

Ю. А. Македонова, А. В. Поройская, Т. К. Чурсина, И. В. Венскель

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра патологической анатомии;
Волгоградский медицинский научный центр;
Лаборатория моделирования патологии

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И РОЛЬ ДЕНТИН-МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В ДЕГРАДАЦИИ ДЕНТИННОГО МАТРИКСА (ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ)

УДК 616-091.814

Изучение морфологических особенностей строения тканей зуба с последующей разработкой патогенетически обоснованных методов фармакотерапии является важной задачей в практической стоматологии. Дентин-матриксные протеиназы представляют для исследования особый интерес. Определение морфологических особенностей, их роль в деградации дентинного матрикса позволит не только расширить представления о развитии патологического процесса, но и обосновать и внедрить в практическую стоматологию новые методы и способы лечения.

Ключевые слова: дентин, матриксные металлопротеиназы, ингибирование, хлоргексидин.

Yu. A. Makedonova, A. V. Poroykaya, T. K. Chursina, I. V. Venskel

MORPHOLOGICAL FEATURES AND ROLE OF DENTINE MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE DEGRADATION OF THE DENTINAL MATRIX

The study of morphological features of the structure of tooth tissues with the subsequent development of pathogenetically justified methods of pharmacotherapy is an important task in practical dentistry. Dentin-matrix proteinases are of particular interest for research. The definition of morphological features, their role in the degradation of the dentin matrix will not only expand the understanding of the development of the pathological process, but also to justify and implement in practical dentistry new methods and methods of treatment.

Key words: dentin, matrix metalloproteinases, inhibition, chlorhexidine.

Дентин-матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство протеолитических ферментов, запертых в минерализованном матриксе дентина, эти ферменты способны гидролизировать органический матрикс деминерализованного дентина. В функциональном плане ММП дентина достаточно разнообразны: они могут разрушать компоненты внеклеточного матрикса (фибриллярный и нефбриллярный коллаген, фибронектин, ламинин и гликопротеины основной мембраны), также ММП играют важную роль в процессе дентиногенеза, воспаления пульпы зуба и прогрессирования кариозного поражения [24].

Открытые фибриллы коллагена могут быть гидролизированы ММП, что может привести к снижению прочности связи. Большинство ММП синтезируются и освобождаются из одонтобластов в виде проферментов, активизирующихся при деминерализации внеклеточного матрикса.

Целью данной работы является обобщение современных знаний о роли дентинных ММП в деградации дентинного матрикса.

Дентин-сложная биологическая структура, похож на другие кальцинированные ткани, такие как костная или цемент. 30 % (по объему) дентина – это органический матрикс, который, в свою очередь, состоит из коллагена (90 %), неколлагеновых белков (10 %), апатитов и неорганических кристаллитов, встроенных в экстрацеллюлярный матрикс (ЕСМ).

Коллаген представлен преимущественно волокнами I типа, наиболее распространенным органическим компонентом ЕСМ, отвечает за прочность дентина на растяжение и биохимические свойства дентина. Неколлагеновые белки – протеогликаны (т. е. chondroitin-4/6-sulphate, decorin, biglycan, lumican, fibromodulin) и небольшой интегрин-связывающий лиганд N-связанных гликопротеинов (sialoprotein, остеопонтин, дентин матрицы белок-1, дентин sialo-фосфо-протеин). Все вместе они играют важную роль в дентиногенезе, в том числе регулируют и контролируют рост кристаллов, фибриллогенез и минерализацию [20]. Оба коллаген и неколлагеновые белки синтезируются и секретируются одонтобластами.

ММП – кальций- и цинк-зависимые ферменты – в норме содержатся в дентине, и в процессе развития зуба замыкаются в минерализованном дентине. ММП играют центральную роль в ряде физиологических процессов, таких как развитие, нормальное ремоделирование тканей и кровеносных сосудов. Дентиногенез является сложным процессом, требующим развития активной внеклеточной ферментативной функции нескольких различных протеиназ, в основном семьи ММП. ММП, по-видимому, также участвуют в различных патологических процессах и в опухолевой прогрессии.

Недавние исследования доказали роль протеиназ в разрушении коллагена в патогенезе кариеса дентина [6, 24, 25] и заболевания пародонта [17].

За последнее время расшифрованы гены некоторых ММП и их структура. Как правило, ММП состоит из продомена, каталитического домена с надежно закрытым цинк-связывающим активным центром, шарнирной области, и hemorexin домена [11]. Каталитический домен содержит множество повторов цистеина, что необходимо для связывающей и расщепляющей деятельности этих протеолитических ферментов. ММП может разрушать компоненты ЕСМ, в том числе фибриллярные и не фибриллярные коллагены, фибронектин, ламинин, и гликопротеины базальной мембраны. Кроме того, они имеют и другие свойства: для активации ферментов необходимо отщепление продомена; это очень цинкзависимые ферменты; сохранения конкретных аминокислотных последовательностей важно для их функционирования; торможение их ферментативной активности возможно под воздействием эндогенных ингибиторов.

Различные протеиназы отвечают за разные функции, ММП играют важную роль в сложном процессе дентиногенеза и в развитии кариеса дентина. Деструкция коллагена при кариесе корня, когда эмаль не повреждена происходит без участия бактериальных ММП и ММП слюны. Помимо воспаления пульпы зуба и прогрессирование кариеса [8], ММП принимают участие в разрушении дентина, подвергнутого процедуре бондинга.

Одонтобласты в развитых человеческих зубах синтезируют несколько ММП, в том числе коллагеназы-2 (ММП-8), желатиназы (ММП-2 и -9), мембранно-связанные ММП-14 (MT1-ММП), enamelysin (ММП-20) и катепсин. Неактивные и активные формы желатиназы нескольких видов (например, ММП-2, ММП-9 и ММП-10) были выявлены в экстракте из минерализованного и деминерализованного человеческого дентина при использовании техники зимографии и

Western blot. Было доказано, что даже порошок минерализованного дентина обладает внутренней коллагенолитической активностью [12].

Под воздействием коллагеназ, таких как ММП-1, ММП-8 и ММП-13, коллаген расщепляется на пептиды 3/4 и 1/4 длины, которые впоследствии разлагаются под воздействием желатиназы ММП-2 и ММП-9 [22]. Распределение ММП-2 и ММП-9 в различных тканях было обнаружено в недавнем исследовании с помощью иммуногистохимического метода с использованием моноклональных антител. Под сканирующим микроскопом с помощью автоэлектронной эмиссии (SEM-FEI) и методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) был изучен частично декальцинированный человеческий дентин и были определены места морфологической локализации ММП-2 и ММП-9 в ЕСМ [19]. Оба ММП-2 и ММП-9 были локализованы в основном в сплетениях коллагеновых волокон в интертубулярном пространстве и вдоль коллагеновых волокон. Boushell и соавт. показал, что ММП-2 присутствует на протяжении всей длины коронкового дентина, но наиболее интенсивно в 9–10 мкм зоне, прилегающей к дентиноэмалевой границе и в 90–200 мкм, зоне, прилегающей к предентину [1].

Для каталитической активности ММП необходимы ионы металлов, таких как кальций и цинк. Большинство ММП синтезируются и освобождаются одонтобластами в виде проферментов, требующих последующей активации через так называемый цистеин-переключатель, высокоизбирательный цинк-связывающий активный центр домена. ММП активизируются при низком значении pH. Изменения pH изменяют конформацию про-пептида – и это представляет собой ключевой шаг в активации фермента.

Некоторые исследования с использованием флуоресцина для пометки коллагена показали, что в частично деминерализованном порошке дентина человека может быть обнаружена некоторая активность коллагеназы. Эта активность, как полагают, стимулирует деструкцию коллагена в деминерализованном дентине в течение 250-дневного периода *in vitro* [21] и деструкцию гибридного слоя *in vivo* [15]. Деструкция коллагена в деминерализованном дентине в течение 250-дневного периода *in vitro* может быть полностью подавлена ингибиторами протеазы, а коллагенолитическая активность в порошке минерализованного дентина снижается на 73 % [21].

Это доказательство того, что ингибиторы ММП могут защитить коллаген и продлить долговечность бондинга.

Результаты этого исследования еще раз подтверждают существование ММП в частично

деминерализованном дентине и доказывают роль ММП в деструкции дентина.

Применение некоторых специфических ингибиторов ММП, может подавлять коллагенолитическую и желатинолитическую активность этих ферментов. Применение ЭДТА [18] и хлоргексидина [13] было рекомендовано с целью ограничения деструкции гибридного слоя. Даже очень низкие концентрации хлоргексидина полностью тормозят ММП [9].

Хлоргексидин является антимикробным агентом широкого спектра и широко используются в лечении заболеваний полости рта. Его антибактериальная эффективность сопоставима с таковой гипохлорита натрия. В последнее время у хлоргексидина были обнаружены желательные ММП-ингибирующие свойства (ММП-2, -8 и -9) даже при низких концентрациях, возможно, благодаря наличию у его Zn^{2+} катиона хелатирующих свойств [9].

Хлоргексидин в концентрациях от 0,05 до 2 % проявляет антимикробную активность против *Enterococcus faecalis* [10]. Кроме того, антисептик может применяться для обработки дентина с целью предотвращения разрушения волокон коллагена [7].

Минимальная концентрация хлоргексидина, которая дает полное ингибирование ММП-9, похоже, 0,002 %. Тем не менее ММП-2 гораздо более чувствительны и ингибируются 0,000,1 % СНХ. ММП-8 может быть блокирована СНХ концентрации от 0,02 % [2]. Было также показано, что коллагенолитическая активность в порошке дентина может быть снижена почти до нулевого уровня путем обработки 0,2 % СНХ в течение 60 секунд [3].

После применения хлоргексидина коллагеновые волокна в составе гибридного слоя сохранили свою нормальную структуру и целостность, без применения которого они показали признаки прогрессирующей деструкции [4]. Кроме того, прочность связей в бондинге после хранения образцов в воде в течение 6 месяцев была выше, если как дополнительный грунт применялся хлоргексидин, по сравнению с образцами, где хлоргексидин не использовался [26]. На прочность связей сразу после лечения применение антисептика никак не влияло [22].

Аппликация хлоргексидина на протравленный дентин может сохранить волокна коллагена в гибридном слое, в случае когда используются etch-and-rinse адгезивы [27]. Это также является косвенным доказательством участия ММП в разрушении коллагена в гибридном слое, заканчивающимся снижением прочности сцепления с течением времени. Несмотря на популярность хлоргексидина как ММП ингиби-

тора, пока не известно, как долго ингибирующий эффект будет продолжаться [23].

Для подавления активности ММП могут быть использованы другие синтетические ингибиторы, обладающие цинк-ион хелатирующими свойствами.

Было также обнаружено, что золедронат, третье поколение бисфосфонатов, имеет способность ингибировать ММП [23]. СМТС и их аналоги, которые в настоящее время оцениваются в ходе клинических испытаний лечения рака, могут предложить перспективные методы для достижения прочных связей бондинга дентина.

Было выявлено, что полифенолы зеленого чая, особенно эпигаллокатехин галлат (EGCG), могут подавлять активацию proMMP-2, MMP-2 и MMP-9 [16]. Соевые сапонины и авокадо [14], олеиновые кислоты [8] показывают эффективное MMP-торможение *in vitro*. Авторы показали, что LU 105, натуральный экстракт из семян *Lupinus albus*, может уменьшить действие MMP-9 и MMP-2 на фибробласты при заболеваниях пародонта [10]. Активный экстракт из коры вяза, *grosyanidin* олигомер, показал аналогичное тормозящее действие на ММП [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Деструкция коллагена оказывает негативное влияние на реминерализацию незащищенных волокон коллагена дентина в естественных условиях. ММП ингибиторы, препятствующие деструкции коллагена, должны быть рекомендованы для использования при лечении кариозного дентина.

Во время медикаментозной обработки было бы целесообразно применять ингибиторы ММП, которые имеют способность не только тормозить разрушение коллагена дентина в гибридном слое, тем самым повышая прочность связи, но и предотвратить возникновение вторичного кариеса вокруг реставраций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Immunohistochemical localization of matrix-metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol* / L. W. Boushell [et al.]. – 2008. – Vol. 53 (2). – P. 109–116.
2. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive / M. G. Brackett [et al.] // *Oper Dent*. – 2009. – Vol. 34 (4). – P. 381–385.
3. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers *in vivo* / W. W. Brackett [et al.] // *Oper Dent*. – 2007. – Vol. 32 (2). – P. 107–111.
4. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro* / S. Geraldini [et al.] // *J Dent Res*. 2007. – Vol. 86 (1). – P. 90–94.

5. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries / C. Chaussain-Miller [et al.] // *J Dent Res.* – 2006. – Vol. 85 (1). – P. 22–32.
6. *Dayan, D.* A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix / D. Dayan, I. Binderman, G. L. Mechanic // *Arch Oral Biol.* – 1983. – Vol. 28 (2). – P. 185–187.
7. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins / M. Demeule [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2000. – Vol. 1478 (1). – P. 51–60.
8. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate / S. Garbisa [et al.] // *Cancer.* – 2001. – Vol. 91 (4). – P. 822–832.
9. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine / R. Gendron [et al.] // *Clin Diagn Lab Immunol.* – 1999. – Vol. 6 (3). – P. 437–439.
10. Effectiveness of 2 % chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro* / B. P. Gomes [et al.] // *Int Endod J.* – 2003. – Vol. 36 (4). – P. 267–275.
11. In vitro effect of nanoleakage expression on resin-dentin bond strengths analyzed by microtensile bond test, SEM/EDX and TEM / M. Hashimoto [et al.] // *Bio-materials.* – 2004. – Vol. 25 (25). – P. 5565–5574.
12. Permeability of adhesive resin films / M. Hashimoto [et al.] // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2005. – Vol. 74 (2). – P. 699–705.
13. Effect of chlorhexidine on MMP activity of human dentin / M. Hashimoto [et al.] // *IADR/AADR/CADR 83rd General Session.* – 2005.
14. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen / M. Hashimoto [et al.] // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2003. – Vol. 66 (1). – P. 287–298.
15. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo* / J. Hebling [et al.] // *J Dent Res.* – 2005. – Vol. 84 (8). – P. 741–746.
16. Conversion of one-step to two-step self-etch adhesives for improved efficacy and extended application / N. M. King [et al.] // *Am J Dent.* – 2005. – Vol. 18 (2). – P. 126–134.
17. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction *in vivo*: role of active enzyme in human periodontitis / W. Lee [et al.] // *J Periodontol Res.* – 1995. – Vol. 30 (1). – P. 23–33.
18. Self-etching increases matrix metalloproteinase expression in the dentin-pulp complex / N. Lehmann [et al.] // *J Dent Res.* – 2009. – Vol. 88 (1). – P. 77–82.
19. Immunohistochemical / A. Mazzoni [et al.] // *Int J Oral Sci.* – 2009. – Vol. 1 (4). – P. 163–176.
20. *Moses, K. D.* Immunohistochemical study of small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins in reactionary dentin of rat molars at different ages / K. D. Moses, W. T. Butler, C. Qin // *Eur J Oral Sci.* – 2006. – Vol. 114 (3). – P. 216–222.
21. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging / D. H. Pashley [et al.] // *J Dent Res.* – 2004. – Vol. 83 (3). – P. 216–221.
22. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design / L. Sartor [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 2002. – Vol. 64 (2). – P. 229–237.
23. Two-photon laser confocal microscopy study of resin-dentin interfaces created with water or ethanol wet-bonding technique: qualitative and quantitative micropermeability assessment / S. Sauro [et al.] // *J Biomed Mater Res: Part B Appl Biomater.* – 2009. – 90B. – P. 327–337.
24. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin / M. Sulkala [et al.] // *Arch Oral Biol.* – 2007. – Vol. 52 (2). – P. 121–127.
25. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen *in situ* / A. J. van Strijp [et al.] // *Caries Res.* – 2003. – Vol. 37 (1). – P. 58–65.
26. *van Wart, H. E.* The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family / H. E. van Wart, H. Birkedal-Hansen // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1990. – Vol. 87 (14). – P. 5578–5582.
27. Effect of structural change of collagen fibrils on the durability of dentin bonding / B. Yang [et al.] // *Bio-materials.* – 2005. – Vol. 26 (24). – P. 5021–5031.