

## تأثیر دهان شویه کلرهگزیدین ۰/۱۲٪ بر میکروهاردنس و الاستیک مدولوس عاج و سمان دندان های کشیده شده در اثر پریودونتیت مزمن و سالم

سید علی بنی هاشم راد<sup>۱</sup>، سیده حوریه موسوی بندرآبادی<sup>۲</sup>، امیررضا مکیبری<sup>۳</sup>، سید احمد بنی هاشم راد<sup>۳</sup>، سارا مجیدی نیا<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشیار گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۲</sup> استاد گروه ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۳</sup> دندانپزشک، مشهد، ایران

<sup>۴</sup> استادیار گروه ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۹/۹/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۲۱

### The effect of Chlorhexidine 0.12% Mouthwash on Microhardness and Elastic Modulus of Dentin and Cementum of Healthy and Periodontally Involved Extracted Teeth

Ali Banihashem Rad<sup>1</sup>, Seyedeh Hourieh Moosavi Bandarabadi<sup>2</sup>, Amir Reza Mokabberi<sup>3</sup>, Ahmad Banihashem Rad<sup>3</sup>, Sara Majidinia<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Periodontics, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>2</sup> Professor, Department of Restorative Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>3</sup> Dentist, Mashhad, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor, Department of Restorative Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: 15 December 2020; Accepted: 11 May 2021

**Introduction:** This study aimed to evaluate the effect of 0.12% chlorhexidine mouthwash on microhardness and elastic modulus of dentine and cementum of healthy and periodontally involved extracted teeth.

**Materials and Methods:** Totally, 30 teeth extracted due to chronic periodontitis and 30 healthy teeth that were removed due to orthodontics treatments or latency were examined in this cross-sectional study. In each group, half of the samples were placed in 0.12% chlorhexidine mouthwash and the other half were placed in artificial saliva for two weeks. Subsequently, 1 mm slices from beneath the CEJ in parallel with the horizon were prepared and the microhardness and modulus elasticity of dentin and cementum were measured. Data were analyzed using ANOVA and t-test ( $\alpha=0.05$ ).

**Results:** There was an interaction between group and chlorhexidine for the variable of dentin microhardness; however, the interaction between group and chlorhexidine was not significant in terms of the variables of cementum microhardness, dentin, and cementum elasticity ( $P=0.196$ ,  $P=0.897$ , and  $P=0.829$ , respectively). The mean dentin microhardness in the healthy and periodontitis samples in chlorhexidine was significantly higher compared to samples without chlorhexidine. In addition, the cementum microhardness, and dentin and cementum elasticity were significantly higher in the healthy group compared to those in the periodontitis group with or without chlorhexidine. Furthermore, the mean cementum microhardness, as well as dentin and cementum elasticity in the group of samples with chlorhexidine was notably higher compared to the group of samples without chlorhexidine.

**Conclusion:** Based on the obtained results, the application of 0.12% chlorhexidine mouthwash improved the mechanical properties of the teeth (microhardness and modulus of elasticity) in the healthy and chronic periodontitis groups compared to those without mouthwash. The mechanical properties of dentin and cementum of healthy teeth were also higher compared to those with chronic periodontitis.

**Key words:** Chronic periodontitis, Chlorhexidine mouthwash, Microhardness, Modulus elasticity

**Corresponding Author:** majidini@sids.ac.ir

*J Mash Dent Sch 2021; 45(3): 230-6.*

#### چکیده

**مقدمه:** هدف از این مطالعه بررسی تأثیر دهان شویه کلرهگزیدین ۰/۱۲٪ بر میکروهاردنس و الاستیک مدولوس عاج و سمان دندان های کشیده شده در اثر پریودونتیت مزمن و سالم بود.

\* مولف مسؤول، نشانی: مشهد، میدان پارک، دانشکده دندانپزشکی، گروه دندانپزشکی ترمیمی و زیبایی، تلفن: ۰۵۱-۳۸۸۲۹۵۰۱-۱۵

E-mail: majidini@sids.ac.ir

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، ۳۰ دندان کشیده شده در اثر پریدونتیت مزمن و ۳۰ دندان سالم که به علت درمان های ارتودنسی یا نهنفتگی خارج شده بودند، مورد آزمایش قرار گرفتند. هر یک از گروه های دندانهای مبتلا به پریدونتیت و سالم به دو زیر گروه تقسیم شدند. یک زیر گروه به مدت دو هفته در محلول کلرگزیدین ۰/۱۲٪ و زیر گروه دیگر در بزاق مصنوعی قرار گرفتند. برش هایی از ۱ میلی متر زیر ناحیه CEJ دندان ها بصورت موازی با افق تهیه و میزان ریز سختی و مدولوس الاستیسیته عاج و سمان دندان های مورد مطالعه اندازه گیری شد. داده ها توسط آزمون ANOVA و t-test آنالیز گردید. ( $\alpha=0/05$ )

**یافته ها:** در این مطالعه اثر متقابل بین گروه و کلرگزیدین برای متغیر ریز سختی عاج وجود داشت ( $P=0/002$ )، اما اثر متقابل بین گروه و کلرگزیدین برای متغیرهای ریز سختی سمان، الاستیسیته عاج و سمان معنی دار نبود. (به ترتیب  $P=0/196$ ،  $P=0/897$ ،  $P=0/829$ ). میانگین ریز سختی عاج در نمونه های سالم و پریدونتیت با کلرگزیدین نسبت به نمونه های بدون کلرگزیدین به طور معناداری بیشتر بود. همچنین میانگین ریز سختی سمان، الاستیسیته عاج و سمان در گروه سالم به طور معناداری بیشتر از گروه پریدونتیت بود. به علاوه، میانگین ریز سختی سمان و الاستیسیته عاج و سمان در نمونه های با کلرگزیدین نسبت به نمونه های بدون کلرگزیدین به طور معناداری بیشتر بود.

**نتیجه گیری:** استفاده از دهانشویه کلرگزیدین ۰/۱۲٪ باعث بهبود خواص مکانیکی (ریز سختی و مدولوس الاستیسیته) در هر یک از گروه های سالم و پریدونتیت مزمن می شود. همچنین خواص مکانیکی عاج و سمان دندان های سالم از دندان های مبتلا به پریدونتیت مزمن بیشتر می باشد.

**کلمات کلیدی:** پریدونتیت مزمن، دهانشویه کلرگزیدین، ریز سختی، مدولوس الاستیسیته. مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۴۰۰ دوره ۴۵ / شماره ۳: ۶-۲۳۰.

#### مقدمه

می شود و ماتریکس خارج سلولی موقت تولید شده حین ترمیم پریدونتال نیز متفاوت است.<sup>(۱)</sup> مطالعات نشان داده اند در بیماری پریدونتال مشکل اصلی کاهش میزان کلاژن خارج سلولی می باشد. علت این کاهش، تخریب بافت های کلاژنی توسط آنزیم های کلاژناز و ماتریکس-متالوپروتیناز (MMP) می باشد، که این آنزیم ها توسط نوتروفیل هایی که به بافت لته مهاجرت کرده اند تولید می شوند.<sup>(۷)</sup> از طرف دیگر، افزایش محتوای معدنی مانند کلسیم، فسفر و فلوراید در لایه ی سطحی سمان ریشه ی دندان که به دلیل کنار رفتن لته، در معرض حفره ی دهان قرار گرفته اند نیز مشاهده شده است. اگر چه مطالعات مختلف، تغییرات سمان ریشه ی دندان را حین پیشرفت بیماری پریدونتال گزارش کرده اند، اما خواص مکانیکی سمان و عاج به طور کامل درک نشده است.<sup>(۸)</sup>

کلرگزیدین یکی از پر مصرف ترین دهانشویه ها در دندانپزشکی با خواص آنتی میکروبیال وسیع است که در درمان بیماری های پریدونتال بکار می رود. این ماده علاوه بر خواص آنتی میکروبیال، توانایی اتصال به الیاف کلاژن

بیماری پریدونتال، یک بیماری التهابی بافت های حمایت کننده دندان است که بواسطه میکروارگانیزم های خاص ایجاد شده و منجر به تخریب پیشرونده پریدونتال لیگامنت و استخوان آلوئول، همراه با تشکیل پکت، تحلیل لته و یا هر دو می شود.<sup>(۱)</sup> به طور معمول عاج و سمان ریشه دندان در پاتوژنز بیماری های پریدونتال تحت تغییرات متعدد فیزیکی<sup>(۲)</sup>، شیمیایی<sup>(۳)</sup>، ساختاری<sup>(۴)</sup> و سیتوتوکسیک<sup>(۵)</sup> قرار می گیرد. در طول مراحل اولیه بیماری پریدونتال، فیبرهای بیرونی و بدون سلول سمان ریشه ی دندان به صورت برگشت ناپذیر آسیب می بینند.<sup>(۶)</sup> ماتریکس خارج سلولی سمان از نظر ترکیب ساختاری، شبیه دیگر بافت های مینرالیزه دندان می باشد؛ با این حال فیزیولوژی آن منحصر به فرد می باشد و شامل مولکول هایی است که در بافت های دیگر دندان یافت نشده است. تمامیت ساختاری و ترکیب بیوشیمیایی ماتریکس خارج سلولی سمان ریشه ی دندان هنگامی که در معرض بیماری های پریدونتال قرار می گیرد به شدت تضعیف

محلول حاوی بزاق مصنوعی که شرایطی مشابه شرایط دهان را ایجاد می کند، قرار گرفت. بزاق مصنوعی حاوی ترکیبات (۲/۲ mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>، ۲/۲ mM CaCl<sub>2</sub>، ۵۰ mM NaCl و مابقی آب مقطر (DDW) بود. نیمی از دندان های هر گروه به منظور بررسی تاثیر دهانشویه کلرهگزیدین هر روز به مدت ۳ دقیقه برای دو هفته در داخل محلول کلرهگزیدین ۰/۰۱۲ (VI-one، تبریز، ایران) قرار گرفت و سپس به محلول حاوی بزاق مصنوعی انتقال یافت. پس از دو هفته تمامی نمونه ها با اپوکسی (شرکت کیان رزین، تهران، ایران) مانت شدند. پس از تکمیل فرایند پلیمریزاسیون اپوکسی رزین، نمونه ها جهت برش در ناحیه CEJ به دستگاه CNC انتقال یافت. به کمک دستگاه CNC برش های افقی دقیق از ناحیه CEJ هر یک از دندان ها صورت گرفت.

دستگاه CNC حاوی دیسک از جنس استیل ضد زنگ الماس به ضخامت ۰/۳ میلی متر می باشد سرعت برش دستگاه RPM ۴۰۰۰ می باشد. سطح هر یک از نمونه ها در ناحیه برش خورده به منظور ایجاد یک سطح قابل رویت در میکروسکوپ، سمباده زده شده و سپس با نمد آغشته به رز تمیز گردید.

هر یک از نمونه های مانت شده به منظور بررسی سختی سنجی به دستگاه سختی سنج MH3 (شرکت کوپا پژوهش، ایران) انتقال یافت. ابتدا توسط بزرگنمایی ۵۰ و سپس توسط بزرگنمایی ۲۰۰ میکروسکوپ نواحی هدف انتخاب شد و پس از مشخص کردن عاج و سمان، توسط قسمت ایدنتور دستگاه، اثر Indentation (فرورفتگی) به ناحیه مورد نظر اعمال گردید. مدت زمان نفوذ فرو رونده الماسی در هر یک از نمونه ها ۱۰s بوده است. برای هر نمونه، ۴ اثر سنبه ای در ناحیه سمان و ۴ اثر سنبه ای در ناحیه عاج صورت گرفت. نمونه ها با فرو رونده الماسی مربعی حداکثر

عاج را داشته و به عنوان یک عامل کراس لینک برای الیاف کلاژن شناخته شده است. این ماده هم چنین به عنوان یک مهارکننده آنزیم های MMP عمل می کند و فعالیت آن وابسته به دوز است. در غلظت های پایین با مکانیسم Cation chelating عمل می کند؛ که این مکانیسم بر آنزیم های MMP-2 موثر است. در غلظت های بالا با مکانیسم دناتوریشن آنزیمی، آنزیم های MMP-2، 8، 9 را غیرفعال می کند.<sup>(۹)</sup>

از آنجایی که تغییراتی که در ساختار معدنی و آلی عاج و سمان دندان مبتلا به پریدونتیت ایجاد می شود بر توانایی باند مواد ترمیمی به آن ها موثر است<sup>(۷)</sup> و با توجه به کاربرد کلرهگزیدین بعنوان درمانی رایج برای بیماری های پریدونتال، بر آن شدید تا تغییرات ریز سختی عاج و سمان ریشه دندان های کشیده شده در اثر پریدونتیت مزمن را با دندان های کشیده شده سالم مورد بررسی قرار دهیم. فرضیه صفر این بود که ریزسختی و الاستیسیته عاج و سمان دندان های کشیده شده سالم و دندان های کشیده شده در اثر پریدونتیت مزمن با هم تفاوتی ندارد و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲ درصد بر روی ریزسختی و الاستیسیته عاج و سمان دندانهای کشیده شده سالم و دندان های کشیده شده در اثر پریدونتیت مزمن تاثیری ندارد.

### مواد و روش ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، حجم نمونه با استناد به مقاله Sundaram و همکاران<sup>(۱۰)</sup> تعیین شد. بدین ترتیب از ۳۰ دندان کشیده شده در اثر پریدونتیت مزمن و نیز ۳۰ دندان که به علت درمان ارتودنتیک یا نهفتگی درآورده شده بودند، استفاده گردید. پس از خارج سازی دندان ها از ساکت دندان، هر یک از نمونه ها به درون محفظه های جداگانه حاوی ماده ضدعفونی کننده تیمول ۰/۲ درصد تا زمان انجام آزمایش انتقال یافت. سپس، دندان ها درون

### یافته ها

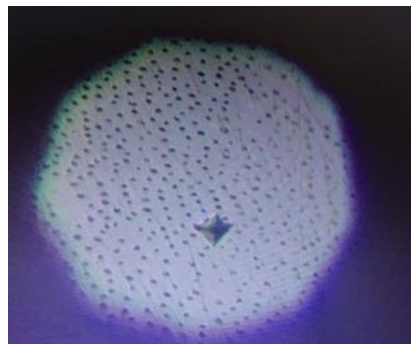
در ابتدا با استفاده از آزمون شاپیروویلک مشخص گردید که توزیع داده ها در گروه های مورد مطالعه نرمال بود. میانگین و انحراف معیار متغیرهای مورد بررسی به تفکیک هر عامل در جدول ۲ مشاهده می گردد. با استفاده از آزمون ANOVA اثر متقابل بین گروه و کلرگزیدین برای متغیر ریزسختی عاج وجود داشت ( $P=0/002$ ) اما اثر متقابل بین گروه و کلرگزیدین برای متغیرهای ریزسختی سمان، الاستیسیته عاج و الاستیسیته سمان معنی دار نبود (به ترتیب  $P=0/196$ ،  $P=0/897$  و  $P=0/829$ ).

در گروه دندان های سالم ریزسختی عاج با کلرگزیدین به طور معناداری از گروه بدون کلرگزیدین بالاتر بود ( $P<0/001$ ). همچنین در گروه پرپودنتیت، میانگین ریزسختی عاج بدون کلرگزیدین به طور معنی داری از گروه با کلرگزیدین کمتر بود ( $P<0/001$ ). ریزسختی سمان به طور معنی داری در گروه سالم بیشتر از گروه پرپودنتیت و نیز در گروه با کلرگزیدین بیشتر از بدون کلرگزیدین بود ( $P<0/001$ ). (جدول ۲)

الاستیسیته عاج به طور معنی داری در گروه سالم بیشتر از گروه پرپودنتیت بود ( $P<0/001$ ) و همچنین در گروه با کلرگزیدین بیشتر از بدون کلرگزیدین بود ( $P=0/026$ ). (جدول ۲)

الاستیسیته سمان به طور معنی داری در گروه سالم بیشتر از گروه پرپودنتیت ( $P<0/001$ ) و نیز در گروه با کلرگزیدین بیشتر از بدون کلرگزیدین بود ( $P=0/005$ ). (جدول ۱)

تحت نیروی ۱۰g قرار گرفتند. قطر اثر فرورونده توسط بزرگنمایی های ۵۰ و ۲۰۰ میکروسکوپ مشخص شده و میکروهاردنس ویکرز هر نمونه در ناحیه سمان و عاج تعیین گردید. (تصویر ۱)



تصویر ۱: اثر سنبه ای Indentor دستگاه MH3 بر روی عاج دندان

همچنین هر یک از نمونه ها به منظور بررسی مدولوس الاستیسیته عاج به دستگاه (UTM سنتام، تهران، ایران) انتقال یافت. این دستگاه حاوی سوزن به قطر ۰/۱mm بود که به عاج و سمان هر یک از نمونه های مورد مطالعه، نیروی ۱N وارد می کرد. سپس بر روی نمایشگر متصل به دستگاه، منحنی تبدیل فاز الاستیک به پلاستیک نمونه ها نشان داده می شد. بر اساس مقاومت دندان ها در برابر تغییر شکل، عددی بر روی صفحه نمایشگر که در واقع شیب نمودار در فاز الاستیک نمونه ها بود، نمایش داده می شد. داده ها با استفاده از آزمون ANOVA و t.test آنالیز شدند.

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار متغیرهای مورد مطالعه به تفکیک هر یک از سطوح عامل های گروه و کلرگزیدین

گروه	کلرگزیدین	تعداد	ریزسختی عاج (Kg/mm <sup>2</sup> )	ریزسختی سمان (Kg/mm <sup>2</sup> )	الاستیسته عاج (GPa)	الاستیسته سمان (GPa)
سالم	ندارد	۱۵	۶۴/۹±۴/۶۲	۳۳/۸±۳/۶	۱۹/۷±۱/۵	۱۰/۸±۰/۹
	دارد	۱۵	۷۴/۴±۵/۲	۴۱/۷±۵/۰	۲۱/۸±۱/۹	۱۲/۶±۰/۶
پریودنتیت	ندارد	۱۵	۴۳/۲±۵/۷	۲۰/۷±۳/۷	۱۳/۲±۱/۲	۶/۸±۱/۵
	دارد	۱۵	۶۰/۶±۳/۲	۳۱/۵±۴/۶	۱۵/۴±۱/۰	۸/۵±۰/۹

### بحث

در این مطالعه آزمایشگاهی، تعداد ۶۰ دندان کشیده شده (۳۰ دندان مربوط به بیماران پریودنتیت مزمن و ۳۰ دندان افراد سالم) از نظر ریزسختی عاج و سمان و الاستیسته عاج و سمان در دو گروه با و بدون حضور کلرگزیدین ۰/۱۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

این مطالعه نشان داد که تفاوت چشمگیری بین سختی عاج و سمان دندان های سالم و دندان های مبتلا به بیماری پریودنتال وجود داشت ( $P < 0/05$ ). این کاهش سختی در عاج و سمان دندان مبتلا می تواند به دلیل نرم شدن عاج و سمان دندان بواسطه دمیترالیزاسیون آنها توسط اسیدهای آلی موجود درون آگزودا های التهابی و همچنین فعالیت آنزیمی که در محدوده پاکت پریودنتال رخ می دهد، باشد.<sup>(۱۱)</sup> موسوی و همکاران<sup>(۱۲)</sup> نیز در مطالعه خود نشان دادند که ریزسختی عاج بدنال ابتلا به بیماری پریودنتال کاهش می یابد.

Riffle<sup>(۱۳)</sup> و Emslie<sup>(۱۴)</sup> در مطالعات خود نشان دادند که سختی عاج با عمق پاکت پریودنتال رابطه عکس دارد. Lee و همکاران<sup>(۷)</sup> نیز نشان دادند که بیماری های پریودنتال بدنال فعال کردن پروتیینازهای عاجی می توانند باند به عاج را تحت تاثیر قرار دهند.

همچنین مدولوس الاستیسته عاج دندان های پریودنتیت مزمن مورد مطالعه نسبت به دندان های سالم کاهش چشمگیری داشته است. که این موضوع می تواند بعلت اسیدهای آلی و آنزیم های موجود در آگزودای التهابی پاکت پریودنتال باشد که نتیجه آن انحلال اجزا معدنی و تجزیه پروتینی فیبرهای کلاژن می باشد.<sup>(۱۵)</sup>

بر اساس مطالعه Ruben و همکاران<sup>(۱۱)</sup>، ریز سختی سمان دندان هایی که پاکت پریودنتال دارند، در مقایسه با سمان دندان های سالم که با بافت همبند پوشانده شده اند، بلافاصله در ناحیه اپیکال اپیتلیوم جانکشنال کاهش می یابد. نرم تر شدن سمان در بیماری های پریودنتال نیز مانند عاج مربوط به فرایند دمیترالیزاسیون سطح سمان بواسطه ی اسیدهای آلی ناشی از ترشحات التهابی و به دلیل تحلیل ماتریکس کلاژنی و پروتئین-پلی ساکارییدی از طریق فعالیت آنزیم ها می باشد. با این حال بعد از تحلیل لته، سمان ریشه دندان در معرض محیط حفره ی دهان قرار می گیرد؛ لذا ممکن است توسط یون های کلسیم و دیگر املاح بزاق و مایع شیار لته رمینرالیزه شود. هنگامی که این اتفاق می افتد، سختی سماتی که در معرض حفره دهان قرار دارد، ممکن است به حالت عادی نزدیک شود.

از طرف دیگر مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از دهانشویه کلرگزیدین ۰/۱۲ درصد باعث بهبود خواص

دکلسیفیکاسیون عاجی جلوگیری می کند، که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

### نتیجه گیری

می توان از این مطالعه چنین نتیجه گرفت که دندان های سالم دارای خواص مکانیکی بالاتری نسبت به دندان های مبتلا به پریدونتیت مزمن می باشد و همچنین استفاده از دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۱۲ درصد باعث بهبود سختی و مدولوس الاستیسیته هم دندان های سالم و هم دندان های مبتلا به بیماری پریدونتال می شود.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان نامه دانشجویی با شماره ۲۸۵۶ می باشد؛ که با استفاده از حمایت مالی مرکز تحقیقات مواد دندان‌دانی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، انجام گردیده است که بدینوسیله از آنها تقدیر و تشکر می گردد.

مکانیکی (میکروهاردنس و مدولوس الاستیسیته) در هر یک از گروه های سالم و پریدونتیت مزمن نسبت به گروه های فاقد محلول شده است. اثر متقابل بین دندان های مورد مطالعه و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۱۲ درصد در آزمایشات سختی سنجی سمان، مدولوس الاستیسیته سمان و همچنین مدولوس الاستیسیته عاج دیده نشده است. به این معنی که کلرهگزیدین باعث بهبود خواص مکانیکی در هر دو گروه سالم و پریدونتیت گردیده است.

برخی مطالعات نشان داده اند که کلرهگزیدین از طریق ثابت کردن یون های کلسیم و فسفات و نیز دارا بودن توانایی مهار فعالیت های پروتئولیتیک آنزیم های MMPs ۲ و ۸ و ۹، که در نتیجه موجب کاهش تخریب ماتریکس ارگانیک می گردد، موجب حفظ یکپارچگی عاج می شود.<sup>(۱۷و۱۶)</sup> Ferrer و همکاران<sup>(۱۸)</sup> با بررسی توسط اتمیک اسپکتروفوتومتر نشان دادند که کلرهگزیدین از

### منابع

1. Rad AB, Saghafi S, Hashemi E, Aghasizadeh E, Ebrahimi F, Banihashem A, et al. Comparison of albumin, total protein, globulin and enzyme activity Creatine Phospho Kinase (CPK) in the Gingival Crevicular Fluid of patients with chronic periodontitis before and after treatment. *Int J Multidisciplinary Curr Res* 2018; 6:1091-6.
2. Emslie RD, Stack MV. The micro hardness of roots of teeth with periodontal disease. *Dent Pract Dent Rec* 1958; 9:101-3.
3. Selvig KA, Hals E. Periodontally diseased cementum studied by correlated microradiography, electron probe analysis and electron microscopy. *J Periodontal Res* 1977; 12(6):419-29.
4. Selvig KA. Biological changes at the tooth-saliva interface in periodontal disease. *J Dent Res* 1969; 48(5):846-55.
5. Aleo JJ. Inhibition of endotoxin-induced depression of cellular proliferation by ascorbic acid. *Proc Soc Exp Biol Med* 1980; 164(3):248-51.
6. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(6):474-84.
7. Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontal Res* 1995; 30(1):23-33.
8. Ho SP, Goodis H, Balooch M, Nonomura G, Marshall SJ, Marshall G. The effect of sample preparation technique on determination of structure and nanomechanical properties of human cementum hard tissue. *Biomaterials* 2004; 25(19):4847-57.
9. Ricci HA, Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Effect of chlorhexidine on bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems to dentin of primary and permanent teeth. *Am J Dent* 2010; 23(3):128-32.
10. Sundaram S, Ramaseshan R, Dash S, Rao SR. Evaluation of the nanostructure of cervical third cementum in health and chronic periodontitis: an in vitro study. *J Indian Soc Periodontol* 2014; 18(5):560-6.

11. Ruben MP, Shapiro A. An analysis of root surface changes in periodontal disease a review. *J Periodontol* 1978; 49(2):89-91.
12. Horieh Moosavi DD, Sara Majidinia DD, Rad SA, Giv MJ, Fatemeh Namdar DD. Microhardness and cervical microleakage of healthy and periodontally involved dentin at class II cavities restored with conventional and bulk-fill resin composites. *Ann Stomatol* 2018; 9(3):123-9.
13. Riffle AB. The cervical enamel: its physical characteristics during curettage. *J Periodontol* 1951; 22(4):225-33.
14. Emslie RD, Stack MV. The micro hardness of roots of teeth with periodontal disease. *Dent Pract Dent Rec* 1958; 9:101-3.
15. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, et al. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res* 2012; 91(12):1119-23.
16. 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.
17. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000; 45(9):757-65.
18. Ferrer-Luque CM, Perez-Heredia M, Baca P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP. Decalcifying effects of antimicrobial irrigating solutions on root canal dentin. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18(1):e158-61.