

МАТРИКСМЕТАЛОПРОТЕИНАЗИ - МОЛЕКУЛАРНИ БИОМАРКЕРИ НА ПАРОДОНТАЛНАТА БОЛЕСТ

Ристоска С.

СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, Катедра за болести на устата и пародонтот

Пародонцијалната болест претставува инфламаторна состојба, која постепено доведува до оштетување и до деструкција на периодонтниот ткива на забите. Екстрацелуларниот матрикс композиција, како што се, колагенот, фибронектинот и протеогликаниот, претставуваат голема зграда на ткивни протеини, кои се одговорни за одржување на структурниот интегритет на ткивата кои ги окружуваат забите. Деструкцијата на периодонтниот апарат се карактеризира со деградација на екстрацелуларниот матрикс композиција, доведувајќи до иреверзибилна загуба на периодонтниот меки сврзни ткива и алвеоларната коска. Патогениите бактерии присутни во дениталниот биофилм, како и нивните производи, претставуваат главни (примарни) етиолошки агенси, кои директно ја иницираат пародонцијалната болест. Меѓутоа, инфламаторниот и имуниот одговор од страна на домаќинот, патогениите бактерии и нивните вирусни фактори, исто така, се одговорни за ткивната деструкција присутна во секој на пародонцијалниот апарат.

Матриксметалопротеиназиите (ММП) претставуваат фамилија на цинк-зависни ендотелитиди, кои ги секретираат различни клетки на домаќинот, како инативни прекурсори (proMMP), кои имаат способност да деструктираат различни типови колаген. ММП значајно придонесуваат кон ткивната деструкција и за ремоделирањето на здравиот ткива и се клучни ензими одговорни за екстрацелуларната матрикс деградација. Бројни матриксметалопротеинази, како интерстицијалната колагеназа (ММП-1), желатиназа-А (ММП-2), стромелизин-1 (ММП-3), неутрофилната колагеназа (ММП-8), желатиназа-Б (ММП-9) во гингивалниот ткива, гингивалниот сулкусен флуид и во примероциите од џунка, идентификувани се кај пациенти со пародонцијална болест. ММП-2, ММП-8 и ММП-13 потекнуваат од инфламаторниот сулкусен епител, полиморфонуклеарните леукоцити, а се присутни и во ткивните екстрацелуларни супстанции. Бројни *in vitro* и *in vivo* студии укажуваат дека постоеа значајна поврзаност меѓу ММП и пародонцијалната болест. Тие сугерираат дека матриксметалопротеиназиите можат да бидат корисни молекуларни биомаркери за следење на пародонцијалниот статус кај пациентите, во медицински и научно-истражувачки цели.

Клучни зборови: матриксметалопротеинази, пародонцијална болест, биомаркери

Ремоделирањето и реструктурирањето на екстрацелуларниот матрикс и базалната мембрана се доминантни настани, кои се случуваат во текот на многу физиолошки процеси (раст и развој), меѓутоа тие се и интегрален дел во прогресијата на бројни ткивно-деструктивни инфламаторни и малигни заболувања (10, 19, 21). Пародонталната болест како бактериски индуцирано инфламаторно заболување, кое доведува до прогресивна загуба на забите, претставува комплексен процес во кој партиципираат бактериите со своите ензими, како и протеолитичките ензими по потекло од домаќинот (27, 29). Иницијацијата и прогресијата на

пародонталните лезии се придружени со бројни добро документирани клинички настани. Тие вклучуваат инфламација и едем на ткивото, формирање на плитки или длабоки пародонтални џебови проследени со крвавење при сондирање, како и загуба на потпорните ткива. Во текот на тие процеси настанува зголемена васкуларизација и полиморфонуклеарна (PMN) инфилтрација, зголемен проток на гингивалниот флуид, загуба на припојниот епител и сврзно-ткивниот атачмент, како и загуба на алвеоларната коска (22). Механизмите преку кои микроорганизмите од денталниот плак ги деструираат овие ткива, сè уште не се докрај разјаснети, но јасно е дека активноста на заболувањето зависи од интеракцијата на бројни фактори, вклучувајќи ги чувствителноста на домаќинот, присуството на патогени микроорганизми (30), како и отсуството на корисни специенси (5). Балансот меѓу пародонталното здравје, со минимална ткивна деструкција, а рапидна репарација, како и заболување проследено со максимална деструкција, но минимална регенерација, кои се наоѓаат во еден динамичен еквилибриум, можат да бидат под влијание на локални или на системски промени. Тоа вклучува намалена или зголемена одбранбена способност на домаќинот, или квантитативни и (или) квалитативни промени во периопатогените микроорганизми (31).

Бројни сценарија и потенцијални механизми можат да ги опишат основните патогени елементи присутни во текот на пародонталната болест, но сè уште не е можно да се идентификува разумен (јасен) начин да се објаснат интеракциите кои настануваат меѓу бактериите и клетките на домаќинот, кои доведуваат до загуба на атачментот. Податоците укажуваат дека експресијата или активноста на MMP може да биде стимулирана во култура на различни клетки, ослободени од хуманите периодонтални ткива. Покрај полиморфонуклеарните леукоцити, тука се вклучени и фибробластите (25), макрофагите и кератиноцитите. Активноста на MMP може да биде стимулирана директно од

страна на бактериските продукти од плакот, кој ги колонизира забите и околните ткива (38), или индиректно, преку инфламаторните медијатори ослободени како одговор на оралните микроорганизми. Бактериските продукти кои играат важна улога во транскрипционата активација на ендогените деградирани патишта ги вклучуваат бактериските липополисахариди (LPS), протеиназите (1) и веројатно лектините (26). Анализата на гингивалниот сулкусен флуид укажува дека медијаторите, како што се IL-1 α , IL-1 beta и TNF- α , кои се потенцијално способни да индуцираат MMP експресија, присутни се во гингивалниот флуид во физиолошки значајни концентрации.

Porphyromonas gingivalis и *Treponema denticola* се посочуваат како важни компоненти на бактериската флора при напредната пародонтопатија, асоцирана со ткивна деструкција. Вируленцијата на овие микроорганизми се поврзува со неколку фактори. Вниманието особено се фокусира на силниот протеолитички арсенал на овие две периопатогени бактерии (13). Се смета дека нивните протеази посредуваат при ткивната деструкција преку активација на проколагеназите (proMMP) во каталитички активни форми. Исто така, се смета и дека можат да ја индуцираат продукцијата на MMP од страна на клетките на домаќинот и многу ефикасно да ги деградираат колагените пептиди, кои претходно се разградени од колагеназите и желатиназите (33, 39).

Матриксметалопротеиназите (matrix-metalloproteinases, MMP) претставуваат фамилија на протеолитички ензими продуцирани од голем број клетки, како што се, неутрофилните гранулоцити, макрофагите, фибробластите, епителните клетки, остеобластите, остеокластите. Тие имаат способност да ги деградираат екстрацелуларните матрикс молекули, како што се колагенот, желатинот и еластинот. Фамилијата на матриксметалопротеинази опфаќа околу 25 генетски различни, но структурно поврзани, Zn²⁺ зависни или клеточно асоцирани протеолитички ензими, одговорни за ремоделирање и деграда-

ција на компонентите на екстрацелуларниот матрикс (ЕСМ) и базалната мембрана (1). Оваа голема група ензими е поделена на 3 подгрупи: (24) интерстицијални колагенази, желатинази (тип IV колагенази) и стромелизини. Еднаквоста на аминокиселинските секвенци на MMP покажува дека постои висок степен на сличност меѓу ензимите во секоја група (околу 80%), како и сличност меѓу групите (околу 50%). Својствата на секоја MMP група варираат зависно од видот или од клеточниот тип кој ги продуцира. MMP имаат затворени места каде е присутен Zn и овие места имаат извесен степен на хомологност со бактериската MMP. Исто така, постојат и региони на хомологност кои можат да играат важна улога во активацијата на латентните проформи во активни ензими. Сите MMP ензими имаат потреба од присуство на 2-3 Ca²⁺ јони за нивната стабилност и ензимска активност (28).

Матриксметалопротеиназа-1 (MMP-1, или интерстицијална колагеназа) се синтезира и се секретира од страна на сврзно ткивните клетки (фибробластите) и макрофагите, а најчесто е асоцирана со нормалното ткивно ремоделирање (41). *In vitro* MMP-1 се експресира во голем број клетки, на пример, кај фибробластите, ендотелните клетки, моноцитите, хондроцитите, остеобластите, кератоцитите и различни клетки на туморите (23, 1). MMP-1 е способна да го деградира типот III колаген.

Матриксметалопротеиназа-8 (MMP-8, хумана неутрофилна колагеназа), се синтезира и се складира во специфичните гранули на полиморфонуклеарните леукоцити (PMN), во латентна форма, за да биде ослободен со дегранулација настаната како резултат на активирани PMN клетки во инфламационите места од страна на бактериските протеази. Се смета дека е еден од клучните медијатори на инфламаторната ткивна деструкција при пародонтитот и пери-имплантитот (15, 7). Детектиран е во гингивата, во гингивалните сулкусни епителни клетки (37), саливата, денталниот плак и во периапикалното ткиво кај хроничните периапикални процеси. MMP-

8 особено е ефикасен при хидролиза на тип I и II колаген (11).

Матриксметалопротеиназа-13 (MMP-13, колагеназа-3) се експресира во коскениот ткиво за време на неговиот развој, во остеоартритичната 'рскавица и синовијалната мембрана. Најчесто се поврзува со патолошките состојби, како што се, остеоартритот и ревматоидниот артритис (21), инвазијата на карциномите на главата и на вратот, како и други типови карциноми (17). Зголемените нивоа на MMP-13 во гингивалниот флуид укажуваат на коскен тип на колагена деградација при адултната форма на пародонтопатија (8).

Хомеостазата на ЕСМ е регулирана преку ослободување на MMP од страна на различни клетки, како фибробластите и макрофагите и присуството на ткивни инхибитори на MMP (TIMP), кои широко се дистрибуирани во ткивата и во ткивните флуиди. Биолошката активност на MMP може да биде регулирана на ниво на транскрипција на генот, активација и инактивација на ензимите. Нивната активност е контролирана преку промените во билансот меѓу експресијата и синтезата на MMP и нивните бројни ендогени инхибитори (TIMP). Хуманите гингивални фибробласти нормално продуцираат ниски нивоа на MMP, а високи концентрации на TIMP. Различни студии укажуваат дека високи нивоа на MMP се асоцирани со ниски нивоа на TIMP во текот на пародонталната болест. Анализата на гингивалниот флуид и на плунката кај пациентите со пародонтопатија укажува на патолошки зголемени нивоа на MMP-8 (колагеназа-2), во текот на каталитички активната форма на заболувањето и прогресивната загуба на сврзно-ткивниот атачмент. Тоа значи дека MMP се продуцира локално во периодонциумот и дека игра важна улога во периодонтално ткивната деструкција (2, 18, 20). Hernandez и сор. (12) го проучувале нивото на MMP-13 и TIMP-1 во гингивалниот флуид (GCF) и во гингивалните ткивни биопсии кај пациентите со хронична пародонтопатија. Тие земале материјал од активните, како и од

места без знаци на акутно воспаление и го анализирале со помош на Immunowestern blot и immunodot blots методите. Резултатите укажале на зголемена MMP-13 експресија. Во текот на прогресијата на заболувањето кај активните места, авторите забележале намалување на нивото на TIMP-1, асоцирано со зголемување на нивото на MMP-13.

Ilgenli и сор. (14) го проследиле нивото, молекуларните форми и степенот на активација на MMP-13 во гингивалниот флуид кај пациентите со пародонтопатија и ги корелирале добиените резултати со клиничките параметри. Молекуларните форми на MMP-13 во примероците на GCF биле анализирани со Western immunoblotting методот. Резултатите укажале дека зголемените нивоа на MMP-13 во GCF играат важна улога во патогенезата на хроничната пародонтопатија и позитивно биле корелирани со сите клинички параметри.

Постојат неколку патишта на разградба на структурните макромолекули од интерстицијалните сврзни ткива и базалната мембрана. Податоците укажуваат дека полиморфонуклеарните леукоцити (PMN) можат да посредуваат во деградацијата на екстрацелуларните матрикс молекули преку ослободување на два вида серин протеинази и тоа, неурофилна еластаза и катепсин G. Овие протеинази се способни да разградат различни матрикс протеини, вклучувајќи го типот IV колаген, ламинин, фибронектин, како и 'рскавичните протеогликани (40, 1). Плазмин зависната протеолиза се иницира преку секреција на еден или на повеќе активирачки ензими, локално во самите ткива. Многу клеточни типови, вклучувајќи ги и оние кои се доминантни во периодонталните ткива (фибробласти, кератиноцити, ендотелни клетки, PMN), можат да бидат индуцирани да експресираат еден или повеќе активирачки ензими, кои ќе доведат до деструкција на ткивата. Ензимските механизми преку кои настанува разградбата на органскиот матрикс на коските и на забите сè уште не се комплетно разјаснети, но податоците укажуваат дека матриксметалопр-

теиназите, како и лизозомалните тиол-протеинази се инволвирани во тој процес (3). Се смета дека киселите тиол-протеинази ослободени од остеокластите се способни да го разградат колагениот матрикс при ниски рН вредности. Иако деталните ензимски активности при овие процеси не се јасни, докажано е дека колагената мрежа на коскениот ткиво е чувствителна на дејството на катепсините при кисела рН, во присуство на висока концентрација на Ca^{2+} јони. Тие сугерираат дека постојат екстрацелуларен и интрацелуларен пат на колагена деградација и коскена ресорпција и на тој начин ја илустрираат комплексноста на овие специфични деструктивни процеси. Со проучување на колагената деградација и на коскениот ресорпција се занимавале и Everts и сор. (4), кои укажале дека MMP и цистеин-протеиназите се вклучени во овој процес и дека и двете класи на протеинази се подеднакво важни.

Sorsa и сор. (34, 35) детектирале зголемена колагеназна активност во гингивалниот сулкусен флуид во текот на ортодонтското поместување на забите, при што аплицираната механичка сила довела до рапидно ремоделирање на периодонталниот лигаментарен комплекс. При тоа, MMP ослободени од периодонталните фибробласти, при механички стрес, се смета дека имаат голем удел во ремоделирањето на екстрацелуларниот матрикс. Тие утврдиле и патолошки зголемени нивоа на MMP при инфламаторни состојби на периодонталниот лигаментарен комплекс.

Зголемена експресија на MMP-8 и MMP-13 mRNA кај периодонталниот лигаментарен комплекс на стаорци во текот на активното поместување на забите, забележале и Takahashi и сор. (36).

Ingman и сор. (16) утврдиле сигнификантно повисоки нивоа на MMP-8 во GCF кај пациентите со фиксни ортодонтски протези, споредено со контролната група, во текот на едномесечен период.

Истражувањата во научните кругови сè почесто се фокусираат на пронаоѓањето на

нови, потенцијални терапевтски агенси во третманот на пародонтопатијата, насочени кон инхибиција на активноста на MMP. Докажано е инхибиторното дејство на тетрациклините и нивните хемиски модифицирани деривати врз активноста на MMP и нивните позитивни терапевтски ефекти (9, 32). Меѓутоа, во последно време хлорхексидинот се посочува како многу ефикасно средство во третманот на заболувањето, бидејќи врши директна инхибиција на активноста на MMP-2, MMP-8 и MMP-9 (6). Токму поради неговите корисни антипротеолитички можности и веќе потврдените антибактериски карактеристики се смета дека може да биде особено корисен во терапевтскиот пристап при лекувањето на пародонталната болест.

Присуството и проучувањето на матрикс-металопротеиназите во оралните флуиди - плунката, гингивалниот сулкусен флуид, како и во инфламираните пародонтални ткива, можат да ни послужат како корисни биомаркери за идентификација на пациентите со зголемена склоност кон заболувањето, да ни обезбедат брза и сигурна дијагноза, динамичен мониторинг на активноста на болеста, како и пронаоѓање на нови терапевтски модалитети.

MATRIX METALLOPRTEINASES - MOLECULAR BIOMARKERS OF PERIODONTAL DISEASE

Ristoska S.

Summary

Periodontal disease is an inflammatory condition which gradually leads to impairment and destruction of supportive tissues. The extracellular matrix components, including collagens, fibronectin, and proteoglycans, are the major tissue proteins responsible for the structural integrity of the tooth anchoring apparatus. Destruction of the supportive apparatus is characterized by a degrada-

tion of the extracellular matrix components, leading to irreversible loss of periodontal soft connective tissues and alveolar bone. Bacterial pathogens and their products are primary etiologic agents that directly initiate periodontal disease. However, it is the host inflammatory and immune response, triggered by these pathogens and their virulence factors, that is mainly responsible for the tissue destruction observed during periodontitis. Matrix metalloproteinases (MMPs), a family of zinc-dependent endopeptidases, are secreted by a variety of cells as inactive precursors (proMMPs) and degrade a series of collagens. MMPs significantly contribute to tissue destruction and remodeling events, and are the key enzymes responsible for extracellular matrix degradation. The presence of interstitial collagenase (MMP-1), gelatinase-A (MMP-2), stromelysin-1 (MMP-3), neutrophil collagenase (MMP-8), and gelatinase-B (MMP-9), has been identified in gingival tissues, gingival crevicular fluid samples and saliva samples from periodontitis affected patients. MMP-2, MMP-8 and MMP-13 originate from inflamed gingival sulcular epithelium, polymorphonuclear leukocyte and they were found in tissue extract supernatants. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies have suggested that there is an relation between MMPs and periodontal disease. They imply that MMP are molecular biomarkers for assessment of the periodontal status in medical and research settings.

Key words: Matrix metalloproteinases, periodontal disease, biomarkers

Литература

1. Birkedal-Hansen H., Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197-250, 1993.;
2. Chen HY, Cox SW, Eley BM, et al: Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 27: 366, 2000.
3. Delaisse J-M, Vaes G (1992). Mechanism of mineral solubilization and matrix degradation in osteoclastic bone resorption. In: Rifkin BR, Gay CV, editors. *Biology and physiology of the osteoclast*. Boca Raton (FL): CRC Press, 289-314.
4. Everts V, Delaisse J-M, Korper W, Niehof A, Vaes G (1992). Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. *J Cell Physiol* 150: 221-231.

5. Genco RJ (1992). Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 63: 338-355.
6. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2,8 and 9 by Chlorhexidine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, May 1999, p.437-439, Vol.6, No. 3
7. Golub L M et al. 1997 A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflammation Research* 46: 310-319;
8. Golub L M et al. 1997 A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflammation Research* 46: 310-319;
9. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 12: 12-26, 1998. ;
10. Hanemaaijer R et al. 1997 Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by TNF-alpha and doxycycline. *Journal of Biological Chemistry* 272:31504-31509.;
11. Hasty K A, Jeffry J J, Hibbs M S, Welgus H G 1987. The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *Journal of Biological Chemistry* 262: 10048-10052.;
12. Hernandez M, Martinez B, Tejerina JM, Valenzuela MA, Gamonal J. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007 Sep; 34(9): 729-35.;
13. Holt S. C., and E. Bramanti. 1991. Factors in virulence and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2:177-281.
14. Ilgenli T, Vardar-Sengul S, Gurkan A, Sorsa T, Stackelberg S, Kose T, Ailla G. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-13 levels and molecular forms in various types of periodontal diseases. *Oral Dis*. 2006 Nov; 12(6): 573-579. ;
15. Ingman et al. 1996 Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *Journal of Clin Periodontology* 23 (12): 1127-1132;
16. Ingman T, Apajalahti S, Mantyla P, Savolainen P, Sorsa T. 2005 Matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. *European Journal of Orthodontics* 27: 202-207.;
17. Johansson N, Airola K, Grenman S, Kariniemi A, Kere U K, Kahari V M 1997 Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *American Journal of Pathology* 151: 499-50;
18. Kinane DF: Regulators of tissue destruction and homeostasis as diagnostic aids in periodontology, *Periodontol* 200 24: 215, 2000.
19. Kontinen Y T et al. 1998 New collagenolytic enzymes/cascade identified at the pannus-hard tissue junction in rheumatoid arthritis: destruction from above. *Marix Biology* 17: 585-601.
20. Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA: Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis, *J Periodontal Res* 30: 23, 1995.
21. Lindy O et al. 1997 Matrix metalloproteinases-13 (collagenase-3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis and Rheumatism* 40: 1391-1399.;
22. Listgarten MA (1986). Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 13: 418-425.
23. Meikle MC, Bord S., Hembry RM, Comston J., Croucher PI, Reynolds JJ. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J Cell Sci* 103: 1093-1099.
24. Murphy GJP, Murphy G, Reynolds JJ (1991c) The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett* 289: 4-7.;
25. Overall CM, Wiebkin OW, Thonard JC (1987). Demonstration of tissue collagenase activity in vivo and its relationship to inflammation severity in human gingival. *J Periodontal Res* 22: 81-88.
26. Overall CM, Wrana JL, Sodek J (1989). Independent regulation of collagenase 72-kDa progelatinase, and matrix metalloproteinase inhibitor (TIMP) expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 264: 1860-1869.
27. Potempa J.A., Banbula, and J. Travis. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol*. 2000 24:153-192.
28. Reynolds J.J., Hembry R.M., Meikle M.C. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res* 8(2): 312-319, 1994.;
39. Reynolds J.J., and M.C. Meikle. 1997. Mechanisms of connective tissue destruction in periodontitis. *Periodontol*. 2000. 14: 144-157.
30. Slots J (1986). Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol* 13: 912-917.

31. Smalley J.W. Pathogenic mechanisms in periodontal disease. *Adv Dent Res* 8 (2): 320-328, July, 1994.
32. Smith GN, Brandt KD, Hasty KA. Activation of recombinant human neutrophil procollagenase in the presence of doxycycline results in fragmentation of the enzyme and loss of enzyme activity. *Arthritis Rheum* 39:235-244, 2002.;
33. Sorsa T., V.-J. Uitto, K.Suomalainen, H. Turto, and S. Lindy. 1987. A trypsin-like protease from *Bacteroides gingivalis*: partial purification and characterization. *J. Periodontal Res.* 22: 375-380.
34. Sorsa T, Ingman T, Mikkonen T, Suomalainen K, Golub L M, Thesleff I 1992 Characterisation of interstitial collagenase in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement in man. In: Davidovitch Z (ed.) *The biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation.* EBSCO Media, Alabama, pp. 47-51;
35. Sorsa T, Ingman T, Mikkonen T, Suomalainen K, Golub L M, Thesleff I 1992 Characterisation of interstitial collagenase in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement in man. In: Davidovitch Z (ed.) *The biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation.* EBSCO Media, Alabama, pp. 47-51;
36. Takahashi I et al. 2003 Expression of MMP-8 and -13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *Journal of Dental Research* 82: 562-567.;
37. Tervahartiala T, Pirila E, et al. 2000 The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2,-8,-13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *Journal of Dental Research* 79: 1969-1977.
38. Uitto V-J, Raeste A-M (1978). Activation of latent collagenase of human leukocytes and gingival fluid by bacterial plaque. *J Dent Res* 57: 844-851.
39. Uitto, V.-J., M. Haapasalo, T. Laakso, and T. Salo. 1988. Degradation of basement membrane collagen by proteases from some oral microorganisms. *Oral Microbiol. Immunol.* 3: 97-102.
40. Weiss S J. 1989 Tissue destruction by neutrophils. *New England Journal of Medicine* 320: 365-376.
41. Welgus H G, Jeffrey J J, Eisen A Z 1981. The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. *Journal of Biological Chemistry* 256: 9511-9515.