

Ana Isabella Arruda Meira Ribeiro¹, Darlene Cristina Ramos Eloy Dantas¹, Jose Wrban Garcia da Silva¹, Gymenna Maria Tenorio Guenes², Rodivan Braz³, Alessandro Leite Cavalcanti¹

Vliv doby aplikace antioxidantu na deproteinizovaný dentin: studie SEM/EDS

1 Stomatologická škola, Státní univerzita Paraíba, Campina Grande, PB, Brazílie

2 Stomatologická škola, Federální univerzita Campina Grande, Patos, PB, Brazílie

3 Fakulta stomatologie, Univerzita Pernambuco, Camaragibe, PE, Brazílie

Úvod

Pronikání pryskyřičného monomeru do dentinových tubulů a jejich větví a jeho impregnace tenké vrstvy demineralizované intertubulární kolagenové matrice odhalené následkem leptání kyselinou jsou důležitými složkami při lepení pryskyřičných materiálů na dentin (1). Překážky, které mohou zkomplikovat adhezi dentinu, zahrnují chemické složení (organický a vodní obsah); strukturální topografické odchylky (počet a průměr dentinových tubulů); a přítomnost nečisté vrstvy z důvodu přípravy zubu. K poruše adheze mohou vést i smrštění při polymerizaci, rozdíly v koeficientech tepelné a hygroskopické expanze kompozitních pryskyřic, kdy vznikají drobné mezery a následné mikro úniky (2). Prvořadé je vytvoření hybridní vrstvy tvořené směsí adhesivních monomerů a dentinové matrice, aby bylo zajištěno okamžité slepení a stabilita těsnosti (3). Je velmi dobře známo, že kvalita pryskyřičných dentinových pojiv je ovlivněna mírou infiltrace pryskyřice do odkrytého kolagenu (4).

Jako strategie prevence pozdější degradace, která může ohrozit dlouhověkost pryskyřičných dentinových pojiv (5) zvýšením navlhavosti a vytvořením více hydrofilního povrchu, protože kolagen má nízkou povrchovou energii (6), se doporučuje úplné odstranění kolagenové matrice pomocí chlornanu sodného (NaOCl) před postupem lepení dentinu. Roztoky chlornanu sodného se používají na celém světě díky jejich antimikrobiálním vlastnostem (7). Kromě odstranění exponovaných kolagenových vláken leptáním kyselinou použití NaOCl rozpouští exponovanou organickou složku v povrchu dentinu (8).

Pravděpodobně potíže s proteolytickou úpravou spojené s existencí zbývajících volných radikálů danou degradací NaOCl dentinu by vedly k nedostatečné polymerizaci z důvodu urychleného ukončení polymerového řetězce (9). Nicméně ošetření dentinu opláchnutého v NaOCl kyselinou askorbovou nebo askorbanem sodným vrací pevnost vazby na přijatelnou úroveň (10,11).

Cílem této studie je posoudit in vitro vliv doby aplikace antioxidantního činidla (10% askorbanu sodného) na deproteinizovaný dentin a to skenováním elektronovým mikroskopem/energieově disperzní spektroskopii (SEM/EDS).

Materiály a metody

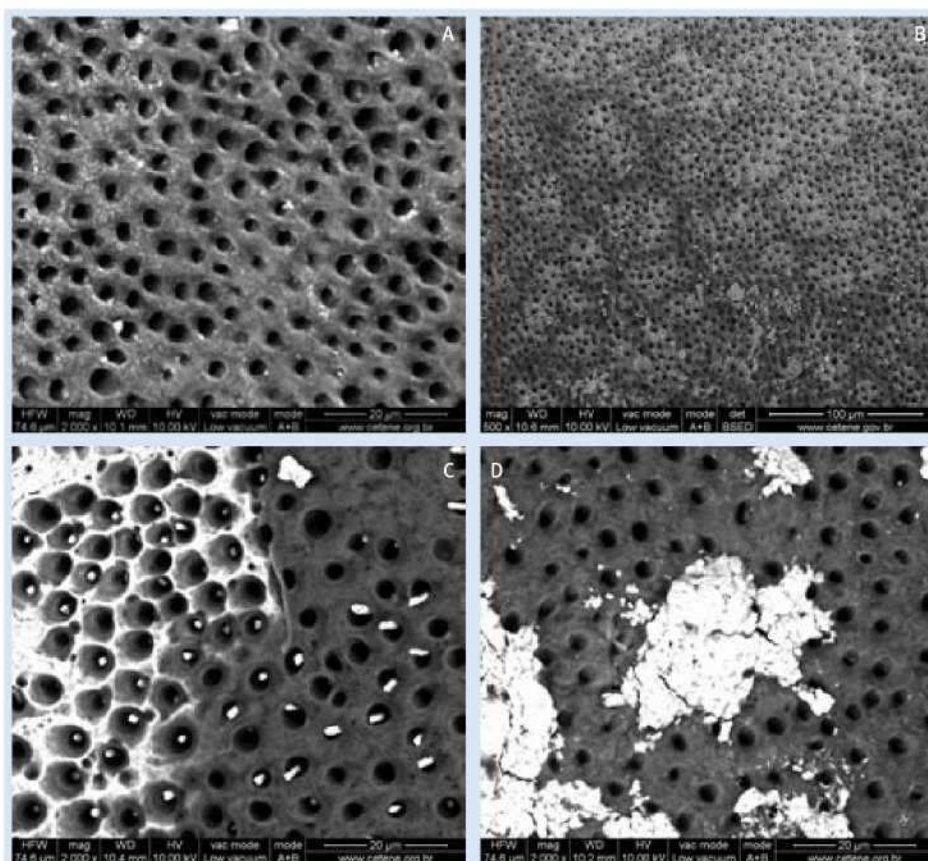
Sedm čerstvě vytržených lidských třetích stoliček bylo vyčištěno a uloženo do 1% thymolového roztoku při teplotě 4°C na maximálně 6 měsíců. Po vizuální kontrole, zda nevykazují nedokonalé obrysy, byly připravené zuby náhodně rozděleny do sedmi skupin, podle použitého odlišného ošetření povrchu (tabulka 1).

Okluzní sklovina byla odstraněna řezem kolmo k podélné ose zubu, asi 1 mm od špičky, paralelně ke středové rýze, pomocí oboustranného diamantového kotouče (SSWhite, Rio de Janeiro, Brazílie), který se otáčí nízkou rychlostí (200 ot./min.) s neustálým oplachem, aby se odhalil povrch.

Tabulka 1 Rozdělení skupin podle použití deproteinizačního a antioxidačního činidla.			
Skupina	Demineralizační ošetření	Ošetření s NaOCl	Ošetření antioxidantem
G1	Bez 37% H ₃ PO ₄	Bez 10% NaOCl	Bez askorbanu sodného
G2	37% H ₃ PO ₄	Bez 10% NaOCl	Bez askorbanu sodného
G3	37% H ₃ PO ₄	10% NaOCl	bez 10% askorbanu sodného
G4	37% H ₃ PO ₄	10% NaOCl	10% askorbanu sodného 15s
G5	37% H ₃ PO ₄	10% NaOCl	10% askorbanu sodného 30s
G6	37% H ₃ PO ₄	10% NaOCl	10% askorbanu sodného 1 min
G7	37% H ₃ PO ₄	10% NaOCl	10% askorbanu sodného 10 min

Pomocí leštičky (Panambra, Sao Paulo, Brazílie) je dentinový povrch zdrsňen silikonovými karbidovými abrasivy s klesající hrubostí 180, 240, 320 a 600, respektive, s chlazením vodou, a pomocí oboustranného diamantového kotouče (SSWhite, Rio de Janeiro, Brazílie), vznikne kotouč dentinu o tloušťce 1 mm.

Pro provedení rozboru složení povrchu dentinu pomocí SEM/EDS bylo souběžně analyzováno 7 vzorků, a to následovně: G1: zdravý dentinový substrát, G2: demineralizovaný dentinový substrát s 37% kyselinou fosforečnou (Attaque gel, Biod- inamica, Ibipora, PR, Brazílie) po dobu 15 s (demineralizace), důsledně podle doporučení výrobce, G3: deproteinizovaný dentinový substrát po demineralizaci, 10% vodní roztok chlornanu sodného (Phormula Ativa, Recife, PE, Brazílie) po dobu 60 s při konstantním míchání (deproteinizace), (12), G4, G5, G6 a G7: demineralizovaný, deproteinizovaný dentinový substrát po použití 10% askorbanu sodného (Phormula Ativa, Recife, PE, Brazílie) na dobu 15 s, 30 s, 60 s, 10 min, respektive. Vzorky byly upevněny na čepy pomocí oboustranné uhlíkové pásky a byly zkoumány skenováním pomocí elektronového mikroskopu (Quanta 2000 - Fei Company) vybaveného energiově disperzní spektroskopií s urychlovacím napětím 10 KV při x 2 000 zvětšení ve vakuu. V každém vzorku se kvantitativně posuzovalo 5 oblastí, severně, jižně, východně, západně a uprostřed pomocí EDS (13). Průměrné hodnoty EDS a standardní odchylky byly načteny a analyzovány statisticky pomocí zkoušek Mann-Whitney a Kruskal- Wallis s párovaným porovnáváním. Míra významnosti ve výši 5% byla použita u všech statistických zkoušek.



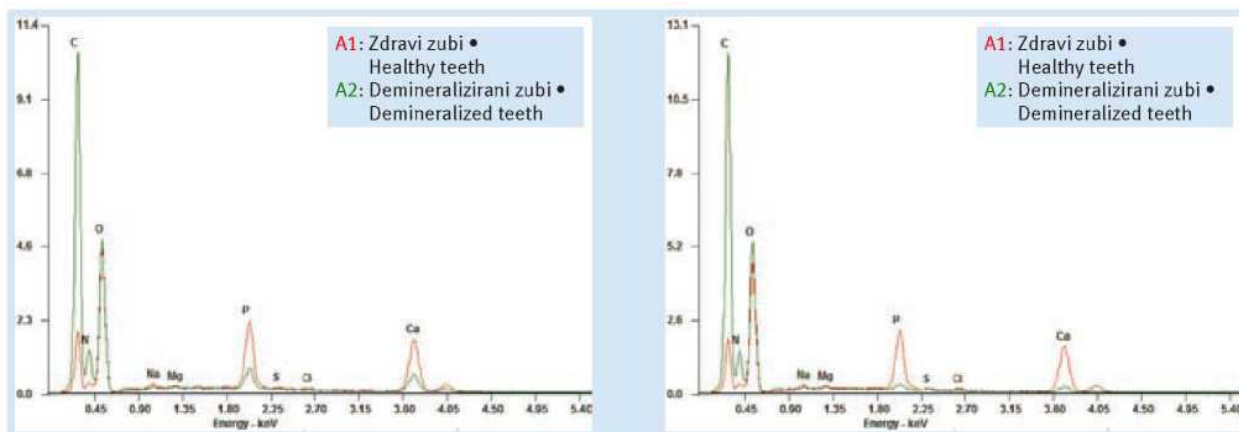
Obrázek 1 (A) Vzhled dentinu po deproteinizaci a po použití askorbanu sodného po dobu 15s; (B) 30s; (C) 60s; (D) 10 min.

Výsledky

Analýza SEM ukázala, že po použití 10% askorbanu sodného na dobu 15 s, 30 s, 60 s a 10 min (Obr. 1 A-D) došlo k progresivnímu ukládání krystalů askorbanu sodného s tím, jak se navyšovala doba použití, a ke vzniku krusty na dentinovém substrátu, což vedlo k okluzi u některých dentinových tubulů. Kvantitativní rozbor pomocí SEM/ EDS ukázal značné navýšení uhlíkových iontů ($p = 0,016$) a dusíkových iontů ($p = 0,008$) u vzorku spolu se značným poklesem kyslíkových iontů ($p = 0,008$), fosforečných iontů ($p = 0,016$) a sodíkových iontů ($p = 0,008$) během demineralizace dentinového substrátu (obr. 2). Nebyl zjištěn žádný výrazný rozdíl mezi G2 a G3 ($P > 0,05$) (obr. 3). Nicméně použití 10% askorbanu sodného na dobu 60 s vedlo k poklesu hladiny kyslíku ($P = 0,029$), magnesia ($P = 0,019$) a sodíku ($P = 0,029$) (obr. 4).

Diskuse

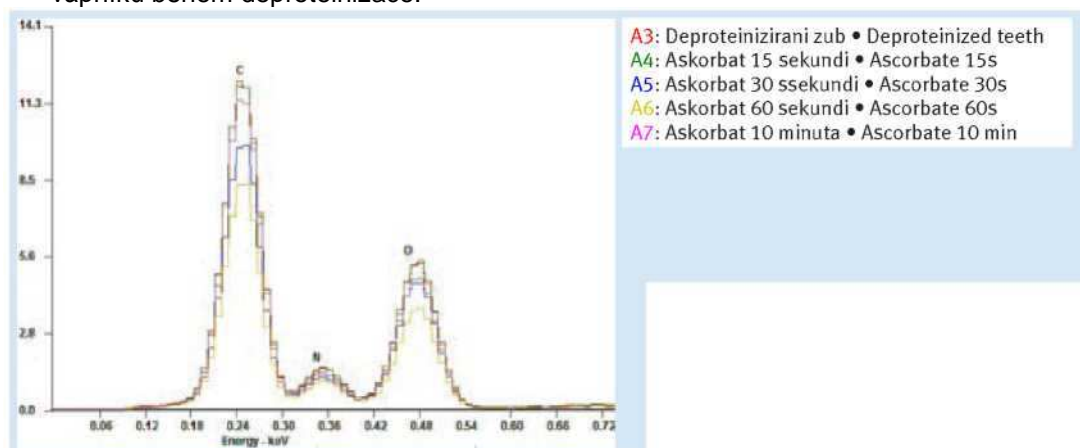
Stabilita pryskyřičného dentinového pojiva má nejvyšší důležitost pro trvanlivost postupů lepení v restorativní stomatologii (14), protože mikro úniky obvykle vedou k hypersenzitivitě dentinu, sekundárním kazům, marginální pigmentaci a nakonec poškození dřeně (15).



A1 – zdravý zub A2 - demineralizovaný zub

Obr. 2 Kvantitativní rozbor hladiny uhlíku, dusíku, kyslíku, sodíku, magnesia, fosforu, síry, chloridu a vápníku během demineralizace.

Obr. 3 Kvantitativní rozbor hladiny uhlíku, dusíku, kyslíku, sodíku, magnesia, fosforu, síry, chloridu a vápníku během deproteinizace.



Obr. 4 Kvantitativní rozbor hladiny uhlíku, dusíku a kyslíku během použití 10% askorbanu sodného na dobu 15 s, 30s, 60 s a 10 min.

Zařízení pro lepení pryskyřice na dentin bylo určeno podle několika faktorů, které zahrnují vytvoření hybridní vrstvy, rozmnožení hydrofilních monomerů v intertubulárním dentinu, výskyt stop pryskyřice v dentinových tubulech, jiná chemická pojiva jako jsou organické a anorganické složky substrátu (16).

Běžné adhezí systémy obsahují samostatný krok leptání a oplachu, po kterém následuje příprava a nanesení pryskyřičného adheziva pomocí leptání 37% kyselinou fosforečnou po dobu 15s pro odstranění znečištěné vrstvy, otevření dentinových tubulů a demineralizaci intertubulárního a peritubulárního dentinu, pro zvýšení jeho propustnosti a odhalení uspořádání kolagenového vlákna, které je prostoupeno krystaly hydroxyketonu. Uchování prostorové konfigurace kolagenové sítě po dobu hybridizace dentinu přispívá k difuzi pryskyřičného monomeru (17).

Použití NaOCl vede k větší porézности na mineralizovaném povrchu dentinu (18), což podporuje vyšší mikro mechanickou retenci (19), která je dána navýšením propustnosti dentinu a navlhavostí adhezivního systému (20).

Na druhé straně NaOCl funguje tak, že okysličuje složku v dentinové matrici, která se ruší s tvorbou volných radikálů na rozhraní pryskyřice a dentinu, což vede k nižší pevnosti vazby. Ošetření askorbanem sodným mění okysličený substrát, který obnovuje redukční potenciál dentinu a považuje se za podporu polymerizace metylmetakrylátové / polymethylmetakrylátové pryskyřice (21-23).

Roztok askorbanu sodného je neutrálním a biokompatibilním antioxidantem a bezpečným výrobkem pro ústní použití, který je tvořen netoxickými látkami, a je také považován za nejvýznamnější systemickou ochranu proti degenerativním nemocem a procesům plynoucím z oxidačního napětí (24), a účinně se používá v různých lékařských odvětvích, jako je dermatologie,

lékařství a výživa (25). Tato látka se používala v zubním lékařství ke snížení tvorby bakteriálního biofilmu při léčbě periodontálních onemocnění (26) a jako prevence vzniku skvrn na povrchu zubů způsobeného užitím minocyklinu (27) s ohledem na jeho schopnost odstraňovat superoxydy, kyselinu chlornou a hydroxylové radikály.

Co se týká chemického složení dentinového substrátu po ošetření povrchu, zjištění této studie nesouhlasí s výsledky předchozích zkoumání (28), protože analýza SEM/EDS neukázala žádné navýšení iontů magnesia oproti uhlíkovým, které výrazně narostly po použití antioxidantního činidla. Někteří autoři uvádí, že ošetření demineralizovaného dentinu pomocí NaO-Cl snižuje organickou matici (18), ale neovlivňuje množství uhlíkových a fosforečných iontů, stejně jako bylo zjištěno v této studii.

Literatura uvádí možnou chemickou reakci adhesivních systémů s ionty vápníků dentinu (29). Rozbor EDS ukázal, že koncentrace vápníku po demineralizaci spadla z 28,62 na 12,77%, zůstala na 8,68% po deproteinizaci a vzrostla na 15,99% po použití askorbanu sodného po dobu 10 min, a to tak, že možná tato chemická reakce také přispěla k poklesu marginálních mikro úniků, na rozdíl od výsledků předchozích studií (30,31). Vrstva pod deproteinizovanou vrstvou dentinu je bohatá na krystaly hydroxyketonu, což podporuje vysokou povrchovou energii s nárůstem koncentrace vápníků (32), a potvrzují výsledky této studie.

Měly by být provedeny dodatečné studie k posouzení stability vazby pryskyřice a dentinu a vlivu ošetření s NaOCl na degradaci adhesivního rozhraní. Podobně je potřeba další výzkum pro urychlení percepce případného chemického pojiva dentinem a použití proteolytické úpravy u samoleptajících adhesiv, které odhalilo rozporné hodnoty marginálních mikro úniků (33,34). Dále by se měl zkoumat účinek antioxidantních činidel na redukci cytotoxicity některých stomatologických materiálů z důvodu neutralizace metakrylátových monomerů redukcí (35).

Závěr

Po použití 10% askorbanu sodného docházelo postupně k ukládání krystalů askorbanu sodného, což vytvářelo krusty na dentinovém substrátu, a vedlo k okluzi některých dentinových tubulů.

Poděkování

Profesorce Cristině Peixoto a SEM technikovi, panu Francisco Luiz Correa Rangel z CETENE (Northeast Strategic Technological Center) za SEM/EDS analýzy.

Abstrakt

Cíl: Posoudit in vitro vliv doby použití 10% askorbanu sodného na deproteinizaci pomocí skenování elektronovým mikroskopem/energiově disperzní spektroskopii (SEM/EDS). Metody: Bylo vybráno sedm extrahovaných lidských třetích stoliček. Pro účely rozboru složení dentinového povrchu pomocí SEM/EDS, bylo zároveň analyzováno 7 vzorků a to následovně: G1: zdravý dentinový substrát, G2: demineralizovaný dentinový substrát s 37% kyselinou fosforečnou po dobu 15 s (demineralizace), důsledně podle doporučení výrobce, G3: deproteinizovaný dentinový substrát po demineralizaci, 10% vodní roztok chlornanu sodného po dobu 60 s při konstantním míchání (deproteinizace), G4, G5, G6 a G7: demineralizovaný, deproteinizovaný dentinový substrát po použití 10% askorbanu sodného na dobu 15 s, 30 s, 60 s, 10 min, respektive.

Vzorky byly prozkoumány skenováním elektronovým mikroskopem (Quanta 2000 - Fei Company) vybaveným energiově disperzním spektrometrem s urychlovacím napětím 10 KV při x 2000 zvětšení ve vakuu.

Výsledky: Rozbor SEM/EDS ukázal progresivní ukládání krystalů askorbanu sodného s rostoucí dobou použití antioxidantního činidla, což vedlo k tvorbě krusty, která může způsobit okluzi některých dentinových tubulů. Nebyl zjištěn statisticky výrazný rozdíl mezi G2 a G3 ($P > 0,05$). Nicméně použití 10% askorbanu sodného na dobu 60 s vedlo k poklesu hladiny kyslíku ($P = 0,029$), magnesia ($P = 0,019$) a sodíku ($P = 0,029$). Závěr: Po použití 10% askorbanu sodného došlo k ukládání krystalů askorbanu sodného což postupně vedlo k tvorbě krusty na dentinovém substrátu, což vedlo k okluzi některých dentinových tubulů.

Přijato: 7. duben 2011, Přijato: 10. května 2011

Adresa pro korespondenci: Ana Isabella Arruda Meira Ribeiro Rua Coronel Jose Andre, 96 - Centro Campina Grande/PB CEP: 58400-068. Tel.: +55. (83) 3337-3649 isaro_jesus@hotmail.com

Klíčová slova

Dentin; antioxidanty, kyselina askorbová, mikroskopie, elektron, skenování, spektrometrie, vysílání rentgenových paprsků

Reference

1. Mjor IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J.* 2009;20(1):3-16.
2. Pioch T, Kobaslija S, Huseinbegovic A, Muller K, Dorfer CE. The effect of NaOCl dentin treatment on nanoleakage formation. *J Biomed Mater Res.* 2001 Sep 15;56(4):578-83.
3. Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater.* 2005 Mar;21(3):232-41.
4. Hashimoto M, De Munck J, Ito S, Sano H, Kaga M, Oguchi H et al. In vitro effect of nanoleakage expression on resin-dentin bond strengths analyzed by microtensile bond test, SEM/EDX and TEM. *Biomaterials.* 2004 Nov;25(25):5565-74.
5. Sauro S, Mannocci F, Tay FR, Pashley DH, Cook R, Carpenter GH et al. Deproteinization effects of NaOCl on acid-etched dentin in clinically-relevant vs prolonged periods of application. A confocal and environmental scanning electron microscopy study. *Oper Dent.* 2009 Mar-Apr;34(2):166-73.
6. Montes MA, de Goes MF, Ambrosano GM, Duarte RM, Sobrinho LC. The effect of collagen removal and the use of a low-viscosity resin liner on marginal adaptation of resin composite restorations with margins in dentin. *Oper Dent.* 2003 Jul-Aug;28(4):378-87.
7. Nicoletti MA, Siqueira EL, Bombana AC, Oliveira GG. Shelf-life of a 2.5% sodium hypochlorite solution as determined by Arrhenius equation. *Braz Dent J.* 2009;20(1):27-31.
8. Soeno K, Taira Y, Ito S, Atsuta M, Pashley DH. Effects of a ferric chloride primer on collagen-depleted dentin bonding between tri-n-butylborane initiated self-curing resin and dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007 Nov;83(2):359-63.
9. Lai SC, Mak YF, Cheung GS, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM et al. Reversal of compromised bonding to oxidized etched dentin. *J Dent Res.* 2001 Oct;80(10):1919-24.
10. Nagpal R, Tewari S, Gupta R. Effect of various surface treatments on the microleakage and ultrastructure of resin-tooth interface. *Oper Dent.* 2007 Jan-Feb;32(1):16-23.
11. Yiu CK, Garda-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Imazato S, King NM et al. A nanoleakage perspective on bonding to oxidized dentin. *J Dent Res.* 2002 Sep;81(9):628-32.
12. Toledano M, Osorio R, Perdigao J, Rosales JI, Thompson JY, Ca- brerizo-Vilchez MA. Effect of acid etching and collagen removal on dentin wettability and roughness. *J Biomed Mater Res.* 1999 Nov;47(2):198-203.
13. Weerasinghe DD, Nikaido T, Ichinose S, Waidyasekara KG, Tag- ami J. Scanning electron microscopy and energy-dispersive X- ray analysis of self-etching adhesive systems to ground and unground enamel. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Jun;18(6):1111-6.
14. 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 Jan;24(1):90-101.
15. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lam- brechts P, Braem M et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005 Feb;84(2):118-32.
16. Nakabayashi N, Pashley DH. Hybridization of dental hard tissues. Tokyo: Quintessence Publishing; 2000.
17. Haller B. Recent developments in dentin bonding. *Am J Dent.* 2000 Feb;13(1):44-50.
18. Mountouris G, Silikas N, Eliades G. Effect of sodium hypochlorite treatment on the molecular composition and morphology of human coronal dentin. *J Adhes Dent.* 2004 Autumn;6(3):175-82.
19. Maior JR, Da Figueira MA, Netto AB, de Souza FB, da Silva CH, Tredwin CJ. The importance of dentin collagen fibrils on the marginal sealing of adhesive restorations. *Oper Dent.* 2007 May-Jun;32(3):261-5.
20. Correr GM, Alonso RC, Grando MF, Borges AF, Puppini-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on primary dentin--a scanning elec- tron microscopy (SEM) evaluation. *J Dent.* 2006 Aug;34(7):454-9.
21. Pamir T, Turkun M, Kaya AD, Sevgican F. Effect of antioxidant on coronal seal of dentin following sodium-hypochlorite and hydro- gen-peroxide irrigation. *Am J Dent.* 2006 Dec;19(6):348-52.
22. Kimyai S, Valizadeh H. Comparison of the effect of hydrogel and a solution of sodium ascorbate on dentin-composite bond strength after bleaching. *J Contemp Dent Pract.* 2008 Feb 1;9(2):105-12.
23. Weston CH, Ito S, Wadgaonkar B, Pashley DH. Effects of time and concentration of sodium ascorbate on reversal of NaOCl-induced reduction in bond strengths. *J Endod.* 2007 Jul;33(7):879-81.
24. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem*

- Biol Interact. 1994 Jun;91(2- 3):133-40.
25. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J.* 2003 Aug 21;2:7.
 26. Vaananen MK, Markkanen HA, Tuovinen VJ, Kullaa AM, Karin- paa AM, Luoma H et al. Dental caries and mutans streptococci in relation to plasma ascorbic acid. *Scand J Dent Res.* 1994 Apr;102(2):103-8.
 27. Bowles WH. Protection against minocycline pigment formation by ascorbic acid (vitamin C). *J Esthet Dent.* 1998;10(4):182-6.
 28. Inaba D, Ruben J, Takagi O, Arends J. Effect of sodium hypochlorite treatment on remineralization of human root dentine in vitro. *Caries Res.* 1996;30(3):218-24.
 29. Abo T, Asmussen E, Uno S, Tagami J. Short- and long-term in vitro study of the bonding of eight commercial adhesives to normal and deproteinized dentin. *Acta Odontol Scand.* 2006 Aug;64(4):237- 43.
 30. Andia-Merlin RY, Garone-Netto N, Arana-Chavez VE. SEM evaluation of the interaction between a three-step adhesive and dentin. *Oper Dent.* 2001 Sep-Oct;26(5):440-4.
 31. Meira Ribeiro AI, Tenorio Guenes GM, Dantas DC, da Silva JW, Cavalcanti AL, Braz R. Influence of antioxidant agents on the marginal seal of class V restorations. *Acta Stomatol Croat.* 2010;44(4):225-31.
 32. Panighi M, G'Sell C. Influence of calcium concentration on the dentin wettability by an adhesive. *J Biomed Mater Res.* 1992 Aug;26(8):1081-9.
 33. Erhardt MC, Osorio E, Aguilera FS, Proenfa JP, Osorio R, Toledano M. Influence of dentin acid-etching and NaOCl-treatment on bond strengths of self-etch adhesives. *Am J Dent.* 2008 Feb;21(1):44-8.
 34. Fawzy AS, Amer MA, El-Askary FS. Sodium hypochlorite as dentin pretreatment for etch-and-rinse single-bottle and two-step selfetching adhesives: atomic force microscope and tensile bond strength evaluation. *J Adhes Dent.* 2008 Feb;10(2):135-44.
 35. Soheili Majd E, Goldberg M, Stanislawski L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials.* 2003 Jan;24(1):3-9.