

Matriks metalloproteinazlar: diş dokuları ve çürük üzerine etkileri

Matrix metalloproteinases: effects on dental tissues and caries

Hande Erkli, DDS, Engin Ersöz, DDS, PhD

Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti Anabilim Dalı, Ankara.

Received: 22 October 2010 Accepted: 26 January 2011

ÖZET

Oral kavitede görülen hastalıkların mikroorganizmalarla olan ilişkileri ortaya konduktan sonra tedavi seçenekleri bu organizmaları ortadan kaldırmaya yönelik olmuştur. Ancak günümüzde yapılan çalışmalar bu hastalıkların oluşmalarının yalnızca mikroorganizmalar nedeniyle olmadığını aynı zamanda konak cevabının ve konak kaynaklı faktörlerin de hastalığın oluşması ve seyri etkilediğini gözler önüne sermiştir. Bu konak kaynaklı faktörlerden bir tanesi ise Matriks Metallo Proteinaz (MMP) adı verilen bir enzim grubudur. MMP'ler; yıkımdan sorumlu birçok ekstraselüler matriks proteini ile organogenez, büyüme ve doku dönüşümü sırasında uyum içinde çalışan enzim grubudur. Bu derleme matriks metalloproteinazlarının hem sistemik etkilerine değinecek hem de ağız hastalıklarının seyri ve tedavi seçenekleri içerisinde üstlenebilecekleri rollere ışık tutacak şekilde hazırlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Matriks metalloproteinaz, çürük, kollagen, matriks metalloproteinaz doku inhibitörü.

ABSTRACT

Since relationship between oral diseases and microorganisms have been revealed treatment options were focused to terminate those microorganisms. However; today's researches show that host response and host related factors have influence on diseases and their progress. Matrix metalloproteinases (MMP) are one of those host related factors. MMP's act as a degradative extracellular matrix protein during organogenesis, growth and tissue transformation processes. This review is about; systemic effects of MMP's and their roles in disease progression and treatment options.

Key words: Matrix metalloproteinases, caries, collagen, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases.

Oral hastalıkların mikrobiyal doğası keşfedildikten sonra yıllar boyu yapılan araştırmalar hastalıkların ardındaki mikroorganizmalarla savaşmaya yönelik olmuştur.¹ Yıllar içerisinde birçok oral hastalığın temelini anlaşılmasında konak kaynaklı faktörlerin anahtar rol üstleneceği ortaya çıkmıştır. Bu konak faktörlerinden bir tanesi ise Matriks Metalloproteinaz (MMP) adı verilen bir enzim grubudur.²⁻⁴

MMP'ler; yıkımdan sorumlu birçok ekstraselüler matriks proteini ile organogenez, büyüme ve doku dönüşümü sırasında uyum içinde çalışan enzim grubudur. MMP'lerin yetişkin dokudan salınımı ve aktivasyonu kısıtlıdır, ancak istenmeyen doku yıkımına neden olan inflamatuvar hastalıklar, tümör gelişimi ve metaztas gibi çeşitli doku patolojilerinde kayda değer bir yükselme izlenir. Matriks metalloproteinazları; matriksin ve ekstraselüler matriksin hidrolize componentleri olarak da gösterilirler.⁵ řu ana kadar insandaki 24 adet MMP kimliklendirilmiş, 26 adet iyi tanımlanmış üye rapor edilmiştir. Bunların çoğu farklı etkilere

Hande ERKLİ
Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti Anabilim Dalı
Beşevler / ANKARA
Telefon: 0312 296 56 02 / 0533 315 49 51
Fax: 0312 212 39 54
e-mail: herkli@hotmail.com

sahip proteinler olarak; matriks komponentlerine yapışmaları, aktivasyon göstermek için çinko iyonuna bağlanmaları, etki göstermeden önce bölünmeyle aktivasyon ihtiyacı, aile üyeleri arasında özel aminoasit dizilerinin korunması, metalloproteinazların endojen doku inhibitörleriyle (*tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases* (TIMP)) enzimatik aktivitelerindeki azalmalarına göre tanımlanırlar.^{6,7} Bu proteinler; büyüme, normal doku yapımı ve anjiogenezis gibi birçok biyolojik süreçte merkezi rol oynar. Ayrıca aterom, artrit, kanser ve doku ülserasyonu gibi hastalıklarda yara iyileşmesi sürecinde anahtar rol üstlenirler.⁸ MMP'ler doku yıkımı görülen oral hastalıklarda da dikkat çekici rol üstlenir. Yüksek miktarda kollajenaz (özellikle MMP-8'in) varlığı ve aktivitesinin istenmeyen doku yıkımıyla ilişkisine en iyi örnek periodontitis ve periimplantitistir. Ancak MMP'lerin çürük ve oral kanserler gibi diğer ağız hastalıklarıyla olan ilişkisine dair kanıtlar daha ileri çalışmalar yapılmasını zorunlu kılmıştır.¹

Tükürükten izole edilen MMP'ler de, tükürük direkt olarak çürük dentine ulaşabildiği için, yıkım sürecine etkilidirler. Çürük oluşumunda dentin ekstraselüler matriksinin yıkımında bakteriyel proteazlar ana sorumlu olarak görülmüştür.^{4,9} Ancak; birçok çalışma; çürüğün kontrolü ve gelişiminde bakteriyel asitlerin yaptığı demineralizasyonu takiben konak kaynaklı MMP'lerin de dentin yıkımına katıldığını göstermektedir.¹⁰

MATRIKS METALLOPROTEİNAZLARI (MMP) VE DOKU İNHİBİTÖRLERİ (TIMP)

Matriks metalloproteinazlarının (MMP) biyolojik fonksiyonları

MMP'ler; bazal membran ve ekstraselüler matriks bileşenlerinde bozulmalara sebep olan; yapısal olarak benzer ancak genetik olarak farklılık gösteren enzim ailesidir. 23 insan enzim

grubu kollajenaz, jelatinaz, stromelizin, membran-tip MMP'ler ve diğer MMP'ler olarak sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma; özel olarak etkin oldukları yapılar ve metalloproteinazların moleküler yapıları esas alınarak oluşturulmuştur. MMP'ler; doku büyümesi, *remodeling*, yara iyileşmesi gibi fiziksel süreçlerde de görev alırlar ve hücreler arası iletişimin düzenlenmesinde, moleküler değişim ve bağışıklık üzerinde; hücre yüzey reseptörleri, sitokinler, hormonlar, defensin, adezyon molekülleri ve büyüme faktörlerinin biyolojik etkinliğini işleyerek önemli rol oynarlar. MMP aktivitesi; MMP'lerin ve bunların en büyük endojen inhibitörü olan matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri yani TIMP'lerin sentezi arasındaki hassas denge ile kontrol edilir. MMP'lerin katalitik etkinliği proenzimlerin aktivasyonu ve TIMP'lerin inhibe edilmesi yoluyla sağlanır.¹¹

MMP doku inhibitörlerinin (TIMP) biyolojik fonksiyonları

İlk TIMP; insan serum ve fibroblastlarının olduğu bir besi yerinde kollajenaz aktivitesini inhibe etme yeteneğine sahip bir protein olarak tespit edilmiştir.^{12,13} MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki denge hem büyüme ve gelişim gibi fiziksel süreçlerde hem de kanser ve periodontitis gibi patolojik durumlarda değişkenlik gösterir.¹⁴⁻¹⁶

TIMP'lerin bilinen ilk biyolojik fonksiyonu keşfedilmelerine sebep olan kollajenaz inhibisyonudur.¹⁷ TIMP'ler ekstraselüler matrikste MMP'lerle 1:1 oranında *non-kovalent stokiometrik* kompleksler şeklinde bulunurlar. Hemen hemen her MMP, bağlanma yatkınlıklarında farklılık olmasına rağmen, dört TIMP tarafından inhibe edilebilirler.¹⁸ Membran tip (MT-) MMP'ler olarak da bilinen farklı bir grup, hücre membranı ile sınırlandırıldıklarından dolayı TIMP-1 tarafından baskılanamazlar.^{19,20}

TIMP-1 ve TIMP-2; hücrelerin büyük çoğunluğu için kuvvetli bir büyüme faktörü olarak tanımlanır.^{21,22} *In vitro*

çalışmalarda TIMP-1'in 80-kDa transmembran proteini yoluyla meme kanseri hücrelerine bağlandığı ve doza bağımlı mutajenik etkisi olduğu gösterilmiştir.²³ Bu bulgular TIMP-1'in meme kanseri için *marker* olarak kullanılması yolunda çalışmalar yapılması gerektiğini göstermiştir.^{24,25} TIMP-1'in aort kası hücrelerinde ve keratositlerde de mutajenik etkisi olduğu bilinmektedir.²⁶

TIMP'lerin apoptosisin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. TIMP-1; meme epitelyal hücrelerinde ve B-lenfositlerinde apoptosisi azaltır.²⁷⁻²⁹ Buna alternatif olarak; TIMP-2'de melanoma hücre dizilerinde apoptosisi inhibe eder.³⁰ TIMP-3 basit retinitis pigmentosa olarak da bilinen retinanın dağılmasına neden olan otozomal dominant hastalıktan etkilenmiş retina hücrelerinde apoptosisi uyarır.³¹⁻³³ TIMP'lerin apoptosiz üzerine direkt ya da indirekt etkileri hücre tipine özeldir.³⁴ Mononükleer fagositler, nötrofiller ve dendritik hücreler de TIMP ve MMP üretebilme yeteneğine sahiptirler.^{15,35,36}

MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARININ ORAL ETKİLERİ

Mine ve dentinde matriks metalloproteinazlar

MMP'ler diş morfogenezi esnasında hücre matriks etkileşiminin düzenlenmesi ve dokuların yeniden şekillenmesi işleminde rol alırlar. Dişi oluşturan hücreler tarafından neredeyse sadece MMP-20'nin (enamelinin) salgılandığı bilinmektedir. Mine matriksinin en büyük yapısal bileşeni amelogeninlerdir. Enamelinin benzersiz yapısal ve enzimatik özellikleri amelogeninin bozunmasını sağlayabilmesi ve mine gelişiminde önemli rol oynamasının esas sebebidir.^{38,39} Enamelinin doğal insan odontoblastları tarafından dentinal sıvı içine salgılanabilir. Süt dişlenme dönemi sırasında üretilmeye başlanan ve dentinin

yapısına katılan MMP-20 çürük gelişim süreci boyunca serbest kalır.⁴⁰

Mine formasyonu ile ilgili bir diğer bir enzim ise MMP-2'dir. MMP-2 diş gelişiminde önemli rol üstlenir. MMP-2 amelogenini parçalayabilir. MMP-2 ve onun aktivatörü olan membrantip-1 MMP (MT-1MMP); ameloblastlar, odontoblastlar ve pulpa tarafından üretilir.⁴¹

MMP-20; uygun mine formasyonun oluşturulmasında MMP-2 'ye göre daha önemlidir. MMP-20 gen yıkımlı farelerle yapılan bir araştırma sonucunda amelogeninin düzgün işlenmediği ve buna bağlı olarak mine matriksinde değişimlerin olduğu görülmüştür. Sonuçta oluşturulan mine; normalden ince, prizmatik yapısı bozuk, tabakalar halinde dentinden uzaklaşan, pürüzsüz hipoplastik amelogenezis imperfektaya benzer yapıdadır.³⁸ MMP-20 gen yıkımlı farelerin minelerinin mineral içeriğinin; sağlıklı farelerdekinin yaklaşık olarak yarısı, mine sertliğinin ise 2/3 oranında olduğu görülmüştür.³⁹

Dental florozis ilk olarak Black ve McKay tarafından 1916'da ortaya konmuştur.⁴² Diş gelişimi sırasında yüksek oranda *fluoride* maruz kalma nedeniyle oluşan artmış pöröziteyle karakterize mine mineralizasyonundaki bir defekt olarak tanımlanmıştır.⁴³ Mine oluşumu sırasında yüksek miktarda *fluoride* maruz kalma, proteinazlar tarafından hidrolize edilmesi gereken amelogeninin uzaklaştırılmasını geciktirir. Protein hidrolizindeki bu gecikmenin sebebi; mine proteinlerinin bozunmasından sorumlu ekstraselüler proteinazlardaki bir sorun olabilir. Vücuda alınan floridin mine matriksindeki proteinazların özellikle MMP-20'nin işleviyle ilişkisi araştırılmış; yapılan *in vivo* çalışma sonucunda florid alımının, yüksek miktarda aktif MMP-20 değişimiyle ilişkili olduğunu gösterilmiştir.⁴⁴ *In vitro* çalışmalarda; floridin mikromolar konsantrasyonlarının metalloproteinaz aktivitesinde değişimlere yol açtığı, MMP-20 tarafından yapılan amelogenin

hidrolizinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bu bulguların ışığında; floridin MMP-20'nin salgılanması ve aktivitesi üzerine olan etkisinin; minedeki ya da diğer mineralize dokulardaki fluorozisin etyolojisine dahil olduğu düşünülebilir.

Dayan ve ark.⁴⁵ sağlam dentindeki kollejenolitik aktiviteyi göstermişler ancak bu aktivitenin kaynağını tespit edememişlerdir. İnsan dentininde MMP-2 mevcudiyeti ilk kez Martin de Las Heras ve ark.⁴⁶ tarafından tanımlanmış ve mineralizasyon sonrası matriksin yeniden şekillendiğinin indirekt kanıtını gözler önüne sermişlerdir. Daha sonra MMP-8'in mineralize dentin matriksindeki varlığı da gösterilmiştir.⁴⁷

Çürük oluşumunda matriks metalloproteinazları

MMP'lerin çürüğün ilerleme sürecine katıldıkları öne sürülmüştür ancak proteolitik enzimlerin bu süreç içindeki rolü ve kesin kaynağı hala tartışma konusudur. *S. mutans* çürük lezyonunun gelişimine katılan baskın organizmadır.⁴⁸ Yapısı kollajen fibrillere benzeyen sentetik bir peptid olan FALGPA'ya bağlanıp, parçalayabilme özelliği ve gösterdiği kollejenolitik aktivite sebebiyle *S. mutans* diş çürüğünde önemli bir virulans faktör olarak düşünülür.⁴⁹ Ancak mineralize dokulardaki üçlü-sarmal kollajen fibrillerin parçalanması sentetik peptidlerin parçalanmasından daha karmaşıktır.⁵⁰ Gerçekten de dentin matriksin çözülmesinin bakterilere bağlı olmadığı gösterilmiştir. *In vitro* çalışmalar; karyojenik bakterilerin yalnızca dentin yüzeyinde demineralizasyona neden olduğunu; ancak kavite oluşumu için gerekli olan dentin kollajen matriksinin parçalanmasına neden olmadıklarını göstermiştir.² Dentine kadar ilerlemiş lezyonlardan alınan bakteri örnekleri kollajen yıkımında başarısızlık göstermişlerdir³ ayrıca çürük aktif bireylerden alınan tükürük örneklerinden izole edilen bakterilerin jelatinolitik

aktivite göstermedikleri saptanmıştır.¹⁰ Bu iki çalışma; yapılan *in vitro* dentin çürüğü oluşturma deneylerinde ortama dışarıdan kollajenaz eklenmesinin gerekliliğini göstermiştir.^{2,51} Tükürükteki asit miktarı MMP'ların aktivasyonunu artırır bu da demineralize dentin matriksinin bozunmasına neden olur.¹⁰

MMP'larının dentin matriksi^{40,45-47,52} ya da tükürük içindeki^{10,53} varlığının kanıtlanması dentin çürüğündeki matriks bozunmasından bu enzimlerin sorumlu olabileceğini gösterir niteliktedir. Çürük dentindeki kollejenolitik aktivite sağlam dentine göre artar bunun nedeni ise kollajenaz aktivatörlerinin varlığı ya da kollajenaz inhibitor komplekslerinin salgılanmasındaki kısmi azalmadır.⁴⁵ Kollajenaz (MMP-8) ve jelatinazın (MMP-2 ve -9) öncül ve aktif formlarının dentin çürüğü lezyonlarında görüldüğü ve aktivasyonlarının doğal olarak ortaya çıktığı gözlemlenmiştir.¹⁰

Artmış MMP değerleri ve aktivitesi; Sjogren sendromundan muzdarip hastalarda ve radyoterapi sonrası tükürük miktarlarında azalma oluşan hastalarda gözlenmiştir. Her iki durumda da çürük miktarında artış olduğu bilinmektedir.^{54,55} Tetrasiklin türevleri (doksisisiklin, kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklin (CMT) ve tüm etkili MMP inhibitörleri) *in vivo*⁵⁶ ve *in vitro*⁵⁷ olarak tükürük MMP aktivitesini azaltmıştır. Sonuç olarak; fare molar dişleriyle yapılan bir *in vivo* çalışma MMP inhibitörleri kullanılarak tükürük MMP aktivitesinin azaltılması yoluyla dentin çürüğü gelişiminin önemli ölçüde azaltıldığını göstermiştir.⁵⁸ Bu bulgular çürükten korunmada yeni bir yol yarattıkları için çok önemlidirler. Organik matriksin geri dönüşsüz biçimde yıkımının engellenmesi ya da yavaşlatılmasıyla çürük için dekalsifiye dentinin remineralizasyonu yoluyla doğal bir iyileşme sağlanabilir. Çürük oluşumundan korunmada MMP inhibitörlerinin kullanışlı olduğu kanıtlanabilir. Ayrıca klorheksidinin direkt olarak MMP-2,-8 ve -9'un aktivitesini inhibe edebiliyor olması dikkate

değerdir.⁵⁸ Elde edilen sonuçlar bu antimikrobiyal ajanın; antiproteolitik aktiviteye de sahip olması nedeniyle sık kullanıldığı durumlarda çürük tedavisinde yararlı olabileceğini göstermiştir. Ancak MMP'lerin çürüğün ilerleyişindeki rolü kesinleştirilmiş değildir. MMP-1,-2 ve -9'un varlığı ve aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada; tamamen demineralize edilmiş dentin örnekleri 4 hafta süreyle ağız ortamına yerleştirilmiş bunun sonucunda hem tükürük içinde hem de dentin kollajenlerinde MMP aktivitesi gözlenmiştir. Bütün tükürük örneklerinde öncül MMP'lerin bulmasına karşılık dentin örneklerinin yalnızca %30'unda öncül MMP bulunuyor olmasına rağmen dentinde de MMP aktivitesinin gözlenmiş olması ilgi çekicidir. Enzim aktivitesi derecesiyle dentin örneklerindeki kollajen kaybı arasında bir bağlantı kurulamamış olması MMP'lerin matriks bozunmasındaki rolünün kanıtlanmasında başarısız olmuştur.⁵⁹ Ancak bunun sebebi bozunma boyunca görülen MMP kaybı olabilir. Bu durum; en bariz şekilde bozunmuş dentin matrikse sahip örneklerin en düşük MMP seviyelerine sahip olmalarıyla kanıtlanabilir. Matriks yıkımı bireyler arasında ve bireylere özel değişiklikler göstermektedir. Bu sebepten mekanizmanın tam anlamıyla anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Demineralize kollajen matrikste matriks metalloproteinazları

Hidrofilik dentin adezivlerinde zaman içinde bozulma gözleendiği kanıtlandığından beri yapılan restorasyonların diş yüzeyine bağlandıkları bölgenin uzun süreli olarak sabit kalmasının sağlanması diş hekimliğinin ilgilendiği önemli konulardan biri haline gelmiştir.⁶⁰ Asitle pürüzlendirilmiş dentin yüzeyinde açığa çıkmış kollajen matriksin de bozulmanın nedeni olduğundan şüphelenilmektedir.⁶¹ Bu bozulma nedeniyle kesin olarak görülen sonuç; adezyon kaybıdır. Rezin-dentin arayüzündeki stabilite kaybında kollajenin hidrolitik bozulmasının rolü

büyüktür.⁶² Kollajen fibrillerin hidrolitik bozulmaları bakteriyel kolonizasyonun olmadığı durumlarda bile gözlenebilmektedir.⁵² Araştırmacılar; mineralize dentin matriksindeki MMP'lerin asitleme işlemi boyunca aktive oldukları ve kollajen matriks bozulmasından bu durumun sorumlu olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca; rezin infiltrasyonu tamamlanmamış kollajen fibrillerin hibrit tabakadaki MMP'lerden korunmasının önemli olduğunu belirtmişlerdir. Diş hekimliğinde güvenli olması nedeniyle geniş kullanım alanı bulan klorheksidinin asitle pürüzlendirilmiş dentine uygulanmasını önermişlerdir. Yapılan bir *in vivo* çalışmada⁶³ da bu savı destekler şekilde rezin infiltre olmuş dentinde kollajen matriksin kendi kendine yıkıma uğradığı gösterilmiş ancak klorheksidinin MMP inhibitörü olarak kullanımı halinde bu durumun ortadan kalktığı gösterilmiştir.

Restoratif uygulamalarda matriks metalloproteinazları

Adeziv sistemler mine-dentin arayüzündeki rezin restorasyonun marjinal örtücülüğünün artırılması amacıyla kullanılmaktadırlar. Asit uygulanmasını gerektiren adeziv sistemler mine ve dentinde yüzeysel demineralizasyonu arttırmaktadırlar.⁶⁴ Zaman içinde mineye olan bağlanma sağlam kalsa da dentindeki bağlanma heterojen ve ıslak yapısı sebebiyle minedeki kadar kararlı kalmaz. Yüzeysel demineralizasyon sonrası rezin, dentin ekstaselüler matriksi ile karışır ve burada polimerize olarak hibrit tabakayı oluşturur. Adeziv restorasyonlardaki önemli problemde biri de hibrit tabakadaki bağlanma kuvvetinde azalma ve restorasyon ömrünün kısalmasıyla karakterize bozulmadır.^{65,66} Endojen proteinazların salınımı ve aktivitesinin; yaşlandırma yapılmış, adeziv uygulanmış ve izole edilmiş dentin dokusunda rezinin tam olarak infiltre olamadığı hibrit tabakada kollajen yıkımından sorumlu olduğunu gösteren *in vitro* bir çalışma bulunmaktadır.^{52,67,68} Hibrit tabakanın en

alt kısmında dentin kollajenlerinin bozulduğu daha sonradan *in vivo* olarak da kanıtlanmıştır.^{63,69} MMP-2 ve -9 moleküler formlarının yapıda bulunması halinde *total etch*⁷⁰ ve *self etch* adezivlerin⁷¹ asidik demineralizasyon sonrası jelatinolitik aktiviteyi arttırdığı doğrulanmıştır.⁷²

Kısmen mineralize insan dentin talaşları içersine fluoresanla işaretlenmiş kollajen karıştırılarak yapılan bir çalışmada; önemli derecede kollajenaz aktivitesi gözlemlenmiş bu gözlem sonucunda 270 günlük zaman dilimi içerisinde demineralize dentinin *in vitro* bozulmasından⁵² ve hibrit tabakadaki *in vivo* bozulmadan bu aktivitenin sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır.⁶³ İnkubasyon ortamına dört proteaz inhibitörünün eklenmesi sonucunda *in vitro* kollajen bozulması tamamen, mineralize dentin talaşındaki kollejenolitik aktivite ise %73 oranında baskılanmıştır. Aynı çalışmada mineralize dentin talaşlarına 15 sn boyunca %37'lik fosforik asit uygulamasını takiben kollejenolitik aktivite % 65 oranında artmıştır.⁵²

Birçok tek aşamalı *self etch* adeziv sisteminin pH değerinin 1 ve 2 arasında olduğu bilinmektedir. Tek aşamalı *self etch* adeziv sistemlerin pH'sı enzimleri denature edebilecek kadar kuvvetli değildir ancak MMP'leri aktive edebilirler bu durum tek şişe adezivlerle beraber MMP inhibitörlerinin kullanımını gerektirir.⁷¹

Matriks metalloproteinaz inhibitörleri ve dentin çürüğü: tedavi olanakları

Sentetik MMP inhibitörleri

Birçok birinci kuşak MMP inhibitörü; kollajenaz enziminin bölünme bölgesi çevresine çinko bağlayarak enzimatik aktiviteyi baskılayan, kollajeni taklit eden bir aminoasit içerecek şekilde tasarlanmıştır. Süksinat gibi başka çinko – şelat grupları da geliştirilmiştir.⁷³ Bu tür ilaçlar esas olarak kanser tedavisi için üretildiklerinden ve ağır yan etkilere sahip olduklarından dolayı çürükten korunmada kullanımları uygun değildir. Ancak bu tür

ajanların çürük üzerine topikal olarak uygulanması yeterli olabileceği gibi; daha seçici ve daha az toksik MMP inhibitörleri tercih edilebilir.⁷⁴

Çinko oksit ojenol içerisindeki çinko MMP-2 ve -9'un proteolitik aktivitesini etkili olarak baskılamaktadır.⁷⁵ Çinkonun, diş hekimliğinin klinik uygulamalarında sıklıkla kullanılması; restoratif materyallerin önemli bir parçası olması, diş macunları ve gargaralar içerisinde aktif olarak bulunması nedeniyle de MMP inhibisyonunda önemli yere sahiptir.

Siklinler ve bifosfonatlar

Antimikrobial olmayan kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklinler (CMT) özellikle ağız içi uygulama sonrasında güvenli ve etkili bulunan birkaç MMP inhibitörü arasındadır. CMT 'ler MMP'lerin aktivitelerini ve salınımlarını Ca⁺² şelasyonu yoluyla baskılar.⁷⁶⁻⁷⁸ MMP'lerin çürük gelişimindeki etkinliğini kanıtlamak amacıyla; CMT, zoledronate ve kombinasyonları *in vivo* olarak genç fareler üzerinde denenmiştir. Bu moleküller dentindeki çürük ilerlemesini baskılanmasında ümit verici yeni bir ilaç grubu oluşturabilirler.^{57,79}

Doğal terapiler

Avokado ve soya fasulyesinin MMP inhibisyonu yaptıkları *in vitro* olarak gösterilmiştir.⁸⁰ Yeşil çay, özellikle MT1-MMP aktivitesini azaltarak proMMP-2 değerlerinde de düşmeye neden olma potansiyeline sahiptir.⁸¹⁻⁸³ Bu doğal maddelerin baskılayıcı etkisi dentin çürüğünün ilerlemesinin yavaşlatılmasında da etkili olabilir.

MMP baskılanmasında klorheksidin kullanımı

Klorheksidin (CHX) oral bakterilere karşı yaygın olarak kullanılan bir antimikrobial ajandır.⁸⁴ Çalışmalar subgingival bölgenin CHX ile yıkanmasının periodontal enflamasyon, kanama, cep derinliği miktarlarında azalmaya neden olduğunu göstermiştir.^{85,86}

Periodontal hastalıklar üzerine etkili faktörler araştırıldıkça konak kaynaklı proteolitik enzimler yani MMP'lerin etkinliği ve bu patolojik süreçteki rolü net olarak görülmüştür.^{6,87,88} Klorheksidinin periodontal fibroblastlardan salgılanan MMP'ler üzerine olan etkinliği göz önüne alındığında aynı etkinliği çürük süreci ve hibrit tabakanın bozulmasında etkili olan dentin kaynaklı MMP üzerinde de göstereceği fikri üzerine çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu savı destekler şekilde adeziv uygulanmış ve uygulanmamış dentin içindeki kollajen fibrillerin kaybolduğu^{61,89-91} ya da yaşlandırılmış hibrit tabakalarda başarısızlıklar olduğu gözlemlenmiştir.^{60,92} Fosforik asitle yapılan pürüzlendirmenin mineralize dentinde kollajenolitik aktiviteyi azalttığı fakat tamamen ortadan kaldırmadığı ancak çok düşük konsantrasyonlarda dahi olsa klorheksidin uygulamasının bu aktiviteyi güçlü biçimde baskıladığı izlenmiştir. Bu da klorheksidini potansiyel bir MMP baskılayıcısı haline getirir.^{58,63}

SONUÇ

MMP'lerin dentin- pulpa kompleksi, çürük patogenezi ve dentin adeziv arayüzündeki bozunmadaki rolü üzerine daha ileri araştırmalar yapılmalıdır. Klorheksidin, doksisisiklin, ve minosiklinin periodontal hastalıklarda etkin olan MMP'leri, tetrasiklin ve zoledronatın diş çürüğü ilerleyişinde etkin olan MMP'leri baskılayabildiği kanıtlanmıştır. MMP inhibitörlerinin çürükten korunmada, pulpitis ve periodontitisin tedavisinde kullanılabilirlikleri araştırılmaya değer bir konudur. Konuyla ilgili yapılacak klinik uygulamalara karar verilmeden önce mutlaka *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yürütülmeli; çürük profilaksisinde MMP inhibitörlerinin kullanılması için ise mevcut klinik kanıtlara dayalı bilgilerin uzun dönem klinik periyodik takip çalışmalarıyla onaylanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004;10:311-318.
2. Katz S, Park KK, Palenick CJ. In vitro root surface caries studies. *J Oral Med* 1987;42:40-48.
3. van Strijp AJ, van Steenberg TJ, de Graaff J, ten Cate JM. Bacterial colonization and degradation of demineralized dentin matrix in situ. *Caries Res* 1994;28:21-27.
4. Armstrong WG. Further studies on the action of collagenase on sound and carious human dentin. *J Dent Res* 1958;37:1001-1015.
5. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:207-214.
6. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64:474-484.
7. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:21491-21494.
8. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
9. Sognnaes RF. Introduction to the problem of caries. *Ann NY Acad Sci* 1965;131:687-689.
10. 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.
11. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2003;31:77-104.
12. Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ. Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;64:232-240.

13. Woolley DE, Roberts DR, Evanson JM. Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;66:747-754.
14. Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res* 2002;37:196-203.
15. Kerkelä E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 2003;12:109-125.
16. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:187-198.
17. Snoek-van Beurden PAM, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005;38:73-83.
18. Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 1997;272:29975-29983.
19. English WR, Velasco G, Stracke JO, Knäuper V, Murphy G. Catalytic activities of membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *FEBS Lett* 2001;491:137-142.
20. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719-3727.
21. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide-range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992;298:29-32.
22. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growthpromoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 1994;107:2373-2379.
23. Luparello C, Avanzato G, Carella C, Pucci-Minafra I. Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999;54:235-244.
24. Würtz SØ, Christensen IJ, Schrohl AS, Mouridsen H, Lademann U, Jensen V. Measurement of the uncomplexed fraction of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the prognostic evaluation of primary breast cancer patients. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:483-491.
25. Würtz SØ, Schrohl AS, Sørensen NM, Lademann U, Christensen IJ, Mouridsen H, Brüner N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:215-227.
26. Akahane T, Akahane M, Shah A, Thorgeirsson UP. TIMP-1 stimulates proliferation of human aortic smooth muscle cells and Ras effector pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:440-445.
27. Guedez L, Courtemanch L, Stetler-Stevenson M. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* 1998;92:1342-1349.
28. Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, et al. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 1998;102:2002-2010.
29. Li G, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast

- epithelial cells. *Cancer Res* 1999;59:6267-6275.
30. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 1998;75:246-253.
 31. Jones SE, Jomary C, Neal MJ. Expression of TIMP3 mRNA is elevated in retinas affected by simplex retinitis pigmentosa. *FEBS Lett* 1994;352:171-174.
 32. Jomary C, Neal MJ, Jones SE. Increased expression of retinal TIMP3 mRNA in simplex retinitis pigmentosa is localized to photoreceptorretaining regions. *J Neurochem* 1995;64:2370-2373.
 33. Schwartz SB, Aleman TS, Cideciyan AV, Swaroop A, Jacobson SG, Stone EM. De novo mutation in the RP1 gene (Arg677ter) associated with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3593-3597.
 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. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995;96:2304-2310.
 36. Osman M, Tortorella M, Londei M, Quarantino S. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases define the migratory characteristics of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 2002;105:73-82.
 37. Kouwenhoven M, Ozenci V, Tjernlund A, Pashenkov M, Homman M, Press R, Link H. Monocyte-derived dendritic cells express and secrete matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitors and are imbalanced in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002;126:161-171.
 38. Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 2002; 277: 49598-49604.
 39. Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Smith CE. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J Dent Res* 2004;83:909-913.
 40. 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.
 41. Caron C, Xue J, Sun X, Simmer JP, Barlett JD. Gelatinase A (MMP-2) in developing tooth tissues and amelogenin hydrolysis. *J Dent Res* 2001;80:1660-1664.
 42. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007;65:1-13.
 43. Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ. Clinical and structural features and possible pathogenic mechanisms of dental fluorosis. *Scand J Dent Res* 1977;85:510-534.
 44. DenBesten PK, Yan Y, Featherstone JDB, Hilton JF, Smith CE, Li W. Effects of fluoride on rat dental enamel matrix proteinases. *Arch Oral Biol* 2002;47:763-770.
 45. Dayan D, Binderman I, Mechanic GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 1983;28:185-187.
 46. Martin de Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in

- human dentine. *Arch Oral Biol* 2000;45:757-765.
47. 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.
 48. Keltjens HM, Schaeken MJ, Van Der Hoeven JS, Hendriks JC. Microflora of plaque from sound and carious root surfaces. *Caries Res* 1987;21:193-199.
 49. Jackson RJ, Lim DV, Dao ML. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol* 1997;34:49-54.
 50. Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase_gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest* 1995;72:311-322.
 51. Kawasaki K, Featherstone JDB. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res* 1997;76:588-595.
 52. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83:216-221.
 53. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23:1127-1132.
 54. Vuotila T, Ylikontiola L, Sorsa T, Luoto H, Hanemaaijer R, Salo T, Tjäderhane L. The relationship between MMPs and pH in whole saliva of irradiated head and neck cancer patients. *J Oral Pathol Med* 2002;31:329-338.
 55. Konttinen YT, Halinen S, Hanemaaijer R, Sorsa T, Hietanen J, Ceponis A, Xu JW, Manthorpe R, Whittington J, Larsson A, Salo T, Kjeldsen L, Stenman UH, Eisen AZ. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 type IV collagenase/gelatinase implicated in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Matrix Biol* 1998;17:335-347.
 56. Lauhio A, Salo T, Tjäderhane L, Lahdevirta J, Golub LM, Sorsa T. Tetracyclines in treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1995;346:645-646.
 57. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, Tjäderhane L. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res* 2001;80:1545-1549.
 58. Gendron R, Greiner D, Sorsa T, Maryrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:437-439.
 59. Van Strijp AJP, Jansen DC, Degroot J, Ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentin collagen in situ. *Caries Res* 2003;37:58-65.
 60. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003;82:136-140.
 61. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, Kumagai H, Kudou Y, Kubota M, Oguchi H. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res* 2003;66:287-298.
 62. Carrilho MRO, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater* 2005;21:232-241.

63. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84:741-746.
64. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 2003;28:215-235.
65. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005;84:118-132.
66. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008;24:90-101.
67. 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.
68. Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007;86:529-533.
69. Koshiro K, Inoue S, Tanaka T, Koase K, Fujita M, Hashimoto M, Sano H. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch vs. a total-etch adhesive system. *Eur J Oral Sci* 2004;112:368-375.
70. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006;27:4470-4476.
71. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006;114:160-166.
72. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GAM, Papa S, Mazotti G, Di Lenarda R, Pashley DH, Breschi L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res* 2007;86:436-440.
73. Rasmussen HS, McCann PP. Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Ther* 1997;75:69-75.
74. Overall CM, Lopez-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the posttrial era. *Nat Rev Cancer* 2002;2:657-672.
75. Santos M, De Souza A, Gerlach R, Trevilatto P, Scarel-Caminaga R, Line S. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. *J Oral Rehabil* 2004;31:660-664.
76. Ramamurthy NS, Rifkin BR, Greenwald RA, Xu JW, Liu Y, Turner G, Golub ML, Vernillo AT. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. *J Periodontol* 2002;73:726-734.
77. Kivela-Rajamaki M, Maisi P, Srinivas R, Tervahartiala T, Teronen O, Husa V, Salo T, Sorsa T. Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. *J Periodontal Res* 2003;38:583-590.

78. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple nonantimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 1998;12:12-26.
79. Tjäderhane L, Sulkala M, Sorsa T, Teronen O, Larmas M, Salo T. The effect of MMP inhibitor metastat on fissure caries progression in rats. *Ann NY Acad Sci* 1999;878:686-688.
80. Huet E, Cauchard JH, Berton A, Robinet A, Decarme M, Hornebeck W, Bellon G. Inhibition of plasmin-mediated prostromelysin-1 activation by interaction of long chain unsaturated fatty acids with kringle 5. *Biochem Pharmacol* 2004;67:643-654.
81. Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 2000;1478:51-60.
82. Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer* 2001;91:822-832.
83. Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol* 2002;64:229-237.
84. Stanley A, Wilson M, Newman HN. The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol* 1989;16:259-264.
85. Jolkovsky DL, Waki MY, Newman MG, Otomo-Corgel J, Madison M, Flemming TF, Nachnani S, Nowzari H. Clinical and microbiological effects of subgingival and gingival marginal irrigation with chlorhexidine gluconate. *J Periodontol* 1990;61:663-669.
86. Wieder, SG, Newman HN, Strahan JD. Stannous fluoride and subgingival chlorhexidine irrigation in the control of plaque and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 1983;10:172-181.
87. Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch C. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: a role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontal Res* 1995;30:23-33.
88. Rifkin, BR, Vernillo AT, Golub LM. Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. *J Periodontol* 1993;64:819-827.
89. 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;24:3795-3805.
90. 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.
91. Yoshida E, Hashimoto M, Hori M, Kaga M, Sano H, Oguchi H. Deproteinizing effects on resin-tooth bond structures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004;68:29-35.
92. Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE, Qian F. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Oper Dent* 2004;29:705-712.