

Degradation of a hybrid layer – review of literature

Degradacja warstwy hybrydowej – przegląd piśmiennictwa

Monika Łukomska-Szymańska, Jerzy Sokołowski, Barbara Łapińska

Zakład Stomatologii Ogólnej, Katedra Stomatologii Odtwórczej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska
Department of General Dentistry, Chair of Restorative Dentistry, Medical University of Lodz, Poland
Head: prof. J. Sokołowski

Abstract

Introduction. The basic premise of adhesive dentistry is to achieve the reliable chemical bond between dental hard tissues and restorative composite material. The hybrid layer is one of the key elements of this interface. Unfortunately, over time the hybrid layer wears out under the influence of physical and chemical factors. As a consequence of this process, marginal leakage forms along the restoration interface, together with marginal discolorations, and even the loss of filling retention. Two following models of hybrid layer degradation were described: disorganization of collagen fibres and hydrolysis (loss) of the resin from the inter-fibrillar spaces within the hybrid layer. Degradation of the collagen matrix requires the coexistence of demineralization and activation of endogenous enzymes present in the dentine. Metalloproteinase of the dentine matrix can be activated by caries or by the application of certain types of bonding systems. **Aim of the study.** To review up-to-date research results on factors affecting the hybrid layer degradation. **Conclusions.** Both the type of bonding system and the method of dentine surface treatment have a significant impact on the quality of the hybrid layer, and thus the durability of the resulting adhesive bond. A proper clinical protocol should be established in order to achieve the highest bond strength between the composite material and the dental hard tissue while minimizing degradation with time.

Streszczenie

Wstęp. Podstawowym założeniem stomatologii adhezyjnej jest uzyskanie trwałego połączenia chemicznego twardych tkanek zębca z materiałem kompozytowym. Jednym z kluczowych elementów tego połączenia jest warstwa hybrydowa. Niestety z upływem czasu dochodzi do starzenia się warstwy hybrydowej pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych. W konsekwencji tego procesu dochodzi do powstania przecieku brzeżnego wzdłuż granicy wypełnienia, przebarwień brzeżnych, a nawet utraty retencji wypełnienia. Opisano dwa modele degradacji warstwy hybrydowej: dezorganizację włókien kolagenowych oraz hydrolizę (ubytek) żywicy przestrzeni międzywłóknienkowych w obrębie warstwy hybrydowej. Degradacja matrycy kolagenowej wymaga współistnienia demineralizacji i aktywacji endogennych enzymów obecnych w zębnie. Zawarte w macierzy zębiny metaloproteiny mogą zostać aktywowane, m. in. przez proces próchnicowy lub po zastosowaniu niektórych typów systemów wiążących. **Cel pracy.** Podsumowanie wyników badań pochodzących z piśmiennictwa, dotyczących czynników wpływających na degradację warstwy hybrydowej. **Podsumowanie.** Zarówno zastosowany system wiążący, jak i sposób przygotowania powierzchni zębiny mają znaczący wpływ na jakość warstwy hybrydowej, a tym samym na trwałość uzyskanego połączenia adhezyjnego. Należy zastanowić się nad takim protokołem postępowania klinicznego, który zapewni uzyskanie najlepszej wytrzymałości połączenia materiału kompozytowego z tkankami twardymi zębca przy jednoczesnym ograniczeniu jego degradacji w czasie.

KEYWORDS:

hybrid layer, dentine, matrix metalloproteinase, bonding system, degradation

HASŁA INDEKSOWE:

warstwa hybrydowa, zębina, metaloproteiny macierzy, system wiążący, degradacja

The basic premise of adhesive dentistry is to achieve a reliable chemical bond between the hard tissues of the tooth and a ceramic or composite reconstructive material. The hybrid layer is one of the key elements of this interface. The hybrid layer is formed by dentine demineralization due to the action of acid and resin infiltration into the etched tissue. Its task is to combine two different elements: hydrophilic dentine and hydrophobic composite material, as well as to seal the dentine surface against micro-leakage and increase its resistance to acids. The clinical success of restoration depends not only on the quality of the hybrid layer at the time of its formation, but more importantly on its long-term stability and durability.

Unfortunately, the hybrid layer wears out over time. The clinical implications of this are seen in the dental practice. The weakening of the bond between the composite material and dental hard tissues initially leads to the leakage and passage of micro-organisms. In consequence, the filling may lose retention or secondary caries may develop, and a new composite filling or prosthetic reconstruction is required. The aging of the hybrid layer depends on physical and chemical agents. Physical factors such as chewing forces, shrinkage and expansion stresses repeated due to temperature changes or as a result of cross-linking of the resin that occur in the oral cavity¹ affect the bond stability.²⁻⁴ Acidic chemicals contained in the liquid of dentinal tubules, saliva, foods and drinks, as well as bacterial products, additionally endanger the tooth-biomaterial bond. They cause different degradation models of unprotected collagen fibres,⁵⁻⁷ resin monomers elution (probably due to incomplete polymerisation)⁸⁻¹⁰ and degradation of its elements.^{3,4,11}

Hashimoto et al.^{5,6} and Armstrong et al.^{12,13} described two models of the hybrid layer degradation. They observed disorganization of collagen fibres and hydrolysis (loss) of the interfibrillar resin spaces within the hybrid layer, which decreases the bond strength between the bonding system and dentine.

Hydrolysis and degradation of collagen fibres were observed in the absence of bacteria.^{6,14}

Podstawowym założeniem stomatologii adhezyjnej jest uzyskanie trwałego chemicznego połączenia twardych tkanek zęba z ceramicznym lub kompozytowym materiałem odtwórczym. Jednym z kluczowych elementów tego połączenia jest warstwa hybrydowa. Warstwa hybrydowa powstaje na skutek demineralizacji tkanek zęba pod wpływem działania kwasu oraz infiltracji żywic w głąb wytrawionej tkanki. Jej zadaniem jest połączenie dwóch różnych elementów: hydrofilowej zębiny i hydrofobowego materiału kompozytowego oraz uszczelnienie powierzchni zębiny przed mikroprzeciekami i podniesienie jej odporności na działanie kwasów. O sukcesie klinicznym odbudowy decyduje nie tylko jakość warstwy hybrydowej w momencie jej postania, ale co ważniejsze jej stabilność, a zarazem trwałość w czasie.

Niestety z upływem czasu dochodzi do starzenia się warstwy hybrydowej. Kliniczne implikacje tego zjawiska są obserwowane w codziennej praktyce stomatologicznej. Osłabienie połączenia materiał kompozytowy – tkanki twarde zęba prowadzi początkowo do przecieku i otwiera drogę dla drobnoustrojów. W późniejszym etapie, może dojść do utraty retencji wypełnienia lub powstania próchnicy wtórnej, co jest równoznaczne z koniecznością wykonania nowego wypełniania kompozytowego lub odbudowy protetycznej. Proces starzenia warstwy hybrydowej jest zależny od czynników fizycznych i chemicznych. Czynniki fizyczne – takie jak siły żucia, naprężenia skurczowe i rozkurczowe powtarzające się w wyniku zmian temperatury lub w wyniku sieciowania, do jakich dochodzi w jamie ustnej¹ – wpływają na stabilność tego połączenia.²⁻⁴ Kwaśne substancje chemiczne, zawarte w płynie kanalików zębinowych, ślinie, pokarmach i napojach oraz produkty bakteryjne dodatkowo narażają połączenie zęb – biomateriał. Powodują różne modele degradacji niechronionych włókien kolagenowych,⁵⁻⁷ elucję monomerów żywicy (prawdopodobnie na skutek niecałkowitej polimeryzacji)⁸⁻¹⁰ oraz degradację jej składników.^{3,4,11}

Hashimoto i wsp.^{5,6} oraz Armstrong i wsp.^{12,13} opisali dwa modele degradacji warstwy hybrydowej. Zaobserwowali dezorganizację włókien kolagenowych oraz hydrolizę (ubytek) żywicy prze-

Because some components of the bonding system are released into water, water trees (small spaces filled with water) are formed within the polymer matrix. This produces a permeable bond along the filling border (nano-leakage) without the presence of bacteria.¹⁴⁻¹⁶ Thus, hydrolysis may cause bacterial leakage. Other factors involved in the formation of nano-leakage include: the type of solvent (water, acetone), monomers (HEMA PENTA, Bis-GMA), different molecular weight of components (from 130 – HEMA to 513 - Bis-GMA), various additives (maleic acid, glutaraldehyde), and different methods of bonding system application (to the dentine with different humidity).¹⁷ As regards polymers, hydrolysis is a chemical process that involves degradation of covalent bonds between polymers following the cleavage of ester bond caused by its reaction with water molecule. This causes weight loss within the bonding system. In addition to washing the resin out of the bonding system, hydrolysis is believed to be the main cause of degradation of the bonding system in the hybrid layer,^{2,5-7,18,19} thus reducing over time the bond strength formed by bonding agents.^{2,20,21}

Degradation of the collagen matrix requires the coexistence of demineralization and activation of endogenous enzymes present in the dentine. Dentine, as well as other tissues of collagen, contains bound matrix metalloproteinases (MMPs) – MMP-2 and MMP-9 gelatinases, MMP-3 stromelysin (proteoglycanase), MMP-8 collagenase and MMP-20 enamelysin (located mainly in the newly formed enamel) – and cathepsins.²²⁻²⁶ Their greatest concentration is in the dentine-enamel junction, and this may cause the spread of decay along this interface.²⁷

The study results obtained by *Mazzoni et al.*²⁸ clearly showed that despite the higher content of MMP-3 in the mineralized dentine compared to demineralized tissue, MMP-3 was proteolytically active only in the demineralised dentine. Matrix metalloproteinase may be present in the dentine as unbound protein or bound to the mineralized matrix. Pulp odontoblasts directly adjacent to the dentine may be another source of MMP. Self-etch adhesive systems applied to the treated dentine

strzeni międzywłókienkowych w obrębie warstwy hybrydowej, która powoduje zmniejszenie wytrzymałości połączenia systemu wiążącego z zębina.

Zaobserwowano występowanie hydrolizy i degradacji włókien kolagenowych przy braku obecności bakterii.^{6,14} Ponieważ niektóre składniki systemu wiążącego są uwalniane do wody, w matrycy polimeru powstają drobne przestrzenie wypełnione wodą. W wyniku tego powstaje przepuszczalne połączenie wzdłuż granicy wypełnienia (nanoprzeciek) bez obecności bakterii.¹⁴⁻¹⁶ Hydroliza może być więc przyczyną przecieku bakteryjnego. Z innych czynników wpływających na powstanie nanoprzecieku można wymienić: rodzaj rozpuszczalnika (woda, aceton), monomery (HEMA, PENTA, Bis-GMA), różną masę cząsteczkową składników (od 130 – HEMA, do 513 – Bis-GMA) oraz różne dodatki (kwas maleinowy, aldehyd glutarowy), jak również metodę aplikacji systemu wiążącego (na zębina o różnym stopniu wilgotności).¹⁷ Hydroliza w odniesieniu do polimerów jest procesem chemicznym, który polega na rozkładzie wiązań kowalencyjnych między polimerami poprzez dołączenie wody do wiązania estrowego. Powoduje to utratę masy systemu wiążącego. Oprócz wymywania żywicy systemu wiążącego, hydroliza jest uważana za główną przyczynę degradacji systemu wiążącego w warstwie hybrydowej,^{2,5-7,18,19} co wpływa na zmniejszenie wytrzymałości połączenia wytworzonego przez systemy wiążące w czasie.^{2,20,21}

Degradacja matrycy kolagenowej wymaga współistnienia demineralizacji i aktywacji endogennych enzymów obecnych w zębina. Zębina, podobnie jak inne tkanki zbudowane z kolagenu, zawiera związane metaloproteiny macierzy (ang. matrix metalloproteinases, MMPs) – żelatynazy MMP-2 i MMP-9, stromelizynę MMP-3 (proteoglikanaza), kolagenozę MMP-8 i enamelizynę MMP-20 (umiejscowioną głównie w nowo powstałym szkliwie) – oraz katepsyny.²²⁻²⁶ Ich największa koncentracja znajduje się na linii połączenia szkliwno-zębinowego, co może być przyczyną szerzenia się próchnicy wzdłuż tej granicy podczas jej rozwoju w zębina.²⁷

Wyniki badań *Mazzoni* i wsp.²⁸ jasno wska-

cause the secretion of MMP by the odontoblasts. Then, the enzyme can reach the hybrid layer through the dentinal tubules.²⁹ Activated MMP can also reach the hybrid layer through micro- or nano-leakage along the adhesive bond.³⁰

Under physiological conditions, the proteolytic activity of MMP is regulated by tissue inhibitors of metalloproteinase. This balance can be disturbed, among others, by dental caries, periodontal inflammation, arthritis, cancer and cardiovascular diseases.^{26,31} MMPs can also be activated by adhesive procedures using simplified total etch bonding systems (TE)³² or strongly acidic self-etch bonding systems (SE).^{16,33} After applying 37% phosphoric acid for 15 seconds, the collagenolytic activity of the mineralized dentine reduction has been observed – probably as a result of strong acidic environment (pH = 0.7), which partially denatures or removes MMPs.^{14,32} However, the application of simplified total etch bonding systems (Single Bond, pH = 3.3-3.5) causes a 3.5-fold increase in the MMP levels compared to the unetched dentine. This can be explained by the fact that the use of a slightly acidic bonding system could cause additional demineralisation of the underlying mineralized dentine, revealing new MMPs (without their denaturation) and causing their activation.

Biochemical and immuno-histochemical tests have shown that, as a consequence of the application of two-stage TE bonding system, MMP-2 is trapped in the hybrid layer.³⁴ The method of etching can thus affect the degradation model of the bond over time. The degradation mechanism⁵ can occur in different ways depending on the bonding system used to connect the composite material and dentine (SE or TE).³⁵⁻³⁸

Moreover, the number of active MMP-2 enzymes depends on the method of dentine surface treatment (etching, bonding system, CHX).³⁴ The enzymes are incorporated into the hybrid layer, which prevents their separation.³⁴ Despite infiltration of the resin, MMPs remain in the active form, causing slow degradation of the exposed collagen fibres contained in the hybrid layer, especially when the etched dentine is not fully impregnated with resin monomers.^{32,33,39,40} This leads to a reduction of

zują, że mimo wyższej zawartości MMP-3 w zębinie zmineralizowanej w porównaniu z niezmineralizowaną, MMP-3 jest aktywna proteolitycznie jedynie w zębinie zdeminiarizowanej. Metaloproteinazy macierzy mogą występować w zębinie w postaci niezwiązanego białka lub w postaci związanej ze zmineralizowaną macierzą. Innym prawdopodobnym źródłem MMP mogą być odontoblasty miążgi sąsiadujące bezpośrednio z zębiną. Samotrawiące systemy wiążące nałożone na opracowaną zębinę powodują wydzielanie MMP przez odontoblasty. Następnie enzym ten może kanalikami zębinowymi dotrzeć do warstwy hybrydowej.²⁹ Zaktywowane MMP mogą dotrzeć także do warstwy hybrydowej w wyniku mikroprzecieku lub nanoprzecieku wzdłuż połączenia adhezyjnego.³⁰

W warunkach fizjologicznych aktywność proteolityczna MMP jest regulowana przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz. Równowaga ta może zostać zakłócona, m.in. przez próchnicę zębiny, stan zapalny przyzębia, zapalenie stawów, nowotwory czy choroby układu sercowo-naczyniowego.^{26,31} Do aktywacji MMP może dojść również w wyniku przeprowadzenia procedur adhezyjnych z wykorzystaniem uproszczonych systemów wiążących typu total etch (TE)³² lub silnie kwaśnych systemów typu self-etch (SE).^{16,33} Po zastosowaniu 37% kwasu fosforowego przez 15 sekund zaobserwowano zmniejszenie aktywności kolagenolitycznej zmineralizowanej zębiny – prawdopodobnie w wyniku silnie kwaśnego odczynu (pH = 0,7), co częściowo denaturuje lub usuwa MMPs.^{14,32} Zastosowanie na wytrawioną zębinę uproszczonego systemu wiążącego TE (Single Bond; pH = 3,3–3,5) powoduje jednak 3,5-krotny wzrost poziomów MMPs w porównaniu z niewytrawioną zębiną. Można to tłumaczyć tym, że zastosowanie systemu wiążącego o nieznacznie kwaśnym odczynie mogło spowodować dodatkową demineralizację leżącą poniżej zmineralizowanej zębiny, odsłaniając nowe MMPs (nie denaturując ich) i powodując ich aktywację.

Badania biochemiczne i immunohistochemiczne wykazały, że MMP-2 zostaje uwięziona w warstwie hybrydowej powstałej w wyniku zastosowania 2-etapowego systemu wiążącego typu TE.³⁴

the bond strength (μ TBS) in long-term studies (after three and twelve months).³⁸

The bonding system, as well as the method of dentine surface treatment, have a significant impact on the quality of the hybrid layer, and thus on the durability and nature of the adhesive bond. A proper clinical protocol should be established in order to achieve the highest bond strength between the composite material and the dental hard tissue while minimizing degradation with time. Based on the literature it can be concluded that both two-step self-etch system (together with selective enamel etching) and total-etch system allow obtaining a stable adhesive bond.

Rodzaj trawienia może więc wpływać na model degradacji połączenia w czasie,⁵ a mechanizm degradacji może przebiegać w różny sposób w zależności od systemu wiążącego użytego do połączenia materiału kompozytowego z zębina (SE czy TE).³⁵⁻³⁸

Ponadto, liczba aktywnych enzymów MMP-2 jest zależna od sposobu przygotowania powierzchni zębiny (trawienie, system wiążący, CHX).³⁴ Enzymy te zostają wbudowane w warstwę hybrydową, co uniemożliwia ich odłączenie.³⁴ Mimo infiltracji żywicą, MMP pozostają w aktywnej postaci, powodując powolną degradację odsłoniętych włókien kolagenowych znajdujących się w warstwie hybrydowej – szczególnie jeżeli wytrawiona zębina nie jest w pełni zaimpregnowana monomerami żywicy.^{32,33,39,40} Skutkuje to zmniejszeniem wytrzymałości połączenia (μ TBS) w badaniach długoczasowych (po 3 i 12 miesiącach).³⁸

Zarówno zastosowany system wiążący, jak i sposób przygotowania powierzchni zębiny mają znaczący wpływ na jakość warstwy hybrydowej, a tym samym na trwałość i jakość uzyskanego połączenia adhezyjnego. Należy zastanowić się nad takim protokołem postępowania klinicznego, który zapewni uzyskanie najlepszej wytrzymałości połączenia materiału kompozytowego z tkankami twardymi zęba przy jednoczesnym ograniczeniu jego degradacji w czasie. Na podstawie piśmiennictwa można stwierdzić, że zastosowanie zarówno dwuetapowych systemów self-etch (wraz selektywnym trawieniem szkliwa), jak i total-etch pozwala uzyskać stabilne połączenie adhezyjne.

References

1. Gale MS, Darvell BW: Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *J Dent* 1999; 27: 89-99.
2. Tay FR, Pashley DH: Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J. Can. Dent Assoc* 2003; 69: 726-731.
3. De Munck J, Van Landuyt k, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al.: A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005; 84: 118-132.
4. De Munck J, Braem M, Wevers M, Yoshida Y, Inoue S, Suzuki K, et al.: Micro-rotary fatigue of tooth-bi-

- omaterial interfaces. *Biomaterials* 2005; 26: 1145-1153.
5. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, et al.: SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J. Biomed. Mater Res B Appl Biomater* 2003; 66: 287-298.
 6. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H: In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials* 2003; 24: 3795-3803.
 7. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H: In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res* 2000; 79: 1385-1391.
 8. Cadenaro M, Pashley DH, Marchesi G, Carrilho M, Antonioli F, Mazzoni A, et al.: Influence of chlorhexidine on the degree of conversion and E-modulus of experimental adhesive blends. *Dent Mater* 2009; 25: 1269-1274.
 9. Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH, Robinson SJ: Current concepts on adhesion to dentin. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8: 306-335.
 10. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al.: Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci* 2005; 113, 525-530.
 11. Finer Y, Santerre JP: Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res* 2004; 83: 22-26.
 12. Armstrong SR, Keller JC, Boyer DB: The influence of water storage and C-factor on the dentin-resin composite microtensile bond strength and debond pathway utilizing a filled and unfilled adhesive resin. *Dent Mater* 2001; 17: 268-276.
 13. Armstrong SR, Vargas MA, Fang Q, Laffoon JE: Microtensile bond strength of a total-etch 3-step, total-etch 2-step, self-etch 2-step, and a self-etch 1-step dentin bonding system through 15-month water storage. *J Adhes Dent* 2003; 5: 47-56.
 14. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al.: Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83: 216-221.
 15. Ferrari M, Tay FR: Technique sensitivity in bonding to vital, acid-etched dentin. *Oper Dent* 2003; 28: 3-8.
 16. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al.: Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 160-166.
 17. Ding PG, Wolff D., Pioch T, Staehle HJ, Dannewitz B: Relationship between microtensile bond strength and nanoleakage at the composite-dentin interface. *Dent Mater* 2009; 25: 135-141.
 18. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, et al.: Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res* 2002; 63: 306-311.
 19. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Hiraishi N, Yiu CK: Water treeing in simplified dentin adhesives – déjà vu? *Oper Dent* 2005; 30: 561-579.
 20. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al.: Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials* 2005; 26: 6449-6459.
 21. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al.: Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater* 2006; 22: 973-980.
 22. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM: The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 757-765.
 23. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L: The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 2002; 81: 603-607.
 24. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L: The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007; 65: 1-13.
 25. Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, et al.: Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod* 2009; 35: 686-689.
 26. 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: 147-152.
 27. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M: Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 109-116.
 28. Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, et al.: Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent* 2011; 39: 231-237.
 29. Lehmann N, Debret R, Roméas A, Magloire H, Degrange M, Bleicher F, et al.: Self-etching increases matrix metalloproteinase expression in the dentin-pulp complex. *J Dent Res* 2009; 88: 77-82.
 30. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M,

- Menashi S*: The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 2006; 85: 22-32.
31. *Małgorzata Nędzi-Góra, Górska R*: Role of metalloproteinases in periodontal diseases. A review. *Nowa Stomatol* 2001; 1: 46-49.
32. *Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L*, et al.: Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006; 27: 4470-4476.
33. *De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G*, et al.: Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res* 2009; 88: 1101-1106.
34. *Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjäderhane 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: 470-477.
35. *De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K*, et al.: In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch and an etch-and-rinse adhesive. *J Dent Res* 2003; 82: 136-140.
36. *Koshiro K, Inoue S, Sano H, De Munck J, Van Meerbeek B*: In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch and an etch-and-rinse adhesive. *Eur J Oral Sci* 2005; 113: 341-348.
37. *Toledano M, Osorio R, Albaladejo A, Aguilera FS, Osorio E*: Differential effect of in vitro degradation on resin-dentin bonds produced by self-etch versus total-etch adhesives. *J Biomed Mater Res A* 2006; 77: 128-135.
38. *Toledano M, Osorio R, Osorio E, Aguilera FS, Yamauti M, Pashley DH*, et al.: Effect of bacterial collagenase on resin-dentin bonds degradation. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18: 2355-2361.
39. *Reis AF, Giannini M, Pereira PNR*: Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin-dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dent Mater* 2007; 23: 1164-1172.
40. *Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L*, et al.: Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater* 2010; 26: 320-325.

Address: 92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
Tel.: +4842 6757461,
e-mail: monika.lukomska-szymanska@umed.lodz.pl

Received: 10th April 2016
Accepted: 23rd April 2017