

# Sağlıklı ve Çürük Diş Dokularının Mekanik Özelliklerinin Nanoindentasyon Yöntemiyle Karşılıklı Olarak İncelenmesi

## Comparative Evaluation of Mechanical Properties of Healthy and Decayed Dental Tissues by Nanoindentation Method

Cem PEŞKERSOY

<https://orcid.org/0000-0003-2502-2698>

Ege Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi Ana Bilim Dalı, İzmir

**Atıf/Citation:** Peşkersoy C., (2022). Sağlıklı ve Çürük Diş Dokularının Mekanik Özelliklerinin Nanoindentasyon Yöntemiyle Karşılıklı Olarak İncelenmesi. Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 2022; 43\_2, 129-139.

### ÖZ

**Giriş ve Amaç:** Çalışmamızın amacı nanoindentasyon yöntemiyle diş sert dokularının ve farklı aşamalarda çürük lezyonunun mekanik özelliklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesidir.

**Yöntem ve Gereçler:** Nanoindentasyon test yöntemi için yarı retansiyonlu ve sürme güçlüğü nedeniyle çekilmiş üçüncü alt molar dişler kullanılmıştır. 2 mm kalınlığında diskler şeklinde hazırlanan mine ve dentin örnekleri toplamda 6 gruba ayrılarak (n=12), DUH-W201S nanoindentasyon cihazında test edilmiş ve her bir örneğe ait gerilme, gerinim, sertlik, elastisite modülü, akma dayanımı ve kırılma tokluğu değerleri ölçülmüştür. Gruplar arasında fark olup olmadığı Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testleri ile, sağlıklı mine ve dentin gruplarının demineralizasyona bağlı değişimi ise Wilcoxon Sum Rank Testi ile incelenmiştir (p=0.01).

**Bulgular:** Sağlıklı mine dokusunun sertlik, gerilme, elastisite modülü, akma dayanımı ve kırılma tokluğu değerlerinin diğer gruplara kıyasla yüksek olduğu belirlenmiştir. Demineralize mine ve dentin dokularından elde edilen sertlik ve gerilme değerleri sağlıklı mine ve dentin dokularına kıyasla %90 oranında azalırken, gerinim (%265), kırılma tokluğu (%45) ve elastik toparlanma değerleri (%160) artmıştır. Demineralize mine ve dentin dokuları arasında tüm mekanik özellikler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark varken (p=0.000), mine ve dentin çürükleri arasında tüm mekanik özellikler açısından fark bulunmamaktadır (p=0.099).

**Tartışma ve Sonuç:** Farklı diş dokularında meydana gelen demineralizasyon işlemi dişin mekanik özelliklerini azaltırken, dişin yapısını daha esnek ve fiziksel açıdan zayıf hale getirmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Mine, Dentin, Çürük Lezyonu, Beyaz Nokta Lezyonu, Nanoindentasyon

### ABSTRACT

**Introduction:** Aim of this study is to compare the mechanical properties of dental hard tissues and caries lesions at different stages by nanoindentation method.

**Methods:** Partially erupted extracted lower third molar teeth, were utilized for the nanoindentation test. Specimens were prepared in the form of 2 mm. thick disks and separated into 5 groups (n=10) to test the stress, strain, hardness, modulus of elasticity, yield strength, fracture toughness and elastic recovery values of each sample with the DUH-W201S nanoindentation device. The differences between the groups was examined with the Kruskal Wallis and Mann Whitney-U tests, while the changes of sound enamel and dentin due to demineralization were examined with Wilcoxon Sum Rank Test (p=0.01).

**Results:** The hardness, stress, elastic modulus, yield strength and fracture toughness values of healthy enamel tissue were higher than the other groups. While hardness and stress values obtained from demineralized enamel and dentin tissues decreased by 90% compared to healthy dental tissues, strain (265%), fracture toughness (45%) and elastic recovery values (160%) increased. Besides the difference between demineralized enamel and dentin was significant (p=0.000), there was no difference between enamel and dentin caries (p=0.099).

**Discussion and Conclusion:** Demineralization in dental tissues reduces mechanical properties and makes the structure more flexible and softer.

**Keywords:** Enamel, Dentin, Caries Lesion, White Spot Lesion, Nanoindentation

Sorumlu yazar/Corresponding author\*: dtcempeskersoy@hotmail.com

Başvuru Tarihi/Received Date: 26.07.2021

Kabul Tarihi/Accepted Date: 08.12.2021

## GİRİŞ

Mine dokusu, ağırlık bakımından %95' i inorganik, %1' i organik, %4' ü sudan oluşan, yüksek oranda mineralize olmuş, kalınlığı tüberkül tepelerinde 1.5-2 mm fissürlerin tabanında ise 0.2-0.5 mm olan bir yapıdır<sup>1</sup>. Mine dokusunun sertliği, yüzeyden iç kısımlara doğru azalırken, mine-dentin sınırında en düşüktür.<sup>1,2</sup> Mine dokusunun elastisite modülü yüksek, kırılma dayanımı ve gerilme direnci düşüktür.<sup>2,3</sup> Dentin dokusunun organik yapısında ise kollagen ve substantia fundamentalis, kondroidin sülfat, mukoproteinler, sialoproteinler, lipitler, sitratlar, flüoresan maddeler bulunur<sup>1,4</sup>. Dentin dokusu mine dokusuna oranla daha düşük sertlik ve elastisite modülü değerine, daha yüksek çekme gerinimine ve kırılma dayanımına sahiptir<sup>5,6</sup>.

Bir dokunun sertliği, elastisite modülü gibi mekanik özellikleri, kalsifiye dokunun mineral içeriği ile doğru orantılıdır.<sup>7</sup> Mine ve dentin dokularında mineral kaybı ile başlayan, beyaz nokta lezyonu (BNL) şeklinde kendini belli eden ve çürük lezyonuna kadar ilerleyen doku kayıplarında mekanik ve fiziksel özelliklerin ölçümünün lezyon altında kalan sert dokunun özellikleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.<sup>8,9</sup> Beyaz nokta lezyonlarının veya çürük dentinin sertliğinin, lezyon boş-luğunun tabanına doğru önemli ölçüde ve aşamalı olarak azaldığı, bununla birlikte ise dokunun elastikliğinde belirgin değişikliklerin gözlenmediği bildirilmiştir.<sup>10</sup> Ayrıca, çürük lezyonunun mine veya dentinde olmasına bağlı olarak mekanik değerlerinin değişeceği görüşünü savunan araştırmacılar da vardır.<sup>11</sup>

Diş sert dokularının mekanik özelliklerinin geleceksel test yöntemleri ile incelendiği çalışmalarda, uygulanan kuvvetin ve örnek sayısının standart olması, her test aşamasından sonra örneklerde sonuçları etkileyecek deformasyonların oluşması, çalışmalar arasında uyum ve tutarlılığı olumsuz etkilemektedir.<sup>9-11</sup> Mine dokusunda yeni başlamış olan demineralizasyon alanlarının, çürük dokusu gibi amorf ve dayanıksız bölgelerin ve çürük lezyonundan kısmen etkilenmiş dentin bölgelerinin mekanik özelliklerinin daha net olarak belirlenmesinde nano yöntemler tercih edilmektedir.<sup>8,9,12</sup>

Nanoindentasyon yönteminde küçük boyutta örneklerle, mikro düzeyde kuvvet uygulanabilmekte, böylelikle mekanik özellikler daha az hatayla, daha homojen ve daha az girişimsel olarak ölçülebilmektedir.<sup>13-14</sup> Nanoindentasyon testi minimal girişimsel bir analiz yöntemidir. Bu yöntem ile sertlik, elastisite modülü, kırılma tokluğu, akma dayanımı gibi birkaç özelliğin tek bir ölçümle hesaplanmasına olanak sağlamasının yanı sıra tekrarlanabilir ölçümler de yapılabilmektedir.<sup>15</sup> Akma dayanımı ve kırılma tokluğu değerleri test edilen materyal mutlak deformasyona uğramadan hesaplanabilir.<sup>16</sup>

Diş dokularının mekanik özelliklerinin doğru ölçülmesi bu dokularda meydana gelen demineralizasyon –

remineralizasyon gibi süreçlerin tam olarak anlaşılması açısından oldukça önemlidir. Demineralizasyonun başladığı noktadan, diş sert dokularında madde kayıpları oluşuncaya kadar geçen süreçte mekanik özelliklerde oluşan değişikliklerin takibi de çürük oluşum süreci hakkında daha detaylı bilgiler verecektir. Diş sert dokularının ve deneysel çürük lezyonlarının mekanik özelliklerinin araştırıldığı çalışmalar mevcut olmakla birlikte, başlangıç ve ilerlemiş çürük lezyonlarının gerçek diş dokularında yarattığı tahribatı karşılaştırmalı olarak inceleyen çalışmalar oldukça kısıtlıdır.<sup>17-19</sup>

Çalışmamızın amacı; sağlıklı ve çürüklü diş sert dokularının mekanik özelliklerinin nanoindentasyon yöntemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmektir. Başlangıç hipotezimizde mine dokusunun dentin dokusuna kıyasla demineralizasyon ve çürük oluşumuna karşı daha dirençli olacağı ve dentin dokusunda mekanik özelliklerde daha fazla bir düşüş izleneceği yönündedir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada diş sert dokularının sağlıklı olduğu, minede demineralizasyon sonucu BNL 'nun, dentinde başlangıç çürüklerinin oluştuğu ve madde kayıplarının artarak kaviteye döndüğü dönemlerde diş dokularının mekanik özelliklerinde meydana gelen değişimler, nanoindentasyon yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Nanoindentasyon yönteminde ölçüm yapılacak alan sistemin bağlı olduğu mikroskop ile tespit edilmekte, önceden belirlenen bir kuvvet değerine kadar artan oranlarda yük uygulanmaktadır.<sup>20</sup> Örnekte elde edilen çentikleme izinin özelliklerine göre de sistemin yazılımında yer alan algoritmaları kullanarak örneğe ait mekanik özellikler hesaplanmaktadır.<sup>16</sup>

### Sağlıklı Mine, Dentin ve Çürük Lezyonlu Diş Örneklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada 18-25 yaş arası hastaların, yarı retansiyonlu ve sürme gücüne bağlı çekim işlemi gerçekleştirilmiş üçüncü alt molar dişleri kullanılmıştır ( $n = 12$ ) (Ref.No: 15/3T-18). Dişlerin kök gelişimi, konumu ve fissürlerinde dentin dokusuna kadar ulaşan çürük varlığı radyolojik olarak tespit edilmiştir. Diş çekiminin diş sert dokularını zedelemeyen gerçekleştirilmesine özen gösterilmiştir, çekilen dişler ışık mikroskopunda kırık, çatlak ve deformasyon açısından incelenmiştir. (Resim-1a). Çekim esnasında zedelene dişler çalışma dışı bırakılmıştır. Dişlerin üzerindeki tüm eklentiler el aletleriyle mekanik olarak uzaklaştırılmış, yüzey ve fiziksel özelliklerinin bozulmaması için çekilen dişler inceleme aşamalarına kadar % 0.1' lik timol solüsyonunda saklanmıştır.<sup>8-11</sup> Sağlıklı diş sert dokuları, başlangıç çürükleri ve ilerlemiş çürük lezyonuna ait incelemeler, aynı diş üzerinde nanoindentasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çalışmada kullanılacak dişler 2 ana grup ve 4 alt gruba ayrılarak sınıflandırılmıştır:

Grup-1: Sağlıklı Mine Dokusu

Grup-1a: Başlangıç Yüzey Çürüğü (beyaz nokta lezyonu)

Grup-1b: İlerlemiş Mine Çürüğü (mine dokusunda kavitasyon yaratmış çürük lezyonu)

Grup-2: Sağlıklı Dentin Dokusu

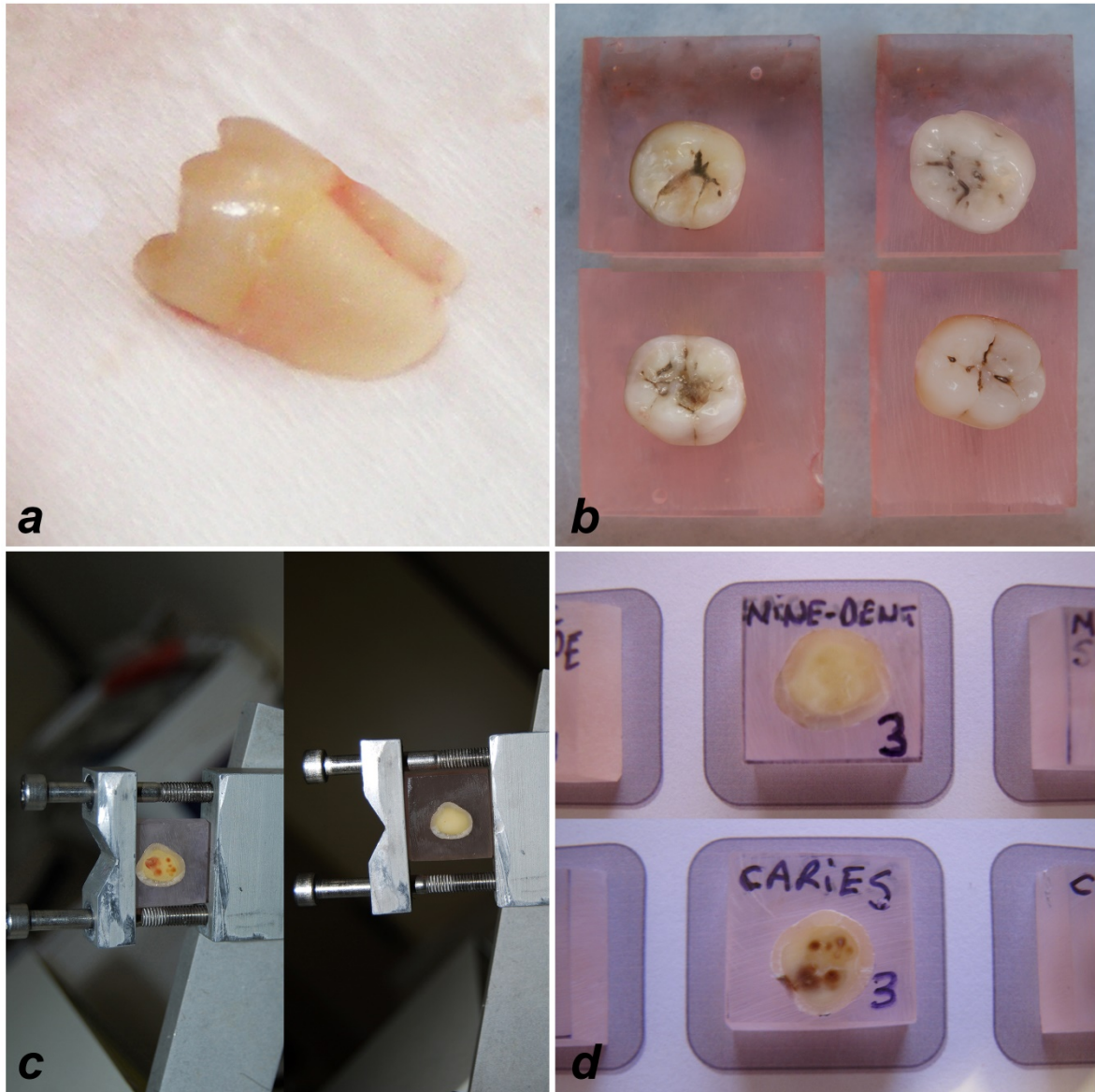
Grup-2a: Demineralize Dentin Bölgesi (başlangıç çürüğü)

Grup-2b: İlerlemiş Dentin Çürüğü (dentin dokusunda kavitasyon yaratmış çürük lezyonu)

Her bir dişin kuron kısmı, mine-sement birleşim hizasından horizontal yönde aeratöre takılan yeşil kuşak

elmas frezler yardımı ile su soğutması altında kesilmiştir<sup>10,12,21</sup>. Dişlerin kuronları, oklüzal yüzeyleri açıkta kalacak şekilde polyester (Polikor, Polikor Ltd, Türkiye) kalıba alınmıştır (Resim-1b). Polyester kalıba alınan örnekler yaklaşık olarak ortasından, horizontal şekilde su soğutması altında İsetet testeresi ile (Buehler Ltd, Springfield VA, USA) kesilmiştir (Resim-1c).

Kesilen parçalardan servikale yakın ve çiğneme yüzüne yakın olmak üzere iki bölüm oluşturulmuştur (Resim-1d). Servikal tarafta olan bölgeden, sağlıklı mine ve dentin ölçümleri ile yapay oluşturulan başlangıç yüzey çürüklerinin ölçümleri yapılmıştır. Çiğneme yüzüne yakın bölgeden ise, çürük mine ve dentin dokusuna ait ölçümler yapılmıştır.<sup>14,21</sup>



**Resim 1:** Çalışmada kullanılan dişlerin; a) gözle ve büyüteç yardımıyla incelenmesi, b) polyester kalıba alınması, c) sağlıklı ve çürük alanlarının ayrılması ve d) ölçümler için gruplandırılması.

### Beyaz Nokta Lezyonlarının Oluşturulması

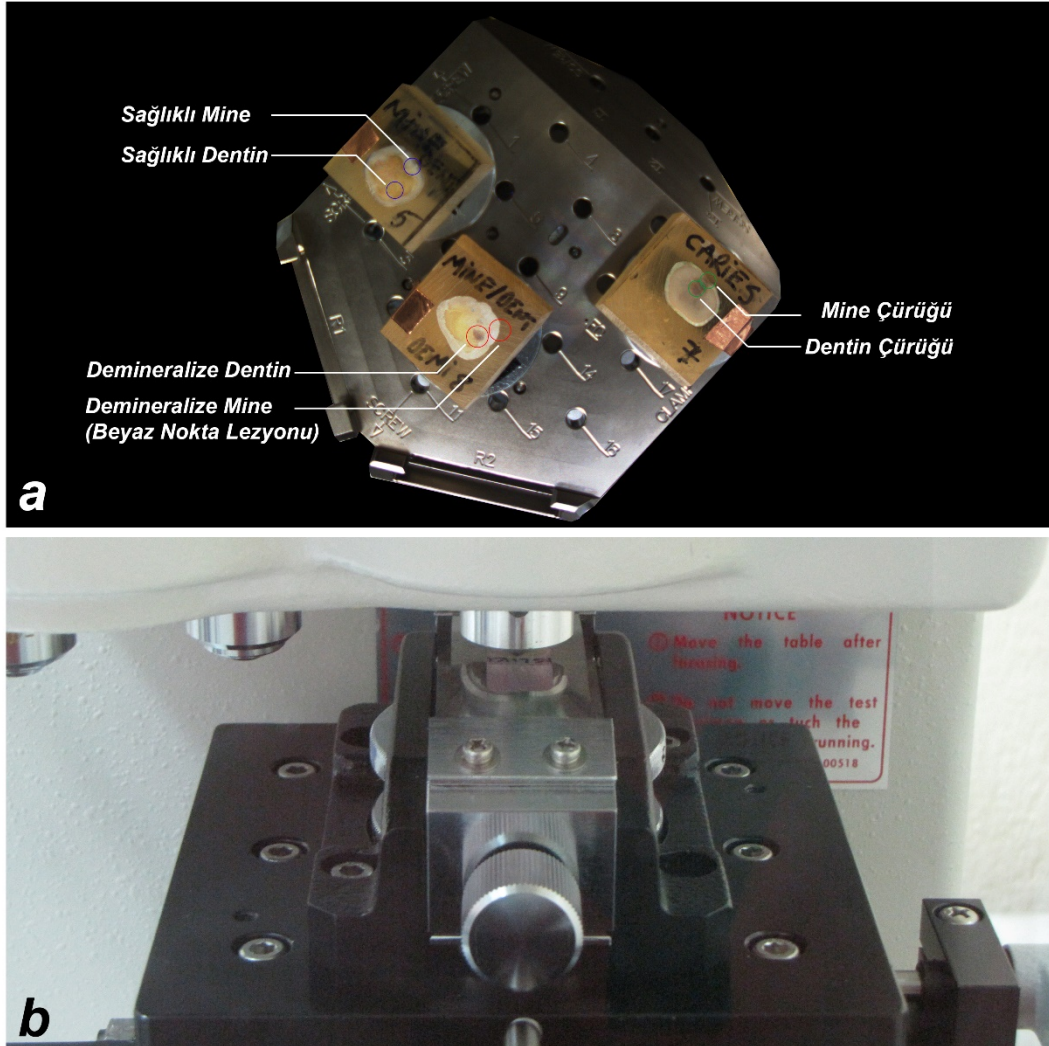
Mine örneklerinde beyaz nokta lezyonu ve dentin örneklerinde başlangıç çürükleri (demineralizasyon alanları) oluşturmak amacıyla Al-obaidi ve ark.'ların çalışmalarında kullandıkları demineralizasyon solüsyonu (0.075 M/L asetik asit, 1.0 mM/L kalsiyum klorür, 2.0 mM/L potasyum fosfat, pH = 4.3) kullanılmıştır.<sup>22</sup> Örnekler 20 ml demineralizasyon solüsyonu içeren cam kaplarda DIAGNODent™ (Kavo, Biberach, Almanya) cihazı ile 7 değerini verene kadar 37°C etüvde (Nüve EN-400, İstanbul, Türkiye) bekletilmiştir.

### Nano-indentasyon test işleminin uygulanması

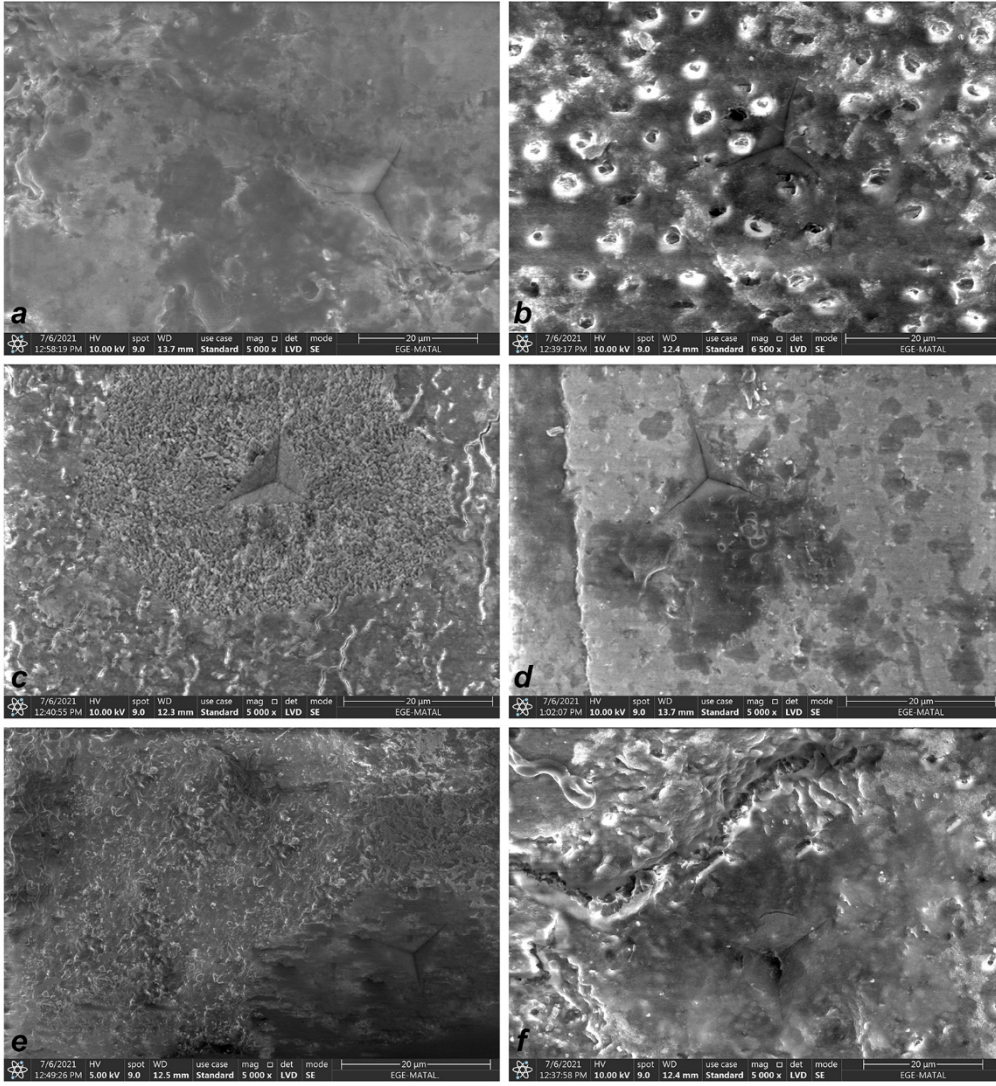
Çalışmamızdaki örneklerde testin uygulanacağı noktalar ışık mikroskopi ile (Leica, DM300, Wetzlar, Almanya) mine ve dentin kalınlıklarının yarısına, başlangıç ve ilerlemiş çürük lezyonlarında ise lezyonun

orta noktasına denk gelecek şekilde belirlenmiştir (Resim-2a). Bu sayede mine-dentin sınırındaki daha az mineralize olan bölgeden alınacak olası hatalı ölçümler engellenmiştir. Ölçümler her bir örneğin 3 farklı noktasından yapılmıştır. Örnekler, bekleme süresince kurumamaları için işlem aralarında 37°C etüvde bekletilmiş ve nanoindentasyon test işlemi tüm örneklerde aynı gün içerisinde tamamlanmıştır.

Nanoindentasyon testleri, tepe açısı 140,6° olan, malzeme ile temas yüzeyi 130.6 ° derecelik bir açı oluşturan, genişliği 150 nm boyutlarında, üçgensel piramit şeklindeki Berkovich çentikleyci ucuna sahip DUH-W201S (Schimadzu, Kyoto, Japonya) indentasyon cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Resim-2b). Örnekler 1 mN' dan başlayarak, sabit artan yüklem hızı (6.6149 mN/sn) ile 50 mN, 100 mN, 150 mN ve 200 mN' luk kuvvetler şeklinde 10 saniye süreyle uygulanmıştır.<sup>16</sup> Ölçümler sonrasında örneklerden taramalı elektron mikroskopi görüntüleri alınmıştır (Resim-3).



**Resim 2:** Çalışmadaki örneklerde; a) testin uygulanacağı noktaların ışık mikroskopi ile belirlenmesi ve b) nanoindentasyon testlerinin uygulanması.



**Resim 3:** Ölçümler sonrasında örneklerden alınan taramalı elektron mikroskobu görüntüleri; a) Sağlıklı Mine (5000x), b) Sağlıklı Dentin (6500x), c) Minede oluşturulan demineralizasyon alanı - Beyaz Nokta Lezyonu (5000x), d) Dentinde oluşturulan demineralizasyon alanı (5000x), e) Minede oluşan çürük lezyonu (5000x), f) Dentinde oluşan çürük lezyonu (5000x).

### Nanoindentasyon prosedüründe mekanik özelliklerin hesaplanması

Nanoindentasyon testinde çentikleyci ucun yarıçapı ( $R = 6.2$ ), cihazın çentikleyci ucunun hızı ( $K=30\mu\text{m/sn}$ ) ve batma alanının yarıçapı ( $a = 5.3$ ) sabit değerlerdir. Test başlangıcında belirlenen maksimum uygulanacak kuvvet ( $P_{max}$ ), cismin ilk boyu ( $L_0$ ), cismin birim alanı ( $A_c$ ), poisson sabiti de ( $\nu$ ) girilerek yazılımın gerek duyacağı tüm veriler kaydedilir. Bu değerlere ek olarak test sonucunda örneklerden elde edilen, minimum batma derinliği ( $h_{min}$ ), ucun batma derinliği ( $h_{max}$ ), ucun oluşturduğu tahmini basma alanı ( $A_c$ ) ve batma alanının çevresinde oluşan kırıkların uzunlukları ( $h_c$ ) ölçülerek, C++ programıyla hazırlanan sistem içerisindeki algoritma yardımıyla materyalin mekanik özellikleri hesaplanır. Bu ölçümlerde materyale ait; Gerilme –

Stress ( $\sigma$ ), Gerinim – Birim Deformasyon ( $\epsilon$ ), Dinamik Sertlik ( $DHV$ ), İndentasyon Sertliği ( $H$ ), Elastisite modülü ( $E$ ), Akma Dayanımı ( $\sigma_y$ ) ve Kırılma Tokluğu ( $K_c$ ) değerleri tespit edilebilmektedir.<sup>16</sup>

$$\text{Gerilme}(\sigma) = \frac{\text{Kuvvet} (F)}{\text{Alan} (A)}$$

$$(\sigma) = \frac{P_m}{A_c} \quad (1)$$

$$\text{Gerinim}(\epsilon) = \frac{\text{Deformasyon miktarı} (\Delta L)}{\text{Cismin ilk boyutu} (L)}$$

$$(\epsilon) = \frac{2.3 \cdot \pi \cdot P_m}{10.4 \cdot E} \quad (2)$$

Dinamik sertlik değerinin ölçümü; uygulanan kuvvet miktarı ( $P_{max}$ ), cisimde meydana gelen batma derinliği

( $h_{max}$ ), nanoindentasyon cihazının sabiti ( $R = 0.582$ ) ve cihazın çentikleyci ucunun hız ( $K=6,61$ ) değerinin formülde yerine konulması ile elde edilir:<sup>16</sup>

$$DHV = K \cdot \frac{P}{h_{max}^2} \cdot R \quad (3)$$

Nanoindentasyon testlerinde sertlik; maksimum çentik kuvvetinin ( $P_{max}$ ) sertlik etkisinin tahmini alanına ( $A_c$ ) oranı şeklinde tanımlanır ve aşağıdaki formül ile hesaplanır (3).<sup>23</sup>

$$Sertlik = \frac{Yük}{Alan} \quad H = \frac{P}{A} = \frac{P_{max}}{k_c \cdot h_c^2}$$

$$H = \frac{P_{max}}{A_c} = \frac{P_{max}}{C_0 \cdot h_{max}^2 + C_1 \cdot h_{max}} \quad (4)$$

Elastisite modülü ( $E$ ); bir materyalin uygulanan kuvvet karşısında elastiklik özelliğini kaybettiği ve plastik deformasyonun başladığı noktadır. Materyale uygulanan kuvvetin, kuvvet uygulanan birim alana oranının (gerilme - " $\sigma$ "), malzemede meydana gelen deformasyon miktarı ile malzemenin ilk boyutlarının oranına (gerinim - " $\epsilon$ ") bölünmesidir. Elastik toparlanma ( $E_{rr}$ ) ise plastik deformasyona neden olan yük kaldırıldığında materyalde oluşan düzelmelerin yüzdesel oranıdır. Bu değer cismin esnekliğini belirler:<sup>23</sup>

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad E = \frac{F/A}{\Delta l/L_0} \quad E = \frac{\pi \cdot P_{max}}{2 \cdot h_c^2 \cdot \tan \alpha}$$

$$E_{rr} = \frac{(h_{max} - h_{min})}{h_{max}} \cdot 100 \quad (5)$$

Akma Dayanımı ( $\vartheta_y$ ); bir malzemenin kalıcı şekil değişikliğine uğramadan dayanabileceği en büyük kuvvettir ve kuvvette herhangi bir değişiklik olmaksızın cisimde plastik deformasyon meydana gelir. Nanoindentasyon testlerinde aşağıdaki formülle hesaplanır:<sup>16</sup>

$$Y(\vartheta_y) = 7 \cdot 10^{-2} H - 4.4 \cdot 10^{-4} E \quad (6)$$

Kırılma Tokluğu ( $K_c$ ); bir cisme uygulanan kuvvet altında, cisimde meydana gelen çatlağın yayılmasına karşı cismin gösterdiği dirençtir. Uygulanan kuvvet sonucu plastik deformasyonun bittiği ve cismin kırılmadan önce dayanabildiği son kuvvet değeridir ve  $MPa/m^{-1/2}$  cinsinden ifade edilir. Nanoindentasyon testlerinde aşağıdaki formülle hesaplanır:<sup>24</sup>

$$K_c = \sigma \cdot \sqrt{\pi \cdot a}$$

$$K_{ic} = 0.0084 \cdot \left(\frac{E}{H}\right)^{0.4} \cdot \left(\frac{2P}{\Delta l}\right) \cdot \left(\frac{1}{c^{0.5}}\right) \quad (7)$$

## İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmadan elde edilen veriler SPSS 20.0 programına (IBM, Armonk, New York, ABD) aktarıldı. Grupların normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile tespit edildi. Gruplar arasında gerilme, gerinim, sertlik, elastisite modülü, akma dayanımı, kırılma dayanımı ve elastik toparlanma yüzdeleri açısından fark olup olmadığı Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testleri ile, mine ve dentin gruplarının zamana bağlı değişimi ise Wilcoxon Sum Rank Testi ile incelenmiştir ( $\alpha = 0.01$ ).

## BULGULAR

Çalışmamızda nanoindentasyon yöntemi ve ilgili yazılım kullanılarak tüm gruplara ait örneklerden elde edilen gerilme ve gerinim, elastisite modülü ve toparlanma yüzdesi, dinamik ve indentasyon sertliği, akma dayanımı ve kırılma tokluğu değerleri Tablo-1'de verilmiştir.

### Gerilme (Stress) ve Gerinim (Strain) Değerleri

Bulgularımıza göre sağlıklı minenin ortalama gerilme değeri  $0.435 \pm 0.044$  GPa, gerinim değeri ise  $\% 0.53 \pm 0.004$  tür. Sağlıklı dentinin gerilme değeri ortalama  $0.139 \pm 0.021$  GPa, gerinim değeri ise  $\% 0.71 \pm 0.005$  olarak tespit edilmiştir. Demineralize mine dokusunda gerilme değerlerinde  $\%35$  ve demineralize dentin dokusunda  $\% 55$  azalma gözlenmiştir ( $p < 0.01$ ). Çürük lezyonu örneklerinde ise gerilme değerlerinde yaklaşık  $\% 80-90$  oranında düşüş ( $\sigma = 0.04 \pm 0.01$  Gpa) izlenmektedir ( $p < 0.01$ ). Gerinim değerleri incelendiğinde, sağlıklı dokulara kıyasla çürük lezyonunun olduğu mine ve dentinde ortalama 2.5 kat artış saptanmıştır ( $p < 0.01$ ).

### Elastisite Modülü Değerleri ve Elastik Toparlanma Yüzdeleri

Çalışmamızda minenin ortalama elastisite modülünün ortalama  $82.57 \pm 2.42$  GPa ve elastik toparlanma yüzdesinin  $\% 16$  olduğu tespit edilmiştir. Dentin dokusunda ise elastisite modülü ortalama  $19.62 \pm 1.56$  GPa ve elastik toparlanma  $\% 39.8$  olarak bulunmuştur. Sağlıklı mineden, demineralizasyonun başlayarak beyaz nokta lezyonunun geliştiği ( $E = 14.73 \pm 1.56$  GPa,  $E_{rr} = \%46.3$ ) ve çürük lezyonunun olduğu ( $E = 2.94 \pm 0.84$  GPa,  $E_{rr} = \%52.7$ ) noktaya kadar dokunun elastisite modülü değerlerinde istatistiksel düzeyde anlamlı fark izlenirken ( $p < 0.01$ ), elastik toparlanma değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.01$ ).

**Tablo 1.** Çalışmadaki gruplara ait; gerilme ( $\sigma$ ), gerinim ( $\varepsilon$ ), elastisite modülü ( $E$ ), ve elastik toparlanma ( $E_{rr}$ ), dinamik sertlik (DHV), indentasyon sertliği ( $H$ ), akma dayanımı ( $\vartheta$ ) ve kırılma tokluğu ( $K_c$ ) değerleri

	<i>Mine Dokusu</i>	<i>Deminerale Mine (Beyaz Nokta Lezyonu)</i>	<i>Mine Çürüğü</i>	<i>Dentin Dokusu</i>	<i>Deminerale Dentin</i>	<i>Dentin Çürüğü</i>
<i>GERİLME (GPa)</i>	0.44 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.04 + 0.01 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.02	0.06 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.004 <sup>a</sup>
<i>GERİNİM (%)</i>	0.53 ± 0.004 <sup>b</sup>	1.26 ± 0.007	1.92 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.71 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.002 <sup>b</sup>	1.92 ± 0.003 <sup>c</sup>
<i>ELASTİSİTE MODÜLÜ (GPa)</i>	82.57 ± 2.42	14.73 ± 1.80 <sup>d</sup>	2.94 ± 0.84 <sup>e</sup>	19.62 ± 1.56 <sup>d</sup>	9.33 ± 0.52	1.49 ± 0.20 <sup>e</sup>
<i>ELASTİK TOPARLANMA (%)</i>	16.00 ± 1.27	46.30 ± 4.97 <sup>f</sup>	52.71 ± 3.07	39.77 ± 4.76	47.56 ± 6.17 <sup>f</sup>	63.26 ± 10.06
<i>DİNAMİK SERTLİK (DHV)</i>	181.48 ± 12.06	15.65 ± 1.83	2.17 ± 0.42 <sup>g</sup>	69.82 ± 4.38	6.34 ± 0.92	1.12 ± 0.06 <sup>g</sup>
<i>İNDENTASYON SERTLİĞİ (GPa)</i>	3.24 ± 0.40	0.29 ± 0.03 <sup>h</sup>	0.04 ± 0.004 <sup>i</sup>	1.27 ± 0.20	0.12 ± 0.02 <sup>h</sup>	0.02 ± 0.003 <sup>i</sup>
<i>AKMA DAYANIMI (GPa)</i>	0.21 ± 0.04 <sup>j</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>j</sup>	0.03 ± 0.003 <sup>k</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>l</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>l</sup>	0.02 ± 0.003 <sup>k</sup>
<i>KIRILMA TOKLUĞU (MPa / m<sup>-1/2</sup>)</i>	1.06 ± 0.09	1.57 ± 0.31	2.97 ± 1.45 <sup>m</sup>	1.80 ± 0.10	2.07 ± 0.44	3.17 ± 0.15 <sup>m</sup>

\* Aynı harfli üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı olmayan farklara işaret etmektedir.

Sağlıklı dentin ile demineralize dentin ( $E = 9.33 \pm 0.52$  GPa,  $E_{rr} = \% 47.6$ ) ve çürük dentin dokusu ( $E = 1.49$  GPa  $\pm 0.19$ ,  $E_{rr} = \% 63.3$ ) arasında elastisite modülü ve elastik toparlanma değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). BNL ve demineralize dentin dokusu arasında elastik toparlanma açısından fark bulunmamıştır ( $p > 0.01$ ).

#### Dinamik Sertlik ve İndentasyon Sertliği Değerleri

Mine dokusunun dinamik sertlik değerinde ( $181.48 \pm 12.06$  DHV) demineralizasyon sonucunda % 90.1 ve indentasyon sertliği değerinde ise ( $H = 3.24 \pm 0.40$  GPa) % 89.8 oranında azalma tespit edilmiştir. Sağlıklı mine ve BNL arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). Benzer olarak dentinin dinamik sertlik ve indentasyon sertlik değerleri demineralizasyon ile birlikte azalarak, demineralize dentinde (DHV = % 90.9,  $H = \% 90.8$ ) ve dentindeki çürük lezyonunda (DHV = % 98.4,  $H = \% 98.5$ ) istatistiksel olarak anlamlı düşüşler göstermiştir ( $p < 0.01$ ).

Mine ve dentin dokularında kavitasyon yaratan çürük lezyonlarının sertlik değerleri karşılaştırıldığında; minedeki çürüğün hem dinamik sertlik (% 193), hem de indentasyon sertliği (% 211) açısından dentindeki çürük lezyonundan yaklaşık 2 kat daha sert olduğu belirlenmiştir.

#### Akma Dayanımı ve Kırılma Tokluğu Değerleri

Sağlıklı minenin akma dayanımı ( $\vartheta = 0.21 \pm 0.04$  GPa) ile BNL 'nin akma dayanımı ( $\vartheta = 0.19 \pm 0.02$  GPa) arasındaki fark anlamlı değil iken ( $p > 0.01$ ), mine çürüğünde ( $\vartheta = 0.03 \pm 0.003$  GPa) tespit edilen akma dayanımının sağlıklı ve demineralize mine dokularından anlamlı düzeyde düşük olduğu hesaplanmıştır ( $p < 0.01$ ).

Sağlıklı dentinin akma dayanımı ( $0.08 \pm 0.01$  GPa) ile, demineralize dentinin akma dayanımı ( $0.07 \pm 0.01$  GPa) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı hesaplanmamıştır ( $p > 0.01$ ). Fakat ilerlemiş dentin çürüğünde akma dayanımı, ( $0.02 \pm 0.003$  GPa) sağlıklı ve demineralize diş dokularından anlamlı düzeyde farklı belirlenmiştir ( $p < 0.01$ ). Sağlıklı mine ve dentin örnekleri arasında ve demineralize dokular arasında istatistiksel fark gözlenmekle beraber ( $p < 0.01$ ), ilerlemiş çürük lezyonu bulunan mine ve dentin dokuları benzer özellikler sergilemiştir ( $p > 0.01$ ).

Sağlıklı mine ve dentin dokularında demineralizasyonla birlikte mekanik olarak yumuşama ve esneme belirlenmiştir. Kırılma tokluğu değerlerinin ise demineralizasyon ilerledikçe arttığı gözlemlenmiştir. ( $p < 0.01$ ).

#### TARTIŞMA

Çalışmamızda sağlıklı diş dokularının çeşitli etkenlerle demineralizasyona uğrayarak zayıflaması ve çürük lezyonu oluşuncaya kadar geçen evrelerdeki mekanik özelliklerinde meydana gelen değişimleri incelenmiştir. Literatürde yer alan bilgilerin de kıyaslandığı çalışmamızda sağlıklı mine ve dentin dokuları ile demineralize mine (beyaz nokta lezyonu) ve demineralize dentin dokuları arasında fark olduğu tespit edilmiş ve başlangıç hipotezimiz kısmi olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte mine ve dentinde oluşan çürük lezyonlarının mekanik özelliklerinin büyük oranda benzerlikler göstermektedir. Böylelikle de sağlıklı mine dokusundan çürük lezyonuna geçişte mekanik özelliklerde daha fazla düşüş yaşandığı tespit edilmiştir. Böylelikle de başlangıç hipotezimizin dentinde daha fazla yıkım olacağı yönündeki bölümü reddedilmiştir.

Diş dokularının mekanik özelliklerinin incelenmesinde mikrosertlik ölçümü, üniversal test cihazı, dijital ortamda modelleme, özel geliştirilen aşındırma cihazları kullanılmaktadır.<sup>2,5,25,26</sup> Farklı test metodlarının kullanıldığı çalışmalarda, çalışma standartlarının sağlanamamasına bağlı olarak sonuçlarda farklılıklar, bulguların incelenmesi ve karşılaştırılmasında subjektif değerlendirmelerden kaynaklı bazı sınırlamalar oluşabilmektedir.<sup>23</sup> Nano test yöntemlerinde ise, ölçümlerin dijital ortamda yapılması ve sonuçların ilgili yazılımlar ile elde edilmesi objektif değerlendirmelere, daha anlamlı sonuçların elde edilmesine ve sert diş dokularındaki mineral yoğunluğuna bağlı olarak ilgili dişlerin haritalandırılmasına olanak sağlamaktadır.<sup>27,28</sup> Ayrıca nanoindentasyon yönteminde küçük boyutta örnekler ile çalışılabilme kolaylığı, uygulanan kuvvetin mikro ve nano düzeyde olması ve mekanik özelliklerin daha az girişimsel olarak ölçülebilmesi önemli avantajlardır.<sup>14</sup> Bu yöntem ile sertlik, elastisite modülü, kırılma tokluğu, akma dayanımı gibi birkaç özelliğin tek bir ölçümle hesaplanmasının yanı sıra tekrarlanabilir ölçümler de yapılabilmektedir.<sup>14,29</sup> Bu nedenlerden dolayı çalışmamızı nano test yöntemleri kullanarak gerçekleştirmiş bulunmaktayız.

Sağlıklı mine dokusunda yapılan çalışmalarda; Habelitz ve ark. yaptıkları nanoindentasyon çalışmalarında elastisite modülünü  $E=87.5 \pm 2.2$  GPa ve sertlik değerini  $H=3.6 \pm 0.3$  GPa, Angker ve ark. ise elastisite modülünü  $E=90.5 \pm 6$  GPa ve sertliğini  $H=3.78 \pm 0.35$  GPa ve Mahoney ve ark. elastisite modülünü  $E=86.5 \pm 7.5$  GPa ve sertlik değerlerini  $H=3.99 \pm 0.76$  GPa olduğunu bulmuşlar, değerlerin birbirleriyle uyumlu ve standart sapmaların düşük olduğunu belirtmişlerdir.<sup>8,14,21,30</sup> Bizim çalışmamızda da sağlıklı mine dokusunun, elastisite modülünün  $E=82.57 \pm 2.42$  GPa ve sertlik değerinin  $H= 3.24 \pm 0.40$  GPa olduğunu tespit ettik. Sonuçlarımız Habelitz, Angker, Mahoney ve ark. yaptıkları çalışmalarda uyumludur.

Akma dayanımı ve kırılma dayanımının ölçülmesinde en temel ve parametre örneklerin standart olarak hazırlanmasıdır. Uygulanan kuvvetten bağımsız olarak standart örneklerde belirli bir noktadan yapılan ölçümler sonucunda sağlıklı ve tekrarlanabilir sonuçlara ulaşılabilmektedir. Bu özelliklerin ölçüleceği alanların heterojen örneklerde standardize edilmesi zor olduğu için, akma dayanımı ile ilgili diş dokuları üzerinde yapılan çalışmalar sınırlıdır.<sup>31,32</sup> He'in yaptığı çalışmada elde ettiği değerler ( $\sigma_y = 0.33 \pm 0.08$  GPa) ile bizim çalışmamızdaki bulgularımızla ( $\sigma_y = 0.21 \pm 0.04$  GPa) uyumludur.<sup>31</sup> Sağlıklı mine dokusunun kırılma tokluğunun incelendiği çalışmalarda örnek standardizasyonunun sonuçları direkt olarak etkilediği bildirilmiştir.<sup>33,34</sup> Çalışmamızda mine dokusuna ait kırılma tokluğu değerinin ( $K_c=1.06 \pm 0.09$  MPa /m<sup>1/2</sup>) bu özellik için literatürde bildirilen değer limitleri arasında yer aldığı tespit edilmiştir. Bulgularımızın He 'nin yaptığı çalışma ile uyumlu olmasını ölçüm alanlarının benzer

noktalardan seçilmiş olmasına bağlamaktayız.

Dentinde yer alan tübüllerinin sayısının, diziliminin ve düzeninin ayrıca uygulanan kuvvetin bu tübüllere olan doğrultusunun mekanik özelliklerin belirlenmesine etkisi olduğu düşünülmektedir.<sup>6,35</sup> Dentin içerisinde mine-dentin sınırından pulpaya doğru yaklaştıkça, penetrasyon değerlerinde artış, sertlik ve elastisite modülü değerlerinde azalmanın gözlenmesi doğaldır. Yapılan çalışmalarda sağlıklı dentin dokusunun sertlik değerleri;  $H=1.15 \pm 0.12$  GPa ve elastisite modülü değerleri  $E=24.38 \pm 2.30$  GPa olarak belirlenmiştir.<sup>5,6,8,14,21,36</sup> Bizim çalışmamızda dentinin sertlik değeri  $H=1.27 \pm 0.20$  GPa ve elastisite modülü değeri  $E=19.62 \pm 1.56$  GPa olarak bulunmuştur. Bu sonuç Poolthong, Toparlı ve Mahoney' in çalışmaları ile uyumludur.<sup>16,21,25</sup> Ancak çalışmada elde ettiğimiz değerler De Luis, Angker ve Inoue' nin çalışmalarından yüksek çıkmıştır.<sup>5,8,14,36</sup> Bunun nedeni olarak, bazı çalışmalarda ölçümler için düşük kuvvetlerin uygulanmasının veya dişlerin otoklavda bekletilmesi sonucu dehidratasyona uğramalarının bu farklılığa sebep olduğunu düşünmekteyiz.

Literatürde farklı sertlikteki dentin dokularının akma dayanımı incelendiği sınırlı sayıda çalışmada elde edilen ortalama akma dayanımı değerleri benzerlikler göstermektedir.<sup>16,25,37</sup> Bu sonuçlar ile çalışmamızda elde ettiğimiz akma dayanımı değerleri ( $\sigma_y=0.8 \pm 0.1$  GPa) incelendiğinde, sonuçlarımızın uyumlu olduğunu tespit etmiş bulunmaktayız. Akma dayanımı gibi dentinin kırılma tokluğunun incelendiği çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmalardan Imbeni ve ark.,<sup>38</sup> Iwamoto ve ark.,<sup>39</sup> ve Yan ve ark.<sup>40</sup> yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri değerler çalışmamızdaki bulgularımızla ( $K_c= 1.79 \pm 0.1$  MPa /m<sup>1/2</sup>) uyumludur. Bu uyumun nedeni olarak; sağlıklı mine ve dentin dokularının demineralize ve çürük dokulara kıyasla daha homojen yapıda olması nedeniyle akma ve kırılma dayanımlarının uygulanan kuvvetten bağımsız olarak daha düşük standart sapmalarla ölçülmesinin mümkün olmasına bağlamaktayız.

Sağlıklı diş dokuları üzerine yapılan son dönem nanoindentasyon çalışmalarında diş dokularının fiziksel özelliklerinin ve çeşitli ağız içi şartlarında gösterdiği mekanik davranışların daha net kavranabilmesi amaçlanmıştır.<sup>11,22</sup> Bu sayede diş dokuları hakkında daha kesin bilgiler elde edilerek demineralizasyon ve çürük gibi kimyasal süreçler hakkında daha fazla fikir sahibi olmak hedeflenmektedir.<sup>9,18,41</sup> Diş çürüğü, mine ve dentin dokularının bozulmasından kaynaklı bir süreç olmasından dolayı, lezyonun tam boyutlarının ve aktifliğinin tespitinin zor olmasına yol açmakta bu nedenle birçok çalışmada örneklerinin standardizasyonu için yapay çürük oluşturma yöntemlerinin tercih edilmektedir. Bu sebeple literatürde gerçek çürük lezyon üzerinde yapılan çalışma sayısı oldukça azdır.<sup>9,11,12,21,42</sup>

Minede demineralizasyon hidroksiapatit (HAP) kristallerinin hem çevresinden hem de merkezinden başlayan çözümler ile ortaya çıkar.<sup>43</sup> Ancak demineralizasyon



yonun ilerlemesi ile birlikte, çözünen HAP kristallerinin içindeki boşluklara su ve çözülmüş iyonlar dolar ve daha fazla çözünmeye karşı dirençli hale gelirler.<sup>44</sup> Bu nedenle, HAP kristalleri genellikle tamamen çözünmez ve birbirinden ayrılmaz çünkü onları bir arada tutan ince protein 'matris' aside karşı dirençlidir, böylece apatit kristalitlerinin dış yüzeyini korur.<sup>9</sup> Sonuç olarak, demineralize olmuş ve beyaz nokta lezyonları şeklinde madde kaybı yaşanan mine dokusu, sağlıklı mineye kıyasla daha fazla içi boş gözenekli HAP kristalleri içerdiğinden yapısal olarak daha zayıf hale gelir. Doğal BNL ile karşılaştırıldığında, yapay BNL'larında genellikle remineralizasyonun gerçekleşmediği, demineralizasyonun daha küçük alanlarda yoğunlaştığı ve eşit kalınlıkta (100-300 µm) olduğu tespit edilmiştir.<sup>9</sup> Ancak, yapılan çalışmalarda doğal BNL örnekleri arasında nispeten büyük farklılıklar olduğu ( $E = 70.4-89.7$  GPa ve  $H = 3.37-4.80$  GPa) ve testin uygulandığı alanda meydana gelen remineralizasyon miktarının sonuçları doğrudan etkilediği bildirilmiştir.<sup>9</sup> Yapay BNL'ları üzerinde yapılan mikro mekanik testlerde, yüzey sertliğinin 0.13-1.44 GPa ve elastisite modülünün 14-34.4 GPa arasında olduğu rapor edilmiştir.<sup>9,45</sup> Elde edilen bu değerler, bizim çalışmamızda tespit edilen sertlik ( $H = 0.29 \pm 0.03$  GPa) ve elastisite modülü ( $E = 14.73 \pm 1.56$  GPa) sonuçlarıyla da tutarlıdır.

Çürük lezyonunun mekanik özelliklerinin incelendiği nanoindentasyon çalışmalarında çürük lezyonunun tabakalarının özelliklerinin farklı olması ve incelenecek alanın hangi tabakada olduğunun tespitinin zor olması nedeniyle mekanik özellikler ( $H = 0.1 - 1.4$  GPa ve  $E = 0.5 - 6$  GPa) geniş aralıklarda ölçülmüştür.<sup>9,12,21,46</sup> Bizim çalışmamızda çürük lezyonunun sertlik değeri  $H = 0.2 \pm 0.02$  GPa ve elastisite modülü değeri  $E = 1.49 \pm 0.2$  GPa olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Mahoney ve Huang'ın yaptığı çalışmalarla uyumludur, ancak Marshall ve ark. yaptığı çalışmaya kıyasla düşüktür.<sup>9,21,42</sup> Bunun nedeni olarak Marshall'ın araştırmasında, çalışmamızdan farklı olarak dişlerin sagittal düzlemde kesilerek hazırlandığı ve tüm çalışma süresince farklı bir solüsyonda bekletilmelerinden kaynaklandığı görüşündeyiz.<sup>42</sup> Çalışmamızda çürük lezyonunun dinamik sertlik değerinin  $1.20 \pm 0.06$  DHV olduğunu, akma dayanımı değerinin  $\sigma_y = 0.02 \pm 0.003$  GPa ve kırılma tokluğu değerinin  $K_{IC} = 3.17 \pm 0.16$  MPa /m<sup>1/2</sup> olduğu tespit edilmiştir. Literatürde çürük lezyonunun akma ve kırılma dayanımı değerlerinin incelendiği araştırma olmamasından dolayı çalışmamızı diğer çalışmalar ile kıyaslamak konusunda zorlanmaktayız.

Yakın zamanda, nano-indentasyon yöntemiyle doğal BNL'ları ve çürük lezyonları üzerinde yapılan bu çalışmalarda, mekanik özelliklerin birçok farklı

faktörden etkilendiği belirtilmiştir.<sup>9,11</sup> Bu faktörlerin başında; örneklerin biyokimyasal içeriklerindeki iyon farklılıklarının, test edilen örneklerdeki prizmaların ve tübüllerin doğrultu farklılıklarının, test alanının anatomik konumunun, örneklerin hidrasyon durumunun ve kullanılan test yükünün olduğu bildirilmiştir.<sup>47</sup> Cuy ve ark. ise demineralize diş örneklerinde, ölçüm yapılan bölgenin altında yer alan mine ve dentin dokusunun mekanik özelliklerinin sonuçları doğrudan etkileyebileceğini bu nedenle ölçümlerin lezyon gövdesine yakın bölgelerden yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.<sup>28</sup> Çalışmamızda histolojik olarak, ölçüm alanları, lezyon kesitlerini gösteren SEM görüntülerinden de görüleceği üzere lezyon merkezine yakın alanlardan seçilmiştir.

Çalışmamızda dental dokular ve çürük lezyonunun mekanik özelliklerinin birbirinden farklı çıkması, sağlıklı halden çürük hale geçişte dokuların bütünlüğünün ve dayanıklılığının oldukça yüksek oranda etkilendiğini göstermektedir. Yumuşak yapıdaki çürük lezyonunun, sağlıklı dokular kadar rijit olmayıp kuvvet altında daha fazla esneklik gösterdiği, minenin dentine kıyasla daha rijit ve kırılğan olduğu sonucuna varılmıştır.

## SONUÇLAR

Araştırmamızda test edilen gruplardaki örneklerden elde edilen veriler ve standart sapmalar göz önüne alınarak yapılan grup içi istatistiksel değerlendirmelerde her bir grup içinde standart sapmalar arasındaki farkların oldukça düşük olması, nanoindentasyon yönteminin diş dokuları ve dental materyallerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde güvenle kullanılabilmesini ve yöntemin yeteri kadar etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda sağlıklı mine dokusunun sertlik, gerilme, elastisite modülü, akma dayanımı, kırılma tokluğu ve elastik toparlanma değerlerinin beklendiği üzere sağlıklı dentin dokusundan yüksek bulunmuştur.

Demineralize mine ve dentin dokuları arasında elastisite ve elastik toparlanma değerleri hariç elde edilen istatistiksel farklılıkların, demineralize alanların altındaki sağlam diş sert dokularının etkisi sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Çürük lezyonunun ise ister minede ister dentin de oluşsun tüm mekanik özellikler açısından benzer olduğu, sağlıklı diş sert dokularına kıyasla ise oldukça elastik ve yumuşak kıvamlı bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Lezyonun stabil olmayan yapısı ve sergilediği viskoelastik davranış sebebiyle çürük dokusunun kırılma tokluğu, gerinim ve elastik toparlanma değerlerinin yüksek çıkmasına neden olduğu görüşündeyiz.

**KAYNAKLAR**

1. Cengiz, T. Endodonti. 4. Baskı, Barış Yayınları, İzmir, 1996, 49-85.
2. Craig RG, Peyton FA. The microhardness of enamel and dentin. *J Dent Res* 1958; 37: 661-8.
3. Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arch Oral Bio* 2001; 46: 173-83.
4. Bertassoni LE, Orgel JP, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater* 2012; 8: 2419-33.
5. Giráldez de Luis I, Garrido MA, Gómez-del Río T. Comparison of the mechanical properties of dentin and enamel determined by different nanoindentation techniques: conventional method and continuous stiffness measurement. *Bol Soc Esp Ceram* 2010; 49: 177-82.
6. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Bio Med* 2003; 14: 13-29.
7. Ang SF, Scholz T, Klocke A, Schneider GA. Determination of the elastic/plastic transition of human enamel by nanoindentation. *Dent Mat* 2009; 25: 1403-10.
8. Angker L. Micro-mechanical characterization of the properties of sound and carious primary dentine. University of Sydney, Australia. 2003. PhD Thesis
9. Huang TTY, He LH, Darendeliler MA, Swain MV. Nano-indentation characterisation of natural carious white spot lesions. *Caries Res* 2010; 44: 101-7.
10. Pashley DH, Agee KA, Wataha JC, et al. Viscoelastic properties of demineralized dentin matrix. *Dent Mater* 2003; 19: 700-6.
11. Sadyrin E, Swain M, Mitrin B, Rzhepakovsky I, Nikolaev A, Irkha V. Characterization of enamel and dentine about a white spot lesion: mechanical properties, mineral density, microstructure and molecular composition. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10:1889.
12. Ebenstein D, Pruitt L. Nanoindentation of biological materials. *Nano Today* 2006;1:26-33.
13. Habelitz S, Marshall GW, Balooch M, Marshall SJ. Nanoindentation and storage of teeth. *J Biomech* 2002; 35: 95-8.
14. Angker L, Swain MV, Kilpatrick N. Characterising the micro-mechanical behaviour of the carious dentine of primary teeth using nano-indentation. *J Biomech* 2005; 38: 1535-42.
15. Wolf B. Inference of mechanical properties from instrumented depth sensing indentation at tiny loads and indentation. *Depths Cryst Res Technol* 2000; 35: 377-99.
16. Toparlı M, Köksal NS. Hardness and yield strength of dentin from simulated nano-indentation tests. *Comp Meth Prog Biomed* 2005; 77: 253-7.
17. Hosoya Y, Marshall GW. The nano-hardness and elastic modulus of sound deciduous canine dentin and young premolar dentin: Preliminary study. *J Mater Sci* 2005; 16: 1-8.
18. Sakoolnamarka R, Burrow MF, Swain M, Tyas MJ. Microhardness and Ca:P ratio of carious and Carisolv™ treated caries-affected dentine using an ultra-micro-indentation system and energy dispersive analysis of x-rays – A pilot study. *Austr Dent Journal* 2005; 50:246-50.
19. Lippert F, Parker D, Jandt K. In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. *J Col Inter Sci* 2004; 280:442-8.
20. Oyen ML, He LH, Swain MV. Handbook of Nanoindentation: With Biological Applications. 1st Ed., Pan Stanford Publishing, ABD, 2010, 123-85.
21. Mahoney EK, Holt A, Swain MV, Kilpatrick N. The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth: an ultra-micro-indentation study. *J Dent* 2000; 28: 589-94.
22. Al-Obaidi R, Salehi H, Desoutter A, Chemical & nano-mechanical study of artificial human enamel subsurface lesions. *Sci Rep* 2018; 8: 4047.
23. Oliver WC, Pharr GM. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding of methodology. *J Mater Res* 2004; 19: 3-20.
24. Zmak I, Ćorić D, Mandić V, Ćurković L. Hardness and indentation fracture toughness of slip cast alumina and alumina-zirconia ceramics. *Materials* 2020; 13: 1-17.
25. Poolthong S. Characterization of the mechanical properties of enamel, dentine and cementum by an ultra micro-indentation system. University of Sydney, Australia. 1998, PhD Thesis.
26. Zhang YR, Du W, Zhou XD, Yu H. Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *Inter J Oral Sci* 2014; 6: 61-9.
27. Gallagher RR, Balooch M, Balooch G, Wilson RS. Coupled nanomechanical and raman microspectroscopic investigation of human third molar. *J Dent Biomech* 2010; 2010: 256903.
28. Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Arch Oral Bio* 2002; 47: 281-91.
29. Zhou J, Hsiung LL. Depth dependence of the mechanical properties of human enamel by nanoindentation. *J Biomed Mater Res Part A* 2006; 81: 66-74.

30. Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 173-83.
31. He LH. Mechanical behaviour of human enamel and the relationship to its structural and compositional characteristics. University of Sydney, Australia, 2008, PHD Thesis.
32. Staines M, Robinson WH, Hood JAA. Spherical indentation of tooth enamel. *J Mater Sci* 1981; 16:2551-6.
33. Bajaj D, Arola D. On the R-curve behavior of human tooth enamel. *Biomaterials* 2009; 30: 4037-46.
34. Padmanabhan SK, Balakrishnan A, Chub MC, Kima TN, Chob SJ. Micro-indentation fracture behavior of human enamel. *Dent Mater* 2010; 26: 100-4.
35. Han CF, Wu BH, Chung CJ. Stress-strain analysis for evaluating the effect of the orientation of dentin tubules on their mechanical properties. *J Mech Behav Biomed Mater* 2012; 12: 1-8.
36. Inoue T, Saito M, Yamamoto M, Debari K, Kou K, Nishimura F. Comparison of nanohardness between coronal and radicular intertubular dentin. *Dent Mater J* 2009; 28: 295-300.
37. Ichim I, Li Q, Li W, Loughran J, Swain MV, Kieser J. Modelling of fracture behaviour in biomaterials. *Biomaterials* 2007; 28; 1317-26.
38. Imbeni V, Nalla RK, Bosi C, Kinney JH, Ritchie O. In vitro fracture toughness of human dentin. *J Biomed Mater Res* 2003; 66(A): 1-9.
39. Iwamoto N, Ruse D. Fracture toughness of human dentin. Wiley Periodicals Inc. 2003:507-12.
40. Yan J, Taskonak B, Mecholsky JJ. Fractography and fracture toughness of human dentin. *J Mech Behav Biomed Mater* 2009; 2: 478-84.
41. Pashley DH, Agee KA, Carvalho R, Lee K, Tay F, Callison T. Effects of water and water-free polar solvents on the tensile properties of demineralized dentin. *Dent Mater* 2003; 19: 347-52.
42. Marshall GW, Habelitz S, Gallagher R, Balooch M, Balooch G, Marshall SJ. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. *J Dent Res* 2001; 80: 1768-71.
43. Yanagisawa T, Miake Y. High-resolution electron microscopy of enamel-crystal demineralization and remineralization in carious lesions. *J Electron Microscop* 2003; 52: 605-13
44. Wang LJ, Tang RK, Bonstein T, Orme CA, Bush PJ, Nancollas GH. A new model for nanoscale enamel dissolution. *J Phys Chem B* 2005; 109: 999-1005.
45. Dickinson ME, Wolf KV, Mann AB. Nanomechanical and chemical characterization of incipient in vitro carious lesions in human dental enamel. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 753-60.
46. Pugach MK, Strother J, Darling CL, et al. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. *J Dent Res* 2009; 88; 71-9.
47. Braly A, Darnell LA, Mann AB, Teaford MF, Weihs TP. The effect of prism orientation in the indentation testing of human molar enamel. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 856-60.