

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Fogorvostudományi Kar, Fogpótlástani Tanszék*
 Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet**
 Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet***
 Debreceni Egyetem, Fizikai Kémiai Intézet****

10–30%-os hidrogén-peroxid humán fogzománcra gyakorolt hatásának in vitro vizsgálata

DR. BISTEY TAMÁS*, DR. JENEI ATTILA**, DR. SZONDY ZSUZSA***, DR. NAGY P ISTVÁN****, DR. HEGEDŰS CSABA*

A fogászati gyakorlatban széles körben alkalmaznak fogfehérítési módszereket a különböző elszíneződések kezelésére. Ezek az anyagok hidrogén- vagy karbamid-peroxidot tartalmaznak, melyek oxidatív tulajdonságuk révén fejtik ki hatásukat. A fogfehérítések során számos mellékhatással kell számolni, melyek hatással lehetnek a nyálkahártyára és a fogak kemény szöveteire. Jelen munka célja, hogy szerzők megvizsgálják a 10–30%-os koncentrációjú hidrogén-peroxid oldatok hatással vannak-e a fogzománc felületi morfológiájára és az organikus állományra.

Vizsgálatukban 10-20-30%-os hidrogén-peroxid oldattal, egy óráig kezelték 29 emberi fogat. A külső felszín vizsgálatához atomerő-mikroszkópot alkalmaztak. A belső szerkezeti változások értékelésére, Ellman-reakcióval, az anorganikus állomány SH csoportjain végbemenő változások kimutatását választották.

Az atomerő-mikroszkópos felvételeken a zománc felületének határozott változása volt megfigyelhető, mind a három alkalmazott koncentráció (10-20-30%) esetében. Az Ellman-reakcióval három különböző típusú tiol-csoportot tudtak megkülönböztetni, melyekhez a hidrogén-peroxid könnyen, közepesen vagy nehezen fért hozzá, utalva azok elhelyezkedésére. A két vizsgálat egyaránt változásokat mutatott ki a zománc felületén és az organikus állományban. Az eredmények rámutatnak a fogfehérítéshez használt peroxidok nem szelektív oxidatív hatására, illetve azok lehetséges mellékhatásaira.

Kulcsszavak: fogfehérítés, hidrogén-peroxid, atomerő-mikroszkópia, organikus állomány, anorganikus állomány

Bevezetés

Az elmúlt több mint egy évtized alatt a fogfehérítés napjaink egyik általános fogászati kezelésévé vált. Ez a módszer egyre népszerűbbé vált mind a betegek, mind a fogorvosok körében. A klinikai gyakorlatban számos eljárás ismeretes, melyek segítségével az elszíneződött fogakat nem restauratív módszerekkel fehérebbé, világosabbá lehet tenni.

A fogfehérítés első alkalmazását már a 18. században leírták [15], de a napjainkban leginkább használt 10%-os karbamid-peroxid alkalmazásáig sok egyéb kémiai anyagot is kipróbáltak [13]. Haywood és Heymann [13] 1989-ben írták le először ezt a módszert, melynek számos előnyös tulajdonsága mellett mellékhatásai is vannak. Habár a peroxid-tartalmú fogfehérítők hatásait nagyszámú klinikai és in vitro vizsgálattal próbálták elemezni, az oxidatív hatásmechanizmus minden részletét nem ismerjük pontosan. Feltételezések szerint a kis molekulaméretű oxidatív gyökök a fog kemény szövetébe penetrálva egy ún. nem szelektív oxidációban fejtik ki a hatásukat. Minden szerves és szervesetlen struktúrát oxidálnak, miközben feltételezések szerint, azok a mole-

kulák, amelyek kettős kötéseket vagy aromás gyűrűket tartalmaznak, szerkezetileg megváltoznak, és elvesztik színes tulajdonságukat. Ez a folyamat a zománcban és a dentinben játszódik le, vagyis az oxidáció a fog szöveteire is hatással van. A legtöbb tanulmány [11, 18, 28] eredménye azt mutatja, hogy a változások nem jelentősek vagy klinikailag nem szignifikánsak.

Az anorganikus állományban [6, 8, 10, 22, 31] több vizsgálat is változásokat mutatott ki. Rotstein [21] és McCracken [16] tanulmányaikban szignifikáns Ca^{2+} -csökkenést, illetve a Ca/P arány változását mutatták ki 7 napos fogfehérítési kezelés után. Arwill és mtsai [3] a fog kemény szöveteinek tanulmányozása során a zománc megnövekedett porozitását mutatták ki 30%-os hidrogén-peroxiddal végzett, 6 órás kezelés után. Attin és mtsai [4] a fehérített zománc keménységét tanulmányozták, és a mikrokeménységi mutatók szignifikáns csökkenését írták le. Seghi és Denry [25] tanulmányukban nem tudtak kimutatni csökkenést a zománc keménységében, de a törési paraméterek szignifikánsan csökkentek. Shannon és mtsai [26] felületi elválásokat mutattak ki kéthetes fogfehérítés után, de a keménység változása ebben az esetben sem volt szig-

nifikáns. *Wandera és mtsai* [30] 2, 4 és 8 hetes kezelése után nem tudtak kimutatni anyagvesztést a zománcban. *Hegedűs és mtsai* [14] 28 órás fogfehérítést követően atomerő-mikroszkóp segítségével vizsgálták a zománc felületét. Méréseikhez 10%-os hidrogén-peroxidot és 30%-os hidrogén-peroxidot használtak. A kezeléseket után a zománc felülete határozottan megváltozott, a felületi barázdák mélyebbek és érdekesebbek lettek. *Bitter* [7] hasonló barázdákat írt le pásztázó elektronmikroszkópos (PEM) módszert használva 30 órás fogfehérítés után. *Titley és mtsai* [27] tömény hidrogén-peroxid (35%) alkalmazása után 60 perccel precipitáriumképződést észleltek a zománc felületén. *McGuckin és mtsai* [17] különböző koncentrációjú fogfehérítő termékeknek a fogzománc felszíni morfológiájára kifejtett hatását vizsgálták profilometriás eljárással. Eredményeik szerint a fogfelszín érdekesebb és hullámosabb lett a kezeléseket után. *Goldberg és mtsai* [12], *Arends és mtsai* [2] a karbamid zománcra gyakorolt hatását vizsgálták. Ezen tanulmányok alapján elmondható, hogy mind az organikus, mind pedig az anorganikus állomány szerepet játszik a zománc fogfehérítés után megfigyelt strukturális változásaiban.

Az oxidáció vélhetően az érett fogzománc organikus állományára is hatással van.

Jelen tanulmány célja az volt, hogy kimutassuk, milyen hatása vannak a 10-20-30%-os koncentrációjú hidrogén-peroxid oldatok a fogzománc felületi morfológiájára, és az organikus állomány SH csoportjainak oxidációjára, valamint hogy felhasználhatók-e az SH csoportok az organikus állományban végbemenő degradáció leírására a koncentráció függvényében.

Anyagok és módszerek

Vizsgálatunkhoz 29 emberi, vitális, nem carieses, nem tömött fogat (9 metszőfog, 3 szemfog, 17 premoláris és moláris) vizsgáltunk meg, melyeket parodontológiai megbetegedések miatt távolítottunk el. A fogak kiszáradásának, és az azt követő degradációnak megelőzésére a fogakat a vizsgálatok idejéig Kloramin-T oldatban (9,0g NaCl és 5,0g Kloramin-T, 1000 ml desztillált vízben feloldva) tároltuk.

A fogakból készített minták változásait két módszerrel vizsgáltuk: atomerő-mikroszkópia, Ellman-reakció.

Atomerő-mikroszkópia

Tizenkét fogat vizsgáltunk meg az atomerő mikroszkóppal. A fogak gyökerét és a koronájának lingualis felét, vízhűtés mellett, turbinával eltávolítottuk. Az így kapott mintákat (a klinikai korona buccális fele) könnyebben tudtuk a mikroszkóp alá helyezni. A mintákat véletlenszerűen négy csoportra (1–4) osztottuk. Minden csoportba három minta került. Az 1. csoportot negatív kontrollként használtuk. A mintákat fiziológiás sóoldatban tároltuk egy óráig,

majd az atomerő mikroszkóppal a természetes buccalis zománcfelszínekről felvételeket készítettünk. A 2. csoport mintáit 10%, a 3. csoport mintáit 20%, a 4. csoport mintáit pedig 30%-os hidrogén-peroxid oldatban kezeltük (Sigma Chemical Corporation H1009). Saját méréseink szerint az oldat pH-értéke 7,50 volt. A kezeléseket előtt 5,25%-os nátrium-hipoklorit oldattal átnedvesített vattával tisztítottuk meg a természetes zománcfelszíneket. A peroxidos kezeléseket ideje egy óra volt, melyet zárt Petri-csészékben végeztünk. A kezeléseket alatt a mintákat teljesen ellepte a hidrogén-peroxid oldat. A kezelés után a mintákat egy percig mostuk víz-spray alatt, majd fiziológiás sóoldatba helyeztük a mikroszkópos felvételek készítéséig.

A vizsgálatokhoz egy egyénileg épített ún. *stand-alone* típusú atomerő-mikroszkópot használtunk [29]. A mintákról felvételeket készítettünk kontakt és ún. *tapping* módban, levegőben. A mintákat egy a laboratóriumban készített alumíniumárványra helyeztük. A mikroszkóp „fej” része egy három lábon álló egység, melyet a minta felett megfelelően pozicionálva készítettünk a felvételeket. A letapogatótuk mozgatása elektronikus úton történt. A felvételekhez piramis formájú Si_3N_4 tartókarokat használtunk. A tűk átmérője 10–30 nm-ig változott, a tartókarok rugalmassági tényezője megközelítőleg 0,06 N/m volt. A zománcfelszínekről 10 x 10 és 20 x 20 μm nagyságú képeket készítettünk, melyeket számítógépesen dolgoztunk fel. Minden mintán hét területet vizsgáltunk oly módon, hogy egy hatszög csúcsainak és a látótér középső részén található területet értékeltük egy látóteren belül.

A szabad tiol-csoportok meghatározása

A fogzománc organikus állományának fehérjei illetve a peroxidok közötti reakció kimutatására szolgáló biokémiai eljáráshoz 17 fogat használtunk fel. A fog gyökerét a vizsgálatokhoz eltávolítottuk. A koronális részből a dentint és a pulpát turbinával, gyémánt forgóeszköz segítségével vízhűtés mellett eltávolítottuk. Az így kapott mintákat, melyek csak zománcot tartalmaztak, kerámiamozsárban homogenizáltuk. A zománcdarabokból 4 csoportot képeztünk, melyek mindegyike 500 mg zománcot tartalmazott. Az első csoportot negatív kontrollként használtuk, és fiziológiás sóoldatban tároltuk egy óráig. A többi három csoportot pedig 10-20-30%-os hidrogén-peroxidos kezelésnek vetettük alá. A kezelési idő egy óra volt. Minden egyes csoportot további két, 250 mg zománcot tartalmazó csoportra osztottuk a kezelés után alkalmazott dializáló oldat alapján. A kezelés után az egyik 250 mg zománcot tartalmazó csoportot foszfát pufferben (pH 7,27) dializáltuk hat óráig, a másikat pedig 6M guanidin-kloridot tartalmazó foszfát pufferben. A guanidin-klorid denaturálta a zománcproteineket, ezáltal a rejtett vagy temetett tiol-csoportok számát is meg tudtuk határozni, mivel az Ellman-reakcióban [19] keletkező anion számára nem hozzáférhetőek a teme-

tett tiol-csoportok. A dialízis oxigénmentes környezetben történt, hogy a maradék hidrogén-peroxidot eltávolítsuk a zománcból. Ennek érdekében a dializáló oldatba pozitív nyomású nitrogéngázt vezettünk az oxigén távoltartására. Erre azért volt szükség, mert az Ellman-reakció során keletkező aniont oxidálhatja a hidrogén-peroxid, és a meghatározás pontatlan lenne. A dialízis után a szabad tiol-csoportok számát az Ellman-reakcióval határoztuk meg. Minden egyes 250 mg zománcot tartalmazó mintára 1 ml 5'5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoészav)-at tartalmazó Ellman-reagenst cseppentettünk steril teszt csőben, majd egy óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A 5'5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoészav) a színes tionitrobenzoészav felszabadulása mellett reagál a szabad SH-csoportokkal. A keletkezett mennyiség arányos a reagáló szabad tiol-csoportok számával. Ezután a reagens abszorpcióját Shimadzu spektrofotométerrel 412 nm-en határoztuk meg. Referenciának a dializáló oldatot használtuk. A szabad tiol-csoportok számát a zománc egységnyi tömegére (mg) vonatkoztatva adtuk meg.

Eredmények

Atomerő-mikroszkópia

Az összes felvétel közül azokat válogattuk ebbe a közleménybe, melyek a felszíni képet jól reprezentálták a kezelés előtti és a kezelés utáni állapotban.

A hidrogén-peroxid oldatokkal végzett kezelések után a minták felülete makroszkóposan sima, fényes volt. A felvételeken nem volt látható a zománcot felépítő prizmák felszíni végződése, ami a foszforsavas kezelésre jellemző.

A nem kezelt minták felületén sekély barázdákat figyeltünk meg, melyek lefutása teljesen szabálytalan volt. Mélységük 28–84 nm, szélességük 100–250 nm között változott (1. ábra A,B).

A 2. ábra a 10%-os hidrogén-peroxid oldatos kezelés eredményét mutatja be két- és háromdimenziós fel-

vételeken (A, B). A felvételek jól ábrázolják a barázdák méretbeni változásait a negatív kontrollhoz viszonyítva. A barázdák szélessége 380–600 nm, míg a mélységük 50–150 nm között változott.

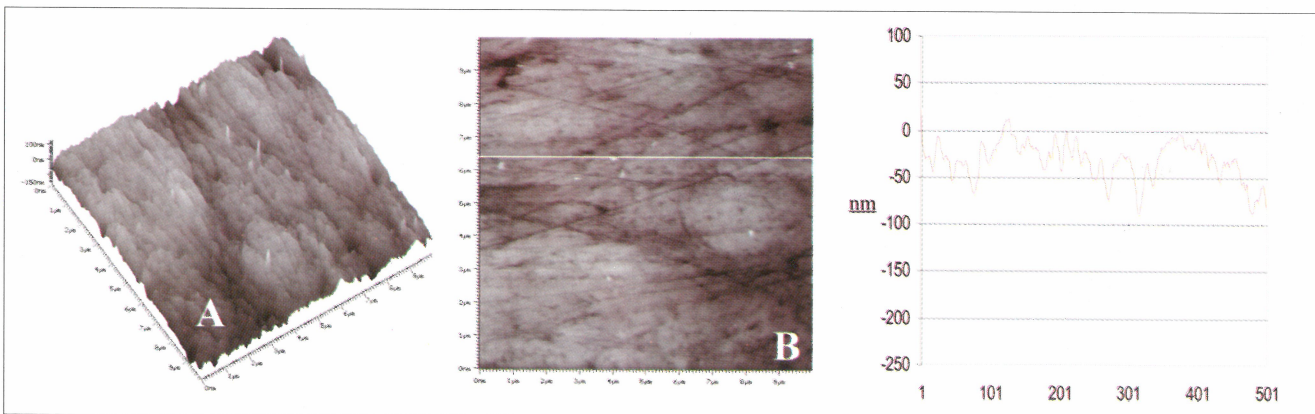
A 20% illetve a 30%-os oldatok tovább növelték a felszíni barázdák szélességét és mélységét (3–4. ábra A, B). A 20%-os hidrogén-peroxiddal végzett egyórás kezelés végére a felszíni barázdák átlagosan 136–544 nm szélesek és 100–150 nm mélyek voltak. A 30%-os oldatban való kezelés után ezek a paraméterek még tovább növekedtek (szélesség: 710–2000 nm, mélység: 50–250 nm).

A szabad tiol-csoportok meghatározása

Az összes tiol-csoport száma 1 mg zománcra vonatkoztatva $4,2 \pm 0,3 \cdot 10^{12}$ volt guanidin-klorid jelenlétében, és $1,01 \pm 0,12 \cdot 10^{12}$ volt guanidin-klorid nélkül. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy a tiol-csoportok 25%-a könnyen hozzáférhető az 5'5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoészav) számára. Az 5. ábráról leolvasható, hogy a 10%-os hidrogén-peroxid elegendő volt ahhoz, hogy az összes szabadon elérhető tiol-csoportot oxidálja. A mélyen fekvő ún. „temetett” tiol-csoportokkal azonban nem tudott reagálni az alacsony koncentrációjú peroxidoldat. Ezzel szemben a 20%-os hidrogén-peroxid már a „temetett” tiol-csoportokkal is reakcióba lépett (5. ábra). Azonban a koncentráció további növelése nem eredményezte a temetett tiol-csoportok számának szignifikáns csökkenését.

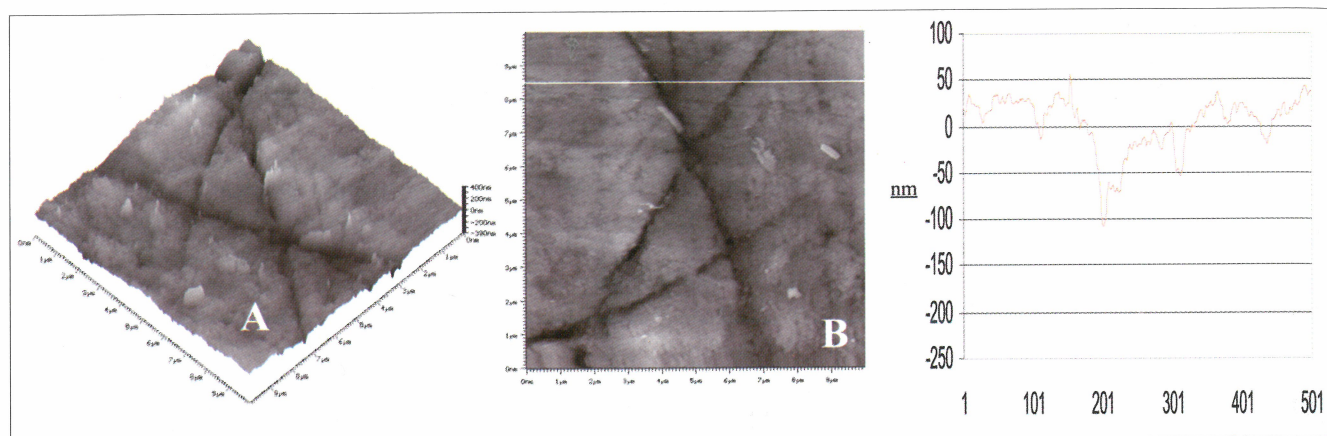
Megbeszélés

Napjainkban a fogfehérítés az esztétikus fogászat egyik fontos kezelési eljárása. A különböző peroxid-tartalmú fogfehérítők szinte mindennapos gyakorisággal kerülnek felhasználásra. A fogfehérítők legfontosabb alkotóeleme a karbamid- vagy hidrogén-peroxid, melyeket 3–38% közötti töménységben alkalmazhatunk.

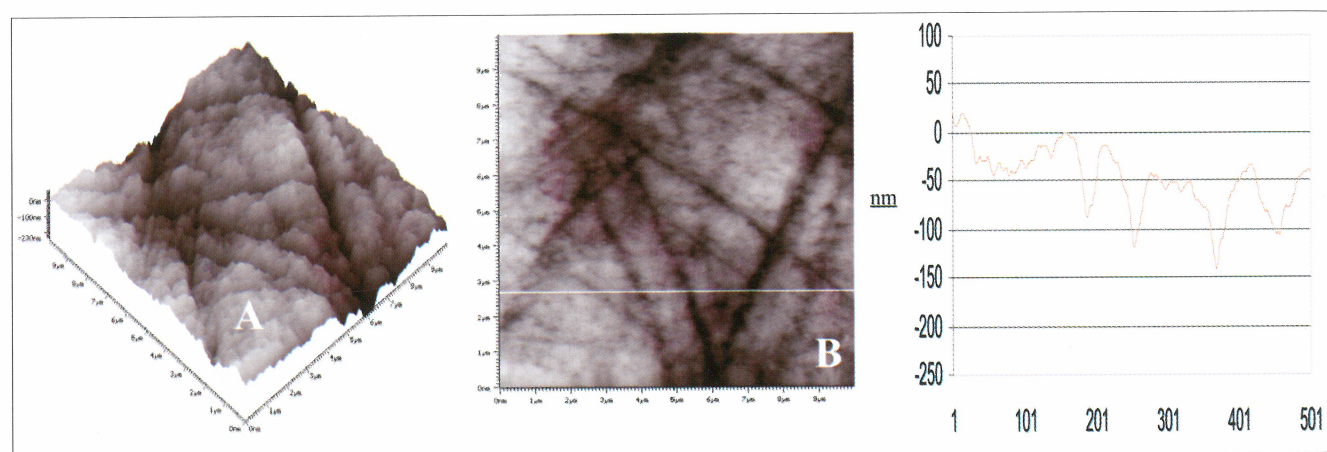


1. ábra. A nem kezelt, natív zománcfelület atomerő-mikroszkópos felvétele. A 3D (A) és a felülnézeti felvételeken (B) nagyszámú barázda látható, melyek lefutása szabálytalan. A grafikon a felülnézeti képen látható vonalnak megfelelően ábrázolja a 'z' magassági paramétereket. A grafikonról leolvasható a barázdák mélysége, mely 28–84 nm között változik. Fehér vonal: a grafikon helye.

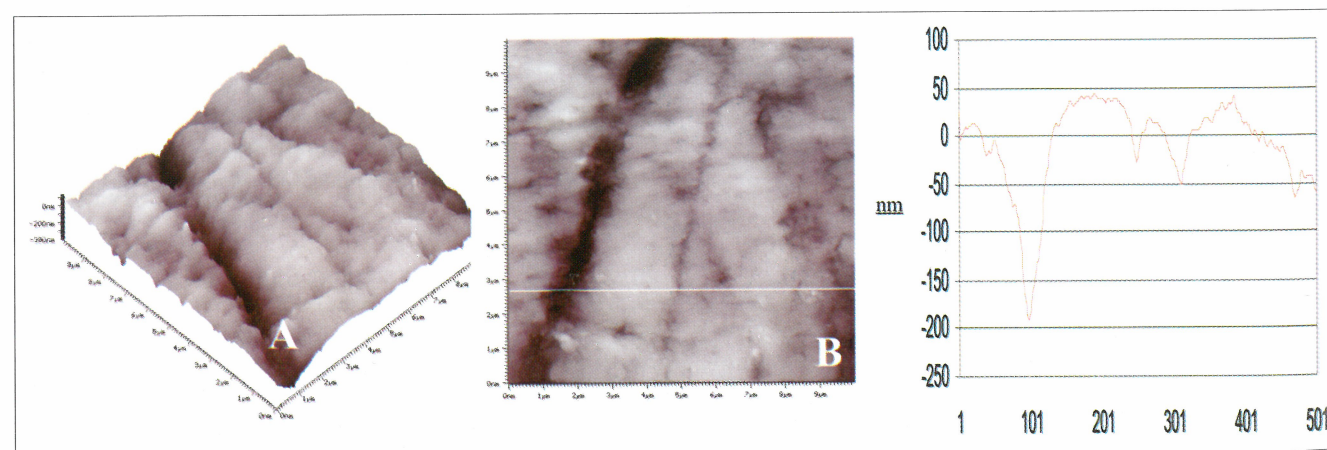
Méret: $10 \cdot 10 \mu\text{m}$. A grafikonon a magassági eloszlás nm-ben.



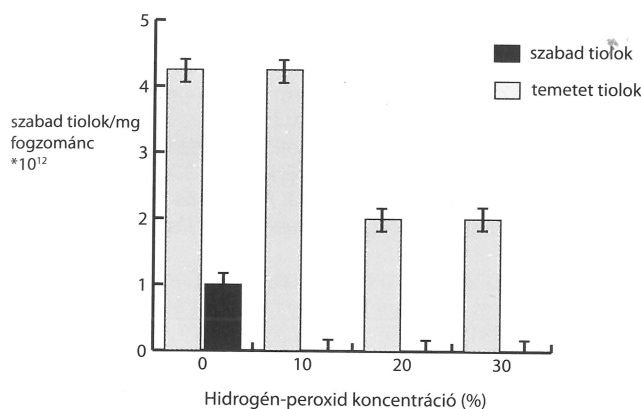
2. ábra. A 10%-os hidrogén-peroxid oldattal kezelt zománc atomerő-mikroszkópos felvétele. A natív zománc felületéhez hasonlítva a barázdák mélysége és szélessége is növekedett (A, B). A barázdák szélessége 380–600 nm, mélységük pedig 50–150 nm. Ezeket a változásokat jól szemlélteti a grafikon, mely a felülnézeti ábrán (B) jelölt helyen (fehér vonal) mutatja a felszínre merőleges méreteket. Méret: 10*10 μm . A grafikonon a magassági eloszlás nm-ben



3. ábra. A 20%-os hidrogén-peroxid oldattal kezelt zománc atomerő-mikroszkópos felvétele. A barázdák paramétereit további növekedést mutattak a nagyobb koncentrációjú oldat hatására (A, B). Barázdák méretei: szélesség: 136–544 nm, mélység: 100–150 nm. Fehér vonal: a grafikon helye. Méret: 10*10 μm . A grafikonon a magassági eloszlás nm-ben



4. ábra. A 30%-os hidrogén-peroxid oldattal kezelt zománc atomerő-mikroszkópos felvétele. A kifejezetten mély barázdák a zománc felületén (A, B). Barázdák méretei: szélesség: 710–2000 nm, mélység: 50–250 nm. Fehér vonal: a grafikon helye. Méret: 10*10 μm . A grafikonon a magassági eloszlás nm-ben



5. ábra. A hidrogén-peroxid koncentrációjának hatása a zománcban található szabad tiol-csoportok számára. A temetett tiol-csoportok számát a 6,4 M guanidin klorid jelenlétében és hiányában mért értékek különbségeként kaphatjuk meg. A szabad tiol-csoportok a peroxidok jelenlétében teljesen eltűntek. A temetett tiol-csoportokra nem volt hatással a 10%-os hidrogén-peroxid oldat, míg a 20 és 30%-os oldatok esetében szignifikáns csökkenés volt tapasztalható

Peroxidokat felhasználva a legtöbb fogelszíneződés eredményesen kezelhető, de számos mellékhatással kell számolnunk. Ennek a fogfehérítési technikának számos formája ismeretes. Napjainkban az egyik legelterjedtebb módszer az otthon végzett kezelés, melynek során leggyakrabban 10%-os karbamid-peroxidot tartalmazó készítményt használunk. Ezt a módszert 1989-ben írták le először [13]. Az elmúlt egy évtizedben számos vizsgálatot végeztek a peroxidok fogfehérítésben betöltött szerepének tisztázása érdekében, de a pontos hatásmechanizmus nem ismeretes. A hidrogén-peroxidból keletkező szabad gyökök (szuperoxid, hidroxil) oxidálják a fogban lévő többszörösen telítetlen szénláncú és aromás molekulákat, amelyek színtelenné válnak. Ez az oxidáció azonban nem specifikus, és a fog szöveteire is hatással van vagy lehet.

A legtöbb vizsgálat a fog kemény szöveteire, ezek közül is a fogzománcra irányult. Az irodalmi adatok alapján a fogzománcban felületi és belső változások is bekövetkeznek a fogfehérítések hatására [2–4, 14, 16, 21, 25, 27]. Ezek a változások érintik a zománcnak mind az organikus és az anorganikus állományát is. Mindenképpen fontos a zománcot mint egységes szövetet vizsgálni, mert ezzel jobban közelíthetünk az in vivo állapothoz. Bármilyen változást is eredményez a peroxidos fogfehérítés, ez főként a peroxid penetrációjának tulajdonítható. Nem szabad azonban a peroxid mechanikai tisztító hatásáról sem elfelejtenünk, hiszen ez is hozzájárulhat a felületi morfológia megváltozásához.

A hidrogén-peroxid zománcval való érintkezésekor először a felülettel, majd a mélyebb struktúrákkal lép reakcióba. A fognak a fogívben való elhelyezkedése, illetve egy fogon belül a felülettől (pl. proximális, buccalis) függően a zománc ún. aprizmatikus réteg található, még a maradó fogakon is. Ennek a prizmától mentes rétegnek eltér az összetétele a prizmatikus zománcétól. Nagyobb arányban

tartalmaz organikus összetevőket, és az apatit kristályok mérete kisebb, ill. az elrendeződésük sem olyan szabályos, mint a prizmatikus zománcban. A hidrogén-peroxid ebbe a struktúrába vélhetően könnyebben penetrálhat, és gyorsabban degradálhatja az organikus állományt, megbontva ezzel az organikus és az anorganikus állomány közötti kapcsolatot. A felület későbbi mechanikus tisztítása pedig könnyebben okozhatja az apatit kristályok leválását, és így a felületi morfológia megváltozását. Feltehetően hasonló reakciók zajlanak le a prizmatikus zománc felületén is, bár ebben az esetben a folyamathoz vagy több idő, vagy nagyobb koncentráció szükséges. Ezt a folyamatot bizonyítja az a penetrációs vizsgálat is, melyet *Arwill* [3] végzett el. A ²²Na izotópok penetrációja a zománcba fokozódott a hidrogén-peroxid hatására.

A felületi morfológia fontos információt ad a peroxid és a fogzománc között végbement folyamatról. A zománc felülete fényes volt, ami arra utal, hogy a peroxidok nem marták meg a felületet. Ezt támasztja alá az is, hogy nem láttunk azt atomerő-mikroszkópos felvételeken a zománcot súlyosan destruáló, az adhezív tömés technika során alkalmazott foszforsavas kondicionálásra jellemző struktúrát, illetve a prizmáknak a természetes fogfelszínen a végződéseit. Hasonló zománcfelületet írt le *Bitter* [7] is elektronmikroszkópos tanulmányában. A barázdák feltehetően a fogfejlődés során alakultak ki, hiszen az irányuk változatos, és a kevéssé valószínű, hogy külső abrazív hatás révén alakultak volna ki. A barázdák mélységében bekövetkező változások igen jelentősek. A nem kezelt, kontrollcsoporthoz képest a 30%-os hidrogén-peroxiddal végzett kezeléseket után a barázdák mélysége és szélessége három-négyszeresére nőtt. Ezt a változást okozhatja a peroxidoknak az apatitra kifejtett hatása, illetve az organikus állomány degradációja, ami a fehérjék harmadlagos, negyedleges szerkezetét változtatja meg. Ezt a lehetőséget támasztják alá azok a vizsgálatok is, amelyekben a zománc oldékonyságának növekedését vagy a mikrokeményység csökkenését írták le [4, 16, 21].

Az SH-csoportok elvesztése arányos volt az alkalmazott hidrogén-peroxid koncentrációjával. A hidrogén-peroxidok azonnal reakcióba léptek a zománcban található tiol-csoportokkal, már a legkisebb (10%-os) koncentrációban is. A 20%-os koncentráció mellett a mély, temetett tiolok degradálódását is megfigyeltük. A koncentráció emelése azonban nem okozta a temetett tiolok további csökkenését.

Az eredmények általánosítását nehezítheti az a tényező, hogy a zománc proteinekben nem a cisztein a leggyakoribb aminosav, de amint azt az Ellman-rekció eredményei mutatják, fontos markere lehet az érett zománcban végbemenő oxidatív folyamatoknak.

Elmondhatjuk, hogy az általunk alkalmazott két, egymástól független vizsgálati módszer egyaránt változásokat mutatott ki a fogzománcban, melyek koncentráció függőek voltak. A változások érintették a zománc felületét és a mélyebb szerkezetét is. Eredményeink egyik gyakorlati következménye lehet a baktériumok fokozott adhéziója a fogzománc felületéhez, amit *Goldberg* és

mtsai [13] vizsgálatukban leírtak. A továbbiakban tervezzük a végbement változások reverzibilitásának, a fluoridok hatásának, illetve az időfaktor szerepének vizsgálatát. Ismeretes ugyanis, hogy a fogfehérítés során jelentkező fogérzékenység kezelésére leggyakrabban fluoridokat alkalmaznak. Ezek feltehetően a degradált apatit felületéhez képesek kötődni, illetve a károsodott organikus mátrixon keresztül a zománc mélyebb rétegeibe is eljuthatnak. A hosszabb kezelési idő ugyanakkor feltehetően növeli a változásokat.

Irodalom

- ANDERSON DG, CHIEGO DJ, GLICKMAN GN, MCCAULEY LK: A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue. *J Endod* 1999; 25: 247-250.
- AREND S, JONGEBLOED WL, GOLDBERG M, SCHUTHOF J: Interaction of urea and human enamel. *Caries Res* 1984; 18: 17-24.
- ARWILL T, MYRBERG N, SÖREMARK R: Penetration of radioactive isotopes through enamel and dentine II. Transfer of ^{22}Na in fresh and chemically treated dental tissues. *Odont Revy* 1969; 20: 47-54.
- ATTIN T, KIELBASSA AM, SCHWANENBERG M, HELLWIG E: Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. *J Oral Rehabil* 1997; 24: 282-286.
- ATTIN T, HANNING C, WIEGAND A, ATTIN R: Effects of bleaching on restorative materials and restorations – a systematic review. *Den Mat* 2004; 20: 852-861.
- EVERY JK: Histology of Enamel. In: *Oral Development and Histology*. Thieme Medical Publishers Inc., New York, 1994; 231-233.
- BITTER NC: A scanning electron microscopy study of the effect of bleaching agents on enamel: A preliminary report. *J Prosthet Dent* 1992; 67: 852-855.
- BOYDE A: Microstructure of enamel. In: *Dental Enamel*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 205) 1997; 18-31.
- COHEN SC: Human pulpal response to bleaching procedures. *J Endod* 1979; 5: 134-138.
- COLE AS, EASTOE JE: Chapter 32. Enamel. In: *Biochemistry and Cell Biology*. Wright, Bristol, 1988; 461-463.
- ERNST CP, MARROQUIN BB, WILLERSHAUSEN-ZÖNNCHEN B: Effects of hydrogen peroxide-containing bleaching agents on the morphology of human enamel. *Quint Int* 1996; 27: 53-56.
- GOLDBERG M, AREND S, JONGEBLOED WL, SCHUTHOF J, SEPTIER D: Action of urea solutions on human enamel surfaces. *Caries Res* 1983; 17: 106-112.
- HAYWOOD VB, HEYMANN HO: Nightguard vital bleaching. *Quint Int* 1989; 20: 173-176.
- HEGEDÜS C, BISTEY T, FLORA-NAGY E, KESZTHELYI G, JENEI A: An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *J Dent* 1999; 27: 509-515.
- JANOFF LE: Origin and development of hydrogen peroxide disinfection systems. *CLAO Journal*. 1990; 16: 1.
- MCCRACKEN MS, HAYWOOD VB: Demineralization effects of 10 percent carbamide peroxide. *J Dent* 1996; 24: 395-398.
- MCGUCKIN RS, BABIN JF, MEYER BJ: Alterations in human enamel surface morphology following vital bleaching. *J Prosthet Dent* 1992; 68: 754-760.
- MURCHISON DF, CHARLTON DG, MOORE BK: Carbamide peroxide bleaching: Effects on enamel surface hardness and bonding. *Oper Dent* 1992; 17: 181-185.
- RIDDLES PW, BLAKELEY RL, ZERNER B: Reassessment of Ellman's reagent. *Method Enzymol* 1983; 91: 49-60.
- ROBERTSON WD, MELFI RC: Pulpal response to vital bleaching procedures. *J Endod* 1980; 6: 645-649.
- ROTSTEIN I, DANKER E, GOLDMAN A, HELING I, STABHOLZ A, ZALKIND M: Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod* 1996; 22: 23-26.
- SASAKI T, TAKAGI M, YANAGISAWA T: Structure and function of secretory ameloblasts in enamel formation. In: *Dental Enamel*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 205) 1997; 32-50.
- SEAL NS, WILSON CF: Pulpal response to bleaching of teeth in dogs. *Pediatr Dent* 1985; 7: 209-214.
- SEAL NS, MCINTOSH JE, TAYLOR AN: Pulpal reaction to bleaching of teeth in dogs. *J Dent Res* 1981; 60: 948-953.
- SEGHI RR, DENRY I: Effect of external bleaching on the indentation and abrasion characteristics of human enamel in vitro. *J Dent Res* 1992; 71: 1340-1344.
- SHANNON H, SPENCER P, GROSS K, TIRA D: Characterisation of enamel exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. *Quint Int* 1993; 24: 39-44.
- TITLEY KC, TORNECK CD, SMITH DC: The effects of concentrated hydrogen peroxide solution on the surface morphology of human tooth enamel. *J Endod* 1988; 14: 69-74.
- TONG LSM, PANG MKM, MOK NYC, KING NM, WEI SHY: The effects of etching, micro-abrasion, and bleaching on surface enamel. *J Dent Res* 1993; 72: 67-71.
- VAN DER WERF KO, PUTMAN CAJ, DE GROOTH BG, SEGERINK FB, SCHIPPER EH, VAN HULST NF, GREVE J: Compact stand-alone atomic force microscope. *Rev Sci Instrum* 1993; 64: 2892-2897.
- WANDERA A, FEIGAL RJ, DUOGLAS WH, PINTADO MR: Home-use tooth bleaching agents: An in vitro study on quantitative effects on enamel, dentin, and cementum. *Quint Int* 1994; 25: 541-546.
- WRIGHT TJ, HALL K, YAMAUCHI M: The protein composition of normal and developmentally defective enamel. In: *Dental Enamel*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 205) 1997; 85-97.

BISTEY T, JENEI A, SZONDY Zs, NAGY PI, HEGEDÜS Cs:

In vitro study of the effects of 10-30 % hydrogen peroxide solutions on the human teeth's enamel surface

The aim of the present study was to investigate the effects of hydrogen peroxide solutions (10-30%) on the enamel surface and the inner structure of human teeth. Prepared enamel samples were exposed to various concentrations of hydrogen peroxide solutions for one hour. Changes in the enamel were analyzed by two different methods. The inner structure was studied by the Ellman's reagent to detect possible changes in the amount of free thiol groups in the remaining organic phase of matured enamel. Surface alterations were imaged by atomic force microscope.

Ellman's reaction revealed the presence of three groups of free thiols: one with easy, the second one with medium and the third one with difficult accessibility by hydrogen peroxide. Atomic force microscopy revealed severe alterations on the enamel surface after treatment with both low and high concentration of hydrogen peroxide.

Our observations indicated that hydrogen peroxide induced alterations in the surface structure and in the inner phases of mature enamel in both low and high concentrations.

Key words: tooth bleaching, hydrogen peroxide, atomic force microscopy, organic enamel phase, inorganic enamel phase