

# Izražaj enzima heparanaze 1 u oboljelih od uznapredovalog generaliziranog parodontitisa

---

**Veček, Nikolina Nika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:804197>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-28**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nikolina Nika Veček**

**IZRAŽAJ ENZIMA HEPARANAZE 1 U OBOLJELIH OD UZNAPREDOVALOG  
GENERALIZIRANOG PARODONTITISA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:  
2018/2019**

**Mentor:  
doc. dr. sc. Darko Kero**

**Split, rujan 2019.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nikolina Nika Veček**

**IZRAŽAJ ENZIMA HEPARANAZE 1 U OBOLJELIH OD UZNAPREDOVALOG  
GENERALIZIRANOG PARODONTITISA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:  
2018/2019**

**Mentor:  
doc. dr. sc. Darko Kero**

**Split, rujan 2019.**

## **SADRŽAJ**

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                                                  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Parodontitis .....</b>                                       | <b>2</b>  |
| 1.1.2 Mehanizam nastanka upale parodontnih tkiva .....               | 3         |
| <b>1.2 Biokemija glikozaminoglikana i njihova uloga u upali.....</b> | <b>4</b>  |
| 1.2.1 Uloga enzima heparanaze-1 u upali .....                        | 5         |
| <b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>                                    | <b>7</b>  |
| <b>3. ISPITANICI I METODE .....</b>                                  | <b>9</b>  |
| 3.1 Vrsta istraživanja, odabir ispitanika i uzimanje uzoraka .....   | 10        |
| 3.2. Priprema uzoraka tkiva za imunohistokemijsko bojanje.....       | 11        |
| 3.3. Protokol za imunofluorescentno bojanje.....                     | 11        |
| 3.4. Fotografiranje i obrada panoramskih slika preparata.....        | 12        |
| 3.5. Statistička analiza .....                                       | 13        |
| <b>4. REZULTATI .....</b>                                            | <b>14</b> |
| 4.1 Histometrija – morfologija i celularnost uzoraka tkiva .....     | 15        |
| 4.2 Analiza izražaja HPSE1 .....                                     | 17        |
| <b>5. RASPRAVA.....</b>                                              | <b>24</b> |
| <b>6. ZAKLJUČCI .....</b>                                            | <b>29</b> |
| <b>7. POPIS CITIRANE LITERATURE .....</b>                            | <b>31</b> |
| <b>8. SAŽETAK.....</b>                                               | <b>34</b> |
| <b>9. SUMMARY .....</b>                                              | <b>36</b> |
| <b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>                                            | <b>38</b> |

*Zahvaljujem se svom mentoru doc. dr. sc. Darku Keri i dr. med. dent Mariji Roguljić na pomoći prilikom pisanja rada.*

*Hvala dr.med.dent. Roku Duplančiću što me je uključio u doktorski rad i pomogao pri izradi diplomskog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na neograničenoj podršci tijekom cijelog studija.*

**POPIS KRATICA:**

GAG - glikozaminoglikan

DAMP- eng. damage associated molecular fragment (molekularni fragmenti vezani za tkivna oštećenja)

DAPI - 4'6'-diamidino-2-fenilindol

H/E - hematoksilin i eozin

HPSE1- eng. heparanase 1 (heparanaza 1)

HS - heparan sulfat

HSPG- heparan sulfat proteoglikan

IF – imunofluorescencija

PAMP- eng. pathogen associated molecular patterns (molekularni fragmenti vezani za tkivne patogene)

PBS - fosfatni pufer

PFA – paraformaldehid

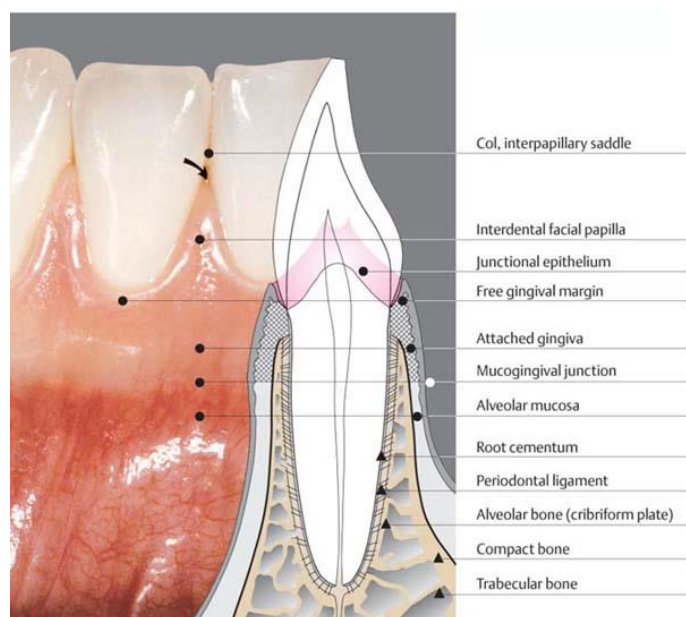
PG- proteoglikani

PX – pikseli

## **1. UVOD**

## 1.1. Parodontitis

Prema podacima iz dostupne literature, parodontna bolest (parodontitis) je, uz zubni karijes, jedna od najučestalijih bolesti usne šupljine. Procjenjuje se da oko 10% svjetske populacije boluje od uznapredovalih oblika parodontitisa koji se povezuju s gubitkom zubi (1). Gubitak zubi narušava žvačnu funkciju i gutanje, fonaciju i estetiku što u konačnici bitno smanjuje kvalitetu života pojedinca.



**Slika 1.** Parodontalne strukture. Parodont je složeno tkivo koje se sastoji od gingive, cementa korijena, parodontnog ligamenta (PDL) i alveolarne kosti. Gingiva je dio mastikatorne sluznice usne šupljine koji počinje na mukogingivalnom spojištu, a pokriva koronarne dijelove alveolarnog nastavka čeljusti. Cement je tanki sloj mineraliziranoga tkiva po sastavu nalik kosti koje prekriva vanjsku površinu korijena zuba, a pruža se od cervikalnog ruba cakline do vrha korijena. U cement ulaze kolagena vlakna bogato vaskulariziranog i inerviranog PDL-a, koji na taj način povezuje korijen zuba s alveolarnom kosti. Cement, PDL i alveolarna kost zajedno sudjeluju u adekvatnoj raspodjeli okluzijskog opterećenja na zub. Preuzeto iz (2).

Parodontno zdravlje općenito se određuje odsustvom klinički prepoznatljive upale u svim sastavnicama pričvrstnog aparata zuba (Slika 1). U klasifikaciji iz 2017. godine dogovoreno je da se parodontitis opisuje multidimenzionalnim sustavom stadija i razreda iz barem dva osnovna razloga (3). Jedan je taj što kliničko zdravlje pojedinih sastavnica



parodonta (poput gingive) može biti obilježje i intaktnog i reduciranog parodonta, a drugi razlog proizlazi iz potrebe kliničara da, u svrhu adekvatnog liječenja, što točnije procijene budući tijek parodontne bolesti.

Sustav stadija se sastoji od četiri kategorije (stadij I-IV) kojima se opisuje zatečeno stanje i koje se određuju pomoću kliničkih parametara poput gubitka kliničkog pričvrstka, dubine sondiranja, prisutnosti i opsega angularnih koštanih defekata te zahvaćenost račvišta korjenova, pomičnosti zuba i gubitka zuba zbog parodontitisa.

Sustav razreda opisuje aspekte vezane za napredovanje parodontitisa ovisno o općem zdravlju pacijenta i različitim rizičnim čimbenicima (štetne navike, sistemske bolesti) te uključuje tri razine za procjenu napredovanja bolesti (razred A – niski rizik, razred B – umjereni rizik, razred C – visoki rizik za napredovanje bolesti) (3).

Stadiji III i IV predstavljaju uznapredovali oblik parodontitisa s vjerojatnosti dodatnog gubitka zubi, a potom i cjelokupne denticije.

Njihovi klinički parametri su interdentalni klinički gubitak pričvrstka veći ili jednak 5 mm, radiološki gubitak kosti do razine srednje ili apikalne trećine korijena, dubine sondiranja veće od 6 mm, vertikalni gubitak kosti veći od 3 mm, prisutnost furkacije 2. ili 3. stupnja te gubitak većeg broja zubi što zahtjeva obuhvatniji klinički pristup u svrhu rehabilitacije žvačne funkcije stomatognatog sustava.

### **1.1.2 Mehanizam nastanka upale parodontnih tkiva**

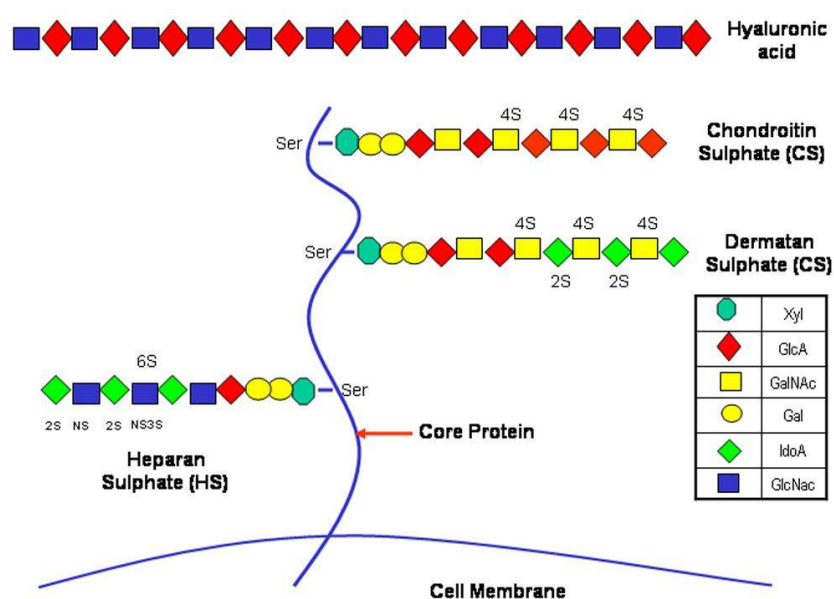
Upala je fiziološki odgovor na ozljedu tkiva fizikalnim agensima (mehanički, termički), kemijskim sredstvima ili bakterijskom infekcijom. U akutnoj fazi upale odgovor je brz i kratkog trajanja. Ako se uzrok upale ne ukloni, upalni odgovor postaje kroničan, što se može smatrati patološkim.

Kronična izloženost parodonta bakterijama s površine tvrdih zubnih tkiva (plak/mikrobni biofilm) i njihovim endotoksinima preduvjet je za nastanak gingivitisa koji je u osnovi podloga za daljnji razvoj parodontne bolesti. Međutim, glavni uzrok ireverzibilne destrukcije parodontnog tkiva u parodontitisu je neadekvatna regulacija upalnog odgovora domaćina. Patogenezu parodontne bolesti u ukupnoj progresiji od gingivitisa do parodontitisa možemo podijeliti u četiri faze (inicijalna lezija, inicijalna akutna lezija, uspostavljena lezija i uznapredovala lezija) koje obilježavaju različiti molekularni profili upalnih medijatora i sastav populacija stanica izravno uključenih u upalni odgovor, kao i strukturne promjene u histološkoj građi parodontnog tkiva (4).

## 1.2 Biokemija glikozaminoglikana i njihova uloga u upali

Glikozaminoglikani (GAG) su složeni polisaharidi koji općenito imaju važne uloge u morfogenezi i homeostazi tkiva u okviru kojih sudjeluju u regulaciji različitih procesa poput proliferacije, diferencijacije, i migracije stanica te strukturne organizacije izvanstaničnog matriksa (5).

GAG su građeni od ponavljajućih disaharidnih jedinica koje se sastoje od aminošećera (N-acetil-D-glukozamin ili N-acetil-D-galaktozamin) i heksuronske kiseline (glukuronska ili iduronska kiselina) (Slika 2).



**Slika 2.** Shematski prikaz građe GAG. Xyl-D – ksilitol; GlcA – glukuronska kiselina; GalNAc – N-acetilgalaktozamin; Gal galaktoza; IdA – iduronska kiselina; GlcNAc – N-acetilglukozamin. Preuzeto iz (6).

Prema razlikama u kemijskom sastavu ponavljajućih disaharidnih jedinica te zastupljenosti sulfatnih grupa (biosintetske i post-biosintetske modifikacije lanca) postoji pet glavnih tipova GAG-a – heparin, heparan sulfat (HS), hondroitin sulfat, keratan sulfat i hijaluronska kiselina. Postojanje sulfatnih grupa odgovorno je za izraziti negativni naboj GAG lanaca zbog čega GAG-ovi mogu vezati (i time funkcionirati kao tkivni spremnik) različite ligande poput čimbenika rasta, morfogenata, medijatora upale (citokini, kemokini), proteolitičke enzime i njihove inhibitore, te molekularne fragmente vezane za tkivna oštećenja (DAMP) ili patogene (PAMP) (7). Osim hijaluronske kiseline, svi ostali GAG-ovi u tkivima se nalaze u sklopu proteoglikana (PG), složenih molekula u čijem sastavu može biti jedan ili

više GAG lanaca vezanih za tzv. sržni protein ili proteinski nosač. PG-ovi se u tkivima nalaze ili kao komponente izvanstaničnog matriksa, ili usidreni na površni stanica (membranski receptori) poput heparan sulfat proteoglikana (HSPG) (5).

GAG-ovi (i posljedično HSPG-ovi) igraju važne uloge u regulaciji upalnog odgovora zbog svoje sposobnosti da vezivanjem upalnih medijatora poput kemokina i citokina formiraju njihove gradijente. Formiranje gradijenata upalnih medijatora, čimbenika rasta i proteolitičkih enzima utječe na različite aspekte upalnog odgovora od akumulacije leukocita u krvnim žilama i njihove ekstravazacije do usmjerene migracije na mjesto tkivnog oštećenja, a jednako tako je važno i za zaustavljanje upalnog odgovora i cijeljenje tkiva. Prema tome, GAG-ovi mogu istovremeno funkcionirati kao pro-upalni i kao protu-upalni čimbenici, a razlog leži u tome što je, s jedne strane, njihova struktura po kemijskom sastavu (o čemu i ovisi sposobnost GAG-ova da formiraju upalne gradijente) izrazito varijabilna čak i između istih tipova GAG lanaca u različitim tkivima (tkivna specifičnost), a s druge strane podložna post-biosintetskim modifikacijama (poput cijepanja lanca na manje fragmente) koje ovise o trenutnim zbivanjima u tkivu (8).

Prema istraživanjima na različitim modelima akutne i kronične upale, pokazalo se da oba mehanizma mogu biti odgovorna za pro-upalno, odnosno protu-upalno djelovanje GAG-a ovisno o tipu nokse i tkivu u kojem se upala odvija (9).

### **1.2.1 Uloga enzima heparanaze 1 u upali**

Heparanaza 1 (HPSE1) je jedini poznati enzim iz skupine endoglikozidaza u sisavaca sposoban za razgradnju HS GAG-ova, neovisno o tome nalaze li se u sastavu HSPG-ova izvanstaničnog matriksa ili u sklopu HSPG-ova stanične površine.

HPSE1 cijepa HS lance na manje oligosaharidne fragmente, čime sudjeluje u remodelaciji izvanstaničnog matriksa na način da oslobađa tkivne rezerve mnogih liganada povezanih s HS-om, poput proteolitičkih enzima, njihovih inhibitora i čimbenika rasta, ali i upalnih medijatora čime regulira formiranje njihovih gradijenata i posljedično tijek upalnog odgovora. Dodatno, aktivnost HPSE1 olakšava i proteolitičko cijepanje izvanstaničnih domena HSPG-ova što također može utjecati na prethodno navedene tkivne procese.

Osim što je uloga HPSE1 dobro opisana u patogenezi malignih bolesti, istraživanja molekularnih mehanizama u pozadini kronične opstruktivne bolesti pluća, reumatoidnog artritisa i ulceroznog kolitisa pokazuju da pojačana aktivnost HPSE1 može predstavljati važnu odrednicu i u razvoju kroničnog upalnog odgovora (10). Naime, poznato je da promjene u

strukturi HS GAG lanaca, i shodno tome različita aktivnost čimbenika koji reguliraju strukturu HS GAG lanaca, utječu na odvijanje upalnog odgovora na više razina, uključujući formiranje gradijenata upalnih medijatora, ali i olakšavanje razgradnje različitih komponenata izvanstaničnog matriksa. Oba procesa su nužna za aktivaciju i usmjerenu migraciju upalnih stanica na mjesto tkivnog oštećenja ili upale.

Veza između upalnog odgovora i pojačane aktivnosti HPSE1 prvi put je dokumentirana prije više od dva desetljeća, kad je pokazano da pojačani izražaj HPSE1 pozitivno korelira s većom prisutnošću malih fragmenata HS-a (degradacija HS GAG lanaca) i nakupljanjem određenih populacija leukocita (neutrofili, aktivirani T-limfociti) na mjestima upale. Prema novijim istraživanjima, otkriveno je da HPSE1 može izravno utjecati i na regulaciju izražaja gena odgovornih za iniciranje tzv. upalnog fenotipa u endotelnim stanicama i T-limfocitima. S druge strane, u eksperimentalnim istraživanjima na životinjskim modelima dokazani su i protu-upalni učinci inhibitora HPSE1, što dodatno potvrđuje važnu ulogu HPSE1 u razvoju upalnog odgovora (11).

Iako su leukociti sposobni sintetizirati brojne litičke enzime potrebne za razgradnju komponenata izvanstaničnog matriksa što je presudno za ekstravazaciju i migraciju leukocita tijekom upalnog odgovora, čini se da oni ipak nisu glavni izvor HPSE1 u upali već su to endotelne i epitelne stanice. Naime, jači izražaj HPSE1 primijećen je u endotelu krvnih žila i epitelnom tkivu u nekim autoimunim bolestima poput reumatoidnog artritisa, ateroskleroze, ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti, kao i u tkivima dišnih putova na mišjim modelima različitih reakcija preosjetljivosti odgođenog tipa (12).

Iako HPSE1 sudjeluje u regulaciji različitih aspekata upalnog odgovora, u dostupnoj literaturi, međutim, nisu pronađeni podaci o eventualnoj ulozi ovog enzima u patogenezi parodontitisa.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja bio je ispitati moguću regulatornu ulogu HPSE1 u upalnom odgovoru tijekom uznapređovalog generaliziranog parodontitisa temeljem usporedbe izražaja ovog enzima i korelacijom s izražajem općeg upalnog biljega CD45 u uzorcima gingive pacijenata sa zdravim parodontom (kontrolna skupina) i pacijenata oboljelih od uznapređovalog generaliziranog parodontitisa (ispitna skupina). Također, jedan od ciljeva bio je ispitati može li se izražaj HPSE1 povezati i sa strukturnim promjenama u tkivu (osim formiranja upalnog infiltrata). U tu svrhu, provedena je korelacija izražaja HPSE1 s histometrijskim parametrima (opća celularnost, celularnost tkivnih odjeljaka) uzoraka gingive pacijenata kontrolne i ispitne skupine.

*Nulte hipoteze* ovog istraživanja su sljedeće:

1. Nema razlike u izražaju HPSE1 u uzorcima gingive pacijenata sa zdravim parodontom i pacijenata oboljelih od uznapređovalog generaliziranog parodontitisa.
2. Izražaj HPSE1 ne korelira s izražajem općeg upalnog biljega CD45 ni u uzorcima gingive pacijenata sa zdravim parodontom, ni pacijenata oboljelih od uznapređovalog generaliziranog parodontitisa.
3. Izražaj HPSE1 ne korelira sa strukturnim promjenama u tkivu gingive ni kod pacijenata sa zdravim parodontom, ni kod pacijenata s uznapređovalim generaliziranim parodontitisom.
4. HPSE1 nema ulogu u regulaciji upalnog odgovora tijekom uznapređovalog generaliziranog parodontitisa.

### **3. ISPITANICI I METODE**

### 3.1 Vrsta istraživanja, odabir ispitanika i uzimanje uzoraka

Istraživanje je provedeno u razdoblju od veljače 2018. do ožujka 2019. u Vježbalištu Stomatološke poliklinike Split, nastavne baze Medicinskog fakulteta i u privatnoj ordinaciji specijalista parodontologije. Ovo istraživanje napravljeno je u sklopu izrade doktorskog rada dr. med. dent. Roka Duplančića (13). Moj doprinos bio je bojenje preparata i analiza izražaja enzima HPSE1 i općeg upalnog biljega CD45. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu. Uzimanje i obrada uzoraka tkiva provedeni su u skladu sa smjernicama Helsinške deklaracije (14).

Svi sudionici dobili su detaljne informacije o istraživanju i potpisali informirani pristanak za sudjelovanje. Pacijentima je uzeta opća medicinska i stomatološka anamneza te parodontološki status. Parodontološka mjerenja koja su prethodila terapiji, proveo je jedan ispitivač, a tri osobe sudjelovale su u protokolu terapije. Ispitanici su dvije skupine prema postavljenoj dijagnozi uznapređovalog generaliziranog parodontitisa stadija III i IV (ispitanici s parodontitisom) i zdravi ispitanici te su bili usklađeni prema dobi i spolu za obje skupine.

Glavni kriterij uključivanja u istraživanje bio je da su pacijenti imali barem jedan zub koji je bilo potrebno izvaditi zbog uznapređovalog generaliziranog parodontitisa (interdentarni gubitak pričvrstka (CAL) na dva susjedna zuba više od 3mm, krvarenje pri sondiranju (BoP) veće od 10 % i dubina sondiranja (PD) veća od 4mm).

Isključujući čimbenici bili su: osobe mlađe od 18 godina i starije od 75 godina, trudnoća i dojenje, uzimanje sistemske hormonske terapije, antibiotske terapije i terapije kortikosteroidima posljednjih 6 mjeseci te provedena inicijalna parodontološka terapija unatrag 6 mjeseci.

Skupina ispitanika s parodontitisom:

Ispitanici su odabrani u ordinaciji polivalentnog doktora dentalne medicine sa sumnjom na uznapređovali generalizirani parodontitis (stadij III i IV).

Specijalistica parodontologije potvrdila je dijagnozu polivalentnog doktora dentalne medicine i nemogućnost liječenja zuba predviđenog za ekstrakciju. Kod svih sudionika istraživanja provedena je inicijalna parodontološka terapija u četiri posjete.

Nakon uzimanja oralnog statusa, obavljena je ekstrakcija zuba pod lokalnom anestezijom te je uzet uzorak slobodne gingive (od ruba slobodne gingive do alveolarne kosti). Nakon toga, pristupilo se supragingivnoj i subgingivnoj instrumentaciji u lokalnoj anesteziji po kvadrantima.



Pacijenti su nakon provedene inicijalne terapije bili uključeni u sustav potporne parodontološke terapije (eng.recall).

Zdravi ispitanici:

Sudionici su odabrani u privatnoj ordinaciji specijalista parodontologije, a glavni kriterij odabira je bio nepostojanje parodontološki kompromitiranih zubi u oralnom statusu. Uzorci slobodne gingive uzeti su kod zubi predviđenih za kirurški zahvat produljenja kliničke krune. S obzirom da postupak kirurškog produljenja kliničke krune uključuje eksternu gingivektomiju od ruba slobodne gingive do ruba alveolarne kosti, i takvi su ispitanici bili prikladni pri odabiru za uzorkovanje zdrave gingive.

### **3.2. Priprema uzoraka tkiva za imunohistokemijsko bojenje**

Uzorci slobodne gingive pohranjeni su i fiksirani u 4% paraformaldehidu (PFA). Vestibularna strana uzoraka (oralni epitel) obojen je tkivnom bojom kako bi se olakšala njihova orijentacija prilikom uklapanja u parafinske blokove.

Uklopljene uzorci serijski su rezani na debljinu od 5  $\mu$ m i postavljeni na predmetna stakalca (preparati). Pravilna orijentacija rezova (vidljiv oralni i sulkusni epitel slobodne gingive sa subepitelnom stromom između dvaju epitela) te očuvanost tkiva su se ispitali na kontrolnim preparatima obojenim hematoksilinom i eozinom (H/E) (svaki deseti preparat po uzorku). Jedan dio preparata se kasnije koristio za imunofluorescentno bojenje, a ostatak je pohranjen u arhivsku zbirku Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju (Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu).

### **3.3. Protokol za imunofluorescentno bojenje**

Preparati s rezovima tkiva su deparafinirani po standardnom protokolu ksilenom i etanolom (u silaznim koncentracijama etanola od 100%, 95%, 70%) te rehidrirani u destiliranoj vodi. Rezovi su kratko isprani u fosfatnom puferu (PBS) i potom stavljeni u natrijev citratni pufer te zagrijavani 25 minuta u parnoj kupelji na 95°C, a zatim ostavljeni da se ohlade na sobnu temperaturu (15, 16). Ponovljeno je ispiranje PBS-om i provedeno blokiranje pozadine inkubiranjem preparata na 25 minuta protein blokom (ab64226, Abcam, UK) prije stavljanja primarnih protutijela.

Za ovo istraživanje upotrijebljena su sljedeća primarna protutijela: zečje poliklonsko protutijelo na HPSE1 (anti-HPSE1) (1:200; ab85543, Abcam, UK) i mišje monoklonsko

protutijelo na opći upalni biljeg CD45 (anti- CD45) [MEM-28] (1:200; ab8216, Abcam, UK). Inkubacija preparata primarnim protutijelima u vlažnoj komori je trajala 24 sata.

Sekundarna protutijela su: mišji Alexa Fluor 488 (ZELENO; ab150105, Abcam, UK), zečji Alexa Fluor 594 (CRVENO; ab150092, Abcam, UK) i zečji Alexa Fluor 488 (ZELENO; ab150077, Abcam, UK). Inkubacija preparata sekundarnim protutijelima u vlažnoj komori trajala je 1 sat. Za bojenje staničnih jezgri, preparati su kratko inkubirani (2 minute) 4'6'-diamidino-2-fenilindolom (DAPI), isprani destiliranom vodom i preklopljeni pokrovnica. Za pozitivnu kontrolu obojeni su uzorci sluznice usne šupljine s maksilarnog tubera iz arhiva Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju i analizirani prema prethodno opisanom protokolu (17). Provedeno je jednostruko i dvostruko imunofluorescentno bojenje.

### **3.4. Fotografiranje i obrada panoramskih slika preparata**

Preparati su pregledani pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX40; Olympus, Tokyo, Japan) opremljenim digitalnom kamerom (Olympus DP27; Olympus, Japan), te fotografirani tehnikom panoramskog snimanja pri povećanju  $\times 20$  i fiksnim manualnim postavkama (okvir:  $1900 \times 1200$  piksela (px); ekspozicija: 8 ms; ISO: 100).

Panoramske slike obrađene su u programu Adobe Photoshop® CC (2014). Nadalje, panoramske slike su formatirane na podlozi s visokom razlučivosti (300 dpi) kako bi se unatoč smanjenju ukupnih dimenzija izbjegao gubitak razlučivosti podataka. Alati Wizard Tool (ukupna površina) i maskiranje (površina epitelnog i stromalnog odjeljka korišteni su za mjerenje histometrijski parametara rezova (ukupna površina reza, površina epitelnog i stromalnog odjeljka, celularnost uzorka (izražena kao omjer ukupne površine staničnih jezgri i međujezgrenog prostora) na H/E panoramskim slikama.

Digitalni grafički predložak s olovkom (graphic pen-tablet Wacom Intuos PRO; Wacom Co, Saitama, Japan) korišten je za maskiranje odjeljaka.

Mjere za sve parametre su najprije izražene u pikselima (px), a potom su površine odjeljaka preračunate u postotke (%) od ukupne površine reza.

Rotiranje, formatiranje i maskiranje imunofluorescentnih (IF) panoramskih slika provedeno je na sličan način kako je opisano za H/E panoramske slike, iako je morao biti primijenjen restriktivniji postupak za smanjenje veličine. Pojedine IF panoramske slike korištene za prikaz u rezultatima dodatno su obrađene na način da su različiti rasponi IF signala prikazani u četiri boje („heatmap“) (plava: 10-60 px; zelena: 60-150 px; crvena: 150-255 px; žuta: 255 px) prema prethodno opisanom protokolu (18).

Uz prethodno navedene histometrijske parametre, mjereni su površina signala ispitivanih čimbenika (izražajna domena) u čitavom rezu, te u pojedinim odjeljcima (epitel, subepitelna stroma) kao i gradijent prosječnog intenziteta signala u dva smjera (vestibularno-sulkularno (lijevo-desni plot); marginalno-apikalno (gore-dolje plot)). Donji granični prag za mjerenje površine signala (cut-off) je postavljen na 10 px pri čemu se ukupna vrijednost površine izražajne domene dobila zbrajanjem ukupnog broja piksela pridruženih pojedinačnim vrijednostima intenziteta na zatvorenoj skali od 10-255 px. Ukupne površine izražajnih domena signala (HPSE1, CD45, DAPI), kao i površine izražajnih domena signala u odjeljcima su naknadno izražene u postotcima (%) od ukupne površine reza, odnosno ukupnih površina pojedinih odjeljaka, te su prikazane kumulativnim vrijednostima (jedan broj) ili frakcijski (245 vrijednosti prema zatvorenoj skali intenziteta) kako bi se olakšala statistička analiza izražajnih domena između pojedinih uzoraka, odnosno grupa uzoraka (kontrole/ispitanici).

### **3.5. Statistička analiza**

Demografski i klinički parametri sudionika ovog istraživanja su analizirani opisnom statistikom te Fisherovim egzaktnim testom za kategoričke varijable. Test analize varijance (ANOVA) korišten je za analizu općih histometrijskih parametara kontrolne i ispitne skupine (površine i celularnost (DAPI) rezova i pojedinih tkivnih odjeljaka, površina upalnog infiltrata (CD45) u subepitelnoj stromi) te izražajnih domena ispitivanog čimbenika (HPSE1).

Napravljena je i korelacija izražaja HPSE1 (nezavisna varijabla) s distribucijom upalnog infiltrata (izražajna domena CD45; zavisna varijabla) testom linearne regresije pojedinačno za kontrolnu i ispitnu skupinu.

Grupni prosjeci prikazani frakcijski prema zatvorenoj skali intenziteta korišteni su za statističku analizu izražajnih domena HPSE1 i za analizu korelacije HPSE1 s distribucijom upalnog infiltrata. Kumulativne vrijednosti svih histometrijskih parametara prikazane su i stupčastim grafovima. Programi Microsoft Office Excel® 2016 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) i GraphPad v8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) korišteni su za statističku analizu. Statistička značajnost ( $\alpha$ ) je postavljena na 0,01 ( $p < 0,01$ ).

## **4. REZULTATI**

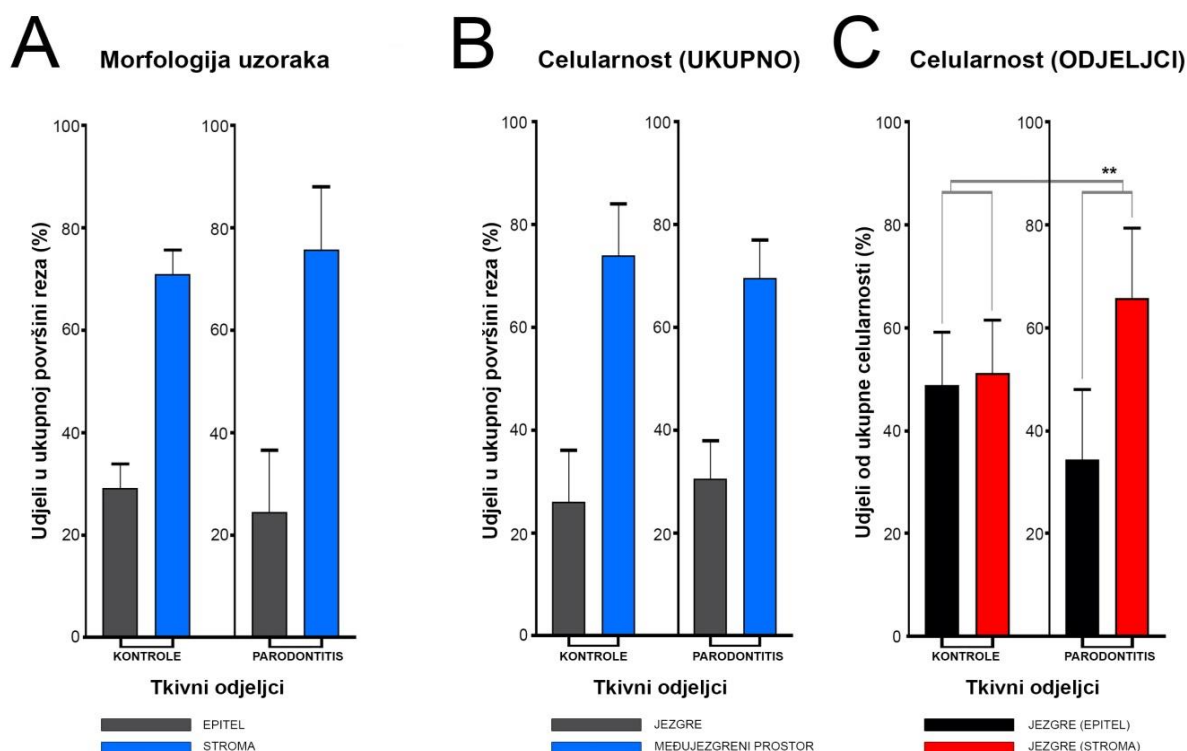
#### 4.1 Histometrija – morfologija i celularnost uzoraka tkiva

Za ovo istraživanje uzeto je ukupno 40 uzoraka slobodne gingive (20 po skupini). Demografski i klinički parametri ispitanika prikazani su Tablici 1.

**Tablica 1.** Demografski i klinički parametri sudionika iz kontrolne skupine i skupine oboljelih od parodontitisa. **FMPS** – eng. Full Mouth Plaque Score (ukupni plak indeks); **FMBS** – eng. Full Mouth Bleeding Score (ukupni indeks krvarenja gingive); **PD** – eng. Probing Depth (dubina sondiranja); **CAL** – eng. Clinical Attachment Level (razina kliničkog pričvrstka); Razina značajnosti ( $\alpha$ ) je postavljena na  $\alpha = 0,01$  (\*\*\*)  $p < 0,01$ ;  $F_{crit} = 7,325545$ ; (\* granične vrijednosti, razina značajnosti  $\alpha = 0,05$ ); Statistički značajna razlika među skupinama je utvrđena za dob ( $p = 0,007571$ ), pušenje ( $p = 0,000001$ ), FMPS ( $p = 0,001056$ ), FMBS ( $p = 0,000216$ ), PD ( $p = 0,000579$ ) and CAL ( $p = 0,000631$ ). Među skupinama nije bilo statistički značajne razlike za distribuciju sudionika po spolu ( $p = 1$ ). Preuzeto iz (13).

|                           | KONTROLE (n = 20) | PARODONTITIS (n = 20) |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|
| <b>Dob***</b><br>(godine) | 38,9 ± 9,23       | 50,26 ± 10,6          |
| <b>Spol (Ž/M)</b>         | 8 Ž / 12 M        | 9 Ž / 11 M            |
| <b>Pušenje***</b>         | 0                 | 17                    |
| <b>FMPS* (%)</b>          | 21,95 ± 8,95      | 36,17 ± 15,76         |
| <b>FMBS*** (%)</b>        | 8,95 ± 3,73       | 43 ± 11,27            |
| <b>PD*** (mm)</b>         | 1,47 ± 0,22       | 4,53 ± 1,19           |
| <b>CAL*** (mm)</b>        | 1,52 ± 0,22       | 6,1 ± 1,43            |

Gingiva se histološki sastoji od dva osnovna tkivna odjeljka – epitela (oralni, sulkusni i epitel džepa) i subepitelne strome (vezivno tkivo). Omjeri površina epitela i subepitelne strome izmjereni su i izraženi u postotcima za svaki uzorak te prikazani i kao prosječne grupne vrijednosti za kontrole i ispitanike (Slika 3).



**Slika 3.** Histometrijski parametri uzoraka gingive ispitanika iz kontrolne skupine i skupine s parodontitisom. Usporedbom površina epitelnih i stromalnih tkivnih odjeljaka između uzoraka gingive iz kontrolne skupine i skupine s parodontitisom (A) nije pronađena statistički značajna razlika (ANOVA) ( $p = 0,63899$ ,  $\alpha = 0,01$ ) zbog čega se morfologija uzoraka može isključiti kao zbunjujući čimbenik u naknadnoj analizi izražajnih domena ispitivanih čimbenika. Celularnost je prikazana kao odnos površine koju pokrivaju jezgre stanica i površine međujezgrenog prostora (B). Usporedbom celularnosti uzoraka gingive iz kontrolne skupine i skupine s parodontitisom nije pronađena statistički značajna razlika (ANOVA) ( $p = 0,12603$ ,  $\alpha = 0,01$ ). Međutim, usporedbom omjera ukupne površine jezgara stanica u epitelu i stromi u uzorcima gingive iz kontrolne skupine (1:1) i skupine s parodontitisom (približno 1:2) (C) pronađena je statistički značajna razlika (\*\*\*) ( $p = 0,00371$ ,  $\alpha = 0,01$ ) što upućuje na promjene u homeostazi gingive tijekom parodontitisa. Preuzeto iz (13).

Usporedbom navedenih histometrijskih parametara nije nađena statistički značajna razlika između uzoraka kontrolne i ispitne grupe. Prosječni grupni omjer epitela i subepitelne strome uzoraka ispitne grupe bio je 24,27% / 75,73% , a kontrolne grupe je 29,27% / 70,87% ( $p = 0,63899$ ).

Ukupna celularnost rezova izražena je također u postocima, a izračunata je kao dio površine pokrivena DAPI bojanjem (slika) od ukupne površine reza i prikazana kao mjera odnosa površine koju prekrivaju jezgre stanica prema površini međujezgrenog prostora. Nije bilo statistički značajne razlike između grupa ni u ovom slučaju (u prosjeku ukupni omjer površine jezgara prema površini međujezgrenog prostora za ispitnu grupu bio je 28,31% / 71,69% , a za kontrole 22,55% / 77,45%, ( $p = 0,12603$ ) (slika 3).

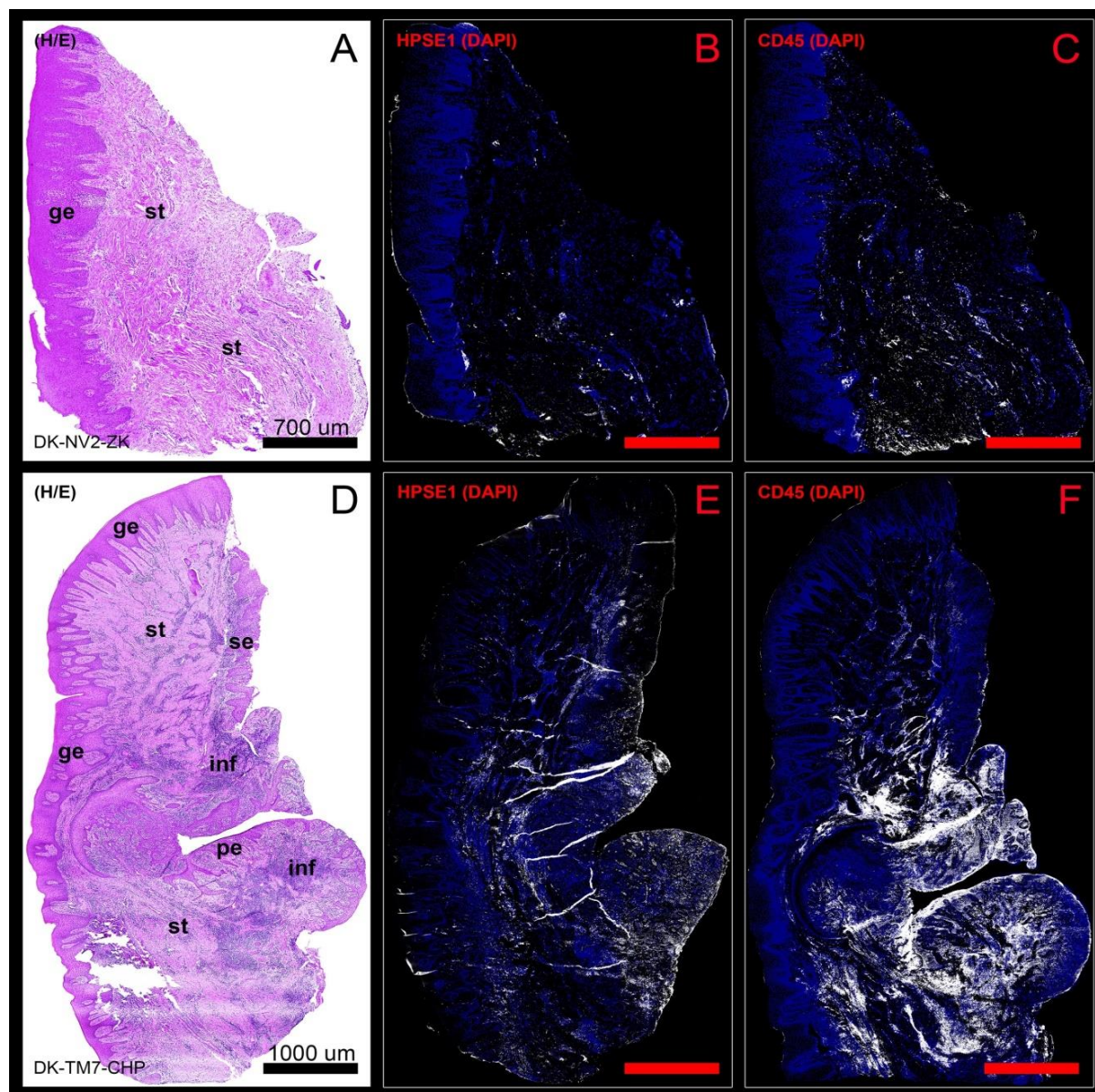
Međutim, kad je celularnost izračunata odvojeno za pojedine tkivne odjeljke i postavljena u omjer, razlike između kontrolne i ispitne grupe su postale vidljive. Omjer celularnosti epitelnog prema stromalnom odjeljku u ispitnoj grupi bio je gotovo 1:2 (34,36% / 65,54%) u korist subepitelne strome, dok je u kontrolnoj 1:1 (49,54% / 50,46%;  $p = 0,00371$ ) (slika 3). Dodatno, usporedbom prosječnih vrijednosti ukupne i stromalne površine izražajne domene općeg upalnog biljega CD45 (izraženih kumulativno i frakcijski) ustanovljena je značajna razlika između ispitne i kontrolne (stromalni omjer 9,47%/1,76% ,  $p = 0,00349$ ).

Analiza histometrijskih parametara upućuje na to da su u gingivnom tkivu oboljelih od parodontitisa aktivni homeostatski mehanizmi putem kojih se nastoji održati normalna struktura tkiva (ukupni omjer epitelnog i stromalnog tkivnog odjeljka, ukupna celularnost) usporediva s onom u zdravom tkivu. Međutim, molekularna pozadina tih homeostatskih mehanizama ipak je različita u zdravoj i bolesnoj gingivi – pozitivna korelacija izražaja HPSE1 s ukupnom i stromalnom celularnošću dobivena je samo za bolesnu gingivu ( $r = 0,999996$ ,  $p = 0,000687$ ;  $r = 0,999819$ ,  $p = 0,005872$ ), dok u zdravoj gingivi izražaj HPSE1 uopće ne korelira s celularnošću neovisno promatramo li je ukupno ( $r = 0,993503$ ,  $p = 0,257513$ ) ili po zasebnim tkivnim odjeljcima ( $r = 0,985491$ ,  $p = 0,697399$ ).

#### **4.2 Analiza izražaja HPSE1**

U uzorcima gingive kontrolne grupe, HPSE1 je vrlo slabo izražena, kako u epitelnom tkivnom odjeljku tako i u subepitelnoj stromi. U uzorcima gingive ispitne grupe, izražaj HPSE1 u epitelnom tkivnom odjeljku ima sličan obrazac kao i kod kontrola, međutim, u subepitelnoj stromi izražaj HPSE1 je intenzivniji i najvidljiviji u područjima perivaskularnog

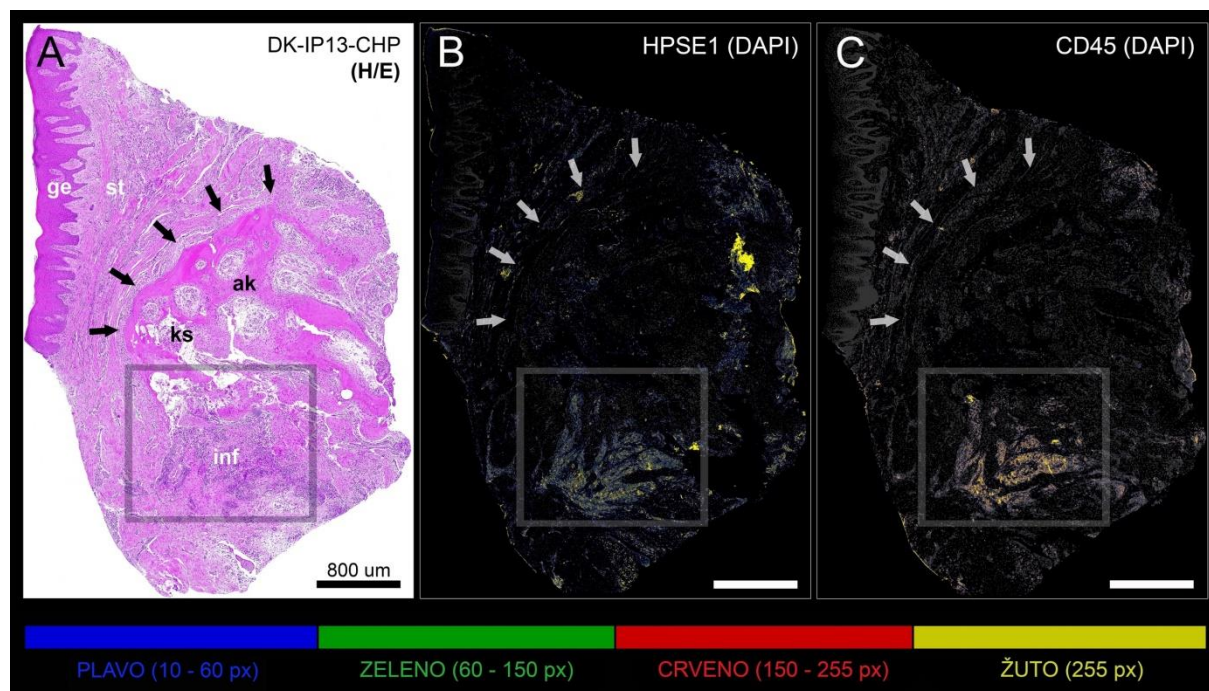
upalnog infiltrata, pogotovo u područjima subepitelne strome koja se nalaze uz sulkusni epitel gingive, odnosno u područjima bližim alveolarnoj kosti (slika 4, 5).



**Slika 4.** H/E i IF panoramske slike uzorka gingive iz kontrolne skupine (DK-NV2-ZK) (A-C) i uzorka gingive iz skupine s parodontitisom (DK-TM7-CHP) (D-F). U zdravoj gingivi je vidljiv zadebljani gingivni epitel i čista subepitelna stroma s malim perivaskularnim infiltratom upalnih stanica (A) za razliku od bolesne gingive u kojoj je gingivni epitel stanjen s izdancima koji prodiru duboko u subepitelnu stromu (*rete pegs*), a epitel džepa prikazuje tzv. pseudoepiteliomatoznu hiperplaziju (D). Subepitelna stroma bolesne gingive difuzno je prožeta obilnim infiltratom upalnih stanica (D). Izražaj HPSE1 i općeg upalnog biljega CD45



(bijela boja) je vrlo slab i vidljiv sporadično uz pojedine perivaskularne prostore subepitelne strome u zdravoj gingivi (B, C), dok je u bolesnoj gingivi stromalni izražaj oba čimbenika, razmjerno prisustvu obilnijeg infiltrata upalnih stanica, puno intenzivniji (E, F). Povećanje (A-F):  $\times 10$ ; *mjerila* – (A-C) 700  $\mu\text{m}$ ; (D-F) 1000  $\mu\text{m}$ . Oznake: gingivni epitel (**ge**), sulkusni epitel (**se**), epitel džepa (**pe**), subepitelna stroma (**st**), infiltrat upalnih stanica (**inf**).

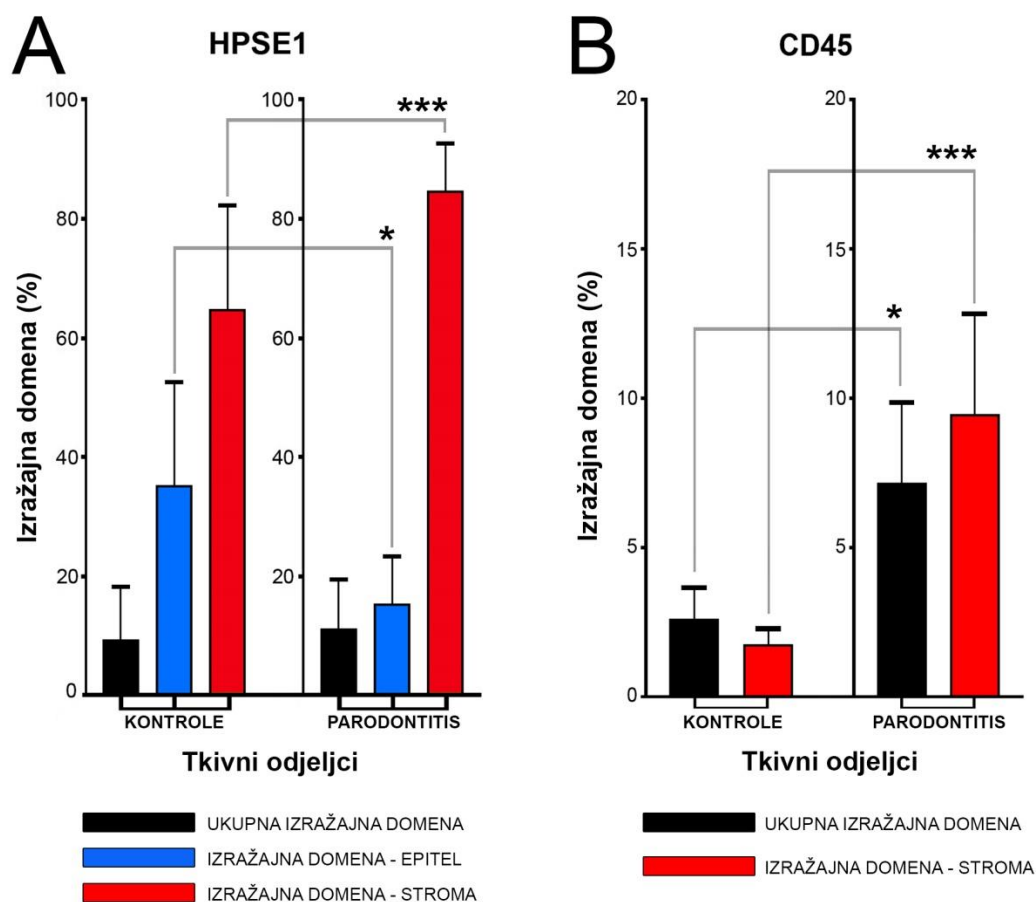


**Slika 5.** H/E (A) i višebojne (*heatmap*) IF panoramske slike izražaja HPSE1 i općeg upalnog biljega CD45 (B, C) u uzorku gingive iz skupine s parodontitisom (DK-IP13-CHP) uzetog iz područja račvišta korijena zuba. Infiltrat upalnih stanica (okvir) nalazi se u dubljim slojevima subepitelne strome uz rubne dijelove alveolarne kosti pri čemu je vidljiva njezina degradacija (A-C). Izražajne domene HPSE1 i CD45 se gotovo u potpunosti preklapaju. Povećanje: (A-C)  $\times 10$ ; *mjerila* – (A-C) 800  $\mu\text{m}$ . Oznake: gingivni epitel (**ge**), subepitelna stroma (**st**), alveolarna kost (**ak**), koštana srž (**ks**), infiltrat upalnih stanica (**inf**); strelice označavaju sučelje subepitelne strome i intaktne alveolarne kosti.

Usporedbom ukupnih površina izražajnih domena HPSE1, statistički značajne razlike u izražaju HPSE1 u uzorcima gingive kontrolne i ispitne grupe su pronađene upravo za subepitelnu stromu ( $p = 0,002389$ ) (tablica 2; slika 6).

**Tablica 2.** Statistička analiza površine ukupne, epitelne i stromalne izražajne domene HPSE1 i općeg upalnog biljega CD45 u uzorcima gingive sudionika iz kontrolne skupine i skupine s parodontitisom (ANOVA test). Površine izražajnih domena su analizirane kao prosječne vrijednosti ispitivanih čimbenika za pojedinu skupinu (kontrolne, parodontitis) prikazanih frakcijski na skali od 10-255 px i zbirno. Razina značajnosti ( $\alpha$ ) je postavljena na  $\alpha = 0,01$  (\*\*\*)  $p < 0,01$ ;  $F_{\text{crit}} = 6,686878$ ); (\*) granične vrijednosti, razina značajnosti  $\alpha = 0,05$ ).

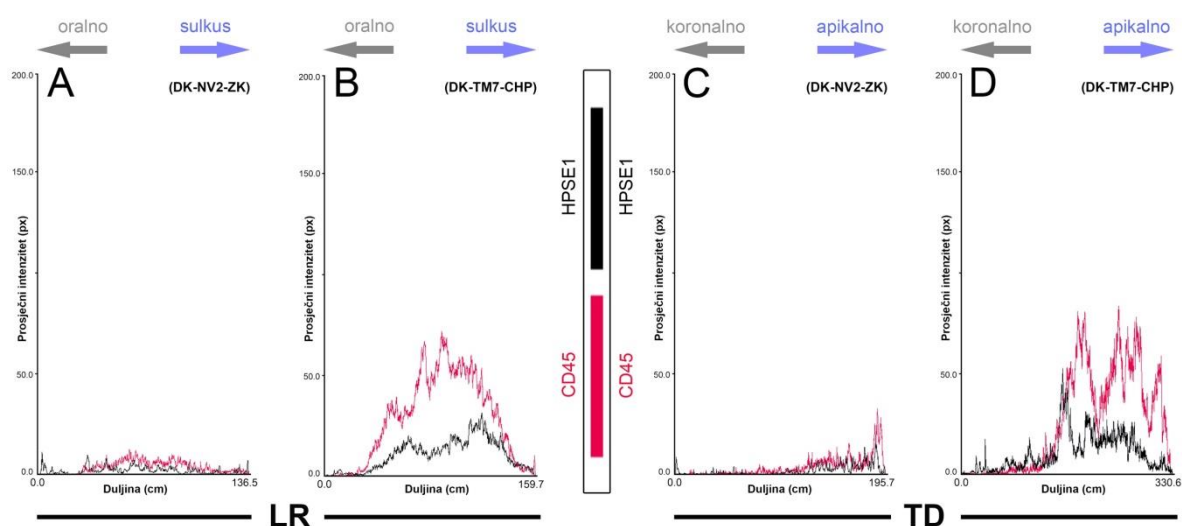
| Čimbenik | Tkivni odjeljak | F               | P               |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| HPSE1    | UKUPNO          | <i>1,049814</i> | 0,306055        |
|          | EPITEL          | <b>4,965093</b> | <b>0,026316</b> |
|          | STROMA***       | <b>9,320604</b> | <b>0,002389</b> |
| CD45     | UKUPNO*         | <i>4,461122</i> | <b>0,035180</b> |
|          | STROMA***       | <b>8,483681</b> | <b>0,003747</b> |



**Slika 6.** Prosječne grupne vrijednosti ukupnih i stromalnih izražajnih domena HPSE1 (A) i općeg upalnog biljega CD45 (B) izražene u postotcima od ukupne površine histoloških rezova iz uzoraka gingive iz kontrolne skupine i uzoraka gingive iz skupine s parodontitisom. Za HPSE1 je dodatno prikazan i odnos prosječne površine epitelne i stromalne izražajne domene za kontrolnu i ispitnu skupinu. Statistički značajna razlika među skupinama pronađena je usporedbom prosječne stromalne izražajne domene HPSE1 (\*\*\*)  $p = 0,002389$ ,  $\alpha = 0,01$ ) uz napomenu da se dvije grupe statistički značajno razlikuju i prema prosječnoj distribuciji upalnog infiltrata u subepitelnoj stromi (\*\*\*)  $p = 0,003747$ ,  $\alpha = 0,01$ ). (\* granične vrijednosti, razina značajnosti  $\alpha = 0,05$ ).

Krivulje prostornih gradijenata intenziteta izražaja HPSE1 i općeg upalnog biljega CD45 u uzorcima gingive kontrolne grupe se razlikuju od onih u uzorcima gingive ispitne grupe, iako, promatraju li se kontrolni i ispitni uzorci zasebno, i HPSE1 i CD45 prikazuju sličan trend pri čemu u obje grupe HPSE1 ima razmjerno niži prosječni intenzitet izražaja u odnosu na CD45 (slika 7). To je dodatno potvrđeno korelacijom izražaja HPSE1 i CD45 pomoću testa linearne regresije koji pokazuje da i u kontrolama ( $r = 0,999970$ ;  $p = 0,030304$ )

i u ispitnoj grupi ( $r = 0,999842$ ;  $p = 0,042033$ ) HPSE1 negativno korelira s prisutnošću upalnog infiltrata (tablica 3). Ovakav rezultat upućuje da u regulaciji upalnog odgovora kako u zdravoj gingivi tako i o onoj oboljelih od parodontitisa, HPSE1 ne mora nužno djelovati kao pro-upalni čimbenik već i kao negativni modulator upalnog odgovora.



**Slika 7.** 2D plotovi prostornih gradijenata izražaja HPSE1 i općeg upalnog biljega CD45 u uzorku gingive iz kontrolne skupine (DK-NV2-ZK) (A, C) i uzorku gingive iz skupine s parodontitisom (DK-TM7-CHP) (B, D). Prostorni gradijent izražaja ispitivanih čimbenika je prikazan krivuljama s prosječnim vrijednostima intenziteta signala na panoramskim IF slikama u dva smjera (strelice) – od oralno prema gingivnom sulkusu (L-R plotovi) (A, C) i od koronalno (slobodni rub gingive) prema apikalno (dio gingive bliži alveolarnoj kosti) (T-D plotovi) (B, D). Može se primijetiti da prostorni gradijenti HPSE1 (crne krivulje) i CD45 (crvene krivulje) pokazuju uzlazni trend u smjeru prema gingivnom sulkusu (B), odnosno prema apikalno (D). (x-os – duljina skeniranja prema dimenziji pojedine stranice panoramske slike u cm; y-os – prosječni intenzitet u px).

**Tablica 3.** Korelacija izražaja HPSE1 (nezavisna varijabla) i općeg upalnog biljega CD45 (zavisna varijabla) u subepitelnoj stromi uzoraka gingive ispitanika iz kontrolne skupine i skupine s parodontitisom (test linearne regresije). Za analizu su korištene prosječne vrijednosti stromalnih izražajnih domena ispitivanih čimbenika za pojedinu skupinu (kontrola, parodontitis) prikazanih frakcijski na skali od 10-255 px. Razina značajnosti ( $\alpha$ ) je postavljena na  $\alpha = 0,01$  (\*\*\*)  $p < 0,01$ ; (+ pozitivna korelacija, – negativna korelacija, / nema korelacije); (\* granične vrijednosti, razina značajnosti  $\alpha = 0,05$ ).

| <b>KONTROLE</b> |             | <b>Modificirani <math>r^2 = 0,999970</math></b> |                                             | <b>Značajnost (<math>\alpha = 0,01</math>)</b> |                 |
|-----------------|-------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------|
| <b>ČIMBENIK</b> | Koeficijent | <i>Std. Greška</i>                              | <b>P-vrijednost</b>                         | <b>KORELACIJA</b>                              | <b>ČIMBENIK</b> |
| <b>CD45</b>     | 0,001153    | <i>3,4873E-05</i>                               | <b><math>8,69889 \times 10^{-91}</math></b> | <b>y-intercept</b>                             | <b>CD45</b>     |
| <b>HPSE1*</b>   | -0,017389   | <i>0,00798</i>                                  | <b>0,03030448*</b>                          | <b>-</b>                                       | <b>HPSE1</b>    |

| <b>PARODONTITIS</b> |             | <b>Modificirani <math>r^2 = 0,999842</math></b> |                                             | <b>Značajnost (<math>\alpha = 0,01</math>)</b> |                 |
|---------------------|-------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------|
| <b>ČIMBENIK</b>     | Koeficijent | <i>Std. greška</i>                              | <b>P-vrijednost</b>                         | <b>KORELACIJA</b>                              | <b>ČIMBENIK</b> |
| <b>CD45</b>         | 0,007491    | <i>0,000401</i>                                 | <b><math>2,03439 \times 10^{-48}</math></b> | <b>y-intercept</b>                             | <b>CD45</b>     |
| <b>HPSE1*</b>       | -0,546769   | <i>0,267466</i>                                 | <b>0,042033*</b>                            | <b>-</b>                                       | <b>HPSE1*</b>   |

## **5. RASPRAVA**

Prve spoznaje o tome da se pojačana enzimatska aktivnost HPSE1 može povezati s odvijanjem upale u tkivu datiraju unatrag dva desetljeća (19). Međutim, unatoč brojnim istraživanjima koja su uslijedila i potvrdila da HPSE1 ima važne uloge u regulaciji upalnog odgovora, za sada nije poznato kakav je utjecaj ovog enzima u patogenezi parodontitisa, kronične degenerativne bolesti koja rezultira gubitkom zuba. Iako je parodontitis bolest s multifaktorskom etiologijom, destrukcija mekih i tvrdih potpornih tkiva zuba u parodontitisu prije svega je posljedica poremećene regulacije upalnog odgovora čija funkcija (kao jednog od obrambenih mehanizama) prestaje biti isključivo zaštita potpornih tkiva zuba od patogena iz mikrobnog biofilma s površine zuba (20).

Rezultati ovog istraživanja temeljili su se na usporedbi izražaja HPSE-1 u uzorcima slobodne gingive pacijenata koji nisu imali parodontitis i pacijenata s dijagnozom generaliziranog parodontitisa. Kako bismo uzorke tkiva analizirali u potpunosti, izrađene su panoramske snimke kojima su pojedini uzorci tkiva obuhvaćeni u cijelosti i s velikom razlučivosti. Kvantifikacija bojenja je napravljena računalnim metodama čime je isključena pristranost istraživača u mjerenju i interpretaciji rezultata. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju, pokazuju da enzim HPSE1 ima različit izražaj u zdravom i patološki promijenjenom parodontnom tkivu. Nije primijećena značajna razlika u izražaju HPSE1 u epitelu između kontrolne skupine i skupine s dijagnozom parodontitisa. Međutim, izražaj HPSE1 u subepitelnoj stromi pokazuje razliku između skupina. Izražaj HPSE1 je intenzivniji i najvidljiviji na mjestima perivaskularnog upalnog infiltrata u subepitelnoj stromi, i to prije svega u područjima subepitelne strome koja se nalaze uz sulkusni epitel gingive, odnosno u blizini ruba alveolarne kosti. Ovo je ujedno i očekivani rezultat s obzirom da se povećan izražaj HPSE1 smatra karakterističnim obilježjem tkiva u kojima se odvija upala. S druge strane, izražaj enzima HPSE1 je negativno korelirao s prisutnošću upalnog infiltrata u zdravom i oboljelom parodontnom tkivu, što upućuje na to da se HPSE1 može shvatiti i kao negativni modulator upalnog odgovora kako u zdravom parodontnom tkivu, tako i tijekom generaliziranog parodontitisa. Jednako tako, navedeni rezultati, u kontekstu metodoloških ograničenja ovog istraživanja, ali i podataka iz pregledane literature, otvaraju mogućnost da HPSE1 istovremeno može imati i dvojaki učinak na odvijanje upalnog odgovora tijekom parodontne bolesti (kao pro-upalni i protu-upalni čimbenik).

Da HPSE1 općenito ima važnu ulogu u regulaciji upalnog odgovora u kroničnim degenerativnim bolestima pokazala su brojna istraživanja. Naime, pojačani izražaj ovog enzima opisan je u sluznici crijeva u različitim oblicima upalne bolesti crijeva uključujući Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis, kao i u lezijama kože oboljelih od psorijaze (21).

Povišene koncentracije HPSE1 pronađene su u sinovijalnoj tekućini oboljelih od reumatoidnog artritisa, bolesti u kojoj zbog destruktivnog upalnog odgovora dolazi do progresivne degradacije zglobnih površina (22). Također, povišena enzimatska aktivnost HPSE1 se povezuje i s razvojem nekih komplikacija u sklopu dijabetesa tipa 1 poput dijabetičke retinopatije i dijabetičke nefropatije (23). Iako u pregledanoj literaturi nisu pronađena istraživanja o povezanosti HPSE1 s bolestima potpornih tkiva zuba, prema prethodno navedenome može se pretpostaviti da bi ovaj enzim mogao imati važne uloge u patogenezi generaliziranog parodontitisa kao jednog od oblika kronične degenerativne bolesti.

Bez obzira što je u ovom istraživanju ustanovljeno da postoji statistička značajna razlika u izražaju HPSE1 u subepitelnoj stromi zdrave i bolesne gingive, ne može se decidirano zaključiti postoje li, shodno tome, i razlike u ukupnoj enzimatskoj aktivnosti HPSE1 između zdrave i bolesne gingive. Poteškoće u tumačenju rezultata na taj način proizlaze iz činjenice da se HPSE1 (kao i ostali enzimi odgovorni za razgradnju komponenata izvanstaničnog matriksa čija aktivnost mora biti strogo regulirana) u tkivima pojavljuje u dva oblika – HPSE1 se sintetizira i izlučuje u inaktivnom obliku (proenzim), koji pod određenim uvjetima i ovisno o zbivanjima u tkivu prelazi u oblik s enzimatskom aktivnosti (24). Komercijalna protutijela na HPSE1 (uključujući i protutijelo korišteno u ovom istraživanju) se podjednakim afinitetom vezuju za aktivni i inaktivni oblik HPSE1 pa se samo na osnovu imunohistokemijskog bojenja na HPSE1 ne može razlučiti koliki je udio pojedinog oblika HPSE1 u njezinom ukupnom izražaju (17). S druge strane, tragovi enzimatske aktivnosti HPSE1 se mogu prikazati neizravno korištenjem specijaliziranih protutijela na pojedine epitope HS GAG lanaca koji se nalaze ili na veznom (3G10) odnosno slobodnom kraju (10E4) lanca (25). Naime, izražaj protutijela 10E4 je slabiji u tkivu u kojem se odvija aktivno cijepanje HS GAG lanaca, za razliku od tkiva u kojem su HS GAG lanci intaktni pa se zbog toga i izražajne domene 10E4 i 3G10 u velikoj mjeri preklapaju. U svakom slučaju, rezultate ovog istraživanja bi se moglo preciznije tumačiti uz dodatno imunohistokemijsko bojenje zdrave gingive i gingive oboljelih od parodontitisa korištenjem navedenih protutijela na pojedine epitope GAG lanaca. Prema rezultatima ovog istraživanja također se ne može sa sigurnošću utvrditi precizna distribucija HPSE1 u tkivu zdrave i bolesne gingive na ultrastrukturnoj razini, odnosno koliki je udio celularne HPSE1 u odnosu na HPSE1 koja se nalazi u izvanstaničnom matriksu što također može upućivati na eventualne promjene u enzimatskoj aktivnosti HPSE1. U tu svrhu bila bi korisna dvostruka IF bojenja na HPSE1 i pojedine HSPG-ove poput Sdc1 (za epitelni tkivni odjeljak), odnosno bojenja na HPSE1 i biljege široko zastupljenih strukturnih proteina poput kolagena I (za subepitelnu stromu). Na



temelju dvostrukih IF bojenja može se napraviti računalna kolokalizacijska analiza kojom se precizno utvrđuje koliki je omjer celularne i ekstracelularne komponente u izražajnoj domeni HPSE1 u istraživanom tkivu (26). Međutim, u ovom istraživanju je pokazano da izražaj HPSE1 pozitivno korelira s promjenama u ukupnoj i stromalnoj celularnosti u uzorcima bolesne gingive, što upućuje na to da se pojačani izražaj HPSE1 može povezati i s određenim strukturnim promjenama potpornog tkiva kod oboljelih od parodontitisa.

Prema prostornoj distribuciji, izražajna domena HPSE1 u subepitelnoj stromi zdrave i bolesne gingive se u velikoj mjeri preklapa s izražajnom domenom općeg upalnog biljega CD45, odnosno raširenošću upalnog infiltrata. Upalni infiltrat je u zdravoj gingivi oštro ograničen na uske perivaskularne prostore, a u pojedinim uzorcima bolesne gingive uz perivaskularne prostore difuzno penetrira i subepitelnu stromu, osobito područja subepitelne strome bliža sulkusnom epitelu i rubu alveolarne kosti. Ovakav nalaz upućuje da stanice endotela krvnih žila i upalne stanice mogu biti glavni izvor HPSE1 i zdravoj i bolesnoj gingivi. S obzirom da je za bojenje upalnog infiltrata ovdje korišten samo opći upalni biljeg CD45, ne može se sa sigurnošću potvrditi o kojim specifičnim populacijama upalnih stanica se radi. Prema podacima iz literature o ulozi HPSE1 u regulaciji upalnog odgovora u različitim upalnim bolestima, kao glavni izvor HPSE1 od upalnih stanica se navode neutrofili, makrofazi i aktivirani T-limfociti (10). Kako bi se djelomice razjasnio i ovaj aspekt uloge HPSE1 u regulaciji upalnog odgovora u parodontitisu, potrebna su dodatna imunohistokemijska bojenja specijaliziranim biljezima za pojedine populacije upalnih stanica.

U zaključku, rezultati ovog istraživanja upućuju na to da HPSE1 djeluje kao modulator upalnog odgovora u zdravoj gingivi i u gingivi oboljelih od parodontitisa. Pojačani izražaj HPSE1 u bolesnoj gingivi poklapa se s rezultatima brojnih istraživanja prema kojima se pojačani izražaj HPSE1 općenito smatra karakterističnim obilježjem patoloških zbivanja u tkivu od formiranja upalnog odgovora (akutne i kronične upale) do maligne alteracije (21). Iako razlike u izražaju HPSE1 u zdravoj i bolesnoj gingivi govore u prilog pro-upalnom djelovanju i pojačanoj enzimskoj aktivnosti HPSE1 u parodontitisu, negativna korelacija izražaja HPSE1 i općeg upalnog biljega CD45 upućuje i na moguće protu-upalno djelovanje HPSE1 prilikom formiranja upalnog odgovora u parodontitisu. Iako se fragmentiranje mreže HS GAG lanaca (čime se oslobađaju tkivne zalihe upalnih medijatora te narušava integritet tkiva i omogućava lakše prodiranje upalnog infiltrata) smatra važnom posljedicom pojačane enzimatske aktivnosti HPSE1 i temeljnim mehanizmom njezina pro-upalnog djelovanja, u pregledanoj literaturi pronađena su istraživanja koja govore u prilog tome da upravo pojačana enzimatska aktivnost HPSE1 može suprimirati upalni odgovor (10). Naime, transgenični

miševi koji konstitutivno pojačano izražavaju HPSE1 u svim tkivima i kod kojih je ukupna enzimatska aktivnost HPSE1 povišena (dokazano nalazom visokih koncentracija malih fragmenata HS GAG lanaca u serumu), u usporedbi s normalnim miševima ispoljavaju gotovo neznatan ili prigušen upalni odgovor na različite nokse s jedne strane kao posljedicu slabije aktivacije neutrofila i općenito sporije migracije upalnih stanica na mjesta tkivnih oštećenja. Uzevši sve ovo u obzir, moglo bi se donekle i objasniti zašto inhibitori enzimatske aktivnosti HPSE1 poput laminaran-sulfata ili suramina, koji se trenutno istražuju kao potencijalni lijekovi za upalne bolesti, ne pokazuju jednaku učinkovitost u rezoluciji upalnog odgovora u različitim eksperimentalnim modelima (27). Drugi pristup u kojem se enzimatsko djelovanje HPSE1 odgovorno za razgradnju mreže HS GAG lanaca neizravno poništava ugrađivanjem sintetskih HS GAG lanaca (tzv. HS mimetici) u proteoglikansku komponentu izvanstaničnog matriksa, je također opravdan jer, prema brojnim istraživanjima HS mimetici djeluju pozitivno na zaustavljanje upalnog odgovora i adekvatno cijeljenje tkiva (28). Do sada je provedena svega nekolicina istraživanja djelovanja HS mimetika na eksperimentalnom modelu parodontitisa u hrčaka, kojima je pokazano da pojedini HS mimetici mogu inicirati uspješnu regeneraciju destruiranih tvrdih i mekih tkiva parodonta (29).

U svakom slučaju, moduliranje enzimatske aktivnosti HPSE1 se može iskoristiti u budućnosti i kao potencijalni terapijski pristup u liječenju generaliziranog parodontitisa. Koliko će takav pristup biti opravdan, trebaju pokazati daljnja istraživanja kojima se treba razjasniti u kojoj je mjeri uloga HPSE1 u regulaciji upalnog odgovora uvjetovana tkivno-specifičnim razlikama u sastavu i strukturi HS GAG lanaca kao njezinog glavnog supstrata, ali i ovisna o pojedinim fazama tijeka upalnog odgovora u generaliziranom parodontitisu.

## **6. ZAKLJUČCI**

Parodontitis je kronična bolest multifaktorske etiologije u kojoj dolazi do destrukcije potpornog tkiva zubi i posljedičnog gubitka zubi. Destrukcija potpornog tkiva zuba prije svega je posljedica poremećene regulacije upalnog odgovora. Iako su brojna istraživanja potvrdila da enzim HPSE1 sudjeluje u regulaciji upalnog odgovora, do sada nije istražena njegova uloga u patogenezi parodontitisa. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati moguću ulogu HPSE1 u regulaciji upalnog odgovora tijekom uznapredovalog generaliziranog parodontitisa. U tu svrhu, provedena je analiza izražaja HPSE1 te korelacija s izražajem općeg upalnog biljega CD45 u uzorcima slobodne gingive pacijenata sa zdravim parodontom (kontrolna skupina) i pacijenata oboljelih od uznapredovalog generaliziranog parodontitisa (ispitna skupina). Dodatni cilj bio je ispitati može li se izražaj HPSE1 povezati i s drugim strukturnim promjenama u tkivu (osim formiranja upalnog infiltrata) temeljem njegove korelacije s histometrijskim parametrima (opća celularnost, celularnost tkivnih odjeljaka) uzoraka slobodne gingive pacijenata kontrolne i ispitne skupine.

Prema rezultatima istraživanja izvode se sljedeći zaključci:

1. Postoji statistički značajna razlika u izražaju HPSE1 u zdravoj gingivi i gingivi oboljelih od uznapredovalog generaliziranog parodontitisa.
2. Izražaj HPSE1 negativno korelira s prisutnošću upalnog infiltrata u subepitelnoj stromi zdrave gingive i gingive oboljelih od uznapredovalog generaliziranog parodontitisa.
3. Izražaj HPSE1 u gingivi oboljelih od uznapredovalog generaliziranog parodontitisa pozitivno korelira s nekim strukturnim promjenama tkiva (ukupna i stromalna celularnost)
4. HPSE1 ima moguću ulogu u regulaciji upalnog odgovora tijekom uznapredovalog generaliziranog parodontitisa.
5. Moduliranje enzimatske aktivnosti HPSE1 se može iskoristiti u budućnosti kao jedan od terapijskih pristupa u liječenju generaliziranog parodontitisa, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje razjasnila priroda uloge HPSE1 u patogenezi ove bolesti.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*. 2012;60(1):15-39.
2. Wolf HFR, K. H.; Rateitschak-Plüss, E. M. *Parodontologija, Stomatološki atlas*: Naknada Slap; 2009. 536 p.
3. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S159-S72.
4. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):57-80.
5. Pomin VH, Mulloy B. *Glycosaminoglycans and Proteoglycans*. Pharmaceuticals (Basel). 2018;11(1).
6. Souza-Fernandes AB, Pelosi P, Rocco PR. Bench-to-bedside review: the role of glycosaminoglycans in respiratory disease. *Crit Care*. 2006;10(6):237.
7. Prydz K. Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules*. 2015;5(3):2003-22.
8. Hamel DJ, Sielaff I, Proudfoot AE, Handel TM. Chapter 4. Interactions of chemokines with glycosaminoglycans. *Methods Enzymol*. 2009;461:71-102.
9. Gschwandtner M, Strutzmann E, Teixeira MM, Anders HJ, Diedrichs-Mohring M, Gerlza T, et al. Glycosaminoglycans are important mediators of neutrophilic inflammation in vivo. *Cytokine*. 2017;91:65-73.
10. Goldberg R, Meirovitz A, Hirshoren N, Bulvik R, Binder A, Rubinstein AM, et al. Versatile role of heparanase in inflammation. *Matrix Biol*. 2013;32(5):234-40.
11. Edovitsky E, Lerner I, Zcharia E, Peretz T, Vlodavsky I, Elkin M. Role of endothelial heparanase in delayed-type hypersensitivity. *Blood*. 2006;107(9):3609-16.
12. Waterman M, Ben-Izhak O, Eliakim R, Groisman G, Vlodavsky I, Ilan N. Heparanase upregulation by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Mod Pathol*. 2007;20(1):8-14.
13. Duplancic R, Roguljic M, Puhar I, Veccek N, Dragun R, Vukojevic K, et al. Syndecans and Enzymes for Heparan Sulfate Biosynthesis and Modification Differentially Correlate with Presence of Inflammatory Infiltrate in Periodontitis. *Front Physiol* (u postupku objave). 2019;.
14. Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. *Bull World Health Organ*. 2008;86(8):650-2.
15. Kero D, Cigic L, Medvedec Mikic I, Galic T, Cubela M, Vukojevic K, et al. Involvement of IGF-2, IGF-1R, IGF-2R and PTEN in development of human tooth germ - an immunohistochemical study. *Organogenesis*. 2016;12(3):152-67.
16. Kero D, Kalibovic Govorko D, Medvedec Mikic I, Vukojevic K, Cigic L, Saraga-Babic M. Analysis of expression patterns of IGF-1, caspase-3 and HSP-70 in developing human tooth germs. *Arch Oral Biol*. 2015;60(10):1533-44.
17. Kero D, Vukojevic K, Stazic P, Sundov D, Mardesic Brakus S, Saraga-Babic M. Regulation

of proliferation in developing human tooth germs by MSX homeodomain proteins and cyclin-dependent kinase inhibitor p19(INK4d). *Organogenesis*. 2017;13(4):141-55.

18. Kero D, Bilandzija TS, Arapovic LL, Vukojevic K, Saraga-Babic M. Syndecans and Enzymes Involved in Heparan Sulfate Biosynthesis and Degradation Are Differentially Expressed During Human Odontogenesis. *Frontiers in physiology*. 2018;9:732.

19. Vlodavsky I, Eldor A, Haimovitz-Friedman A, Matzner Y, Ishai-Michaeli R, Lider O, et al. Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation. *Invasion Metastasis*. 1992;12(2):112-27.

20. Hasan A, Palmer RM. A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease. *Br Dent J*. 2014;216(8):457-61.

21. Meirovitz A, Goldberg R, Binder A, Rubinstein AM, Hermano E, Elkin M. Heparanase in inflammation and inflammation-associated cancer. *FEBS J*. 2013;280(10):2307-19.

22. Li RW, Freeman C, Yu D, Hindmarsh EJ, Tymms KE, Parish CR, et al. Dramatic regulation of heparanase activity and angiogenesis gene expression in synovium from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(6):1590-600.

23. Wang F, Wan A, Rodrigues B. The function of heparanase in diabetes and its complications. *Can J Diabetes*. 2013;37(5):332-8.

24. Wu L, Viola CM, Brzozowski AM, Davies GJ. Structural characterization of human heparanase reveals insights into substrate recognition. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(12):1016-22.

25. Backen AC, Cole CL, Lau SC, Clamp AR, McVey R, Gallagher JT, et al. Heparan sulphate synthetic and editing enzymes in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1544-8.

26. Masola V, Bellin G, Gambaro G, Onisto M. Heparanase: A Multitasking Protein Involved in Extracellular Matrix (ECM) Remodeling and Intracellular Events. *Cells*. 2018;7(12).

27. Miao HQ, Elkin M, Aingorn E, Ishai-Michaeli R, Stein CA, Vlodavsky I. Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int J Cancer*. 1999;83(3):424-31.

28. Lanzi C, Cassinelli G. Heparan Sulfate Mimetics in Cancer Therapy: The Challenge to Define Structural Determinants and the Relevance of Targets for Optimal Activity. *Molecules*. 2018;23(11).

29. Coyac BR, Detzen L, Doucet P, Baroukh B, Llorens A, Bonnaure-Mallet M, et al. Periodontal reconstruction by heparan sulfate mimetic-based matrix therapy in *Porphyromonas gingivalis*-infected mice. *Heliyon*. 2018;4(8):e00719.

## **8. SAŽETAK**



## **Cilj istraživanja**

Cilj istraživanja bio je ispitati moguću ulogu HPSE1, enzima za modifikaciju HS GAG lanaca, u regulaciji upalnog odgovora tijekom uznapredovalog generaliziranog parodontitisa.

## **Materijali i metode**

U svrhu istraživanja uzeti su uzorci gingive zdravih ispitanika (kontrolna skupina; n = 20) i ispitanika s dijagnozom uznapredovalog generaliziranog parodontitisa (ispitna skupina; n = 20) koji su obrađeni za imunohistokemijsko bojenje. Preparati uzoraka bojeni su orijentacijski (H/E bojenje) te primarnim protutijelima na HPSE1 i opći upalni biljeg CD45 (imunofluorescencija) i potom fotografirani tehnikom panoramskog snimanja. Kvantifikacijska različitih atributa bojenja (histometrijski parametri gingive, površine izražajnih domena i prostorni gradijenti intenziteta HPSE1 i CD45) napravljena je računalno korištenjem programa AdobePhotoshop® CC i ImageJ za obradu slika, odnosno Microsoft Office Excel® 2016 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) i GraphPad v8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) za statističku analizu.

## **Rezultati**

Pokazana je statistički značajna razlika u izražaju HPSE1 u zdravoj gingivi i gingivi oboljelih od parodontitisa. Izražaj HPSE1 je negativno korelirao sa prisutnošću upalnog infiltrata u subepitelnoj stromi zdrave gingive i gingive oboljelih od parodontitisa. S druge strane, izražaj HPSE1 u gingivi oboljelih od uznapredovalog generaliziranog parodontitisa je pozitivno korelirao sa nekim strukturnim promjenama u tkivu (ukupna i stromalna celularnost).

## **Zaključak**

HPSE1 ima moguću ulogu u regulaciji upalnog odgovora tijekom uznapredovalog generaliziranog parodontitisa. Moduliranje enzimatske aktivnosti HPSE1 se može iskoristiti u budućnosti kao jedan od terapijskih pristupa u liječenju uznapredovalog generaliziranog parodontitisa, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje razjasnila priroda uloge HPSE1 u patogenezi ove bolesti.

## **9. SUMMARY**

## **Objective**

The aim of the study was to examine if HPSE-1, the enzyme for modification of HS GAG chains, could be considered as a regulator of inflammatory response in advanced generalized periodontitis.

## **Materials and methods**

For the purpose of the study, the samples of healthy gingiva (controls; n = 20) and diseased gingiva from patients diagnosed with advanced generalized periodontitis (test group; n = 20) were taken and processed for immunohistochemistry (H/E staining and immunofluorescence). For immunofluorescence, the primary antibodies against HPSE1 and general inflammatory cell marker CD45 were applied. Quantification of various staining properties (histometric parameters of gingival tissue, expression domains and intensity gradients of immunofluorescence staining) was performed on high-resolution panoramic images by using AdobePhotoshop® CC and ImageJ (image editing), as well as Microsoft Office Excel® 2016 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) and GraphPad v8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) for statistical analysis.

## **Results**

The expression of HPSE1 in healthy and diseased gingiva displayed statistically significant difference. The expression of HPSE1 was negatively correlated with the presence of inflammatory infiltrate in subepithelial stroma of both healthy and diseased gingiva. On the other hand, the expression of HPSE1 was correlated positively with specific structural changes in diseased gingiva (total and stromal cellularity).

## **Conclusion**

HPSE1 could be considered as a regulator of inflammatory response in advanced generalized periodontitis. Modulation of enzymatic activity of HPSE1 could be exploited in the future as a possible approach for treatment of advanced generalized periodontitis. However, further studies are still needed in order to fully elucidate the scope of regulatory roles of HPSE1 in pathogenesis of advanced generalized periodontitis.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## OSOBNİ PODATCI

Ime i prezime: Nikolina Nika Veček

Datum rođenja: 29.10.1994

Mjesto rođenja: Zagreb

Državljanstvo: hrvatsko

Elektronska pošta: veceknika@gmail.com

## OBRAZOVANJE

- 2001.- 2009. Osnovna škola „Split 3“
- 2009.- 2013. V.gimnazija „Vladimir Nazor“
- 2013.- 2019. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Studij Dentalne medicine

## JEZICI

- Engleski (C1)
- Talijanski (B2)

## AKTIVNOSTI

- Urednica studentskog časopisa „DentiST“
- Organizator „Praktičnih znanja za studente 2019.“
- Članica organizacije studenata dentalne medicine „DentiST“
- Sudjelovanje na „ISA Skils Competition“ 2018. i 2019.