

Metaloproteinazy i ich udział w degradacji systemów wiążących. Część 1

Metalloproteinases and their role in the degradation of bonding systems. Part 1

¹Private practice: Centrum Stomatologii MAX-DENT, Warsaw

Head of Practice: Paweł Łazicki, MD, PhD

²Department of Conservative Dentistry, Medical University of Warsaw

Head of Department: Agnieszka Mielczarek, MD, PhD

SŁOWA KLUCZOWE

metaloproteinazy (MMPs), inhibitory metaloproteinaz (TIMPs), systemy adhezyjne

STRESZCZENIE

Współczesna stomatologia opiera się na koncepcji stomatologii estetycznej i małoinwazyjnej. Zaowocowało to powszechnym użyciem materiałów złożonych do rekonstrukcji twardych tkanek zęba. Zastosowanie tego typu materiałów wymaga wykorzystania pośrednich systemów adhezyjnych. Po aplikacji przenikają one włókna kolagenowe zębiny i zapewniają zakotwiczenie i retencję materiału odtwórczego. W wielu przypadkach impregnacja włókien kolagenowych jest niewystarczająca i część włókien pozostaje odsłonięta. Odsłonięte włókna kolagenowe ulegają degradacji przez metaloproteinazy (MMPs) – grupę endogennych enzymów proteolitycznych, produkowanych przez strukturalne komórki tkanek i przez komórki odczynu zapalnego. Odgrywają one istotną rolę w metabolizmie macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym również zmineralizowanej macierzy zębinowej. Wyróżniono takie grupy, jak: kolagenazy, stromielizyny, żelatynazy, matrylizyny, metaloproteinazy błonowe oraz metaloproteinazy nieprzyporządkowane do innych grup. Trawienie składników macierzy zewnątrzkomórkowej ma wpływ na osłabienie siły adhezji, powstanie przecieku bakteryjnego i predysponuje do powstania próchnicy wtórnej. Metaloproteinazy mają w związku z tym wpływ na trwałość rekonstrukcji tkanek zęba. Praca stanowi przegląd dostępnego piśmiennictwa w bazie medycznej PubMed opublikowanego w latach 1982-2014. Celem pracy jest analiza udziału MMPs w degradacji systemów wiążących.

KEYWORDS

metalloproteinases (MMPs), metalloproteinase inhibitors (TIMPs), adhesive systems

SUMMARY

Modern dentistry is based on an aesthetic and minimally invasive approach, which has resulted in widespread use of composite materials for the reconstruction of hard dental tissues. This kind of materials requires the use of dental adhesive systems. After application they penetrate collagen fibres of the dentin and provide an anchor and retention for the tooth filling. In many cases, the impregnation of the demineralized dentin matrix is insufficient and some fibres remain exposed. The exposed collagen fibres can be affected by metalloproteinases (MMPs) – a group of endogenous proteolytic enzymes, which can hydrolyze the extracellular matrix components, including mineralized dentin matrix. These processes affect the bond strength, can cause bacterial leakage and predispose to the development of secondary caries. The present work is the review of the available literature published in the PubMed database over the years 1982-2014. The aim of this review was to analyze the contribution of MMPs to the degradation of bonding resins.

WSTĘP

Różnice w budowie i poziomie mineralizacji wpływają na tempo i specyfikę procesu próchnicowego toczącego się w szkliwie i zębinie. Głównym czynnikiem etiologicznym choroby próchnicowej są kwasy organiczne produkowane przez bakterie kariogenne, które przez obniżenie pH w środowisku jamy ustnej inicjują próchnicową demineralizację i rozpuszczają zębinę, odsłaniając macierz pozakomórkową (ECM). Macierz jest zbudowana z białek kolagenowych i glikoprotein, stanowi rusztowanie utrzymujące konstrukcję tkanki zębinowej. Kolagen typu I stanowi największą komponentę (90%) macierzy zewnątrzkomórkowej, warunkuje elastyczność, wytrzymałość i właściwości biomechaniczne zębiny. Włókna kolagenowe oraz niekolagenowe proteiny są syntetyzowane i wydzielane przez odontoblasty (1-4).

Niekontrolowany postęp procesu próchnicowego prowadzi do powstania ubytku. Leczenie zmian ubytkowych wymaga odbudowy brakujących tkanek zęba. Współczesna stomatologia odtwórcza promuje w tym celu estetyczne materiały złożone. Ich wykorzystanie wiąże się z wykonaniem określonych procedur, w tym użyciem systemów adhezyjnych. W wyniku aplikacji kwaśnych uzdatniaczy dochodzi do powierzchniowej demineralizacji zębiny. Dla stworzenia optymalnej strefy łączenia, tzw. warstwy hybrydowej, zbudowanej z włókien kolagenowych typu I oraz proteoglikanów otoczonych łańcuchami polimerowymi, wskazane jest całkowite wysycenie żywicą wytrawioną kwasem ortofosforowym macierzy zębinowej (5-7). Warstwa hybrydowa, złożona z kolagenu, żywicy, hydroksyapatytu oraz resztek wody, zwana jest też strefą wzajemnej dyfuzji. Monomery żywicy wnikają do wypełnionych wodą przestrzeni pomiędzy sąsiadujące włókna kolagenowe zębiny i tworzą element retencyjny dla materiału odtwórczego (8). W obrębie warstwy hybrydowej impregnacja włókien kolagenowych żywicą nie jest całkowita i część włókien pozostaje odsłonięta. Mogą one zostać zdegradowane przez metaloproteiny (ang. *metalloproteinases* – MMPs), co wpływa na osłabienie siły adhezji systemu wiążącego i zębiny. Skurcz materiału odtwórczego towarzyszący zjawisku polimeryzacji może być przyczyną przecieku bakteryjnego, prowadzić do występowania nadwrażliwości zębiny i przebarwień brzegów wypełnienia. Z upływem czasu, degradacja żywicy łączącej jest widoczna jako utrata retencji lub zmniejszenie siły adhezji. Kliniczny przegląd różnych systemów wiążących zastosowanych w ubytkach V klasy według Blacka wykazał największą utratę retencji w badanych zębach w przeciągu 5 lat po zastosowaniu systemów samotrąwiających, lepsze wyniki uzyskano przy zastosowaniu systemu adhezyjnego dwu- lub trzyetapowego z wytrawianiem. Największą kliniczną efektywność wykazały wypełnienia glassjonomery. Powyższe problemy stwarzają często konieczność wymiany wypełnienia (9).

Połączenie systemów wiążących z macierzą zębinową pozostaje w sferze zainteresowania, gdyż, jak wykazują badania, ulega pogorszeniu wraz z upływem czasu. Wynika to z wpływu na strefę adhezji wielu czynników fizycznych

INTRODUCTION

The differences in the structure and level of mineralization of the teeth determine the speed and characteristics of caries process in the enamel and dentin. The primary aetiological factor of caries are organic acids produced by cariogenic bacteria. They initiate caries demineralization by decreasing the pH of the oral cavity and dissolve the dentin, exposing the extracellular matrix (ECM). The matrix is built of collagen proteins and glycoproteins. It acts as a scaffold for the dentin tissue structure. Type 1 collagen is the largest component of the extracellular matrix (90%) and determines the elasticity, durability and biomechanical properties of the dentin. Collagen fibres and non-collagenous proteins are synthesized and secreted by odontoblasts (1-4).

Uncontrolled progression of the caries process leads to the formation of a cavity. The treatment of cavities requires the reconstruction of the missing dental tissues. To this end, contemporary restorative dentistry promotes aesthetic composite materials. Their use involves certain procedures, including the use of adhesive systems. The application of acidic conditioners leads to superficial demineralization of the dentin. In order to create an optimal bonding zone – the so-called hybrid layer, built of type 1 collagen fibres and proteoglycans surrounded by polymer chains, dentin matrix etched with orthophosphoric acid needs to be thoroughly impregnated with resin (5-7). The hybrid layer, composed of collagen, resin, hydroxyapatite and water residues is also called the zone of mutual diffusion. Resin monomers penetrate water-filled spaces between neighbouring dentin fibres and create a retention element for the restorative material (8). The impregnation of collagen fibres with resin within the hybrid layer is incomplete and some fibres remain exposed. They can be degraded by metalloproteinases (MMPs), which reduces the strength of the bonding system and dentin. The shrinkage of the restorative material associated with its polymerization can cause bacterial leakage, dentin hypersensitivity and discolouration of the filling margins. With time, the degradation of the bonding resin is observed as loss of retention or the reduction of adhesion strength. A clinical review of various bonding systems used in Black class V cavities demonstrated the highest rate of retention loss in the examined teeth within five years of the use of self-etching systems; better results were achieved after the use of a two- or three-step adhesive system with etching. Glass-ionomer fillings demonstrated the highest clinical efficacy. Due to the problems discussed above fillings often need to be replaced (9).

The connection of bonding systems to the dentin matrix is an important topic since research shows that it deteriorates over time. This is due to the effect of multiple physical and chemical factors on the zone of adhesion. These include chewing forces and repeated expansion,

i chemicznych. Wśród nich wymienić należy siły żucia, powtarzalną ekspansję, naprężenia i skurcze spowodowane zmianami temperatury w jamie ustnej (10-17). Zjawiska te prowadzą do degradacji nieosłoniętych włókien kolagenowych, elucji monomerów, będących składnikiem żywicy, i rozkładu jej komponentów (18, 19). W dolnej części warstwy hybrydowej, niezależnie od rodzaju zastosowanego systemu wiążącego, pozostają niechronione i podatne włókna kolagenowe, które mogą ulec hydrolizie przez endogenne enzymy zwane metaloproteinazami (MMPs) (20-22).

MMPs są zamykane wewnątrz zmineralizowanej zębiny w trakcie rozwoju zęba. Mogą hydrolizować składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (23-25). Odgrywają znaczącą rolę w procesach fizjologicznych, takich jak rozwój i przebudowa zębiny – dentinogeneza (26, 27). Ich udział odnotowuje się również w przebiegu różnych procesów patologicznych. Wiele metaloproteinaz, w szczególności żelatynazy i MMP-1, zostały powiązane z angiogenezą (28). Zwiększoną aktywność MMPs odnotowuje się w chorobach jamy ustnej, takich jak: zapalenie dziąseł, zapalenie przyzębia, próchnica, zmiany w tkankach okołowierzchołkowych, liszaj płaski czy rak płaskonabłonkowy (29, 30).

RODZAJE METALOPROTEINAZ

Metaloproteinazy należą do grupy enzymów proteolitycznych, które odgrywają istotną rolę w metabolizmie macierzy zewnątrzkomórkowej. Są odpowiedzialne za postęp procesu próchnicowego oraz uszkodzenie zębiny niecałkowicie spenetrowanej przez żywicę łączącą (20, 22). Kolagen jest rozkładany przez kolagenazy, które degradują peptydy między 1/4 a 3/4 długości łańcucha białkowego, a następnie przez żelatynazy, które rozkładają krótsze peptydy (28). Metaloproteinazy są zależne od jonów wapnia i cynku. Mogą być aktywowane w środowisku obojętnym lub nieznacznie zasadowym. W organizmie ludzkim zidentyfikowano 23 metaloproteinazy, które zostały podzielone na 6 grup. Zestawienie metaloproteinaz występujących w organizmie ludzkim zawiera tabela 1.

BUDOWA METALOPROTEINAZ

Metaloproteinazy wytwarzane są przez strukturalne komórki tkanek – odontoblasty, fibroblasty, osteoblasty, jak i przez komórki odczynu zapalnego – makrofagi, limfocyty T, monocyty, granulocyty obojętnochłonne. MMPs zbudowane są z: domeny katalitycznej, prodomeny, domeny hemopeksyny i elastycznego łącznika. Na końcu aminowym MMPs posiadają peptyd sygnałowy i prodomenę. Za działanie proteolityczne enzymu odpowiada domena katalityczna. W jej skład wchodzi jeden jon cynku i zazwyczaj 3 jony wapniowe. W prodomecie wyróżnia się propeptyd odpowiedzialny za utrzymanie enzymu w postaci nieaktywnej. Domena hemopeksyny jest istotna dla właściwego wykrycia substratu. W grupie kolagenaz umożliwia rozpoczęcie procesu trawienia superhelisy kolagenowej (31-33).

stress and shrinkage caused by temperature changes in the oral cavity (10-17). These phenomena lead to the degradation of exposed collagen fibres, elution of resin monomers and breakdown of resin components (18, 19). Regardless of the bonding system used, there are unprotected and vulnerable collagen fibres left in the lower part of the hybrid layer. These fibres can be hydrolyzed by endogenous enzymes called metalloproteinases (MMPs) (20-22).

MMPs are enclosed inside mineralized dentin during the development of the tooth. They can hydrolyze the components of the extracellular matrix (23-25). They play an important role in physiological processes such as the development and restructuring of the dentin – dentinogenesis (26, 27). They have also been observed to be involved in different pathological processes. A number of metalloproteinases, particularly gelatinases and MMP-1 have been linked to angiogenesis (28). An increased activity of MMPs is observed in diseases of the oral cavity such as gingivitis, periodontitis, caries, periapical tissue lesions, lichen planus or squamous cell carcinoma (29, 30).

TYPES OF METALLOPROTEINASES

Metalloproteinases belong to the group of proteolytic enzymes which play an important role in the metabolism of the extracellular matrix. They are responsible for the progression of the caries process and damage to dentin which has not been completely penetrated by the bonding resin (20, 22). Collagen is broken down by collagenases, which degrade peptides between 1/4 and 3/4 of the protein chain length and subsequently by gelatinases, which decompose shorter peptides (28). Metalloproteinases are calcium and zinc ion-dependent. They can be activated in a neutral or slightly basic environment. In the human body 23 metalloproteinases have been identified, which have been divided into 6 groups. Table 1 presents a summary of metalloproteinases found in the human body.

STRUCTURE OF METALLOPROTEINASES

Metalloproteinases are produced by structural tissue cells: odontoblasts, fibroblasts, osteoblasts as well as by inflammatory reaction cells: macrophages, T-cells, monocytes and neutrophils. MMPs are built of a catalytic domain, prodomain, haemopexin domain and a flexible linker. MMPs have a signal peptide and a prodomain at the N-terminus. The catalytic domain is responsible for the proteolytic effect of the enzyme. It is composed of one zinc ion and usually three calcium ions. The prodomain includes a propeptide responsible for keeping the enzyme in an inactive state. The haemopexin domain is important for the correct detection of the substrate. In the case of collagenases it allows for the digestion of the collagen superhelix to be initiated (31-33).

Tab. 1. Zestawienie metalloproteiny występujących w organizmie ludzkim (modyfikacja własna w oparciu o (38))

Grupa metalloproteiny	MMP	Nazwa potoczna	Substrat
kolagenazy	MMP-1	kolagenaza	kolagen typ I, II, III, V, VII, VIII, X
	MMP-8	kolagenaza 2	kolagen typ I, II, III, IV
	MMP-13	kolagenaza 3	kolagen typ I, II, III, IV, V, IX, X, XI, żelatyna, laminan
	MMP-18	kolagenaza 4, Xenopus	kolagen typu I, żelatyna
stromielizyny	MMP-3	stromielizyna 1, proteoglikanaza	elastyna, proglukany, agrekany, żelatyna, proMMP-1, -8, -9
	MMP-10	stromielizyna 2	kolagen typ I, II, III, V
	MMP-11	stromielizyna 3	laminan, inhibitor 1 proteiny, antytrypsyna
żelatynazy	MMP-2	żelatynaza	kolagen typ I, IV, V, VII, X, żelatyna, elastyna
	MMP-9	żelatynaza B	kolagen typ IV, żelatyna, laminan
matrylizyny	MMP-7	matrylizyna, metaloendopeptydaza	kolagen typ IV, glikoproteiny, żelatyna
	MMP-12	elastaza, MME	elastyna
	MMP-26	matrylizyna, endometaza	kolagen typ IV, żelatyna, fibrynogen, fibronektyna, witronektyna, kazeina, proMMP-9
błonowe	MMP-14	MT1-MMP	kolagen typ I, II, III, żelatyna, laminan, agrekany, proMMP-2, -13
	MMP-15	MT2-MMP	kolagen typ I, II, III, żelatyna, proMMP-13
	MMP-16	MT3-MMP	kolagen typ I, II, laminan, proMMP-2, -13
	MMP-17	MT4-MMP	fibronektyna, fibryna, żelatyna
	MMP-24	MT5-MMP	proMMP-2, -13
	MMP-25	MT6-MMP	proMMP-2
nieprzyporządkowane do innych grup	MMP-19	RASI 1	kolagen typ I, IV, żelatyna, fibronektyna, laminina, agrekan, entaktyna, tenascyna
	MMP-20	amelizyna	amelagenina, agrekany
	MMP-21	XMMP	-
	MMP-22	CMMP	żelatyna
	MMP-23	CA-MMP	żelatyna
	MMP-27	CMMP	-
	MMP-28	epilizyna	kazeina

Metalloproteiny syntetyzowane są w postaci proenzymu, a do przestrzeni zewnątrzkomórkowej wyzwalane są jako proenzymy. Aktywacja enzymu następuje przez usunięcie prodomeiny, co odsłania miejsce aktywne MMP. Proces ten przebiega z udziałem enzymów proteolitycznych, trypsyny, plazminy, oksydantów, obniżenia pH, laurylosiarczanu sodu (SDS), chlorku rtęci(II) ($HgCl_2$), glutationu utlenionego i podwyższonej temperatury (34, 35). Schemat budowy poszczególnych grup metalloproteiny zaprezentowano na rycinie 1.

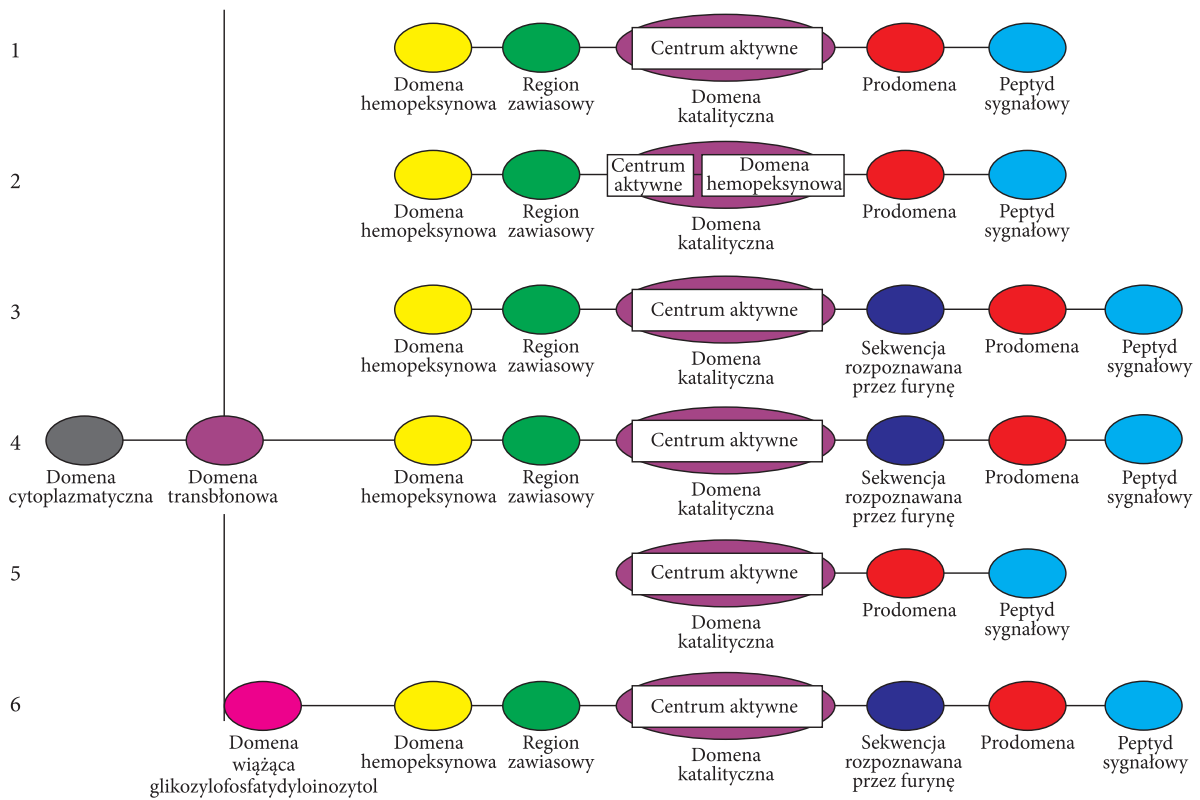
Metalloproteinases are synthesized as pre-proenzymes and released into the extracellular space as proenzymes. The enzyme is activated by removing the prodomain, which exposes the active site of MMP. Proteolytic enzymes, trypsin, plasmin, oxidants, pH decrease, sodium lauryl sulphate (SDS), mercury(II) chloride ($HgCl_2$), oxidized glutathione and elevated temperature are involved in this process (34, 35). The structure of the different groups of metalloproteinases is presented on figure 1.

Tab. 1. Types of metalloproteinases present in the human body (own modification based on (38))

Group of metalloproteinases	MMP	Popular name	Substrate
collagenases	MMP-1	collagenase	type I, II, III, V, VII, VIII, X collagen
	MMP-8	collagenase 2	type I, II, III, IV collagen
	MMP-13	collagenase 3	type I, II, III, IV, V, IX, X, XI collagen, gelatine, laminan
	MMP-18	collagenase 4, Xenopus	type I collagen, gelatine
stromelysins	MMP-3	stromelysin 1, proteoglycanase	elastin, proglycans, aggrecans, gelatine, proMMP-1, -8, -9
	MMP-10	stromelysin 2	type I, II, III, V collagen
	MMP-11	stromelysin 3	laminan, proteinase inhibitor 1, antitrypsin
gelatinases	MMP-2	gelatinase	type I, IV, V, VII, X collagen, gelatine, elastin
	MMP-9	gelatinase B	type IV collagen, gelatine, laminan
matrilysins	MMP-7	matrilysin, metaloendopeptidase	type IV collagen, glycoproteins, gelatine
	MMP-12	elastase, MME	elastin
	MMP-26	matrilysin, endometase	type IV collagen, gelatine, fibrinogen, fibronectin, vitronectin, casein, pro-MMP-9
membrane MMPs	MMP-14	MT1-MMP	type I, II, III collagen, gelatine, laminan, aggrecans, proMMP-2, -13
	MMP-15	MT2-MMP	type I, II, III collagen, gelatine, proMMP-13
	MMP-16	MT3-MMP	type I, II collagen, laminan, proMMP-2, -13
	MMP-17	MT4-MMP	fibronectin, fibrin, gelatine
	MMP-24	MT5-MMP	proMMP-2, -13
	MMP-25	MT6-MMP	proMMP-2
MMPs not classified under any other group	MMP-19	RASI 1	type I, IV collagen, gelatine, fibronectin, laminin, aggrecan, entactin, tenascin
	MMP-20	enamelysin	amelagenin, aggrecans
	MMP-21	XMMP	-
	MMP-22	CMMP	gelatine
	MMP-23	CA-MMP	gelatine
	MMP-27	CMMP	-
	MMP-28	epilysin	casein

Najważniejszą funkcją metaloproteinaz jest degradacja białek macierzy pozakomórkowej. Regulacja działania MMPs polega na utrzymywaniu w równowadze ekspresji i syntezy enzymu oraz hamowania endogennego (36).

The most important function of metalloproteinases is the degradation of the extracellular matrix proteins. The regulation of MMPs involves maintaining a balance between enzyme expression and synthesis and endogenous inhibition (36).



Ryc. 1. Schemat budowy enzymów z rodziny metaloproteinaz (modyfikacja własna w oparciu o (39))

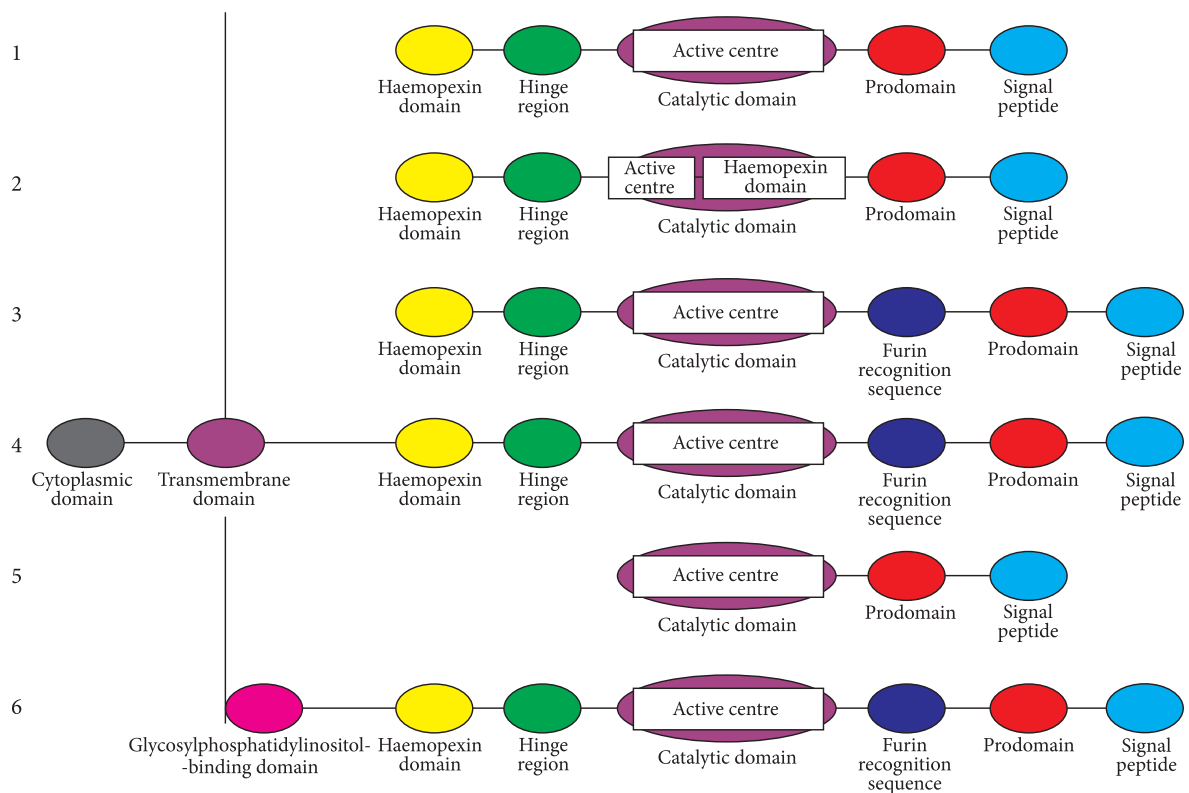


Fig. 1. Diagram of the metalloproteinases structure (own modification based on (39))

SYSTEMY ADHEZYJNE

Do połączenia złożonego materiału odtwórczego z tkankami zęba niezbędne jest użycie systemu adhezyjnego. Obecnie dostępnych jest kilka ich generacji – od IV do VIII.

Przy użyciu systemów IV generacji następują całkowite usunięcie warstwy mazistej i modyfikacja odsłoniętej powierzchniowej warstwy zębiny. Systemy te składają się z dwóch składników – primera i żywicy. Po całkowitym, jednoczesnym wytrawieniu kwasem fosforowym szkliwa i zębiny stosuje się primer. Jego użycie prowadzi do demineralizacji powierzchniowej warstwy zębiny z pozostawieniem włókien kolagenowych. Następnym etapem pracy jest aplikacja żywicy łączącej. W wyniku zastosowanych procedur dochodzi do powstania warstwy hybrydowej. W przypadku systemów IV generacji osiąga się siłę wiązania do zębiny rzędu 17-25 MPa. Rzadziej obserwuje się wrażliwość pozabiegową. Konieczna jest kontrola wilgotności tkanek zęba. Nadmierne wysuszenie powoduje zapadanie włókien kolagenowych i utrudnioną penetrację primera, z kolei zwiększona wilgotność przyczynia się do rozdzielenia składników primera i utrudnia polimeryzację.

Systemy V generacji to tzw. systemy jednobutelkowe. Zawierają połączony primer i bond. Podobnie jak systemy IV generacji, wymagają wcześniejszego trawienia tkanek zęba. Ich siła wiązania przekracza 20 MPa.

Systemy VI generacji są samotrawiące. Wyróżniamy dwa typy: pierwszy zawiera dwa składniki – kwaśny primer i czynnik adhezyjny, drugi składa się z jednej lub dwóch butelek – kwaśny primer i czynnik adhezyjny miesza się przed aplikacją. Drugi typ systemów samotrawiących jest niekompatybilny z kompozytami chemoutwardzalnymi. W systemach samotrawiących obserwuje się niedostateczne wiązanie do niewypręparowanego szkliwa.

Systemy VII generacji to uproszczona wersja VI generacji. Są jednoskładnikowe i należy je nakładać w kilku warstwach. Stosuje się je do naprawy uzupełnień protetycznych oraz uszczelniania bruzd. Są niekompatybilne z kompozytami chemoutwardzalnymi.

W systemie VIII generacji system jest zawarty w materiale wypełniającym. Pierwszym systemem tego typu był samoadhezyjny półpłynny kompozyt Vertise Flow. Po opracowaniu ubytku należy rozprowadzić i utwardzić jego pierwszą warstwę. Jako kolejne warstwy można używać tego samego materiału lub zastosować inny kompozyt. Prawdziwym przedstawicielem tej grupy jest Futurabond DC – samowytrawiający, podwójnie utwardzalny system adhezyjny o uniwersalnym zastosowaniu. Jego siła wiązania z tkankami zęba wynosi 30 MPa (37).

AKTYWACJA METALOPROTEINAZ

Do aktywacji MMP niezbędne są jony metali, takie jak wapń i cynk. Większość MMPs jest syntetyzowana i uwalniana przez odontoblasty jako proenzymy. Wymagają one aktywacji z udziałem kłucza cysteinowego. Proces ten może się odbywać w środowisku o niskim pH, w którym dochodzi

ADHESIVE SYSTEMS

An adhesive system is essential for connecting a composite restorative material to dental tissues. Currently a few generations of adhesive systems are available: from the 4th to the 8th.

The use of the 4th generation systems involves complete removal of the smear layer and modification of the exposed surface layer of the dentin. These systems include two components: a primer and resin. Following complete, simultaneous etching of the enamel and dentin with phosphoric acid, a primer is used. It leads to the demineralization of the surface layer of the dentin with collagen fibres being preserved. The next step of dental work is the application of bonding resin. As a result of these procedures a hybrid layer is formed. In the case of the 4th generation systems 17-25 MPa dentin bond strength is achieved. Post-operative sensitivity is observed less frequently. Dental tissue moisture level needs to be controlled. Excessive drying causes depression of collagen fibres and makes primer penetration more difficult; however, increased moisture contributes to the separation of primer components and hampers polymerization.

The 5th generation systems are the so-called one-bottle systems. They contain combined primer and bond. As in the case of the 4th generation systems, they require prior etching of dental tissues. Their bond strength exceeds 20 MPa.

The 6th generation systems are self-etching. There are two types of these systems. The first one includes two components: an acidic primer and adhesive agent and the second one includes one or two bottles: an acidic primer and adhesive agent which are mixed before application. The second type of self-etching systems is incompatible with chemically cured composites. With self-etching systems insufficient bonding to unprepared enamel is observed.

The 7th generation systems are a simplified version of the 6th generation systems. They are single-component systems and should be applied in a few layers. They are used for the repair of prosthetic restorations and for sealing crevices. They are incompatible with chemically cured composites.

An 8th generation system is contained in the filling material. The first system of this type was a self-adhering, flowable composite Vertise Flow. After preparing a cavity the first layer should be applied and cured. For the next layers the same material or another composite can be used. A real representative of this group is Futurabond DC: a self-etching, dual-cured adhesive system with a universal use. Its strength of bonding with dental tissues is 30 MPa (37).

ACTIVATION OF METALLOPROTEINASES

Ions of metals such as calcium and zinc are essential for the activation of metalloproteinases. The majority of MMPs are synthesized and released by odontoblasts as proenzymes. They require activation involving a cysteine key. This process can take place in a low-pH environment,

do modyfikacji konformacji propeptydu i pobudzenia klucza cysteinowego. Spadek pH może być inicjowany aktywnością metaboliczną bakterii próchnicotwórczych – produkcją mleczanów, które aktywują autogenne proenzymy obecne w zębiny objętej procesem próchnicowym. Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej przez aktywne MMPs rozpoczyna się po neutralizacji pH przez system buforowy śliny (27, 38).

MMPs mogą być aktywowane również przez inne proteazy, które usuwając prodomenę, odsłaniają aktywne miejsce enzymu.

W MMPs strefa wiązania kolagenu jest zlokalizowana w rejonie katalicznego miejsca wiązania. MMP-1 i MMP-21 oraz wszystkie błonowe MMPs mogą być aktywowane w komórce w aparacie Golgiego. MMP-2 jest natomiast aktywowana przez transbłonowe MMPs (MT-MMPs).

Aktywacja autogennych MMPs następuje przy udziale kwaśnych składników systemów wiążących. Kwasy są odpowiedzialne za aktywację MMPs pochodzących z zębiny. Lehmann i wsp. wykazali, że ekspresja MMP-2 i proMMP-9 w kompleksie miążgowo-zębinowym wzrosła po aplikacji systemu samowytrawiającego podczas rekonstrukcji ubytku próchnicowego. W usuniętych trzecich zębach trzonowych zbadano radiologicznie objętość miążgi zębów. Wypreparowano ubytki na powierzchni żującej zębów. Następnie podzielono zęby na dwie grupy: w pierwszej zastosowano system samowytrawiający, a w drugiej, kontrolnej grupie, nie użyto systemu wiążącego. W obydwu grupach zastosowano materiał kompozytowy typu *flow*. Przy użyciu przeciwciał badano obecność metaloпротеиназ. Oceniano również ich aktywność przy użyciu zymografii, metody Western Blotting i analizy densytometrycznej. Wykazano, że źródłem endogennych metaloпротеиназ, oprócz zębiny, mogą być także odontoblasty (40-43).

Systemy samotrawiące (o pH 1,5-2,7), aktywując duże ilości latentnych postaci MMPs, mogą powodować degradację żywic łączących. Aplikacja kwaśnych primerów czy systemów łączących z kwaśnymi monomerami sprzyja aktywacji MMPs. Prowadzi to do 14-15-krotnego wzrostu miana aktywnych MMPs (41, 42). W związku z tym, włókna kolagenowe w warstwie zębiny pokrytej systemem łączącym, niewysyczone w całości systemem adhezyjnym, z obecnymi pustymi przestrzeniami, są podatne na proteolityczną degradację (43).

Wykazano również, że na stopień aktywacji MMPs wpływa poziom pH. Niskie pH aktywuje metaloпротеиназы. Istnieje również korelacja pomiędzy wartością pH a aktywnością żelatynaz. Aktywność kolagenaz w zmineralizowanej zębiny, wytrawionej przez okres 15 sek. 37% kwasem fosforowym, była zmniejszona o 65%. Niskie pH kwasu fosforowego, oprócz demineralizacji zębiny i aktywacji MMPs, może też prowadzić do denaturacji samych enzymów. Wiele systemów samotrawiących posiada pH w zakresie 1-2. Poziom ten jest niewystarczający do denaturacji MMPs, ale może powodować aktywację ich form

in which a propeptide conformation is modified and a cysteine key is activated. A decrease in pH can be initiated by the metabolic activity of cariogenic bacteria. It involves the production of lactates which activate autogenous proenzymes present in the dentin affected by caries. The degradation of the extracellular matrix by active MMPs starts after the neutralization of pH by the saliva buffer system (27, 38).

MMPs can also be activated by other proteases, which expose the active site of the enzyme by removing the prodomain.

In MMPs the collagen binding site is located in the area of the catalytic binding site. MMP-1 and MMP-21 as well as all membrane MMPs can be activated in the cell in the Golgi apparatus. MMP-2 is activated by membrane-type MMPs (MT-MMPs).

Autogenous MMPs are activated by acidic components of bonding systems. Acids are responsible for activating dentin-derived MMPs. Lehmann et al. demonstrated that the expression of MMP-2 and proMMP-9 in the pulp-dentin complex increased upon the application of a self-etching system during the reconstruction of a carious cavity. The volume of the dental pulp was radiologically examined in extracted third molars. Cavities on the occlusal surface of the teeth were prepared. Subsequently, the teeth were divided into two groups: in the first one a self-etching system was used and in the other one, the control group, no bonding system was used. In both groups a flow composite material was used. The presence of metalloproteinases was tested using antibodies. Their activity was also assessed using zymography, Western Blotting and densitometry analysis. It has been demonstrated that apart from dentin, odontoblasts can also be the source of endogenous metalloproteinases (40-43).

Self-etching systems (with a pH of 1.5-2.7) can cause degradation of bonding resins by activating large amounts of latent MMPs. The application of acidic primers or bonding systems with acidic monomers is conducive to the activation of MMPs. It leads to a 14-15-fold increase in the titre of active MMPs (41, 42). As a result, collagen fibres in the layer of the dentin covered with the bonding system which are not completely impregnated with the adhesive system and are surrounded by empty spaces are prone to proteolytic degradation (43).

It has also been demonstrated that the level of MMP activation is affected by the pH level. Low pH activates metalloproteinases. There is also a correlation between the pH value and gelatinase activity. The activity of collagenases in mineralized dentin etched for 15 s using 37% phosphoric acid was reduced by 65%. Low pH of phosphoric acid, apart from demineralization of the dentin and activation of MMPs, can lead to the denaturation of the enzymes themselves. The pH of many self-etching systems is within the range of 1-2. This level is insufficient for the denaturation of MMPs themselves, but can lead to the activation of their latent forms.

latentnych. Zainicjowana tym samym degradacja kolagenu prowadzi do zmniejszenia siły wiązania żywicy łączącej z tkankami zęba (19, 41, 43).

Kwas fosforowy może zmniejszać aktywność MMPs ze względu na swoje niskie pH, lecz aplikacja samotrąwiącego systemu adhezyjnego może ponownie uaktywnić MMP obecne w zębinie (20). To wyjaśnia, dlaczego degradacja warstwy hybrydowej jest obserwowana po użyciu samotrąwiających systemów adhezyjnych w warunkach *in vivo* i *in vitro* (42).

Wiele czynników wpływa na wytrzymałość wypełnień. Do najistotniejszych zaliczamy: aplikacje samotrąwiających systemów wiążących, niewystarczającą infiltrację (pokrycie powierzchni zębiny systemem adhezyjnym), niepełną polimeryzację, degradację elementów żywicy oraz wysoką przepuszczalność powierzchni pokrytych żywicą (11-14, 44).

PODSUMOWANIE

Metaloproteinazy to enzymy proteolityczne, hydrolizujące składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, biorące udział w rozwoju i przebudowie zębiny. Ich zwiększona aktywność jest wykrywana w przebiegu chorób jamy ustnej, takich jak: zapalenie dziąseł, próchnica, zmiany w tkankach okołowierzchołkowych, liszaj płaski, rak płaskonabłonkowy.

MMPs mogą być aktywowane w środowisku o niskim pH, natomiast degradacja tkanek z ich udziałem odbywa się dopiero po neutralizacji pH środowiska jamy ustnej przez system buforowy śliny. Aktywacja MMPs może być również inicjowana przez proteazy, tripsyny, plazminy, oksydanty, laurylosiarczan sodu (SDS), chlorek rtęci(II) $HgCl_2$, utleniony glutation czy podwyższoną temperaturę.

Aktywne metaloproteinazy hydrolizują odsłonięte włókna kolagenowe zębiny. Prowadzi to do degradacji żywic łączących i zmniejszenia adhezji wypełnienia. MMPs mają zatem istotny wpływ na trwałość systemów wiążących, a co za tym idzie trwałość stomatologicznych rekonstrukcji tkanek zęba. Nowoczesne systemy wiążące powinny zapewnić trwałe połączenie materiału wypełniającego z tkankami zęba. Kontynuacja badań w zakresie tworzenia i wykorzystania skutecznych inhibitorów MMPs może być źródłem nowych rozwiązań w stomatologii adhezyjnej.

In this way degradation of collagen is initiated, which leads to a decrease in the strength of connection between the bonding resin and dental tissues (19, 41, 43).

Phosphoric acid can reduce MMP activity due to its low pH; however, the application of a self-etching adhesive system can reactivate MMPs present in the dentin (20). This explains why the degradation of the hybrid layer has been observed following the use of self-etching adhesive systems in *in vivo* and *in vitro* studies (42).

There are a number of factors affecting the durability of restorations. The most important ones include the application of self-etching bonding systems, insufficient infiltration (coating of the dentin surface with an adhesive system), incomplete polymerization, degradation of resin components and high permeability of resin-coated surfaces (11-14, 44).

CONCLUSIONS

Metalloproteinases are proteolytic enzymes which hydrolyze the components of the extracellular matrix and take part in the development and restructuring of the dentin. Their increased activity is detected in oral cavity diseases such as gingivitis, caries, periapical tissue lesions, lichen planus or squamous cell carcinoma.

MMPs can be activated in a low-pH environment, while the degradation of tissues in which they are involved occurs only after the pH of the oral cavity is neutralized by the saliva buffer system. The activation of MMPs can also be initiated by proteases, trypsin, plasmin, oxidants, sodium lauryl sulphate (SDS), mercury(II) chloride ($HgCl_2$), oxidized glutathione and elevated temperature.

Active metalloproteinases hydrolyze exposed collagen fibres of the dentin. This leads to the degradation of bonding resins and reduction of the restoration's adhesion. Thus, MMPs have a significant influence on the durability of bonding systems and, consequently, dental tissue reconstruction. Modern bonding systems should ensure a durable connection between the restorative material and dental tissues. The continuation of research on the creation and use of effective MMP inhibitors may be the source of new solutions in adhesive dentistry.

KONFLIKT INTERESÓW CONFLICT OF INTEREST

Brak konfliktu interesów
None

PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

1. Chaussain C, Boukpepsi T, Khaddam M et al.: Dentin matrix degradation by host-matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration. *Front Physiol* 2013; 4(308): 1-7.
2. Konopka Ł, Brzezińska-Błaszczyk E: Rola metaloproteinaz w chorobach jamy ustnej – nowe możliwości terapii. *Dent Med Probl* 2008; 45(3): 229-235.
3. Goldberg M, Takagi M: Dentine proteoglycans: composition, ultrastructure and functions. *Histochem J* 1993; 25(11): 781-806.
4. Linde A, Goldberg M: Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(5): 679-728.
5. Breschi L, Perdigão J, Gobbi P et al.: Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etched dentin. *J Biomed Mater Res* 2003; 4(66A): 764-769.

ADRES DO KORESPONDENCJI
CORRESPONDENCE

*Aneta Zduniak

Zakład Stomatologii Zachowawczej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Miodowa 1, 00-246 Warszawa
tel. +48 504-134-792
aneta.zduniak@gmail.com

6. Breschi L, Prati C, Gobbi P et al.: Immunohistochemical analysis of collagen fibrils within the hybrid layer: a FEISEM study. *Oper Dent* 2004; 29(5): 538-546.
7. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M: The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent* 1997; 25(6): 441-458.
8. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E: The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982; 16(3): 265-273.
9. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J et al.: Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dent Mater* 2005; 21(9): 864-881.
10. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M et al.: A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005; 84(2): 118-132.
11. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PNR et al.: Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, *in vivo*. *J Dent Res* 1999; 78(4): 906-911.
12. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M et al.: *In vivo* degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res* 2000; 79(6): 1385-1391.
13. Hashimoto M, Ohno H, Sano H et al.: Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res* 2002; 63(3): 306-311.
14. Takahashi A, Inoue S, Kawamoto C et al.: *In vivo* long-term durability of the bond using two adhesive systems. *J Adhes Dent* 2002; 4(2): 151-159.
15. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M et al.: *In vitro* degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials* 2003; 24(21): 3795-3803.
16. Hashimoto M, Sano H, Yoshida E et al.: Effects of multiple adhesive coatings on dentin bonding. *Oper Dent* 2004; 29: 416-423.
17. Yang B, Adelung R, Ludwig K et al.: Effect of structural change of collagen fibrils on the durability of dentin bonding. *Biomaterials* 2005; 26(24): 5021-5031.
18. Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH, Robinson SJ: Current concepts on adhesion to dentin. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 81(3): 306-335.
19. Finer Y, Santerre JP: Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res* 2004; 83(1): 22-26.
20. Pashley DH, Tay FR, Yiu C et al.: Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83(3): 216-221.
21. Carrilho MRO, Carvalho RM, Goes MF et al.: Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. *J Dent Res* 2007; 86(1): 90-94.
22. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T et al.: The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998; 77(8): 1622-1629.
23. van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J et al.: Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen *in situ*. *Caries Res* 2003; 37: 58-65.
24. Brinckerhoff CE, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(3): 207-214.
25. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM: The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Oral Biol* 2000; 45(9): 757-765.
26. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M et al.: The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res* 2001; 80(6): 1545-1549.
27. Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8): 827-839.
28. Handsley MM, Edwards DR: Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2005; 115(6): 849-860.
29. Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. *J Cutan Pathol* 2001; 28(2): 72-82.
30. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S: The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 2006; 85(1): 22-32.
31. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR: Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res* 2007; 86(5): 436-440.
32. Maskos K: Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* 2005; 87(3-4): 249-263.
33. Murphy G, Allan JA, Willenbrock F et al.: The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J Biol Chem* 1992; 267(14): 9612-9618.
34. Nagase H: Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378(3-4): 151-160.

35. Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(3): 161-174.
36. Hartung HP, Kieseier BC: The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 2000; 107(2): 140-147.
37. Jańczuk Z, Kaczmarek U, Lipski M: Stomatologia zachowawcza z endodoncją. Zarys kliniczny. Wyd. 4. PZWL, Warszawa 2014: 67-69.
38. Lipka D, Boratyński J: Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Post Hig Med Dosw* 2008; 62: 328-336.
39. Jung P, Zimowska M: Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej w rozwoju, fizjologii i procesach degeneracyjnych mięśni szkieletowych. *Postępy Biochemii* 2016; 62(1): 25-35.
40. Lehmann N, Debret R, Roméas A et al.: Self-etching increases matrix metalloproteinase expression in the dentin-pulp complex. *J Dent Res* 2009; 88(1): 77-82.
41. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y et al.: Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006; 27(25): 4470-4476.
42. 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(2): 160-166.
43. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A et al.: Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008; 24(1): 90-101.
44. Perdigo J, Lambrechts P, Van Meerbeek B et al.: Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dent Mater* 1996; 12(4): 262-271.

nadesłano/submitted:

19.10.2017

zaakceptowano do druku/accepted:

15.11.2017