

# Proteomika u istraživanjima parodontnih bolesti

Janja Barun<sup>1</sup>

doc. dr. sc. Ana Badovinac<sup>2</sup>

[1] studentica pete godine

[2] Zavod za parodontologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

## Parodontne bolesti

Upalne parodontne bolesti jedne su od najčešćih bolesti ljudskog organizma, a nastaju kao imunološki odgovor organizma na mikroorganizme biofilma na površini zuba i njihove produkte (1, 2). Variraju od relativno benignih oblika bolesti potpornog zubnog tkiva pod nazivom gingivitis, pa sve do agresivnog i kroničnog parodontitisa koji ne samo da mogu uzrokovati gubitak zubi, već predstavljaju prijetnju cjelokupnom zdravlju organizma (3). Postavljanje dijagnoze i utvrđivanje opsega bolesti temelji se na kliničkom pregledu pacijenta i analizi rendgenskih snimaka. Mjerenje parodontoloških parametara i indeksa kao što su dubina sondiranja, recesija gingive, krvarenje pri sondiranju i prisutnost zubnog plaka sastavni su dio parodontološkog pregleda pacijenta (4).

Upotreba novih analitičkih tehnologija u istraživanjima parodontnih bolesti mogla bi dovesti do pronalaska biomarkera i tako omogućiti otkrivanje osoba s rizikom od razvoja parodontnih bolesti, rano postavljanje dijagnoze te razlikovanje bolesnoga odnosno zdravoga parodonta (5).

## Proteomika

Proteini su složene makromolekule koje obavljaju niz važnih uloga u organizmu. Sudjeluju u strukturnoj izgradnji, metaboličkim procesima i prijenosu signala. Naziv protein dolazi od grčke riječi proteios što znači primaran, najvažniji (6). Svi proteini koji se ekspimiraju u organizmu, uključujući i njihove izmjene tijekom vremena te u različitim okolnostima kroz koje stanica odnosno organizam prolazi, čine proteom (7). Proteomika proučava cjelokupni set proteina nekog organizma, opisuje njihovu zastupljenost, posttranslacijske modifikacije određenog proteina, distribuciju, funkciju i interakciju s ostalim makromolekulama (8).

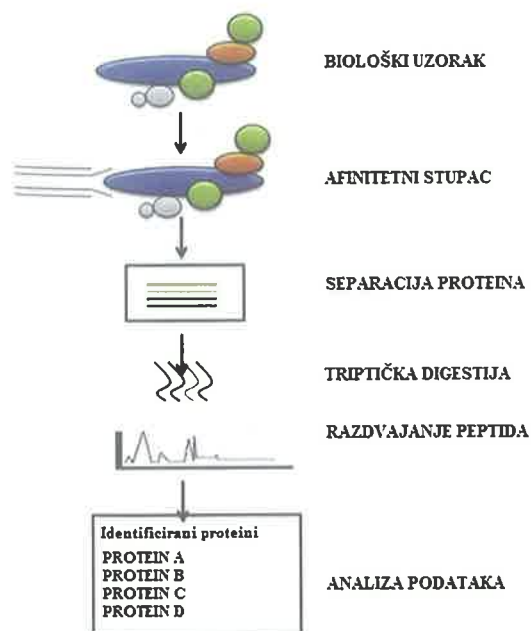
Proteomska istraživanja provode se pomoću različitih tehnoloških i metodoloških pristupa, međutim, ne postoji nijedna tehnologija koja bi bila prikladna za jedinstvenu primjenu. Iako se pristup u pripremi i analizi uzoraka razlikuje od istraživanja do istraživanja svima im je zajednički niz koraka koji bi se mogli podijeliti u tri glavne cjeline: priprema uzorka, analiza uzorka u masenom spektrometru i obrada podataka (9). Prvi korak pripreme uzorka je frakcioniranje, tj. rastavljanje

uzorka na sastavne dijelove. Zatim slijedi separacija proteina, najčešće dvodimenzionalnom poliakrilamidnom gel elektroforezom. Tim postupkom temeljem razlika u molekularnoj masi i izoelektričnoj točki pojedinih proteina dolazi do njihovog razdvajanja u uzorku. Prije unošenja uzorka u maseni spektrometar proteini se tripsitičkom digestijom rastavljaju na peptide. Peptidi ulaze u maseni spektrometar gdje slijedi njihova detekcija, identifikacija i kvantifikacija. Računalo spojeno na maseni spektrometar vrši identifikaciju proteina pomoću različitih programa za obradu podataka (Slika 1) (10,11).

## Proteomska istraživanja parodontnih bolesti

Tijekom posljednja dva desetljeća u stomatologiji su provedena brojna proteomska istraživanja u svrhu detaljnijeg razumijevanja fizioloških i patofizioloških procesa u usnoj šupljini. Analizirani su proteomi stanica, primjerice fibroblasta i cementoblasta, kao i pojedinih mikroorganizama te njihovih interakcija u subgingivnom biofilmu (12,13). Također su istraživane bolesti zuba i usne šupljine kao što su karijes, Sjögrenov sindrom, oralni karcinomi te parodontne bolesti (14,15,16).

Kod parodontnih bolesti analizirane su proteinske ekspresije prije i poslije terapije kroničnog parodontitisa te proteomi pacijenata u fazi održavanja (17,18). Također su uspoređivani proteomi zdravih pojedina s osobama oboljelim od agresivnog parodontitisa (19). Posebno su zanimljiva istraživanja proteina u eksperimentalno izazvanom gingivitisu. Grant i sur. uspoređivali su uzorke sulkusne tekućine tijekom razvoja i smirivanja gingivitisa u želji da se identificiraju novi proteini i upalni markeri parodontnih bolesti. U navedenom istraživanju eksperimentalno izazvanog



Slika 1. Osnovni koraci obrade uzoraka za masenu spektrometriju. Priprema uzorka, separacija proteina, tripsitička digestija, razdvajanje peptida i analiza podataka. Preuzeto iz (9).

gingivitis identificirano je 186 ljudskih i 16 bakterijskih proteina, no autori se nisu odlučili istaknuti imena potencijalnih biomarkera, već su zaključili da su potrebna daljnja istraživanja u tom području s većim brojem pacijenata, odnosno uzoraka (16).

U istraživanjima parodontnih bolesti pretežito su analizirani uzorci sulkusne tekućine i sline, međutim, postoje i drugi biološki uzorci koji se mogu upotrijebiti kao što su krv, biopsijski uzorci tkiva i mikroorganizmi (Slika 2) (5). Neinvazivni postupci uzorkovanja sulkusne tekućine i sline čine ih pogodnim materijalima za istraživanja. Sulkusna tekućina oslikava sastav krvnog seruma, a sadrži i komponente parodontnog tkiva i mikroorganizama džepa (20). Stabilna je i visoko specifična za mjesto prikupljanja zbog čega se unutar istog pacijenta oboljelog od parodontne bolesti može uzeti uzorak sa zdravog i bolesnog mjesta i time isključiti problem biološke varijabilnosti. Nadalje, puliranjem, odnosno spajanjem više uzoraka istog stanja u jedan, povećava se vjerojatnost pronalaska proteina prisutnih u malim koncentracijama (21). Sve navedeno čini sulkusnu tekućinu izvrsnim uzorkom za proteomska istraživanja.

Slina je također uzorak koji se tehnički jednostavno prikuplja, međutim 90% proteinskog sastava sline čine proteini žlijezda slinovnica pa ona nije specifična za mjesto prikupljanja. Uz to, dio proteoma sline čine proteaze koje uništavaju druge proteine i tako smanjuju mogućnost otkrivanja potencijalnih biomarkera. Još jedan nedostatak salivarnih uzoraka je promjenjivost sastava i koncentracije salivarnog proteoma tijekom dana te ovisno o dobi i općem zdravlju pacijenta (22, 23).

Uzorci parodontnog tkiva su poput sulkusne tekućine specifični za mjesto uzorkovanja te nadilaze biološku varijabilnost. Međutim, uzorkovanje parodontnog tkiva invazivan je postupak, a

metode obrade i pripreme uzorka za proteomske analize vrlo su kompleksne (24).

Najčešći proteini proteomskih istraživanja parodontnih bolesti

Broj identificiranih proteina u proteomskim istraživanjima parodontnih bolesti raste iz dana u dan te je sve više onih čija ekspresija izaziva posebnu pažnju. Među novootkrivenim proteinima pojedini pokazuju zanimljivo ponašanje te se ističu kao potencijalni biomarkeri parodontnih bolesti.

Vrlo zanimljiv protein čije se ime sve više nameće je Azurocidin. Nalazi se u citoplazmi neutrofila, pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv gram negativnih bakterija, sudjeluje u aktivaciji imunološkog odgovora i povećava propusnost endotela pospješujući nastanak edema (25).



Slika 2. Biološki uzorci dostupni za proteomska istraživanja parodontnih bolesti. Preuzeto iz (24).

On pokazuje pojačanu ekspresiju u parodontitisu te ga neki istraživači smatraju mogućim markerom za ranu detekciju bolesti (26).

Imunoglobulini su prepoznati kao jedna od najistaknutijih obitelji proteina u parodontitisu (27). Stvaraju ih plazma-stanice nakon transformacije iz B-limfocita, a budući da im je zadaća prepoznavanje i neutraliziranje stranih antigena, imaju važnu ulogu u lokalnom obrambenom odgovoru (28).

Još jedna zanimljiva obitelj proteina su


S-100 proteini. Budući da S-100 proteini potiču kemotaksiju i adheziju neutrofila, odnosno sudjeluju u akutnoj upalnoj reakciji, ne začuđuje što su čest nalaz u gingivitisu i parodontitisu (29).

Osim izdvojenih proteina koji su zastupljeniji u parodontnoj bolesti, identificirane su vrste proteina koje pokazuju jaču ekspresiju u uzorcima zdravih pacijenata, primjerice proteini 14-3-3 i aneksini. Dok su proteini 14-3-3 važna karika u općim i specijaliziranim signalnim putevima, aneksini sudjeluju u upalnom i imunološkom odgovoru organizma. Pretpostavlja se da bi njihova smanjena razina mogla biti povezana s nastankom bolesti (26, 27, 30).

Navedeno je svega nekoliko najzanimljivijih proteina dosadašnjih proteomskih istraživanja parodontnih bolesti, no valja očekivati da će u budućnosti razvoj tehnologije i napredak u pripremi uzoraka dovesti do novih, možda čak i zanimljivijih proteina.

### Zaključak

Proteomske analize omogućuju iscrpan prikaz ekspresije proteina u različitim biološkim uzorcima te označuju napredniji pristup u istraživanjima proteoma. Istraživanja proteoma novom i naprednijom tehnologijom zasigurno su pridonijela otkrivanju novih spoznaja u patogenezi parodontnih bolesti, no nažalost i

dalje se čeka otkrivanje i imenovanje biomarkera parodontnoga zdravlja odnosno bolesti. 

## LITERATURA

- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005;366:1809-20.
- Kinane DF, Berglundh T, Lindhe J. Pathogenesis of periodontitis. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, editors. *Clinical periodontology nad implant dentistry*. 1. 5th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 285-387.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Komman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000.1997;14:216-48.
- Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol* 2000. 2004;34:22-33.
- Grant MM. What do 'omic technologies have to offer periodontal clinical practice in the future? *J Periodont Res* 2012;47:2-14.
- Wilkin Marc R. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nat Biotechnol*. 1996;14:61e65.
- James P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys*. 1997;30:279e331.
- Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol* 2000;24:127e152.
- Gupta A, Govila V, Saini A. Proteomics - The research frontier in periodontics. *J Oral BiolCraniofac Res* 2015;5:46-52.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975;250:4007e4021.
- Issaq HJ, Chan KC, Janini GM, Conrads TP, Veenstra TD. Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2005;817:35e47.
- Boraldi F, Bini L, Liberatori S, Armini A, Pallini V, Tiozzo R, et al. Normal human dermal fibroblasts: proteomic analysis of cell layer and culture medium. *Electrophoresis*. 2003;24(7-8):1292-310.
- 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 ClinPeriodontol*. 2012;39(1):80-90.
- Hu S, Yu T, Xie Y, Yang Y, Li Y, Zhou X, et al. Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. *Cancer Genomics Proteomics*. 2007;4(2):55-64.
- Peluso G, De Santis M, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Messana I, et al. Proteomic study of salivary peptides and proteins in patients with Sjogren's syndrome before and after pilocarpine treatment. *Arthritis Rheum*. 2007;56(7):2216-22.
- Grant MM, Creese AJ, Barr G, Ling MR, Scott AE, Matthews JB, et al. Proteomic analysis of a noninvasive human model of acute inflammation and its resolution: the twenty-one day gingivitis model. *J Proteome Res*. 2010;9(9):4732-44.
- Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, Barnett MP, Smolenski GA, Wheeler TT. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. *J ClinPeriodontol*. 2010;37(3):241-7.
- Ngo LH, Veith PD, Chen YY, Chen D, Darby IB, Reynolds EC. Mass spectrometric analyses of peptides and proteins in human gingival crevicular fluid. *J Proteome Res*. 2010;9(4):1683-93.
- Bostanci N, Heywood W, Mills K, Parkar M, Nibali L, Donos N. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *J Proteome Res*. 2010;9(5):2191-9.
- Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003;31:55-76.
- Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomarkers in medicine*. 2010;4(1):171-89.
- Bertoldi C, Bellei E, Pellacani C, Ferrari D, et al. Non-bacterial protein expression in periodontal pockets by proteome analysis. *J ClinPeriodontol* 2013;40:573-582.
- Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *Omic : a journal of integrative biology*. 2011;15(6):353-61.
- Badovinac A. *Proteomskai istraživanje parodontnih bolesti*. Poslijediplomski specijalistički rad. Zagreb: Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2015.
- Soehnlein O, Lindbom L. Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system. *J Leukoc Biol*. 2009;85(3):344-51.
- 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.
- Bostanci N, Heywood W, Mills K, Parkar M, Nibali L, Donos N. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *J Proteome Res*. 2010;9(5):2191-9.
- Berglundh T, Donati M, Zitzmann N. B cells in periodontitis: friends or enemies? *Periodontol* 2000. 2007;45:51-66.
- Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(11):1622-31.
- Autieri MV, Carbone CJ. 14-3-3Gamma interacts with and is phosphorylated by multiple protein kinase C isoforms in PDGF-stimulated human vascular smooth muscle cells. *DNA Cell Biol*. 1999;18(7):555-64.