

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. M. Hannig)

**Experimentelle Untersuchung zum Nachweis und zur
Modifikation der enzymatischen Aktivität von
Matrix- Metalloproteinasen im Dentin**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von: Michel Alai-Omid

geb. am: 19.12.1975 in Kiel

Tag der Promotion:

Dekan: Univ.-Professor Dr. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Univ.-Professor Dr. Matthias Hannig

2. Berichterstatter:

Meinen Eltern und Stiefeltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Abstract.....	1
2. Einleitung.....	5
2.1 Einführung in das Thema.....	5
2.2 Matrix- Metalloproteinasen.....	5
2.3 Matrix- Metalloproteinasen im Dentin.....	10
2.4 Zur Bedeutung von MMPs in der Adhäsiven Zahnheilkunde	12
2.5 Inhibitoren der Enzymaktivität von MMPs	13
2.6 Fragestellungen	14
3. Material und Methodik	19
3.1 Messung der Enzymaktivität mit dem EnzCheck-System.....	19
3.2 Vorbereitungen des Dentins für die Versuche	20
3.3 Vorversuche.....	21
3.3.1 Verwendung eines Dentinpools.....	21
3.3.2 Ermittlung der Dentinpartikelgröße.....	21
3.3.3 Festlegung der Substratmenge	23
3.3.4 Festlegung der Inkubationszeit	24
3.3.5 Festlegung der Dentinmenge	25
3.3.6 Festlegung des Substrates.....	26
3.3.7 Vergleich der gelatinolytischen Aktivität zwischen schockgefrorenem und sofort aufbereitetem Dentinpulver	28
3.4 Hauptversuche.....	29
3.4.1 Prinzipieller Versuchsablauf eines Inhibitorentestes	29
3.4.2 Darstellung der Versuchsreihen des Hauptversuches.....	30
3.4.3 Verwendete Effektoren und deren Konzentrationen in der Übersicht... ..	32
3.4.4 Kontrollversuche zur Eigenfluoreszenz der am Versuchssystem beteiligten Substanzen	32
3.5 Statistische Analyse der Versuchsergebnisse	33

4. Ergebnisse	34
4.1 Ergebnisse der Versuchsreihe 1	34
4.2 Ergebnisse der Versuchsreihe 2	36
4.3 Ergebnisse der Versuchsreihe 3	37
4.4 Ergebnisse der Versuchsreihe 4	38
4.5 Ergebnisse der Versuchsreihe 5	40
4.6 Übersichtsgrafik der Enzymaktivität im Dentin nach Anwendung der verschiedenen Effektoren und statistische Analyse	41
5. Diskussion	43
5.1 Diskussion von Material und Methodik.....	43
5.1.1 Herkunft der Dentinproben	43
5.1.2 Verwendung von partikulärem Dentin	43
5.1.3 Einrichtung eines Dentinpools.....	43
5.1.4 Kontrollansätze zur Prüfung der Eigenfluoreszenz	44
5.1.5 Zum Nachweis der Enzymaktivität im Dentin	44
5.1.6 Verwendung von Gelatine als Substrat für die Hauptversuche	45
5.1.7 Festlegung der Inkubationszeit des Dentins mit der Gelatine	46
5.1.8 Festlegung der Inkubationszeit des Dentins mit dem Effektor.....	46
5.1.9 Festlegung der Dentinmenge für den Hauptversuch.....	47
5.2 Diskussion der Ergebnisse	47
5.2.1 Diskussion der Versuchsreihe 1	47
5.2.2 Diskussion der Versuchsreihe 2	50
5.2.3 Diskussion der Versuchsreihe 3	51
5.2.4 Diskussion der Versuchsreihe 4	53
5.2.5 Diskussion der Versuchsreihe 5	54
5.3 Schlußfolgerungen.....	56
6. Literaturverzeichnis	58
7. Danksagung	70
8. Lebenslauf.....	72

1. Zusammenfassung / Abstract

Bei den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) handelt es sich um eine Gruppe von zinkabhängigen Endopeptidasen, die in der Lage sind, die organische Matrix im Dentin zu degradieren.

Jüngste Untersuchungen deuten daraufhin, dass MMPs stärker als bisher angenommen in Degradationsprozesse sowohl bei der Dentinkaries als auch bei der Wurzelkaries involviert sind. Möglicherweise sind diese kariösen Degradationsprozesse als eine intrinsische Abwehrleistung des Individuums zu verstehen. Die Beteiligung von MMPs an der Degradation von freigelegten, demineralisierten Kollagenfibrillen im Dentin ist auch von Bedeutung für adhäsiv verankerte Restaurationen, da man vermutet, dass die MMPs den Haftverbund zwischen der organischen Matrix des Dentins und den adhäsiven Füllungen enzymatisch schwächen.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen, die kollagenolytische / gelatinolytische Aktivität von MMPs im Dentin nachzuweisen. Zum anderen sollte die Möglichkeit einer Modifikation der gelatinolytischen Aktivität durch den Einsatz von Effektoren untersucht werden.

Dazu wurde Dentinpulver von humanen, kariesfreien Weisheitszähnen verwendet. Der Nachweis der kollagenolytischen / gelatinolytischen Aktivität erfolgte mit dem EnzCheck-System. Dazu wurde das Dentinpulver mit einem fluoreszenzmarkierten Substrat (Kollagen oder Gelatine) für zwei Stunden inkubiert, welches von den im Dentin befindlichen MMPs umgesetzt wird. Daraufhin erfolgte die Messung der fluoreszierenden Spaltprodukte in einem Fluoreszenzdetektor. Die Messwerte wurden in „Relativen Fluoreszenzeinheiten“ (RFU) angegeben.

Die Analyse der Messergebnisse zeigte eindeutig eine kollagenolytische / gelatinolytische Aktivität im Dentin. Bei den Untersuchungen zur Modifikation der gelatinolytischen Aktivität wurde das Dentinpulver zunächst mit verschiedenen Effektoren (Chlorhexidin, Natriumdodecylsulfat, Etylendiamintetraacetat, Natriumfluorid, Tetracyclin-Hydrochlorid, Tanninsäure, dentaler Primer) behandelt und dann mit dem fluoreszenzmarkierten Substrat zusammengebracht.

Anschließend erfolgte die Messung der kollagenolytischen / gelatinolytischen Aktivität in einem Fluoreszenzdetektor.

Durch den Einsatz der verschiedenen Effektoren konnte nachgewiesen werden, dass eine Modifikation der gelatinolytischen Aktivität sowohl im Sinne einer Stimulation als auch einer Reduktion möglich ist. Besonders der Effektor Tanninsäure zeigte eine signifikante Reduktion der gelatinolytischen Aktivität im Dentin. Im Weiteren konnte die in der Literatur beschriebene inhibitorische Wirkung von Chlorhexidin auf die gelatinolytische Aktivität im Dentin bestätigt werden. Aber auch die Anwendung von Tetracyclin-Hydrochlorid und Ethylendiamintetraacetat ergab eine Reduktion der gelatinolytischen Aktivität im Dentin. Fluoridhaltige Präparate zeigten keine Wirkung auf die gelatinolytische Aktivität im Dentin. Nach Anwendung von Bestandteilen eines dentalen Adhäsivsystems oder Natriumdodecylsulfat konnte ein Anstieg der gelatinolytischen Aktivität im Dentin gemessen werden. Die Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass eine Modifikation der gelatinolytischen Aktivität bis hin zu einer Inhibition realisierbar ist.

Weiterhin wurde die Wirkung von ionisierender Strahlung auf die gelatinolytische Aktivität der MMPs untersucht. Nach Anwendung von ionisierender Strahlung ließ sich in der Tendenz eine Erhöhung der gelatinolytischen Aktivität des Dentins nachweisen, welche möglicherweise einen pathogenetisch relevanten Faktor im Krankheitsbild der Strahlenkaries darstellen könnte.

In zukünftigen Arbeiten sollte die Anwendung von Effektoren der MMPs auch unter In-vivo-Bedingungen getestet werden mit dem Ziel der Prävention von MMP-assoziierten Degradationsprozessen, wie Wurzel- oder Dentinkaries. Möglicherweise lassen sich durch den Einsatz dieser Effektoren auch MMP-assoziierte Degradationsprozesse im Rahmen der dentalen Adhäsivtechnik vermeiden, mit dem Ziel, die Langzeitergebnisse von adhäsiv befestigten Füllungen zu verbessern.

Abstract

Detection and modification of the enzymatic activity of matrix-metalloproteinases in dentin – An experimental investigation.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of zinc depending endopeptidases which are able to degrade the organic matrix in dentin. Recent studies indicate that MMPs are involved in proteolytic degradation processes taking place in dentinal and root caries. These carious degradation processes could be understood as an intrinsic defense mechanism of the individual. MMP-induced degradation of the demineralised collagenic fibrils in dentin is also of relevance for the longevity of adhesive restorations. The presumption is that MMPs degrade enzymatically the adhesive bond at the resin-dentin interface. The aim of the present study was to detect the collagenolytic / gelatinolytic activity of MMPs in human dentin. Furthermore the possibility to modify the gelatinolytic activity by the use of effectors was investigated. Dentin powder of human caries free molars was used. For detection of collagenolytic / gelatinolytic activity in dentin powder the EnzCheck-system was used. Dentin powder was incubated for two hours with a fluorescent substrate (gelatine). This substrate was degraded by the MMPs in dentin. Subsequently, measurement of the fluorescent cleavage products took place in a fluorescence detector. The data were displayed in “relative fluorescent units” (RFU). The analysis of the data demonstrated definitely collagenolytic / gelatinolytic activity in dentin.

In order to investigate modifying effects on the gelatinolytic activity, dentin powder was first incubated with different effectors (chlorhexidine, sodiumdodecylsulfate, ethyldiamintetraacetate, tetracycline-hydrochloride, sodiumfluoride, tannic acid and a dental primer) and secondly incubated with a fluorescent marked substrate. Then the gelatinolytic activity was measured with a fluorescence detector. By the use of different effectors it was verified that it is possible to enhance or reduce gelatinolytic activity in dentin. Especially the effector tannic acid caused a significant reduction of gelatinolytic activity in dentin powder. Furthermore, the established effect of chlorhexidine to inhibit the gelatinolytic activity in dentin could be confirmed. The use of tetracycline-hydrochloride and ethyldiamintetraacetate resulted in a reduction of the gelatinolytic activity in dentin. The application of

components of a dental adhesive system or sodiumdodecylsulfate caused an increase of the gelatinolytic activity in dentin. The conclusion was that a modification and inhibition of gelatinolytic activity in dentin is possible. Furthermore the effect of ionizing radiation on the gelatinolytic activity in human dentin was investigated. The use of ionizing radiation revealed an increase of gelatinolytic activity. This could be a pathogenetically relevant factor concerning the clinical aspect of radiation induced caries.

In further studies the use of these effectors must be investigated also in vivo, with the aim to prevent MMP associated degradation processes and, thus, to improve the longevity of adhesive restorations.

2. Einleitung

2.1 Einführung in das Thema

Matrix- Metalloproteinasen (MMPs) gehören zu einer Gruppe von zinkabhängigen Endopeptidasen, die in der Lage sind, Proteine der extrazellulären Matrix (EZM), wie z.B. Kollagen, im Gewebe zu degradieren (Tjäderhane et al. 2001, Birkedal-Hansen et al. 1993, Sorsa et al. 2004, Vu et al. 2000). Gross und Lapiere beschrieben 1962 als erste die Existenz einer kollagenolytischen Aktivität im Rahmen der Entwicklung von Kaulquappen.

MMPs sind ubiquitär im Körper vorhanden und involviert in viele physiologische Prozesse des menschlichen Organismus, zum Beispiel im Rahmen der Morphogenese von Organen sowie beim Umbau von Gewebe (Alexander et al. 1996, Miralles et al. 1998, Vu et al. 1998).

Zusätzlich sind MMPs beteiligt an pathologischen Prozessen. Vorgänge wie Wundheilung, Tumorentstehung und Reaktionen nach dem Einsatz von ionisierender Strahlung werden beeinflusst durch eine gesteigerte Expression von MMPs (Lund et al. 1996, Sternlicht et al. 2000, Araya et al. 2001, Väänänen et al. 2001).

Im Bereich der Zahnmedizin liegt das Hauptaugenmerk bezüglich der Matrix-Metalloproteinasen derzeit auf der gesteigerten Expression von MMPs bei Parodontalerkrankungen (Garlet et al. 2004), der Progression der Wurzel- und Dentinkaries (Yang et al. 2006) sowie bei Degradationsprozessen des adhäsiven Verbundes in der Füllungstherapie (Sano et al. 1999, Hashimoto et al. 2002, Tjäderhane et al. 1998).

2.2 Matrix- Metalloproteinasen

Zum Verständnis der enzymatischen Funktion der MMPs sind Kenntnisse ihrer molekularen Struktur erforderlich. Im Folgenden soll ein Überblick über die biochemische Struktur der MMPs gegeben werden.

Alle MMPs weisen gemeinsame strukturelle Komponenten auf (Abb.1). Sie beinhalten eine Signalpeptidsequenz am N-terminalen Ende, auf die eine

Propeptidsequenz folgt. In der Mitte des Enzyms liegt die katalytische Domäne, in die zentral ein Zink-Ion integriert ist. Das Zink-Ion markiert das aktive Zentrum des Enzyms. Eine Scharnierregion verbindet die katalytische Domäne kovalent mit einer Hemopexin ähnlichen Domäne (Visse und Nagase 2003). Diese Scharnierregion ist entscheidend für die Substratspezifität der MMPs.

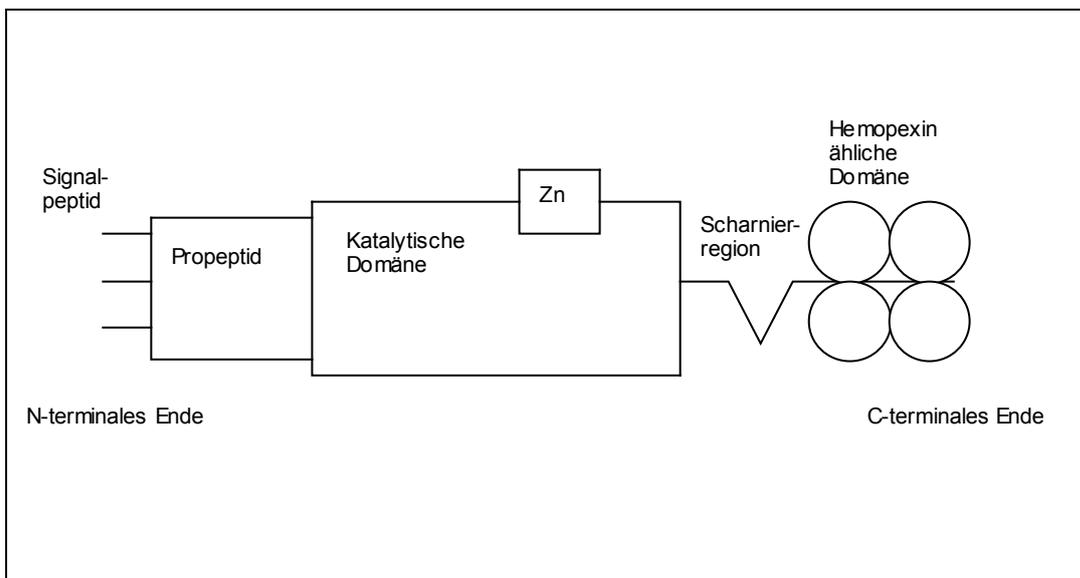


Abb. 1:
Schematische Darstellung eines Pro-MMP-Moleküls

Normalerweise liegen die MMPs in einem inaktiven Zustand vor, den man Zymogen nennt. In dieser Form bezeichnet man sie auch als Pro-MMPs. Die Pro-MMPs besitzen ein Molekulargewicht von circa 90 kD.

Die Aktivierung der MMPs erfordert die Abspaltung der Propeptidsequenz. Dadurch verringert sich das Molekulargewicht um ungefähr 20 kD (Bode et al. 1998).

Die Abspaltung der Propeptidsequenz erfolgt durch proteolytische Enzyme oder Senkung des pH-Werts (<4,5) in der Umgebung (Tjäderhane et al. 1998, Nagase und Woessner 1999). Ihre enzymatische Aktivität entfalten die MMPs jedoch nur in einem pH-neutralen Milieu (van Strijp et al. 2003).

Im inaktiven Zustand interagieren Sulfhydrylgruppen der Signalpeptidsequenz mit dem Zink-Ion der katalytischen Domäne. Die Aktivierung erfordert eine Konformationsänderung des Enzyms durch Aufhebung der Interaktion zwischen dem Zink-Ion und den Sulfhydrylgruppen. An das nun freiliegende Zink-Ion kann

Wasser binden und die Peptidkette eines Substrates kann angegriffen werden (Chaussain-Miller et al. 2006).

Die MMPs werden unterteilt in verschiedene Gruppen. Diese Unterteilung erfolgt nach der Substratspezifität der MMPs. Man unterscheidet die Gruppen Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Transmembran MMPs, Matrilysine und nicht weiter klassifizierte MMPs (Vu et al. 2000, Tjäderhane et al. 2001, Chaussain-Miller et al. 2006). Derzeit klassifiziert man 28 verschiedene MMP-Subgruppen. Die nachfolgende Tabelle (Tab. 1) gibt Aufschluss über die derzeit bekannten MMPs und deren Substratspezifität. Zusätzlich sind die MMPs nach dem EC-Nummernsystem eingeteilt, welches aus vier Zahlen pro Enzym besteht und ein leichteres Auffinden des Enzymcodes gewährleisten soll. Allerdings sind bisher noch nicht alle MMPs in diesen Enzymcodes klassifiziert.

Tabelle 1: Einteilung der Matrix Metalloproteinasen (nach Lynch und Matrisian 2002)

MMP	Alternativname	Substrate	EC-Nummer
MMP-1	Kollagenase-1	Kollagen I-III, VII, X; Gelatine, Proteoglykan, Casein, Aggrecan, Fibronectin	3.4.21.32
MMP-2	Gelatinase A	Kollagen I, III, IV, V, VII, X, XI, XIV; Gelatine, Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Laminin	3.4.24.24
MMP-3	Stromelysin-1	Kollagen III, IV, V, VII, IX, X, XI; Gelatine, Elastin, Aggrecan, Fibronectin	3.4.24.17
MMP-4	nicht definiert		
MMP-5	nicht definiert		
MMP-6	nicht definiert		
MMP-7	Matrilysin	Kollagen I, IV, X; Aggrecan, Fibronectin	3.4.24.23
MMP-8	Kollagenase 2	Kollagen I-III, V, VII, X; Gelatine, Fibronectin, Aggrecan	3.4.24.7

MMP-9	Gelatinase B	Kollagen IV, V, VII, X, XI, XIV; Aggrecan, Fibronectin	3.4.24.35
MMP-10	Stromelysin-2	Kollagen III, IV, V; Aggrecan, Fibronectin	3.4.24.22
MMP-11	Stromelysin-3	Casein	3.4.24.B3
MMP-12	Metalloelastase	Elastin, Fibronectin, Kollagen IV, Laminin, Casein, Vitronectin, Proteoglykan, Aggrecan	3.4.24.65
MMP-13	Kollagenase-3	Kollagen I, II, III, IV, VI, IX, X, XIV; Aggrecan	3.4.24.B4
MMP-14	MT1-MMP	Kollagen I-III, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Proteoglykan, Gelatine, Elastin, Casein, proMMP-2, -9, -13, -20, Aggrecan	3.4.24.80
MMP-15	MT2-MMP	MMP-2, Aggrecan	3.4.24.B5
MMP-16	MT3-MMP	MMP-2, Kollagen III, Gelatine, Casein, Fibronectin, Transglutaminase	
MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogen, Fibrin, proTNF- α	
MMP-18	Kollagenase-4	proMMP-2, Kollagen I	
MMP-19	RASI	Kollagen I, IV; Gelatine, Fibronectin, Laminin, Aggrecan, Entactin, Tenascin	
MMP-20	Enamelysin	Amelogenin, Kollagen XVIII, Gelatine	3.4.24.B6
MMP-21	XMMP	nicht definiert	
MMP-22	CMMP	Gelatine	
MMP-23	CA-MMP	Gelatine	
MMP-24	MT5-MMP	Kollagen I, Gelatine, Fibronectin, Laminin	
MMP-25	MT6-MMP	Kollagen IV, Gelatine, Fibronectin	
MMP-26	Matrilysin-2	Kollagen IV, Fibronectin, Gelatine, Casein	3.4.24.B7
MMP-27	nicht definiert		
MMP-28	Epilysin	Casein	

MMPs schneiden Komponenten der EZM spezifisch in Fragmente. Dabei spalten Kollagenasen ein Protein in ein „ $\frac{3}{4}$ “- und ein „ $\frac{1}{4}$ “- Fragment. Gelatinasen schneiden Proteine in viele kleine Fragmente (Tjäderhane et al. 2001).

Die Expression von MMPs wird über zwei prinzipielle Regulationsmechanismen gesteuert. Der erste Mechanismus umfasst die Steuerung über die Genexpression, der zweite Mechanismus steuert die MMP-Expression über eine Proteinaktivierung (Nuti et al. 2007).

MMPs werden in Osteoblasten, Fibroblasten und Odontoblasten produziert und dann in das umliegende Gewebe sezerniert (Chaussain-Miller et al. 2006). Eine Hauptaufgabe von MMPs ist der Umbau der EZM in Geweben. Da die normale Halbwertszeit von Kollagenfibrillen 30-200 Tage beträgt, unterliegt die EZM einem ständigen Umbau, auch wenn sie nicht durch Verletzungen geschädigt ist (Löffler 2006). Die EZM stellt eine natürliche Grenze für die Zellbewegung dar, aber MMPs sind durch ihre Fähigkeit zur Degradation der EZM in der Lage, an Prozessen wie Zellmigration und Chemotaxis teilzunehmen (Sternlicht et al. 2000). Physiologische Vorgänge, wie Apoptose und Proliferation, werden beeinflusst durch das Zusammenwirken von EZM und Zelle. Durch ihre Fähigkeit, die EZM abzubauen, nehmen MMPs auf diese Vorgänge Einfluss, indem sie auf die normale Interaktion zwischen Zelloberfläche und EZM einwirken (Johnson and Knox 1999).

Liegen physiologische Verhältnisse vor, so halten sich die Prozesse der Aktivierung und der Inhibition von MMPs die Waage. Die Aktivität wird reguliert durch körpereigene Inhibitoren, diese nennt man Tissue Inhibitors of MMP, kurz TIMP (Birkedal-Hansen et al. 1993, Nagase und Woessner 1999, Terp et al. 2001). Derzeit unterscheidet man vier verschiedene TIMP-Moleküle (TIMP 1-4). Diese TIMPs entfalten ihre inhibitorische Wirkung, indem sie mit den MMPs einen Enzym-Inhibitor-Komplex bilden (Verstappen et al. 2006). Dieser Enzym-Inhibitor-Komplex wird in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 gebildet. Im Rahmen verschiedener Erkrankungen, wie z.B. Arthritiden, malignen Tumoren oder bei der Ausbildung von Metastasen, kommt es zu einer überschießenden Produktion von MMPs. Dabei gerät das Verhältnis von MMPs zu TIMPs aus dem Gleichgewicht (Overall et al. 2002), so dass die Enzymaktivität der MMPs überwiegt. Die TIMPs sind dann nicht mehr in der Lage, die MMPs wirksam zu inhibieren (Verstappen et al. 2002). Die Inhibition der MMPs durch die TIMPs erfolgt durch Blockade des Zink-Ions am aktiven Zentrum (Kontogiorgis et al. 2005). Diese Problematik verdeutlicht die Notwendigkeit, nach wirksamen biologischen und synthetischen

MMP-Inhibitoren zu suchen, um so die Aktivität der überschießenden MMP-Produktion zu kompensieren.

Eine weitere pathophysiologische Wirkung der MMPs wird beschrieben bei der Anwendung von ionisierender Strahlung (Yang et al. 2007). Araya et al. (2001) beobachteten als Folge der Bestrahlung eine erhöhte Produktion von MMP-2 im humanen Lungenepithel, wohingegen keine vermehrte Expression von TIMP-Molekülen festgestellt werden konnte. Das hier entstandene Missverhältnis zwischen Enzym und Inhibitor wird für schwerwiegende Komplikationen, wie z.B. die radiogene Pneumonitis, verantwortlich gemacht.

2.3 Matrix- Metalloproteinasen im Dentin

MMPs sind ubiquitär in der Mundhöhle zu finden. Sie sind in Dentin, Odontoblasten, Plaque, Speichel, Sulkusflüssigkeit und kariösen Läsionen nachgewiesen worden (Tjäderhane et al. 2001, v. Strijp et al. 2003, Palossari et al. 2003).

Im Folgenden soll ein Überblick über die Bestandteile und chemische Zusammensetzung der Zahnhartsubstanz, speziell des Dentins, gegeben werden, da für diese Arbeit die im Dentin lokalisierten MMPs von Bedeutung sind.

Die mineralisierte Hartsubstanz Dentin bildet den Hauptanteil des Zahnes. Dentin ist koronal von Schmelz bedeckt, während sich im Bereich der Wurzel das Zahnzement auflagert. In seiner chemischen Zusammensetzung ist Dentin dem Knochen sehr ähnlich, unterscheidet sich jedoch stark vom Schmelz (Eastoe 1967). Der Zahnschmelz enthält zu 98% Hartsubstanz. Dentin hingegen besteht zu 70% aus anorganischem Material, zu 20% aus organischen Bestandteilen und zu 10% aus Wasser. Der Mineralanteil des Dentins enthält im Wesentlichen Kalzium, Phosphat sowie geringe Mengen Karbonat. Die organische Matrix des Dentins besteht zu 91% aus Kollagen und zu 9% aus nicht kollagener Grundsubstanz (Jones und Leaver 1974). Das Kollagen besteht hauptsächlich aus Kollagen I mit einem Anteil von ungefähr 3% Kollagen III (Lindhe und Goldberg 1993).

Daraus resultiert, dass im Dentin diejenigen MMPs von vorrangiger Bedeutung sind, die in der Lage sind Kollagen I zu zersetzen (Tjäderhane et al. 2001, Chaussain-Miller et al. 2006). Hierzu zählen die MMPs 1, 2, 8, 9 und 20, welche

auch im Dentin nachgewiesen worden sind (Lindhe und Goldberg 1993, Sulkala et al. 2002, v. Strijp et al. 2003, Sulkala et al. 2007, Mazzoni et al. 2007).

MMPs werden von Odontoblasten sezerniert, wobei sie an der Mineralisierung des Prädentins beteiligt sein sollen (Palossari et al. 2002, Palossari et al. 2003, Sulkala et al. 2004, Fanchon et al. 2004). Weiterhin wird den MMPs eine Beteiligung an Sklerosierungsprozessen der Tubuli (Sulkala et al. 2002) und der Reizdentinbildung (Tjäderhane et al. 2001) zugesprochen. Im Zuge der Mineralisierung der Zahnhartsubstanz sollen sich die MMPs als „eingeschlossene“ Enzyme im Dentin befinden (Tjäderhane et al. 2001, Martin-De Las Heras et al. 2000). Neuerdings vermutet man, dass eine große Menge von MMPs an der Schmelz-Dentin-Grenze lokalisiert ist (Goldberg et al. 2003). Hier sollen sie an Mineralisationsprozessen des Manteldentins beteiligt sein (Beniash et al. 2006). Die genaue Lokalisation der MMPs innerhalb des Dentins ist noch nicht vollständig geklärt. Über die Wirkungsmechanismen der verschiedenen MMPs ist in den letzten Jahren sehr viel Wissen hinzugewonnen worden, dennoch gibt es hinsichtlich der Aktivität von MMPs im murenen Dentin bisher nur erste orientierende Erkenntnisse (Pashley et al. 2004, Hebling et al. 2005, Nishitani et al. 2006). Insbesondere über die MMP-Aktivität in kariösen Läsionen und die Modifikation der Enzymaktivität ist bisher noch sehr wenig bekannt (Tjäderhane et al. 1998, Sulkala et al. 2001). In den letzten Jahren fand ein Paradigmenwechsel in Bezug auf die Ätiologie dentinkariöser Läsionen statt. Bisher wurden hauptsächlich bakterielle Kollagenasen für die Denaturierung der organischen Matrix des Dentins verantwortlich gemacht (van Houte 1994). Die bakterielle Kollagenase weist jedoch eine deutlich eingeschränkte Aktivität auf, nachdem sie einem pH-Wert Abfall unter pH 4,5 ausgesetzt war (van Strijp et al. 1994, van Strijp et al. 1997), zusätzlich soll die bakterielle Kollagenase nur an der Dentinoberfläche aktiv sein (Katz et al. 1987). Dies führte zu der Vermutung, dass wirtseigene Kollagenasen in einem stärkeren Ausmaß an der Degradation des Dentins beteiligt sind, als man bisher vermutet hat. Man begreift die Dentinkaries eher als autolytischen Prozess, der nach der Demineralisation des Dentins und Freilegung der MMPs stattfindet (Dung et al. 1995).

In der Literatur sind Aktivitätssteigerungen von MMPs in humanen Geweben als Folge einer tumortherapeutischen Bestrahlung nachgewiesen (Araya et al. 2001, Strup-Perrot et al. 2006, Yang et al. 2007), allerdings gibt es keinerlei

Erkenntnisse in der Anwendung von ionisierender Strahlung und deren Wirkung auf MMPs im Dentin. Der Einsatz ionisierender Strahlung im Mund-, Kiefer-, Gesichtsbereich wird unter anderem für das Phänomen der Strahlenkaries verantwortlich gemacht (Grötz et al. 1998). Da die genauen Ursachen der Strahlenkaries bislang nicht im Detail geklärt sind, könnte auch eine radiogen bedingte Zunahme der MMP-Aktivität ein ätiologischer Faktor bei diesem Krankheitsbild sein.

2.4 Zur Bedeutung von MMPs in der Adhäsiven Zahnheilkunde

Dentale Adhäsivsysteme dienen der Haftvermittlung von Dentin und Komposit, indem sie die hydrophile Dentinoberfläche in eine hydrophobe Polymeroberfläche überführen. Dies ermöglicht das Anfügen von Kompositmaterial (Hellwig et al. 2006, van Meerbeek et al. 2005). Selbstätzende Primer sind ebenfalls Bestandteile von dentalen Adhäsivsystemen und dienen zusätzlich der gleichzeitigen Konditionierung von Schmelz und Dentin ohne separate Phosphorsäureätzung. In selbstätzenden Primern sind Ester, bivalente Alkohole mit Methacrylat- und Phosphatresten enthalten (Hannig et al. 1999). Man nimmt an, dass es durch den Kontakt der Säurereste mit den freigelegten Kollagenfibrillen zu einer Aktivierung der wirtseigenen, inaktiven Pro-MMPs im Dentin kommen kann (Pashley et al. 2004, Nishitani et al. 2006, Tay et al. 2006). Diese Aktivierung zu aktiven MMPs wird für eine nachfolgende Degradation der Grenzfläche zwischen Hybridschicht und Dentin verantwortlich gemacht, die den Haftverbund zwischen dem Kollagengeflecht des Dentins und dem Füllungsmaterial mit der Zeit auflöst. Dieser Vorgang wird für das sogenannte Nanoleakage, d.h. ein Flüssigkeitsdurchtritt in der beschädigten Hybridschicht von Dentin und Kunststoffanteil, verantwortlich gemacht (Sano et al. 1999, Hashimoto et al. 2002, Sano et al. 2006). Aus diesem Grund rückt die Untersuchung des Einsatzes von potentiellen MMP-Inhibitoren bei MMP-assoziierten Degradationsprozessen zunehmend in das Interesse der konservierenden Zahnheilkunde (Pashley et al. 2004, Hebling et al. 2005). Das Bestreben ist es eine Reduktion der MMP-Aktivität zu erreichen, die so weit wie möglich an eine Inhibition heranreicht. Dadurch soll die Dauer des Haftverbundes zwischen Dentin

und Füllungsmaterial verlängert werden, um so ein längere Haltbarkeit der adhäsiv verankerten Füllung zu erreichen.

2.5 Inhibitoren der Enzymaktivität von MMPs

Inhibitoren der MMPs lassen sich grob unterteilen in nicht-synthetische Inhibitoren (z.B. TIMPs) und synthetische Inhibitoren (z.B. Chlorhexidin, Tetracycline etc.) (Acharya et al. 2004).

Chlorhexidin (CHX) wurde in der Literatur als sehr wirksamer Inhibitor der MMP-Aktivität beschrieben (Gendron et al. 1999; Pashley et al. 2004, Hebling et al. 2005, Nishitani et al. 2006; Yang et al. 2006). CHX ist ein Molekül, welches zwei symmetrische Benzolringe aufweist. Es wird in der Zahnmedizin als lokales Antiseptikum in Form von Mundspüllösungen, Gelen oder Lacken verwendet. Aufgrund seiner antibakteriellen Eigenschaften wird es vor oralchirurgischen Eingriffen, im Rahmen von Parodontalerkrankungen, zur Kariesprävention und bei Entzündungen des Mund- und Rachenraumes eingesetzt. Zusätzlich hat CHX eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Prävention und Kontrolle kariöser Läsionen (Tweetman 2004). Innerhalb der Zahnmedizin findet es häufig Verwendung als 0,2%ige Lösung. Obwohl die Wirkung auf die MMPs im Dentin schon beschrieben wurde, ist der genaue Wirkungsmechanismus auf die MMPs bislang nicht geklärt.

In der Literatur sind Angaben zur Aktivitätssteigerung der MMPs nach Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) zu finden (Hannas et al. 2007). SDS ist Bestandteil von zahnärztlichen Prophylaxemitteln, wie z.B. Zahnpasten (Platzer 1993). Auch hier ist der genaue Wirkungsmechanismus auf die MMPs nicht geklärt.

Weiterhin werden in der Literatur auch Effekte auf MMPs bei der Anwendung von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) beschrieben (Imafuku et al. 2002). Allerdings sind die Mechanismen bei der Anwendung von EDTA nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise beruht die Wirkung von EDTA auf MMPs auf der Fähigkeit, als Metall-Chelator zu fungieren.

Fluoridhaltige Substanzen sind im alltäglichen Gebrauch sowohl im häuslichen als auch im zahnärztlichen Bereich. Natriumfluorid (NaF) ist das Natriumsalz der Fluorwasserstoffsäure. Fluoride finden Verwendung in Mundspüllösungen, Zahnpasten und Lacken. Die kariesprotektiven und remineralisierenden Effekte von Fluoridpräparaten sind vielfach beschrieben. Aber über die Wirkung von Fluoridpräparaten auf die MMPs im Dentin gibt es bisher kaum Erkenntnisse (Nordbø et al. 2003).

Tetracycline finden aufgrund ihrer antibakteriellen Eigenschaften Verwendung zur Bekämpfung des bakteriellen Keimspektrums im Rahmen der Parodontaltherapie. Sie werden aber auch zur Hemmung der MMP-Aktivität verwendet, da MMPs für schwerwiegende Komplikationen bei parodontalen Erkrankungen verantwortlich gemacht werden (Wang et al. 2005, Sorsa et al. 2006). Gerade MMP-8 wird als Marker zur Diagnostik parodontaler Erkrankungen verwendet (Agan et al. 2006). Allerdings gibt es bislang keine Erkenntnisse über die Wirkung von Tetracyclinen auf die MMP-Aktivität im Dentin.

Eine weitere Stoffklasse, über deren Wirkung auf die MMP-Aktivität im Dentin bisher wenig bekannt ist, stellt die Gruppe der Polyphenole dar. Polyphenole sind aromatische Verbindungen mit mehr als einer an den aromatischen Ringen gebundenen Hydroxylgruppe. Natürliche Polyphenole kommen in Pflanzen als bioaktive Substanzen wie Farbstoffe (Flavonoide, Anthocyane), Geschmacksstoffe und Gerbsäuren (Tannine) vor. Bisher ist im Hinblick auf zahnmedizinisch relevante Effekte der Polyphenole nur bekannt, dass sie die Säureproduktion von *Streptococcus mutans* im bakteriellen Biofilm an der Zahnoberfläche herabsetzen (Percival et al. 2006, Smullen et al. 2006, Daglia et al. 2007). In der Literatur wird den Polyphenolen ein inhibitorischer Effekt auf MMPs zugesprochen (Yun et al. 2004, Tanimura et al. 2005, Gagliano et al. 2005), welcher sich auf die Eigenschaft als Metall-Chelator begründet (Soobratte et al. 2005).

2.6 Fragestellungen

MMPs sind an einer Vielzahl zahnmedizinisch relevanter, sowohl physiologischer als auch pathophysiologischer Prozesse, beteiligt.

Gerade die Wirkung verschiedener Agenzien, die in der Zahnheilkunde verwendet werden, auf die MMPs ist zum großen Teil noch nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit sollen die Wirkungen von einigen bereits in der Literatur beschriebenen Effektoren bestätigt werden sowie die Wirkung von neuartigen Effektoren und anderen Möglichkeiten der Einflussnahme auf die MMP-Aktivität getestet werden. Es sollen neue und weiterführende Erkenntnisse bezüglich der Aktivität der MMPs im Dentin gewonnen werden, da das Wissen über die MMP-Aktivität innerhalb des Dentins zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch sehr gering ist (Pashley et al. 2004). Aus diesem Grund ergeben sich folgende Fragestellungen, die in dieser Arbeit untersucht werden.

Fragestellung 1:

Bisher wurde in vielen Arbeiten zum Nachweis von MMPs als Methode vor allem die Zymographie, die Polymerase-Ketten-Reaktion oder das Western-Blotting verwendet. Diese Methoden bleiben jedoch den Nachweis einer echten Aktivitätsmessung schuldig, da sie nur Aufschluss über die Anwesenheit eines Proteins geben. Von klinischem Interesse ist aber die Wirkung aller im Dentin befindlichen MMPs auf die umgebende Matrix. Daher wurde in dieser Arbeit das EnzCheck-System verwendet, ein kommerziell verfügbares Testverfahren, welches die Messung der gelatinolytischen / kollagenolytischen Enzymaktivität aller im Dentin befindlichen MMPs ermöglicht (Pashley et al. 2004, Hebling et al. 2005, Nishitani et al. 2006). Da die Durchführung dieses Verfahrens an Dentinproben bisher noch nicht im Detail beschrieben wurde, beschäftigt sich der erste Teil dieser Arbeit nicht nur mit dem Nachweis der gelatinolytischen / kollagenolytischen Aktivität im Dentin, sondern insbesondere auch mit der Festlegung der Versuchsparameter.

Die Fragestellung war, ob man mit dem verwendeten Testverfahren (EnzCheck) eine gelatinolytische / kollagenolytische Aktivität im Dentin nachweisen kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen die Möglichkeiten einer Einflussnahme auf die gelatinolytische / kollagenolytische Enzymaktivität untersucht werden. Hierbei sind von besonderem Interesse die potentiell inhibitorische Wirkung zahnärztlicher Medizinprodukte, die Auswirkungen von polyphenolhaltigen Agenzien und die

Folgen einer Anwendung ionisierender Strahlung auf die gelatinolytische Aktivität im Dentin.

Fragestellung 2:

Zur Beeinflussung von MMPs durch zahnärztliche Medizinprodukte sind eine Reihe von Publikationen in der Literatur zu finden (Souza et al. 2001, Santos et al. 2001, Gendron et al. 1999). Allerdings wird in diesen Veröffentlichungen kein Nachweis der Enzymaktivität im Dentin geliefert. Auch der Nachweis der Modifikation der gelatinolytischen / kollagenolytischen MMP-Aktivität im Dentin durch zahnärztliche Medizinprodukte ist in der Literatur bisher erst ansatzweise beschrieben worden (Pashley et al. 2004, Hebling et al. 2005, Nishitani et al. 2006), was die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen auf diesem Gebiet unterstreicht.

Daher war die zweite Fragestellung, welchen Einfluss zahnärztlich-prophylaktische Substanzen, wie Chlorhexidin, Natriumdodecylsulfat, Ethylendiamintetraacetat und Natriumfluorid auf die gelatinolytische MMP-Aktivität im Dentin haben.

Fragestellung 3:

Zusätzlich wurde die Wirkung von Tetracyclinen getestet werden. Dieses Medikament wird vor allem in der Parodontaltherapie als Inhibitor der MMP-Aktivität beschrieben (Gapski et al. 2004, Agan et al. 2006, Sorsa et al. 2006). Es sollte untersucht werden, ob sich eine inhibitorische Wirkung der Tetracycline auf die gelatinolytische MMP-Aktivität im Dentin mit dem EnzCheck-System nachweisen lässt.

Fragestellung 4:

Die Anwendung von polyphenolhaltigen Agenzien ist im Zusammenhang mit der Inhibition der Enzymaktivität von MMPs im Rahmen der Tumortherapie beschrieben worden (Yun et al. 2004, Tanimura et al. 2005, Gagliano et al. 2005). Allerdings gibt es bisher keine Erkenntnisse hinsichtlich der Anwendung von Polyphenolen zur potentiellen Hemmung der MMP-Aktivität im Dentin.

Daher sollte geprüft werden, ob sich die in der Literatur beschriebene Wirkung polyphenolhaltiger Substanzen auf MMPs auch auf die gelatinolytische

Enzymaktivität im Dentin übertragen lässt. In dieser Arbeit soll speziell die Wirkung von Tanninsäure auf MMPs im Dentin nachgewiesen werden.

Fragestellung 5:

Fernerhin soll die in der Literatur beschriebene gelatinolytische Aktivitätssteigerung der MMPs bei der Anwendung von selbstätzenden Primern überprüft werden (Nishitani et al. 2006).

Fragestellung 6:

Die Verwendung ionisierender Strahlung und ihre Auswirkungen auf die MMP-Aktivität wurde bisher in humanem Lungenepithel untersucht (Yang et al. 2007). Dabei zeigte sich als Folge der Anwendung ionisierender Strahlung ein Anstieg der Enzymaktivität. Über die Auswirkungen der ionisierenden Strahlung auf die Enzymaktivität im Dentin gibt es dagegen keine Erkenntnisse. Daher war es auch das Ziel dieser Arbeit, erstmalig zu untersuchen, ob sich die Erkenntnisse bezüglich einer Erhöhung der Enzymaktivität nach dem Einsatz ionisierender Strahlung an humanem Lungenepithel auf die gelatinolytische MMP-Aktivität im Dentin übertragen lassen.

Im einzelnen sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kann man mit dem verwendeten Testverfahren (EnzCheck) eine gelatinolytische / kollagenolytische Aktivität im Dentin nachweisen?
2. Welchen Einfluß haben zahnärztlich-prophylaktische Substanzen, wie CHX, SDS, EDTA und NaF, auf MMPs im Dentin?
3. Haben Tetracycline eine inhibitorische Wirkung auf die gelatinolytische MMP-Aktivität im Dentin?
4. Besitzt Tanninsäure eine inhibitorische Wirkung auf die gelatinolytische Enzymaktivität im Dentin?

5. Lässt sich die in der Literatur angegebene Steigerung der gelatinolytischen Enzymaktivität bei der Anwendung von zahnärztlichen Primern bestätigen?

6. Hat der Einsatz ionisierender Strahlen einen Einfluss auf die gelatinolytische MMP-Aktivität im Dentin?

3. Material und Methodik

3.1 Messung der Enzymaktivität mit dem EnzCheck-System

Primäres Ziel des Versuches war es, die gelatinolytische / kollagenolytische Aktivität der im Dentin enthaltenen MMPs zu messen. Dazu wurde das EnzCheck® Gelatinase / Kollagenase Assay Kit (E12055) der Firma Molecular Probes® (Eugene, OR, USA) verwendet. Dieses Versuchssystem misst unspezifisch die gelatinolytische / kollagenolytische Aktivität der MMPs im Dentin. Die Ermittlung der gelatinolytischen / kollagenolytischen Aktivität erfolgt über die Verwendung von fluoreszenzmarkierter Gelatine, welche in einem Tris-HCl Puffer gelöst ist. Dieses Substrat hat die Eigenschaft, dass es eine geringe Eigenfluoreszenz aufweist, solange es noch nicht umgesetzt worden ist, da die fluoreszierenden Stellen intramolekular verdeckt sind. Die Spaltung dieses Substrates durch die MMPs führt zur Freilegung von fluoreszierenden Stellen. Dieser Anstieg der Fluoreszenz wird in einem Fluoreszenzdetektor gemessen. Somit gibt das Ausmaß der Fluoreszenz indirekt die Aktivität der MMPs in der Probe (in diesem Fall Dentin) wieder. Die Messwerte werden in Relativen Fluoreszenzeinheiten wiedergegeben [RFU]. Die Messungen des umgesetzten fluoreszenzmarkierten Substrates erfolgten am Fluoreszenzdetektor GENios der Firma Tecan (Firmware: V4.62- 07/01 GENios Serial number: 12900400253; Salzburg, Austria). Als Software wurde das Programm XFLUOR4 Version verwendet.

Einstellungen am Fluoreszenzdetektor:

Measurement mode: Fluorescence Top

Excitation wavelength: 485 nm

Emission wavelength: 535 nm

Gain (Manual): 50

Number of flashes: 3

Lag time: 0 µs

Integration time: 40 µs

Plate definition file: GRE96 fb.pdf

Für die Proben wurden 96-well Mikrotiterplatten (Greiner 96fb) verwendet.

3.2 Vorbereitungen des Dentins für die Versuche

In diesem Arbeitsschritt wurde das Dentin für die Versuche vorbereitet. Das Ziel war es, aus ganzen Zähnen ein Dentinpulver herzustellen, um so eine größtmögliche, reaktive Oberfläche zu erhalten und die MMPs des Dentins freizulegen. Für die Versuche wurden ausschließlich kariesfreie, humane Weisheitszähne verwendet, um eine Erhöhung der MMP-Aktivität durch kariöse Prozesse auszuschließen. Sofort nach der Extraktion wurden die Zähne in 0,9% NaCl-Lösung zwischengelagert. Im weiteren Verfahren wurden die Zähne zunächst von Zahnzement und Schmelz befreit. Dazu wurden eine Turbine mit Wasserkühlung und ein Diamantschleifkörper verwendet. Anschließend wurden die Zähne zwischen Kronen- und Wurzeldentin mit der Turbine getrennt. Die nun freigelegte Kronen- und Wurzelpulpa wurde mit einer Hedström-Feile (Iso-Größe 25) extirpiert. Die so aufbereiteten Dentinstücke wurden zunächst mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren und dann bei -83 °C gelagert.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Dentinstücke in einer Schwingmühle gemahlen. Dazu wurden sie in Fassungsbehälter aus Edelstahl mit einem Volumen von 10 ml eingebracht. Die Menge des Dentins betrug pro Mahlvorgang ein Gramm. Zur Pulverisierung des Dentins wurde eine Kugel aus Wolframcarbid mit einem Durchmesser von zwölf Millimetern und einem Gewicht von 13,5 g verwendet. Vor dem Mahlvorgang wurden die Edelstahlbehälter samt Inhalt in flüssigem Stickstoff vorgekühlt, um einer Hitzedegradation des Gewebes im Rahmen des Pulverisierungsprozesses vorzubeugen. Das Dentin wurde in einer Schwingmühle zerkleinert (Retsch 5657 HAAN1, Type MM2, Article No. 207130001, Ser.No 91108006, 220V, 50Hz, 40W). Das Dentinpulver wurde bis zur weiteren Verwendung bei -83 °C gelagert.

3.3 Vorversuche

Da die Verwendung des EnzCheck® Gelatinase / Kollagenase Assay Kits in Verbindung mit Dentin bisher noch nicht im Detail beschrieben wurde, dienten die Vorversuche zum einen der Etablierung der Versuchsmethode und zum anderen dem Nachweis einer gelatinolytischen / kollagenolytischen Aktivität von MMPs im Dentin.

3.3.1 Verwendung eines Dentinpools

Um interindividuelle Unterschiede der Enzymaktivität einzelner Zähne ausschließen zu können, wurde das gesamte Material in einem Pool zusammengelegt und durchmischt. Für den Hauptversuch wurden Proben aus diesem Pool verwendet. Dies garantierte eine Vergleichbarkeit der Versuche untereinander. Der Dentinpool wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen eingerichtet. In dieser Zeit wurden sämtliche Zähne sofort nach der Extraktion aufbereitet und das Dentin zu Pulver zermahlen. Danach wurde das Dentinpulver in einem Sammelbehälter bei -83°C gelagert. Nach zwei Wochen wurde das Anlegen des Dentinpools abgeschlossen und das gesammelte Dentinpulver wurde durchmischt. Von diesem Zeitpunkt an wurde dem Dentinpool kein neues Material mehr hinzugefügt.

3.3.2 Ermittlung der Dentinpartikelgröße

Aufgrund der Vorgaben der Literatur (Pashley et al. 2004) sollte im Rahmen dieses Vorversuches eine definierte Partikelgröße des pulverisierten Dentins nachgewiesen werden, die unter $10\ \mu\text{m}$ im Durchmesser liegt. Die aus dem Zerspanungs-/ Zertrümmerungsprozess des Dentins in der Schwingmühle resultierende Partikelgröße ist von der Dauer des Pulverisierungsprozesses abhängig. Daher wurden die Zeiten des Pulverisierungsprozesses in diesem Vorversuch variiert. Die Dauer der Mahlvorgänge wurde auf 8, 10, 12 und 14 Minuten festgelegt.

Die Kontrolle der Dentinpartikelgröße erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai 12, Biotwin, Fei-Company, Kassel, Deutschland). Hierzu wurde eine Suspension der Dentinpartikel angefertigt und anschließend auf TEM-Grids

aufgetragen. Im Ergebnis ließ sich feststellen, dass die Größe der Dentinpartikel abnahm, je länger der Pulverisierungsprozess andauerte (Abb. 2a, 2b). Bei einer Dauer des Pulverisierungsprozesses von 14 min ließen sich keine Dentinpartikel mehr nachweisen, die im Durchmesser über 10 µm lagen.

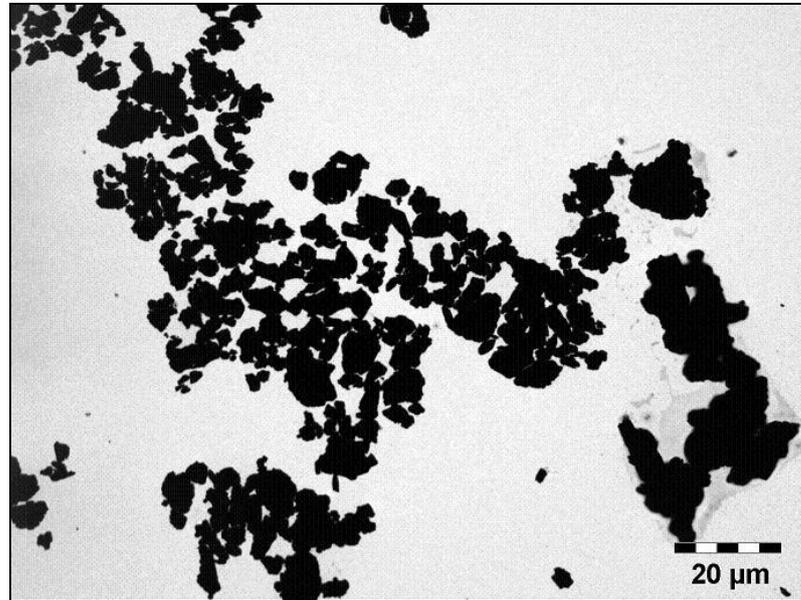


Abb.2a TEM-Aufnahme der Dentinpartikel nach dem Zerspanungsprozess (Vergr. 690fach) und einem Mahlvorgang von 8 min.

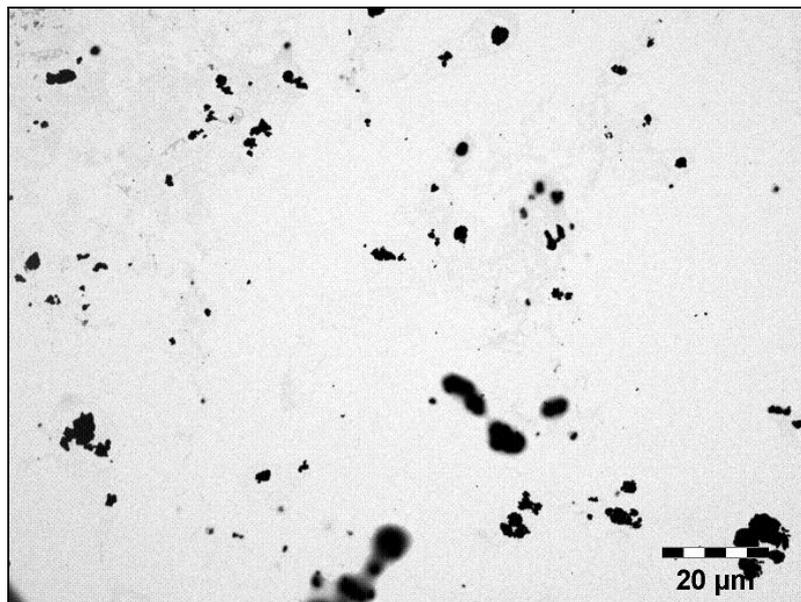


Abb.2b TEM-Aufnahme der Dentinpartikel nach dem Zerspanungsprozess (Vergr. 690fach) und einem Mahlvorgang von 14 min.

Für die weiteren Versuche wurde die Dauer des Zerspanungsprozesses auf 14 Minuten festgelegt.

3.3.3 Festlegung der Substratmenge

Dieser Versuch diente der Ermittlung einer geeigneten Substratmenge, die nachfolgend in jedem Versuchsansatz eingesetzt werden sollte, und weiterhin der Überprüfung, ob bei sukzessiver Erhöhung der Zugabe von Substrat die Enzymaktivität zunimmt. Als Substrat wurde fluoreszenzmarkiertes Kollagen (D12060, DQ collagen type I from bovine skin, fluorescein conjugate, Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) verwendet. Als Testenzym (Positivkontrolle) wurde dieser Versuch mit der bakteriellen Kollagenase von *Chlostridium Histolyticum* durchgeführt, welche Bestandteil des Testsystems ist. Dazu wurden fünf Eppendorf Tubes mit einer konstanten Menge (0,2 µl Kollagenase in Puffer gelöst) der Testkollagenase befüllt. Anschließend wurde das Substrat hinzugegeben, welches in der zugegebenen Menge variierte. Das Kollagen wurde gemäß Herstellerangaben mit Aqua Destillata verdünnt. Aus dieser Lösung wurde Kollagen in den Mengen 0, 2,5, 5, 10 und 20 µl hinzugefügt. Danach wurden die Proben bis zur Messung für zwei Stunden in den Inkubator bei 37°C gestellt. Anschließend erfolgte die Messung der kollagenolytischen Aktivität im Fluoreszenzdetektor. Im Ergebnis ließ sich erkennen, dass sich eine erhöhte kollagenolytische Aktivität nachweisen ließ, je mehr Substrat hinzugegeben wurde (Diagramm 1).

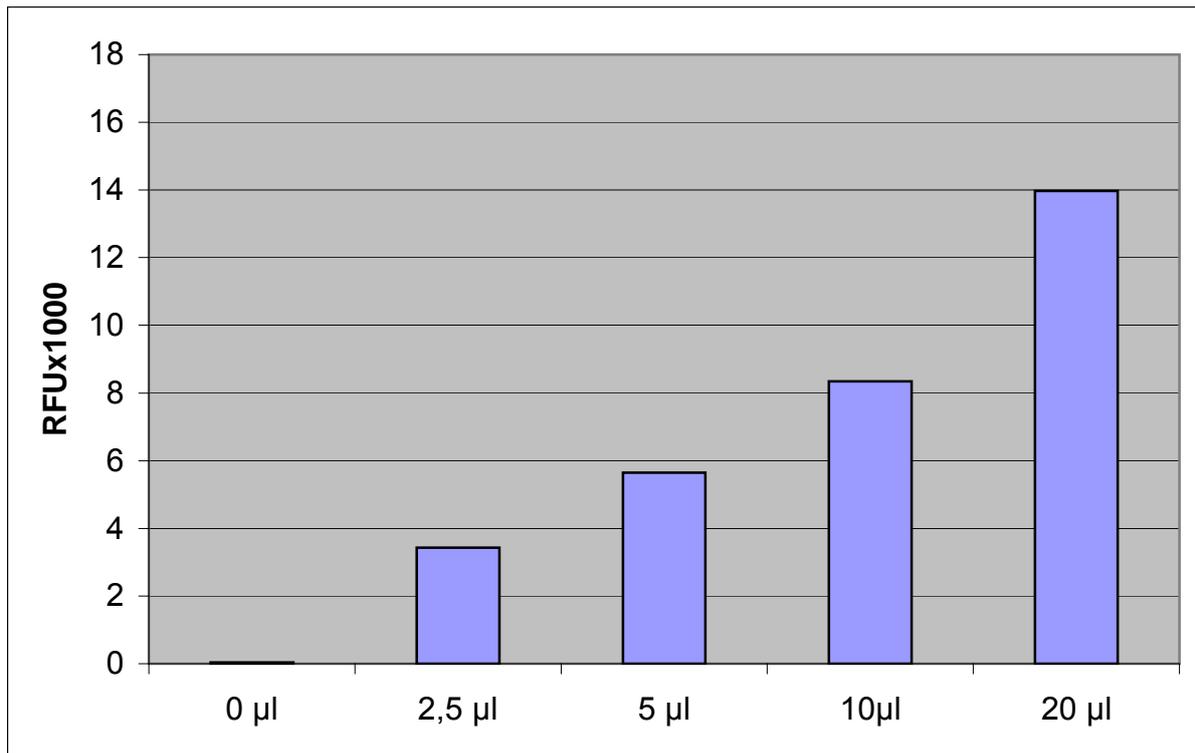


Diagramm 1: Darstellung der kollagenolytischen Aktivität bei sukzessiver Erhöhung der Substratmenge

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Menge an Substrat für die nachfolgenden Versuche auf 10 µl festgelegt.

3.3.4 Festlegung der Inkubationszeit

Ferner musste zur Standardisierung des Versuches eine Inkubationszeit festgelegt werden, in der das Substrat von der Kollagenase umgesetzt wird. Hier sollte festgestellt werden, ob sich die kollagenolytische Aktivität bei unterschiedlichen Inkubationszeiten ändert. In Anlehnung an die Ergebnisse von Yokota et al. (2003) wurde der erste Messwert nach zwei Stunden erhoben. Der restliche Reaktionsansatz wurde im Inkubator belassen. Die kollagenolytische Aktivität der Versuchsansätze aus Punkt 3.3.3 wurde dann nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erneut gemessen. Im Ergebnis ließ sich eine geringfügige Steigerung der 24h- Werte gegenüber den 2h- Werten feststellen (Diagramm 2).

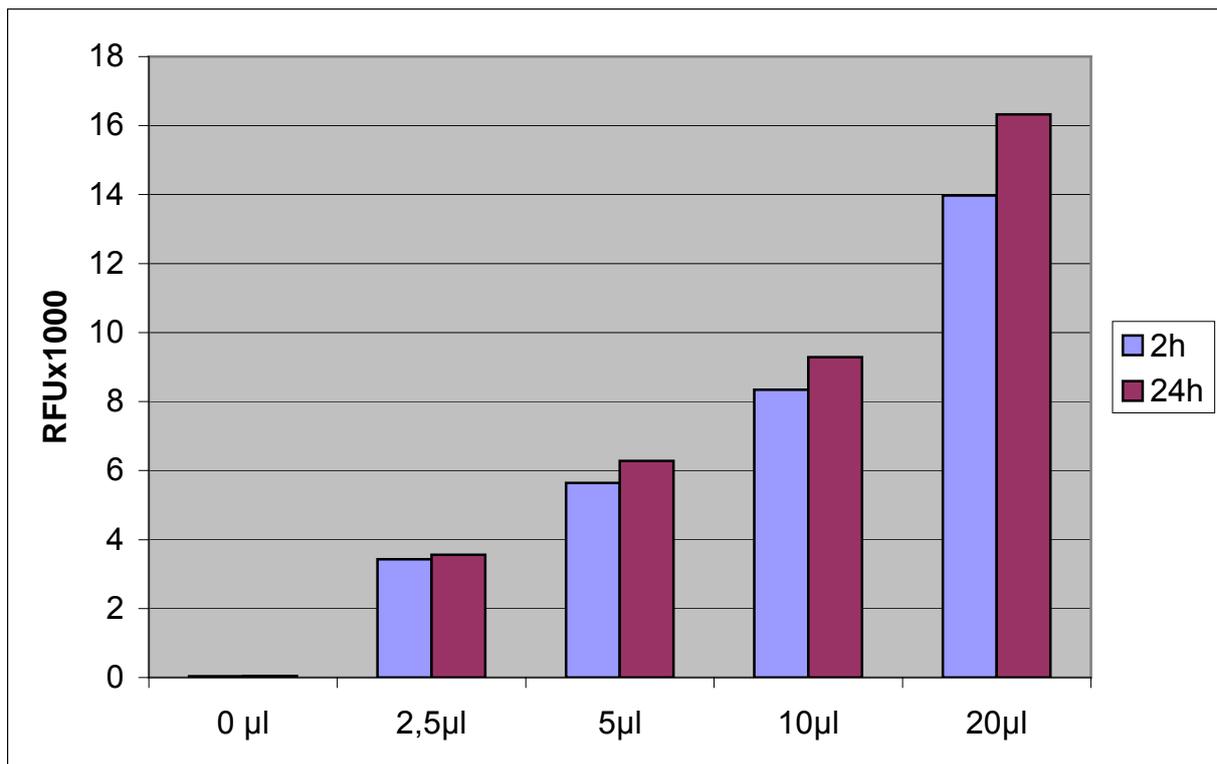


Diagramm 2: Darstellung der kollagenolytischen Aktivität bei unterschiedlicher Inkubationszeit

Als Schlussfolgerung aus diesem Vorversuch wurde für die weiteren Versuche eine Inkubationszeit von 2 Stunden festgelegt.

3.3.5 Festlegung der Dentinmenge

Die Verwendung von Dentinpulver zwecks Überprüfung der kollagenolytischen / gelatinolytischen Aktivität im Dentin mit dem EnzCheck-System ist in der Literatur beschrieben worden (Pashley et al. 2004, Hebling et al. 2005, Nishitani et al. 2006, Tay et al. 2006). Von Nishitani et al. (2006) wurde pro Reaktionsansatz eine Dentinmenge von 80 mg verwendet.

Ziel dieses Vorversuches war es festzustellen, ob eine Erhöhung der Dentinmenge mit einer Steigerung der kollagenolytischen Aktivität korreliert. Weiterhin wurde im Rahmen dieses Vorversuches festgelegt, welche Menge Dentinpulver pro Versuchsansatz verwendet werden sollte. Dazu wurden fünf Versuchsansätze vorbereitet. In diesen lag die Menge von Substrat bei 10 µl Kollagen (D12060, DQ collagen typel from bovine skin, fluorescein conjugate Molecular Probes®, Eugene, OR, USA), wohingegen die Menge an Dentinpulver variierte. Es wurde Dentin in den

Mengen 0, 10, 30, 50 und 80 mg hinzugefügt. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubationszeit im Inkubator bei 37 °C bis zur Messung. Im Ergebnis ließ sich feststellen, dass bei einer Erhöhung der Dentinmenge auch mehr Substrat umgesetzt wurde (Diagramm 3), was sich in den erhöhten Messwerten der kollagenolytischen Aktivität widerspiegelte. Weiterhin erbrachte dieses Experiment auch den Nachweis, dass MMPs im Dentin vorhanden sind und das im Rahmen des EnzCheck-System verwendete Substrat (D12060, DQ collagen type1 from bovine skin, fluorescein conjugate, Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) umsetzen.

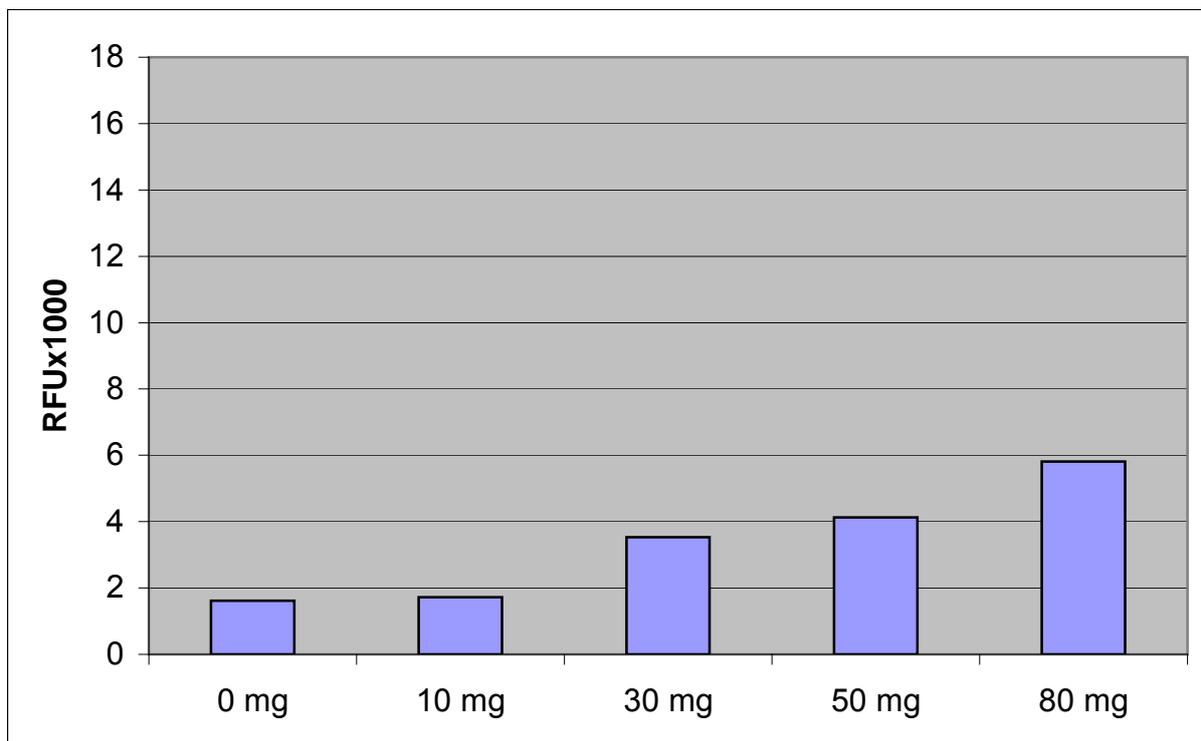


Diagramm 3: Darstellung der kollagenolytischen Aktivität bei sukzessiver Erhöhung der Dentinmenge

Für die weiteren Versuche wurde eine Menge von 50 mg Dentinpulver pro Einzel-Versuchsansatz eingesetzt.

3.3.6 Festlegung des Substrates

Dieser Versuch sollte den Nachweis darüber liefern, ob die im Dentin enthaltenen MMPs auch Gelatine als Substrat umsetzen. In der Literatur ist die Verwendung von beiden Substraten in der Verbindung mit dem EnzCheck System beschrieben

worden (Hebling et al. 2005). Aus der Literatur ist auch bekannt, dass die MMPs im Dentin sowohl Gelatine als auch Kollagen als Substrat umsetzen können (Nishitani et al. 2006). Dieser Vorversuch diente zur Überprüfung der Ergebnisse. Dazu wurden die Enzymaktivitäten nach Verwendung von Kollagen (D12060, DQ collagen typel from bovine skin, fluorescein conjugate, Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) bzw. Gelatine als Substrate miteinander verglichen (D12061, DQ-gelatine from pig skin, fluorescein conjugate, Molecular Probes®, Eugene, OR, USA). Die Versuchsansätze enthielten je 50 mg Dentinpulver und zehn Mikroliter des jeweiligen Substrates.

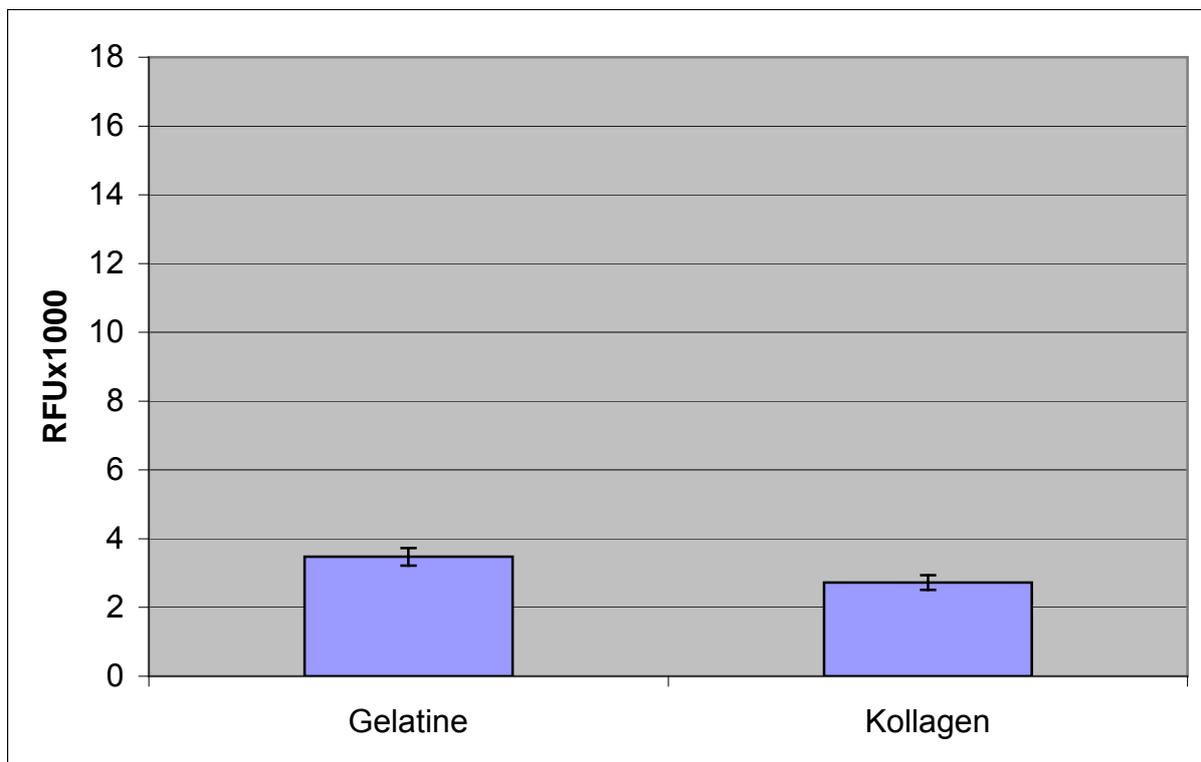


Diagramm 4: Darstellung der gelatinolytischen / kollagenolytischen Enzymaktivität nach Verwendung verschiedener Substrate

Als Ergebnis ließ sich beobachten, dass beide Substrate von den MMPs des Dentinpulvers umgesetzt wurden, wobei beim Einsatz des Kollagen eine geringfügig niedrigere Aktivität nachgewiesen werden konnte (Diagramm 4). Für die Versuche wurde Gelatine (D12061, DQ-gelatine from pig skin, fluorescein conjugate, Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) als Substrat verwendet.

3.3.7 Vergleich der gelatinolytischen Aktivität zwischen schockgefrorenem und sofort aufbereitetem Dentinpulver

Im Rahmen dieses Vorversuches sollte geklärt werden, ob der Prozess des Einfrierens des Dentinpulvers einen Einfluss auf die gelatinolytische Aktivität hat, da das Dentinpulver über einen längeren Zeitraum (mehrere Wochen) bei $-83\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde. Dazu wurde aus einer Hälfte eines Zahnes sofort nach der Extraktion Dentinpulver hergestellt. Der Zeitraum zwischen Extraktion und Messung der gelatinolytischen Aktivität betrug ca. vier Stunden. Die andere Hälfte des Zahnes wurde schockgefroren, einen Tag später aufbereitet und anschließend die gelatinolytische Aktivität gemessen. Für diesen Vorversuch wurde Kollagen (D12060, DQ collagen type I from bovine skin, fluorescein conjugate, Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) verwendet. Als Erkenntnis aus diesem Vorversuch ergab sich, dass die gelatinolytische Aktivität des schockgefrorenen Dentinpulvers im Vergleich zum sofort aufbereiteten Dentinpulver nur geringfügig erhöht war (Diagramm 5).

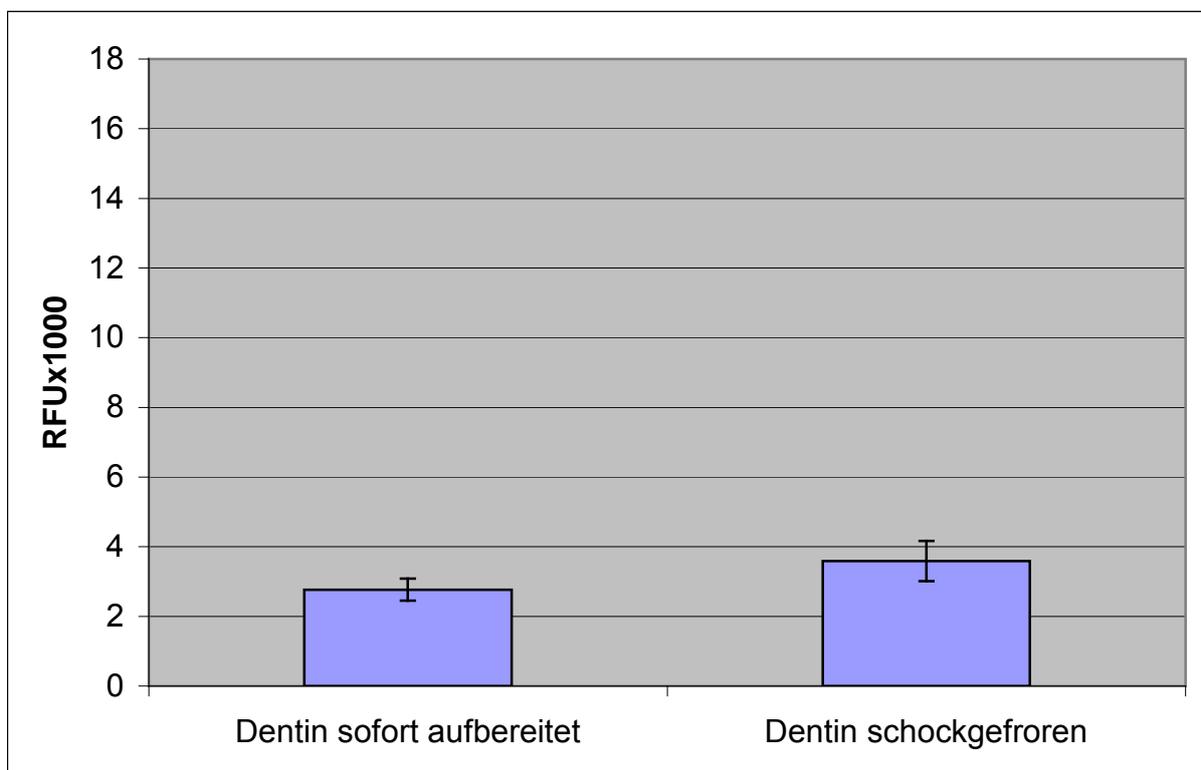


Diagramm 5: Darstellung der gelatinolytischen Aktivität von sofort aufbereitetem und schockgefrorenem Dentinpulver

Die Schlussfolgerung aus diesem Vorversuch war, dass die gelatinolytische Aktivität des Dentinpulvers nicht durch den Einfrierungsprozess beeinträchtigt wurde. Somit konnte das Dentinpulver für den Zeitraum der Versuche bei $-83\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

3.4 Hauptversuche

Das Ziel der Hauptversuche war es, den Einfluss potentieller Inhibitoren auf die gelatinolytische Aktivität der MMPs des Dentins nachzuweisen. Dazu wurden verschiedene Effektoren verwendet und nachfolgend in verschiedenen Versuchsreihen untersucht.

3.4.1 Prinzipieller Versuchsablauf eines Inhibitorentestes

Nachfolgend ist das prinzipielle, experimentelle Vorgehen im Rahmen der Prüfung verschiedener MMP-Inhibitoren am Dentinpulver dargestellt. Die Experimente wurden für jeden Effektor mit jeweils sechs Einzelproben durchgeführt.

Schritt 1: Einwaage von 50 mg Dentinpulver in ein Eppendorf-Tube

Schritt 2: Inkubation mit 200 μl eines Effektors für eine Minute, anschließend Durchmischen des Versuchsansatzes mit dem Labormischer.

Schritt 3: Zentrifugation mit einer Ultrazentrifuge (13000 U/min für 30 s) und Abpipettieren des Überstandes

Schritt 4: Waschen des inkubierten Pulvers mit 400 μl Pufferlösung für eine Minute und Durchmischen des Versuchsansatzes mit dem Labormischer

Schritt 5: Zentrifugation mit einer Ultrazentrifuge (13000 U/min für 30 s) und Abpipettieren des Überstandes

Schritt 6: Inkubation des Dentins mit 10 μl der fluoreszenzmarkierten Gelatine und 190 μl Pufferlösung, gleichzeitig Lichtabschirmung des Versuchsansatzes

Schritt 7: Inkubation der Versuchsansätze für zwei Stunden bei 37°C

Schritt 8: Messung mit 100 μl des Versuchsansatzes in einer 96-well Mikrotiterplatte im Fluoreszenzdetektor (Tecan, GENios), Angabe der Messwerte in RFUs

3.4.2 Darstellung der Versuchsreihen des Hauptversuches

Versuchsreihe 1: Wirkung von zahnärztlich-prophylaktischen Medizinprodukten auf MMPs.

In der ersten Versuchsreihe wurden zahnärztlich-prophylaktische Medizinprodukte in ihrer Wirkung auf MMPs des Dentinpulvers untersucht. In dieser Gruppe befanden sich Chlorhexidin (meridol® CHX mouth rinse without fluoride, 0,2% chlorhexidine-diguconate, GABA International), Natriumdodecylsulfat (SDS 2%, ultra pure, Art. No. 2326.1, Calroth GmbH. CoKg, 76185 Karlsruhe, Germany), Ethylendiamintetraacetat (EDTA, 0,1M, Art. No. 10944, [Ph Eur.] VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Germany) und Natriumfluorid Spüllösung (meridol® mouth rinse, 250 ppm F⁻, GABA International).

Versuchsreihe 2: Wirkung von Tetracyclinen auf MMPs.

Tetracyclinpräparate werden in der Literatur als wirksame Inhibitoren der MMPs beschrieben. Es wurde ein handelsübliches Tetracyclin-Hydrochlorid verwendet (Art. No. 4684 [Ph Eur.] Caelo, Caesar u. Loretz, GmbH, 40702 Hilden, Germany). Für die Durchführung des Experimentes wurden 1000 mg TCN-HCl in 1,4 ml Wasser gelöst. Mit dieser Lösung wurden die nachfolgenden Versuche, wie unter 3.4.1 beschrieben, durchgeführt.

Versuchsreihe 3: Wirkung von Polyphenolen auf MMPs

In Versuchsreihe 3 sollte abgeklärt werden, ob die Anwendung von Polyphenolen als potentieller Inhibitor der MMPs eine Wirkung auf die gelatinolytische Aktivität im Dentin hat. In diesem Versuch wurde Tanninsäure als wässrige Lösung (Kat. No.1.59446.0010, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) verwendet, die in den Verdünnungen 1%, 0,1% und 0,01% getestet wurde.

Versuchsreihe 4: Wirkung eines Primers auf MMPs

Diese Versuchsreihe sollte die in der Literatur angegebene aktivierende Wirkung von selbstätzenden Primern auf die gelatinolytische Aktivität überprüfen (Nishitani et al. 2006). In dieser Versuchsreihe wurde der ED Primer II aus dem Adhäsivsystem Panavia F 2.0 (0491 EU, Panavia™, ED-Primer II, Liquid A, 0492 EU, Panavia™, ED-Primer II, Liquid B, Kuraray-Dental, Osaka, Japan) verwendet. Hierbei wurde von dem in Punkt 3.4.1 beschriebenen Schema abgewichen, da der Primer aufgrund seiner Viskosität nicht wie eine Flüssigkeit behandelt werden kann. Außerdem sollte die Anwendung des Primers möglichst in Analogie zum klinischen Einsatz verwendet werden.

Dazu wurde der Primer auf nichtpulverisierte Dentinstücke für 30 s aufgetragen und dann verblasen. Erst nachfolgend wurde das Dentin zermahlen und die Messung der gelatinolytischen Aktivität erfolgte wie in 3.4.1 Schritt 6 beschrieben.

Versuchsreihe 5: Wirkung von ionisierender Strahlung auf MMPs

In diesem Versuch musste von dem in Punkt 3.4.1 beschriebenen Versuchsschema abgewichen werden, da hier die Modifikation der MMPs nicht über die Inkubation mit einer Flüssigkeit erfolgte. Das Dentinpulver wurde zunächst mit einer Dosis von 10 Gy bestrahlt (Röntgenröhre MCN 165/796704, Phillips; 90 kV 19 mA; 2 Gy/min). Bis zur Messung wurde das Dentinpulver für zwei Tage im Inkubator bei 37°C gelagert. Als Vergleichswert diente unbestrahltes Dentinpulver, welches ebenfalls für zwei Tage im Inkubator gelagert wurde und dann auf die gelatinolytische Aktivität untersucht wurde. Die anschließende Messung erfolgte dann wieder nach dem unter Punkt 3.4.1 beschriebenen Schema.

3.4.3 Verwendete Effektoren und deren Konzentrationen in der Übersicht

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Inhibitoren und deren Konzentrationen.

Tabelle 2: Die verwendeten Effektoren

Effektor	Abkürzung	Konzentration		
Chlorhexidin	CHX	0,2%		
Natriumdodecylsulfat	SDS	2%		
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	0,1 M		
Natriumfluorid	NaF	250 ppm		
Tetracyclin-Hydrochlorid	TCN-HCl	1 g/1,4 ml		
Tanninsäure	Tannin	1,0%	0,1%	0,01%
Teil eines Adhäsivsystems	Primer	handelsüblich		
Bestrahlung	10 Gy	10 Gy		

3.4.4 Kontrollversuche zur Eigenfluoreszenz der am Versuchssystem beteiligten Substanzen

Im Rahmen der Kontrollansätze wurden die am Versuchssystem beteiligten Substanzen auf ihre Eigenfluoreszenz hin untersucht, denn sowohl beim Dentinpulver als auch beim jeweils verwendeten Effektor ließen sich Eigenfluoreszenzen nachweisen. Zur Kontrolle wurden daher jeweils 50 mg des Dentinpulvers mit 200 µl des jeweiligen Effektors inkubiert. Nachfolgend wurde die Eigenfluoreszenz dieses Reaktionsansatzes gemessen. Dieses Vorgehen sollte garantieren, dass erhöhte Werte im Hauptversuch nicht als stärkere Enzymaktivität fehlgedeutet werden, da sie nicht auf der Umsetzung des fluoreszenzmarkierten Substrates durch die MMPs beruhen, sondern auf der Eigenfluoreszenz der am Versuch beteiligten Substanzen.

3.5 Statistische Analyse der Versuchsergebnisse

Alle Experimente wurden mit jeweils sechs Einzelproben durchgeführt. Die Messwerte wurden in Relativen Fluoreszenzeinheiten (RFUs) ermittelt. Aus den gewonnenen Messdaten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet (Tab. 8). Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgend einem Tukey-Test als post-hoc Test, wobei die Werte von unbehandeltem Dentin als Referenzgruppe dienten. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt. Als Software wurde das Programm Sigma Stat., Version 10.0 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Versuchsreihe 1

In dieser Versuchsreihe wurde die gelatinolytische Aktivität des unbehandelten Referenzdentins mit der gelatinolytischen Enzymaktivität des Dentins nach dem Einsatz der zahnärztlichen Medizinprodukte CHX (0,2%), SDS (2%), EDTA (0,1M) und NaF (250 ppm) verglichen. Die Daten sind in Diagramm 6 dargestellt. Die Signifikanzen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

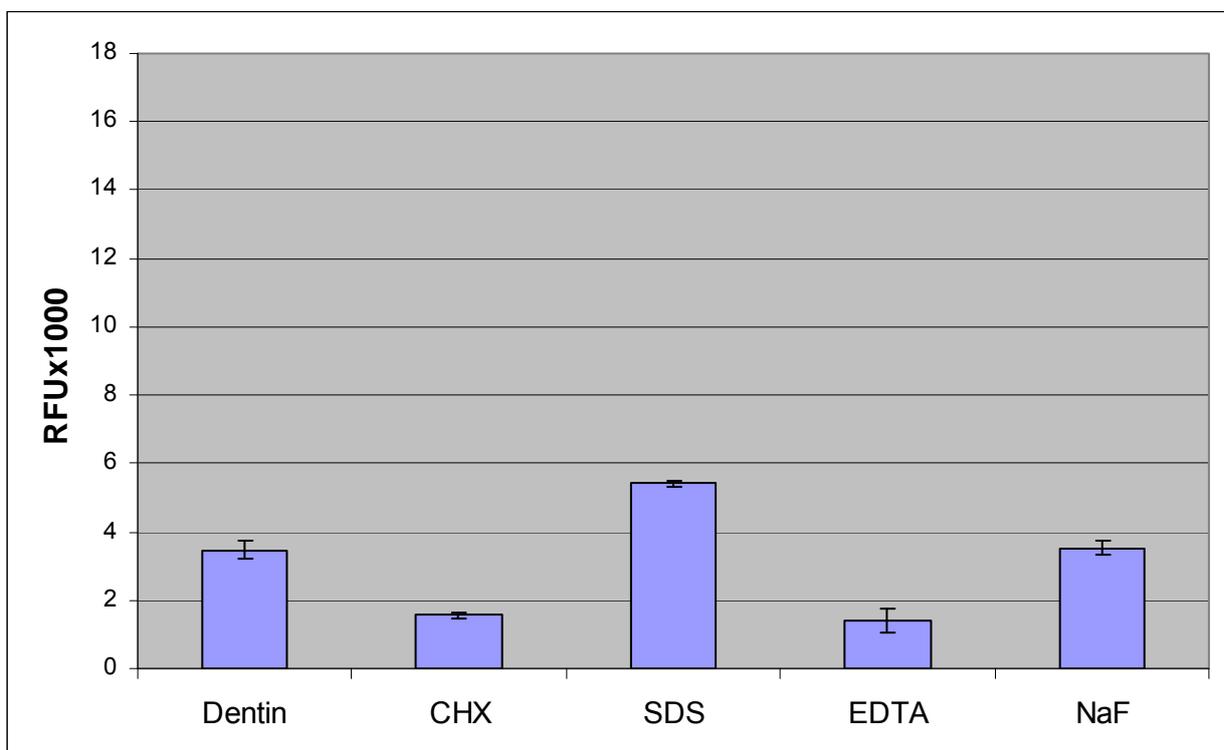


Diagramm 6: Darstellung der gelatinolytischen Aktivität des unbehandelten Referenzdentins und der gelatinolytischen Aktivität von Dentinpulver nach Anwendung verschiedener zahnärztlicher Medizinprodukte

Die Messwerte der gelatinolytischen Aktivität und die Kontrollmesswerte für die Eigenfluoreszenz sind in Tabelle 3 dargestellt. Als Referenz dient die gelatinolytische Aktivität des unbehandelten Dentins. Nach dem Einsatz von CHX lässt sich eine statistisch signifikante ($p < 0,001$) Reduktion der gelatinolytischen Aktivität des Dentins nachweisen (Tab.8).

Die Verwendung von SDS bewirkt eine statistisch signifikante ($p < 0,001$) Steigerung der gelatinolytischen Aktivität (Tab.8). Nach der Anwendung von EDTA wurden Werte für die gelatinolytische Aktivität gemessen, die signifikant ($p < 0,001$) unter

denen der Referenzwerte des Dentins lagen (Tab.8). Diese befanden sich auf dem Niveau wie nach der Anwendung von CHX.

Die Anwendung einer NaF-Lösung führte zu keiner signifikanten ($p=0,673$) Reduktion der gelatinolytischen Aktivität des Dentinpulvers im Vergleich zu den Referenzwerten des unbehandelten Dentins (Tab.8). Die Werte in der Kontrollgruppe ergaben keinen Hinweis auf eine erhöhte Fluoreszenz der beteiligten Substanzen, die eine Verfälschung der Messungen nach sich gezogen hätte.

Tabelle 3: Messwerte für die gelatinolytische Aktivität im Dentin nach Anwendung zahnärztlicher Medizinprodukte und Kontrollmesswerte für die Eigenfluoreszenz

Gelatinolytische Aktivität (RFU)		Eigenfluoreszenz (RFU)	
Versuchskomponenten	Mittelwerte	Versuchskomponenten	Mittelwerte
Gelatine, Dentin	3476 (± 252)	Dentin	417 (± 10)
Gelatine, Dentin, CHX	1561 (± 92)	Dentin, CHX	282 (± 5)
Gelatine, Dentin, SDS	5422 (± 81)	Dentin, SDS	190 (± 28)
Gelatine, Dentin, EDTA	1414 (± 355)	Dentin, EDTA	270 (± 12)
Gelatine, Dentin, NaF	3535 (± 215)	Dentin, NaF	244 (± 23)

4.2 Ergebnisse der Versuchsreihe 2

In der Versuchsreihe 2 wurde die gelatinolytische Aktivität von unbehandeltem Dentin mit der gelatinolytischen Aktivität von Dentin nach dem Einsatz von Tetracyclin-Hydrochlorid verglichen. Die Konzentration der TCN-HCl-Lösung betrug 1,4 g/ml. Die Daten sind in Diagramm 7 dargestellt.

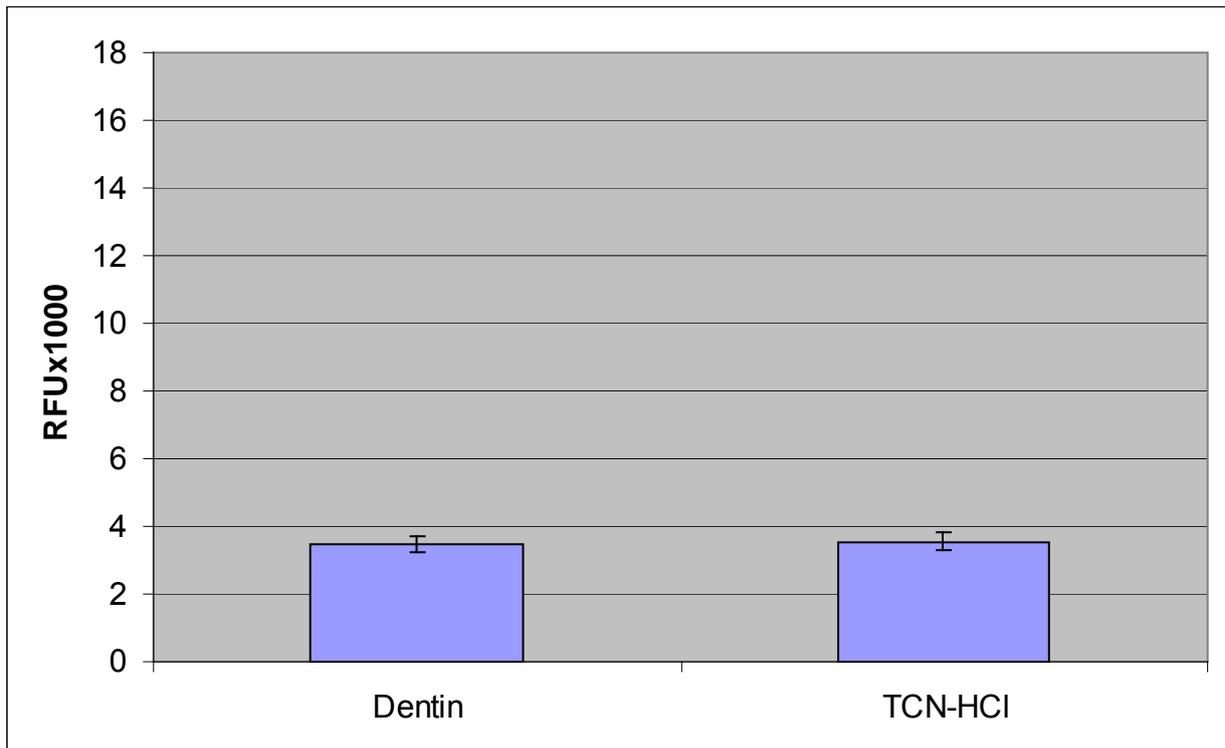


Diagramm 7: Darstellung der gelatinolytischen Aktivitäten des unbehandelten Dentins und der gelatinolytischen Aktivität von Dentin nach Anwendung von Tetracyclin-Hydrochlorid

Tabelle 4 gibt die Messwerte und die Kontrollmesswerte wieder. Eine Reduktion der gelatinolytischen Aktivität nach dem Einsatz von TCN-HCl wird in diesem in vitro Experiment nicht festgestellt. Die Messwerte der beiden Gruppen wiesen keine statistisch signifikanten ($p=0,653$) Unterschiede auf (Tab.8). Auffallend ist hier jedoch der hohe Messwert für die Eigenfluoreszenz des Versuchsansatzes von Dentinpulver mit TCN-HCl ohne das Substrat Gelatine.

Tabelle 4: Messwerte nach Anwendung von TCN-HCl und Kontrollmesswerte

Gelatinolytische Aktivität (RFU)		Eigenfluoreszenz (RFU)	
Versuchskomponenten	Mittelwerte	Versuchskomponenten	Mittelwerte
Gelatine, Dentin	3476 (± 252)	Dentin	417 (± 10)
Gelatine, Dentin, TCN-HCl	3546 (± 273)	Dentin, TCN-HCl	1539 (± 366)

4.3 Ergebnisse der Versuchsreihe 3

In dieser Versuchsreihe wurde die gelatinolytische Aktivität des unbehandelten Dentins mit der gelatinolytischen Aktivität nach dem Einsatz von Tanninsäure in verschiedenen Verdünnungen (1%, 0,1% und 0,01%) verglichen. Die Daten sind in Diagramm 8 dargestellt.

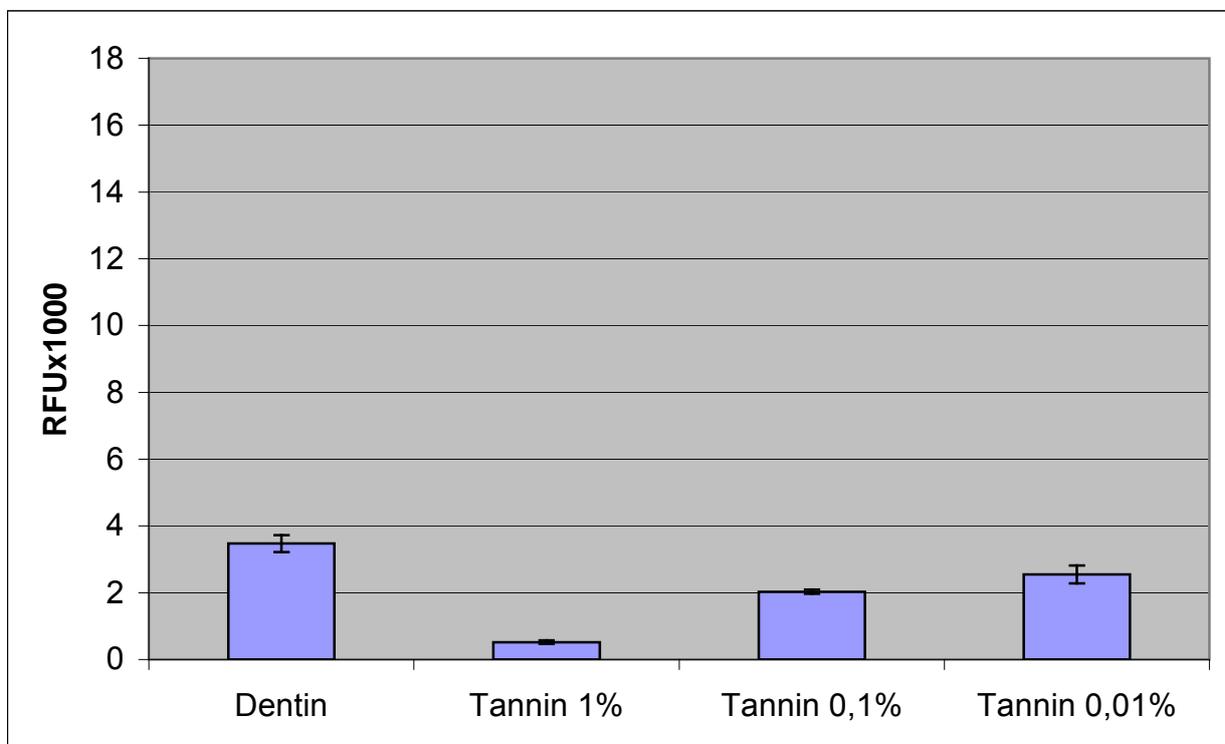


Diagramm 8: Darstellung der gelatinolytischen Aktivität des unbehandelten Dentins und der gelatinolytischen Aktivität von Dentin nach Anwendung von Tanninsäure in unterschiedlichen Konzentrationen

Die Messwerte und Eigenfluoreszenzen sind in Tabelle 5 dargestellt. Im Ergebnis lässt sich erkennen, dass der Einsatz von 1%iger Tanninsäure mit einer statistisch signifikanten ($p=0,002$) Reduktion der gelatinolytischen Aktivität im Vergleich zum unbehandelten Dentin einhergeht (Tab. 8), aber sowohl Tanninsäure 0,1% ($p=0,002$), als auch Tanninsäure 0,01% ($p=0,001$) reduzierten die gelatinolytische Aktivität signifikant. Die Verwendung von 1%iger Tanninsäure ergab die stärkste Reduktion der gelatinolytischen Aktivität aller verwendeten Effektoren. Die Abnahme der Enzymaktivität im Dentin korreliert mit der Konzentrationszunahme des Effektors Tanninsäure. Alle Messwerte lagen nach dem Einsatz der Tanninsäure signifikant niedriger als die Werte des unbehandelten Dentins (Tab. 8).

Tabelle 5: Messwerte nach Anwendung von Tanninsäure in absteigender Verdünnung und Kontrollmesswerte

Gelatinolytische Aktivität (RFU)		Eigenfluoreszenz (RFU)	
Versuchskomponenten	Mittelwerte	Versuchskomponenten	Mittelwerte
Gelatine, Dentin	3476 (± 252)	Dentin	417 (± 10)
Gelatine, Dentin, Tannin 1%	518 (± 51)	Dentin, Tannin 1%	232 (± 23)
Gelatine, Dentin, Tannin 0,1%	2030 (± 62)	Dentin, Tannin 0,1%	647 (± 58)
Gelatine, Dentin, Tannin 0,01%	2553 (± 114)	Dentin, Tannin 0,01%	499 (± 24)

4.4 Ergebnisse der Versuchsreihe 4

In Versuchsreihe 4 wurde die gelatinolytische Aktivität von unbeeinflusstem Dentin mit der gelatinolytischen Aktivität von Dentin, welches mit einem dentalen Primer behandelt wurde, verglichen. Die Daten sind im Diagramm 9 dargestellt.

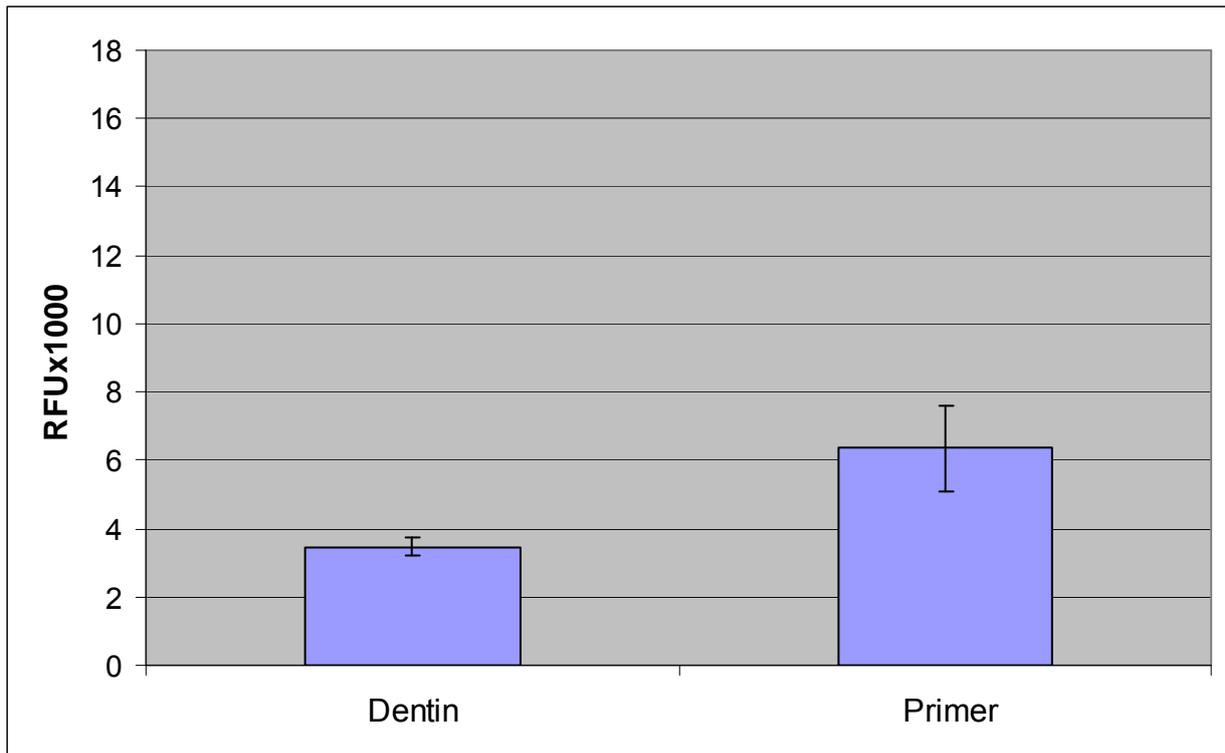


Diagramm 9: Darstellung der gelatinolytischen Aktivität des unbehandelten Dentins und der gelatinolytischen Aktivität von Dentin nach Anwendung eines dentalen Primers

Die Messergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Im Ergebnis zeigt sich ein Anstieg der gelatinolytischen Aktivität nach dem Einsatz des Primers. Auch nach dem statistischen Abgleich ließ sich ein signifikanter ($p < 0,001$) Unterschied der gelatinolytischen Aktivität von Dentin und der gelatinolytischen Aktivität des Dentins nach dem Einsatz des Primers feststellen (Tab. 8).

Tabelle 6: Messwerte nach Anwendung eines dentalen Primers

Gelatinolytische Aktivität (RFU)		Eigenfluoreszenz (RFU)	
Versuchskomponenten	Mittelwerte	Versuchskomponenten	Mittelwerte
Gelatine, Dentin	3476 (± 252)	Dentin	417 (± 10)
Gelatine, Dentin, Primer	6342 (± 1248)	Dentin, Primer	221 (± 26)

4.5 Ergebnisse der Versuchsreihe 5

In dieser Versuchsreihe wurde die gelatinolytische Aktivität von Dentinpulver, welches 48 Stunden im Inkubator bei 37 °C gelagert wurde, mit der gelatinolytischen Aktivität von Dentinpulver, welches mit einer Dosis von 10 Gy bestrahlt wurde und anschließend für 48 Stunden im Inkubator bei 37 °C gelagert wurde, verglichen. Daher wurde in dieser Versuchsreihe eine andere Referenz für die gelatinolytische Aktivität im Dentin verwendet als in den vorangegangenen Versuchsreihen. Die Daten sind im Diagramm 10 dargestellt.

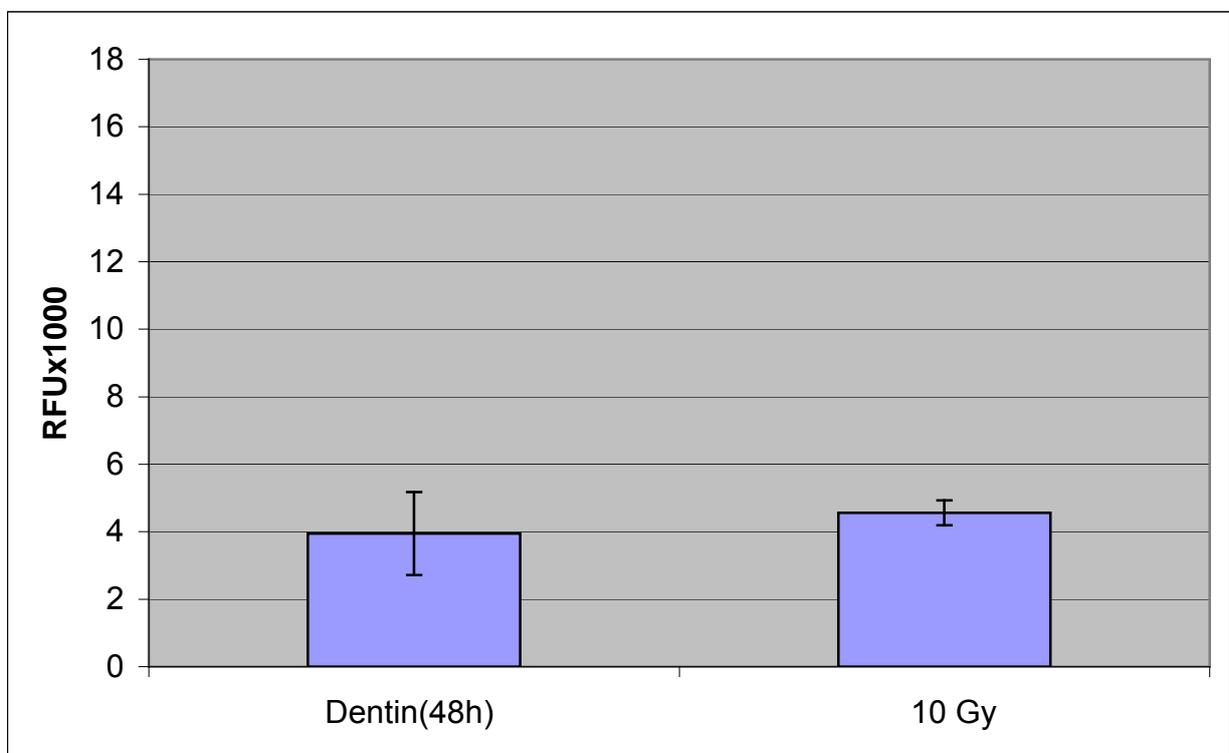


Diagramm 10: Darstellung der gelatinolytischen Aktivität von Dentin, welches 48 h im Inkubator (37 °C) gelagert wurde, und gelatinolytischen Aktivität von Dentin, welches nach Bestrahlung mit 10 Gy 48 h im Inkubator (37 °C) gelagert wurde

Die Messwerte dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 7 dargestellt. Bei dem Einsatz von ionisierender Strahlung im Dentin konnte eine geringe Steigerung der gelatinolytischen Aktivität im Vergleich zu unbestrahltem Dentin gemessen werden (Diagramm10). Die nachfolgend durchgeführte Statistik ergab keinen signifikanten ($p=0,218$) Unterschied der gelatinolytischen Aktivität von dem mit 10 Gy bestrahltem Dentin im Vergleich zum unbestrahltem Dentin (Tab. 8).

Tabelle 7: Messwerte nach Bestrahlung mit 10 Gy

Gelatinolytische Aktivität (RFU)	
Versuchskomponenten	Mittelwerte
Gelatine, Dentin (48h)	3943 (\pm 1231)
Gelatine, Dentin (48h), 10 Gy	4561 (\pm 370)

4.6 Übersichtsgrafik der Enzymaktivität im Dentin nach Anwendung der verschiedenen Effektoren und statistische Analyse

Das Diagramm 11 zeigt in einer Übersicht die gelatinolytischen Aktivitäten der MMPs von Dentin und den in den Versuchsreihen 1-5 getesteten Effektoren.

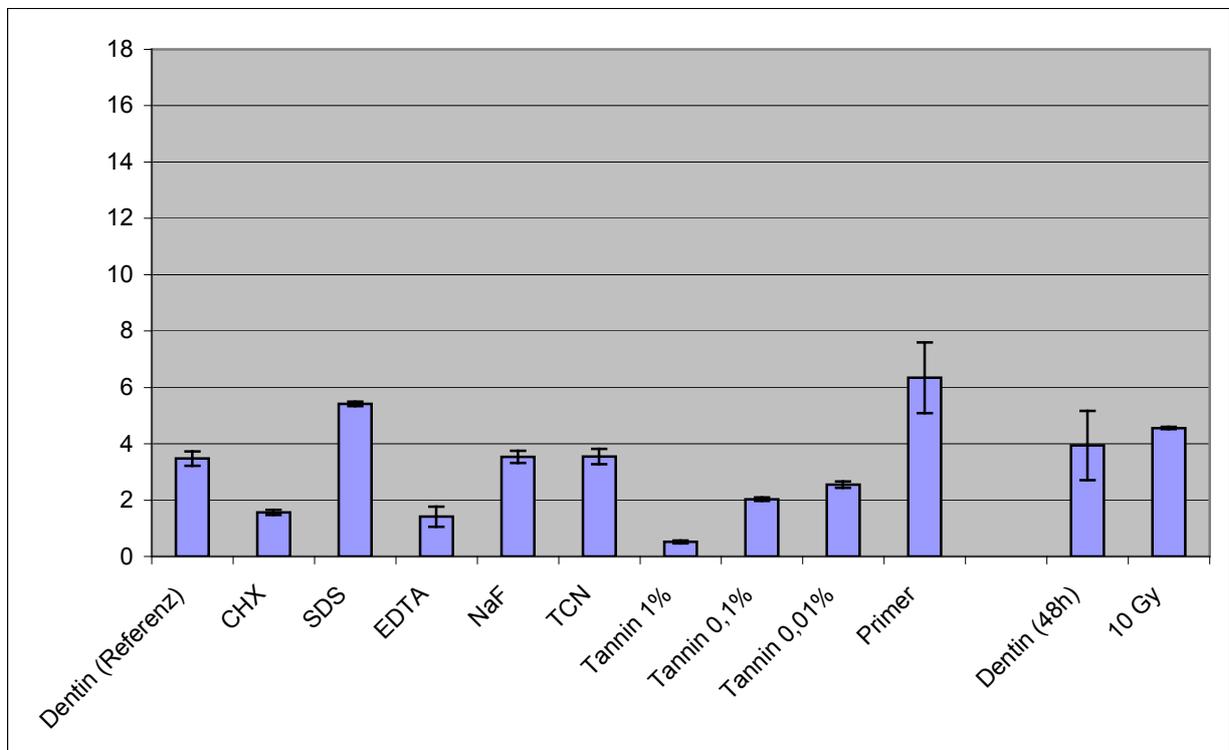


Diagramm 11: Übersichtsgrafik der gelatinolytischen Aktivität im Dentin nach Anwendung der verwendeten Effektoren

Tabelle 8 zeigt die Einzelmesswerte, Mittelwerte und Standardabweichungen der gelatinolytischen Aktivität nach dem Einsatz der verschiedenen Effektoren, die in Versuchsreihe 1-5 verwendet wurden, im Vergleich zur MMP-Aktivität des unbeeinflussten Dentins. Des Weiteren sind in Tabelle 8 die Signifikanzen für den Vergleich der gelatinolytischen Aktivität des Referenzdentins mit der gelatinolytischen Aktivität im Dentin nach Anwendung der verschiedenen Effektoren dargestellt. Im Ergebnis zeigte sich ein signifikanter Unterschied der MMP-Aktivität in den Gruppen CHX, SDS, EDTA, Tannin 1%, Tannin 0,1%, Tannin 0,01% und Primer im Vergleich zur gelatinolytischen Aktivität im Dentin.

Tabelle 8: Übersichtstabelle der Einzelmesswerte, Mittelwerte, Standardabweichungen in RFUs sowie der Signifikanzen für den Vergleich der gelatinolytischen Aktivität im unbehandelten Dentin (Referenz) mit der des Dentins nach Anwendung der verschiedenen Effektoren

Effektoren	Einzelmesswerte						Mittelwerte	Standardabweichung	Signifikanzniveau
Dentin	3875	3553	3131	3510	3297	3492	3476	±252	Referenz
CHX	1621	1694	1544	1587	1476	1446	1561	±92	p<0,001
SDS	5377	5374	5517	5377	5374	5517	5422	±73	p<0,001
EDTA	1787	1377	1078	1787	1377	1078	1414	±318	p<0,001
NaF	3603	3887	3375	3256	3523	3567	3535	±215	p>0,05
TCN-HCl	3379	4030	3281	3508	3683	3399	3546	±273	p>0,05
Tannin 1%	555	496	464	472	526	597	511	±51	p<0,002
Tannin 0,1%	2042	1963	2086	2042	1963	2086	2042	±62	p<0,002
Tannin 0,01%	2683	2514	2464	2683	2514	2464	2553	±102	p<0,001
Primer	8378	6153	7126	5417	4905	6075	6342	±252	p<0,001

Dentin (48h)	4528	4209	4947	4528	4209	4947	3943	±1101	Referenz
10 Gy	3501	2994	5335	3501	2994	5335	4561	±331	p>0,05

5. Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methodik

5.1.1 Herkunft der Dentinproben

Für die vorliegenden Versuche wurden ausschließlich humane, kariesfreie Weisheitszähne verwendet. Dadurch ließ sich eine erhöhte Enzymaktivität aufgrund eines bestehenden kariösen Defektes ausschließen. Weiterhin lassen sich die gewonnenen Ergebnisse direkt auf den Menschen übertragen, da ausschließlich humane Präparate verwendet wurden.

5.1.2 Verwendung von partikulärem Dentin

Das für diese Arbeit verwendete Dentinpulver sollte eine größtmögliche, reaktive Oberfläche aufweisen und soweit wie möglich reproduzierbare, standardisierte Partikeldurchmesser aufweisen. Zur Zerkleinerung und Standardisierung der Dentinpartikel beschreiben Pashley et al. (2004) die Verwendung einer Schwingmühle und nachfolgend das Durchsieben der Partikel in einem 20 µm Sieb. In dieser Untersuchung wurde das Dentinpulver ebenfalls mit einer Schwingmühle für einen Zeitraum von 14 Minuten zermahlen. Die Kontrolle der Dentinpartikelgröße erfolgte in der vorliegenden Arbeit stichprobenartig an einem Transmissionselektronenmikroskop. Dieses Vorgehen stellte sicher, dass keine Dentinpartikel mehr vorhanden waren, deren Durchmesser über einem Wert von 10 µm lag.

Die Verwendung von Dentinpulver geht mit der Problematik einher, dass der zu messende Versuchsansatz nicht aus einer homogenen Flüssigkeit besteht und dadurch möglicherweise die Messung beeinflusst wird. Da das Dentinpulver nicht in Lösung geht, sinkt ein Teil der Zahnhartsubstanz auf den Boden der Versuchsansätze. Dieses Problem einer inhomogenen Flüssigkeit, die im Fluoreszenzdetektor gemessen werden muss, spiegelt sich wieder in der großen Streubreite der Messwerte.

5.1.3 Einrichtung eines Dentinpools

Die Zusammenfassung des gesamten Dentinpulvers in einem Pool hatte zum Ziel, die Versuchsbedingungen im Hinblick auf das Dentin so konstant wie möglich zu

halten und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu gewährleisten. Durch diese Vorgehensweise konnten interindividuelle Unterschiede in der Dentinzusammensetzung als Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Lediglich in Versuchsreihe 4 Punkt 3.4.2 (Primer-Applikation) wurde aufgrund der Versuchsanordnung kein Dentin aus dem Dentinpool verwendet. Somit ist hier ein interindividueller Unterschied in der Dentinqualität möglich.

5.1.4 Kontrollansätze zur Prüfung der Eigenfluoreszenz

Ein Problem innerhalb des Versuchssystems lag darin, dass nicht nur das fluoreszenzmarkierte Substrat eine Fluoreszenz aufwies. Auch bei sämtlichen an den Versuchen beteiligten Substanzen konnte in unterschiedlichem Ausmaß eine Eigenfluoreszenz gemessen werden. Da diese Eigenfluoreszenz der Testsubstanzen möglicherweise zu erhöhten Werten führt, können diese als überhöhte Enzymaktivität fehlgedeutet werden. Daher wurden in allen Versuchsreihen Kontrollversuche in Anlehnung an die Vorgaben von Tay et al. (2006) durchgeführt. Für die Kontrollversuche zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz wurden die Enzymaktivitäten von Dentinpulver mit dem jeweiligen Effektor gemessen. Dieses Vorgehen erlaubte eine Zuordnung dieser Kontrolle zur Enzymaktivität des Hauptversuches.

5.1.5 Zum Nachweis der Enzymaktivität im Dentin

Die Verwendung des kommerziell erhältlichen EnzCheck-Systems zum Enzymaktivitätsnachweis ist bisher schon in der Literatur beschrieben worden (Yokota et al. 2003, Pashley et al. 2004, Hebling et al. 2005, Nishitani et al. 2006). Die Möglichkeit eine Aktivität von Enzymen über die Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Substrates zu messen, stellt ein elegantes Verfahren zum Aktivitätsnachweis von Enzymen dar, da man die umgesetzten Spaltprodukte indirekt über den Anstieg ihrer Fluoreszenz messen kann. Weiterhin ist dieser Versuchsaufbau weitaus weniger zeit- und kostenintensiv als z.B. der Enzymnachweis über eine Polymerase-Ketten-Reaktion. Ein weiterer Vorteil ist, dass das zugegebene Substrat von den verschiedenen MMP-Arten, die im Dentin nachgewiesen sind (MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-20), umgesetzt wird. So lässt der in dieser Arbeit verwendete Versuchsaufbau eine Aussage über die

kollagenolytische / gelatinolytische Aktivität der MMPs im Dentin zu und liefert nicht nur den Nachweis über die Menge der in den Proben vorhandenen MMPs. Die MMPs aus den Dentinproben mussten auch nicht aufgereinigt und in ihre Subgruppen isoliert werden, da für diese Arbeit die kollagenolytische / gelatinolytische Aktivität aller im Dentin befindlichen MMP von Interesse war. Ein Nachteil dieses Testsystems besteht darin, dass man keine Aussage über eine mögliche Aktivierung von Pro-MMPs treffen kann, die ebenfalls im Dentin nachgewiesen sind, da sich diese Proenzyme nicht mit dem EnzCheck-System nachweisen lassen.

5.1.6 Verwendung von Gelatine als Substrat für die Hauptversuche

Im Rahmen dieses Vorversuches wurde untersucht, ob die fluoreszenzmarkierte Gelatine aus dem EnzCheck-System als Substrat für die MMPs des Dentins verwendet werden konnte. In Anlehnung an Tabelle 1 (Lynch and Matrisian 2002, Seite 7-8) stellt nicht nur Kollagen, sondern auch Gelatine ein Substrat für die MMPs des Dentins dar (MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 und MMP-20). Aber auch bei der Verwendung des EnzCheck-Systems in Verbindung mit Dentinpulver ist beschrieben worden, dass Gelatine von den MMPs umgesetzt wird (Hebling et al. 2005). Daher sollte dieser Vorversuch den Nachweis liefern, dass für die weitere Versuchsdurchführung die fluoreszenzmarkierte Gelatine als Substrat Verwendung finden konnte. Im Ergebnis zeigte sich, dass sowohl das fluoreszenzmarkierte Kollagen als auch die fluoreszenzmarkierte Gelatine von den MMPs des Dentins umgesetzt wurde. Die Analyse der gewonnenen Messwerte ergab, dass sich die Enzymaktivitäten des Dentins bei der Verwendung der Substrate Kollagen und Gelatine auf dem gleichen Niveau befanden. Als Schlussfolgerung ließ sich ableiten, dass es keinen Unterschied machte, welches Substrat in diesem Versuch verwendet wurde.

Die in dieser Arbeit verwendete fluoreszenzmarkierte Gelatine entstammte verschiedenen EnzCheck-Kits. Die Verwendung der Gelatine aus den verschiedenen Sätzen birgt eine Fehlerquelle in sich, da möglicherweise die Gelatine aus unterschiedlichen Sets auch differierende Reaktionseigenschaften mit sich bringen könnte.

5.1.7 Festlegung der Inkubationszeit des Dentins mit der Gelatine

Für die Versuchsdurchführung stellte sich die Frage, wie lange die MMPs des Dentins mit der fluoreszenzmarkierten Gelatine inkubiert werden sollten, bis die Messung der kollagenolytischen / gelatinolytischen Aktivität erfolgte. In der Literatur sind dazu unterschiedliche Angaben zu finden. In den Untersuchungen von Yokota et al. (2003) mit dem EnzCheck-System wurden die Proben nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37 °C im Inkubator auf ihre Enzymaktivität hin untersucht. Im Gegensatz dazu werden die Versuchsansätze bei Pashley et al. (2004) erst nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im 37 °C-Inkubator auf die MMP-Aktivität hin untersucht. Aufgrund dieser unterschiedlichen Angaben zur Inkubationszeit diente der Vorversuch aus Punkt 3.3.4 der Überprüfung der Auswirkung der Inkubationszeit auf die kollagenolytische / gelatinolytische Aktivität. Messungen der kollagenolytischen / gelatinolytischen Aktivität wurden nach zwei Stunden und 24 Stunden durchgeführt. Im Ergebnis zeigte sich, dass bereits nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden reproduzierbar eine eindeutige kollagenolytische / gelatinolytische Aktivität zu messen war. Die Messung der kollagenolytischen / gelatinolytischen Aktivität nach 24 h ergab nur geringfügig höhere Werte. Daher wurden in dieser Arbeit die Messwerte, in Anlehnung an Yokota et al. (2003), nach zwei Stunden erhoben.

5.1.8 Festlegung der Inkubationszeit des Dentins mit dem Effektor

Die Kontaktzeit der Effektoren mit dem Dentinpulver wurde auf eine Minute festgelegt. Im Rahmen der Verwendung des EnzCheck-Systems wurde in der Literatur ebenfalls eine Kontaktzeit des Effektors mit dem Dentinpulver von einer Minute beschrieben (Nishitani et al. 2006). Des Weiteren sollte der Anwendungszeitraum auf eine Minute beschränkt bleiben, um so nah wie möglich an einer eventuellen klinischen Anwendung zu bleiben, da lange Applikations- und Einwirkzeiten klinisch nicht umsetzbar wären. Da die Inkubationszeit des Effektors auf die MMPs im Dentinpulver auf eine Minute beschränkt bleiben sollte, wurde der Effektor nach einer Minute abpipettiert und das Dentinpulver mit Pufferlösung gewaschen. Dies sollte eine Interaktion zwischen Effektor und nachfolgendem fluoreszenzmarkierten Substrat verhindern.

5.1.9 Festlegung der Dentinmenge für den Hauptversuch

Die Festlegung der Dentinmenge, die in jedem Reaktionsansatz verwendet werden sollte, diente der Standardisierung des Hauptversuches. Die Verwendung von Dentinpulver mit dem EnzCheck-System ist in der Literatur schon beschrieben worden (Nishitani et al. 2006), wobei pro Reaktionsansatz 80 mg Dentinpulver eingesetzt wurde. Allerdings gibt es keine Angaben, wie diese Menge ermittelt wurde. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit ein Vorversuch den Nachweis liefern, inwieweit der Anstieg der kollagenolytischen / gelatinolytischen Aktivität mit der Menge des zugesetzten Dentinpulvers, als Quelle der Enzyme, korreliert. Dazu wurde Dentinpulver in den Mengen 0 mg, 10 mg, 30 mg, 50 mg und 80 mg in den Reaktionsansatz gegeben. Die Ergebnisse zeigten, dass bei der Erhöhung der Dentinpulvermenge auch eine stärkere Fluoreszenz gemessen werden konnte. Für den Hauptversuch wurden jeweils 50 mg Dentinpulver pro Reaktionsansatz verwendet.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Diskussion der Versuchsreihe 1

In der ersten Versuchsreihe wurde die gelatinolytische Aktivität der MMPs des Dentins per se („Grundaktivität“) sowie nach der Anwendung der Effektoren Chlorhexidin (0,2%), Natriumdodecylsulfat (2%), Ethyldiamintetraacetat (0,1M) und Natriumfluorid (250ppm) in handelsüblicher Konzentration untersucht.

Chlorhexidin wird in 0,1% oder 0,2%iger Form als antibakterielles Therapeutikum in der Mundhöhle verwendet (van Steenberghe et al. 2001). Gerade im Rahmen der Parodontaltherapie und zur Kariesprävention im kariesaktiven Gebiss ist die Wirkung von CHX gut untersucht (Zhang et al. 2006). Es findet Anwendung als Mundspüllösung oder wird direkt als Gel appliziert. In jüngster Zeit wurde CHX auch als potenter Inhibitor der MMPs des Dentins beschrieben (Gendron et al. 1999, Pashley et al. 2004, Hebling et al. 2005, Nishitani 2006), daher sollte in dieser Arbeit die inhibitorische Wirkung von CHX hinsichtlich der gelatinolytischen Aktivität im Dentin bestätigt werden. Die in der Literatur angegebene Reduktion der gelatinolytischen Aktivität nach Anwendung von CHX konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Pashley et al. 2004, Hebling et al. 2005). Die Inaktivierung der

MMPs erfolgt durch Blockade des Zink-Ions am aktiven Zentrum der Enzyme durch die Wirkung des CHX als Chelator (Grenier et al. 2000). Die Aktivität der MMPs nach CHX-Anwendung war signifikant niedriger als im unbehandelten Dentin (ANOVA, Tukey-Test). Gerade diese starke Inhibition bei der kurzen Einwirkzeit von nur einer Minute auf das Dentinpulver macht diesen Wirkstoff sehr interessant, um ihn möglicherweise im Rahmen der adhäsiven Füllungstherapie einzusetzen und so den nachfolgenden Degradationsprozessen vorzubeugen (Carrilho et al. 2007b). In weiteren Arbeiten müsste abgeklärt werden, ob mit einer noch höheren Konzentration von CHX möglicherweise eine stärkere Inhibition der gelatinolytischen Aktivität möglich ist (Carrilho et al. 2007a). Die Kontrollversuche, in denen Dentinpulver mit CHX auf die Eigenfluoreszenz hin untersucht wurde, blieben ohne Auffälligkeiten (Tab. 3).

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein Monoester der Schwefelsäure. SDS ist ein anionisches Tensid, welches als Detergenz Verwendung findet. Detergenzien setzen die Grenzflächenspannung zwischen Oberflächen herab. Daher sind Tenside wie SDS integraler Bestandteil von zahnärztlichen Prophylaxemitteln, wie z.B. Zahnpasten (Platzer 1993). SDS besitzt eine hohe Affinität zum Hydroxylapatit des Zahnschmelzes und wird über elektrostatische Wechselwirkungen an den Kalzium-Ionen des Schmelzes gebunden (Rykke et al. 1990). Somit ist eine Wechselwirkung von SDS und den zweiwertigen Ionen der MMPs möglich. Allerdings gibt es bisher keine Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von SDS und den MMPs des Dentins. Die durchschnittliche Konzentration von SDS in Zahnpasten beträgt zwei Prozent. Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung einer zweiprozentigen Lösung SDS auf die MMP-Aktivität hin untersucht.

SDS wurde bisher als Aktivator der MMPs in der Literatur beschrieben (Hannas et al. 2007). Auch in der vorliegenden Untersuchung zog die Verwendung von SDS eine Erhöhung der gelatinolytischen Aktivität im Vergleich zur Grundaktivität des Dentins nach sich. Die Wirkung von SDS als Detergenz hat keinen inhibierenden Einfluss auf die gelatinolytische Aktivität des Dentins. Der Mechanismus der Aktivierung der MMPs durch SDS ist bisher nicht geklärt. Die Überprüfung von Eigenfluoreszenzen der beteiligten Substanzen im Rahmen der Kontrollversuche blieb ohne Auffälligkeiten (Tab. 3).

Als potentieller Inhibitor der MMPs wurde außerdem die Wirkung von EDTA auf die MMPs untersucht. EDTA ist ein Komplexbildner. In der Labormedizin werden mit EDTA Blutproben ungerinnbar gemacht, indem EDTA das für die Koagulation notwendige Kalzium bindet. Es ist bekannt, dass EDTA ein Bindungsmotiv für zweiwertige Metallionen darstellt. Diese Eigenschaft macht es zu einem vielversprechenden Inhibitor der MMP-Aktivität. Aufgrund der Tatsache, dass es bisher keinerlei Erkenntnisse über die Anwendung von EDTA in Verbindung mit dem EnzCheck-System gibt, sollte dieser potentielle Inhibitor auf seine Fähigkeit, die gelatinolytische Aktivität im Dentin zu reduzieren, getestet werden.

Die Anwendung von EDTA in 0,1 molarer Verdünnung ergab die in der Literatur beschriebene Reduktion der MMP-Aktivität (Osorio et al. 2005). Die Wirkung von EDTA beruht auf der starken Metall-Chelator-Kapazität. Von allen Effektoren in der Versuchsreihe 1 war die aktivitätsreduzierende Wirkung nach Anwendung von EDTA (0,1M) am stärksten ausgeprägt.

Bisher wird EDTA auf dem dentalen Sektor im Rahmen von endodontischen Behandlungen als Spüllösung von Wurzelkanälen eingesetzt (Hülsmann et al. 2003). Denkbar wäre es, das Spektrum der Anwendung für EDTA zu erweitern und auch in füllungstherapeutische Werkstoffe, mit dem Ziel der Inhibition der MMP-Aktivität, zu integrieren. Die Messung der Eigenfluoreszenz von Dentin mit EDTA ohne fluoreszenzmarkiertes Substrat blieb ohne Auffälligkeiten (Tab. 3).

Fluoridpräparate werden im Rahmen der alltäglichen, häuslichen Zahnpflege zur Kariesprophylaxe eingesetzt. Fluoride werden als Zahnpaste, Mundspüllösung oder als Lack verwendet. Aufgrund der weiten Verbreitung und Akzeptanz in der Bevölkerung sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob die Verwendung von fluoridhaltigen Präparaten in handelsüblicher Konzentration eine Wirkung auf die MMPs des Dentins hat. Die Anwendung des EnzCheck-System mit einer fluoridhaltigen Lösung ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mundspüllösung mit einem Fluoridgehalt von 250 ppm Natriumfluorid getestet. Die Anwendung dieser Spüllösung als potentieller MMP-Inhibitor ergab keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur der gelatinolytischen Aktivität des unbehandelten Dentins (ANOVA, Tukey-Test). Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass mit der Anwendung von fluoridhaltigen Agenzien keine Reduktion der gelatinolytischen Aktivität im Dentin einhergeht.

Auch hier ergab die Durchführung der Kontrollansätze keine Auffälligkeiten (Tab. 3).

5.2.2 Diskussion der Versuchsreihe 2

Tetracycline werden derzeit in der Zahnmedizin nur bei der Behandlung marginaler Parodontitiden verwendet. Insbesondere ihre antibiotische Wirkung gegenüber spezifischen Erregern machen sie attraktiv zur medikamentösen Therapie bei parodontalen Erkrankungen (Al-Nawas 2002).

Tetracyclinpräparate werden in der Literatur zusätzlich als wirksame Inhibitoren der MMPs beschrieben (Agan et al. 2006). Gerade im Rahmen der medikamentösen Parodontaltherapie sollen sie die MMP-Aktivität in der parodontalen Tasche inhibieren (Garlet et al. 2004). In dieser Versuchsreihe sollte abgeklärt werden, ob sich eine enzyminhibierende Wirkung der Tetracycline mit dem EnzCheck-System auch am Dentinpulver nachweisen lässt. Dazu wurde für die Versuche die Wirkung eines handelsüblichen Tetracyclinhydrochlorids auf die die gelatinolytische Aktivität untersucht. Im Ergebnis ließ sich zunächst keine Hemmung der gelatinolytischen Aktivität nach dem Einsatz von Tetracyclin nachweisen. Allerdings lieferte die Kontrolle dieses Versuches einen auffällig hohen Wert (Tab. 4). Die am Versuch beteiligten Substanzen (Dentin und Tetracyclin) zeigten eine hohe Eigenfluoreszenz. Zieht man diesen Kontrollwert von der gelatinolytischen Aktivität des Hauptversuches ab, so ergibt sich ein niedrigerer Wert, der auf dem Niveau der gelatinolytischen Aktivität nach dem Einsatz von CHX liegt. Somit scheinen Tetracycline auch am Dentin eine Hemmung der gelatinolytischen Aktivität zu bewirken.

Allerdings können Tetracycline aufgrund von Kontraindikationen und Nebenwirkungen nicht grundsätzlich in zahnärztliche Prophylaxemittel des alltäglichen Gebrauchs integriert werden. Die antibakterielle Wirkung und die damit auch verbundene Gefahr einer Resistenzbildung bei Bakterien verbieten den täglichen Gebrauch in dentalen Prophylaxeprodukten. Aber auch eine Gravidität bedarf einer gesonderten Indikationsstellung für die Anwendung von Tetracyclinen, da Tetracycline die Schmelzbildung der fetalen Zahnanlagen schädigen. Ebenso wie bei Kindern und Jugendlichen, deren Zahnwachstum noch nicht abgeschlossen ist, ist der Einsatz dieser Substanzklasse als Standardtherapeutikum wegen möglicher Zahnverfärbungen nicht ideal (Al-Nawas

2002). Aufgrund dieser Anwendungsbeschränkungen scheinen Tetracycline nicht uneingeschränkt zur Inhibition der MMPs des Dentins geeignet.

Eine mögliche Erweiterung des Einsatzspektrums von Tetracyclinen könnte sich durch die Verwendung von „Chemisch Modifizierten Tetracyclinen“ (CMTs) ergeben. Diese werden durch eine chemische Modifikation auf molekularer Ebene in eine nicht mehr antibiotisch wirksame Form überführt. Dazu wird eine Dimethylaminogruppe am „A“-Ring des Moleküls ausgetauscht (Archarya et al. 2004). Die Wirkung der CMTs als Inhibitor der MMPs wird in der Literatur beschrieben (Golub et al. 1987, Tjäderhane et al. 2007). Durch den Verlust der antibiotischen Fähigkeit könnte möglicherweise das Problem der Resistenzbildung bei Bakterien umgangen werden. Eine schädliche Wirkung der CMTs in der Zahnentwicklung ist bisher nicht beschrieben worden. In weiteren Versuchen müssten CMTs auch in Verbindung mit dem EnzCheck-System auf ihre Fähigkeit, MMPs zu inhibieren, getestet werden. Möglicherweise kann man durch den Einsatz von CMTs die MMP-Aktivität im Dentin inhibieren, ohne die schädlichen Wirkungen der konventionellen Tetracycline in Kauf nehmen zu müssen.

5.2.3 Diskussion der Versuchsreihe 3

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Wirkung von polyphenolhaltigen Substanzen auf die gelatinolytische Aktivität der MMPs im Dentin überprüft. Bisher ist bezüglich der Einsatzmöglichkeit von Polyphenolen in der Zahnmedizin nur bekannt, dass die Gruppe der Polyphenole antibakterielle Eigenschaften gegenüber kariesrelevanten Bakterien aufweist (Smullen et al. 2006, Daglia et al. 2007). Das Potential der Polyphenole, MMPs zu inhibieren, ist bisher im Rahmen der Tumorthherapie beschrieben worden (Demeule et al. 2000, Garbisa et al. 2001, Sartor et al. 2002, Tanimura et al. 2005). Diese Arbeit sollte den Nachweis liefern, ob sich die in der Literatur beschriebene Eigenschaft von polyphenolhaltigen Agenzien zur Hemmung der MMP-Aktivität auch auf die MMP-Aktivität im Dentin übertragen lässt. Denn bisher gibt es zur Anwendung von Polyphenolen zur Hemmung der gelatinolytischen Aktivität der MMPs des Dentins keine Erkenntnisse. Die Fähigkeit polyphenolhaltiger Präparate mit Proteinen der EZM zu interagieren ist verantwortlich für die Inhibition der MMPs. Die Hydroxylgruppen der Polyphenole können die Peptidkette von Enzymen chelieren

(Cheynier et al. 2005, Kontogiorgis et al. 2005). Dieser Vorgang führt zum Verlust der biologischen Aktivität der MMPs.

Weiterhin ist das inhibitorische Potential der Polyphenole zurückzuführen auf ihre Eigenschaft, zweiwertige Kationen zu binden (Fernandez et al. 2002, Soobratte et al. 2005). Da MMPs Zink als zweiwertiges Metallion in ihrer Struktur aufweisen, wird das Zink cheliiert und steht somit nicht mehr für die Aktivität des Enzyms zur Verfügung. Polyphenole sind in größeren Mengen enthalten in z.B. Rotwein, grünem Tee, schwarzem Tee und Tanninen.

In dieser Arbeit wurde Tanninsäure in der Verdünnung 1%, 0,1% und 0,01% hinsichtlich der Inhibition der gelatinolytischen Aktivität der MMPs untersucht. Der Einsatz von Tanninsäure erbrachte eine signifikante Reduktion der MMP-Aktivität (ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der des Referenzdentins. Dabei zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Tanninsäure die MMPs in ihrer Aktivität zu hemmen. Der Anstieg der Konzentration der Tanninsäure ging mit der Reduktion der Enzymaktivität des Dentins einher. Als Kontrolle wurden die verschiedenen Tanninsäurelösungen in Verbindung mit Dentin auf die Eigenfluoreszenz hin getestet (Tab. 5) Die Durchführung der Kontrollen blieb ohne Auffälligkeiten. Die Anwendung von Tanninsäure in 1%iger Lösung ergab weiterhin eine signifikant niedrigere Enzymaktivität als der Einsatz von CHX (0,2%) (ANOVA, Tukey-Test). Aufgrund dieses Ergebnisses sind weitere Untersuchungen zum inhibitorischen Potential der Polyphenole von Interesse, da es abzuklären gilt, ob der enzymreduzierende Effekt auch in vivo nachzuweisen ist. Wäre dies der Fall, so stünde möglicherweise ein stärkerer Effektor für die Reduktion der Enzymaktivität im Dentin als bisher zur Verfügung. Weiterhin wäre es von Interesse, ob die Anwendung von CHX in einer aufsteigenden Konzentration ebenfalls eine erniedrigte Enzymaktivität nach sich ziehen würde. Dies gilt es in weiteren Untersuchungen abzuklären.

Möglicherweise sind diese Substanzen in der Lage, die Progression von MMP-induzierten Schädigungen des Kollagenetzwerkes zu hemmen. Der Mangel von unerwünschten Nebenwirkungen bei natürlich gewonnenen Polyphenolen macht sie sehr attraktiv, um sie in dentale Prophylaxeprodukte zu integrieren (Chaussain-Miller et al. 2006). Da eine starke enzymhemmende Wirkung bereits bei einer Applikationszeit von einer Minute beobachtet wurde, kann man Polyphenole

möglicherweise in Zahnpasten und Mundspüllösungen verwenden oder direkt als Lack auf die Zahnoberflächen applizieren.

5.2.4 Diskussion der Versuchsreihe 4

Immer häufiger werden selbstätzende Primer in der adhäsiven Zahnheilkunde verwendet. Die Zeitersparnis in der Anwendung dieser Primer macht sie sehr attraktiv als Alternative zur klassischen „Etch-and-Rinse“ Technik. Die Wirkung dieser zahnärztlichen Primer auf die MMPs im Dentin ist nicht vollständig geklärt. Bisher weiß man, dass ein saurer pH-Wert die MMPs von ihrer inaktiven Proform in eine biologisch aktive Form überführen kann (Tjäderhane et al. 1998, Sulkala et al. 2002). Da selbstätzende Primer einen pH-Wert aufweisen, der zwischen pH 1-3 liegt, war es ein Ziel dieser Arbeit, die Aktivität der MMPs im Dentin nach Anwendung eines selbstätzenden Primers zu ermitteln. Die Anwendung des Primers erbrachte nachfolgend einen Anstieg der Enzymaktivität des Dentins. Mit diesen Ergebnissen konnten die Erkenntnisse der Literatur bezüglich der Anwendung selbstätzender Primer bestätigt werden (Nishitani et al. 2006, Tay et al. 2006). Als Referenz diente die Enzymaktivität des nicht mit dem Primer behandelten Dentins. Bei diesem Versuch musste von dem üblichem Schema (Punkt 3.4.1) abgewichen werden, da das Dentin, welches mit dem Primer behandelt wurde, nicht aus dem Dentinpool stammte. Die Anwendung wurde in Punkt 3.4.2 beschrieben.

Es wird angenommen, dass der Anstieg dieser Enzymaktivität eine Ursache für die Degradation der Hybridschicht zwischen Kollagengeflecht und Kunststoffmatrix sein könnte (Hashimoto et al. 2002). Hierbei geht man derzeit davon aus, dass die Infiltration des sauren Primers in das Kollagennetzwerk eine vermehrte Produktion von MMPs nach sich zieht. In weiteren Versuchen gilt es abzuklären, ob durch den Einsatz eines geeigneten Inhibitors dieser Anstieg der MMP-Aktivität reduziert werden kann (Nishitani et al. 2006). Denkbar wäre es, diese Inhibitoren in dentale Adhäsivprodukte zu integrieren. Reduziert man so die nachfolgenden enzymatischen Abbauvorgänge, so lassen sich möglicherweise diese Degradationsprozesse in der Hybridschicht zwischen organischer Matrix des Dentins und Bestandteilen der dentalen Adhäsivsysteme aufhalten. Würden diese Degradationsprozesse durch MMP-Inhibitoren gestoppt, so kann dies ein Faktor sein, der den Haftverbund von Dentin und Füllungsmaterial optimiert und den

klinischen Erfolg der adhäsiven Füllungstherapie sicherstellt. In zukünftigen Arbeiten müssten die MMP-Inhibitoren an extrahierten Zähnen und artifiziell gelegten Füllungen im Rahmen eines Kaulastversuches getestet werden, um die gewonnenen Neuerkenntnisse zu bestätigen und nachfolgend diese Inhibitoren auch klinisch zum Einsatz zu bringen.

5.2.5 Diskussion der Versuchsreihe 5

Die Bestrahlung stellt einen unverzichtbaren Bestandteil des Therapiespektrums zur Behandlung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich dar (Grötz 2002). Häufig werden bei dieser Therapieform hohe Dosen appliziert (>60 Gy). Eine Problematik hierbei ist, dass sich Kiefer, Speicheldrüsen und Zähne meist im Herdvolumen des Strahlenfeldes befinden. Die Anwendung dieser Therapieform im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich kann daher verschiedene Kollateralschäden mit sich bringen, wie zum Beispiel radiogene Mukositis, Radioxerostomie, infizierte Osteoradionekrose oder das Krankheitsbild der „Strahlenkaries“. Die Strahlenkaries wurde erstmals 1922 von Gotthard beschrieben (Gotthard 1922). Diese radiogene Karies manifestiert sich klinisch in erweichtem Dentin. Dieser Defekt breitet sich von peripher nach zentral hin aus und ist nicht auf bereits füllungstechnisch versorgte Zähne begrenzt. Im Gegenteil stellt sich das Dentin unter Vollgussrestorationen nach Strahlenbehandlung intakt dar. Die genauen Ursachen für dieses Krankheitsbild sind nicht geklärt. Als Ursachen gelten bisher eine direkte Strahlenwirkung (Raab et al. 1990) und eine indirekte Strahlenwirkung im Sinne einer Radioxerostomie (Grötz et al. 2001). Eine zahnärztliche Maßnahme zur Kariesprophylaxe prae-, intra- und postradiationem ist die lokale Applikation von Fluoridpräparaten mittels individuell angefertigter Schienen als Medikamententräger (Jansma et al. 1989). Der remineralisierende Effekt auf den Zahnschmelz durch lokale Fluoridierung ist in der Literatur beschrieben (Kielbassa et al. 2000). Eine Hypothese der vorliegenden Untersuchung ist es jedoch, dass die orale Manifestation der Strahlenkaries auf einen Anstieg der MMP-Aktivität infolge der Bestrahlung zurückzuführen ist. Diese Arbeit zeigt auch, dass die Anwendung von fluoridhaltigen Präparaten keine Reduktion der gelatinolytischen Aktivität mit sich bringt (Punkt 4.1). In jüngsten Untersuchungen ist belegt worden, dass ein strahleninduzierter Schaden am Zahn häufig an der Schmelz-Dentin-Grenze auftritt, da diese Gewebegrenzfläche als locus minoris resistentiae

verstanden wird (Grötz et al. 1997, Pioch et al. 1992, Pioch et al. 1997). Möglicherweise gibt es hier einen Zusammenhang zwischen dieser Prädilektionsstelle für strahleninduzierte Schäden am Zahn und der erhöhten Konzentration von MMPs an der Schmelz-Dentin-Grenze (Goldberg et al. 2003). Bisher ist im Rahmen der strahlentherapeutischen Behandlung eine Erhöhung der MMP-Aktivität in humanem Lungenepithel beschrieben worden (Araya et al. 2001). Ziel der Versuche war es, eine Beziehung zwischen der Anwendung ionisierender Strahlung und einer möglicher Erhöhung der gelatinolytischen Aktivität im Dentin nachzuweisen.

In diesem Versuch wurde die Durchführung modifiziert, indem das bestrahlte und unbestrahlte Dentinpulver bis zur Messung 48h im Inkubator gelagert wurde. Als Kontrolle und Referenz wurde unbestrahltes Dentin ebenfalls für 48h im 37 °C Inkubator gelagert und dann die gelatinolytische Aktivität gemessen. Diese Lagerung diente dazu, einer möglichen Aktivierung der MMPs durch die ionisierende Strahlung ausreichend Zeit zu geben. Nach dem Einsatz von 10 Gy konnten im Mittel höhere Werte für die gelatinolytische Aktivität gemessen werden, als beim Referenzdentin. Die Steigerung der gelatinolytischen Aktivität nach der Bestrahlung war allerdings nicht signifikant höher als bei unbestrahltem Dentin (Tab. 8), welches ebenfalls 48h im 37°C Inkubator gelagert wurde. In weiteren Untersuchungen müssten diese Ergebnisse bestätigt werden, um mehr über die Mechanismen einer möglichen Aktivierung der MMPs durch ionisierende Strahlung zu erfahren. Dies scheint umso wichtiger, da über diese Problemstellung bisher in der Literatur nichts bekannt ist und hier ein Faktor für das Krankheitsbild der Strahlenkaries vorliegen könnte. Sollte sich diese Beobachtung der erhöhten gelatinolytischen Aktivität nach Anwendung von ionisierender Strahlung bestätigen, gilt es auch die derzeitigen Therapieansätze bei der Strahlenkaries zu überdenken. Eine Option der Erweiterung des Therapiespektrums wäre es, die im Strahlenfeld liegenden Bereiche, wie zum Beispiel Zähne und Alveolarfortsatz abzuschirmen, um so eine mögliche Aktivierung der MMPs zu verhindern. Eine weitere Option zur Vermeidung von MMP assoziierten Degradationsprozessen, die möglicherweise durch die Bestrahlung induziert worden sind, könnte es sein, MMP-Inhibitoren lokal zu applizieren. Denkbar wäre es, diese Inhibitoren, gleich der Anwendung von Fluoridpräparaten, prä-, intra- und postradiationem über eine Schienenversorgung

zu verabreichen. Jedoch müssten zunächst diese in vitro gewonnenen Daten in weiteren Versuchen bestätigt werden. Aber auch der Nachweis der Enzymaktivität des Dentins von strahlenerkrankten, extraktionswürdigen Zähnen wäre von Interesse und müsste zukünftig untersucht werden.

5.3 *Schlußfolgerungen*

Schlussfolgerung aus Fragestellung 1:

Die Fragestellung war, ob sich mit dem in dieser Untersuchung verwendeten EnzCheck-System eine gelatinolytische / kollagenolytische Enzymaktivität im Dentin nachweisen lässt. Als Schlussfolgerung aus den Vorversuchen und Versuchen konnte man feststellen, dass sich diese Enzymaktivität eindeutig und reproduzierbar nachweisen ließ.

Schlussfolgerung aus Fragestellung 2:

Die zweite Fragestellung war, welchen Einfluss zahnärztlich-prophylaktische Substanzen, wie Chlorhexidin, Natriumdodecylsulfat, Ethylendiamintetraacetat und Natriumfluorid, auf die gelatinolytische Aktivität im Dentin haben. Die Versuche ergaben, dass die Verwendung von Chlorhexidin und Ethylendiamintetraacetat die MMP-Aktivität im Dentin signifikant reduzierte. Der Einsatz von Natriumdodecylsulfat ergab einen signifikanten Anstieg in der gelatinolytischen Aktivität der MMPs. Die Behandlung des Dentins mit Natriumfluorid ließ keine Wirkung auf die gelatinolytische Aktivität im Dentin erkennen.

Schlussfolgerung aus Fragestellung 3:

Es sollte untersucht werden, ob Tetracycline eine inhibitorische Wirkung auf die MMP-Aktivität haben. Als Erkenntnis aus diesem Versuch wurde abgeleitet, dass Anwendung von Tetracyclinen mit einer Reduktion der gelatinolytischen Aktivität einhergeht.

Schlussfolgerung aus Fragestellung 4:

Es sollte geprüft werden, ob sich die in der Literatur beschriebene inhibierende Wirkung polyphenolhaltiger Substanzen (Tanninsäure) auch auf die gelatinolytische Aktivität der MMPs im Dentin übertragen lässt. Die Versuche zeigten, dass sich die gelatinolytische Aktivität des Dentins durch Einsatz von

Tanninsäure effektiv reduzieren lässt und dass diese Reduktion der gelatinolytischen Aktivität abhängig von der Konzentration der verwendeten Tanninsäure ist.

Schlussfolgerung aus Fragestellung 5:

In dieser Arbeit sollte die in der Literatur beschriebene Steigerung der gelatinolytischen Aktivität der MMPs bei der Anwendung von selbstätzenden Primern überprüft werden. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Anwendung des getesteten dentalen Primers mit einer Steigerung der gelatinolytischen Aktivität der MMPs des Dentins einhergeht.

Schlussfolgerung aus Fragestellung 6:

Die Fragestellung war, ob der Einsatz ionisierender Strahlen einen Einfluss auf die gelatinolytische Aktivität im Dentin hat. Als Schlussfolgerung konnte gezogen werden, dass die Anwendung von ionisierender Strahlung in der Tendenz eine Erhöhung der gelatinolytischen Aktivität zeigte. Möglicherweise ist dieser Anstieg der gelatinolytischen Aktivität ein Faktor für strahleninduzierte Schäden am Zahn.

6. Literaturverzeichnis

1. Acharya MR, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A (2004) Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resist Update* 7: 195-208
2. Agan S, Sonmez S, Serdar M (2006) The effect of topical doxycycline usage on gingival crevicular fluid MMP-8 levels of chronic and aggressive periodontitis patients. *Int J Dent Hyg* 4: 114-21
3. Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, Werb Z (1996) Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122: 1723-1736
4. Al-Nawas B (2002) Einsatz von Antibiotika in der zahnärztlichen Praxis. *Dtsch Zahnärztl Z* 57: 8-12
5. Araya J, Maruyama M, Sassa K, Fujita T, Hayashi R, Matsui S, Kashii T, Yamashita N, Sugiyama E, Kobayashi M (2001) Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 production in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: 30-8
6. Beniash E, Skobe Z, Bartlett JD (2006) Formation of the dentino-enamel interface in enamelysin (MMP-20)-deficient mouse incisors. *Eur J Oral Sci* 1: 24-9
7. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993) Matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 97-250
8. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K (1998) Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 55: 639-52

9. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L (2007a) Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 86: 90-4
10. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D (2007b) In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 86: 529-533
11. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S (2006) The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 85: 22-32
12. Cheynier V (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 81: 223-229
13. Daglia M, Papetti A, Grisoli P, Aceti C, Dacarro C, Gazzani G (2007) Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. *J Agric Food Chem* 55: 5038-5042
14. Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R (2000) Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 1478: 51-60.
15. Dung SZ, Gregory RL, Li Y, Stookey GK (1995) Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. *Caries Res* 29: 483-9
16. Eastoe JE (1967) Chemical organization of the organic matrix of dentine structure and chemical organization of teeth vol. III, Academic Press, London
17. Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, Goldberg M (2004) Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci* 112: 171-176

18. Fernandez MT, Mira ML, Florencio MH, Jennings KR (2002) Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem* 92: 105-11
19. Gapski R, Barr JL, Sarment DP, Layher MG, Socransky SS, Giannobile WV (2004) Effect of systemic matrix metalloproteinase inhibition on periodontal wound repair: a proof of concept trial. *J Periodontol* 75: 441-52
20. Gagliano N, Moscheni C, Torri C, Magnani I, Bertelli AA, Gioia M (2005) Effect of resveratrol on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) on human cultured glioblastoma cells. *Biomed Pharmacother* 59: 359-64
21. Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A (2001) Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavonol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer* 91: 822-832
22. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS (2004) Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004 31: 671-9
23. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D (1999) Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 437-9
24. Goldberg M, Septier D, Bourd K, Hall R, George A, Goldberg H, Menashi S (2003) Immunohistochemical localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in the forming rat incisor. *Connect Tissue Res* 44: 143-53
25. Golub LM, McNamara TF, D'Angelo G, Greenwald RA, Ramamurthy NS (1987) A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J Dent Res* 66: 1310-4

26. Gotthard F (1922) Über Zahnschäden nach Röntgenstrahlungen. Dtsch Röntgen-Ges 13: 139-42
27. Grenier D (1993) Reduction of proteolytic degradation by chlorhexidine. J Dent Res 72: 630-633
28. Grötz KA, Duschner H, Kutzner J (1997) Neue Erkenntnisse zur Ätiologie der sogenannten Strahlenkaries. Nachweis direkter radiogener Veränderungen an der Schmelz-Dentin-Grenze. Strahlenther Onkol 173: 668-76
29. Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W (1998) Histomographische Untersuchungen zur Frage direkt radiogener Schmelzveränderungen. Mund Kiefer GesichtsChir 2: 85-90
30. Grötz KA, Riesenbeck D, Brahm R, Seegenschmiedt MH, Al-Nawas B, Dörr W, Kutzner J, Willich N, Thelen M, Wagner W (2001) Chronische Strahlenfolgen an Zahnhartgeweben ("Strahlenkaries"). Strahlenther Onkol 177: 96-104
31. Grötz KA (2002) Zahnärztliche Betreuung von Patienten mit tumortherapeutischer Kopf-Hals-Bestrahlung. Strahlenther Onkol 179: 275-278
32. Gross J, Lapiere CM (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci USA 48: 1014-22
33. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L (2007) The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Acta Odontol Scand 65: 1-13
34. Hannig M, Reinhardt KJ, Bott B (1999) Self-etching primer vs phosphoric acid: an alternative concept for composite-to enamel bonding. Oper Dent 24: 172-80
35. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, Oguchi H, Araki Y, Kubota M (2002) Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. J Biomed Mater Res 63: 306-11

36. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR (2005) Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 84: 741-6
37. Hellwig E, Klimek, Attin T (2006) Einführung in die Zahnerhaltung. 4. Auflage Urban & Fischer Verlag, München, Jena
38. Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A (2003) Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J* 36: 810-30
39. Imafuku Y, Meguro S, Kanno K, Hiraki H, Nemoto U, Hata R, Takahashi K, Miura Y, Yoshida H (2002) The effect of EDTA contaminated in sera on laboratory data. *Clin Chim Acta* 325: 105-11
40. Jansma J, Vissink A, Gravenmade EJ, Visch LL, Fidler V, Retief DH (1989) In vivo study on the prevention of postradiation caries. *Caries Res* 23: 172-8
41. Johnson S and Knox A (1999) Autocrine production of matrix metalloproteinase-2 is required for human airway smooth muscle proliferation. *Am J Physiol* 227: 1109 -1117
42. Jones IL Leaver AG (1974) Studies on the minor components of the organic matrix of human dentine. *Arch Oral Biol* 19: 371-380
43. Katz S Park KK Palenik CJ (1987) In-vitro root surface caries studies. *J Oral Med* 42: 40-8
44. Kielbassa AM, Shohadai SP, Schulte-Mönting J (2001) Effect of saliva substitutes on mineral content of demineralized and sound dental enamel. *Support Care Cancer* 9: 40-7
45. Kontogiorgis CA, Papaioannou P, Hadjipavlou-Litina DJ (2005) Matrix metalloproteinase inhibitors: a review on pharmacophore mapping and (Q)SARs results. *Curr Med Chem* 12: 339-55

46. Linde A, Goldberg M (1993) Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 679-728
47. Löffler (2006) *Basiswissen Biochemie*, 6.Auflage, Springer Medizinverlag, Heidelberg, 692-693
48. Lund LR, Romer J, Bugge TH, Nielsen BS, Frandsen TL, Degen JL, Stephens RW, Dano K (1999) Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *EMBO J* 18: 4645-4656
49. Lynch CC, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 70: 561-73
50. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM (2000) The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 45: 757-65
51. Miralles F, Battelino T, Czernichow P, Scharfmann R (1998) TGF-beta plays a key role in morphogenesis of the pancreatic islets of Langerhans by controlling the activity of matrix metalloproteinase MMP2. *J Cell Biol* 143: 827-836
52. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, Di Lenarda R, Pashley DH, Breschi L (2007) Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and MMP-9 forms in human sound dentin. *J Dent Res* 86: 436-440
53. Nagase H, Woessner JF (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-4
54. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH (2006) Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 114: 160-6
55. Nordbø H, Leirskar J, Ngo H, Mount GJ, Wahlgreen J (2003) The influence of a Matrix Metalloproteinase on the remineralization of artificially demineralised Dentin. *Oral Health Prev Dent* 1: 267-272

56. Nuti E, Tuccinardi T, Rossello A (2007) Matrix metalloproteinase inhibitors: New challenges in the era of post broadspectrum inhibitors. *Curr Pharm Des* 13: 2087-2100
57. Osorio R, Erhardt MCG, Pimenta LAF, Osorio E, Toledano M (2005) EDTA treatment improves resin-dentin bonds resistance to degradation. *J Dent Res* 84: 736-740
58. Overall CM, Lopez-Otin C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2: 657-72
59. Palosaari H, Ding Y, Larmas M, Sorsa T, Bartlett JD, Salo T, Tjäderhane L (2002) Regulation and interactions of MT1-MMP and MMP-20 in human odontoblasts and pulp tissue in vitro. *J Dent Res* 81: 354-9
60. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T (2003) Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci* 111: 117-27
61. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S (2004) Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 83: 216-21
62. Percival RS, Devine DA, Duggal MS, Chartron S, Marsh PD (2006) The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Eur J Oral Sci* 114: 343-8
63. Pioch T, Golfels D, Staehle H (1992) An experimental study of the stability of irradiated teeth in the region of dentinoenamel junction. *Endod Dent Traumatol* 8: 241-4

64. Pioch T, Mayer T (1997) Untersuchungen an Frakturflächen von Zähnen mit „radiogener Karies“. *Stomatologie* 97: 19-25
65. Platzer U (1993) Zur Anwendung Natriumlaurylsulfat-haltiger Zahnpasten. *Dtsch Zahnärztl Z* 48: 93
66. Raab WH, Petschelt A, Voss A (1990) Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur radiogenen Karies. *Dtsch Zahnärztl Z* 45: 425-7
67. Rykke M, Rölla G, Sönju T (1990) Effect of sodium lauryl sulfate on protein adsorption to hydroxyapatite in vitro and on pellicle formation in vivo. *Scand J Dent Res* 98: 135-43
68. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, Pashley DH (1999) Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer in vivo. *J Dent Res* 78: 906-11
69. Sano H (2006) Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. *J Dent Res* 85: 11-14
70. Santos MC, de Souza AP, Gerlach RF, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Line SR (2004) Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. *J Oral Rehabil* 31: 660-4
71. Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S (2002) Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol* 64: 229-237
72. Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbe A, Storey DM (2006) The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against streptococcus mutans. *Caries Res* 41: 342-349

73. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res* 579: 200-13
74. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T (2004) Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 10: 311-8
75. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mäntylä P (2006) Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 38: 306-321
76. Souza AP, Gerlach RF, Line SR (2001) Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials* 22: 2025-30
77. Sternlicht M, Coussens LM, Vu TH, Werb Z (2000) Biology and regulation of matrix metalloproteinases. In *cancer drug discovery and development: Matrix Metalloproteinase inhibitors in cancer therapy*. Humana Press Inc.1-37
78. Strup-Perrot C, Vozenin-Brotans MC, Vandamme M, Benderitter M, Mathe D (2006) Expression and activation of MMP -2, -3, -9, -14 are induced in rat colon after abdominal X-irradiation. *Scand J Gastroenterol* 41: 60-70
79. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, Tjäderhane L (2001) The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res* 80: 1545-9
80. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L (2002) The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 81: 603-7
81. Sulkala M, Paakkonen V, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L (2004) Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13, collagenase-3) is highly expressed in human tooth pulp. *Connect Tissue Res* 45: 231-7

82. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L (2007) Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* 52: 121-7
83. Tanimura S, Kadomoto R, Tanaka T, Zhang Y, Kouno I, Kohno M (2005) Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolysable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity. *Biochem Biophys Res Comm* 330: 1306-1313
84. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R (2006) Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod* 32: 862-8
85. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T (1998) The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 77: 1622-9
86. Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T (2001) Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res* 15: 55-8
87. Tjäderhane L, Hotakainen T, Kinnunen S, Ahonen M, Salo T (2007) The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis. *Int Endod J* 40: 282-9
88. Terp GA, Cruciani G, Christensen IT, Jørgensen FS (2001) Structural differences of matrix metalloproteinases with potential implications for inhibitor selectivity examined by grid/cpca approach. *J Med Chem* 45: 2675-2684
89. Tweetman S (2004) Antimicrobials in future caries control? *Caries Res* 38: 223-9

90. Väänänen A, Srinivas R, Parikka M, Palosaari H, Bartlett JD, Iwata K, Grenman R, Stenman UH, Sorsa T, Salo T (2001) Expression and regulation of MMP-20 in human tongue carcinoma cells. *J Dent Res* 80: 1884-9
91. van Houte J (1994) Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 73: 672-81
92. van Meerbeek B, Van Landuyt K, De Munck J, Hashimoto M, Peumans M, Lambrechts P, Yoshida Y, Inoue S, Suzuki K (2005) Technique-sensitivity of contemporary adhesives. *Dent Mater J* 24: 1-13
93. van Steenberghe D, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Coucke W, Lijnen A, Quirynen M (2001) Effect of different mouth rinses on morning breath. *J Periodontol* 72: 1183-91
94. van Strijp AJ, van Steenberghe TJ, de Graaff J, ten Cate JM (1994) Bacterial colonization and degradation of demineralized dentin matrix in situ. *Caries Res* 28: 21-7
95. van Strijp AJ, van Steenberghe TJ, ten Cate JM (1997) Effects of chlorhexidine on the bacterial colonization and degradation of dentin and completely demineralized dentin in situ. *Eur J Oral Sci* 105: 27-35
96. van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V (2003) Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res* 37: 58-65
97. Verstappen J, Von den Hoff JW (2006) Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Their biological functions and involvement in oral disease *J Dent Res* 85: 1074-84
98. Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-39

99. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z (1998) MMP-9 / gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93: 411-422
100. Vu TH, Werb Z (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14: 2123-33
101. Wang Y, Morlandt AB, Xu X, Carnes DL Jr, Chen Z, Steffensen B (2005) Tetracycline at subcytotoxic levels inhibits matrix metalloproteinase-2 and -9 but does not remove the smear layer. *J Periodontol* 76: 1129-39
102. Yang DM, Li YJ, Su Y, Sun YL (2006) Effect of host derived matrix metalloproteinase on the degradation of root dentin collagen. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 41: 275-8
103. Yang K, Palm J, König J, Seeland U, Rosenkranz S, Feiden W, Rube C, Rube CE (2007) Matrix Metalloproteinases and their tissue inhibitors in radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Biol* 83: 665-76
104. Yokota H, Goldring MB, Sun HB (2003) Cited 2-mediated regulation of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes under flow shear. *J Biol Chem* 278: 47275-80
105. Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo Y-J, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH (2004) Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodont Res* 39: 300-307
106. Zhang Q, van Palenstein, Helderma WH, van't Hof MA, Truin GJ (2006) Chlorhexidine varnish for preventing dental caries in children, adolescents and young adults. *Eur J Oral Sci* 114: 449-55

7. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Professor Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikum des Saarlandes, für die freundliche Überlassung des Themas sowie die ausgezeichnete Betreuung und stets konstruktive Kritik, sowohl in der praktischen Versuchsdurchführung als auch beim Verfassen der schriftlichen Arbeit.

Frau OÄ Dr. Karin Huber gilt mein besonderer Dank für die wissenschaftliche Betreuung im Rahmen der praktischen Versuchsdurchführung.

Folgenden Personen in auswärtigen Institutionen bin ich zu Dank verpflichtet:

Herrn Professor Dr. Gerald Thiel sowie Herrn Dr. Oliver Rössler, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes, für die Bereitstellung des Fluoreszenzdetektors und die Anleitung bei der praktischen Durchführung der Versuche.

Herrn Univ.-Professor Dr. Christian Rube sowie Frau PD Dr. Claudia E. Rube, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikum des Saarlandes, für die Durchführung der Bestrahlung an den Dentinproben.

Herrn Univ.-Professor Dr. Mathias Herrmann und Fr. Karin Hilgert, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikum des Saarlandes, für die Bereitstellung der Schwingmühle zur Herstellung der Dentinproben.

Herrn Univ.-Professor Dr. Dr. Wolfgang J. Spitzer, Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes, für die freundliche Bereitstellung der Zahnpräparate.

Herrn Dr. Gaebel, Facharzt für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Homburg/Saar, für seine Mühe, stets Zähne für die Versuche zur Verfügung zu stellen.

Publikationen (eingereicht)

Alai-Omid M, Huber K, Rössler O, Al-Marrawi F, Hannig M (2007) Polyphenolic agents inhibit the gelatinolytic activity in human dentin.

Alai-Omid M, Huber K, Al-Marrawi F, Hannig M (2008) Effects of prophylactic solutions on the gelatinolytic activity of MMPs in human dentin.

Preise

3. Preis als Vertreter der Universität des Saarlandes im Rahmen des DGZMK / BZÄK / Dentsply-Förderpreises mit dem Thema „Neue Möglichkeiten zur Prävention und Inhibition enzymvermittelter Degradationsprozesse durch Matrix- Metalloproteinasen“

Abstracts

„Neue Möglichkeiten zur Prävention und Inhibition enzymvermittelter Degradationsprozesse durch Matrix- Metalloproteinasen“ (Dtsch Zahnärztl Z 11: D46, 2007)

8. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Michel Alai-Omid, geb. am 19.12.1975 in Kiel

Eltern:

Dr. Iradj Alai-Omid, Dipl. Geologe

Wiebke Hoth-Hannig, MTA

Schulbildung:

1982 bis 1986 Reventlouschule Kiel

1986 bis 1996 Kieler-Gelehrten-Schule

1996 Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

Bundeswehr:

1996 bis 1998 Wehrdienst im Panzeraufklärungsbataillon 6 Eutin, Dienstgrad:

Leutnant der Reserve

Studium:

1998 bis 2000 Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel

Sommersemester 2000 Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg

2001 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

2003 Zahnärztliche Vorprüfung

2006 Zahnärztliche Prüfung

Januar 2007 Zahnärztliche Approbation

Beruf:

seit April 2007 Assistenz Zahnarzt in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Universität Hamburg

Hamburg 16.3.08