

Steffen Müller, Stefan Rupf, Natalia Umanskaya, Matthias Hannig

# Nachweis der Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMP's) im Wurzel dentin humaner Zähne

## Warum Sie diesen Artikel lesen sollten?

Matrix-Metalloproteinasen (MMP's) sind Enzyme, die an der Degradation von Dentin beteiligt sind. Die Studie weist MMP's an Dentinscheiben aus unterschiedlichen Abschnitten der Zahnwurzel nach, wodurch eine Zuordnung der MMP-Aktivität zu koronalen oder apikalen Wurzelabschnitten möglich wurde. Erwartungsgemäß zeigten apikale Abschnitte die höchsten MMP-Aktivitätswerte, jedoch wurde auch in koronalem Dentin diese Enzymaktivität nachgewiesen. Die Ergebnisse legen nahe, dass ein auto-kollagenolytischer Abbau des Dentins erfolgen kann – mit entsprechenden Folgen für das Verständnis des Kariesprozesses und der Füllungstherapie.

**Einführung:** Matrix-Metalloproteinasen (MMP's) spielen eine wichtige Rolle bei der Zahnhartsubstanzbildung. Sie sind als proteolytische Enzyme an der Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix in der oralen Umgebung einschließlich der dentalen Hartgewebe beteiligt. Ihre unregulierte Aktivität steht mit Krankheitsprozessen in Verbindung. Seit einiger Zeit wird eine Beteiligung der MMP's an der Ausbreitung kariöser Läsionen diskutiert. Lokalisation und Verteilung der MMP's im Dentin nach abgeschlossener Zahnentwicklung sind bisher nicht aufgeklärt und sollen in dieser Studie untersucht werden.

**Material und Methode:** Als Untersuchungsmaterial wurde Wurzel dentin von 30 humanen Zähnen verwendet. Insgesamt wurden 3 Untersuchungsgruppen mit jeweils 10 Zähnen gebildet: UG1: endodontisch behandelte Zähne, UG2: nicht endodontisch behandelte Zähne und UG3: noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne. Die enzymatische Aktivitätsmessung wurde mit einem Gelatinase-/Kollagenase-Assay an 90 Dentin-Scheiben, die jeweils aus dem koronalen, medialen und apikalen Wurzel dentin gewonnen wurden, über 2 h jeweils zum Zeitpunkt 0 min, 30 min, 60 min, 120 min, durchgeführt. Die Mittelwerte der MMP-Aktivität über 2 h in  $\mu\text{U}/\text{mg}$  Dentin wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Der Vergleich der koronalen, medialen und apikalen Werte innerhalb der Gruppen erfolgte mit dem gepaarten T-Test, während die Unterschiede der Mittelwerte zwischen den Untersuchungsgruppen mit dem ungepaarten T-Test überprüft wurden. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von  $p \leq 0,05$  definiert.

**Ergebnisse:** An allen Dentin-Scheiben konnte enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Bezogen auf das Dentin der gesamten Zahnwurzel wurden über 2 h für UG1 (endodontisch behandelt) im Mittel  $4,8 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$ , für UG2 (nicht endodontisch behandelt)  $4,7 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  und für die Zähne der UG3 (noch nicht in der Mundhöhle exponiert)  $4,8 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  enzymatischer Aktivität ermittelt. Die Ergebnisse der UG1, UG2 und UG3 unterschieden sich statistisch nicht voneinander. Innerhalb der Untersuchungsgruppen konnten von koronal nach apikal für UG1 mit Aktivitätswerten von  $4,4 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  für die koronale Schnittebene,  $4,7 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  für die mediale Schnittebene und  $5,4 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  für die apikale Schnittebene statistisch signifikante Unterschiede gemessen werden. Für UG2 wurden für

Praxis für Zahnheilkunde, Brettener Str. 2, 75438 Knittlingen: Dr. Steffen Müller

Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes, Gebäude 73, 66421 Homburg: Prof. Dr. Stefan Rupf, Dr. Natalia Umanskaya, Prof. Dr. Matthias Hannig

\*Deutsche Übersetzung der englischen Version Müller S, Rupf S, Umanskaya N, Hannig M: Detection of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in the root dentin of human teeth. Dtsch Zahnärztl Z Int 2019; 1: 161–167

**Zitierweise:** Müller S, Rupf S, Umanskaya N, Hannig M: Nachweis der Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMP's) im Wurzel dentin humaner Zähne. Dtsch Zahnärztl Z 2019; 74: 317–324

**Peer-reviewed article:** eingereicht: 21.08.2017, revidierte Fassung akzeptiert: 02.02.2018

DOI.org/10.3238/dzz.2018.5119, EPub 10.04.2018

die koronale Ebene mit  $4,2 \times 10^{-1}$   $\mu\text{U}/\text{mg}$ , für die mediale mit  $4,7 \times 10^{-1}$   $\mu\text{U}/\text{mg}$  und für die apikale Ebene mit  $5,1 \times 10^{-1}$   $\mu\text{U}/\text{mg}$  Aktivität ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede gemessen. In UG3 unterschieden sich die Werte aller Ebenen,  $3,8 \times 10^{-1}$   $\mu\text{U}/\text{mg}$  für die koronale Schnittebene,  $4,5 \times 10^{-1}$   $\mu\text{U}/\text{mg}$  für die mediale Schnittebene und  $6,0 \times 10^{-1}$   $\mu\text{U}/\text{mg}$  für die apikale Schnittebene, statistisch signifikant voneinander.

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse dieser Studie wiesen erstmals MMP-Aktivität am Dentin-Hartmaterial nach. In allen Untersuchungsgruppen nahm die MMP-Aktivität von koronal nach apikal zu. Die generell bestehende Aktivierbarkeit von MMP's, die seit ihrer Synthetisierung und Sezernierung in die mineralisierte Dentin-Matrix bei der Dentinogenese eingeschlossen waren, zeigt die außerordentliche Stabilität und Langlebigkeit dieser Enzyme.

**Schlüsselwörter:** Matrix-Metalloproteinasen (MMP's); proteolytische Aktivität; Gelatinase-/Kollagenase-Assay; Wurzeldentin; Dentinscheiben

## Einführung

Matrix-Metalloproteinasen (MMP's) sind Vertreter der großen Familie von Calcium-abhängigen, zinkhaltigen Endopeptidasen [1, 2, 17, 26, 33, 36]. Sie entfalten ihre physiologische und pathologische Rolle als proteolytische Enzyme beim Aufbau und bei der Degradation von Proteinen vorwiegend in der extrazellulären Matrix (ECM) [1, 11] und bei Um- und Abbauprozessen in der oralen Umgebung einschließlich der dentalen Hartgewebe [5, 8].

MMP's spielen weiterhin eine Schlüsselrolle in der normalen Physiologie des Bindegewebes, also während der Entwicklung, der Morphogenese und der Wundheilung [4]. Ihre unregulierte Aktivität wird allgemeinmedizinisch mit zahlreichen Krankheitsprozessen wie Arthritis, Metastasierung von Geweben durch Tumorzellen, Atherosklerose [4], kardiovaskuläre Erkrankungen, Nephritis, neurologische Krankheiten, Ausfall der Blut-Hirn-Schranke, Haut- und Magengeschwürbildung, Leberfibrose, Lungenemphysem und nicht zuletzt parodontalen Erkrankungen [21] in Verbindung gebracht. Schon seit einiger Zeit wird auch eine Beteiligung der MMP's an der Ausbreitung von Kariesläsionen diskutiert [25].

MMP's werden durch eine Vielzahl von Bindegewebe- und proin-

flammatorischen Zellen, einschließlich Fibroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten [5] sowie Endothelzellen, Makrophagen und neutrophilen Lymphozyten sezerniert [33]. Sie sind zudem eine Gruppe von strukturell verwandten Enzymen verschiedenen genetischen Ursprungs, die zusammen für den Abbau vieler extrazellulärer Matrix-Proteine der ECM und Komponenten der Basalmembranen verantwortlich sind [25]. Gross und Lapiere berichteten 1962 erstmals über MMP's im Rahmen ihrer Studien der Entwicklung von Kaulquappen [10].

## Fragestellung

Es ist bekannt, dass MMP's proteolytisch wirkende Enzyme sind, die am Aufbau und der Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix wesentlich beteiligt sind [22, 32–35]. Zu dieser extrazellulären Matrix zählen besonders fibrilläre Kollagene [7] und als einer der Hauptbestandteile des Dentins zu 90 % Kollagen vom Typ I [6]. Kommt es durch Entmineralisierung des Dentins zum Freiliegen von Kollagenfasern und werden dabei gleichfalls Pro-MMP's in ihre aktiven Formen überführt, können die aktivierten Kollagenasen und Gelatinasen die freiliegenden Kollagenfasern degradieren [20]. Dies scheint anhand der Literatur von entscheidender Be-

deutung für verschiedene Bereiche, vor allem in der adhäsiven Zahnheilkunde zu sein. In verfügbaren Studien zeigt sich vor allem, dass sich der Nachweis kollagenolytischer und gelatinolytischer Aktivität im Dentin, vorwiegend auf das koronale Dentin beschränkt. Mit der heute zunehmenden Bedeutung der adhäsiven Zahnheilkunde, z.B. mit der adhäsiven Befestigung von Wurzelstiften und zusätzlichen Verankerungstags von Endokronen im koronalen Drittel der Wurzel, wird auch hier die Frage nach der Stabilität der Hybridschicht an Wichtigkeit zunehmen.

Gleichfalls lässt die Literatur aber durchaus auch die Vermutung offen, dass es neben bestimmten mechanischen Gründen für Wurzelfrakturen, auch zu Frakturen der Wurzel durch eine Schwächung der Kollagenmatrix des Dentins durch MMP-Degradation kommen könnte. So wurde in einer In-vitro-Studie nachgewiesen, dass es bei endodontisch behandelten Zähnen mit einer Stiftversorgung über einen längeren klinischen Beobachtungszeitraum zu einer Auflösung der strukturellen Integrität der Kollagen-Matrix im Wurzeldentin gekommen ist [9]. Über die Zersetzung der Matrix entweder durch bakterielle Besiedelung und deren Abbauprodukte oder durch eine Aktivierung wirtseigener MMP's

## Detection of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in the root dentin of human teeth

**Introduction:** Matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in the metabolism of dental hard tissue. They are proteolytic enzymes whose function is the degradation of extracellular matrix proteins in the oral cavity. They influence dental substances and tissues and their uncontrolled activity is associated with disease processes such as the progression of carious lesions. Since the distribution of MMPs in the dentin has not previously been investigated, this was addressed by this study.

**Material and Methods:** Root dentin from 30 human teeth was used for this study, divided into 3 groups of 10 each as follows: Gp1(Group1): teeth with root canal fillings, Gp2: non-endodontically treated teeth and Gp3: unerupted teeth. 90 dentin disks were obtained by taking a coronal, medial and apical slice from each tooth. Enzyme activity was measured by a gelatinase/collagenase assay over a 2 hour period with every specimen having 4 readings recorded at time = 0 min, 30 min, 60 min and 120 min. The mean values of MMP activity over the 2 hours in  $\mu\text{U}/\text{mg}$  dentin were tested for normal distribution by using the Shapiro-Wilk test. The coronal, medial and apical values within the groups were compared with the paired T-test, while the differences in mean values between the study groups were checked with the unpaired T-test. The significance level was set at  $p \leq 0.05$ .

**Results:** All the dentin disks exhibited evidence of enzyme activity. Mean values calculated for the entire roots were  $4.8 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  for Gp1 (root canal filled),  $4.7 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  for Gp2 (non-endodontically treated) and lastly for Gp3 (unerupted),  $4.8 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$ . These differences in enzyme activity between the 3 groups were not statistically significant. However, all 3 groups displayed statistically significant increases in enzyme activities in the apical direction i.e. moving from coronal to apical. For Gp1,  $4.4 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  coronally,  $4.7 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  medially and  $5.4 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  apically were measured. For Gp2,  $4.2 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  coronally,  $4.7 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  medially and  $5.1 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  apically were measured. Lastly Gp3,  $3.8 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  coronally,  $4.5 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  medially and  $6.0 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  apically were measured.

**Conclusion:** The results of this study demonstrated for the first time MMP activity within mineralized hard dentin. In all 3 groups, MMP activity increased from the coronal to apical regions of the roots. MMPs which were originally synthesized and secreted during dentinogenesis and became incorporated into the mineralized dentin matrix, retain their reactive potential. The study demonstrated the extraordinary stability and longevity of these enzymes.

**Keywords:** matrix metalloproteinases; proteolytic activity; gelatinase/collagenase assay; root dentin; dentin disk/slice

konnten jedoch nur Vermutungen angestellt werden, da sich die experimentellen Auswertungen auf elektronenmikroskopische Verfahren beschränkten.

Ausgehend von der bisherigen Studienlage setzen hier die Überlegungen an, sich mit der enzymatischen Aktivität im Wurzel-Dentin endodontisch und nicht endodon-

tisch behandelter Zähne zu beschäftigen. Dazu wurden folgende Fragestellungen formuliert:

1. Gibt es eine nachweisbare enzymatische Aktivität von MMP's im Wurzel-Dentin von endodontisch und nicht endodontisch behandelten Zähnen und lässt sich diese im Gegensatz zum gepoolten Dentin-pulver direkt am Dentin-Hartmaterial nachweisen?
2. Lassen sich Unterschiede in der Verteilung einer durch MMP's hervorgerufenen enzymatischen Aktivität innerhalb des Wurzel-Dentins eines Zahnes von koronal nach apikal nachweisen?
3. Lassen sich Unterschiede in Menge oder Verteilung einer durch MMP's hervorgerufenen enzymatischen Aktivität innerhalb des Wurzel-dentins zwischen endodontisch und nicht endodontisch behandelten Zähnen sowie noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähnen finden?

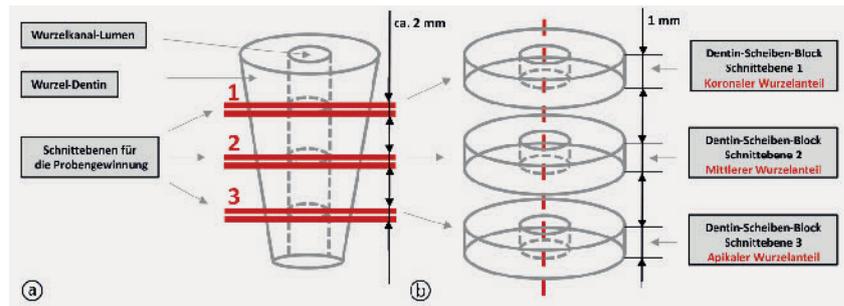
### Material und Methode

Extrahierte Zähne ( $n = 30$ ), die von Patienten zurückgelassen wurden, wurden in 3 Untersuchungsgruppen (UG) mit jeweils  $n = 10$  eingeteilt: UG1 (endodontisch behandelte Zähne), UG2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) und UG3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne). Alle Zähne waren im Wurzelbereich kariesfrei. Zähne der UG2 und UG3 wiesen keine Restaurationen auf. Die Zähne der UG1 mussten eine vollständige Wurzelfüllung aufweisen. Dies wurde radiologisch überprüft. Sie besaßen weiterhin ausgedehnte koronale Restaurationen wie ausgedehnte Amalgamfüllungen und Metall- oder Metallkeramik-Kronen. Da die Zähne vollständig anonymisiert gesammelt wurden, konnte das Alter der Wurzelfüllungen nicht ermittelt werden. Die Zähne der UG3 wiesen ein abgeschlossenes apikales Wurzelwachstum auf. Während sich UG1 und UG2 aus Frontzähnen, Prämolaren und Molaren zusammensetzten, waren die Zähne der UG3 ausschließlich osteotomierte obere und untere dritte Molaren, die noch nicht in der Mundhöhle exponiert waren.

Die Zähne der UG2 und UG3 wurden nach klinischer Vorgehensweise einer Wurzelkanalaufbereitung

unterzogen. Dabei wurden das Pulpen-cavum eröffnet, das Pulpagewebe entfernt, die Kanäle dargestellt, und mittels maschineller Aufbereitungsfeilen der ISO-Größe 25/06 und 25/07 des Systems Mtwo (VDW, München, Deutschland), sowie Hedströmfeilen der ISO-Größen 40 und 45 aufbereitet. Bei den Zähnen der UG1 wurde die vorhandene Wurzelfüllung mittels maschineller Revisionsfeilen ISO-Größe 15/05 und 25/05 des Systems Mtwo entfernt. Die erneute Aufbereitung der Wurzelkanäle nach Entfernung der alten Wurzelfüllung erfolgte analog der beiden anderen UG. Zur Spülung aller Kanäle wurde 1%ige physiologische Kochsalzlösung verwendet. Danach wurde die Zahnkrone, die apikalen 2 mm der Zahnwurzel, sowie das komplette Zahnzement mit Diamantschleifern entfernt. Für die enzymatischen Aktivitätsmessungen wurden Dentinscheiben aus jedem Wurzel-drittel (koronal, medial, apikal) präpariert (Abb. 1). Dies erfolgte maschinell durch horizontale Heraustrennung von Dentinsegmenten mittels einer Sägemaschine (Conrad Apparatebau GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland, diamantierte Trennscheibe, Ø100 × 0,6, Scott Diamant Werkzeuge GmbH, Stadtoldendorf, Deutschland) unter Wasserkühlung. Die Dentinsegmente mit einer Dicke von 2 mm wurden durch Politur auf eine Stärke von 1 mm reduziert (Poliermaschine Metkon GRiPO 2V, Buehler, Lake Bluff, USA, Silicon Carbide Grinding-Papier P 1200, P 2500, Buehler). Die Lagerung der entsprechend präparierten Dentinscheiben erfolgte in 0,1%iger Thymol-Lösung.

Für die enzymatischen Messungen wurden die Dentinscheiben für 24 h in Wasser gelagert. Danach wurden die Dentinscheiben zur Freilegung des Kollagens und zur Aktivierung der im Dentin eingebundenen MMP's für 10 min bei Zimmertemperatur mit 0,5 M EDTA-Lösung unter ständiger Bewegung auf einem Schüttler bei 10 rpm demineralisiert. Nach erfolgter Demineralisierung wurden die Dentinscheiben in die Messkavitäten einer 96-Well-Mikroplatte (Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol) gelegt und mit den Reaktionslösungen 80 µl



**Abbildung 1** Schematische Darstellung der Schnittebenen innerhalb einer Zahnwurzel (a) und der entsprechenden daraus präparierten Dentin-Scheiben (b)

Reaktionspuffer und 20 µl DQ-Gelatine-Lösung des EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit E12055 (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) versetzt.

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten jeweils 10-fach nach 2-stündiger Inkubation bei einer Temperatur von 37°C nach  $t = 0$  min,  $t = 30$  min,  $t = 60$  min und  $t = 120$  min. Die fluoreszenzmarkierten Spaltprodukte der DQ Gelatinase besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 495 nm und ihr Fluoreszenz-Emissionsmaximum bei 515 nm. Für die Fluoreszenzmessungen in dieser Untersuchung wurde ein Fluoreszenzdetektor (GENios, Tecan, Salzburg, Austria) Firmware V4.62- 07/01 GENios unter Zuhilfenahme der Software Tecan-i-control 1.10.4.0 verwendet.

Um die Werte der gemessenen Fluoreszenz in enzymatische Aktivitätswerte umzuwandeln, waren entsprechende Standardkurven erforderlich. Für die Standardkurven wurde die Standard-Collagenase Typ IV Clostridium histolyticum verwendet. Die ursprüngliche Konzentration von 1 U pro ml wurde durch Verdünnungsreihen auf einen zu erwartenden Messbereich von 0 bis 25 µU eingestellt, der durch entsprechende Vorversuche ermittelt wurde. Anhand des Gewichts der Dentinscheiben und der errechneten enzymatischen Konzentration, konnte die enzymatische Aktivität pro mg Dentin, als Mittelwert je Dentinscheibe für die 4 Messzeitpunkte, errechnet werden. Die Enzymaktivitätswerte in µU/mg Dentin wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Der Vergleich der enzy-

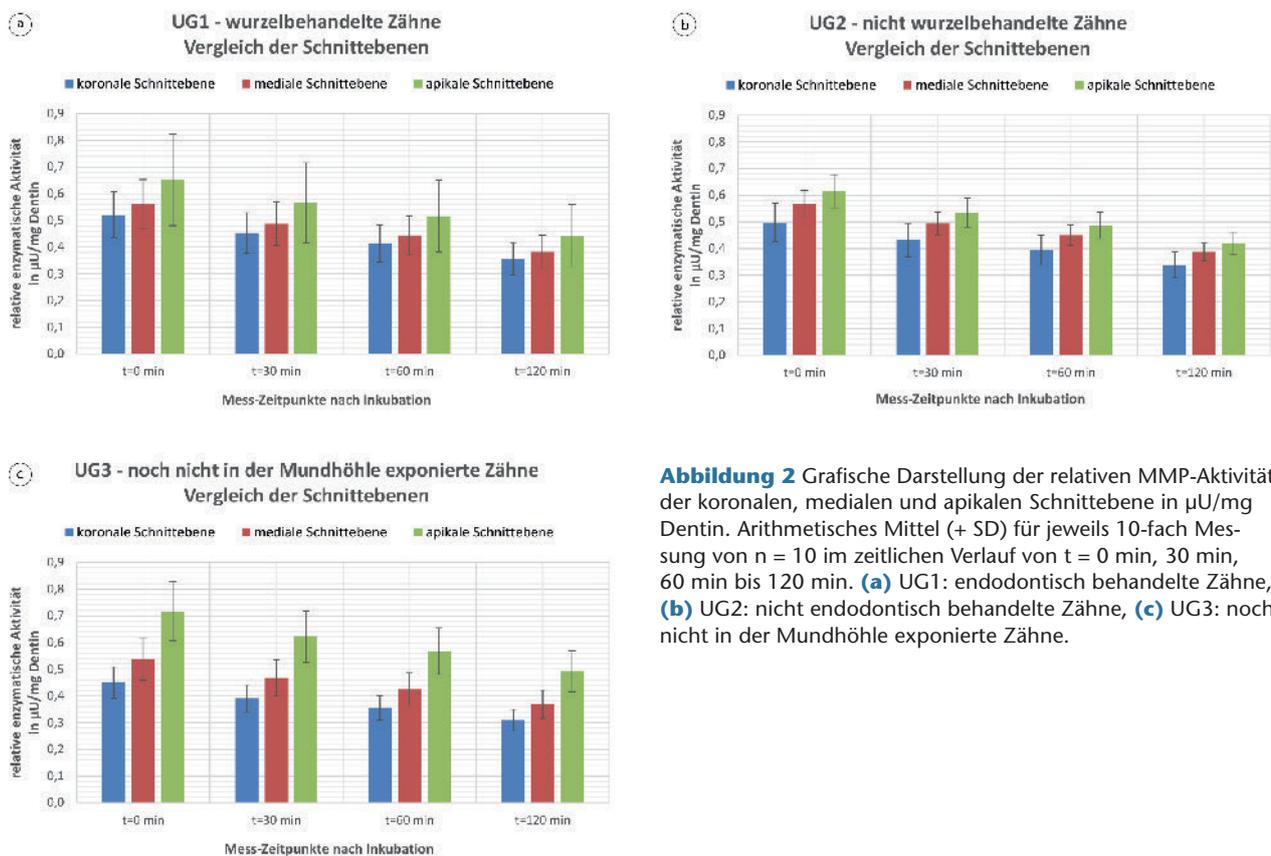
matischen Werte der Wurzelbereiche koronal, medial und apikal erfolgte mit dem gepaarten T-Test, während die Unterschiede der Mittelwerte der jeweiligen Untersuchungsgruppen bezogen auf das Gesamt-Dentin mit dem ungepaarten T-Test überprüft wurden. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von  $p < 0,05$  definiert.

## Ergebnisse

In jeder Probe der drei klassifizierten Untersuchungsgruppen, UG1 (endodontisch behandelte Zähne), UG2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) und UG3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne), konnte zu allen Messzeiten eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Diese fiel entsprechend der Enzymkinetik kontinuierlich und parallel in allen Untersuchungsgruppen ab.

### UG1 (Gruppe der endodontisch behandelten Zähne)

Die Dentinscheiben der UG1 (endodontisch behandelte Zähne) hatten im Mittel ein Gewicht von 35,2 mg ( $\pm 8,9$  mg) je Probe. Abbildung 2a zeigt die enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Schnittebenen über den Messzeitraum von 2 h nach 0 min, 30 min, 60 min und 120 min. Dabei lässt sich ein charakteristisches Verteilungsmuster der enzymatischen Aktivität für die Schnittebenen erkennen. Die Mittelwerte der enzymatischen Aktivität über alle Messzeitpunkte betragen  $4,4 \times 10^{-1}$  µU/mg Dentin für die koronale Schnittebene,  $4,7 \times 10^{-1}$  µU/mg Dentin für die mediale Schnittebene und  $5,4 \times 10^{-1}$  µU/mg Dentin für die apikale Schnittebene. Die Unterschiede



**Abbildung 2** Grafische Darstellung der relativen MMP-Aktivität der koronalen, medialen und apikalen Schnittstelle in  $\mu\text{U}/\text{mg}$  Dentin. Arithmetisches Mittel (+ SD) für jeweils 10-fach Messung von  $n = 10$  im zeitlichen Verlauf von  $t = 0$  min, 30 min, 60 min bis 120 min. **(a)** UG1: endodontisch behandelte Zähne, **(b)** UG2: nicht endodontisch behandelte Zähne, **(c)** UG3: noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne.

zwischen allen Ebenen waren statistisch signifikant. (koronal vs. medial:  $p = 0,008$ ; koronal vs. apikal:  $p = 0,006$ ; medial vs. apikal:  $0,04$ ; (Abb. 3a).

### UG2 (Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähne)

In dieser UG ergab sich im Mittel je Probe ein Gewicht von  $35,2$  mg ( $\pm 5,1$  mg). Im Vergleich zur UG1 konnte ein vergleichbares Verteilungsmuster der enzymatischen Aktivität bezogen auf die Schnittebenen zu allen Messzeitpunkten nachgewiesen werden (Abb. 2b). Es zeigten sich jeweils die höchsten enzymatischen Aktivitätswerte in der apikalen Schnittstelle. Demgegenüber finden sich die geringsten Werte in der koronalen Schnittstelle. Im Mittel wurden für die koronale Schnittstelle eine enzymatische Aktivität von  $4,2 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  Dentin, für die mediale im Mittel eine Aktivität von  $4,7 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  Dentin und für die apikale Schnittstelle im Mittel eine enzymatische Aktivi-

tät von  $5,1 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  Dentin gemessen. Die Werte für die koronale und die mediale, sowie die apikale Schnittstelle unterschieden sich statistisch signifikant ( $p = 0,002$ ;  $p = 0,0002$ ), während der Vergleich der Ergebnisse von mittlerer und apikaler Ebene keinen statistisch signifikanten Unterschied ergab ( $p = 0,07$ ; Abb. 3a).

### UG3 (Gruppe der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne)

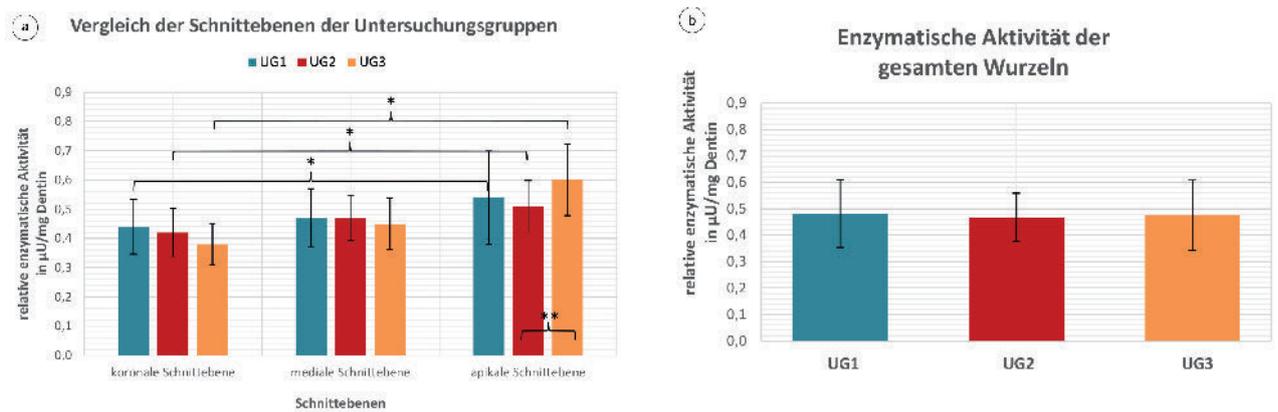
Die Dentin-Scheiben der UG3 hatten im Mittel ein Gewicht von  $34,4$  mg ( $\pm 7,9$  mg). Abbildung 2c zeigt das Verteilungsmuster der enzymatischen Aktivität im jeweiligen Schnittebenenvergleich (koronal, medial, apikal) über den Messzeitraum von  $t = 120$  min mit von koronal nach apikal hin ansteigender enzymatischer Aktivität. Im Vergleich der Schnittebenen über alle Messzeitpunkte zeigte sich die höchste enzymatische Aktivität mit einem Mittelwert von  $6,0 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  Dentin in der apikalen Schnittstelle. Für die me-

diale Ebene wurden  $4,5 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  Dentin und für die koronale Schnittstelle  $3,8 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$  Dentin ermittelt. Zwischen allen Schnittebenen bestanden zu allen Messzeitpunkten statistisch signifikante Unterschiede ( $p = 0,001$  bis  $p = 0,0001$ ; Abb. 3a).

### Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von UG1, UG2 und UG3

Die mittleren enzymatischen Aktivitäten über 2 h der koronalen und medialen Schnittebenen von UG1 ( $4,8 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$ ), G2 ( $4,7 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$ ) und UG3 ( $4,8 \times 10^{-1} \mu\text{U}/\text{mg}$ ) unterschieden sich nicht statistisch signifikant ( $p = 0,05$  bis  $0,83$ ). Lediglich für den Vergleich der apikalen Schnittebenen von UG2 und UG3 war ein statistisch signifikanter Unterschied zu verzeichnen ( $p < 0,02$ ; Abb. 3a).

Bezogen auf das gesamte Wurzelzementin waren für den Vergleich aller Zähne der UG1 bis UG3 keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen ( $p = 0,53$  bis  $p = 0,79$ ; Abb. 3b).



(Abb. 1-3: S. Müller)

**Abbildung 3** Grafische Darstellung der MMP-Aktivität in µU/mg Dentin im Vergleich der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG1: endodontisch behandelte Zähne, UG2: nicht endodontisch behandelte Zähne, UG3: noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne). Mittelwerte (+ SD) aus den Messwerten für t = 0 min bis t = 120 min. **(a)** koronale, mediale und apikale Schnittebenen der UG1 bis UG3, statistische Unterschiede innerhalb der Gruppen: \*, p < 0,05 **(b)** MMP-Aktivität der gesamten Wurzeln im Vergleich von UG1 bis UG3. Keine statistisch signifikanten Unterschiede.

## Diskussion

In der vorgestellten Studie wurde erstmals die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen am nicht zuvor pulverisierten Wurzelndentin nachgewiesen. Die von Pashley [24] beschriebene und u.a. von Hebling [12] und Nishitani [23] angewendete Pulverisierung des Dentins für eine enzymatische Aktivitätsmessung mit dem Gelatinase/Collagenase Assay vermischt das Dentin verschiedener Dentinproben. Da das Dentin bei dieser Methode mit einer Schwingmühle partikularisiert wird, ist eine mechanische Veränderung der Kollagenstruktur und somit auch der MMP's nicht eindeutig auszuschließen.

Demgegenüber ermöglichte die Verwendung von Dentin-Hartmaterial (Dentinscheiben) die enzymatische Aktivitätstestung der MMP's an einer definierten intakten Dentinstruktur. Zusätzlich konnten durch das Design der hier vorgestellten Studie, indem jeweils aus der Zahnwurzel einer jeden Probe eine koronale, mediale und apikale Wurzel-Dentinscheibe gefertigt wurde, Aussagen über die enzymatische Aktivitätsverteilung innerhalb der Zahnwurzel generiert werden. Somit erhielt man gezielt Ergebnisse auf den Einzelzahn bezogen. Die genutzte Methode ist allerdings auch ein In-vitro-Verfahren, bei dem die Ergebnisse nicht

vollständig auf den klinischen Aspekt übertragen werden können. Für die Fluoreszenzmessung wurde eine in der Literatur etablierte Methodik verwendet [12, 23, 24, 29], die im Gegensatz zur ebenfalls beschriebenen Western-Blot-Methode [6, 7, 19, 27, 30] und der Zymografie [13, 32], ein wenig zeit- und kostenintensives Verfahren darstellt. Die Methode weist z.B. die relevanten MMP-1, MMP-3, MMP-8, sowie MMP-2 und MMP-9 nach [17].

Die Enzymaktivität konnte sowohl an wurzelkanalbehandelten Zähnen, an Zähnen ohne Wurzelkanalbehandlung sowie an noch nicht in die Mundhöhle exponierten Zähnen belegt werden. Insgesamt wiesen alle Zahnwurzeln, auch die der osteotomierten Zähne, nahezu vergleichbare enzymatische Aktivitäten auf. In dieser Studie wurde ebenfalls die MMP-Aktivität in unterschiedlichen Wurzelsegmenten betrachtet. Die Enzymaktivität nahm von koronal nach apikal zu. Dieses Ergebnis konnte erwartet werden. Gleichwohl wurde dies bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Grundbedingung für den Studieneinschluss war kariesseres Wurzelndentin. Nicht berücksichtigt wurde hingegen die Versorgung der Zähne im Kronenbereich. Die genutzten endodontisch behandelten Zähne wiesen ausgedehnte koronale

Restaurationen auf, die nicht endodontisch behandelten Zähne und die nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne besaßen intakte Kronen. Der Einfluss der Versorgungssituation des Zahnes auf die Beschaffenheit des Wurzelndentins ist bisher nicht bekannt. Somit kann keine Aussage über den Einfluss koronaler Restaurationen auf die Aktivität von MMP's im Wurzelndentinsbereich getroffen werden. Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch eine Aktivierung von MMP's in den Zähnen der Gruppen UG1 und UG2 durch Wurzelexposition gegenüber der Mundhöhle durch parodontalen Knochenabbau oder sonstige Defekte am Zahnhalteapparat [5, 30]. Lediglich für Zähne der UG3 kann dies ausgeschlossen werden. Trotz eines möglichen Nachlassens der MMP-Aktivität durch Degradation der Biomoleküle war in allen Zähnen der UG1 und UG2 diese nachweisbar.

Solange die Dentin-Matrix-Struktur mineralisiert ist, bleiben die in ihr enthaltenen MMP's inaktiviert [23, 28]. Wie in der Literatur beschrieben, können durch eine geringe Entmineralisierung des Dentins z.B. durch Säureätzung mit zweistufigen Dentinadhäsiven und auch durch selbständige Adhäsive im Dentin liegende MMP's, wie MMP-2 und MMP-9 aktiviert werden [20]. In der klinischen

Anwendung der Füllungstherapie demineralisiert man heutzutage das Dentin für 15 sec mit 30- bis 37%iger Phosphorsäure. Längere Einwirkzeiten der Säure bedeuten eine tiefere Entmineralisierung, was eine tiefere Harzimpregnierung und somit auch eine dickere Hybridschicht zur Folge hätte, was aber den Haftverbund nicht unbedingt verbessern würde [31]. Eine mögliche Abnahme der Stabilität der Komposit-Dentin-Interaktion wird durch einen Verlust der Integrität der Dentin-Matrix vermutet [9]. Nach der Säureätzung kann es durch nicht gleichmäßige Benetzung zu einer unvollständigen Imprägnierung der Kollagenmatrix kommen [37]. Es wurde gezeigt, dass in der Dentinmatrix eingeschlossene wirtseigene Proteasen (MMP's), freiliegende Kollagenfasern in der Hybridschicht angreifen und abbauen können [20, 23, 24, 37].

Während die Freilegung des Kollagen-Netzwerkes durch Säureätzung mit „Etch & Rinse“-Materialien und damit eine Aktivierung eingeschlossener MMP's gesichert ist, ist die aktuelle Studienlage über eine Aktivierung der MMP's durch „Self-Etch“ und „All in one Adhäsive“ nicht eindeutig [20, 23, 24]. Zu diskutieren wäre, dass dünne Dentinadhäsivschichten wie eine semipermeable Membran wirken können. Durch die Wasserdurchlässigkeit bietet sie aktivierten MMP's die Möglichkeit, ihre hydrolytische Funktion gegenüber Kollagenfibrillen auszuüben und so das kollagene Netzwerk zu zerstören [37]. Aus klinischer Sicht wäre es deshalb vorteilhaft, die Aktivierung der MMP's zu verhindern [24]. Daher wird momentan die Anwendung von MMP-Inhibitoren, wie EDTA [19, 24] und Chlorhexidin [12, 37] empfohlen. Unter physiologischen Bedingungen werden die Aktivitäten von MMP's auf der Ebene der Transkription, auf der Ebene der Aktivierung zymogener Vorläufer der sogenannten Pro-MMP's, sowie aber auch auf der Ebene der Hemmung durch endogene Inhibitoren z.B. Gewebehemmer, Metalloproteinase selbst und den TIMP's reguliert [14]. Die MMP's besitzen zudem eine große Variabilität, durch Intervention in komplexe Vorgänge unter

pathophysiologischen Bedingungen einzugreifen. Im Sinne der zahnmedizinischen Betrachtungen sind vor allem jene Mechanismen der MMP's interessant, die in physiologische und pathophysiologische Vorgänge der Mundhöhle und der Zähne eingreifen können. So wird beispielsweise diskutiert, dass im Dentin gebundene MMP's durch Lösen dentin gebundener Wachstumsfaktoren, eine mitwirkende Rolle während regenerativer Vorgänge und bei der Regulierung der komplexen Dentin-Pulpa-Abwehrreaktionen bei kariösen Läsionen spielen könnten [27, 30].

Die Aktivierbarkeit von MMP's, die seit ihrer Synthetisierung und Sezernierung in die mineralisierte Dentin-Matrix bei der Dentinogenese eingeschlossen waren, zeigt u.a. eindrucksvoll die Stabilität und Langlebigkeit dieser Enzyme selbst in endodontisch behandelten Zähnen [15].

### Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie wurde Dentin-Hartmaterial in Form von Dentinscheiben auf eine unspezifische enzymatische Aktivität von MMP's getestet. In jeder der 3 Untersuchungsgruppen, UG1 (endodontisch behandelte Zähne), UG2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) und UG3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne), konnte eine enzymatische Aktivität am Dentin-Hartmaterial nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten erstmals Aussagen über eine Verteilung der MMP's von koronal nach apikal innerhalb des Wurzel-Dentins getroffen werden.

Aus den Ergebnissen der dargestellten Versuche resultiert die Fragestellung nach der Aufschlüsselung und Klassifizierung der unspezifisch nachgewiesenen MMP's.

Nicht aufgeklärt ist bisher die Verteilung der MMP's innerhalb der Wurzel vom Wurzelkanal zur Dentin-Wurzelzement-Grenze. Die klinische Relevanz des Nachweises von MMP-Aktivität auch in endodontisch behandelten Zähnen ergibt sich in der Anwendung von MMP-Inhibitoren, z.B. Chlorhexidin, im Rahmen der

endodontischen und der Füllungstherapie.

### Interessenkonflikte:

Die Autoren erklären, dass kein Interessenkonflikt im Sinne der Richtlinien des International Committee of Medical Journal Editors besteht.

### References

- Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA: Biology of metalloproteinases. Rom J Morphol Embryol 2007; 48: 323–334
- Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K: Structural properties of matrix metalloproteinases. Cell Mol Life Sci 1999; 55: 639–652
- 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
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta 2000; 1477: 267–283
- 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
- De Paula-Silva FW, D'Silva NJ, da Silva LA, Kapila YL: High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. J Endod 2009; 35: 1234–1242
- Dezerega A, Madrid S, Mundi V et al.: Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. J Inflamm (Lond) 2012; 9: 8
- Fanchon S, Bourd K, Septier D et al.: Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. Eur J Oral Sci 2004; 112: 171–176
- Ferrari M, Mason PN, Goracci C, Pashley DH, Tay FR: Collagen degradation in endodontically treated teeth after clinical function. J Dent Res 2004; 83: 414–419
- Gross J, Lapiere CM: Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci USA 1962; 48: 1014–1022
- Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L: The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Acta Odontol Scand 2007; 65: 1–13

12. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR: Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2001; 84: 741–746
13. Hernández Ríos M, Sorsa T, Obregón F et al.: Proteolytic roles of matrix metalloproteinase (MMP)-13 during progression of chronic periodontitis: initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 1011–1017
14. Hijova E: Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl Lek Listy* 2005; 106: 127–132
15. Kato MT, Hannas AR, Leite AL et al.: Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res* 2011; 45: 429–434
16. Linde A, Goldberg M: Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 679–728
17. Lynch CC, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002; 70: 561–573
18. Mannello F, Tonti GA, Bagnara GP, Papa S: Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 475–481
19. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM: The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 757–765
20. Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M et al.: Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res* 2013; 92: 82–86
21. Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562–573
22. Nagase H, Woessner JF Jr: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491–21494
23. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B et al.: Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 160–166
24. Pashley DH, Tay FR, Yiu C et al.: Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83: 216–221
25. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T: Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004; 10: 311–318
26. Sternlicht MD, Werb Z: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463–516
27. 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
28. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L: Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 121–127
29. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R: Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod* 2006; 32: 862–868
30. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T: The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998; 77: 1622–1629
31. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y et al.: Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 2003; 28: 215–235
32. Van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V: Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res* 2003; 37: 58–65
33. Verma RP, Hansch C: Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q) SARs. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 2223–2268
34. Verstappen J, Von den Hoff JW: Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res* 2006; 85: 1074–1084
35. Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827–839
36. Vu TH, Werb Z: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14: 2123–2133
37. Zhang SC, Kern M: The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci* 2009; 1: 163–176



(Foto: privat)

**DR. STEFFEN MÜLLER, M.A., M.SC.**  
Praxis für Zahnheilkunde  
Brettener Str. 2  
75438 Knittlingen  
zahnarztpraxis.mueller@gmx.de