

بررسی تأثیر مه‌ار کننده‌های مصنوعی ماتریکس متالوپروتئینازها بر روی دوام استحکام باند ریزکشی کامپوزیت به عاج

دکتر عبدالرحیم داوری^۱ - دکتر علیرضا دانش کاظمی^۲ - دکتر فرناز فراهت^۲ - دکتر فاطمه کوهستانی^۴

- ۱- استاد گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران؛ عضو مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت دهان و دندان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۲- دانشیار گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران؛ عضو مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت دهان و دندان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۳- استادیار گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۴- دستیار تخصصی گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

Effect of different synthetic matrix metalloproteinase inhibitors on composite-dentin microtensile bond strength durability

Abdolrahim Davari¹, Alireza Daneshkazemi², Farnaz Frahat³, Fatemeh Kohestani^{4†}

1- Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran; Member of Social Determinant of Oral Health Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

2- Associate Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran; Member of Social Determinant of Oral Health Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

3- Assistant Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

4[†]- Post-Graduate Student, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran (Kohestani-fatemeh@yahoo.com)

Background and Aims: Despite patient's demand increased for tooth color restorations, the stable bond between dentin and composite is a challenge in dentistry. Dentin protease activation is responsible for dentin-resin bond failure. The aim of this study was to determine the best pretreatment agent to inhibit matrix metalloproteinase and increase resin-dentin bond durability.

Materials and Methods: After collecting 24 intact third molars, the dentin surfaces were exposed immediately under DEJ. After acid etching of dentin rewetting was done with CHX 2%, EDC 0.3 M for 60 and water (control group). Then the adhesive (Single bond, 3M ESPE, USA) and composite (Filtek Z250 XT, 3M ESPE, USA) were applied. 48 sectioned dentinal specimens were prepared. The specimens were divided into 3 groups. Each group was divided into 2 sub groups (n=8). In half of each group, the micro tensile bond strength test was done immediately and another part half 6 months. Then, the specimens were evaluated by stereomicroscope and SEM. Statistical analysis was performed using SPSS23 software, two-way ANOVA and multiple Tukey and T-test comparisons. P<0.05 was considered as a significant level.

Results: There were not significant differences between immediate micro tensile bond strength of CHX, EDC and control groups (P=0.97). However, there was significant differences between CHX, EDC compared with the control group (P≤0.0001). Comparison between the immediate and 6-month bond strengths in each group, only in EDC group, there was no significant after 6 months' difference (P=0.64).

Conclusion: EDC and CHX t did not have any effect on the immediate microtensile bond strength. After 6 months, EDC prevented bond strength deterioration, but the bond strength was decreased after CHX usage.

Key Words: Hybrid layer, MMPs enzymes, Microtensile bond strength, Chlorhexidin, Carbodiimid

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2019;32(1):40-51

† مؤلف مسؤول: یزد- خیابان امام- بولوار دهه فجر- دانشکده دندانپزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد- گروه آموزشی ترمیمی و زیبایی
تلفن: ۰۳۵۳۶۲۵۶۹۷۵ نشانی الکترونیک: Kohestani-fatemeh@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: علیرغم افزایش تقاضای ترمیم‌های هم رنگ دندان مانند کامپوزیت، ایجاد باند با ثبات کامپوزیت با عاج همچنان چالشی در دندانپزشکی می‌باشد. فعال شدن پروتئازهای عاجی از دلایل از دست رفتن باند می‌باشد. هدف این مطالعه تعیین بهترین ماده پیش درمانی عاج پس از اسید اچ جهت مهار آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز جهت افزایش ثبات باند رزین عاج بود.

روش بررسی: پس از جمع آوری ۲۴ مولر سوم بدون پوسیدگی، از عاج زیر DEJ استفاده شد. پس از اسید اچ دو نوع ماده شامل کلرگزیدین ۲٪ (CHX)، کربودی ایمید ۰/۳ مول (EDC) به مدت ۶۰ ثانیه و آب (گروه کنترل) به کار رفت. سپس در تمام نمونه‌ها از باندینگ Single bond استفاده و با کامپوزیت XT Filtek Z250 ترمیم شدند. تعداد ۴۸ نمونه برش عاجی از دندان‌ها حاصل و نمونه‌ها به سه گروه CHX و EDC و کنترل که هر گروه به دو زیر گروه n=۸ (جمعاً ۶ گروه) تقسیم شدند. نیمی از نمونه‌ها فوراً و نیمی پس از ۶ ماه، تحت تست استحکام باند ریزکشی قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها زیر استریومیکروسکوپ و میکروسکوپ الکترونی ارزیابی شدند. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS23 و آزمون‌های تحلیل واریانس دو طرفه و مقایسه‌های چندگانه توکی و T زوجی انجام شد و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میانگین استحکام باند کشتی فوری گروه‌ها (CHX-EDC-کنترل) تفاوت آماری معنی‌داری نداشت ($P=0/97$). میانگین استحکام باند کشتی پس از ۶ ماه CHX و EDC تفاوت معنی‌داری با کنترل داشتند ($P \leq 0/0001$). در مقایسه استحکام باند فوری و پس از ۶ ماه تنها در گروه EDC استحکام باند فوری و پس از ۶ ماه تفاوت معنی‌داری نداشت ($P=0/64$).

نتیجه‌گیری: محلول‌های CHX و EDC تأثیری بر استحکام باند فوری نداشتند. در CHX پس از ۶ ماه کاهش استحکام باند مشاهده شد. اما EDC باعث ثبات استحکام باند پس از ۶ ماه شد.

کلید واژه‌ها: لایه هیبرید، آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز، استحکام باند ریزکشی، کلرگزیدین، کربودی ایمید

وصول: ۹۷/۰۹/۲۱ اصلاح نهایی: ۹۸/۰۲/۰۲ تأیید چاپ: ۹۸/۰۲/۲۰

مقدمه

دو شکل اساسی در دژنره شدن باند رزین-عاج در طول زمان عبارتند از:

- ۱) هیدرولیز آهسته اجزای رزینی به علت جذب آب که به علت افزایش هیدروفیلی آدهزیوهای امروزی افزایش می‌یابد.
- ۲) دژنره شدن فیبریل‌های کلاژن غنی از آب دارای رزین بعلت فعال شدن MMP ها.

Mazzoni و همکاران (۱۰) نشان دادند که این ناحیه فعالیت آنزیمی بسیار بالایی دارد که آغاز پیشرفت تخریب را تسهیل می‌کند. از آنجایی که ثبات و یکپارچگی فیبریل‌های کلاژن برای انکوریج ترمیم‌های کامپوزیتی به عاج ضروری هستند، این فرآیند تعیین کننده دوام باند است. در واقع تخریب فیبریل‌های کلاژن داخل لایه هیبرید به عنوان یکی از اصول مستعد کننده در پیشبرد شکست است (۱۱، ۱۲). یکی از عواملی که در کاهش قدرت dentin-bonding در دراز مدت نقش دارد، وجود آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP) است. آنزیم‌های MMP نوعی اندوپپتیداز وابسته به روی و کلسیم هستند که در بسیاری پروسه‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش دارند و درون ماتریکس معدنی عاج در طول تکامل دندان به دام می‌افتند (۱۵-۱۳).

امروزه با توجه به افزایش آگاهی بیماران از مقوله زیبایی و افزایش اهمیت این موضوع در جامعه و نیز بهبود خواص کامپوزیت‌ها، مصرف آن‌ها علاوه بر دندان‌های قدامی، در دندان‌های خلفی نیز مورد توجه قرار گرفته است (۱).

باند رزین-عاج نیازمند مجموعه‌ای از درمان‌های سطحی روی عاج می‌باشد که ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی را از سطحی هیدروفیل، کریستالی و ناپایدار نسبت به اسید به سطحی با خصوصیات هیدروفوب و نفوذپذیری بیشتر و مقاوم‌تر به اسید تبدیل می‌کند (۲).

علی‌رغم پیشرفت‌های بسیار واضح در سال‌های اخیر اینترفیس باند هنوز ضعیف‌ترین ناحیه کمپلکس ترمیم است. جایگذاری ترمیم‌های رزین کامپوزیت با استفاده از فرآیند باندینگ متداول باعث فعال شدن پروتئازهای داخلی در آماده سازی‌های گسترش یافته به عاج می‌گردد (۳-۵). استفاده از اسید اچ در عاج مینرالیزه باعث فعال سازی پروتئازها و تخریب آنزیمی آهسته فیبریل‌های کلاژن در لایه هیبرید می‌گردد. میزان تخریب با گذشت زمان افزایش می‌یابد و این تخریب انتهای لایه هیبرید جایی که کلاژن‌ها به طور ضعیفی اینفیلتره شده‌اند بیشتر است (۹-۶).

مولکول کلاژن برقرار کنند. مزیت غیر فعال سازی آنزیم‌های پروتئولیتیک در ماتریکس عاجی توسط کراس لینک، مکانیسم غیر اختصاصی آن می‌باشد. چنین درمان‌هایی تمام انواع MMPs ها و سیستمین کاتپسین‌ها را که در عاج یافت می‌شوند کراس لینک می‌کنند و این کراس لینک شامل باندهای کوالانسی است که در طول زمان ثابت می‌ماند. در سال‌های اخیر در دندانپزشکی یک کلاژن کراس لینکر منحصر به فرد با حداقل سایتو توکسیسیته، بنام کربودی ایمید که یک ایزومر بانبات از کربودی ایمید می‌باشد، محبوبیت یافته و جدیدترین پروتئین کراس لینکر غیر اختصاصی است که نشان داده قادر است سایت‌های کاتالیتیک MMPs را غیر فعال کند. هدف از این مطالعه تعیین تأثیر دو نوع مهار کننده مصنوعی ماتریکس متالوپروتئینازها (EDC و CHX) در زمان‌های مختلف روی استحکام باند ریزکشی کامپوزیت به عاج بود.

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی و از نوع آزمایشگاهی صورت گرفت. تعداد ۲۴ عدد دندان مولر سوم انسانی کشیده شده بدون پوسیدگی جمع‌آوری گردید و هرگونه بافت نرم از سطوح دندانی به وسیله اسکیلر و آب برداشته شد. همه دندان‌ها از زمان کشیده شدن تا زمان آزمایش در سرم فیزیولوژی که هر هفته عوض می‌شد قرار گرفتند. همچنین برای ضد عفونی نمونه‌ها از ۲۴ ساعت قبل از آزمایش در محلول تیمول ۲٪ قرار داده شدند. به منظور یکسان سازی عمق عاج و اجتناب از تأثیر آن بر نتایج آزمایش و از آنجا که نمونه‌ها می‌بایست برای مانع شدن روی Universal testing machine (SD Mechatronic MTD-500/Germany) حداقل ۳ میلی متر عاج داشته باشند، از سطحی‌ترین عاج (زیر DEJ) ناحیه میانی اکلوژال استفاده گردید.

جهت دسترسی به سطح عاجی، دندان‌ها توسط فرز الماسی با سرعت بالا (#3195, KG Sorensen, Brazil) و اسپری آب، برش افقی زده شدند. به صورتی که فقط مینا برداشته شد و عاج زیر ناحیه (DEJ) اکسپوز گردید. سپس سطح عاجی حاصل شده در تمام نمونه‌ها توسط کاغذ سیلیکون کارباید ۶۰۰ گریت به مدت ۶۰ ثانیه برای تولید لایه اسمیر یکسان پالیش شد. تمام سطوح عاجی با ژل اسید فسفریک

این آنزیم‌ها در عاج و بیشتر در محل اتصال دنتین و انامل (DEJ) وپره دنتین وجود دارند. این گروه ۲۳ تایی آنزیم‌های انسانی قادر به تخریب و دژنره کردن ماتریکس خارج سلولی می‌باشند و می‌توانند سبب تخریب لایه هیبرید پس از دیمینرالیزاسیون به صورت هیدرولیز فیبریل‌های کلاژن که به صورت کامل با ادهزیو رزین پلیمریزه پوشیده نشده‌اند، گردند (۱۶،۱۷). در محیط دهان توجه خاصی به یافتن توزیع و عملکرد MMPs های میزبان معطوف است. مشخص شده است که ماتریکس عاجی حداقل ۴ نوع (۲-۳-۸-۹) MMPs دارد (۱۸-۲۰).

این آنزیم‌ها که به علت اسید فسفریک موجود در سیستم‌های اچ-شستشو فعال می‌شوند، سبب شکسته شدن فیبریل‌های کلاژن موجود در لایه هیبرید می‌شوند (۲۱). اخیراً موادی به منظور کاهش فعالیت این آنزیم‌ها معرفی شده‌اند. استفاده از کلاژن کراس لینکرها در پروسه ادهزیو در سال‌های اخیر با افزایش محبوبیت روبرو بوده است (۲۳،۲۲). استفاده از Proanthocyanidins -Glutaraldehyde -Riboflavin -genipin و Carbodiimid برای تقویت ثبات ساختاری و مکانیکی کلاژن‌های عاجی در نظر گرفته شده است که منجر به شبکه ماتریکس عاجی با ثبات می‌گردد که پس از رزین انفیلتراسیون بتواند لایه هیبرید بادوامی را تأمین کند (۲۶-۲۴).

بیشتر آزمایشات طراحی شده برای تقویت دوام باند عاجی به وسیله مهار آنزیم با استفاده از CHX انجام شده است. CHX عامل آنتی میکروبیال قوی است و هم به عنوان مهار کننده غیر اختصاصی MMPs مطرح است و می‌تواند از تخریب باند عاجی ممانعت کرده و به طور مؤثری ۲-۸-۹ MMP و سیستمین کاتپسین را مهار کند (۲۸،۲۷).

CHX از طریق چلاته کردن یون‌های کلسیم و روی سبب مهار فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود (۳). عوامل کراس لینک کننده شیمیایی و طبیعی برای افزایش کراس لینک ماتریکس کلاژنی دیمینرالیزه قبل از کاربرد ادهزیو استفاده می‌شود. عوامل کراس لینک کلاژنی قابلیت تقویت شبکه فیبریلی کلاژن توسط القاء کراس لینک اینترا و اینتر مولکولار را دارا می‌باشد. اخیراً مطالعاتی نشان داده‌اند که برخی از این عوامل قادر به غیرفعال سازی MMPs های عاجی نیز می‌باشند. کربو دی ایمیدها گروه دیگری از عوامل کراس لینک هستند که می‌توانند باندهای آمیدی بین گروه‌های آمینی و کربوکسیل روی

به صورتی که نمونه‌ها حالت ساعت شنی داشته و دارای حداقل ۶ میلی متر طول بودند و مساحت سطح مقطع آن‌ها در اینترفیس ۱ میلی متر مربع بود. بنابراین نمونه‌ها ($n=48$) به ابعاد (1×6) میلی متر حاصل شدند. نمونه‌ها در هر گروه به صورت رندوم توسط جدول اعداد تصادفی به دو دسته تقسیم شدند. نیمی از نمونه‌ها پس از فرآیند باندینگ به مدت ۲۴ ساعت در محلول نرمال سالین ۳۷ درجه نگهداری و سپس در universal testing machine تحت نیروی tensile با سرعت ۱ میلی متر در دقیقه تا نقطه شکست قرارگرفت و استحکام باند ریزکشی فوری آن‌ها اندازه‌گیری شد.

نیمه دیگر نمونه‌های هر گروه پس از گذشت ۶ ماه نگهداری در محلول نرمال سالین ۳۷ درجه سانتی‌گراد که هر هفته تعویض می‌گردید و متعاقب انجام ترموسایکل برای شبیه سازی هرچه بیشتر شرایط کلینیکال (بدین صورت که به وسیله دستگاه ترموسایکلینگ (وفایی، ایران) تحت تأثیر تعداد ۵۰۰۰ سیکل حرارتی معادل ۶ ماه فانکشن *in vivo*، بین ۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد (۱۵ ثانیه هر دما و ۱۵ ثانیه زمان بینایی) قرار گرفتند و سپس میزان استحکام باند ریزکشی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری استحکام باند میله‌ها با استفاده از چسب سیانواکریلات به دستگاه باند و با سرعت ۱ میلی متر در دقیقه تا نقطه شکست بارگذاری شدند.

پس از انجام تست استحکام باند نمونه‌ها زیر استریومیکروسکوپ (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) با بزرگنمایی ۳۰ برابر بررسی و برحسب نوع شکست به انواع mixed و adhesive, cohesive طبقه‌بندی شدند.

همچنین از هر گروه یک نمونه (جمعاً ۶ نمونه) بر اساس جدول اعداد تصادفی انتخاب و زیر میکروسکوپ الکترونی (Pro- X Switzerland) با بزرگنمایی ۸۰۰ برابر بررسی شدند و میزان نفوذ استتال‌های رزینی در عاج اچ شده و اثر احتمالی مواد مورد استفاده روی عمق نفوذ بررسی گردید.

پس از جمع‌آوری اطلاعات نمونه‌ها کد گذاری و وارد نرم افزار SPSS23 شدند. از آزمون ANOVA برای مقایسه گروه‌های مختلف و از آزمون‌های Tukey برای مقایسه دو به دو بین گروه‌ها و Paired T-Test برای مقایسه قبل و بعد در هر گروه استفاده شد.

۳۷٪ (BISCO/USA) به مدت ۵ ثانیه اچ شدند و پس از آن به مدت ۳۰ ثانیه با آب شستشو داده شدند. تعداد ۴۸ نمونه برش عاجی از دندان‌ها حاصل و نمونه‌ها به سه گروه CHX و EDC و کنترل که هر گروه به دو زیر گروه $n=8$ (جمعاً ۶ گروه) تقسیم شدند.

در گروه اول پس از حذف آب و رطوبت توسط میکرو براش از روی سطح عاج از محلول کلرگزیدین ۲٪ CHX (Consepsis Ultra dent USA) به مدت ۶۰ ثانیه به کمک میکرو براش با حرکات جارویی برای پیش درمانی عاج استفاده شد و اضافی محلول توسط میکرو براش از سطح حذف گردید و رطوبت سطحی باقی گذاشته شد.

در گروه دوم نیز پس از حذف آب و رطوبت توسط میکرو براش از روی سطح عاج با محلول کربودی ایمید ۰/۳ M EDC (Sigma Aldrich St Louis MO, USA) به مدت ۶۰ ثانیه مانند کلرگزیدین پیش درمانی انجام و اضافی محلول توسط میکرو براش از سطح حذف گردید و رطوبت سطحی نیز باقی گذاشته شد.

در گروه سوم (کنترل) پیش درمانی انجام نشد و فقط حذف آب اضافی توسط میکرو براش صورت گرفت. به طوری که سطح عاج به طور کامل خشک نگردد و رطوبت سطحی باقی گذاشته شد. سپس در تمام گروه‌ها، باندینگ با حلال اتانول آبی single Adper (3M ESPE bond/ USA) طبق دستور کارخانه سازنده توسط میکرو براش اعمال و از پوار هوای ملایم برای تبخیر حلال استفاده و نمونه‌ها به مدت ۲۰ ثانیه توسط دستگاه Light Emission Diode (DEMI, Kerr, USA) با شدت 800 mw/cm^2 که با دستگاه رادیومتر چک می‌شد و در فاصله ۱ میلی متری از سطح کیور شدند.

سپس ضخامت ۳ میلی متر از کامپوزیت Filtek Z250 XT (3M ESPE/ USA) با رنگ A1 در ۲ لایه جداگانه $1/5$ میلی متری روی سطوح عاجی قرار گرفت. هر لایه به طور جداگانه به مدت ۴۰ ثانیه با فاصله ۱ میلی متر از تمامی سطوح کیور شد. دندان‌ها به صورت تکی در آکریل فوری و در قالب دستگاه برش (Labcut 1010, Extex co, USA) مانده شدند. سپس دندان‌ها در جهت طولی مزودیستالی و عمود بر کف پالپال توسط دستگاه برش زده شدند تا تیغه‌هایی به ضخامت ۱ میلی متر بریده و با استفاده از فرز در حد فاصل کامپوزیت و دندان به سطح مقطع ۱ میلی متر رسیدند.

یافته‌ها

در این مطالعه تأثیر دو نوع محلول پیش درمانی بر استحکام باند ریزکشی کامپوزیت به برش‌های عاجی از دندان‌های مولر سوم کشیده شده انسانی، مورد ارزیابی قرار گرفت بدین منظور میزان استحکام باند ریزکشی ۴۸ نمونه در ۶ گروه (در هر گروه ۸ نمونه) در نظر گرفته شد.

نتایج آزمون ANOVA برای مقایسه استحکام باند فوری در گروه‌های مطالعه در جدول ۱ مشاهده می‌شود. میانگین مقادیر استحکام باند در گروه‌های مورد مطالعه، تفاوت ناچیزی داشت و با توجه به اینکه ($P > 0.05$) بوده، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مطالعه در میانگین استحکام باند در این زمان وجود نداشت ($P = 0.97$).

نتایج آزمون ANOVA برای بررسی تفاوت میانگین استحکام باند پس از ۶ ماه، در سه گروه مطالعه در جدول ۲ آورده شده است. با توجه به نتایج نشان داده شده، پس از گذشت این مدت، میانگین مقادیر استحکام باند در گروه کنترل (۲۰) به طور مشخصی کمتر از گروه EDC (۳۱/۲۲) و CHX (۲۹/۳۵) بود که از لحاظ آماری معنی‌داری بود ($P = 0.0001$).

تفاوت میانگین مقادیر استحکام باند بین گروه‌ها به صورت دو به دو در جدول ۳ نشان داده شده است. مقایسه مقادیر استحکام باند فوری، میزان اختلاف (۰/۲۶۲) بین گروه کنترل و EDC، (۰/۱۸۷) بین گروه کنترل و CHX و (۰/۰۷۵) بین گروه EDC و CHX برحسب مگاپاسکال وجود داشت. آزمون Tukey نشان داد که بین هیچ یک از گروه‌ها در زمان سنجش فوری، تفاوت آماری معنی‌داری در میزان

میانگین استحکام باند یافت نشد ($P > 0.05$).

در صورتی که پس از گذشت ۶ ماه میزان تفاوت (۱۰/۸۶) بین گروه کنترل و EDC، (۸/۹۸) بین گروه کنترل و CHX و (۱/۸۷) بین گروه EDC و CHX دیده شد، که تفاوت بین کنترل و EDC، همچنین بین کنترل و CHX معنی‌دار بود ($P \leq 0.0001$). در صورتی که بین گروه EDC و CHX تفاوت اندکی وجود داشت که بر اساس آزمون Tukey از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P = 0.368$).

مقایسه مقادیر میانگین استحکام باند فوری و ۶ ماهه در هر گروه به صورت جداگانه در جدول ۴ مشاهده می‌شود. آزمون Paired T Test نشان داد که در گروه کنترل استحکام باند فوری (۳۲/۱۵) نسبت به ۶ ماه بعد (۲۰/۳۶) کاهش مشخصی داشت این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P \leq 0.0001$).

در گروه CHX تفاوت میزان استحکام باند فوری (۳۱/۹۶) نسبت به ۶ ماه بعد (۲۹/۳۵) اندک اما از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P = 0.015$). در گروه EDC استحکام باند فوری (۳۱/۸۸) در مقایسه با ۶ ماه بعد (۳۱/۲۲) تقریباً ثابت بود که میزان $P = 0.643$ نشان دهنده عدم معنی‌داری این میزان تفاوت بود. در بررسی نوع شکست طبق جدول ۵ دیده شد که در زمان تست فوری شکست غالب در تمام گروه‌ها شکست Mixed بود. اما پس از ۶ ماه در گروه کنترل شکست نوع Adhesive in dentin-bonding غالب بود ولی در گروه EDC و CHX شکست غالب همچنان نوع Mixed بود.

در هر گروه یک نمونه به صورت کیفی توسط میکروسکوپ SEM مورد بررسی قرار گرفت و تصاویر زیر با بزرگنمایی ۸۰۰ برابر بدست آمد (اشکال ۳-۱).

جدول ۱- میانگین (انحراف معیار) استحکام باند فوری گروه‌های مطالعه بر حسب مگاپاسکال

گروه‌ها	میانگین (انحراف معیار) استحکام باند فوری	نتیجه آزمون ANOVA
کنترل	۳۲/۱۵ (۲/۶۳)	P=۰/۹۷۹
EDC	۳۱/۸۸ (۲/۴۰)	
CHX	۳۱/۹۶ (۲/۸۸)	

جدول ۲- میانگین (انحراف معیار) استحکام باند گروه‌های مطالعه پس از ۶ ماه بر حسب مگاپاسکال

گروه‌ها	میانگین (انحراف معیار) استحکام باند پس از ۶ ماه	نتیجه آزمون ANOVA
کنترل	۲۰ (۲/۱۶)	P=۰/۰۰۰۱
EDC	۳۱/۲۲ (۲/۰۵)	
CHX	۲۹/۳۵ (۳/۶۳)	

جدول ۳- مقایسه استحکام باند فوری و ۶ ماه گروه‌ها به صورت دو به دو با استفاده از آزمون Tukey

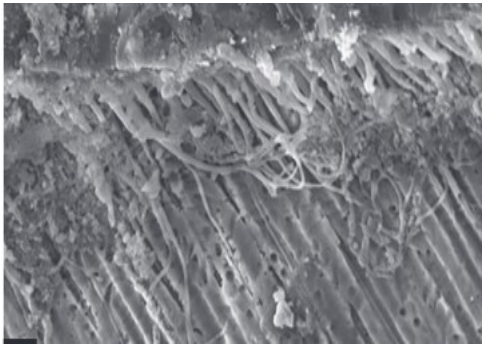
گروه	تفاوت میانگین استحکام باند			
	فوری	پس از ۶ ماه	فوری	پس از ۶ ماه
کنترل و EDC	۰/۲۶۲	۱۰/۸۶	۰/۹۷۹	۰/۰۰۰۱
کنترل و CHX	۰/۱۸۷	۸/۹۸	۰/۹۸۹	۰/۰۰۰۱
CHX و EDC	۰/۰۷۵	۱/۸۷	۰/۹۹۸	۰/۳۶۸

جدول ۴- مقایسه میانگین (انحراف معیار) استحکام باند فوری و ۶ ماه در هر گروه با استفاده از Paired.T. Test

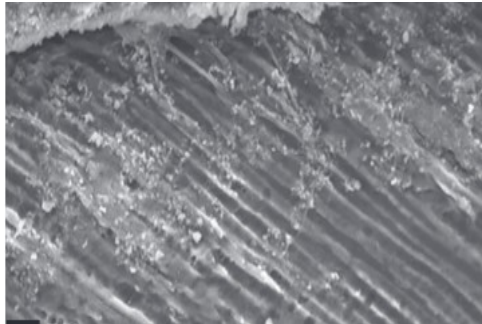
نتیجه Paired.T. Test	استحکام باند فوری		گروه‌ها
	میانگین (انحراف معیار)	استحکام باند پس از ۶ ماه	
P=۰/۰۰۰۱	۳۲/۱۵ (۲/۶۰)	۲۰/۳۶ (۲/۱۶)	کنترل
P=۰/۶۴۳	۳۱/۸۸ (۲/۴۰)	۳۱/۲۲ (۲/۰۵۲)	EDC
P=۰/۰۱۵	۳۱/۹۶ (۲/۸۸)	۲۹/۳۵ (۳/۶۳)	CHX

جدول ۵- توزیع مدل‌های شکست در ۶ گروه (n=۸)

گروه‌ها	زمان تست	نوع شکست			
		Mixed	Adhesive	Cohesive in composite	Cohesive in dentin
کنترل	فوری	۵	۳	—	—
	پس از ۶ ماه	۲	۵	—	۱
EDC	فوری	۶	۱	۱	—
	پس از ۶ ماه	۵	۲	۱	—
CHX	فوری	۵	۲	—	۱
	پس از ۶ ماه	۴	۳	۱	—

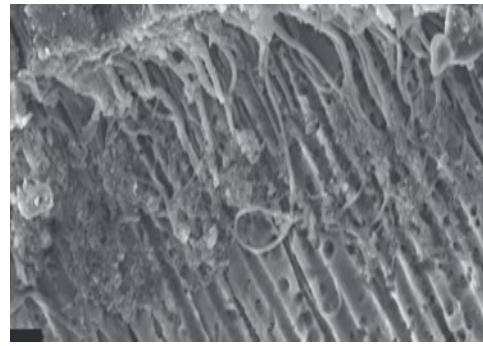


فوری

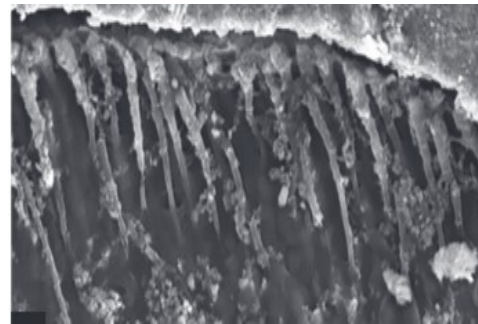


پس از ۶ ماه

شکل ۳- SEM مدل شکست نمونه‌های گروه CHX پس از باند فوری و پس از گذشت ۶ ماه mixed

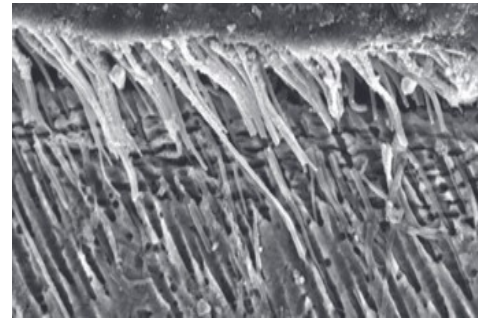


فوری

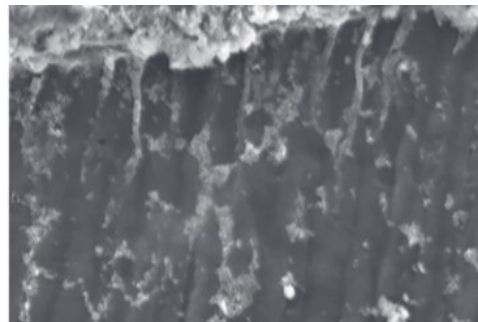


پس از ۶ ماه

شکل ۱- SEM مدل شکست نمونه‌های گروه EDC پس از باند فوری و پس از گذشت ۶ ماه mixed



فوری



پس از ۶ ماه

شکل ۲- SEM مدل شکست نمونه‌های گروه کنترل پس از باند فوری mixed و پس از گذشت ۶ ماه adhesive

بحث و نتیجه‌گیری

دوام دراز مدت باند امروزه مسأله‌ای است که توجه بیشتر محققین را به خود معطوف کرده است. علی‌رغم پیشرفت‌های بسیار واضح در سال‌های اخیر، ایتترفیس باند هنوز ضعیف‌ترین ناحیه کمپلکس ترمیم است (۲۹).

هدف از این مطالعه مقایسه تأثیر دو نوع مهار کننده آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز بنام کربودی‌ایمید و کلرهگزیدین بر استحکام باند کامپوزیت به عاج تاجی بود. نتایج این مطالعه نشان داد، در میانگین استحکام باند کششی گروه‌های مورد مقایسه در استفاده از ۲ نوع محلول پیش‌درمانی مورد مطالعه (EDC, CHX) چه در زمان (۲۴ ساعت) تست فوری ($P=0/99$) و چه پس از ۶ ماه ($P=0/36$) تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت. بنابراین فرضیه صفر اول مبنی بر تفاوت میانگین استحکام باند کششی گروه‌های مورد مقایسه در استفاده از ۲ نوع محلول پیش‌درمانی مورد مطالعه (EDC, CHX) رد شد.

فوری با نتایج بسیاری از مطالعات از جمله Breschi, Brackett, Carrilho, Komori و Loguercio مطابق می‌باشد (۳۷-۳۳). Ricci و همکاران (۳۸) نیز بدلیل مشابهت مقادیر استحکام باند فوری عاج اسید اچ شده پیش درمانی شده با CHX با گروه پیش درمانی نشده دریافتند، علیرغم اینکه CHX مولکولی بزرگ با جرم مولکولی بالاتر در مقایسه با برخی اجزای مونومری سیستم های ادهزیو از قبیل HEMA و Bis-GMA می‌باشد، نفوذ مونومر را به داخل عاج دیمینرالیزه به طور منفی تحت تأثیر قرار نمی‌دهد، که در مورد مقایسه استحکام باند فوری CHX و کنترل در مطالعه حاضر صدق می‌کند.

مقالات متعدد دیگر نیز تأثیر منفی در مورد پیش درمانی عاج با CHX پس از اسید اچ و قبل از کاربرد سیستم ادهزیو نیافتند (۳۹،۴۰). علی‌رغم گزارشات در مورد تاثیر مثبت CHX روی دوام باند عاجی، این تاثیر در برخی مطالعات تأیید نشده است. جذب آب و باند الکترواستاتیک قابل برگشت نتیجه دوام تأثیر مهاری را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵).

در بسیاری از مطالعات *in vitro* کلرهگزیدین قادر به کاهش افت استحکام باند در طول زمان می‌باشد، اما از آن جلوگیری نمی‌کند که مطابق یافته‌های مطالعه حاضر می‌باشد.

در سال Yiu و همکاران (۴۱) مدارک واضحی از تأثیر مهاری روی آنزیم‌های کلاژنولیتیک عاجی نشان داد. از آن به بعد مطالعات بسیاری نشان دادند که CHX می‌تواند یکپارچگی ساختاری ماتریکس کلاژنی لایه هیبرید را حفظ کند و کاهش استحکام باند عاجی در طول زمان را چه در *in vivo* چه در *in vitro* تقلیل دهد که در مطالعه حاضر نیز پس از استفاده از CHX نسبت به گروه کنترل تخریب باند کمتری پس از ۶ ماه دیده شد.

Breschi و همکاران (۳۷) در سال ۲۰۱۰ نتیجه گرفتند که اگر CHX بر روی لایه عاجی اچ شده قبل از جایگذاری ادهزیو به کار رود باعث حفظ استحکام باند و دوام ترمیم ادهزیو دندانی نسبت به گروه کنترل می‌گردد. اما میزان کاهش استحکام باند در مطالعه آن‌ها بسیار بیشتر از مطالعه حاضر بود که می‌تواند به دلیل مدت زمان کوتاه‌تر کاربرد CHX (۳۰ ثانیه) باشد.

Dutra-Correa و همکاران (۴۲) گزارش کردند که کاربرد CHX قبل از کاربرد ادهزیو کارایی کلینیکال را بیش از ۱۸ ماه تحت تأثیر

همچنین با مقایسه میانگین استحکام باند کششی گروه‌های مورد مقایسه در زمان‌های مختلف (بلافاصله و ۶ ماه) در گروه کنترل تفاوت آماری واضحی وجود داشت که در گروه CHX تفاوت اندک اما از لحاظ آماری معنی‌دار بود. اما در مورد EDC تفاوت آماری واضحی دیده نشد. بنابراین فرضیه صفر دوم بر اساس تفاوت میانگین استحکام باند کششی گروه‌های مورد مقایسه در زمان‌های مورد مطالعه (یک روز و ۶ ماه)، در مورد گروه کنترل و CHX پذیرفته اما در مورد گروه EDC رد شد.

تشکیل لایه هیبرید رزین اینفیلتره کامل برای تأمین ادهیژن موفق و با دوام به عاج انسانی ضروری است. باند به عاج به علت رطوبت و طبیعت هیدروفیل آن، هنوز چالش بزرگی است و علی‌رغم بهبودها در شیمی سیستم‌های ادهزیو کنونی، مسئله تخریب لایه هیبرید به مرور زمان وجود دارد و باعث کاهش استحکام باند می‌گردد.

کاهش استحکام باند به مرور زمان ممکن است به دلیل نفوذ آب در طول لایه هیبرید و یا تخریب فیبریل‌های کلاژن انفیلتره نشده توسط ادهزیو در انتهای لایه هیبرید باشد. بنابراین حفاظت از یکپارچگی ماتریکس کلاژن برای تقویت دوام باند عاجی ضروری است (۲،۳۰).

این تخریب به آنزیم‌های MMP در ماتریکس عاجی نسبت داده می‌شوند که به صورت فیزیولوژیک غیر فعال هستند اما توسط تغییرات PH ایجاد شده توسط اسید اچینگ، مونومرهای اسیدی در ادهزیوهای دندانی و یا چالش‌های پوسیدگی فعال می‌گردند.

فعالیت کلاژنولیتیک MMPs توسط مهارکننده‌های اختصاصی از قبیل کلرهگزیدین دی‌گلوکونات مهار می‌شود. بیشتر آزمایشات طراحی شده برای تقویت دوام باند عاجی به وسیله مهار آنزیم با استفاده از CHX انجام شده است (۲۱). همچنین بیشتر مطالعات از غلظت ۲٪ استفاده شده است. CHX آنزیم آنتی میکروبیال قوی می‌باشد که به طور مؤثری ۲-۸-۹ MMP و سیستمین کاتپسین را مهار می‌کند (۳۱).

Gendron و همکاران (۳۲) در سال ۱۹۹۹ دریافتند که ۰/۰۰۲ درصد کمترین غلظت CHX برای مهار کامل MMP ۹ است و در حالی که ۰/۰۰۱ درصد موجب مهار کامل فعالیت MMP ۲ می‌گردد.

نتایج مطالعه حاضر در مورد عدم تأثیر CHX در استحکام باند

قرار نمی‌دهد. که می‌تواند به دلیل جذب آب و باند الکترواستاتیک برگشت پذیر CHX باشد.

دوام اثربخشی CHX می‌تواند توسط محبوس شدن در اینترفیس باند توضیح داده شود. که امکان حذف آن توسط مایع عاجی به وسیله تشکیل رزین تگ‌ها که توپول‌ها را مسدود می‌کنند به حداقل می‌رسد. البته در مطالعه حاضر به دلیل aging نمونه‌ها در محلول آبی نرمال سالین، پس از انجام برش و تبعاً اثر بیشتر جذب آب بر حذف CHX از اینترفیس که دارای باند نسبتاً ضعیفی است، کاهش استحکام باند پس از ۶ ماه در این گروه از لحاظ آماری معنی‌دار بود. گرچه به دلیل اینکه کاهش روی داده بسیار اندک می‌باشد، این میزان کاهش از لحاظ کلینیکی معنی‌دار نمی‌باشد و نسبت به گروه کنترل حفاظت از باند دیده شد.

بنابراین هرچند CHX هر دو MMPs و سیستئین کاتپسین‌ها را مهار می‌کند معایب احتمالی این است که CHX می‌تواند از لایه هیبرید در عرض ۱۸-۲۴ ماه شسته شود (۴۲).

کاهش پیشرونده در مقادیر استحکام باند نشان دهنده تخریب باند رزین عاج است. هرچند در گروه درمان شده با CHX کاهش استحکام باند، سرعت مشخصاً کمتری داشت. زیرا پس از aging به مدت ۶ ماه استحکام باند ریزکشی در گروه کنترل ۳۰٪ و در گروه CHX ۸٪ کاهش داشت.

استفاده از عوامل کلاژن کراس لینکر در فرآیند ادهزیو در سال‌های اخیر با افزایش محبوبیت روبرو بوده است (۱۶،۲۲،۲۳،۴۳). استفاده از کراس لینکرها می‌تواند به عنوان یک روش بیولوژیک مهندسی بافت در نظر گرفته شود. بدین صورت که تقویت ویژگی‌های سوبسترا توسط تغییر شیمی بافت صورت می‌گیرد (۴۴،۴۵).

چنین فرض می‌شود که عوامل کراس لینک ترکیب سه بعدی بخش کاتالیتیک MMPs ها را تغییر می‌دهند (۴۶)، یا شارژ منفی گروه‌های کربوکسیل یونیزه را به شارژ مثبت گروه‌های آمیدی تغییر می‌دهد تا MMPs ها را غیر فعال کند. به دلیل اینکه MMPs ها درعاج تکثیر نمی‌شوند غیر فعال سازی آن‌ها با عوامل کراس لینک باید زمان طولانی باقی بماند و ممکن است حتی از MMP inhibitor ها مؤثر تر باشند (۳۷).

EDC نشان داده شده است که نتایج امیدوار کننده‌ای در کاهش

تخریب کلاژن عاجی و حفظ استحکام باند عاجی در طول زمان، با روش کاربرد کلینیکی قابل قبول داشته است. کراس لینک کلاژن عاجی با EDC تخریب را کاهش می‌دهد و ویژگی‌های مکانیکال کلاژن عاجی را تقویت می‌کند. این فرآیند با فعال سازی گروه‌های کربوکسیل از گلوتامیک اسید و اسپارتیک اسید در پروتئین‌ها عمل می‌کند و سپس با کراس لینک اسیدهای آمینه، باندهای پپتیدی جدید و باثباتی ایجاد می‌کند و کاهش حرکت مولکولار و ساپرس فعالیت آنزیمی را باعث می‌شود. Tezvergil-Mutluay و همکاران (۴۷) نتیجه گرفتند که EDC-HCL قابلیت کراس لینک زنجیره‌های پپتیدی در MMPs و سیستئین کاتپسین‌های باند شده به ماتریکس عاجی را دارند. این باعث کاهش حرکت مولکولار و ساپرس فعالیت آنزیمی می‌گردد که در روش اندازه‌گیری کارایی کراس لینک EDC با مطالعه حاضر تفاوت داشت بدین صورت که به صورت شیمیایی با استفاده از کیت سنجش MMP مستقیماً فعالیت این آنزیم‌ها بررسی و غلظت ۰/۳ مول و زمان یک دقیقه پیشنهاد شد که در مطالعه حاضر نیز استفاده شد.

در مطالعه دیگری که توسط Mazzoni و همکاران (۴۸) انجام شد، پیش درمانی با EDC به مدت یک دقیقه انجام و سپس پروسه باند با استفاده از دو سیستم باندینگ سلف اچ و E&R صورت گرفت. نتایج استحکام باند نشان دهنده تقویت دوام و یکپارچگی ساختاری اینترفیس عاج رزین توسط EDC با هر دو نوع ادهزیو دیده شد که وابسته به سیستم ادهزیو نمی‌باشد. البته این تأثیر در استفاده از ادهزیوسلف اچ کمی بیشتر بود که می‌تواند به دلیل این واقعیت باشد که ادهزیو سلف اچ ماتریکس کلاژنی عاج را به طور کامل اکسپوز نمی‌کند و در واقع کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت بیشتری در لایه هیبرید باقی می‌مانند که فعال سازی MMPs را به حداقل می‌رساند.

بر خلاف CHX که تنها باند الکترواستاتیک با عاج برقرار می‌کند، EDC با عاج برای برقراری باند کوالانسی واکنش می‌دهد. در واقع CHX به نظر می‌رسد که یون‌های Ca^{2+} و Zn^{2+} را روی سایت‌های فعال آنزیم چلاته می‌کند تا آن را مهار کند. کراس لینکرها از جمله EDC با ایجاد کراس لینک در زنجیره‌های کلاژن آن را سفت می‌کنند بنابراین ساختار کلاژن به باز شدن مقاوم‌تر می‌گردد. کراس لینکرها همچنین می‌توانند پروتئازها را کراس لینک کرده و مستقیماً با فانکشن آن‌ها

مطلوب و پیوستن به سوبسترای کلازنی تیپ ۱ جلوگیری نماید. از آنجا که MMPs در عاج محیطی turn over نمی‌شوند، غیر فعال‌سازی آن‌ها توسط عوامل کراس لینکری همچون EDC باید برای مدت طولانی باقی بماند و ممکن است پس از گذشت زمان بیشتر بسیار مؤثرتر از مهارکننده‌هایی چون CHX باشد (۱۷،۵۰).
CHX و EDC براستحکام باند فوری بی‌تأثیر بودند. در صورتی که پس از ۶ ماه تفاوت آماری واضحی در استحکام باند دو گروه CHX و EDC نسبت به گروه کنترل دیده شد.
حفظ استحکام باند پس از ۶ ماه توسط EDC دیده شد، بنابراین استفاده از EDC در حفظ دوام باند عاجی طی مدت زمان ۶ ماه موفقیت آمیز بود. این در حالی است که گروه بدون پیش درمانی با کاهشی حدود ۳۰٪ در استحکام باند طی این مدت زمان روبرو شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان نامه تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد به شماره ۱۵۲ ت می‌باشد که بدین وسیله قدردانی می‌گردد. در ضمن از مشاور آمار این پایان نامه جناب آقای دکتر فلاح زاده سپاسگزاری می‌گردد.

تداخل کنند (۴۹). نتایج مطالعه حاضر حفاظت بیشتر از باند در گروه EDC طی زمان ۶ ماه نسبت به گروه CHX دیده شد، که از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

نتایج آزمایشات استحکام باند توسط بررسی توزیع مدل‌های شکست نیز تأیید گردید. بدین صورت که در زمان تست فوری نوع شکست غالب بین تمام گروه‌ها Mixed بود اما پس از گذشت ۶ ماه به دلیل کاهش واضح استحکام باند در گروه کنترل بیشتر شکست‌ها از نوع ادهزیو بود. گرچه در گروه EDC به دلیل حفظ استحکام باند نسبت به گروه کنترل همچنان شکست غالب از نوع Mixed وجود داشت.

آزمایشات SEM نیز با نشان دادن مشابهت در میزان و حجم رزین تگ‌ها در زمان تست استحکام باند فوری و همچنین مشاهده تخریب رزین تگ‌ها در گروه کنترل پس از گذشت ۶ ماه و تخریب بسیار کمتر در گروه CHX و ثبات اجزای لایه هیبرید در گروه EDC نسبت به زمان تست فوری نتایج تست‌های استحکام باند را تأیید کرد.

در واقع عوامل کراس لینکر می‌توانند کراس لینک‌های متعددی بین اسیدهای آمینه داخل سایت‌های کاتالیتیک آنزیم‌ها ایجاد کنند که به طور غیر قابل برگشت ساختار سه بعدی آن‌ها و انعطاف‌پذیری قسمت کاتالیتیک شیار مانند آن‌ها را تغییر می‌دهد و از تشخیص

منابع:

- 1- Karrabi M, Davari AR, Danesh Kazemi AR. Comparison Of Chlorhexidine 2% And Sodium Hypochlorite 5% As Rewetting Agents On Resin- Dentin Micro Tensile Bond Strength. *J Dent Mater Tech*. 2016;5(4):189-95.
- 2- Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability-A literature review. *Dent Mater*. 2016;32(2):e41-53.
- 3- Hashimoto M. A review-micromorphological evidence of degradation in resin-dentin bonds and potential preventional solutions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;92(1):268-80.
- 4- Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;88(2):558-78.
- 5- Kermanshahi S, Santerre JP, Cvitkovitch DG, Finer Y. Biodegradation of resin-dentin interfaces increases bacterial microleakage. *J Dent Res*. 2010;89(9):996-1001.
- 6- Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):17-28.
- 7- Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):1-16.
- 8- Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Tjaderhane L, Breschi L, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of pH on dentin protease inactivation by carbodiimide. *Eur J Oral Sci*. 2017;125(4):288-93.
- 9- Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008;24(1):90-101.
- 10- Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjaderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res*. 2012;91(5):467-72.
- 11- Perdigao J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013;25(4):219-41.
- 12- Baseggio W, Consolmagno EC, de Carvalho FL, Ueda JK, Schmitt VL, Formighieri LA, et al. Effect of deproteinization and tubular occlusion on microtensile bond strength and marginal microleakage of resin composite restorations. *J Appl*

Oral Sci. 2009;17(5):462-68.

13- Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007;65(1):1-13.

14- Stape THS, Tjaderhane L, Tezvergil-Mutluay A, Da Silva WG, Dos Santos Silva AR, da Silva WJ, et al. In situ analysis of gelatinolytic activity in human dentin. *Acta Histochem.* 2018;120(2):136-41.

15- Femiano F, Femiano R, Femiano L, Jamilian A, Rullo R, Perillo L. Dentin caries progression and the role of metalloproteinases: an update. *Eur J Paediatr Dent.* 2016;17(3):243-47.

16- Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee K, Turco G, de Souza Costa CA, et al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. *Oper Dent.* 2014;39(2):152-8.

17- Mazzoni A, Tjaderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res.* 2015;94(2):241-51.

18- Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, Ruggeri A, Jr, et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent.* 2011;39(3):231-37.

19- Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjaderhane L, Gobbi P, Nucci C, et al. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: biochemical and immunohistochemical analysis. *J Dent.* 2011;39(7):470-75.

20- Ou Q, Hu Y, Yao S, Wang Y, Lin X. Effect of matrix metalloproteinase 8 inhibitor on resin-dentin bonds. *Dent Mater.* 2018;34(5):756-63.

21- Moon PC, Weaver J, Brooks CN. Review of matrix metalloproteinases' effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. *Open Dent J.* 2010;4(1):63-9.

22- Jain K, Beri L, Kunjir K, Borse N, Neekhara N, Kadam A. Comparative evaluation of the effect of 10% sodium ascorbate, 10% hesperidin, 1% riboflavin 5 phosphate, collagen cross-linkers, on the pushout bond strength of fiber postluted to radicular dentin: In vitro study. *J Conserv Dent.* 2018;21(1):95-9.

23- Venigalla BS, Jyothi P, Kamishetty S, Reddy S, Cherukupalli RC, Reddy DA. Resin bond strength to water versus ethanol-saturated human dentin pretreated with three different cross-linking agents. *J Conserv Dent.* 2016;19(6):555-9.

24- Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;94(1):250-5.

25- Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, et al. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dent Mater.* 2014;30(2):227-33.

26- Wang M, Da L, Xie Y, Xie H. Application of genipin for modification of natural biomaterials as a crosslinking agent. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2013;27(5):580-5.

27- Strobel S, Hellwig E. The effects of matrix-metalloproteinases and chlorhexidine on the adhesive bond. *Swiss Dent J.* 2015;125(2):134-45.

28- Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res.* 2012;91(4):420-5.

29- Stape TH, Menezes MS, Barreto BC, Aguiar FH, Martins LR, Quagliatto PS. Influence of matrix metalloproteinase synthetic inhibitors on dentin microtensile bond strength of resin cements. *Oper Dent.* 2012;37(4):386-96.

30- Pucci CR, Gu LS, Zhang HY, Song Q, Xia VW, Davis LB, et al. Water-associated attributes in the contemporary dentin bonding milieu. *J Dent.* 2018.

31- Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials.* 2005;26(9):1035-42.

32- Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(3):437-9.

33- Loguercio AD, Hass V, Gutierrez MF, Luque-Martinez IV, Szezs A, Stanislawczuk R, et al. Five-year Effects of Chlorhexidine on the In Vitro Durability of Resin/Dentin Interfaces. *J Adhes Dent.* 2016;18(1):35-42.

34- Komori PC, Pashley DH, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, de Goes MF, et al. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2009;34(2):157-65.

35- Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent.* 2009;34(4):379-83.

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

37- Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjaderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater.* 2010;26(4):320-5.

38- Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(4):411-6.

39- Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent.* 2009;37(2):108-14.

40- Abu Nawareg M, Elkassas D, Zidan A, Abuelenain D, Abu Haimed T, Hassan AH, et al. Is chlorhexidine-methacrylate as effective as chlorhexidine digluconate in preserving resin dentin interfaces? *J Dent.* 2016;45:7-13.

41- Yiu CK, Hiraishi N, Tay FR, King NM. Effect of chlorhexidine incorporation into dental adhesive resin on durability of resin-dentin bond. *J Adhes Dent.* 2012;14(4):355-62.

42- Dutra-Correa M, Saraceni CH, Ciaramicoli MT, Kiyan VH,

- Queiroz CS. Effect of chlorhexidine on the 18-month clinical performance of two adhesives. *J Adhes Dent.* 2013;15(3): 287-92.
- 43- Maravic T, Breschi L, Comba A, Cunha SR, Angeloni V, Nucci C, et al. Experimental use of an acrolein-based primer as collagen cross-linker for dentine bonding. *J Dent.* 2018;68: 85-90.
- 44- Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater.* 2014;30(1):62-76.
- 45- Bedran-Russo AK, Zamperini CA. New Preventive Approaches Part II: Role of Dentin Biomodifiers in Caries Progression. *Monogr Oral Sci.* 2017;26:97-105.
- 46- Busenlehner LS, Armstrong RN. Insights into enzyme structure and dynamics elucidated by amide H/D exchange mass spectrometry. *Arch Biochem Biophys.* 2005;433(1): 34-46.
- 47- Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, et al. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *J Dent Res.* 2012;91(2):192-6.
- 48- Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjaderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, et al. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res.* 2013;92(1):82-6.
- 49- Zhang Z, Beitzel D, Majd H, Mutluay M, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, et al. Effect of carbodiimide on the fatigue crack growth resistance of resin-dentin bonds. *Dent Mater.* 2016;32(2):211-22.
- 50- Cova A, Breschi L, Nato F, Ruggeri Jr A, Carrilho M, Tjaderhane L, et al. Effect of UVA-activated riboflavin on dentin bonding. *J Dent Res.* 2011;90(12):1439-45.