Proteomska istraživanja parodontnih bolesti

Badovinac, Ana

Professional thesis / Završni specijalistički

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:275093

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 3.0

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Ana Badovinac

PROTEOMSKA ISTRAŽIVANJA PARODONTNIH BOLESTI

poslijediplomski specijalistički rad

Zagreb, prosinac 2015.

Rad je ostvaren na Zavodu za parodontologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor rada: Prof.dr.sc. Darije Plančak, Zavodu za parodontologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Lektor hrvatskog jezika: Tomislav Salopek, profesor hrvatskog jezika i književnosti te komparativne književnosti

Dankovečka 1a, 10000 Zagreb, tel: 098890190

Lektor engleskog jezika: Anna-Maria Uroda, sudski tumač i prevoditelj za engleski jezik, diplomirani anglist

Prilaz Gjure Deželića 55, 10000 Zagreb, tel: 0915205801

Rad sadrži: _65_ stranica

__3_ tablice

__3_ slike

__1_CD

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Dariju Plančaku na nesebičnoj

pomoći pri izradi ovog rada.

SADRŽAJ

1. Uvod.....1
2. Svrha rada.....4
3. Parodontne bolesti.....6
    3.1. Gingivne bolesti.....9
        3.1.1. Gingivne bolesti uzrokovane plakom.....10
    3.2. Parodontitis.....12
        3.2.1. Agresivni parodontitis.....13
        3.2.2. Kronični parodontitis.....15
        3.2.3. Destrukcija parodontnih tkiva.....17
4. Proteomska istraživanja parodontnih bolesti.....20
    4.1. Proteomske analize i spektrometrija mase.....21
    4.2. Dosadašnja proteomska istraživanja u parodontologiji.....26
        4.2.1. Odabir uzoraka za proteomska istraživanja.....27
        4.2.2. Rezultati proteomskih istraživanja parodontnih bolesti.35
5. Rasprava.....42
6. Zaključak.....45
7. Sažetak.....47
8. Summary.....49
9. Literatura.....51
10. Životopis.....64

POPIS KRATICA

1-DE ili 2-DE: jedno-(dvo-)dimenzionalna elektroforeza

CAL- gubitak kliničkog pričvrstka

GAgP: generalizirani agresivni parodontitis

Ig: imunoglobulini

IL: interleukin

KP: kronični parodontitisa

LC: tekućinska kromatografija

LPS: lipopolisaharidi

MALDI: od engl. matrix-assisted laser desorption/ionization

MMP: matriksne metaloproteinaze

MS: spektrometrija mase

MS/MS: uzastopna spektrometrija mase

PGE_2: prostaglandin E_2

SDS-PAGE: od engl. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

SELDI: od engl. surfaceenhanced laser desorption/ionization

TNF-α : faktor tumorske nekroze α

1. Uvod

U prošlom desetljeću razvoj spektrometrije mase doveo nas je u novo doba analize proteina, ali i potrage za biomarkerima koji bi mogli imati velik utjecaj u dijagnostici, liječenju i prognozi različitih bolesti. Analize proteina u uzorcima rade se do najsitnijih detalja. Osim toga što se detektiraju prisutnost, zastupljenost i količina proteina, moguće je čak i određivanje posttranslacijskih modifikacija različitih proteina u analiziranom uzorku.

Proteomske analize omogućuju iscrpan prikaz ekspresije proteina u različitim biološkim uzorcima i najnapredniji su pristup u istraživanjima proteoma. Budući da su proteini sastavni dijelovi organizma i da sudjeluju u gotovo svim unutarstaničnim i međustaničnim procesima, proteomika znatno pridonosi trenutačnim spoznajama o proteinima koji su vezani za zdravlje, odnosno bolest.

Napredak u izolaciji tkiva, separaciji proteina, kvantifikaciji, analizama sekvenca, te strukturna i interakcijska proteomika otvaraju nova vrata u istraživanju fizioloških i patoloških zbivanja unutar parodonta. Spoznaja cjelokupne ekspresije staničnih i matriksnih proteina dobar je početak i označuje potpuno novu eru u razumijevanju događaja u parodontu, a nove spoznaje o molekulama i molekularnim zbivanjima koje se događaju u patogenezi parodontitisa mogle bi pomoći u razjašnjavanju još uvijek nepoznatih činjenica koje se događaju tijekom razvoja ove bolesti.

Dosadašnja proteomska istraživanja parodontnih bolesti većinom su analizirala proteom sulkusne tekućine i sline. Radovi su pokazali velik broj proteina koji bi mogli pridonijeti razumijevanju patoloških promjena koje se događaju tijekom parodontitisa te su izdvojili nove proteine koji bi mogli biti potencijalni biomarkeri parodontnih bolesti, odnosno zdravlja.

2. Svrha rada

Svrha je ovoga preglednog rada prikazati trenutačne spoznaje proteomskih istraživanja parodontnih bolesti te izdvojiti proteine koji bi mogli biti potencijalni biomarkeri.

3. Parodontne bolesti

Upalne parodontne bolesti variraju od relativno benignih oblika bolesti potpornoga zubnoga tkiva poznatih pod nazivom gingivitis, pa sve do agresivnog i kroničnog parodontitsa, koji ne da su samo prijetnja denticiji nego mogu biti prijetnja cjelokupnomu zdravlju organizma. Svi oblici upalnih parodontnih bolesti povezani su s kroničnom upalom, koja rezultira destrukcijom potpornih zubnih tkiva. Ako se bolest ne liječi, nastaje znatan gubitak tkiva, zubi postaju pomični i u konačnici može nastupiti gubitak zuba zahvaćenog bolešću (1).

Zanimljivo je da parodontna bolest nije homogeno stanje koje podjednako zahvaća sve zube i sve površine određenog zuba, nego je svaka zahvaćena površina mikrookolina za sebe. Tako je u ustima istog pacijenta moguće dijagnosticirati i gingivitis i parodontitis, ali i pronaći zdravo mjesto. Do danas još nije poznato zašto u nekih pacijenata, ili u istog pacijenta, upala ostaje ograničena na rubni dio gingive, a u nekih napreduje u apikalnome smjeru. Sigurno je tek da se narušava ravnotežno stanje domaćina i mikroorganizama (2).

Kad govorimo o zdravom parodontu, gingivi, valja napomenuti da je pravi naziv klinički zdrava gingiva, odnosno parodont. Naime, gingiva je u stalnom doticaju s mikroorganizmima i njihovim produktima u području sulkusa te je kao takva tkivo u kojemu je stalno prisutan upalni infiltrat. Neutrofili prevladavaju u području spojnog epitela, dok se limfociti nalaze u vezivnome tkivu (3). Prava se upalna reakcija razvija kada produkti mikroorganizama nadvladaju obranu domaćina. Među najčešće spominjanim sintetiziranim

produktima mikroorganizama spominju se kolagenaze, hijaluronidaze, proteinaze, endotoksini i hondroitinsulfataze (4). Svi oni dovode do oštećenja epitela i vezivnoga tkiva te do proširivanja međustaničnoga prostora spojnog epitela. U tim trenutcima upala je smještena na području gingive i uzrokuje bolest koja se zove gingivitis (5). Tijekom gingivitisa naglašen je gubitak kolagena te počinju i imunosne reakcije domaćina na mikroorganizme. Upala može ostati ograničena na područje gingive dugi niz godina te biti bez gubitka parodontnoga pričvrstka, ligamenta ili alveolarne kosti, ali isto tako u nekom trenutku upala može početi širenjem u dublje slojeve parodonta te uzrokovati prelazak gingivitisa u parodontitis (6).

3.1. Gingivne bolesti

Bolesti gingive, gingivitisi, obuhvaćaju veliku skupinu kompleksnih i zasebnih patoloških entiteta koji zahvaćaju gingivno tkivo. Dok je etiologija gingivnih bolesti vrlo raznolika, klinička obilježja kao što su klinički znakovi upale tkiva, pogoršanje kliničke slike uz prisutnost dentobakterijskoga plaka te reverzibilnost bolesti nakon uklanjanja etiološkog faktora, zajedničke su svim oblicima gingivnih bolesti (7).

Godine 1999. opisana su općenita obilježja zajednička svim gingivnim bolestima, a to su:

1. znakovi i simptomi bolesti ograničeni su na gingivu,
2. prisutnost zubnoga plaka potrebna je za početak i/ili pogoršanje lezije,
3. prisutnost kliničkih znakova upale: edem, promjena boje, povišenje sulkusne temperature, krvarenje na stimulaciju i povećanje toka sulkusne tekućine,
4. bolest se pojavljuje na parodontu bez kliničkog gubitka pričvrstka, ali i na reduciranom parodontu,
5. reverzibilnost bolesti nakon uklanjanja etioloških čimbenika,
6. mogući prekursor u kliničkom gubitku pričvrstka.

Klasifikacija gingivnih bolesti također je definirana 1999. godine, a oslanja se na prisutnost dentalnoga plaka i čimbenike koji modificiraju upalno stanje gingive. Prema navedenoj klasifikaciji, gingivne bolesti uzrokovane zubnim plakom dijele se na one koje su povezane samo sa zubnim plakom na

parodontu bez gubitka pričvrstka ili na reduciranom parodontu te na one koje su povezane sa zubnim plakom i modificirane sustavnim čimbenicima kao što su spolni hormoni, lijekovi, sustavne bolesti i malnutricija (7).

Podjela bolesti koje zahvaćaju gingivu zahtijeva procjenu pacijentovih znakova i simptoma bolesti, detaljnu stomatološku i medicinsku anamnezu, klinički pregled te radiološku analizu.

3.1.1. Gingivne bolesti uzrokovane plakom

Gingivitis uzrokovan plakom upalno je stanje gingive koje nastaje kao posljedica nakupljanja dentobakterijskoga plaka na rubovima gingive. Uloga dentobakterijskoga plaka u etiologiji gingivitisa potvrđena je 1965. godine legendarnim znanstvenim istraživanjem eksperimentalnog gingivitisa u ljudi Löea i suradnika (8). Gingivitis uzrokovan plakom pojavljuje se u svim dobnim skupinama i najčešći je oblik parodontne bolesti (9, 10). Klinički znakovi bolesti jesu eritem, edem, krvarenje, bol, osjetljivost i hiperplazija (tablica 1.) (8). Gubitak pričvrstka u toj bolesti ne postoji, niti postoji radiološki gubitak kosti.

Tablica 1. Obilježja gingivitisa uzrokovana plakom. Preuzeto iz: Mariotti A. AnnPeriodontol. 1999;4(1):7-19.

Obilježja gingivitisa uzrokovana plakom
1. Prisutnost plaka na rubu gingive
2. Bolest počinje na rubu gingive
3. Promjena boje gingive
4. Promjena kontura gingive
5. Sulkusna temperatura lagano povišena
6. Gingivni eksudat povećan
7. Krvarenje na provokaciju
8. Nema gubitka alveolne kosti
9. Nema gubitka pričvrstka
10. Histološke promjene
11. Reverzibilnost bolesti nakon uklanjanja plaka

Bolest počinje na rubovima gingive te se širi *per continuitatem,* a intenzitet kliničkih znakova i simptoma varira od pacijenata do pacijenta, ali i unutar samog pacijenta (11). Osim toga, na intenzitet bolesti mogu utjecati još i morfologija zubne krune i korijena, restorativni i protetski nadomjesci. Patohistološke promjene uključuju proliferaciju bazalnoga epitelnog pričvrstka koji dovodi do apikalne i lateralne stanične migracije, upale krvnih žila epitelnoga pričvrstka, destrukcije kolagenskih vlakana, citopatološke promjene fibroblasta i progresivni upalni stanični infiltrat (3). Bakteriološka

flora pacijenata s gingivitisom uzrokovanim plakom razlikuje se od flore zdravih pojedinaca, no ipak ne postoji bakterijska flora koja bi bila specifična za ovu bolest (12).

3.2. Parodontitis

Parodontitis je upalna bolest koja zahvaća potporno zubno tkivo, a uzrokovana je specifičnim anaerobnim patogenima koji se nalaze na površini zuba. Karakterizira ga upala gingive te destrukcija potporne kosti i parodontnog ligamenta koji napredovanjem bolesti dovode do povećane pomičnosti zuba i u konačnici uzrokuju gubitak zuba (13). Svaki parodontitis počinje gingivitisom koji je definiran kao reverzibilno upalno stanje koje ne uzrokuje destrukciju potpornih struktura, nego je isključivo lokaliziran na područje gingive. Ako se takvo upalno stanje ne liječi, dolazi do sekrecije proteaza i drugih upalnih komponenti koje u nekim slučajevima uzrokuje destrukciju parodontnoga tkiva i bolesti zvanu parodontitis (14).

Dva su najčešća oblika parodontitsa: agresivni i kronični parodontitis. Agresivni oblik češće zahvaća mlađe osobe, destrukcija parodontnoga tkiva je brza, postoji nerazmjer između stupnja uznapredovalosti bolesti i količine tvrdih i mekih bakterijskih naslaga na površini zuba te ima tendenciju pojavljivanja unutar iste obitelji (15). Nasuprot agresivnom obliku, kronični parodontitis karakteriziraju sporije napredovanje bolesti i starija životna dob.

3.2.1. Agresivni parodontitis

Agresivni je parodontitis definiran na međunarodnoj radionici za klasifikaciju parodontnih bolesti 1999. godine (16). Dotadašnja podjela parodontitisa temeljila se na dobi pacijenta, što se, prema novim spoznajama, ispostavilo nepravilnim kriterijem za donošenje dijagnoze. Agresivni oblik parodontitisa može se pojaviti u bilo kojoj dobi, a primarna obilježja za klasifikaciju postala su:

- medicinska anamneza bez osobitosti
- brz gubitak pričvrstka i kosti
- tendencija pojavljivanja bolesti unutar obitelji.

Sekundarne obilježja za koja se smatra da se obično, ali ne i obvezno pojavljuju, jesu:

- nerazmjer između količina mikrobnih naslaga i težine destrukcije
- povišena razina *A. actinomycetemcomitansa*, a u nekih pacijenata i *P. gingivalisa*
- abnormalnosti fagocita
- hiperreaktivni fenotip makrofaga
- povišene razine PGE_2 i IL-1
- te spontani prestanak napredovanja bolesti.

Da bi se postavila dijagnoza agresivnog parodontitisa, ne trebaju biti prisutna i dokazana sva navedena obilježja, nego ju je moguće temeljiti i na kliničkim, radiološkim i anamnestičkim podatcima. Laboratorijska su testiranja svakako dobrodošla, no nisu ključan korak u određivanju bolesti.

Budući da se grupa stručnjaka složila da postoji dovoljan broj specifičnih obilježja za podjelu bolesti na lokalizirani i generalizirani oblik, 1999. godine definirana je i potklasifikacija agresivnog parodontitisa.

Lokalizirani oblik karakteriziraju:

- početak oko vremena i u vrijeme puberteta
- jak odgovor serumskoga protutijela na uzročnike
- interproksimalni gubitak pričvrstka na prvom kutnjaku/sjekutiću te najmanje još na dvama trajnim zubima, od kojih je jedan prvi kutnjak, te da zahvaća ne više od dva zuba a da nisu samo prvi kutnjak i sjekutić.

Generalizirani oblik karakteriziraju:

- obično zahvaća osobe mlađe od 30 godina, a mogu oboljeti i starije
- epizodna priroda destrukcije pričvrstka i alveolne kosti
- slab odgovor serumskog protutijela na uzročnike
- generaliziran interproksimalni gubitak pričvrstka na najmanje trima trajnim zubima a da to nisu samo prvi kutnjak i sjekutić.

3.2.2. Kronični parodontitis

Prema definiciji Američke akademije za parodontologiju, kronični je parodontitis infektivna bolest pri kojoj dolazi do upale potpornih zubnih tkiva, gubitka pričvrstka i alveolne kosti, uz posljedično stvaranje parodontnih džepova i/ili recesiju gingive. To je najčešći oblik parodontitisa čija prevalencija i uznapredovalost bolesti rastu s dobi pacijenata. Početak bolesti može biti u bilo kojoj dobi, no ipak češće započinje u odraslih osoba. Dentobakterijski plak zaslužan je za početak bolesti, no i obrambeni mehanizmi domaćina imaju važnu ulogu u patogenezi. Ako se ne liječi, bolest napreduje, a njezina se progresivnost može potvrditi i mjeriti samo ponovljenim kliničkim pregledima.

Kronični se parodontitis dijeli prema opsegu i jačini bolesti. Prema broju zahvaćenih zubnih ploha razlikujemo (16):

- lokalizirani kronični parodontitis, zahvaćeno ≤ 30 % zubnih ploha
- generalizirani kronični parodontitis, zahvaćeno > 30 % zubnih ploha.

Težina bolesti može se klasificirati s obzirom na gubitak kliničkoga pričvrstka (CAL) kao:

- blaga, 1 – 2 mm CAL
- srednja, 3 – 4 mm CAL
- teška ≥ 5 mm CAL.

Klinička su obilježja kroničnog parodontitisa sljedeća:

- najčešće se pojavljuje u odraslih osoba, no moguć je i u djece i adolescenata
- opseg destrukcije razmjeran je prisutnošću lokalnih faktora
- subgingivni kamenac čest je nalaz
- varijabilna mikrobiološka slika
- bolest napreduje sporo do umjereno brzo, ali mogu postojati i razdoblja izrazito brze progresije
- prema raširenosti i težini, bolest se može dalje klasificirati
- može biti povezan s lokalnim predisponirajućim čimbenicima (npr. jatrogeni faktori, faktori povezani s položajem zuba)
- bolest može biti modificirana i/ili povezana sa sustavnim bolestima (npr. dijabetes, infekcija HIV-om) te s ostalim čimbenicima poput pušenja i emocionalnoga stresa.

3.2.3. Destrukcija parodontnih tkiva

Imunosna i upalna zbivanja tijekom parodontitisa vođena su velikim brojem različitih molekula koja uzrokuju destrukcije parodontnih tkiva. Zaštitni odgovor organizma postaje nadjačan, koncentracija patogena u subgingivnom području raste, a upalna zbivanja prodiru u sve dublje slojeve parodonta.

Izravan patološki učinak bakterija na parodont odigrava se u ranijim stadijima bolesti. Analize plaka pacijenata s rastućom težinom upale gingive otkrivaju bakterijske vrste koje su sposobne izazvati upalni odgovor. Tako npr. prisutnost bakterije *Fusobacterium nucleatum* i njezinih metaboličkih produkata izravno utječe na vaskularizaciju gingive, dolazi do edema i pojačanog stvaranja sulkusne tekućine, čime nastaje pogodan okoliš i za druge mikroorganizme (17). *P. gingivalis* poznat je pak po stvaranju enzima (proteaza, kolagenaza, fibrinolizina, fosfolipaze A) koji dovode do degradacije okolnih tkiva, metaboličkih produkta kao NH_3, H_2S i masne kiseline, koji su pak toksični za okolne stanice (18-20), te lipopolisharida (LPS) koji su *in vitro* sposobni potaknuti resorpciju kosti (21).

Posredan patološki učinak bakterija počinje kada obrambeni elementi parodontnoga tkiva bivaju nadjačani virulentnošću mikroorganizama. Tada počinje odgovor domaćina koji pokreće destruktivne događaje u tkivu. Polimorfonuklearni limfociti (PMN) stvaraju enzime koji imaju sposobnost degradacije kolagena i bazalne membrane te dolazi do aktivacije monocita, limfocita, fibroblasta i drugih stanica domaćina. Bakterijski LPS-i stimuliraju

stvaranje citokina i prostaglandina E_2 (PGE_2) koji potiču oslobađanje matriksnih metaloproteinaza (MMP) (22, 23).

Citokini i upalni posrednici (medijatori) koji se najčešće povezuju s parodontitisom jesu interleukini IL-1 i IL-6, faktor tumorske nekroze TNF-α i PGE_2. IL-1 je upalni citokin s mnogobrojnim funkcijama, a povišene razine u tkivu i sukusnoj tekućini uočene su u pacijenata s parodontnim bolestima. Svoju ulogu u patološkim događanjima tijekom parodontitisa ponajprije ostvaruje stimulacijom monocita i fibroblasta na oslobađanje PGE_2 te MMP (24). IL-6 stvaraju limfociti, monociti i fibroblasti, a primarno djeluje na proliferaciju plazma-stanica zaslužnih za stvaranje protutijela. Usto, dokazana je i stimulativna aktivnost u stvaranju osteoklasta, što izravno povezuje IL-6 s resorpcijom kosti (25). Njegove su razine također povišene u pacijenata s parodontitisom, i to u većoj mjeri nego u osoba s gingivitisom (26, 27). IL-8 kemotaksijski djeluje na neutrofile i potiče stvaranje MMP-a. Stvaraju ga monociti stimulirani LPS-om, IL-1 i TNF-α, a zanimljivo je da ga se u lezijama parodontitisa ponajprije povezuje s makrofagima i spojnim epitelom (28, 29). TNF-α je citokin koji je po biološkim aktivnostima i funkciji vrlo sličan IL-1 (produkcija PGE_2, stimulacija MMP-a i resorpcija kosti), ali ono što ga čini drukčijim jest činjenica da ga izlučuju monociti i fibroblasti nakon stimulacije bakterijskim LPS-om (30). PGE_2, vazoaktivni upalni medijator iz grupe eikosanoida, u mnogim istraživanjima pokazuje povišene razine u sulkusnoj tekućini i tkivima, i to u osoba s gingivitisom i aktivnim parodontitisom (31). Stvaraju ga fibroblasti i makrofagi, a uloga u destrukciji

parodonta objašnjava se indukcijom MMP-a i resorpcijom kosti putem osteoklasta.

4. Proteomska istraživanja parodontnih bolesti

4.1. Proteomske analize i spektrometrija mase

Proteomika je znanost koja se bavi proučavanjem proteina, njihovom strukturom i funkcijom, sa svrhom sveobuhvatne kvalitativne i kvantitativne deskripcije proteinske ekspresije, ali i njezinih promjena pod utjecajem bioloških promjena koje se događaju primjerice za vrijeme bolesti i liječenja (32).

Proteomske analize omogućuju iscrpan prikaz ekspresije proteina u različitim biološkim uzorcima te označuju napredniji pristup u istraživanjima proteoma (proteom je cjelokupni proteinski sastav jedinice promatranja) (33). Budući da su proteini sastavni dijelovi organizma i da sudjeluju u gotovo svim unutarstaničnim i međustaničnim procesima, proteomika znatno pridonosi trenutačnim spoznajama o proteinima koji su vezani za zdravlje, odnosno bolest (34).

Istraživanja u području proteomike provode se s pomoću različitih tehnoloških i metodoloških pristupa, međutim, ne postoji nijedna tehnologija koja bi bila prikladna za jedinstvenu primjenu. Analize se sastoje od niza koraka koji zahtijevaju različitu tehnologiju, a organizacija i integracija analitičkih koraka ključ su uspjeha. U prošlom desetljeću razvoj spektrometrije mase doveo nas je u novo doba analize proteina, ali i potrage za biomarkerima koji bi mogli imati velik utjecaj u dijagnostici, liječenju i prognozi različitih bolesti. Analize proteina u uzorcima rade se do najsitnijih detalja. Osim toga što se detektiraju prisutnost, zastupljenost i količina

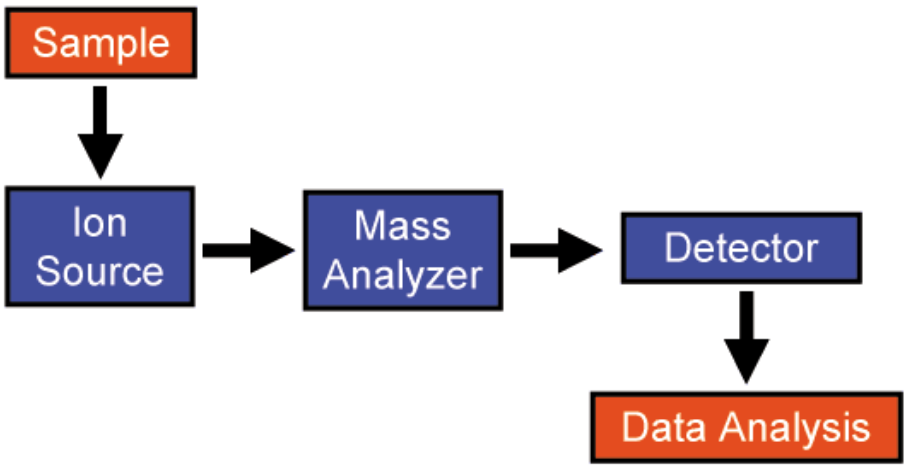
proteina, moguće je čak i određivanje posttranslacijskih modifikacija različitih proteina u analiziranom uzorku (35, 36).

Spektrometrija mase (MS) tehnika je kojom se analiziraju molekule na temelju njihove mase i naboja. Radi na principu ioniziranja kemijskih komponenti promatranog uzorka stvarajući nabijene molekule ili fragmente molekula te zatim mjeri omjer mase i naboja. Upotrebljava se za određivanje masa čestica, sastava uzorka ili molekule i za objašnjavanje kemijskih struktura molekula, primjerice peptida. Strojevi u kojima se obavlja MS zovu se spektrometri masa i sastoje se od triju glavnih dijelova: ionizatora (ionizira molekule), masenog analizatora (raspoređuje ione prema njihovim masama s pomoću elektromagnetskog polja) i detektora (detektira signal i pruža podatke za mjerenje zastupljenosti pojedinih iona) (slika 1.).



Slika 1. Spektrometar mase (preuzeto iz Planetorbitrap.com [stranica na internetu]. [posjećeno 4. ožujka 2013.]. Dostupno na: http://planetorbitrap.com/q-exactive.

Standardna procedura MS-a sastoji se od niza koraka (slika 2). Prvi je korak nanošenje uzorka u spektrometar mase, a zatim slijedi ionizacija molekula u ionizatoru koja rezultira stvaranjem nabijenih čestica (iona). Nastali ioni provode se kroz analizator koji ih potom razdvaja prema omjeru mase i naboja. Iz analizatora ioni idu na detektor, gdje proizvode električni signal koji se može registrirati na računalu (37).



Slika 2. Shematski prikaz koraka spektrometrije masa s pomoću spektrometra mase (preuzeto iz Commons.wikimedia.org [stranica na Internetu]. [posjećeno 4. ožujka 2013.]. Dostupno na: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ms_block_schematic.gif.

Da bi se željeni uzorci proteomski analizirali, potrebna je njihova priprema kojoj je cilj separacija proteina prije ulaska u spektrometar mase. Takvim se pristupom omogućuje se identifikacija većega broja proteina jer se zastupljeniji proteini odvajaju od onih koji su prisutni u malim količinama te se povećava dinamički raspon detekcije. Frakcioniranje uzoraka, npr. gel elektroforezom ili kromatografijom, pokazuje mnogo veći broj detektiranih peptida u usporedbi s uzorcima koji nisu frakcionirani (38). Gel elektroforeza metoda je kojom se s pomoću jednosmjerne struje razdvajaju pojedine komponente uzorka na temelju veličine i naboja. U proteomskim je istraživanjima cilj razdvojiti smjese proteina u određenom uzorku. U tu svrhu često se primjenjuje metoda gel elektroforeze u poliakrilamidnom gelu, SDS-PAGE (engl. *Sodiumdodecylsulphate- polyacrylamide gelelectrophoresis*). Kod SDS-a poliakrilamid gel elektroforeze proteini su tretirani anionskim deterdžentom, natrijevim dodecilsulfatom (SDS), koji razmata proteinske molekule u polipeptidne lance i daje im negativan naboj. Budući da se proteini istoga naboja razlikuju po svojoj veličini, separacija se događa na osnovi veličine molekula. Kraće molekule putuju brže kroz pore gela te je na taj način osigurano separiranje proteina određenog uzorka.

4.2. Dosadašnja proteomska istraživanja u stomatologiji i parodontologiji

Proteomska istraživanja pružaju iscrpne informacije o proteinima u različitim tkivima i organima, a budući da su proteini funkcijske molekule, metode koje omogućuju određivanje njihove ekspresije smatraju se bitnima za detaljnije razumijevanje funkcije tkiva. Proteomika je već pronašla mjesto u stomatologiji. Što se tiče mikroorganizama, rađena je proteomska analiza oralnih patogena (39), funkcionalnog proteoma bakterije *Streptococcus mutans* (40) i proteoma vanjske membrane bakterije *P. gingivalis* (41). Od stanica koje su važne za funkcioniranje parodontnih tkiva istraživani su fibroblasti (42), osteoblasti (43), osteoklasti (44) i cementoblasti (45). Također su istraživane bolesti zuba i usne šupljine kao što su karijes (46, 47), Sjögrenov sindrom (48) i oralni karcinomi (47).

Dosadašnja istraživanja parodontnih bolesti vezana su uglavnom za analize sline i sulkusne tekućine, međutim, postoji niz drugih uzoraka koji bi se mogli upotrijebiti. Uzorci dostupni za *in vivo* proteomska istraživanja parodontnih bolesti uključuju sulkusnu tekućinu, mikroorganizme, slinu, biopsijske uzorke tkiva te uzorke krvi (49) (slika 3.).



Slika 3. Biološki uzorci dostupni za proteomska istraživanja parodontnih bolesti

4.2.1. Odabir uzoraka za proteomska istraživanja

Kompleksnost parodontnih bolesti dovela je do opsežnih istraživanja patoloških mehanizama bolesti i do stalne potrage za biomarkerima. Proteini su potencijalno velik izvor biomarkera jer su upravo oni molekule koje povezuju statični genom pojedinca i biološku aktivnost organizma. Istraživanja proteoma bazirana na MS tehnologiji obuhvaćaju analiziranje različitih bioloških uzoraka te omogućuju istraživanja različitih stadija bolesti. Klinička proteomska istraživanja najčešće analiziraju biološke tekućine kao što su to urin i cerebrospinalni likvor, zatim krv i serum, te najrjeđe tkiva zbog svoje visoke kompleksnosti.

U tablici 2. prikazano je 17 proteomskih istraživanja parodontnih bolesti. Vidljivo je da su najzastupljenija istraživanja provedena na uzorcima sline i

sulkusne tekućine pacijenata, dok je gingivno tkivo kao biološki uzorak iskorišteno tek u jednom istraživanju.

Tablica 2. Kliničke proteomske studije parodontnih bolesti. Preuzeto iz: Guzman YA, Sakellari D, Arsenakis M, Floudas CA. ExpertRevProteomics. 2014;11(1):31-41.

Istraživanje	Tip bolesti	Vrsta uzorka	Sudionici	Broj uzoraka	MS platforma	Broj identificiranih proteina	Referenca
Wu i sur., 2009.	GAgP	slina	5 zdravih 5 bolesnih	10	2-DE, LC-MS/MS	11 humanih	(50)
Ngo i sur., 2010.	KP	sulkusna tekućina	12 u fazi održavanja	30 pojedinačnih 3 pulirana	A. 1-DE, MALDI-TOF B. 1-DE, LC-MS/MS	66 humanih (23 iz A, 66 iz B)	(51)
Bostanci i sur., 2010.	GAgP	sulkusna tekućina	5 zdravih 5 bolesnih	10 puliranih (4 mjesta/uzorku)	LC-MS	150 (101 humani, 27 bakterijski, 14 gljivičnih,	(52)

						8 virusnih)	
Haigh i sur., 2010.	teški generalizirani parodontitis	slina	9 bolesnih	18	A. 2-DE, MALDI-TOF B. 2-DE, LC-MS/MS	10 humanih (3 iz A, 7 iz B)	(53)
Goncavales i sur., 2010.	KP	slina	10 zdravih 10 bolesnih	20	A. 2-DE, MALDI-TOF B. LC-MS/MS	29 humanih (4 iz A, 27 iz B)	(54)
Grant i sur., 2010.	eksperimentalni gingivitis	sulkusna tekućina	10 zdravih	8 puliranih (3 mjesta/uzorku)	LC-MS/MS	202 (186 humanih, 16 bakterijskih)	(55)
Goncalves i sur. 2011.	gingivitis	slina	10 zdarvih 10 bolesnih	20	A. 2-DE, MALDI-TOF/TOF B. LC-	24 humanih (10 iz A, 23 iz B)	(56)

					MS/MS		
Choi i sur., 2011.	KP	sulkusna tekućina	11 zdravih, 12 bolesnih	4 pulirana po sudioniku i stanju	1-DE LC-MS/MS	305 humanih	(57)
Bliban i sur., 2012.	KP	sulkusna tekućina	6 zdravih, 6 bolesnih	12 puliranih (4 mjesta/uzorku)	LC-MS/MS	423 humana 32 bakterijska	(58)
Kido i sur. 2012.	neklasificirani parodontitis	sulkusna tekućina	1 zdravi 8 bolesnih	3 pulirana (2 bolesna, 1 zdrav)	1-DE LC-MS/MS	231 humani	(59)
Range i sur., 2012.	neklasificirani parodontitis	slina	13 bolesnih (pretilih) 25 zdravih (pretilih) 19 zdravih (normalne težine)	57 (pulirani za 1-DE MS)	SELDI-TOF, 1-DE MS ili MALDI-TOF/TOF	7 humanih	(60)
Ngo i sur., 2013.	KP	sulkusna tekućina	41 u fazi održavanja	41	MALDI-TOF/TOF	predikcijski model	(61)
Baliban i sur., 2013.	KP	sulkusna tekućina	51 bolesni, 45 zdravih	96 puliranih (4 mjesta/uzo	LC-MS/MS	predikcijski model	(62)

				rku)			
Bertoldi i sur., 2013.	KP	interproksimalno gingivno tkivo	25 bolesnih (najmanje 1 intrakoštanid efekt)	50	2 DE, LC-MS/MS	19 humanih	(63)
Bostanci i sur., 2013.	eksperimentalni gingivitis	sulkusna tekućina	20 zdravih	80 (2 mjesta/uzorku)	LC-MS/MS	254 humana, 18 bakterijskih	(64)
Tsuchida i sur., 2013.	KP	sulkusna tekućina	31 bolesni, 16 zdravih	6 puliranih (4 bolesna, 2 zdrava)	LC-MS/MS	619 humanih	(65)
GesellSalazar i sur., 2013.	neklasificirani parodontitis	slina	20 bolesnih, 20 zdravih	40	LC-MS/MS	344 humanih	(66)

1-DE ili 2-DE – jednodimenzionalna i dvodimenzionalna elektroforeza
KP – kronični parodontitis
GAgP – generalizirani agresivni parodontitis
LC – tekućinska kromatografija
MALDI – od engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization*
MS/MS – uzastopna spektrometrija mase
SELDI – od engl. *Surfaceenhanced laser desorption/ionization*

I slina i sulkusna tekućina biološki su uzorci koji se lako mogu prikupiti i ne zahtijevaju invazivnost pri uzimanju. Samim time oni su vrlo pogodan materijal za istraživanja, za razliku od tkiva čije je uzorkovanje vrlo invazivno.

Sulkusnu tekućinu karakteriziraju stabilnost i specifičnost te je zbog toga vrlo prikladan tip uzorka za proučavanje patoloških mehanizama parodontnih bolesti. Kao takva, može se iskoristiti za dijagnostiku, klasifikaciju bolesti,

predvidljivost napredovanja bolesti i za praćenje odgovora pojedinih parodontnih džepova na provedenu terapiju. Budući da se sulkusna tekućina može prikupiti i sa zdravoga i s bolesnoga mjesta unutar istog pacijenta, svaki je pacijent je istodobno sam sebi i zdrava kontrola. Time se nadilazi problem biološke varijabilnosti između pacijenata koji se često navodi kao nedostatak proteomskih istraživanja (67).

Sulkusna tekućina ima još jednu veliku prednost, a to je njezina pretvorba tijekom parodontnih bolesti iz gingivnoga transudata u gingivni eksudat. Ona odražava kompoziciju seruma te sadržava neke supstancije parodontnoga tkiva i mikroorganizama parodontnoga džepa (68). Kao što smo već spomenuli, u ustima pacijenta oboljelog od parodontne bolesti moguće je naći i bolesna i zdrava mjesta. Sulkusna se tekućina prikuplja s određenog mjesta uz zub pokazujući time visoku specifičnost za mjesto uzimanja. Tako je moguće u istog pacijenta prikupiti uzorke sulkusne tekućine sa zdravih mjesta i s mjesta zahvaćenih različitim stadijem parodontne bolesti. U tablici 2. vidljivo je da su se neki istraživači odlučili na puliranje (spajanje) više uzoraka istoga stanja u samo jedan uzorak. Iako se tim načinom pripreme uzoraka za analizu gubi specifičnost mjesta uzimanja, velika je prednost u tome što se povećanjem broja uzoraka povećava i šansa za detekciju proteina prisutnih u vrlo malim koncentracijama (67). Zbog navedenih obilježja sulkusna je tekućina odličan tip uzorka za istraživanja parodontnih bolesti.

Uzorci sline bili su osnova mnogobrojnih istraživanja proteinskih biomarkera oralnih bolesti te su vrlo dobra alternativa sulkusnoj tekućini (69). Budući da 90 % proteina sline dolazi iz parotidnih, submandibularnih i sublingvalnih žlijezda slinovnica, uzorci sline ne mogu biti visoko specifični za mjesto uzimanja kao sulkusna tekućina. Međutim, velika prednost sline kao uzorka za analizu jest jednostavnost njezina prikupljanja. Dok je prikupljanje sulkusne tekućine tehnički vrlo zahtjevno i često ga izvode samo stručnjaci, prikupljanje sline može obaviti dentalni asistent ili sestra.

Upotrebu uzoraka sline za proteomska istraživanja treba razmotriti vrlo oprezno. Naime, uspoređujući slinu s drugim vrstama uzoraka, npr. serum, vidljivo je da dinamički raspon detekcije proteina u uzorcima sline bitno manji nego u serumu. U istraživanjima proteoma sline zastupljenost *top 10* proteina u uzorku katkad iznosi 40 % ukupnoga broja proteina, a kadšto čak i 98 % (34, 70). Time se teško mogu detektirati proteini koji se nalaze u vrlo malim koncentracijama, a upravo su ti proteini oni najzanimljiviji u istraživanju proteoma uzorka. Još jedan nedostatak sline kao uzorka za proteomska istraživanja jest prisutnost brojnih proteaza u njoj. Proteaze uništavaju proteine sline i na taj način uništavaju potencijalne biomarkere. Navedeni nedostatak, za razliku od prvoga, može se u nekoj mjeri zaobići dodavanjem inhibitora proteaza u uzorak, no mnogo bolji način je smrzavanjem uzoraka na – 80 °C odmah nakon prikupljanja (71, 72). Osim navedenog, pri odabiru pacijenata i prikupljanja uzoraka sline treba imati na umu da se relativni i apsolutni sastav sline mijenjaju tijekom dana te da pacijentova dob također

mijenja sastav i koncentraciju salivarnog proteoma (73, 74). Za razliku od sline sulkusna tekućina, čiji se volumen povećava tijekom parodontnih bolesti, ne pokazuje promjenu u koncentraciji proteina ovisno o pacijentovoj bolesti i dobi (75, 76).

Istraživanja proteoma sline i sulkusne tekućine nastoje opravdati izbor jedne biološke tekućine pred drugom, no u budućnosti bi bilo dobro da se provedu istraživanja istodobno na obama tipovima uzoraka u svrhu otkrivanja biomarkera parodontitisa.

4.2.2. Rezultati proteomskih istraživanja parodontnih bolesti

Uvođenje spektrometrije mase za analizu kliničkih uzoraka pacijenata s parodontnim bolestima pokazalo se kao odličan pristup koji bi mogao znatno utjecati na znanje o proteinima vezanim za zdravlje, odnosno bolest (34). Osnovni cilj opsežnih proteomskih istraživanja u području parodontologije jest izdvajanje liste proteina koji bi mogli biti specifični za određeno stanje te pratiti promjene u zastupljenosti proteina ovisno o stadiju, fazi bolesti ili pak odgovoru na terapiju. U tablici 3. navedeni su proteini koji su se istaknuli u dosadašnjim proteomskim istraživanjima parodontnih bolesti.

Tablica 3. Proteini koji su se istaknuli u dosadašnjim proteomskim istraživanjima parodontnih bolesti.

Ime proteina	Biološka funkcija	Ekspresija u bolesti
matriksne metaloproteinaze	degradacija kolagena	povišene u parodontitisu
hemoglobin	protein plazme	povišen u parodontnim bolestima
haptoglobin	protein plazme	povišen u parodontitisu
α-2-makroglobulin	protein plazme	povišen u KP
aktin	formacija mikrofilamenata	povišen u parodontitisu
profilin	veže aktin	povišen u parodontitisu
plastin	veže aktin	povišen u parodontitisu
adenil-ciklaza 1	veže aktin	povišen u parodontitisu
apolipoproteini	vežu lipide	A1 – snižen u parodontnim

		bolestima B1 – povišen u gingivitisu
aneksini	upalni i imunološki odgovor	sniženi u parodontitisu
ATP-vežući proteini	homeostaza proteina	povišeni u parodontnim bolestima
α-amilaza	kidanje polisaharida	povišen u parodontnim bolestima
azurocidin	upalni i imunološki odgovor	povišen u parodontitisu
katalaza	redukcija aktivnog kisika u upali	povišen u KP-u
cistatini	inhibitori proteaza	sniženi u parodontnim bolestima
fibrinogen	upalni odgovor	povišen u KP-u
S100-A9	upalni odgovor, antimikrobno djelovanje	povišen u KP
imunoglobulini	imunološki odgovor	povišeni u parodontnim bolestima
vitamin D vežući protein	imunološki odgovor	povišen u parodontitisu
neutrofildefenzin 1	antimikrobno djelovanje	povišen u parodontnim bolestima
14-3-3 protein sigma	višestruko djelovanje, regulacija rasta epitelnih stanica	snižen u parodontitisu
histoni	antimikrobno djelovanje	povišeni u parodontitisu
karbonilreduktaza 1	katalitički enzim	snižen u parodontitisu
Parodontitis: povezanost s kroničnim i agresivnim oblikom Parodontne bolesti: povezanost s parodontitisom i gingivitisom KP – kronični parodontitis		

Matriksne metaloproteinaze (MMP), proteini koji dovode do razaranja kolagena u upaljenome parodontnom tkivu, pronađeni su u nekoliko kliničkih studija KP-a i GAgP-a. Njihova je ekspresija bila pojačana u uzorcima bolesnih osoba/mjesta u usporedbi s uzorcima zdravih (52, 57, 66). Iako bi se moglo očekivati da se MMP detektiraju u svim uzorcima bolesnih mjesta i pacijenata, čini se da je njihova koncentracija u rasponu od samo nekoliko pikograma/mililitru nedovoljna te ih zaklanjaju veći proteini prisutni u mikrogramima/mililitru, primjerice albumin.

U mnogim su istraživanjima identificirani proteini plazme hemoglobin (52, 54, 57, 59, 64), haptoglobin (52, 53, 59) i α-2-makroglobulin (54, 66). Prisutnost navedenih proteina u uzorcima pacijenata oboljelih od parodontnih bolesti ne začuđuje jer se u takvih pacijenata pojavljuje pojačana sklonost krvarenju gingive, a samim time raste i koncentracija proteina plazme u uzorcima.

Protein aktin bitan je protein mikrofilamenata te pokazuje povezanost s parodontitisom. Izlaganje aktina poznatomu parodontnom patogenu gram-negativnoj bakteriji *Treponemi denticoli* dovodi do njegova pregrađivanja i do odvajanja fibroblasta (77). U istraživanjima sulkusne tekućine i interproksimalnoga gingivnog tkiva pacijenata s parodontitisom aktin je pokazao povećanu ekspresiju s obzirom na uzorke zdravih ispitanika (57, 63). Osim njega, proteini koji su zaslužni za vezanje aktina, profilin (52, 66) i plastin (52, 57, 66), također su pokazali pojačanu ekspresiju u parodontitisu.

Proteomska su istraživanja pokazala zanimljive korelacije između parodontnih bolesti i lipoproteina. *High-densitylipoprotein (LDL*) (78) i njegova bitna sastavnica apolipoprotein A-1 (56, 58) sniženi su u parodontitisu, dok su *low-density protein (LDL)* i apolipoprotein B-100 povišeni u parodontitisu, odnosno gingivitisu (55, 78). Apolipoproteini su proteini koji se vežu za lipide stvarajući lipoproteine te na taj način sudjeluju u transportu lipida kroz limfni i cirkulacijski sustav. Osim uloge u transportu lipida, spominje ih se i kao sudionike imunosnog odgovora domaćina. Naime, istraživanje Kallioa i sur. pokazalo je da bi upala i endotoksemija pri teškom parodontitisu mogle povećati aktivaciju makrofaga posredovanu lipoproteinima i nakupljanje kolesterola u stanicama (79). Vidljivo je da postoje poveznice apolipoproteina i parodontitisa, no potrebna su daljnja istraživanja za točnije činjenice i tvrdnje.

S-100 proteini često su identificirani u proteomskim istraživanjima pacijenata s parodontnim bolestima, a razlog tomu jest njihova uključenost u upalni odgovor. U dosadašnjim proteomskim istraživanjima sulkusne tekućine pacijenata s parodontitisom i gingivitisom uglavnom su identificirani protein S100-A8 i A9 (52, 57, 64). Njih karakterizira mala molekularna masa i dva mjesta za koja se mogu vezati kalcijevi ioni, a u akutno upaljenome tkivu eksprimirani su u makrofagima i epitelnim stanicama (80). Smatra se da imaju važnu ulogu u regulaciji upalnog i imunosnog odgovora potičući kemotaksiju i adheziju neutrofila (81). Osim toga što potiču kemotaksiju neutrofila i makrofaga, S100A8/A9 proteini inhibiraju produkciju H_2O_2 od

makrofaga i pokazuju antimikrobnu aktivnost (82). Za razliku od S100-A8/A9 proteina, S100-A6 protein identificiran je samo u istraživanju Haigh i sur. U tom je istraživanju protein pokazao jaču ekspresiju u slini pacijenata s parodontitisom prije terapije nego u uzorcima sline nakon terapije upućujući na moguću povezanost s upalnim stanjem.

Protein Azurocidin nalazi se u citoplazmatskim granulama neutrofila, pokazuje antimikrobnu aktivnost posebice protiv Gram-negativnih bakterija, sudjeluje u aktivaciji imunološkog odgovora te pojačava permeabilnost endotela i stvaranje edema. Osim što ga se povezuje s upalom i imunološkim odgovorom navedeni protein ima sposobnost vezanja heparina (83, 84). Proteomsko istraživanje Choija i sur. pokazalo je jaču ekspresiju Azurocidina kod ispitanika s parodontitisom nego kod zdravih kontrola (57). Iako još nema puno dokaza o povezanosti Azurocidina i parodontne upale, Choi i sur. ga izdvajaju kao mogući biomarker za ranu detekciju parodontne destrukcije. Razlog tome je *in vitro* eksperiment kojim su pokazali da Azurocidin inhibira osteoklastogenezu u stanicama koštane srži miša. Na temelju te spoznaje zaključuju da bi Azurocidin mogao imati inhibitornu ulogu u diferencijaciji osteoklasta i zaštitnu ulogu u gubitku alveolarne kosti tijekom ranih faza parodontitisa.

Proteini 14-3-3 još su jedna zanimljiva obitelj proteina čija je glavna funkcija sudjelovanje u širokome spektru općih i specijaliziranih signalnih putova vežući se za fosfoserine ili fosfotronine (85). U proteomskim istraživanjima parodontnih bolesti proteini 14-3-3 redovito su imali jaču ekspresiju u

uzorcima zdravih pacijenata u usporedbi s bolesnima (50, 57, 59, 63). Na temelju ovih nalaza obitelj 14-3-3 proteina mogla bi biti važno obilježje zdravog parodonta.

U proteomskim su se istraživanjima sulkusne tekućine pacijenata s parodontitisom imunoglobulini (Ig), uz keratine i albumin, pokazali kao jedna od najzastupljenijih vrsta proteina, te su pokazali jaču ekspresiju u parodontitisu (52, 58). Ig su proteini koje stvaraju plazma-stanice nakon transformacije iz B-stanica, a imunološki ih sustav stvara i koristi se njima za identifikaciju i neutralizaciju stranih antigena. (86). Koliko su plazma stanice, odnosno B-stanice, važne u patogenezi parodontitisa govori i podatak da je udio B-stanica u leziji zahvaćenoj parodontitisom oko 18 %, a udio plazma stanica čak oko 50% (87). Budući da plazma-stanice stvaraju Ig, istraživanja potvrđuju važnu ulogu tih stanica, ali i Ig u patogenezi parodontitisa. Ig imaju važnu ulogu u lokalnome obrambenom odgovoru, a iscrpne proteomske analize mogle bi biti korisne u istraživanjima odgovora domaćina kod parodontnih bolesti.

Još jedna zanimljiva obitelj proteina koji se povezuju s upalnim i imunološkim odgovorom organizma jesu aneksini (88). Istraživanje Bostanci i sur. pokazalo je da je ekspresija aneksina jača u zdravim uzorcima sulkusne tekućine nego u uzorcima pacijenata koji boluju od agresivnog parodontitisa (52), dok u proteomskom istraživanju sulkusne tekućine eksperimentalnog gingivitisa aneksini nisu pokazali značajne promjene u zastupljenosti tijekom

razvoja upale (64). Čini se da bi povišene razine tih proteina mogle biti povezane s parodontnim zdravljem.

Navedeni su proteini najzanimljiviji proteini dosadašnjih proteomskih istraživanja parodontnih bolesti, no valja očekivati da će u budućnosti razvoj tehnologije i napredak u pripremi uzoraka dovesti do novih, možda čak i zanimljivijih proteina. Spoznaja cjelokupne ekspresije staničnih i matriksnih proteina dobar je početak i označuje potpuno novu eru u razumijevanju događaja u parodontu, a nove spoznaje o molekulama i molekularnim zbivanjima koje se događaju u patogenezi parodontitisa mogle bi pomoći u razjašnjavanju još uvijek nepoznatih činjenica koje se događaju tijekom razvoja ove bolesti.

5. Rasprava

Navedena su istraživanja samo dio proteomskih istraživanja provedenih u parodontologiji, a iz navedenog se vidi da broj identificiranih proteina tijekom istraživanja povećava. Napredak u izolaciji tkiva, separaciji proteina, kvantifikaciji, analizama sekvenca te strukturna i interakcijska proteomika otvaraju nova vrata u istraživanju fizioloških i patoloških zbivanja unutar parodonta (37).

Tijekom posljednjeg desetljeća potraga za biomarkerima parodontnih bolesti postaje sve zanimljivija. Traže se specifični biomarkeri koji bi bili važni za dijagnosticiranje, prognozu i praćenje bolesti, ali i za odgovor na terapiju (89). Do danas je istraživan velik broj citokina, proteolitičkih enzima, produkata tkivne destrukcije i bakterijskih metabolita koji bi se mogli povezati s aktivnošću bolesti te služiti kao indikatori ili prediktori stanja, no i dalje ne postoje klinički testovi koji bi se upotrebljavali u te svrhe (90-92).

Velik izazov u kliničkoj parodontologiji jest pronalazak pouzdanih molekularnih markera koji bi obilježavali destrukciju parodontnoga tkiva. Međutim, još se uvijek čekaju njihov pronalazak i potvrđivanje, a parodontni parametri i indeksi te klinički pregled pacijenta, i dalje su najpouzdaniji znak parodontnih bolesti (93).

Proteomske analize imaju sve veću primjenu u identifikaciji proteina kod pacijenata s parodontnim bolestima, a svoje mjesto također pronalaze i u istraživanjima koja se bave otkrivanjima mogućih biomarkera. Novija se istraživanja koriste tehnikama spektrometrije mase koje su usmjerene ciljanim proteinima, međutim, u posljednje su vrijeme ipak su sve češće

opsežne proteomske analize (94, 95). Osnovni cilj opsežnih proteomskih istraživanja u području parodontologije jest izdvajanje liste proteina koji bi mogli biti specifični za određeno stanje te pratiti promjene u zastupljenosti tih proteina ovisno o stadiju, fazi bolesti ili pak o odgovoru na terapiju. Uvođenje takvih analiza kliničkih uzoraka (serum, slina ili sulkusna tekućina) pacijenata s parodontitisom pokazao se kao odličan pristup koji bi mogao znatno utjecati na znanje o proteinima vezanima za zdravlje, odnosno bolest (34). Većina je dosadašnjih istraživanja u području parodontologije bila usredotočena na analiziranje proteomskog sastava sulkusne tekućine, dok su se neki istraživači opredijelili za analizu sline (50, 51, 53, 55, 62, 96).

Rezultati proteomskih istraživanja parodontnih bolesti pokazali su širok spektar proteina koji bi mogli pridonijeti razumijevanju patoloških promjena koje se događaju tijekom bolesti, no daljnja istraživanja s većim brojem uzoraka potrebna su za eventualni pronalazak biomarkera. Proteomski pristup u analizi uzoraka, zasigurno, otvara nova vrata za razumijevanje patogeneze parodontitisa, a vjerojatno pridonosi i razvoju novih načina dijagnosticiranja i liječenja ove bolesti.

6. Zaključak

Primjena različitih tehnologija u analizama proteoma parodontnih bolesti i zdravlja još uvijek je u nastajanju, a potraga za biomarkerima koji će obilježavati aktivnost bolesti, njezinu progresiju i odgovor pacijenata na liječenje i dalje će biti u žarištu proteomskih istraživanja parodontnih bolesti.

Sulkusna tekućina zbog svoje visoke specifičnosti odličan je uzorak za istraživanja proteoma parodontnih bolesti.

Pacijentova slina uzorak je koji se lagano prikuplja, no zbog promjena u njezinu sastavu tijekom dana i doprinosa žlijezda slinovnica nije visoko specifična za mjesto uzimanja te je lošiji uzorak za proteomske analize od sulkusne tekućine.

Iz dosadašnjih istraživanja proteoma gingivitisa, parodontitisa i zdravog parodonta moguće je izdvojiti proteine koji se učestalo identificiraju i time se ističu kao potencijalni biomarkeri, no za definiranje liste biomarkera potrebna su daljnja istraživanja s većim brojem uzoraka.

7. Sažetak

Parodontne bolesti variraju od relativno benignih oblika bolesti potpornog zubnog tkiva poznatijih pod nazivom gingivitis, pa sve do agresivnog i kroničnog parodontitsa, koji ne da su samo prijetnja denticiji, već mogu biti prijetnja cjelokupnom zdravlju organizma. Tijekom posljednjeg desetljeća potraga za biomarkerima parodontnih bolesti postaje sve zanimljivija. Traže se specifični biomarkeri koji bi bili važni za dijagnosticiranje, prognozu i praćenje bolesti, ali i za odgovor pacijenta na terapiju.

Proteomske analize imaju sve veću primjenu u identifikaciji proteina kod pacijenata s parodontnim bolestima, a svoje mjesto također pronalaze i u istraživanjima koja se bave otkrivanjima mogućih biomarkera. Proteini su potencijalno velik izvor mogućih biomarkera budući da su upravo oni molekule koje povezuju statični genom pojedinca i biološku aktivnost organizma. Rezultati proteomskih istraživanja parodontnih bolesti pokazuju širok spektar proteina koji bi mogli pridonijeti razumijevanju patoloških promjena koje se događaju tijekom bolesti. Među mnogim zanimljivim proteinima ističu se aneksini, S-100 i 14-3-3- proteini, matriksne metaloproteinaze i lipoproteini. Uz navedene proteine, po svojoj funkciji i ponašanju u parodontnim bolestima ističu se i druga imena, no jednako kao i za navedene proteine potrebna su daljnja istraživanja s većim brojem uzoraka za eventualno definiranje i izdvajanje biomarkera parodontnih bolesti.

8. Summary

Periodontal diseases range from the relatively benign form of the disease known as gingivitis, to the chronic and aggressive periodontitis, which are not only a threat to the dentition, but also a threat to the overall health. During the last decade the search for the biomarkers of periodontal diseases becomes more and more interesting. We are looking for specific biomarkers that would be important for the diagnosis, prognosis and monitoring of diseases, but also for the patient's response to the therapy.

Proteomic analyses have been increasingly used in the identification of proteins in patients with periodontal diseases, and have also found their place in the research dealing with the detection of possible biomarkers. Proteins are a potentially large source of biomarkers since they are the molecules that connect the static genome of the individual and the biological activity of the organism. Results of the proteomic studies of periodontal diseases show a wide range of proteins that could contribute to the better understanding of pathological changes that occur during disease. Among the most interesting proteins stand the annexins, S-100 and 14-3-3 proteins, lipoproteins and matrix metalloproteinase. In addition to these proteins, according to their function and behaviour, there are also many other interesting names, but the problem is the same. Further research with a larger number of samples is required for the possible designation of biomarkers of periodontal diseases.

9. Literatura

1. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000. 1997;14:216-48.

2. Kinane DF, Berglundh T, Lindhe J. Pathogenesis of periodontitis. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, editors. Clinical periodontology nad implant dentistry. 1. 5th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 285-387.

3. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest. 1976;34(3):235-49.

4. Caffesse RG, Nasjleti CE. Enzymatic penetration through intact sulcular epithelium. J Periodontol. 1976;47(7):391-7.

5. Page RC. Gingivitis. J Clin Periodontol. 1986;13(5):345-59.

6. Saglie R, Newman MG, Carranza FA, Jr., Pattison GL. Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. J Periodontol. 1982;53(4):217-22.

7. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. Ann Periodontol. 1999;4(1):7-19.

8. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. J Periodontol. 1965;36:177-87.

9. Stamm JW. Epidemiology of gingivitis. J Clin Periodontol. 1986;13(5):360-70.

10. Page RC. Oral health status in the United States: prevalence of inflammatory periodontal diseases. Journal of dental education. 1985;49(6):354-67.

11. Trombelli L, Tatakis DN, Scapoli C, Bottega S, Orlandini E, Tosi M. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of "high-responder" and "low-responder" subjects. J Clin Periodontol. 2004;31(4):239-52.

12. Ranney RR. Classification of periodontal diseases. Periodontol 2000. 1993;2:13-25.

13. Savage A, Eaton KA, Moles DR, Needleman I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. J Clin Periodontol. 2009;36(6):458-67.

14. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. J Clin Periodontol. 1984;11(1):21-32.

15. Albandar JM, Rams TE. Risk factors for periodontitis in children and young persons. Periodontol 2000. 2002;29:207-22.

16. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999;4(1):1-6.

17. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994;5:66-77.

18. Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. Crit Rev Oral Biol Med. 1991;2(2):177-281.

19. Birkedal-Hansen H, Taylor RE, Zambon JJ, Barwa PK, Neiders ME. Characterization of collagenolytic activity from strains of Bacteroides gingivalis. J Periodontal Res. 1988;23(4):258-64.

20. Singer RE, Buckner BA. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. Infect Immun. 1981;32(2):458-63.

21. Hausmann E, Raisz LG, Miller WA. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. Science. 1970;168(3933):862-4.

22. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. Ann Periodontol. 1996;1(1):821-78.

23. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. J Periodontal Res. 1993;28(6 Pt 2):500-10.

24. Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. J Periodontol. 1993;64(5 Suppl):416-31.

25. Lotz M. Interleukin-6: a comprehensive review. Cancer Treat Res. 1995;80:209-33.

26. Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi JI, et al. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. J Clin Periodontol. 1993;20(3):225-31.

27. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. J Periodontol. 1993;64(10):980-3.

28. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. J Periodontol. 1993;64(5 Suppl):456-60.

29. Fitzgerald JE, Kreutzer DL. Localization of interleukin-8 in human gingival tissues. Oral Microbiol Immunol. 1995;10(5):297-303.

30. Rink L, Kirchner H. Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field. Int Arch Allergy Immunol. 1996;111(3):199-209.

31. Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE. The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. J Periodontal Res. 1986;21(2):101-12.

32. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis. 1998;19(11):1853-61.

33. Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li GZ, et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. Anal Chem. 2005;77(7):2187-200.

34. Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. J Dent Res. 2010;89(10):1016-23.

35. Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, Bascands JL, Schanstra JP, Coon JJ, et al. Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. J Proteome Res. 2007;6(12):4549-55.

36. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. Expert Rev Proteomics. 2007;4(4):531-8.

37. McCulloch CA. Proteomics for the periodontium: current strategies and future promise. Periodontol 2000. 2006;40:173-83.

38. Righetti PG, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E. Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. Electrophoresis. 2005;26(2):297-319.

39. Macarthur DJ, Jacques NA. Proteome analysis of oral pathogens. J Dent Res. 2003;82(11):870-6.

40. Len AC, Cordwell SJ, Harty DW, Jacques NA. Cellular and extracellular proteome analysis of Streptococcus mutans grown in a chemostat. Proteomics. 2003;3(5):627-46.

41. Veith PD, Talbo GH, Slakeski N, Reynolds EC. Identification of a novel heterodimeric outer membrane protein of Porphyromonas gingivalis by two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. Eur J Biochem. 2001;268(17):4748-57.

42. Boraldi F, Bini L, Liberatori S, Armini A, Pallini V, Tiozzo R, et al. Normal human dermal fibroblasts: proteomic analysis of cell layer and culture medium. Electrophoresis. 2003;24(7-8):1292-310.

43. Conrads KA, Yu LR, Lucas DA, Zhou M, Chan KC, Simpson KA, et al. Quantitative proteomic analysis of inorganic phosphate-induced murine MC3T3-E1 osteoblast cells. Electrophoresis. 2004;25(9):1342-52.

44. Chang EJ, Kwak HB, Kim H, Park JC, Lee ZH, Kim HH. Elucidation of CPX-1 involvement in RANKL-induced osteoclastogenesis by a proteomics approach. FEBS Lett. 2004;564(1-2):166-70.

45. Bozic D, Grgurevic L, Erjavec I, Brkljacic J, Orlic I, Razdorov G, et al. The proteome and gene expression profile of cementoblastic cells treated by bone morphogenetic protein-7 in vitro. J Clin Periodontol. 2012;39(1):80-90.

46. Vitorino R, de Morais Guedes S, Ferreira R, Lobo MJ, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, et al. Two-dimensional electrophoresis study of in vitro

pellicle formation and dental caries susceptibility. Eur J Oral Sci. 2006;114(2):147-53.

47. Hu S, Yu T, Xie Y, Yang Y, Li Y, Zhou X, et al. Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. Cancer Genomics Proteomics. 2007;4(2):55-64.

48. Peluso G, De Santis M, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Messana I, et al. Proteomic study of salivary peptides and proteins in patients with Sjogren's syndrome before and after pilocarpine treatment. Arthritis Rheum. 2007;56(7):2216-22.

49. Grant MM. What do 'omic technologies have to offer periodontal clinical practice in the future? J Periodontal Res. 2012;47(1):2-14.

50. Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. J Periodontal Res. 2009;44(5):636-44.

51. Ngo LH, Veith PD, Chen YY, Chen D, Darby IB, Reynolds EC. Mass spectrometric analyses of peptides and proteins in human gingival crevicular fluid. J Proteome Res. 2010;9(4):1683-93.

52. Bostanci N, Heywood W, Mills K, Parkar M, Nibali L, Donos N. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). J Proteome Res. 2010;9(5):2191-9.

53. Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, Barnett MP, Smolenski GA, Wheeler TT. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. J Clin Periodontol. 2010;37(3):241-7.

54. Goncalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, et al. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. Journal of proteomics. 2010;73(7):1334-41.

55. Grant MM, Creese AJ, Barr G, Ling MR, Scott AE, Matthews JB, et al. Proteomic analysis of a noninvasive human model of acute inflammation and its resolution: the twenty-one day gingivitis model. J Proteome Res. 2010;9(9):4732-44.

56. Goncalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia CH, Camisasca DR, Domont G, et al. Analysis of the salivary proteome in gingivitis patients. J Periodontal Res. 2011;46(5):599-606.

57. Choi YJ, Heo SH, Lee JM, Cho JY. Identification of azurocidin as a potential periodontitis biomarker by a proteomic analysis of gingival crevicular fluid. Proteome Sci. 2011;9:42.

58. Baliban RC, Sakellari D, Li Z, DiMaggio PA, Garcia BA, Floudas CA. Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. J Clin Periodontol. 2012;39(3):203-12.

59. Kido J, Bando M, Hiroshima Y, Iwasaka H, Yamada K, Ohgami N, et al. Analysis of proteins in human gingival crevicular fluid by mass spectrometry. J Periodontal Res. 2012;47(4):488-99.

60. Range H, Leger T, Huchon C, Ciangura C, Diallo D, Poitou C, et al. Salivary proteome modifications associated with periodontitis in obese patients. J Clin Periodontol. 2012;39(9):799-806.

61. Ngo LH, Darby IB, Veith PD, Locke AG, Reynolds EC. Mass spectrometric analysis of gingival crevicular fluid biomarkers can predict periodontal disease progression. J Periodontal Res. 2013;48(3):331-41.

62. Baliban RC, Sakellari D, Li Z, Guzman YA, Garcia BA, Floudas CA. Discovery of biomarker combinations that predict periodontal health or disease with high accuracy from GCF samples based on high-throughput proteomic analysis and mixed-integer linear optimization. J Clin Periodontol. 2013;40(2):131-9.

63. Bertoldi C, Bellei E, Pellacani C, Ferrari D, Lucchi A, Cuoghi A, et al. Non-bacterial protein expression in periodontal pockets by proteome analysis. J Clin Periodontol. 2013;40(6):573-82.

64. Bostanci N, Ramberg P, Wahlander A, Grossman J, Jonsson D, Barnes VM, et al. Label-Free Quantitative Proteomics Reveals Differentially Regulated Proteins in Experimental Gingivitis. J Proteome Res. 2013.

65. Tsuchida S, Satoh M, Kawashima Y, Sogawa K, Kado S, Sawai S, et al. Application of quantitative proteomic analysis using tandem mass tags for discovery and identification of novel biomarkers in periodontal disease. Proteomics. 2013;13(15):2339-50.

66. Salazar MG, Jehmlich N, Murr A, Dhople VM, Holtfreter B, Hammer E, et al. Identification of periodontitis associated changes in the proteome of

whole human saliva by mass spectrometric analysis. J Clin Periodontol. 2013;40(9):825-32.

67. Guzman YA, Sakellari D, Arsenakis M, Floudas CA. Proteomics for the discovery of biomarkers and diagnosis of periodontitis: a critical review. Expert Rev Proteomics. 2014;11(1):31-41.

68. Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. Periodontol 2000. 2003;31:55-76.

69. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, et al. Current developments in salivary diagnostics. Biomarkers in medicine. 2010;4(1):171-89.

70. Messana I, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Castagnola M. Facts and artifacts in proteomics of body fluids. What proteomics of saliva is telling us? Journal of separation science. 2008;31(11):1948-63.

71. Schipper R, Loof A, de Groot J, Harthoorn L, van Heerde W, Dransfield E. Salivary protein/peptide profiling with SELDI-TOF-MS. Ann N Y Acad Sci. 2007;1098:498-503.

72. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. Omics : a journal of integrative biology. 2011;15(6):353-61.

73. Siqueira WL, Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. Proteomics Clinical applications. 2011;5(11-12):575-9.

74. Cabras T, Pisano E, Boi R, Olianas A, Manconi B, Inzitari R, et al. Age-dependent modifications of the human salivary secretory protein complex. J Proteome Res. 2009;8(8):4126-34.

75. Hattingh J, Ho E. The concentration of proteins in human gingival crevicular fluid. J Periodontal Res. 1980;15(1):90-5.

76. Borden SM, Golub LM, Kleinberg I. The effect of age and sex on the relationship between crevicular fluid flow and gingival inflammation in humans. J Periodontal Res. 1977;12(3):160-5.

77. Baehni PC, Song M, McCulloch CA, Ellen RP. Treponema denticola induces actin rearrangement and detachment of human gingival fibroblasts. Infect Immun. 1992;60(8):3360-8.

78. Griffiths R, Barbour S. Lipoproteins and lipoprotein metabolism in periodontal disease. Clinical lipidology. 2010;5(3):397-411.

79. Kallio KA, Hyvarinen K, Kovanen PT, Jauhiainen M, Pussinen PJ. Very low density lipoproteins derived from periodontitis patients facilitate macrophage activation via lipopolysaccharide function. Metabolism. 2012.

80. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). Biochem Biophys Res Commun. 2004;322(4):1111-22.

81. Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. Biochem Pharmacol. 2006;72(11):1622-31.

82. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. Biol Pharm Bull. 2003;26(6):753-60.

83. Linder A, Soehnlein O, Akesson P. Roles of heparin-binding protein in bacterial infections. J Innate Immun. 2010;2(5):431-8.

84. Soehnlein O, Lindbom L. Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system. J Leukoc Biol. 2009;85(3):344-51.

85. Autieri MV, Carbone CJ. 14-3-3Gamma interacts with and is phosphorylated by multiple protein kinase C isoforms in PDGF-stimulated human vascular smooth muscle cells. DNA Cell Biol. 1999;18(7):555-64.

86. Berglundh T, Donati M, Zitzmann N. B cells in periodontitis: friends or enemies? Periodontol 2000. 2007;45:51-66.

87. Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. J Clin Periodontol. 2005;32 Suppl 6:87-107.

88. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol. 2009;9(1):62-70.

89. Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? Periodontol 2000. 2005;39:53-72.

90. Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. Periodontol 2000. 2003;31:167-80.

91. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. Periodontol 2000. 2003;31:77-104.

92. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. Ann N Y Acad Sci. 2007;1098:216-29.

93. Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. J Clin Periodontol. 2011;38 Suppl 11:85-105.

94. Lundy FT, Orr DF, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ. Detection of individual human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in unfractionated gingival crevicular fluid--a MALDI-MS approach. Mol Immunol. 2005;42(5):575-9.

95. Dommisch H, Acil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. Oral Microbiol Immunol. 2005;20(3):186-90.

96. Carneiro LG, Venuleo C, Oppenheim FG, Salih E. Proteome data set of human gingival crevicular fluid from healthy periodontium sites by multidimensional protein separation and mass spectrometry. J Periodontal Res. 2012;47(2):248-62.

10. Životopis

Ana Badovinac rođena je 13. listopada 1982. godine u Zagrebu gdje završava osnovnu školu Ivana Gorana Kovačića te V. gimnaziju. 2001. godine upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad izradila je na Zavodu za parodontologiju te ga obranila 2007. Jednogodišnji pripravnički staž odradila je u Stomatološkoj poliklinici Zagreb.

U travnju 2009. počinje raditi na Zavodu za parodontologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Poslijediplomski doktorski studij na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završava 2013. godine obranom disertacije pod naslovom „Proteomska analiza epitelnoga i vezivnog tkiva parodonta kod pacijenata s agresivnim parodontitisom“. Specijalistički ispit iz parodontologije polaže 2014. godine.

2014. godine dobitnica je Robert Frank međunarodne znanstvene nagrade IADR-a, te druge nagrade na IADR Hatton natjecanju 2015. godine.

Autorica je i koautorica nekoliko znanstvenih i stručnih radova, te brojnih kongresnih priopćenja. Aktivno je sudjelovala na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima i kongresima. Služi se engleskim i talijanskim jezikom. Majka je jednog djeteta.