Proteomska analiza epitelnoga i vezivnoga tkiva parodonta kod pacijenata s agresivnim parodontitisom

Badovinac, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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:127:469233

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository

Sveučilište u Zagrebu
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Ana Badovinac

PROTEOMSKA ANALIZA EPITELNOGA I VEZIVNOGA TKIVA PARODONTA KOD PACIJENATA S AGRESIVNIM PARODONTITISOM

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.

University of Zagreb

SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Ana Badovinac

PROTEOMIC ANALYSIS OF THE EPITHELIAL AND CONNECTIVE PERIODONTAL TISSUE IN PATIENTS WITH AGGRESSIVE PERIODONTITIS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013

Sveučilište u Zagrebu
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Ana Badovinac

PROTEOMSKA ANALIZA EPITELNOGA I VEZIVNOGA TKIVA PARODONTA KOD PACIJENATA S AGRESIVNIM PARODONTITISOM

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Doc.dr.sc. Darko Božić
Doc.dr.sc. Lovorka Grgurević

Zagreb, 2013.

University of Zagreb
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Ana Badovinac

PROTEOMIC ANALYSIS OF THE EPITHELIAL AND CONNECTIVE PERIODONTAL TISSUE IN PATIENTS WITH AGGRESSIVE PERIODONTITIS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Doc.dr.sc. Darko Božić
Doc.dr.sc. Lovorka Grgurević

Zagreb, 2013

Rad je izrađen na Zavodu za parodontologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Centru za proteomiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Istraživanje je provedeno uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta pri znanstvenom projektu "Sistemni aspekti u etiologiji parodontnih bolesti" (065-0650444-0415) voditelja prof.dr.sc. Darija Plančaka.

Mentor: Doc.dr.sc. Darko Božić, docent na Zavodu za parodontologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Komentor: Doc.dr.sc. Lovorka Grgurević, docent na Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Lektor hrvatskog jezika: Tanja Ratković, prof. hrvatskog jezika i književnosti, Zabočka 3, 10000 Zagreb, Hrvatska; telefon: +385915690344

Lektor engleskog jezika: Mirjana Travar Pugelnik, mr.sc. engleskog jezika, Huzjanova 10, 10000 Zagreb, Hrvatska; telefon: +385955605733

Rad sadrži: 107 stranica

9 slika

8 tablica

1 CD

Zahvaljujem se roditeljima na svemu što su mi omogućili i pružili u životu, posebno na neizmjernoj podršci, brizi i ljubavi. Biti vaše dijete prava je privilegija pa se nadam da ću vam uspjeti uzvratiti jednako lijepim osjećajima i životnim trenucima.

Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc. Darku Božiću na ideji istraživanja, uloženom vremenu, trudu i živcima, te nesebično podijeljenom znanju i iskustvu, komentorici doc.dr.sc. Lovorki Grgurević na pomoći u ključnim trenucima pripreme i izvedbe istraživanja, te prof.dr.sc. Dariju Plančaku koji mi je omogućio da tjedne i tjedne provedem u laboratoriju i što je uvijek tu kad ga zatrebam.

Veliko hvala Nikoli na razumijevanju i strpljenju za "moju znanost" i podršci koju mi je pružio za vrijeme izrade doktorskog rada. Također hvala mom Cvrčku koji mi je dao snage, volje i mira da dovršim pisanje rada.

I za kraj hvala Genadiju, kolegama i sestrama Zavoda za parodontologiju, Luki, Noni, te svim dragim prijateljima na pomoći i podršci u ostvarivanju ovog rada.

SAŽETAK

Proteomske analize omogućuju iscrpan prikaz ekspresije proteina u različitim biološkim uzorcima te predstavljaju napredan pristup u istraživanjima proteoma. Svrha ovog istraživanja bila je dokazati da epitelno i vezivno tkivo parodonta zdravih ispitanika (kontrolna skupina) i zdravog mjesta, mjesta s gingivitisom, parodontitisom i mjesta s parodontitisom nakon terapije kod pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom (ispitivane skupine) pokazuju različitu ekspresiju proteina.

U istraživanju je sudjelovalo osam pacijenata. Ispitivanu skupinu činila su četiri pacijenta s dijagnozom generaliziranog agresivnog parodontitisa (dva muškarca i dvije žene), dok su kontrolnu skupinu činila četiri ispitanika bez znakova parodontne bolesti kojima je razlog dolaska bio kirurško produljenje krune zuba (dva muškarca i dvije žene). Uzorci epitelnog i vezivnog parodontnog tkiva uzeti su pri provođenju inicijalne parodontološke terapije u ispitivanoj skupini, a u kontrolnoj skupini tijekom indiciranog kirurškog zahvata. Uzorci su pohranjeni u RNAlater tekućinu prema uputama proizvođača do analiza. Proteini tkivnog lizata razdvojeni su 1D gel elektroforezom nakon koje je uslijedila digestija u gelu tripsinom te mjerenje proteina pomoću nano-skale HPLC sistema preko nano-elektrospreja ionizacijskog izvora i spektrometra mase. Dobiveni podaci obrađeni su u MaxQuant programu.

Ukupan broj identificiranih proteina u istraživanju iznosio je 3420. Nakon statističke obrade podataka izdvojena su 193 proteina koji su identificirani i kvantificirani u svim uzorcima, te su u svim ispitivanim skupinama pokazali statistički značajnu promjenu ekspresije u odnosu na kontrolnu skupinu. Proteini koji bi mogli biti obilježje zdravog parodonta jesu: Multimerin-1, aneksini, *14-3-3 protein gamma*; gingivitisa: *Dedicator of cytokinesis protein 2, Band 3 anion transport protein*; parodontitisa: Azurocidin, *Myeloid cell nuclear differentiation antigen*, histoni, imunoglobulini, Prolargin; stanja poslije terapije: *Oligosaccharyltransferase complex subunit* i Mimecan. Najzanimljiviji protein istraživanja je Azurocidin koji pokazuje jaku ekspresiju u gingivitisu i parodontitisu. Rezultati istraživanja pokazali su različitu ekspresiju proteina u ispitivanim skupinama te potvrdili da bi proteomske analize parodontnog tkiva mogle pridonijeti boljem razumijevanju patogeneze parodontnih bolesti, možda čak i napretku u dijagnostici i prognozi ovih bolesti.

Ključne riječi: agresivni parodontitis; gingivitis; proteomika; spektrometrija mase, biopsija, identifikacija proteina, proteini

SUMMARY

Proteomic analyses enable large scale descriptions of protein expression in a variety of biological samples, and provide an advanced approach in proteome research. The aim of this study was to establish the changes in protein expression between the epithelial and connective periodontal tissues samples in healthy subjects (control group) and healthy sites, sites with gingivitis, periodontitis, and post treatment sites in patients suffering from generalized aggressive periodontitis (test groups).

The study was conducted on eight patients divided into two groups. The test group consisted of four patients with generalized aggressive periodontitis (two male, two female), and the control group consisted of four subjects (two male, two female) with no signs of periodontal disease, referred to the Department of Periodontology for crown lengthening procedure. The epithelial and connective periodontal tissue samples in the test group were harvested during initial periodontal treatment, and in the control group during the surgical procedure. Tissue samples were stored in the RNAlater reagent according to the manufacturer's instructions until further analyses. Proteins from tissue lysate were separated by 1D gel electrophoresis, in gel digested with trypsin, and measured by nano-scale HPLC system coupled to a mass spectrometer through a nano-electrospray ionization source. The obtained raw data was processed by MaxQuant software.

A total number of proteins identified in the study was 3420. After statistical processing of data, a total of 193 proteins were identified and quantified in all samples, and showed statistically significant changes in expression level between the control group and test groups. Proteins that could possibly be a mark of periodontal health are: Multimerin-1, annexins, 14-3-3 protein gamma; of gingivitis: Dedicator of cytokinesis protein 2, Band 3 anion transport protein; of parodontitis: Azurocidin, Myeloid cell nuclear differentiation antigen, histones, immunoglobulins, Prolargin; and of post treatment condition: Oligosaccharyltransferase complex subunit and Mimecan. The most interesting protein in the study was Azurocidin, showing the highest fold change in periodontitis and gingivitis. The results showed different protein expressions in tested groups and confirmed that proteomic analyses of periodontal tissue could contribute to a better understanding of the pathogenesis of periodontal diseases, and might even contribute to the improvements in diagnosis and prognosis of these diseases.

Key words: aggressive periodontitis; gingivitis; proteomics; mass spectrometry; biopsy, protein identification, proteins

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Građa parodonta 2
1.1.1. Gingiva 3
1.1.2. Spojni epitel 5
1.1.3. Parodontalni ligament, cement i alveolarna kost 8
1.2. Patogeneza parodontne bolesti i odgovor domaćina 10
1.2.1. Patohistološke promjene parodonta tijekom upale 11
1.2.2. Karakteristike domaćina koje sprečavaju nastanak parodontitisa 13
1.2.3. Odgovor domaćina koji dovodi do destrukcije parodonta 14
1.2.3.1. Prirođeni odgovor domaćina 14
1.2.3.2. Stečeni odgovor domaćina 16
1.3. Agresivni parodontitis 19
1.3.1. Obilježja agresivnog parodontitisa 19
1.3.2. Učestalost agresivnog parodontitisa 20
1.3.3. Etiologija agresivnog parodontitisa 21
1.3.4. Destrukcija parodontnih tkiva 22
1.4. Proteomska istraživanja u parodontologiji 24
1.4.1. Proteomske analize i spektrometrija mase 24
1.4.2. Dosadašnja proteomska istraživanja u stomatologiji i parodontologiji 27
2. SVRHA ISTRAŽIVANJA 30
3. ISPITANICI I METODE 32
3.1. Odabir ispitanika 33
3.2. Provođenje terapije i uzimanje uzoraka tkiva 33
3.3. Homogenizacija uzoraka 34
3.4. Gel elektroforeza 35
3.5. Digestija u gelu 36
3.6. Mikropročišćavanje i odsoljavanje peptida 37
3.7. Tekućinska kromatografija – Spektrometrija mase (LC-MS/MS) 38
3.8. Analiza podataka i statistička obrada 38
4. REZULTATI 39

4.1. Demografski podaci i klinički parametri 40
4.2. Rezultati proteomskih analiza 41
4.2.1. Ukupan broj identificiranih proteina 42
4.2.2. Zastupljenost proteina u ispitivanim skupina 43
4.2.3. Stupnjevi promjene proteina u ispitivanim skupinama 45
4.2.4. Usporedba kontrolne skupine i zdravog mjesta ispitivane skupine 53
4.2.5. Usporedba kontrolne skupine i mjesta s gingivitisom ispitivane skupine 58
4.2.6. Usporedba kontrolne skupine i mjesta s parodontitisom ispitivane skupine 63
4.2.7. Usporedba kontrolne skupine i mjesta s parodontitisom nakon terapije ispitivane skupine 68
4.2.8. Analiza identificiranih proteina genskom ontologijom (GO) 73
5. RASPRAVA 74
6. ZAKLJUČCI 84
7. LITERATURA 86
8. ŽIVOTOPIS 104

Popis oznaka i kratica

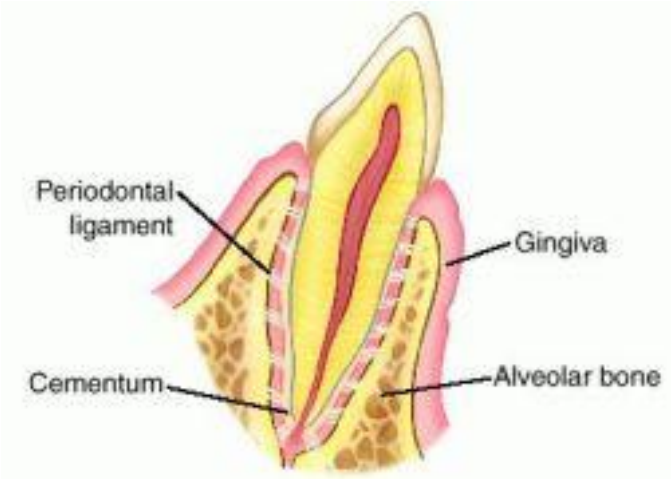
1D gel elektroforeza	jednodimenzionalna gel elektroforeza
A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
ACN	acetonitril
CEACAM1	od engl. Carcino-embryonic Ag-related cell adhesion molecule 1
ELAM-1	endotelna leukocitna adhezijska molekula 1
FDR	od engl. false discovery rate
GO	genska ontologija
HPLC	od engl. high pressure liquid chromatography
ICAM-1	intercelularna adhezijska molekula 1
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
INF	interferon
LAP	lokalizirani agresivni parodontitis
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija-spektrometrija mase
LFA-3	od engl. Lymphocyte function antigen-3
LFQ	od engl. Label-free quantification
LPS	lipopolisaharid
MaxQuant ID	MaxQuant broj
MIF	od engl. Macrophage migration inhibitory factor
MMP	matriksna metaloproteinaza

MS	spektrometrija mase
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
PGE_2	prostaglandin E_2
PMN	polimorfonuklearni leukocit
RANKL	nuklearni faktor-κB lingand
SDS	od engl. Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	od engl. Sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis
Th1	Th1-limfocit
Th2	Th2-limfocit
TNF-α	faktor nekroze tumora α
TRY	tripsin
Uniprot ID	Uniprot identifikacijski broj

1. UVOD

1.1. Građa parodonta

Parodont (grč. *peri* - okolo, *odontos* - zub), kako i sama riječ govori, potporno je tkivo oko zuba. Glavna mu je uloga pričvršćivanje zuba uz koštano tkivo čeljusti i zadržavanje integriteta površine mastikatorne sluznice usne šupljine. Osnovni su dijelovi parodonta: gingiva, parodontalni ligament, cement i alveolarna kost (Slika 1.). Gingiva štiti tkiva ispod nje dok cement, parodontalni ligament i alveolarna kost predstavljaju pričvrsni aparat parodonta. Parodont nije tkivo koje miruje, već podliježe čestim funkcionalnim i morfološkim promjenama, te promjenama koje su povezane s promjenama u oralnoj okolini (1).

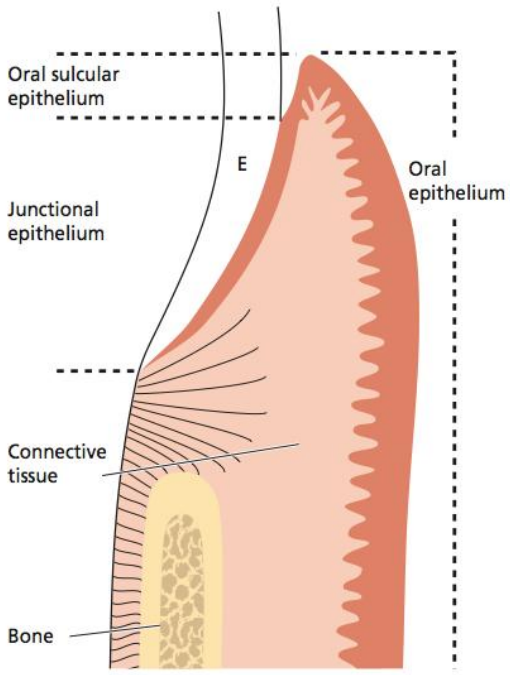


Slika 1. Osnovni dijelovi parodonta: gingiva, parodontalni ligament, cement i alveolarna kost. (Preuzeto iz Medical-dictionary.thefreedictionary.com [homepage on the Internet]. [posjećeno 4. ožujka 2013.]. Available from: http://medical-dictionary.thefreedictionary.com /periodontium)

1.1.1. Gingiva

Gingiva je dio mastikatorne mukoze koji prekriva alveolarni nastavak čeljusti i okružuje cervikalni dio zuba. Makroskopski gledano, gingiva se dijeli na slobodnu i pričvrsnu gingivu. Iako oba tipa gingive pokazuju varijacije u diferencijaciji, histologiji i debljini, zajednička im je specifična struktura koja omogućava odgovarajuće funkcioniranje protiv mehaničkih i mikrobima izazvanih oštećenja (2). Osim toga, takva struktura pruža i dobru obranu protiv prodiranja mikroorganizama i štetnih tvari u dublje dijelove tkiva. Slobodna gingiva obuhvaća gingivna tkiva vestibularno i oralno od zuba te interdentalnu gingivu. Široka je oko 1 mm, a proteže se od slobodnoga gingivnog ruba do gingivne brazde koja se nalazi na mjestu koje odgovara razini caklinsko-cementnog spojišta (3). Slobodna gingiva formira gingivni sulkus prosječne dubine od 0.69 do 1.5 mm (4). To je prostor koji se nalazi oko zuba i čija je dubina izuzetno važan klinički i dijagnostički parametar. Na slobodnu gingivu se prema apikalno nastavlja pričvrsna gingiva koja seže sve do mukogingivnog spojišta. Pričvrsna gingiva je vezivnim vlaknima čvrsto vezana za alveolarnu kost i cement, a širina joj pokazuje varijacije ovisno o različitim dijelovima usta i o dobi ispitanika (5).

Mikroskopski gledano gingiva je sastavljena od višeslojnoga skvamoznog keratiniziranog epitela i vezivnog tkiva. Ovisno o stupnju diferencijacije stanica koje proizvode keratin, epitel je podijeljen na četiri glavna sloja: bazalni sloj, sloj šiljatih stanica, sloj granuloznih stanica i površinski sloj keratiniziranih stanica. Osim stanica koje proizvode keratin u epitelu se pojavljuju i bistre stanice. Taj naziv dobile su zbog svjetlije obojene jezgre. Uloga bistrih stanica vrlo je raznolika, Merkelove stanice imaju senzoričku funkciju, Langerhansove sudjeluju u obrani oralnog epitela, a melanociti su zaduženi za sintezu melanina. Uz njih u području epitela nalaze se i brojne upalne stanice (6).



Slika 2. Shematski prikaz koji opisuje sastav gingive i kontaktnog područja između gingive i cakline zuba (preuzeto iz: Lindhe J, Lang NP, Karring T. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2008.)

Epitel koji pokriva područje slobodne gingive dijeli se na: oralni epitel, oralni sulkusni epitel i spojni epitel (Slika 2.). Oralni epitel je dio epitela slobodne gingive koji je okrenut prema usnoj šupljini, dok je oralni sulkusni epitel okrenut prema zubu, ali nije u dodiru s njim. Spojni epitel je epitel koji osigurava čvrst kontakt između gingive i zuba. Morfološki se razlikuje od prethodna dva, a na granici s vezivnim tkivom nema karakterističnih zupca pile. Budući da spojni epitel ima slobodnu površinu koja se nalazi na dnu gingivnog sulkusa, u stalnom je kontaktu s različitim štetnim čimbenicima (1). Stanice spojnog epitela zaslužne su za sintezu mnogobrojnih molekula uključenih u obranu protiv bakterija i njihovih produkata. Osim toga, dolazi i do ekspresije mnogobrojnih molekula koje potiču migraciju polimorfonuklearnih leukocita prema dnu gingivnog sulkusa (7).

1.1.2. Spojni epitel

Spojni epitel je komponenta dento-gingivnog kompleksa koji je u kontaktu s površinom zuba. Razvija se prilikom erupcije zuba kada se susretnu reducirani caklinski epitel i oralni gingivni epitel. Proces transformacije reduciranoga caklinskog epitela u stanice spojnog epitela vrlo je spor. Reducirane caklinske stanice transformiraju se tako da iz kubičnog oblika prelaze u spljoštene stanice paralelne s caklinom zuba. Rezultat transformacije je višeslojni nekeratinizirani skvamozni epitel, tj. spojni epitel. On se sastoji od dva sloja: bazalnog sloja s kubičnim stanicama i suprabazalnog sloja gdje su stanice već izduženog oblika. Za razliku od drugih vrsta epitela, stanice spojnog epitela povezane su sa samo nekoliko dezmosoma i ponekom spojnom pukotinom (8). Takva građa dovodi do značajne permeabilnosti spojnog epitela. Međustanični prostor također je bitan jer omogućava prolazak gingivne tekućine i leukocita. Prema istraživanju Shiötta i Löea, otprilike 30 000 polimorfonuklearnih neutrofila migrira kroz klinički zdrav spojni epitel u minuti (9). Takav je protok izuzetno bitan jer predstavlja način na koji se domaćin brani od stalnog bakteriološkog izazova i ovisan je o stupnju upale. U intersticijskom prostoru spojnog epitela nalaze se antigen prezentirajuće stanice, Langerhansove stanice, dendritične stanice i mononuklearni leukociti. Neutrofilni granulociti mogu se pronaći u središnjem dijelu spojnog epitela blizu površine zuba, dok se limfociti i makrofagi nalaze dublje u epitelu blizu bazalnog sloja (10).

Spojni epitel nalazi se između gingivnog sulkusa nastanjenog različitim mikroorganizmima i mineraliziranoga vezivnog tkiva koje zahtijeva zaštitu od moguće izloženosti bakterijama i njihovim proizvodima (6). Takav položaj čini ovaj epitel vrlo specifičnom i strateški vrlo važnom površinom koja se strukturalnom i funkcionalnom prilagodbom odupire stalnom mikrobiološkom izazovu. Za razliku od ostalih vrsta epitela spojni epitel nema sloj keratiniziranih stanica koje bi činile fizičku barijeru te taj nedostatak nadopunjava posebnom strukturom, i suradnjom epitelnih i ostalih stanica. Unatoč navedenim specifičnostima obrambeni mehanizmi spojnog epitela ponekad nisu dovoljni te dolazi do razvoja gingivne i parodontne lezije. Parodontopatogene bakterije, posebice *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) i *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), razvili su način kojim uspijevaju narušiti strukturalni i funkcionalni integritet spojnog epitela. Spojni epitel tada prelazi u epitel džepa i postaje predmetom mnogobrojnih istraživanja i obilježjem progresije gingivitisa u parodontitis (7). Način na koji tkivo održava integritet također se smatra pitanjem čiji bi odgovori mogli pridonijeti razjašnjavanju mnogih

nepoznatih faktora u inicijaciji parodontne bolesti. U prilog tome govori i činjenica da stanice spojnog epitela pokazuju ekspresiju mnogobrojnih adhezivnih molekula, prije svega integrina i kadherina (11).

Integrini su površinski receptori koji posreduju u kontaktu stanica i ekstracelularnog matriksa te pridonose međustaničnoj adheziji (12). Promijenjena ekspresija tih molekula mogla bi upućivati na promijenjen integritet tkiva budući da pokazuje mogućnost interakcije s matriksnim komponentama spojnog epitela. Osim njih od značajnog su interesa i kadherini. Oni su odgovorni za uski međustanični kontakt koji je iznimno važan aspekt parodontne bolesti budući da dolazi do patoloških promjena spojnog epitela prilikom stvaranja parodontnog džepa. E-kadherini su epitelno specifične adhezivne molekule koje igraju važnu ulogu u održavanju tkivnog integriteta (11, 13). Prema studiji Ye i sur. E-kadherin se pojavljivao u manjem intenzitetu u tkivu spojnog epitela nego u oralnom epitelu gingive, dok Heymanna i sur. njegovu ekspresiju u spojnom epitelu nisu identificirali (14, 15). Druga zanimljiva molekula je *Carcino-embryonic Ag-related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1). Ta molekula pokazuje veću ekspresiju u spojnom epitelu, nego u oralnom sulkularnom epitelu te se eksprimira na polimorfonuklearnim leukocitima (PMN), epitelu i endotelu krvnih žila. Budući da u svakoj minuti velik broj PMN-a prolazi kroz spojni epitel, Hyman i sur. smatraju da je upravo ekspresija CEACAM1 na površini PMN-a odgovorna za prolazak i vođenje PMN-a kroz spojni epitel (15). Osim toga, CEACAM1 sudjeluje u regulaciji stanične proliferacije, stimulacije i koregulacije aktiviranih T-limfocita (16, 17). Još jedna zanimljiva uloga CEACAM1 molekule je njezina funkcija da služi kao stanični receptor za različite bakterije (18).

Osim navedenih adhezivnih molekula ekspresiju u spojnom epitelu pokazuju i druge molekule. *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) i *Lymphocyte function antigen-3* (LFA-3) su adhezivne molekule, pripadaju obitelji imunoglobulina i pokazuju ekspresiju u tkivu spojnog epitela. ICAM-1 je imunoglobulinu sličan transmembranski glikoprotein koji posreduje u međustaničnim interakcijama prilikom upalnih događaja. Svoju funkciju obavlja kao ligand za β2 integrine prisutne na leukocitima kontrolirajući tako migraciju leukocita u upalnom tkivu (19-21). Tonetti smatra da je uspostavljanje gradijenta ICAM-1 unutar spojnog epitela važan mehanizam za vođenje PMN-a prema dnu gingivnog sulkusa gdje se PMN mogu suprotstaviti bakterijskom izazovu (21). U spojnom epitelu visoku ekspresiju pokazuje i kemotaktični citokin Interleukin-8 (IL-8) koji svojom prisutnošću ukazuje na još jedan mehanizam kojim se PMN usmjeravaju prema mjestima bakterijskog izazova (21, 22).

Citokini Interleukin-1α (IL-1α), Interleukin-1β (IL-1β) i *Tumor necrosis factor-α* (TNF-α) također pokazuju jaku ekspresiju u koronalnom dijelu spojnog epitela, te je u gotovo svim stanicama spojnog epitela dokazana jaka ekspresija navedenih citokina nakon izlaganja lipopolisaharidima (LPS) (23). Stvaranje citokina od strane stanica spojnog epitela i makrofaga, koji se nalaze u površinskom dijelu spojnog epitela, potvrđuju njihovu ulogu u obrani od bakterija prisutnih u gingivnom sulkusu. Time se vidi da spojni epitel nije samo epitel koji pruža pričvršćivanje za površinu zuba, već je i vrlo aktivno mjesto u kojem se događa cijeli niz interakcija na razini domaćin-mikroorganizam.

Čimbenici rasta i odgovarajući receptori, tkivni plazminogeni, antimikrobni peptidi i proteini, također su bili predmet istraživanja u spojnom epitelu. Epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal growth factor,* EGF) je potentni mitogen koji sudjeluje u rastu epitela, diferencijaciji i cijeljenju rana, djelujući preko EGF-receptora na površini stanice. Ekspresija EGF-receptora u spojnom epitelu zdrave humane gingive vrlo je slaba ili čak neprimjetna, dok je kod pacijenata s kroničnim parodontitisom vrlo jaka (24). U spojnom epitelu prisutan je i *Tissue plasminogen activator,* serinska proteinaza koja pretvara plazminogen u plazmin. Plazmin degradira mnoge izvanstanične matriksne proteine i aktivira matriksne metaloproteinaze (MMP). Proteolitički enzim Matrilizin (*Matrix metalloproteinase-7,* MMP-7) pokazuje ekspresiju u suprabazalnim stanicama spojnog epitela (25, 26). Antimikrobne molekule koje se povezuju s parodontnim zdravljem su α i β defenzini, Katlicidin LL-37 i Kalprotektin, međutim ekspresiju u spojnom epitelu prokazuju jedino LL-37 i α-defenzin. Razlog tomu mogao bi biti u njihovu podrijetlu, naime i LL-37 i α-defenzin produkti su PMN-a, koji i na taj način štite spojni epitel (27).

Prema gore navedenom vidljivo je da spojni epitel pokazuje nekoliko jedinstvenih strukturalnih i funkcionalnih obilježja koji sprečavaju kolonizaciju patološke mikrobne flore u dublje slojeve parodonta (28). Čvrsta veza spojnog epitela s površinom zuba stvara epitelnu barijeru bakterijama prisutnima u zubnom plaku. Spojni epitel omogućuje prolazak gingivne tekućine, upalnih stanica i obrambenih stanica od strane domaćina u prostor ruba gingive. I završno, stanice spojnog epitela karakterizira brza izmjena koja pridonosi ravnoteži između domaćina i mikroorganizama te brzom oporavku oštećenog tkiva (29). Prema navedenim karakteristikama jasno je zašto je spojni epitel razlog brojnih istraživanja i zašto se promatranjem njegove strukture i sadržaja pokušava doći do pojašnjenja mnogih nepoznanica u patogenezi parodontnih bolesti.

1.1.3. Parodontalni ligament, cement i alveolarna kost

Četiri glavne komponente parodonta, gingiva, parodontalni ligament, cement i alveolarna kost, zaslužni su za održavanje zuba u funkciji. Iako se nalaze na različitim područjima oko zuba, i iako su im arhitektura tkiva i biokemijski sastav različiti, zajedno funkcioniraju kao jedna jedinica. Dokazuje to i Bartoldovo istraživanje u kojem je uočeno da komponente izvanstaničnog matriksa jedne parodontne strukture mogu utjecati na staničnu aktivnost susjednih parodontnih struktura (30).

Parodontalni ligament je mekano vezivno tkivo bogato stanicama i krvnim žilama, okružuje zub i spaja cement korijena zuba s alveolarnom kosti. Prostor ligamenta ima oblik pješčanog sata i prosječna mu je širina oko 0,25 mm, međutim širina prostora nije konstantna tijekom cijeloga životnog vijeka, već ovisi o opterećenju zuba. Kod zuba koji nisu u funkciji širina se prostora smanjuje, dok se kod preopterećenih zuba prostor parodontalnog ligamenta sve više širi (31). Glavna je funkcija ligamenta raspodjela i resorpcija sila koje se javljaju prilikom žvakanja i ostalih pokreta prilikom kojih dolazi do kontakata sa zubima. Takvu funkciju ligamenta omogućavaju glavna vlakna sastavljena od kolagena koja su ujedno i glavni gradivni element. Osim kolagenih, parodontalni ligament sadržava i nekolicinu elastičnih vlakana koja su u vezi s krvnim žilama, te oksitalanska vlakna još uvijek nepoznate funkcije. Od stanica prevladavaju fibroblasti, osteoblasti, cementoblasti, osteoklasti, živčane i epitelne stanice (1).

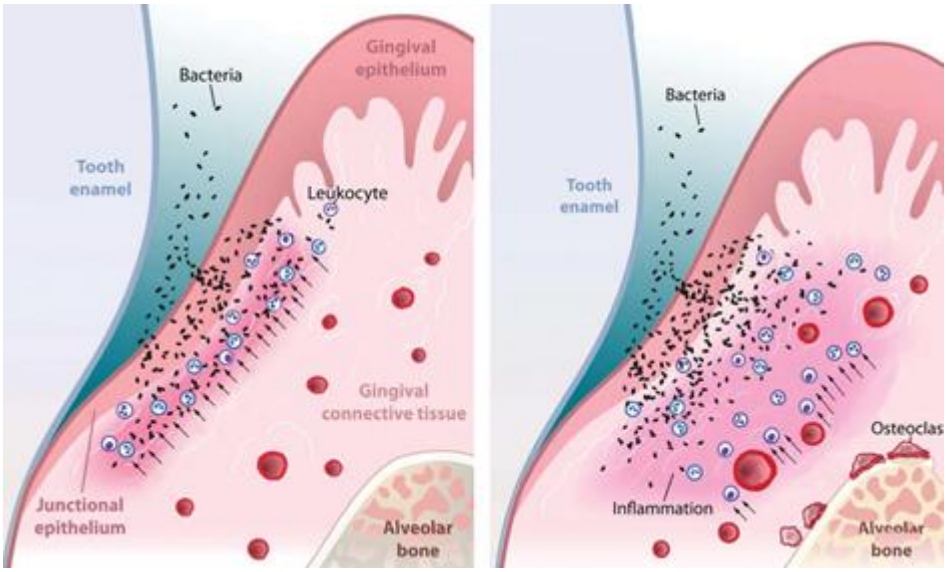
Cement je mineralizirano, avaskularno mezenhimalno tkivo koje prekriva korijen zuba. Postoje dva glavna tipa cementa, a to su: acelularni (primarni) i celularni (sekundarni). Oba tipa cementa sastoje se od kolagenih vlakana i kalcificiranog organskog matriksa. Zreli cement pokazuje ekspresiju različitih proteina koji promiču migraciju i pričvršćivanje stanica, te potiču sintezu proteina u stanicama gingivnih fibroblasta i stanica parodontalnog ligamenta (32). Najčešće spominjani adhezivni proteini pronađeni u cementu su koštani *Sialoprotein*, *Osteopontin* i *Osteonectin* (33, 34). Osim navedenih proteina, u cementu se pojavljuju i tkivno specifični proteini *Cementum attachment protein* (CAP) i *Cementum-derived growth factor* (CGF). CAP je zadužen za promoviranje adhezije i podjelu mezenhimalnih stanica, dok CGF pojačava proliferaciju gingivnih fibroblasta i stanica parodontnog ligamenta (35, 36). Kolagena vlakna cementa nastaju od fibroblasta i zovu se Sharpeyeva vlakna (ekstrinzična) ili od cementoblasta pa se zovu unutarnja (intrinzična) vlakna. Osim podjele na acelularni i

celularni, cement se dijeli i na acelularni cement sastavljen od ekstrinzičnih vlakana, celularni miješani slojeviti cement i celularni cement sastavljen od intrinzičnih vlakana. Cement je tvrdo zubno tkivo koje ne podliježe fiziološkoj resorpciji i pregradnji, ali pod utjecajem lokalnih i sistemskih čimbenika može doći do tih procesa (1).

Alveolarna kost je dio maksile i mandibule koja tvori i podupire zubne alveole. Sastoji se od tri glavna dijela: vanjske ploče (kortikalne kosti), unutarnjeg zida (kompaktne kosti) i spongioznog dijela između. Kompaktna kost se na rendgenogramu vidi kao tanka bijela linija, nazvana kao *lamina dura*. U kompaktnoj kosti postoji niz Volkmannovih kanala kroz koje iz alveolarne kosti u parodontni ligament prolaze krvne i limfne žile te živčana vlakna (1). Alveolarna kost stvara se prilikom nicanja zuba, ali se isto tako i resorbira nakon gubitka zuba. Budući da je alveolarna kost struktura koja ovisi o zubu, veličina, oblik, lokacija i funkcija zuba određuju njezinu morfologiju (37). Kost se sastoji od anorganskog i organskog dijela, a stanice koje prevladavaju su osteoblasti i osteoklasti. Prilikom remodelacije i obnove koštanog tkiva osteoblasti stvaraju novu kost, dok su osteoklasti zaduženi za resorpciju (38). Iako se unutarnja organizacija koštanog tkiva stalno mijenja, tkivo ostaje vrlo slično kroz cijeli život.

1.2. Patogeneza parodontne bolesti i odgovor domaćina

Glavna zbivanja koja se događaju u parodontu tijekom gingivitisa i parodontitisa upalne su i imunološke reakcije na mikroorganizme biofilma na površini zuba i na njihove produkte. Cilj je takvih zbivanja sprečavanje mikroorganizama da se prošire i invadiraju u tkiva, međutim prilikom obrane domaćina često dođe i do oštećenja susjednih stanica i tkiva. Napredovanjem bolesti upala se širi u vezivno tkivo te se sve više približava alveolarnoj kosti (Slika 3.).



Slika 3. Prikaz širenja upale u parodontnom tkivu (Preuzeto iz Journaloforalmicrobiology.net [homepage on the Internet]. [posjećeno 4. ožujka 2013.]. Available from: http://www.journaloforalmicrobiology.net/index.php/jom/rt/printerFriendly/5304/6699.

Zanimljivo je da parodontna bolest ne predstavlja homogeno stanje koje podjednako zahvaća sve zube i sve površine određenog zuba, već 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 kod nekih pacijenata, ili kod istog pacijenta, upala ostaje ograničena na rubni dio gingive, a kod nekih napreduje u apikalnom smjeru. Sigurno je tek da se narušava ravnotežno stanje domaćina i mikroorganizama (39).

Kad govorimo o zdravom parodontu, gingivi, valja napomenuti da je pravi naziv zapravo 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 kojem je stalno prisutan upalni infiltrat. Neutrofili prevladavaju u području spojnog epitela, dok se limfociti nalaze u vezivnom tkivu (40). Prava upalna reakcija razvija se kada produkti mikroorganizama nadvladaju obranu domaćina. Među najčešće spominjanim sintetiziranim produktima mikroorganizama spominju se kolagenaze, hijaluronidaze, proteinaze, endotoksini i hondroitin sulfataze (41). Svi oni dovode do oštećenja epitela i vezivnog tkiva, te do proširivanja međustaničnog prostora spojnog epitela. U tim trenucima upala je smještena na području gingive i izaziva bolest koja se zove gingivitis (42). Prilikom gingivitisa naglašen je gubitak kolagena te počinju i imunološke reakcije domaćina na mikroorganizme. Upala može ostati ograničena na područje gingive dugi niz godina te biti bez gubitka parodontnog pričvrstka, ligamenta ili alveolarne kosti, ali isto tako u nekom trenutku upala može početi sa širenjem u dublje slojeve parodonta te dovesti do prijelaza gingivitisa u parodontitis (43).

1.2.1. Patohistološke promjene parodonta tijekom upale

Na osnovi kliničkih i histopatoloških podataka Page i Schroeder su 1976. klasificirali progresiju gingivne i parodontne upalne lezije u četiri faze: inicijalnu, ranu, uspostavljenu i uznapredovalu (40). Iako postoje četiri vrste lezija, treba napomenuti kako ne postoji jasna granica između napredovanja jedne vrste lezije u drugu. Unatoč brojnim istraživanjima i razvoju tehnologije, i dan danas nije se otkrila jasna razlika između normalnog gingivnog tkiva i inicijalne faze gingivitisa. Većina biopsijskih uzoraka klinički zdrave gingive sadrži upalne stanice koje ne uzrokuju oštećenje gingive, već su ondje samo kao odgovor organizma na stalni mikrobni izazov kojem je izložena gingiva (42).

Inicijalna lezija nema kliničkih simptoma, ali zato se na mikroskopskoj razini vide klasični znakovi akutne upale u području vezivnog tkiva ispod spojnog epitela. Vaskularna dilatacija i povećan protok krvi postaju glavna karakteristika ove faze. Kao posljedica toga dolazi do povećanja hidrostatskog tlaka, porasta permeabilnosti kapilara te do izlučivanja tekućina i proteina u tkiva (44). Polimorfonuklearni neutrofili migriraju kroz endotel kapilara i odlaze u vezivo, spojeni epitel i sulkus. Migraciju im znatno olakšavaju adhezijske molekule ICAM-1 i endotelna leukocitna adhezijska molekula 1 (ELAM-1) (45). Inicijalna lezija nastaje dva do četiri dana nakon početka akumulacije plaka te oko sedmog dana prelazi u ranu leziju. U fazi

rane lezije javljaju se i klinički znakovi upale. Zbog dilatacije krvnih žila dentogingivnog pleksusa i otvaranja dotad inaktivnih kapilarnih tokova javlja se blago crvenilo marginalne gingive, te takva gingiva ujedno i krvari pri sondiranju (46). Mikroskopska analiza tkiva pokazuje limfocitnu infiltraciju spojnog epitela, uglavnom T-limfocitima, ali u tkivu se mogu vidjeti i neutrofili, makrofagi te plazma stanice (47). Budući da brojne nove stanice ulaze u tkivo dolazi do sve veće destrukcije kolagena te im je na taj način osiguran prostor. Bazalne stanice spojnog i sulkusnog epitela pokazuju povećanu proliferaciju ne bi li pojačali obrambenu barijeru, a pojava se histološki očituje u tkivu kao zupci pile na strani sulkusnog i spojnog epitela (48). Koronalni spojni epitel popušta na granici s caklinom zuba i upravo to mjesto omogućava stvaranje subgingivnog biofilma. Trajanje faza rane lezije nije točno određeno jer ponajviše ovisi o osjetljivosti domaćina. Nakon otprilike četrnaest dana od početka akumulacije plaka dolazi do stvaranja uspostavljene lezije koju karakteriziraju prisutnost plazma stanica i B-limfocita, te klinički znakovi kao što su crvenilo gingive i promjena njezine konzistencije. Aktivnost kolagenaza raste, a gubitak kolagena nije više smješten samo oko infiltrata upalnih stanica, već napreduje prema dubljim slojevima (49). Zupci pile sve su naglašeniji, raste međustanični prostor spojnog epitela, a na pojedinim mjestima dolazi i do oštećenja bazalne lamine. Sve ove promjene dovode do stvaranja epitela džepa koji pokazuje veću propustljivost i znatnu infiltraciju leukocitima. Uspostavljena lezija je reverzibilno stanje koje može postojati dugi niz mjeseci pa čak i godina. Poboljšanom higijenom i uklanjanjem drugih modificirajućih faktora dolazi do promjene patogene mikrobne flore u nepatogenu, te kao posljedica toga, i do smanjenja broja plazma stanica, odnosno povećanja broja limfocita (50). Ako uspostavljena lezija postane još aktivnija pretvara se u uznapredovalu leziju. Iako te dvije lezije imaju mnogo sličnih karakteristika, imaju i jednu bitnu razliku, a to je gubitak alveolarne kosti i vezivnotkivnog pričvrstka. Napredovanjem lezije prema apikalno pomiče se i epitel, gingiva poprima fibrozni izgled, udio plazma stanica prelazi 50%, a u tkivu se manifestiraju upalna i imunopatološka oštećenja (51). Prilikom nastanka parodontitisa, oštećenja koja nastaju u tkivu događaju se ne samo zbog virulentnosti određenih mikroorganizama i njihovih proizvoda, već i zbog reakcije domaćina na njih. Neki čimbenici virulentnosti djeluju izravno na stanice, dok ostali izazivaju odgovor domaćina koji je zapravo štetniji za tkivo nego sam mikroorganizam. Upravo zbog toga događaji se gledaju s aspekta međudjelovanja domaćina i mikroorganizma, te s aspekta reakcija koje se pripisuju obrani domaćina. Budući da su pojedinci različito podložni destruktivnim događajima prilikom parodontne infekcije, jasno je da varijabilnost u odgovoru domaćina uvelike pridonosi incidenciji parodontne bolesti u populaciji (52).

1.2.2. Karakteristike domaćina koje sprečavaju nastanak parodontitisa

Polimorfonuklearni leukociti (PMN) podvrsta su bijelih krvnih stanica koje karakteriziraju segmentirana jezgra i prisutnost citoplazmatskih granula. Glavna im je funkcija zaštita domaćina od mikroorganizama koju obavljaju fagocitozom uz pomoć brojnih enzima. Najvažniji predstavnici PMN-a su neutrofili koji čine čak 90% granulocita u perifernoj krvi, a ujedno su i najbrojnije stanične komponente u akutnom upalnom odgovoru koje na mjesto upale stižu privučeni različitim kemotaktičnim tvarima. Histološki nalazi tkiva zahvaćenih gingivitisom i parodontitisom potvrđuju njihovu prisutnost i govore u prilog važnoj ulozi u održavanju parodontnog zdravlja (53). U području spojnog epitela kao da stvaraju zid koji štiti dublje parodontne strukture od bakterijskog biofilma, a prisutnost u tkivu rezultat je kemotaktičnih faktora iz područja gingivnog sulkusa i dubljih struktura (54, 55). Zaštitnu ulogu PMN-a potvrđuju i brojna istraživanja koja opisuju sindrome vezane za disfunkciju leukocita, npr. kemotaktične disfunkcije i poremećaje u adheziji. Osobe s takvim poremećajima imaju teže oblike parodontitisa, bolest počinje u ranijoj životnoj dobi te je sami tijek bolesti puno brži nego kod osoba s normalnom funkcijom leukocita (56, 57).

Protutijela su proteini koji se stvaraju kao reakcija na strane supstancije, tvari i organizme (antigene) koji su prodrli u organizam domaćina. Nastaju u B-limfocitima i zapravo su topljivi oblik receptora za antigene na njima. Svako protutijelo može vezati samo jednu vrstu antigena i kao takvo pokazuje visok stupanj specifičnosti. Pacijenti s parodontitisom proizvode različita lokalna i sistemska protutijela koja reagiraju s različitim parodontopatogenima (58, 59). Međutim, značajniji porast titra protutijela pojavljuje se tek nakon što je destrukcija parodontnog tkiva već počela, a parodontno zdrave osobe vrlo rijetko imaju povišene razine protutijela (58, 60). Protutijela perzistiraju i dugo nakon parodontne terapije pa se postavlja pitanje jesu li protutijela stvorena tijekom bolesti funkcionalna ili samo služe kao markeri prošle infekcije (61). Iako se u početku smatralo da klinička slika parodontitisa ima veze s titrom protutijela novija istraživanja naglašavaju da uloga zaštitnog odgovora putem protutijela još uvijek nije utvrđena (62, 63).

Oralni epitel, posebice spojni i sulkusni, predstavlja fizičku i kemijsku barijeru mikroorganizmima koji se nalaze u samoj blizini ovih anatomskih struktura. O ulozi i svojstvima spojnog epitela bilo je već riječi, ali treba još jedanput istaknuti kako epitelno tkivo ne sadržava samo epitelne stanice, već i stanice koje pomažu u upalno-imunološkim

zbivanjima (dendritičke stanice, PMN leukocite, limfocite i mononuklearne fagocite) (10). Citokini koji su posljedica prirođenoga imunološkog odgovora također pokazuju ekspresiju u spojnom epitelu (IL-8, IL-1 i TNF-α). Novija istraživanja pokazuju da parodontopatogene bakterije potiču i stvaranje β-defenzina i IL-8 od strane PMN leukocita, te da je ekspresija defenzina pojačana u tkivu pacijenata s kroničnim parodontitisom (64, 65). Osim u bolesnom tkivu, defenzini pokazuju ekspresiju i u zdravom tkivu podupirući njihov značaj u održavanju homeostaze (66).

1.2.3. Odgovor domaćina koji dovodi do destrukcije parodonta

Temelj svake imunološke reakcije prepoznavanje je strane tvari te njezino neutraliziranje, odnosno uklanjanje iz organizma. Imunološki odgovor može biti prirođen (nespecifičan) i stečen (specifičan, adaptivan). Prirođena imunost djeluje bez prethodnog susreta domaćina sa stranom tvari i usmjerena je protiv gotovo svih antigena koji ulaze u organizam domaćina. Nasuprot njoj, stečena imunost razvija se kasnije i djeluje protiv točno određenog antigena, ali tek nakon prethodnog susreta s njim. Tijekom patoloških zbivanja u parodontnoj leziji vrlo je teško razdvojiti i individualizirati utjecaj prirođenog i stečenog imunološkog odgovora. Histopatološke analize mjesta zahvaćenih parodontitisom potvrdile su da u tkivu postoje elementi, odnosno stanice oba tipa imunološkog i upalnog odgovora (61).

1.2.3.1. Prirođeni odgovor domaćina

Otprije je poznato da su PMN leukociti odgovorni za održavanje zdravlja parodontnih struktura koje su u stalnom doticaju s dentalnim plakom bogatim različitim mikroorganizmima, ali također je poznato da igraju i veliku ulogu u imunološkim i patološkim zbivanjima tijekom parodontitisa. Visoke koncentracije protutijela karakterističnih za parodontitis u serumu i sulkusnoj tekućini, obilje opsoniziranih bakterija u subgingivnom prostoru i interakcija fagocita s bakterijama, samo su neki od argumenata koji idu u prilog destruktivnoj ulozi PMN leukocita (45, 53). Osim spomenutog, PMN leukociti sintetiziraju i otpuštaju različite lizosomalne enzime, među kojima su možda najvažnije tkivno-destruktivne proteaze koje se povezuju s kolapsom parodontnog tkiva (67, 68). Prilikom interakcije s

bakterijama dolazi do oštećenja fibroblasta, endotelnih stanica i keratinocita (69). Prisutnost proteolitičkih enzima, lipida odgovornih za resorpciju kosti i drugih medijatora upale koji se otpuštaju tijekom susreta s bakterijama pridonose upalnom odgovoru i gubitku pričvrstka. Kantarci i sur. smatraju da je hiperaktivnost PMN leukocita kod pacijenata s agresivnim parodontitisom odgovorna za većinu tkivne destrukcije, a rezultat je pojačane proizvodnje upalnih i koštano-resorbirajućih lipida (70).

Monociti su mononuklearni fagociti koji nastaju iz mijeloidnog progenitora u koštanoj srži i odlaze u krvotok. Iz krvotoka zatim odlaze u organe i tkiva te prelaze u makrofage koji imaju dvije osnovne zadaće: fagocitozu i predočavanje antigena. Makrofagi u citoplazmi imaju brojne granule među kojima su i lizosomi s perokisdazama i hidrolazama, važni enzimi za unutarstanično ubijanje fagocitiranih mikroba. Osim fagocitoze, makrofagi imaju bitnu ulogu u kontroli imunološkog odgovora koju postižu kontaktom s ostalim imunocitima ili lučenjem topljivih posrednika. Među najvažnijim tvarima su hidrolitički enzimi, komponente komplementa, metaboliti kisika, dušikov oksid, bioaktivni lipidi (prostaglandini, leukotrieni), citokini (IL-1, IL-6, TNF-α) i čimbenici rasta. Pomoću uloge i funkcije makrofaga može se objasniti kako Gram-negativna infekcija parodontne lezije dovodi do destrukcije vezivnog i koštanog parodontnog tkiva. U područjima kronične upale bakterije privlače leukocite direktnom ekspresijom kemotaktičnih peptida ili stimulacijom produkcije i sekrecije kemotaktičnih citokina i upalnih lipida od strane stanica domaćina (45, 54, 71). Bakterijski LPS reagiraju s makrofagima ili receptorima na dendritičkim stanicama i stimuliraju proizvodnju upalnih citokina i ostalih medijatora. Tatakis ističe da proizvodnja IL-1 ima ključnu ulogu u destrukciji tkiva pokrećući razgradnju kosti i kolagena (72). Interakcijom makrofaga i LPS dolazi i do stvaranja prostaglandina, prije svega prostaglandina E_2 (PGE_2) koji se na mjestima zahvaćenim destrukcijom parodontnog tkiva nalazi u visokim koncentracijama. PGE_2 je lipidni upalni medijator koji vodi resorpciji kosti (73, 74). Klinička istraživanja na pacijentima s parodontitisom, kao i istraživanja na životinjskim modelima, pokazala su da se lokalnom ili sistemskom primjenom nesteroidnih protuupalnih lijekova značajno smanjuje koncentracija PGE_2 i gubitak kosti (75, 76).

1.2.3.2. Stečeni odgovor domaćina

Mehanizmi prve linije obrane, nespecifični ili prirođeni odgovori, često nisu dovoljni za eliminaciju patogena te se tada aktiviraju stečeni ili adaptivni imunosni odgovori s ciljem poboljšanja sposobnosti domaćina za prepoznavanje patogena. Stečeni odgovor domaćina koristi se pamćenjem, prepoznavanjem i vezanjem antigena s ciljem njihove eliminacije (39). Trenutačne teze o patogenezi parodontitisa glavninu mehanizama koji su odgovorni za destrukciju tkiva pripisuju prirođenoj imunosti. Međutim, histopatološki nalazi parodontne lezije i sistemski učinci parodontnih bakterija na imunološke faktore, kao što su protutijela i citokini, upućuju i na bitnu ulogu stečene imunosti u patogenezi ove bolesti.

U ranoj parodontnoj leziji prevladavaju makrofagi i T-limfociti, dok u uznapredovalim lezijama B-limfociti i plazma stanice čine veći dio staničnog infiltrata (61). Teng te Yamazaki i sur. ističu kako su histološke karakteristike, profil citokina, priroda i specifičnost lokalnog imunološkog odgovora u parodontnoj leziji određeni prisutnošću i funkcijom podklasa regulatornih T-stanica koje su inducirane mikrobnim biofilmom (77, 78). Tako se npr. za vrijeme rane lezije, dakle kliničke dijagnoze gingivitisa, najčešće nalaze Th1-limfociti (Th1) kao odgovor na unutarstanične patogene (79). Uznapredovale lezije pak najčešće karakteriziraju Th2-limfociti (Th2) koji su zaduženi za borbu protiv izvanstaničnih patogena. Važno je napomenuti da i sam patogen određuje tip odgovora domaćina putem interakcije s posredničkim stanicama koje dovode do proizvodnje citokina karakterističnih za taj odgovor (80, 81). Th1 odgovor je najčešće karakteriziran stvaranjem interleukina-12 (IL-12) koji potiče stvaranje interferona-γ (INF-γ) vodeći aktivaciji makrofaga i fagocitozi. Odgovor putem Th2 znači stvaranje citokina i to IL-4, IL-10 i IL-13 te produkciju protutijela. Zanimljivo je da najpoznatiji parodontni patogen *A.actinomycetemcomitans* potiče stvaranje IgG2 protutijela ovisnih o Th1, a ne o Th2 citokinima (82). Tijekom imunološkog odgovora dominirat će ili citokini od Th1 ili od Th2 limfocita upućujući na polarizaciju imunološkog odgovora. Rezultati istraživanja daju konfliktne rezultate, ali najčešće upućuju na prisutnost i Th1 i Th2 citokina ili dominaciju jednih u odnosu prema drugima (77-79, 83). Takvi rezultati zapravo i nisu čudni jer je u parodontnoj leziji prisutan cijeli niz bakterijskih vrsta koje dovode do imunološkog odgovora. Osim toga, na heterogenost citokinskog odgovora utječe i različit histološki stadij bolesti, drugačiji oblik parodontne bolesti, ali i aktivnost same bolesti. Onaj parodontitis koji bi se ipak mogao povezati sa samo jednim tipom odgovora je lokalizirani agresivni parodontitis. Pacijenti s lokaliziranim agresivnim parodontitisom imaju

povišene koncentracije IgG2 proteina u serumu i povišena protutijela specifična za Th1 (84, 85). U prilog toj teoriji ide i činjenica da je serumski IgG2 genetski kontroliran, a lokalizirani agresivni parodontitis često se pojavljuje unutar obitelji (86).

Nedavno je opisana i nova podvrsta Th-stanica, Th17-stanice, koje daju novu dimenziju imunološkoj regulaciji parodontne bolesti. Razvoj Th17-stanica ovisan je o prisutnosti IL-23, IL-6 i transformirajućeg čimbenika rasta beta, a same stvaraju IL-17, citokin koji se povezuje s nekolicinom kroničnih sistemskih upalnih bolesti, kao primjerice s reumatoidnim artritisom, Chronovom bolesti, multiplom sklerozom i psorijazom (87). Navedenim bolestima i parodontitisu zajednička je lokalna kronična upala zbog koje dolazi do stvaranja upalnih citokina i posljedične tkivne destrukcije. Tkivna destrukcija se vjerojatno događa zbog ekspresije gena Th17-stanica koja dovodi do produkcije metaloproteinaza i povećane ekspresije aktivator receptora za nuklearni faktor-κB lingand (RANKL) na osteoklastima (88).

Prema tradicionalnim konceptima imunologije B-limfociti djeluju kao dobro kontroliran dio adaptivnog odgovora domaćina reguliran T-limfocitima, no novija istraživanja navode da uz dobro poznatu ulogu stvaranja imunoglobulina B-limfociti sudjeluju i u drugim aspektima odgovora domaćina sudjelujući u aktivaciji imunološkog sustava (89, 90). Stvaraju se u koštanoj srži, a aktivacijom i diferencijacijom, posredstvom citokina IL-4, IL-5, IL-6 od strane Th2-limfocita B-limfociti postaju plazma stanice, odnosno plazmociti (91). Uloga B limfocita je višestruka, osim što stvaraju protutijela nakon transformacije u plazma stanice, služe i kao stanice za prezentiranje antigena, stvaraju citokine, sudjeluju u autoimunim reakcijama, ali i u destrukciji tkiva (92).

B-limfociti, odnosno plazma stanice, igraju značajnu ulogu u parodontitisu. Koliko su plazma stanice bitne u parodontnoj leziji govori i činjenica da je njihova zastupljenost u leziji čak oko 50%, dok je zastupljenost B-limfocita oko 18% u odnosu na druge stanice adaptivnog imunološkog odgovora. T-limfocita je manje nego B-limfocita te su Th-limfociti zastupljeniji od Tc-limfocita, dok zastupljenost polimorfonuklearnih leukocita i makrofaga iznosi samo oko 5% (51). U radu Berglundha i sur. vidljivo je da lezije agresivnog i kroničnog parodontitisa imaju podjednak stanični sastav, ali i da je jačina bolesti povezana s gustoćom plazma i B-stanica. Njihov je udio veći što je teži oblik parodontitisa (93).

U tkivima zahvaćenim parodontnom bolesti, protutijela stvorena od plazma stanica usmjerena su protiv antigena prisutnih u subgingivnom biofilmu pa je tako kod pacijenata s agresivnim

parodontitisom uočena povećana proizvodnja IgG_2 u odnosu na IgG_1 (94), a istraživanja dolaze i do zaključka da se titar IgG na glavne parodontne patogene (*P. gingivalis* i *A. actinomycetemcomitans*) smanjuje nakon provedene parodontne terapije (95). Osim toga, razina IgG u sulkusnoj tekućini (96) i razina IgA i IgG u slini također se smanjuju nakon provedenog liječenja (97, 98). Navedeni podaci podržavaju hipotezu da odgovor protutijelima usmjerenima na antigene oralnih patogena smanjuje jačinu bolesti, te da se ovakav odgovor domaćina može smatrati zaštitnim odgovorom organizma na patološka zbivanja tijekom parodontne bolesti. Međutim, u daljnjem tekstu bit će vidljivo da odgovor domaćina putem B-limfocita također ima i negativan učinak na parodontna tkiva.

Uz proizvodnju protutijela usmjerenih protiv antigena, moguća je i pojava autoantitijela koja su proizvod autoreaktivnih B-limfocita (B1-limfociti). Berglundh i sur. te Afar i sur. opisuju velik broj B1-limfocita u perifernoj krvi pacijenata s uznapredovalim parodontitisom (99, 100). Osim toga, plazma stanice proizvode i različite citokine, primjerice TNF-α, IL-6, IL-10 i transformirajući faktor rasta β (TGF-β). Stvaranje i sekrecija TNF-α potiču ekspresiju matriksnih metaloproteinaza (MMP), te se tom činjenicom plazma stanice povezuju s tkivnom destrukcijom. Ekspresija MMP-a u normalnim je tkivima niska, ali povećava se kako napreduju patološki procesi koji dovode do destrukcije tkiva (93). Aktivnost MMP-a je povećana kod eksperimentalnog gingivitisa (101), korelira s težinom parodontne bolesti (102), te se koncentracija MMP-a smanjuje nakon provedenog parodontološkog liječenja (103). Iako postoje brojni dokazi o povezanosti tkivne destrukcije i MMP-a, Sorsa i sur. predlažu da se njihova uloga ne smije tumačiti samo kao takva, već da postoje i obrambene i zaštitne funkcije tih molekula (104, 105).

Na temelju navedenog vidljivo je da T-limfociti djeluju kao glavna grupa regulatornih stanica tijekom parodontitisa, ali i da je njihov udio u tkivima zahvaćenim parodontitisom manji nego udio B-limfocita. B-limfociti i plazma stanice dominiraju u parodontnoj leziji, a budući da je destrukcija tkiva glavni znak parodontitisa, čini se da te stanice pridonose degradaciji vezivnog tkiva i da je zaštitna uloga manje istaknuta. Navedene činjenice potvrđuju da upalna i imunološka zbivanja štite domaćina od lokalnog napada mikroorganizama, ali i da takve obrambene reakcije pridonose oštećenju parodonta kod gingivitisa i parodontitisa.

1.3. Agresivni parodontitis

Parodontitis je upalna bolest koja zahvaća potporno tkivo zuba, a uzrokovana je specifičnim anaerobnim patogenima koji se nalaze na površini zuba. Karakterizira ga upala gingive, te destrukcija potporne kosti i parodontalnog ligamenta koji napredovanjem bolesti dovode do povećane pomičnosti zuba i u konačnici do gubitka zuba (106). Svaki parodontitis počinje gingivitisom koji je definiran kao reverzibilno upalno stanje koje ne dovodi do destrukcije potpornih struktura, već 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 dovode do destrukcije parodontnog tkiva i do bolesti zvane parodontitis (107). Dva su najčešća oblika parodontitisa agresivni i kronični parodontitis. Agresivni oblik češće zahvaća mlađe osobe, destrukcija parodontnog 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 (108). Nasuprot agresivnom obliku, kronični parodontitis karakterizira sporije napredovanje bolesti i starija životna dob.

1.3.1. Obilježja agresivnog parodontitisa

Agresivni parodontitis definiran je na međunarodnoj radionici za klasifikaciju parodontnih bolesti 1999. Dotadašnja podjela parodontitisa temeljila se na dobi pacijenta što se prema novim spoznajama ispostavilo nepravilnim kriterijem za donošenje dijagnoze. Agresivni oblik parodontitisa može se javiti u bilo kojoj dobi, a primarne osobine za klasifikaciju postale su medicinska anamneza bez osobitosti, brz gubitak pričvrstka i kosti, te tendencija javljanja bolesti unutar obitelji. Sekundarne osobine za koje se smatra da se obično, ali ne i obvezatno, javljaju su nerazmjer između količina mikrobnih naslaga i težine destrukcije, povišena razina *A. actinomycetemcomitansa,* a kod nekih pacijenata i *P. gingivalis*a, abnormalnosti fagocita, hiperreaktivni fenotip makrofaga, povišene razine PGE_2 i IL-1, te spontani prestanak napredovanja bolesti (109). Da bi se postavila dijagnoza agresivnog parodontitisa, ne trebaju biti prisutne i dokazane sve navedene karakteristike, već ju je moguće temeljiti i na kliničkim, radiološkim i anamnestičkim podacima. Laboratorijska testiranja svakako su dobrodošla, no nisu ključan korak u određivanju bolesti.

Budući da se grupa stručnjaka složila da postoji dovoljan broj specifičnih obilježja za podjelu te bolesti na lokalizirani i generalizirani oblik, 1999. je definirana i podklasifikacija agresivnog parodontitisa. Lokalizirani oblik karakteriziraju početak oko i za vrijeme puberteta, jak odgovor serumskog protutijela na uzročnike i interproksimalni gubitak pričvrstka na prvom kutnjaku/sjekutiću te najmanje još dva trajna zuba od kojih je jedan prvi kutnjak, i da zahvaća ne više od dva zuba a da nisu samo prvi kutnjak i sjekutić. Generalizirani oblik obično zahvaća osobe mlađe od 30 godina (mogu biti i starije), epizodna priroda destrukcije pričvrstka i alveolarne kosti, slab odgovor serumskog protutijela na uzročnike i generaliziran interproksimalni gubitak pričvrstka na najmanje tri trajna zuba a da nisu samo prvi kutnjak i sjekutić.

1.3.2. Učestalost agresivnog parodontitisa

Budući da definicija agresivnog parodontitisa iz 1999. nema dugu povijest i da ona nije samo novi termin ranije definiranog parodontitisa koji počinje u mlađoj životnoj dobi (engl. early-onset periodontitis, EOP) i juvenilnog parodontitisa, epidemiološka istraživanja većinom se odnose na te dvije dijagnoze, a tek će budućnost donijeti znatniji broj epidemioloških istraživanja vezanih za agresivni parodontitis. Prevalencija agresivnog parodontitisa, EOP i juvenilnog parodontitisa u populaciji pokazuje velike razlike u literaturi, a kao glavni razlog tih varijacija navode se rasna pripadnost, razvijenost zemlje i dob pregledane populacije (110-113). Studija Melvina i sur. pokazuje da je prevalencija bolesti manja od 0,1% kod razvijenih nacija, a čak 5% u nerazvijenim zemljama (114). Godine 2010. Demmer i Papapanou imali su cilj prikazati pregled literature o prevalenciji kroničnog i agresivnog parodontitisa prema klasifikaciji iz 1999., no došli su do zaključka da nema dovoljno znanstvenih studija koje bi pridonijele donošenju zaključaka o globalnoj prevalenciji agresivnog, odnosno kroničnog parodontitisa (115).

1.3.3. Etiologija agresivnog parodontitisa

Parodontne bolesti uzrokovane su mikroorganizmima koji koloniziraju površinu zuba iznad i ispod gingivnog ruba. Pretpostavka je da oko petsto različitih vrsta kolonizira usta, te da u zdravom sulkusu broj bakterija iznosi oko 10^3, a u dubokim parodontnim džepovima taj broj prelazi i 10^8. Bakterija koja se najčešće povezuje s agresivnim parodontitisom je *A. actinomycetemcomitans*. Taj Gram-negativni, fakultativno anaerobni nepokretni štapić smatra se ključnim mikroorganizmom kod lokaliziranog agresivnog parodontitisa (LAP) (116). Tom zaključku pridonose činjenice da je *A. actinomycetemcomitans* izoliran u parodontnim lezijama kod više od 90% pacijenata oboljelih od LAP-a, da proizvodi leukotoksin i da je u stanju izazvati bolest kod eksperimentalnih životinja (117, 118). Također su povišena serumska protutijela na A. actinomycetemcomitans kod pacijenata oboljelih od LAP-a, te je utvrđena povezanost neuspjelog liječenja parodontitisa s neuspjehom smanjenja razina *A. actinomycetemcomitansa* (119, 120). *A. actinomycetemcomitans* svoju patogenost ostvaruje različitim mehanizmima i sposobnostima. Karakteriziraju ga lako prianjanje uz različita tkiva domaćina, lučenje bakteriocina, inhibiranje rasta bakterija koje pogoduju obrani domaćina, te lagano razvijanje rezistencije na tetraciklinske antibiotike (121). Također posjeduje toksin koji ubija fibroblaste (122) i izdašan je izvor leukotoksina koji ubija neutrofile i makrofage (123). Osim *A. actinomycetemcomitans* u etiologiji agresivnog parodontitisa često se još spominje i *P. gingivalis*. *P. gingivalis* je Gram-negativni, anaerobni, nepokretni štapić koji proizvodi različite štetne enzime, kao npr. kolagenaze i peptidaze, endotoksin i masne kiseline (124). Često se pojavljuje u refraktornim lezijama, a pacijenti s generaliziranim parodontitisom koji počinje u mlađoj životnoj dobi imaju jake lokalne i imunološke reakcije protiv ove bakterije (125, 126). Svoju patogenost postiže proizvodnjom širokog spektra proteinaza, uključujući i one koje su u stanju cijepati imunoglobuline domaćina vezane za površinu mikroorganizma (127). Sposoban je ući u stanicu domaćina i umnožavati se što ga čini pravim unutarstaničnim patogenom (128), te je uz to prema *in vitro* istraživanjima sposoban prelaziti iz inficirane stanice u susjednu zdravu stanicu (129). Nadalje, *P. gingivalis* u svojoj vanjskoj membrani ima jak endotoksin (LPS) i proizvodi razne nisko-molekularne iritanse poput amonijaka, hidrogen-sulfida, indola i kratko-lančanih masnih kiselina (127). Još jedna bitna karakteristika pridonosi patogenosti ove bakterije, a to je stvaranje proteoliposoma. Proteoliposomi su malene vezikule u vanjskoj membrani bakterije koje olakšavaju interakciju s drugim bakterijama (130) te inaktiviraju ili suprimiraju odgovor domaćina (131). Sve navedene karakteristike čine *A. actinomycetemcomitans* i *P. gingivalis*

jakim parodontnim patogenima sa širokim repertoarom faktora virulencije koji im pomažu u izbjegavanju obrane domaćina, izazivanju upalnih i imunoloških zbivanja koja vode destrukciji tkiva domaćina.

1.3.4. Destrukcija parodontnih tkiva

Kao što je već prije spomenuto, imunološka i upalna zbivanja vođena su velikim brojem različitih molekula koja dovode do destrukcije parodontnih tkiva. Zaštitni odgovor organizma postaje nadjačan, koncentracija patogena u subgingivnom području raste, a upalna zbivanja prodiru u sve dublje slojeve parodonta.

Direktan patološki učinak bakterija na parodont odvija 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 direktno utječe na vaskularizaciju gingive, dolazi do edema i pojačanog stvaranja sulkusne tekućine, stvarajući tako pogodnu okolinu i za druge mikroorganizme (132). *P. gingivalis* je pak poznat 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 (133-135), te LPS-a koji su *in vitro* sposobni potaknuti resorpciju kosti (136).

Indirektan patološki učinak bakterija počinje kada obrambeni elementi parodontnog tkiva bivaju nadjačani virulentnošću mikroorganizama. Tada počinje odgovor domaćina koji pokreće destruktivne događaje u tkivu. 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) (137, 138).

Citokini i upalni medijatori koji se najčešće povezuju s parodontitisom su IL-1, IL-6, TNF-α i PGE_2. IL-1 je upalni citokin s mnogobrojnim funkcijama, a povišene razine u tkivu i sulkusnoj tekućini uočene su kod pacijenata s parodontnim bolestima. Svoju ulogu u patološkim događanjima tijekom parodontitisa ponajprije ostvaruje stimulacijom monocita i fibroblasta na oslobađanje PGE_2 te MMP (72). IL-6 stvaraju limfociti, monociti i fibroblasti, a

primarno djeluje na proliferaciju plazma stanica zaslužnih za stvaranje protutijela. Uz to dokazana je i stimulativna aktivnost u stvaranju osteoklasta što direktno povezuje IL-6 s resorpcijom kosti (139). Njegove razine također su povišene kod pacijenata s parodontitisom i to u većoj mjeri nego kod osoba s gingivitisom (140, 141). 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 (142, 143). 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 drugačijim je činjenica da ga izlučuju monociti i fibroblasti nakon stimulacije bakterijskim LPS-om (144). PGE_2, vazoaktivni upalni medijator iz grupe eikosanoida, u mnogim istraživanjima pokazuje povišene razine u sulkusnoj tekućini i tkivima, i to kod osoba s gingivitisom i aktivnim parodontitisom (145). Stvaraju ga fibroblasti i makrofagi, a uloga u destrukciji parodonta objašnjava se indukcijom MMP-a i resorpcijom kosti putem osteoklasta.

1.4. Proteomska istraživanja u parodontologiji

1.4.1. Proteomske analize i spektrometrija mase

Proteomika je znanost koja se bavi proučavanjem proteina, njihovom strukturom i funkcijom, s ciljem sveobuhvatne kvalitativne i kvantitativne deskripcije proteinske ekspresije, ali i njezinih promjena pod utjecajem bioloških promjena koje se događaju primjerice za vrijeme bolesti i liječenja (146).

Proteomske analize omogućuju iscrpan prikaz ekspresije proteina u različitim biološkim uzorcima te predstavljaju napredniji pristup u istraživanjima proteoma (proteom je cjelokupni proteinski sastav jedinice promatranja) (147). Budući da su proteini sastavni dijelovi organizma i da sudjeluju u gotovo svim unutarstaničnim i međustaničnim procesima, proteomika značajno pridonosi trenutačnim spoznajama o proteinima koji su vezani za zdravlje, odnosno bolest (148).

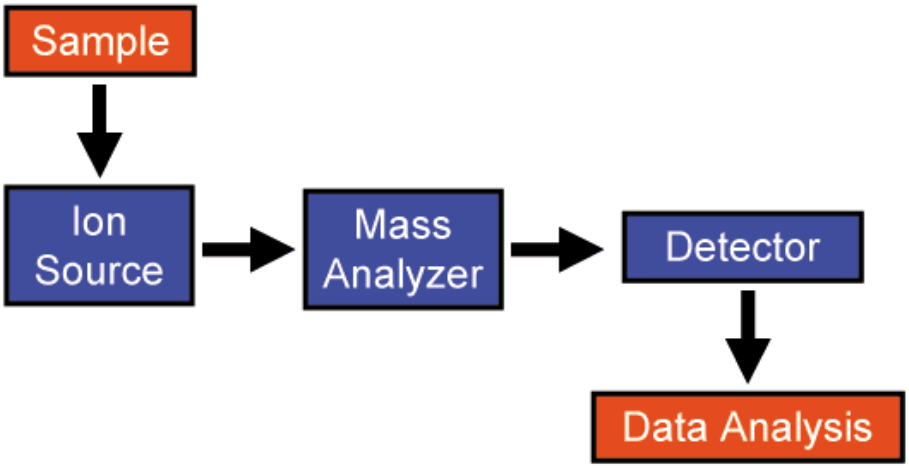
Istraživanja u području proteomike provode se pomoću različitih tehnoloških i metodoloških pristupa, međutim ne postoji ni jedna tehnologija koja bi bila prikladna za jedinstvenu primjenu. Analize se sastoje od niza koraka koji zahtijevaju različitu tehnologiju, a organizacija i integracija analitičkih 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, terapiji i prognozi različitih bolesti. Analize proteina u uzorcima rade se do najsitnijih detalja. Osim što se detektira prisutnost, zastupljenost i količina proteina, moguće je čak i određivanje posttranslacijskih modifikacija različitih proteina u analiziranom uzorku (149, 150).

Spektrometrija mase (MS) je tehnika 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 pojašnjavanje kemijskih struktura molekula, primjerice peptida. Strojevi u kojima se odvija MS zovu se spektrometri masa i sastoje se od tri glavna dijela: ionizatora (ionizira molekule), masenog analizatora (raspoređuje ione prema njihovim masama uz pomoć elektromagnetskog polja) i detektora (detektira signal i pruža podatke za mjerenje zastupljenosti pojedinih iona) (Slika 4.).



Slika 4. Spektrometar mase (Preuzeto iz Planetorbitrap.com [homepage on the Internet]. [posjećeno 4. ožujka 2013.]. Available from: http://planetorbitrap.com/q-exactive.

Standardna procedura MS-a sastoji se od niza koraka (Slika 5.). Prvi korak je nanošenje uzorka u spektrometar masa, zatim slijedi ionizacija molekula u ionizatoru koja rezultira stvaranjem nabijenih čestica (iona). Nastali ioni provode se kroz analizator koji ih zatim razdvaja prema omjeru mase i naboja. Iz analizatora ioni idu na detektor gdje proizvode električni signal koji se može registrirati na računalu (151).



Slika 5. Shematski prikaz koraka spektrometrije masa pomoću spektrometra mase (Preuzeto iz Commons.wikimedia.org [homepage on the Internet]. [posjećeno 4. ožujka 2013.]. Available from: 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 pristupom omogućava se identifikacija većeg 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 znatno veći broj detektiranih peptida u odnosu na uzorke koji nisu frakcionirani (152). Gel elektroforeza je metoda kojom se pomoću jednosmjerne struje razdvajaju pojedine komponente uzorka na temelju veličine i naboja. U proteomskim istraživanjima cilj je razdvojiti smjese proteina u određenom uzorku. U te svrhe često se primjenjuje metoda gel elektroforeze u poliakrilamidnom gelu, SDS-PAGE (engl. *Sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis*). Kod SDS 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.

1.4.2. 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 omogućavaju 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 (153), funkcionalnog proteoma *Streptococcus mutans-a* (154) i proteoma vanjske membrane *P. gingivalis-a* (155). Od stanica koje su važne za funkcioniranje parodontnih tkiva istraživani su fibroblasti (156), osteoblasti (157), osteoklasti (158) i cementoblasti (159). Također su istraživane bolesti zuba i usne šupljine kao što su karijes (160, 161), Sjögrenov sindrom (162) i oralni karcinomi (161).

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 (163) (Slika 6).



Slika 6. Biološki uzorci dostupni za proteomska istraživanja parodontnih bolesti

Ngo i sur. analizirali su sulkusnu tekućinu upaljenih parodontnih džepova 12 pacijenata koji su završili s parodontnom terapijom i bili u fazi održavanja. Autori su po prvi put identificirali 33 peptida i 66 proteina koji se nalaze u sulkusnoj tekućini upaljenog parodonta i istaknuli kako će to otkriće pridonijeti u razumijevanju sudbine serumskih proteina u sulkusnoj tekućini (164). Bostanci i sur. također su proteomski analizirali sulkusnu tekućinu. Oni su za usporedbu uzeli 5 pacijenata s agresivnim parodontitisom i 5 parodontno zdravih pojedinaca. U navedenom istraživanju identificirano je ukupno 154 proteina ljudskog, bakterijskog i virusnog podrijetla. Proporcija mikrobnih proteina bila je veća kod pacijenata s parodontitisom, a proteini vezani za obranu domaćina, kao *Cistatin-B* i defenzini, pokazali su ekspresiju samo u zdravim uzorcima. Budući da je uzorak malen i da se tek krenulo s proteomskim analizama u parodontologiji, autori ne ističu ni jedan protein kao mogući biomarker, već napominju da su za takve pretpostavke potrebne veće kohortne studije (165). U želji da se identificiraju promjene proteinskog sastava sline s obzirom na aktivnost bolesti, Haigh i sur. proveli su istraživanje na 9 pacijenata s uznapredovalim parodontitisom prije i poslije terapije. Učinjena je kvantitativna proteomska analiza sline te je utvrđeno da od 126 identificiranih proteina njih 15 pokazuje različitu zatupljenost u slini prije i poslije terapije. Rezultati su istaknuli dominantnu ulogu S100 proteina u odgovoru domaćina tijekom parodontitisa, te su naveli da bi upravo ti proteini mogli biti potencijalni biomarkeri pri praćenju aktivnosti ove bolesti (166).

U želji da se analiziraju proteini u fazi nastanka i smirivanja gingivitisa, Grant i sur. napravili su istraživanje pomoću 21 dnevnog modela. Sulkusna tekućina od 10 pacijenata skupljana je na početku istraživanja te 7., 14., 21. i 35. dan. Ukupan broj identificiranih proteina eksperimentalno izazvanoga gingivitisa bio je 186 humanih i 16 bakterijskih. Bakterijski proteini pokazali su male varijacije tijekom trajanja eksperimenta, 170 humanih proteina nije pokazalo nikakve promjene, dok se zastupljenost 16 proteina mijenjala od nultog do 35. dana. Neki od istaknutih proteina bili su *Annexin A1* i *A3*, Cistatin B, IgG3, Apolipoprotein B-100 i Histone 4 i 1.2. Zanimljivo je da citokini, koji su često istraživani kao mogući biomarkeri parodontnih bolesti u sulkusnoj tekućini, uopće nisu bili detektirani (167). Jednako se pokazalo i u istraživanju Bostancija i sur., a kao mogući razlog izostanka detekcije navode se jako niske koncentracije citokina u uzorcima (165). U posljednjem istraživanju eksperimentalnoga gingivitisa identificirano je 287 proteina, od kojih je 101 protein pokazao različitu ekspresiju. Među izdvojenim proteinima našli su se ponovno *Annexin A1*, IgG3, Histon 1.2, S100-A8, ali i neki novi poput citokeratina 1 i 2, Cistatin S, Katepsin G i Alfa-

amilaza 1. U istraživanju također nisu detektirani citokini, a autori navode da će detekcija molekula koje su u malim koncentracijama prisutne u uzorcima biti moguća tek s napretkom u pripremi uzoraka, ponajprije misleći na bolju separaciju proteina prije masene spektrometrije kako bi se povećao dinamički raspon detekcije (168).

Navedena istraživanja samo su dio proteomskih istraživanja provedenih u parodontologiji, a iz navedenog se vidi da broj identificiranih proteina raste kroz istraživanja. Napredak u izolaciji tkiva, separaciji proteina, kvantifikaciji, analizama sekvenca, te strukturalna i interakcijska proteomika otvaraju nova vrata u istraživanju fizioloških i patoloških zbivanja unutar parodonta (151). Spoznaja cjelokupne ekspresije staničnih i matriksnih proteina predstavlja dobar početak i 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.

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA

Svrha istraživanja bila je dokazati da uzorci epitelnog i vezivnog parodontnog tkiva zdravih ispitanika (kontrolne skupine) i zdravog mjesta, mjesta s gingivitisom, parodontitisom i mjesta s parodontitisom nakon terapije pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom (ispitivane skupine) pokazuju različitu ekspresiju proteina.

Ciljevi istraživanja bili su:

1. identificirati i kvantificirati proteine u uzorcima epitelnog i vezivnog parodontnog tkiva zdravih ispitanika
2. identificirati i kvantificirati proteine u uzorcima epitelnog i vezivnog parodontnog tkiva zdravog mjesta pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom
3. identificirati i kvantificirati proteine u uzorcima epitelnog i vezivnog parodontnog tkiva mjesta s gingivitisom pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom
4. identificirati i kvantificirati proteine u uzorcima epitelnog i vezivnog parodontnog tkiva mjesta s parodontitisom pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom
5. identificirati i kvantificirati proteine u uzorcima epitelnog i vezivnog parodontnog tkiva mjesta s parodontitisom nakon terapije pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom
6. odrediti proteine koji pokazuju ekspresiju u svim istraživanim skupinama, odnosno zajedničke proteine svih uzoraka, te izračunati stupnjeve promjena ekspresije proteina u ispitivanim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu

Hipoteza istraživanja bila je da ne postoji razlika u ekspresiji proteina između kontrolne skupine i ispitivanih skupina.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Odabir ispitanika

U istraživanju je sudjelovalo osam pacijenata Zavoda za parodontologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sudionici istraživanja dobili su informacije za sudionike u pisanom obliku te su potpisali Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

Sve sudionike istraživanja pogledala je, odabrala i obradila ista doktorica. Za dijagnostiku parodontne bolesti koristilo se stomatološko ogledalo, UNC-15 parodontna sonda i ortopantomografske snimke. Pacijentima su mjereni parodontološki parametri, a oni su uključivali dubinu sondiranja, recesiju gingive i razinu kliničkog pričvrstka, te parodontni indeksi: aproksimalni plak indeks i indeks krvarenja pri sondiranju. Ovisno o kliničkom nalazu i anamnestičkim podacima pacijentima je dijagnosticirano stanje prema klasifikaciji parodontnih bolesti iz 1999. (109)

Ispitivanu skupinu činila su četiri pacijenta s dijagnozom generaliziranog agresivnog parodontitisa, i to dva muškarca i dvije žene kako bi se isključio utjecaj spola na rezultate. Kontrolnu skupinu činila su četiri pojedinca, također dva muškarca i dvije žene, bez znakova parodontne bolesti, tj. oni pacijenti Zavoda za parodontologiju kojima je razlog dolaska na zavod bio zahvat kliničkog produljenja krune zuba.

Isključujući kriteriji za sudjelovanje u istraživanju bili su: maloljetne osobe, osobe koje trebaju skrbnika, pušači, sistemne bolesti (npr. dijabetes, autoimune bolesti), nedavna ili aktualna akutna ili kronična infekcija, trudnoća, laktacija, ovisnost o alkoholu ili opojnim drogama, parodontološko liječenje u posljednjih šest mjeseci, uzimanje antibiotika unutar zadnjih šest mjeseci.

3.2. Provođenje terapije i uzimanje uzoraka tkiva

Kod pacijenata s agresivnim parodontitisom prije početka inicijalne parodontološke terapije pomoću skalpela 15-C (Aesculap AG, Njemačka) uzeo se uzorak mekoga parodontnog tkiva (epitel i vezivo). Kod svakog pacijenta uzeti su uzorci sa zdravog mjesta (mjesto bez kliničkih znakova parodontne bolesti i bez gubitka kosti), mjesta s gingivitisom i mjesta s

parodontitisom. Nakon toga provedena je inicijalna terapija. Tri mjeseca nakon inicijalne terapije ponovno su uzeti uzorci tkiva s mjesta gdje je na početku uzet uzorak s dijagnozom parodontitisa. Kod pacijenata koji čine kontrolnu skupinu uzorci tkiva uzimali su se tijekom kirurškog zahvata kliničkoga produljenja krune zuba. Uzorci tkiva, svaki zasebno, pohranjivali su se u epruvete volumena 2,5 mL (Eppendorf, Njemačka) u kojima je bio stabilizacijski reagens RNAlater® (Qiagen, SAD). Prema uputama proizvođača uzorci su se tijekom prve noći pohranili na temperaturu od +4°C do +8°C, a nakon toga na temperaturu od -20°C do sljedećih koraka.

3.3. Homogenizacija uzoraka

Priprema uzoraka radila se u laboratoriju Centra za proteomska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Budući da veličine i mase uzoraka tkiva nisu bile jednake najprije se odredila težina svakog uzorka kako bi se dodavale jednake količine pufera za lizu i homogenizaciju stanica. Nakon što su uzorci izvagani uslijedila je homogenizacija uzoraka pomoću tekućeg dušika u keramičkom tarioniku.

Prije same homogenizacije uzoraka odredili smo način spajanja dva uzorka u jedan kako bi uzorci bili reprezentativniji (Tablica 1 i 2).

Tablica 1. Spajanje uzoraka ispitivane skupine

Ime spojenog uzorka	**Uzorci za spajanje**	**Ime spojenog uzorka**	**Uzorci za spajanje**
Pool 1A	Pacijent 1 i 2 zdravo mjesto	Pool 5E	Pacijent 3 i 4 zdravo mjesto
Pool 2B	Pacijent 1 i 2 mjesto s gingivitisom	Pool 6F	Pacijent 3 i 4 mjesto s gingivitisom
Pool 3C	Pacijent 1 i 2 mjesto s parodontitisom	Pool 7G	Pacijent 3 i 4 mjesto s parodontitisom
Pool 4D	Pacijent 1 i 2 mjesto s parodontitisom nakon terapije	Pool 8H	Pacijent 3 i 4 mjesto s parodontitisom nakon terapije

Tablica 2. Spajanje uzoraka kontrolne skupine

Ime spojenog uzorka	Uzorci za spajanje
Pool 9I	Pacijent 5 i 6 zdravo mjesto
Pool 10J	Pacijent 7 i 8 zdravo mjesto

Svaki uzorak tkiva izrezan je na manje komadiće, smrznut tekućim dušikom i usitnjen do praškaste konzistencije. Usitnjeni uzorci tkiva stavljeni su u epruvete volumena 2,5 mL prema rasporedu spajanja uzoraka. Pufer za lizu stanica (4% natrijev dodecil sulfat (SDS), 0.1 M dithiothretiol u 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6) dodan je usitnjenim uzorcima u istom odnosu pufera prema tkivu, grijan na 96°C 10 minuta i centrifugiran 15 minuta na 12000x g. Centrifuga supernatanta ponovljena je, ali ovaj put u trajanju od 30 minuta. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima procijenjena je prema UV-metodi na 280 nm. Doprinos nukleinskih kiselina umanjen je korištenjem apsorpcije na 260 nm (1.55 A280 – 0.76 A260 = ukupno proteina mg/mL) (169). Uzorci su izjednačeni krajnje čistom vodom do jednakih proteinskih koncentracija i pomiješani s SDS-PAGE puferom uzorka 4x (Life Technologies, SAD).

3.4. Gel elektroforeza

Separacija proteina elektroforezom napravljena je pomoću poliakrilamidnog gela (Nu PAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm X 12 well, Life Technologies, SAD) u X Cell Sure Mini-Cell (Invitrogen Corporation Carlsbad, SD) uređaju za elektroforezu na 180V i 120mA otprilike 45 minuta.

Uzorci su inkubirani na 70°C tijekom 3 minute te naneseni u jažice gela. U svaku jažicu naneseno je 75 μl uzorka. Za SDS elektroforezu upotrijebljen je MOPS SDS pufer (Life Technologies, SAD) pH 7,7 koji sadrži MOPS (3-N-morpholino propan-sulfonska kiselina), Tris bazu, natrijev dodecilsulfat, etilendiamin tetraoctenu kiselinu i deioniziranu vodu.

Nakon gel elektroforeze uslijedilo je bojenje i odbojavanje gelova u mikrovalnoj pećnici prema uputama proizvođača.

Prvi korak bio je ispiranje gelova. Gelovi su potopljeni u plastične posudice u 100 ml krajnje čiste vode, lagano prekriveni plastičnim poklopcem i grijani u mikrovalnoj pećnici na 1 000W 1 minutu. Nakon toga plastične posudice s gelovima stavljene su 2 minute na treskalicu, a potom je voda odstranjena. Ovaj korak napravljen je tri puta.

Drugi korak bilo je bojenje gelova SimplyBlue™ SafeStain bojom (Life Technologies, SAD). U svaku posudicu s gelom stavljeno je 20 ml boje te su gelovi grijani u mikrovalnoj pećnici 1 minutu na 1000W. Nakon toga posudice s gelovima izvađene su iz mikrovalne pećnice i stavljene na treskalicu kroz 5 minuta. Boja je potom odstranjena iz posudica, te je dodano 100 ml krajnje čiste vode, a posudice su ponovno stavljene na treskalicu 10 minuta.

Treći korak bilo je odbojavanje gelova. U plastične posudice stavljeno je po 20 ml 20% otopine natrijeva-klorida. U toj otopini gelovi su se odbojali za desetak minuta, te su pohranjeni u hladnjak na temperaturu od +4°C do +8°C do idućeg koraka.

3.5. Digestija u gelu

Postupak digestije u gelu radio se prema protokolu Shevchenka i sur. (170).

Svaki gel izrezan je na vrpce koje su dodatno podijeljene na 6 dijelova. Svaki od tih 6 dijelova dodatno je izrezan na kockice veličine od oko 2 mm^2. Usitnjeni komadići gela stavljeni su u epruvete volumena 2,5 ml, te je uslijedila digestija u gelu.

Komadići gela inkubirani su sa 1 ml acetonitrila (ACN) tijekom 10 minuta, zatim je izvađena tekućina. Nakon svakog daljnjeg dodavanja ACN-a iz epruveta je odstranjena sva tekućina kako bi u epruvetama ostali samo komadići gela. Disulfidni mostovi proteina koji se nalaze zarobljeni u gelu reducirani su i alkilirani na sljedeći način: komadićima gela najprije je dodano 300 µl ditiotreitola (DDT) te su uzorci stavljeni 30 minuta na temperaturu od 56°C. Komadićima je dodan 1 ml ACN-a te su ponovno inkubirani tijekom 10 minuta. Nakon toga u svaku je epruvetu dodano 300 µl jodoacetamida (IAA) te su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi 20 minuta, ali u zamračenom prostoru. U svaku epruvetu ponovno je dodan 1 ml ACN-a na 10 minuta. Komadići gela odbojani su pomoću 300 µl otopine 100mM amonij-bikarbonat/acetonitril u omjeru 1:1 v/v tijekom 30 minuta. Komadići gela ponovno su inkubirani u 1 ml ACN-a tijekom 10 minuta.

Tako pripremljeni proteini u gelu su enzimski pocijepani na sljedeći način. Komadići gela osušeni su u vakuum centrifugi (30 minuta, sobna temperatura) te su ponovno rehidrirani s 300 µl TRY (100 ng/ml tripsina u 9,4 ml 50 mM amonij-bikarbonat) u razdoblju od 30 minuta na 4°C. Nakon toga provjereno je treba li dodati još TRY kako bi se komadići gela u potpunosti rehidrirali. Poslije provjere uzorci su stavljeni na 4°C kroz daljnjih 90 minuta. Poslije digestije TRY tekućina iz epruveta izvađena je, a komadićima gela dodano je 300 µl 50mM amonij-bikarbonata te su uzorci inkubirani preko noći na 37°C.

Nakon inkubacije peptidi su ekstrahirani iz gelova te je u idućim koracima sva tekućina iz epruveta s komadićima gelova skupljana u nove epruvete od 2,5 ml. Najprije je dodano 100 µl pufera za ekstrakciju (30% ACN, 3% triflouroctena kiselina) na 20-30 minuta. Nakon toga se tekućina pokupila i premjestila u nove epruvete. U epruvete s komadićima gela dodano je 200 µl pufera za ekstrakciju (80% ACN, 0.5% octena kiselina) tijekom 20-30 minuta. Tekućina se ponovno pokupila i premjestila u epruvete. Na kraju se dodalo 200 µl ACN-a u razdoblju od 20-30 minuta te se tekućina ponovno pokupila. Prikupljena tekućina, tj. uzorci, stavljeni su na uparavanje u vakuumsku centrifugu (2 sata, sobna temperatura) kako bi ACN ispario i ostao čist uzorak. Ovim korakom završen je protokol digestije u gelu, peptidi u uzorcima su razmotani te slijedi pročišćavanje uzoraka za spektrometriju mase.

3.6. Mikropročišćavanje i odsoljavanje peptida

Peptidi iz uzoraka ukoncentrirani su, odsoljeni i pročišćeni uz pomoć nastavaka pod imenom *stop and go extraction tips (StageTips)* prema uputama Rappsilbera i sur. (171). Ukratko, „Stage tipsovi" napravljeni su od C18 Empore ekstrakcijskih diskova (3M, SAD), namočeni su metanolom i uravnoteženi otopinom A (0,5% CH3COOH). Ekstrahirani peptidi zakiseljeni su solucijom A i naneseni na uravnotežene tipsove. Soli su isprane otopinom A te su peptidi eluirani s tipsova otopinom B. Na kraju, ACN je uparen s odsoljenih i pročišćenih peptida centrifugiranjem u vakuumu.

3.7. Tekućinska kromatografija – Spektrometrija mase (LC-MS/MS)

Peptidi su razdvojeni i nakon toga izmjereni pomoću HPLC-sistema nano skale Easy-nLC (Proxeon Biosystems) (engl. *high pressure liquid chromatography*, HPLC) vezanog za LTQ-Orbitrap Discovery spektrometar mase (Thermo Scientific) kroz nano-elektrosprej ionizacijski izvor (Proxeon Biosystems) (172). Ukratko, peptidi su naneseni na C18 nano kolonu kućne izrade napravljene pakiranjem picofrit kapilare (New Objective, promjera 75 μm i promjera vrha od 10 μm) s kašom od Luna 3 μm C18(2) faze (Phenomenex) u metanolu. Nakon toga peptidi su eluirani s kolone primjenom linearnog gradijenta otopine B u otopini A (od 3% do 35% B otopine kroz 4.5 sati). Spektrometar mase mjerio je peptide u orbitrap analizatoru (10^6 iona pri rezoluciji 30 000) i istovremeno je fragmentirano top 20 peptida u linearnoj ionskoj stupini (3 000 iona) koristeći se dinamičkim isključenjem kako bi se spriječila ponavljajuća fragmentacija istaknutih peptida.

3.8. Analiza podataka i statistička obrada

Neobrađeni podaci procesuirani su MaxQuant programom razvijenom na Max Planck Institutu za biokemiju u Njemačkoj prema opisu Coxa i Manna (173). Liste iona za pretraživanje baze proteinskih sekvenci sastavljene su primjenom programa MaxQuant. Uniprotov kompletan humani proteomski set bio je pretražen koristeći se postavljenim parametrima MaxQuanta. Pogoci obrnutih sljedova omogućili su kontrolu broja lažno pozitivnih identifikacija. Konačna lista proteina dobivena je odbacivanjem proteina s visokim E bodom tako da je mjera lažnog otkrića (engl. *False Discovery Rate*, FDR) zadržana na oko 10%. Svim identificiranim proteinima dodijeljen je Uniprot pristupni broj.

Nakon obrade podataka u MaxQuant programu napravljena je statistička analiza varijance (ANOVA) uz Benjamini–Hochberg kontrolu višestrukog testiranja.

Analiza genske ontologije (GO) provedena je primjenom DAVID bioinformatičkog programa (174).

4. REZULTATI

4.1. Demografski podaci i klinički parametri

U istraživanju je sudjelovalo osam ispitanika. Četiri ispitanika (dvije žene, dva muškarca) s dijagnozom generaliziranog agresivnog parodontitisa činila su ispitivanu skupinu, a prosječna dob bila je 34,5 ± 3,7 godina (raspon 30-38 godina). Kontrolnu skupinu činila su četiri ispitanika (dvije žene, dva muškarca) bez kliničkih znakova parodontne bolesti, prosječna dob bila je 33,3 ± 3,8 godina (raspon 28-37 godina). Vrijednosti demografskih podataka i kliničkih parametara ispitanika prikazane su u Tablici 3.

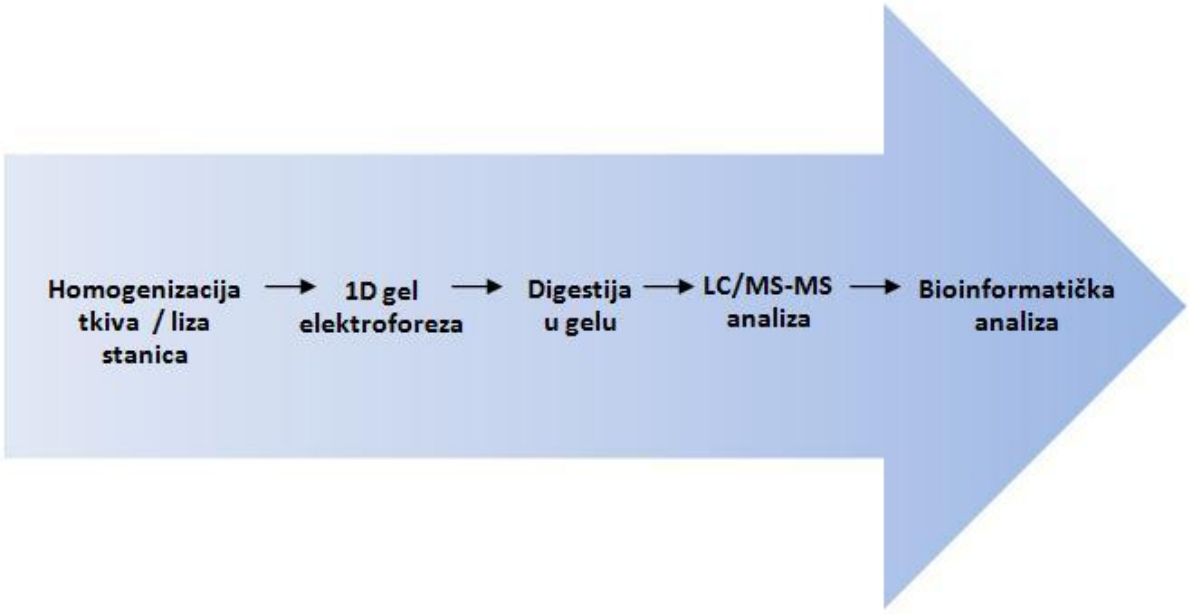
Tablica 3. Demografski podaci i klinički parametri ispitanika

	Agresivni parodontitis	**Kontrolna skupina**
Broj sudionika	4	4
Žene	2	2
Muškarci	2	2
Dob (prosjek ± sd)	34,5 ± 3,7	33,3 ± 3,9
Dob (raspon)	30 - 38	28 - 37
Dubina sondiranja (mm) (prosjek ± sd)	4,0 ± 2,2	1,9 ± 0,1
Dubina sondiranja poslije terapije (mm) (prosjek ± sd)	3,42 ± 1,83	-
Recesije (mm) (prosjek ± sd)	0,29 ± 0,29	0,06 ± 0,09
Recesije poslije terapije (mm) (prosjek ± sd)	0,53 ± 0,18	-
Krvarenje pri sondiranju (%) (prosjek ± sd)	85,7 ± 13,2	11,0 ± 8,1
Krvarenje pri sondiranju poslije terapije (%) (prosjek ± sd)	43,6 ± 19,3	-
Aproksimalni plak indeks (%) (prosjek ± sd)	45,8 ± 24,9	19,0 ± 2,6
Aproksimalni plak indeks poslije terapije (%) (prosjek ± sd)	16,1 ± 4,6	-

sd : standardna devijacija

4.2. Rezultati proteomskih analiza

Label-free kvantifikacija i LC-MS/MS analiza (engl. *Liquid chromatography–mass spectrometry,* LC-MS/MS) korištene su za identifikaciju i kvantifikaciju proteina u uzorcima epitelnog i vezivnog tkiva parodonta prikupljenih od zdravih ispitanika (kontrolna skupina) i ispitanika s dijagnozom generaliziranog agresivnog parodontitisa (ispitivana skupina). Takav pristup analize zajedno s pripremom uzoraka, 1D gel elektroforezom (jednodimenzionalan, 1D) i digestijom proteina u gelu, pokazao se kao učinkovita metoda za proteomsku analizu epitelnog i vezivnog tkiva parodonta (Slika 7).



Slika 7. Tijek eksperimentalnih procedura. Uzorci tkiva su homogenizirani, proteini iz lizata su odvojeni 1D gel elektroforezom te je nakon toga uslijedila digestija proteina u gelu tripsinom. Peptidi su zatim analizirani LC-MS/MS nakon čega su bioinformatički obrađeni.

4.2.1. Ukupan broj identificiranih proteina

Proteomskom analizom uzoraka identificirano je ukupno 3420 proteina. Nakon što su izbačeni reverzni hitovi (proteini iz baze obrnutih aminokiselinskih sekvenci koji služe za kontrolu FDR-a, engl. *False discovery rate*) broj proteina smanjio se na 3350. Među 3350 identificiranih proteina našli su se i proteini koji nisu kvantificirani (intenzitet im je bio jednak 0) te su morali biti uklonjeni. Time se došlo do broja od 3155 proteina.

Proteinima s jednom neizmjerenom vrijednosti LFQ kolone (engl. *Label-free quantification,* LFQ) ili više njih pristupilo se na sljedeći način. S popisa od 3155 proteina izbačeni su svi proteini s više od jedne LFQ kolone jednake vrijednosti 0, a oni koji su imali u samo jednoj LFQ koloni vrijednost 0 zamijenjeni su za srednju vrijednost pojedinog proteina. Time je ukupan broj proteina pao je na brojku 1564.

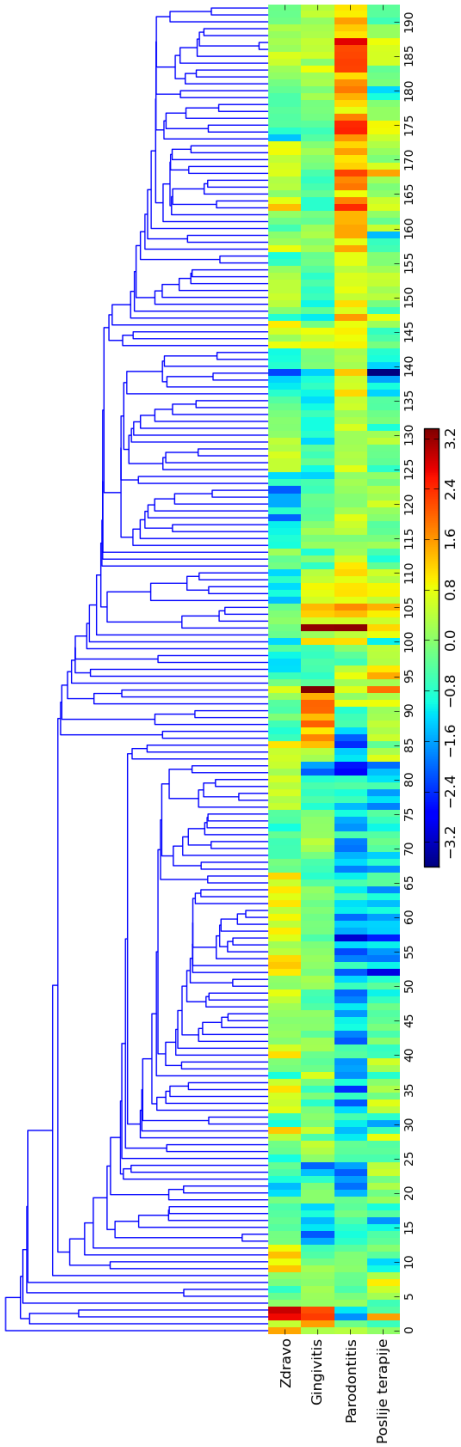
Statističkom analizom varijance (ANOVA) uz kontrolu zbog višestrukog testiranja došlo se do konačnog broja od 193 proteina uz FDR od 10%. Ti proteini pronađeni su u svim uzorcima, te su pokazali statistički značajne promjene u ekspresiji između kontrolne grupe i ispitivanih grupa.

4.2.2. Zastupljenost proteina u ispitivanim skupina

Slika 8 prikazuje usporedbu u promjenama zastupljenosti 193 proteina kod pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom i to zdravog mjesta, mjesta s gingivitisom, parodontitisom i mjesta s parodontitisom nakon terapije (ispitivane skupine) kada se usporede s kontrolnom skupinom. Ekspresija proteina je normalizirana prema kontrolnoj skupini. Proteini su grupirani i poredani metodom klasteriranja hijerarhijskom aglomerativnom metodom koristeći metriku kosinusne korelacije.

Vrijednosti promjena izražene su bojama te je vidljiva jasna razlika između obojenosti skupine parodontitis i ostale tri ispitivane skupine. Takva obojenost ukazuje da je u skupini parodontitis učestalost proteina s većim stupnjem promjene veća nego u ostalim ispitivanim skupinama. U ispitivanoj skupini parodontitis vidljiva je grupa proteina (od 20. do 90. mjesta, plavkasto obojeni) čija je zastupljenost manja nego u ostale tri ispitivane skupine (zdravo, gingivitis i poslije terapije), te grupa proteina (157. do 193. mjesto, narančasto-crveno obojeni) čija je zastupljenost veća nego u ostale tri ispitivane skupine (zdravo, gingivitis i poslije terapije). Također je zanimljivo pratiti stupanj promjene određenog proteina kroz ispitivane skupine. Tako npr. protein pod rednim brojem 139 na Slici 8 (*Oligosaccharyltransferase complex subunit*, redni broj 139) pokazuje slabiju ekspresiju u skupini zdravo i poslije terapije, a povećanu u parodontitisu. Protein pod rednim brojem 102 na slici 8 (Azurocidin) znatno je povećan u skupini gingivitis i parodontitis dok je u skupini zdravo i poslije terapije njegova ekspresija znatno manja. Zanimljiva je i ekspresija proteina pod redim brojem 84 i 85 (*Cadherin-1 i Transgelin-2*), oni su samo u skupini parodontitis smanjeni dok im je ekspresija u ostale tri ispitivane skupine povećana.

Ovo je samo kratak uvod u praćenje promjena proteina kroz ispitivane skupine. Tablice koje slijede dat će detaljnije informacije o stupnju promjene određenog proteina u ispitivanim skupinama.



Slika 8. Prikaz promjena zastupljenosti proteina ovisno o ispitivanoj skupini (zdravo, gingivitis, parodontitis, poslije terapije). Redovi predstavljaju individualan protein, a stupci ispitivanu skupinu. Stupanj promjene je predočen kao logaritam baze 2 omjera intenziteta ispitivanih skupina i kontrolne skupine. Raspon gradijenta boje toplinske mape prikazan je uz mapu. Spektar od zelene boje prema crvenoj označava longitudinalan porast u zastupljenosti, a spektar od zelene boje prema plavoj označava pad zastupljenosti.

4.2.3. Stupnjevi promjene proteina u ispitivanim skupinama

193 proteina pokazala su različitu zastupljenost u uzorcima ispitivanih skupina kada su se usporedili s kontrolnom skupinom. Popis proteina i stupnjevi promjena prikazani su u Tablici 4.

Svaki protein određen je Uniprot identifikacijskim brojem (Uniprot ID), MaxQuant brojem (MaxQuant ID) te proteinskim imenom. Stupac Redni br odnosi se na redni broj pod kojim se određeni protein može pronaći na Slici 8. Stupci pod imenom Stupanj promjene pokazuju u kojoj mjeri je određeni protein povećan ili smanjen (predznak "-") u ispitivanoj skupini (zdravo, gingivitis, parodontitis, poslije terapije) u odnosu na isti protein u kontrolnoj skupini.

Tablica 4. Popis 193 proteina (posloženi prema rednom broju) i stupnjevi promjene zastupljenosti proteina u ispitivanim skupinama. Predznak "-" označava da je određeni protein smanjen u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

				Stupanj promjene			
Uniprot ID	**Ime proteina**	**MaxQuant ID**	**Redni br**	**Zdravo**	**Gingivitis**	**Parodontitis**	**Poslije terapije**
H0YBZ2	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain (Fragment)	1535	0	2,83	1,23	1,32	1,04
P51531	Probable global transcription activator SNF2L2	2152	1	1,42	2,93	-1,18	-1,59
P06703	Protein S100-A6	1574	2	6,31	4,9	-3,29	2,93
Q13201	Multimerin-1	574	3	7,56	4,42	-2,21	-1,36
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	844	4	1,02	1,06	1,07	-1,53
Q06830	Peroxiredoxin-1	2398	5	-1,23	1,1	-1,1	1,17
Q9H2U2-2	Isoform 2 of Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	534	6	-1,68	1,17	-1,41	1,47
P62191	26S protease regulatory subunit 4	2264	7	-1,09	-1,00	-1,23	1,96
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	2192	8	1,01	1,07	-1,19	1,24
G3XAF6	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	980	9	2,41	1,18	-1,00	-1,99
P05452	Tetranectin	705	10	1,81	-1,15	-1,04	-2,34
O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	1416	11	2,46	-1,4	-1,06	-1,32
P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase	38	12	1,84	-1,53	-1,32	-1,01

	subunit beta-1						
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	896	13	-1,11	-2,92	-1,72	-1,29
P52630	Signal transducer and activator of transcription 2	954	14	-1,13	-4,32	-1,91	-1,4
P17050	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	1771	15	-1,34	-2,2	-1,71	-1,99
Q12768	WASH complex subunit strumpellin	2427	16	-1,26	-2,71	-1,43	-3,29
P29590	Protein PML	1921	17	-1,34	-1,89	-1,11	-1,35
P50453	Serpin B9	2141	18	-1,42	-2,38	-1,3	-1,92
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	2118	19	-1,11	-1,0	-1,22	1,08
P10768	S-formylglutathione hydrolase	1663	20	-2,26	1,01	-2,73	-1,16
Q12959-2	Isoform 2 of Disks large homolog 1	2440	21	-2,68	-1,07	-3,89	1,23
Q14134	Tripartite motif-containing protein 29	2501	22	-1,88	-1,72	-3,15	-1,13
Q6IBS0	Twinfilin-2	2708	23	-1,41	-2,64	-4,27	1,45
Q9BWD1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	3042	24	-1,25	-4,07	-3,03	1,34
P51149	Ras-related protein Rab-7a	2148	25	-1,96	1,02	-1,45	-1,44
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	2097	26	-1,23	1,27	-1,3	-1,3
P00734	Prothrombin	1436	27	-1,17	1,4	-1,24	-1,37
E7ESP4	Integrin alpha-2	554	28	1,3	-1,42	-2,14	1,75
J3KN62	Cadherin-13	1127	29	2,39	1,43	-2,7	-1,55
G8JLA8	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	998	30	-1,93	-1,08	-2,11	-3,04
P50148	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	2133	31	-1,57	1,01	-1,47	-1,76
B7Z468	Calpastatin	301	32	1,67	-1,09	-2,31	1,32
Q96FQ6	Protein S100-A16	2953	33	1,47	-1,73	-4,28	1,67
P09525	Annexin A4	1638	34	1,54	-1,07	-1,64	-1,15
O95274	Ly6/PLAUR domain-containing protein 3	1390	35	2,1	-1,63	-5,32	1,23
Q99729-2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	505	36	1,47	-1,09	-1,87	-1,01
H0YK83	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	1040	37	-1,92	1,59	-3,31	-1,78
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	2460	38	-1,12	-1,18	-3,05	1,17
P32455	Interferon-induced guanylate-binding protein 1	1971	39	-1,05	-1,3	-3,22	1,53
P61981	14-3-3 protein gamma	2260	40	2,12	-1,2	-1,35	-1,55
P29622	Kallistatin	1922	41	1,56	1,16	-1,44	-1,64
Q9ULZ3	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	3256	42	-1,01	1,15	-4,32	1,01
O14786	Neuropilin-1	636	43	1,09	-1,3	-3,53	-1,46
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein	3162	44	1,02	-1,0	-1,96	-1,09

	3A						
Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	306	45	-1,01	-1,02	-2,07	-1,28
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A	1642	46	1,06	1,04	-3,19	-1,37
O75718	Cartilage-associated protein	1350	47	1,15	-1,4	-2,15	-1,18
P01040	Cystatin-A	1452	48	1,39	-1,57	-3,53	-1,63
P35052	Glypican-1	1984	49	1,75	-1,47	-4,05	-2,07
P35232	Prohibitin	1987	50	1,01	1,11	-1,6	-1,3
Q9Y224	UPF0568 protein C14orf166	3277	51	1,04	1,18	-2,37	-1,78
P20774	Mimecan	1816	52	2,02	-1,1	-4,34	-7,92
P36955	Pigment epithelium-derived factor	2017	53	2,39	1,02	-1,57	-2,06
P51884	Lumican	2167	54	2,19	1,09	-3,56	-3,74
E9PIE3	Protein kinase C delta-binding protein	712	55	1,33	-1,0	-4,62	-3,22
P08758	Annexin A5	1629	56	1,15	-1,07	-2,32	-2,13
P51888	Prolargin	2168	57	1,64	-1,44	-8,57	-5,74
P07585	Decorin	1594	58	1,98	-1,11	-2,89	-2,45
P02545	Prelamin-A/C	1496	59	1,36	-1,09	-2,43	-2,4
P21810	Biglycan	51	60	1,86	-1,16	-3,91	-3,06
P39060	Collagen alpha-1(XVIII) chain	2031	61	1,35	-1,05	-2,13	-1,93
Q8IUX7	Adipocyte enhancer-binding protein 1	2800	62	2,05	-1,19	-2,28	-2,65
P08670	Vimentin	1624	63	1,65	-1,02	-1,43	-1,88
Q9Y6C2	EMILIN-1	3338	64	2,02	1,06	-2,14	-3,36
P07355-2	Isoform 2 of Annexin A2	1591	65	1,46	-1,35	-1,44	-1,3
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	2315	66	2,2	-1,77	-2,1	-1,35
H3BMK9	Tryptase alpha/beta-1	913	67	-1,21	-1,53	-3,57	-3,28
O94826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	1374	68	-1,13	-1,44	-2,32	-1,73
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	2524	69	-1,52	-1,11	-2,78	-2,48
P39019	40S ribosomal protein S19	2028	70	-1,5	1,18	-3,77	-1,34
Q5T9B7	Adenylate kinase H	1435	71	-1,53	1,35	-3,61	-1,18
Q14112	Nidogen-2	2499	72	-1,24	1,06	-1,44	-1,37
P08708	40S ribosomal protein S17	1626	73	-1,95	1,04	-3,28	-2,05
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	1426	74	-1,4	1,02	-2,91	-1,58
Q9NP72	Ras-related protein Rab-18	3127	75	-1,35	-1,07	-1,94	-1,35
H3BP20	Beta-hexosaminidase subunit alpha	1059	76	1,44	-1,8	-2,71	-3,61
Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	2405	77	1,25	-1,42	-1,55	-2,24
P36269-3	Isoform 3 of Gamma-glutamyltransferase 5	2006	78	1,54	-1,66	-1,9	-3,13
Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	2761	79	1,3	-1,46	-1,37	-1,45
Q9UNH7	Sorting nexin-6	185	80	1,55	-1,79	-1,64	-2,25
O75531	Barrier-to-autointegration factor	1340	81	1,17	-4,22	-7,05	-2,66

B7Z6H3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	308	82	1,43	-3,02	-5,99	-3,93
P12830	Cadherin-1	1706	83	1,52	1,18	-2,2	1,63
P37802	Transgelin-2	2022	84	1,43	1,32	-2,47	1,22
P02652	Apolipoprotein A-II	1500	85	2,06	2,48	-5,29	-1,28
P30043	Flavin reductase (NADPH)	1929	86	-1,58	3,36	-4,17	1,45
P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	296	87	-1,83	2,0	-2,33	1,23
P00918	Carbonic anhydrase 2	1443	88	-1,54	4,03	-1,44	1,39
P32119	Peroxiredoxin-2	1969	89	-1,06	2,52	-1,52	1,18
P00915	Carbonic anhydrase 1	1442	90	-1,42	3,87	-1,79	1,1
P02671	Fibrinogen alpha chain	1501	91	-1,35	3,94	1,76	1,79
P69905	Hemoglobin subunit alpha	2326	92	1,11	2,73	1,04	1,22
P02730	Band 3 anion transport protein	1503	93	1,65	10,25	1,63	3,66
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	1434	94	-1,1	-1,31	1,15	1,16
Q9UBG3	Cornulin	3208	95	-1,61	-1,69	1,77	2,77
O14936	Peripheral plasma membrane protein CASK	919	96	-2,29	-1,49	1,32	2,01
P07384	Calpain-1 catalytic subunit	1592	97	-2,33	-1,41	-1,53	1,25
Q6IN85	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	976	98	-2,05	-1,64	-1,29	1,3
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1356	99	-1,34	-1,54	-1,0	1,34
Q9NYL4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	3172	100	-2,38	2,18	2,12	-2,11
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	206	101	-1,19	1,11	1,35	1,76
P20160	Azurocidin	1806	102	-1,14	9,39	9,59	2,2
P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	1871	103	1,03	1,48	1,51	1,47
P00450	Ceruloplasmin	1428	104	-1,05	2,29	2,54	1,95
P26373	60S ribosomal protein L13	1888	105	-1,23	2,59	3,28	2,65
P83731	60S ribosomal protein L24	400	106	-2,62	1,51	1,69	1,38
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	647	107	-1,91	1,69	2,1	1,89
J3QQ67	60S ribosomal protein L18 (Fragment)	891	108	-2,34	1,87	2,04	1,86
P62241	40S ribosomal protein S8	2266	109	-1,71	1,41	1,71	1,27
Q99459	Cell division cycle 5-like protein	2992	110	-2,35	1,31	2,21	1,52
Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	2597	111	-1,14	-1,67	2,03	-1,26
P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	1805	112	-1,26	-1,04	1,52	-1,89
H7C2I1	Protein arginine N-methyltransferase 1	724	113	1,14	-1,85	1,14	-1,48
P62854	40S ribosomal protein S26	2292	114	-1,92	1,08	1,08	1,14

P20618	Proteasome subunit beta type-1	1811	115	-1,85	-1,07	-1,07	-1,1
B5ME19	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	278	116	-2,05	1,18	1,33	-1,28
A8MUS3	60S ribosomal protein L23a	77	117	-2,13	-1,03	1,47	-1,34
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome	1014	118	-4,07	-1,29	1,68	-1,02
Q15046	Lysine--tRNA ligase	2540	119	-1,76	-1,34	1,16	1,09
E7EPK6	40S ribosomal protein S24	577	120	-2,92	-1,25	-1,03	1,54
Q14008-3	Isoform 3 of Cytoskeleton-associated protein 5	2496	121	-2,88	-1,21	-1,01	1,14
P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	1662	122	-4,22	-1,57	1,09	1,25
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	1710	123	-1,62	-1,47	1,17	-1,13
Q13620	Cullin-4B	2483	124	-2,33	-2,4	1,04	1,05
Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	2759	125	1,41	-1,99	1,66	-1,72
Q9H2M9	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	3087	126	1,42	-1,22	1,2	-1,26
Q14240-2	Isoform 2 of Eukaryotic initiation factor 4A-II	585	127	1,59	-1,54	1,26	-1,2
P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	1946	128	1,26	-1,32	1,17	-1,19
O95470	Sphingosine-1-phosphate lyase 1	1399	129	1,39	-2,35	1,11	1,39
F5H098	Malate dehydrogenase B	806	130	1,01	-1,75	1,11	1,14
Q16537	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	326	131	-1,03	-1,96	1,58	-1,88
Q92797	Symplekin	2912	132	-1,01	-1,96	1,23	-1,09
P68363	Tubulin alpha-1B chain	2319	133	-1,1	-1,57	1,11	-1,18
E5RJD8	Tubulin-specific chaperone A	549	134	-1,21	-2,01	1,49	-1,38
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	2726	135	-1,36	-2,33	1,41	-1,35
Q9UBV2	Protein sel-1 homolog 1	3214	136	-1,75	-2,03	2,22	-2,43
O76094	Signal recognition particle 72 kDa protein	1371	137	-2,17	-1,65	1,52	-1,93
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	135	138	-2,4	-1,87	1,46	-3,0
Q9NRP0	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC	3145	139	-4,77	-2,45	2,39	-12,03
J3KN10	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	1123	140	-1,79	-1,06	1,16	-2,41
Q00341	Vigilin	2346	141	-1,92	-1,12	1,26	-1,94
J3KNB4	Antibacterial protein FALL-39	1130	142	-2,01	-1,08	1,18	-1,77
O00291	Huntingtin-interacting protein 1	602	143	1,76	1,89	1,89	-1,1
P0C0S5	Histone H2A.Z	1650	144	1,11	1,44	1,79	-1,42
P18085	ADP-ribosylation factor 4	401	145	1,55	1,79	1,95	-1,64

O14907	Tax1-binding protein 3	1225	146	1,97	-1,13	1,75	1,12
P01625	Ig kappa chain V-IV region Len	1468	147	-1,82	-2,16	3,0	1,77
Q13315	Serine-protein kinase ATM	2461	148	-1,01	-1,26	1,6	-1,57
Q9Y3B4	Pre-mRNA branch site protein p14	3300	149	1,32	-2,02	2,15	-1,12
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	2359	150	1,46	-1,55	1,41	1,34
Q9Y6Y8	SEC23-interacting protein	810	151	1,35	-1,69	1,74	1,17
E9PEN8	Exportin-7	678	152	1,36	-1,44	1,57	1,41
Q02543	60S ribosomal protein L18a	2374	153	1,27	-1,71	1,62	1,47
P51812	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	168	154	1,08	-1,36	1,34	1,15
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2109	155	-1,65	-1,15	1,69	-1,06
Q92616	Translational activator GCN1	2905	156	-1,87	-1,23	1,72	-1,03
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	416	157	1,76	1,17	2,84	-1,52
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	1562	158	1,12	-1,02	1,68	-1,62
Q3SY69	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	2616	159	1,01	1,23	2,83	-2,7
Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase	2970	160	-1,51	1,13	2,81	1,43
O75955	Flotillin-1	1366	161	-1,15	-1,25	2,63	-1,22
P99999	Cytochrome c	381	162	1,06	-1,12	2,61	1,05
P01834	Ig kappa chain C region	1485	163	2,51	-1,76	5,32	1,62
Q92608	Dedicator of cytokinesis protein 2	2904	164	1,69	-1,74	3,41	1,46
J3KN16	Protein KIAA0368	1124	165	1,01	-1,26	1,81	1,03
Q06210	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	2395	166	1,3	-1,47	3,59	-1,07
O95834-2	Isoform 2 of Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	1415	167	1,25	-1,66	3,28	1,14
P04839	Cytochrome b-245 heavy chain	1545	168	1,64	-1,44	4,73	2,9
P57740	Nuclear pore complex protein Nup107	2222	169	1,55	-1,12	2,27	1,59
P61970	Nuclear transport factor 2	2257	170	1,37	-1,03	2,04	-1,07
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2198	171	1,85	1,18	2,92	1,09
A3KMH1	von Willebrand factor A domain-containing protein 8	21	172	1,72	-1,03	2,23	1,25
Q86UE4	Protein LYRIC	2782	173	-2,59	-1,36	3,13	1,47
P01861	Ig gamma-4 chain C region	1489	174	-1,74	-1,55	5,54	1,82
P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	2144	175	-1,34	-1,32	5,32	1,88
P62805	Histone H4	2287	176	-1,37	-1,15	3,42	1,07
P14550	Alcohol dehydrogenase	1735	177	-1,33	-1,09	1,71	1,06

	[NADP(+)]						
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	2122	178	-1,44	-1,11	2,17	-1,03
P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	1895	179	-1,43	1,19	2,68	-1,93
Q8N5K1	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	2832	180	-1,25	-1,07	3,57	-2,39
Q16706	Alpha-mannosidase 2	2591	181	-1,13	1,2	3,16	-1,07
P02766	Transthyretin	1512	182	1,04	1,15	2,15	-1,16
P29762	Cellular retinoic acid-binding protein 1	1924	183	1,12	1,79	4,69	-1,24
P18077	60S ribosomal protein L35a	1785	184	1,46	-1,02	4,75	1,56
P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	2299	185	1,6	1,51	4,61	1,54
P01620	Ig kappa chain V-III region SIE	1466	186	1,11	1,35	4,54	1,58
P41218	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	2045	187	1,19	1,42	6,72	1,81
Q9UKK3	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	3249	188	1,07	1,23	2,06	1,08
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	1190	189	1,23	1,19	2,35	1,08
B5MCQ5	Protein disulfide-isomerase A6	272	190	-1,16	1,07	2,95	-1,54
P62244	40S ribosomal protein S15a	1115	191	-1,2	1,4	1,95	-1,33
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	1332	192	-1,18	1,27	2,07	-1,3

U Tablici 4. vidljivi su iznosi stupnjeva promjene 193 proteina u određenoj ispitivanoj skupini, a izdvojeni su sljedeći.

U zdravoj ispitivanoj skupini proteini vrijedni razmatranja su *Mimecan* (P20774, Redni br 52), *Decorin* (P07585, Redni br 146), *14-3-3 protein gamma* (P61981, Redni br 40), *Vimentin* (P08670, Redni br 63), *Annexin A4* (P09525, Redni br 34), *Isoform 2 of Annexin A2* (P07355-2, Redni br 65), *Annexin A5* (P08758, Redni br 56) i *Cystatin-A* (P01040, Redni br 48). Kada se pogleda njihov stupanj promjene, vidljivo je da je ekspresija tih proteina u zdravoj skupini pojačana, dok je u skupinama gingivitis, parodontitis i poslije terapije snižena. Nasuprot tome, protein *Ceruloplasmin* (P00450, Redni br 104) pokazuje smanjenu ekspresiju u zdravoj u odnosu na ostale tri skupine.

Band 3 anion transport protein (P02730, Redni br 93), *Nidogen-2* (Q14112, Redni br 73) i *Prothrombin* (P00734, Redni br 27) su proteini čija je ekspresija povišena u gingivitisu. Njihova ekspresija u ostalim ispitivanim skupinama je snižena te bi zbog te činjenice mogli

biti proteini koji obilježavaju ovo stanje. *Dedicator of cytokinesis protein 2* (Q92608, Redni br 164) također bi mogao biti zanimljiv budući da je samo u stanju gingivitisa njegova ekspresija smanjena.

U ispitivanoj skupini parodontitis mnogi proteini su pokazali zanimljive promjene u ekspresiji, a izdvojeni su sljedeći. Protein S100-A6 (P06703, Redni br 2) i *Cadherin-1* (P12830, Redni br 83) sniženi su samo u stanju parodontitisa, dok je *Cadherin-13* (J3KN62, Redni br 29) snižen i u stanju poslije terapije, a protein S100-A16 (Q96FQ6, Redni br 33) u stanju parodontitisa i gingivitisa. *Annexin A5* (P08758, Redni br 56) pokazuje najnižu ekspresiju u stanju parodontitisa dok protein *Azurocidin* (P20160, Redni br 102) pokazuje najjaču ekspresiju u parodontitisu, ali je njegova ekspresija u gingivitisu također vrlo jaka. Protein *Vigilin* (Q00341, Redni br 141) povišen je samo u parodontitisu, a proteini *Histon H4* (P62805, Redni br 176) i *Protein LYRIC* (Q86UE4, Redni br 173) u parodontitisu i poslije terapije.

Za stanje poslije terapije istaknuti su sljedeći proteini. Protein S100-A16 (Q96FQ6, Redni br 33) mogao bi biti zanimljiv za ovo stanje jer je njegova ekspresija povišena u zdravome, snižena u gingivitisu i parodontitisu, a onda opet povišena u stanju poslije terapije. Protein imena *Oligosaccharyltransferase complex subunit* (Q9NRP0, Redni br 139) pokazuje iznimno nisku ekspresiju u stanju poslije terapije, snižen je također u zdravoj skupini i gingivitisu, dok je povišen u parodontitisu. I završno, proteini čija je ekspresija povišena jedino u stanju poslije terapije su *Twinfilin-2* (Q6IBS0, Redni br 23), *Calpain-1 catalytic subunit* (P07384, Redni br 97), *Isoform 2 of Disks large homolog 1* (Q12959-2, Redni br 21) i *Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase* (Q12797, Redni br 4).

4.2.4. Usporedba kontrolne skupine i zdravog mjesta ispitivane skupine

Usporedba zastupljenosti proteina zdravog mjesta kontrolne skupine i zdravog mjesta ispitivane skupine. Rezultati usporedbe prikazani su u Tablici 5. Svaki protein određen je Uniprot identifikacijskim brojem (Uniprot ID), MaxQuant brojem (MaxQuant ID) te proteinskim imenom. Stupac Redni br odnosi se na redni broj pod kojim se određeni protein može pronaći na Slici 8. Stupac pod imenom Stupanj promjene u zdravom mjestu ispitivane skupine pokazuje koliko je puta određeni protein povećan ili smanjen (predznak "-") u zdravom uzorku ispitivane skupine u odnosu na isti protein kontrolne skupine.

Tablica 5. Prikaz proteina prema stupnju promjene u zdravom mjestu ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu. Predznak "-" označava da je određeni protein smanjen u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

Uniprot ID	Ime proteina	MaxQuant ID	Redni br	Stupanj promjene u zdravom mjestu ispitivane skupine
Q13201	Multimerin-1	574	3	7,56
P06703	Protein S100-A6	1574	2	6,31
H0YBZ2	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain (Fragment)	1535	0	2,83
P01834	Ig kappa chain C region	1485	163	2,51
O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	1416	11	2,46
G3XAF6	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	980	9	2,41
J3KN62	Cadherin-13	1127	29	2,39
P36955	Pigment epithelium-derived factor	2017	53	2,39
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	2315	66	2,20
P51884	Lumican	2167	54	2,19
P61981	14-3-3 protein gamma	2260	40	2,12
O95274	Ly6/PLAUR domain-containing protein 3	1390	35	2,10
P02652	Apolipoprotein A-II	1500	85	2,06
Q8IUX7	Adipocyte enhancer-binding protein 1	2800	62	2,05
P20774	Mimecan	1816	52	2,02
Q9Y6C2	EMILIN-1	3338	64	2,02
P07585	Decorin	1594	58	1,98
O14907	Tax1-binding protein 3	1225	146	1,97
P21810	Biglycan	51	60	1,86
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2198	171	1,85
P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	38	12	1,84
P05452	Tetranectin	705	10	1,81
O00291	Huntingtin-interacting protein 1	602	143	1,76
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	416	157	1,76
P35052	Glypican-1	1984	49	1,75
A3KMH1	von Willebrand factor A domain-containing protein 8	21	172	1,72

Q92608	Dedicator of cytokinesis protein 2	2904	164	1,69
B7Z468	Calpastatin	301	32	1,67
P08670	Vimentin	1624	63	1,65
P02730	Band 3 anion transport protein	1503	93	1,65
P51888	Prolargin	2168	57	1,64
P04839	Cytochrome b-245 heavy chain	1545	168	1,64
P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	2299	185	1,60
Q14240-2	Isoform 2 of Eukaryotic initiation factor 4A-II	585	127	1,59
P29622	Kallistatin	1922	41	1,56
P18085	ADP-ribosylation factor 4	401	145	1,55
Q9UNH7	Sorting nexin-6	185	80	1,55
P57740	Nuclear pore complex protein Nup107	2222	169	1,55
P36269-3	Isoform 3 of Gamma-glutamyltransferase 5	2006	78	1,54
P09525	Annexin A4	1638	34	1,54
P12830	Cadherin-1	1706	83	1,52
Q96FQ6	Protein S100-A16	2953	33	1,47
Q99729-2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	505	36	1,47
P07355-2	Isoform 2 of Annexin A2	1591	65	1,46
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	2359	150	1,46
P18077	60S ribosomal protein L35a	1785	184	1,46
H3BP20	Beta-hexosaminidase subunit alpha	1059	76	1,44
P37802	Transgelin-2	2022	84	1,43
B7Z6H3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	308	82	1,43
Q9H2M9	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	3087	126	1,42
P51531	Probable global transcription activator SNF2L2	2152	1	1,42
Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	2759	125	1,41
P01040	Cystatin-A	1452	48	1,39
O95470	Sphingosine-1-phosphate lyase 1	1399	129	1,39
P61970	Nuclear transport factor 2	2257	170	1,37
E9PEN8	Exportin-7	678	152	1,36
P02545	Prelamin-A/C	1496	59	1,36
Q9Y6Y8	SEC23-interacting protein	810	151	1,35
P39060	Collagen alpha-1(XVIII) chain	2031	61	1,35
E9PIE3	Protein kinase C delta-binding protein	712	55	1,33
Q9Y3B4	Pre-mRNA branch site protein p14	3300	149	1,32
Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	2761	79	1,30
E7ESP4	Integrin alpha-2	554	28	1,30
Q06210	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	2395	166	1,30
Q02543	60S ribosomal protein L18a	2374	153	1,27
P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	1946	128	1,26
O95834-2	Isoform 2 of Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	1415	167	1,25
Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	2405	77	1,25
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	1190	189	1,23
P41218	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	2045	187	1,19
O75531	Barrier-to-autointegration factor	1340	81	1,17
P08758	Annexin A5	1629	56	1,15
O75718	Cartilage-associated protein	1350	47	1,15
H7C2I1	Protein arginine N-methyltransferase 1	724	113	1,14
P29762	Cellular retinoic acid-binding protein 1	1924	183	1,12
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	1562	158	1,12
P0C0S5	Histone H2A.Z	1650	144	1,11
P01620	Ig kappa chain V-III region SIE	1466	186	1,11
P69905	Hemoglobin subunit alpha	2326	92	1,11
O14786	Neuropilin-1	636	43	1,09
P51812	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	168	154	1,08

Q9UKK3	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	3249	188	1,07
P99999	Cytochrome c	381	162	1,06
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A	1642	46	1,06
Q9Y224	UPF0568 protein C14orf166	3277	51	1,04
P02766	Transthyretin	1512	182	1,04
P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	1871	103	1,03
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	3162	44	1,02
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	844	4	1,02
F5H098	Malate dehydrogenase B	806	130	1,01
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	2192	8	1,01
Q3SY69	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	2616	159	1,01
P35232	Prohibitin	1987	50	1,01
J3KN16	Protein KIAA0368	1124	165	1,01
Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	306	45	-1,01
Q92797	Symplekin	2912	132	-1,01
Q13315	Serine-protein kinase ATM	2461	148	-1,01
Q9ULZ3	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	3256	42	-1,01
Q16537	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	326	131	-1,03
P32455	Interferon-induced guanylate-binding protein 1	1971	39	-1,05
P00450	Ceruloplasmin	1428	104	-1,05
P32119	Peroxiredoxin-2	1969	89	-1,06
P62191	26S protease regulatory subunit 4	2264	7	-1,09
P68363	Tubulin alpha-1B chain	2319	133	-1,10
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	1434	94	-1,10
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	2118	19	-1,11
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	896	13	-1,11
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	2460	38	-1,12
O94826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	1374	68	-1,13
P52630	Signal transducer and activator of transcription 2	954	14	-1,13
Q16706	Alpha-mannosidase 2	2591	181	-1,13
P20160	Azurocidin	1806	102	-1,14
Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	2597	111	-1,14
O75955	Flotillin-1	1366	161	-1,15
B5MCQ5	Protein disulfide-isomerase A6	272	190	-1,16
P00734	Prothrombin	1436	27	-1,17
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	1332	192	-1,18
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	206	101	-1,19
P62244	40S ribosomal protein S15a	1115	191	-1,20
H3BMK9	Tryptase alpha/beta-1	913	67	-1,21
E5RJD8	Tubulin-specific chaperone A	549	134	-1,21
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	2097	26	-1,23
P26373	60S ribosomal protein L13	1888	105	-1,23
Q06830	Peroxiredoxin-1	2398	5	-1,23
Q14112	Nidogen-2	2499	72	-1,24
Q8N5K1	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	2832	180	-1,25
Q9BWD1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	3042	24	-1,25
Q12768	WASH complex subunit strumpellin	2427	16	-1,26
P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	1805	112	-1,26
P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	1735	177	-1,33
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1356	99	-1,34
P17050	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	1771	15	-1,34
P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	2144	175	-1,34
P29590	Protein PML	1921	17	-1,34
P02671	Fibrinogen alpha chain	1501	91	-1,35

Q9NP72	Ras-related protein Rab-18	3127	75	-1,35
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	2726	135	-1,36
P62805	Histone H4	2287	176	-1,37
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	1426	74	-1,40
Q6IBS0	Twinfilin-2	2708	23	-1,41
P50453	Serpin B9	2141	18	-1,42
P00915	Carbonic anhydrase 1	1442	90	-1,42
P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	1895	179	-1,43
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	2122	178	-1,44
P39019	40S ribosomal protein S19	2028	70	-1,50
Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase	2970	160	-1,51
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	2524	69	-1,52
Q5T9B7	Adenylate kinase H	1435	71	-1,53
P00918	Carbonic anhydrase 2	1443	88	-1,54
P50148	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	2133	31	-1,57
P30043	Flavin reductase (NADPH)	1929	86	-1,58
Q9UBG3	Cornulin	3208	95	-1,61
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	1710	123	-1,62
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2109	155	-1,65
Q9H2U2-2	Isoform 2 of Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	534	6	-1,68
P62241	40S ribosomal protein S8	2266	109	-1,71
P01861	Ig gamma-4 chain C region	1489	174	-1,74
Q9UBV2	Protein sel-1 homolog 1	3214	136	-1,75
Q15046	Lysine--tRNA ligase	2540	119	-1,76
J3KN10	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	1123	140	-1,79
P01625	Ig kappa chain V-IV region Len	1468	147	-1,82
P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	296	87	-1,83
P20618	Proteasome subunit beta type-1	1811	115	-1,85
Q92616	Translational activator GCN1	2905	156	-1,87
Q14134	Tripartite motif-containing protein 29	2501	22	-1,88
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	647	107	-1,91
P62854	40S ribosomal protein S26	2292	114	-1,92
Q00341	Vigilin	2346	141	-1,92
H0YK83	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	1040	37	-1,92
G8JLA8	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	998	30	-1,93
P08708	40S ribosomal protein S17	1626	73	-1,95
P51149	Ras-related protein Rab-7a	2148	25	-1,96
J3KNB4	Antibacterial protein FALL-39	1130	142	-2,01
B5ME19	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	278	116	-2,05
Q6IN85	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	976	98	-2,05
A8MUS3	60S ribosomal protein L23a	77	117	-2,13
O76094	Signal recognition particle 72 kDa protein	1371	137	-2,17
P10768	S-formylglutathione hydrolase	1663	20	-2,26
O14936	Peripheral plasma membrane protein CASK	919	96	-2,29
P07384	Calpain-1 catalytic subunit	1592	97	-2,33
Q13620	Cullin-4B	2483	124	-2,33
J3QQ67	60S ribosomal protein L18 (Fragment)	891	108	-2,34
Q99459	Cell division cycle 5-like protein	2992	110	-2,35
Q9NYL4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	3172	100	-2,38
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	135	138	-2,40
Q86UE4	Protein LYRIC	2782	173	-2,59
P83731	60S ribosomal protein L24	400	106	-2,62
Q12959-2	Isoform 2 of Disks large homolog 1	2440	21	-2,68
Q14008-3	Isoform 3 of Cytoskeleton-associated protein 5	2496	121	-2,88
E7EPK6	40S ribosomal protein S24	577	120	-2,92

P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome	1014	118	-4,07
P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	1662	122	-4,22
Q9NRP0	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC	3145	139	-4,77

10 proteina koji pokazuju najveći stupanj promjene između ove dvije skupine su:

1. *Multimerin-1* (Q13201), 7,56
2. *Protein S100-A6* (P06703), 6,31
3. *HLA class II histocompatibility antigen gamma chain* (H0YBZ2), 2,83
4. *Ig kappa chain C region* (P01834), 2,51
5. *N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2* (O95865), 2,46
6. *Cytoskeleton-associated protein 5* (Q14008-3), -2,88
7. *40S ribosomal protein S24* (E7EPK6), -2,92
8. *RNA-binding motif protein, X chromosome* (P38159), -4,07
9. *cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit* (P10644), -4,22
10. *Oligosaccharyltransferase complex subunit* (Q9NRP0), -4,77

Decimalni broj iza zagrade pokazuje koliko je puta određeni protein povećan ili smanjen (predznak "-") u zdravom mjestu ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.2.5. Usporedba kontrolne skupine i mjesta s gingivitisom ispitivane skupine

Usporedba zastupljenosti proteina zdravog mjesta kontrolne skupine i mjesta s gingivitisom ispitivane skupine. Rezultati usporedbe prikazani su u Tablici 6. Svaki protein određen je Uniprot identifikacijskim brojem (Uniprot ID), MaxQuant brojem (MaxQuant ID) te proteinskim imenom. Stupac Redni br odnosi se na redni broj pod kojim se određeni protein može pronaći na Slici 8. Stupac pod imenom Stupanj promjene u mjestu s gingivitisom ispitivane skupine pokazuje koliko je puta određeni protein povećan ili smanjen (predznak "-") u uzorku mjesta s gingivitisom ispitivane skupine u odnosu na isti protein u kontrolnoj skupini.

Tablica 6. Prikaz proteina prema stupnju promjene u mjestu s gingivitisom ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu. Predznak "-" označava da je određeni protein smanjen u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

Uniprot ID	Ime proteina	MaxQuant ID	Redni br	Stupanj promjene u mjestu s gingivitisom ispitivane skupine
P02730	Band 3 anion transport protein	1503	93	10,25
P20160	Azurocidin	1806	102	9,39
P06703	Protein S100-A6	1574	2	4,90
Q13201	Multimerin-1	574	3	4,42
P00918	Carbonic anhydrase 2	1443	88	4,03
P02671	Fibrinogen alpha chain	1501	91	3,94
P00915	Carbonic anhydrase 1	1442	90	3,87
P30043	Flavin reductase (NADPH)	1929	86	3,36
P51531	Probable global transcription activator SNF2L2	2152	1	2,93
P69905	Hemoglobin subunit alpha	2326	92	2,73
P26373	60S ribosomal protein L13	1888	105	2,59
P32119	Peroxiredoxin-2	1969	89	2,52
P02652	Apolipoprotein A-II	1500	85	2,48
P00450	Ceruloplasmin	1428	104	2,29
Q9NYL4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	3172	100	2,18
P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	296	87	2,00
O00291	Huntingtin-interacting protein 1	602	143	1,89
J3QQ67	60S ribosomal protein L18 (Fragment)	891	108	1,87
P18085	ADP-ribosylation factor 4	401	145	1,79
P29762	Cellular retinoic acid-binding protein 1	1924	183	1,79
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	647	107	1,69
H0YK83	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	1040	37	1,59
P83731	60S ribosomal protein L24	400	106	1,51
P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	2299	185	1,51
P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	1871	103	1,48

P0C0S5	Histone H2A.Z	1650	144	1,44
J3KN62	Cadherin-13	1127	29	1,43
P41218	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	2045	187	1,42
P62241	40S ribosomal protein S8	2266	109	1,41
P00734	Prothrombin	1436	27	1,40
P62244	40S ribosomal protein S15a	1115	191	1,40
Q5T9B7	Adenylate kinase H	1435	71	1,35
P01620	Ig kappa chain V-III region SIE	1466	186	1,35
P37802	Transgelin-2	2022	84	1,32
Q99459	Cell division cycle 5-like protein	2992	110	1,31
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	1332	192	1,27
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	2097	26	1,27
H0YBZ2	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain (Fragment)	1535	0	1,23
Q9UKK3	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	3249	188	1,23
Q3SY69	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	2616	159	1,23
Q16706	Alpha-mannosidase 2	2591	181	1,20
P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	1895	179	1,19
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	1190	189	1,19
Q9Y224	UPF0568 protein C14orf166	3277	51	1,18
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2198	171	1,18
B5ME19	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	278	116	1,18
P39019	40S ribosomal protein S19	2028	70	1,18
P12830	Cadherin-1	1706	83	1,18
G3XAF6	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	980	9	1,18
Q9H2U2-2	Isoform 2 of Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	534	6	1,17
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	416	157	1,17
P29622	Kallistatin	1922	41	1,16
P02766	Transthyretin	1512	182	1,15
Q9ULZ3	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	3256	42	1,15
Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase	2970	160	1,13
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	206	101	1,11
P35232	Prohibitin	1987	50	1,11
Q06830	Peroxiredoxin-1	2398	5	1,10
P51884	Lumican	2167	54	1,09
P62854	40S ribosomal protein S26	2292	114	1,08
B5MCQ5	Protein disulfide-isomerase A6	272	190	1,07
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	2192	8	1,07
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	844	4	1,06
Q9Y6C2	EMILIN-1	3338	64	1,06
Q14112	Nidogen-2	2499	72	1,06
P08708	40S ribosomal protein S17	1626	73	1,04
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A	1642	46	1,04
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	1426	74	1,02
P51149	Ras-related protein Rab-7a	2148	25	1,02
P36955	Pigment epithelium-derived factor	2017	53	1,02
P10768	S-formylglutathione hydrolase	1663	20	1,01
P50148	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	2133	31	1,01
P62191	26S protease regulatory subunit 4	2264	7	-1,00
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	3162	44	-1,00
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	2118	19	-1,00
E9PIE3	Protein kinase C delta-binding protein	712	55	-1,00
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	1562	158	-1,02

P08670	Vimentin	1624	63	-1,02
P18077	60S ribosomal protein L35a	1785	184	-1,02
Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	306	45	-1,02
A3KMH1	von Willebrand factor A domain-containing protein 8	21	172	-1,03
P61970	Nuclear transport factor 2	2257	170	-1,03
A8MUS3	60S ribosomal protein L23a	77	117	-1,03
P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	1805	112	-1,04
P39060	Collagen alpha-1(XVIII) chain	2031	61	-1,05
J3KN10	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	1123	140	-1,06
P08758	Annexin A5	1629	56	-1,07
P09525	Annexin A4	1638	34	-1,07
Q8N5K1	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	2832	180	-1,07
Q12959-2	Isoform 2 of Disks large homolog 1	2440	21	-1,07
P20618	Proteasome subunit beta type-1	1811	115	-1,07
Q9NP72	Ras-related protein Rab-18	3127	75	-1,07
G8JLA8	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	998	30	-1,08
J3KNB4	Antibacterial protein FALL-39	1130	142	-1,08
B7Z468	Calpastatin	301	32	-1,09
P02545	Prelamin-A/C	1496	59	-1,09
Q99729-2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	505	36	-1,09
P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	1735	177	-1,09
P20774	Mimecan	1816	52	-1,10
P07585	Decorin	1594	58	-1,11
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	2122	178	-1,11
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	2524	69	-1,11
Q00341	Vigilin	2346	141	-1,12
P99999	Cytochrome c	381	162	-1,12
P57740	Nuclear pore complex protein Nup107	2222	169	-1,12
O14907	Tax1-binding protein 3	1225	146	-1,13
P62805	Histone H4	2287	176	-1,15
P05452	Tetranectin	705	10	-1,15
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2109	155	-1,15
P21810	Biglycan	51	60	-1,16
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	2460	38	-1,18
Q8IUX7	Adipocyte enhancer-binding protein 1	2800	62	-1,19
P61981	14-3-3 protein gamma	2260	40	-1,20
Q14008-3	Isoform 3 of Cytoskeleton-associated protein 5	2496	121	-1,21
Q9H2M9	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	3087	126	-1,22
Q92616	Translational activator GCN1	2905	156	-1,23
E7EPK6	40S ribosomal protein S24	577	120	-1,25
O75955	Flotillin-1	1366	161	-1,25
J3KN16	Protein KIAA0368	1124	165	-1,26
Q13315	Serine-protein kinase ATM	2461	148	-1,26
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome	1014	118	-1,29
P32455	Interferon-induced guanylate-binding protein 1	1971	39	-1,30
O14786	Neuropilin-1	636	43	-1,30
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	1434	94	-1,31
P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	2144	175	-1,32
P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	1946	128	-1,32
Q15046	Lysine--tRNA ligase	2540	119	-1,34
P07355-2	Isoform 2 of Annexin A2	1591	65	-1,35
P51812	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	168	154	-1,36
Q86UE4	Protein LYRIC	2782	173	-1,36
O75718	Cartilage-associated protein	1350	47	-1,40
O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	1416	11	-1,40

P07384	Calpain-1 catalytic subunit	1592	97	-1,41
E7ESP4	Integrin alpha-2	554	28	-1,42
Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	2405	77	-1,42
P51888	Prolargin	2168	57	-1,44
E9PEN8	Exportin-7	678	152	-1,44
O94826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	1374	68	-1,44
P04839	Cytochrome b-245 heavy chain	1545	168	-1,44
Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	2761	79	-1,46
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	1710	123	-1,47
P35052	Glypican-1	1984	49	-1,47
Q06210	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	2395	166	-1,47
O14936	Peripheral plasma membrane protein CASK	919	96	-1,49
H3BMK9	Tryptase alpha/beta-1	913	67	-1,53
P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	38	12	-1,53
Q14240-2	Isoform 2 of Eukaryotic initiation factor 4A-II	585	127	-1,54
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1356	99	-1,54
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	2359	150	-1,55
P01861	Ig gamma-4 chain C region	1489	174	-1,55
P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	1662	122	-1,57
P68363	Tubulin alpha-1B chain	2319	133	-1,57
P01040	Cystatin-A	1452	48	-1,57
O95274	Ly6/PLAUR domain-containing protein 3	1390	35	-1,63
Q6IN85	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	976	98	-1,64
O76094	Signal recognition particle 72 kDa protein	1371	137	-1,65
O95834-2	Isoform 2 of Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	1415	167	-1,66
P36269-3	Isoform 3 of Gamma-glutamyltransferase 5	2006	78	-1,66
Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	2597	111	-1,67
Q9UBG3	Cornulin	3208	95	-1,69
Q9Y6Y8	SEC23-interacting protein	810	151	-1,69
Q02543	60S ribosomal protein L18a	2374	153	-1,71
Q14134	Tripartite motif-containing protein 29	2501	22	-1,72
Q96FQ6	Protein S100-A16	2953	33	-1,73
Q92608	Dedicator of cytokinesis protein 2	2904	164	-1,74
F5H098	Malate dehydrogenase B	806	130	-1,75
P01834	Ig kappa chain C region	1485	163	-1,76
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	2315	66	-1,77
Q9UNH7	Sorting nexin-6	185	80	-1,79
H3BP20	Beta-hexosaminidase subunit alpha	1059	76	-1,80
H7C2I1	Protein arginine N-methyltransferase 1	724	113	-1,85
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	135	138	-1,87
P29590	Protein PML	1921	17	-1,89
Q92797	Symplekin	2912	132	-1,96
Q16537	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	326	131	-1,96
Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	2759	125	-1,99
E5RJD8	Tubulin-specific chaperone A	549	134	-2,01
Q9Y3B4	Pre-mRNA branch site protein p14	3300	149	-2,02
Q9UBV2	Protein sel-1 homolog 1	3214	136	-2,03
P01625	Ig kappa chain V-IV region Len	1468	147	-2,16
P17050	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	1771	15	-2,20
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	2726	135	-2,33
O95470	Sphingosine-1-phosphate lyase 1	1399	129	-2,35

P50453	Serpin B9	2141	18	-2,38
Q13620	Cullin-4B	2483	124	-2,40
Q9NRP0	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC	3145	139	-2,45
Q6IBS0	Twinfilin-2	2708	23	-2,64
Q12768	WASH complex subunit strumpellin	2427	16	-2,71
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	896	13	-2,92
B7Z6H3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	308	82	-3,02
Q9BWD1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	3042	24	-4,07
O75531	Barrier-to-autointegration factor	1340	81	-4,22
P52630	Signal transducer and activator of transcription 2	954	14	-4,32

10 proteina koji pokazuju najveće promjene između ove dvije skupine su:

1. *Band 3 anion transport protein* (P02730), 10,25
2. *Azurocidin* (P20160), 9,39
3. *Protein S100-A6* (P06703), 4,90
4. *Multimerin-1* (Q13201), 4,42
5. *Carbonic anhydrase 2* (P00918), 4,03
6. *Keratin, type I cytoskeletal 18* (P05783), -2,92
7. *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9* (B7Z6H3), -3,02
8. *Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic* (Q9BWD1), -4,07
9. *Barrier-to-autointegration factor* (O75531), -4,22
10. *Signal transducer and activator of transcription 2* (P52630), -4,32

Decimalni broj iza zagrade pokazuje koliko je puta određeni protein povećan ili smanjen (predznak "-") u mjestu s gingivitisom ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.2.6. Usporedba kontrolne skupine i mjesta s parodontitisom ispitivane skupine

Usporedba zastupljenosti proteina zdravog mjesta kontrolne skupine i mjesta s parodontitisom ispitivane skupine. Rezultati usporedbe prikazani su u Tablici 7. Svaki protein određen je Uniprot identifikacijskim brojem (Uniprot ID), MaxQuant brojem (MaxQuant ID) te proteinskim imenom. Stupac Redni br odnosi se na redni broj pod kojim se određeni protein može pronaći na Slici 8. Stupac pod imenom Stupanj promjene u mjestu s parodontitisom ispitivane skupine pokazuje koliko je puta određeni protein povećan ili smanjen (predznak "-") u uzorku mjesta s parodontitisom ispitivane skupine u odnosu na isti protein u kontrolnoj skupini.

Tablica 7. Prikaz proteina prema stupnju promjene u mjestu s parodontitisom ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu. Predznak "-" označava da je određeni protein smanjen u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

Uniprot ID	Ime proteina	MaxQuant ID	Redni br	Stupanj promjene u mjestu s parodontitisom ispitivane skupine
P20160	Azurocidin	1806	102	9,59
P41218	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	2045	187	6,72
P01861	Ig gamma-4 chain C region	1489	174	5,54
P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	2144	175	5,32
P01834	Ig kappa chain C region	1485	163	5,32
P18077	60S ribosomal protein L35a	1785	184	4,75
P04839	Cytochrome b-245 heavy chain	1545	168	4,73
P29762	Cellular retinoic acid-binding protein 1	1924	183	4,69
P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	2299	185	4,61
P01620	Ig kappa chain V-III region SIE	1466	186	4,54
Q06210	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	2395	166	3,59
Q8N5K1	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	2832	180	3,57
P62805	Histone H4	2287	176	3,42
Q92608	Dedicator of cytokinesis protein 2	2904	164	3,41
O95834-2	Isoform 2 of Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	1415	167	3,28
P26373	60S ribosomal protein L13	1888	105	3,28
Q16706	Alpha-mannosidase 2	2591	181	3,16
Q86UE4	Protein LYRIC	2782	173	3,13
P01625	Ig kappa chain V-IV region Len	1468	147	3,00
B5MCQ5	Protein disulfide-isomerase A6	272	190	2,95
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2198	171	2,92
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	416	157	2,84
Q3SY69	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	2616	159	2,83
Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase	2970	160	2,81

P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	1895	179	2,68
O75955	Flotillin-1	1366	161	2,63
P99999	Cytochrome c	381	162	2,61
P00450	Ceruloplasmin	1428	104	2,54
Q9NRP0	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC	3145	139	2,39
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	1190	189	2,35
P57740	Nuclear pore complex protein Nup107	2222	169	2,27
A3KMH1	von Willebrand factor A domain-containing protein 8	21	172	2,23
Q9UBV2	Protein sel-1 homolog 1	3214	136	2,22
Q99459	Cell division cycle 5-like protein	2992	110	2,21
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	2122	178	2,17
P02766	Transthyretin	1512	182	2,15
Q9Y3B4	Pre-mRNA branch site protein p14	3300	149	2,15
Q9NYL4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	3172	100	2,12
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	647	107	2,10
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	1332	192	2,07
Q9UKK3	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	3249	188	2,06
J3QQ67	60S ribosomal protein L18 (Fragment)	891	108	2,04
P61970	Nuclear transport factor 2	2257	170	2,04
Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	2597	111	2,03
P18085	ADP-ribosylation factor 4	401	145	1,95
P62244	40S ribosomal protein S15a	1115	191	1,95
O00291	Huntingtin-interacting protein 1	602	143	1,89
J3KN16	Protein KIAA0368	1124	165	1,81
P0C0S5	Histone H2A.Z	1650	144	1,79
Q9UBG3	Cornulin	3208	95	1,77
P02671	Fibrinogen alpha chain	1501	91	1,76
O14907	Tax1-binding protein 3	1225	146	1,75
Q9Y6Y8	SEC23-interacting protein	810	151	1,74
Q92616	Translational activator GCN1	2905	156	1,72
P62241	40S ribosomal protein S8	2266	109	1,71
P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	1735	177	1,71
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2109	155	1,69
P83731	60S ribosomal protein L24	400	106	1,69
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	1562	158	1,68
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome	1014	118	1,68
Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	2759	125	1,66
P02730	Band 3 anion transport protein	1503	93	1,63
Q02543	60S ribosomal protein L18a	2374	153	1,62
Q13315	Serine-protein kinase ATM	2461	148	1,60
Q16537	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	326	131	1,58
E9PEN8	Exportin-7	678	152	1,57
O76094	Signal recognition particle 72 kDa protein	1371	137	1,52
P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	1805	112	1,52
P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	1871	103	1,51
E5RJD8	Tubulin-specific chaperone A	549	134	1,49
A8MUS3	60S ribosomal protein L23a	77	117	1,47
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	135	138	1,46
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	2359	150	1,41
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	2726	135	1,41
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	206	101	1,35
P51812	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	168	154	1,34
B5ME19	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	278	116	1,33
O14936	Peripheral plasma membrane protein CASK	919	96	1,32
H0YBZ2	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain (Fragment)	1535	0	1,32

Q14240-2	Isoform 2 of Eukaryotic initiation factor 4A-II	585	127	1,26
Q00341	Vigilin	2346	141	1,26
Q92797	Symplekin	2912	132	1,23
Q9H2M9	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	3087	126	1,20
J3KNB4	Antibacterial protein FALL-39	1130	142	1,18
P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	1946	128	1,17
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	1710	123	1,17
Q15046	Lysine--tRNA ligase	2540	119	1,16
J3KN10	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	1123	140	1,16
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	1434	94	1,15
H7C2I1	Protein arginine N-methyltransferase 1	724	113	1,14
O95470	Sphingosine-1-phosphate lyase 1	1399	129	1,11
F5H098	Malate dehydrogenase B	806	130	1,11
P68363	Tubulin alpha-1B chain	2319	133	1,11
P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	1662	122	1,09
P62854	40S ribosomal protein S26	2292	114	1,08
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	844	4	1,07
Q13620	Cullin-4B	2483	124	1,04
P69905	Hemoglobin subunit alpha	2326	92	1,04
G3XAF6	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	980	9	-1,00
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1356	99	-1,00
Q14008-3	Isoform 3 of Cytoskeleton-associated protein 5	2496	121	-1,01
E7EPK6	40S ribosomal protein S24	577	120	-1,03
P05452	Tetranectin	705	10	-1,04
O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	1416	11	-1,06
P20618	Proteasome subunit beta type-1	1811	115	-1,07
Q06830	Peroxiredoxin-1	2398	5	-1,10
P29590	Protein PML	1921	17	-1,11
P51531	Probable global transcription activator SNF2L2	2152	1	-1,18
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	2192	8	-1,19
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	2118	19	-1,22
P62191	26S protease regulatory subunit 4	2264	7	-1,23
P00734	Prothrombin	1436	27	-1,24
Q6IN85	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	976	98	-1,29
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	2097	26	-1,30
P50453	Serpin B9	2141	18	-1,30
P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	38	12	-1,32
P61981	14-3-3 protein gamma	2260	40	-1,35
Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	2761	79	-1,37
Q9H2U2-2	Isoform 2 of Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	534	6	-1,41
Q12768	WASH complex subunit strumpellin	2427	16	-1,43
P08670	Vimentin	1624	63	-1,43
Q14112	Nidogen-2	2499	72	-1,44
P00918	Carbonic anhydrase 2	1443	88	-1,44
P07355-2	Isoform 2 of Annexin A2	1591	65	-1,44
P29622	Kallistatin	1922	41	-1,44
P51149	Ras-related protein Rab-7a	2148	25	-1,45
P50148	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	2133	31	-1,47
P32119	Peroxiredoxin-2	1969	89	-1,52
P07384	Calpain-1 catalytic subunit	1592	97	-1,53
Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	2405	77	-1,55
P36955	Pigment epithelium-derived factor	2017	53	-1,57

P35232	Prohibitin	1987	50	-1,60
Q9UNH7	Sorting nexin-6	185	80	-1,64
P09525	Annexin A4	1638	34	-1,64
P17050	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	1771	15	-1,71
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	896	13	-1,72
P00915	Carbonic anhydrase 1	1442	90	-1,79
Q99729-2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	505	36	-1,87
P36269-3	Isoform 3 of Gamma-glutamyltransferase 5	2006	78	-1,90
P52630	Signal transducer and activator of transcription 2	954	14	-1,91
Q9NP72	Ras-related protein Rab-18	3127	75	-1,94
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	3162	44	-1,96
Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	306	45	-2,07
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	2315	66	-2,10
G8JLA8	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	998	30	-2,11
P39060	Collagen alpha-1(XVIII) chain	2031	61	-2,13
E7ESP4	Integrin alpha-2	554	28	-2,14
Q9Y6C2	EMILIN-1	3338	64	-2,14
O75718	Cartilage-associated protein	1350	47	-2,15
P12830	Cadherin-1	1706	83	-2,20
Q13201	Multimerin-1	574	3	-2,21
Q8IUX7	Adipocyte enhancer-binding protein 1	2800	62	-2,28
B7Z468	Calpastatin	301	32	-2,31
P08758	Annexin A5	1629	56	-2,32
O94826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	1374	68	-2,32
P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	296	87	-2,33
Q9Y224	UPF0568 protein C14orf166	3277	51	-2,37
P02545	Prelamin-A/C	1496	59	-2,43
P37802	Transgelin-2	2022	84	-2,47
J3KN62	Cadherin-13	1127	29	-2,70
H3BP20	Beta-hexosaminidase subunit alpha	1059	76	-2,71
P10768	S-formylglutathione hydrolase	1663	20	-2,73
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	2524	69	-2,78
P07585	Decorin	1594	58	-2,89
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	1426	74	-2,91
Q9BWD1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	3042	24	-3,03
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	2460	38	-3,05
Q14134	Tripartite motif-containing protein 29	2501	22	-3,15
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A	1642	46	-3,19
P32455	Interferon-induced guanylate-binding protein 1	1971	39	-3,22
P08708	40S ribosomal protein S17	1626	73	-3,28
P06703	Protein S100-A6	1574	2	-3,29
H0YK83	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	1040	37	-3,31
O14786	Neuropilin-1	636	43	-3,53
P01040	Cystatin-A	1452	48	-3,53
P51884	Lumican	2167	54	-3,56
H3BMK9	Tryptase alpha/beta-1	913	67	-3,57
Q5T9B7	Adenylate kinase H	1435	71	-3,61
P39019	40S ribosomal protein S19	2028	70	-3,77
Q12959-2	Isoform 2 of Disks large homolog 1	2440	21	-3,89
P21810	Biglycan	51	60	-3,91
P35052	Glypican-1	1984	49	-4,05
P30043	Flavin reductase (NADPH)	1929	86	-4,17
Q6IBS0	Twinfilin-2	2708	23	-4,27
Q96FQ6	Protein S100-A16	2953	33	-4,28
Q9ULZ3	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	3256	42	-4,32
P20774	Mimecan	1816	52	-4,34

E9PIE3	Protein kinase C delta-binding protein	712	55	-4,62
P02652	Apolipoprotein A-II	1500	85	-5,29
O95274	Ly6/PLAUR domain-containing protein 3	1390	35	-5,32
B7Z6H3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	308	82	-5,99
O75531	Barrier-to-autointegration factor	1340	81	-7,05
P51888	Prolargin	2168	57	-8,57

10 proteina koji pokazuju najveće promjene između ove dvije skupine su:

1. *Azurocidin* (P20160), 9,59
2. *Myeloid cell nuclear differentiation antigen* (P41218), 6,72
3. *Ig gamma-4 chain C region* (P01861), 5,54
4. *Vasodilator-stimulated phosphoprotein* (P50552), 5,32
5. *Ig kappa chain C region* (P01834), 5,32
6. *Apolipoprotein A-II* (P02652), -5,29
7. *Ly6/PLAUR domain-containing protein 3* (O95274), -5,32
8. *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* FKBP9 (B7Z6H3), -5,99
9. *Barrier-to-autointegration factor* (O75531), -7,05
10. *Prolargin* (P51888), -8,57

Decimalni broj iza zagrade pokazuje koliko je puta određeni protein povećan ili smanjen (predznak "-") u mjestu s gingivitisom ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.2.7. Usporedba kontrolne skupine i mjesta s parodontitisom nakon terapije ispitivane skupine

Usporedba zastupljenosti proteina zdravog mjesta kontrolne skupine i mjesta s parodontitisom poslije terapije ispitivane skupine. Rezultati usporedbe prikazani su u Tablici 8. Svaki protein određen je Uniprot identifikacijskim brojem (Uniprot ID), MaxQuant brojem (MaxQuant ID) te proteinskim imenom. Stupac Redni br odnosi se na redni broj pod kojim se određeni protein može pronaći na Slici 8. Stupac pod imenom Stupanj promjene u mjestu s poslije terapije ispitivane skupine pokazuje koliko je puta određeni protein povećan ili smanjen (predznak "-") u uzorku mjesta poslije terapije ispitivane skupine u odnosu na isti protein u kontrolnoj skupini.

Tablica 8. Prikaz proteina prema stupnju promjene u mjestu poslije terapije ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu. Predznak "-" označava da je određeni protein smanjen u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

Uniprot ID	Ime proteina	MaxQuant ID	Redni br	Stupanj promjene u mjestu nakon terapije ispitivane skupine
P02730	Band 3 anion transport protein	1503	93	3,66
P06703	Protein S100-A6	1574	2	2,93
P04839	Cytochrome b-245 heavy chain	1545	168	2,90
Q9UBG3	Cornulin	3208	95	2,77
P26373	60S ribosomal protein L13	1888	105	2,65
P20160	Azurocidin	1806	102	2,20
O14936	Peripheral plasma membrane protein CASK	919	96	2,01
P62191	26S protease regulatory subunit 4	2264	7	1,96
P00450	Ceruloplasmin	1428	104	1,95
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	647	107	1,89
P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	2144	175	1,88
J3QQ67	60S ribosomal protein L18 (Fragment)	891	108	1,86
P01861	Ig gamma-4 chain C region	1489	174	1,82
P41218	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	2045	187	1,81
P02671	Fibrinogen alpha chain	1501	91	1,79
P01625	Ig kappa chain V-IV region Len	1468	147	1,77
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	206	101	1,76
E7ESP4	Integrin alpha-2	554	28	1,75
Q96FQ6	Protein S100-A16	2953	33	1,67
P12830	Cadherin-1	1706	83	1,63
P01834	Ig kappa chain C region	1485	163	1,62
P57740	Nuclear pore complex protein Nup107	2222	169	1,59
P01620	Ig kappa chain V-III region SIE	1466	186	1,58
P18077	60S ribosomal protein L35a	1785	184	1,56
E7EPK6	40S ribosomal protein S24	577	120	1,54
P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	2299	185	1,54
P32455	Interferon-induced guanylate-binding protein 1	1971	39	1,53

Q99459	Cell division cycle 5-like protein	2992	110	1,52
Q86UE4	Protein LYRIC	2782	173	1,47
Q9H2U2-2	Isoform 2 of Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	534	6	1,47
P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	1871	103	1,47
Q02543	60S ribosomal protein L18a	2374	153	1,47
Q92608	Dedicator of cytokinesis protein 2	2904	164	1,46
P30043	Flavin reductase (NADPH)	1929	86	1,45
Q6IBS0	Twinfilin-2	2708	23	1,45
Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase	2970	160	1,43
E9PEN8	Exportin-7	678	152	1,41
O95470	Sphingosine-1-phosphate lyase 1	1399	129	1,39
P00918	Carbonic anhydrase 2	1443	88	1,39
P83731	60S ribosomal protein L24	400	106	1,38
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1356	99	1,34
Q9BWD1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	3042	24	1,34
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	2359	150	1,34
B7Z468	Calpastatin	301	32	1,32
Q6IN85	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	976	98	1,30
P62241	40S ribosomal protein S8	2266	109	1,27
A3KMH1	von Willebrand factor A domain-containing protein 8	21	172	1,25
P07384	Calpain-1 catalytic subunit	1592	97	1,25
P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	1662	122	1,25
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	2192	8	1,24
O95274	Ly6/PLAUR domain-containing protein 3	1390	35	1,23
Q12959-2	Isoform 2 of Disks large homolog 1	2440	21	1,23
P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	296	87	1,23
P37802	Transgelin-2	2022	84	1,22
P69905	Hemoglobin subunit alpha	2326	92	1,22
P32119	Peroxiredoxin-2	1969	89	1,18
Q9Y6Y8	SEC23-interacting protein	810	151	1,17
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	2460	38	1,17
Q06830	Peroxiredoxin-1	2398	5	1,17
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	1434	94	1,16
P51812	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	168	154	1,15
F5H098	Malate dehydrogenase B	806	130	1,14
P62854	40S ribosomal protein S26	2292	114	1,14
O95834-2	Isoform 2 of Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	1415	167	1,14
Q14008-3	Isoform 3 of Cytoskeleton-associated protein 5	2496	121	1,14
O14907	Tax1-binding protein 3	1225	146	1,12
P00915	Carbonic anhydrase 1	1442	90	1,10
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	2198	171	1,09
Q15046	Lysine--tRNA ligase	2540	119	1,09
Q9UKK3	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	3249	188	1,08
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	2118	19	1,08
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	1190	189	1,08
P62805	Histone H4	2287	176	1,07
P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	1735	177	1,06
Q13620	Cullin-4B	2483	124	1,05
P99999	Cytochrome c	381	162	1,05
H0YBZ2	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain (Fragment)	1535	0	1,04
J3KN16	Protein KIAA0368	1124	165	1,03
Q9ULZ3	Apoptosis-associated speck-like protein containing	3256	42	1,01

	a CARD			
Q99729-2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	505	36	-1,01
P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	38	12	-1,01
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome	1014	118	-1,02
Q92616	Translational activator GCN1	2905	156	-1,03
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	2122	178	-1,03
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	2109	155	-1,06
P61970	Nuclear transport factor 2	2257	170	-1,07
Q06210	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	2395	166	-1,07
Q16706	Alpha-mannosidase 2	2591	181	-1,07
Q92797	Symplekin	2912	132	-1,09
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	3162	44	-1,09
P20618	Proteasome subunit beta type-1	1811	115	-1,10
O00291	Huntingtin-interacting protein 1	602	143	-1,10
Q9Y3B4	Pre-mRNA branch site protein p14	3300	149	-1,12
Q14134	Tripartite motif-containing protein 29	2501	22	-1,13
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	1710	123	-1,13
P09525	Annexin A4	1638	34	-1,15
P10768	S-formylglutathione hydrolase	1663	20	-1,16
P02766	Transthyretin	1512	182	-1,16
Q5T9B7	Adenylate kinase H	1435	71	-1,18
O75718	Cartilage-associated protein	1350	47	-1,18
P68363	Tubulin alpha-1B chain	2319	133	-1,18
P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	1946	128	-1,19
Q14240-2	Isoform 2 of Eukaryotic initiation factor 4A-II	585	127	-1,20
O75955	Flotillin-1	1366	161	-1,22
P29762	Cellular retinoic acid-binding protein 1	1924	183	-1,24
Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	2597	111	-1,26
Q9H2M9	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	3087	126	-1,26
B5ME19	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	278	116	-1,28
Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	306	45	-1,28
P02652	Apolipoprotein A-II	1500	85	-1,28
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	896	13	-1,29
P35232	Prohibitin	1987	50	-1,30
P07355-2	Isoform 2 of Annexin A2	1591	65	-1,30
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	2097	26	-1,30
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	1332	192	-1,30
O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	1416	11	-1,32
P62244	40S ribosomal protein S15a	1115	191	-1,33
A8MUS3	60S ribosomal protein L23a	77	117	-1,34
P39019	40S ribosomal protein S19	2028	70	-1,34
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	2315	66	-1,35
Q9NP72	Ras-related protein Rab-18	3127	75	-1,35
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	2726	135	-1,35
P29590	Protein PML	1921	17	-1,35
Q13201	Multimerin-1	574	3	-1,36
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A	1642	46	-1,37
Q14112	Nidogen-2	2499	72	-1,37
P00734	Prothrombin	1436	27	-1,37
E5RJD8	Tubulin-specific chaperone A	549	134	-1,38
P52630	Signal transducer and activator of transcription 2	954	14	-1,40
P0C0S5	Histone H2A.Z	1650	144	-1,42

P51149	Ras-related protein Rab-7a	2148	25	-1,44
Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	2761	79	-1,45
O14786	Neuropilin-1	636	43	-1,46
H7C2I1	Protein arginine N-methyltransferase 1	724	113	-1,48
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	416	157	-1,52
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	844	4	-1,53
B5MCQ5	Protein disulfide-isomerase A6	272	190	-1,54
J3KN62	Cadherin-13	1127	29	-1,55
P61981	14-3-3 protein gamma	2260	40	-1,55
Q13315	Serine-protein kinase ATM	2461	148	-1,57
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	1426	74	-1,58
P51531	Probable global transcription activator SNF2L2	2152	1	-1,59
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	1562	158	-1,62
P01040	Cystatin-A	1452	48	-1,63
P18085	ADP-ribosylation factor 4	401	145	-1,64
P29622	Kallistatin	1922	41	-1,64
Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	2759	125	-1,72
O94826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	1374	68	-1,73
P50148	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	2133	31	-1,76
J3KNB4	Antibacterial protein FALL-39	1130	142	-1,77
H0YK83	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	1040	37	-1,78
Q9Y224	UPF0568 protein C14orf166	3277	51	-1,78
Q16537	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	326	131	-1,88
P08670	Vimentin	1624	63	-1,88
P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	1805	112	-1,89
P50453	Serpin B9	2141	18	-1,92
P39060	Collagen alpha-1(XVIII) chain	2031	61	-1,93
P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	1895	179	-1,93
O76094	Signal recognition particle 72 kDa protein	1371	137	-1,93
Q00341	Vigilin	2346	141	-1,94
G3XAF6	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	980	9	-1,99
P17050	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	1771	15	-1,99
P08708	40S ribosomal protein S17	1626	73	-2,05
P36955	Pigment epithelium-derived factor	2017	53	-2,06
P35052	Glypican-1	1984	49	-2,07
Q9NYL4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	3172	100	-2,11
P08758	Annexin A5	1629	56	-2,13
Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	2405	77	-2,24
Q9UNH7	Sorting nexin-6	185	80	-2,25
P05452	Tetranectin	705	10	-2,34
Q8N5K1	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	2832	180	-2,39
P02545	Prelamin-A/C	1496	59	-2,40
J3KN10	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	1123	140	-2,41
Q9UBV2	Protein sel-1 homolog 1	3214	136	-2,43
P07585	Decorin	1594	58	-2,45
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	2524	69	-2,48
Q8IUX7	Adipocyte enhancer-binding protein 1	2800	62	-2,65
O75531	Barrier-to-autointegration factor	1340	81	-2,66
Q3SY69	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	2616	159	-2,70
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	135	138	-3,00
G8JLA8	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	998	30	-3,04
P21810	Biglycan	51	60	-3,06

P36269-3	Isoform 3 of Gamma-glutamyltransferase 5	2006	78	-3,13
E9PIE3	Protein kinase C delta-binding protein	712	55	-3,22
H3BMK9	Tryptase alpha/beta-1	913	67	-3,28
Q12768	WASH complex subunit strumpellin	2427	16	-3,29
Q9Y6C2	EMILIN-1	3338	64	-3,36
H3BP20	Beta-hexosaminidase subunit alpha	1059	76	-3,61
P51884	Lumican	2167	54	-3,74
B7Z6H3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	308	82	-3,93
P51888	Prolargin	2168	57	-5,74
P20774	Mimecan	1816	52	-7,92
Q9NRP0	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC	3145	139	-12,03

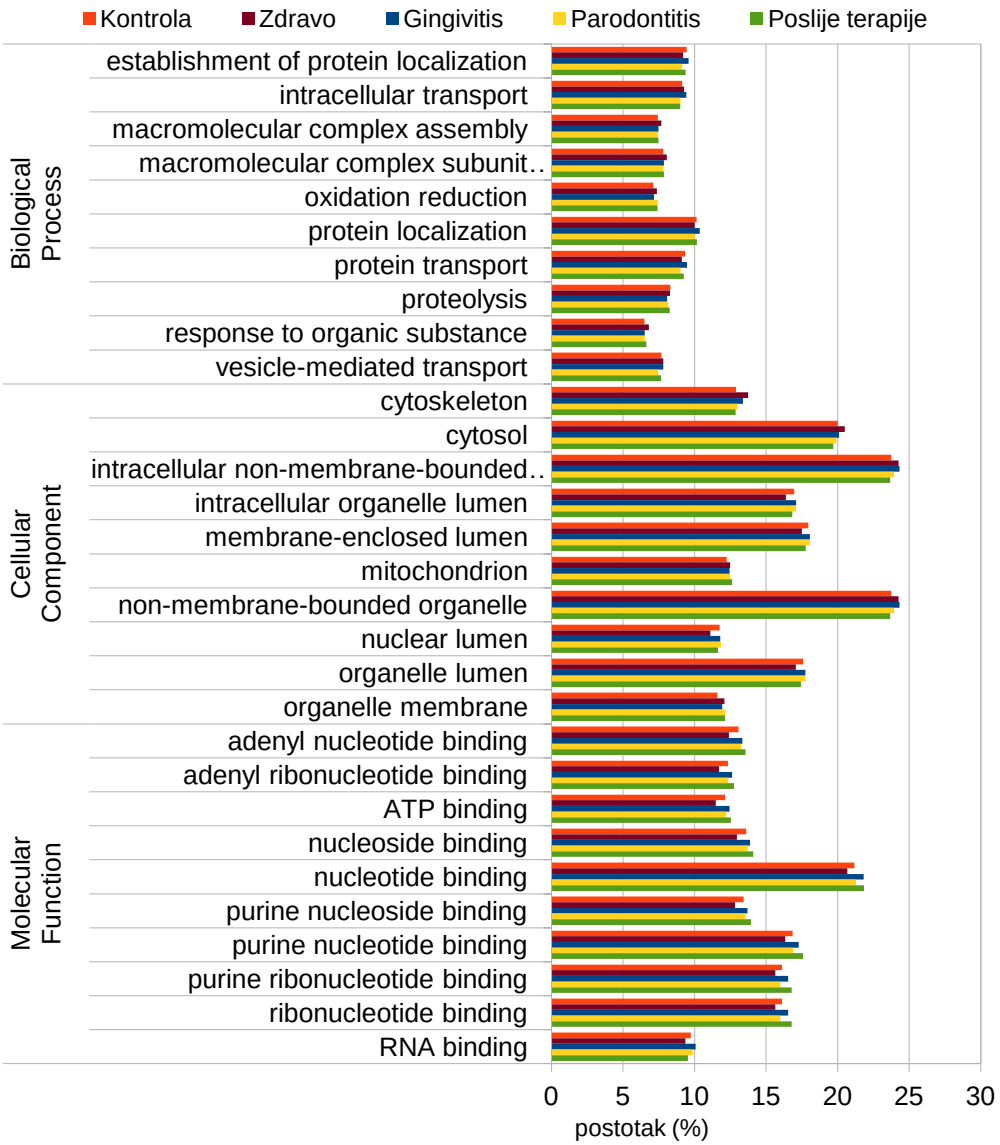
10 proteina koji pokazuju najveće promjene između ove dvije skupine su:

1. *Band 3 anion transport protein* (P02730), 3,66
2. *Protein S100-A6* (P06703), 2,93
3. *Cytochrome b-245 heavy chain* (P04839), 2,9
4. *Cornulin* (Q9UBG3), 2,77
5. *60S ribosomal protein L13* (P26373), 2,65
6. *Lumican* (P51884), -3,74
7. *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* (B7Z6H3), -3,93
8. *Prolargin* (P51888), -5,74
9. *Mimecan* (P20774), -7,92
10. *Oligosaccharyltransferase complex subunit* (Q9NRP0), -12,03

Decimalni broj iza zagrade pokazuje koliko je puta određeni protein povećan ili smanjen (predznak "-") u mjestu s gingivitisom ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.2.8. Analiza identificiranih proteina genskom ontologijom (GO)

GO analiza pokazuje distribuciju identificiranih proteina ispitivane i kontrolnih skupina prema molekularnoj funkciji, staničnoj komponenti i biološkom procesu (Slika 9). Iz rezultata analize vidljivo je da su postoci distribucije identificiranih proteina podjednaki u svih pet uzorka.



Slika 9. Genska ontologija (GO) identificiranih proteina u svih pet analiziranih skupina (kontrola, zdravo, gingivitis, parodontitis i poslije terapije). Prikazano je deset najistaknutijih grupa prema tri različita kriterija GO: molekularna funkcija, stanična komponenta i biološki proces.

5. RASPRAVA

Parodontne bolesti su jedne od najčešćih bolesti u populaciji. Oko 90% ljudi tijekom života razvije gingivitis, dok 7-13% ljudi oboli od teškog oblika parodontitisa (175). Novije istraživanje o prevalenciji parodontitisa provedeno u Sjedinjenim Američkim Državama na 3742 osobe starije od 30 godina pokazalo je da čak 47% ispitanika ima parodontitis (8,7% početni, 30% umjereni i 8,5% uznapredovali oblik bolesti) (176). Agresivni parodontitis predstavlja vrlo ozbiljan oblik parodontne bolesti te bi zbog intenziteta, brzine napredovanja bolesti i posljedica rano otkrivanje bolesti trebala biti jedna od glavnih zadaća doktora dentalne medicine.

Tijekom posljednjeg desetljeća potraga za biomarkerima parodontne bolesti postaje sve zanimljivija. Traže se specifični biomarkeri koji bi bili važni za dijagnosticiranje, prognozu i praćenje bolesti, ali i za odgovor na terapiju (177). 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 (178-180). Velik izazov u kliničkoj parodontologiji predstavlja pronalazak pouzdanih molekularnih markera koji bi obilježavali destrukciju parodontnog tkiva. Međutim, još se uvijek čeka njihov pronalazak i potvrđivanje, a parodontni parametri i indeksi, te klinički pregled pacijenta, i dalje su najpouzdaniji znak parodontnih bolesti (181).

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. Neka istraživanja koriste se tehnikama spektrometrije mase koje su usmjerene ciljanim proteinima, npr. defenzinima, međutim u novije vrijeme sve su češće opsežne proteomske analize (182, 183). 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 odgovoru na terapiju. Uvođenje takvih analiza kliničkih uzoraka (serum, slina ili sulkusna tekućina) pacijenata s parodontitisom pokazao se kao odličan pristup koji bi mogao značajno utjecati na znanje o proteinima vezanih za zdravlje, odnosno bolest (148). Većina dosadašnjih istraživanja u području parodontologije bila je usredotočena na analiziranje proteomskog sastava sulkusne tekućine, dok su se neki istraživači opredijelili za analizu sline (164, 166, 167, 184-186). Međutim, proteomske analize parodontnog tkiva kod pacijenata koji boluju od neke vrste parodontne bolesti još nisu objavljene.

U ovom istraživanju korištena je *label-free* LC-MS/MS tehnologija za identifikaciju i kvantifikaciju proteina epitelnog i vezivnog tkiva parodonta kod pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom i zdravih kontrola. Takav pristup u proteomskoj analizi tkiva pokazao se kao dobra metoda izbora što potvrđuje i činjenica da je ukupan broj identificiranih proteina iznosio čak 3420. Jednakom tehnologijom za svoje istraživanje koristili su se Bostanci i sur. u želji da analiziraju i usporede proteom sulkusne tekućine pacijenata s agresivnim parodontitisom i onom zdravih ispitanika. Autori su također bili zadovoljni rezultatima koje su dobili, 154 identificirana proteina među kojima su neki identificirani prvi put, te su zaključili da bi korištena tehnologija mogla olakšati karakterizaciju proteoma sulkusne tekućine i pridonijeti dijagnostici i prognoziranju parodontnih bolesti (165). Iako se brojka od 154 proteina čini malom u usporedbi s 3420 proteina koji su identificirani u našem istraživanju, valja napomenuti da je naše istraživanje analiziralo tkivo koje ima veći broj različitih stanica, a samim tim i različitih proteina.

Ukupan broj identificiranih proteina u našem istraživanju iznosio je 3420, međutim tijekom analize rezultata i statističke obrade podataka došlo se do broja od 193 proteina. Ti proteini pronađeni su u svim uzorcima te su njihove promjene u ekspresiji bile statistički značajne u svakoj ispitivanoj skupini (zdravo, gingivitis, parodontitis, poslije terapije) kada se usporedila s kontrolnom skupinom. Ovakav pristup u odabiru proteina omogućio je stvaranje liste zajedničkih proteina za sve uzorke te je time omogućeno praćenje ekspresije određenog proteina u sve četiri ispitivane skupine.

U zdravoj ispitivanoj skupini najjaču ekspresiju pokazali su proteini *Multimerin-1, Protein S100-A6, HLA class II histocompatibility antigen gamma chain, Ig kappa chain C region* i *14-3-3 protein gamma.*

Multimerin-1 je protein koji pokazuje ekspresiju u megakariocitima, trombocitima i stanicama endotela. Po svojoj strukturi ima karakteristike adhezivnog proteina te *in vitro* podržava adheziju različitih tipova stanica, uključujući aktivirane trombocite, neutrofile i stanice endotela. Osim toga, pokazuje mogućnost stvaranja velikih, razgranatih vlakana matriksa, a vjerojatno najvažniju funkciju pokazuje u alfa-granulama trombocita gdje funkcionira kao protein za koji se veže koagulacijski faktor V, poznat kao glavni regulator koagulacije (187). *Multimerin-1* još nije istraživan i povezivan s parodontnim bolestima, ali njegova identifikacija i stupnjevi promjene u našem istraživanju pokazuju zanimljivosti. Najzastupljeniji je u zdravoj ispitivanoj skupini, zatim mu ekspresija pada u gingivitisu, u

parodontitisu mu je čak i snižena, da bi mu opet malo porasla u skupini poslije terapije. Moguće objašnjenje takvog ponašanja jest u njegovoj ulozi poticanja adhezije različitih stanica, a od posebnog interesa su neutrofili koji su sastavni dio parodontnih lezija. Histološki nalazi tkiva zahvaćenih gingivitisom i parodontitisom potvrđuju prisutnost neutrofila i govore u prilog važne uloge u održavanju parodontnog zdravlja (53). Nadalje, kod pacijenata koji boluju od upalnih parodontnih bolesti povećani su indeksi krvarenja u odnosu na zdrave pojedince te bi i ta činjenica mogla objasniti zašto *Multimerin-1*, protein koji sudjeluje u koagulaciji, pokazuje najjaču ekspresiju u zdravoj skupini, odnosno najnižu u parodontitisu. Smanjena količina *Multimerin-1* vjerojatno dovodi do slabijeg vezanja koagulacijskog faktora V u trombocitima, a kao posljedica toga dolazi do poremećaja u mehanizmu zgrušavanja krvi i do jačeg krvarenja gingive.

Među statistički značajno promijenjenim proteinima našla su se i dva pripadnika obitelji S100 proteina, Protein S100-A6 i A16. Gledajući njihovu ekspresiju u ispitivanim skupinama vidljivo je da u zdravom tkivu i tkivu nakon terapije pokazuju jaču ekspresiju dok im je ekspresija u tkivu s parodontitisom znatno manja. U dosadašnjim proteomskim istraživanjima sulkusne tekućine pacijenata s parodontitisom i gingivitisom uglavnom su identificirani protein S100-A8 i A9 (165, 168, 188). Njih karakterizira mala molekularna masa i dva mjesta na koja se mogu vezati kalcijevi ioni, a u akutno upaljenom tkivu eksprimirani su u makrofagima i epitelnim stanicama (189). Smatra se da igraju važnu ulogu u regulaciji upalnog i imunološkog odgovora potičući kemotaksiju i adheziju neutrofila (190). Osim što potiču kemotaksiju neutrofila i makrofaga, S100A8/A9 proteini inhibiraju produkciju H_2O_2 od strane makrofaga i pokazuju antimikrobnu aktivnost (191). Za razliku od S100-A8/A9 proteina, S100-A6 protein identificiran je samo u istraživanju Haigha i sur. U tom istraživanju protein je pokazao jaču ekspresiju u slini pacijenata s parodontitisom prije terapije, nego u uzorcima sline nakon terapije ukazujući na moguću povezanost s upalnim stanjem. Naše istraživanje pokazalo je suprotno ponašanje tog proteina, a budući da je malo dokaza o povezanosti S100-A6 proteina i upale potrebna su daljnja istraživanja i više dokaza koji bi govorili o funkciji spomenutog proteina. Poznato je tek da na životinjskom modelu astme pokazuje pojačanu ekspresiju nakon stimulacije TNF-α i aktivacije NF-κB, te da mu je kod nekih tumora pojačana ekspresija (192-194).

Protein *HLA class II histocompatibility antigen gamma chain* poznat još i kao CD74 protein, pokazao je najjaču ekspresiju u uzorcima zdravog tkiva pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom. Do danas još nema istraživanja koje je povezalo parodontitis i

CD74 protein, ali ono što je poznato jest to da protein CD74 sudjeluje u nekoliko ključnih procesa imunološkog odgovora kao što su prezentacija antigena, diferencijacija B-stanica i signalizacija tijekom upale, a kao najznačajnija uloga često se ističe njegova interakcija s katepsinima i s proteinom imena *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF) (195). Njegova uloga u patogenezi parodontitisa mogla bi biti zanimljiva zato što je protein CD74 u interakciji s MIF-om. Naime, bakterijski antigeni stimuliraju leukocite na otpuštanje MIF-a, cirkulirajući MIF se veže na CD74 drugih stanica imunološkog odgovora te potiče akutni imunološki odgovor (196). Na temelju te činjenice MIF se klasificira kao upalni citokin koji igra ulogu u sistemskom i lokalnom upalnom i imunološkom odgovoru, a dosadašnja istraživanja povezuju ga s reumatoidnim artritisom i sepsom (197, 198). U istraživanju Morimote i sur. istraživani su prisutnost i lokalizacija MIF-a u uzorcima gingive. MIF je pokazao ekspresiju u citoplazmi keratinocita i to posebno u epitelu slobodne gingive i spojnog epitela, a autori su došli do zaključka da bi MIF mogao igrati važnu ulogu u homeostatskom procesu parodontne upale (199). Tek objavljeno istraživanje Lija i sur. o ekspresiji MIF-a u tkivu gingive pacijenata s kroničnim parodontitisom i zdravih ispitanika pokazalo je da bi MIF mogao biti povezan sa stanjem parodonta i da bi ekspresiju MIF-a mogao modulirati lipopolisaharide *P.gingivalisa* (200). Iz ovih činjenica vidljivo je da bi proteini CD74 i MIF mogli imati potencijalnu ulogu biomarkera parodontne bolesti, no za takve tvrdnje potrebno je više dokaza.

14-3-3 protein gamma pokazao se zanimljivim zato što mu je ekspresija bila povećana samo u zdravim uzorcima ispitivane skupine. U proteomskom istraživanju sline Wu i sur. pronašli su snižene razine 14-3-3 proteina sigma u slini pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom u odnosu na zdrave ispitanike (186). Iako je riječ o dva različita proteina vidljivo je da bi 14-3-3 obitelj proteina mogla biti važno obilježje zdravog parodonta. Funkcija tih proteina prilično je raznolika jer sudjeluju u širokom spektru općih i specijaliziranih signalnih puteva vežući se za fosfoserine ili fosfotronine (201).

Četiri imunoglobulina *Ig gamma-4 chain C region, Ig kappa chain C region, Ig kappa chain V-III region SIE i Ig kappa chain V-IV region Len* identificirani su i kvantificirani u svim skupinama uzoraka. Zanimljivo je da su sva četiri imunoglobulina pokazala najjaču ekspresiju u parodontitisu. Ig su proteini koje stvaraju plazma stanice nakon transformacije iz B-stanica, a imunološki sustav ih stvara i koristi se njima za identifikaciju i neutralizaciju stranih antigena. (93). 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% (51). Budući da plazma stanice stvaraju Ig, naše istraživanje potvrđuje važnu ulogu tih stanica, ali i Ig-a u patogenezi parodontitisa. U proteomskim istraživanjima sulkusne tekućine pacijenata s parodontitisom Ig su se uz keratine i albumin pokazali kao jedna od najzastupljenijih vrsta proteina (165, 202). Zanimljivo je da u oba prethodno navedena istraživanja, kao i u našem, nisu identificirani IgG i IgA koji se često spominju u istraživanjima agresivnog parodontitisa. Naš nalaz potvrđuje važnu ulogu koju bi Ig mogli igrati u lokalnom obrambenom odgovoru i pokazuje da bi proteomska istraživanja mogla biti korisna u analizi odgovora domaćina u parodontnim bolestima.

Među proteinima koji su pokazali zanimljivo ponašanje kroz sve četiri ispitivane skupine su i pripadnici obitelji *Annexina*: *Annexin A4, A5 i Isoform Annexin A2*. *Annexini* su skupina proteina koji vežu kalcij, funkcija im je još uvijek nepoznata, a samo se *Annexin A1* povezuje s upalnim stanjima i obrambenim odgovorom organizma (203). Naime, u istraživanjima endotoksemije i artritisa na životinjskim modelima nedostatak *Annexina A1* doveo je do povišenih razina citokina i egzacerbacije akutne upale (204, 205). Ekspresija *Annexina* u našem istraživanju bila je snižena u uzorcima gingivitisa, parodontitisa i poslije terapije, dok je u uzorcima zdrave ispitivane skupine pokazala pojačanu ekspresiju. Istraživanje Bostancija i sur. također je pokazalo da je ekspresija *Annexina* jača u zdravim uzorcima sulkusne tekućine, nego u uzorcima pacijenata koji boluju od agresivnog parodontitisa (165), dok u proteomskom istraživanju sulkusne tekućine eksperimentalnog gingivitisa *Annexini* nisu pokazali značajne promjene u zastupljenosti tijekom razvoja upale. Iako funkcija i uloga *Annexina* identificiranih u našem istraživanju (A4, A5 i *Isoform* A2) još nisu poznate čini se da bi povišene razine tih proteina mogle biti povezane s parodontnim zdravljem, odnosno da bi njihov nedostatak ili smanjena razina mogli pomoći u objašnjavanju upalnih zbivanja tijekom razvoja parodontitisa. Zbog navedenih karakteristika ova obitelj proteina ističe se kao jedna od najzanimljivijih u našem istraživanju i svakako zaslužuje daljnja istraživanja kako u parodontologiji tako i u ostalim biomedicinskim znanostima.

Protein imena *Oligosaccharyltransferase complex subunit* pokazao je zanimljive stupnjeve promjene unutar ispitivane skupine posebice u skupini poslije terapije gdje se istaknuo kao protein najjačeg stupnja promjene kad se usporedio s kontrolnom skupinom. Koje su karakteristike i funkcija tog proteina još nije poznato, poznato je samo da je riječ o membranskom proteinu. *Band 3 anion transport protein* pokazao je najjaču ekspresiju u gingivitisu. Riječ je o glikoproteinu membrane eritrocita, no koja je poveznica njega i upalnih stanja također još nije poznato.

U uzorcima parodontitisa protein koji je pokazao najjači stupanj promjene bio je Azurocidin. Osim u parodontitisu, pokazao je visok stupanj promjene i u uzorcima gingivitisa. Azurocidin još je poznat i pod imenom *Cationic antimicrobial protein* (CAP37) ili *Heparin-binding protein* (HBP). 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. Nakon oslobađanja iz sekretornih granula neutrofila, izazvanih vezanjem neutrofilnih beta (2)-integrina kao odgovor na prisutne bakterije, Azurocidin djeluje kemotaktički na monocite i makrofage te pojačava oslobađanje citokina i fagocitozu. Osim što ga se povezuje s upalom i imunološkim odgovorom navedeni protein ima sposobnost vezanja heparina (206, 207). Jaka ekspresija tog proteina uočena je u plazmi pacijenata u stanju teške sepse i to neposredno prije razvijanja hipotenzije, te u patofiziološkim zbivanjima tijekom infekcije mekih tkiva, a autori navode da bi upravo taj protein mogao biti dijagnostički marker i ciljna molekula liječenja (206). Proteomsko istraživanje Choija i sur. identificiralo je 305 proteina u sulkusnoj tekućini pacijenata s parodontitisom, od kojih je 45 pokazalo različitu ekspresiju u odnosu na kontrolnu skupinu (188). Azurocidin je, kao i u našem istraživanju, pokazao jaču ekspresiju kod ispitanika s parodontitisom nego kod zdravih kontrola. Iako još nema puno dokaza o povezanosti Azurocidina i parodontne upale, autori 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. Iz navedenih podataka vidljivo je da je Azurocidin protein koji bi svakako trebalo povezati s parodontitisom i označiti ga kao potencijalan biomarker za tu bolest.

Proteini koji su se također pokazali zanimljivim zbog visokih stupnjeva promjene u parodontitisu su *Myeloid cell nuclear differentiation antigen,* Apolipoprotein A-II i Prolargin. *Myeloid cell nuclear differentiation antigen* (MNDA) je protein koji je prisutan samo u stanicama granulocitne i monocitne linije, a vjeruje se da bi mogao djelovati kao transkripcijski aktivator, odnosno supresor mijeloičkih stanica (208) i da igra ulogu u staničnom odgovoru granulocita i monocita na interferon (209). U dosadašnjim proteomskim istraživanjima parodontitisa nije bio identificiran, međutim u našem istraživanju identificiran je u svim uzorcima te je pokazao statistički značajne promjene u svim ispitivanim skupinama. Najjaču ekspresiju pokazao je u parodontitisu, a budući da se monociti/makrofagi povezuju s

mehanizmima gubitka potporne kosti tijekom parodontitisa, ovaj protein svakako treba biti istaknut. Glavno obilježje upalom izazvanog gubitka kosti u parodontitisu pojačana je aktivnost osteoklasta, stanica koje nastaju iz monocita/makrofaga i koje se smatraju glavnim odgovornim stanicama za resorpciju kosti tijekom parodontitisa (210). Pri stvaranju osteoklasta posreduju različiti citokini, među kojima su najpoznatiji RANKL i faktor stimulacije makrofaga (engl. *Macrophage colony stimulating factor*, M-CSF) (211). Poznato je da u mehanizmu resorpcije kosti postoji niz kaskadnih reakcija pa bi dodatna istraživanja MNDA proteina, koji možda predstavlja sam početak tih procesa, bila potrebna za pojašnjavanje njegove uloge u parodontitisu.

Protein imena Apolipoprotein A-II (APOA2) pronađen je u svim uzorcima, a najnižu ekspresiju pokazao je u uzorcima parodontitisa. Analizom sulkusne tekućine kod modela eksperimentalnog gingivitisa spomenuti protein identificiran je samo u fazi smirivanja upale, dok u uzorcima indukcijske faze upale nije pronađen (168). Funkcija i uloga APOA2 u parodontnim bolestima još se ne zna, a identifikacija različitih apoliproteina (A1, A1.3, J, B, L) u drugim proteomskim istraživanjima parodontitisa i gingivitisa upućuje na potencijalno zanimljivu proteinsku obitelj (165, 202, 212). 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 imunološkog odgovora domaćina. Naime, istraživanje Kallioa i sur. pokazalo je da bi upala i endotoksemija kod teškog parodontitisa mogle povećati aktivaciju makrofaga posredovanu lipoproteinima i nakupljanje kolesterola u stanicama (213). Vidljivo je da postoje poveznice apolipoproteina i parodontitisa, no potrebna su daljnja istraživanja za točnije činjenice i tvrdnje.

Posljednji protein zanimljiv zbog visokog stupnja promjene u uzorcima parodontitisa je Prolargin. Njegova ekspresija karakteristična je za izvanstanični matriks vezivnog tkiva, a funkcija mu je sidrenje kolagena tipa I za bazalne membrane vezivnog tkiva (214). Ovaj protein nije posrednik upalnih ili imunoloških zbivanja, već je bitan u organizaciji vezivnog tkiva parodonta. Ekspresija Prolargina u uzorcima parodontitisa bila je jako snižena u odnosu na zdrave uzorke potvrđujući dobro znan podatak o destrukciji i razgradnji vezivnog tkiva u lezijama parodontitisa. Ubrzana razgradnja vezivnog tkiva tijekom parodontitisa može se smatrati i neuspjehom normalnih regulatornih mehanizama u održavanju molekularne organizacije izvanstaničnog matriksa (215). Tu tezu podržava i rezultat našeg istraživanja. Naime, stalna pregradnja vezivnog tkiva vjerojatno uključuje stvaranje Prolargina koji mu

pomaže u sidrenju kolagenih vlakana te mu je zbog toga pojačana ekspresija u uzorcima klinički zdrave gingive.

U ispitivanoj skupini poslije terapije zanimljivim su se pokazali *Band 3 anion transport protein*, Protein S100-A6, Prolargin, *Oligosaccharyltransferase complex subunit* i Mimecan. Od navedenih proteina posebno zanimljivim proteinom pokazao se Mimecan. Protein Mimecan, zove se još i Osteoglycin, malen je proteoglikan bogat leucinom koji vjerojatno potiče stvaranje kosti zajedno s beta 1 i 2 transformirajućim faktorima rasta (216). Povezuje ga se i s koštanim morfogenetskim proteinom-1 koji vjerojatno potiče Mimecan na stvaranje kolagenih vlakana i s lipopolisaharidima koji u hondrocitima štakora pojačavaju stvaranje Mimecana (217, 218). Stupnjevi promjena ekspresije navedenog proteina pokazali su da je ekspresija u tkivu poslije terapije oko osam puta niža nego u tkivu kontrolne skupine, oko četiri puta niža u parodontitisu i oko jedan put niža u uzorcima gingivitisa. Jasno je vidljivo da ekspresija proteina pokazuje tendenciju pada u ispitivanim skupinama, no zašto je to tako može se tek nagađati jer još ne postoje podaci o povezanosti parodontitisa i Mimecana, a i uloga i funkcija samog proteina u biološkim procesima još nisu potpuno razjašnjene.

Uzorci gingivitisa pokazali su zanimljivu ekspresiju proteina poput: *Band 3 anion transport protein*, Azurocidina, Proteina S100-A6, Multimerin-1 i *Dedicator of cytokinesis proteina 2*. *Dedicator of cytokinesis protein 2* (DOCK2) sudjeluje u preuređenju citoskeleta potrebnog za migraciju limfocita (219). U proteomskim istraživanjima parodontnih bolesti još nije bio identificiran, no budući da se njegova funkcija povezuje s limfocitima, važim stanicama parodontnih lezija, možda bi upravo praćenje ekspresije tog proteina moglo pomoći u razjašnjavanju imunoloških događaja u patogenezi parodontitisa.

Naše istraživanje otkrilo je i pojačanu ekspresiju Histona H4 i H2A u uzorcima parodontitisa. Histoni su jezgreni proteini koji igraju ulogu u mnogobrojnim biološkim procesima, npr. apoptozi, antimikrobnom djelovanju, organizaciji strukture DNA, regulaciji transkripcije, popravcima i replikaciji DNA, te u stabilizaciji kromosoma. Povišene razine histona zabilježene su u serumu osoba s traumatskim ozljedama i sepsom (220), a u proteomskom istraživanju eksperimentalnoga gingivitisa histoni su pokazali slabiju ekspresiju pri kraju rezolucijskog perioda (167). Pojačana ekspresija histona u uzorcima parodontitisa našeg istraživanja mogla bi upućivati na povezanost tih proteina s bakterijskom aktivnosti, te su svakako potrebna daljnja istraživanja koja bi objasnila njihovu ulogu u parodontitisu.

Kao i druga proteomska istraživanja, ni naše istraživanje nije identificiralo citokine poznate da sudjeluju u patogenezi parodontne bolesti (167, 168, 202). Razlog tome mogao bi biti u činjenici da su citokini prisutni u rasponu pikograma/mililitru i da ih zaklanjaju veći proteini prisutni u mikrogramima/mililitru, primjerice albumin. Kako bi se nadvladali ovi problemi identifikacije proteina, potrebne su nove metode pripreme uzoraka, prikupljanja podataka i novi analitički koraci koji se koriste analitičkim algoritmima potrebnima za poticanje otkrivanja proteina i pretvorbu detektiranih signala u identificiranu molekulu. Osim toga, korištenjem sadašnjih tehnologija za analizu većeg broj uzoraka trebat će mjeseci ili godine kako bi se diferencirali proteini vezani za bolesti od varijacija humanih uzoraka (221, 222).

Naše je istraživanje po prvi put prikazalo usporedbu ekspresije proteina u uzorcima epitelnog i vezivnog parodontnog tkiva zdravih ispitanika i pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom. Rezultati pokazuju širok spektar proteina koji bi mogli pridonijeti razumijevanju patoloških promjena koje se događaju tijekom parodontitisa, 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. ZAKLJUČCI

Zaključci ovog istraživanja su sljedeći:

1. *Label-free* LC-MS/MS tehnologija korištena za identifikaciju i kvantifikaciju proteina epitelnog i vezivnog tkiva parodonta kod pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom i zdravih kontrola pokazala se kao dobra metoda izbora za proteomsku analizu parodontnog tkiva.

2. Proteini koji bi se mogli povezivati s parodontnim zdravljem su: Multimerin-1, Prolargin, Protein S100-A6, *HLA class II histocompatibility antigen gamma chain protein, 14-3-3 protein gamma* i *Annexin A4, A5* te *Isoform A2.*

3. Stanje gingivitisa obilježavaju proteini: *Dedicator of cytokinesis protein 2,* Azurocidin i *Band 3 anion transport protein.*

4. U uzorcima parodontitisa najzanimljivijim proteinima pokazali su se: imunoglobulini (*Ig gamma-4 chain C region, Ig kappa chain C region, Ig kappa chain V-III region SIE i Ig kappa chain V-IV region Len*), Histoni H4 i H2A, Azurocidin i *Myeloid cell nuclear differentiation antigen.*

5. Proteini *Band 3 anion transport protein, Oligosaccharyltransferase complex subunit* i Mimecan pokazali su najzanimljivije ponašanje u ispitivanoj skupini poslije terapije.

6. Azurocidin bi se mogao izdvojiti kao najzanimljiviji protein ovog istraživanja i mogući biomarker parodontitisa. Razlog tome je izuzetno visok stupanj promjene ekspresije u uzorcima gingivitisa i parodontitisa u odnosu na kontrolnu skupinu.

7. Multimerin-1 bio mogao biti protein čija ekspresija obilježava zdrav parodont.

8. S100 obitelj proteina, aneksini i histoni pokazuju zanimljivo ponašanje u našem istraživanju i u drugim proteomskim istraživanjima parodontnih bolesti, te se time ističu kao proteini koji bi mogli biti potencijalni biomarkeri parodontnih bolesti.

7. LITERATURA

1. Lindhe J, Karring T, Araujo M. The anatomy of periodontal tissues. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, editors. Clinical periodontology and implant dentistry. 5th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 3-50.

2. Ainamo J, Talari A. The increase with age of the width of attached gingiva. J Periodontal Res. 1976 Jul;11(4):182-8.

3. Ainamo J, Loe H. Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. J Periodontol. 1966 Jan-Feb;37(1):5-13.

4. Gargiulo AW, Wentz FM, Orban B. Dimensions and relations of the dentogingival junction in humans. J Periodontol. 1961;32(3):1.

5. Bowers GM, Moffitt WC, Williams JE, Jr. Tooth position and the periodontium. Dent Clin North Am. 1972 Jul;16(3):597-602.

6. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. Periodontol 2000. 1997 Feb;13:91-120.

7. Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. J Dent Res. 2005 Jan;84(1):9-20.

8. Schroeder HE. Ultrastructure of the junctional epithelium of the human gingiva. Helv Odontol Acta. 1969 Oct;13(2):65-83.

9. Schiott CR, Loe H. The origin and variation in number of leukocytes in the human saliva. J Periodontal Res. 1970;5(1):36-41.

10. Schroeder HE. Transmigration and infiltration of leucocytes in human junctional epithelium. Helv Odontol Acta. 1973 Apr;17(1):6-18.

11. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2002;42:283-323.

12. Graber HG, Conrads G, Wilharm J, Lampert F. Role of interactions between integrins and extracellular matrix components in healthy epithelial tissue and establishment of a long junctional epithelium during periodontal wound healing: a review. J Periodontol. 1999 Dec;70(12):1511-22.

13. Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA. Structure and functions of classical cadherins. Biochemistry (Mosc). 2001 Oct;66(10):1174-86.

14. Ye P, Chapple CC, Kumar RK, Hunter N. Expression patterns of E-cadherin, involucrin, and connexin gap junction proteins in the lining epithelia of inflamed gingiva. J Pathol. 2000 Sep;192(1):58-66.

15. Heymann R, Wroblewski J, Terling C, Midtvedt T, Obrink B. The characteristic cellular organization and CEACAM1 expression in the junctional epithelium of rats and mice are genetically programmed and not influenced by the bacterial microflora. J Periodontol. 2001 Apr;72(4):454-60.

16. Singer BB, Scheffrahn I, Obrink B. The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. Cancer Res. 2000 Mar 1;60(5):1236-44.

17. Kammerer R, Hahn S, Singer BB, Luo JS, von Kleist S. Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. Eur J Immunol. 1998 Nov;28(11):3664-74.

18. Hauck CR, Meyer TF, Lang F, Gulbins E. CD66-mediated phagocytosis of Opa52 Neisseria gonorrhoeae requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. EMBO J. 1998 Jan 15;17(2):443-54.

19. Crawford JM. Distribution of ICAM-1, LFA-3 and HLA-DR in healthy and diseased gingival tissues. J Periodontal Res. 1992 Jul;27(4 Pt 1):291-8.

20. Crawford JM, Hopp B. Junctional epithelium expresses the intercellular adhesion molecule ICAM-1. J Periodontal Res. 1990 Jul;25(4):254-6.

21. Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. J Periodontol. 1998 Oct;69(10):1139-47.

22. Tonetti MS, Gerber L, Lang NP. Vascular adhesion molecules and initial development of inflammation in clinically healthy human keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. J Periodontal Res. 1994 Nov;29(6):386-92.

23. Miyauchi M, Sato S, Kitagawa S, Hiraoka M, Kudo Y, Ogawa I, et al. Cytokine expression in rat molar gingival periodontal tissues after topical application of lipopolysaccharide. Histochem Cell Biol. 2001 Jul;116(1):57-62.

24. Nordlund L, Hormia M, Saxen L, Thesleff I. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptors in human gingival epithelia. J Periodontal Res. 1991 Jul;26(4):333-8.

25. Uitto VJ, Salonen JI, Firth JD, Jousimies-Somer H, Saarialho-Kere U. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) expression in human junctional epithelium. J Dent Res. 2002 Apr;81(4):241-6.

26. Schmid J, Cohen RL, Chambers DA. Plasminogen activator in human periodontal health and disease. Arch Oral Biol. 1991;36(3):245-50.

27. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. Periodontol 2000. 2002;30:70-8.

28. Pollanen MT, Salonen JI, Uitto VJ. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. Periodontol 2000. 2003;31:12-31.

29. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. Periodontol 2000. 2000 Oct;24:9-27.

30. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. Periodontol 2000. 2000 Oct;24:28-55.

31. McCulloch CA, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. Periodontol 2000. 2000 Oct;24:56-72.

32. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. Periodontol 2000. 2000 Oct;24:73-98.

33. McKee MD, Zalzal S, Nanci A. Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. Anat Rec. 1996 Jun;245(2):293-312.

34. Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. Anat Rec. 1996 Jun;245(2):267-92.

35. Saito M, Narayana AS. Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. J Bone Miner Res. 1999 Jan;14(1):65-72.

36. Ikezawa K, Hart CE, Williams DC, Narayanan AS. Characterization of cementum derived growth factor as an insulin-like growth factor-I like molecule. Connect Tissue Res. 1997;36(4):309-19.

37. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. Periodontol 2000. 2000 Oct;24:99-126.

38. Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Akamine A, et al. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. J Periodontal Res. 2004 Feb;39(1):42-9.

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

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

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

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

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

44. Hock J, Niki K. A vital microscopy study of the morphology of normal and inflamed gingiva. J Periodontal Res. 1971;6(2):81-8.

45. Attstrom R, Egelberg J. Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. J Periodontal Res. 1970;5(1):48-55.

46. Lindhe J, Rylander H. Experimental gingivitis in young dogs. Scand J Dent Res. 1975 Nov;83(6):314-26.

47. Seymour GJ, Powell RN, Cole KL, Aitken JF, Brooks D, Beckman I, et al. Experimental gingivitis in humans. A histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulations. J Periodontal Res. 1983 Jul;18(4):375-85.

48. Schroeder HE. Quantitative parameters of early human gingival inflammation. Arch Oral Biol. 1970 May;15(5):383-400.

49. Hancock EB, Cray RJ, O'Leary TJ. The relationship between gingival crevicular fluid and gingival inflammation. A clinical and histologic study. J Periodontol. 1979 Jan;50(1):13-9.

50. Lindhe J, Parodi R, Liljenberg B, Fornell J. Clinical and structural alterations characterizing healing gingiva. J Periodontal Res. 1978 Sep;13(5):410-24.

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

52. Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. J Int Acad Periodontol. 2005 Jan;7(1):3-7.

53. Miyasaki KT. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. J Periodontol. 1991 Dec;62(12):761-74.

54. Hellden L, Ericson T, Lindhe J. Neutrophil chemotactic substances in different fractions of soluble dental plaque material. Scand J Dent Res. 1973;81(4):276-84.

55. Tempel TR, Snyderman R, Jordan HV, Mergenhagen SE. Factors from saliva and oral bacteria, chemotactic for polymorphonuclear leukocytes: their possible role in gingival inflammation. J Periodontol. 1970 Feb;41(2):71-80.

56. Anderson DC, Schmalsteig FC, Finegold MJ, Hughes BJ, Rothlein R, Miller LJ, et al. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative

definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. J Infect Dis. 1985 Oct;152(4):668-89.

57. Van Dyke TE, Vaikuntam J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. Curr Opin Periodontol. 1994:19-27.

58. Albandar JM, DeNardin AM, Adesanya MR, Diehl SR, Winn DM. Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. J Periodontol. 2001 Nov;72(11):1463-9.

59. Ebersole JL. Systemic humoral immune responses in periodontal disease. Crit Rev Oral Biol Med. 1990;1(4):283-331.

60. Mouton C, Hammond PG, Slots J, Genco RJ. Serum antibodies to oral Bacteroides asaccharolyticus (Bacteroides gingivalis): relationship to age and periondontal disease. Infect Immun. 1981 Jan;31(1):182-92.

61. Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. Periodontol 2000. 2006;40:77-93.

62. Gunsolley JC, Burmeister JA, Tew JG, Best AM, Ranney RR. Relationship of serum antibody to attachment level patterns in young adults with juvenile periodontitis or generalized severe periodontitis. J Periodontol. 1987 May;58(5):314-20.

63. Darby IB, Mooney J, Kinane DF. Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. J Clin Periodontol. 2001 Aug;28(8):796-805.

64. Vankeerberghen A, Nuytten H, Dierickx K, Quirynen M, Cassiman JJ, Cuppens H. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. J Periodontol. 2005 Aug;76(8):1293-303.

65. Lu Q, Jin L, Darveau RP, Samaranayake LP. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. J Periodontal Res. 2004 Aug;39(4):221-7.

66. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray PB, Jr., et al. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. J Oral Pathol Med. 2004 May;33(5):278-85.

67. Lah TT, Babnik J, Schiffmann E, Turk V, Skaleric U. Cysteine proteinases and inhibitors in inflammation: their role in periodontal disease. J Periodontol. 1993 May;64(5 Suppl):485-91.

68. McCulloch CA. Host enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. J Clin Periodontol. 1994 Aug;21(7):497-506.

69. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med. 1989 Feb 9;320(6):365-76.

70. Kantarci A, Oyaizu K, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. J Periodontol. 2003 Jan;74(1):66-75.

71. Hellden L, Lindhe J. Enhanced emigration of crevicular leukocytes mediated by factors in human dental plaque. Scand J Dent Res. 1973;81(2):123-9.

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

73. Goodson JM, Dewhirst FE, Brunetti A. Prostaglandin E2 levels and human periodontal disease. Prostaglandins. 1974 Apr 10;6(1):81-5.

74. Offenbacher S, Farr DH, Goodson JM. Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. J Clin Periodontol. 1981 Aug;8(4):359-67.

75. Offenbacher S, Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Odle BM, Smith MA, et al. Effects of NSAIDs on beagle crevicular cyclooxygenase metabolites and periodontal bone loss. J Periodontal Res. 1992 May;27(3):207-13.

76. Zhou J, Zou S, Zhao W, Zhao Y. Prostaglandin E2 level in gingival crevicular fluid and its relation to the periodontal pocket depth in patients with periodontitis. Chin Med Sci J. 1994 Mar;9(1):52-5.

77. Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(4):237-52.

78. Yamazaki K, Yoshie H, Seymour GJ. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. Histol Histopathol. 2003 Jul;18(3):889-96.

79. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? Acta Odontol Scand. 2001 Jun;59(3):167-73.

80. Jankovic D, Liu Z, Gause WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. Trends Immunol. 2001 Aug;22(8):450-7.

81. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol. 2003 Dec;3(12):984-93.

82. Kikuchi T, Hahn CL, Tanaka S, Barbour SE, Schenkein HA, Tew JG. Dendritic cells stimulated with Actinobacillus actinomycetemcomitans elicit rapid gamma interferon responses by natural killer cells. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5089-96.

83. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(1):17-34.

84. Lu H, Wang M, Gunsolley JC, Schenkein HA, Tew JG. Serum immunoglobulin G subclass concentrations in periodontally healthy and diseased individuals. Infect Immun. 1994 May;62(5):1677-82.

85. Tanaka S, Barbour SE, Best AM, Schenkein HA, Tew JG. Prostaglandin E2-mediated regulation of immunoglobulin G2 via interferon gamma. J Periodontol. 2003 Jun;74(6):771-9.

86. Diehl SR, Wu T, Burmeister JA, Califano JV, Brooks CN, Tew JG, et al. Evidence of a substantial genetic basis for IgG2 levels in families with aggressive periodontitis. J Dent Res. 2003 Sep;82(9):708-12.

87. Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. Microbes Infect. 2009 Apr;11(5):625-30.

88. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity. 2006 Jun;24(6):677-88.

89. Lund FE, Garvy BA, Randall TD, Harris DP. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. Curr Dir Autoimmun. 2005;8:25-54.

90. Porakishvili N, Mageed R, Jamin C, Pers JO, Kulikova N, Renaudineau Y, et al. Recent progress in the understanding of B-cell functions in autoimmunity. Scand J Immunol. 2001 Jul-Aug;54(1-2):30-8.

91. Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. J Dent Res. 1998 Jan;77(1):16-26.

92. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. Annu Rev Immunol. 2012;30:221-41.

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

94. Wilson ME, Bronson PM, Hamilton RG. Immunoglobulin G2 antibodies promote neutrophil killing of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun. 1995 Mar;63(3):1070-5.

95. Papapanou PN, Neiderud AM, Disick E, Lalla E, Miller GC, Dahlen G. Longitudinal stability of serum immunoglobulin G responses to periodontal bacteria. J Clin Periodontol. 2004 Nov;31(11):985-90.

96. Johnson V, Johnson BD, Sims TJ, Whitney CW, Moncla BJ, Engel LD, et al. Effects of treatment on antibody titer to Porphyromonas gingivalis in gingival crevicular fluid of patients with rapidly progressive periodontitis. J Periodontol. 1993 Jun;64(6):559-65.

97. Hagewald SJ, Fishel DL, Christan CE, Bernimoulin JP, Kage A. Salivary IgA in response to periodontal treatment. Eur J Oral Sci. 2003 Jun;111(3):203-8.

98. Reiff RL. Serum and salivary IgG and IgA response to initial preparation therapy. J Periodontol. 1984 May;55(5):299-305.

99. Berglundh T, Liljenberg B, Tarkowski A, Lindhe J. The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis. J Clin Periodontol. 2002 Apr;29(4):281-6.

100. Afar B, Engel D, Clark EA. Activated lymphocyte subsets in adult periodontitis. J Periodontal Res. 1992 Mar;27(2):126-33.

101. Kowashi Y, Jaccard F, Cimasoni G. Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man. Arch Oral Biol. 1979;24(9):645-50.

102. Ohlsson K, Olsson I, Tynelius-Bratthall G. Neutrophil leukocyte collagenase, elastase and serum protease inhibitors in human gingival crevicles. Acta Odontol Scand. 1974;32(1):51-9.

103. Haerian A, Adonogianaki E, Mooney J, Manos A, Kinane DF. Effects of treatment on gingival crevicular collagenase, stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases and their ability to predict response to treatment. J Clin Periodontol. 1996 Feb;23(2):83-91.

104. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. Oral Dis. 2004 Nov;10(6):311-8.

105. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. Ann Med. 2006;38(5):306-21.

106. 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 Jun;36(6):458-67.

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

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

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

110. Barnett ML, Baker RL, Yancey JM. The prevalence of juvenile periodontitis ("periodontosis") in a dental school patient population. J Dent Res. 1982 Feb;61(2):391-2.

111. Harley AF, Floyd PD. Prevalence of juvenile periodontitis in schoolchildren in Lagos, Nigeria. Community Dent Oral Epidemiol. 1988 Oct;16(5):299-301.

112. Levin L, Baev V, Lev R, Stabholz A, Ashkenazi M. Aggressive periodontitis among young Israeli army personnel. J Periodontol. 2006 Aug;77(8):1392-6.

113. Saxen L. Prevalence of juvenile periodontitis in Finland. J Clin Periodontol. 1980 Jun;7(3):177-86.

114. Melvin WL, Sandifer JB, Gray JL. The prevalence and sex ratio of juvenile periodontitis in a young racially mixed population. J Periodontol. 1991 May;62(5):330-4.

115. Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. Periodontol 2000. 2010 Jun;53:28-44.

116. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol. 1992 Apr;63(4 Suppl):322-31.

117. Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. Infect Immun. 1980 Sep;29(3):1013-20.

118. Zambon JJ, Umemoto T, De Nardin E, Nakazawa F, Christersson LA, Genco RJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans in the pathogenesis of human periodontal disease. Adv Dent Res. 1988 Nov;2(2):269-74.

119. Genco RJ, Zambon JJ, Murray PA. Serum and gingival fluid antibodies as adjuncts in the diagnosis of Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated periodontal disease. J Periodontol. 1985 Nov;56(11 Suppl):41-50.

120. Haffajee AD, Socransky SS, Ebersole JL, Smith DJ. Clinical, microbiological and immunological features associated with the treatment of active periodontosis lesions. J Clin Periodontol. 1984 Oct;11(9):600-18.

121. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Periodontol 2000. 1999 Jun;20:136-67.

122. Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen Actinobacillus actinomycetemcomitans. Annu Rev Microbiol. 2003;57:29-55.

123. Kachlany SC, Fine DH, Figurski DH. Secretion of RTX leukotoxin by Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun. 2000 Nov;68(11):6094-100.

124. Shah HN, Gharbia SE. Biochemical and chemical analyses of black-pigmented gram-negative anaerobes. FEMS Immunol Med Microbiol. 1993 Mar;6(2-3):89-96.

125. Murray PA, Burstein DA, Winkler JR. Antibodies to Bacteroides gingivalis in patients with treated and untreated periodontal disease. J Periodontol. 1989 Feb;60(2):96-103.

126. Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, Frey DE. Human immune responses to oral microorganisms: patterns of systemic antibody levels to Bacteroides species. Infect Immun. 1986 Feb;51(2):507-13.

127. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of Porphyromonas gingivalis. Periodontol 2000. 1999 Jun;20:168-238.

128. Dorn BR, Dunn WA, Jr., Progulske-Fox A. Bacterial interactions with the autophagic pathway. Cell Microbiol. 2002 Jan;4(1):1-10.

129. Yilmaz O, Verbeke P, Lamont RJ, Ojcius DM. Intercellular spreading of Porphyromonas gingivalis infection in primary gingival epithelial cells. Infect Immun. 2006 Jan;74(1):703-10.

130. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. Genes Dev. 2005 Nov 15;19(22):2645-55.

131. Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles. Microb Pathog. 2004 Jun;36(6):319-25.

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

133. 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.

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

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

136. Hausmann E, Raisz LG, Miller WA. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. Science. 1970 May 15;168(3933):862-4.

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

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

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

140. 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 Mar;20(3):225-31.

141. 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 Oct;64(10):980-3.

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

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

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

145. 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 Mar;21(2):101-12.

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

147. 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 Apr 1;77(7):2187-200.

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

149. 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 Dec;6(12):4549-55.

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

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

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

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

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

155. 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 Sep;268(17):4748-57.

156. 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 Apr;24(7-8):1292-310.

157. 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 May;25(9):1342-52.

158. 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 Apr 23;564(1-2):166-70.

159. 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 Jan;39(1):80-90.

160. 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 Apr;114(2):147-53.

161. 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 Mar-Apr;4(2):55-64.

162. 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 Jul;56(7):2216-22.

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

164. 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 Apr 5;9(4):1683-93.

165. 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 May 7;9(5):2191-9.

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

167. 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 Sep 3;9(9):4732-44.

168. 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 Jan 4.

169. Aitken A, Learmonth MP. Protein Determination by UV Absorption. In: Walker JM, editor. The Protein Protocols Handbook. 2nd ed: Humana Press; 2002. p. 3-6.

170. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc. 2006;1(6):2856-60.

171. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. Nat Protoc. 2007;2(8):1896-906.

172. Gatlin CL, Kleemann GR, Hays LG, Link AJ, Yates JR, 3rd. Protein identification at the low femtomole level from silver-stained gels using a new fritless electrospray interface for liquid chromatography-microspray and nanospray mass spectrometry. Anal Biochem. 1998 Oct 1;263(1):93-101.

173. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol. 2008 Dec;26(12):1367-72.

174. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009;4(1):44-57.

175. Brown LJ, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. Periodontol 2000. 1993 Jun;2:57-71.

176. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. J Dent Res. 2012 Oct;91(10):914-20.

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

178. 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.

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

180. 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 Mar;1098:216-29.

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

182. 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 Mar;42(5):575-9.

183. 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 Jun;20(3):186-90.

184. 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 Feb;40(2):131-9.

185. 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 Apr;47(2):248-62.

186. 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 Oct;44(5):636-44.

187. Jeimy SB, Tasneem S, Cramer EM, Hayward CP. Multimerin 1. Platelets. 2008 Mar;19(2):83-95.

188. 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.

189. 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 Oct 1;322(4):1111-22.

190. Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. Biochem Pharmacol. 2006 Nov 30;72(11):1622-31.

191. 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 Jun;26(6):753-60.

192. Balluff B, Rauser S, Meding S, Elsner M, Schone C, Feuchtinger A, et al. MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer. Am J Pathol. 2011 Dec;179(6):2720-9.

193. Nipp M, Elsner M, Balluff B, Meding S, Sarioglu H, Ueffing M, et al. S100-A10, thioredoxin, and S100-A6 as biomarkers of papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis identified by MALDI imaging. J Mol Med (Berl). 2012 Feb;90(2):163-74.

194. Calvo FQ, Fillet M, de Seny D, Meuwis MA, Maree R, Crahay C, et al. Biomarker discovery in asthma-related inflammation and remodeling. Proteomics. 2009 Apr;9(8):2163-70.

195. Borghese F, Clanchy FI. CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease. Expert Opin Ther Targets. 2011 Mar;15(3):237-51.

196. Shan ZX, Lin QX, Deng CY, Tan HH, Kuang SJ, Xiao DZ, et al. [Identification of the interactions between the truncated fragments of macrophage migration inhibitory factor and CD74 using a yeast two-hybrid system]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2009 Dec;29(12):2383-6, 90.

197. Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. Microbes Infect. 2002 Apr;4(4):449-60.

198. Lin X, Sakuragi T, Metz CN, Ojamaa K, Skopicki HA, Wang P, et al. Macrophage migration inhibitory factor within the alveolar spaces induces changes in the heart during late experimental sepsis. Shock. 2005 Dec;24(6):556-63.

199. Morimoto T, Nishihira J, Kohgo T. Immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human gingival tissue and its pathophysiological functions. Histochem Cell Biol. 2003 Oct;120(4):293-8.

200. Li X, Lan HY, Huang XR, Zhang C, Jin LJ. Expression profile of macrophage migration-inhibitory factor in human gingiva and reconstituted human gingival epithelia stimulated by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. J Periodontal Res. 2013 Jan 9.

201. 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 Jul;18(7):555-64.

202. 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 Mar;39(3):203-12.

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

204. Yang Y, Hutchinson P, Morand EF. Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. Arthritis Rheum. 1999 Jul;42(7):1538-44.

205. Damazo AS, Yona S, D'Acquisto F, Flower RJ, Oliani SM, Perretti M. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. Am J Pathol. 2005 Jun;166(6):1607-17.

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

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

208. Burrus GR, Briggs JA, Briggs RC. Characterization of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen: relationship to interferon-inducible proteins. J Cell Biochem. 1992 Feb;48(2):190-202.

209. Briggs R, Dworkin L, Briggs J, Dessypris E, Stein J, Stein G, et al. Interferon alpha selectively affects expression of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen in late stage cells in the monocytic but not the granulocytic lineage. J Cell Biochem. 1994 Feb;54(2):198-206.

210. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003 May 15;423(6937):337-42.

211. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. Periodontol 2000. 2010 Jun;53:55-69.

212. Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Kawashima Y, Kado S, et al. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. Proteomics. 2012 Jul;12(13):2190-202.

213. 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 Dec 3.

214. Lewis M. PRELP, collagen, and a theory of Hutchinson-Gilford progeria. Ageing Res Rev. 2003 Jan;2(1):95-105.

215. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. Periodontol 2000. 1997 Jun;14:144-57.

216. Hamajima S, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tagawa T, Kawahara M, Ohta M, et al. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. Lasers Med Sci. 2003;18(2):78-82.

217. Haglund L, Bernier SM, Onnerfjord P, Recklies AD. Proteomic analysis of the LPS-induced stress response in rat chondrocytes reveals induction of innate immune response components in articular cartilage. Matrix Biol. 2008 Mar;27(2):107-18.

218. Ge G, Seo NS, Liang X, Hopkins DR, Hook M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1/tolloid-related metalloproteinases process osteoglycin and enhance its ability to regulate collagen fibrillogenesis. J Biol Chem. 2004 Oct 1;279(40):41626-33.

219. Fukui Y, Hashimoto O, Sanui T, Oono T, Koga H, Abe M, et al. Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. Nature. 2001 Aug 23;412(6849):826-31.

220. Margraf S, Logters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. Shock. 2008 Oct;30(4):352-8.

221. Veenstra TD. Where are all the biomarkers? Expert Rev Proteomics. 2011 Dec;8(6):681-3.

222. Lubec G, Afjehi-Sadat L. Limitations and pitfalls in protein identification by mass spectrometry. Chem Rev. 2007 Aug;107(8):3568-84.

8. ŽIVOTOPIS

Ana Badovinac rođena je 13. listopada 1982. u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu Ivana Gorana Kovačića 1997., te V. gimnaziju 2001. Godine 2001. 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. Državni ispit položila je 2009.

U travnju 2009. počinje raditi na Zavodu za parodontologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine upisuje poslijediplomski doktorski studij. 2010. počinje specijalizaciju iz parodontologije te upisuje poslijediplomski specijalistički studij Dentalne medicine. Autorica je i koautorica nekoliko znanstvenih i stručnih radova. Aktivno je sudjelovala na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima i kongresima. Služi se engleskim i talijanskim jezikom. Majka je jednog djeteta.

Popis objavljenih radova

1. Badovinac A, Razdorov G, Grgurević L, Puhar I, Plančak D, Božić D. The application of LC-MS/MS technology for proteomic analysis of gingival tissue: a pilot study. Acta Stomatol Croat. 2013;47(1):10-20.

2. Badovinac A, Božić D, Vučinac I, Vešligaj J, Vražić D, Plančak D. Oral health attitudes and behavior of dental students at the University of Zagreb, Croatia. J Dent Educ. 2013;77(9):1171-8.

Kongresna priopćenja

1. Badovinac A, Božić D, Vešligaj J, Vučinac I, Vražić D, Plančak D. Preclinical and clinical differences in oral health attitudes and behaviour of dental students in Zagreb, Croatia. J Clin Periodontol. 2012;39 Suppl 13:152.

2. Bradvica I, Badovinac A, Brailo V, Vučičević-Boras V, Božić D, Puhar I, Andabak-Rogulj A, Ladika-Davidović B. Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2012;39 Suppl 13:97.

3. Božić D, Badovinac A, Puhar I, Vražić D, Plančak D. Horizontal ridge augmentation utilizing platelet derived growth factor (rhPDGF-BB) and demineralized bovine bone graft without the use of membranes. J Clin Periodontol. 2012;39 Suppl 13:217.

4. Vražić D, Čimić S, Kraljević-Šimunković S, Puhar I, Božić D, Badovinac A, Plančak D. Impact of occlusal scheme on gingival recession – a pilot study. J Clin Periodontol. 2012;39 Suppl 13:154.

5. Paliska J, Par M, Kovačević A, Sabalić M, Badovinac A, Plančak D. Oral hygiene practice in Croatian intensive care units. J Clin Periodontol. 2012;39 Suppl 13:160.

6. Lončar S, Puhar I, Štrkalj-Ivezić S, Srdjak S, Vražić D, Badovinac A, Božić D. Periodontal status in patient with posttraumatic stress disorder. J Clin Periodontol. 2012;39 Suppl 13:281-2.

7. Puhar I, Lovrenčić-Huzjan A, Šodec-Šimičević D, Strineka M, Badovinac A, Vražić D, Božić D, Illeš D, Plančak D, Demarin V. Arterial elastic properties in chronic periodontitis patients. J Clin Periodontol. 2012;39 Suppl 13:68-9.

8. Badovinac A, Božić D, Vražić D, Puhar I, Plančak D. Self-Reported Oral Hygiene Habits of Patients Referred to the Periodontist. J Dent Res. 2011;90 Spec Iss A:2714.

9. Božić D, Vražić D, Puhar I, Badovinac A, Plančak D. Hydrogel Containing Type-I Collagen and VEGF in Treating Intrabony Defects. J Dent Res. 2011;90 Spec Iss A:2842.

10. Božić D, Badovinac A, Vražić D, Puhar I, Plančak D. Augmentacija bezubog grebena pomoću trombocitnog faktora rasta (rhPDGF-bb) i govođe demineralizirane kosti. Acta Stomatol Croat. 2011;45(2):149.

11. Božić D, Vražić D, Badovinac A, Puhar I, Plančak D. Terapija intrakoštanog defekta s humanim trombocitnim čimbenikom rasta i beta trikalcijevim fosfatom. Acta Stomatol Croat. 2011;45(2):147.

12. Badovinac A, Vražić D, Puhar I, Božić D, Plančak D. Use of antiseptic mouthwashes in patients reffered to the periodontist. Periodicum Biol. 2010;112 Suppl 1:111.

13. Brailo V, Badovinac A, Vučićević-Boras V, Božić D, Vidović Juras D, Andabak A, Cigić L, Lukač J. Salivary cytokines as possible biomarkers of periodontal disease. Oral Dis. 2010; 16(6):528.

14. Puhar I, Badovinac A, Vražić D, Plančak D. Protetski aspekti biološke širine. Acta Stomatol Croat. 2009;43(4):355.