اثر فعالیت آنزیم‌های بزاق انسان در تجزیه رزین کامپوزیت دندانی

عیسی لیالی[۱]، افسانه رضایی[۲]، ریحانه سریری*[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، گروه زیست شناسی، ساری، ایران، صندوق پستی: ۱۹۳۱۸-۴۸۱۶۱

۲- دانشگاه ایست، دانشکده دندانپزشکی، گروه پریودنتولوژی، مانیل، فیلیپین

۳ - دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

(*عهده‌دار مکاتبات- sariri@guilan.ac.ir)

چکیده

فعالیت کلسترول استراز CE در بزاق ۵۵ نفر از داوطلبان سالم شناسایی شدند. هدف از این تحقیق بررسی وجود استرازها و به خصوص کلسترول استراز در بزاق انسان و اثر آن به صورت جداگانه روی منومرهای رزین و هم چنین روی کامپوزیت‌های ساخته شده از هر دو نوع این منومرها بود. دو نوع ساختمان معمول منومری، بیس فنیل گلایسیدیل دی متاکریلات (آب گریز) و تری اتیلن گلیکول دی متاکریلات (آب دوست) انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های بزاق انسانی ابتدا سانتریفوژ و سپس روی ستون ژل فیلتراسیون جداسازی شدند قسمت‌های جدا شده همراه با منومرهای فوق و هم چنین با کامپوزیت‌های تجاری انتخابی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای بررسی فعالیت CE انکوبه شدند. بررسی عمل زیست تجزیه با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا HPLC انجام شد. قسمت‌هایی که بیشترین فعالیت کلسترول استراز را داشتند تمایل کمتری به تجزیه منومر آروماتیک (آب گریز) و هم چنین ماده کامپوزیتی از خود نشان دادند و اثر آن‌ها روی منومرهای آب دوست بسیار بیشتر بود. با توجه به یافته‌های این تحقیق نتیجه گرفته شد که آنزیم کلسترول استراز بزاقی در مقابل تجزیه کامپوزیت‌های دندانی موجود در بازار که از مخلوط منومرهای آب گریز و آب دوست ساخته شده‌اند فعالیت زیادی دارد. به این دلیل توصیه می‌شود که در تهیه این کامپوزیت‌های نسبت منومرهای آب دوست و آب گریز با دقت انتخاب شوند به طوری که در مقابل اثر آنزیم-های بزاقی بیشترین مقاومت را از خود نشان دهند.

کلمات کلیدی: آنزیم، بزاق، رزین پلیمری، کامپوزیت، بیوتجزیه‌پذیر.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

کامپوزیت ترکیبی از یک رزین کوپلیمری آکریلیک و ذرات نرم شبیه شیشه می‌باشد که ترمیمی همرنگ دندان ایجاد نموده است. دوام کامپوزیت و مقاومت آن به شکستگی با نیروی جویدن متوسط در ترمیم‌های کوچک تا متوسط خوب است. از طرفی، مقدار کمتری از ساختمان دندان در طی تراش دندان برای ترمیم با کامپوزیت برداشته می‌شود و این امر منجر به ایجاد ترمیم کوچکتر نسبت به آمالگام می‌شود. کامپوزیت‌ها با استفاده از مواد چسبنده به ساختمان دندان متصل شده و به دندان پزشک امکان ترمیم ظریف‌تر و قابل اعتمادتری را می‌دهد. در دندان‌های تحت نیروهای مضغی شدید، ترمیم‌های کامپوزیت مقاومت متوسطی نسبت به سایش دارند که میزان آن کمتر از مقاومت آمالگام است. قیمت آن متوسط است و به اندازه ترمیم و تکنیکی که دندانپزشک برای جایگزینی آن در حفره انتخاب می‌کند، بستگی دارد. زمان لازم برای قرار دادن یک ترمیم کامپوزیت معمولاً بیشتر از آمالگام است. در ترمیم کامپوزیت باید بتوان حفره را در طی انجام ترمیم، خشک و تمیز نگهداشت. این نوع ترمیم ممکن است به مرور زمان دچار تغییر رنگ شود (شکل ۱).

شکل ۱: تغییر رنگ رزین کامپوزیت در اثر مرور زمان

در مقابل، گلاس آینومرها موادی همرنگ دندان هستند که از مخلوط اسید آکریلیک و پودر شیشه نرم تهیه می‌شوند و برای ترمیم حفرات به ویژه در سطح ریشه دندان‌ها استفاده می‌شوند. گلاس آینومرها مقادیر اندکی فلوراید آزاد می‌سازند که برای بیماران در معرض خطر پوسیدگی ممکن است مفید باشد. میزان تراش دندان و در نتیجه وسعت ترمیم نهایی در ترمیم با گلاس آینومر کوچکتر از آمالگام است. گلاس آینومر در ترمیم‌های کوچک که تحت فشارهای مضغی قوی نیست، استفاده می‌شود، چون مقاومت اندکی نسبت به شکستگی دارند، اغلب در حفرات کوچکی که تحت فشار نیستند (بین دندان‌ها) یا روی ریشه دندان‌ها استفاده می شوند. رزین آینومرها هم از فیلر شیشه و اسیدهای آکریلیک و رزین آکریلیک تشکیل شده‌اند. این رزین‌ها نیز مقاومت کم تا متوسطی نسبت به شکستگی داشته و در ترمیم‌هایی که تحت فشار نیست (بین دندان‌ها) به کار می‌روند. آینومرها در سطوح اکلوزال دچار سایش زیادی می‌شوند. هم گلاس و هم رزین آینومرها رنگ‌هایی شبیه به رنگ طبیعی دندان داشته ولی شفافیت مینا را ندارند. هردو به خوبی توسط بیماران تحمل می‌شوند و به ندرت واکنش آلرژیک دیده شده است.

استفاده از رزین‌های کامپوزیت در دندانپزشکی ترمیمی امروزه بسیار متداول و به دلیل اثر نهایی جالب توجه آن‌ها از نقطه نظر استحکام نسبی در مقابل عوامل فیزیکی و شیمیایی، زیست سازگاری، رنگ و نمای ظاهری مورد تأیید اغلب دندانپزشکان است. اغلب مواد رزینی مورد استفاده در دندانپزشکی دارای مقدار زیاد از یک منومر رقیق‌کننده به نام تری اتیلن گلایکول دی متاکریلات (TEGDMA) می‌باشند که به دلیل

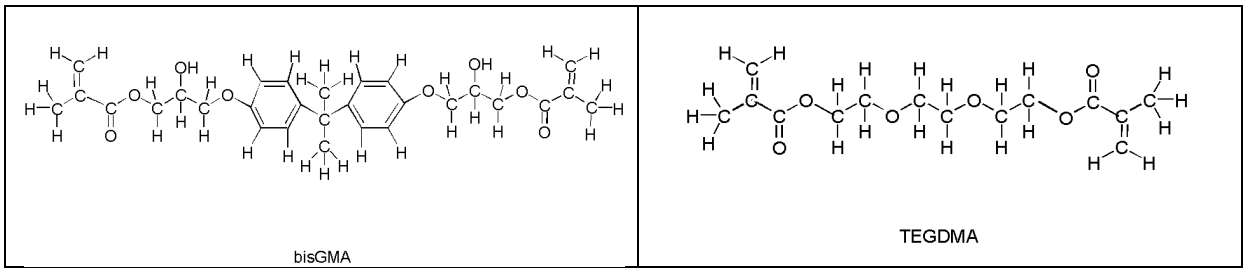
Archive of SID

www.SID.ir

خاصیت آب دوستی به داخل حفره دهانی نشت می‌کند. درباره پایداری بیوشیمیایی این کامپوزیت‌های سنتزی تا چند سال قبل هنوز مطالعات زیادی انجام نشده و اطلاعات جامعی در دست نبود (۵، ۷ و ۲۲). مطالعات نشان داده اند که برخی از این رزین‌ها به تدریج از دندان نشت نموده و موادی آزاد می کنند که سمی و مضر باشند (۶، ۱۲ و ۱۹).

از طرفی برخی از این رزین‌های کامپوزیتی در اثر عمل آنزیم‌ها تجزیه شده و محصولات سمی از قبیل متاکریلیک اسید تولید می‌کنند. متاکریلیک اسید می‌تواند در شرایط ویژه اکسیده شود که یکی از محصولات جانبی این واکنش فرمالدئید سمی است (۱۴و۱۶). از نظر زیست سازگاری باید در نظر داشت که محصولات جانبی حاصل از تجزیه رزین‌های کامپوزیت دندانی ممکن است روی بافت دندان و سایر بافت‌های دهانی اثرات نامطلوب داشته باشند. تحقیقات نشان داده‌اند که ترکیباتی نظیر بیس فنل A دی متاکریلات و هم چنین محصولات تجزیه بیس فنیل گلایسیدیل دی متاکریلات (BisGMA) ممکن است برای دندان و بافت دهانی مضر و سمی باشند (۷ و۲۰). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که تری اتیلن گلایکول دی متاکریلات (TEGDMA) می‌تواند سرعت رشد باکتری‌هایی از نوع *Lactobacillus acidophilus* و *Streptococcus sobrinus* را به شدت افزایش دهد (۸).

بنابراین زیست تخریب‌پذیری رزین‌های کامپوزیت دندانی می‌تواند نقش مهمی در تغییر بیوشیمیایی محیط دهان داشته باشد. با توجه به ساختمان شیمیایی (شکل ۲)، رزین‌های BisGMA خاصیت آب گریزی دارند، در حالی که رزین‌هایی از نوع TEGDMA که در ساختمان آن‌ها متاکریلیک اسید و گروه‌های هیدروکسیل وجود دارند آب دوست می‌باشند و از نظر زیست سازگاری مناسب‌تر هستند. از آنجایی که فقط تحقیقات معدودی فعالیت آنزیم‌های استراز نظیر کلسترول استراز (CE) در بزاق انسان (HS) را گزارش نموده‌اند و با توجه به این که چنین آنزیم‌هایی می‌توانند منومرهای کامپوزیت دندانی را تجزیه نمایند (۹)، هدف از تحقیق حاضر جداسازی این آنزیم از بزاق و بررسی اثر آن روی زیست تخریب رزین‌های BisGMA و TEGDMA و بررسی محصولات تجزیه یعنی TEGMA و متاکریلیک اسید MA بود. میزان فعالیت آنزیم از طریق بررسی افزایش مقدار محصولات حاصل از تجزیه منومر انجام گرفته است.



شکل ۲: ساختمان‌های شیمیایی رزین‌های BisGMA و TEGDMA

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش ها

الف- مواد شیمیایی و دستگاه‌ها

منومرهای BisGMA و TEGDMA تهیه شده از شرکت شیمیایی سیگما توسط یکی از همکاران در انگلستان به عنوان هدیه ارسال شده بودند، حلال‌ها، مواد لازم برای تهیه بافرها و اندازه گیری فعالیت آنزیم‌ها نیز هدایایی از طرف همکاران در دانشگاه آستون انگلستان بودند. دستگاه (HPLC) مورد استفاده ساخت کارخانه (Waters®) و ستون مورد استفاده از نوع فاز معکوس (Reverse phase) تهیه شده بود. دستگاه سپکتروفتومتر ماورای بنفش-مرئی از کارخانه (Shimazu) و موجود در دانشکده علوم دانشگاه گیلان بود.

ب- تهیه نمونه های بزاق

۵۰ نفر داوطلب بعد از پر کردن یک فرم مخصوص که در آن در مورد عادات غذایی، سیگار و بهداشت دهان و دندان اطلاعات خواسته شده بود، و شستشوی دهان با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر، برای دادن نمونه بزاق آماده شدند. حدود ۳۰ میلی لیتر از بزاق آن‌ها بدون تحریک و طی ۳ مرحله در لوله‌های استریل ۵۰ میلی‌لیتری سانتریفوژ جمع‌آوری گردید. نمونه‌های به دست آمده سپس به مدت ۱۵ ثانیه روی هموژنایزر به صورت یک نواخت در آمده و به دنبال آن برای حداقل ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد با ۲۰۰۰ دور در ثانیه (rpm) سانتریفوژ شدند و مایع شفاف رویی برای ادامه آزمایش در ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این دما نمونه‌ها منجمد می‌شدند که برای حفظ فعالیت آنزیمی لازم است تا زمان آزمایش در حالت فریز شده باشند. بعد از جمع آوری همه نمونه‌ها و فراهم آوردن شرایط اندازه‌گیری، نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای اطاق قرار گرفتند تا از انجماد خارج شوند.

جداسازی فراکشن مربوط به کلسترول استراز

نمونه‌های بزاق با استفاده از یک ستون ژل سفاریل S-200 در ۴°C در بافر فسفات با pH 7.2 جداسازی شدند. سرعت جریان ۰/۵ mL/min و فراکشن‌های ۵ میلی‌لیتری جمع آوری گردیدند. فعالیت CE در pH 7.0 و ۲۵°C و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۱ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم کلسترول استراز عبارت است از تغییر جذب نوری و بر حسب units/min بیان می‌شود.

هیدرولیز منومرها

محلول بافر فسفات با pH 7.0 به عنوان حلال مورد استفاده قرار گرفت تا ۲ میلی‌لیتر از منومرهای BisGMA ($۱۰^{-۴}$ M) یا TEGDMA ($۰/۵\times۱۰^{-۴}$ M) در ۳۷°C تهیه گردیدند، در عمل، ۰/۷۳ گرم از BisGMA و ۰/۶۶ گرم از TEGDMA به طور جداگانه در بشر حاوی ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات (pH 7.0 که برای افزایش حلالیت ۱٪ متانول نیز به آن اضافه شده بود) ریخته شدند. بشرها روی بهم زن مغناطیسی قرار گرفته و همراه با به هم زدن ملایم در دمای اطاق و طی نیم ساعت حل شدند. سپس در زمان های مختلف (۱، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت) نمونه‌های ۲۰۰ میکرولیتری از محلول‌های منومری برداشته شده و ۱۳۳ میکرولیتر متانول به آن

Archive of SID

www.SID.ir

اضافه شد. محلول متانول موجب تغییر ماهیت آنزیم و توقف عمل هیدرولیز آنزیمی می‌شود. محلول حاصل سپس توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت. دستگاه (HPLC) مورد استفاده ساخت کارخانه (Waters®) و کروماتوگرافی به روش فاز معکوس (Reverse phase) انجام شد.

آزمایش بیودگراداسیون

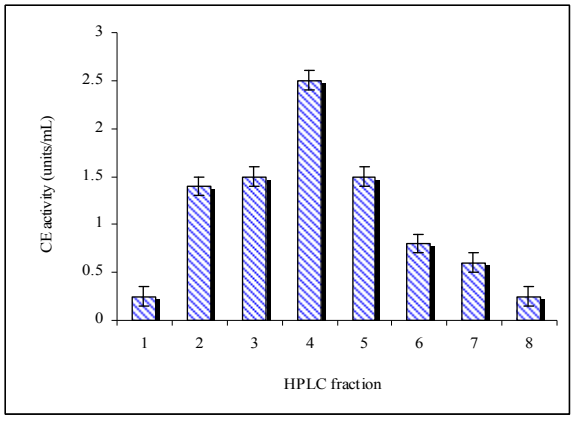
طبق دستور کار توصیه شده از طرف سازنده، کامپوزیت‌های استوانه‌ای از پلیمر در قالب تفلونی تهیه شدند و از طریق نوری در یک آون پلیمریزه و در آون خلا به مدت ۴۸ ساعت در ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. کامپوزیت‌های مورد استفاده دو نوع با نام‌های تجاری TPH®Spectrum™ (متشکل از بیس فنل A دی متاکریلات، Bis-EMA و بیس فنل A دی گلایسیدیل اتر دی متاکریلات، Bis-GMA) و Filtek Z250 (متشکل از بیس فنل A دی گلایسیدیل اتر دی متاکریلات Bis-GMA و تری اتیلن گلایکول دی متاکریلات TEGDMA) بودند.

آزمایش بیودگراداسیون با ایجاد شرایط دما، pH شبیه به محیط زنده ولی در آزمایشگاه و روی شیکر در طول ۱۵ روز (n=۳) انجام گرفت و محصولات بیودگراداسیون در محلول با استفاده از HPLC در روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ انجام شدند. آنالیز آماری با استفاده از ANOVA در نرم افزار Excel صورت پذیرفت.

ویال‌های شامل دو نوع کامپوزیت در محلول یک میلی‌لیتر از فراکشن‌های محتوی CE و PCE در ۳۷ درجه انکوبه شدند. محلول‌های انکوبه شده برای مدت ۱۵ روز به هم اضافه شده و ذخیره شدند. محصولات تجزیه پس از ۵، ۱۰ و ۱۵ روز مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج

بزاق‌های سانتریفوژ و فریز شده بعد از ذوب مجدد روی ستون ژل فیلتراسیون قرار گرفته و فراکشن‌های ۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری و سپس برای فعالیت کلسترول استراز مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳).

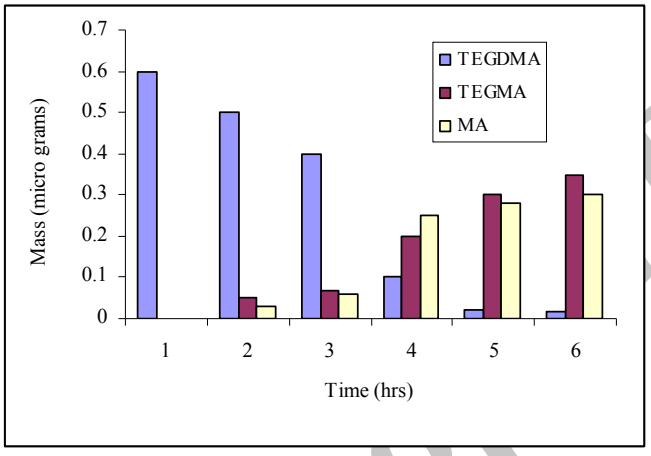


شکل ۳: تغییرات فعالیت کلسترول استراز در فراکشن‌های بزاق. فراکشن ۴ به عنوان بخشی که بیشترین فعالیت آنزیمی را داشت برای مطالعات بیودگراداسیون انتخاب شد

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۴ تغییرات وزن منومر TEGDMA و محصولات تجزیه آن یعنی TEGMA و MA را در فراکشن ۴ که در آن فعالیت CE زیاد بوده است نشان می‌دهد. به طوری که ملاحظه می‌شود با گذشت زمان مقدار منومر کاهش یافته و مقادیر محصولات تجزیه آن افزایش قابل توجه دارند که تأیید کننده عمل تجزیه منومر توسط آنزیم کلسترول استراز بزاقی است.

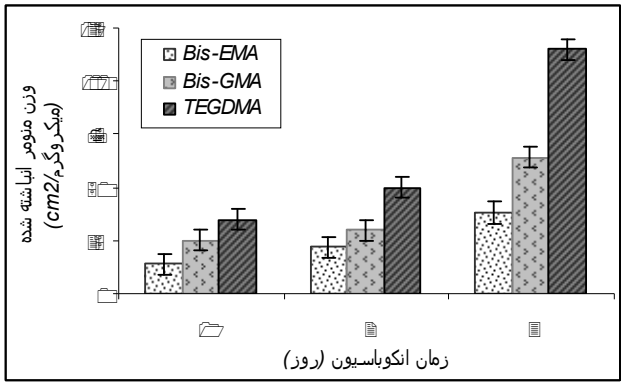


شکل ۴: کاهش منومر TEGDMA در اثر هیدرولیز توسط کلسترول استراز بزاقی و افزایش محصولات تجزیه آن یعنی TEGMA و MA

در شکل ۵ وزن محصولات بیودگراداسیون کامپوزیت‌ها در محلول های حاصل از انکوباسیون بعد از ۵، ۱۰و ۱۵ روز نشان داده شده است. به طوری که ملاحظه می‌شود فراکشن ۴، که در آن فعالیت کولین استراز CE زیاد بوده است، کامپوزیت Filtek Z250 شامل منومر هیدروفیلی TEGDMA در مقایسه با کامپوزیت دیگر یعنی TPH®Spectrum™ که فاقد این منومر بوده را با شدت بیشتر تحت اثر قرار داده است که این نتیجه می‌تواند در تائید کننده تمایل بیشتر کلسترول استراز برای منومرهای آب دوست می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵: انباشته شدن تدریجی محصولات بیودگراداسیون کامپوزیت Filtek Z250 و ™TPH®Spectrum توسط فراکشن ۴ در روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ انجام انکوباسیون. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شده و با در نظر گرفتن خطای استاندارد انجام گرفته‌اند و مقادیر استفاده شده در رسم نمودار میانگین ۳ تکرار اند. توجه شود که مقدار Bis-GMA مجموع مقدار حاصل از تجزیه هر دو نوع کامپوزیت است.

بحث

از آنجایی که در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون فراکشن‌ها در جهت کاهش وزن مولکولی خارج می‌شوند، بنابراین خارج شدن CE در فراکشن ۴ نشان می‌دهد که این آنزیم دارای وزن مولکولی پائین‌تری از سایر استرازهای موجود در بزاق است. همان طور که ذکر شد، فعالیتی شبیه به پسودوکولین استراز PCE نیز در فراکشن ۱ مشاهده شد که وجود این آنزیم با وزن مولکولی بالاتر می‌باشد. در هر حال، فقط فعالیت کلسترول استراز بزاقی و اثر آن روی نوع منومر کامپوزیت‌های دندانی بود.

بررسی‌های کتابخانه‌ای در مورد اثر آنزیم‌های بزاقی در زیست تخریب پذیری پلیمرهای کامپوزیتی نشان دادند که در اکثر موارد نتایج تحقیق حاضر با کارهای مشابه روی کوپلیمرهای دیگر دندانی مطابقت دارد. ویژگی مهم پژوهش ما در مورد بررسی اختصاصی بودن کولین استراز بزاقی روی قسمت‌های مختلف کامپوزیت بوده است که در کارهای دیگران کمتر به آن توجه شده است.

اثر بزاق انسان بر تغییر چسبندگی چسب‌های دندان همیشه مورد توجه دانشمندان بوده است بدون آن که اشاره خاص به تجزیه از طریق آنزیمی شده باشد (۱۱). با افزایش آگاهی در زمینه نقش آنزیم‌های بزاقی به عنوان مارکرهای تشخیصی بیماری‌های پریودنتال (۱۳) و اثر آن‌ها روی سیم‌های ارتودنسی (۱۷) و کامپوزیت‌های دندانی (۲)، مسیر پژوهشی مهمی گشوده شد. به این ترتیب، در تحقیقی دیگر اثر آنزیم‌های استراز غیر بزاقی در خارج از محیط بیولوژیکی روی تجزیه کوپلیمرهای HEMA/ bisGMA که به عنوان چسب دندانپزشکی استفاده می‌شوند، مورد مطالعه قرار گرفته است. در پژوهش مذکور اثر آنزیم استراز کبدی روی تجزیه کوپلیمرهای مذکور در آزمایشگاه بررسی شده است (۱۰). نتایج نشان داده اند که در حضور آنزیم استراز کبدی، مقدار متاکریلیک اسید (MAA) و ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات (HEMA)، محصولات تجزیه کوپلیمر فوق، به شدت افزایش می‌یابند که نشان دهنده اثر مشابه آنزیم استراز کبدی در تجزیه رزین دندانی می‌باشد و با

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصل از این پژوهش مشابهت دارد و یافته‌های ما را تائید می‌کند. بررسی اثر برخی آنزیم‌های بزاقی مانند کلاژناز در آزمایشگاه نشان داده‌اند که تجزیه رزین کامپوزیت نسبت مستقیم با فعالیت آنزیم کلاژناز دارد (۱). این یافته نیز اثر آنزیم‌های هیدرولیز کننده را روی رزین دندانی تائید کرده و با نتایج تحقیق حاضر مشابهت‌هایی نشان می‌دهد. از طرفی، برخی بررسی‌ها در مورد چگونگی بیوتجزیه رزین‌های دندانی نشان داده‌اند که علاوه بر اثر آنزیم‌های هیدرولیز کننده، ساختمان شیمیایی کامپوزیت‌های دندانی نیز در بیوتجزیه‌پذیری آن‌ها اثر مستقیم دارد (۴و۱۸) در تحقیق حاضر، اختصاصی بودن آنزیم برای تجزیه قسمت‌های مختلف کامپوزیت مورد توجه بوده است و نتایج ما نشان دادند که علاوه بر نوع آنزیم و غلظت و فعالیت آن، نوع کامپوزیت دندانی نیز در تجزیه دخالت دارند که این نتایج با تحقیقات انجام شده دانشمندان دیگر نیز هماهنگ می‌باشند (۳).

در نهایت، با توجه به یافته‌های این تحقیق و مقایسه نتایج آن با کارهای دیگران می‌توان اظهار داشت که علاوه بر ساختمان شیمیایی و نوع آنزیم عمل کننده، کامپوزیت‌هایی که در صد منومر آب دوست بیشتری دارند مقاومت کمتری در مقابل تجزیه توسط آنزیم‌های بزاقی از خود نشان می‌دهند.

سپاسگزاری

منومرها و حلال‌ها هدیه همکاران ما در دانشگاه آستون انگلستان بودند که موجب امتنان فراوان است.

منابع

1. Armstrong, S. R., Jessop, J. L., Vargas, M. A., Zou, Y., Aian, F., Campbell J. A. and Pashly, D. H., 2006. Effects of exogenous collahenase and cholesterol esterase on duability of the resin-dentin bond, J Adhes Dent 8, pp. 151-160.
2. Bayne, S. C., 2005. Dental biomaterials: where are we and where we going? Journal of Dental Education 5, pp. 571-585.
3. Finer, Y. and Santerre, J. P., 2003. Biodegradation of a dental composite by esterases: Dependence on enzyme concentration and specificity, J Biomater Sci Polym Ed 14, pp. 837-849.
4. Finer, Y. and Santerre, J. P., 2004. The influence of resin chemistry on a dental composite's biodegradation, J Biomed Mater Res 69A, pp. 233-246.
5. Geurtsen, W. and Leyhausen, G., 2001. Chemical–biological interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA), J Dent Res 80 pp. 2046–2050.
6. Geurtzen, W., 1990. Biocompatibility of resin-modified filling materials, *Crit Rev* Oral Biol Med 11, pp. 333–355.
7. Hansel, C., Leyhausen, G., Mai, U.E.H. and Geurtsen, U.E.H., 1998. Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms in vitro, J Dent Res 77 (1998), pp. 60–67.
8. Jaffer, F., Finer, Y. and Santerre, J. P., 2002. Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases, Biomaterials 23 pp. 1707–1719.
9. Khalichi, P., Cvitkovitch, D. G. and Santerre, J. P., 2004. Effect of composite resin biodegradation products on oral streptococcal growth, Biomaterials 24, pp. 5467–5472.
10. Kostoryz, E. L., Dharmala, K., Ye, Q., Wang, Y., Huber, J., Park, J. G., Snider, G., Katz, J. L. and Spencer, P., 2008. Enzymatic Biodegradation of HEMA/BisGMA adhesives formulated with different water content, J Biomed Mater Res 10B, pp. 394-401.
11. Larsen, I. B. and Munksgaard, E.C., 1991. Effect of human saliva on surface degradation of composite resins, Scand J Dent Res 99, pp. 245-261.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Lefebvre, C. A., Schuster, G. S., Rueggeberg, F. A., Tamareselvy, K. and Knoernschild, K. L., 1996. Responses of oral epithelial cells to dental resin composites, *J Biomater* Sci Polym Ed 7, pp. 965–976.
13. Miller, C. S., King, C. P., Langub, M. C., Kryscio, R. J. and Thomas, M. V., 2006. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: A cross-sectional study, J Am Dent Assoc 137, (2006), pp. 322-329.
14. Munksgaard, E. C. and Freund, M., 1990. Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers, Scand J Dent Res 98, pp. 261–267.
15. Olea, R., Pulgar Perez, P., Olea Serrano, F., Rivas A. and Novillo-Fertrell, A. and et al., 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry, Environ Health Persp 104, pp. 298–304.
16. Øysæd, H., Ruyter, I. E. and Sjøvik-Kleven, I. J., 1988. Release of formaldehyde from dental composites, J Dent Res 67, pp. 1289–1294.
17. Rashkova, M., Baleva, M., Toneva, N., Peneva, M., Perenovska P. and Koprivarova, K., 2009. Seretory immunoglobulin A (S-IgA) in the saliva of children with type 1 diabetes, asthma, systemic health and systemic health but wearing removable orthodontics appliances, OHDMBSC 8, pp. 16-28.
18. Santerre, J. P., Shajii, L. and Leung, B. W., 2001. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products, Crit Rev Oral Biol Med 12, pp. 136–151.
19. Spahl, W., Budzikiewicz, H. and Geurtsen, W., 1998. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/ mass spectrometry, J Dent 26, pp. 137–145.
20. Stanley, H. R., 1993. Effects of dental restorative materials; local and systemic responses reviewed, J Am Dent Assoc 124, pp. 76–80.
21. Tarumi, H., Imazato, S., Marimatsu, M., Matsuo, M. and Ebisu, S., 2001. Estrogenicity of fissure sealants and adhesive resins determined by reporter gene assay, J Dent Res 79. pp. 1838–1843.
22. Yourtee, D. M., Smith, R. E., Russo, K. A., Burmaster, S., Cannon, J. M., Eick J.D. and Kostoryz, E. L., 2001. The stability of methacrylate biomaterials when enzyme challenged: kinetic and systematic evaluations, J Biomed Mater Res 57, pp. 522–531.

www.SID.ir