

# 超短脉冲 Er: YAG 激光对提高牙本质粘结强度最佳脉冲宽度的研究

甄丹静, 夏荣, 徐基亮, 孙子环, 刘春, 余金兰

**摘要** 目的 探究超短脉冲 Er: YAG 激光对提高牙本质粘结强度的最佳脉冲宽度。方法 选取 50 颗离体的第三磨牙在颈部按楔状缺损形态制备, 取冠向面, 将样本随机分为 5 组, G0 组为空白对照组, G1 ~ G4 组, 使用 30 MJ 20 Hz Er: YAG 激光处理, 脉冲宽度分别设置为 30、40、50、60  $\mu\text{s}$ 。扫描电子显微镜 (SEM) 观察各组牙本质表面的形态学改变, 并通过能量色散 X 射线光谱 (EDX) 检测各组钙磷比。通过冷热循环实验, 以万能力学试验机测试各组剪切粘结强度 (SBS) 及体式显微镜下的断裂形式。评价不同脉宽值对提高牙本质粘结强度的影响。结果 SEM 观察牙本质表面经不同脉冲宽度激光处理后玷污层均去除, 牙本质小管有不同程度的开放, 经激光处理后牙本质表面钙磷比均上升, G2 组激光处理前后的钙磷比值变化差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。冷热循环实验后 SBS 平均值:  $G2 > G3 > G1 > G4 > G0$ , G2 组与 G0 组、G1 组、G3 组和 G4 组组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); G0 组与 G1 组、G2 组、G3 组和 G4 组组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。各组断裂形式主要为类型 1 和类型 3。结论 30 MJ 20 Hz Er: YAG 激光脉冲宽度设置为 40  $\mu\text{s}$  可显著提高牙本质的粘结强度。

**关键词** Er: YAG 激光; 超短脉冲; 牙本质粘结; 扫描电子显微镜

中图分类号 R 312; R 348.1; R 781.05

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-1056-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.031

Er: YAG 激光发射波长 2.94  $\mu\text{m}$  与羟基磷灰石中的水和羟基基团的最强吸收带之间的重合使 Er: YAG 激光发射的能量能很好地被牙体硬组织吸收, 使 Er: YAG 激光切割牙本质得以实现<sup>[1-2]</sup>。使用 Er: YAG 激光进行牙体预备可改变其化学成分比并提高牙本质粘结强度<sup>[3]</sup>。但切割过程会产生更高

的温度, 从而对牙本质表面造成热损伤, 可能会影响牙本质的粘结强度<sup>[4]</sup>。降低激光处理过程中产生的热损伤是近年来的研究重点, 而脉冲宽度是 Er: YAG 激光处理过程中降低热损伤非常重要的因素<sup>[5]</sup>。脉冲宽度越大, 切割过程中产生的热量就越大<sup>[6]</sup>。因此, 该研究使用一台超短脉冲模式的 Er: YAG 激光, 使脉冲宽度接近牙齿的热弛豫时间, 以探究此模式下的最佳脉冲宽度, 值得临床借鉴和参考。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** 超短脉冲模式 Er: YAG 激光器 (中国科学院合肥物质科学研究院健康与医学技术研究所研制); GeminiSEM 300 场发射扫描电子显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司); E3000 电子动静态疲劳试验机 (美国 Instron 公司); TC-501F 冷热循环机 (上海华邻实业有限公司); ESPE Single Bond 通用型粘结剂、Z350XT 光固化复合树脂 (美国 3M 公司); 离子溅射仪 (英国 Cressington 公司); CLEAN-Q2 超声波清洗机 (宁波蓝野医疗器械有限公司)。

**1.2 离体牙的收集** 收集安徽医科大学第二附属医院口腔科 2021 年 9—12 月因治疗需要拔除的第三磨牙, 患者年龄 30 ~ 60 岁, 要求牙冠完整, 活髓、无龋坏、无隐裂; 拔牙后, 用牙周刮治器刮除表面结石、软垢, 组织残留物 0.5% 氯胺溶液消毒 48 h 后, 置于生理盐水中 4  $^{\circ}\text{C}$  环境保存, 每 2 d 更换 1 次溶液。

## 1.3 试件的制备与分组

**1.3.1 试件的制备** 50 颗离体牙, 使用高速涡轮手机 TF-11 金刚砂车针冷却下在离体牙颊侧颈部沿釉牙骨质界向内制备深 5 mm、牙合龈高度 4 mm (使用牙周探针测量), 近远中贯通的 V 类洞型 (牙合壁与龈壁交角约为 60 $^{\circ}$ ), 沿着缺损的颊侧向舌侧延伸至冠根分离, 取冠向面处理, 将制备好的牙齿块包埋于高度 15 mm、直径 10 mm 的聚四氟乙烯模具中, 自凝树脂固定, 暴露牙颈部充填区。牙面采用 220、400、600 目水砂纸逐级抛光, 每个牙面 60 s, 以创建

2023-03-26 接收

基金项目: 国家重点研发计划项目 (编号: 2018YFB0407204); 医学物理与技术安徽省重点实验室开放基金资助项目 (编号: LMPT201707)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院口腔科, 合肥 230601

作者简介: 甄丹静, 女, 硕士研究生;

夏荣, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xiarongqh@aliyun.com

一个与临床相关的标准玷污层。使用 20 ℃ 超纯水超声荡洗 60 min, 取出试件置于生理盐水中, 备用。粘结石处理之后每个样本粘结石上固定直径 2 mm、高 4 mm 的圆柱形模具。

**1.3.2 实验设计与分组** 采用简单随机抽样, 将样本随机分为 5 组, G0 组为空白对照组, G1 ~ G4 组, 使用 30 MJ 20 Hz Er: YAG 激光处理, 脉冲宽度分别设置为 30、40、50、60  $\mu\text{s}$ 。每组随机抽取 2 个试件用于 SEM 观察, 其余试件进行冷热循环实验后用于 SBS 实验。将试件固定于 0.6 mm/s 二维速控平台上, 分别使用 30、40、50、60  $\mu\text{s}$  的 Er: YAG 激光处理, 同一位置处理 2 次。用三枪喷头冲洗 20 s, 使用通用性粘结石于牙面反复涂布 20 s, 轻轻吹匀, 光照 20 s。

**1.4 扫描电镜观察** Er: YAG 激光处理前各实验组随机抽取 2 个试件, 牙面继续采用水砂纸梯度抛光: 800、1 000、1 500、2 000 目, 便于在显微镜下更好的观察牙面变化。Er: YAG 激光处理后, 50%、70%、80%、90%、100% 梯度乙醇溶液脱水、固定, 临界点干燥, 喷金, 扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 观察分析处理后牙表面形貌特征变化。

**1.5 能量色散 X 射线光谱 (energy dispersive X-ray spectroscopy, EDX) 分析** EDX 借助分析样品发出的元素特征 X 射线的波长和强度测定元素的相对含量, 每组在电镜 3 000 倍下选取处理与未处理两处区域, 分别选取 3 点进行 EDX 分析, 记录数值并计算钙磷比值。

**1.6 冷热循环实验** 所有试件按组标记, 固定于摇臂上, 在温度设置 5、55 ℃ 水槽中各水浴 30 s 为一循环, 循环 5 000 次。

**1.7 剪切粘结石强度 (shear bond strength, SBS) 实验** 将制作好的力学试件, 固定于夹具中, 在距离粘结石面 1 mm 处, 万能力学试验机以 0.5 mm/min 的速度进行 SBS 测试, 记录剪切时的最大力值。将断裂后的试件在体式显微镜下观察断裂模式。断裂模式分为 3 类, 类型 1: 粘结石失败; 类型 2: 内聚失败; 类型 3: 混合失败。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 统计软件分析数据, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 利用 SNK 检验进行两两之间的比较, 组内钙磷比差异采用 *t* 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 牙本质表面形貌分析** SEM 显示激光处理后的牙本质表面均去除了玷污层, 牙本质小管呈不同程度的开放。未处理的牙面 (图 1) 可观察到抛光后留下的划痕, 划痕周围玷污层阻塞牙本质小管, 表面平坦; 脉宽为 30  $\mu\text{s}$  的 Er: YAG 激光处理后 (图 2), 牙本质小管形态隐约可见; 脉宽为 40  $\mu\text{s}$  的 Er: YAG 激光处理后 (图 3), 牙本质小管形态清晰可见, 小管完全开放, 管周牙本质突出, 与周围界限分明, 出现微裂纹; 脉宽为 50  $\mu\text{s}$  的 Er: YAG 激光处理后 (图 4), 表面胶原纤维坍塌, 出现轻微熔融现象, 牙本质小管部分被覆盖, 形态不明显, 与周围界限不清晰, 有轻微裂痕; 脉宽为 60  $\mu\text{s}$  的 Er: YAG 激光处理后 (图 5), 表面胶原纤维坍塌, 裂痕明显, 出现大面积熔融, 牙本质小管形态消失, 小管几乎全部覆盖。

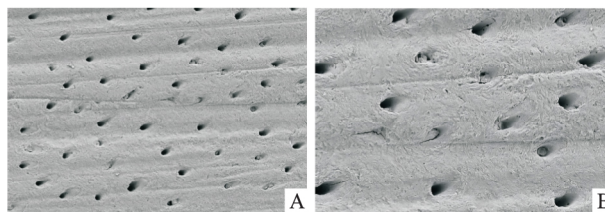


图 1 G0 组 2 000 目水砂纸抛光后电镜图

A: G0 组  $\times 1\ 500$ ; B: G0 组  $\times 3\ 000$

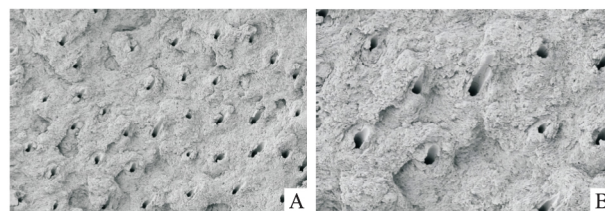


图 2 G1 组的 Er: YAG 激光组电镜图

A: G1 组的 Er: YAG 激光处理牙面  $\times 1\ 500$ ; B: G1 组的 Er: YAG 激光处理牙面  $\times 3\ 000$

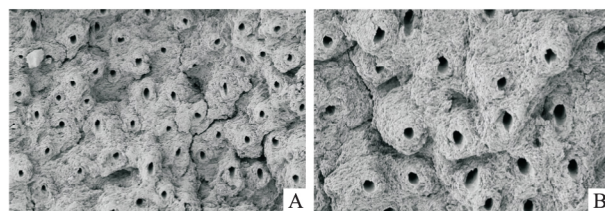


图 3 G2 组的 Er: YAG 激光组电镜图

A: G2 组的 Er: YAG 激光处理牙面  $\times 1\ 500$ ; B: G2 组的 Er: YAG 激光处理牙面  $\times 3\ 000$

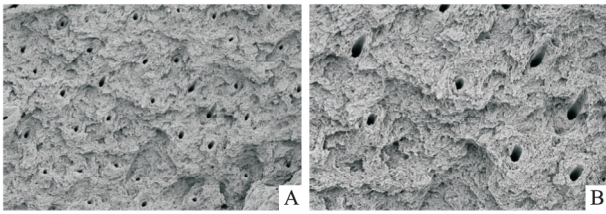


图4 G3组的Er:YAG激光组电镜图

A: G3组的Er:YAG激光处理牙面 ×1 500; B: G3组的Er:YAG激光处理牙面 ×3 000

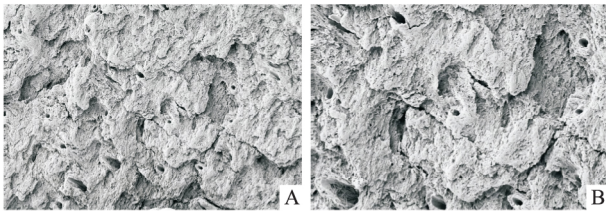


图5 G4组的Er:YAG激光组电镜图

A: G4组的Er:YAG激光处理牙面 ×1 500; B: G4组的Er:YAG激光处理牙面 ×3 000

2.2 牙本质表面钙磷比分析 Er:YAG 激光处理后,钙磷的平均重量百分比上升,且钙磷比增加,G2组激光处理前后的钙磷比值变化差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图6。

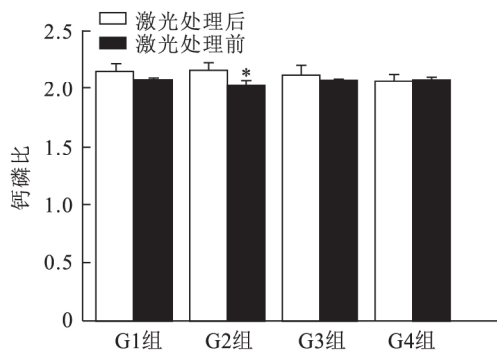


图6 各组钙磷比分析

与激光处理后比较: \*  $P < 0.05$

2.3 各组 SBS 比较 冷热循环实验后的各组 SBS 值见表1,采用单因素方差分析比较不同处理方式之间的差异,SBS 最大值在 G2 组,最小值在 G0 组,SBS 平均值  $G2 > G3 > G1 > G4 > G0$  其中,G1 组、G3 组和 G4 组之间的 SBS 平均值差异无统计学意义,G2 组与 G0 组、G1 组、G3 组和 G4 组组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );G0 组与 G1 组、G2 组、G3 组和 G4 组组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图7。

表1 各组经过冷热循环实验后的 SBS 比较( MPa)

组别	样本量	最小值	最大值	$\bar{x} \pm s$
G1	8	3.50	7.80	$5.23 \pm 1.32$
G2	8	7.10	14.20	$9.04 \pm 2.42$
G3	8	2.60	8.20	$5.50 \pm 2.08$
G4	8	2.60	8.10	$5.14 \pm 2.12$
G0	8	0.00	3.50	$2.05 \pm 1.38$
P 值	< 0.05			
F 值	6.892			

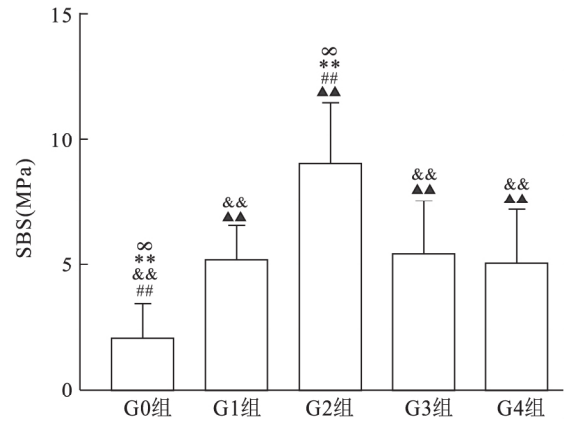


图7 各组 SBS 分析

与 G0 组比较: ▲▲  $P < 0.01$ ; 与 G1 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 G2 组比较: &&  $P < 0.01$ ; 与 G3 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 G4 组比较: \*  $P < 0.05$

2.4 界面破坏方式分析 SBS 实验后牙本质与树脂之间的断裂形式见表2,各组界面破坏方式主要以类型1为主,G1、G2、G3、G4 和 G0 组类型1 占比分别为 86.5%、75.0%、100.0%、100.0%、100.0%。

表2 粘结面断裂形式

组别	粘结失败	内聚失败	混合失败
G1	7	0	1
G2	6	0	2
G3	8	0	0
G4	8	0	0
G0	8	0	0

### 3 讨论

SBS 是最常用评估粘结效果的定量指标。SEM 可观察牙本质表面的微观形貌,并通过 EDX 检测牙本质表面钙磷比,为材料的粘结性能提供有效信息。冷热循环实验在温度设置 5、55 °C 水槽中各水浴 30 s 为一循环,循环 5 000 次可模仿口内充填物半年后的状态<sup>[7]</sup>。因此,为了检测口腔材料的长期稳定性,本研究通过冷热循环实验,模拟半年后充填物状态,粘结材料的粘结强度。

Aoki et al<sup>[8]</sup>描述了激光处理牙本质表面的微观形貌,管周牙本质呈袖口状外观,牙本质小管的开放是增强与激光处理的牙本质结合的重要因素,本研究中通过 SEM 观察结果与 Aoki et al<sup>[8]</sup>的研究结果相一致。牙本质的无机成分主要是羟基磷灰石中的钙和磷。Aljdaimi et al<sup>[9]</sup>研究表明 Er: YAG 激光照射牙本质后,其表面钙磷比增加可对充填材料的粘结强度产生积极影响,因为钙磷比的增加提高了充填材料和牙本质之间的化学键强度。使用超短脉冲 Er: YAG 处理牙本质时,钙磷比增加更加明显<sup>[3]</sup>。本研究中的 EDX 结果显示,G2 组牙本质激光处理后钙磷比增加,且与激光处理前差异有统计学意义;G1 组、G3 组和 G4 组激光处理后的钙磷比增加,与激光处理前的钙磷比差异无统计学意义。实验结果表明,冷热循环实验后 G2 组的 SBS 最大。此结果与 Aljdaimi et al<sup>[9]</sup>的研究结果一致,从钙磷比角度验证了脉冲宽度为 40  $\mu\text{s}$  时,可显著提高牙本质的 SBS。

在本研究中,在特定的脉冲宽度(40  $\mu\text{s}$ )时,SBS 明显高于其他组,增加或减小脉冲宽度均会降低 SBS;超过最佳脉冲宽度,会导致牙本质裂纹以及牙本质熔融,这些被认为是树脂突进入牙本质小管的限制因素,从而导致 SBS 值降低<sup>[10]</sup>。从断裂形式来看,断口的形成受粘结面积的影响,粘结面积越小,应力分布越均匀,粘结断裂的可能性越小<sup>[11]</sup>,越能够反映材料的真实粘结强度。

Karadas et al<sup>[12]</sup>比较了激光与高速涡轮机处理牙本质后与树脂之间的粘结稳定性,其结果显示:牙本质采用不同粘结方式,冷热循环实验后牙本质粘结强度无显著差异,建议使用自酸蚀粘结剂,因此本研究采用自酸蚀粘结系统。Akin et al<sup>[13]</sup>通过对激光切割牙体硬组织的粘接强度的研究发现,与 100  $\mu\text{s}$  的脉冲模式比较,50  $\mu\text{s}$  的超短脉冲激光切割模式能够较大提高粘接强度,有利于牙科后续治疗。Shinkai et al<sup>[14]</sup>认为需要准确选择激光脉冲持续时间,以限制整个牙本质照射过程中的不良影响。以上研究提示,Er: YAG 激光作用于牙面的效果与脉冲宽度有密不可分的关系,因此本研究使用了新的 Er: YAG 激光器,以探究超短脉冲宽度 Er: YAG 处理牙面的最佳脉冲宽度。

本研究是为了探讨在单独激光处理条件下的最佳参数,有研究证明引入酸蚀后可进一步提高粘结性能,可进一步实验进行论证。本研究存在一定的局限性,牙齿的病变情况无法在体外模拟,为了控制

变量,本研究统一选取牙颈部处的牙本质,牙齿其他部位的牙本质小管方向有差异,需进一步对不同部位牙本质以及更多的激光参数进行研究。

综上所述,Er: YAG 激光器操作简单、安全、微创,可有效去除玷污层,减轻患者痛苦。30 MJ,20 HZ,40  $\mu\text{s}$  的 Er: YAG 激光能够高效率的提高界面的粘结性能,对临床有一定的借鉴价值。

## 参考文献

- [1] Firat E, Gurgan S, Gutknecht N. Microtensile bond strength of an etch-and-rinse adhesive to enamel and dentin after Er: YAG laser pretreatment with different pulse durations [J]. *Lasers Med Sci*, 2012, 27(1): 15–21.
- [2] 刘芮, 夏荣, 肖楠楠, 等. Er, Cr: YSGG 激光处理技术对楔状缺损粘结面的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(10): 1646–50.
- [3] Moosavi H, Ghorbanzadeh S, Ahrari F. Structural and morphological changes in human dentin after ablative and subablative Er: YAG laser irradiation [J]. *J Lasers Med Sci*, 2016, 7(2): 86–91.
- [4] 江健涛, 魏蒙恩, 熊正东, 等. 子脉冲序列模式 Er: YAG 激光消融牙本质的实验观察 [J]. *中国激光*, 2021, 48(1): 151–7.
- [5] Lukac N, Suhovrnik T, Lukac M, et al. Ablation characteristics of quantum square pulse mode dental erbium laser [J]. *J Biomed Opt*, 2016, 21(1): 1–10.
- [6] Trevelin L T, Da S B, De Freitas P M, et al. Influence of Er: YAG laser pulse duration on the long-term stability of organic matrix and resin-dentin interface [J]. *Lasers Med Sci*, 2019, 34(7): 1391–9.
- [7] Li H, Burrow M F, Tyas M J. The effect of thermocycling regimens on the nanoleakage of dentin bonding systems [J]. *Dent Mater*, 2002, 18(3): 189–96.
- [8] Aoki A, Ishikawa I, Yamada T, et al. Comparison between Er: YAG laser and conventional technique for root caries treatment *in vitro* [J]. *J Dent Res*, 1998, 77(6): 1404–14.
- [9] Aljdaimi A, Devlin H, Dickinson M, et al. Effect of 2.94 microm Er: YAG laser on the chemical composition of hard tissues [J]. *Microsc Res Tech*, 2018, 81(8): 887–96.
- [10] Atalay C, Uslu A, Yazici A R. Does laser etching have an effect on application mode of a universal adhesive? –A microleakage and scanning electron microscopy evaluation [J]. *Microsc Res Tech*, 2021, 84(1): 125–32.
- [11] Phrukkanon S, Burrow M F, Tyas M J. The influence of cross-sectional shape and surface area on the microtensile bond test [J]. *Dent Mater*, 1998, 14(3): 212–21.
- [12] Karadas M, Caglar I. The effect of Er: YAG laser irradiation on the bond stability of self-etch adhesives at different dentin depths [J]. *Lasers Med Sci*, 2017, 32(5): 967–74.
- [13] Akin M, Veli I, Erdur E A, et al. Different pulse modes of Er: YAG laser irradiation: effects on bond strength achieved with self-etching

(下转第 1063 页)

- ant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(23): 7624–34.
- [12] Coati I, Lotz G, Fanelli G N, et al. Claudin-18 expression in oesophagogastric adenocarcinomas: a tissue microarray study of 523 molecularly profiled cases[J]. *Br J Cancer*, 2019, 121(3): 257–63.
- [13] Dottermusch M, Kruger S, Behrens H M, et al. Expression of the potential therapeutic target claudin-18.2 is frequently decreased in gastric cancer: results from a large caucasian cohort study[J]. *Virchows Arch*, 2019, 475(5): 563–71.
- [14] Oue N, Sentani K, Sakamoto N, et al. Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells[J]. *Int J Clin Oncol*, 2019, 24(7): 771–8.
- [15] Tsuda H H. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification in human breast cancer[J]. *Breast cancer*, 2001, 8(1): 38–44.
- [16] Luo G, Hu Y, Zhang Z, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of Ki-67 expression in patients with gastric cancer: a meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 50273–83.
- [17] Schirren R, Novotny A, Oesterlin C, et al. Significance of Lauren classification in patients undergoing neoadjuvant/perioperative chemotherapy for locally advanced gastric or gastroesophageal junction cancers—analysis from a large single center cohort in Germany[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(2): 290.
- [18] Jiménez Fonseca P, Carmona-Bayonas A, Hernández R, et al. Lauren subtypes of advanced gastric cancer influence survival and response to chemotherapy: real-world data from the Agamenon national cancer registry[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(6): 775–82.
- [19] 方艺, 张玉晶, 李 霖, 等. Lauren 分型与局部进展期胃癌术前放化疗后肿瘤病理反应相关性分析[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2020, 29(5): 349–53.
- [20] Hu S, Liu C, Wang X, et al. Pathological evaluation of neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric cancer[J]. *World J Surg Oncol*, 2019, 17(1): 3.
- [21] Yin X, Fang T, Wang Y, et al. Prognostic significance of serum inflammation indexes in different Lauren classification of gastric cancer[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(3): 1103–19.

(上接第 1059 页)

- primers[J]. *J Orofac Orthop* 2016, 77(3): 151–9.
- [14] Shinkai K, Takada M, Kawashima S, et al. Effects of the percentage

of air/water in spray on the efficiency of tooth ablation with erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet (Er,Cr:YSGG) laser irradiation[J]. *Lasers Med Sci* 2019, 34(1): 99–105.

## Study on optimal pulse width of ultra-short pulse Er: YAG laser for improving dentin adhesion

Zhen Danjing, Xia Rong, Xu Jiliang, Sun Zihuan, Liu Chun, Yu Jinlan

(Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To explore the optimal pulse width of ultra-short pulse Er: YAG laser for improving dentin bonding strength. **Methods** Forty isolated third molars were prepared in the shape of wedge defect in the neck and the coronal plane was taken. The samples were randomly divided into 5 groups: group G0 was blank group, and groups G1–G4 were treated with 30 MJ 20 Hz Er: YAG laser and the pulse width was set to 30, 40, 50 and 60  $\mu\text{s}$ , respectively. The morphology of dentin surface was observed by scanning electron microscopy (SEM) and the ratio of calcium to phosphorus was detected by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). The shear bond strength (SBS) of each group and the fracture form under the type microscope were tested by the universal mechanical testing machine. The effect of different pulse width on improving dentin bonding strength was evaluated. **Results** SEM observation showed that the stained layer was removed after laser treatment with different pulse widths and the dentin tubules were opened to different degrees. The calcium-phosphorus ratio of dentin after laser treatment increased, and the difference of calcium-phosphorus ratio in G2 group was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The mean value of SBS after the cold and hot cycle experiment was  $G2 > G3 > G1 > G4 > G0$  and the difference between G2 group and G0 group, G1 group, G3 group and G4 group are statistically significant ( $P < 0.05$ ). The difference between group G0 and groups G1, G2, G3 and G4 was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The main fracture forms of each group were type 1 and type 3. **Conclusion** The 30 MJ 20 Hz Er: YAG laser pulse width of 40  $\mu\text{s}$  can significantly improve the bond strength of dentin.

**Key words** Er: YAG laser; ultra-short pulse; dentin bonding; scanning electron microscopy