića presut je u nove bunariće (Slika 3.16a), a zatim je broj vijabilnih, metabolički aktivnih ćelija mikroorganizama prisutnih u biofilmu formiranom na površini uzoraka kvantifikovan merenjem optičke gustine dobijenog rastvora. Sam proces merenja izvršen je na talasnoj dužini 540 nm upotrebom spektrofotometra (RT-2100C Microplate Reader, Raito Life and Analytical Sciences, Šenžen, Kina) (Slika 3.16b).



Slika 3.16. Test vijabilnosti (održivosti) ćelija mikroorganizama: (a) Mikrotitarska ploča sa bunarićima ispunjenim rastvorom koga čine inkubirani MTT (3-(4,5-dimetiltiazol)-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid) rastvor (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) sa dodatim dimetil sulfoksidom, spreman za merenje optičke gustine u spektrofotometru. (b) Spektrofotometar (RT-2100C Microplate Reader, Raito Life and Analytical Sciences, Šenžen, Kina).

3.4.4 Analiza formiranog biofilma upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa

U cilju vizuelizacije topografije biofilma formiranog na površini uzoraka ispitivanih materijala u 2D, površine šest uzoraka svake grupe materijala ($n = 6$), po jednog uzorka za svaki od šest mikroorganizama, snimane su na jednom, nasumično odabranom polju upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM).

Postupak pripreme uzoraka za proces snimanja podrazumevao je (Dal Piva i sar., 2018; Jaeggi i sar., 2022; Kamel i sar., 2021; Scarano i sar., 2004; Silva i sar., 2018):

- Ispiranje uzoraka materijala sa biofilmom pomoću sterilnog PBS kako bi se sa površine uzoraka uklonile neadherirane ćelije bakterija/gljivica;
- Pričvršćivanje biofilma za površinu uzoraka materijala uranjanjem uzoraka sa biofilmom u 2,5% glutaraldehid u trajanju od 48 h;
- Dehidratacija uzoraka sa biofilmom primenom serije rastućih koncentracija etanola (50%, 60%, 70%, 80%, 90% i 100%) u 3% rastvoru sirćetne kiseline u trajanju od ukupno 1 h;
- Prebacivanje uzoraka materijala sa biofilmom na mesto za sušenje gde je izvršeno nekoliko supstitucija pomoću CO_2 do potpunog sušenja uzoraka materijala;
- Oblaganje (naparivanje) uzoraka materijala slojem zlata u debljini 20 nm, u trajanju od 2 min, sa ciljem očuvanja strukture i provodljivosti elektrona, sprečavanja nakupljanja električnog naboja u uzorku materijala prilikom snimanja, kao i poboljšanja kvaliteta i rezolucije slike bez stvaranja artefakata.

Pozlaćeni uzorci su potom umetnuti u komoru SEM, nakon čega je izvršeno snimanje pri sledećim podešenim parametrima uređaja (Barkarmo i sar., 2019; Giti i sar., 2021; Poole i sar., 2020):

- Napon snimanja 20 kV;
- Uglovi nagiba snimanja od 10° do 45° ;
- Uveličanja slike $\times 500$ i $\times 3500$.

3.5 Ispitivanje formiranog biofilma na površinama materijala u *in situ* uslovima

3.5.1 Anamneza, klinički pregled i izbor učesnika

Za potrebe sprovedenog istraživanja regrutovano je ukupno 28 osoba, od kojih je osmoro isključeno iz istraživanja zbog neispunjavanja zadatih kriterijuma za uključanje u studiju. Među 20 učesnika studije nije zabeleženo nijedno odustajanje za vreme njenog trajanja.

Dvadeset učesnika ($n = 20$; 12 muškaraca i 8 žena, prosečne starosti 25,9 godina) odabrano je na osnovu sledećih kriterijuma uključenja u studiju (Günther i sar., 2022; Jaeggi i sar., 2022; O’Leary i sar., 1972; Silva i sar., 2018; Zaugg i sar., 2017; Zeller i sar., 2020):

- Starost između 20 i 30 godina;
- Odsustvo sistemskih bolesti;
- Odsustvo redovne upotrebe medikamenata na dnevnom nivou;
- Odsustvo antibiotske terapije u poslednja 3 meseca pre početka studije;
- Odsustvo poznate alergijske reakcije na ispitivane materijale;
- Nepušači;
- Ispitanik nije trudnica ili dojilja;
- Prisustvo kompletne denticije;
- Odsustvo kliničkih znakova aktivnih karijesnih lezija ili parodontitisa:
Vrednost dubine sondiranja (DS) na svim prisutnim zubima ≤ 3 mm;
Vrednost nivoa ivice gingive (NIG) na svim prisutnim zubima ≤ 3 mm;
Vrednost nivoa pripojnog epitela (NPE) na svim prisutnim zubima 0 mm;
Vrednost indeksa labavljenja zuba (ILZ) na svim prisutnim zubima 0;
Vrednost indeksa krvarenja gingive na provokaciju (KNP) $< 20\%$;
Vrednost plak indeksa (PI) $< 20\%$.

U prvoj poseti učesnici su obavešteni o ciljevima, proceduri, potencijalnim rizicima i neželjenim efektima, kao i očekivanoj koristi naučnog istraživanja (Prilog 1). Zatim se pristupilo popunjavanju istraživačkog kartona za svakog učesnika, prikupljanjem anamnestičkih podataka i obavljanjem kliničkog pregleda (Prilog 2). Klinički pregled je podrazumevao popunjavanje dijagnostičkog kartona dok su za njegovo izvođenje upotrebljeni instrumenti stomatološko ogledalce i parodontalna sonda graduisana na 1 mm (PCPUNC-15, HU-Friedy, Čikago, Illinois, SAD).

Na osnovu podataka iz dijagnostičkog kartona određeni su sledeći parametri i indeksi:

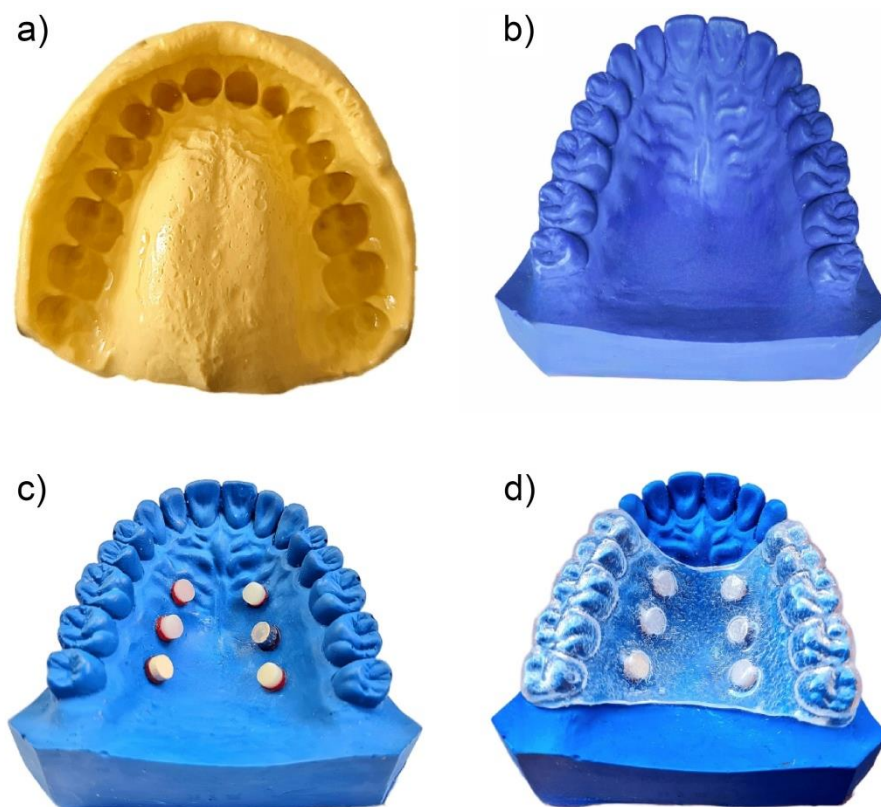
- Dubina sondiranja (DS) - predstavlja rastojanje od ivice slobodne gingive do koronarnog kraja pripojnog epitela tj. dna postojećeg parodontalnog prostora (gingivalni sulkus, gingivalni ili parodontalni džep). Merenje je izvršeno na svim prisutnim zubima u šest referentnih tačaka (vestibulomezijalna, vestibulomedijalna, vestibulodistalna, oromezijalna, oromedijalna i orodistalna) pomoću parodontalne sonde dok su vrednosti izražene u milimetrima.
- Nivo ivice gingive (NIG) - predstavlja rastojanje od ivice slobodne gingive do gleđno-cementne granice zuba. Merenje je, slično kao prilikom merenja DS, izvršeno u istih šest referentnih tačaka pomoću parodontalne sonde dok su vrednosti takođe izražene u milimetrima.
- Nivo pripojnog epitela (NPE) - predstavlja rastojanje od gleđno-cementne granice do koronarnog kraja pripojnog epitela tj. dna postojećeg parodontalnog prostora. Merenje je, slično kao prilikom merenja DS i NIG, izvršeno u istih šest referentnih tačaka pomoću parodontalne sonde dok su vrednosti takođe izražene u milimetrima.
- Indeks labavljenja zuba (ILZ) - predstavlja indeks koji pokazuje prisustvo ili odsustvo labavljenja zuba nakon bimanuelnog pomeranja zuba u vestibulo-oralnom i koronarno-apikalnom pravcu. Vrednosti za svaki zub su izražene brojevima od 0 do 3, pri čemu je vrednost 0 označavala odsustvo labavljenja zuba, vrednost 1 labavljenje zuba u fiziološkim granicama, vrednost 2 labavljenje zuba u iznosu većem od 1 mm u vestibulo-oralnom pravcu dok je vrednost 3 predstavljala labavljenje zuba u iznosu većem od 1 mm u vestibulo-oralnom pravcu uz prisustvo labavljenja i u koronarno-apikalnom pravcu.
- Indeks krvarenja gingive na provokaciju (KNP) - predstavlja indeks koji pokazuje prisustvo ili odsustvo krvarenja gingive nakon dodira parodontalnom sondom. Merenje je, slično kao prilikom merenja DS, NIG i NPE, izvršeno u istih šest referentnih tačaka pomoću parodontalne sonde. U slučaju odsustva pojave krvarenja gingive u roku od 30 s nakon dodira parodontalnom sondom, referentnoj tački dodeljena je vrednost 0 dok je u slučaju prisustva iste, referentnoj tački dodeljena vrednost 1. Vrednost indeksa izražena je zatim u procentima, u rangi od 0 do 100% i predstavlja količnik broja referentnih tačaka sa prisustvom krvarenja na provokaciju i ukupnog broja referentnih tačaka, pomnožen sa 100.
- Plak indeks (PI) - predstavlja indeks koji pokazuje prisustvo ili odsustvo plaka na površini zuba ili u parodontalnom prostoru. Merenje je, slično kao prilikom merenja dubine DS, NIG, NPE i KNP, izvršeno u istih šest referentnih tačaka pomoću parodontalne sonde. Na mestima gde prevlačenjem parodontalne sonde nije detektovan plak na pomenutim površinama i u pomenutim prostorima, referentnoj tački dodeljena je vrednost 0 dok je u slučaju detektovanja istog, referentnoj tački dodeljena vrednost 1. Vrednost indeksa izražena je zatim u procentima, u rangi od 0 do 100% i predstavlja količnik broja referentnih tačaka sa prisustvom plaka i ukupnog broja referentnih tačaka, pomnožen sa 100.

Nakon što je na osnovu prikupljenih anamnestičkih podataka i informacija iz dijagnostičkog kartona ustanovljeno da učesnik ispunjava postavljene kriterijume uključenja u naučno istraživanje, isti je, nakon potpisivanja obrasca informisanog pristanka, uključen u studiju (Prilog 3). U ovoj poseti učesniku je potom izvršeno profesionalno čišćenje čvrstih i mekih naslaga.

3.5.2 Izrada individualnog intraoralnog splinta i njegovo nošenje

U drugoj poseti učesnika (sedam dana nakon prethodne posete) pristupilo se izradi individualnog intraoralnog splinta na sledeći način (Jaeggi i sar., 2022) (Slika 3.17):

- Uzimanje otiska gornjeg zubnog niza učesnika otisnim materijalom ireverzibilnim hidrokoloidom (Tropicalgin, Zhermack, Badija Polezine, Italija) pomoću standardne metalne perforirane otisne kašike (COE Metal Impression Tray, GC America, Olsip, Ilionis, SAD) (Slika 3.17a).
- Izlivanje radnog modela od tvrdog gipsa (PoliDUR Hard dental plaster Type 3, Polident, Volčja Draga, Slovenija) (Slika 3.17b).
- Na radni model, u predelu kosih delova tvrdog nepca u visini između prvog premolara i poslednjeg molara postavljeno je sa svake strane po tri uzorka materijala. Minimalno rastojanje između dva uzorka iznosilo je 3 mm dok je minimalno rastojanje između uzoraka i slobodne gingive zuba iznosilo 5 mm. Uzorci materijala postavljeni na radni model privremeno su pričvršćeni za površinu radnog modela slojem lepljivog voska debljine 2-3 mm (Slika 3.17c) kako bi kasnije prilikom nošenja splinta postojao prostor iste širine između uzoraka u splintu i nepca ispitanika. Ovo je omogućilo lakši protok pljuvačke i njeno zadržavanje na mestima gde se uzorci nalaze.
- Upotrebom vakuum aparata (Erkoloc pro 2.0 × 120 mm, Erkodent Erich Kopp, Pfalzgrafenvajler, Nemačka), preko radnog modela sa postavljenim uzorcima materijala adaptirana je folija od kopoliestera i poliuretana debljine 2 mm (Erkoloc pro 2.0 × 120 mm, Erkodent Erich Kopp, Pfalzgrafenvajler, Nemačka).
- Nakon adaptacije folije, uzorci materijala i lepljivi vosak prstima su istisnuti iz svojih mesta u foliji. Zatim je, kako bi se obezbedio veći protok pljuvačke između splinta i nepca, izvršeno isecanje folije tako da je definitivan splint obuhvatao zube od prvog premolara do poslednjeg molara obostrano, kao i tvrdo nepce u istoj visini.
- Po izradi splinta usledilo je njegovo čišćenje u ultrazvučnom kupatilu, u prisustvu 70% etanola u trajanju od 5 min i u prisustvu destilovane vode u trajanju od dodatnih 5 min. Očišćeni splint zatim je osušen u prisustvu vazduha na sobnoj temperaturi, te izložen prisustvu ultraljubičastog zračenja na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min (Jaeggi i sar., 2022; Silva i sar., 2018; Zaugg i sar., 2017).
- U tako pripremljen splint adaptirani su prethodno očišćeni uzorci materijala, po jedan iz svake grupe (ukupno šest), nasumično raspoređeni kod svakog učesnika (Slika 3.17d), nakon čega je splint sa uzorcima odložen u sterilnu plastičnu kutiju do dalje upotrebe.



Slika 3.17. Izrada individualnog intraoralnog splinta: (a) Otisak gornjeg zubnog niza ispitanika uzet otisnim materijalom ireverzibilnim hidrokoloidom (Tropicalgin, Zhermack, Badija Polezine, Italija). (b) Radni model od tvrdog gipsa (PoliDUR Hard dental plaster Type 3, Polident, Volčja Draga, Slovenija). (c) Uzorci materijala sa slojem lepljivog voska debljine 2-3 mm postavljeni na radni model. (d) Individualni intraoralni splint sa nasumično raspoređenim uzorcima, po jednim iz svake od šest grupa ispitivanih materijala.

U trećoj poseti (tri dana nakon prethodne posete) svakom učesniku je predat individualni intraoralni splint i data uputstva za njegovo nošenje koja su podrazumevala nošenje splinta u ukupnom trajanju od 24 h, uključujući i noću, sa ukupno četiri pauze, tri pauze od po 30 min za tri obroka u toku dana, kao i jedna pauza od 5 min za održavanje oralne higijene pred spavanje. Svim učesnicima studije je za proceduru obavljanja oralne higijene obezbeđena ista pasta za zube (Curaprox Enzycal, Curaden, Kriens, Švajcarska) dok upotreba antibakterijskih tečnosti za ispiranje usta tokom perioda akumulacije nije bila dozvoljena. Učesnicima je savetovano da za vreme pauza odlože splint u plastičnu kutiju sa 0,9% sterilnim fiziološkim rastvorom koja je im uručena zajedno sa splintom (Zeller i sar., 2020).

U četvrtoj poseti (24 h nakon prethodne posete) učesnik je predao individualni intraoralni splint sa uzorcima materijala rukovodiocima istraživanja, nakon čega je isti odložen u sterilnu plastičnu kutiju do daljih analiza.

3.5.3 Određivanje ukupnog broja bakterija metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu

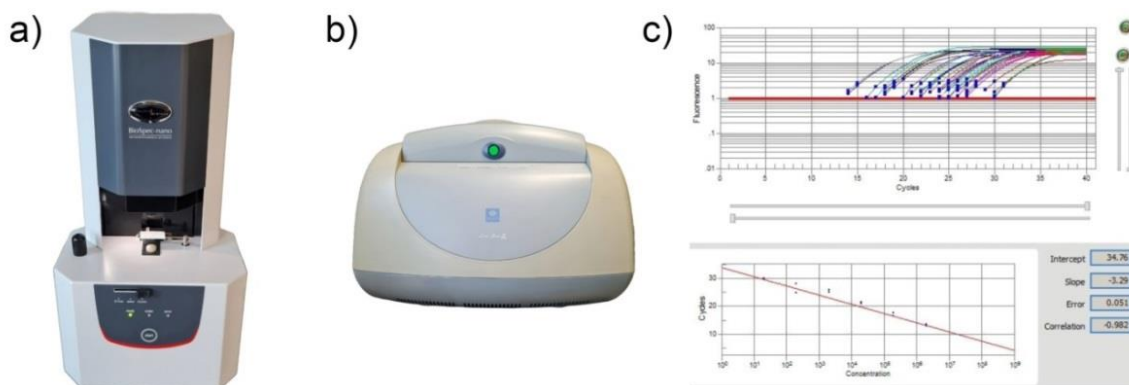
Ukupan broj bakterija usne duplje u biofilmu formiranom na površinama uzoraka ispitivanih materijala određen je pomoću metode lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)*) (Brajović i sar., 2016; Dige i sar., 2009; Sotozono i sar., 2021). Postupak je sproveden na 108 uzoraka, 18 po grupi materijala ($n = 18$), koje je pomoću splintova nosilo 18 nasumično odabranih učesnika studije.

Po predaji splinta izvršeno je njegovo blago ispiranje 0,9% sterilnim fiziološkim rastvorom kako bi se sa uzoraka u splintu uklonio višak pljuvačke. Uzorci su zatim pažljivo, sterilnom stomatološkom pincetom, izvađeni iz splinta i postavljeni u sterilne tube za mikrocentrifugiranje zapremine 1,5 ml koje su potom odložene u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalje upotrebe.

U sledećem koraku izvršena je izolacija ukupne bakterijske DNK sa površina uzoraka materijala metodom prokuvavanja. Uzorci su najpre inkubirani u 300 μl 50 mM vodenog rastvora NaOH u termo-šejkeru (Thermo-Shaker TS-100C, Biosan, Riga, Letonija), u trajanju od 5 min, na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zatim je, u cilju stabilizacije i prezervacije molekula DNK, u rastvor dodato 30 μl 1M vodenog rastvora Tris-HCl (Tris-HCl (tris-(hidroksimetil)-aminometan hidrohlorid) pH vrednosti 8. Čistoća i koncentracija izolovane DNK određena je upotrebom spektrofotometra (BioSpec Nano, Shimadzu, Tokio, Japan) (Slika 3.18a), nakon čega je izolovana bakterijska DNK odložena u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalje upotrebe.

Određivanje ukupnog broja kopija bakterijske DNK u analiziranim uzorcima materijala izvršeno je pomoću *real-time* PCR metode na uređaju za detekciju fluorescencije (Line Gene-K fluorescence PCR detection system, BIOER, Šangaj, Kina) (Slika 3.18b). U reakcionu smešu koja sadrži 10 μl *real-time* PCR master miksa (Luna Universal qPCR Master Mix 2X, New England Biolabs, Ipsvič, Masačusets, SAD) dodato je po 1 μl prednjeg i reverznog prajmera za visoko konzerviranu sekvencu 16S ribozoma DNK (u konačnoj koncentraciji od 200 nmol/l), 6 μl nukleaza-slobodne vode i 2 μl prethodno izolovane bakterijske DNK. Sekvenca prednjeg prajmera EuF je bila TCCTACGGGAGCACAGT, a sekvenca reverznog prajmera EuR GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT.

Amplifikacija bakterijske DNK izvršena je prema uputstvu proizvođača hemikalija i u skladu sa neophodnom temperaturom hibridizacije korišćenih prajmera. Nakon početne denaturacije (5 min, na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$), radi umnožavanja bakterijske DNK izvršeno je 35 ciklusa denaturacije (60 s, na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$), hibridizacije (60 s, na $55\text{ }^{\circ}\text{C}$) i elongacije molekula DNK (90 s, na $72\text{ }^{\circ}\text{C}$). Reakcija je završena konačnom elongacijom u trajanju od 5 min, na $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Šest serijskih razblaženja (1:10) DNK ekstrahovane iz referentnog bakterijskog soja *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845 (Microbiologics KWIK-STIK, Manasas, Virdžinija, SAD) uključeno je u svaki ciklus gde su korišćena za generisanje standardnih kriva iz kojih je ekstrapoliran ukupan broj kopija bakterijske DNK (Slika 3.18c).



Slika 3.18. Metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu: (a) Spektrofotometar (BioSpec Nano, Shimadzu, Tokio, Japan). (b) Uređaj za detekciju fluorescencije (Line Gene-K fluorescence PCR detection system, BIOER, Šangaj, Kina). (c) Standardna kriva reakcije.

3.5.4 Analiza formiranog biofilma upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa

Slično kao prilikom izvođenja *in vitro* dela studije, u cilju vizuelizacije biofilma formiranog na površinama ispitivanih materijala u 2D korišćen je skenirajući elektronski mikroskop (SEM). Postupak je sproveden na 12 uzoraka, dva po grupi materijala ($n = 2$), koje je pomoću splintova nosilo dva nasumično odabrana učesnika studije. Po vađenju uzoraka iz splinta, uzorci su podlegli identičnom postupku pripreme za snimanje, nakon čega je sam proces snimanja izvršen prema istim postavljenim parametrima, kao i u ranije opisanom *in vitro* delu studije.

3.6 Statistička analiza podataka

U cilju određivanja veličine uzorka korišćen je kompjuterski program G*Power 3.1.9.7 (Heinrich Heine University, Dizeldorf, Nemačka) sa intervalom poverenja od 95% i statističkom snagom od 95%. Na osnovu prikupljenih informacija formirana je baza podataka u kompjuterskom programu (IBM SPSS v22.0, SPSS, Čikago, Illinois, SAD) u kom je izvršena statistička analiza.

Istraživanje nije uključivalo analizu atributivnih podataka, te se testovi za analizu takve vrste podataka nisu koristili. Prilikom analize numeričkih podataka najpre je izvršeno testiranje normalnosti njihove raspodele pomoću *Kolmogorov-Smirnov* testa, sa nivoom statističke značajnosti postavljenim na $\alpha = 0,05$ i statističkom snagom od 80%. Analiza numeričkih podataka izvršena je različitim testovima u zavisnosti od prirode raspodele samih podataka. Numerički podaci koji su pokazali normalan tip raspodele ($p > 0,05$) poređeni su između grupa materijala koristeći jednofaktorsku analizu varijanse (engl. *one way analysis of variance (ANOVA)*) praćenu *Tukey post hoc* testom. Numerički podaci koji su pokazali tip raspodele drugačiji od normalne ($p < 0,05$) poređeni su između grupa materijala upotrebom *Kruskal-Wallis* testa i *Dunn post hoc* analize. Stepenn povezanosti (korelacije) između željenih numeričkih podataka ispitivan je upotrebom *Spearman* koeficijenta korelacije rangova.

U cilju opisa numeričkih podataka korišćene su metode deskriptivne statistike. Za opis numeričkih podataka koji su pokazali normalan tip raspodele podataka ($p > 0,05$) kao mera centralne tendencije korišćena je aritmetička sredina (engl. *mean*) dok je kao mera varijabiliteta korišćena standardna devijacija (engl. *standard deviation*). Za opis numeričkih podataka koji su pokazali tip raspodele drugačiji od normalne ($p < 0,05$) kao mera centralne tendencije korišćena je medijana (engl. *median*) dok su kao mere varijabiliteta korišćene minimalna i maksimalna vrednost (engl. *minimum - maximum*). Svi dobijeni podaci prikazani su tabelarno ili grafički, a svaka p vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1 Rezultati ispitivanja karakteristika površine materijala

4.1.1 Rezultati merenja površinske hrapavosti

Rezultati merenja površinske hrapavosti prikazani su u tabeli 4.1.

Uzorci grupe cirkonija glazirana (CG) pokazali su statistički značajno više vrednosti ($p < 0,05$) srednjeg aritmetičkog odstupanja (Ra) i maksimalne visine neravnina (Rz) profila merenja hrapavosti površine u poređenju sa drugim grupama ispitivanih materijala.

Niže vrednosti Ra i Rz demonstrirali su uzorci grupa poli (etar etar keton) (PEEK), kobalt-hrom legura (CoCr) i kompozit na bazi smole (KBS). Posmatrajući vrednosti Ra navedene tri grupe materijala, KBS grupa pokazala je statistički značajno nižu vrednost jedino u poređenju sa PEEK ($p = 0,048$) dok je u vrednosti Rz uočena statistička značajnost u poređenju KBS sa obe navedene grupe uzoraka ($p < 0,001$).

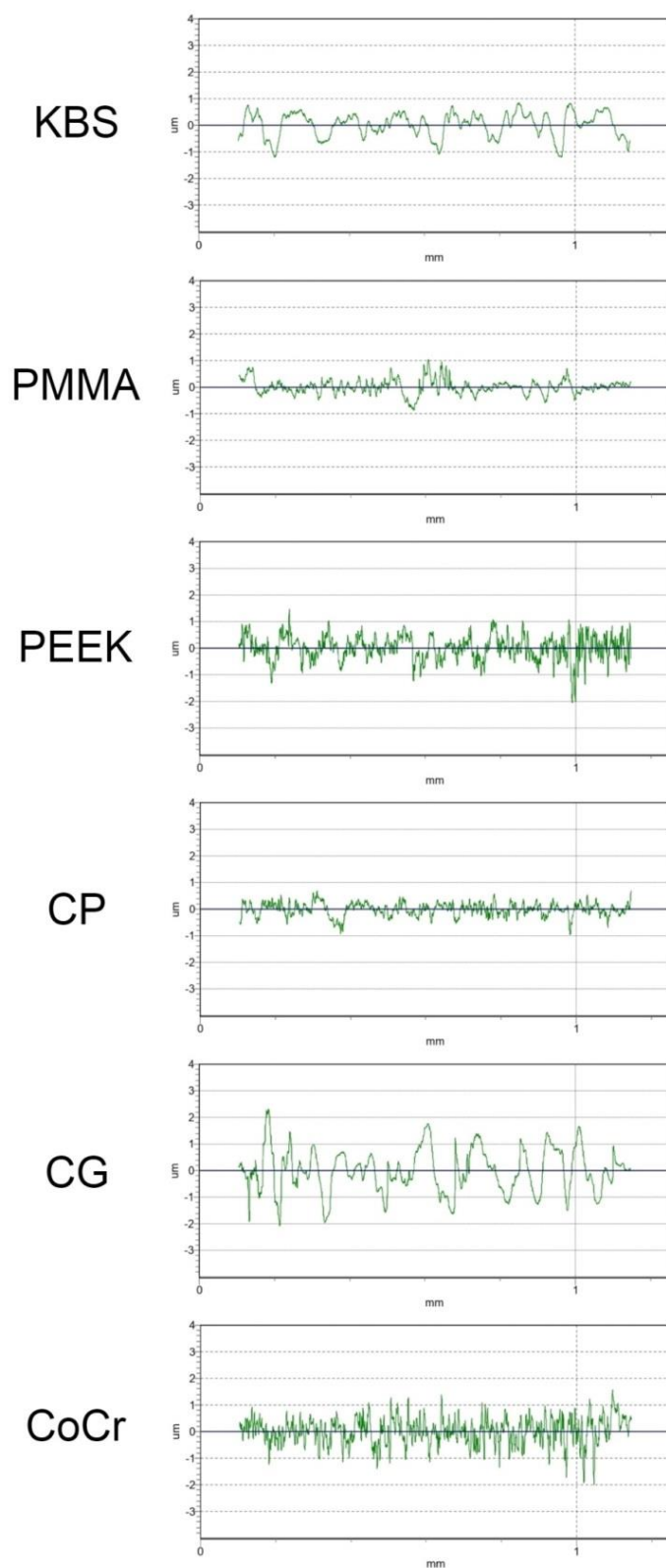
U poređenju sa drugim grupama, grupe cirkonija polirana (CP) i poli (metil metakrilat) (PMMA) pokazale su statistički značajno niže vrednosti oba parametra hrapavosti ($p < 0,05$), s izuzetkom u odnosu vrednosti Rz gde između PMMA i KBS nije uočeno prisustvo statističke značajnosti ($p > 0,05$). Iako su uzorci CP grupe demonstrirali najmanje hrapave površine, poredivši međusobno grupe CP i PMMA nije uočena statistički značajna razlika ni u jednom od dva merena parametra hrapavosti površine ($p > 0,05$).

Tabela 4.1. Rezultati merenja površinske hrapavosti.

Grupa	Ra (μm) Medijana (min - max)	Rz (μm) Medijana (min - max)
KBS	0,33 (0,18 - 0,46) ^c	1,75 (1,24 - 2,15) ^d
PMMA	0,29 (0,18 - 0,45) ^d	1,58 (1,24 - 1,98) ^{d, e}
PEEK	0,36 (0,29 - 0,42) ^b	2,00 (1,65 - 2,77) ^c
CP	0,25 (0,21 - 0,30) ^d	1,49 (1,20 - 1,92) ^e
CG	0,68 (0,61 - 0,79) ^a	3,54 (3,05 - 4,25) ^a
CoCr	0,35 (0,26 - 0,47) ^{b, c}	2,39 (2,09 - 3,20) ^b

KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura; Ra - srednje aritmetičko odstupanje profila merenja hrapavosti površine; Rz - maksimalna visina neravnina profila merenja hrapavosti površine; μm - mikrometar; min - minimum; max - maksimum. Različita slova ukazuju na prisustvo statistički značajne razlike između grupa za dati parametar ($p < 0,05$; Dunn post hoc test).

Dijagram krive profila merenja površinske hrapavosti reprezentativnih uzoraka svake grupe materijala (Slika 4.1) potvrdile su prethodno iznete numeričke rezultate.



Slika 4.1. Dijagram krive profila merenja površinske hrapavosti reprezentativnih uzoraka grupa ispitivanih materijala, dobijene analizom pomoću kontaktnog profilometra. KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.

Kriva reprezentativnog uzorka CG grupe demonstrirala je izuzetnu nepravilnost, karakterisanu izraženim visinskim razlikama između vrhova (engl. *peaks*) i dolina (engl. *valleys*), kao i odsustvom oštih i strmih delova duž čitavog datog profila merenja. Nasuprot tome, uzorak CP grupe prikazao je homogeniji, pravilniji tok dijagram krive na kojoj se zapaža mnoštvo strmih delova, kao i manja razlika u visini između vrhova i dolina.

Sličan oblik poput krive CP uzorka pokazale su krive uzoraka KBS i PMMA grupe. Međusobnim poređenjem dijagram kriva te dve grupe materijala može se uočiti blagi tok KBS krive sa većom distancom između dva vrha, odnosno dve doline na prikazanom profilu merenja u poređenju sa strmijom krivom reprezentativnog uzorka PMMA grupe.

Površine reprezentativnih uzoraka PEEK i CoCr grupe otkrile su najstrmije dijagram krive u poređenju sa drugim grupama ispitivanih materijala. Duž čitavog profila merenja prostiru se visoki vrhovi, međusobno bliski jedan drugom, između kojih se usecaju izražena udubljenja.

4.1.2 Rezultati merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i izračunavanja površinske slobodne energije

Rezultati merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i izračunate vrednosti površinske slobodne energije (engl. *surface free energy (SFE)*) uzoraka grupa ispitivanih materijala sažeti su u tabeli 4.2.

Grupa uzoraka CG pokazala je najniže vrednosti kontaktnih uglova za dve od tri referentne tečnosti u poređenju sa drugim grupama ispitivanih materijala. Posmatrajući vrednosti kontaktnog ugla destilovane vode (KUV) uočena je statistička značajnost u poređenju CG grupe sa PEEK ($p < 0,001$) i CoCr ($p = 0,027$) dok je vrednost kontaktnog ugla etilen glikola (KUE) CG grupe uzoraka bila statistički značajno niža u poređenju sa svim preostalim grupama ispitivanih materijala ($p < 0,001$).

Nasuprot CG, PEEK grupa uzoraka demonstrirala je najviše vrednosti kontaktnih uglova dve od tri referentne tečnosti u poređenju s preostalim grupama. Uzeći u obzir KUV, uzorci PEEK grupe bili su jedini na kojima je izmerena vrednost viša od 90° . Ipak, osim pomenute statističke značajnosti u poređenju sa CG grupom ($p < 0,001$), vrednost KUV PEEK grupe nije bila statistički značajno viša u poređenju sa drugim grupama ispitivanih materijala ($p > 0,05$). Međutim, uzimajući u obzir KUE, PEEK grupa pokazala je statistički značajno višu vrednost u poređenju sa PMMA ($p = 0,005$), kao i svim preostalim grupama ispitivanih materijala ($p < 0,001$).

Uzorci CoCr grupe prednjačili su sa najvišom izmerenom vrednošću kontaktnog ugla dijudmetana (KUD). Ipak, statistička značajnost uočena je jedino u poređenju KUD ove grupe sa KUD grupa CG ($p = 0,015$), PEEK ($p = 0,004$) i PMMA ($p < 0,001$).

Uzorci grupa KBS, PMMA i CP nisu ni za jednu od korišćenih referentnih tečnosti demonstrirali najviše, a ni najniže vrednosti izmerenih kontaktnih uglova. Takođe, međusobnim poređenjem ove tri grupe ispitivanih materijala nije uočena statistički značajna razlika u vrednostima kontaktnih uglova ni za jednu od korišćenih referentnih tečnosti ($p > 0,05$).

Izmerene vrednosti kontaktnih uglova tri referentne tečnosti omogućile su izračunavanje SFE na osnovu ranije objašnjene *Van Oss-Chaudhury-Good* formule termodinamičkog pristupa za tri različite tečnosti (Van Oss i sar., 1988). Iz dobijenih vrednosti SFE moglo se uočiti prisustvo statistički značajno više vrednosti u CG grupi u poređenju sa uzorcima preostalih grupa materijala ($p < 0,001$). Najniže vrednosti SFE zabeležene su u grupama CoCr, KBS i PEEK, između kojih nije uočeno prisustvo statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

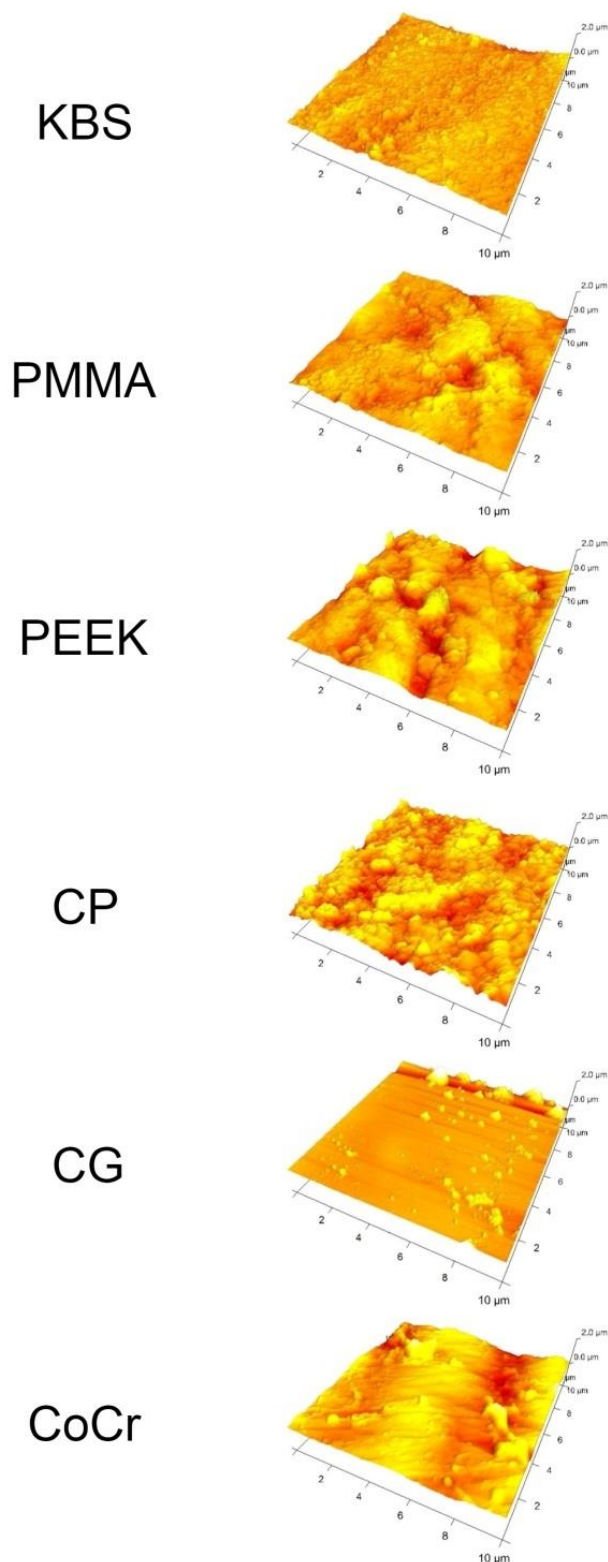
Tabela 4.2. Rezultati merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i izračunavanja vrednosti površinske slobodne energije.

Grupa	KUV (°) Medijana (min - max)	KUE (°) Srednja vrednost $\pm$ SD	KUD (°) Srednja vrednost $\pm$ SD	SFE (mN/m)
KBS	85,47 (71,51 - 97,37) ^{a, b}	61,22 $\pm$ 6,72 ^b	51,53 $\pm$ 2,69 ^{a, b}	41,72 $\pm$ 9,45 ^{c, d}
PMMA	78,96 (69,65 - 84,40) ^{a, b}	68,38 $\pm$ 4,62 ^b	42,16 $\pm$ 3,85 ^b	52,88 $\pm$ 4,16 ^b
PEEK	96,04 (92,87 - 98,85) ^a	81,45 $\pm$ 2,87 ^a	46,13 $\pm$ 10,59 ^b	41,48 $\pm$ 4,22 ^{c, d}
CP	75,52 (65,17 - 81,05) ^{a, b}	58,68 $\pm$ 6,23 ^{b, c}	55,10 $\pm$ 3,39 ^{a, b}	48,31 $\pm$ 4,50 ^{b, c}
CG	43,26 (36,31 - 46,88) ^b	28,92 $\pm$ 3,67 ^d	48,32 $\pm$ 6,57 ^b	72,04 $\pm$ 2,56 ^a
CoCr	86,18 (81,48 - 91,74) ^a	51,04 $\pm$ 5,09 ^c	63,70 $\pm$ 8,98 ^a	32,57 $\pm$ 6,20 ^d

KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura; KUV - kontaktni ugao destilovane vode; KUE - kontaktni ugao etilen glikola; KUD - kontaktni ugao dijudmetana; SFE - površinska slobodna energija (engl. *surface free energy*); min - minimum; max - maksimum; SD - standardna devijacija; mN - milinjutn; m - metar. Različita slova ukazuju na prisustvo statistički značajne razlike između grupa za dati parametar ($p < 0,05$; *Dunn* post hoc test za KUV; *Tukey* post hoc test za KUE, KUD i SFE).

4.1.3 Rezultati analize površinske morfologije upotrebom mikroskopa atomskih sila

Visokokvalitetni trodimenzionalni (3D) snimci morfologije površine uzoraka grupa materijala nastali upotrebom mikroskopa atomskih sila (engl. *atomic force microscope (AFM)*) prikazani su na slici 4.2.



Slika 4.2. Rezultati analize površinske morfologije upotrebom mikroskopa atomskih sila. KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.

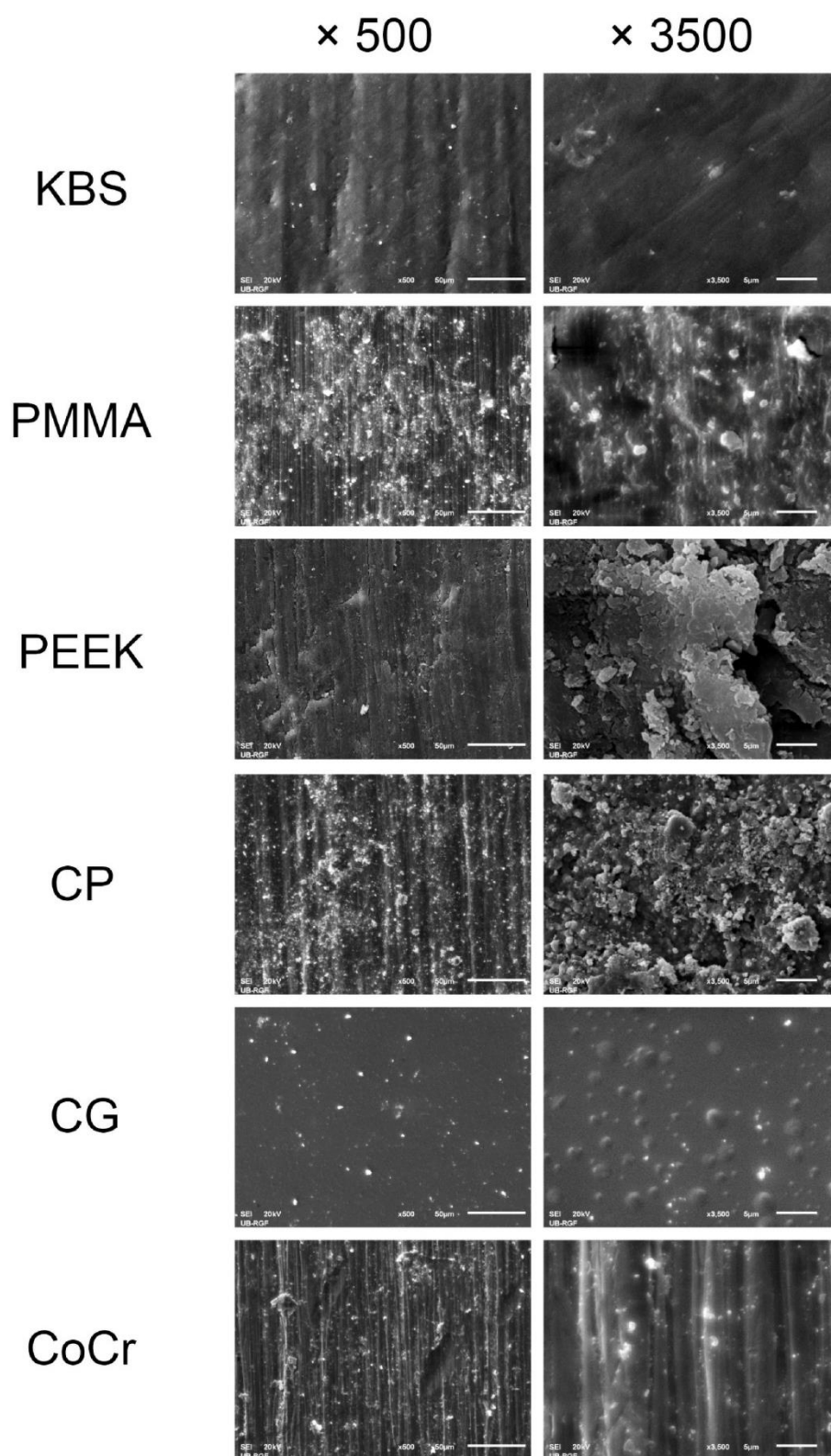
Površina uzorka CG grupe okarakterisana je prisustvom lamelarne strukture sa svega nekoliko istaknutih konusnih formacija različitih visina, okruženih plitkim jamicama i fisurama. S druge strane, AFM 3D analiza pokazala je homogenu površinu CP uzorka sa dominacijom granulastih struktura po čitavom polju snimanja i odsustvom oštih i strmih delova. Slična morfologija zapažena je i na površinama uzoraka PMMA i PEEK grupe, na kojima su uočene masivne kupole razdvojene dolinama nešto veće dubine u poređenju sa onima na površini CP uzorka. Za površinu uzorka CoCr grupe mogla se ustanoviti mešovita površinska tekstura, nastala usled kombinacije lamelarnih delova i brojnih zrnastih čestica različitog oblika. Na levoj i desnoj strani snimka jasno su vidljiva dva paralelna uzdužna žleba duž celog snimka. AFM 3D snimak uzorka KBS grupe prikazao je regularnu distribuciju stotine pravilno raspoređenih, šiljatih, strmih vrhova, okruženih plitkim dolinama po čitavoj snimljenoj površini uzorka.

4.1.4 Rezultati analize površinske morfologije upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa

Rezultati prikaza površine uzoraka ispitivanih materijala u dvodimenzionalnom (2D) prostoru, nastali upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (engl. *scanning electron microscope (SEM)*) prikazani su na slici 4.3.

Mikrografi su bili u visokom stepenu komplementarni prethodno prikazanim AFM snimcima. Na snimljenim površinama uzoraka svih grupa ispitivanih materijala uočena je u manjem ili većem opsegu heterogenost površinske morfologije okarakterisana prisustvom brojnih defekata poput pukotina, rascepa i žlebova različite dubine, nastalih kao posledica postupaka završne mehaničke obrade i poliranja.

Posmatrajući mikrograf nastao na manjem uveličanju ($\times 500$), zapažena je pravilna i relativno homogena struktura površine uzorka CG grupe dok je tek na većem uveličanju ($\times 3500$) omogućen uvid u nekoliko nasumično raspoređenih okruglih ili trouglastih uzvišenja nalik ostrvcima, ranije predstavljenih na AFM 3D snimcima u vidu izdignutih konusnih formacija različitih visina. Za razliku od CG grupe, 2D CP mikrografi demonstrirali su manje homogenu strukturu površine datog uzorka. Između nekoliko uzdužnih žlebova nastalih kao posledica završne mehaničke obrade i poliranja prostiru se zrnaste formacije različite veličine duž čitavog polja snimanja, jasno uočljive na većem uveličanju. Pomenuti uzdužni žlebovi najizraženije su vidljivi na snimku uzorka CoCr grupe. Saglasno sa AFM 3D snimkom uočeni su veći i manji defekti površine koji doprinose vrlo varijabilnoj teksturi. Površine uzoraka PMMA i PEEK grupe bile su nalik jedna drugoj sa mnoštvom nepravilnih elipsastih delova, većih dimenzija na PEEK uzorku, okruženih sa svega nekoliko uzdužnih žlebova. KBS uzorak demonstrirao je ravnu i homogenu morfologiju površine sa malim brojem izbočina vidljivih na većem uveličanju. Međutim, SEM 2D mikrografi nisu izrazili brojne, dobro organizovane uzdignute strme delove kao što je to prikazao AFM 3D snimak, ukazujući na njihove male dimenzije, teško vidljive na oba korišćena uveličanja SEM analize.



Slika 4.3. Rezultati analize površinske morfologije upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa. KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.

4.2 Rezultati ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u *in vitro* uslovima

4.2.1 Rezultati brojanja formiranih kolonija mikroorganizama

Rezultati brojanja formiranih kolonija (engl. *colony forming units (CFU)*) mikroorganizama po mililitru tečnosti (Slika 4.4) demonstrirali su prisustvo statistički značajne razlike u vrednostima CFU/ml između grupa ispitivanih materijala za sve mikroorganizme uključene u studiju ($p < 0,001$).

Posmatrajući broj adheriranih *Streptococcus mutans* (Slika 4.4a), uočena je statistički značajno viša vrednost CFU/ml u CG grupi u poređenju sa preostalim grupama materijala ($p < 0,001$). Površine uzoraka grupa PMMA i PEEK pokazale su nešto manji broj adheriranih *Strep. mutans*, a poređenjem vrednosti CFU/ml ove dve grupe nije zabeležena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Najmanji broj pomenutih bakterija bio je prisutan na površinama uzoraka CP grupe. Ipak, poredivši CP sa CoCr i KBS, nije uočena statistička značajnost u vrednosti ispitivanog parametra ($p > 0,05$).

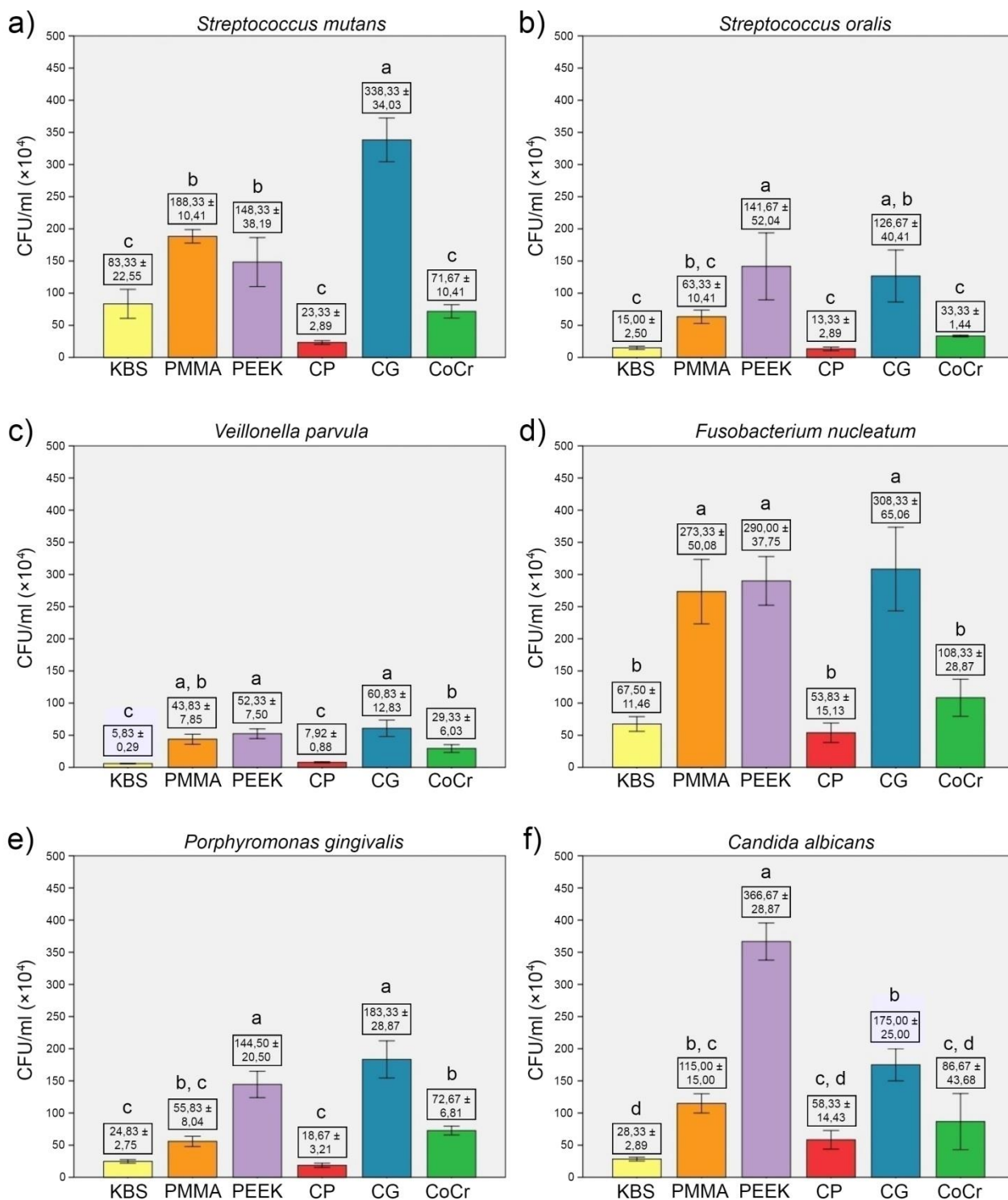
Vrednosti CFU/ml *Streptococcus oralis* (Slika 4.4b) bile su najizraženije u grupama PEEK i CG, između kojih nije uočeno prisustvo statistički značajne razlike ($p > 0,05$). Slično poput CFU/ml *Strep. mutans*, uzorci CP, KBS i CoCr pokazali su manju prijemчивost ka *Strep. oralis* u poređenju sa preostale tri grupe uzoraka. Ipak, poredivši PMMA sa navedene tri grupe, nije uočeno prisustvo statistički značajne razlike u CFU/ml *Strep. oralis* ($p > 0,05$).

Sličan trend primećen je prilikom kvantifikacije adheriranih *Veillonella parvula* (Slika 4.4c). U grupi CG ponovo je uočen najveći afinitet ka adheziji mikroorganizama. Ipak, statistički značajna razlika u vrednostima CFU/ml zabeležena je u poređenju ove grupe jedino sa CoCr ($p = 0,002$), kao i grupama KBS i CP ($p < 0,001$). Uzorci KBS i CP pokazali su najmanji afinitet ka adheziji *V. parvula*. Ipak, za razliku od prethodno opisanog brojanja streptokoka, nešto niža vrednost CFU/ml zabeležena je u KBS grupi u poređenju sa CP ($p > 0,05$).

Rezultati CFU/ml *Fusobacterium nucleatum* (Slika 4.4d) ukazali su na jasnu podelu između grupa ispitivanih materijala. Naime, uzorci grupa CG, PEEK i PMMA adherirali su statistički značajno veći broj bakterija u poređenju sa CP, KBS i CoCr ($p < 0,05$). CP grupa uzoraka pokazala je najmanju prijemчивost površina ka adheziji *F. nucleatum*, sa nešto nižim vrednostima CFU/ml u poređenju sa KBS grupom ($p > 0,05$).

Adhezija *Porphyromonas gingivalis* (Slika 4.4e) bila je najizraženija na uzorcima CG i PEEK grupe, uz prisustvo statistički značajne razlike u vrednosti CFU/ml u poređenju sa preostalim grupama ispitivanih materijala ($p < 0,05$). Nasuprot njima, uzorci grupa CP i KBS pokazali su najmanji afinitet ka adheziji *P. gingivalis*, uz odsustvo statistički značajne razlike u vrednostima CFU/ml između ove dve grupe ($p > 0,05$).

Posmatrajući CFU/ml *Candida albicans* (Slika 4.4f), statistički značajno viša vrednost zabeležena je u PEEK grupi u poređenju sa drugim grupama ispitivanih materijala ($p < 0,001$). Grupe CG i PMMA zabeležile su takođe visoke vrednosti adheriranih gljivica, uz odsustvo statističke značajnosti u vrednostima CFU/ml između ove dve grupe uzoraka ($p > 0,05$). Najmanja količina adheriranih *C. albicans* zabeležena je u KBS grupi, nešto niža u poređenju sa grupama CP i CoCr ($p > 0,05$).



Slika 4.4. Rezultati brojanja formiranih kolonija mikroorganizama: a) *Streptococcus mutans*. b) *Streptococcus oralis*. c) *Veillonella parvula*. d) *Fusobacterium nucleatum*. e) *Porphyromonas gingivalis*. f) *Candida albicans*. CFU/ml - broj formiranih kolonija (engl. colony forming units) mikroorganizama po mililitru tečnosti; KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Različita slova ukazuju na prisustvo statistički značajne razlike između grupa za dati parametar ($p < 0,05$; Tukey post hoc test).

Povezanost (korelacija) površinske hrapavosti i biofilma formiranog na površinama materijala u *in vitro* uslovima prikazani su kao odnos srednjeg aritmetičkog odstupanja profila merenja hrapavosti površine (*Ra*) i broja formiranih kolonija svakog ispitivanog mikroorganizma na površinama uzoraka grupa materijala (CFU/ml), u vidu *Spearman* koeficijenta korelacije rangova (Tabela 4.3).

Posmatrajući dobijene rezultate, između *Ra* i CFU/ml *Strep. mutans*, *Strep. oralis*, *F. nucleatum* i *P. gingivalis* uočeno je prisustvo umerene pozitivne korelacije dok je između *Ra* i CFU/ml *V. parvula* i *C. albicans* zabeležena slaba pozitivna korelacija. Pritom, statistička značajnost ($p < 0,05$) uočena je u odnosu *Ra* sa CFU/ml *Strep. oralis*, *F. nucleatum* i *P. gingivalis*.

Tabela 4.3. Rezultati ispitivanja povezanosti (korelacije) površinske hrapavosti i biofilma formiranog na površinama materijala u *in vitro* uslovima.

Povezani parametri	ρ	Opis povezanosti	Statistička značajnost
<i>Ra</i> - CFU/ml <i>Streptococcus mutans</i>	0,405	Umerena pozitivna	$p = 0,095$
<i>Ra</i> - CFU/ml <i>Streptococcus oralis</i>	0,581	Umerena pozitivna	$p = 0,011^*$
<i>Ra</i> - CFU/ml <i>Veillonella parvula</i>	0,385	Slaba pozitivna	$p = 0,115$
<i>Ra</i> - CFU/ml <i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,542	Umerena pozitivna	$p = 0,020^*$
<i>Ra</i> - CFU/ml <i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,596	Umerena pozitivna	$p = 0,009^*$
<i>Ra</i> - CFU/ml <i>Candida albicans</i>	0,234	Slaba pozitivna	$p = 0,350$
<i>Ra</i> - srednje aritmetičko odstupanje profila merenja hrapavosti površine; CFU/ml - broj formiranih kolonija (engl. <i>colony forming units</i>) mikroorganizama po mililitru tečnosti; ρ - vrednost <i>Spearman</i> koeficijenta; * - statistički značajno.			

4.2.2 Rezultati testa vijabilnosti (održivosti) ćelija mikroorganizama

Rezultati testa vijabilnosti (održivosti) ćelija mikroorganizama (engl. *cell viability assay*) predstavljeni su na slici 4.5. Slično poput rezultata brojanja formiranih kolonija mikroorganizama, između grupa ispitivanih materijala zabeleženo je prisustvo statistički značajne razlike u vrednostima optičke gustine (engl. *optical density (OD)*) ranije opisanog obojenog jedinjenja na talasnoj dužini 540 nm za sve mikroorganizme uključene u studiju ($p < 0,05$).

Rezultati vijabilnosti *Strep. mutans* (Slika 4.5a) pokazali su najvišu vrednost OD 540 nm u CG grupi. Međutim, data vrednost bila je statistički značajno viša jedino u poređenju sa vrednošću istog parametra CP grupe uzoraka ($p = 0,04$), na čijim površinama je zabeležen najmanji broj vijabilnih ćelija *Strep. mutans*. Poređenjem preostalih grupa materijala, zapaženo je odsustvo statistički značajne razlike u vrednostima OD 540 nm obojenog jedinjenja ($p > 0,05$).

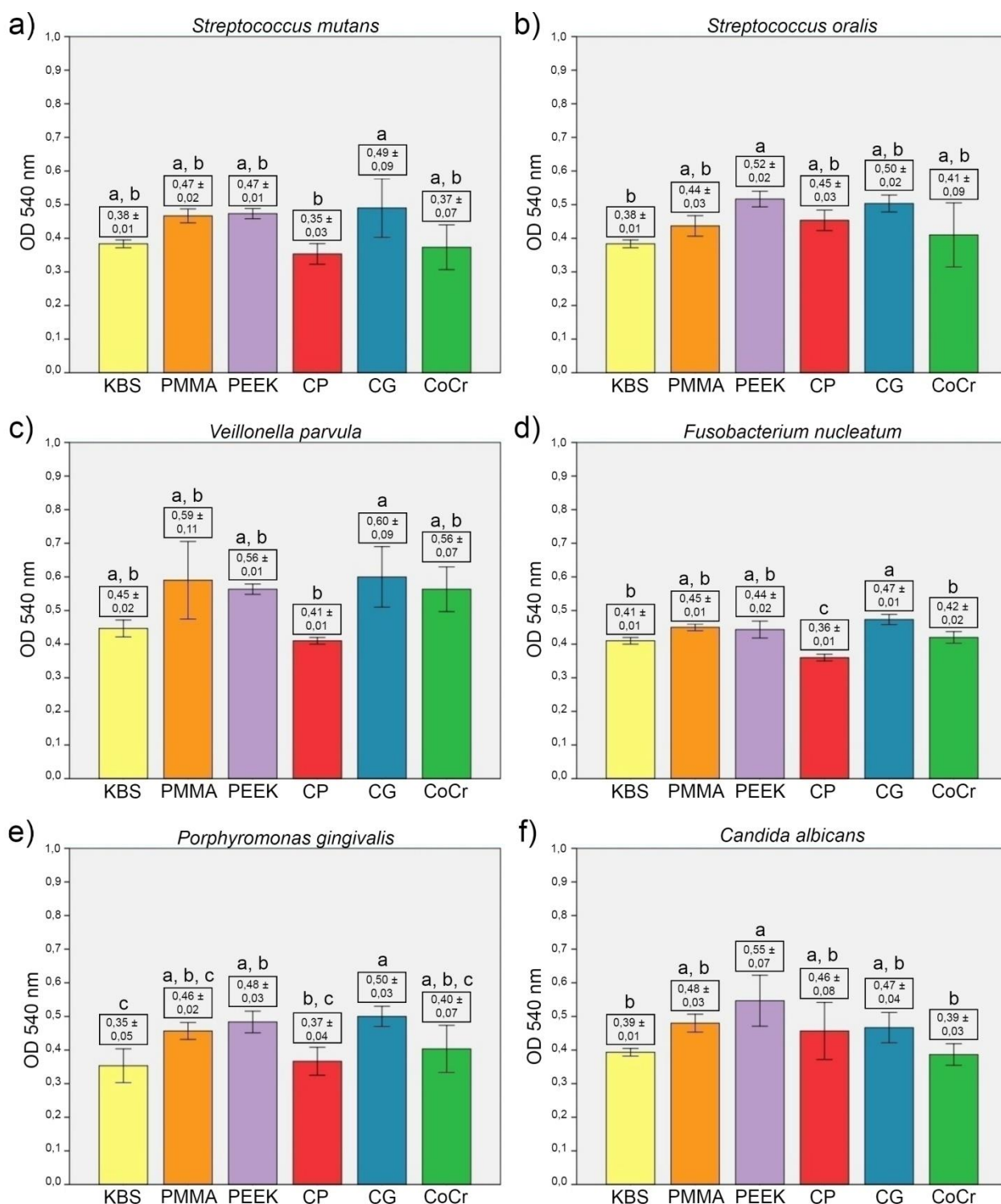
Analizirajući vijabilnost ćelija *Strep. oralis* (Slika 4.5b), najviša vrednost OD 540 nm zabeležena je u PEEK grupi uzoraka što je bilo statistički značajno jedino u poređenju sa KBS grupom ($p = 0,033$). Broj vijabilnih ćelija *Strep. oralis* nije bio statistički značajno drugačiji, međusobnim poređenjem preostalih grupa ispitivanih materijala ($p > 0,05$).

Slično poput rezultata vijabilnosti *Strep. mutans*, ispitujući vijabilnost ćelija *V. parvula* (Slika 4.5c) uočena je statistički značajno viša vrednost OD 540 nm u CG grupi, u poređenju sa CP grupom uzoraka ($p = 0,041$). Takođe, poredivši vrednosti istog parametra između preostalih grupa materijala, nije zapaženo prisustvo statistički značajne razlike u vijabilnosti ove bakterije ($p > 0,05$).

Statistički značajno manji broj vijabilnih ćelija *F. nucleatum* (Slika 4.5d) zabeležen je u CP grupi uzoraka u poređenju sa KBS ($p = 0,02$), CoCr ($p = 0,005$), kao i preostalim grupama ispitivanih materijala ($p < 0,001$). Najviša vrednost OD 540 nm zabeležena je u CG grupi, međutim bez prisustva statističke značajnosti u poređenju sa vrednostima PMMA i PEEK grupe ($p > 0,05$).

Najveći broj vijabilnih ćelija *P. gingivalis* (Slika 4.5e) uočen je u CG grupi uzoraka, statistički značajno jedino u poređenju sa grupama KBS ($p = 0,015$) i CP ($p = 0,029$) čiji su uzorci pokazali najniže vrednosti OD 540 nm za ćelije datog mikroorganizma, uz odsustvo međusobne statističke značajnosti ($p > 0,05$).

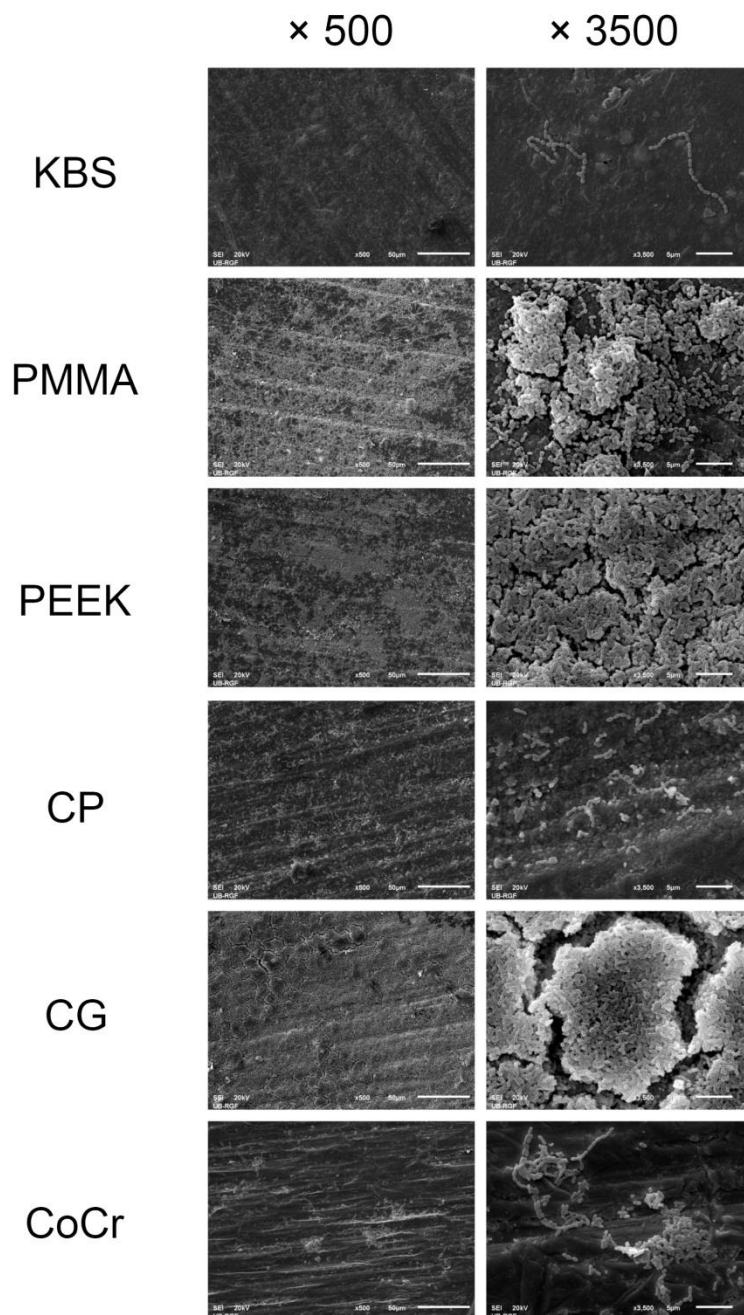
PEEK grupa uzoraka pokazala je najveći broj vijabilnih ćelija *C. albicans* (Slika 4.5f) na svojim površinama, ipak bez statistički značajne razlike u poređenju sa uzorcima grupa PMMA, CG i CP ($p > 0,05$). Najmanja vijabilnost *C. albicans* uočena je na površinama uzoraka KBS i CoCr grupe, između kojih nije zabeleženo prisustvo statistički značajne razlike u vrednosti OD 540 nm dobijenog proizvoda za ispitivanu gljivičnu vrstu ($p > 0,05$).



Slika 4.5. Rezultati testa vijabilnosti (održivosti) ćelija mikroorganizama: a) *Streptococcus mutans*. b) *Streptococcus oralis*. c) *Veillonella parvula*. d) *Fusobacterium nucleatum*. e) *Porphyromonas gingivalis*. f) *Candida albicans*. OD 540 nm - vrednost optičke gustine (engl. optical density) dobijenog jedinjenja na talasnoj dužini 540 nm; KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Različita slova ukazuju na prisustvo statistički značajne razlike između grupa za dati parametar ($p < 0.05$; Tukey post hoc test).

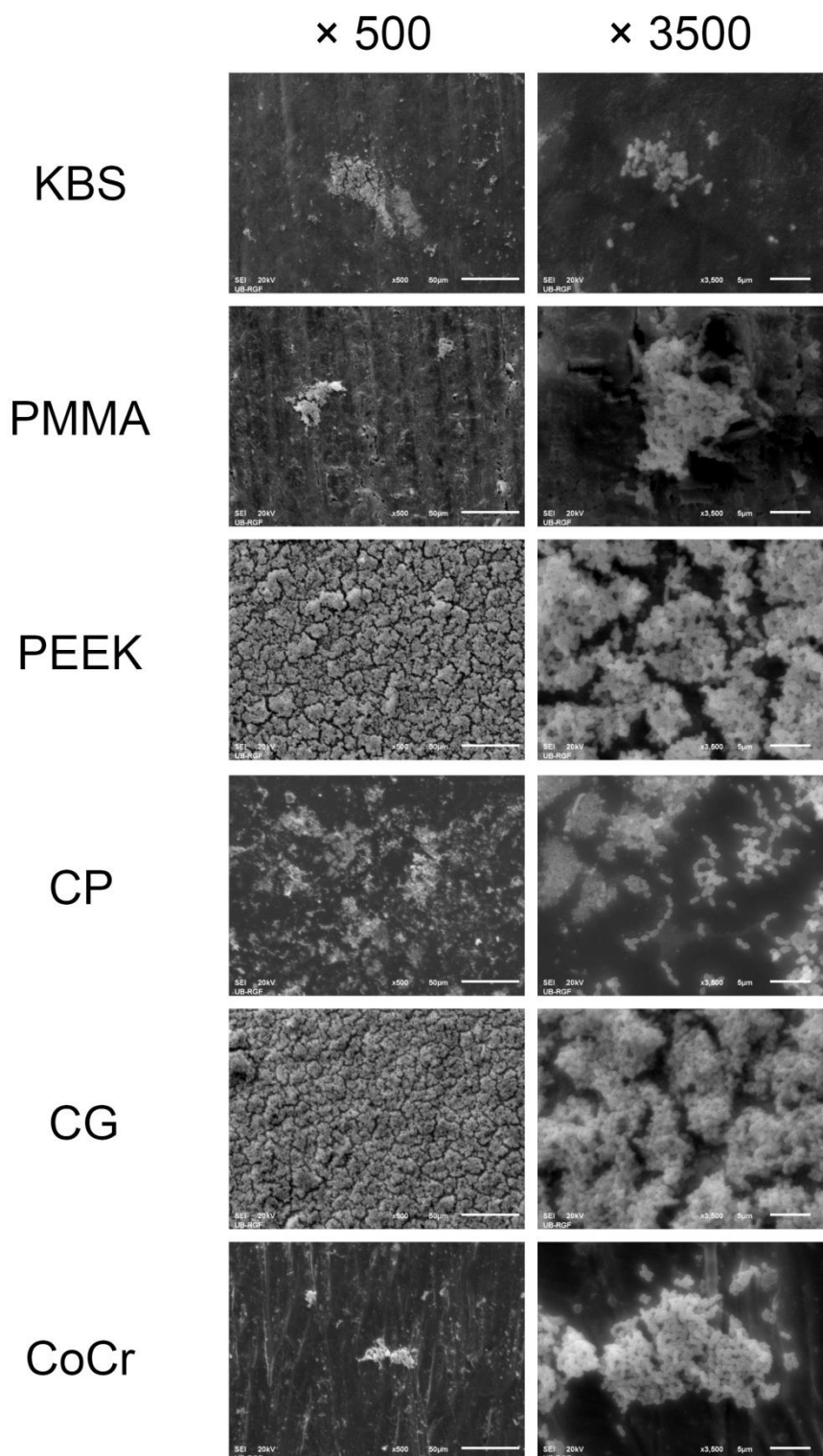
4.2.3 Rezultati analize formiranog biofilma upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa

Mikrografi nastali upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) koji u 2D prikazuju nasumično odabrana polja površina uzoraka grupa ispitivanih materijala sa adheriranim mikroorganizmima prikazani su na slikama 4.6 - 4.11. SEM 2D prikaz biofilma *Strep. mutans* (Slika 4.6) u skladu je sa prethodno iznetim rezultatima CFU. Mikrografi nastali na manjem uveličanju ($\times 500$) demonstrirali su prekrivenost čitave snimljene površine uzoraka CG, PEEK i PMMA grupe mikroorganizmima dok je na većem uveličanju ($\times 3500$) vidljiv gust sloj dobro organizovanih koka. Nasuprot tome, na snimcima KBS, CP i CoCr uzoraka zabeleženo je prisustvo svega nekoliko lančano grupisanih kolonija pomenute bakterije, jasno diferentovanih od morfologije površine uzoraka materijala u pozadini.



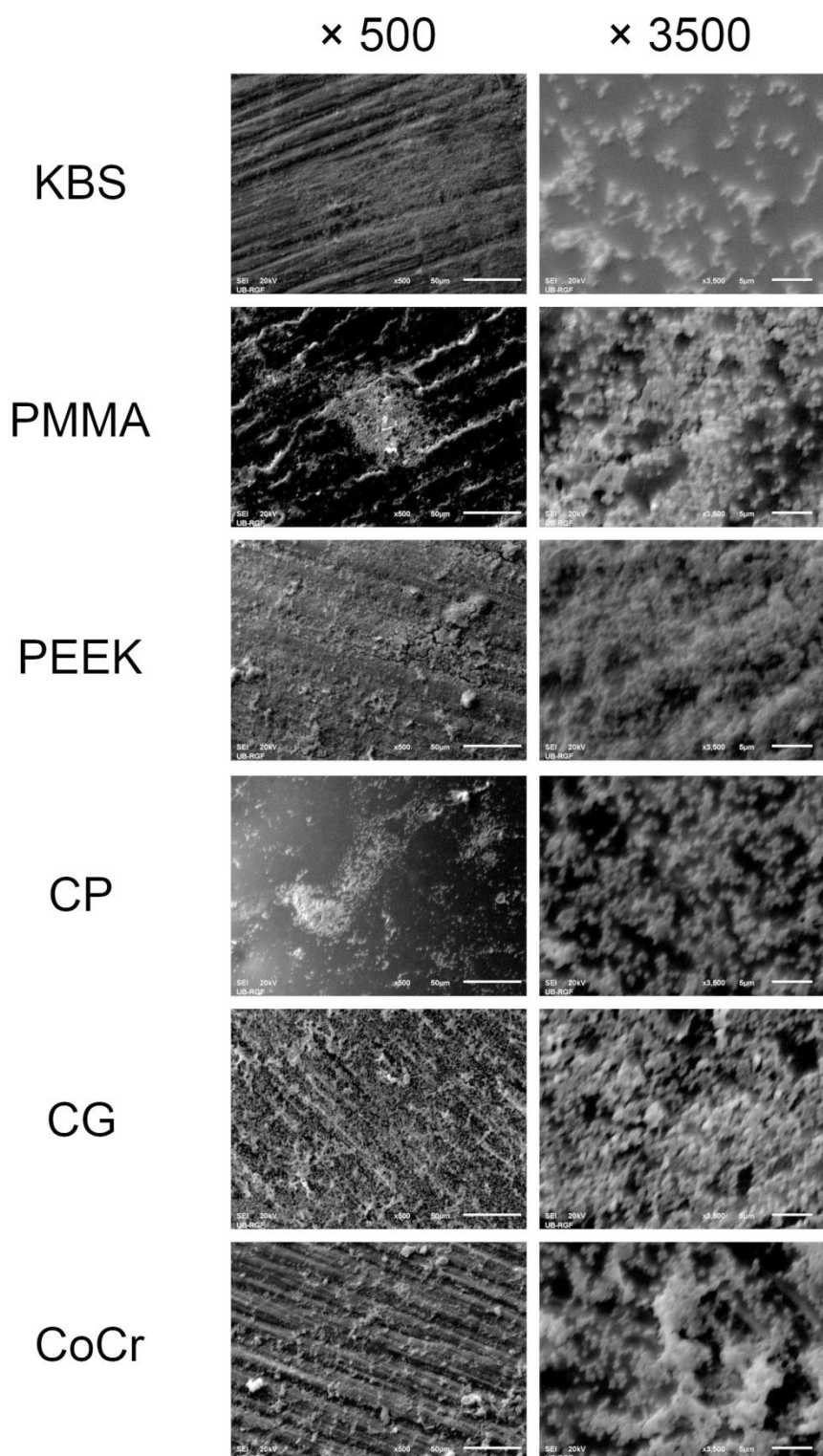
Slika 4.6. Mikrografi 2D prikaza biofilma *Streptococcus mutans* na površinama uzoraka ispitivanih materijala, nastali upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa. KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.

Adhezija *Strep. oralis* (Slika 4.7) bila je najuočljivija na uzorcima CG i PEEK grupe, na čijim površinama je zapažen grozdast raspored sitnih ovalnih koka. Bakterijski biofilm formiran na površinama uzoraka preostalih grupa materijala nije bio jasno vidljiv na snimcima nastalim na manjem uveličanju. Međutim, veće uveličanje pružilo je uvid u nekoliko nepravilno raspoređenih kolonija, okruženih relativno homogenom površinskom teksturom uzoraka materijala, sa nekolicinom uzdužnih žlebova nastalih usled procesa završne mehaničke obrade i poliranja.



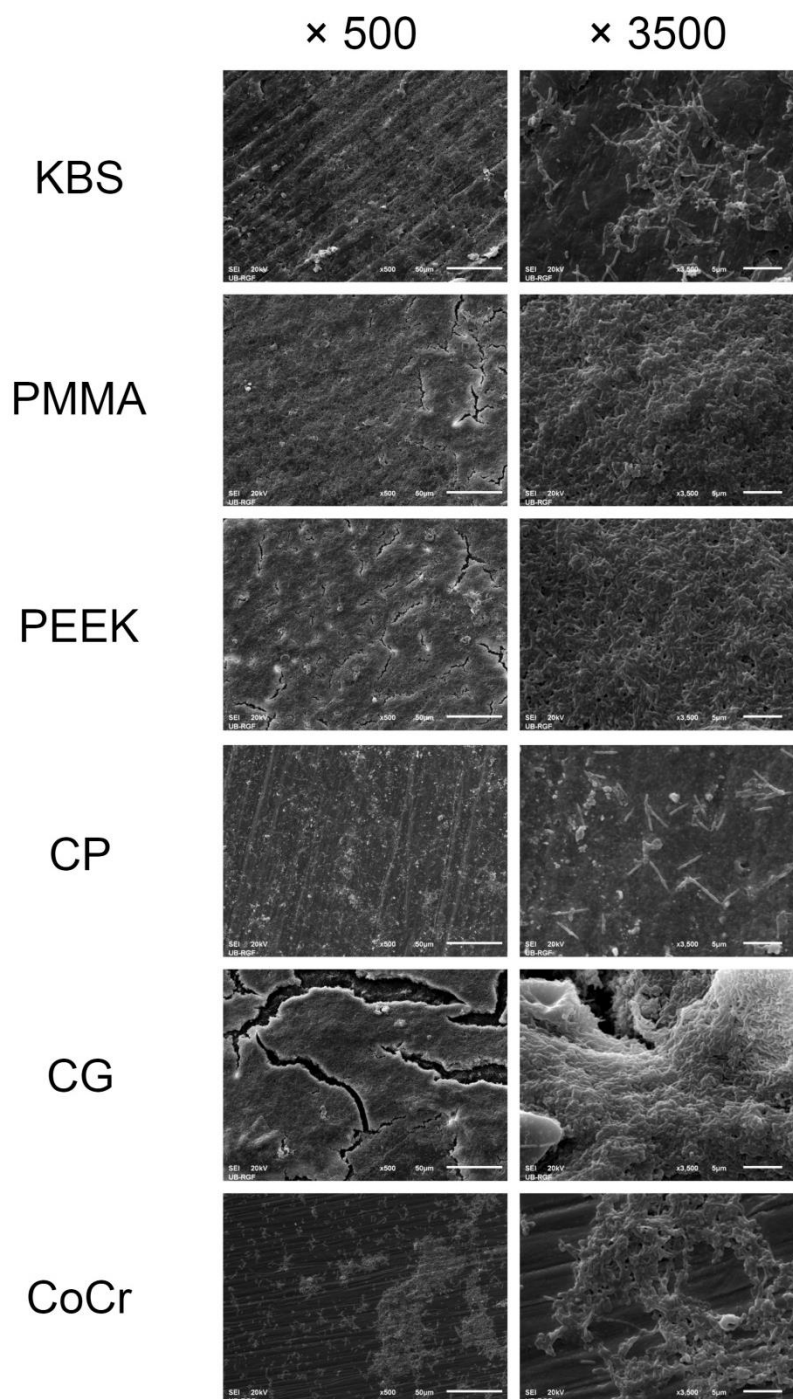
Slika 4.7. Mikrografi 2D prikaza biofilma *Streptococcus oralis* na površinama uzoraka ispitivanih materijala, nastali upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa. KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.

Usled malih dimenzija *V. parvula*, formiran biofilm ove bakterije teško je bio uočljiv na snimcima površina uzoraka grupa ispitivanih materijala nastalim na manjem uveličanju (Slika 4.8). Međutim, bliži pogled omogućio je jasnu karakterizaciju loptastog oblika pomenute koke, demonstrirajući njeno prisustvo u nešto gušćem sloju na površinama uzoraka CG, PEEK i PMMA grupe u poređenju sa ostalim grupama ispitivanih materijala.



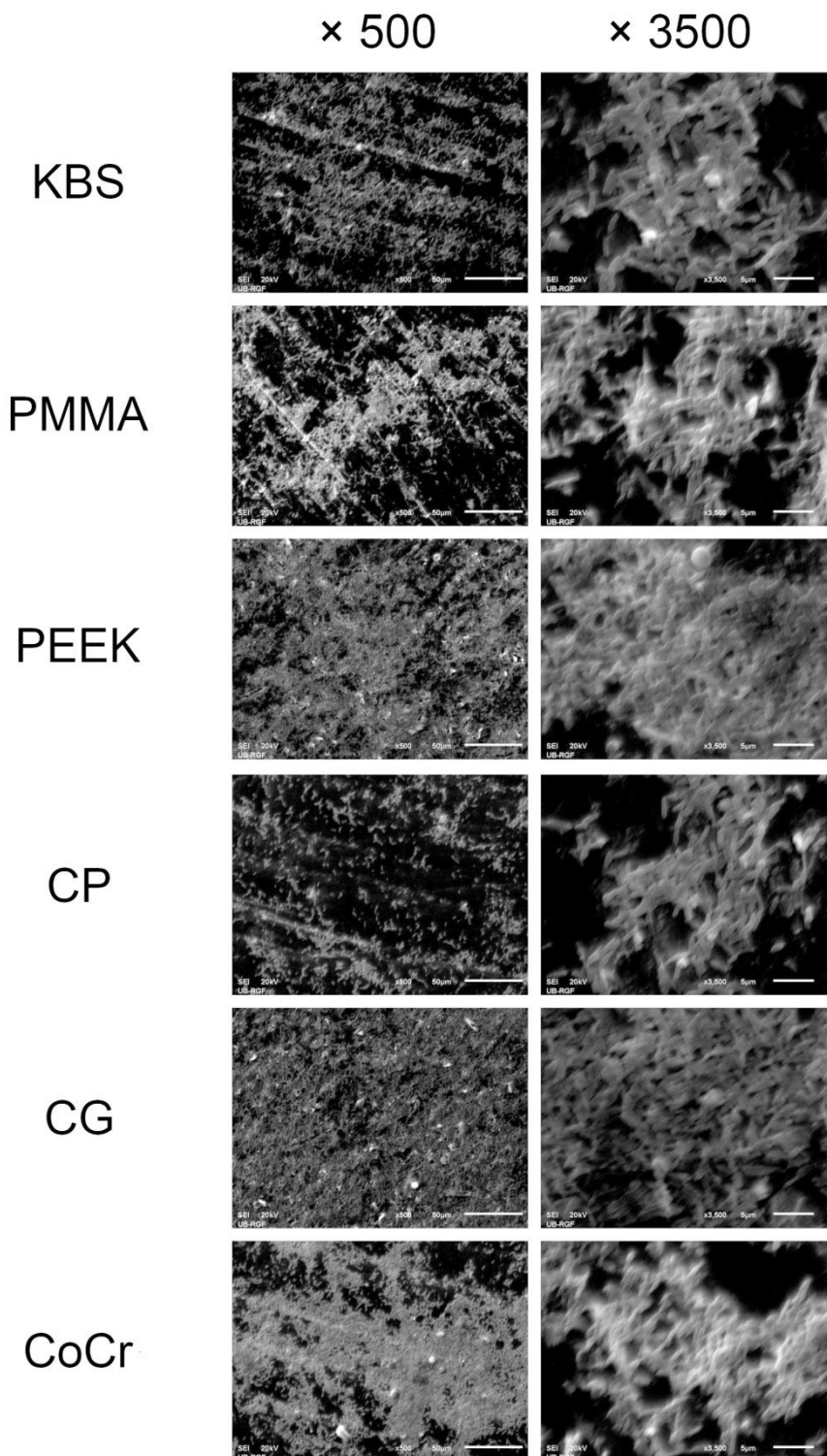
Slika 4.8. Mikrografi 2D prikaza biofilma *Veillonella parvula* na površinama uzoraka ispitivanih materijala, nastali upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa. KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.

Posmatrajući način prostiranja *F. nucleatum* i gustinu formiranog biofilma ove bakterije na površinama uzoraka (Slika 4.9) uočena je evidentna razlika između grupa materijala. Uzorci grupa CG, PEEK i PMMA pokazali su dominaciju u broju vretenastih bakterija duž čitavog snimljenog polja površine, sa gušćim slojem biofilma na površini uzorka CG grupe, posmatrano na snimcima oba uveličanja. S druge strane, mikrografi KBS i CP uzoraka omogućili su jasan uvid u tip grupisanja *F. nucleatum*, demonstrirajući nekoliko izduženih bacila povezanih u parovima. Na njihovim površinama, kao i na površini uzorka CoCr grupe, u pozadini se mogla uočiti površinska morfologija uzoraka materijala.



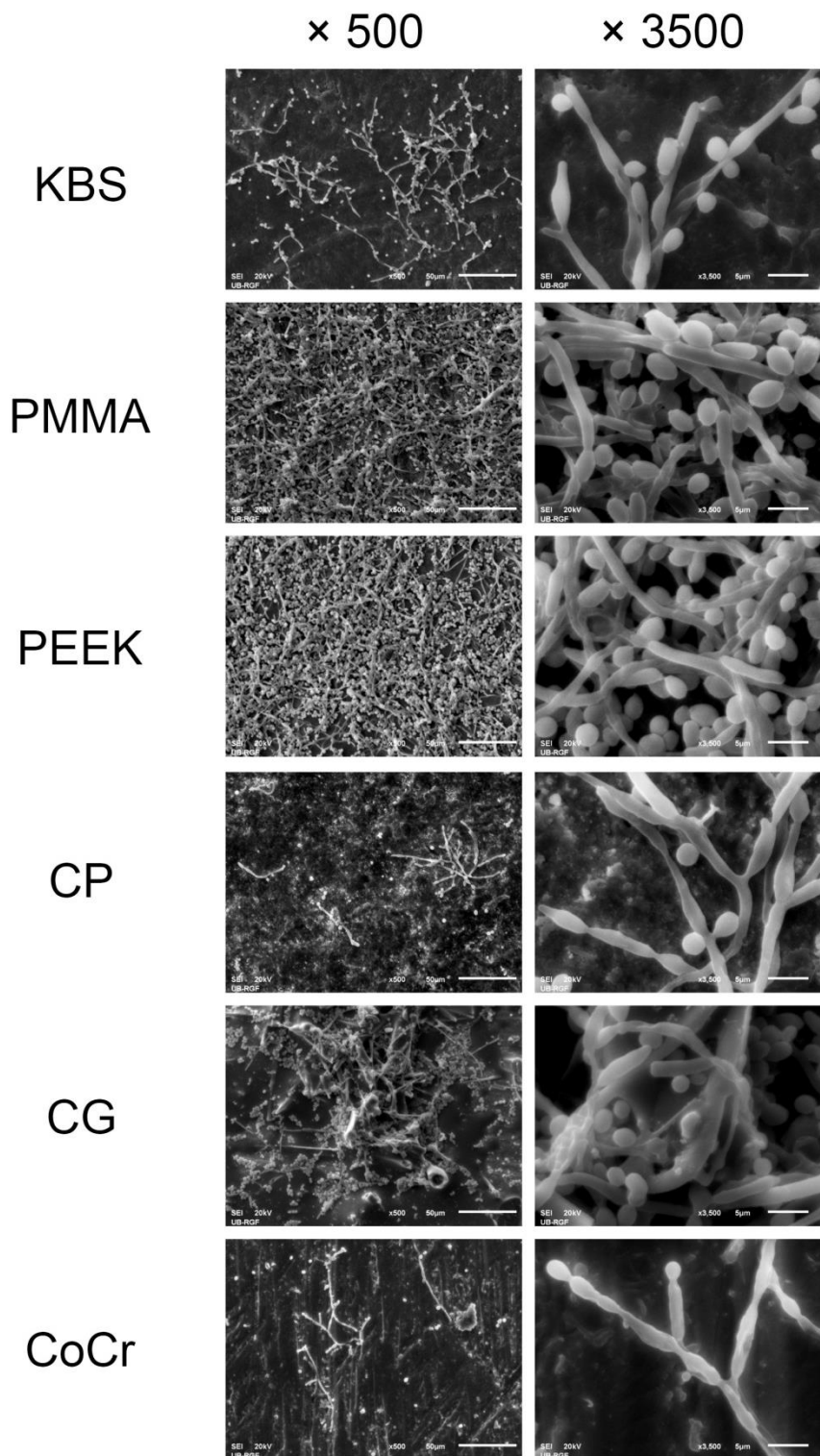
Slika 4.9. Mikrografi 2D prikaza biofilma *Fusobacterium nucleatum* na površinama uzoraka ispitivanih materijala, nastali upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa. KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.

Slična zapažanja su bila moguća i u vezi sa 2D mikrografima formiranog biofilma *P. gingivalis* (Slika 4.10), na kojima su uočene brojne bakterije duž čitave snimljene površine uzoraka CG i PEEK grupe. Snimci nastali na manjem uveličanju prikazali su linearan raspored mikroorganizama na površinama uzoraka preostalih grupa, uz veću gustinu sloja biofilma uočenu na uzorku CoCr grupe. Na snimcima većeg uveličanja između uzoraka nije uočena jasna razlika u gustini biofilma *P. gingivalis*, omogućavajući uvid u štapičast izgled pomenute bakterije.



Slika 4.10. Mikrografi 2D prikaza biofilma *Porphyromonas gingivalis* na površinama uzoraka ispitivanih materijala, nastali upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa. KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.

Masa biofilma *C. albicans* (Slika 4.11) skoro u potpunosti je prekrivala snimljene površine uzoraka PEEK, PMMA i CG grupe, suprotno 2D mikrografima površina uzoraka preostalih grupa ispitivanih materijala koji su demonstrirali manji deo lančano orijentisanih gljivica okruženih većim površinama uzoraka bez prisustva mikroorganizama. Snimci nastali na većem uvećanju omogućili su jasnu karakterizaciju pseudohifalnog rasta *C. albicans* na uzorcima svih grupa ispitivanih materijala.



Slika 4.11. Mikrografi 2D prikaza biofilma *Candida albicans* na površinama uzoraka ispitivanih materijala, nastali upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa. KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.

4.3 Rezultati ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u *in situ* uslovima

4.3.1 Rezultati određivanja ukupnog broja bakterija metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu

Rezultati određivanja ukupnog broja bakterija usne duplje adheriranih na površinama uzoraka grupa ispitivanih materijala nakon izloženosti istih uslovima oralne sredine tokom perioda od 24 h, dobijeni metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)*) prikazani su u tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Rezultati određivanja ukupnog broja bakterija usne duplje adheriranih na površinama uzoraka grupa ispitivanih materijala nakon izloženosti istih uslovima oralne sredine tokom perioda od 24 h, dobijeni metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu.

Broj kopija bakterijske DNK ($\times 10^{13}$)							
Učesnik	KBS	PMMA	PEEK	CP	CG	CoCr	
1	19,70	8,72	11,70	0,99	1,61	1,48	
2	1,36	27,60	73,50	4,80	34,50	5,55	
3	3,32	5,35	33,30	0,59	521,00	0,54	
4	0,61	4,39	6,40	1,17	30,10	0,55	
5	2,00	4,39	11,90	12,40	10,20	30,50	
6	5,86	27,80	44,80	0,19	11,60	3,34	
7	0,12	140,00	609,00	0,85	667,00	5,15	< 1
8	3,38	45,40	33,20	32,90	78,80	10,60	1 - 10
9	13,70	12,70	24,60	20,30	13,40	13,7	10 - 50
10	0,01	11,60	37,20	0,11	4,04	0,06	50 - 100
11	1,61	24,10	36,90	3,48	564,00	230,00	100 - 500
12	51,60	108,00	148,00	184,00	812,00	91,70	> 500
13	38,70	110,00	100,00	64,40	142,00	120,00	
14	1,67	6,67	11,50	7,15	2,67	0,07	
15	0,09	0,15	0,01	0,04	0,04	0,04	
16	93,00	11,40	20,10	24,00	150,00	4,31	
17	0,12	415,00	110,00	0,60	310,00	0,32	
18	11,20	606,00	42,20	48,80	97,30	114,00	
Medijana	2,66	18,4	35,1	4,14	56,65	4,73	
(min - max)	(0,01 - 93,00) ^b	(0,15 - 606,00) ^{a,b}	(0,01 - 609,00) ^a	(0,04 - 184,00) ^{a,b}	(0,04 - 812,00) ^a	(0,04 - 230,00) ^{a,b}	

KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura; min - minimum; max - maksimum. Različita slova ukazuju na prisustvo statistički značajne razlike između grupa za dati parametar ($p < 0,05$; *Dunn* post hoc test).

Na površinama svih uzoraka grupa ispitivanih materijala detektovano je prisustvo bakterija. Međusobnim poređenjem grupa ispitivanih materijala uočeno je prisustvo statistički značajne razlike u broju adheriranih bakterija ($p < 0,05$). Najveći broj kopija bakterijske DNK detektovan je u grupama CG i PEEK što je bilo statistički značajno jedino u poređenju sa KBS grupom ($p < 0,05$). Uzorci PMMA su takođe pokazali veću sklonost ka adheziji bakterija nego uzorci CoCr, CP i KBS grupe, međutim uz odsustvo statističke značajnosti ($p > 0,05$). Niže vrednosti zabeležene su u grupama KBS, CP i CoCr, između kojih nije uočeno prisustvo statistički značajne razlike u broju kopija bakterijske DNK ($p > 0,05$). Izuzev razlike između grupa materijala, uočena je i jasna individualna razlika između učesnika uključenih u istraživanje.

Rezultati ispitivanja povezanosti (korelacije) površinske hrapavosti i biofilma formiranog na površinama materijala u *in situ* uslovima predstavljeni su kao odnos srednjeg aritmetičkog odstupanja profila merenja hrapavosti površine (R_a) i ukupnog broja kopija bakterijske DNK na površinama uzoraka grupa materijala kvantifikovanih *real-time* PCR metodom u vidu *Spearman* koeficijenta korelacije rangova (Tabela 4.5). Dobijen rezultat ukazao je na prisustvo slabe pozitivne korelacije između dva izmerena parametra, uz prisustvo statističke značajnosti ($p < 0,05$).

Tabela 4.5. Rezultati ispitivanja povezanosti (korelacije) površinske hrapavosti i biofilma formiranog na površinama materijala u *in situ* uslovima.

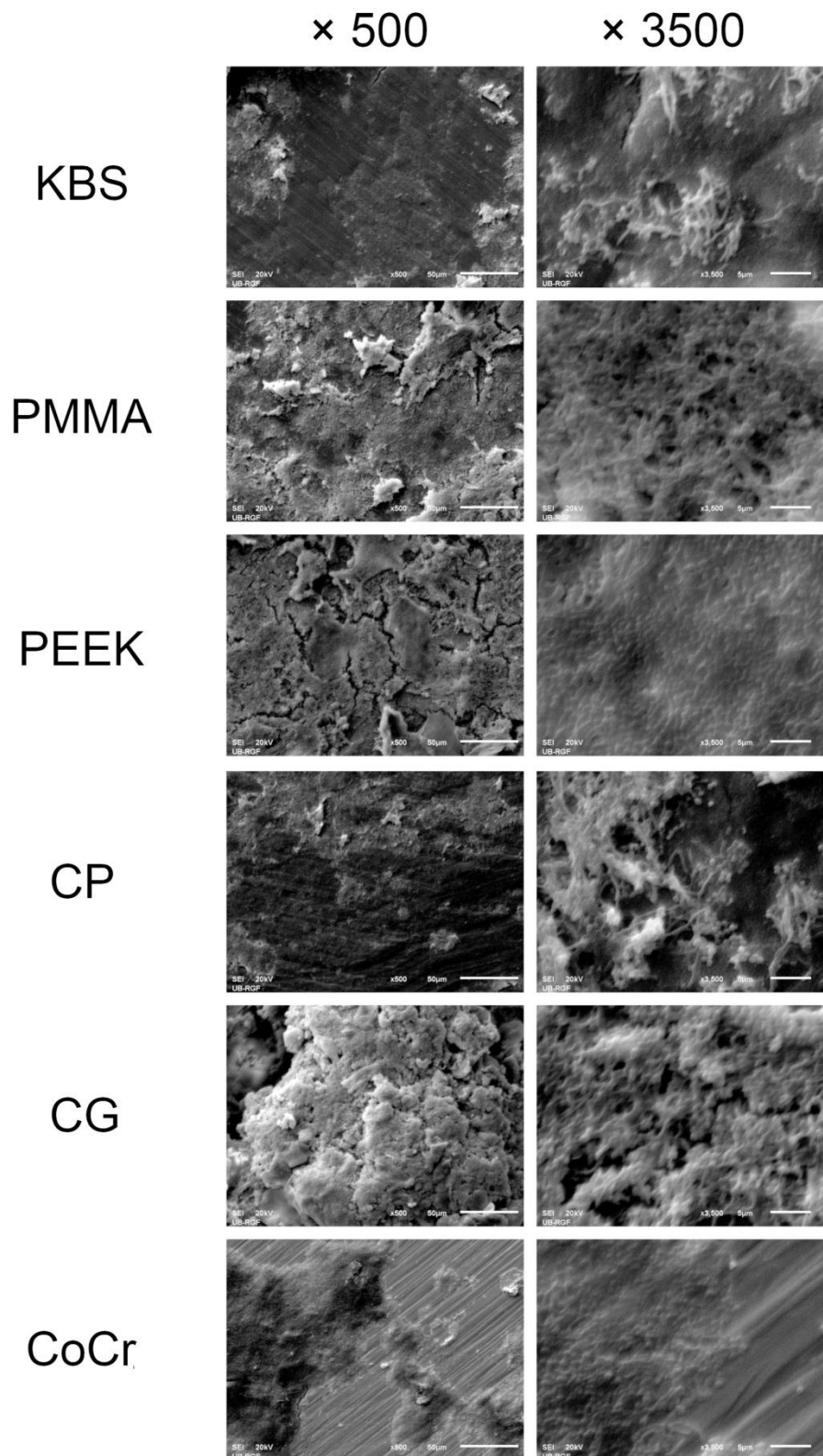
Povezani parametri	ρ	Opis povezanosti	Statistička značajnost
R_a - Broj kopija bakterijske DNK	0,275	Slaba pozitivna	$p = 0,004^*$
R_a - srednje aritmetičko odstupanje profila merenja hrapavosti površine; ρ - vrednost <i>Spearman</i> koeficijenta; * - statistički značajno.			

4.3.2 Rezultati analize formiranog biofilma upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa

Mikrografi nastali upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) koji u 2D prikazuju nasumično odabrana polja površina uzoraka ispitivanih materijala sa adheriranim mikroorganizmima usne duplje nakon 24 h izloženosti istih uslovima oralne sredine predstavljeni su na slici 4.12.

Snimci su u saglasnosti sa prethodno opisanim rezultatima dobijenim *real-time* PCR kvantifikacijom, podržavajući jasne razlike između pojedinih grupa materijala. Na oba uveličanja uočeno je prisustvo gustog višeslojnog biofilma koji prekriva čitava snimljena polja površina uzoraka CG, PEEK i PMMA grupe. Heterogenu mikrobnu strukturu formirali su dobro organizovani aglomerati koka u obliku grozda, povezanih putem nekoliko umetnutih kratkih štapica mikroorganizama.

Nasuprot tome, snimci površina uzoraka KBS, CP i CoCr grupe prikazali su biofilm manje gustine sa minornom porcijom mikroorganizama. Na većem uveličanju uočene su površine uzoraka materijala delimično prekrivene izolovanim raštrkanim kokama i mikroorganizmima filamentoznog oblika dok je u pozadini uočena morfologija površina uzoraka materijala sa prisustvom nekolicine uzdužnih žlebova nastalih kao posledica postupaka završne mehaničke obrade i poliranja.



Slika 4.12. Mikrografi 2D prikaza površina uzoraka materijala prekrivenih mikroorganizmima usne duplje nakon 24 h izloženosti uslovima oralne sredine, nastali upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa. KBS - kompozit na bazi smole; PMMA - poli (metil metakrilat); PEEK - poli (etar etar keton); CP - cirkonija polirana; CG - cirkonija glazirana; CoCr - kobalt-hrom legura.

5. DISKUSIJA

Uvođenjem mašinski obradivih dentalnih materijala u svet stomatologije zubne nadoknade dobile su na unapređenju mehaničkih i estetskih karakteristika, zahvaljujući standardizovanom načinu pripreme materijala pod strogo kontrolisanim uslovima. Međutim, u cilju obezbeđivanja dugotrajnosti nadoknade u oralnoj sredini i sprečavanju nastanka oralnih infekcija od najvećeg značaja je sklonost materijala adheziji oralnih mikroorganizama na svojoj površini. Ovom procesu doprinosi i prisustvo brojnih predisponirajućih faktora od kojih se kao najvažnije izdvajaju karakteristike površine materijala. Imajući sve navedeno u vidu, fokus studije bio je na ispitivanju sklonosti mašinski obradivih dentalnih materijala ka adheziji mikroorganizama na njihovim površinama i zavisnosti iste od karakteristika površine materijala, nakon završne mehaničke obrade i poliranja materijala prema uputstvu proizvođača.

U istraživanje su uključeni mašinski obradivi dentalni materijali koji se ubrajaju među najzastupljenije u savremenoj stomatologiji. Tu su kompozit na bazi smole (KBS), poli (metil metakrilat) (PMMA), poli (etar etar keton) (PEEK), cirkonijum-dioksidna keramika (cirkonija) u poliranom (CP) ili glaziranom obliku (CG) i kobalt-hrom legura (CoCr).

U prvom delu studije ispitivane su karakteristike površine materijala, merenjem površinske hrapavosti, merenjem kontaktnih uglova različitih referentnih tečnosti i izračunavanjem površinske slobodne energije (engl. *surface free energy (SFE)*). Kao dopuna numeričkim rezultatima izvršena je potom analiza površinske morfologije materijala u trodimenzionalnom prostoru (3D) upotrebom mikroskopa atomskih sila (engl. *atomic force microscope (AFM)*), kao i u dvodimenzionalnom prostoru (2D) upotrebom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (engl. *scanning electron microscope (SEM)*).

Drugi deo istraživanja podrazumevao je ispitivanje formiranog monomikrobnog biofilma mikroorganizama usne duplje na površinama materijala u laboratorijskim *in vitro* uslovima. S obzirom da se pojedini mikroorganizmi oralnog biofilma pod određenim uslovima smatraju glavnim etiološkim faktorom za nastanak oralnih infekcija, u studiji je ispitivan biofilm bakterije *Streptococcus mutans*, glavnog izazivača karijesa, bakterija *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* i *Porphyromonas gingivalis*, usko povezanih sa nastankom infekcija parodontalnih i peri-implantatnih tkiva, kao i gljivične vrste *Candida albicans*, u velikoj meri prisutne kod infekcija sluzokože usne duplje izazvanih prisustvom mobilne zubne nadoknade. Eksperimentalni deo podrazumevao je analizu formiranog biofilma metodom brojanja formiranih kolonija (engl. *colony forming units (CFU)*), testom vijabilnosti ćelija mikroorganizama (engl. *cell viability assay*) i vizuelizacijom biofilma ispitivanih mikroorganizama na površinama materijala u 2D upotrebom SEM.

U trećem i poslednjem delu studije izvršeno je ispitivanje ukupno formiranog biofilma na površinama materijala u *in situ* uslovima. Za potrebe ovog dela studije dizajniran je specijalan individualni intraoralni splint u koji su postavljeni uzorci materijala i koji su u trajanju od 24 h nosili učesnici studije. Učesnici su bili sa odličnim opštim i oralnim zdravstvenim stanjem radi eliminacije brojnih faktora koji bi mogli uticati na adheziju oralnih mikroorganizama na površinama uzoraka ispitivanih materijala. Nakon perioda akumulacije, izvršeno je određivanje broja bakterija na površinama materijala metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)*) dok je analiza dopunjena vizuelizacijom biofilma na površinama materijala u 2D upotrebom SEM.

Na sledećim stranicama su rezultati sprovedene studije prodiskutovani i upoređeni sa dosadašnjim saznanjima autora drugih istraživanja usko vezanih za temu adhezije mikroorganizama na površinama konvencionalnih ili mašinski obradivih dentalnih materijala, kao i zavisnost iste od karakteristika površine samih materijala.

5.1 Analiza rezultata merenja površinske hrapavosti

Merenje hrapavosti površine uzoraka grupa ispitivanih materijala obavljeno je upotrebom kontaktnog profilometra čime su dobijene vrednosti srednjeg aritmetičkog odstupanja (R_a) i maksimalne visine neravnina datog profila merenja (R_z). Pored numeričkih vrednosti, prikazane su i dijagram krive koje u 2D pružaju uvid u hrapavost površine datog uzorka.

Metoda je pouzdana, tačna i pruža procenu hrapavosti površine. Međutim, upotreba isključivo kontaktnog profilometra nije dovoljna za verodostojan prikaz morfologije površine određenog materijala. Iz ovog razloga, numerički i grafički podaci dobijeni na osnovu analize kontaktnim profilometrom dopunjeni su 3D prikazom površine uzoraka materijala upotrebom AFM, kao i analizom morfologije površine istih na 2D mikrografima visoke rezolucije, nastalim upotrebom SEM.

Rezultati merenja površinske hrapavosti upotrebom kontaktnog profilometra izmereni na mikrometerskoj skali pokazali su slične vrednosti R_a za sve grupe ispitivanih materijala. Razlog tome, kao što je ranije pomenuto, može se pripisati činjenici da su mašinski obradivi dentalni materijali pripremljeni na standardizovan način čime su eliminisani brojni nedostaci konvencionalnog načina rada koji mogu dovesti do pojedinih nepravilnosti u površinskoj morfologiji samog materijala. Međutim, i pored protokola završne mehaničke obrade i poliranja po uputstvima proizvođača i želje da se površine uzoraka materijala naprave što glatkijim, između grupa ispitivanih materijala uočeno je prisustvo statistički značajne razlike u vrednostima oba izmerena parametra površinske hrapavosti.

Najviše vrednosti R_a i R_z demonstrirala je grupa CG čiji su uzorci bili statistički značajno hrapaviji u poređenju sa uzorcima ostalih grupa materijala. Osim toga, dijagram kriva reprezentativnog uzorka ove grupe dobijena na osnovu analize kontaktnim profilometrom pokazala je najnepravilniji tok, karakterisan mnoštvom vrhova (engl. *peaks*) i dolina (engl. *valleys*) na datom profilu merenja. Kao još jedan pokazatelj neravnomernosti u površinskoj strukturi može se uzeti i 3D snimak nastao upotrebom AFM, na kom se jasno uočava razlika između visokih strmih kota i okolnog zaravnjenog podnožja na datom polju snimanja. Takođe, SEM 2D mikrograf bio je komplementaran AFM snimku, otkrivajući jasnu razliku između mnogobrojnih ostrvaca nepravilnog oblika, okruženih homogenom morfologijom preostale snimljene površine uzorka ove grupe.

Glavni razlog za ovo opažanje može biti uticaj manuelne veštine zubnog tehničara prilikom nanošenja glazure na površinu nadoknade izrađene od keramičkog materijala. U toku samog postupka glaziranja, glazurna pasta se ručno nanosi u tankom sloju na površinu zubne nadoknade pomoću specijalno dizajnirane četkice. Usled toga, na relativno ravnoj površini nadoknade najčešće se pojavljuju mikromehurići koji izledaju poput ostrvaca zbog čega je na ovaj način izuzetno teško postići glatku i sjajnu površinu (Dal Piva i sar., 2018; Zhang Y i sar., 2004).

Takođe, kao još jedan bitan faktor mora se uzeti u obzir i razlika u vrednostima koeficijenata termičke ekspanzije između cirkonije i sloja glazurne paste. Naime, prateći uputstva proizvođača primenjuju se različiti programi sinterovanja (pečenja) presinterovane neglazirane cirkonije i sinterovane cirkonije sa nanetom glazurom na svojoj površini. Usled toga može doći do stvaranja unutrašnjih napona i naprezanja pojedinih delova nadoknade od glazirane cirkonije što povećava verovatnoću od nastanka mikrodefekata i povećanja hrapavosti njene površine (Kumchai i sar., 2018).

S druge strane, grupa CP demonstrirala je najniže vrednosti oba izmerena parametara hrapavosti u poređenju sa drugim grupama ispitivanih materijala. Takođe, dijagram kriva reprezentativnog uzorka ove grupe pokazala je pravilan i homogen tok uz odsustvo izraženih amplituda između uzvišenja i udubljenja na datom profilu merenja. Pritom, na AFM 3D snimku CP uzorka uočeno je mnoštvo čestica sličnih dimenzija bez prisutnih abnormalnosti koje odudaraju od ostatka snimljenog polja površine. Samim tim, lako je uočiti da su ručno kontrolisani instrumenti za završnu mehaničku obradu (finireri) i poliranje (polireri) bili uspešniji u formiranju manje hrapave površine na istom materijalu što upućuje na lakšu i precizniju manipulaciju ovim instrumentima u poređenju sa postupkom glaziranja upotrebom četkice.

Međutim, SEM 2D mikrofotografije CP uzorka pokazali su lomljenje (engl. *chipping*) i dislokaciju čestica pomenutog materijala što se najverovatnije može pripisati kompresiji zrna na njegovoj površini uzrokovanoj postupcima završne mehaničke obrade i poliranja. Autori ranijih istraživanja na istu temu sugerisali su da ručno kontrolisani instrumenti za završnu mehaničku obradu poput freza, dijamantskih svrdala ili gumica neprimerenom manipulacijom lako mogu izazvati dislokaciju kristala cirkonijum-dioksida u samom materijalu čime dolazi do nastanka sitnih žlebova i mikropukotina na površini sinterovane cirkonije, kao i na površini presinterovanog oblika pomenutog materijala koji prilikom kasnijeg procesa sinterovanja nisu bili izgladeni (Al-Haj Husain i sar., 2016; Hatanaka i sar., 2017). Ipak, u sprovedenoj studiji ova pojava nije doprinela povećanju hrapavosti površine uzoraka CP grupe, već je pokazala uspešnost u sakrivanju pomenutih defekata.

Brojne studije u prošlosti bavile su se upoređivanjem različitih keramičkih sistema u pogledu kvaliteta površinske morfologije nakon različitih postupaka završne obrade (Goo i sar., 2016; Huh i sar., 2016; Khayat i sar., 2018). Rezultati pojedinih istraživanja potvrđuju hipotezu da cirkonija polirana gumicama pokazuje izuzetnu glatkoću površine i da, bez obzira na vrstu keramičkog sistema, nanošenje sloja glazure neminovno dovodi do povećanja hrapavosti površine zubne nadoknade izrađene od keramike (Dal Piva i sar., 2018; Janyavula i sar., 2013; Vila-Nova i sar., 2020). S druge strane, grupa autora negira postojanje značajne razlike između glazirane i gumicama polirane cirkonije u pogledu hrapavosti površine, odbacujući uticaj načina završne obrade u pogledu formiranja kvalitetne površine ovog materijala (Sarac i sar., 2006). Uzimajući sve do sada navedeno u obzir, kao razlog nepodudarnosti prikazanih rezultata različitih studija mogu se pripisati individualne razlike u veštini zubnog tehničara prilikom postupaka završne obrade cirkonije i činjenici da i sloj glazure, adekvatno, pažljivo i ravnomerno nanet na površinu pomenutog materijala može dovesti do postizanja glatkoće površine materijala dok idealno adaptiran može čak popuniti i maskirati neravnine nastale u toku prethodne mehaničke obrade materijala.

Poredivši rezultate površinske hrapavosti mašinski obradivih dentalnih polimera uključenih u studiju, kao što su PEEK, PMMA i KBS, uočeno je prisustvo statistički značajne razlike u vrednostima R_a i R_z između navedenih grupa ispitivanih materijala. PMMA uzorci pokazali su se kao podobniji formiranju glatke površine nakon postupaka završne mehaničke obrade i poliranja u poređenju sa uzorcima PEEK i KBS grupe. Kao što je ranije naglašeno, uvođenje sistema mašinske obrade u stomatologiju primetno je poboljšalo karakteristike PMMA zahvaljujući izbegavanju ručnog mešanja polimernog praha i monomerne tečnosti. Time je omogućeno oslobađanje znatno manje količine rezidualnog monomera i bolja fizička i hemijska svojstva materijala uključujući i unapređen kvalitet površine (Bidra i sar., 2013).

Veličina čestica dodatih keramičkih punioca u sastavu PEEK korišćenog u studiji bila je veoma mala (0,3 - 0,5 μm), te je zbog toga bilo očekivano olakšano postizanje homogenosti površine uzoraka ove grupe materijala nakon postupaka završne mehaničke obrade i poliranja. Međutim, analizom površinske morfologije utvrđene su statistički značajno više vrednosti Ra i Rz , izraženija razlika između vrhova i dolina na AFM 3D snimcima, kao i manje homogena topografija površine na SEM 2D mikrografima uzoraka PEEK grupe u poređenju sa PMMA. Kao razlog za izraženu razliku u kvalitetu površine dva pomenuta dentalna polimera može se uzeti u obzir, ranije opisan, indirektan uticaj hemijskog sastava materijala na kvalitet površine. Naime, PEEK korišćen u studiji modifikovan je dodavanjem keramičkih čestica koje, iako malih dimenzija, u kombinaciji sa drugim sastojcima doprinose određenoj heterogenosti površine materijala otežavajući postupak njene završne mehaničke obrade i poliranja (Sarac i sar., 2006).

Postoje brojna neslaganja kada je u pitanju poređenje kvaliteta površinske morfologije PMMA i PEEK sa drugim grupama materijala. Rezultati sprovedenog istraživanja su u saglasnosti sa prethodno objavljenom studijom u kojoj su uzorci PEEK grupe pokazali veću hrapavost površine u poređenju sa CP (Peng i sar., 2021), kao i sa studijom na konvencionalno proizvedenim materijalima u kojoj je PMMA okarakterisan većom hrapavošću površine u poređenju sa KBS i CoCr zahvaljujući heterogenoj polimernoj strukturi (Merghni i sar., 2016). Ipak, druga istraživanja pokazala su suprotne rezultate demonstrirajući značajno niže vrednosti površinske hrapavosti kod uzoraka mašinski obradivog PEEK i konvencionalno izrađenog PMMA u poređenju sa mašinski obradivom CP (Hahnel i sar., 2015).

Uzorci KBS grupe pokazali su više vrednosti oba izmerena parametra hrapavosti površine u poređenju sa PMMA, što potvrđuje i AFM snimak na kom se uočava veliki broj strmih delova sitnih dimenzija duž čitavog polja snimanja. Razlog za ovo može ležati u činjenici da, iako KBS poseduje zadovoljavajuće estetske osobine, uticaj komponenti njegovog sastava poput količine čestica punilaca i tipa organskog matriksa onemogućava formiranje visoke uglaćanosti njegove površine (Lee, 2008; Marghalani, 2010).

Takođe, ispitujući konvencionalno izrađene kompozitne materijale sa različitom veličinom čestica punioca grupa autora je pokazala da materijali sa česticama manjih dimenzija poseduju manje hrapave površine u poređenju sa onima sa česticama punila većih dimenzija, sugerisući da mikro- i nanočestice pružaju mogućnost lakšeg pakovanja i poliranja (Da Costa i sar., 2007). Sve u svemu, lako je uočiti da hemijski sastav kompozitnih materijala ispoljava jednako važan uticaj na kvalitet površinske morfologije, kao i sam postupak završne mehaničke obrade i poliranja.

Prema uputstvima proizvođača, uzorci CoCr grupe bili su jedini koji su završno mehanički obrađeni i ispolirani samo u jednom pravcu, za razliku od ostalih grupa ispitivanih materijala gde su upotrebljeni kružni pokreti prilikom pomenute procedure. S tim u vezi, analizom AFM 3D snimka, kao i SEM 2D mikrografa uzoraka ove grupe materijala uočeno je prisustvo brojnih, uzdužnih, paralelnih žlebova prosečne širine oko 2 μm duž čitave snimljene površine uzorka. Kao posledica toga, CoCr grupa pokazala je statistički značajno više vrednosti Ra i Rz , podržano prisustvom strmije dijagram krive u poređenju sa grupama CP i PMMA.

5.2 Analiza rezultata merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i izračunavanja površinske slobodne energije

Metoda merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) izvršena je kako bi se omogućila karakterizacija površina ispitivanih materijala u pogledu njihove hidrofilnosti. Naime, hidrofilni karakter površina materijala u naučnim referencama uglavnom je utvrđivan merenjem kontaktnog ugla jedne tečnosti, najčešće destilovane vode. Međutim, radi boljeg razumevanja hidrofilnosti površina ispitivanih materijala, kao i uvida u uticaj iste na povećan ili smanjen afinitet ka mikrobiološkoj adheziji, u sprovedenom istraživanju izvršeno je izračunavanje površinske slobodne energije materijala. Vrednost SFE dobijena je na osnovu izmerenih vrednosti kontaktnih uglova tri različite referentne tečnosti koje se razlikuju s aspekta hidrofilnosti, kao što su destilovana voda, etilen glikol i diiodmetan, upotrebom *Van Oss-Chaudhury-Good* formule (Van Oss i sar., 1988).

Rezultati studije pokazali su prisustvo statistički značajne razlike između grupa materijala u vrednostima izmerenih kontaktnih uglova svih korišćenih referentnih tečnosti. Uzorci PEEK grupe demonstrirali su najviše vrednosti kontaktnih uglova destilovane vode (KUV) i etilen glikola (KUE) dok su uzorci CoCr grupe demonstrirali najvišu vrednost kontaktnog ugla diiodmetana (KUD). Za ove dve grupe uzoraka su posledično izračunate najniže vrednosti SFE, a njihove površine se mogu okarakterisati kao hidrofobnije u poređenju sa površinama drugih grupa ispitivanih materijala.

Rezultati pojedinih istraživanja u prošlosti u saglasnosti su s ovim opažanjem, te je PEEK više puta okarakterisan kao materijal sa blago hidrofobnim karakterom površine. Kao razlog tome autori navode činjenicu da u kontaktu sa tečnošću poput destilovane vode, PEEK evidentno zadržava kap vode na svojoj površini sa izmerenim kontaktnim uglom obično blago većim od 90° (Chen i sar., 2019; Nieminen i sar., 2008) što je prethodno opisano kao granična vrednost iznad koje se površina materijala može smatrati hidrofobnom (Law, 2014).

S druge strane, uzorci dve različito završno obrađene grupe cirkonije (polirana i glazirana) pokazali su niže vrednosti kontaktnih uglova dve od tri referentne tečnosti, kao i višu izračunatu vrednost SFE, pa se stoga mogu uzeti u obzir kao grupe materijala sa izraženijom hidrofilnošću površine u poređenju sa preostalim grupama materijala.

U skladu s ovim, grupa autora nedavno objavljene studije pokazala je niže vrednosti kontaktnog ugla CP u poređenju sa PEEK ukazujući na jasnu razliku u stepenu kvašenja površina ova dva materijala (Peng i sar., 2021). Takođe, u drugim studijama više puta je naglašen hidrofilni karakter cirkonije i kompozitnih materijala dok se kobalt-hrom legura izdvaja kao materijal sa blago hidrofobnim površinskim svojstvima (Hjerppe i sar., 2021; Kozmos i sar., 2021).

5.3 Analiza povezanosti (korelacije) rezultata merenja površinske hrapavosti i rezultata merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i izračunavanja površinske slobodne energije

U cilju ispitivanja međusobne povezanosti površinske hrapavosti i hidrofilnosti materijala, autori brojnih studija u prošlosti koristili su najčešće direktnu vezu izračunatih numeričkih vrednosti srednjeg aritmetičkog odstupanja profila merenja površinske hrapavosti (Ra) i kontaktnog ugla destilovane vode (KUV), predstavljanjem korelacije u vidu izračunate vrednosti određenog koeficijenta. Međutim, u sprovedenoj studiji u cilju verodostojnijeg opisa površine materijala sa aspekta hidrofilnosti korišćena je SFE. S obzirom da je vrednost SFE izračunata na osnovu ranije pomenute formule, nije bilo moguće uspostaviti direktnu korelaciju između površinske hrapavosti i hidrofilnosti materijala izračunavanjem vrednosti koeficijenata korelacije.

Ipak, posmatrajući međusobnu povezanost rezultata merenja različitih karakteristika površine ispitivanih materijala uočava se da su najviše vrednosti izračunate SFE i najizraženiji hidrofilni karakter površine zapaženi u CG grupi uzoraka koja je prethodno opisana kao grupa sa najvišim vrednostima parametara površinske hrapavosti.

U saglasnosti sa rezultatima sprovedenog istraživanja, u nedavnoj studiji ispitivanja različito završno obrađenih uzoraka cirkonije grupa autora je zaključila da vrednost ugla izmerenog u trenutku dodira površine ovog materijala sa kapi destilovane vode opada sa višim vrednostima hrapavosti površine (Alves i sar., 2019). Takođe, koristeći sličan dizajn studije baziran na izračunavanju vrednosti SFE, u istraživanju na različito završno obrađenim keramičkim materijalima pokazano je da hrapavost površine dovodi do povećavanja vrednosti SFE (Dal Piva i sar., 2018).

Međutim, u potpunoj suprotnosti su mišljenja drugih autora koji sugerišu da površinska hrapavost pojačava hidrofobno svojstvo površine materijala. Kao moguće objašnjenje navedena je mogućnost zarobljavanja vazduha u mikronepravilnostima na površini materijala odbijajući na taj način zadržavanje kapi tečnosti (Bico i sar., 2002).

Ipak, u pojedinim studijama nije pronađena nikakva korelacija između površinske hrapavosti i hidrofilnosti što negira povezanost ove dve karakteristike površine materijala, a različitosti u vrednostima KUV između ispitivanih materijala pripisane su pre svega uticaju komponenti njihovog hemijskog sastava (Çakmak i sar., 2021; Sturz i sar., 2015).

5.4 Analiza rezultata ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u *in vitro* uslovima

U cilju poređenja biofilma formiranog na površinama uzoraka grupa ispitivanih materijala u *in vitro* uslovima, analizirani su i međusobno poređeni rezultati brojanja formiranih kolonija šest različitih mikroorganizama po mililitru tečnosti, nakon određenog perioda potrebnog za njihovu inkubaciju i formiranje biofilma.

Između grupa materijala utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u CFU/ml svakog ispitivanog mikroorganizma. Najveći afinitet ka adheziji četiri od šest mikroorganizama uključenih u studiju pokazala je grupa CG dok je s druge strane grupa CP demonstrirala izuzetnu otpornost ka adheziji mikroorganizama, pokazavši uz KBS najniže vrednosti akumuliranog biofilma svakog mikroorganizma. Razlog za ovo nedvosmisleno predstavlja različitost u proceduri završne obrade istog materijala koja je dovela do povećane hrapavosti površine uzoraka grupe CG i posledično veće tendencije istih ka adheziji mikroorganizama u poređenju sa CP.

Slične rezultate predložili su autori nekoliko laboratorijskih *in vitro* studija baziranih na akumulaciji biofilma raznih streptokoka, kao i gljivice *C. albicans* na različito završno obrađenim uzorcima cirkonije (Dal Piva i sar., 2018) i drugih keramičkih materijala (Karayazgan i sar., 2010), ukazujući na veći potencijal za akumulaciju biofilma na glaziranim uzorcima u poređenju sa poliranim, zahvaljujući povećanoj hrapavosti njihovih površina. Ipak, u nedavnoj studiji grupe autora, iako su utvrđene statistički značajno više vrednosti *Ra* i SFE glazirane u poređenju sa poliranom cirkonijom, nije utvrđeno prisustvo značajne razlike u količini biofilma *C. albicans* na njihovim površinama, odbacujući uticaj karakteristika površine na adheziju ovog mikroorganizma (Zupančić Čepić i sar., 2020).

Izuzev CG, PEEK se može tretirati kao grupa sa izuzetno velikom količinom adheriranih mikroorganizama, pokazavši najviše vrednosti prisutnih *Strep. oralis* i *C. albicans* u poređenju s drugim grupama ispitivanih materijala. U saglasnosti sa ovim opažanjem, u prethodnim laboratorijskim studijama sličnog dizajna pokazano je da PEEK poseduje izuzetan afinitet ka brzom formiranju biofilma na svojoj površini (Williams i sar., 2011). Takođe, u nedavnoj studiji na mašinski obradivim materijalima za izradu teleskop kruna demonstrirana je veća akumulacija bakterija na površini PEEK u poređenju sa cirkonijom (Kamel i sar., 2021).

Međutim, rezultati sprovedene studije su u neskladu sa pojedinim literaturnim podacima u kojima je PEEK opisan kao materijal koji poseduje izuzetna antibakterijska svojstva protiv adhezije inicijalnih kolonizatora poput *Strep. oralis*, nakon inkubacije ove bakterije u trajanju od 24 h i 48 h na površini materijala u *in vitro* uslovima (D'Ercole i sar., 2020). Osim toga, poredivši količinu biofilma više različitih mikroorganizama na materijalima za izradu implantatnih suprastruktura u *in vitro* uslovima, grupa autora je pokazala da je količina formiranog biofilma na površini PEEK niža u poređenju sa onim na površini gumicom polirane cirkonije (Peng i sar., 2021).

Iako su dentalni polimeri opisani kao materijali sa sličnim, heterogenim sastavom površine i, pod pretpostavkom, sličnim afinitetom ka adheziji mikroorganizama, u sprovedenom *in vitro* delu studije uočeno je prisustvo statistički značajne razlike u vrednostima CFU/ml svakog ispitivanog mikroorganizma između PEEK, PMMA i KBS. Poredivši KBS sa preostale dve grupe uočen je značajno manji broj formiranih kolonija adheriranih mikroorganizama. Ovakvi rezultati su u kontradiktornosti sa ishodima prethodnih studija u kojima je prikazana podložnost zubnih nadoknada od KBS kolonizaciji mikroorganizama. Kao razlog tome, autori su istakli ranije pomenutu polimerizacionu kontrakciju materijala i curenje nepolimerizovanih monomera sa površine materijala u usnu duplju koji mogu zatim stimulisati rast oralnih bakterija i formiranje biofilma na površini nadoknade od KBS (Brambilla i sar., 2009; Takahashi i sar., 2004).

Ipak, u saglasnosti sa rezultatima sprovedenog istraživanja, u pojedinim studijama sličnog *in vitro* dizajna pokazan je smanjen afinitet kompozitnih smola ka adheziji *Strep. mutans* i *Strep. oralis* (Buergers i sar., 2009; Ionescu i sar., 2012). Iako je ova grupa pokazala povišene vrednosti hrapavosti površine, kao razlog niskoj podložnosti KBS adheziji mikroorganizama u toj, kao i u ovoj studiji, može se uzeti u obzir način izrade materijala, te činjenica da su uvođenjem sistema mašinske obrade značajno poboljšane mehaničke karakteristike KBS čime je indirektno ostvaren i pozitivan uticaj sa mikrobiološke tačke gledišta (Ionescu i sar., 2020). Takođe, još jedan bitan razlog za nizak afinitet KBS ka kolonizaciji bakterija predstavlja i činjenica da materijal korišćen u studiji u svom hemijskom sastavu sadrži čestice metakrilata. Ove čestice poseduju bolja antimikrobna svojstva u poređenju sa bisakrilnom (Ozel i sar., 2017) ili trietilen glikol dimetakrilatnom (TEGDMA) smolom čije promene u strukturi izazvane procesom polimerizacije mogu dovesti do stvaranja defekata na površini materijala i posledično sklonosti materijala adheziji mikroorganizama (Sideridou i Achilias, 2005).

U skladu s očekivanjima, uzorci PMMA grupe su, uz uzorke grupa CG i PEEK, pokazali najveću prijemčivost površina ka adheziji mikroorganizama uključenih u *in vitro* deo istraživanja. Iako su, kako je ranije objašnjeno, uvođenjem sistema mašinske obrade karakteristike PMMA znatno poboljšane, materijal i dalje pokazuje određene nedostatke s mikrobiološkog aspekta.

Brojne studije u prošlosti bavile su se problematikom adhezije mikroorganizama na površini PMMA, od kojih je većina uključivala ispitivanje formiranja biofilma gljivice *C. albicans*, najčešće prisutnog mikroorganizma na površini mobilnih zubnih nadoknada izrađenih od PMMA i glavnog uzročnika proteznog stomatitisa. Kao neke od razloga nedostataka ovog materijala s mikrobiološkog aspekta pojedini autori su izdvojili izuzetno slabu antimikrobnu aktivnost smola unutar njegovog sastava (He i sar., 2012). Takođe, u kliničkim uslovima ne bi trebalo zanemariti ni činjenicu da površina PMMA teško podnosi mehanički pritisak prilikom funkcije žvakanja. Tada često dolazi do nastanka mikropukotina na površini zubne nadoknade izrađene od ovog materijala koje potom predstavljaju predisponirajuća mesta za akumulaciju mikroorganizama.

Posmatrajući adheziju mikroorganizama na površini uzoraka CoCr grupe nisu uočena evidentna odstupanja u broju formiranih kolonija u poređenju sa ostalim grupama. Sprovedeno je nekoliko kliničkih studija baziranih na ispitivanju količine akumuliranog plaka i posledičnog nastanka oboljenja mekih tkiva kod pacijenata rehabilitovanih parcijalnom skeletiranom protezom gde je kao materijal za skelet korišćena konvencionalno izrađena CoCr legura. Međutim, mišljenja o sklonosti pomenute legure ka adheziji mikroorganizama su podeljena. Naime, jedna grupa autora pokazala je visoku prevalenciju plaka i gingivitisa (Chandler i sar., 1984; Yeung i sar., 2000) dok su rezultati drugih studija demonstrirali malu količinu biofilma na površinama mekih tkiva i same proteze, te odlično antibakterijsko svojstvo pomenute legure (Bergman i Ericson, 1989; Budtz-Jørgensen i Isidor, 1990).

Paralelno sa analizom količine formiranog biofilma, u *in vitro* delu studije sproveden je i test ispitivanja vijabilnosti (održivosti) ćelija mikroorganizama uključenih u studiju na površinama uzoraka ispitivanih materijala.

Naime, metoda je sprovedena u skladu sa standardom (International Organization for Standardization (ISO) 10993-5:2009) i podrazumevala je merenje sposobnosti enzima suksinat dehidrogenaze, prisutnog u mitohondrijama živih mikrobnih ćelija, da redukuje MTT (3-(4,5-dimetiltiazol)-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid), žuto obojenu hidrosolubilnu tetrazolijumovu so, u formazan, jedinjenje ljubičaste boje. Aplikacijom dimetil sulfoksida izazvano je zatim rastvaranje ćelija mikroorganizama, nakon čega je broj vijabilnih (održivih) i metabolički aktivnih ćelija mikroorganizama na površini uzoraka materijala određen merenjem optičke gustine (engl. *optical density* (OD)) oslobođenog formazana, fotometrijskom metodom upotrebom spektrofotometra na talasnoj dužini 540 nm. Kao rezultat, povišena vrednost OD 540 nm dobijenog proizvoda ukazivala je na povećan broj živih, metabolički aktivnih ćelija mikroorganizama na površini uzorka određene grupe materijala, te se takvi materijali mogu smatrati pogodnijim za rast i razvoj ispitivanog mikroorganizma (Ghasemi i sar., 2021; Hannig i sar., 2007; Rüttermann i sar., 2012).

U sprovedenoj studiji, vrednosti OD 540 nm za sve mikroorganizme varirale su između grupa ispitivanih materijala u opsegu od 0,35 do 0,6, opisujući testirane materijale sa skoro jednakim uslovima za aktivnost ćelija mikroorganizama na svojim površinama. Ipak, rezultati istraživanja otkrili su prisustvo statistički značajne razlike u pomenutim vrednostima svakog ispitivanog mikroorganizma između grupa materijala. U saglasnosti sa CFU rezultatima, najviše vijabilnih ćelija *Strep. mutans*, *V. parvula*, *F. nucleatum* i *P. gingivalis* zabeleženo je na površinama uzoraka grupe CG dok je u grupi PEEK uočen najveći broj vijabilnih *Strep. oralis* i *C. albicans*. Nasuprot njima, niže vrednosti OD 540 nm pokazale su grupe KBS, CoCr i CP. Kao razlog za najviše vrednosti OD 540 nm u grupama CG i PEEK može se uzeti činjenica da su uzorci ove dve grupe pokazali najveći broj formiranih kolonija mikroorganizama na svojim površinama, pa je bilo za očekivati da će proporcionalno biti i najviše vijabilnih ćelija čiji bi mitohondrijalni enzimi redukovali referentni rastvor MTT, te pokazali najveću optičku gustinu boje dobijenog proizvoda.

Zabeleženo je svega nekoliko istraživanja u kojima je podobnost materijala poput onih korišćenih u ovoj studiji ka adheziji mikroorganizama utvrđivana ispitivanjem vijabilnosti ćelija mikroorganizama adheriranih na njihovim površinama. Dobijeni rezultati nisu u skladu sa studijom na mašinski obradivim materijalima u kojoj je prikazano prisustvo značajno manje količine metabolički aktivnih ćelija *Strep. gordonii*, *Strep. mutans*, *A. naeslundii* i *C. albicans* na površini PEEK u poređenju sa poliranom cirkonijom i PMMA (Hahnel i sar., 2015). Ipak, nešto noviji literaturni podaci pokazali su veći broj živih ćelija *Strep. mutans* na površinama PEEK uzoraka u poređenju sa površinama uzoraka polirane cirkonije (Kamel i sar., 2021).

Nakon grupa CG i PEEK, najveći broj vijabilnih ćelija zabeležen je na površinama uzoraka PMMA grupe. Ovo opažanje je u skladu sa ranijim istraživanjem u kom je sugerisano da bez obzira na vrstu završne mehaničke obrade i poliranja površine PMMA, mikroorganizmi usne duplje, pogotovo pripadnici gljivičnih vrsta kao što je *C. albicans*, mogu prodreti čak 1-2 mm unutar baze proteze izrađene od ovog materijala, te ostati metabolički aktivni na tom mestu (Davenport, 1970).

Kako bi se upotpunila slika formiranog biofilma svakog ispitivanog mikroorganizma na površinama grupa materijala uključenih u studiju u *in vitro* uslovima, izvršena je i SEM 2D analiza. Međutim, iako dobro poznata u naučnim referencama pružajući uvid u jasnu razliku između manje i veće gustine formiranog biofilma kao i opis prisutnih mikroorganizama, metoda se ne može razmatrati u cilju određivanja tačnog broja mikroorganizama na površinama uzoraka materijala s obzirom na činjenicu da polje snimanja obuhvata samo jedan deo površine čitavog uzorka.

Ipak, snimani uzorci svih grupa ispitivanih materijala demonstrirali su na svojim površinama prisustvo formiranog biofilma mikroorganizama uključenih u studiju. U saglasnosti sa CFU i MTT rezultatima, SEM 2D mikrofotografije uzoraka grupa CG, PEEK i PMMA pokazali su gušći sloj biofilma u poređenju s preostale tri grupe, uzimajući u obzir sve ispitivane mikroorganizame.

5.5 Analiza povezanosti (korelacije) rezultata merenja površinske hrapavosti i rezultata ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u *in vitro* uslovima

Opšte je poznato da kvalitet površine materijala za izradu zubne nadoknade ima uticaj na brojne karakteristike zubne nadoknade. Tu se izdvajaju estetske osobine poput održavanja sjaja ili apsorpcije boje i pigmenata uz diskoloraciju nadoknade, biokompatibilnost, korozija, mehaničko trošenje tokom funkcije i dr. Međutim, u cilju obezbeđivanja dugotrajnosti nadoknade i očuvanja oralnog i opšteg zdravlja od izuzetne važnosti je i afinitet površine zubne nadoknade ka adheziji mikroorganizama usne duplje koji je pod uticajem karakteristika površine materijala od kojeg je nadoknada izrađena.

Međusobna povezanost (korelacija) površinske hrapavosti i formiranog biofilma na površinama materijala u *in vitro* uslovima predstavljena je u vidu odnosa izračunatih numeričkih vrednosti srednjeg aritmetičkog odstupanja profila merenja površinske hrapavosti materijala (*Ra*) i broja formiranih kolonija (engl. *colony forming units (CFU)*) ispitivanih mikroorganizama po mililitru tečnosti, upotrebom *Spearman* koeficijenta korelacije rangova.

Rezultati sprovedene studije otkrili su prisustvo umerene pozitivne korelacije između *Ra* i CFU/ml *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Fusobacterium nucleatum* i *Porphyromonas gingivalis*, kao i slabe pozitivne korelacije između *Ra* i CFU/ml *Veillonella parvula* i *Candida albicans*, ukazujući na povećanu akumulaciju pomenutih mikroorganizama na hrapavijim površinama ispitivanih materijala.

Autori brojnih istraživanja demonstrirali su slična opažanja, upućujući na neminovno veću akumulaciju biofilma na hrapavijim površinama zubnih nadoknada (Bollen i sar., 1997; Quirynen i sar., 1993). Takođe, *Ra* vrednost od 0,2 μm prihvaćena je kao granična vrednost ispod koje hrapavost površine materijala nema uticaja na adheziju mikroorganizama (Bollen i sar., 1996). Pojedini autori kasnije su dopunili ovu tvrdnju pokazujući da se između površinske hrapavosti zubne nadoknade i broja prisutnih mikroorganizama ipak može očekivati prisustvo slabe pozitivne korelacije ukoliko je vrednost *Ra* površine nadoknade niža od 0,2 μm dok se ukoliko je vrednost viša od 0,2 μm može zapaziti umerena ili jaka pozitivna korelacija između datih parametara (Yuan C i sar., 2016).

U saglasnosti sa rezultatima studije, prethodna istraživanja u vezi sa konvencionalno izrađenim KBS (Ikeda i sar., 2007; Park JW i sar., 2019), konvencionalno izrađenim PMMA (Radford i sar., 1998; Verran i sar., 1991), mašinski obradivim PEEK (D'Ercole i sar., 2020; Kamel i sar., 2021), mašinski obradivom cirkonijom (Jaeggi i sar., 2022; Yu i sar., 2016), kao i mašinski obradivom (Hjerpe i sar., 2021) ili konvencionalno izrađenom CoCr legurom (Taylor i sar., 1998) pokazala su da hrapavije površine pomenutih materijala favorizuju veći broj adheriranih mikroorganizama na svojim površinama.

Nasuprot tome, uzimajući takođe u obzir materijale poput onih korišćenih u sprovedenom istraživanju, u brojnim literaturnim podacima nije pronađena jaka direktna veza između adhezije mikroorganizama i hrapavosti površina konvencionalnog KBS (Bilgili i sar., 2020; Cazzaniga i sar., 2017; Pereira i sar., 2011), konvencionalnog (De Foggi i sar., 2016; Zamperini i sar., 2010) ili mašinski obradivog PMMA (Fiore i sar., 2022; Giti i sar., 2021), mašinski obradivog PEEK (Hahnel i sar., 2015), kao i mašinski obradive cirkonije (Hahnel i sar., 2009; Zupančić Čepić i sar., 2020), sugerišući da druge karakteristike pomenutih materijala igraju važniju ulogu u formiranju biofilma na njegovoj površini.

Takođe, koristeći sličan *in vitro* dizajn studije sa istim sojevima mikroorganizama grupa autora pojedinih studija pokazala je da rana adhezija oralnih streptokoka poput *Strep. mutans* (Yu i sar., 2016; Yuan C i sar., 2016) i *Strep. oralis* (D'Ercole i sar., 2020), kao i gljivičnih vrsta poput *C. albicans* (Al-Fouzan i sar., 2017; Da Silva i sar., 2015) direktno zavisi od prisustva strukturnih nepravilnosti na površini zubne nadoknade, kao što su fisure i žlebovi nastali kao posledica završne mehaničke obrade i poliranja.

Nasuprot tome, nekoliko autora prezentovalo je u potpunosti drugačije rezultate, upućujući na povećanu adheziju *Strep. mutans* na glatkim površinama konvencionalnih (Carlen i sar., 2011) ili mašinski obradivih KBS (Ionescu i sar., 2020). Kao razlog za ovu naizgled neobičnu pojavu autori navode činjenicu da *Strep. mutans* poseduje sposobnost lučenja brojnih supstanci nerastvorljivih u vodi koje mu olakšavaju prijanjanje za glatkije površine zubnih nadoknada.

Konačno, u pojedinim studijama nije pronađena direktna povezanost hrapavosti površine zubnih nadoknada i adhezije *Strep. mutans* (Cazzaniga i sar., 2017; Hjerpe i sar., 2021), *Strep. oralis* (Yamamoto i sar., 1996), *P. gingivalis* (Holban i sar., 2021) ili *C. albicans* (De Foggi i sar., 2016; Hahnel i sar., 2010), ukazujući na druge faktore koji bi mogli imati veći uticaj na adheziju pomenutih mikroorganizama na površinama zubnih nadoknada.

5.6 Analiza povezanosti (korelacije) rezultata merenja kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i površinske slobodne energije i rezultata ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u *in vitro* uslovima

Kao što je ranije naglašeno, izuzev površinske hrapavosti formiranje biofilma na površini materijala za izradu zubne nadoknade zavisi i od karaktera njegove površine sa aspekta hidrofilnosti (kvašenja). U cilju ispitivanja uticaja hidrofilnosti površine materijala na adheziju mikroorganizama u *in vitro* uslovima fokus brojnih studija u prošlosti bio je na poređenju numeričkih vrednosti kontaktnog ugla određene tečnosti, najčešće destilovane vode i broja formiranih kolonija mikroorganizama na površini materijala, predstavljanjem korelacije u vidu izračunate vrednosti određenog koeficijenta. Međutim, s obzirom da je u sprovedenoj studiji hidrofilnost materijala definisana na osnovu formulom izračunate vrednosti SFE, prikaz povezanosti pomenutih parametara izračunavanjem vrednosti određenog koeficijenta nije moguć.

Ipak, upoređujući adheziju mikroorganizama na površinama uzoraka grupa ispitivanih materijala uočava se da su uzorci CG grupe, prethodno opisani kao hidrofilni sa najnižim vrednostima izmerenih kontaktnih uglova dve od tri referentne tečnosti (destilovana voda i etilen glikol), kao i najvišom vrednošću izračunate SFE, pokazali najveću sklonost ka adheziji četiri od šest ispitivanih mikroorganizama na svojim površinama (*Strep. mutans*, *V. parvula*, *F. nucleatum* i *P. gingivalis*). Međutim, najveću količinu preostala dva mikroorganizma (*Strep. oralis* i *C. albicans*) na svojim površinama demonstrirali su uzorci grupe PEEK, iako su prethodno pokazali najviše vrednosti izmerenih kontaktnih uglova za dve od tri referentne tečnosti (destilovana voda i etilen glikol), kao i skoro najnižu vrednost izračunate SFE. Iz svega navedenog, na osnovu rezultata sprovedenog istraživanja nije moguće utvrditi direktan uticaj hidrofilnosti površine materijala na adheziju mikroorganizama.

Bez obzira na to što pojedina grupa autora sugerise da je hidrofilnost materijala čak važnija od hrapavosti njegove površine sa mikrobiološkog aspekta (De-la-Pinta i sar., 2019), prethodne studije pokazale su različite ishode i do danas nije utvrđen jasan uticaj pomenutog parametra na adheziju mikroorganizama na površini materijala.

U saglasnosti s rezultatima sprovedenog istraživanja, autori pionir studija usko vezanih za ovu temu demonstrirali su prisustvo pozitivne korelacije između visokih vrednosti SFE supstrata i akumuliranog plaka, upućujući na činjenicu da su hidrofilne površine poput zubne gleđi sposobne da akumuliraju i do deset puta više plaka od hidrofobnih, kao što je teflon traka (Quirynen i sar., 1990).

Takođe, analizirajući formiranje biofilma istih sojeva mikroorganizama na konvencionalno ili mašinski izrađenim dentalnim materijalima poput materijala uključenih u sprovedeno istraživanje, grupa autora pokazala je da veća hidrofilnost površine dentalnih polimera dovodi do povećane sklonosti ka kolonizaciji bakterija, istražujući prijemчивost *Strep. mutans* na površini konvencionalnog KBS (Bilgili i sar., 2020; Hahnel i sar., 2008), *Strep. oralis* na površini mašinski obradivog PEEK (D'Ercole i sar., 2020), kao i *F. nucleatum* na površini mašinski obradivog PMMA (Astasov-Frauenhoffer i sar., 2018). Osim toga, gljivična vrsta *C. albicans* opisana je kao mikroorganizam sa izrazitim afinitetom ka hidrofilnim površinama sa visokim vrednostima SFE, nakon analize rezultata ispitivanja njene adhezije na površinama konvencionalnih KBS (Ozel i sar., 2017) i PMMA (Da Silva i sar., 2015; Zamperini i sar., 2010).

S druge strane, brojni literaturni podaci upućuju na potpuno drugačije rezultate, pokazujući sklonost mikroorganizama ka adheziji na površinama konvencionalnog PMMA (Ozel i sar., 2017) i mašinski obradive cirkonije (Scarano i sar., 2004) koji u pomenutim studijama pokazuju hidrofobni karakter površine sa niskim vrednostima SFE.

Kao jedan od razloga za povećan afinitet mikroorganizama ka površinama zubnih nadoknada sa hidrofobnim karakterom pojedini autori navode činjenicu da hidrofobne površine materijala za izradu zubnih nadoknada dozvoljavaju efikasno uklanjanje bilo kakvog prisustva vlage sa iste čime se mikroorganizmima omogućava lakši pristup i formiranje jače adhezivne sile sa površinom zubne nadoknade (Mei i sar., 2009). Štaviše, hidrofobne površine pokazuju i tendenciju ka izrazitoj akumulaciji raznih proteina pljuvačne pelikule koji zatim predstavljaju receptorska mesta za adheziju oralnih mikroorganizama (Ge i sar., 2004).

U prilog ovakvim opažanjima ide i ranije pomenuto hidrofobno svojstvo površine samog mikrorganizma, te su brojne studije sličnog dizajna pokazale veću tendenciju *Strep. mutans* (Grivet i sar., 2000; Kim i Kwon, 2017), *Strep. oralis* (Song i sar., 2015) i *C. albicans* (Anil i sar., 2001; Ozel i sar., 2017) ka adheziji na hidrofobnim površinama materijala, zahvaljujući hidrofobnom karakteru njihove sopstvene površine.

Međutim, rezultati pojedinih prethodnih istraživanja nisu demonstrirali prisustvo direktnog uticaja pomenute karakteristike površine materijala na adheziju mikroorganizama, odbacujući njenu važnost s mikrobiološkog aspekta. S tim u vezi, uzimajući u obzir mikroorganizme uključene u sprovedeno istraživanje nije uočen ni pozitivan a ni negativan uticaj hidrofilnosti površine konvencionalnog (Cazzaniga i sar., 2017) i mašinski obradivog KBS na adheziju *Strep. mutans* (Aykent i sar., 2010; Ionescu i sar., 2020), konvencionalno izrađenog PMMA i adhezije *C. albicans* (De Foggi i sar., 2016; Moura i sar., 2006), kao i mašinski obradive cirkonije i adhezije *Strep. oralis* (Zhao B i sar., 2014), *F. nucleatum* i *P. gingivalis* (Jaeggi i sar., 2022).

Konačno, kao moguće objašnjenje navedenom nepodudaranju rezultata navedenih istraživanja u nedavnim studijama predstavljeno je još jedno mišljenje. Naime, povećana adhezija mikrorganizama povezuje se uglavnom sa umereno hidrofilnim ili umereno hidrofobnim površinama sa vrednostima izmerenih kontaktnih uglova u rasponu od 40° do 130° (Wassmann i sar., 2017; Yuan Y i sar., 2017). Nasuprot tome, izrazito hidrofilne ili hidrofobne površine materijala sa vrednostima kontaktnih uglova van pomenutog opsega pokazuju do određene mere otpornost ka kolonizaciji mikroorganizama (Falde i sar., 2016; Sterzenbach i sar., 2020; Zhang X i sar., 2013).

Nedostatak jakog pozitivnog uticaja površinske hrapavosti, kao i odsustvo uvida u direktnu povezanost površinske slobodne energije i broja formiranih kolonija mikroorganizama na površinama ispitivanih materijala u *in vitro* uslovima upućuje na činjenicu da karakteristike površine materijala nisu uvek odlučujuće sa mikrobiološke tačke gledišta i da je formiranje biofilma na mašinski obradivim dentalnim materijalima značajno pod uticajem i drugih faktora.

Jedan od najvažnijih predstavljaju same osobine komponenti hemijskog sastava materijala. Naime, autori ranije studije sličnog *in vitro* dizajna pokazali su da u prisustvu veštački formirane pljuvačne pelikule preko površine uzoraka materijala u *in vitro* uslovima površine uzoraka podležu adheziji i hidrofilnih i hidrofobnih mikroorganizama, kako na hrapavim tako i na glatkim površinama (Mabboux i sar., 2004). Pritom, kao što je ranije objašnjeno, uloga komponenti hemijskog sastava materijala na adheziju mikroorganizama na njegovoj površini može biti indirektna, uticanjem na menjanje karakteristika površine ili direktna, interakcijom sa prisutnim proteinima pljuvačne pelikule koji zatim predstavljaju receptorska mesta za adheziju primarnih kolonizatora (Cazzaniga i sar., 2017).

5.7 Analiza rezultata ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u *in situ* uslovima

Nakon sprovedenog *in vitro* dela istraživanja usledio je drugi deo mikrobiološke analize koji se odnosio na ispitivanje formiranog biofilma na površinama uzoraka grupa materijala uključenih u studiju u *in situ* uslovima nakon 24 h izloženosti istih uslovima oralne sredine.

Za potrebe izvođenja ovog dela studije uključeni su učesnici kojima su date instrukcije za nošenje individualnog intraoralnog splinta izrađenog od kopoliester/poliuretan folije sa posebnim kućistima za smeštaj uzoraka grupa ispitivanih materijala. Splint je bio dizajniran tako da obezbedi dovoljan prostor između uzoraka u splintu i sluzokože nepca. Na taj način omogućeno je konstantno izlaganje uzoraka prisustvu pljuvačke uz odsustvo bilo kakvih mehaničkih smetnji od strane jezika i orofacijalnih mišića usled čega bi potencijalno moglo doći do slučajnog gubitka uzoraka tokom perioda nošenja splinta (Jaeggi i sar., 2022; Silva i sar., 2018; Zaugg i sar., 2017; Zeller i sar., 2020). Procedura izrade splinta bila je jednostavna, a svi učesnici sprovedene studije okarakterisali su splint kao komforan za nošenje s jedinom prijavljenom blagom smetnjom u izgovoru pojedinih glasova.

In situ model studije primenjen je zbog mogućnosti reprodukcije dinamičkog i multifaktorijskog procesa formiranja biofilma u uslovima oralne sredine. Period akumulacije mikroorganizama bio je ograničen na 24 h što je opšte prihvaćeno kao prikladno za studije fokusirane na analizu inicijalno formiranog biofilma (Kommerein i sar., 2018; Park JH i sar., 2014; Periasamy i Kolenbrander, 2010). Naime, rana kolonizacija mikroorganizama na površini zubne nadoknade primetna je već nakon 6 h izlaganja iste uslovima oralne sredine sa maksimumom postignutim nakon 24 h, nakon čega se ne primećuju značajnije promene u broju adheriranih mikroorganizama (Quirynen i sar., 1994).

Nakon 24 h eksperimentalnog perioda i uklanjanja uzoraka grupa ispitivanih materijala iz individualnog intraoralnog splinta učesnika, ukupan broj kopija DNK bakterija usne duplje prisutnih na površinama uzoraka određen je pomoću *real-time* PCR metode. Metoda je pouzdana i u osnovi predstavlja praćenje amplifikacije bakterijske DNK u realnom vremenu tokom trajanja PCR ciklusa (Higuchi i sar., 1992; Holland i sar., 1991). Naime, po završetku svakog ciklusa reakcije intenzitet emitovanog fluorescentnog signala prikazuje trenutnu količinu amplifikovane bakterijske DNK u ispitivanom uzorku. Samim tim određivanje ukupnog broja kopija bakterijske DNK u uzorcima omogućeno je na osnovu prikazanih kalibracionih kriva serijski razblaženih standardnih uzoraka sa poznatim brojem kopija (Bustin, 2009; Kubista i sar., 2006).

Poput rezultata *in vitro* dela istraživanja, i u *in situ* delu studije utvrđeno je prisustvo statistički značajne razlike u ukupnom broju adheriranih bakterija usne duplje na površinama uzoraka grupa ispitivanih materijala. Dobijeni rezultati ukazali su na statistički značajno veći broj kopija bakterijske DNK u grupama CG i PEEK u poređenju sa KBS i veće vrednosti, ali bez statističke značajnosti, u poređenju sa uzorcima PMMA, CoCr i CP grupe. S druge strane, uzorci CoCr, CP i KBS grupe pokazali su nizak afinitet ka adheziji oralnih bakterija nakon određenog perioda prisustva u usnoj duplji.

Imajući u vidu eksperimentalni *in situ* dizajn, zabeleženo je svega nekoliko studija u vezi sa sličnim, konvencionalnim ili mašinski obradivim dentalnim materijalima. U skladu sa rezultatima sprovedenog istraživanja, grupa autora istakla je dobra antimikrobna svojstva polirane cirkonije protiv rane adhezije mikroorganizama u usnoj duplji (Nascimento i sar., 2016; Scarano i sar., 2004) dok noviji literaturni podaci pokazuju da su u uslovima oralne sredine zubne nadoknade izrađene od mašinski obradive CoCr legure manje podložne brzom formiranju biofilma zbog specifične površinske slobodne energije ovog materijala (Engel i sar., 2020). Ipak, autori pojedinih prethodno objavljenih *in situ* studija nude drugačija opažanja i upućuju na veliku osetljivost konvencionalnog (Carlén i sar., 2001) i mašinski obradivog KBS (Engel i sar., 2020) na ranu kolonizaciju mikroorganizama u usnoj duplji.

Izuzev razlike između grupa ispitivanih materijala, rezultati *real-time* PCR analize ukazali su i na značajne varijacije među učesnicima studije u pogledu ukupnog broja bakterija adheriranih na površinama uzoraka grupa materijala nakon 24 h izlaganja istih uslovima oralne sredine. Velika odstupanja u količini biofilma nakon kratkog vremenskog intervala prisustva u usnoj duplji bila su očekivana, što je u velikoj meri povezano sa individualnim razlikama u sastavu oralne flore, kao i razlikama u samom protoku i sastavu pljuvačke između učesnika studije. Štaviše, unos različite vrste i količine hrane i pića za vreme pauza tokom perioda akumulacije nedvosmisleno je uticao na povećanje ili smanjenje pH vrednosti u usnoj duplji u kraćem ili dužem periodu nakon konzumacije, a samim tim i na brzinu stvaranja bakterijskog biofilma.

S tim u vezi, grupa autora ranije objavljenih studija demonstrirala je da sam sastav rano formiranog biofilma na površinama zubnih nadoknada nije zavisao isključivo od vrste materijala za izradu zubnih nadoknada, već je i individualno specifičan, te da se u pogledu brzine i intenziteta formiranja ranog biofilma pojedinci mogu svrstati u dve grupe, u „spore” ili „brze” stvaraoce plaka (Hu i sar., 2022; Zee i sar., 1997).

U cilju dopune analize ispitivanja formiranog biofilma u *in situ* delu studije, nakon *real-time* PCR kvantifikacije izvršena je i 2D analiza formiranog biofilma na površinama uzoraka grupa ispitivanih materijala upotrebom SEM. Kao što je ranije objašnjeno, metoda nije visoko senzitivna za kvantifikaciju tačnog broja adheriranih bakterija poput *real-time* PCR. Međutim, njeno uvođenje pružilo je uvid u gustinu formiranog biofilma mikroorganizama usne duplje i omogućilo karakterizaciju vrsta mikroorganizama prisutnih u ranom biofilmu na površinama uzoraka grupa ispitivanih materijala nakon prisustva istih u usnoj duplji u trajanju od 24 h.

Mikrografi snimljeni pri manjem uveličanju potvrdili su prethodno predstavljene rezultate *real-time* PCR analize i omogućili jasnu diferencijaciju između uzoraka čije su površine bile gotovo u celosti prekrivene mikroorganizmima, kao što su uzorci grupa CG, PEEK i PMMA, i uzoraka koji su na svojim površinama prikazali znatno manju porciju mikroorganizama, kao što su uzorci grupa CoCr, CP i KBS. Snimci svih uzoraka nastali na većem uveličanju pokazali su biofilm sa dominacijom koka okruženih sa nekolicinom kratkih štapićastih mikroorganizama, što je bilo očekivano za floru nezrelog biofilma (Carrassi i sar., 1989; Kvich i sar., 2022).

5.8 Analiza povezanosti (korelacije) rezultata merenja površinske hrapavosti, kontaktnog ugla (ugla kvašenja) i površinske slobodne energije i rezultata ispitivanja formiranog biofilma na površinama materijala u *in situ* uslovima

Ispitujući povezanost karakteristika površine uzoraka materijala i adhezije mikroorganizama nakon 24 h izloženosti uzoraka uslovima oralne sredine, slično poput rezultata *in vitro* dela studije i u *in situ* delu zabeleženo je prisustvo slabe pozitivne korelacije između srednjeg aritmetičkog odstupanja profila merenja hrapavosti površine (R_a) i ukupnog broja kopija bakterijske DNK na površinama uzoraka grupa ispitivanih materijala.

Takođe, i u ovom delu mikrobiološke analize moglo se uočiti odsustvo jasnog pokazatelja uticaja hidrofilnosti površine uzoraka materijala na adheziju oralnih mikroorganizama, s obzirom da su CG i PEEK, grupe sa najvećim brojem adheriranih bakterija na svojim površinama nakon zadatog perioda akumulacije, prethodno opisane kao grupe uzoraka sa najhidrofilnijim (CG), odnosno najhidrofobnijim (CP) karakterom površine u poređenju sa drugim grupama ispitivanih materijala.

Zahvaljujući tome, rezultati *in situ* dela studije potvrdili su prethodna zapažanja izneta na osnovu rezultata *in vitro* analize, ukazujući na odsustvo jakog uticaja karakteristika površine ispitivanih materijala na formiranje biofilma na njihovim površinama u realnim uslovima oralne sredine, te činjenicu da mnoštvo drugih faktora doprinosi ovom složenom dinamičkom procesu.

Na osnovu svega navedenog, postavljena radna hipoteza studije da mašinski obradivi dentalni materijali, iako na isti način pripremljeni, završno mehanički obrađeni i ispolirani prema uputstvu proizvođača, ispoljavaju različitosti u karakteristikama površine koje dovode do povećane sklonosti ka adheziji mikroorganizama na površini jednog materijala u poređenju sa drugim može biti delimično prihvaćena.

5.9 Klinički značaj istraživanja

Prevenција infekcija usne duplje, kao što su karijes, infekcije parodontalnog tkiva poput gingivitisa i parodontitisa, infekcije peri-implantatnih tkiva poput peri-implantatnog mukozitisa i peri-implantitisa, kao i infekcije sluzokože usne duplje izazvane prisustvom mobilne zubne nadoknade predstavljaju i dalje problem savremene stomatologije. Imajući u vidu značaj oralnog biofilma u nastanku ovih bolesti, od izuzetne važnosti je unapređenje znanja, razumevanje i adekvatna kontrola formiranja biofilma u cilju poboljšanja i unapređenja oralnog, ali i opšteg zdravstvenog stanja.

Čak i naizgled idealno sprovođenje postupaka oralne higijene nije dovoljno da obezbedi potpunu zaštitu od nastanka oralnih infekcija. Kao što je ranije objašnjeno, velika količina mikroorganizama akumulirana na površini zubne nadoknade nedvosmisleno dovodi do nastanka infekcija usne duplje. Stoga, cilj je stvoriti dentalni materijal koji će nakon procedure izrade, završne mehaničke obrade i poliranja posedovati adekvatne karakteristike koje ograničavaju akumulaciju mikroorganizama na njihovim površinama tokom prisustva u usnoj duplji čime usporavaju ili eliminišu nastanak navedenih bolesti.

Poslednjih godina, posebna pažnja savremene stomatologije usmerena je ka razvoju mašinski obradivih dentalnih materijala kako bi se proizvodnja materijala standardizovala i kako bi se u najvećoj mogućoj meri poboljšale osobine materijala s mikrobiološkog aspekta. Međutim, i pored izuzetnog napretka u razvoju ove grupe materijala i dalje postoji gomila izazova u stvaranju njihovih zadovoljavajućih karakteristika i razjašnjenju mehanizama kojima bi se ovi materijali što više oduprli adheziji mikroorganizama na svojim površinama.

U svetlu ovih razmatranja, dobijeni rezultati sprovedene studije pružaju uvid u sklonost ispitivanih mašinski obradivih dentalnih materijala ka adheziji mikroorganizama na njihovim površinama, kako u laboratorijskim tako i u realnim uslovima oralne sredine. Osim toga, pokazana je i zavisnost iste od karakteristika površine materijala, kao što su površinska hrapavost, kontaktni ugao i površinska slobodna energija. Takođe, stečena saznanja mogu poslužiti i za buduća istraživanja u pogledu ponašanja mašinski obradivih dentalnih materijala kada su u pitanju druge karakteristike usko povezane sa kvalitetom njihove površine, kao što su korozija, habanje, estetska svojstva materijala i dr. Na taj način, naučna zajednica bi mogla biti korak bliže definisanju materijala izbora prilikom izrade različitih zubnih nadoknada izrađenih od mašinski obradivih dentalnih materijala.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata sprovedenog istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Glazirana cirkonija poseduje hrapaviju površinu u poređenju sa drugim ispitivanim mašinski obradivim dentalnim materijalima poput kompozita na bazi smole, poli (metil metakrilata), poli (etar etar ketona), polirane cirkonije i kobalt-hrom legure.
2. U poređenju sa drugim ispitivanim materijalima, nižu vrednost površinske slobodne energije i hidrofobniji karakter površine pokazuju poli (etar etar keton) i kobalt-hrom legura dok višu vrednost površinske slobodne energije i hidrofilniji karakter površine pokazuje glazirana cirkonija.
3. Hrapavije površine ispitivanih materijala poseduju više vrednosti površinske slobodne energije i veću hidrofilnost.
4. Glazirana cirkonija i poli (etar etar keton) pokazuju najveću sklonost ka adheziji mikroorganizama *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* i *Candida albicans* u *in vitro* uslovima dok najmanju podložnost istom pokazuju polirana cirkonija i kompozit na bazi smole.
5. Na hrapavijim površinama ispitivanih materijala javlja se povećana akumulacija pomenutih mikroorganizama u *in vitro* uslovima.
6. Ne uočava se direktan uticaj površinske slobodne energije i hidrofilnosti površine ispitivanih materijala na adheziju pomenutih mikroorganizama na njihovim površinama u *in vitro* uslovima.
7. Glazirana cirkonija i poli (etar etar keton) pokazuju najveću sklonost ka adheziji mikroorganizama usne duplje u *in situ* uslovima dok najmanju podložnost istom pokazuju kompozit na bazi smole i polirana cirkonija.
8. Na hrapavijim površinama ispitivanih materijala javlja se povećana akumulacija mikroorganizama usne duplje u *in situ* uslovima.
9. Ne uočava se direktan uticaj površinske slobodne energije i hidrofilnosti površine ispitivanih materijala na adheziju mikroorganizama usne duplje na njihovim površinama u *in situ* uslovima.
10. Adhezija mikroorganizama usne duplje na površinama ispitivanih materijala u *in situ* uslovima ne pokazuje zavisnost isključivo od karakteristika materijala, već i od individualnih osobina svakog pojedinca.

7. LITERATURA

1. Aguirre, B. C., Chen, J. H., Kontogiorgos, E. D., Murchison, D. F., & Nagy, W. W. (2020). Flexural strength of denture base acrylic resins processed by conventional and CAD-CAM methods. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 123(4), 641–646.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2019.03.010>
2. Ahn, D. H., Kim, H. J., Joo, J. Y., & Lee, J. Y. (2019). Prevalence and risk factors of peri-implant mucositis and peri-implantitis after at least 7 years of loading. *Journal of Periodontal and Implant Science*, 49(6), 397–405.
<https://doi.org/10.5051/jpis.2019.49.6.397>
3. Al Jabbari Y. S. (2014). Physico-mechanical properties and prosthodontic applications of Co-Cr dental alloys: a review of the literature. *Journal of Advanced Prosthodontics*, 6(2), 138–145.
<https://doi.org/10.4047/jap.2014.6.2.138>
4. Al-Amleh, B., Lyons, K., & Swain, M. (2010). Clinical trials in zirconia: a systematic review. *Journal of Oral Rehabilitation*, 37(8), 641–52.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2010.02094.x>
5. Al-Fouzan, A. F., Al-Mejrad, L. A., & Albarrag, A. M. (2017). Adherence of Candida to complete denture surfaces in vitro: A comparison of conventional and CAD/CAM complete dentures. *Journal of Advanced Prosthodontics*, 9(5), 402–408.
<https://doi.org/10.4047/jap.2017.9.5.402>
6. Alghazzawi, T. F. (2016). Advancements in CAD/CAM technology: Options for practical implementation. *Journal of Prosthodontic Research*, 60(2), 72–84.
<https://doi.org/10.1016/j.jpor.2016.01.003>
7. Al-Haj Husain, N., Camilleri, J., & Özcan, M. (2016). Effect of polishing instruments and polishing regimens on surface topography and phase transformation of monolithic zirconia: An evaluation with XPS and XRD analysis. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 64, 104–112.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.07.025>
8. Al-Qarni, F. D., Goodacre, C. J., Kattadiyil, M. T., Baba, N. Z., & Paravina, R. D. (2020). Stainability of acrylic resin materials used in CAD-CAM and conventional complete dentures. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 123(6), 880-887.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2019.07.004>
9. Alrabiah, M., Alshagroud, R. S., Alsahhaf, A., Almojaly, S. A., Abduljabbar, T., & Javed, F. (2019). Presence of Candida species in the subgingival oral biofilm of patients with peri-implantitis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 21(4), 781–785.
<https://doi.org/10.1111/cid.12760>
10. Alt, V., Hannig, M., Wostmann, B., & Balkenhol, M. (2011). Fracture strength of temporary fixed partial dentures: CAD/CAM versus directly fabricated restorations. *Dental Materials*, 27(4), 339–47.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.11.012>

11. Alves, L. M. M., Contreras, L. P. C., Bueno, M. G., Campos, T. M. B., Bresciani, E., Valera, M. C., & Melo, R. M. (2019). The Wear Performance of Glazed and Polished Full Contour Zirconia. *Brazilian Dental Journal*, 30(5), 511–518.
<https://doi.org/10.1590/0103-6440201902801>
12. An, Y. H., & Friedman, R. J. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43(3), 338–348.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199823\)43:3<338::aid-jbm16>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199823)43:3<338::aid-jbm16>3.0.co;2-b)
13. Anil, S., Ellepola, A.N., & Samaranayake, L.P. (2001) The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Diseases*, 7(2), 119-22.
<https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2001.70210.x>
14. Astasov-Frauenhoffer, M., Glauser, S., Fischer, J., Schmidli, F., Waltimo, T., & Rohr, N. (2018). Biofilm formation on restorative materials and resin composite cements. *Dental Materials*, 34(11), 1702–1709.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.08.300>
15. Aykent, F., Yondem, I., Ozyesil, A. G., Gunal, S. K., Avunduk, M. C., & Ozkan, S. (2010). Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 103(4), 221–227.
[https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(10\)60034-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(10)60034-0)
16. Baelum, V., & Ellegaard, B. (2004). Implant survival in periodontally compromised patients. *Journal of Periodontology*, 75(10), 1404–1412.
<https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.10.1404>
17. Baldeck, J. D., & Marquis, R. E. (2008). Targets for hydrogen-peroxide-induced damage to suspension and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(10), 868–875.
<https://doi.org/10.1139/w08-078>
18. Baldi, A., Carossa, M., Comba, A., Alovise, M., Femiano, F., Pasqualini, D., Berutti, E., & Scotti, N. (2022). Wear Behaviour of Polymer-Infiltrated Network Ceramics, Lithium Disilicate and Cubic Zirconia against Enamel in a Bruxism-Simulated Scenario. *Biomedicines*, 10(7), 1682.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10071682>
19. Barazanchi, A., Li, K. C., Al-Amleh, B., Lyons, K., & Waddell, J. N. (2020). Adhesion of porcelain to three-dimensionally printed and soft milled cobalt chromium. *Journal of Prosthodontic Research*, 64(2), 120–127.
<https://doi.org/10.1016/j.jpor.2019.05.007>
20. Barkarmo, S., Longhorn, D., Leer, K., Johansson, C. B., Stenport, V., Franco-Tabares, S., Kuehne, S. A., & Sammons, R. (2019). Biofilm formation on polyetheretherketone and titanium surfaces. *Clinical and Experimental Dental Research*, 5(4), 427–437.
<https://doi.org/10.1002/cre2.205>

21. Bechir, F., Bataga, S. M., Ungureanu, E., Vranceanu, D. M., Pacurar, M., Bechir, E. S., & Cotrut, C. M. (2021). Experimental Study Regarding the Behavior at Different pH of Two Types of Co-Cr Alloys Used for Prosthetic Restorations. *Materials (Basel)*, 14(16), 4635. <https://doi.org/10.3390/ma14164635>
22. Becker, M. R., Paster, B. J., Leys, E. J., Moeschberger, M. L., Kenyon, S. G., Galvin, J. L., Boches, S. K., Dewhirst, F. E., & Griffen, A. L. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 1001–1009. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.1001-1009.2002>
23. Bergman, B., & Ericson, G. (1989). Cross-sectional study of the periodontal status of removable partial denture patients. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 61(2), 208–211. [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(89\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0022-3913(89)90375-2)
24. Bico, J., Thiele, U., & Quéré, D. (2002). Wetting of textured surfaces. *Colloids and Surfaces*, 206(1–3), 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00061-4)
25. Bidra, A. S., Taylor, T. D., & Agar, J. R. (2013). Computer-aided technology for fabricating complete dentures: systematic review of historical background, current status, and future perspectives. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 109(6), 361–366. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(13\)60318-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(13)60318-2)
26. Bilgili, D., DüNDAR, A., Barutçugil, Ç., Tayfun, D., & Özyurt, Ö. K. (2020). Surface properties and bacterial adhesion of bulk-fill composite resins. *Journal of Dentistry*, 95, 103317. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103317>
27. Boitelle, P., Mawussi, B., Tapie, L., & Fromentin, O. (2014). A systematic review of CAD/CAM fit restoration evaluations. *Journal of Oral Rehabilitation*, 41(11), 853–74. <https://doi.org/10.1111/joor.12205>
28. Bollen, C. M., Lambrechts, P., & Quirynen, M. (1997). Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dental Materials*, 13(4), 258–269. [https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(97\)80038-3](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(97)80038-3)
29. Bollen, C. M., Papaioanno, W., Van Eldere, J., Schepers, E., Quirynen, M., & van Steenberghe, D. (1996). The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clinical Oral Implants Research*, 7(3), 201–211. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1996.070302.x>
30. Brajović, G., Popović, B., Puletić, M., Kostić, M., & Milašin, J. (2016). Estimation of total bacteria by real-time PCR in patients with periodontal disease. *Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo*, 144(1-2), 10–14. <https://doi.org/10.2298/sarh1602010b>
31. Brambilla, E., Gagliani, M., Ionescu, A., Fadini, L., & García-Godoy, F. (2009). The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces. *Dental Materials*, 25(9), 1067–1072. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.02.012>

32. Brennan, C. A., & Garrett, W. S. (2019). *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 156–166.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0129-6>
33. Budtz-Jørgensen, E., & Isidor, F. (1990). A 5-year longitudinal study of cantilevered fixed partial dentures compared with removable partial dentures in a geriatric population. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 64(1), 42–47.
[https://doi.org/10.1016/0022-3913\(90\)90151-2](https://doi.org/10.1016/0022-3913(90)90151-2)
34. Buergers, R., Schneider-Brachert, W., Hahnel, S., Rosentritt, M., & Handel, G. (2009). Streptococcal adhesion to novel low-shrink silorane-based restorative. *Dental Materials*, 25(2), 269–275.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.07.011>
35. Bustin S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169–193.
<https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
36. Çakmak, G., Subaşı, M. G., & Yilmaz, B. (2021). Effect of thermocycling on the surface properties of resin-matrix CAD-CAM ceramics after different surface treatments. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 117, 104401.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104401>
37. Carlén, A., Nikdel, K., Wennerberg, A., Holmberg, K., & Olsson, J. (2001). Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials*, 22(5), 481–487.
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00204-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00204-0)
38. Carrassi, A., Santarelli, G., & Abati, S. (1989). Early plaque colonization on human cementum. *Journal of Clinical Periodontology*, 16(4), 265–267.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1989.tb01652.x>
39. Cazzaniga, G., Ottobelli, M., Ionescu, A. C., Paolone, G., Gherlone, E., Ferracane, J. L., & Brambilla, E. (2017). In vitro biofilm formation on resin-based composites after different finishing and polishing procedures. *Journal of Dentistry*, 67, 43–52.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.07.012>
40. Cevik, P., Schimmel, M., & Yilmaz, B. (2022). New generation CAD-CAM materials for implant-supported definitive frameworks fabricated by using subtractive technologies. *BioMed Research International*, 2022, 3074182.
<https://doi.org/10.1155/2022/3074182>
41. Chandler, J. A., & Brudvik, J. S. (1984). Clinical evaluation of patients eight to nine years after placement of removable partial dentures. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 51(6), 736–743.
[https://doi.org/10.1016/0022-3913\(84\)90366-4](https://doi.org/10.1016/0022-3913(84)90366-4)
42. Chen, S. G., Yang, J., Jia, Y. G., Lu, B., & Ren, L. (2019). TiO₂ and PEEK Reinforced 3D Printing PMMA Composite Resin for Dental Denture Base Applications. *Nanomaterials (Basel)*, 9(7), 1049.
<https://doi.org/10.3390/nano9071049>

43. Chevalier, J. (2006). What future for zirconia as a biomaterial? *Biomaterials*, 27(4), 535–543.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.034>
44. Chevalier, J., Gremillard, L., Virkar, A., & Clarke, D. R. (2009). The Tetragonal-Monoclinic Transformation in Zirconia: Lessons Learned and Future Trends. *Journal of the American Ceramic Society*, 92(9), 1901–1920.
<https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2009.03278.x>
45. Condò, R., Mampieri, G., Pasquantonio, G., Giancotti, A., Pirelli, P., Cataldi, M. E., La Rocca, S., Leggeri, A., Notargiacomo, A., Maiolo, L., De Filippis, P., & Cerroni, L. (2021). In Vitro Evaluation of Structural Factors Favouring Bacterial Adhesion on Orthodontic Adhesive Resins. *Materials (Basel)*, 14(10), 2485.
<https://doi.org/10.3390/ma14102485>
46. Costa-Palau, S., Torrents-Nicolas, J., Brufau-de Barberà, M., & Cabratosa-Termes, J. (2014). Use of polyetheretherketone in the fabrication of a maxillary obturator prosthesis: a clinical report. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 112(3), 680-2.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2013.10.026>
47. Da Costa, J., Ferracane, J., Paravina, R. D., Mazur, R. F., & Roeder, L. (2007). The effect of different polishing systems on surface roughness and gloss of various resin composites. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 19(4), 214–226.
<https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2007.00104.x>
48. Da Silva, W. J., Leal, C. M., Viu, F. C., Gonçalves, L. M., Barbosa, C. M., & Del Bel Cury, A. A. (2015). Influence of surface free energy of denture base and liner materials on *Candida albicans* biofilms. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 6(2), 141–146.
<https://doi.org/10.1111/jicd.12079>
49. Dal Piva, A. M. O., Contreras, L. P. C., Ribeiro, F. C., Anami, L. C., Camargo, S., Jorge, A., & Bottino, M.A. (2018). Monolithic Ceramics: Effect of Finishing Techniques on Surface Properties, Bacterial Adhesion and Cell Viability. *Operative Dentistry*, 43(3), 315-325.
<https://doi.org/10.2341/17-011-L>
50. Davenport J. C. (1970). The oral distribution of candida in denture stomatitis. *British Dental Journal*, 129(4), 151–156.
<https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4802540>
51. Dawes, C., Pedersen, A. M., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., Aframian, D., McGowan, R., Aliko, A., Narayana, N., Sia, Y. W., Joshi, R. K., Jensen, S. B., Kerr, A. R., & Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 863–874.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.004>
52. De Foggi, C. C., Machado, A. L., Zamperini, C. A., Fernandes, D., Wady, A. F., & Vergani, C. E. (2016). Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture-base acrylic resin and *Candida albicans* colonization. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 7(2), 141–148.
<https://doi.org/10.1111/jicd.12125>

53. De Oliveira Limírio, J. P. J., Gomes, J. M. L., Alves Rezende, M. C. R., Lemos, C. A. A., Rosa, C., & Pellizzer, E. P. (2021). Mechanical properties of polymethyl methacrylate as a denture base: Conventional versus CAD-CAM resin-A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 128(6), 1221-1229.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2021.03.018>
54. De-la-Pinta, I., Cobos, M., Ibarretxe, J., Montoya, E., Eraso, E., Guraya, T., & Quindós, G. (2019). Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(7), 77.
<https://doi.org/10.1007/s10856-019-6281-3>
55. Delaviz, Y., Finer, Y., & Santerre, J. P. (2014). Biodegradation of resin composites and adhesives by oral bacteria and saliva: a rationale for new material designs that consider the clinical environment and treatment challenges. *Dental Materials*, 30(1), 16–32.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.08.201>
56. Delucchi, F., De Giovanni, E., Pesce, P., Bagnasco, F., Pera, F., Baldi, D., & Menini, M. (2021). Framework Materials for Full-Arch Implant-Supported Rehabilitations: A Systematic Review of Clinical Studies. *Materials (Basel)*, 14(12), 3251.
<https://doi.org/10.3390/ma14123251>
57. Denry, I., & Kelly, J. R. (2008). State of the art of zirconia for dental applications. *Dental materials*, 24(3), 299–307.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.05.007>
58. D'Ercole, S., Cellini, L., Pilato, S., Di Lodovico, S., Iezzi, G., Piattelli, A., & Petrini, M. (2020). Material characterization and Streptococcus oralis adhesion on Polyetheretherketone (PEEK) and titanium surfaces used in implantology. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(10), 84.
<https://doi.org/10.1007/s10856-020-06408-3>
59. Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W. H., Lakshmanan, A., & Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5002–5017.
<https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>
60. Di Giulio, M., Traini, T., Sinjari, B., Nostro, A., Caputi, S., & Cellini, L. (2016). Porphyromonas gingivalis biofilm formation in different titanium surfaces, an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research*, 27(7), 918–925.
<https://doi.org/10.1111/clr.12659>
61. Diaz, P. I., Zilm, P. S., & Rogers, A. H. (2002). Fusobacterium nucleatum supports the growth of Porphyromonas gingivalis in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology (Reading)*, 148(2), 467–472.
<https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-467>
62. Dige, I., Raarup, M. K., Nyengaard, J. R., Kilian, M., & Nyvad, B. (2009). Actinomyces naeslundii in initial dental biofilm formation. *Microbiology (Reading)*, 155(7), 2116–2126.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.027706-0>

63. Diken Türksayar, A. A., Hisarbeyli, D., Seçkin Kelten, Ö., & Bulucu, N. B. (2022). Wear behavior of current computer-aided design and computer-aided manufacturing composites and reinforced high performance polymers: An in vitro study. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 34(3), 527-533.
<https://doi.org/10.1111/jerd.12828>
64. Engel, A. S., Kranz, H. T., Schneider, M., Tietze, J. P., Piwowarczyk, A., Kuzius, T., Arnold, W., & Naumova, E. A. (2020). Biofilm formation on different dental restorative materials in the oral cavity. *BMC Oral Health*, 20(1), 162.
<https://doi.org/10.1186/s12903-020-01147-x>
65. Falde, E. J., Yohe, S. T., Colson, Y. L., & Grinstaff, M. W. (2016). Superhydrophobic materials for biomedical applications. *Biomaterials*, 104, 87–103.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.050>
66. Fang, J., Wang, C., Li, Y., Zhao, Z., & Mei, L. (2016). Comparison of bacterial adhesion to dental materials of polyethylene terephthalate (PET) and polymethyl methacrylate (PMMA) using atomic force microscopy and scanning electron microscopy. *Scanning*, 38(6), 665-670.
<https://doi.org/10.1002/sca.21314>
67. Fano, L., Fano, V., Ma, W. Y., Wang, X. G., & Zhu, F. (2005). Adhesiveness of dental resin-based restorative materials investigated with atomic force microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research: Part B Applied Biomaterials*, 73(1), 35–42.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.30180>
68. Featherstone J. D. (2000). The science and practice of caries prevention. *Journal of the American Dental Association*, 131(7), 887–899.
<https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0307>
69. Ferracane, J. L. (2011). Resin composite - state of the art. *Dental Materials*, 27(1), 29-38.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.020>
70. Fiore, A. D., Meneghello, R., Brun, P., Rosso, S., Gattazzo, A., Stellini, E., & Yilmaz, B. (2022). Comparison of the flexural and surface properties of milled, 3D-printed, and heat polymerized PMMA resins for denture bases: An in vitro study. *Journal of Prosthetic Research*, 66(3), 502–508.
https://doi.org/10.2186/jpr.JPR_D_21_00116
71. Fiorillo L. (2020). We Do Not Eat Alone: Formation and Maturation of the Oral Microbiota. *Biology*, 9(1), 17.
<https://doi.org/10.3390/biology9010017>
72. Foster, J. S., & Kolenbrander, P. E. (2004). Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4340–4348.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4340-4348.2004>
73. Ge, J., Catt, D. M., & Gregory, R. L. (2004). Streptococcus mutans surface alpha-enolase binds salivary mucin MG2 and human plasminogen. *Infection and Immunity*, 72(11), 6748–6752.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6748-6752.2004>

74. Gendreau, L., & Loewy, Z. G. (2011). Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of Prosthodontics*, 20(4), 251–260.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x>
75. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.
<https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
76. Giti, R., Dabiri, S., Motamedifar, M., & Derafshi, R. (2021). Surface roughness, plaque accumulation, and cytotoxicity of provisional restorative materials fabricated by different methods. *PLOS One*, 16(4), e0249551.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249551>
77. Gmür, R., Strub, J. R., & Guggenheim, B. (1989). Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *Journal of Periodontal Research*, 24(2), 113–120.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1989.tb00865.x>
78. Goo, C. L., Yap, A., Tan, K., & Fawzy, A. S. (2016). Effect of Polishing Systems on Surface Roughness and Topography of Monolithic Zirconia. *Operative Dentistry*, 41(4), 417–423.
<https://doi.org/10.2341/15-064-L>
79. Goodacre, C. J., Garbacea, A., Naylor, W. P., Daher, T., Marchack, C. B., & Lowry, J. (2012). CAD/CAM fabricated complete dentures: concepts and clinical methods of obtaining required morphological data. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 107(1), 34-46.
[https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(12\)60015-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(12)60015-8)
80. Grenade, C., De Pauw-Gillet, M. C., Gailly, P., Vanheusden, A., & Mainjot, A. (2016). Biocompatibility of polymer-infiltrated-ceramic-network (PICN) materials with human gingival fibroblasts (HGFs). *Dental Materials*, 32(9), 1152–1164.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.06.020>
81. Grenier D. (1992). Demonstration of a bimodal coaggregation reaction between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Oral Microbiology and Immunology*, 7(5), 280–284.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1992.tb00589.x>
82. Grivet, M., Morrier, J. J., Benay, G., & Barsotti, O. (2000). Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11(10), 637–642.
<https://doi.org/10.1023/a:1008913915399>
83. Größner-Schreiber, B., Teichmann, J., Hannig, M., Dörfer, C., Wenderoth, D. F., & Ott, S. J. (2009). Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clinical Oral Implants Research*, 20(8), 817–826.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01729.x>
84. Guess, P. C., Att, W., & Strub, J. R. (2012). Zirconia in fixed implant prosthodontics. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 14(5), 633–645.
<https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2010.00317.x>

85. Günther, M., Karygianni, L., Argyropoulou, A., Anderson, A. C., Hellwig, E., Skaltsounis, A. L., Wittmer, A., Vach, K., & Al-Ahmad, A. (2022). The antimicrobial effect of *Rosmarinus officinalis* extracts on oral initial adhesion ex vivo. *Clinical Oral Investigations*, 26(6), 4369–4380.
<https://doi.org/10.1007/s00784-022-04400-5>
86. Guo, L., Shokeen, B., He, X., Shi, W., & Lux, R. (2017). *Streptococcus mutans* SpaP binds to RadD of *Fusobacterium nucleatum* ssp. *polymorphum*. *Molecular Oral Microbiology*, 32(5), 355–364.
<https://doi.org/10.1111/omi.12177>
87. Hahnel, S., Ettl, T., Gosau, M., Rosentritt, M., Handel, G., & Bürgers, R. (2010). Influence of saliva substitute films on the initial adhesion of *Candida albicans* to dental substrata prior to and after artificial ageing. *Archives of Oral Biology*, 55(5), 391–396.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.03.001>
88. Hahnel, S., Rosentritt, M., Bürgers, R., & Handel, G. (2008). Surface properties and in vitro *Streptococcus mutans* adhesion to dental resin polymers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(7), 2619–2627.
<https://doi.org/10.1007/s10856-007-3352-7>
89. Hahnel, S., Rosentritt, M., Handel, G., & Bürgers, R. (2009). Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion in vitro. *Dental Materials*, 25(8), 969–975.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.02.003>
90. Hahnel, S., Wieser, A., Lang, R., & Rosentritt, M. (2015). Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. *Clinical Oral Implants Research*, 26(11), 1297–1301.
<https://doi.org/10.1111/clr.12454>
91. Hannig, C., & Hannig, M. (2009). The oral cavity - a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clinical Oral Investigations*, 13(2), 123–139.
<https://doi.org/10.1007/s00784-008-0243-3>
92. Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2007). Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Archives of Oral Biology*, 52(11), 1048–1056.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.05.006>
93. Hao, Y., Huang, X., Zhou, X., Li, M., Ren, B., Peng, X., & Cheng, L. (2018). Influence of Dental Prosthesis and Restorative Materials Interface on Oral Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3157.
<https://doi.org/10.3390/ijms19103157>
94. Hatanaka, G. R., Polli, G. S., Fais, L. M. G., Reis, J. M. D. S. N., & Pinelli, L. A. P. (2017). Zirconia changes after grinding and regeneration firing. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 118(1), 61–68.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2016.09.026>

95. He, J., Söderling, E., Lassila, L. V., & Vallittu, P. K. (2012). Incorporation of an antibacterial and radiopaque monomer in to dental resin system. *Dental Materials*, 28(8), e110–e117.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.026>
96. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10(4), 413–417.
<https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>
97. Hjerppe, J., Rodas, S., Korvala, J., Pesonen, P., Kaisanlahti, A., Özcan, M., Suojanen, J., & Reunanen, J. (2021). Surface Roughness and *Streptococcus mutans* Adhesion on Metallic and Ceramic Fixed Prosthodontic Materials after Scaling. *Materials (Basel)*, 14(4), 1027.
<https://doi.org/10.3390/ma14041027>
98. Holban, A.M., Farcasiu, C., Andrei, O.C., Grumezescu, A.M., & Farcasiu, A.T. (2021). Surface Modification to Modulate Microbial Biofilms - Applications in Dental Medicine. *Materials*, 14(22), 6994.
<https://doi.org/10.3390/ma14226994>
99. Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7276–7280.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>
100. How, K. Y., Song, K. P., & Chan, K. G. (2016). Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*, 7, 53.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>
101. Hu, H., Burrow, M. F., & Leung, W. K. (2022). Evaluation of 12-hour in situ bacterial colonization on smooth restorative material surfaces. *Journal of Dentistry*, 119, 104071.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2022.104071>
102. Huettig, F., Prutscher, A., Goldammer, C., Kreutzer, C. A., & Weber, H. (2016). First clinical experiences with CAD/CAM-fabricated PMMA-based fixed dental prostheses as long-term temporaries. *Clinical Oral Investigations*, 20(1), 161-8.
<https://doi.org/10.1007/s00784-015-1475-7>
103. Huh, Y. H., Park, C. J., & Cho, L. R. (2016). Evaluation of various polishing systems and the phase transformation of monolithic zirconia. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 116(3), 440–449.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2016.01.021>
104. Ikeda, M., Matin, K., Nikaido, T., Foxton, R. M., & Tagami, J. (2007). Effect of surface characteristics on adherence of *S. mutans* biofilms to indirect resin composites. *Dental Materials Journal*, 26(6), 915–923.
<https://doi.org/10.4012/dmj.26.915>
105. International Organization for Standardization (2009). *Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity* (ISO Standard No. 10993-5:2009).
<https://www.iso.org/standard/36406.html>

106. International Organization for Standardization. (1996). *Geometrical Product Specifications (GPS) - Surface Texture: Profile Method - Rules and Procedures for the Assessment of Surface Texture* (ISO Standard No. 4288:1996).
<https://www.iso.org/standard/2096.html>
107. Ionescu, A. C., Hahnel, S., König, A., & Brambilla, E. (2020). Resin composite blocks for dental CAD/CAM applications reduce biofilm formation in vitro. *Dental Materials*, 36(5), 603–616.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.03.016>
108. Ionescu, A., Wutscher, E., Brambilla, E., Schneider-Feyrer, S., Giessibl, F. J., & Hahnel, S. (2012). Influence of surface properties of resin-based composites on in vitro *Streptococcus mutans* biofilm development. *European Journal of Oral Sciences*, 120(5), 458–465.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2012.00983.x>
109. Jaeggi, M., Gyr, S., Astasov-Frauenhoffer, M., Zitzmann, N. U., Fischer, J., & Rohr, N. (2022). Influence of different zirconia surface treatments on biofilm formation in vitro and in situ. *Clinical Oral Implants Research*, 33(4), 424–432.
<https://doi.org/10.1111/clr.13902>
110. Janyavula, S., Lawson, N., Cakir, D., Beck, P., Ramp, L. C., & Burgess, J. O. (2013). The wear of polished and glazed zirconia against enamel. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 109(1), 22–29.
[https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(13\)60005-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(13)60005-0)
111. Jin, H. Y., Teng, M. H., Wang, Z. J., Li, X., Liang, J. Y., Wang, W. X., Jiang, S., & Zhao, B. D. (2019). Comparative evaluation of BioHPP and titanium as a framework veneered with composite resin for implant-supported fixed dental prostheses. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 122(4), 383–388.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2019.03.003>
112. Kalra, S., Kharsan, V., & Kalra, N. M. (2015). Comparative evaluation of effect of metal primer and sandblasting on the shear bond strength between heat cured acrylic denture base resin and cobalt-chromium alloy: An in vitro study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 6(3), 386–391.
<https://doi.org/10.4103/0976-237X.161895>
113. Kamada, K., Taira, Y., Sumi, T., & Sawase, T. (2017). Retention strength between veneering resin composites and laser-sintered cobalt-chromium alloy. *Odontology*, 105(1), 23–28.
<https://doi.org/10.1007/s10266-016-0257-2>
114. Kamel, A., Badr, A., & Fekry, G. (2021). Evaluation of Bacterial Accumulation on the Inner Surface of PEEK and Zirconia Secondary Telescopic Crowns. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 12(3), 839–841.
<https://doi.org/10.31838/srp.2021.3.118>
115. Kamma, J. J., Nakou, M., & Manti, F. A. (1995). Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 30(1), 66–72.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1995.tb01254.x>

116. Kaplan J. B. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205–218.
<https://doi.org/10.1177/0022034509359403>
117. Karayazgan, B., Atay, A., Saracli, M. A., & Gunay, Y. (2010). Evaluation of *Candida albicans* formation on feldspathic porcelain subjected to four surface treatment methods. *Dental Materials Journal*, 29(2), 147–153.
<https://doi.org/10.4012/dmj.2009-016>
118. Kattadiyil, M. T., Jekki, R., Goodacre, C. J., & Baba, N. Z. (2015). Comparison of treatment outcomes in digital and conventional complete removable dental prosthesis fabrications in a predoctoral setting. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 114(6), 818–825.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2015.08.001>
119. Khayat, W., Chebib, N., Finkelman, M., Khayat, S., & Ali, A. (2018). Effect of grinding and polishing on roughness and strength of zirconia. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 119(4), 626–631.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2017.04.003>
120. Kigure, T., Saito, A., Seida, K., Yamada, S., Ishihara, K., & Okuda, K. (1995). Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *Journal of Periodontal Research*, 30(5), 332–341.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1995.tb01284.x>
121. Kim, D. H., & Kwon, T. Y. (2017). *In vitro* study of *Streptococcus mutans* adhesion on composite resin coated with three surface sealants. *Restorative Dentistry and Endodontics*, 42(1), 39–47.
<https://doi.org/10.5395/rde.2017.42.1.39>
122. Kim, E. J., Lee, K. B., & Jin, M. U. (2016). Evaluation of marginal leakage of bulk fill flowable composite resin filling with different curing time using micro-computed tomography technology. *Journal of Dental Rehabilitation and Applied Science*, 32(3), 184–193.
<https://doi.org/10.14368/jdras.2016.32.3.184>
123. Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Eglund, P. G., Foster, J. S., & Palmer, R. J., Jr (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 486–505.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.486-505.2002>
124. Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Jr, Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7), 471–480.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
125. Kommerein, N., Doll, K., Stumpp, N. S., & Stiesch, M. (2018). Development and characterization of an oral multispecies biofilm implant flow chamber model. *PLOS One*, 13(5), e0196967.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196967>

126. Kozmos, M., Virant, P., Rojko, F., Abram, A., Rudolf, R., Raspor, P., Zore, A., & Bohinc, K. (2021). Bacterial Adhesion of *Streptococcus mutans* to Dental Material Surfaces. *Molecules (Basel)*, 26(4), 1152.
<https://doi.org/10.3390/molecules26041152>
127. Krämer, N., Reinelt, C., Richter, G., Petschelt, A., & Frankenberger, R. (2009). Nanohybrid vs. fine hybrid composite in Class II cavities: clinical results and margin analysis after four years. *Dental Materials*, 25(6), 750-9.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.12.003>
128. Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., & Qi, F. (2005). Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7193–7203.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7193-7203.2005>
129. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95–125.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
130. Kumamoto, C. A., & Vines, M. D. (2005). Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annual Review of Microbiology*, 59, 113–133.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121034>
131. Kumar, P. S., & Mason, M. R. (2015). Mouthguards: does the indigenous microbiome play a role in maintaining oral health?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 35.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00035>
132. Kumchai, H., Juntavee, P., Sun, A. F., & Nathanson, D. (2018). Effect of Glazing on Flexural Strength of Full-Contour Zirconia. *International Journal of Dentistry*, 2018, 8793481.
<https://doi.org/10.1155/2018/8793481>
133. Kvich, L., Crone, S., Christensen, M. H., Lima, R., Alhede, M., Alhede, M., Staerk, D., & Bjarnsholt, T. (2022). Investigation of the Mechanism and Chemistry Underlying *Staphylococcus aureus*' Ability to Inhibit *Pseudomonas aeruginosa* Growth *In Vitro*. *Journal of Bacteriology*, 204(11), e0017422.
<https://doi.org/10.1128/jb.00174-22>
134. Lafaurie, G. I., Sabogal, M. A., Castillo, D. M., Rincón, M. V., Gómez, L. A., Lesmes, Y. A., & Chambrone, L. (2017). Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. *Journal of Periodontology*, 88(10), 1066–1089.
<https://doi.org/10.1902/jop.2017.170123>
135. Law K. Y. (2014). Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 5(4), 686–688.
<https://doi.org/10.1021/jz402762h>
136. Lee Y. K. (2008). Influence of filler on the difference between the transmitted and reflected colors of experimental resin composites. *Dental Materials*, 24(9), 1243–1247.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.01.014>

137. Liebermann, A., Wimmer, T., Schmidlin, P.R., Scherer, H., Löffler, P., Roos, M., & Stawarczyk, B. (2016). Physicomechanical characterization of polyetheretherketone and current esthetic dental CAD/CAM polymers after aging in different storage media. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 115(3), 321-8.e2.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2015.09.004>
138. Limmer, B., Sanders, A. E., Reside, G., & Cooper, L. F. (2014). Complications and patient-centered outcomes with an implant-supported monolithic zirconia fixed dental prosthesis: 1 year results. *Journal of Prosthodontics*, 23(4), 267–275.
<https://doi.org/10.1111/jopr.12110>
139. Ling, L., Ma, Y., & Malyala, R. (2021). A novel CAD/CAM resin composite block with high mechanical properties. *Dental Materials*, 37(7), 1150-1155.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.03.006>
140. Listgarten M. A. (1976). Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *Journal of Periodontology*, 47(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1902/jop.1976.47.1.1>
141. Listgarten M. A. (1994). The structure of dental plaque. *Periodontology 2000*, 5, 52–65.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1994.tb00018.x>
142. Loesche W. J. (1986). Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiological Reviews*, 50(4), 353–380.
<https://doi.org/10.1128/mr.50.4.353-380.1986>
143. Lu, C., Zheng, Y., & Zhong, Q. (2017). Corrosion of dental alloys in artificial saliva with Streptococcus mutans. *PLOS One*, 12(3), e0174440.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174440>
144. Mabboux, F., Ponsonnet, L., Morrier, J. J., Jaffrezic, N., & Barsotti, O. (2004). Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials - an in vitro study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 39(4), 199–205.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.08.002>
145. Maló, P., de Araújo Nobre, M., Guedes, C. M., Almeida, R., Silva, A., Sereno, N., & Legatheaux, J. (2018). Short-term report of an ongoing prospective cohort study evaluating the outcome of full-arch implant-supported fixed hybrid polyetheretherketone-acrylic resin prostheses and the All-on-Four concept. *Clinical Implant and Dentistry and Related Research*, 20(5), 692–702.
<https://doi.org/10.1111/cid.12662>
146. Manicone, P. F., Rossi Iommetti, P., & Raffaelli, L. (2007). An overview of zirconia ceramics: basic properties and clinical applications. *Journal of Dentistry*, 35(11), 819–826.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.07.008>
147. Marchesi, G., Camurri Piloni, A., Nicolini, V., Turco, G., & Di Lenarda, R. (2021). Chairside CAD/CAM Materials: Current Trends of Clinical Uses. *Biology*, 10(11), 1170.
<https://doi.org/10.3390/biology10111170>

148. Marcotte, H., & Lavoie, M. C. (1998). Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 71–109.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.71-109.1998>
149. Marghalani H. Y. (2010). Effect of filler particles on surface roughness of experimental composite series. *Journal of Applied Oral Science*, 18(1), 59–67.
<https://doi.org/10.1590/s1678-77572010000100011>
150. Marsh P. D. (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 441–454.
<https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.002>
151. Marsh, P. D., Do, T., Beighton, D., & Devine, D. A. (2016). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 70(1), 80–92.
<https://doi.org/10.1111/prd.12098>
152. Mei, L., Busscher, H. J., van der Mei, H. C., Chen, Y., de Vries, J., & Ren, Y. (2009). Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. *European Journal of Oral Sciences*, 117(4), 419–426.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00648.x>
153. Merghni, A., Kammoun, D., Hentati, H., Janel, S., Popoff, M., Lafont, F., Aouni, M., & Mastouri M. (2016). Quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion forces on various dental restorative materials using atomic force microscopy. *Applied Surface Science*, 379, 323–330
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.04.072>
154. Metzger, Z., Lin, Y. Y., Dimeo, F., Ambrose, W. W., Trope, M., & Arnold, R. R. (2009). Synergistic pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in the mouse subcutaneous chamber model. *Journal of Endodontics*, 35(1), 86–94.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.10.015>
155. Meza-Siccha, A. S., Aguilar-Luis, M. A., Silva-Caso, W., Mazulis, F., Barragan-Salazar, C., & Del Valle-Mendoza, J. (2019). In Vitro Evaluation of Bacterial Adhesion and Bacterial Viability of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Porphyromonas gingivalis* on the Abutment Surface of Titanium and Zirconium Dental Implants. *International Journal of Dentistry*, 2019, 4292976.
<https://doi.org/10.1155/2019/4292976>
156. Michelsen, V. B., Kopperud, H. B., Lygre, G. B., Björkman, L., Jensen, E., Kleven, I. S., Svahn, J., & Lygre, H. (2012). Detection and quantification of monomers in unstimulated whole saliva after treatment with resin-based composite fillings in vivo. *European Journal of Oral Sciences*, 120(1), 89-95.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00897.x>
157. Mitra, S. B., Wu, D., & Holmes, B. N. (2003). An application of nanotechnology in advanced dental materials. *Journal of American Dental Association*, 134(10), 1382-90.
<https://doi.org/10.14219/jada.archive.2003.0054>

158. Miyazaki, T., Hotta, Y., Kunii, J., Kuriyama, S., & Tamaki, Y. (2009). A review of dental CAD/CAM: current status and future perspectives from 20 years of experience. *Dental Materials Journal*, 28(1), 44-56.
<https://doi.org/10.4012/dmj.28.44>
159. Mochon, A. B., & Liu, H. (2008). The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the *Candida albicans* surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm. *PLOS Pathogens*, 4(10), e1000190.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000190>
160. Mombelli, A., Müller, N., & Cionca, N. (2012). The epidemiology of peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 23(Suppl 6), 67–76.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02541.x>
161. Mörmann, W. H. (2006). The evolution of the CEREC system. *Journal of the American Dental Association*, 137(Suppl), 7S-13S.
<https://doi.org/10.1016/10.14219/jada.archive.2006.0398>
162. Moura, J. S., da Silva, W. J., Pereira, T., Del Bel Cury, A. A., & Rodrigues Garcia, R. C. (2006). Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 96(3), 205–211.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2006.07.004>
163. Murakami, S., Mealey, B. L., Mariotti, A., & Chapple, I. L. C. (2018). Dental plaque-induced gingival conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(Suppl 20), S17–S27.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12937>
164. Najeeb, S., Zafar, M. S., Khurshid, Z., & Siddiqui, F. (2016). Applications of polyetheretherketone (PEEK) in oral implantology and prosthodontics. *Journal of Prosthodontic Research*, 60(1), 12–19.
<https://doi.org/10.1016/j.jprior.2015.10.001>
165. Nascimento, C.D., Pita, M. S., Santos, E.D.S., Monesi, N., Pedrazzi, V., Albuquerque Junior, R. F., & Ribeiro, R. F. (2016). Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. *Dental Materials*, 32(1), 93–101.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.10.014>
166. Nieminen, T., Kallela, I., Wuolijoki, E., Kainulainen, H., Hiidenheimo, I., & Rantala, I. (2008). Amorphous and crystalline polyetheretherketone: Mechanical properties and tissue reactions during a 3-year follow-up. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 84(2), 377–383.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.31310>
167. Niinomi M. (2008). Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1(1), 30–42.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2007.07.001>
168. Nilius, A. M., Spencer, S. C., & Simonson, L. G. (1993). Stimulation of in vitro growth of *Treponema denticola* by extracellular growth factors produced by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Dental Research*, 72(6), 1027–1031.
<https://doi.org/10.1177/00220345930720060601>

169. O'Leary, T. J., Drake, R. B., & Naylor, J. E. (1972). The plaque control record. *Journal of Periodontology*, 43(1), 38.
<https://doi.org/10.1902/jop.1972.43.1.38>
170. Olmedo-Gaya, M. V., Manzano-Moreno, F. J., Cañaveral-Cavero, E., de Dios Luna-del Castillo, J., & Vallecillo-Capilla, M. (2016). Risk factors associated with early implant failure: A 5-year retrospective clinical study. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 115(2), 150–155.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2015.07.020>
171. Ozel, G. S., Guneser, M. B., Inan, O., & Eldeniz, A. U. (2017). Evaluation of C. Albicans and S. Mutans adherence on different provisional crown materials. *Journal of Advanced Prosthodontics*, 9(5), 335–340.
<https://doi.org/10.4047/jap.2017.9.5.335>
172. Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 577–588.
<https://doi.org/10.1007/s10295-007-0234-4>
173. Park, J. H., Lee, J. K., Um, H. S., Chang, B. S., & Lee, S. Y. (2014). A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. *Journal of Periodontal and Implant Science*, 44(2), 79–84.
<https://doi.org/10.5051/jpis.2014.44.2.79>
174. Park, J. W., An, J. S., Lim, W. H., Lim, B. S., & Ahn, S. J. (2019). Microbial changes in biofilms on composite resins with different surface roughness: An in vitro study with a multispecies biofilm model. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 122(5), 493.e1–493.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2019.08.009>
175. Passos, S. P., Torrealba, Y., Major, P., Linke, B., Flores-Mir, C., & Nychka, J. A. (2014). In vitro wear behavior of zirconia opposing enamel: a systematic review. *Journal of Prosthodontics*, 23(8), 593–601.
<https://doi.org/10.1111/jopr.12167>
176. Peng, T.Y., Lin, D.J., Mine, Y., Tasi, C.Y., Li, P.J., Shih, Y.H., Chiu, K.C., Wang, T.H., Hsia, S.M., & Shieh, T.M. (2021). Biofilm Formation on the Surface of (Poly)Ether-Ether-Ketone and In Vitro Antimicrobial Efficacy of Photodynamic Therapy on Peri-Implant Mucositis. *Polymers (Basel)*, 13(6), 940.
<https://doi.org/10.3390/polym13060940>
177. Pereira, C. A., Eskelson, E., Cavalli, V., Liporoni, P. C., Jorge, A. O., & do Rego, M. A. (2011). Streptococcus mutans biofilm adhesion on composite resin surfaces after different finishing and polishing techniques. *Operative Dentistry*, 36(3), 311–317.
<https://doi.org/10.2341/10-285-L>
178. Periasamy, S., & Kolenbrander, P. E. (2010). Central role of the early colonizer Veillonella sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *Journal of Bacteriology*, 192(12), 2965–2972.
<https://doi.org/10.1128/JB.01631-09>

179. Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17030.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>
180. Poole, S. F., Pitondo-Silva, A., Oliveira-Silva, M., Moris, I. C. M., & Gomes, E. A. (2020). Influence of different ceramic materials and surface treatments on the adhesion of *Prevotella intermedia*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 111, 104010.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104010>
181. Quirynen M. (1994). The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and in vivo experiments. *Journal of Dentistry*, 22(Suppl 1), S13–S16.
[https://doi.org/10.1016/0300-5712\(94\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0300-5712(94)90165-1)
182. Quirynen, M., & Bollen, C. M. (1995). The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *Journal of Clinical Periodontology*, 22(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1995.tb01765.x>
183. Quirynen, M., Marechal, M., Busscher, H. J., Weerkamp, A. H., Darius, P. L., & van Steenberghe, D. (1990). The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *Journal of Clinical Periodontology*, 17(3), 138–144.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1990.tb01077.x>
184. Quirynen, M., van der Mei, H. C., Bollen, C. M., Schotte, A., Marechal, M., Doornbusch, G. I., Naert, I., Busscher, H. J., & van Steenberghe, D. (1993). An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *Journal of Dental Research*, 72(9), 1304–1309.
<https://doi.org/10.1177/00220345930720090801>
185. Radford, D. R., Sweet, S. P., Challacombe, S. J., & Walter, J. D. (1998). Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *Journal of Dentistry*, 26(7), 577–583.
[https://doi.org/10.1016/s0300-5712\(97\)00034-1](https://doi.org/10.1016/s0300-5712(97)00034-1)
186. Rodriguez, L. S., Paleari, A. G., Giro, G., de Oliveira Junior, N. M., Pero, A. C., & Compagnoni M. A. (2013). Chemical characterization and flexural strength of a denture base acrylic resin with monomer 2-tert-butylaminoethyl methacrylate. *Journal of Prosthodontics*, 22(4), 292-7.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-849x.2012.00942.x>
187. Ruchika, S. I., Suchitra, S. R., Hegde, D., Coutinho, C. A., & Priya, A. (2019). BioHPP: Properties and applications in prosthodontics: A review. *Journal of Research in Dentistry*, 7(4), 72-76.
<https://doi.org/10.19177/jrd.v7e4201972/76>
188. Ruse, N. D., & Sadoun, M. J. (2014). Resin-composite blocks for dental CAD/CAM applications. *Journal of Dental Research*, 93(12), 1232–4.
<https://doi.org/10.1177/0022034514553976>

189. Rüttermann, S., Bergmann, N., Beikler, T., Raab, W. H., & Janda, R. (2012). Bacterial viability on surface-modified resin-based dental restorative materials. *Archives of Oral Biology*, 57(11), 1512–1521.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.05.005>
190. Sadig W. (2010). The denture hygiene, denture stomatitis and role of dental hygienist. *International Journal of Dental Hygiene*, 8(3), 227–231.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2009.00413.x>
191. Sarac, D., Sarac, Y. S., Kulunk, S., Ural, C., & Kulunk, T. (2006). The effect of polishing techniques on the surface roughness and color change of composite resins. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 96(1), 33–40.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2006.04.012>
192. Scarano, A., Piattelli, M., Caputi, S., Favero, G. A., & Piattelli, A. (2004). Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *Journal of Periodontology*, 75(2), 292–296.
<https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.2.292>
193. Sideridou, I. D., & Achilias, D. S. (2005). Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 74(1), 617–626.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.30252>
194. Silva, T. S. O., Freitas, A. R., Pinheiro, M. L. L., do Nascimento, C., Watanabe, E., & Albuquerque, R. F. (2018). Oral Biofilm Formation on Different Materials for Dental Implants. *Journal of Visualized Experiments*, 136, 57756.
<https://doi.org/10.3791/57756>
195. Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000, 38, 135–187.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>
196. Song, F., Koo, H., & Ren, D. (2015). Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Journal of Dental Research*, 94(8), 1027–1034.
<https://doi.org/10.1177/0022034515587690>
197. Sotozono, M., Kuriki, N., Asahi, Y., Noiri, Y., Hayashi, M., Motooka, D., Nakamura, S., Yamaguchi, M., Iida, T., & Ebisu, S. (2021). Impact of sleep on the microbiome of oral biofilms. *PLOS One*, 16(12), e0259850.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259850>
198. Souza, J. C., Mota, R. R., Sordi, M. B., Passoni, B. B., Benfatti, C. A., & Magini, R. S. (2016). Biofilm Formation on Different Materials Used in Oral Rehabilitation. *Brazilian Dental Journal*, 27(2), 141–147.
<https://doi.org/10.1590/0103-6440201600625>

199. Stašić, J. N., Selaković, N., Puač, N., Miletić, M., Malović, G., Petrović, Z. L., Veljovic, D. N., & Miletić, V. (2019). Effects of non-thermal atmospheric plasma treatment on dentin wetting and surface free energy for application of universal adhesives. *Clinical Oral Investigations*, 23(3), 1383–1396.
<https://doi.org/10.1007/s00784-018-2563-2>
200. Stawarczyk, B., Beuer, F., Wimmer, T., Jahn, D., Sener, B., Roos, M. & Schmidlin, P. R. (2013a). Polyetheretherketone - a suitable material for fixed dental prostheses? *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101(7), 1209–1216.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.32932>
201. Stawarczyk, B., Eichberger, M., Uhrenbacher, J., Wimmer, T., Edelhoff, D., & Schmidlin, P. R. (2015). Three-unit reinforced polyetheretherketone composite FDPs: Influence of fabrication method on load-bearing capacity and failure types. *Dental Materials Journal*, 34(1), 7-12.
<https://doi.org/10.4012/dmj.2013-345>
202. Stawarczyk, B., Özcan, M., Trottman, A., Schmutz, F., Roos, M., & Hämmerle, C. (2013b). Two-body wear rate of CAD/CAM resin blocks and their enamel antagonists. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 109(5), 325-32.
[https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(13\)60309-1](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(13)60309-1)
203. Steinmassl, P. A., Wiedemair, V., Huck, C., Klaunzer, F., Steinmassl, O., Grunert, I., & Dumfahrt, H. (2017). Do CAD/CAM dentures really release less monomer than conventional dentures? *Clinical Oral Investigations*, 21(5), 1697-705.
<https://doi.org/10.1007/s00784-016-1961-6>
204. Sterzenbach, T., Helbig, R., Hannig, C., & Hannig, M. (2020). Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. *Clinical Oral Investigations*, 24(12), 4237–4260.
<https://doi.org/10.1007/s00784-020-03646-1>
205. Sturz, C. R., Faber, F. J., Scheer, M., Rothamel, D., & Neugebauer, J. (2015). Effects of various chair-side surface treatment methods on dental restorative materials with respect to contact angles and surface roughness. *Dental Materials Journal*, 34(6), 796–813.
<https://doi.org/10.4012/dmj.2014-098>
206. Suresh Unniachan, A., Krishnavilasom Jayakumari, N., & Sethuraman, S. (2020). Association between Candida species and periodontal disease: A systematic review. *Current Medical Mycology*, 6(2), 63–68.
<https://doi.org/10.18502/CMM.6.2.3420>
207. Takahashi N. (2003). Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(2), 109–113.
<https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2003.00054.x>
208. Takahashi, Y., Imazato, S., Russell, R. R., Noiri, Y., & Ebisu, S. (2004). Influence of resin monomers on growth of oral streptococci. *Journal of Dental Research*, 83(4), 302–306.
<https://doi.org/10.1177/154405910408300406>

209. Taylor, R., Maryan, C., & Verran, J. (1998). Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 80(5), 592–597.
[https://doi.org/10.1016/s0022-3913\(98\)70037-x](https://doi.org/10.1016/s0022-3913(98)70037-x)
210. Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., & Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17(Suppl 2), 68–81.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>
211. Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89(Suppl 1), S159–S172.
<https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>
212. Toth, J. M., Wang, M., Estes, B. T., Scifert, J. L., Seim, H. B., & Turner, A. S. (2006). Polyetheretherketone as a biomaterial for spinal applications. *Biomaterials*, 27(3), 324–34.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.011>
213. Valen, H., & Scheie, A. A. (2018). Biofilms and their properties. *European Journal of Oral Sciences*, 126(Suppl 1), 13–18.
<https://doi.org/10.1111/eos.12425>
214. Van Noort, R. (2012). The future of dental devices is digital. *Dental Materials*, 28(1), 3–12.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.10.014>
215. Van Oss, C. J., Chaudhury, M. K., & Good, R. J. (1988). Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews*, 88(6), 927–941.
<https://doi.org/10.1021/cr00088a006>
216. Van Oss, C.J., Ju, L., Chaudhury, M.K., & Good, R.J. (1989). Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. *Journal of Colloid and Interface Science*, 128(2), 313–319.
[https://doi.org/10.1016/0021-9797\(89\)90345-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(89)90345-7)
217. Verran, J., Lees, G., & Shakespeare, A.P. (1991). The effect of surface roughness on the adhesion of *Candida albicans* to acrylic. *Biofouling*, 3, 183–192.
<https://doi.org/10.1080/08927019109378173>
218. Vila-Nova, T. E. L., Gurgel de Carvalho, I. H., Moura, D. M. D., Batista, A. U. D., Zhang, Y., Paskocimas, C. A., Bottino, M. A., & de Assunção E Souza, R. O. (2020). Effect of finishing/polishing techniques and low temperature degradation on the surface topography, phase transformation and flexural strength of ultra-translucent ZrO₂ ceramic. *Dental Materials*, 36(4), e126–e139.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.01.004>
219. Wang, Z., Shen, Y., & Haapasalo, M. (2014). Dental materials with antibiofilm properties. *Dental Materials*, 30(2), e1–e16.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.12.001>

220. Wassmann, T., Kreis, S., Behr, M., & Buergers, R. (2017). The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. *International Journal of Implant Dentistry*, 3(1), 32.
<https://doi.org/10.1186/s40729-017-0093-3>
221. Whittaker, C. J., Klier, C. M., & Kolenbrander, P. E. (1996). Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 50, 513–552.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.513>
222. Williams, D. L., Woodbury, K. L., Haymond, B. S., Parker, A. E., & Bloebaum, R. D. (2011). A modified CDC biofilm reactor to produce mature biofilms on the surface of peek membranes for an in vivo animal model application. *Current Microbiology*, 62(6), 1657–1663.
<https://doi.org/10.1007/s00284-011-9908-2>
223. Wilson J. (1998). The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *British Dental Journal*, 185(8), 380–384.
<https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4809821>
224. Wu, T., Cen, L., Kaplan, C., Zhou, X., Lux, R., Shi, W., & He, X. (2015). Cellular Components Mediating Coadherence of *Candida albicans* and *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of Dental Research*, 94(10), 1432–1438.
<https://doi.org/10.1177/00220345155593706>
225. Yadav, R. D., Raisingani, D., Jindal, D., & Mathur, R. (2016). A Comparative Analysis of Different Finishing and Polishing Devices on Nanofilled, Microfilled, and Hybrid Composite: A Scanning Electron Microscopy and Profilometric Study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 9(3), 201-208.
<https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-136>
226. Yamamoto, K., Ohashi, S., Taki, E., & Hirata, K. (1996). Adherence of oral streptococci to composite resin of varying surface roughness. *Dental Materials Journal*, 15(2), 201–204.
<https://doi.org/10.4012/dmj.15.201>
227. Yeung, A. L., Lo, E. C., Chow, T. W., & Clark, R. K. (2000). Oral health status of patients 5-6 years after placement of cobalt-chromium removable partial dentures. *Journal of Oral Rehabilitation*, 27(3), 183–189.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.2000.00512.x>
228. Yigit, N., Aktas, E., Dagistan, S., & Ayyildiz, A. (2011). Investigating biofilm production, coagulase and hemolytic activity in *Candida* species isolated from denture stomatitis patients. *Eurasian Journal of Medicine*, 43(1), 27–32.
<https://doi.org/10.5152/eajm.2011.06>
229. Yu, P., Wang, C., Zhou, J., Jiang, L., Xue, J., & Li, W. (2016). Influence of Surface Properties on Adhesion Forces and Attachment of *Streptococcus mutans* to Zirconia *In Vitro*. *BioMed Research International*, 2016, 8901253.
<https://doi.org/10.1155/2016/8901253>

230. Yuan, C., Wang, X., Gao, X., Chen, F., Liang, X., & Li, D. (2016). Effects of surface properties of polymer-based restorative materials on early adhesion of *Streptococcus mutans* in vitro. *Journal of Dentistry*, 54, 33–40.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.07.010>
231. Yuan, Y., Hays, M.P., Hardwidge, P.R., & Kim, J. (2017). Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Advances*, 7, 14254–14261.
<https://doi.org/10.1039/c7ra01571b>
232. Zamperini, C. A., Machado, A. L., Vergani, C. E., Pavarina, A. C., Giampaolo, E. T., & da Cruz, N. C. (2010). Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Archives of Oral Biology*, 55(10), 763–770.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.06.015>
233. Zaugg, L. K., Astasov-Frauenhoffer, M., Braissant, O., Hauser-Gerspach, I., Waltimo, T., & Zitzmann, N. U. (2017). Determinants of biofilm formation and cleanability of titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 28(4), 469–475.
<https://doi.org/10.1111/clr.12821>
234. Zee, K. Y., Samaranayake, L. P., & Attström, R. (1997). Scanning electron microscopy of microbial colonization of 'rapid' and 'slow' dental-plaque formers in vivo. *Archives of Oral Biology*, 42(10-11), 735–742.
[https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(97\)00059-9](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(97)00059-9)
235. Zeller, B., Stöckli, S., Zaugg, L. K., Astasov-Frauenhoffer, M., Hauser-Gerspach, I., Waltimo, T., & Zitzmann, N. U. (2020). Biofilm formation on metal alloys, zirconia and polyetherketoneketone as implant materials in vivo. *Clinical Oral Implants Research*, 31(11), 1078–1086.
<https://doi.org/10.1111/clr.13654>
236. Zhang, S., Qiu, J., Ren, Y., Yu, W., Zhang, F., & Liu, X. (2016). Reciprocal interaction between dental alloy biocorrosion and *Streptococcus mutans* virulent gene expression. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(4), 78.
<https://doi.org/10.1007/s10856-015-5645-6>
237. Zhang, X., Wang, L., & Levänen E. (2013). Superhydrophobic Surfaces for the Reduction of Bacterial Adhesion. *RSC Advances*, 3, 12003–12020.
<https://doi.org/10.1039/c3ra4049h>
238. Zhang, Y., Griggs, J. A., & Benham, A. W. (2004). Influence of powder/liquid mixing ratio on porosity and translucency of dental porcelains. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 91(2), 128–135.
<https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2003.10.014>
239. Zhao, B., van der Mei, H. C., Subbiahdoss, G., de Vries, J., Rustema-Abbing, M., Kuijter, R., Busscher, H. J., & Ren, Y. (2014). Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. *Dental Materials*, 30(7), 716–727.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.04.001>

240. Zhao, X., Karthik, N., Xiong, D., & Liu, Y. (2020). Bio-inspired surface modification of PEEK through the dual cross-linked hydrogel layers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 112, 104032.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104032>
241. Zupančić Čepić, L., Dvorak, G., Piehslinger, E., & Georgopoulos, A. (2020). In vitro adherence of *Candida albicans* to zirconia surfaces. *Oral Diseases*, 26(5), 1072–1080.
<https://doi.org/10.1111/odi.13319>

8. PRILOZI

Prilog 1

OBRAZAC OBAVEŠTENJA O UČEŠĆU U NAUČNOM ISTRAŽIVANJU

Klinika za Stomatološku protetiku
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

“Ispitivanje karakteristika površine mašinski obradivih dentalnih materijala i njihovog uticaja na adheziju mikroorganizama iz usne duplje”

Rukovodioci studije: Dr Stefan Vulović, Prof. dr Aleksandra Milić Lemić

Poštovani,

Obraćamo Vam se ovim putem u nadi da ćete dobrovoljno učestvovati u naučnom istraživanju pod nazivom **“Ispitivanje karakteristika površine mašinski obradivih dentalnih materijala i njihovog uticaja na adheziju mikroorganizama iz usne duplje”**.

Istraživanje će se odvijati na Klinici za stomatološku protetiku, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Dr Stefana Vulovića i Prof. dr Aleksandre Milić Lemić. Etički odbor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu odobrio je sprovođenje ovog naučnog istraživanja.

Mašinski obradivi dentalni materijali zauzimaju sve važniju ulogu u savremenoj stomatologiji. Zahvaljujući nezavisnosti od manuelnih veština prilikom izrade, zubne nadoknade od ove grupe materijala pokazuju unapređena mehanička, biohemijska i estetska svojstva u poređenju sa nadoknadama od konvencionalno proizvedenih materijala čime su u mogućnosti da adekvatnije odgovore na funkcionalne i estetske zahteve svakog pacijenta. Uprkos navedenim prednostima, nijedan od mašinski obradivih materijala primenjen u oralnoj sredini nije pošteđen adhezije mikroorganizama na svojoj površini koja može dovesti do biorazgradnje materijala, narušavajući integritet zubne nadoknade i olakšavajući razvoj oralnih bolesti. U nedostatku takve vrste studije, fokus ovog naučnog istraživanja biće na ispitivanju karakteristika površine različitih mašinski obradivih dentalnih materijala i njihovog uticaja na adheziju mikroorganizama iz usne duplje na površinama pomenutih materijala.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati i uporediti razlike u karakteristikama površine između različitih mašinski obradivih dentalnih materijala, dobijenih nakon standardnog postupka završne obrade i poliranja materijala prema uputstvu proizvođača.
2. Ispitati i uporediti između ispitivanih materijala adheziju mikroorganizama usne duplje na njihovim površinama.
3. Ispitati povezanost između karakteristika površine ispitivanih materijala i adhezije mikroorganizama usne duplje na njihovim površinama.

PROCEDURA ISTRAŽIVANJA

1. Poseta - Anamneza, klinički pregled i profesionalno uklanjanje čvrstih i mekih naslaga (ukoliko se na osnovu anamneze i kliničkog pregleda ustanovi da učesnik ispunjava kriterijume uključenja u naučno istraživanje).
2. Poseta (sedam dana nakon prethodne posete) - Uzimanje otiska gornjeg zubnog niza učesnika otisnim materijalom ireverzibilnim hidrokoloidom pomoću standardne metalne otisne kašike. Na osnovu otiska rukovodioci istraživanja izradiće radni model gornje vilice od tvrdog gipsa na kom će biti napravljen splint od kopoliester/poliuretanske folije debljine 2 mm. Splint će biti dizajniran tako da će između splinta i tvrdog nepca u visini između prvog premolara i poslednjeg molara u splint biti postavljeno šest uzoraka, po jedan od svake od šest grupa ispitivanih materijala, oblika diska, porečnika 5 mm i debljine 2 mm.
3. Poseta (tri dana nakon prethodne posete) - Predaja splinta i davanje uputstava za njegovo nošenje koja podrazumevaju nošenje splinta u ukupnom trajanju od 24 h, uključujući i noću, sa ukupno četiri pauze, tri pauze od po 30 min za tri obroka u toku dana, kao i jedna pauza od 5 min za održavanje oralne higijene pred spavanje. U toku pauza splint se odlaže u posudu sa sterilnim fiziološkim rastvorom koja će Vam biti uručena zajedno sa splintom.
4. Poseta (24 h nakon prethodne posete) - Predaja splinta rukovodiocima istraživanja.

RIZICI I NEŽELJENI EFEKTI

U literaturi nisu opisani potencijalni rizici i neželjeni efekti koji su u vezi sa sprovođenjem navedenog naučnog istraživanja.

OČEKIVANA KORIST OD ISTRAŽIVANJA

Dobijeni rezultati pružili bi uvid u sklonost ispitivanih mašinski obradivih dentalnih materijala ka adheziji mikroorganizama na njihovim površinama, kao i zavisnost istog od karakteristika površine materijala. Takođe, stečena saznanja mogu poslužiti i za buduća istraživanja u pogledu ponašanja mašinski obradivih dentalnih materijala kada su u pitanju druge karakteristike usko povezane sa kvalitetom njihove površine, kao što su korozija, habanje, estetska svojstva materijala i dr. Na taj način, naučna zajednica bi mogla biti korak bliže definisanju materijala izbora prilikom izrade različitih zubnih nadoknada izrađenih od mašinski obradivih dentalnih materijala.

UČESTVOVANJE U NAUČNOM ISTRAŽIVANJU

Učestvovanje u naučnom istraživanju je na dobrovoljnoj bazi i ne podrazumeva materijalnu nadoknadu, a ni materijalne troškove ispitanika. Učesnik može odustati u bilo kom trenutku bez ikakvih posledica.

DOKUMENTACIJA O UČESNIKU

Dokumentacija o učesniku je poverljiva. Direktan uvid u medicinsku dokumentaciju mogu imati samo članovi istraživačkog tima.

DODATNE INFORMACIJE

Ukoliko budete imali bilo kakva pitanja ili budete osetili bilo kakve tegobe pre, u toku ili nakon izvođenja naučnog istraživanja, obratite se Dr Stefanu Vuloviću (tel: +381 69 351 20 36) ili Prof. dr Aleksandri Milić Lemić (tel: +381 63 813 70 74).

Hvala Vam na saradnji.

Prilog 2

ISTRAŽIVAČKI KARTON

ANAMNESTIČKI PODACI

Redni broj učesnika: _____

Inicijali učesnika: _____

Pol: M Ž

Datum rođenja: _____

Adresa: _____

Mesto: _____

Broj telefona: _____

Da li učesnik boluje od prisustva određene sistemske bolesti? DA NE

Ukoliko boluje, navesti od koje: _____

Da li učesnik koristi određene medikamente na dnevnom nivou? DA NE

Ukoliko koristi, navesti koje: _____

Da li je učesnik koristio/la antibiotike u prethodna 3 meseca? DA NE

Ukoliko jeste, navesti koje: _____

Da li učesnik ima registrovano prisustvo alergijske reakcije na sledeće materijale?

- | | | |
|---|----|----|
| • Kompozit na bazi smole | DA | NE |
| • Poli (metil metakrilat) | DA | NE |
| • Poli (etar etar keton) | DA | NE |
| • Cirkonijum-dioksidna (ZrO ₂) keramika | DA | NE |
| • Kobalt-hrom (CoCr) legura | DA | NE |
| • Kopoliester | DA | NE |
| • Poliuretan | DA | NE |

KLINIČKI PREGLED

DIJAGNOSTIČKI KARTON ZA GORNJU VILICU

DS															
NIG															
NPE															
FUR															
ILZ															
KNP															
PI															

vestibularno

oralno

DS															
NIG															
NPE															
FUR															
KNP															
PI															

Broj zuba sa vrednošću dubine sondiranja (DS) > 3 mm _____

Broj zuba sa vrednošću nivoa ivice gingive (NIG) > 3 mm _____

Broj zuba sa vrednošću nivoa pripojnog epitela (NPE) > 0 mm _____

Broj zuba sa vrednošću indeksa labavljenja zuba (ILZ) > 0 _____

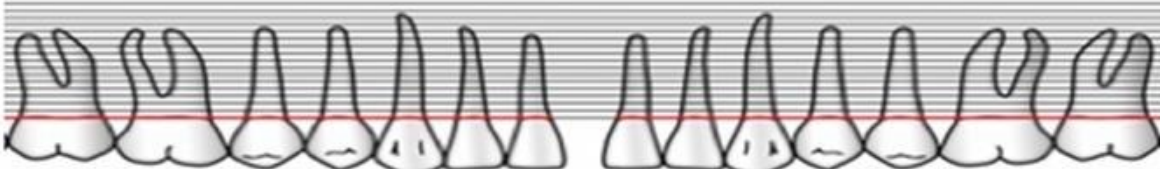
Vrednost indeksa krvarenja gingive na provokaciju (KNP) _____

Vrednost plak indeksa (PI) _____

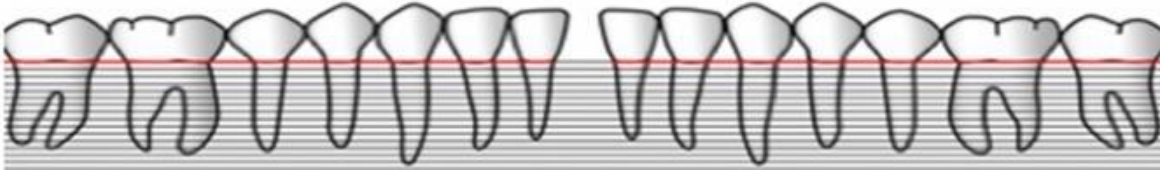
DIJAGNOSTIČKI KARTON ZA DONJU VILICU

DS															
NIG															
NPE															
FUR															
ILZ															
KNP															
PI															

oralno



vestibularno



DS															
NIG															
NPE															
FUR															
KNP															
PI															

Broj zuba sa vrednošću dubine sondiranja (DS) > 3 mm _____

Broj zuba sa vrednošću nivoa ivice gingive (NIG) > 3 mm _____

Broj zuba sa vrednošću nivoa pripojnog epitela (NPE) > 0 mm _____

Broj zuba sa vrednošću indeksa labavljenja zuba (ILZ) > 0 _____

Vrednost indeksa krvarenja gingive na provokaciju (KNP) _____

Vrednost plak indeksa (PI) _____

**OBRAZAC INFORMISANOG PRISTANKA ZA
UČEŠĆE U NAUČNOM ISTRAŽIVANJU**

Ime i prezime: _____

Redni broj učesnika: _____

Pročitao/la sam i razumeo/la obaveštenje i imao/la sam dovoljno vremena da razmislim o učešću u naučnom istraživanju pod nazivom **“Ispitivanje karakteristika površine mašinski obradivih dentalnih materijala i njihovog uticaja na adheziju mikroorganizama iz usne duplje”**.

Detaljno mi je objašnjen tok i značaj istraživanja i zadovoljan/na sam dobijenim odgovorima i objašnjenjima na sva moja pitanja. Upoznat/a sam sa potencijalnim rizicima i neželjenim efektima u toku i nakon izvođenja naučnog istraživanja. Upoznat/a sam o dobrovoljnom učešću u istraživanju i mogućnošću prekida učešća u istraživanju u bilo kom trenutku na moj zahtev ili na zahtev rukovodioca istraživanja bez ikakvih negativnih posledica. Učestvovanjem u istraživanju ne ostvarujem nikakvu ličnu niti materijalnu korist.

Dajem svoj pristanak za učešće u predloženom naučnom istraživanju i odobravam upotrebu i objavljivanje informacija i fotografija u vezi sa ovim istraživanjem.

(potpis učesnika)

U Beogradu,

Dana _____. god.

(potpis rukovodioca istraživanja)

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Stefan Vulović rođen je 26.05.1994. u Pančevu. Osnovnu školu „Stevica Jovanović“ kao i gimnaziju „Uroš Predić“ u Pančevu završio je odličnim uspehom. Integrisane osnovne i master akademske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu započeo je u septembru 2013. godine, a završio u julu 2019. godine kao najbolje diplomirani student u generaciji sa prosečnom ocenom 9,87 (devet i 87/100). U toku osnovnih studija dodeljene su mu nagrade „Colgate Palmolive Adria“ za najboljeg studenta pete godine Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, nagrada za najboljeg studenta u generaciji na kraju svake školske godine studiranja i nagrada za najbolje diplomiranog studenta od strane Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Takođe, dobitnik je Povelje Rektora Univerziteta u Beogradu za najboljeg studenta u generaciji Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Obavezan pripravnički staž obavljao je na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u periodu od oktobra 2019. do aprila 2020. godine, a u maju 2020. godine položio je stručni ispit pred komisijom Ministarstva zdravlja Republike Srbije. U martu 2021. godine zasnovao je radni odnos na Klinici za Stomatološku protetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu u funkciji saradnika u visokom obrazovanju. Doktorske akademske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je u novembru 2021. godine na modulu „Bazična i klinička istraživanja u stomatologiji“ i položio je sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10. Specijalističke studije iz oblasti Stomatološke protetike na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je u oktobru 2022. godine. Tečno govori engleski i nemački jezik iz kojih poseduje B2 sertifikate: „Common European Standard - CEF Young Adult Intermediate" sertifikat iz engleskog jezika i „Goethe B2" sertifikat iz nemačkog jezika.

Spisak dosadašnjih naučnih i stručnih publikacija

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. **Vulović, S.,** Nikolić-Jakoba, N., Radunović, M., Petrović, S., Popovac, A., Todorović, M., & Milić-Lemić, A. (2023). Biofilm Formation on the Surfaces of CAD/CAM Dental Polymers. *Polymers*, 15(9), 2140. (IF 2022 = 5,0)
<https://doi.org/10.3390/polym15092140>

Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

1. **Vulović, S.,** Todorović, A., Stančić, I., Popovac, A., Stašić, J. N., Vencl, A., & Milić-Lemić, A. (2022). Study on the surface properties of different commercially available CAD/CAM materials for implant-supported restorations. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 34(7), 1132–1141. (IF 2022 = 3,2)
<https://doi.org/10.1111/jerd.12958>
2. **Vulović, S.,** Stašić, J. N., Ilić, J., Todorović, M., Jevremović, D., & Milić-Lemić, A. (2023). Effect of different finishing and polishing procedures on surface roughness and microbial adhesion on highly-filled composites for injectable mold technique. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 35(6), 917–926. (IF 2022 = 3,2)
<https://doi.org/10.1111/jerd.13045>

Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

1. **Vulović, S.,** Popovac, A., Radunović, M., Petrović, S., Todorović, M., & Milić-Lemić, A. (2023). Microbial adhesion and viability on novel CAD/CAM framework materials for implant-supported hybrid prostheses. *European Journal of Oral Sciences*, 131(1), e12911. (IF 2022 = 1,9)
<https://doi.org/10.1111/eos.12911>

Radovi u novopokrenutim naučnim časopisima (M54)

1. **Vulović, S.**, Stančić, I., Popovac, A., & Milić-Lemić, A. (2022). Surface roughness evaluation of different novel CAD/CAM dental materials. *Tribology and Materials*, 1(2), 55-60.
<https://doi.org/10.46793/tribomat.2022.010>

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. Ilić, J., Beljić-Ivanović, K., **Vulović, S.**, & Milić-Lemić A. The effect of additional clinical training in final year of studies on dental students' self-reported competence level. Association for Dental Education in Europe (ADEE) Annual Meeting, Palma de Mallorca, Spain, August 2022.
2. Špadijer-Gostović, A., Racić, A., Rovčanin, M., Milić-Lemić, A., & **Vulović, S.** Minimally invasive prosthodontic procedures for treatment of tooth wear. 26th Congress of the BaSS, Skopje, North Macedonia, 11-14th of May 2023, Book of Abstracts, pp 139.
3. Vukić, T., Puzović, K., Špadijer-Gostović, A., & **Vulović, S.** The effect of thermal cycling on surface properties of CAD/CAM hybrid ceramic material. International Conference of Experimental and Numerical Investigations and New Technologies CNN TECH 2023, Zlatibor, Srbija, 04-07th of July 2023, Book of Abstracts, pp 95.
4. Popovac, A., **Vulović, S.**, Petrović, S., Radunović, M., Stančić, I., & Milić-Lemić, A. Comparative evaluation of PEEK, PMMA and CoCr alloy as RPD materials for *Candida albicans* adherence - *in vitro* study. ECG Annual Conference, Stockholm, Sweden, 14-15th of September 2023.
5. Špadijer-Gostović, A., **Vulović, S.**, Milić-Lemić, A., Racić, A., Vukić, T., & Puzović, K. Effect of thermal cycling on surface roughness of CAD/CAM ceramic materials for implant-supported restorations. EAO-DGI Joint Meeting, Berlin, Germany, 28-30th of September 2023.

Učešća u projektima

1. Međunarodni projekat *COST Action PROMoting GeRiAtric Medicine IN countries where it is still eMerGing PROGRAMMING 2022 – 2025*, br. CA21122, od strane COST (European Cooperation in Science and Technology).

Nagrade i priznanja

1. Zlatna plaketa sa zlatnom medaljom Nikole Tesle Saveza pronalazača Beograda za inovaciju „Intraoralni nosač uzoraka materijala za istraživanja u in situ uslovima“ autora: **Vulović, S.**, Milić-Lemić, A., & Tihaček-Šojić, Lj, Beograd, 16. jun, 2023.

Mentorstva u studentskim naučno-istraživačkim radovima

1. Vukić, T., & Puzović, K. Mentor: Špadijer-Gostović, A. Komentor: **Vulović, S.** Efekat termocikliranja na površinske karakteristike mašinske obradive keramike. 62. Kongres studenata biomedicinskih nauka Srbije sa internacionalnim učešćem. Kopaonik, April 2023.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora

Stefan Vulović

Broj indeksa

4006/2021

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Ispitivanje karakteristika površine mašinski obradivih dentalnih materijala i
njihovog uticaja na adheziju mikroorganizama iz usne duplje

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora



U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Stefan Vulović

Broj indeksa 4006/2021

Studijski program Bazična i klinička istraživanja u stomatologiji

Naslov rada Ispitivanje karakteristika površine mašinski obradivih dentalnih materijala i njihovog uticaja na adheziju mikroorganizama iz usne duplje

Mentor Prof. dr Aleksandra Milić Lemić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora



U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje karakteristika površine mašinski obradivih dentalnih materijala i

njihovog uticaja na adheziju mikroorganizama iz usne duplje

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- ☒ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora



U Beogradu, _____

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo - bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.