

تهیه باندینگ عاجی حاوی داکسی سایکلین به عنوان مهارکننده آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز و میزان رهایش آن

دکتر مریم قوام^۱ - دکتر سکینه آرامی^{۲+} - دکتر محمد رشاد^۳ - دکتر محمد ایمانی^۴ - دکتر محمد عطایی^۵ - دکتر منصوره میرزایی^۶

دکتر اسماعیل یاسینی^۶ - دکتر معصومه حسنی طباطبایی^۲ - دکتر ایوب پهلوان^۲ - دکتر حمید کرمانشاه^۲

۱- عضو مرکز تحقیقات دندانپزشکی و دانشیار گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی و زیبایی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

۲- استادیار گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

۳- متخصص دندانپزشکی ترمیمی

۴- استادیار گروه سامانه‌های نوین دارورسانی پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران

۵- استادیار گروه علوم پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران

۶- استاد گروه آموزشی ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

Title: Production of an experimental bonding agent containing doxycycline as matrix metalloproteinase inhibitor and its release rate

Authors: Ghavam M¹, Arami S², Reshad M³, Imani M⁴, Ataie M⁵, Mirzaei M², Yasini E⁶, Hasani Tabatabaie M², Pahlavan A², Kermanshah H²

1- Associate Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences

2- Assistant Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences

3- MSc. In Operative Dentistry

4- Assistant Professor, Department of Science, Novel Drug Delivery System, Iran Polymer and Petrochemical Institute

5- Assistant Professor, Department of Science, Polymer Science, Iran Polymer and Petrochemical Institute

6- Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences

Background and Aims: In spite of the advances achieved in the field of dentin adhesives, the longevity of bond to dentin is still a challenge. According to recent studies, Matrix Metalloproteinase (MMP) inhibitors can increase clinical longevity of bonding and decrease leakage. The aim of this study was to evaluate the amount and pattern of doxycycline release from an experimental dentin adhesive containing this MMP inhibitor.

Materials and Methods: In this experimental study, specimens containing 0.25 and 0.5 loading percent of doxycycline in an experimental monomer were prepared in cylindrical moulds of 12 mm diameter and 2 mm thickness. The adhesive monomer was composed of 12 wt% Bis-GMA, 10 wt% TMPTMA, 28 wt% HEMA and 50 wt% ethanol. Camphorquinone and amine were used as initiators.

Results: Addition of 0.25 and 0.5 w% doxycycline showed linear release in both groups. Increasing the loading percent of doxycycline caused more release. The release continued during the test period.

Conclusion: Doxycycline release was observed from the experimental adhesive. Further studies in this field will help in preparing adhesive systems with more clinical longevity.

Key Words: Dentin adhesives; Doxycycline; MMP inhibitor; Release

چکیده

زمینه و هدف: علیرغم پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه ادهزیوهای عاجی، هنوز مقاومت، دوام و پایداری باند به عاج چالشی است که با آن مواجه هستیم. بر مبنای مطالعات اخیر به نظر می‌رسد بررسی نقش مهارکننده‌های ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP) در کمک به افزایش دوام بالینی باندینگ‌ها و کاهش لیکچ و دوام ترمیم‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان و نحوه رهایش داکسی سایکلین از ادهزیو آزمایشگاهی حاوی داکسی سایکلین بود.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی نمونه‌های حاوی دارو در دو درصد مختلف بارگذاری شامل ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد وزنی از داروی داکسی سایکلین تهیه شدند. نمونه‌ها در قالب‌های استوانه‌ای شکل به قطر ۱۲ میلی‌متر و ضخامت تقریبی ۲ میلی‌متر پخت شدند. مونومر چسب‌ها شامل ۱۲٪ وزنی Bis-GMA، ۱۰٪ وزنی TMPTMA، ۲۸٪ وزنی HEMA و ۵۰٪ وزنی اتانول برای کلیه گروه بود. کمفورکینون و آمین به عنوان آغازگر نوری به کار گرفته شدند.

یافته‌ها: افزودن ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد وزنی داکسی سایکلین به ادهزیو رهایش خطی را در هر دو گروه نشان داد. با بارگذاری بیشتر، رهش بیشتر شد و در طول زمان مطالعه ادامه داشت.

نتیجه‌گیری: رهش داکسی سایکلین از ادهزیو آزمایشگاهی مشاهده شد. اما مطالعات بیشتر در این زمینه می‌تواند کمکی در جهت تولید سیستم‌های ادهزیو با دوام کلینیکی بیشتر باشد.

کلید واژه‌ها: ادهزیوهای عاجی؛ داکسی سایکلین؛ مهارکننده MMP؛ رهایش

وصول: ۸۸/۰۳/۲۸ اصلاح نهایی: ۸۸/۰۹/۰۵ تأیید چاپ: ۸۸/۱۰/۰۲

مقدمه

بالینی باندینگ‌ها و کاهش لیکچ و دوام ترمیم‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار باشد. احتمال دارد تتراسایکلین و داکسی سایکلین بتوانند در افزایش دوام باند نقش مهمی ایفا نمایند. در مطالعه قبلی یک ماده چسبنده به عاج حاوی داکسی سایکلین تهیه و خواص مکانیکی آن بررسی گردید (۸). نتایج نشان داد که غلظت ۱٪ و بیشتر داکسی سایکلین رنگ قهوه‌ای تیره‌ای در ادهزیو آزمایشگاهی ایجاد می‌کند که کاربرد آن را غیر ممکن می‌سازد. نکته مهم در آن مطالعه این بود که غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد اثر سوئی بر خواص مکانیکی ادهزیو نظیر استحکام کششی قطری، استحکام و مدولوس خمشی، درجه پلیمریزاسیون و استحکام باند ریز برشی ندارند. در این مطالعه هدف تهیه یک باندینگ عاجی حاوی داکسی سایکلین به عنوان مهارکننده ماتریکس متالوپروتئیناز و بررسی روند رهایش دارو از این باندینگ تجربی بود.

روش بررسی

ساخت ادهزیو عاجی لایت کیور تجربی:

مطابق جداول ۱ و ۲، ۳۰ گرم (۱۲٪ وزنی) Bis-GMA با ۷۰ گرم (۲۸٪ وزنی) HEMA و ۲۵ گرم (۱۰٪ وزنی) TMPTMA مخلوط شدند. سپس ۱۲۵ گرم (۵۰٪ وزنی) اتانول به مخلوط افزوده شد تا مقدار کل به ۲۵۰ گرم برسد. رزین آماده شده به سه قسمت تقسیم شد.

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که باند رزین به عاج که توسط سیستم‌های ادهزیو آب دوست ایجاد می‌شود، در طی زمان به شدت تخریب می‌گردد (۱،۲).

دوام و پایداری باندهای رزین-عاج بستگی به ثبات اجزاء آن در طی زمان دارد. تحقیقات جدید نشان داده‌اند که دو عامل اصلی در تخریب دراز مدت باند نقش دارند. یکی حضور آب در سیستم‌های آب دوست باندینگ و دیگری آنزیم‌های پروتئولیتیک مشتق از ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP) متعلق به خانواده اندوپیتیدازهای خنثی وابسته به روی هستند و در تخریب ماتریکس خارج سلولی نقش دارند (۳-۴).

اخیراً نشان داده شده است که کاهش باند در نتیجه تخریب و تجزیه هیدرولیتیک رزین و پروتئولیز فیبریل‌های کلاژن محافظت نشده درون عاج دکلسیفیه شده می‌باشد (۵).

علاوه بر این واقعیت که ادهزیوها نسبت به پدیده خستگی مکانیکی حساس هستند، هیدرولیز اینترفیس کلاژن و رزین و شسته شدن محصولات آنها بر عدم پایداری *in-vivo* باند مؤثر می‌باشد (۶).

تخریب شیمیایی اینترفیس رزین-عاج به طور عمده با انتشار آب به درون لایه هیبرید و لایه ادهزیو آغاز می‌شود (۷). به نظر می‌رسد که بررسی نقش مهارکننده‌های MMP در کمک به افزایش دوام

جدول ۱- مواد مصرفی برای ساخت ادهزیوها

مواد مصرفی	Manufacturer
Bis- GMA	Rohm GmbH, chemische fabric, D- 64275 Darmstadt, Germany.
TMPTMA (Trimethylopropane Trimethacrylate)	Merck, Germany
HEMA (Hydroxy Ethyl Methacrylate)	Merck, Germany
Camphorquinone (CQ)	Fluka, Sigma-Aldrich chemie GmbH, Eschenstrasse 5, D-82018 Taufkirchen, Germany.
N, N- dimethyl aminoethyl methacrylate (DMAEMA)	Fluka, Sigma-Aldrich chemie GmbH, Eschenstrasse 5, D-82018 Taufkirchen, Germany.
Doxycycline Monohydrate USP28	Changzhou Pharmaceutical Co, China

جدول ۲- مشخصات گروه‌های مورد آزمون

گروه	درصد وزنی و نوع فیلر	رزین
۱	Control-unfilled bonding	Bis-GMA- %12 wt
		HEMA - %28 wt
		TMPTMA- %10 wt
		ETHANOL- %50 wt
۲	0.25 % wt Doxycycline	Bis-GMA- %12 wt
		HEMA - %28 wt
		TMPTMA- %10 wt
		ETHANOL- %50 wt
۳	0.5 % wt Doxycycline	Bis-GMA- %12 wt
		HEMA - %28 wt
		TMPTMA- %10 wt
		ETHANOL- %50 wt

آنالیز داروی داکسی سایکلین توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC انجام گرفت.

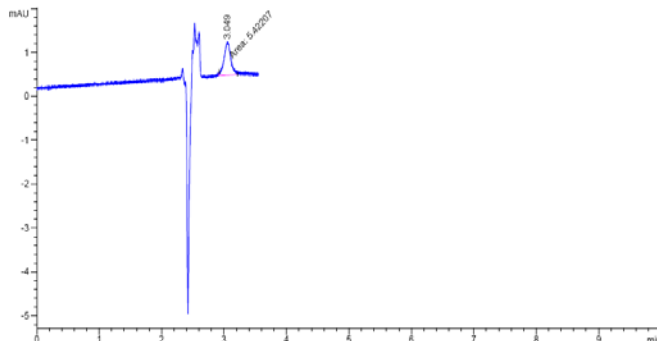
مواد بکار رفته: داروی داکسی سایکلین از شرکت داروسازی Linjxia Qiyuan، تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان و متانول با درجه خلوص بالا (HPLC grade) از شرکت Merk و نمک دی سدیم اتیلن دی آمین تترااستیک اسید از شرکت Romil خریداری شدند. همچنین آب دیونایزد توسط دستگاه Millipore شرکت lin Young تهیه شد.

دستگاه استفاده شده: برای آنالیز HPLC از دستگاه Agilent مدل series 1200 استفاده شد. این دستگاه شامل پمپ Binary pump SL به همراه Degasser، دکتور ماوراء بنفش چند طول موجی، خودکار تزریقی و ترموستات TCC SL بود. ستون

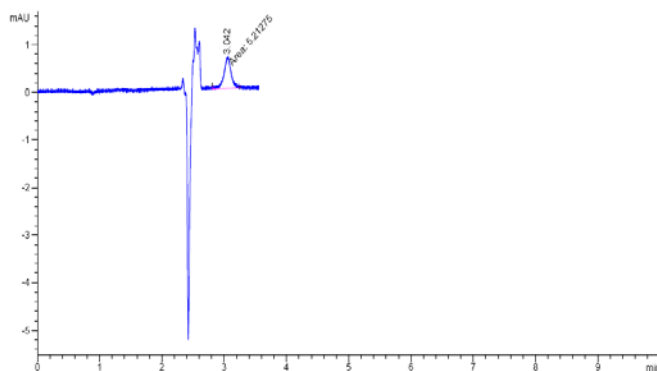
گروه اول شاهد و در گروه‌های ۲ و ۳ به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۵ قسمت درصد قسمت PHR (Part/ per/ Hundred Resin) داکسی سایکلین افزوده شد. آنگاه داکسی سایکلین با درصد مورد نظر به روش دستی با رزین مخلوط شد. سپس Sonication مخلوط نمونه‌ها در آب یخ با دستگاه (BANDELIN/ Germany) SonoPlus به صورت متناوب ۳۰ ثانیه Sonication و ۳۰ ثانیه استراحت، برای ۴ دقیقه انجام شد تا توزیع دارو یکنواخت شود. سپس ۱٪ وزنی اکتیواتور آمین (DMAEMA) و ۰/۵٪ وزنی کامفورکینون (Initiator) به هر گروه اضافه شد و مخلوط‌ها با Shaker بهم زده شدند. بعد ادهزیوهای مزبور در آون خلأ دینامیک در دمای اتاق برای ۲۴ ساعت قرار داده شد تا حلال آن کاملاً تبخیر شود (وزن ادهزیو بدون حلال نصف وزن اولیه ادهزیو باید باشد).

یافته‌ها

کروماتوگرام‌های حاصل از غلظت‌های مختلف داکسی سایکلین در نمودارهای ۱ و ۲ آمده است.



نمودار ۱- کروماتوگرام حاصل از داکسی سایکلین با غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر



نمودار ۲- کروماتوگرام حاصل از داکسی سایکلین با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر

نمودارهای میزان داروی آزاد شده (بر حسب میلی گرم) نسبت به زمان و درصد داروی رها شده بر حسب زمان به ترتیب در نمودارهای ۳ و ۴ نشان داده شده‌اند. همانگونه که در نمودار ۳ دیده می‌شود، با افزایش میزان بارگذاری دارو در نمونه‌ها، میزان ره‌ایش دارو افزایش یافت. اما مطابق نمودار ۴ درصد داروی آزاد شده، با گذشت زمان در یک مقدار معینی ثابت باقی ماند. این امر نشان‌دهنده این موضوع است که افزایش بارگذاری اولیه دارو در نمونه‌ها تأثیری بر درصد داروی ره‌ایش یافته تا یک زمان معین نداشت. در نمودار ۵ مقدار جمع‌ی ره‌ش بر مساحت سطح برحسب $t_{1/2}$ (زمان) برای ترکیب درصد‌های مختلف رسم گردیده و در ضمن معادلات خط فیت شده بر آنها نیز آورده شده است.

(HPLC) برای آنالیز C18 (Eclipse XDB-5 μ m, 4.6 \times 250 mm) بکار گرفته شد. نرم‌افزار مورد استفاده برای آنالیز Agilent ChemStation بود. آزمون ره‌ایش دارو

نمونه‌های حاوی دارو در دو درصد مختلف بارگذاری شامل ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد وزنی از داروی داکسی سایکلین تهیه شدند. در مطالعه قبلی ملاحظه شد که غلظت ۱٪ داکسی سایکلین، رنگ تیره‌ای ایجاد می‌کند که امکان کاربرد آن در چسب‌های دندان‌ی وجود ندارد (۸). نمونه‌ها در قالب‌های استوانه‌ای شکل به قطر ۱۲ میلی‌متر و ضخامت تقریبی ۲ میلی‌متر در شرایط یکسان پخت شدند.

به دلیل حساسیت نوری بالای داروی داکسی سایکلین، نمونه‌های حاوی دارو در ویال‌های شیشه‌ای قهوه‌ای با پوشش فویل آلومینیومی نگهداری شدند. نمونه‌های دیسکی حاصل دارای ابعادی برابر با قالب و وزن تقریبی برابر بوده و از هر ترکیب درصدی، حداقل ۶ نمونه آزمایش شدند. محیط ره‌ایش دارو شامل آب یون و گاز زدایی شده به حجم ۵ میلی لیتر برای هر نمونه بود. ابتدا هر نمونه دیسکی شکل حاوی دارو در یک ویال شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ وارد شده و ۵ میلی لیتر از محیط ره‌ایش به آن افزوده شد. نمونه برداری طبق زمان‌های مشخص شده و به صورت هندسی انجام شده و در هر نمونه برداری بعد از تخلیه کامل ویال از محیط ره‌ایش مجدداً همان حجم به سیستم افزوده شد.

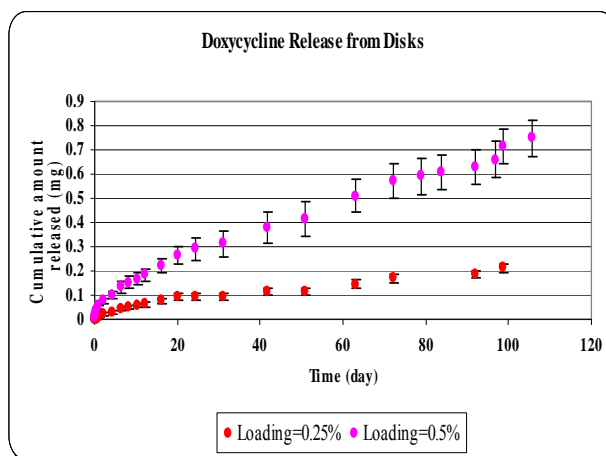
اعتبار سنجی روش: برای اعتبار سنجی روش، غلظت‌های متفاوت از استاندارد تهیه شد. مقدار انحراف استاندارد نسبی (%RSD) برای چندین تزریق در یک روز و تزریق در روزهای مختلف و همچنین مقادیر LOD (Limited of Quantification) و LOQ (Limited of Detection) جهت بررسی ره‌ایش داکسی سایکلین، گروه‌های آزمایشی شامل گروه اول (باندینگ شاهد)، دوم (باندینگ حاوی ۰/۲۵٪ داکسی سایکلین) و سوم (باندینگ حاوی ۰/۵٪ داکسی سایکلین) با هم مقایسه شدند.

مدل ره‌ایش دارو با مدل‌های مختلف استاندارد آزاد شدن دارو منطبق شد و مشاهده گردید که با مدل هیگچی بهترین تطبیق را داشت. لذا با این مدل منطبق شد و با استفاده از این مدل الگوی آزاد سازی تحلیل شد.

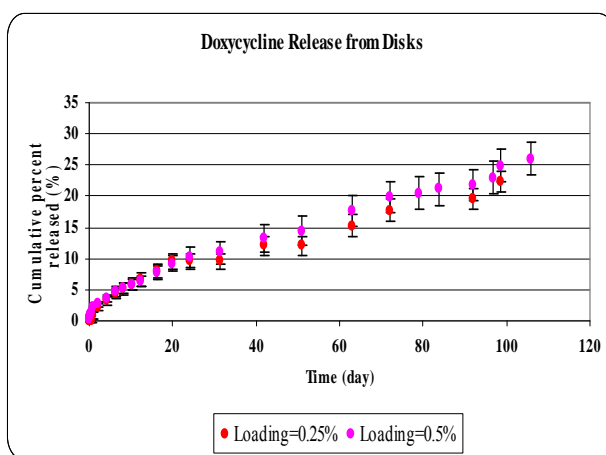
بحث و نتیجه گیری

ماتریکس متالوپروتئینازها خانواده‌ای از آنزیم‌های وابسته به روی هستند که به عنوان مدياتورهای اصلی فیزیولوژیک در تخریب خارج سلولی محسوب می‌شوند و بر حسب سوبسترای اختصاصی خود مشخص می‌گردند. داکسی سایکلین‌ها عضوی از خانواده تتراسیکلین‌ها هستند که خواص غیر آنتی بیوتیکی آنها از طریق مهار کردن فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها به اثبات رسیده است (۹-۱۱).
Sulkala و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۱۲) MMP-20 را در عاج و مایع توبولی نشان دادند. آنها معتقدند که این ماده می‌تواند در طی پوسیدگی آزاد و فعال شود.

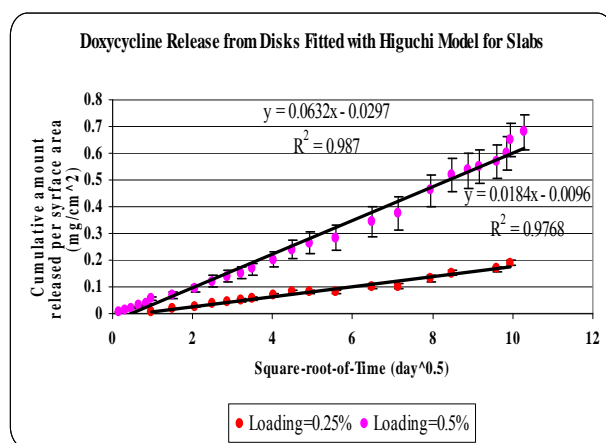
MMP-2, MMP-8, MMP-9 در ضایعات پوسیده دمنرالیزه مشاهده شده‌اند (۱۳). Sulkala و همکاران در مطالعات درون تنی نشان داده که مهار MMP می‌تواند پیشرفت پوسیدگی را متوقف کند (۱۴). ماتریکس متالوپروتئینازها بخشی از مسؤلیت تخریب لایه هیبرید و کاهش باند رزین به عاج را بر عهده دارند و ترکیباتی که MMPها را مهار کنند، می‌توانند در افزایش باند مؤثر باشند (۱۵). Hebling و همکاران کاربرد توأم یک باندینگ Etch & rinse را با کلر هگزیدین بررسی نمودند و آن را با باندینگ به تنهایی مقایسه کردند و نشان دادند که کلاژن در گروه کلر هگزیدین تخریب نیافته بود (۱۶). سایر مهار کننده‌های MMP از جمله تتراسیکلین‌ها در همراهی با چسب‌های عاج بکار نرفته‌اند. بیشترین کاربرد این مواد در درمان بیماری‌های پریدنتال بوده است (۱۷). کاربرد این دارو در چسب‌های دندان با مشکل ایجاد تغییر رنگ مواجه است. داکسی سایکلین نیز از مهار کننده‌های MMP می‌باشد که در چسب عاجی آزمایشگاهی این مطالعه بکار رفت. دو مسئله اولیه قبل از مطالعات in-vivo باید مورد تحقیق قرار گیرند. اول تأثیرات احتمالی افزودن این دارو بر خواص اصلی فیزیکی مکانیکی ادهزیو و یافتن مقادیری از داکسی سایکلین که افزودن آن اثرات مخرب نداشته باشد. این امر در یک پروژه تحقیقاتی مورد بررسی قرار گرفت و ملاحظه شد که غلظت‌های بالای ۰/۵٪ رنگ چسب را تیره می‌کند و ممکن است بر زیبایی نهایی ترمیم اثر بگذارد. مطالعه خواص مکانیکی نشان داد که افزودن ۰/۵٪ و ۰/۲۵٪ بر درجه پلیمریزاسیون، استحکام کششی قطری، استحکام خمشی،



نمودار ۳- منحنی‌های تغییرات میزان رهائش تجمعی داروی داکسی سایکلین بر حسب میلی گرم از نمونه‌های حاوی ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد دارو (n=۶)



نمودار ۴- منحنی‌های تغییرات درصد رهائش تجمعی داروی داکسی سایکلین از نمونه‌های حاوی ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد دارو (n=۶)



نمودار ۵- فیت کردن داده‌های رهائش دارو بر مدل هیگوچی برای شکل هندسی slab، برای نمونه‌های حاوی ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد دارو (n=۶)

۲۸ روز در آب نگهداری نمودند و ارتباط مستقیم بین آزاد سازی دارو و آبدوستی رزین را گزارش کردند (۱۹). در واقع آزاد سازی دارو متعاقب جذب آب در رزین رخ می‌دهد. اساساً رهاپش دارو و یا مواد سمی از پلیمرها به شرایط پلیمریزاسیون و شرایط مطالعه بستگی زیادی دارد، لذا استاندارد کردن این شرایط که در این مطالعه مورد توجه خاص بود، مهم است. Anusavice و همکاران آزاد سازی دی استات کلر هگزیدین را از پلیمر UDMA-TEGDMA مطالعه نمودند و افزایش فیلر به رزین را سبب افزایش آزاد سازی دارو دانستند و این را به کاهش پلیمریزاسیون منوط کردند (۲۰).

با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه، به نظر می‌رسد که با افزودن مقادیر ۰/۲۵٪ و ۰/۵٪ داکسی سایکلین به چسب آزمایشگاهی امکان رهاپش دارو در مدیوم وجود دارد. لازم است که در مطالعات بعدی کاربرد ادهزیو حاوی داکسی سایکلین در حیوان و اثر آن بر دوام باند مطالعه شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی مرکز تحقیقات دندانپزشکی برای تأمین هزینه‌های طرح و از جناب آقای دکتر محمد جواد خرازی فرد جهت انجام مراحل آماری تحقیق و همچنین آزمایشگاه دانشکده فنی دانشگاه تهران جهت تأمین امکانات آزمایشگاه تشکر می‌شود.

مدول خمشی و استحکام باند ریز برشی (Micro-shear bond strength) اثر کاهندگی ندارد (۸). مسئله دیگری که نیاز به بررسی دارد رهاپش دارو از چسب‌های حاوی غلظت‌های ۰/۲۵٪ و ۰/۵٪ داکسی سایکلین است که در این مطالعه بررسی شد. در مطالعه ما آزاد سازی تجمعی داکسی سایکلین با افزایش بارگذاری دارو افزایش داشت. همچنین با گذشت زمان رهاپش دارو افزایش نشان داد و به یک حد رسید. Tallury و همکاران نیز آزاد سازی دی استات کلر هگزیدین را از کوپلیمرهای مختلف متاکریلاتی بررسی نمودند و گزارش کردند که با کاهش وزن ملکولی رزین آزاد سازی کلر هگزیدین کم و با افزایش بارگذاری زیاد ولی نهایتاً به یک حد می‌رسد (۱۸). این نکته با نتایج مطالعه ما هم خوانی دارد. همانگونه که مشاهده می‌گردد هر دو ترکیب درصد از یک الگوی خطی پیروی کرده و سرعت رهاپش دارو از سیستم برای بارگذاری ۰/۵٪ تقریباً ۴ برابر ۰/۲۵٪ (شیب ۰/۰۶۳۲ در برابر ۰/۰۱۸۴) است. به نظر می‌رسد که رهاپش دارو به طور نفوذی از داخل ماتریس صورت می‌گیرد. ارزیابی کارایی غلظت آزاد شده در هر روز بر مهار آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز نیازمند دانستن حجم توزیع دارو در فضای کارگذاری شده و نیز غلظت مؤثر دارو در موضع است. در بیشتر مطالعاتی که آزاد سازی داروها را از پلیمرها بررسی کردند آزاد سازی را در طی زمان فعال گزارش نمودند. این مسئله نیز با مطالعه حاضر همخوانی دارد. Hiraishi و همکاران غلظت‌های مختلف دی استات کلر هگزیدین در چند رزین هیدروفیل و هیدروفوب را به مدت

منابع:

- 1- De Munk J, Van Meerbeek B, Yoshida Y. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003;82(2):136-40.
- 2- Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater*. 2005;21(3):232-41.
- 3- Tanaka J, Ishikawa K, Yatani H, Yamashita A, Suzuki K. Correlation of dentin bond durability with water absorption of bonding layer. *Dent Mater J*. 1999;18(1):11-8.
- 4- Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2000;45(9):757-65.
- 5- Osorio R, Erhardt MC, Pimenta LA, Osorio E, Toledano M. EDTA treatment improves resin-dentin bonds' resistance to degradation. *J Dent Res*. 2005;84(8):736-40.
- 6- De Munk J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*. 2005;84(2):118-32.
- 7- Duke ES. Adhesion and application with restorative materials. *Dent Clin North Am*. 1993;37(3):329-40.
- ۸- قوام مریم، عطایی محمد، ایمانی محمد، رشاد محمد. تأثیر افزودن مهار کننده Matrix Metalloproteinase بر درجه تبدیل مونومر به پلیمر یک باندینگ عاجی آزمایشگاهی. مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران. سال ۱۳۸۸؛ دوره ۲۲ (شماره ۲): ۱۳۱-۵.
- 9- Porter KE, Thompson MM, Loftus IM, McDermott E, Jones L, Crowther M, et al. Production and inhibition of the gelatinolytic matrix metalloproteinases in a human model of vein graft stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999;17(5):404-12.
- 10- Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A, Cowled PA. Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002;23(3):260-9.
- 11- Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases.

Bioessays. 1992;14(7):455-63.

12- Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002;81(9):603-7.

13- Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77(8):1622-9.

14- Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res.* 2001;80(6):1545-9.

15- Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007;86(6):529-33.

16- Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR.

Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005;84(8):741-6.

17- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(2):197-250.

18- Tallury P, Airrabeelli R, Li J, Paquette D, Kalachandra S. Release of antimicrobial and antiviral drugs from methacrylate copolymer system: effect of copolymer molecular weight and drug loading on drug release. *Dent Mater.* 2008;24(2):274-80.

19- Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dent Mater.* 2008;24(10):1391-9.

20- Anusavice KJ, Zhang NZ, Shen C. Controlled release of chlorhexidine from UDMA-TEGDMA resin. *J Dent Res.* 2006;85(10):950-4.