

Diş Çürüğündeki Enzim Aktiviteleri: Matriks Metalloproteinazlar ve Sistein Katepsinler

Enzyme Activities in Dental Caries: Matrix Metalloproteinases and Cysteine Cathepsins

Arş. Gör. Berfin YILDIRIM

Erciyes Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi,
Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı, Kayseri
Orcid ID: 0000-0001-6460-7117

Doç. Dr. Zeynep Aslı GÜÇLÜ

Erciyes Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi,
Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı, Kayseri
Orcid ID: 0000-0003-0453-0167

Geliş tarihi: 02.05.2023

Kabul tarihi: 05.01.2024

doi: 10.5505/yeditepe.2024.65668

Yazışma adresi:

Doç. Dr. Zeynep Aslı Güçlü

Adres: Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Çocuk Diş Hekimliği A.D. 38039 Melikgazi, Kayseri

Tel: 0507 684 2842

E-posta: zaguclu@gmail.com

ÖZET

Çürük gelişiminde rol oynayan faktörlerin belirlenmesi ve bunların etki mekanizmasının araştırılması çürüğün tedavisi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu doğrultuda mikroorganizma ve plağın meydana getirdiği etkiye bağlı olarak konağın yani dişin verdiği tepki de çürüğün ilerleyişi açısından önemlidir. Çürükteki matriks metalloproteinazların (MMP) varlığının kanıtlanmasının ardından katepsin enzimlerinin de varlığının bulunması çürüğün gelişme aşamalarında yeni bir pencere açmıştır. MMP'ler ve sistein katepsinler insan vücudunda yer alan, büyüme gelişme başta olmak üzere; yara iyileşmesi, kemik remodellingi, hormon metabolizması gibi birçok olayda görev alan enzimlerdir. Vücutta yer alan çoğu enzim gibi varlıkları ve işleyişleri muhteşem bir denge içerisinde gerçekleşmektedir. Dengenin bozulmasıyla birlikte; kanser, artrit, fibrotik bozukluklar, inflamatuvar hava yolu hastalıkları gibi birçok hastalık ortaya çıkabilmektedir. Bu sebeple, bu enzimlerin dengesinin oral bölgede de sağlanması oldukça önemlidir. Bu derlemede bu enzimlerin genel etki ve özellikleriyle beraber, ağız içerisindeki pozisyonları ve çürüğe olan etki mekanizmaları mevcut çalışmalarla birlikte toplanmış ve gelecekte bizim için neden önemli olabileceklerini göstermek amacıyla derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sistein katepsin, matriks metalloproteinaz, dentin, çürük enzimi.

ABSTRACT

Determining the factors that play a role in the development of caries and investigating their mechanism of action is of great importance in treating caries. Therefore, the reaction of the host, namely the tooth, depending on the effect of microorganisms and plaque, is also important for the progression of caries. After demonstrating the presence of matrix metalloproteinases in caries, the presence of cathepsin enzymes has opened a new window in the development stages of caries. Matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins are located in the human body, especially in growth and development; they are enzymes involved in many events, such as wound healing, bone remodeling, and hormone metabolism. Like most enzymes in the body, their existence and functioning take place in a magnificent balance. With the deterioration of the balance, many diseases such as cancer, arthritis, fibrotic disorders, and inflammatory airway diseases can occur. For this reason, it is essential to ensure the balance of these enzymes in the oral region. In this review, the general effects and properties of these enzymes, their positions in the mouth, and their mechanisms of action on caries have been collected together with existing studies and compiled to show why they may be important for us in the future.

Keywords: Cysteine cathepsin, matrix metalloproteinase, caries enzymes, dentine.

GİRİŞ

Diş çürüğü; diş sert dokularının, mikrobiyal biyofilm yapısının, şekerin, tükürüğün ve genetik faktörlerin etkili olduğu multifaktöriyel bir oluşumdur.¹ Periodontal hastalıklarla birlikte insanlar arasında tarihsel süreç boyunca en yaygın olarak görülen kronik hastalıklardan olduğu kabul edilmektedir.² Bu nedenle insanlardaki diş ağrısının ve kaybının da en yaygın nedeni olduğu bilinmektedir.³ İnsan yaşamı boyunca diş çürüğünün bu kadar önemli bir yere sahip olmasından dolayı tanımlandığı andan itibaren gelişimiyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bilinen ve olduğu varsayılan çürük gelişme mekanizmasının en ince ayrıntısına kadar açıklamasının yapılabileceği, bu ilerlemenin durdurulmasının mümkün olup olmayacağı, en iyi tedavi şeklinin nasıl olacağı ile ilgili birçok çalışma literatürde yer almaktadır.^{4,5} Bu çalışmalar sonucunda başlangıçta diş sert dokularının kaybındaki asıl neden olarak oral bölgede bulunan mikroorganizmalar ve bunların dişte meydana getirdiği demineralizasyon olarak düşünülse de zamanla aslında dişin yani konağın da bu reaksiyonlara karşı verdiği bir tepkinin de sürecin ilerleyişinde etkili olduğu bulunmuştur.^{6,7}

Diş yüzeyinde gerçekleşen tüm bu reaksiyonlara karşı dişte veya oral bölgede bulunan hücrelerden salgılanan çeşitli enzimlerin de olaya dahil olduğu gösterilmiştir⁸ ve bu enzimlerin de çürük ilerlemesinde etkili bir faktör olduğu görülmüştür.^{9,10}

Diş çürüğünün durdurulması veya sağlıklı dokunun geri kazandırılmasının mümkün olup olmayacağını araştırıldığı noktada, bu enzimlerin inaktive edilmesiyle nasıl bir yol izlenebileceği merak konusu olmuştur ve bu derlemenin amacı da diş çürüğünün ilerlemesine ve durdurulmasına farklı bir bakış açısıyla yaklaşıp, bu süreçte etkili olduğu kabul edilen enzimlerin değerlendirilmesidir.

Diş Çürüğü ve Enzim İlişkisi

Diş çürüğü süreci, başta hidroksiapatit olmak üzere inorganik minerallerin oral bakteriler tarafından üretilen asitlerle demineralizasyonunu içerir.¹¹ Diş çürüğü de kemik rezorpsiyonu gibi dentindeki minerallerin yapıdan uzaklaştırılmasının ardından mevcut kolajen matriksin bozulmasını içeren bir süreçtir. Bu süreçte yüksek oranda çapraz bağlı dentin kolajeninin parçalanmasında spesifik enzim olan kolajenazın varlığı önemli bir önkoşul olarak kabul edilmektedir.¹⁰

Dayan ve ark.¹⁰ tarafından yapılan bir çalışmada çürükten etkilenen dentinde kolajenaz aktivatörlerinin varlığı ile kolajen-kolajenaz-inhibitör kompleksindeki inhibitörün enzimatik yıkımı arasında nedensel bir ilişki olduğunu açıklayan kolajenolitik bir aktivite bildirilmiştir.

Uzun bir süre boyunca ekstrasellüler matriks bozulmasının mevcut bakterilerden açığa çıkan bakteriyel proteazlardan kaynaklandığı düşünülmüştür. Çeşitli oral bak-

terilerin proteolitik enzimler üretebildiği de gösterilmiştir fakat üretilen bu enzimlerin dentinin organik matriksini parçalayabilen enzimler olduklarına dair gerçek bir kanıt bulunamamıştır.¹² Hatta in situ olarak yaratılan dentin lezyonlarından elde edilen bakterilerin, in vitro olarak kolajeni parçalayamadığı görülmüştür.⁷ Bu sonuç bize dentindeki kolajenlerin yıkımında, bakteriyel kaynaklı enzimlerin değil konak kaynaklı enzimlerin görev aldığını göstermektedir.

İnsan Vücudundaki Proteazlar

Omurgalı canlı dokularında bulunan ekstrasellüler matriks bozulmasına esas olarak matriks metalloproteinazlar (MMP) ailesine ait proteazlar neden olur. MMP'ler uyum içerisinde olan doğal ve denatüre formlardaki tüm kolajenler dahil olmak üzere neredeyse tüm matriks proteinlerini bozabilme özelliğine sahiptirler.¹³

MMP'ler, 23 enzimden oluşan bir enzim ailesidir. Bu gruptaki enzimler ekstrasellüler matriks ve bazal membran bileşenlerini parçalayabilen genetik açıdan birbirinden farklı olan enzimlerdir.¹⁴ MMP ailesi, bir sinyal peptidi, bir propeptit ve bir çinko bağlama bölgesi içeren bir katalitik alana sahip ortak bir alan yapısı ile karakterize edilir.¹⁵

Genel olarak doku gelişiminde, dokuların yeniden şekillenmesinde ve yara iyileşmesinde rol alıp bunlara ek olarak hücrelerin yüzey reseptörleri, hormonlar, adezyon molekülleri gibi molekülleri işleyip hücreler arası iletişimde ve bağışıklık fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Kendi aralarında substrat özgüllüğü ve moleküler yapılarındaki farklılığa dayanarak 5 farklı gruba ayrılırlar. Bu gruplar; kolajenazlar, jelatinazlar, stromelizinler, membran tipi MMP'ler ve diğer MMP'lerdir.¹⁴

Bunların içerisinde dentinde varlığı kanıtlanan enzimler arasında; enamelisin (MMP-20),¹⁵ jelatinazlar (MMP-2, MMP-9),^{6,16} stromelisin-1 (MMP-3),¹⁷ kolajenaz-2 (MMP-8)¹⁸ ve membran tip 1 MMP (MT1-MMP)^{19,20} yer almaktadır.

Sistein katepsinler ise aktif bölgelerinde yer alan sisteinden dolayı bu adı almışlardır ve katepsin enzimleri arasında en geniş grubu oluştururlar. İnsan vücudunda 11 farklı sistein katepsin bulunurken bunlar arasında en sık bulunanları katepsin B, H ve L'dir.^{21,22}

Tüm katepsinler tipik olarak lizozomların asidik ortamında aktive olacak şekilde inaktif olarak sentezlenir.²³ Sadece katepsin S nötral pH'de aktif olmayı sürdürür, onun dışında tüm katepsinler nötral pH'de inaktif duruma geçerler.²⁴

Katepsin B ve L kolajenlerin sarmal olmayan telopeptid uzantılarını ayırır ve katepsin K üçlü sarmal bölgede kolajeni ayırır.²⁵ Özellikle katepsin K ve ayrıca B, H, L ve S osteoklastlar tarafından eksprese edilir ve kemik rezorpsiyonuna katılabilir.²⁶ Kemikteki yapım-yıkım dengesinde rol alan bu enzimlerin dişteki varlıklarıyla ilgili çalışmalar

yapılmaya başlanmıştır.

Diş Çürüğündeki Enzimatik Aktiviteler

MMP'ler çürük lezyonlarında dentin matriks yıkımında gözlenen ilk proteaz ailesidir. Bu enzim grubuna ait enzimlerden çoğunun ekstrasellüler matriksin neredeyse tüm bileşenlerini ve özellikle de doğal veya denatüre koşullarda yüksek oranda çapraz bağlı üçlü sarmal kolajenin yapısını bozduğu bilinmektedir.²⁷ Sonrasında da özellikle bazı MMP enzimlerinin varlığı demineralize dentin lezyonlarında gösterilmiş ve tanımlanmıştır. Bu MMP enzimleri MMP-2, MMP-8 ve MMP-9'dur.¹²

Bazal membran (BM) gelişim sırasında ikinci hücre aşamasından ortaya çıkan dokular arasında esnek sınırlar oluşturan ince, tabaka benzeri yapılardan oluşan ilk hücre dışı matriks (ECM)'tir.²⁸ BM'nin ana yapısal bileşeni karmaşık, fibriller olmayan bir ağ oluşturan tip IV kolajendir.²⁹ MMP-2 ve MMP-9 da doğal tip IV kolajen moleküllerini sarmal bölgelerinden farklı boyutlu parçalara ayırabilen enzimlerdir.³⁰ Fakat iki enzim de buna ek olarak doğal tip V, VII ve X kolajenlerini, jelatin, elastin ve fibronektini bozabilmektedir.³¹ MMP-2 genel olarak tip IV kolajen, jelatin, laminin, elastin ve tip V, VII, X kolajeni parçalayabilmektedir.³²

MMP-2 mRNA'sı gelişmekte olan ve fonksiyonel odontoblastlar da dahil olmak üzere fareler üzerinde yapılan deneyler sonrası çeşitli mezenkimal hücrelerde bulunmuştur.^{33,34}

Fare dişleri üzerinde yapılan in situ bir çalışmanın sonucunda mezenkimal hücrelerin gelişmekte olan dişte tip IV kolajen üretiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir.¹⁶ Buna ek olarak dişin gelişim aşamaları boyunca bu kolajenin yapım ve yıkım aşamalarında MMP-2 enziminin salgılandığı görülmüştür. Önceki çalışmalar MMP-2'nin, fibroblastlar, osteoblastlar ve endotel tarafından salgılandığını göstermiş olmakla birlikte, bu çalışmada tüm bu hücrelere ek olarak MMP-2 mRNA'nın öncelikle fare embriyosunun mezenkimal hücrelerinde, diş germininkiller de dahil olmak üzere eksprese edildiğini göstermiştir. İlk olarak kemiğin rezorpsiyonla yeniden şekillenmesi sırasında osteoklastlarda yüksek MMP-9 mRNA aktiviteleri gözlenmiştir.^{33,34} Bundan yola çıkarak hem gelişim aşamasında hem de geri kalan süreçlerde kemikle benzer döngülere sahip olan dişte de bu enzimin etkinliği araştırılmıştır.

Sonraki yapılan çalışmalarda MMP-9 varlığı enflamasyonlu pulpa dokusunda kanıtlanmış ve bu konuda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.³⁵ Fakat bu pulpa dokusuna hangi hücreler aracılığıyla salgılandığı veya nereden geldiği başlarda tam olarak açıklanamamıştır. Sonrasında yapılan başka bir çalışmada odontoblastlarda, fibroblastlarda, enflamatuar hücrelerde ve endotel hücrelerinde pozitif MMP-9 boyanması tespit edilmiştir.³⁶ Bu çalışmaya

göre MMP-9 enflamasyonlu pulpa dokusundaki enflamasyonlu hücre alanlarının enflamatuar reaksiyonların belirli aşamalarında tespit edilebildiği görülmüştür. Bu da odontoblastların, fibroblastların, enflamatuar hücrelerin ve endotel hücrelerinin sitozolünde depolanan MMP-9'un belirli seviyelerde salınabilen bir MMP-9 aktivitesi deposunu temsil edebileceğini düşündürmüştür. Tüm bunlara ek olarak sağlıklı pulpada da MMP-9 aktivitesi görülmüş fakat enflamasyonlu pulpa dokusuna göre önemli ölçüde daha az olduğu bulunmuştur.

Enflamasyonlu pulpada meydana gelen bu MMP-9 aktivitesindeki artış, doğrudan bakteriler tarafından salgılanan veya dolaylı olarak konak hücreler tarafından salgılanan enflamatuar sitokinler aracılığıyla indüklenebilir. Dolayısıyla bu hücreler, proenflamatuar sitokinlerin ve MMP-9'un sentezini kontrol ederek pulpal enflamasyonun patogeneğinde önemli bir rol oynayabilir.³⁶

MMP-8 tam gelişmiş insan dişlerinin odontoblastları ve pulpa dokusu tarafından salgılanır. Dolayısıyla dentinde de en çok bulunan kolajen olma özelliğini taşıyan tip 1 kolajeni substrat olarak tercih eder.¹⁸

Şu ana kadar dentinde teşhis edilen çeşitli MMP türleri arasında MMP-8 majör dentin kolajenolitik MMP olarak kabul edilir.^{14,37} Son zamanlarda MMP-8'in bu yönünü destekleyici ve dentin yıkımında rol aldığını destekleyen verilerde artış söz konusudur. Bu çalışmalar grubuna dahil olan kesitsel klinik bir çalışmada tükürükte bulunan yüksek seviyedeki MMP-8 enzimi ile dentin çürükleri arasında güçlü bir ilişki olduğu bulunmuştur.³⁸ Buna göre ağızda belirgin çürük kaviteasyonu olan hastalarda, çürüğü olmayan hastalara göre çok daha yüksek tükürük MMP-8 konsantrasyonları sergilendiği görülmüştür.

MMP-20 diğer adıyla enamelinin olarak matriks metalloproteinaz enzim ailesinin bir üyesidir. Öncelikle domuz ve sığır dişlerinde yapılan araştırmalarda dişlerdeki mine yapısında olduğu sonucuna varılmıştır.^{39,40} Daha sonrasında insan dişleri üzerinde çalışmalara başlanmış ve olgun insan odontoblastlarından elde edilebildiği görülmüştür.⁴¹

Enamelininin dişte oluşup oluşmadığı, oluşuyorsa ne zaman ve en çok nerede oluştuğunu öğrenmek amacıyla çeşitli deneylerin gerçekleştirildiği bir çalışma yapılmıştır.¹⁵ Bu deneyler sonucunda perifoliküler gevşek bağ dokusu, enamelinin ekspresyonu açısından negatif bulunurken minedeki ameloblastlar ve dental papilla hücrelerinden olan odontoblastlar pozitif bulunmuştur. Yani dişte enamelinin sekresyonu ameloblastlarda ve özellikle de odontoblastlarda gözlenirken aynı zamanda gelişmekte olan mine içerisine de bu enzimin sekresyonunun yapıldığı görülmüştür. Bu sekresyonun da en yüksek seviyeye yüksek kalsiyum içeren ve nötral pH'ye sahip ortamda ulaştığı bulunmuştur.

Sonuç olarak MMP-20 süt dişlenme döneminde salgılan-

maya başlar ve dişin yapısına katılır. Sonrasında da çürüğün tüm gelişim aşamaları boyunca dişte serbest kalır.⁴¹ Çürük gelişim aşamasında ise minenin yapısal proteinlerinden olan amelogeninin yapısını bozarak bu sürecin ilerlemesine neden olur.^{15,41}

MMP-20 enziminin gelişim aşamasındaki dental dokulara olan etkisini değerlendirmek amacıyla, MMP-20 gen yıkımı olan fareler ve olmayan farelerdeki mine formasyonları karşılaştırılmıştır.⁴² MMP-20 gen yıkımı olan farelerde oluşan mine diğer normal farelerdeki mineye göre; daha ince, prizma yapısında bozukluklar olduğu gözlenen, dentinden kolayca uzaklaşabilen ve yapı olarak hipoplastik amelogenezis imperfektaya benzer yapıda olduğu görülmüştür. Yapılan farklı ve buna benzer bir çalışmada ise yine MMP-20 gen yıkımı olan farelerdeki minenin ve normal minenin mineral içeriği karşılaştırılması yapılmıştır.⁴³ Bu çalışmanın sonucunda da MMP-20 gen yıkımlı farelerdeki minenin mineral içeriğinin sağlıklı minenin neredeyse yarısı kadar olduğu görülmüştür. Mineral içeriğinin değişmesine bağlı olarak mine sertliğinin de yine normal mineye göre 2/3 oranında olduğu bulunmuştur.

MMP'lerin sağlam ve çürük dental dokularda varlığının kanıtlanmasının ardından benzer fonksiyona sahip olan katepsin enzimlerinin araştırıldığı bir çalışmada Affymetrix ile saptanan 15 katepsin geninden 10 veya 11'inin doğal pulpa dokusunda bulunduğu ve odontoblastlardan salgılandığı gösterilmiştir.⁴⁴ Katepsin G ve W hem doğal numunelerde hem de kültür numunelerinde hiçbir şekilde ifade edilemeyen enzimlerdi. Bunlara ek olarak hiçbir odontoblast örneğinde katepsin Z gösterilmemiştir ve katepsin E de her iki dokuda da kısa süreli yalnızca geçici olarak ifade edilmiştir. Özellikle katepsin B'ye özgü antikolar immün boyama yapılan odontoblastlarda ve pulpa dokusunda yoğun ve tutarlı bir boyama olduğu gösterilmiştir. Bu boyamanın ağırlıklı olarak peritübüler bölgede lokalize olan dentin tübüllerinde olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada tüm dentin numuneleri sistein katepsin ve MMP aktiviteleri gösterirken artan yaşla birlikte hem sistein katepsin hem de MMP aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Sonrasında da sağlam dentindeki katepsin enzimlerin çürük sırasındaki kolajen yıkımından sorumlu olabileceği düşünülmüş ve araştırılmıştır.

Bu amaçla yapılan bir çalışmada farklı derinlikte çürüğü olan dişler toplanmış ve dişlerdeki enzim aktiviteleri hastaların yaşlarına göre kıyaslanmıştır.⁴⁵ Çalışma sonucunda dentin çürüğü lezyonlarının derinliğinin artmasıyla birlikte özellikle de pulpası ekspoz olan lezyonlarda sistein proteinaz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldüğü bulunmuştur. Yani çürük derinliği arttıkça dişte sistein katepsin aktivitesi artmaktadır. Buna ek olarak dentin çürüğü lezyonları, lezyon aktivitesi ve hastanın

yaşına göre sınıflandırıldığında sistein katepsin aktivitelerinin yaş arttıkça azaldığı bulunmuştur. Bunun sebebi olarak da artan yaşla birlikte daralan dentin tübülleri gösterilmiştir. Lezyonların aktif ve kronik olması açısından değerlendirildiğinde ise aktif lezyonlarda lezyon aktivitesinde artış olduğu bulunmuştur. Sistein proteinaz aktivitelerinin aksine MMP aktivitelerinde hem aktif hem kronik lezyonlarda yaşla birlikte azalma olduğu görülmüştür. Sistein katepsinler düşük pH'li yani asidik ortamda daha iyi işlev görmektedirler.⁴⁶ Bu özellikleri çürüğün aktif durumunda, kronik dentin çürüğüne göre daha yüksek aktiviteye sahip olmalarını açıklar. Sistein katepsin aktivitesini azaltmak için çürük lezyonundaki aşırı asiditeyi ortadan kaldırmak bir çözüm olabilir. Bunun için yapılabileceklerden biri olan iyi bir oral hijyen bakımı lezyonu kronik hale getirebilir. Aktif çürükten kronik çürüğe dönen durumlarda ortamda kalan katepsinlerin kısmen demineralize edilmiş ve muhtemelen kısmen de remineralize olmuş kolajene inaktif olarak bağlandığı düşünülmektedir.⁴⁵

Katepsin B vücutta yaygın bulunan katepsin enzimlerinden olup patolojik ve fizyolojik birçok süreçte yer alır. Fizyolojik süreçlere örnek olarak; kemik rezorpsiyonuyla kemiğin yeniden şekillenmesi, tiroid hormon üretimi ve immünolojik olaylarda antijen sunan hücrelerdeki rolleri verilebilir. Enflamatuar hava yolu hastalıkları, romatoid artrit, kanser ve osteoartrit ise önemli bir rol aldığı patolojik süreçlerden bazılarıdır.⁴⁷ Yüksek katepsin B aktivitesi hücrelerin önemli yapısal bariyerlerinden olan fibronektin, laminin ve tip IV kolajen dahil olmak üzere ekstrasellüler matriks proteinlerinin degradasyonu ile doğrudan ilişkilidir.^{48,49}

Hücre dışı katepsin B aktivitesine ek olarak hücre içi katepsin B tümör invazyonuna katkıda bulunabilir. Çünkü bu hücreler endositoz yoluyla ekstrasellüler matriksi hücre içine alıp bunu hücre içinde parçalayarak tümör hücrelerinin bazal membranları istila etmesine neden olabilir.⁵⁰ Katepsin B'nin bu aktivitesi onun dolaylı olarak ekstrasellüler matriksin bozulmasına aracılık eden bir proteolitik kaskad oluşturan diğer enzimlerin aktivasyonunda da yer almasına neden olur. Katepsin B'nin aktive ettiği bu enzimler arasında metalloproteinazlar da yer almaktadır.⁵¹ Katepsin B hafif asidik ortamlarda optimum aktivite gösterirken alkalın pH değerlerinde geri dönüşümsüz olarak inaktive durumuna geçer.⁵²

İnsan vücudunda tanımlanmış 11 katepsin enzimi vardır ve tüm bu katepsin enzimleri arasında katepsin K belirgin kolajenaz aktivitesine sahip tek katepsindir.⁵³ Bunun sebebi ise tropokolajenin üçlü sarmal bölgesindeki çeşitli bölgelerde kolajeni ayırmasıdır.⁵⁴ Katepsin K'nin bu aktivitesi düşük pH'de aktive edilip işlevsel hale getirilirken optimum işleve pH 5,5 civarında sahiptir.⁴⁵ Katepsin K tümörler ve tümör rezorpsiyonu gibi asidik ortamlarda osteoklastlarda salgılanırken aynı zamanda

proMMP-9'u da aktive ederek sürecin yıkım tarafına daha da ilerlemesine sebep olduğu gösterilmiştir.^{12,55}

Katepsin enzimleri arasında katepsin B, K ve L lizozomal sistein proteinazların insan dişlerinin dentin dokusunda tespiti gerçekleştirilmiş olup aktivitelerinin daha önce dentinde varlığı kanıtlanmış olan MMP'lerle kıyaslanabilir olduğu öne sürülmüştür.⁵⁶

Yapılan bir çalışmada sağlam dişler üzerinde oluşturulan yapay çürük lezyonlarındaki MMP ve katepsin K aktivitelerine bakılmıştır.⁵⁷ Bu çalışmada poliakrilik asidin demineralize ettiği dentin kesitleriyle fosforik asitin demineralize ettiği dentin kesitleri birbiriyle karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda poliakrilik asitle demineralize olan grubun fosforik asit ile demineralize olan gruba kıyaslanması yapıldığında poliakrilik asit grubunun daha güçlü katepsin K aktivitesi gösterdiği bulunmuştur.

Poliakrilik asidin bu güçlü etkisinin görülmesinden sonra benzer bir çalışma laktik asit ve poliakrilik asidin kıyaslanması ile yapılmıştır.⁵⁸ Bu çalışmada da laktik asidin demineralize ettiği dentin kesitlerindeki katepsin K aktivitesi ile poliakrilik asidin demineralize ettiği dentin kesitlerindeki aktivite kıyaslanmıştır. Hem laktik asidin hem de poliakrilik asidin pH'leri 5,5 olarak kullanılmıştır. Poliakrilik asitle demineralize olmuş dentin kesitlerindeki katepsin K aktiviteleri laktik asit ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, laktik asitle demineralize edilen dentin kesitlerinde katepsin K aktivitesinin belirgin olarak daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür. Bunun nedeni olarak laktik asidin moleküler ağırlığının poliakrilik asitten daha düşük olmasından dolayı laktik asidin kolajenler arasındaki difüzyonunun daha kolay olabileceği belirtilmiştir. Fakat çalışmada genel olarak bakıldığında elde edilen bulgular laktik asit ve poliakrilik asit arasında MMP'ler ve katepsin K tarafından meydana gelen proteolitik bozunma arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Katepsin K, sağlam dentinde esas olarak iç mineralize dentinde gösterilmiştir fakat katepsin B ile kıyaslandığında oran olarak ondan daha düşük kalmıştır.⁵⁶ İki enzimin de sağlam dentinde bulunmasıyla birlikte dentinin fizyolojik yapım-yıkım süreçlerinde rol alan önemli enzimler olduğu düşünülebilir ama oran açısından bakıldığında katepsin B'nin matür dentin metabolizmasında katepsin K'den daha baskın olduğu düşünülebilir.

Lizozomal sistein proteazlardan olan katepsin L; protein işleme ve bozunma, translasyon sonrası modifikasyon, hücre dışı matriksin yeniden şekillenmesi, bağışıklık olayları, apoptoz ve hücre ölümünde merkezi bir rol oynamaktadır.⁵⁹

Katepsin L'nin tespit edilen bu özellikleriyle beraber; insan dişindeki varlığı kanıtlanmış diğer katepsinler gibi yer alıp almayacağı merak edilmiş ve araştırılmıştır. Bu amaçla yapılan yeni bir çalışmada da rezin materyallerle tedavi-

si yapılmış dişlerde, sonrasında açığa çıkan monomerlerin sitotoksikite açısından değerlendirilmesi yapılmıştır.⁶⁰ Çalışmada açığa çıkan bu monomerlerin sitotoksik etkisinin katepsin L enzimini aktive etmelerinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda dentin bonding ajanlarının, insan dentin ve pulpasında katepsin L ekspresyonunu ve lizozomal aktivasyonunu uyaran BisGMA gibi içeriklerinden dolayı dentin pulpa kompleksinde katepsin L üretimini indükleyebileceği gösterilmiştir. İnsan vücudundaki fagositik olaylarda ve enflamatuvar süreçte yer aldığı bilinen katepsin L'nin bu aktivasyonu ile birlikte dişte de enflamatuvar süreci başlatıp ilerlemesinde rol alabileceği düşünülebilir.

Çürük Dentindeki Enzimlerin İnhibisyonu

Genel olarak vücuttaki rolleri de oldukça geniş olan MMP'lerin ve sistein katepsinlerin inhibisyonu önemli bir konu olmuştur. Çünkü artmış aktiviteleriyle ortaya çıkan patolojik durumların tedavisinde akla gelebilecek ilk tedavi yöntemi bu enzimlerin inhibisyonu olacaktır. Dolayısıyla özellikle kanser tedavisinde kemoterapötik ilaçların mekanizması bu enzimlerin inhibisyonunu içerecektir.⁶¹ Benzer durumda olan çürük gelişimi için de bu enzimlerin inhibisyonu önemli bir noktadır. Enzimlerin inhibisyonu ile birlikte artan dentin kolajenlerinin kaybının önüne geçilmesi çürüğün meydana getirdiği hasarı azaltacaktır. Çürükteki aktiviteleri kanıtlanmış olan bu enzimlerin inhibisyonu ile yeni tedavi şekillerinin geliştirilip geliştirilemeyeceği konusunda araştırmalar yapılmıştır. Öncelikle periodontitisli hastalarda artan MMP aktivasyonlarına bağlı olarak MMP inhibisyonu araştırılmıştır. Bu konuda tetrasiklin ve türevi maddelerin MMP'leri inhibe ettiği bulunmuştur.^{62,63} Hayvanlar üzerinde yapılan ve MMP'lerin kimyasal inhibitörlerinin kullanıldığı bir çalışmada bu inhibitörlerin kullanımıyla dentindeki çürük ilerlemesinin azaltılabileceği gösterilmiştir.⁶⁴ Kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklin olarak geçen antimikrobiyal etkisi olmayan tetrasiklin analogu CMT-3'ün dentin çürüğü lezyonlarında aktivitesi artan MMP'leri inhibe etmede etkili olduğu belirlenmiştir.⁶⁵

MMP inhibitörleri arasında yer alan diğer madde de bifosfonatlardır. Bifosfonatlar pirofosfat analogları olarak geçip kemik rezorpsiyonunun arttığı durumlarda kullanılan kimyasal bileşiklerdir ve dişte de oldukça fazla yer alan hidroksiapatit kristallerine affiniteleri oldukça yüksektir.⁶⁶ Bifosfonat türevi olan zoledronik asitin de çürük dentininde yer alan MMP'leri inhibe etmede etkili olduğu gösterilmiştir.⁶⁵

Periodontoloji alanında kullanımı oldukça yaygın olan klorheksidin (CHX) solüsyonunun etki mekanizmasının MMP'leri inhibe etmesi yoluyla olduğu açıklanmıştır. CHX'in özellikle çürük dentinde de varlığı kanıtlanmış olan MMP-2, MMP-9 ve MMP-8'i inhibe ettiği bulunmuş-

tur.⁶⁷ Sonrasında ise çürükte varlığı kanıtlanan sistein katepsinin de CHX tarafından inhibe edilebildiği gösterilmiştir.⁶⁸ Ağızda antibakteriyel etkinliği iyi bilinen klorheksidin glukonat solüsyonunun gelecekte yapılacak olan çalışmalarda çürük lezyonlarının ilerlemesindeki etkinliğinin araştırılması beklenebilir.

Yine diş hekimliğinde oldukça yaygın bir kullanım alanına sahip olan etilen diamin tetrafosforik asitin (EDTA) MMP inhibisyonu özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. Dişte bulunan kalsiyum ve çinko iyonlarının EDTA ile şelasyonunun gerçekleşmesi MMP aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.⁶⁹

Çürük dışında pH'de azalmanın meydana geldiği dental erozyonlarda da MMP'lerin ve sistein katepsin enzimlerinin aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir^{70,71} ve bu enzimlerin inhibitörlerinin kullanılmasıyla birlikte dentin erozyonunun ilerlemesinin etkilendiği görülmüştür.⁷² Endojen dentin MMP'lerinin ve katepsin K'nin inhibisyonu insan diş yapısının asite olan direncini arttırmaktadır.⁷³

Tüm bunlara ek olarak dental restorasyonlarda restorasyonun uzun ömürlü olması için önemli bir nokta olan bağlanma ara yüzünün stabilitesinde, MMP inhibitörlerinin varlığının bu stabilizeyi arttırdığı sonucuna varılmıştır.^{74,75}

SONUÇ

Derlemede ortaya konduğu üzere, MMP'lerin ve katepsin enzimlerinin dişteki çürüklü ve çürüksüz lezyonlardaki aktivitesi hem lezyon açısından hem de lezyonun restorasyonu açısından büyük öneme sahiptir. Enzimlerin varlığı lezyonun ilerlemesinde büyük bir faktörken, inhibe edilmediği durumlarda yapılan restorasyonun stabilitesi de etkilenmektedir. Günümüzde diş çürüğünü etkileyen birçok faktörün olduğu bilinen bir gerçektir. Bu faktörlerin arasında yer alan enzimlerin ise hem işleyiş mekanizmalarının netleştirilmesi ve bu konuda çalışmaların yapılması hem de bu enzimlerin inhibisyonları açısından araştırılmaya devam edilmesi çürüğü önleme ve durdurma açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu sebeple bu enzimlerin inhibe edilme mekanizmasının detaylandırılması, bu mekanizmalara karşı alınacak önlemlerin klinik pratiğinde yer edinmesi diş hekimliğinde önemli bir nokta olarak gözükmektedir.

Özellikle ağız boşluğunun dinamik bir doğaya sahip olması, in vitro çalışmaların sonuçlarının klinik olarak yorumlanmasını sınırlamaktadır ve konunun klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Pitts NB. Diagnostic tools and measurements-impact on appropriate care. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997; 25(1): 24-35.
2. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks

to oral health. *Bull World Health Organ* 2005; 83(9): 661-669.

3. Oral health in America: a report of the Surgeon General. *J Calif Dent Assoc* 2000; 28(9): 685-695.
4. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *The Lancet* 2007; 369(9555): 51-59.
5. Sicca C, Bobbio E, Quartuccio N, Nicolò G, Cistaro A. Prevention of dental caries: A review of effective treatments. *J Clin Exp Dent* 2016; 8(5): e604-e610.
6. Tjäderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M, Overall C. A novel organ culture method to study the function of human odontoblasts in vitro: gelatinase expression by odontoblasts is differentially regulated by TGF-β1. *J Dent Res* 1998; 77(7): 1486-1496.
7. Van Strijp A, Van Steenberghe T, Ten Cate J. Bacterial colonization of mineralized and completely demineralized dentine in situ. *Caries Res* 1997; 31(4): 349-355.
8. Larmas M, Sándor GK. Enzymes, dentinogenesis and dental caries: a literature review. *J Oral Maxillofac Res* 2014; 5(4): e3.
9. Armstrong W. Further studies on the action of collagenase on sound and carious human dentin. *J Dent Res* 1958; 37(6): 1001-1015.
10. Dayan D, Binderman I, Mechanic G. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 1983; 28(2): 185-187.
11. Van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994; 73(3): 672-681.
12. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto V-J, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998; 77(8): 1622-1629.
13. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7(5): 728-735.
14. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004; 10(6): 311-318.
15. Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Lee S-K, Ryu O-H, Murakami C, et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *J Dent Res* 1998; 77(8): 1580-1588.
16. Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res* 1995; 74(5): 1226-1234.
17. Hall R, Septier D, Embery G, Goldberg M. Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. *Histochem J* 1999; 31(12): 761-770.
18. Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Rönkä H, Sorsa T, et al. The expression of MMP-8 in human odontoblasts

and dental pulp cells is down-regulated by TGF- β 1. *J Dent Res* 2000; 79(1): 77-84.

19. Caron C, Xue J, Bartlett JD. Expression and localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase in tooth tissues. *Matrix Biol* 1998; 17(7): 501-511.

20. Palosaari H, Ding Y, Larmas M, Sorsa T, Bartlett JD, et al. Regulation and interactions of MT1-MMP and MMP-20 in human odontoblasts and pulp tissue in vitro. *J Dent Res* 2002; 81(5): 354-359.

21. Barrett AJ, Kirschke H. [41] Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* 1981; 80 Pt C: 535-561.

22. Mohamed MM, Sloane BF. Multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(10): 764-775.

23. Gocheva V, Joyce JA. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 2007; 6(1): 60-64.

24. Karcı AÇ. Aktif ve kontrol altında olan akromegali hastalarında Katepsin B, Matriks metalloproteinaz 2 ve 9 düzeyleri ve IGF-1 ile ilişkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Kocaeli Üniversitesi, 2012.

25. Turk B, Turk V, Turk D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem* 1997; 378(3-4): 141-150.

26. Söderström M, Salminen H, Glumoff V, Kirschke H, Aro H, et al. Cathepsin expression during skeletal development. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1446(1-2): 35-46.

27. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8): 827-839.

28. Abrahamson DR. Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J Pathol* 1986; 149(4): 257-278.

29. Yurchenco PD, Ruben GC. Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J Cell Biol* 1987; 105(6): 2559-2568.

30. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990; 6(4): 121-125.

31. Fessler LI, Duncan K, Fessler JH, Salo T, Tryggvason K. Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *J Biol Chem* 1984; 259(15): 9783-9789.

32. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69(3): 562-573.

33. Reponen P, Sahlberg C, Huhtala P, Hurskainen T, Thesleff I, et al. Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development. *J Biol Chem* 1992; 267(11): 7856-7862.

34. Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Association between the expression of murine 72 kDa type IV collagenase by odontoblasts and basement membrane degradation during mouse tooth development. *Arch*

Oral Biol 1992; 37(12): 1021-1030.

35. Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci* 2002; 110(5): 353-357.

36. Tsai CH, Chen YJ, Huang FM, Su YF, Chang YC. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *J Endod* 2005; 31(12): 860-862.

37. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, et al. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* 2007; 52(2): 121-127.

38. Hedenbjörk-Lager A, Björndal L, Gustafsson A, Sorsa T, Tjäderhane L, et al. Caries correlates strongly with salivary levels of matrix metalloproteinase-8. *Caries Res* 2015; 49(1): 1-8.

39. Bartlett JD, Simmer JP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene* 1996; 183(1-2): 123-128.

40. Den Besten PK, Punzi JS, Li W. Purification and sequencing of a 21 kDa and 25 kDa bovine enamel metalloproteinase. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 (Suppl 1): 345-349.

41. Llano E, Pendás AM, Knäuper V, Sorsa T, Salo T, et al. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry* 1997; 36(49): 15101-15108.

42. Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 49598-49604.

43. Bartlett J, Beniash E, Lee D, Smith C. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J Dent Res* 2004; 83(12): 909-913.

44. Tersariol IL, Geraldini S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod* 2010; 36(3): 475-481.

45. Nascimento F, Minciotti C, Geraldini S, Carrilho M, Pashley DH, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res* 2011; 90(4): 506-511.

46. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477(1-2): 98-111.

47. Mort JS, Buttle DJ. Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(5): 715-720.

48. Guinec N, Dalet-Fumeron V, Pagano M. "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993; 374(12): 1135-1146

49. Creemers L, Hoeben K, Jansen D, Buttle D, Beertsen

- W, et al. Participation of intracellular cysteine proteinases, in particular cathepsin B, in degradation of collagen in periosteal tissue explants. *Matrix Biol* 1998; 16(9): 575-584.
- 50.** Ahram M, Sameni M, Qiu RG, Linebaugh B, Kirn D, et al. Rac1-induced endocytosis is associated with intracellular proteolysis during migration through a three-dimensional matrix. *Exp Cell Res* 2000; 260(2): 292-303.
- 51.** Eeckhout Y, Vaes G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J* 1977; 166(1): 21-31.
- 52.** Willenbrock F, Brocklehurst K. Preparation of cathepsins B and H by covalent chromatography and characterization of their catalytic sites by reaction with a thiol-specific two-protonic-state reactivity probe. Kinetic study of cathepsins B and H extending into alkaline media and a rapid spectroscopic titration of cathepsin H at pH 3-4. *Biochem J* 1985; 227(2): 511-519.
- 53.** Panwar P, Du X, Sharma V, Lamour G, Castro M, et al. Effects of cysteine proteases on the structural and mechanical properties of collagen fibers. *J Biol Chem* 2013; 288(8): 5940-5950.
- 54.** Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 1998; 273(48): 32347-32352.
- 55.** Christensen J, Shastri VP. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K. *BMC Res Notes* 2015; 8: 322.
- 56.** Vidal C, Tjäderhane L, Scaffa P, Tersariol I, Pashley D, et al. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *J Dent Res* 2014; 93(3): 269-274.
- 57.** Tezvergil-Mutluay A, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Agee K, Key W, et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. *J Dent Res* 2013; 92(1): 87-91.
- 58.** Bafail A, Azizrahman M, Vilde T, Kishen A, Prakki A. Alternative model for cathepsin K activation in human dentin. *Dent Mater* 2019; 35(11): 1630-1636.
- 59.** Dana D, Pathak SK. A review of small molecule inhibitors and functional probes of human cathepsin L. *Molecules* 2020; 25(3): 698.
- 60.** Chang MC, Chen JH, Lee HN, Chen SY, Zhong BH, et al. Inducing cathepsin L expression/production, lysosomal activation, and autophagy of human dental pulp cells by dentin bonding agents, camphorquinone and Bis-GMA and the related mechanisms. *Biomater Adv* 2023; 145: 213253.
- 61.** Aggarwal N, Sloane BF. Cathepsin B: multiple roles in cancer. *Proteomics Clin Appl* 2014; 8(5-6): 427-437.
- 62.** Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007; 65(1): 1-13.
- 63.** Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006; 38(5): 306-321.
- 64.** Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer—a review. *Dent Mater* 2013; 29(10): 999-1011.
- 65.** Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res* 2001; 80(6): 1545-1549.
- 66.** Fisher JF, Mobashery S. Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(1): 115-136.
- 67.** Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(3): 437-439.
- 68.** Scaffa PMC, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmo AK, et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res* 2012; 91(4): 420-425.
- 69.** Thompson JM, Agee K, Sidow SJ, McNally K, Lindsey K, et al. Inhibition of endogenous dentin matrix metalloproteinases by ethylenediaminetetraacetic acid. *J Endod* 2012; 38(1): 62-65.
- 70.** Toledano M, Nieto-Aguilar R, Osorio R, Campos A, Osorio E, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine. *J Dent* 2010; 38(8): 635-640.
- 71.** Osorio R, Yamauti M, Sauro S, Watson TF, Toledano M. Experimental resin cements containing bioactive fillers reduce matrix metalloproteinase-mediated dentin collagen degradation. *J Endod* 2012; 38(9): 1227-1232.
- 72.** Yang H, Lin XJ, Liu Q, Yu H. Effects of protease inhibitors on dentin erosion: an in situ study. *Clin Oral Investig* 2023; 27(3): 1005-1012.
- 73.** Lin X, Tong X, Yang H, Chen Y, Yu H. Do matrix metalloproteinase and cathepsin K inhibitors work synergistically to reduce dentin erosion? *J Appl Oral Sci* 2023; 31: e20220449.
- 74.** Yu H, Liu J, Liao Z, Yu F, Qiu B, et al. Location of MMPs in human radicular dentin and the effects of MMPs inhibitor on the bonding stability of fiber posts to radicular dentin. *J Mech Behav Biomed Mater* 2022; 129: 105144.
- 75.** Ghazvehi K, Saffarpour A, Habibzadeh S. Effect of pretreatment with matrix metalloproteinase inhibitors on the durability of bond strength of fiber posts to radicular dentin. *Clin Exp Dent Res* 2022; 8(4): 893-899.