

# Utjecaj fiksnoga ortodontskoga aparata na proteomski profil sline

---

**Zgombić Popović, Vojka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2021**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:310186>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-26**



*Repository / Repozitorij:*

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Vojka Zgombić Popović

**UTJECAJ FIKSNOGA  
ORTODONTSKOGA APARATA NA  
PROTEOMSKI PROFIL SLINE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Vojka Zgombić Popović

# **UTJECAJ FIKSNOGA ORTODONTSKOGA APARATA NA PROTEOMSKI PROFIL SLINE**

DOKTORSKI RAD

Mentorice:

Prof. dr. sc. Dubravka Negovetić Vranić

Prof. dr. sc. Lovorka Grgurević

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

School of Dental Medicine

Vojka Zgombić Popović

# **INFLUENCE OF FIXED ORTHODONTIC APPLIANCES ON PROTEOMIC SALIVA PROFILE**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:  
Dubravka Negovetić Vranić, PhD, Professor  
Lovorka Grgurević, PhD, Professor

Zagreb, 2021

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Centru za translacijska i klinička istraživanja, Odjelu za proteomiku, te Dentalnoj poliklinici Orthonova Zagreb

Naziv poslijediplomskog doktorskog studija: Dentalna medicina

Mentorica rada: prof.dr.sc. Dubravka Negovetić Vranić, dr.med.dent. spec. pedodoncije, Zavod za dječju i preventivnu stomatologiju, Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Komentorica rada: prof.dr.sc. Lovorka Gregurević, dr.med., Katedra za anatomiju i kliničku anatomiju, voditeljica Odjela za Proteomiku, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Lektorica hrvatskog jezika: Dunja Aleraj Lončarić, prof.

Lektorica engleskog jezika: Maja Kartuš, prof.

Sastav Povjerenstva za ocjenu poslijediplomskog doktorskog rada:

1. Prof.dr.sc. Hrvoje Jurić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Sandra Anić Milošević
3. Prof. dr.sc. Marina Lapter Varga
4. Prof. dr.sc. Vladimir Trkulja
5. Prof.dr.sc. Nada Vrkić

Sastav Povjerenstva za obranu poslijediplomskog doktorskog rada:

1. Prof.dr.sc. Hrvoje Jurić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Sandra Anić Milošević
3. Prof. dr.sc. Marina Lapter Varga
4. Prof. dr.sc. Vladimir Trkulja
5. Prof.dr.sc. Nada Vrkić

Datum obrane rada: 03.03.2021.

Rad sadrži: 91 stranica

11 tablica

16 slika

1 CD

Rad je vlastito autorsko djelo koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drugačije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i drugo) u radu su izvorni doprinos autora poslijediplomskog doktorskog rada. Autor je odgovoran za pribavljenje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija, odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

## ZAHVALA

Zahvaljujem mojoj mentorici prof.dr.sc. Dubravki Negovetić Vranić na stručnoj pomoći i motivaciji koju mi je nesebično pružala tijekom izrade doktorskog rada.

Posebna zahvalnost pripada mojoj komentorici prof.dr.sc. Lovorki Grgurević, znanstvenici i inovatorici koja je sigurnom rukom vodila i usmjeravala tijekom istraživanja do finalne izrade doktorskog rada.

Zahvalu želim iskazati dr.sc. Ruđeru Novaku na izuzetnoj susretljivosti u dijeljenju novih istraživačkih spoznaja pri analitičkim obradama podataka u ovoj studiji.

Hvala prof.dr.sc. Vladimiru Trkulji na pomoći u ekspertizi i smjernicama tijekom planiranja dizajna rada.

Zahvaljujem mojoj strpljivoj obitelji koja me je baš uvijek i u svemu podržavala tijekom izrade disertacije.

## SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja jest tehnikama proteomske analize potvrditi utjecaj fiksnoga ortodontskoga aparata na razliku u ekspresiji proteina u proteomskom profilu sline kod pacijenata u ortodontskoj terapiji u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Istraživanje je koncipirano na 18 ispitanika u dobi od 13 godina, muškog spola, bez organskih oboljenja i zadnje primjene antibiotika unatrag mjesec dana, a kojima je indicirana fiksna ortodonska terapija. Budući da je proteomski profil sline varijabilan u toj životnoj dobi, prvo uzorkovanje sline obavljeno je 24 sata prije postavljanja i neposredno pred postavljanje fiksnoga ortodontskoga aparata. Uzorkovanje sline bilo je nakon 48 sati, 7. dana terapije i 30. dana terapije te je potom provedena metoda analize uzoraka masenom spektrometrijom.

Analizom dobivenih rezultata kontrolne i terapijske skupine ove studije, najznačajniji nalaz dobiven je tridesetog dana, a govori u prilog i u skladu je s biologijom koštane pregradnje nakon primjene ortodontske fiksne terapije u cilju postizanja zubnog pomaka. U svim uzorcima sline identificirano je 198 proteina te u fazi 30. dana nakon postavljanja ortodontskog aparata proteom sline sadržavao je dodatnu skupinu proteina koji su uključeni u pregradnju kostiju.

Iz spoznaja do kojih smo došli istraživanjem možemo zaključiti da se pojavnost potvrđenih molekula: BMP4, BMPER, IGFBP3 i FGF, koja se događa za vrijeme ortodontskog zubnog pomaka, gotovo identično podudara s pojavnošću molekula prilikom procesa koštane regeneracije, a koja imitira slijed događanja u embrionalnom razvoju. Od svih koštanih morfogenetskih proteina navedeno istraživanje identificiralo je molekulu BMP4 u slini koja zasigurno zauzima važno mjesto u dentalnom razvoju i periodontalnoj regeneraciji. To je prvi put potvrđena identifikacija molekula BMP-a u uzorku sline. Nadalje, potvrđena je i identificirana IGFBP3 u slini kao ključna molekula u koštanom metabolizmu. Završno, identifikacija FGF-a u kontrolnoj i terapijskoj skupini ukazuju nam na njihovu prisutnost u različitim formama, što bi se moglo povezati i s njihovom protektivnom funkcijom te isto tako ulogom u regeneraciji i koštanoj pregradnji.

Ključne riječi: fiksni ortodontski aparat, proteomska analiza sline, koštani morfogenetski proteini.

## **SUMMARY**

**PURPOSE:** The aim of this study is to confirm the influence of a fixed orthodontic appliance on the difference in protein expression in the salivary proteomic profile of patients undergoing orthodontic therapy compared to the control group, using proteomic analysis techniques.

**MATERIALS AND PROCEDURES:** The study was conducted on 18 subjects. All subjects were 13 years old and male, without any organic diseases or a record of antibiotic usage in the month prior to the study, who are undergoing fixed orthodontic therapy. The number of subjects in therapy was twelve (N = 12), including six control subjects (N = 6), but without orthodontic appliances with inclusion and exclusion criteria without risk to patients. Inclusive criteria for the participants' participation in the research are: age of 13 years, male gender and indication for fixed orthodontic therapy. The excluded criteria for the participation of respondents in the research are: existence of some of the systemic diseases that would further alter the affect result of the research, non-response to control examinations and sudden appearance of the disease during the research period. There was no risk for the subjects in this study.

Since the salivary proteomic profile in that age group is variable, the first saliva sampling was performed 24 hours before placement and immediately prior to the placement of the fixed orthodontic appliance. Saliva was then taken again from all subjects from both groups 48 hours later, on the seventh day of therapy, and on the thirtieth day of therapy. The saliva collection procedure was based on three consecutive sputa directly into a Petri dish, after which the saliva was pipetted into Eppendorf tubes, previously marked with the subjects' data. Immediately after the sample collection, the saliva was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  and transported on ice so the samples could be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Finally, the method of sample analysis by mass spectrometry was performed.

**RESULTS:** The most significant finding in the analysis of all results obtained from control and therapeutic groups in this study was found on the thirtieth day, and it is in support of and in accordance with the biology of bone remodeling after the application of fixed orthodontic therapies used for tooth displacement. From the analysis of isolated proteins obtained in this study, we can assume the potential role of individual molecules. A total of 198 proteins were identified in the saliva samples, which is in line with similar saliva studies.



Proteins detected by mass spectrometry were classified on the basis of their functional characteristics, available in the UniProt database. During the initial and later phase of orthodontic therapy, we identified proteins involved in neurological processes, inflammation/stress, cytoskeleton, signal transduction/protein expression, and other processes. On the 30<sup>th</sup> day after the placement of the orthodontic appliance, the saliva proteome contained an additional group of proteins involved in bone remodeling.

**CONCLUSION:** From the findings of the research, we can conclude that the appearance of confirmed molecules: BMP4, BMPER, IGFBP3 and FGF, which occurs during orthodontic tooth movement, almost identically coincides with the appearance of molecules in the process of bone regeneration that mimics the sequence of events during embryonic development. Of all the bone morphogenetic proteins, the above study identified the BMP4 molecule in saliva, which certainly occupies an important place in dental development and periodontal regeneration. The identification of the BMPER molecule in addition to the BMP4 molecule to which it clearly binds, confirms the coordinated activity of growth factors and their inhibitors, which are also confirmed at the proteomic level in the saliva sample as biological material. Furthermore, IGFBP3 in saliva has been confirmed and identified as a key molecule in bone metabolism. Finally, FGF identifications in the control and therapeutic groups indicate their presence in various forms, which could be related to their protective function, as well as their role in regeneration and bone remodeling.

Considering that this is the first identification of the BMP molecule (BMP4) in saliva, this result is extremely important from the aspect of biology of bone morphogenetic proteins, its presence in biological fluids and the development of new knowledge about how and where BMP4 reached the saliva (locally or systemically through the blood) and further, what is its real role in orthodontic therapy. To date, proteomic analysis has confirmed the identification of the BMP6 molecule from the blood and BMP1 (which is not a true BMP molecule, but a proteinase), which is crucial in the activation of BMP molecules and their antagonists.

**Keywords:** fixed orthodontic appliance, salivary proteomic analysis, bone morphogenetic proteins.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Anatomija usne šupljine .....	2
1.2. Anatomija i fiziologija žlijezda slinovnica .....	5
1.3. Uloga sline .....	6
1.3.1. Metode pretrage sline .....	8
1.4. Proteomika .....	11
1.4.1. Proteomska analiza sline .....	12
1.5. Ortodoncija .....	15
1.5.1. Ortodontske naprave .....	16
1.5.2. Ortodontski zubni pomak .....	18
1.5.3. Utjecaj ortodontskog aparata na sastav sline .....	22
2. SVRHA ISTRAŽIVANJA .....	25
3. ISPITANICI I POSTUPCI .....	27
3.1. Ispitanici .....	28
3.2. Prikupljanje uzoraka .....	29
3.3. Analiza uzoraka - masena spektrometrija .....	33
4. REZULTATI .....	36
4.1. Analiza rezultata dobivenih masenom spektrometrijom .....	37
4.2. Identificirani proteini u uzorcima sline .....	39
5. RASPRAVA .....	62
5.1. Identifikacija proteina sline 30 dana nakon postavljanja fiksnog aparata .....	63
5.1.1. Identifikacija veznog proteina 3 inzulinskog faktora rasta ( <i>engl. insulin-like growth factor binding protein-3, IGFBP3</i> ) .....	63
5.1.2. Koštani morfogenetski protein 4, BMP4 ( <i>engl. bone morphogenetic protein 4</i> ) .....	65
5.1.3. Fibroblastni faktor rasta 5, FGF 5 ( <i>engl. fibroblast growth factor 5</i> ) .....	67
5.1.4. BMP-vezni endotelni regulatorni protein, BMPER ( <i>Protein Crossveinless-2</i> ) .....	68
6. ZAKLJUČAK .....	71
7. LITERATURA .....	73
8. ŽIVOTOPIS .....	90

## POPIS POJMOVA I KRATICA

Kratica	Značenje
LC-MS	tekućinska kromatografija – masena spektrometrija
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija – tandem masena spektrometrija
HPLC	tekućinska kromatografija visokih performansi
TNF $\alpha$	faktor nekroze tumora alfa
CPNE1	rekombinantni humani protein Copine 1
NLRP	<i>nod-like</i> receptor obitelji <i>pynn</i> domene koja sadrži protein 3
ASC	apoptoza-pridruženi <i>speck-like</i> protein koji sadrži kaspaza regrutirajuću domenu
IL-1 $\beta$ , 6, 8, 10	interleukin 1 beta, 6, 8, 10
2-DE	dvodimenzionalna gel elektroforeza
2D-MS	dvodimenzionalna gel elektroforeza i masena spektrometrija
SELDI-TOF-MS	površinska pojačana laserska desorpcija/ionizacija, <i>time-of-flight</i> MS
OTM	ortodontski zubni pomak
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta
RANKL	aktivator receptora nuklearnog faktora kapa-B ligand
ECM	ekstracelularni matriks
cAMP	ciklični adenzin-monofosfat
cGMP	ciklični gvanozin-monofosfat
BMP <sup>(1, 2, 4, 6, 10)</sup>	koštani morfogenetski protein <sup>(1, 2, 4, 6, 10)</sup>
Bmp <sup>(2, 4)</sup>	razvojno regulirani mišji gen koštane pregradnje <sup>(2, 4)</sup>
BMPRIa	koštani morfogenetski protein receptor tipa 1a
CBFA1	faktor vezivanja jezgre Alpha 1
CSF	stimulirajući faktor kolonije – sekretivni glikoprotein
OPG	osteoprotegerin

M-CSF	stimulirajući faktor kolonije makrofaga
PGE2	prostaglandin E2
MMP <sup>(3, 9, 13)</sup>	matriks metalopeptidaza <sup>(3, 9, 13)</sup>
RUNX2	faktor transkripcije vezan za Runt
TGFβ	transformirajući faktor rasta beta
MIP	glavni unutarnji protein
MCP	strukturni gen za membranski kofaktor protein

## **1. UVOD**

## 1.1. Anatomija usne šupljine

Usna šupljina početni je dio probavnog sustava koji svojom građom obuhvaća niz elemenata važnih za pravilno funkcioniranje organizma. U užem smislu omeđena je sprijeda i lateralno zubnim lukovima, gore tvrdim i dijelom mekog nepca, dolje jezikom i dnom usne šupljine, a straga drugim dijelom mekog nepca, nakon čijeg suženja prelazi u ždrijelo.

Maksila, gornja čeljust, središnja je i najveća kost gornjeg dijela viscerokranija. Spaja se sa svim kostima lica i nosi zube.

Mandibula, donja čeljust, jedina je kost koja tvori pravi zglob s lubanjskim kostima. Na njezin razvitak i oblik utječe vlak žvačne muskulature, oblik neurokranija i lučenje endokrinih žlijezda.

Predvorje usne šupljine izvana omeđuju usne i obrazi, a iznutra alveolarni nastavci i zubi. Obloženo je sluznicom koja u kontinuitetu prelazi sa sluznice usana i obraza na sluznicu vanjske strane gingive zubi gornje i donje čeljusti.

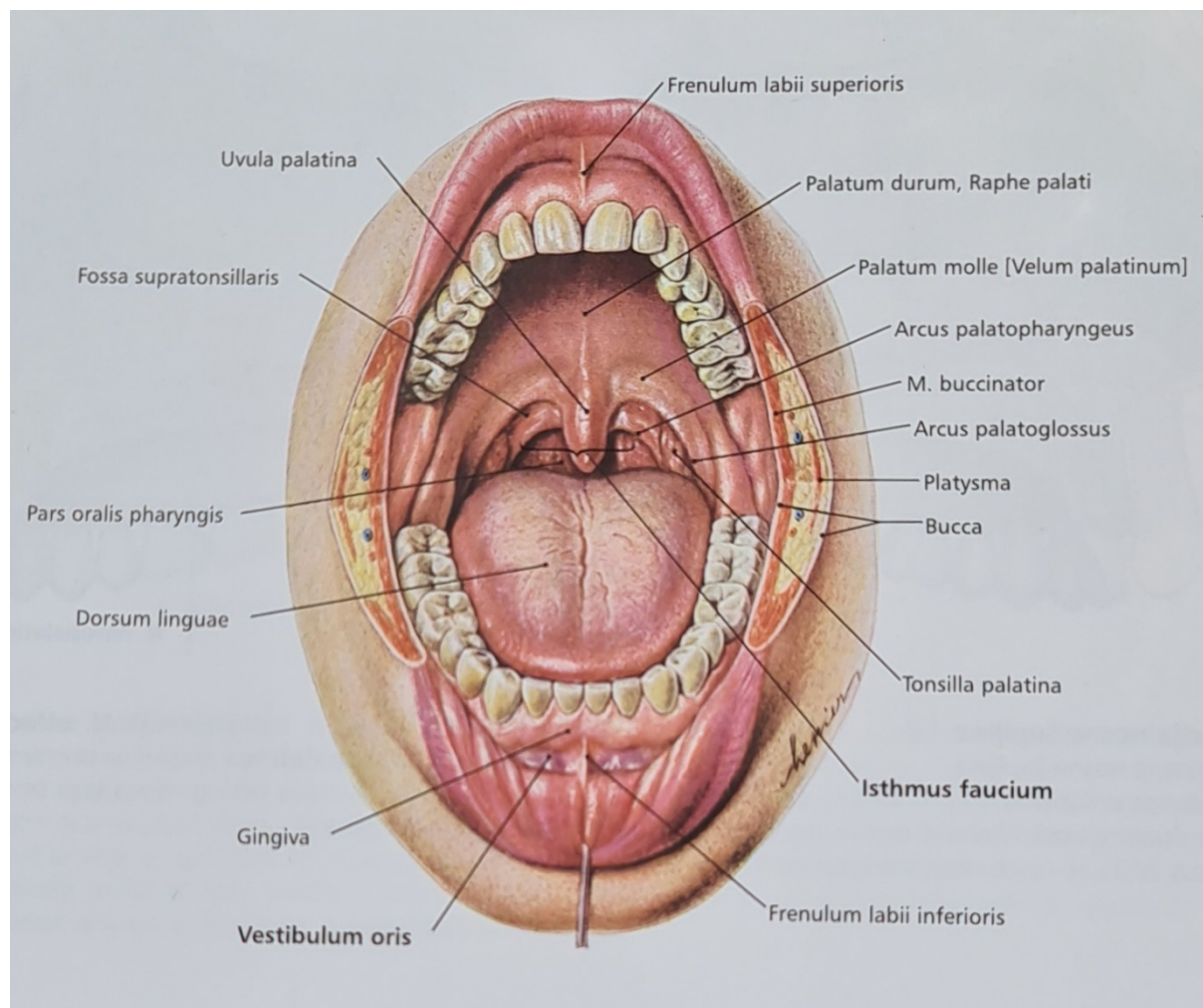
Gornja i donja usna omeđuju otvor usne šupljine. Osnova usana je usni kružni mišić. Krov usne šupljine tvori nepce, a sastoji se od dva dijela. Prednje dvije trećine tvori koštano nepce, tvrdo nepce, a pokretna stražnja trećina jest meko nepce koje završava slobodnim rubom prema ždrijelu.

Mišići mekog nepca napeti su i zatvaraju ždrijelo prema nosnoj šupljini, što je vrlo važno pri gutanju.

U žvačne mišiće ubrajaju se četiri mišića koji pokreću donju čeljust u temporomandibularnom zglobo. To su maseter, temporalni mišić te pterigoidni lateralni i medijalni mišići.

Ti se mišići hvataju na mandibulu i svojom kontrakcijom proizvode pokrete u temporomandibularnom zglobo.

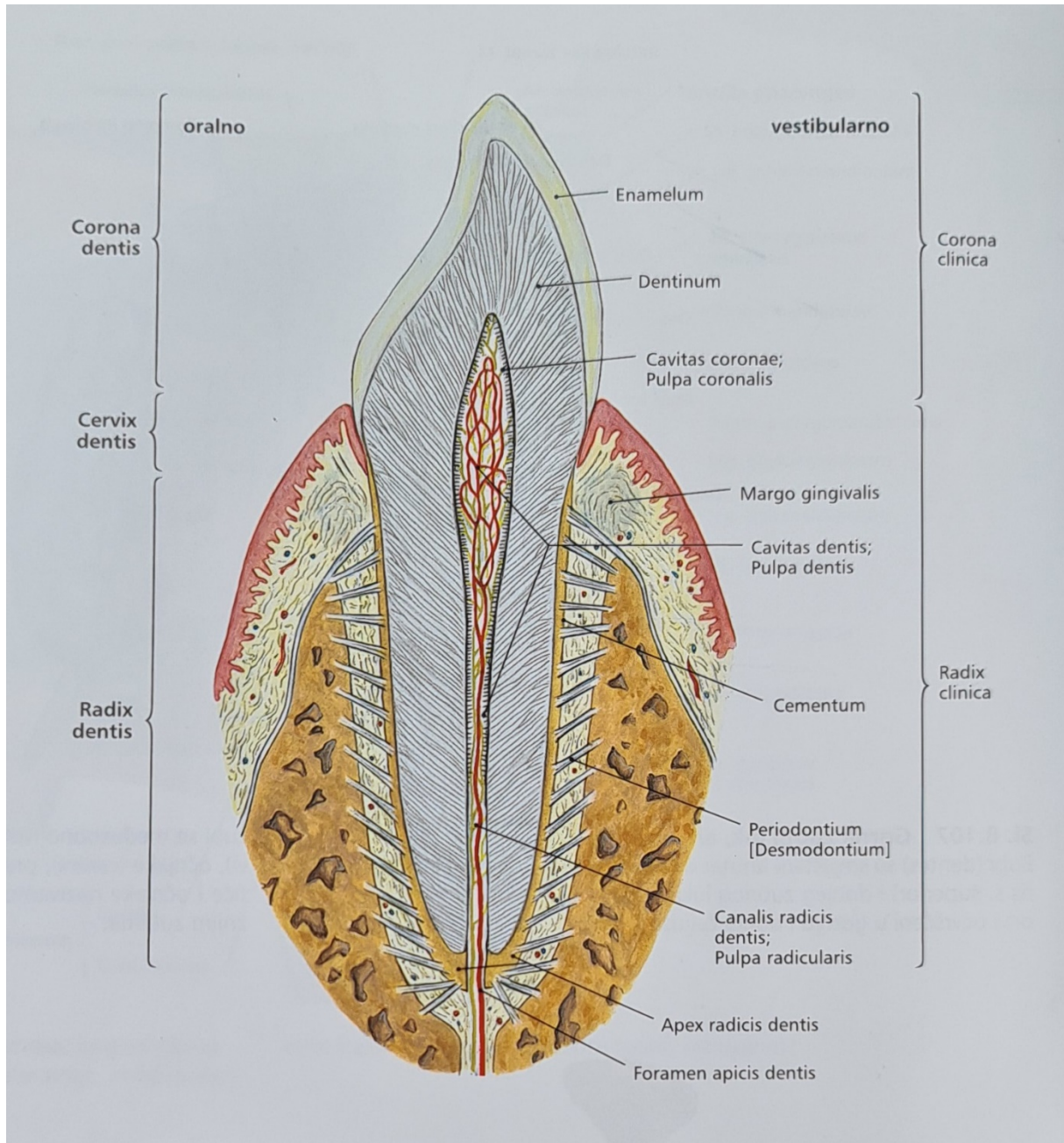
Jezik je organ koji smještajem pripada usnoj šupljini i ždrijelu. Razlikujemo vrh, trup i korijen jezika. Sudjeluje u žvakanju hrane, gutanju i govoru, a ima i osjetilnu ulogu (1,2).



Slika 1. Usna šupljina (izvor: Sobotta, Atlas anatomije čovjeka, 3. svezak, Naklada Slap)

Zubi su bitna sastavnica za očuvanje zdravlja, funkcije i izgleda žvačnog sustava. Položaj i oblik zubi u čeljustima određen je genskom determinantom, ravnotežom sila mišića obraza i jezika, temporomandibularnim zglobovima i kostima čeljusti, silama žvakanja te različitim silama koje djeluju tijekom rasta i razvoja. Čovjeka karakteriziraju dvije denticije, mliječni i trajni zubi. Trajna denticija sastoji se od trideset i dva zuba, smještena bilateralno simetrično u dva zuba luka. Gornji zubni luk tvori poluelipsu, a donji parabolu koja blago divergira unazad. Zbog većih dimenzija prednjih gornjih sjekutića zubni luk gornje čeljusti nešto je veći od luka donje, no to često zna biti kompenzirano i manjim dimenzijama maksilarnih umnjaka. Svaki zubni luk ima šesnaest zubi, četiri sjekutića, dva očnjaka, četiri pretkutnjaka i šest kutnjaka, a svaki zub pokazuje morfološku različitost koja je objašnjiva njegovom funkcijom.

Zub se anatomski dijeli na krunu, vrat i korijen, a građen je od cakline, dentina i cementa. U zubu se nalazi pulpa komorica, ispunjena zubnom pulpom, koja se proteže kroz krunu i korijen te završava otvorom na apeksu zuba. Zub u zubnoj alveoli učvršćuje periodont (3,4,5).



Slika 2. Građa zuba (izvor: Sobotta, Atlas anatomije čovjeka, 3. svezak, Naklada Slap)



## 1.2. Anatomija i fiziologija žlijezda slinovnica

Žlijezde slinovnice egzokrine su žlijezde koje proizvode i luče slinu, a nalaze se u stijenkama usne šupljine i ždrijela. Lučenje sline odvija se putem posebnog sustava kanalića u usnu šupljinu i sudjeluje u mnogim fiziološkim procesima.

Razlikujemo tri velike žlijezde slinovnice: *glandula parotis* – doušna žlijezda slinovnica koja ima funkciju serozne sekrecije sline, *glandula submandibularis* – podčeljusna žlijezda slinovnica koja proizvodi miješanu (pretežno seroznu) slinu te *glandula sublingualis* – podjezična žlijezda s miješanom, ali pretežito mukoznom sekrecijom. Te žlijezde luče 95 % ukupnog volumena sline, a preostalih 5 % proizvod je sekrecije malih žlijezda slinovnica: labijalnih, bukalnih, palatinalnih i lingvalnih, koje su razmještene po cijeloj sluznici usne šupljine te ih je većina dobila naziv po svojem anatomskom smještaju.

Male žlijezde slinovnice također se otvaraju u usnu šupljinu i orofarinks. Mogu biti mukozne i serozne. Osim njih, tu se ubrajaju i Ebnerove čisto serozne žlijezde u području papila valata i foliata.

Parotidna žlijezda serozna je žlijezda te je najveća od triju parnih žlijezda slinovnica. Smještena je u *fossi retromandibularis*, prednjim djelom djelomično prekriva *ramus mandibulae* i *musculus masseter*, sa stražnje je strane omeđuju hrskavica zvukovoda, *processus mastoideus* i *m. sternocleidomastoideus*, dolje stražnji trbuh *m. digastricus*, a gornju granicu čini zigomatična kost.

Parotidna žlijezda inervirana je parasimpatičkim i simpatičkim nitima autonomnoga živčanog sustava. Arterijska opskrba regije parotidne žlijezde bogata je i dolazi od ogranaka vanjske facijalne, okcipitalne i površinske temporalne arterije. Venska drenaža uglavnom prati arterijski sustav te ide putem facijalne vene i vena vrata (6,7).

### 1.3. Uloga sline

Slina, biološka tekućina koja se nalazi u usnoj šupljini, bistra je blago kisela tekućina (pH-vrijednosti 6,0 do 7,0) sastavljena od mješavine izlučevina žlijezda slinovnica, izlučevina velikog broja manjih žlijezda sluznice usne šupljine te gingivalne tekućine.

Po sastavu je vrlo slična krvi te kao kompleksna tekućina sadrži veliki broj enzima, hormona, protutijela, citokina te antimikrobnih tvari (8). Slina je specifičan sekret koji ima važnu ulogu u zaštiti usne šupljine. Sastavljena je od vode, organskih i anorganskih tvari. Dnevno se izlučuje između 500 i 1500 ml sline, a izlučivanje je kontrolirano simpatičkim i parasimpatičkim živčanim sustavom (9). Slina ima brojne funkcije koje su nužne za očuvanje oralnoga zdravlja i normalno funkcioniranje usne šupljine. Antimikrobni učinak sline postiže se na nekoliko načina: mehaničkom eliminacijom mikroorganizama gutanjem, vlaženjem oralnih struktura, čime se sprječava adherencija mikroorganizama na sluznicu, te antagonizmom oralne flore, koji omogućuje anabiozu, stanje u kojem ne dolazi do prevalencije nekih mikroorganizama. Puferski sustavi sline održavaju optimalnu pH-vrijednost, čime onemogućuju razvoj mikroorganizama. Postoji i enzimski sustav sline, koji se sastoji od enzima lizozima, peroksidaze i laktoferina, a koji imaju antimikrobni učinak.

Među salivarnim imunoglobulinima prevladava IgA, čija je glavna funkcija sprječavanje adherencije mikroorganizama na receptore na površini sluznice. Jasno je da će se u slučaju smanjene salivacije poremetiti osnovna funkcija usne šupljine te mehanizam obrane usne šupljine (6).

U slini se također mogu uočiti promjene u fiziološkom stanju organizma, što uključuje emotivne, endokrine, nutritivne te metaboličke promjene. Upravo zbog navedenog, slina se smatra potencijalnim izvorom podataka u procjeni stanja zdravlja, ne samo usne šupljine nego i cijelog organizma (10).

Neupitna je uloga sline koja svojim organskim i anorganskim sastavom ima, osim probavne, i važnu zaštitnu ulogu. Cirkulacija sline u usnoj šupljini ima mehaničku ulogu pri ispiranju patogenih bakterija, uklanja metabolite potrebne bakterijama za rast i razvoj. Slina, isto tako, posjeduje čimbenike kao što su tiocijanatni ioni i proteolitički enzimi koji uništavaju bakterije. Slina sadrži proteine koji nose litičku ulogu te tako eliminiraju bakterije u usnoj šupljini, uključujući i bakterije odgovorne za nastanak zubnog karijesa. Slina je važan biološki čimbenik u prevenciji dentalne erozije.

Ima ulogu u stvaranju zubne pelikule koja djeluje kao polupropusna membrana sprječavajući izravan kontakt kiseline s površinom zuba (11). Puferski kapaciteti u slini (bikarbonatni, proteinski, fosfatni) imaju zadaću neutralizirati kiseline te spriječiti ili zaustaviti demineralizaciju tvrdih zubnih tkiva (12). Istraživanja su pokazala da kisela hrana ima snažan utjecaj na pojačan protok sline, koji može biti znatno povećan u usporedbi s nestimuliranim protokom.

Razvojem novih tehnologija mijenja se i pristup u definiranju sline kao prognostičkog, odnosno dijagnostičkog biološkog materijala.

Serumska komponenta sline koja se dobiva dominantno iz lokalnih krvnih žila karotidne arterije definira slinu kao mogući sistemski pokazatelj promjena koje mogu biti povezane s određenim sistemskim bolestima. Zbog brzog, neinvazivnog i lako dostupnog prikupljanja, slina se često upotrebljava u dijagnostici bolesti usne šupljine. U posljednja dva desetljeća razvijen je niz pristupa koji definiraju slinu kao dijagnostički materijal u praćenju bolesti usne šupljine poput parodontnih bolesti te povećanog rizika za razvoj karijesa (13-15). Mnogobrojni medicinski vrijedni parametri iz sline upotrebljavaju se kao potencijalni biomarkeri u procjeni velikog broja patoloških stanja, poput tumorskih bolesti (16), kardiovaskularnih stanja (17), bakterijskih i virusnih infekcija (18, 19) te autoimunih bolesti (20).

Također, slina kao dijagnostički alat ima važnu ulogu u praćenju i otkrivanju biomarkera u djece i odraslih osoba, tim više što su metode uzorkovanja sline jednostavne za primjenu u usporedbi s uzorkovanjem seruma (nema uboda iglom), neinvazivne su, sigurne za primjenu, minimalni su rizici kontaminacije te je osigurana komercijalna dostupnost analitičkih testova (21).

### 1.3.1. Metode pretrage sline

Slina je idealan translacijski istraživački alat i dijagnostički medij. Upotrebljava se kao biološki materijal u svrhu iznalaženja molekularnih biomarkera za razne oralne i sistemske bolesti i stanja. Izlučivanje sline može se stimulirati stavljanjem limunske kiseline na jezik, no primjena limunske kiseline može izazvati interferencije kod imuno odgovora u tijeku analize povećanjem pH-vrijednosti sakupljenog uzorka. U mnogim istraživanjima slina se prikuplja tkaninama u ustima te potom centrifugira. Procedura prikupljanja uzorka ne smije utjecati na salivarne koncentracije ni apsorpcijom ni modifikacijom analita. Materijali poput parafina i pamuka apsorbiraju određene molekule iz sline te dovode do lažno sniženih rezultata mjerenja. Najčešće su korišteni sustavi za prikupljanje sline Salivette, Quantisal i Intercept. Svi sustavi sadrže jastučice koji se stave u usta, ispod jezika ili uz obraze. Apsorbirajući jastučići drže se u ustima tako da upijaju slinu, čije se stvaranje povećava žvakanjem, tijekom standardiziranog vremena od jedne do dvije minute. Potom se jastučić vraća u epruvetu. Nakon toga slijedi centrifugiranje gdje se slina odvaja od jastučića. Sustavi za uzimanje sline pokazali su reproducibilne rezultate za analizu mnogih steroidnih i peptidnih hormona (22).

Za prikupljanje sline koja se podvrgava daljnjim dijagnostičkim pretragama primjenjuju se različiti protokoli, a za proteomsku analizu uvriježena je metoda tekućinska kromatografija povezana sa spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography – mass spectrometry*, LC-MS). Utvrđeno je da postoje određene razlike u spolu (muškarci, žene), jer u zdravoj slini postoji čak oko 80 razlikovnih proteina. Međutim, ako su žlijezde slinovnice stimulirane kiselinom, ne uočavaju se razlike koje su inače fiziološki izražene u odnosu na spol (23).

Istraživanja provedena 2010. povezana su s proteomskim analizama sulkusne tekućine. Autori su uspoređivali pet pacijenata koji boluju od agresivnog parodontitisa i pet parodontno zdravih pojedinaca te je u provedenom istraživanju identificirano ukupno 154 proteina ljudskog, bakterijskog i virusnog podrijetla. Kroz studiju se pratio ukupni reciprocitet mikrobnih proteina i rezultati su pokazali da su mikrobnih proteini bili veći kod pacijenata s agresivnim parodontitisom, dok su proteini povezani s obranom domaćina, kao što su cistatin B i defenzini, istaknuli ekspresiju samo u ispitanim uzorcima zdravih pojedinaca (24).

U ovoj studiji riječ je o premalom broju ispitanika da bi se mogla postaviti teza pojedinog proteina kao budućeg biomarkera te autori ističu kako bi za takve pretpostavke bilo potrebno proširiti broj ispitanika u relevantnosti podataka.

U slini kao ultrafiltratu krvne plazme može se naći većina proteina biomarkera različitih bolesti (25). U novije doba detektirani su brojni biomarkeri koji su dobiveni proteomskom analizom seruma i / ili sline, kao što je primjerice specifičan proteom egzosoma iz sline, koji je predložen za detekciju karcinoma pluća (26). Istraživanja ukazuju da je otkriven i egzosomalni biomarker PSMA7 iz izolirane sline koji detektira upalnu bolest crijeva (27).

Rezultati istraživanja koja su provodili Haigh i sur. ističu dominantnost uloge proteina S100 pri odgovoru domaćina tijekom parodontitisa i navode kako bi baš ti proteini mogli biti budući potencijalni biomarkeri za praćenje aktivnosti pacijenata s uznapredovalim parodontitisom prije i poslije terapije (28).

Desetak visoko specifičnih proteina ovulacijske faze dokazano je proteomskom analize sline, a jedan je od najvažnijih cistatin S (29).

Ispitivanjima koja su rađena proteomskim analizama sline i suza kod pacijenata oboljelih od autoimune bolesti Sjögrenova sindroma utvrđeno je postojanje citokinskih molekula iz porodice TNF $\alpha$  (*engl. tumor necrosis factor  $\alpha$* ), koji u ranom stadiju mogu biti biomarkeri sindroma. U kontrolnoj skupini zdravih ispitanika nisu pronađene molekule citokina. Utvrđena je i pojačana ekspresija proteina CPNE1 (*engl. rekombinantni humani protein Copine 1*) i B-limfocita (30).

Giusto i sur. započeli su 2016. istraživanje biomarkera iz sline u vezi sa shizofrenijom te bipolarnim i velikim depresivnim poremećajem (31). Nadalje, Chee i sur. 2016. publiciraju rad u kojem biomarker otkriven u slini ukazuje na dijabetičku retinopatiju (32).

Leukoplakija može ukazivati na prekancerozne lezije te se masenom spektrometrijom iz sline može detektirati marker keratin 10 koji je siguran pokazatelj leukoplakije i prekancerozne lezije. Preko keratina 10 može se pratiti oporavak nakon karcinoma usne šupljine kao i u rizičnih skupina pacijenata koji konzumiraju alkohol i duhan (33).

Tecles i sur. 2016. opisuju studiju provedenu na 12 studenata, mladića, prije i nakon nogometne utakmice, u ovisnosti o fizičkoj aktivnosti; mjerili su aktivnost enzima amilaze i ukupne esterase, a kao zaključak iznose da su znatno povećane vrijednosti te je ukupna esteraza bila u pozitivnoj korelaciji s alfa-amilazom (34).

Mononuklearne stanice porijeklom iz periferne krvi i sline imaju jednaki stupanj DNA metilacije u iste individue.

Stoga se mononuklearne stanice mogu upotrebljavati samo iz sline u detekciji respiratornih alergija u slučaju kada se primjenjuje indikator DNA metilacije. Langie i sur. 2016. potvrdili su tezu da se slina pouzdano može upotrijebiti u svrhu mjerenja i detekcije metilacije mononuklearnih stanica koje sudjeluju u respiratornim alergijama (35).

Poznato je da biomarkeri, metaboliti iz sline, mogu ukazivati i na rani nalaz karcinoma dojke. Također je nađeno da su više vrijednosti određenih biomarkera pronađene u pacijentica s invazivnim karcinomom nego u pacijentica s karcinomom *in situ* (36). Biomarkeri kardiovaskularnih bolesti kao što su mioglobin, srčani troponin 1, kreatin fosfokinaza MB i mijeloperoksidaza također se mogu detektirati iz sline (37).

Isaza-Guzman i sur. 2017. proveli su istraživanje na dvije skupine pacijenata: skupini s kroničnim parodontitisom i skupini klinički zdravih pacijenata u kojih su pokazane značajno više vrijednosti NLRP-a (engl. *nod-like receptor family pynn domain containing protein 3*), ASC-a (engl. *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) i IL-1 $\beta$  (*interleukin 1 $\beta$* ) u skupini pacijenata s parodontitisom, dok nije bilo razlike među skupinama u ekspresiji kaspaze 1 (38).

Justino i sur. 2017. proveli su istraživanje na 14 mladih osoba. Uzorkovali su slinu primjenom sistema Salivette i parafina, te žvakaćom gumom kao stimulatorima slinjenja. Uzeli su također i uzorke sline bez stimulacije. U svim su uzorcima mjerili koncentracije ukupnih proteina, nitrita, ukupni antioksidantni kapacitet i alfa-amilazu. Uzorci sline koji su prikupljeni nakon stimulacije parafinom i žvakaćom gumom pokazivali su povišenu proizvodnju sline i sekreciju ukupnih proteina iz žlijezda slinovnica. Također, žvakaća guma stimulirala je povećanu sekreciju nitrita i ukupni antioksidantni kapacitet. Interesantno je da su kod nestimuliranog slinjenja u slini izmjerene niske koncentracije alfa-amilaze. Nadalje, oralna higijena smanjila je produkciju sline i reducirala sekreciju ukupnih proteina, a povećala koncentraciju alfa-amilaze. Tip stimulacije može aktivirati autonomne receptore odgovorne za sekreciju i sastav sline. Zaključak je da je pri proteomskoj procjeni sline vrlo važan način uzimanja uzoraka, kao i oralna higijena (39).

#### 1.4. Proteomika

Proteomika je znanost koja se bavi proučavanjem proteina, njihovom strukturom i funkcijom, u cilju sveobuhvatne kvalitativne i kvantitativne deskripcije proteinske ekspresije, ali i njezinih promjena pod utjecajem bioloških promjena koje se događaju, primjerice, za vrijeme bolesti i liječenja (40).

Izraz „proteomika” prvi se put pojavio 1995. godine i definiran je kao cjelokupni proteinski komplement karakterizacije staničnih linija, tkiva ili organizma (41-43).

Danas se susreću dvije definicije proteomike. Prva je klasičnija definicija i ograničava analizu genskih proizvoda u velikoj mjeri na studije koje uključuju samo proteine. Druga i sveobuhvatnija definicija kombinira studije proteina s analizama koje imaju gensko očitavanje, poput analize mRNA (*glasnička* RNA), genomike i dvohibridne analize kvasca (44).

Međutim, cilj proteomike ostaje isti, tj. postići globalan i integrirani prikaz stanja svih proteina stanice, a ne svakog pojedinačno. Budući da proteini sudjeluju u gotovo svim unutarstaničnim i međustaničnim procesima, proteomika znatno pridonosi trenutačnim spoznajama povezanim sa zdravljem i bolešću (45).

#### 1.4.1. Proteomska analiza sline

Slina predstavlja biološku tekućinu koja ima veliki temeljni i klinički potencijal. U proteomskom smislu, slina se najčešće upotrebljava za razlikovanje između fizioloških i patofizioloških stanja. Primjenom starijih tehnologija moglo se identificirati samo visoko zastupljene molekule, no manje zastupljene, koje dosad nije bilo moguće detektirati, često su mnogo važnije za procjenu pojedinoga patofiziološkog stanja (46).

Nove studije u određivanju proteoma ljudske sline pokazuju da osim glavnih proteina plazme među kojima je alfa-amilaza, slina sadrži do nekoliko stotina manjih molekula ili peptida koji definiraju osnove za razvoj potencijalnih bioloških markera zdravlja odnosno bolesti (47). Tako je i određen proteom sline koji uključuje podjelu proteina ovisno o žlijezdi slinovnici koja ih proizvodi, i to primjenom proteomskih metoda – visokoosjetljive masene spektrometrije u kombinaciji s različitim separacijskim metodama, primjerice metodom LC-MS/MS (*tekućinska kromatografija – tandem masena spektrometrija*) (48–50).

Više od 90 % proteina i peptida izoliranih iz sline dobiveni su sekrecijom iz tri „glavne” žlijezde slinovnice, a sve ostale komponente dobivene su iz manjih žlijezda, gingivalne i cervikalne tekućine, mukoznog eksudata te mikroflora usne šupljine. Proteinski sastav sline uspoređen je s proteinima plazme te je otkriveno da se oko 27 % ukupnih proteina sline nalazi i u plazmi. Iako je riječ o naizgled malom postotku, analiza genske ontologije kao što su molekularna funkcija, stanični odjeljak i biološka aktivnost pokazuju znatno preklapanje funkcionalnih skupina proteina između ovih uzoraka (51).

U posljednje su vrijeme analizom proteoma sline u brojnim patofiziološkim stanjima predloženi mnogi biomarkeri koje je nužno validirati u kliničkoj praksi. Očekivane su indikacije u kojima se kao biomarkeri ispituju proteini sline, upalne bolesti probavnog trakta kao parodontitis (52) i gingivitis (53), ali i upalna bolest crijeva (54). Proteomske analize sline imaju rastuću i sve važniju ulogu u ranoj identifikaciji mnogih vrsta karcinoma, kao što je oralni karcinom (55, 56), karcinom želuca (57) te karcinom pluća (58).

Važna je uloga ovih istraživanja i u potrazi za biomarkerima autoimunih bolesti kao što su Sjögrenov sindrom (30) i sustavni eritematozni lupus (59). Konačno, zbog neinvazivnog pristupa i lakoće prikupljanja uzoraka, osobito je značajno istraživanje biomarkera bolesti iz sline u pacijenata s neurološkim, psihijatrijskim i neurodegenerativnim oboljenjima kao što su autizam (60), shizofrenija i bipolarni poremećaj (61), te Parkinsonova bolest (62).



Osim velikog potencijala u dijagnostici i prognozi bolesnih stanja upotrebom neinvazivnog pristupa, uz minimalni trošak i jednostavnost prikupljanja uzorka, slina može poslužiti kao idealna dijagnostička zamjena za krv, odnosno serum i plazmu. Potvrda hipoteze da ljudska slina odražava stanje unutar cijelog organizma bila bi od velike važnosti, a u tome presudnu ulogu ima definiranje postupaka pravilne pripreme uzorka za analizu te primjena suvremenih tehnologija u detekciji i kvantifikaciji osnovnih komponenata sline. Primjenom naprednih instrumenata i razvojem analitičkih tehnologija, proteomika se nametnula kao moćan pristup u otkriću biomarkera u slini. U prilog tome govore i nove tehnologije analize sline koje se obavljaju masenom spektrometrijom – tehnikom kojom se analiziraju molekule na temelju mase i postojećeg naboja. Prvi je korak pri analizi molekula ionizacija molekula u ionizatoru. Nastali ioni provode se kroz analizator, koji razdvaja ione u prostoru i vremenu. Iz analizatora ioni idu na detektor, gdje se proizvodi električni signal koji se može registrirati na osciloskopu, pisaču, računalu ili na nekom drugom uređaju.

Masena spektrometrija primjenjuje se za: određivanje sastava nepoznatog uzorka (kvalitativna analiza), određivanje izotopskog sastava uzorka, određivanje strukture molekula promatrajući fragmentaciju molekula, određivanje molarne mase molekule, određivanje količine određene tvari u uzorku (kvantitativna analiza), određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava tvari, proučavanje ponašanja iona u vakuumu (preuzeto s <http://www.Wikipedia.org>, pojam „masena spektrometrija”, posjećeno 30. studenoga 2019.).

Trenutačno postoje dva različita eksperimentalna pristupa u analizi ukupnog proteoma sline. U *top-down* pristupu analiziraju se nativni proteini ili peptidi iz sline, a u *bottom-up* pristupu proteini se prije analize (identifikacije) enzimski kidaju na peptide. Poznato je da i sama prehrana kvalitativno i kvantitativno pridonosi razlici u proteomskom sastavu sline (63). Ključna je komponenta proteomske analize postizanje stabilnosti proteoma sline pravilnom manipulacijom, pripremom i pohranom uzoraka prije same analize. Naime, proteom sline podložan je brzom degradaciji endogenim peptidazama iz sline, što može kompromitirati i onemogućiti njezinu upotrebu u kliničkoj dijagnostici. Djelovanjem proteolitičkih enzima dolazi do brze razgradnje proteina koja se sprječava upotrebom proteaznih inhibitora u pripremi uzoraka sline za analizu. Nažalost, navedeni kokteli inhibitora ne mogu u potpunosti spriječiti razgradnju proteina pa se radi na unaprjeđenju tehnologije stabilizacije proteoma primjenom glicerola i etanola. Primjenom etanola može se postići stabilizacija uzorka na sobnoj temperaturi i do dva tjedna (64).

Nekoliko istraživačkih skupina primijenilo je dvodimenzionalnu gel elektroforezu (2-DE) (65, 66) za razdvajanje proteinskih molekula sline te su uzorci nakon digestije proteina iz gela analizirani masenom spektrometrijom (2D-MS). Takvim pristupom identificirano je 19 proteina specifičnih za slinu i 18 serumskih proteina. Iako 2D-MS ima veliki potencijal, problem je u identifikaciji proteina male molekularne mase, visoko kiselih ili lužnatih proteina, hidrofилnih ili onih koji su prisutni u vrlo malim količinama. Alternativa navedenom jest upotreba tekućinskog kromatografa kao separacijskog koraka prije masene spektrometrije (LC-MS). Primjenom tog pristupa identificirano je 102 proteina sline te 67 serumskih proteina, no navedenom tehnologijom ne dobiva se mnogo informacija o zastupljenosti proteina u slini. Kombinacijom tehnologija LC-MS i 2D-MS dobiven je najveći porast u broju identificiranih proteina, njih ukupno 309. Uporabom najmodernijih preparativnih kromatografskih separacijskih tehnika uparenih s modernim spektrometrima masa, nedavno je u ljudskoj slini identificirano više od 5500 proteina, mnogi od kojih su podrijetlom iz oralne mikroflore koja se sastoji od više od 50 bakterijskih rodova (67).

U analizi sline primjenjuje se i tehnologija SELDI-TOF-MS (engl. *surface-enhanced laser desorption ionization*, TOF-MS) kojom se nastoji analizirati proteomski sastav ukupne sline. Ova tehnologija zahtijeva mali volumen uzorka, a omogućava brzu i osjetljivu analizu složenih bioloških uzoraka, uz uobičajen oprez u predanalitičkim i analitičkim postupcima radi ispravne interpretacije dobivenih rezultata (68).

Budući da proteinske analize omogućuju simultano traženje i identifikaciju stotina ili pak tisuća različitih proteinskih molekula, proteomskim metodama možemo proučavati pojedine stanične procese u „suprotnom smjeru” od uobičajenog: umjesto ciljanog traženja određene molekule od interesa, proteomika omogućuje izradu proteomskog profila pojedinih uzoraka te identifikaciju molekula od potencijalne biološke važnosti.

Proteom je cjelokupni proteinski sastav jedinice promatranja. Brzi razvoj tehnologije, a time i medicinskih instrumenata, omogućio je i razvoj masenih spektrometara koji se primjenjuju u proteomskim analizama. Iz tog razloga počeli su se proteomski analizirati bioptati tkiva te tjelesne tekućine kao što su krv, iscjedak iz rane, urin, slina, sinovijalna tekućina, likvori, plodne vode, očna vodica. (69).

Nadalje, autori navode da se može proteomski analizirati niz bioloških tekućina, kao što su: ušni cerumen, očna vodica, suze, aspirat iz bradavice dojke, kolostralno mlijeko iz dojke, cervikalno-vaginalni iscjedak, nosni sekret, tekućina bronho-alveolarne lavaže i stolica (70).

## 1.5. Ortodoncija

Naziv ortodoncija složenica je od grčkih riječi *orthos* – pravilan i *odous* – zub, a označava glavni cilj ortodontske terapije – ispravljanje položaja zubi. Ortodoncija je stomatološka disciplina koja se bavi proučavanjem i nadzorom dentofacijalnog rasta i razvoja od rođenja do dentalne zrelosti, uključujući sve preventivne, interceptivne i terapijske zahvate kod dentalnih, dentoalveolarnih, maksilarnih, intermaksilarnih i maksilofacijalnih nepravilnosti koje iziskuju korekciju uz pomoć mehaničkih sila ili stimuliranje ili preusmjerenje funkcijskih sila unutar maksilofacijalnog kompleksa s pomoću posebno konstruiranih naprava da bi se uspostavili optimalni okluzijski odnosi i skladan izgled lica – navodi American Association of Orthodontics.

Ortodont planiranom terapijom može djelomično utjecati na položaj i odnos kostiju donje trećine lica, pa se ortodoncija naziva i dentofacijalnom ortopedijom. Možemo reći da se ortodoncija bavi proučavanjem i praćenjem rasta i razvoja dentofacijalnih struktura i čimbenika koji utječu na njihov rast, razvoj i položaj. Dijagnostika malokluzija, procjena terapijskih potreba i prioriteta, sprječavanje njihova nastanka, zaustavljanje progresije te njihova terapija, sve to ulazi u područje djelovanja ortodontije.

Cilj je ortodontske terapije postići individualno optimalan sklad okluzije, orofacijalne funkcije, estetike osmijeha i lica te psihosocijalne kvalitete života pacijenta (71).



Slika 3. Prikaz korekcije zagrizu ortodontskom terapijom

Studije koje proučavaju povezanost kvalitete života s malokluzijama većinom ukazuju na prisutnost korelacije između ta dva parametra. Prvotne istraživačke studije iz područja malokluzija, bile su usmjerene na jače izražene malokluzije, u smislu različitih oblika dentofacijalnih deformiteta (72 - 74), a potom su slijedila ispitivanja korelacije kvalitete života s gotovo svim vrstama i kategorijama malokluzija koje se najčešće javljaju u djece i odraslih osoba (75) s posebnim osvrtom na kvalitetu života povezanu s različitim oblicima malokluzija u stadijima dijagnostike, terapije i ishoda terapije (76). Zaključeno je da malokluzije imaju značajan negativni utjecaj na psihofizičko stanje pacijenata, te da ortodonski tretmani uvelike dovode do rješavanja ovakvih problema (72).

#### 1.5.1. Ortodonske naprave

Osnova ortodonske terapije je klinička primjena biomehaničkih koncepata putem aplikacije sile na zube, meka tkiva i koštane strukture orofacijesa. Ortodonske naprave po dizajnu se dijele na mobilne i fiksne, aktivne i pasivne. Mobilne naprave nisu dugotrajno pričvršćene za zube, pacijent ih sam unosi i vadi iz usta te time osobno utječe na njihov učinak i dužinu trajanja terapije. Fiksne su naprave duže vremena fiksirane za zube i pacijent ih ne može sam vaditi iz usta. Po vrsti struktura koje nose, ortodonske naprave mogu se podijeliti na tkivno nošene, zubno nošene i koštano nošene. Mobilne naprave sastoje od akrilatnog tijela u koje su ugrađeni retencijski elementi poput žičanih kvačica i labijalnog luka te aktivni elementi u obliku žičanih opruga i vijaka. Mogu biti izrađene i od drugih materijala, kao na primjer od silikona ili gume, drveta, plemenitog čelika ili elastičnih traka (71).



Slika 4. Mobilni ortodonski aparat

Fiksne su naprave uglavnom izrađene od metala, no mogu sadržavati i akrilatne, silikonske, keramičke, cirkonske ili gumene elemente.



Slika 5. Fiksni ortodontski aparat

U današnje vrijeme velika većina ortodontskih terapija provodi se nekom od tehnika fiksne ortodoncije. Fiksna ortodontska terapija odvija se pomoću bravica, žičanih lukova, te prstenova ili tuba. Bravice, tube i prstenovi kompozitnim se adhezivima fiksiraju na zube te tako ostaju do kraja terapije. Žičani lukovi postavljeni u bravice fiksiraju se metalnim ili gumenim ligaturama, ili metalnim klipovima integriranim u bravice suvremenije izvedbe i mijenjaju se po fazama terapije. Bravice su osnovni elementi svakog fiksnog aparata. Mogu biti izrađene od metala, keramike, plastike ili cirkona. Žičani lukovi izrađuju se od legura željeza, nikla, titana te predstavljaju osnovnu silu za pomak zuba.

Fiksna ortodontska terapija u prosjeku traje oko dvije godine. U samoj terapiji izmjenjuje se nekoliko radnih faza koje završavaju skidanjem aparata te završnom retencijskom fazom, fazom održavanja postignutog rezultata.

### 1.5.2. Ortodontski zubni pomak

Pomicanje zubi u sustavu dento-alveolarnog kompleksa sinergistička je aktivnost fizikalnih fenomena i biologije koštane pregradnje. Zubni biološki sistem reagira na promjenu u veličini i vremenu primijenjene sile reagirajući kroz promjenu aktivnosti receptorskih stanica i signalnih kaskada koje dovode do koštane pregradnje i ortodontskog zubnog pomaka (OTM, engl. *orthodontic tooth movement*).

Kost je rigidnog sastava nesposobnog za unutrašnje širenje ili kontrakciju, a promjene su jedino moguće mehanizmom koštane pregradnje koja uključuje koštanu izgradnju i razgradnju na periostalnoj, odnosno endostealnoj površini kosti. *Periodontium* osigurava zub u području zubne alveole. Sastoji se od mekih tkiva poput gingive i periodontalnog ligamenta (PDL), kao i čvrstog tkiva poput alveolarne kosti i zubnog cementa (slika 2). Sposobnost zubnog pomaka u području zubne alveole ovisi o PDL-u koji povezuje zub i alveolarnu kost. PDL je građen od gustoga fibroznog vezivnog tkiva koje sadrži snopove kolagenih vlakana, stanice, živčane i vaskularne komponente te tkivnu tekućinu. Primarna mu je funkcija potpora zubi u zubnoj alveoli uz osiguravanje uvjeta koji omogućuju zubima primjenu velike žvačne sile. U prostoru periodontalnog ligamenta osim njega nalazimo još: 1) fibroblastima slične stanice koje čine 50 do 60 % stanica, osteoblaste i cementoblaste; 2) resorptivne stanice osteoklaste, fibroblaste i cementoklaste; 3) progenitorne stanice, uključujući nediferencirane mezenhimalne stanice; 4) obrambene stanice kao što su makrofagi, mastociti i limfociti te 5) epitelne stanice, a sve zajedno pridonose homeostazi periodoncija (77).

OTM je proces koji uključuje fiziološku adaptaciju alveolarne kosti na mehaničku silu s manjim reverzibilnim oštećenjem periodoncija. Postoji nekoliko teorija OTM-a: 1) primjena sile tlaka i napetosti na PDL; 2) teorija protoka tekućine; 3) teorija savijanja alveolarne kosti. Klasična teorija tlaka i napetosti rezultira (djelovanjem većinom kemijskih signala) staničnom diferencijacijom i zubnim pomakom. Nekoliko sekundi nakon primjene sile dolazi do kompresije zuba na jednoj strani i napetosti ili tenzije zuba na drugoj strani (78).

U tom kratkom periodu uslijedi brza stanična i tkivna reakcija uz ekstravazaciju te kemotaksiju upalnih stanica. Protok krvi smanjuje se na kompresijskoj strani, dok se istodobno održava ili čak povećava na tenzijskoj strani. Ako sila potraje, promjene u protoku krvi dovode do promjene u omjeru kisika i ugljikova dioksida te kemijskog sastava okoline otpuštanjem biološki aktivnih tvari kao što su prostaglandini i citokini.

Navedeni medijatori dovode do različitih promjena na kompresivnoj i tenzijskog strani, što rezultira koštanom resorpcijom odnosno koštanom izgradnjom. Potrebno je 7 do 14 dana nakon primjene sile da dođe do zubnog pomaka (neki autori navode da je faza nepokretnosti između 4 i 20 dana) (78,79).

Spominju se tri faze zubnog pomaka: 1) inicijalna faza – odmah nakon primjene sile na zub, kada se zub pomiče u periodontalni prostor, traje 24 – 48 h; 2) *lag* faza – vrlo mali pomaci, faza kada dolazi do resorpcije kosti, odnosno micanja nekrotičnog tkiva, hijalinizacije PDL-a (20 do 30 dana); 3) *post lag* faza – od 30. dana nadalje, gdje je pomak zuba veći – to je faza akceleracije (80, 81).

Osnova za početak pomaka jest hipoksija koja se razvija u području PDL-a. Također, smanjenje kisika dovodi do porasta induktivnog faktora rasta 1, HIF-1; aktivacije ekspresije VEGF-a i RANKL-a u fibroblastima i osteoblastima PDL-a, te porasta diferencijacije osteoklasta koji potiču resorpciju kosti na strani kompresije. VEGF je citokin uključen u tkivnu neoformaciju koji povećava permeabilnost krvnih žila i angiogenezu, a RANKL je aktivator receptora nuklearnog faktora kapa-B ligand (82).

Primjena sile dovodi do naprezanja matriksa i okolnih stanica, stanične aktivacije i diferencijacije te tkivne pregradnje. Kada se primjeni sila na zub, dolazi do potiskivanja intersticijske tekućine kroz kanalikle i oko osteocita dovodeći do napetosti stanične površine i izvanstaničnog matriksa. Izvanstanični je matriks (ECM) kosti hidroksiapatit-kolagen kompozit, a izvanstanični matriks PDL-a građen je od fibroznih proteina uklopljenih u polisaharidni gel okolnih stanica. Protok tekućine dovodi do napetosti ECM-a i okolnih stanica potičući integrine te time aktivirajući signalnu kaskadu u osteocitima. Integrini su transmembranski proteini koji povezuju ECM s unutrašnjim citoskeletom, povezuju staničnu citoplazmu i jezgru s izvanstaničnim matriksom. Integrini također vežu fibronektin izvanstanično i talin intracelularno te tako osiguravaju signali transdukcijski put.  $\alpha V\beta 3$  integrin identificiran je u osteoklastima i povezan je s koštanom resorpcijom i u odontoblastima, gdje je povezan s resorpcijom zubnog korijena. Stimulacija stanične površine dovodi do otpuštanja intracelularnih molekula koje potiču osteocitnu gensku ekspresiju, diferencijaciju osteoblasta i osteoklasta te stvaranje i razgradnju kosti.

Dolazi do porasta razine unutarstaničnog kalcija, fosfolipaze A koja otpušta arahidonsku kiselinu, prekursor prostaglandina; enzim ciklooksigenazu koji konvertira arahidonsku kiselinu u prostaglandine, a koji je ključni upalni medijator. Slijedom navedenog dolazi do porasta vrijednosti drugih glasnika cAMP-a (ciklični adenzin-monofosfat) i cGMP-a (ciklični gvanozin-monofosfat) koji potiču fosforilaciju i gensku ekspresiju uz oslobađanje parakrinih i autokrinih signala za koštanu pregradnju (83).

Neki autori smatraju da diferencijacija osteoblasta započinje migracijom matičnih stanica iz zida krvnih žila, aktivacijom mezenhimalnih matičnih stanica prekursora i stvaranjem preosteoblasta 10 sati nakon primjene sile na zub. Stvaranje nove kosti počinje 40 do 48 sati nakon primjene sile (84).

Osteoblasti imaju veliki broj površinskih receptora preko kojih na njih djeluju brojne molekule. Molekule BMP-a (koštani morfogenetski protein) vežu se na te receptore pokrećući signalni put koji dovodi do diferencijacije osteoprogenitora i porasta funkcije osteoblasta. RUNX2 (faktor transkripcije vezan za Runt) je glavni ciljni gen koji dijeli signalne puteve TGF-beta (transformirajući faktor rasta beta) i BMP koji potiče gensku ekspresiju (eng. *core-binding factor alpha*) CBFA 1, ključnog modulatora osteogeneze. Obratno, ekspresija i signaling BMP-a mogu biti kontrolirani drugim signalnim molekulama i proteinima. Hormon rasta potiče koštanu formaciju vezanjem na receptore faktora rasta na površini osteoblasta i stimulaciju faktora rasta (85–87).

Važna je uloga neurotransmitera u ortodontskoj terapiji i pomaku zubi. Pritisak na živčane završetke vodi do oslobađanja vazoaktivnih neurotransmitera iz perifernih periodontalnih živčanih vlakana poput supstancije P (neuropeptida) i kalcitonin genski vezanog peptida, koji djeluju na vaskularne endotelne stanice te dovode do vazodilatacije i porasta permeabilnosti. Kalcitonin genski vezani peptid inducira koštanu formaciju preko proliferacije osteoblasta i inhibicije osteoklasta. Tekućinom potaknuta napetost te hipoksija dovode i potiču remodeliranje kosti i PDL-a, dovodeći do aseptičke upale, pri čemu podraženi endotel dovodi do vezivanja i oslobađanja upalnih stanica leukocita, monocita i makrofaga u PDL. Leukociti oslobađaju upalne citokine, prostaglandine, neurotransmitere i faktore rasta te stimulirajući faktor kolonija (CSF) koji djeluju na koštanu pregradnju. Nakon nekoliko dana akutna upalna komponenta prelazi u kroničnu te dolazi do stimulacije proliferacije fibroblasta, endotelnih stanica, osteoblasta i osteoklasta.



Oslobađaju se citokini IL-1 $\beta$  (interleukin), IL-6, IL-10, dušikov oksid (NO), tumor nekrotizirajući faktor TNF $\alpha$ , transformirajući faktor rasta TGF $\beta$ , M-CSF, prostaglandini, OPG (osteoprotegerin) i RANKL (88, 89).

IL-1 $\beta$  je jedan od aktivnijih citokina u periodontalnoj sredini tijekom inicijalne faze OTM-a i proizvode ga leukociti, fibroblasti, cementoblasti, cementoklasti, osteoblasti i osteoklasti. U prvim satima velik broj stanica pozitivan je na IL-1 $\beta$ . Nadalje, u ranoj fazi IL-1 $\beta$  proizvode osteoklasti, a kasnije makrofagi čija je akumulacija prisutna u kompresivnom području. Kompresija je povezana s porastom ciklooksigenaze 2, COX2, koja katalizira proizvodnju prostaglandina, među kojima je i PGE2 iz arahidonske kiseline. PGE2 djeluju na osteoklaste potičući staničnu koncentraciju cAMP-a koja je važna za resorpciju uz potvrđeni direktan učinak na porast broja osteoklasta. PGE2 stimulira i diferencijaciju osteoblasta i ekspresiju RANKL-a i OPG-a. Porast RANKL-a i M-CSF-a i smanjenje OPG-a od strane osteoblasta dovodi do veće diferencijacije osteoklasta i koštane resorpcije. Otpuštanje citokina kao što su IL-1 $\beta$  korelira s otpuštanjem IL-6 i TNF $\alpha$  te potiče diferencijaciju osteoklasta i njihovo preživljenje, uz paralelni porast upale (90).

Porast vrijednosti IL-8 primijećen je na strani tenzije i smatra se ključnim za koštano remodeliranje. Katepsini i MMP (matriks metalopeptidaza) uključujući i kolagenaze degradiraju PDL, izvanstanični matriks i koštani organski matriks omogućujući osteoklastima mjesto za resorpciju. Ti faktori potiču i mobiliziraju osteoklaste na kompresivnoj strani. Pomak zuba se događa kada se nekrotično tkivo makne skupa sa osteoklastima uz stvaranje novog osteoida od strane osteoblasta. Kompresijom potaknute BMP molekule i RUNX2 ekspresija potiče diferencijaciju osteoblasta i mineralizaciju dok proliferacija i aktivacija fibroblasta dovodi do produkcije ECM. Kod tenzije dominira stvaranje novog tkiva praćeno porastom broja osteoblasta i njihove aktivnosti. Sila napetosti potiče prekursore osteoblasta na diferencijaciju u PDL (91).

Capelli i sur. primijetili su statistički signifikantan porast vrijednosti MMP-3, MMP-9 i MMP-13 u gingivo cervikalnoj tekućini na kompresivnoj strani jedan sat nakon primjene ortodontske sile, uz nagli pad tijekom sljedeća 24 sata. Od 24 sata do 80 dana primijetili su progresivni porast vrijednosti MMP-a (92).

Istraživanja koja su proveli Alfaqeeh i Anil pokazala su progresivni porast degradacije kolagena tipa I, praćen porastom vrijednosti N-telopeptida (razgradni produkt kolagena) (93).

Postoji i teorija bioelektričnih signala u ortodontskom zubnom pomaku. Basset i Backer pretpostavili su da kao odgovor na primijenjenu mehaničku silu dolazi do razvoja električnih potencijala u podraženom tkivu. Navedeni potencijali daju naboj makromolekulama koji djeluju na specifična mjesta na staničnoj membrani ili mobiliziraju ione kroz samu membranu. Konkavna je strana ortodontski tretirane kosti elektronegativna i ima osteoblastičnu aktivnost, dok konveksna, pozitivno nabijena strana pokazuje osteoklastičnu aktivnost. Smatra se da bioelektrični odgovor može djelovati kao prvi glasnik (94).

Enzimi koji reflektiraju biološku aktivnost periodoncija su: kaspaza-1, aspartat aminotransferaza AST,  $\beta$ -glukuronidaza i laktat-dehidrogenaza, a smatra se da visoka enzimska aktivnost ukazuje i na veću staničnu aktivnost. Hijalinizirani PDL stvoren tijekom ranog razvoja ortodontskog tretmana nastoji se ukloniti procesom stanične apoptoze, u čemu je najrelevantnija aktivnost kaspaze 1 koja ima ulogu u procesiranju i aktivaciji proIL-1 $\beta$  i ostalih proinflammatoryh citokina (90).

U gingivalnoj cervikalnoj tekućini potvrđen je porast AST-a i na tenzijskoj i kompresijskoj strani 7. i 14. dana nakon postavljanja ortodontskog aparata. Taj se porast objašnjava posljedicom kontrolirane traume koja dovodi do apoptoze djelovanjem mehaničke sile na alveolarnu kost i PDL (95).

### 1.5.3. Utjecaj ortodontskog aparata na sastav sline

Veliki broj studija proveden je u cilju potvrde utjecaja ortodontskog tretmana na mikrobiološki sastav sline u određenim vremenskim intervalima. Atassi i sur. izvijestili su da je tri mjeseca nakon početka ortodontske terapije postojalo znakovito povećanje u stimuliranoj izlučenoj količini sline, puferskom kapacitetu i razini laktobacila. Kvaliteta sline koja uključuje sastav proteina, viskoznost, pH-vrijednost, puferski kapacitet sline i specifičnu količinu proizvedene sline u određenom vremenskom intervalu predstavlja ključnu ulogu u ravnoteži između demineralizacije i remineralizacije cakline u kariogenom okruženju (96). Svaki ortodontski postupak može na određeni način utjecati na navedene komponente, stoga je i cilj nekih provedenih prospektivnih studija bio pokazati utjecaj fiksnih ortodontskih aparata na pH-vrijednost sline, njezin puferski kapacitet te brzinu stvaranja sline u definiranim vremenskim točkama (97, 98).

Takva istraživanja nisu pokazala statistički značajnu razliku između spomenutih parametara na početku tretmana te godinu dana kasnije.

Za razliku od navedenog istraživanja, druga pokazuju znatan porast u stimuliranom stvaranju sline (reakcija na postavljanje stranog tijela), porast pH-vrijednosti i puferskih karakteristika sline. Osim navedenih rezultata, zabilježen je porast broja bakterija iz roda *Lactobacillus*. Porast u navedenim vrijednostima zabilježen je u ranom periodu od postavljanja aparata, kao odgovor na mehanički podražaj koji promjenom navedenih parametara može protektivno djelovati na pojavu karijesa. Dugotrajnija primjena ortodontskih aparata može utjecati na pojavu karijesa, stoga bi se veća pažnja trebala posvetiti higijeni usne šupljine te prehranbenim navikama (99–102).

Brojna istraživanja bave se utjecajem ortodontskog aparata i njegova učinka na organizam, pa su tako Ahn i sur. 2002. proveli istraživanje u kojem je uspoređen aminokiselinski sastav sline prije postavljanja i nakon postavljanja ortodontskih bravica izrađenih od različitih materijala te su pokazane jasne promjene u aminokiselinskom sastavu sline, što se reflektira i na njen kvalitativni proteinski sastav (103).

Nakon postavljanja plastičnih bravica raste koncentracija proteina koji sadrže aminokiselinu prolin, što je pogodan čimbenik za prihvaćanje bakterije vrste *Streptococcus Gordonii* na bravice i caklinu zuba. Naime, proteini bogati prolinom, alfa-amilazom i mucinom niske molekularne mase pogodovni su čimbenici za adheziju bakterije *S. Gordonii* te razvoj karijesa. Upravo zbog selektivnog vezivanja proteina na ortodontske bravice, ovisno o njihovom aminokiselinskom sastavu, ostvaruju odgovarajući okoliš pogodan za rast bakterija, što ih razlikuje od drugih materijala poput materijala za ispune ili zubne cakline (104).

Slina pacijenata podvrgnutih ortodontskom tretmanu može unosom kiselih pića imati sporiji oporavak pH-vrijednosti od one bez ortodontskog aparata, stoga su pacijenti s ugrađenim aparatom podložniji riziku od dentalnih oštećenja (105).

Štoviše, zabilježen je i pad pH-vrijednosti sline nakon postavljanja ortodontskog aparata (106), koji dovodi do povećanog nakupljanja zubnog plaka i porasta nakupljanja bakterija na površini zuba, što se prikazuje pojavom bijelih mrlja na caklini (103) i demineralizacijom (107).

Rezultati studija koje su nastojale istražiti utjecaj ortodontskog aparata na sastav mikrobiološke flore u usnoj šupljini nisu usuglašeni.

Naime, u *in vivo* studiji provedenoj na dvadesetero djece u dobi od 6 do 15 godina pokazan je znatan porast bakterija vrsta *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.*, kao i gljive *Candida albicans* u različitim vremenskim intervalima nakon postavljanja aparata (108, 109), dok u studiji provedenoj na 32 pacijenta kojima je postavljen različiti tip ortodontskog aparata nije zabilježen znatan porast kolonija vrste *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus* u pacijenata s postavljenim aparatom u odnosu na kontrolnu skupinu (110).

U studiji kojom su obuhvaćena 54 odrasla pacijenta s fiksnim aparatom ukazano je na porast bakterija vrsta *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Fusobacterium nucleatum* u razdoblju nakon što je aparat uklonjen, što ukazuje na rizik od razvoja parodontnih bolesti i na važnost povećane oralne higijene tijekom, ali i nakon primjene aparata (111).

Napravljena je i analiza biljega oksidativnog stresa i antioksidativnog odgovora u zdravih ispitanika s fiksnim ortodontskim aparatom, čiji su rezultati pokazali modifikacije u njihovu balansu povezane s oslobađanjem nikla s ortodontskog aparata u slinu (112, 103, 117, 113–117). Otpuštanje nikla i drugih metala izaziva upalnu reakciju, a kod preosjetljivih osoba i sistemske alergijske reakcije (117, 114).

Interesantno istraživanje povezano s uporabom mobitela, otpuštanjem iona nikla i pH-vrijednošću sline provedeno je na 42 zdrava pacijenta s postavljenim ortodontskim aparatom. Naime, elektromagnetsko zračenje mobitela uzrokuje znatno povećanje u oksidativnom stresu te lučenju sline, što može dodatno korozivno djelovati na metalnu komponentu aparata. Pokazano je da je otpuštanje nikla veće, a pH-vrijednosti sline niže u korisnika mobitela u usporedbi sa skupinom koja nije upotrebljavala mobilni telefon (118).

Također je zaključeno da na količinu otpuštenog nikla iz fiksnoga ortodontskog aparata znatno utječe pH-vrijednost sline (119).

Neki su istraživači potvrdili, kako kod životinjskih tako i kod ljudskih studija, da zračenja mobilnog telefona uzrokuju znatno povećanje oksidacijskog stresa u slini, protoka ukupnog proteina i albumina u plućima, dok se amilazna aktivnost smanjuje (120). Štetni učinci upotrebe mobilnog telefona uglavnom su rezultat emitiranja radiofrekvencijskih elektromagnetskih zračenja. Budući da se mobilni telefon drži u neposrednoj blizini usne šupljine tijekom razgovora, pacijenti koji prolaze fiksnu ortodontsku terapiju mogu imati ozbiljan rizik od izlaganja metalnog aparata zračenju mobilnog telefona, što dovodi do oslobađanja toksičnih korozivnih produkata u slini (121).

## **2. SVRHA ISTRAŽIVANJA**

Svrha istraživanja jest tehnikama proteomske analize nastojati potvrditi utjecaj fiksnoga ortodontskog aparata na razliku u ekspresiji proteina u proteomskom profilu sline kod pacijenata u ortodontskoj terapiji u usporedbi s kontrolnom skupinom, i to u zadanom vremenskom intervalu od mjesec dana.

Cilj je istraživanja ispitati utjecaj postavljanja i aktivacije fiksnoga ortodontskog aparata u djece mlađe adolescentske dobi na proteinski sastav sline.

Nadalje, cilj je s pomoću proteomske analize potvrditi jaču ekspresiju proteina u slini pacijenata podvrgnutih terapiji fiksnim ortodontskim aparatom, te ustanoviti razlike u odnosu na pacijente koji nisu podvrgnuti terapiji.

Hipoteza glasi da postavljanje i aktivacija fiksnog ortodontskog aparata u djece mlađe adolescentne dobi uzrokuje promjene proteinskog sastava sline.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

### 3.1. Ispitanici

Povjerenstvo za etiku Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu odobrilo je studiju i njezin protokol (05-PA-15-4 / 2017) te je od roditelja sudionika studije dobiven pisani informirani pristanak.

U istraživanju su sudjelovali pacijenti poliklinike Orthonova, Maksimirska 32, Zagreb, indicirani za fiksnu ortodontsku terapiju. Ispitivana skupina sastojala se od 18 ispitanika.

Ispitanici su bili u dobi od 13 godina, muškog spola, bez organskih oboljenja i zadnje primjene antibiotika unatrag mjesec dana, a indicirana im je fiksna ortodontska terapija. U terapiji je bilo 12 (N = 12) ispitanika, uključujući šest kontrolnih (N = 6), ali bez fiksnoga ortodontskog aparata.

Uključni kriteriji za sudjelovanje ispitanika u istraživanju jesu: dob od 13 godina, muški spol i indikacija za fiksnu ortodontsku terapiju.

Isključni kriteriji za sudjelovanje ispitanika u istraživanju jesu: postojanje neke od sistemskih bolesti koja bi dodatno utjecala na rezultat istraživanja, ne odazivanje na kontrolne preglede i iznenadna pojava bolesti tijekom perioda istraživanja.

Rizika za ispitanike nije bilo u ovom istraživanju.

Sve informacije prikupljene tijekom istraživanja dobivene su uz informirani pristanak ispitanika i strogo su povjerljive. Identitet sudionika u istraživanju poznat je liječniku dentalne medicine koji obavlja istraživanje i ustanovi za koju odgovorni liječnik obavlja istraživanje.

Ispitanici nisu dobili kompenzaciju za sudjelovanje u istraživanju i ne postoji sukob interesa. Prije ispunjavanja informiranog pristanka, ispitanici su dobili dodatno usmeno pojašnjenje naravi, tijeka i svrhe istraživanja. To je također bilo opisano dodatnim poglavljem u okviru informiranog pristanka.



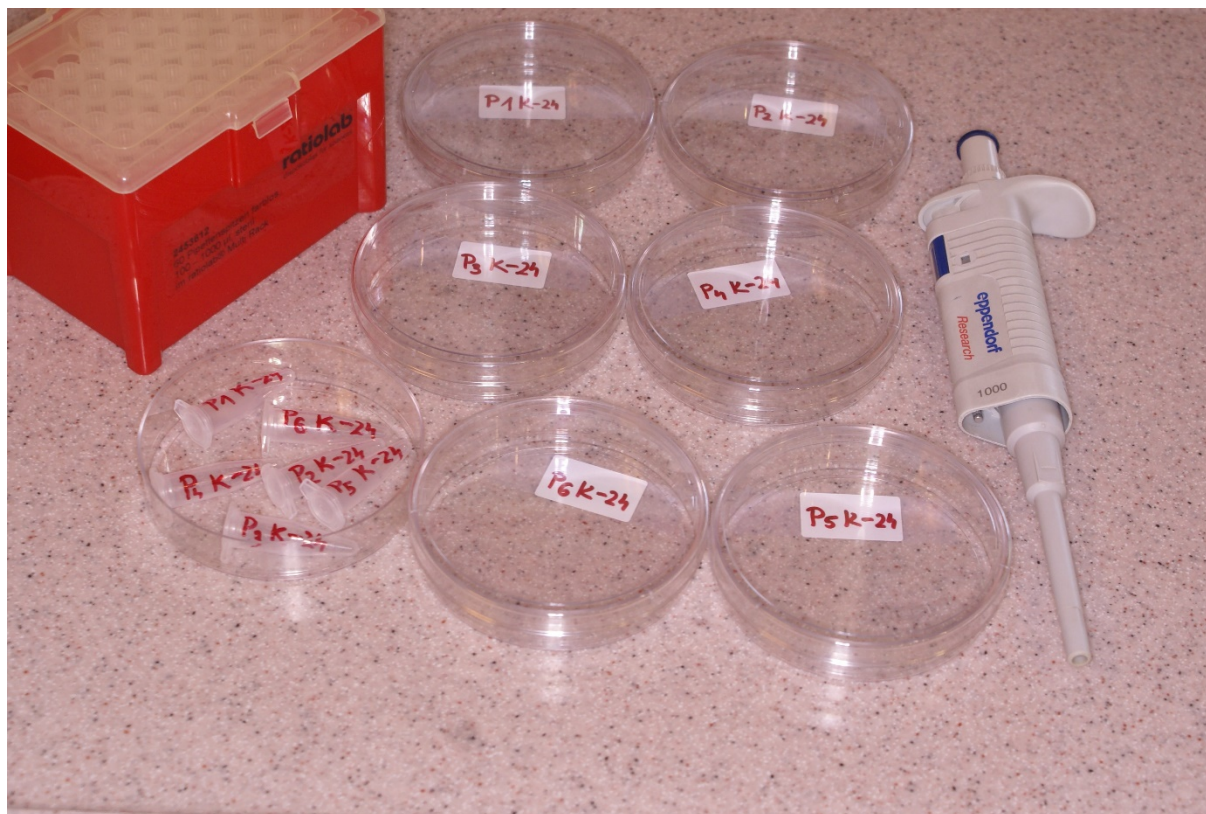
### 3.2. Prikupljanje uzoraka

Ispitanicima su dane jasne upute da sat vremena prije uzimanja uzorka sline operu zube te ne konzumiraju hranu ni piće. Populacija je adolescentske dobi te su ispitanici vrlo detaljno informirani o zabrani konzumacije alkoholnih pića, cigareta i opijata, zbog utjecaja na rezultate. Na dan svakog uzimanja uzoraka sline ispitanici su došli u ordinaciju sat vremena prije uzimanja uzorka, oprali zube te nisu jeli niti pili u tom periodu. Vjerodostojnost istraživanja potvrđena je uzimanjem uzoraka sline pod našom kontrolom kako bi se isključile moguće varijabilnosti.

Budući da je proteomski profil sline varijabilan u toj životnoj dobi, prvo uzimanje sline obavljeno je 24 sata prije postavljanja fiksnoga ortodontskog aparata i neposredno pred postavljanje. Potom je slina uzimana svim ispitanicima iz obiju skupina nakon 48 sati, 7. dana terapije i 30. dana terapije.

Postupak prikupljanja sline obavljen je kroz tri uzastopna ispljuvka direktno u Petrijevu zdjelicu te se uzorak pipetom prebacivao u Eppendorf tubice (2.0 ml) prethodno označene relevantnim podacima ispitanika. U slučaju da su primijećene organoleptičke promjene u boji sline, sukrvica ili ostaci hrane, ispitanika se isključilo iz studije (stoga se u studiju uključilo 20 % više ispitanika). Prikupljeni uzorci sline fotografirani su kao dokaz ispravne procjene. Odmah po prikupljenom uzorku, slina se zamrzavala na - 20 °C te se na ledu transportirala do mjesta pohrane uzoraka na - 80 °C. Naime, slina sadrži brojne proteaze pa je degradacija proteina vrlo brza, stoga se postupak uzorkovanja i pohrane mora obaviti u najkraćem mogućem vremenu.

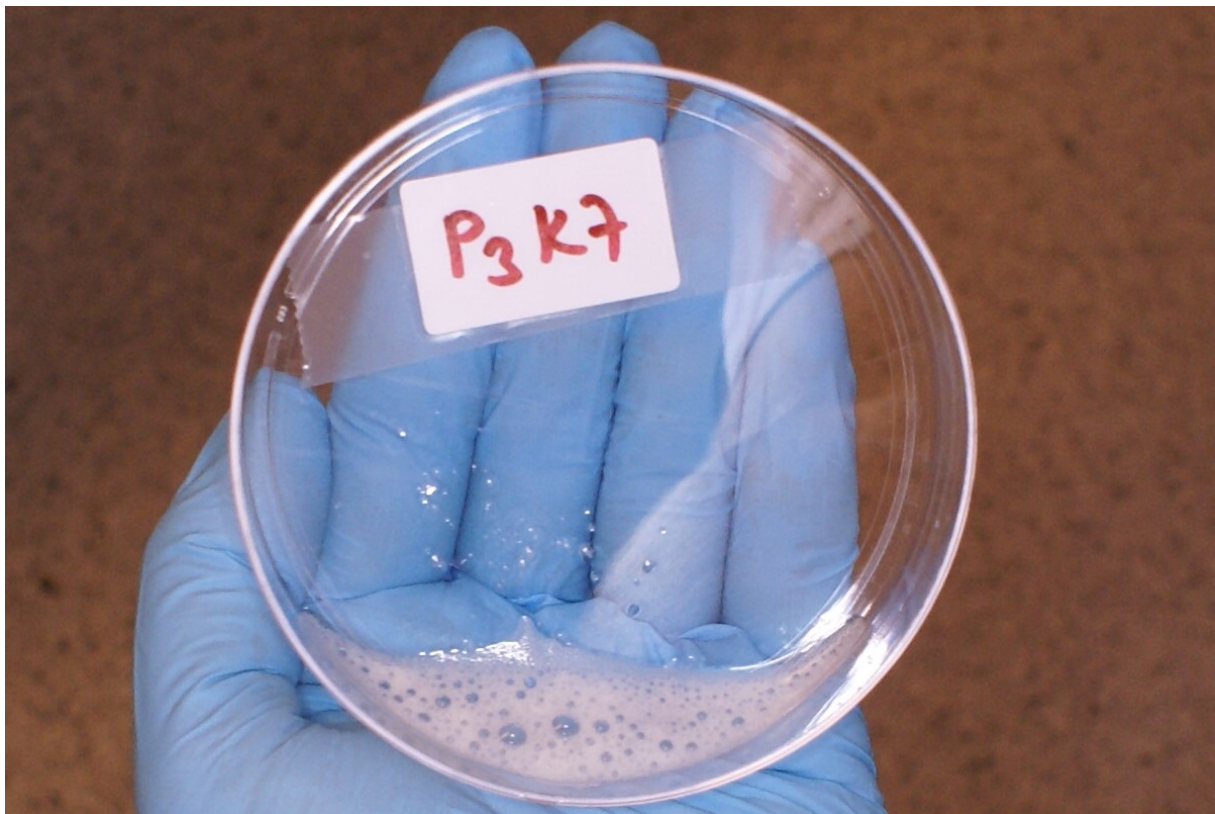
Svi su uzorci prikupljeni prema različitim vremenskim točkama uzorkovanja, centrifugirani su 10 min pri 12 000 g na 4 °C radi uklanjanja nečistoća, a proteini su se pročišćavali taloženjem acetonom. Koncentracija proteina određena je primjenom seta pribora RC DC protein Kit II (Biorad).



Slika 6. Laboratorijski pribor za uzorkovanje sline



Slika 7. Primjer prikupljanja uzorka sline u Petrijevu zdjelicu



Slika 8. Kontrola uzorka



Slika 9. Prikupljanje sline pipetom



Slika 10. Prebacivanje sline u Eppendorf tubicu



Slika 11. Označavanje uzoraka ispitanika

### 3.3. Analiza uzoraka - masena spektrometrija

Uzorci proteina (40 µg) prebačeni su u centrifugalne filtarske jedinice s veličinom pora od 10 kDa, denaturirani su pomoću 8 M ureje i alkilirani 20 minuta u tamnom prostoru pri sobnoj temperaturi primjenom 55 mM jodoacetamida u 8 M ureji. Nakon dva koraka pranja (15 min, 14 000 g, pri sobnoj temperaturi) upotrebom 8 M ureje, uzorci su isprani dva puta 50 mM amonijevim bikarbonatom i preko noći kidani na triptičke peptide na 37 °C s 13 ng/µL tripsina (Worthington, tretiran TPCK) u 25 mM amonijevu bikarbonatu. Pokidani peptidi eluirani su kroz 10 kDa filtre u čiste Eppendorf epruvete i zatim isprani primjenom 0,5 M natrijeva klorida. Peptidi su zatim zakiseljeni s pomoću 20 % octene kiseline i razdvojeni na temelju polarnosti tekućinskom kromatografijom visokih performansi (HPLC, Ultimate 3000, Thermo Fischer Scientific). Za pročišćavanje i odvajanje peptida upotrijebljena je C18 mikro pretkolona i 50-centimetarska analitička C18 kolona. Automatizirani ciklusi masenih spektrometrijskih mjerenja (LTQ Orbitrap Discovery, Thermo Fischer Scientific) sastojali su se od skeniranja punoga masenog spektra (MS) i tandemskog (MS/MS) skeniranja deset najintenzivnijih iona.

Primijenjen je puni raspon pretraživanja od  $m/z$  300 do 2000, rezolucija Orbitrap analizatora namještena je na 100 000, a uz unutarnju kalibraciju instrumenta omogućena je s pomoću tzv. postavke *Lock-mass*. Programski paket MaxQuant, inačica 1.5.1.2. (Max Planck Institute of Biochemistry) upotrijebljen je za obradu sirovih eksperimentalnih podataka i kvantificiranje detektiranih proteina. Tripsin je odabran za *in silico* digestiju, a karbamidometilacija, N-terminalna acetilacija i oksidacija metionina odabrane su kao varijabilne modifikacije peptida. Stopa lažnog otkrivanja na razini peptidnog spektra i na razini detekcije proteina postavljena je na uobičajenih 1 %. Minimalna duljina peptida za identifikaciju proteina bila je sedam aminokiselina. Tolerancija pogreške mase peptida postavljena je na 4,5 ppm. Uobičajeni laboratorijski kontaminanti bili su isključeni iz analize. Proteini su kvantificirani s pomoću iBAQ-a – vrijednosti kontinuiranog intenziteta ekspresije proteina u pojedinim uzorcima (tj. omjera zbroja eksperimentalno utvrđenih intenziteta svih peptida i intenziteta pojedinačnog detektiranog peptida). Eksperimentalni podaci uspoređeni su sa skupom ljudskih proteina dostupnim u bazi podataka UniProt (<http://www.uniprot.org>).

Uzorci su analizirani u tehničkim triplikatima, a proteini identificirani s najmanje jednim peptidom smatrani su relevantnima za analizu (122).



Slika 12. Pohrana uzoraka u hladnjaku na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$



Slika 13. Preparativni laboratorij



Slika 14. Analitički laboratorij



Slika 15. Tekućinska kromatografija i masena spektrometrija

## **4. REZULTATI**



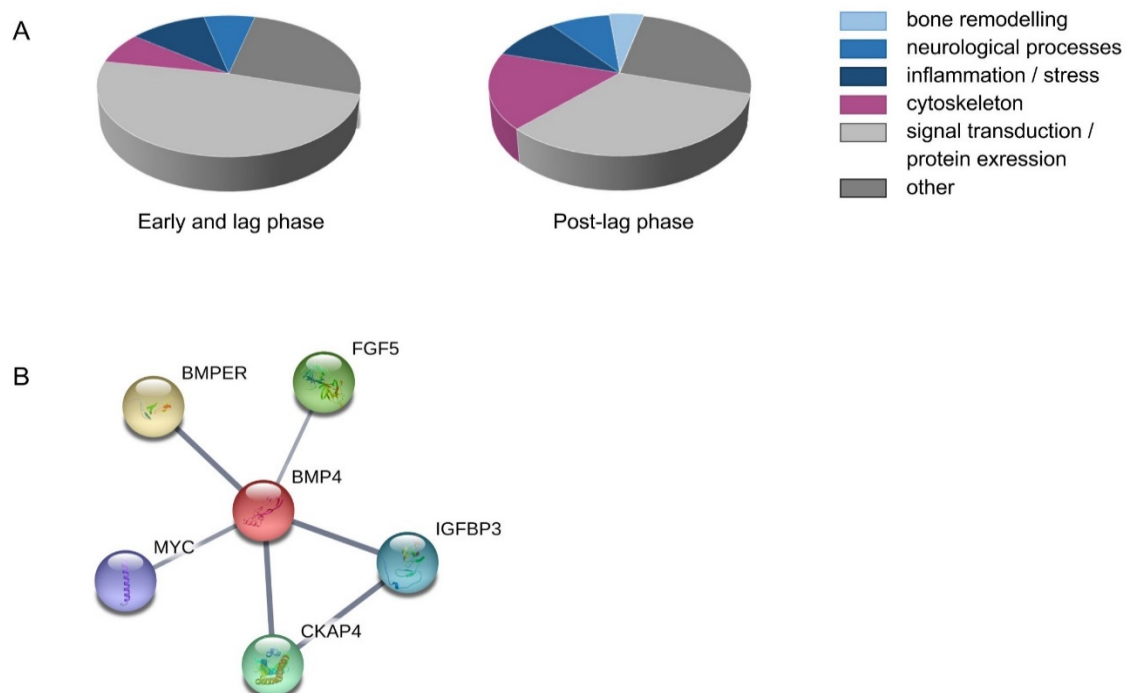
#### 4.1. Analiza rezultata dobivenih masenom spektrometrijom

Dobiveni proteomi sline zdravih ispitanika (u dobi od 13 godina) koji imaju fiksni ortodontski aparat uspoređeni su s kontrolnim uzorcima. Za obje su skupine uzorci sline prikupljeni u različitim vremenskim intervalima u skladu s fazama ortodontskog zubnog pomaka. Kontrolno uzorkovanje sline obavljeno je dan ranije, zatim je slijedilo uzorkovanje sat vremena prije postavljanja fiksnoga ortodontskog aparata, te 2. i 7. dan nakon postavljanja. Posljednja vremenska točka našeg eksperimenta bila je 30. dan nakon postavljanja aparata, što odgovara ranoj *post lag* fazi terapije i početku remodeliranja kostiju.

U svim uzorcima sline identificirano je 198 proteina (tablica 1), što je u skladu sa sličnim proteomskim istraživanjima sline (123).

Proteini otkriveni masenom spektrometrijom klasificirani su na temelju funkcionalnih karakteristika, dostupnih iz baze podataka UniProt. U početnoj i *lag* fazi ortodontske terapije identificirali smo proteine koji su uključeni u neurološke procese, upalu/stres, citoskelet, transdukciju signala / ekspresiju proteina i druge procese. U *post lag* fazi proteom sline sadržavao je dodatnu skupinu proteina uključenih u pregradnju kostiju (slika 16).

Baza podataka STITCH, verzija 5.0 (<http://stitch.embl.de>) upotrijebljena je za analizu interakcijskih mreža ove nove skupine proteina, a BMP4 je definiran kao glavni akter u nadolazećem remodeliranju zubne kosti.



Slika 16. Ekspresija proteina iz sline nakon postavljanja fiksnoga ortodontskog aparata

A. Panel pokazuje proteine izražene u ranoj i *lag* (lijevo) te *post lag* fazi (desno) ortodontskog pomaka zuba. Proteini su grupirani prema fiziološkim procesima čiji su dio.

B. Mreža interakcija proteina povezanih s proteinom BMP4 iz sline u *post lag* fazi kako je to predviđao softver STITCH, verzija 5.0 (<http://stitch.embl.de>).

Debljina crte ukazuje na čvrstoću potpore podataka.

BMP4 – koštani morfoogenetski protein 4

BMPER – proteinski endotelni regulator proteina BMP

FGF5 – faktor rasta fibroblasta 5

IGFBP3 – protein 3 koji veže faktor rasta

CKAP4 – protein 4 povezan s citoskeletom

MYC – myc protoonkogeni protein

## 4.2. Identificirani proteini u uzorcima sline

Tablica 1. Proteini identificirani u svim uzorcima sline

Nazivi proteina	Slijed peptida	UniProt ID	Genski ID
1-fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat fosfodiesteraza beta-2	EMEFLDITSIRDTRF GK	Q9BVT6	PLCB2
2-oksoglutarat i protein 2 koji sadrži o željezu ovisnu domenu oksigenaze	HFCRCACFCTDNLYV AR	F5H890	OGFOD2
Protein 10 povezan s aktinom	LLGSTTPRR	G3V5Y4	ACTR10
Protein adenomatozne polipoze kolona	ILKPGEK	P25054-2	APC
Adenilat ciklaza tipa 9	KKSSIQK	O60503	ADCY9
Protein 13 za sidrenje A kinaze	HCTSTRK	H0YMW2	AKAP13
Alkoholna dehidrogenaza 4	GTKGKVIK	D6RIB1	ADH4
Protein za popravljanje alkilirane DNA alkB homolog 1	RDISTEGFCHLDDQN SEVK	Q13686	ALKBH1
Alfa-amilaza 1	HMWPGDIK	Q5T085	AMY1B
Interaktivni protein obitelji B član 1 koji veže amiloidni beta-A4 prekursorski protein	PPPAVAK	Q7Z5R6	APBB1IP
Antigen KI-67	PKTPLGK	P46013-2	MKI67
Aprataksin	GYVKVKQSLR	Q6JV79	APTX
Astrotaktin-1	EVAAGQVLKGTFR	B1AJS1	ASTN1
ATPaza ASNA1	YLDQMEDLYEDFHI VK	A0A087WX S7	ASNA1
RNA helikaza ovisna o ATP-u DDX18	MSHLPMKLLRK	Q9NVP1	DDX18
RNA helikaza ovisna o ATP-u DDX50	LNGDTEEGFNRLSDE FSK	A0A087WV C1	DDX50
Protein 13 povezan s autofagijom	EIKVSYTVYN	E9PPR2	ATG13
Beta-defensin 126	PEEMHVKNWAMC GKQR	Q9BYW3	DEFB126
BMP-vezujući endotelni regulator protein	VKLRAHR	Q8N8U9	BMPER
Koštani morfo-genetski protein 4	RRPQPSK	H0YMP9	BMP4
Regulatorna podjedinica BRCA1 povezanog aktivatora ATM-a tipa 1	PVSSWCTSWLCPCEV EPR	F8WDN5	BRAT1

Okolna bromodomena domene cinkova prst proteina 2A	VPGRRGR	A0A0C4DGI9	BAZ2A
Kalpain-6	SLYLRKK	Q9Y6Q1	CAPN6
Kalsintenin-2	VPDGIVPK	Q9H4D0	CLSTN2
Protein kinaza ovisna o CAMP-u tipa I – alfa-regulatorna podjedinica	ITRQWPL	X6RAV4	PRKAR1A
Kaspaza-2	PCTPEFYQTHFQLA YR	P42575-2	CASP2
Hondroitin sulfat proteoglikan 5	LSPASELPK	A0A087WU T8	CSPG5
Kohezin podjedinica SA-3	RRVEGPAK	H0Y4S6	STAG3
Komplement C4-A	INVKVGGSNSKGTK	F5GXS0	C4B
Ciklički AMP-responzivni element-vezujući protein 4 sličan proteinu 3	SVLHADEM	Q8TEY5-2	CREB3L4
Kationski kanal beta-3 zaštićen cikličkim nukleotidom	LLWFKVK	Q9NQW8-2	CNGB3
Kinaza 8 ovisna o ciklinu	ITSEQAMQDPYFLED PLPTSDVFAGCQIPY PKR	A0A0D9SEP 3	CDK8
Protein 4 povezan s citoskeletom	LFVKVEK	Q07065	CKAP4
Citosolna karboksipeptidaza 1	IIGPFSKK	J3KNS1	AGTPBP1
Homolog faktor ekspanzije probavnog organa	IIVSNKK	H7C2R4	DIEXF
Protein 1 poremećen u shizofreniji	KTPLKVLEEWK	A0A087WY X6	DISC1
Protein Msh2 za popravljanje neslaganja DNK	AGNKASK	C9J809	MSH2
DNK transpozaza THAP9	WELYNWRETDEYSA EMK	H0Y9F3	THAP9
DNK-3-metiladenin glikozilaza	HVRSTLR	P29372	MPG
Dokirajući protein 3	GERRVIR	D6RAV2	DOK3
Adhezijska molekula Downova sindroma	SQDVHIKAVLR	O60469-2	DSCAM
DPH3 homolog	EDLENGEDVATCPSC SLIK	Q96FX2	DPH3
Dineinski aksonemalni teški lanac 11	PDLEKLLK	A0A0C4DF R0	DNAH11
Dineinski aksonemalni teški lanac 17	TPNVVEATSK	K7EK91	DNAH17
E3 ubikvitin-protein ligaza HERC2	TPKLIK	A0A0J9YX Q8	HERC2
E3 ubikvitin-protein ligaza MIB2	PAELQRR	D6RED3	MIB2

E3 ubikvitin-protein ligaza TRIM69	IKKLPLLK	A0A0G2JPI4	TRIM69
E3 ubikvitin-protein ligaza UBR4	YDEDHSGDDKVFLD CFCK	X6R960	UBR4
Rani endosomski antigen 1	RNQQILK	Q15075	EEA1
Protein 1 sličan proteinu 1 koji vezuje EH domenu	PEASGVDTEPRSGGR EANTK	E9PIH6	EHBP1L1
Pojačivač polikombnog homologa	PLPIYRGK	E9PBA8	EPC2
Podjedinica D eukariotskog faktora 3 inicijacije translacije	TQKTAYQRNR	B0QYA8	EIF3D
Tip 1B eukariotskog faktora 4E inicijacije translacije	APGPLPK	H0Y8X3	EIF4E1B
F-kutija protein 47	ELYCMDWTVKMMQKV CK	Q5MNV8	FBXO47
Protein 8 koji sadrži domenu FERM	DGTEGSAGQPGAER	Q8N4M4	FRMD8
Faktor rasta fibroblasta 7	EGGDIRVR	H0YNE7	FGF7
Faktor rasta fibroblasta 5	IPLSAPR	P12034	FGF5
Receptor folata gama	QVNQSWRK	A0A087WYI 3	FOLR3
Protein 6 koji sadrži domenu FYVE, RhoGEF i PH	TARLLRQK	F8VY01	FGD6
Podjedinica beta-1 receptora gama-aminobutrične kiseline	HGVPSKGRIR	P18505	GABRB1
Glutamil aminopeptidaza	SVFDYFEEYFAMNYS LPK	Q07075	ENPEP
GPNMB protein	LLLYLSLK	Q96F58	GPNMB
Protein 2B koji sadrži domenu GRAM	FETPGSPR	D6REP5	GRAMD3
Podjedinica 4 H/ACA ribonukleoproteinskog kompleksa	PPLIAAVKR	H7BZF2	DKC1
Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein L	RRSVPAR	M0R1W6	HNRNPL
Histonska deacetilaza 10	SLWLNIR	C9J8B8	HDAC10
Histon-lizin N-metiltransferaza SMYD3	EPLKVEK	B0QZ88	SMYD3
Protein 1 povezan s HSPB1	INVVNPDLKR	Q96EW2-3	HSPBAP1
Importin-9	EVTDTQMPLVAPVIL PEMYKIFTMAEVY GIRTR	Q96P70	IPO9
Neaktivni romboidni protein 2	DSGCCVQNDHSGCIQT QRK	Q6PJF5-2	RHBDF2
Neaktivni romboidni protein 2	LQSRKPPN	K7ELA9	RHBDF2
Neaktivna ubikvitin karboksil-terminalna hidrolaza 54	EPSISSDTRTDSSTESYP YK	R4GN32	USP54

Inhibitor proteina koji je u interakciji s kapa-B kinazom nuklearnog faktora	KMEDLTMQMFNMEDD MLK	Q70UQ0	IKBIP
Protein 3 koji veže faktor rasta sličan inzulinu	HRLAAGR	C9JMX4	IGFBP3
Protein interaktora za faktore 1 razmjene citohezina	KFWVILK	E5RK08	IPCEF1
Interferonom-inducirani protein s tetratrikopeptidnim ponavljajućim slijedom 1B	EATNWQPRGQDRETV DR	Q5T764	IFIT1B
Protein 1 koji sadrži motiv IQ i domenu SEC7	GVQYLIER	A0A0C4DG T3	IQSEC1
Protein 3 u interakciji s Janusovom kinazom i mikrotubulom	MELLQLAQRIKELEER	Q5VZ66-2	JAKMIP3
Kalirin	EPLQLPK	C9IZQ6	KALRN
Kanadaptin	KPALPVSPAAR	A0A087WW F4	SLC4A1A P
Protein 1 povezan s kinetohorom	RHPKLLAK	J3KQF2	KNTC1
Protein 1 zarobljen interakcijom krev	RDVRLPLEVEK	O00522-2	KRIT1
Protein 2 ponavljajućeg slijeda bogat leucinom koji sadrži domenu fibronektina tipa-III	LLVLEGQAATLK	Q9ULH4	LRFN2
Serin ponavljajućeg slijeda bogat leucinom / treonin-specifična proteinska kinaza 1	GGARDLLEEACDQC ASQLEK	E9PK39	LRRK1
Limfocitni citosolni protein 2	PPIRAEGR	E7ESF6	LCP2
Matrilin-2	EDHNCEQLCVNVPGS FVCQCYSGYALAED GKR	E5RJM4	MATN2
Metalotionein	CTSCKKSECEAISMV WGCG	H3BRY8	MT1F
Faktor 1 umrežavanja mikrotubula i aktina, izooblici 1/2/3/5	APISPKK	E9PLY0	MACF1
Proteinska kinaza 4 aktivirana mitogenom	NPPPRLKSK	I3L2I2	MINK1
Mucin-16	VFTSSIK	Q8WXI7	MUC16
Protein 9 povezan s višestrukom otpornošću na lijekove	GVQELKK	Q96J65-5	ABCC12
Myc protoonkogeni protein	QRRNELK	H0YBT0	MYC
Kinaza lakog lanca miozina 3	PDPEPLEEGTR	Q32MK0	MYLK3
Natriuretski peptidi A	DGGALGRGPWDSSD RSALLK	B0ZBE8	NPPA
Nebuleta	DLENEIKGK	O76041	NEBL

Nektin-3	QTSSIAVAGAVIGAV LALFIIAIFVTVLLTP RK	Q9NQS3	NECTIN3
Neurotripsin	HGSVRLR	P56730	PRSS12
Nidogen-2	HAFCTDYATGFCCHC QSK	Q14112-2	NID2
Korepresor nuklearnog receptora 2	NRLLSPR	C9JQE8	NCOR2
Član 2 grupe 2 podobitelji 2 nuklearnog receptora	HGAEEKQNSQR	H7C3R1	NR2C2
Niktalopin	FSSLLSK	REV__O751 65	NYX
Protein 7B koji sadrži OTU domenu	TLGSKLKK	Q6GQQ9-2	OTUD7B
Homolog periodičkog proteina 2 triptofana	LLMLHGQKLLK	A0A096LPI6	PWP2
Receptor za aktivator proliferacije peroksisomata	PGLLNVK	E9PFV2	PPARG
Podjedinica fenilalanin – tRNA ligaza beta	IKAPVYK	Q9NSD9	FARSB
Podjedinica alfa koja sadrži domenu fosfatidilinozitol 4-fosfat 3-kinaza C2	SITKLKTK	A0A0C4DGF9	PIK3C2A
Fosfolipaza A2, membranski povezana	FSNSGSR	P14555	PLA2G2A
Protein 4 izveden iz transpozona PiggyBac	KQIPNDLK	Q96DM1	PGBD4
Inhibitor telomeraze 1 u interakciji s PIN2/TERF1	PDPGRRK	E5RGR1	PINX1
Vjerojatna RNA helikaza ovisna o ATP-u DDX60	FAGDILK	Q8IY21	DDX60
Vjerojatni G-protein spregnuti receptor 101	RQHALLYNVKR	Q96P66	GPR101
Vjerojatna ATPaza VA za prijenos fosfolipida	FTPSCLTSGCSSIGSLAANK	O60312	ATP10A
Osnovni protein 1 bogat prolinom	PRSPSPPR	E7EW31	PROB1
Protein Aster-B	SHKRLSK	Q3KR37	GRAMD1 B
Protein bikaudal D homolog 2	LKSLSTK	U3KQF7	BICD1
Protein Crumbs homolog 2	SDPALYGGVQAAFPGA FSFR	Q5IJ48-2	CRB2
Protein FAM117A	GGAGGLR	D6RFX7	FAM117A
Protein FAM50A	EREKQLAK	B0S8I6	FAM50A
Protein kintoun	AEDGGHDTCVAGAA GSGVTTLGDPEVAPP PAAAGEERVPK	Q9NVR5-2	DNAAF2

Protein spasitelj 2	TQGKLSVANK	F8VZI9	FAIM2
Protein Mpv17	FIPGTTK	C9J473	MPV17
Protein SCAF8	PPISKAK	A0A0A0MT33	SCAF8
Protein ZBED8	LEDFWCAQFTAFPNLAK	Q8IZ13	ZBED8
P-selektin	KALTNEAENWADNEPNNK	F6VVT6	SELP
Putativna deoksiribonukleaza TATDN2	QLQLAVSLKKPLVIHCR	H7BZJ2	TATDN2
Putativna egzonukleaza GOR	VGRQPGK	Q8IX06	REXO1L1P
Putativni protein na suprotnom lancu FAM120A	GPGPRPAR	Q5T036	FAM120AOS
Putativni neaktivni katepsin L-sličan protein CTSL3P	GYVTPVK	Q5T8F0	CTSL
Putativni olfaktorni receptor 10D3	ITISILSIRTTEGR	Q8NH80	OR10D3
Putativni protein polikombne grupe ASXL3	NLVTNVALPVK	Q9C0F0	ASXL3
Putativni neokarakterizirani protein ADORA2A-AS1	PALLAPSLATLK	P86434	ADORA2A-AS1
Putativni neokarakterizirani protein FLJ11871	VRITGGK	Q9HAA7	
Putativni neokarakterizirani protein FLJ44790	VQPGRGK	Q6ZTC4	
Putativni neokarakterizirani protein PNAS-138	YSEFTLK	Q9BZS9	PNAS-138
Pirolin-5-karboksilat reduktaza	ISPAALK	A0A087WTV6	PYCR2
Receptorska protein-tirozin kinaza	YGNLSNFLRAK	E9PD35	FLT4
Regulator signaliziranja G-proteina 10	AVSRLSRK	O43665	RGS10
Inhibitor povezan s RelA	VLAEIPR	Q8WUF5	PPP1R13L
Protein povezan s retinoblastomom	STSLSLFYK	P06400	RB1
Rho inhibitor disocijacije GDP-a 1	GGRAVLQPR	J3QQX2	ARHGDI
Protein M160 tipa 1 bogat cisteinom receptora hvatača	LVGGSSR	Q9NR16-3	CD163L1
Secernin-1	QGLEAMEEILTSSEPLDPAEVGDLFYDCVDT EIK	Q12765-3	SCRN1
Seipin	IISTSSR	E9PR78	BSCL2
Serin/treonin-protein kinaza PAK 6	LSVISSNTLR	H0YM99	PAK6



Adapter protein F koji sadrži domenu SH2	AFAVDIK	H0YN16	SHF
Prijenosnik signala i aktivator transkripcije 1-alfa/beta	TLQNRGSSSQNNRVA ECH	D2KFR9	STAT1
Član 3 obitelji 12 prijenosnika otopljene tvari	NRVKSLR	J3QSS1	SLC12A3
Somatotropin	LEDGSPR	B1A4G9	GH1
Sortirajući neksin-22	ASNWGTLR	Q96L94	SNX22
Beta-lanac spektrina, neeritrocitni 5	VVQERLR	Q9NRC6	SPTBN5
Faktor prekrajanja 3A podjedinica 3	LFSTK GK	Q12874	SF3A3
Protein 1 u interakciji sa striatinom	RSILGLPPLPEDSIK VIR	Q5VSL9-3	STRIP1
Sinaptojanin-2	GGKAGNK	E7ER60	SYNJ2
Protein 2 sličan sinaptotagminu	TVVHPKVK	A0A0U1RRJ 3	SYTL2
Sintaksin-17	LEPAIQK	E9PJW1	STX17
Član 10A obitelji domene TBC1	FGFIVGSQGAEGAFVC GAKR	F8WDN6	TBC1D10 A
Homeoboksn protein 2 leukemije T-stanica	EERQALR	F1T0F2	TLX2
Podjedinica teta proteina 1 T-kompleksa	QITSYGETCPGLEQYA IK	P50990-3	CCT8
Tsh homolog 1	QPDSPAGSTTSEEKK	Q6ZSZ6-2	TSHZ1
Tsh homolog 2	ESPHEEASSFSHSEGD SFRK	Q9NRE2-2	TSHZ2
Timidin kinaza	SLTSWSSAR	K7ENW5	TK1
Protein 7 izveden iz Tigger transpozona	QKLSMIK	Q6NT04-2	TIGD7
Titin	EPVAIKK	A0A0A0MR A3	TTN
Protein 2 koji izaziva invaziju T-limfoma i metastazu	HGKEDTLRLK	E9PMZ8	TIAM2
Protein sličan trans-2,3-enoil-CoA reduktazi	FHKACPK	D6RBZ3	TECRL
Protein sličan podjedinici 1 TFIID faktora inicijacije transkripcije	FLHLFGPGK	Q8IZX4	TAF1L
Transmembranski protein 139	PQELDQPPPYSTVVIP PAPEEEQPSHPEGSRR AK	Q8IV31	TMEM139
Transmembranski protein 198	SWALLALWPLL	C9JXI5	TMEM198
Transmembranski protein 43	VPAKKLE	Q9BTV4	TMEM43
Protein gena 6B koji sadrži ponavljajuće sljedove trinukleotida	DEEPSGWEEPSQSISR K	H0Y720	TNRC6B

Protein 66 koji sadrži tripartitni motiv	FTDLLGQGPIVPLDA PKDLAIPSELEEPINLS VKK	B5MCJ9	TRIM66
Trofinin	DVIQEYDEYFPEIIR	B1AKE8	TRO
Nereceptor proteinske tirozin fosfataze tipa 23	NAVRVPR	C9JD91	PTPN23
Homolog C proteina 14 povezan s U3 malom nukleolarnom RNA	LLEAIISLDGKNR	Q5TAP6	UTP14C
Neokarakterizirani protein C11orf53	HTVKDLLAEKR	A0A1B0GU 63	C11orf53
Neokarakterizirani protein C17orf85	NRIGNKLPPEK	Q53F19-2	C17orf85
Neokarakterizirani protein C3orf86	PALAPPSK	P0DN24	C3orf86
Neokarakterizirani protein KIAA1671	PEMGSWLGRDPPDMT KLK	Q9BY89	KIAA1671
Neokarakterizirani protein KIAA1958	GNIPGRK	Q8N8K9	KIAA1958
Nekonvencionalni miozin-Va	VLLHLEEGK	G3V3C9	MYO5A
Uridin difosfat glukoza pirofosfataza NUDT14	LGLSHPI	F8VU44	NUDT14
Protein 13B povezan s vakuolarnim sortiranjem proteina	ALVNPVK	Q7Z7G8-2	VPS13B
Homolog proteina 53 povezan s vakuolarnim sortiranjem proteina	APASYTK	Q5VIR6	VPS53
Podjedinica G 2 protonske ATPaze V-tipa	LKQATRR	O95670	ATP6V1G 2
Protein 1 ponavljajućih sljedova WD i tetratrikoptida	KGPGGGAPVR	Q8N5D0-5	WDTC1
Protein 86 koji sadrži ponavljajući slijed WD	GARKPGR	Q86TI4	WDR86
Protein koji sadrži C3H1 domenu cinkova prsta	KVKDGAK	O60293-2	ZFC3H1
Protein koji sadrži domenu C3H1 cinkova prsta	QQTAWK	O60293-2	ZFC3H1
Protein 1 koji sadrži CHHC-tip cinkova prsta i motiv vezivanja RNA	YGKVVKVTIMK	Q8TBF4	ZCRB1
Protein cinkova prsta 148	KQIREPVDLQK	Q9UQR1	ZNF148
Protein cinkova prsta 219	RKPASPGR	Q9P2Y4	ZNF219
Protein cinkova prsta 23	AFSVKGGK	P17027-2	ZNF23
Protein cinkova prsta 257	SSHLTQHK	Q9Y2Q1-4	ZNF257
Protein cinkova prsta 277	VQVAPPL	E7EW13	ZNF277

Protein cinkova prsta 462	FPCEFCGRAFSQGSE WER	H3BLX4	ZNF462
Protein cinkova prsta 524	GRRPGGATSSNR	K7EP10	ZNF524
Protein cinkova prsta 621	ECGKAFKSSYDCIVH EK	C9JZC2	ZNF621
Protein cinkova prsta 765	RYVARHR	Q7L2R6	ZNF765
Protein cinkova prsta 841	PLDVVLTSGIPK	M0R0F3	ZNF841

Tablica 2. Uzorak 1

<b>ID proteina</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>Peptidi</b>	<b>iBAQ</b>
J3KQF2; P50748	Protein 1 povezan s kinetohorom	1	7825100
D6RIB1; A0A0D9SFB5; P08319	Alkohol dehidrogenaza 4	1	1969600
A0A0C4DGF9; O00443-2; O00443	Podjedinica alfa koja sadrži domenu fosfatidilinozitol 4-fosfat 3-kinaza C2	1	473160
Q6GQQ9-2; Q6GQQ9	Protein 7B koji sadrži OTU domenu	1	447580
Q8N5D0-5; Q8N5D0-3; Q8N5D0-6; Q8N5D0-2; Q8N5D0-4; Q8N5D0	Protein 1 ponavljajućih sljedova WD i tetratrikoptida	1	128500
Q8WXI7	Mucin-16	1	22219
B1A4G9; A0A087WXJ5; P01241-5; P01241-3; P01242-3; P01241-2; P01242; P01241	Somatotropin; Varijanta hormona rasta	1	0
A0A0U1RRJ3; Q9HCH5-11; Q9HCH5-7; Q9HCH5-8; A0A0U1RQP0; A0A0U1RR07	Protein 2 sličan sinaptotagminu	1	0
C9J8B8; Q969S8-2; Q969S8-4; Q969S8	Histska deacetilaza 10	1	0
E7EW31	Osnovni protein 1 bogat prolinom	1	0
F1T0F2	Homeoboksn protein 2 leukemije T-stanica	1	0
F8VY01; Q6ZV73-2; Q6ZV73	Protein 6 koji sadrži FYVE, RhoGEF i PH domenu	1	0
H0YMW2; Q12802-5; Q12802-4; Q12802; Q12802-2	Protein 13 za sidrenje A kinaze	1	0
O60293-2; O60293; G3V1X1; O60293-4	Protein koji sadrži domenu C3H1 domenu cinkova prsta	2	0
Q5VIR6-4	Vakuolarno razvrstavanje združenih proteina homologa 53	1	0
Q6ZTC4	Putativni neokarakterizirani protein FLJ44790	1	0
Q8IZX4	Protein sličan podjedinici 1 TFIID faktora inicijacije transkripcije	1	0
Q9Y6Q1	Kalpain-6	1	0

Tablica 3. Uzorak 2

<b>ID proteina</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>Peptidi</b>	<b>iBAQ</b>
E9PR78; F8W7Q8; E9PIU3; H7BXM1; J3KQ12; Q96G97-3; Q96G97; Q96G97-4	Seipin	1	13817000
Q7Z5R6	Interaktivni protein obitelji B član 1 koji veže amiloidni beta A4 prekursorski protein	1	1864600
D6RBZ3; E9PD39; Q5HYJ1	Protein sličan trans-2,3-enoil-CoA reduktazi	1	240550
Q8WXI7	Mucin-16	1	36475
Q5VZ66-2; Q5VZ66	Protein 3 u interakciji s Janus kinazom i mikrotubulom	1	15370
F1T0F2	Homeoboksnii protein 2 leukemije T-stanica	1	0
H0YMW2; Q12802-5; Q12802-4; Q12802; Q12802-2	Protein 13 za sidrenje A kinaze	1	0
Q6ZTC4	Putativni neokarakterizirani protein FLJ44790	1	0
Q86TI4-2	Ponavljajući WD – sadrži protein 86	1	0
Q8IX06	Putativna egzonukleaza GOR	1	0
Q8N8K9-2	Neokarakterizirani protein KIAA1958	1	0

Tablica 4. Uzorak 3

<b>ID proteina</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>Peptidi</b>	<b>iBAQ</b>
H0YM99; H0YK74; H0YK91; H0YLZ9; H0YMS4; H0YL16; Q9NQU5-2; Q9NQU5	Serin/treonin-protein kinaza PAK 6	1	13605000
E7ER60	Sinaptojanin-2	1	1824000
C9J809; E9PHA6; P43246-2; P43246	Protein Msh2 za popravljanje neslaganja DNK	1	1722400
A0A087WYI3; A0A087WXL1; P41439; P41439-3	Receptor folata gama	1	0
A0A0G2JPI4; Q86WT6	E3 ubikvitin-protein ligaza TRIM69	1	0
H7BZF2; H7C0M1; C9IYT0; O60832-2; O60832	Podjedinica 4 H/ACA ribonukleoproteinskog kompleksa	1	0
H0YNE7	Faktor rasta fibroblasta 7	1	0
K7EK91; Q9UFH2-2; Q9UFH2	Dineinski aksonemalni teški lanac 17	1	0
K7ENW5	Timidin kinaza	1	0
O76041	Nebulett	1	0
P06400	Retinoblastoma-pridruženi protein	1	0
Q96F58	Protein GPNMB	1	0

Tablica 5. Uzorak 4

<b>ID proteina</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>Peptidi</b>	<b>iBAQ</b>
G3V3C9; A0A087WY00; G3V394; F8WE88; F8W6H6; Q9Y4I1-2; Q9Y4I1; Q9Y4I1-3	Nekonvencionalni miozin-Va	1	1215600 0
F8VZI9; A0A0A0MTP9; Q9BWQ8	Zaštitni protein 2	1	6510400
Q9BZS9	Putativni neokarakterizirani protein PNAS-138	1	2386500
P18505	Podjedinica beta-1 receptora gama- aminobutrične kiseline	1	1976200
D6RIB1; A0A0D9SFB5; P08319	Alkohol dehidrogenaza 4	1	1226100
E7ER60	Sinaptojanin-2	1	394360
A0A087WTV6; A0A087WZR9; Q96C36	Pirolin-5-karboksilat reduktaza	1	286590
A0A0C4DGF9; O00443- 2; O00443	Podjedinica alfa koja sadrži domenu fosfatidilinozitol 4-fosfat 3-kinaza C2	1	152360
Q6GQQ9-2; Q6GQQ9	Protein 7B koji sadrži OTU domenu	1	101800
D2KFR9	Prijenosnik signala i aktivator transkripcije 1-alfa/beta	1	0
E9PK39; E9PMK9; Q38SD2-2; Q38SD2	Serin ponavljajućeg slijeda bogat leucinom / treonin-specifična proteinska kinaza 1	1	0
F6VVT6; Q5R342; Q5R345; Q5R341; Q5R349; P16109	P-selektin	1	0
H0Y9F3; Q9H5L6	DNK transpozaza THAP9	1	0
H7BZJ2; H7C1W4; Q93075	Putativna deoksiribonukleaza TATDN2	1	0
J3QQX2	Rho inhibitor disocijacije GDP-a 1	1	0
P50990-3; P50990-2; P50990	Podjedinica teta-proteina 1 T- kompleksa	1	0
Q5IJ48-2; Q5IJ48	Protein Crumbs homolog 2	1	0
X6R960; Q5T4S7-3; Q5T4S7-4; Q5T4S7; Q5T4S7-2	E3 ubikvitin-protein ligaza UBR4	1	0
Q5T764	Interferonom inducirani protein s tetratrikopeptidnim ponavljajućim slijedom 1B	1	0
Q5VSL9-3; Q5VSL9-2; Q5VSL9	Striatin-interaktivni protein 1	1	0
Q70UQ0-4	Inhibitor nuklearnog faktora kapa-B kinaze-interaktivni protein	1	0
Q8IV31	Transmembranski protein 139	1	0
Q8IZ13	Protein ZBED8	1	0

Q8NH80	Putativni olfaktorni receptor 10D3	1	0
Q9NVR5-2; Q9NVR5	Protein kintoun	1	0

Tablica 6. Uzorak 5

ID proteina	Naziv proteina	Peptidi	iBAQ
K7ELA9	Inaktivirani romboidni protein 2	1	4552400
P0DN24	Neokarakterizirani protein C3orf86	1	1770700
H0Y4S6; H7C0H6; D6W5U7; Q9UJ98-2; Q9UJ98-3; Q9UJ98	Cohezin podjedinica SA-3	1	1330700
O43665-3	Regulator G proteina 10	1	984140
Q9P2Y4	Protein cinkova prsta 219	1	893010
D6RIB1; A0A0D9SFB5; P08319	Alkohol dehidrogenaza 4	1	881990
B0S8I6; Q14320	Protein FAM50A	1	765770
Q5T036	Putativni protein na suprotnom lancu FAM120A	1	764750
E7ESF6; A0A0D9SGG1; Q13094	Limfocitni citosolični protein 2	1	601820
E7ER60	Sinaptojanin 2	1	399960
Q6GQQ9-2; Q6GQQ9	Protein 7B koji sadrži OTU domenu	1	383900
U3KQF7; A8MVZ6; Q8TD16; Q96G01-4; Q8TD16-2; Q96G01-3; Q96G01	Protein bikaudal D homolog 2; protein bikaudal D homolog 1	1	285170
Q9H4D0	Kalsintenin-2	1	269940
Q6NT04-2; Q6NT04	Tigger transponirani Protein 7	1	238180
E9PLY0; E9PNZ4	Faktor 1 umrežavanja mikrotubula i aktina, izooblici 1/2/3/5	1	133120
B0ZBE8; A0A087X094; P01160	Natriuretski peptidi As A; atrijski natriuretski faktor	1	0
E9PIH6; Q8N3D4	Protein 1 sličan proteinu 1 koji vezuje EH domenu	1	0
F8WDN6	Član 10A obitelji domene TBC1	1	0
R4GN32; H7C1E9; Q70EL1-6; Q70EL1-7; Q70EL1	Neaktivna ubikvitin karboksil- terminalna hidrolaza 54	1	0
O60312	Vjerojatna ATPaza VA za prijenos fosfolipida	1	0
Q13686	Protein za popravljavanje alkilirane DNK alkB homolog 1	1	0
Q96FX2	DPH3 homolog	1	0
Q9NRE2-2; Q9NRE2	Tsh homolog 2	1	0



Tablica 7. Uzorak 6

<b>ID proteina</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>Peptidi</b>	<b>iBAQ</b>
Q9NR16-3; Q9NR16-2; Q9NR16; Q9NR16-4	Protein M160 tipa 1 bogat cisteinom receptora hvatača	1	816480
P14555	Fosfolipaza A2, membranski povezana	1	579480
C9IZQ6; H7BXZ5; J3QSW6; O60229-2; O60229	Kalirin	1	465350
Q12874	Faktor prekrajanja 3A podjedinica 3	1	78923
A0A0A0MRA3; A0A0A0MTS7; Q8WZ42-3; Q8WZ42-10; Q8WZ42-9; Q8WZ42-5; Q8WZ42-2; Q8WZ42; Q8WZ42-8; Q8WZ42-13; Q8WZ42-12	Titin	1	24808
A0A087WXS7; O43681	ATPaza ASNA1	1	0
F5H890; Q6N063-3; Q6N063	2-oksoglutarat i protein 2 koji sadrži željezo ovisnu domenu oksigenaze	1	0
F8WDN5	Regulatorna podjedinica BRCA1 povezanog ATM aktivatora tipa 1	1	0
H3BLX4; Q96JM2-2; Q96JM2; Q96JM2-3	Protein cinkova prsta 462	1	0
J3QQX2	Rho inhibitor disocijacije GDP-a 1	1	0
P42575-2; P42575	Kaspaza-2; kaspaza-2 podjedinica p18; kaspaza-2 podjedinica p13; kaspaza-2 podjedinica p12	1	0
Q07075	Glutamil aminopeptidaza	1	0
Q8IZ13	Protein ZBED8	1	0
Q9BY89	Neokarakterizirani protein KIAA1671	1	0
Q9BYW3	Beta-defenzin 126	1	0

Tablica 8. Uzorak 7

<b>ID proteina</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>Peptidi</b>	<b>iBAQ</b>
M0R0F3; Q6ZN19-2; Q6ZN19; Q6ZN19-3	Protein cinkova prsta 841	1	423540
Q9C0F0	Putativni protein polikombne grupe ASXL3	1	159360
Q96P70	Importin-9	1	92741
A0A0D9SEP3; A0A0D9SFZ2; P49336-2; P49336	Kinaza 8 ovisna o ciklinu	1	0
B5MCJ9	Protein 66 koji sadrži tripartitni motiv	1	0
E5RJM4; O00339-4	Matrilin 2	1	0
Q12765-3; Q12765; Q12765-2	Secernin-1	1	0
Q9NQS3-3	Nektin-3	1	0

Tablica 9. Uzorak 8

<b>ID proteina</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>Peptidi</b>	<b>iBAQ</b>
A0A087WUT8; O95196-3; O95196-2; O95196	Hondroitin sulfat proteoglikan 5	1	1953100
CON_Q3MHH8; P19961-2; P19961; P04746; P04745; Q5T085; P04746-2	Alfa-amilaza; pankreasna alfa-amilaza; alfa-amilaza 2B; alfa-amilaza 1	2	1303500
A0A087WVC1; Q9BQ39	ATP-ovisna RNA helikaza DDX50	1	0
B1AKE8; A0A087X070; G5E9N2; Q12816-5; Q12816-2; Q12816-3; Q12816-4; Q12816	Trofinin	1	0
C9JZC2; Q6ZSS3	Protein cinkova prsta 621	1	0
Q8N4M4; E9PRA3; E9PRP1; E9PS62; Q9BZ67-2; Q9BZ67-3; Q9BZ67	Protein 8 koji sadrži FERM domenu	1	0
H0Y720; Q9UPQ9-1; Q9UPQ9	Protein gena 6B koji sadrži ponavljajuće sljedove trinukleotida	1	0
H3BRY8	Metalotionin	1	0
P42575-2; P42575	Kaspaza-2; kaspaza-2 podjedinice p18; kaspaza-2 podjedinice p13; kaspaza-2 podjedinice p12	1	0
Q9BVT6; Q00722-3; Q00722-2; Q00722	1-fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat fosfodiesteraza beta-2	1	0
Q14112-2; Q14112	Nidogen-2	1	0
Q5MNV8	F-kutija protein 47	1	0
Q5T764	Interferonom-inducirani protein s tetratrikoptidnim ponavljajućim slijedom 1B	1	0
Q6PJF5-2; Q6PJF5	Neaktivni romboidni protein 2	1	0
Q6ZSZ6-2; Q6ZSZ6	Tsh homolog 1	1	0

Tablica 10. Uzorak 9

<b>ID proteina</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>Peptidi</b>	<b>iBAQ</b>
A0A1B0GU63; A0A1C7CYV6	Neokarakterizirani protein C11orf53	1	27407000
O00522-2; O00522-3; O00522	Protein 1 zarobljen interakcijom krev	1	5463000
Q9NVP1	ATP ovisna RNA helikaza DDX18	1	5141700
Q9UQR1	Protein cinkova prsta 148	1	5141700
Q53F19-2; Q53F19	Neokarakterizirani protein C17orf85	1	4433700
E9PMZ8; Q8IVF5; Q8IVF5-5; Q8IVF5-2	Protein 2 koji izaziva invaziju T-limfoma i metastazu	1	1957600
Q6JV79; E7EVB7	Aprataksin	1	1216600
Q5T085; CON_Q3MHH8; P04746-2; P19961-2; P19961; P04746; P04745	Alfa-amilaza; pankreasna alfa-amilaza; alfa-amilaza 2B; alfa-amilaza 1	1	1183600

Tablica 11. Uzorak 10

<b>ID proteina</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>Peptidi</b>	<b>iBAQ</b>
O95670-2	Protein ATPaza podjedinica V tipa	1	2,05E+08
C9J473; A8MPV4; H0Y6M5; B5MC53; B5MCF8; E7EX18; P39210	Protein Mpv17	1	1,76E+08
E7EW13	Protein cinkova prsta 277	1	1,62E+08
A0A1B0GU63; A0A1C7CYV6	Neokarakterizirani protein C11orf53	1	1,17E+08
C9JMX4	Protein 3 koji veže faktor rasta sličan inzulinu	1	1,16E+08
D6RAV2; D6R951; D6R977; D6RC22; D6RAM3; Q7L591-3; Q7L591	Dokirajući protein 3	1	94336000
M0R1W6	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein L	1	79546000
H0YN16; H0YLM1; Q7M4L6	Adapter protein F koji sadrži domenu SH2	1	76991000
C9JXI5	Transmembranski protein 198	1	74675000
H0YMP9; H0YM53; H0YLR3; P12644	Koštani morfogenetski protein 4 BMP4	1	70772000
Q5T8F0; Q5QP40; Q5NE16; P43235; P07711; O60911	Putativni neaktivni katepsin L-sličan protein CTSL3P; katepsin K; katepsin L1; katepsin L1 teški lanac; katepsin L1 laki lanac; katepsin L2	1	65993000
P29372-2	DNA-3-metiladenin glikozilaza	1	65324000
P12034	Faktor rasta fibroblasta 5	1	52289000
C9JD91	Nereceptor proteinske tirozin fosfataze tipa 23	1	50890000
E5RK08; E5RGN6; E5RGB6; E5RJQ7; G3V132; Q8WWN9; Q8WWN9-2	Protein interaktora za faktore 1 razmjene citohezina	1	44437000
D6RFX7; Q9C073	Protein FAM117A	1	44354000
H0Y8X3	Tip 1B eukariotskog faktora 4E inicijacije translacije	1	38005000
P17027-2; P17027	Protein cinkova prsta 23	1	30148000
H7C2R4; Q68CQ4	Homolog faktor ekspanzije probavnog organa	1	29417000
Q9NR16-3; Q9NR16-2; Q9NR16; Q9NR16-4	Protein M160 tipa 1 bogat cisteinom receptora hvatača	1	25273000
E5RGR1	Inhibitor telomeraze 1 u interakciji s PIN2/TERF1	1	20908000
G3V5Y4; F6S9Y6	Protein 10 povezan s aktinom	1	16961000

Q9ULH4	Protein 2 ponavljajućeg slijeda bogat leucinom koji sadrži domenu fibronektina tipa-III	1	15596000
E9PJW1; E9PQU9; E9PJV6; E9PIC2; P56962	Sintaksin-17	1	15099000
Q9BTV4	Transmembranski protein 43	1	14305000
Q9NQW8-2; Q9NQW8	Kationski kanal beta-3 zaštićen cikličkim nukleotidom	1	12988000
P56730	Neurotripsin	1	12659000
Q7Z5R6	Interaktivni protein obitelji B član 1 koji veže amiloidni beta-A4 prekursorski protein	1	12120000
E9PFV2; P37231-2; P37231	Receptor za aktivator proliferacije peroksisoma-gama	1	11607000
E7ER60	Sinaptojanin 2	1	10777000
Q96P66	Vjerojatni G-protein spregnuti receptor 101	1	10683000
A0A0J9YXQ8; O95714	E3 ubikvitin-protein ligaza HERC2	1	10073000
J3QSS1; P55017; P55017-3; P55017-2	Član 3 obitelji 12 prijenosnika otopljene tvari	1	9527100
A0A0C4DGI9	Okolna bromodomena domene cinkova prst proteina 2A	1	9312600
Q8WUF5	Inhibitor povezan s RelA	1	8536500
D6RED3; D6RAZ0; H0YAM8; F2Z2L2; E9PD12; Q96AX9-9; Q96AX9-10; Q96AX9-8; Q96AX9-7; Q96AX9-4; Q96AX9-6; Q96AX9-5; Q96AX9-2; Q96AX9-12; Q96AX9-3; Q96AX9; Q96AX9-11; Q96AX9-13; Q96AX9-14	E3 ubikvitin-protein ligaza MIB2	1	6537300
C9JQE8; C9J7T7; C9JE98; C9J0Q5; C9JFD3; Q9Y618-5; Q9Y618-4; Q9Y618-3; Q9Y618	Korepresor nuklearnog receptora 2	1	6424400
A0A0A0MT33; Q9UPN6; Q9UPN6-2	Protein SCAF8	1	6208200
Q3KR37-4	Protein Aster-B	1	5857500
I3L2I2; E7ENQ1; G3XAA2; H7C360; G5E948; E7EN19; E7ESS2; A0A0D9SEY1; O95819-4; O95819-2; O95819; O95819-5; Q8N4C8-5; Q8N4C8-2; Q8N4C8-3; Q8N4C8-4; O95819-3; Q8N4C8	Proteinska kinaza 4 aktivirana mitogenom	1	5508700

Q9NVP1	ATP ovisna RNA helikaza DDX18	1	5312200
Q8IY21	Vjerojatna ATP-ovisna RNA helikaza DDX60	1	5021200
A0A087WUT8; O95196-3; O95196-2; O95196	Hondroitin sulfat proteoglikan 5	1	4873900
F8VU44	Uridin difosfat glukoza pirofosfataza NUDT14	1	4383800
Q9HAA7	Putativni neokarakterizirani protein FLJ11871	1	4217600
A0A087WYX6; A0A075B6Q7; Q9NRI5	Protein 1 poremećen u shizofreniji	1	3805600
P46013-2; P46013	Antigen KI-67	1	3701200
B0QZ88; Q9H7B4	Histon-lizin N-metiltransferaza SMYD3	1	3699500
Q15075	Rani endosomski antigen 1	1	3231000
Q5T085; CON_Q3MHH8; P04746-2; P19961-2; P19961; P04746; P04745	Alfa-amilaza; pankreasna alfa-amilaza; alfa-amilaza 2B; alfa-amilaza 1	1	3148500
X6RAV4; K7EMZ6	Protein kinaza ovisna o cAMP-u tipa I – alfa-regulatorna podjedinica	1	3123900
Q9BZS9	Putativni neokarakterizirani protein PNAS-138	1	2935500
Q9NRC6	Beta-lanac spektrina, neeritocitni 5	1	2504000
P25054-2; P25054	Protein adenomatozne polipoze kolona	1	2208200
O60469-2; O60469	Adhezijska molekula Downovog sindroma	1	2127000
H7C3R1; H7C3L1	Član 2 grupe 2 podobitelji 2 nuklearnog receptora	1	2033900
Q53F19-2; Q53F19	Neokarakterizirani protein C17orf85	1	1542900
E9PMZ8; Q8IVF5; Q8IVF5-5; Q8IVF5-2	Protein 2 koji izaziva invaziju T-limfoma i metastazu	1	1410200
B0QYA8; B0QYA6; B0QYA5; O15371-3; O15371	Podjedinica D eukariotskog faktora 3 inicijacije translacije	1	1383600
Q7Z7G8-2; Q7Z7G8-6; Q7Z7G8	Protein 13B povezan s vakuolarnim sortiranjem proteina	1	1355100
REV_O75165; Q9GZU5	Niktalopin	1	1254200
Q5TAP6	Homolog C proteina 14 povezan s U3 malom nukleolarnom RNA	1	1004800
Q9NSD9	Podjedinica fenilalanin – tRNA ligaza beta	1	866810
Q32MK0	Kinaza lakog lanca miozina 3	1	691990
F5GXS0; A0A140TA49; A0A140TA44; A0A140TA32;	Komplement C4-A; Komplement C4 beta-lanca; Komplement C4-A	1	618410

A0A140TA29; A0A0G2JL54; A0A0G2JPR0; P0C0L4-2; P0C0L5; P0C0L4	alfa-lanca; C4a anafilatoksin; C4b-A; C4d-A; komplement C4 gama-lanca; komplement C4-B; komplement C4 beta-lanca; komplement C4-B alfa-lanca; C4a anafilatoksin; C4b-B; C4d-B; komplement C4 gama-lanca		
K7EP10; Q96C55	Protein cinkova prsta 524	1	551090
A0A0A0MRA3; A0A0A0MTS7; Q8WZ42-3; Q8WZ42-10; Q8WZ42-9; Q8WZ42-5; Q8WZ42-2; Q8WZ42; Q8WZ42-8; Q8WZ42-13; Q8WZ42-12	Titin	1	525890
Q7L2R6	Protein cinkova prsta 765	1	523430
O60503	Adenilat ciklaza tipa 9	1	399130
P86434	Putativni neokarakterizirani protein ADORA2A-AS1	1	340620
Q07065	Protein 4 povezan sa citoskeletom	1	295400
A0A096LPI6; A0A0B4J2E5; Q15269	Homolog periodičkog proteina 2 triptofana	1	287830
A0A087WWF4; A0A087X0M4; Q9BWU0	Kanadaptin	1	257280
Q96EW2-3; Q96EW2	Protein 1 povezan s HSPB1	1	249800
E9PPR2	Protein 13 povezan s autofagijom	1	248660
Q96J65-5; Q96J65-2; Q96J65	Protein 9 povezan s višestrukom otpornošću na lijekove	1	219710
Q8N8U9	BMP-vezujući endotelni regulator protein	1	208960
Q8TBF4	Protein 1 koji sadrži CHHC-tip cinkova prsta i motiv vezivanja RNA	1	139890
A0A0C4DFR0; A0A087WYC6; Q96DT5	Dineinski aksonemalni teški lanac 11	1	127010
H0YBT0; A0A087WUS5; P01106; P01106-2	Myc protoonkogeni protein	1	120300
B1AJS1; O14525-3; O14525- 2; O14525	Astrotaktin-1	1	27179
E9PD35; P35916-1; P35916	Receptorska protein-tirozin kinaza; vaskularni endotelni čimbenik rasta receptora 3	1	22031
A0A0C4DGT3; A0A087WWK8; Q6DN90-2; Q6DN90	Protein 1 koji sadrži IQ motiv i SEC7 domenu	1	0
D6REP5	Protein 2B koji sadrži GRAM domenu	1	0
E9PBA8; Q52LR7	Pojačivač polikombnog homologa 2	1	0



---

J3KNS1; Q9UPW5-2; Q9UPW5; Q9UPW5-3	Citosolna karboksipeptidaza 1	1	0
Q8N8K9-2	Neokarakterizirani protein KIAA1958	1	0
Q8TEY5-2	Ciklički AMP-responzivni element-vezujući protein 4 sličan proteinu 3 4; procesirani ciklički AMP-responzivni element- vezujući protein 4 sličan proteinu 3 4	1	0
Q96DM1	PiggyBac transponirani element – izvedeni protein 4	1	0
Q96L94	Sortirajući neksin 22	1	0
Q9Y2Q1-4; Q9Y2Q1-3; Q9Y2Q1-2; Q9Y2Q1	Protein cinkova prsta 257	1	0

## **5. RASPRAVA**

Prethodno opisanim tehnikama proteomske analize u navedenim intervalima prikupljanja sline pacijenata s fiksnim ortodontskim aparatom i bez njega (24 sata prije, nulti dan, 48 sati, 7. dana i 30. dana po postavljanju), identificirani su proteini u svakoj vremenskoj točki uzorkovanja za kontrolnu i terapijsku skupinu.

### **5.1. Identifikacija proteina sline 30 dana nakon postavljanja fiksnog aparata**

Analizom rezultata kontrolne i terapijske skupine ove studije, najznačajniji nalaz dobiven je 30. dan nakon postavljanja aparata, a koji govori u prilog i u skladu je s biologijom koštane pregradnje nakon primjene fiksne ortodontske terapije u cilju postizanja zubnog pomaka. Ovdje je riječ o studiji iz koje analizom dobivenih izdvojenih proteina možemo pretpostaviti njihovu potencijalnu ulogu ovisno o vremenskom intervalu djelovanja fiksnoga ortodontskog aparata. Budućim analizama svake od navedenih proteinskih molekula možemo dobiti precizniji i detaljniji uvid u biologiju koštane pregradnje tijekom ortodontskog zubnog pomaka.

#### **5.1.1. Identifikacija veznog proteina 3 inzulinskog faktora rasta (engl. *insulin-like growth factor binding protein-3*, IGFBP3)**

Inzulinski faktor rasta 1 (IGF-1) jedan je od visoko zastupljenih faktora rasta koji su deponirani u koštanom matriksu (124, 125) gdje održavaju koštanu masu i stimuliraju diferencijaciju mezenhimalnih matičnih stanica u smjeru osteoblasta (126). IGF-1 se stvara isključivo u jetri i nalazi se u visokim koncentracijama u serumu (127), no većina slobodnog proteina vrlo se brzo metabolizira tako da je IGF-1 u cirkulaciji uglavnom vezan za svoje vezne proteine (IGFBPs). IGFBP3 je glikoprotein, najzastupljeniji od veznih proteina koji stvaraju Kupfferove te endotelne jetrene stanice (128). IGFBP3 također stabilizira, transportira te otpušta IGF-1, kontrolira njegovu aktivnost preko regulacije distribucije i interakcije s receptorima, veže se na kolagen tipa I te ima ulogu u pohrani IGF-1 u koštanom matriksu. Uloga IGFBP-a može biti modulirana proteolitičkim kidanjem u području vezne regije između NH<sub>2</sub> liganda i COOH terminalne cisteinom bogate domene, stvarajući proteolitičke fragmente koji reduciraju njihov afinitet za IGF molekule. IGFBP također imaju utjecaj na staničnu pokretljivost, adheziju i rast koji su neovisni od njihove interakcije s IGF-om i mogu biti modulirani navedenim proteolitičkim kidanjem.

Proteolitičko procesiranje IGFBP-a kojim oslobađaju molekule IGF, podsjeća na procesiranje kordina i kordinu sličnih molekula s BMP1 proteinazom kako bi se BMP2 i BMP4 oslobodili iz latentnih kompleksa. Pokazano je da BMP1 cijepa IGFBP3. Fibronektin i komponente izvanstaničnog matriksa ključni su u procesiranju IGFBP3 s molekulom BMP1. Navedeno procesiranje pojačava neke od IGFBP3 funkcija neovisnih o IGF-u, među kojima je i uloga IGFBP3 u inhibiciji diferencijacije osteoblasta preko supresije signalnog puta BMP2 (129). Smatra se da IGFBP3 može suprimirati koštanu formaciju i preko IGF1 ovisnog i neovisnog puta. IGFBP3/IGF1 osovina kontrolira koštani metabolizam ili u smjeru povećanja ili smanjenja diferencijacije osteoblasta (126). IGFBP2 i IGFBP3 reguliraju egzogenu IGF-1 stimulaciju osteogene diferencijacije u kulturi humanih stanica dentalne pulpe. Porast ekspresije IGFBP2 u tim stanicama dovodi do pojačane IGF-1 aktivnosti, za razliku od inhibitorynog IGFBP3 koji je snižen tijekom diferencijacije stanica dentalne pulpe (130). U istraživanju koje je uključilo šest zdravih osoba podvrgnutih ortodontskom tretmanu, praćena je promjena u koncentraciji te imunokemijska detekcija IGFBP3 u gingivo cervikalnoj tekućini nakon primjene ortodontske terapije, gdje su autori pokazali da se s vremenom od postavljanja aparata njegove vrijednosti smanjuju (period od 4 sata do 10 dana) kao rezultat njegove degradacije (131). Uloga IGFBP3 kod dentalnih implantata istraživana je kod laboratorijskih štakora, testiranjem osteogene aktivnosti titanskih implantata obloženih *chitosan gold* nanočesticama (Ch-GNPs), prethodno konjugiranih s IGFBP3. Rezultati ukazuju da prekomjerna ekspresija IGFBP3 smanjuje osteoklastogenezu te pojačava osteogenezu titanskih implantata. Pokazala se kao učinkovita molekula u uspješnosti implantacije (132).

Nasuprot tome, istraživanja provedena na transgeničnim miševima koji imaju pojačanu ekspresiju IGFBP3 u kulturi osteoblasta kalvarije *in vitro* pokazuju da dolazi do porasta osteoklastogeneze i koštane resorpcije, slabljenja diferencijacije osteoblasta uz signifikantno negativan učinak na koštanu formaciju (133).

Identifikacija IGFBP3 u uzorku sline može ukazivati na važnost uloge u koštanom remodeliranju primjenom ortodontske terapije, no istraživanja u tom području trebala bi potvrditi navedeno.

### 5.1.2. Koštani morfogenetski protein 4, BMP4 (*engl. bone morphogenetic protein 4*)

U našem istraživanju prvi je put u slini identificiran BMP4 protein 30. dan nakon početka ortodontske terapije. Do današnjeg dana u slini nije identificiran BMP4 te je posebno važna njegova uloga u usnoj šupljini, kao i alveolarnoj koštanoj pregradnji.

Periodontalno tkivo reagira na podražaj aktivnim remodeliranjem preko ekspresije specifičnih molekula uključenih u periodontalnu regeneraciju i homeostazu (134). U ortodonciji pojačana koštana formacija ima ključnu ulogu u zubnom pomaku. Stanice PDL-a povezane su s ekspresijom velikog broja markera kao što su kolagen tipa III, osteopontin, koštani morfogenetski proteini (BMP), osteokalcin i koštani sijaloprotein (135). Od mnogih proteina povezanih sa stanicama PDL-a, BMP4 kao član superobitelji TGF $\beta$  ključan je u koštanom rastu i pregradnji (136, 137). Porast ekspresije BMP4 nastaje kod koštanih prijeloma, mehaničkoga stresa te sila naprezanja (138-140). Mnoge studije testirale su njegov učinak na ektopičnu osifikaciju, BMP-om induciranu koštanu izgradnju u slučaju koštanog defekta bedrene te alveolarne kosti (141-143). BMP4 u interakciji s nogginom u stanicama koje tvore PDL i pokazuju veću staničnu proliferaciju, mogao bi biti važan za pravilan razvoj parodoncija. Do današnjega dana stvarni učinak BMP4 na PDL nije u potpunosti razjašnjen. Egzogeno primijenjeni BMP4 stimulira ekspresiju mRNA za osteopontin, BMP2, CBFA1 u stanicama PDL-a (144,145). BMP4 pozitivne stanice nađene su u području PDL-a nakon transplantacije zuba i osteoblastima sličnim stanicama nakon stvaranja nove alveolarne koštane površine (146,147). Potencijalna je primjena BMP-a u stvaranju nove kosti obećavajuća, no za takvu primjenu potrebna je velika količina visoko pročišćenoga rekombinantnog proteina (148), adekvatan nosač koji postepeno otpušta molekule BMP-a, kao što je kolagena spužvica u modelu koštanog defekta alveolarne kosti ili grupa novih autoloških nosača poput krvnog ugruška (149, 150).

U posljednje vrijeme uspostavljaju se *in vivo* elektroporacijske metode za transfer plazmidnog vektora za BMP4 u stanice PDL-a te testiranje utjecaja transfekcije PDL-a s BMP4. Iako je BMP4 transfer u mišić bio uspješan i doveo je do indukcije koštane formacije (151, 141), nije primijećeno stvaranje nove kosti u PDL-u, vjerojatno zbog nedovoljne ekspresije BMP4 ili zbog lokalnih inhibitornih mehanizama unutar samog PDL-a (152). Smatra se da BMP4 utječe na proliferaciju i pluripotenciju mišjih embrionalnih stanica najvjerojatnije preko kodiranih proteina Smad, PI3/Akta i Wnt1/ $\beta$ -katenina.

Tijekom razvoja zubnog folikula primijećeno je da BMP4 pridonosi formiranju alveolarne kosti te da BMP2 i BMP4 ubrzavaju njezin razvoj (153, 154).

BMP4 je član TGF $\beta$  superobitelji faktora rasta ključnih u signalnom putu BMP-a, koji je važan i u razvoju zubi, staničnoj diferencijaciji i koštanoj formaciji (155–157). Tijekom ranog razvoja zubi ekspresija BMP4 pomiče se od dentalnog epitela prema mezenhimu, gdje BMP4 ima centralnu ulogu u epitelno-mezenhimalnim interakcijama tijekom zubne morfogeneze (158). Bmp4 *knock-out* životinje pokazuju agenezu molara i reduciranu zubnu veličinu. U drugim animalnim modelima, *knock-out* miševi za Bmp4 i Bmp2 pokazuju defekte skeletnog razvoja (159, 160). Nadalje, BMP4 transkripcija ostaje visokoaktivna tijekom postnatalne koštane pregradnje i sazrijevanja, ukazujući na veliku ulogu BMP4 u koštanom razvoju i homeostazi (161). U novijim istraživanjima otkrivena je specifična mutacija gena BMP4 kod pacijenata sa zubnom agenezom te da ista mutacija može biti povezana s ranim pojavljivanjem osteoporoze i osteopenije u ljudi. Time se ukazuje na važnu ulogu BMP4 u razvoju zubi, sintezi dentina i maturaciji te koštanoj homeostazi (162 -164).

Pojava BMP4 u slini 30. dana nakon postavljanja fiksnoga ortodontskog aparata ukazuje na njegovu moguću važnu ulogu u fazi pregradnje alveolarnoga koštanog tkiva, u skladu s biologijom koštanog pomaka, te ključnu ulogu u održavanju homeostaze novonastalog zubnog pomaka. Navedena identifikacija predstavlja osnovu za buduća istraživanja temeljena na određivanju BMP4 koncentracije tijekom ortodontskog tretmana, ali i u drugim stanjima koja zahvaćaju usnu šupljinu, gdje može poslužiti kao vrijedan marker zdravlja odnosno bolesti.

S obzirom na to da je ovdje riječ o prvoj identifikaciji molekule BMP-a (BMP4) u slini, ovaj rezultat smatra se iznimno važnim iz aspekta biologije koštanih morfogenetskih proteina, njegove prisutnosti u biološkim tekućinama te razvoja novih spoznaja o tome kako je i odakle BMP4 dospio u slinu (lokalno ili sistemski preko krvi) te nadalje, koja je njegova stvarna uloga u ortodontskoj terapiji. Proteomskom analizom do današnjeg je dana potvrđena identifikacija BMP6 molekule iz krvi te BMP1 (koja nije prava molekula BMP-a, nego proteinaza), ključna u aktivaciji molekula BMP-a te njihovih antagonista.

### 5.1.3. Fibroblastni faktor rasta 5, FGF 5 (*engl. fibroblast growth factor 5*)

Fibroblastni faktor rasta 5 član je obitelji molekula fibroblastnog faktora rasta (FGF), koja se sastoji od 18 članova koji omogućuju prijenos signala kroz receptorski sustav tirozin kinaze te se nazivaju i FGF receptorima (FGFR). Nekoliko molekula FGF-a ima važnu ulogu u embrionalnom razvoju, tkivnoj homeostazi i cijeljenju rana. Imaju i angiogenetski i mitogenetski učinak, dok prekomjerna izraženost može dovesti do maligne transformacije stanica. U periodontalnoj terapiji ključna je regeneracija periodoncija, a taj proces zahtijeva izvor stanica koje su sposobne sintetizirati kolagen, cement, odnosno kost. Smatra se da u tom procesu ključnu ulogu imaju fibroblasti PDL-a (165,166).

U nekoliko studija pokazano je da su fibroblasti PDL-a sposobni diferencirati u osteoblaste, osjetljivi su na specifične faktore rasta i sudjeluju u cijeljenju defekta (167,168). Molekule FGF-a predstavljaju veliku obitelj faktora rasta koji imaju raznoliku ulogu. FGF2 predstavlja temeljni ili bazični faktor rasta bFGF i najviše je istraživan. Izoliran je iz velikog broja tkiva poput živčanog tkiva, hipofize, nadbubrežne žlijezde, žutog tijela i placente. Identificiran je također u suzama i slini (169–172). FGF2 stimulira proliferaciju mezodermalnog i neuroektodermalnog porijekla. Svojom aktivnošću ubrzava proliferaciju endotelnih stanica i fibroblasta te se smatra važnim u procesu cijeljenja i tkivne regeneracije. FGF2 stimulira proliferaciju epitela u području gastrointestinalnog trakta te potiče cijeljenje u eksperimentalnom modelu ulkusa kod laboratorijskog štakora (173).

Pretpostavlja se da FGF iz sline može biti odgovoran za održavanje zdravlja sluznice u području gornjeg dijela probavnog sustava. Pokazano je da su vrijednosti bFGF-a veće u mlađoj populaciji, ali također uz znatne varijacije, dok su vrlo niske vrijednosti bFGF-a izmjerene u slini starijih ljudi. Upravo zbog toga što se smatra da je bFGF ključan za proliferaciju fibroblasta i endotelnih stanica, smatra se da je njegova koncentracija opravdano veća u mlađih ljudi (rast novih zubi). FGF2 inducira proliferaciju stromalnih stanica koštane srži i stanica PDL-a, dok nasuprot tome inhibira diferencijaciju stanica PDL-a (174, 175). U stanicama PDL-a, FGF2 inducira matriks metaloproteinazu 3 i sintezu hijaluronina, a inhibira sintezu tropoelastina (176–178). *In vivo* FGF1 i FGF2 induciraju sintezu cementa, dok FGF2 dovodi do stvaranja nove kosti (179).

Stanice PDL-a u kulturi izražavaju velike količine FGF5, dok svježe tkivo PDL-a izražava više FGF receptora (FGFR3 i FGFR2). Egzogeni FGF5 inducira proliferaciju PDL-a, ali sprječava diferencijaciju, tako da ga smatraju regulatorom ranog stadija stanica PDL-a (180).

Podobitelj FGF7, jednu od pet podobitelji FGF-a, čine FGF3, FGF7, FGF10 i FGF22. Članovi podobitelji FGF7 važni su za organogenezu, cijeljenje rana i tkivnu homeostazu u odraslih sisavaca. Za FGF7 se smatra da je odgovoran u razvoju bubrega, timusa i hipokampusa (181-183).

U uzorcima sline ispitanika kontrolne skupine identificiran je FGF7, dok je u uzorcima sline ispitanika na ortodontskoj terapiji identificiran FGF5, 30. dan po postavljanju fiksnog ortodontskog aparata. Iz ovoga se može pretpostaviti, pa i zaključiti da je neupitno potvrđena identifikacije članova obitelji FGF-a u slini, uz pretpostavku njihova protektivnog učinka na sluznicu, kako u održavanju homeostaze tako i kod primjene stranog tijela (fiksni ortodontski aparat).

#### 5.1.4. BMP-vezni endotelni regulatorni protein, BMPER (*Protein Crossveinless-2*)

Molekule BMP-a izvanstanični su proteini koji djeluju preko površinskih receptorskih kompleksa heterodimerskih transmembranskih serin/treonin kinaznin receptora. Aktivacijom receptora dolazi do fosforilacije Smad 1/5 transkripcijskih faktora i njihove translokacije u jezgru, gdje dolazi do modulacije genske ekspresije. Osim puta ovisnog o Smadu, molekule BMP-a aktiviraju i signalnu kaskadu neovisnu o Smadu kao što je MAP kinaza/Erk i fosfoinozimid 3-kinaza (PI3K)/Akt. Signalni putovi BMP-a uključeni su u regulaciju stanične proliferacije, apoptoze, diferencijacije i morfogeneze (85,86).

Tijekom razvoja aktivnost članova obitelji BMP-a strogo je kontrolirana izvanstaničnim regulatorima. Kordin je inhibitor molekule BMP-a koji je ključan za dorzoventralni razvoj u embriju *Xenopus* te je ključan u razvoju sisavaca, što je pokazano fenotipom noggin/kordin dvostrukog mišjeg *knock-outa*. Kordin djeluje tako da se direktno veže na molekule BMP-a sprječavajući njihovo daljnje vezivanje na receptore. Aktivnost kordina povezana je s prisutnošću domene bogate 4 cisteinom (CR), gdje svaka od njih može vezati BMP4, premda s manjim afinitetom nego cijela molekula kordina (184,185).



Otkriven je protein koji posjeduje kordinu sličnu domenu CR uz jasan inhibitory učinak na molekulu BMP-a. Identificirani je protein BMPER ili *Crossveinless-2* (CV2) kordin i kielin paralog, ima pet kordinu sličnih domena CR koju prati domena von Willebrandova faktora tipa D, te domena inhibitora tripsina na svojem C terminalnom kraju. Nedavna istraživanja pokazuju da BMPER ima i antagonistički i agonistički mehanizam djelovanja na molekule BMP-a, gdje mu relativna koncentracija BMPER-a i njegovih liganada određuje pro-BMP ili anti-BMP ulogu (185).

Novija istraživanja ukazuju na bifazičnu aktivnost molekule BMPER-a, gdje niže vrijednosti potiču, dok više vrijednosti inhibiraju prijenos signala tijekom razvoja vinske mušice. Potvrđeno je da BMPER selektivno djeluje s ligandima i receptorima BMP-a, što je ovisno o njegovoj koncentraciji (186).

Mutacija u genu za BMPER povezana je s bolešću *diaphanospondylodysostosis* u ljudi (187). Poznato je da je nekoliko molekula BMP-a prisutno u različitim fazama razvoja zubi. Nedavna istraživanja ukazuju na bifazičnu aktivnost molekule BMPER-a, gdje niže vrijednosti potiču, dok više vrijednosti inhibiraju prijenos signala tijekom razvoja vinske mušice. Poznato je da je nekoliko molekula BMP-a prisutno u različitim fazama razvoja zubi (188,189). Za istaknuti je BMP4 koji je eksprimiran na labijalnoj strani sjekutića te potiče diferencijaciju ameloblasta (190,191). Prekid aktivnosti BMP-a pojačanom ekspresijom njegova antagonista noggina blokira razvoj kutnjaka i kasnu staničnu epitelnu diferencijaciju sjekutića (192).

Na samom početku zubnog razvoja signalni put BMP-a antagonizira signalni put FGF-a u epitelnim stanicama te se navedena interakcija smatra ključnom u definiranju mjesta formiranja zubi (193-195). Inaktivacija receptora BMP-a (BMPRIa) u epitelu i mezenhimalnim stanicama dovodi do inhibicije razvoja zubi (196,197). Nedostatak noggina rezultira fuzijom gornjih sjekutića (198). BMPER je eksprimiran u dentalnom epitelu tijekom zubnog razvoja, što ukazuje na njegovu tkivnu specifičnost (199).

Preko molekule BMPER-a regulirana je i BMP9 aktivnost te se smatra da ima ključnu ulogu u angiogenezi (200–202). CV2 je eksprimiran u ranoj fazi srčanog razvoja te može pomoći u definiranju specifične mezodermalne stanične linije.

Delecija gena CV2 dovodi do redukcije veličine kardiomiocita i debljine srčanog zida te povećava vaskularnu gustoću (203). Potvrđeno je da BMP10 i CV2 odvojeno utječu na kardiomiocitnu diferencijaciju (204).

U navedenom je istraživanju 30. dan nakon postavljanja fiksnoa ortodontskog aparata identificirana i molekula BMPER-a koja ima važnu ulogu u regulaciji BMP4 aktivnosti.

S obzirom na to da su u slini u istom vremenskom intervalu identificirana oba proteina, ovaj rezultat govori u prilog ključnog nalaza kojim se potvrđuje iz literature poznata poveznica molekule BMPER-a i BMP4, uz pretpostavku važne uloge u koštanoj pregradnji tijekom ortodontske terapije. Time se jasno, na proteomskom nivou, potvrđuje aktivnost i pojavnost ključnih molekula koje imaju važnu ulogu tijekom terapije. Njihova daljnja uloga trebala bi u budućnosti biti detaljnije ispitana.

## **6. ZAKLJUČAK**

Ono što neupitno možemo zaključiti iz navedenoga jest da se pojavnost potvrđenih molekula: **BMP4**, **BMPER**, **IGFBP3** i **FGF**, koja se događa tijekom ortodontskog zubnog pomaka, gotovo identično podudara s pojavnošću molekula pri procesu koštane regeneracije, a koja imitira slijed događaja tijekom embrionalnog razvoja. Navedeni rezultati otvaraju nove mogućnosti istraživanja u definiranju ključnih molekula potencijalnih terapijskih markera ne samo za ovu indikaciju nego i kod primjene zubnih implantata, te u parodontologiji općenito.

Od svih koštanih morfogenetskih proteina, navedeno istraživanje identificiralo je molekulu **BMP4** u slini kojoj zasigurno pripada važna uloga u dentalnom razvoju i periodontalnoj regeneraciji. Njezina identifikacija i potvrda u slini otvaraju nove dijagnostičke i terapijske mogućnosti koje bi se trebale dalje istražiti i potvrditi na većem uzorku. To je prva identifikacija molekula BMP-a u uzorku sline.

Identifikacija molekule **BMPER** uz molekulu BMP4, s kojom se jasno povezuje, potvrđuje usklađenu aktivnost faktora rasta i njihovih inhibitora, što je sada prvi put potvrđeno i na proteomskom nivou u uzorku sline kao biološkom materijalu.

Potvrđena je identifikacija molekule **IGFBP3** u slini kao ključne molekule u koštanom metabolizmu.

Potvrđena je i identifikacija molekule **FGF** kod kontrolne i terapijske skupine, koja ukazuje na njihovu prisutnost u različitim formama, što bi se moglo povezati i s njihovom zaštitnom funkcijom te ulogom u regeneraciji, kao i koštanoj pregradnji.

## **7. LITERATURA**

1. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Medicinska naklada Zagreb; 2007. p. 297-308.
2. Jalšovec D. Sustavna i topografska anatomija čovjeka. Zagreb Školska knjiga; 2005. p. 187-201.
3. Ash MM, Nelson SJ. Dental Anatomy, Physiology, and Occlusion. 8th Edition 2003. Elsevier Science Philadelphia.
4. Čatović A. Klinička fiksna protetika. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet; 1999. p. 1-2.
5. Šutalo J. Patologija i terapija tvrdih zubnih tkiva. Naklada Zadro; 1994. p.131-6.
6. Cekić-Arambašin A i sur. Oralna medicina. Zagreb: Školska knjiga; 2005;2 pp.40-44.
7. Bagatin M, Virag M i sur. Maksilofacijalna kirurgija. Zagreb: Školska knjiga; 1991. p. 169-76, 223-5.
8. Rehak NN, Cecco SA, Csako G. Biochemical composition and electrolyte balance of “unstimulated” whole human saliva. Clin Chem Lab Med. 2000;38:335–343. doi: 10.1515/CCLM.2000.049.
9. Andabak Rogulj A, Bakale – Hodak I, Mravak - Stipetić M. Slina – dijagnostički medij za rano otkrivanje bolesti. Medix. 2011;96:218-221.
10. Hirtz C, Vialaret C, Nowak N, Gabelle A, Deville de Periere D, Lehmann S. Absolute quantification of 35 plasma biomarkers in human saliva using targeted MS. Bioanalysis. 2016; 8(1):43-53. doi: 10.4155/bio.15.228.
11. Brkić H, Čuković-Bagić I, Plančak D, Rustemović N, Tarle Z. Dentalna erozija: etiologija, dijagnostika i terapija. Zagreb: Školska knjiga; 2011. p.1-9.
12. Janković B, Pandurić V, Ciglar I, Knežević A, Šutalo J. Uloga poliranja zuba u prevenciji karijesa. Acta Stomat Croat. 2000;34(4):417-20.
13. Kornman KS, Crane A, Wang HY, Di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol. 1997;24(1):72–77. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb01187.x.
14. Baughan LW, Robertello FJ, Sarrett DC, Denny PA, Denny PC. Salivary mucin as related to oral Streptococcus mutans in elderly people. Oral Microbiol Immunol. 2000;15(1):10–14. doi: 10.1034/j.1399-302x.2000.150102.x.
15. Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, Barnett MP, Smolenski GA, Wheeler TT. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. J Clin Periodontol. 2010;37(3):241-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01525.x
16. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. Gastroenterology. 2010;138(3):949–957. doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.010.

17. Adam DJ, Milne AA, Evans SM. Serum amylase isoenzymes in patients undergoing operation for ruptured and non-ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 1999;30(2):229–235. doi: 10.1016/s0741-5214(99)70132-1.
18. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle – a review. *Adv Dent Res.* 2000;14:22–28. doi:10.1177/08959374000140010301.
19. Emmons W. Accuracy of oral specimen testing for human immunodeficiency virus. *Am J Med.* 1997;102(4A):15–20. doi: 10.1016/s0002-9343(97)00033-8.
20. Hu S, Wang J, Meijer J, Jeong S, Xie Y, Yu T et al. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjogren’s syndrome. *Arthritis Rheum.* 2007;56(11):3588–3600. doi: 10.1002/art.22954.
21. Javaid MA, Ahmed AS, Durand R, Tran SD. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic disease. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2016; 6(1): 66–75. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.08.006.
22. Gröschl M. Current Status of Salivary Hormone Analysis. *Clin Chem.* 2008;54:11, 1759-1769. doi: 10.1373/clinchem.2008.108910.
23. Xiao X, Liu Y, Guo Z, Liu X, Sun H, Li O, Sun W. Comparative proteomic analysis of the influence of gender and acid stimulation on normal human saliva using LC/MS/MS. *Proteomics Clin Appl.* 2017;11(7-8). doi: 10.1002/prca.201600142.
24. 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. doi: 10.1021/pr900941z.
25. Wang X, Kaczor-Urbanowicz KE, Wong DT. Salivary biomarkers in cancer detection. *Med Oncol.* 2017;34(1):7. doi: 10.1007/s12032-016-0863-4.
26. Sun Y, Liu S, Qiao Z, Shang Z, Xia Z, Niu X et al. Systematic comparison of exosomal proteomes from human saliva and serum for the detection of lung cancer. *Anal Chim Acta.* 2017; 982:84-95. doi: 10.1016/j.aca.2017.06.005.
27. Zheng X, Chen F, Zhang Q, Liu Y, You P, Sur S, Chan N. Salivary exosomal PSMA7: a promising biomarker of inflammatory bowel disease. *Protein Cell.* 2017; 8(9): 686–695 doi: 10.1007/s13238-017-0413-7.
28. Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, Barnett MP, Smolenski GA, Wheeler TT. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010;37(3):241-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01525.x.
29. Saibaba G, Rajesh D, Muthukumar S, Sathyanarayanan G, Padmanabhan P, Akbarscha MA et al. Proteomic analysis of human saliva: An approach to find the marker protein for ovulation. *Reprod Biol.* 2016; 16(4):287-294. doi: 10.1016/j.repbio.2016.10.005.

30. Aqrabi LA, Galtung HK, Vestad B, Øvstebø R, Thiede B, Rusthen S et al . Identification of potential saliva and tear biomarkers in primary Sjögren's syndrome, utilising the extraction of extracellular vesicles and proteomics analysis. *Utheim Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):14. doi: 10.1186/s13075-017-1228-x.
31. Giusti L, Ciregia F, Mazzoni MR, Luceorchini A. Proteomics insight into psychiatric disorders: an update on biological fluid biomarkers. *Expert Rev. Proteomics.* 2016;(10):941-950 1-10. doi: 10.1080/14789450.2016.1230499.
32. Chee CS, Chang KM, Loke MF, Angela Loo VP, Subrayan V. Association of potential salivary biomarkers with diabetic retinopathy and its severity in type-2 diabetes mellitus: a proteomic analysis by mass spectrometry. *PeerJ.* 2016; 4e2022. doi: 10.7717/peerj.2022.eCollection 2040.
33. Camisasca DR, da Ros Goncalves L, Soares MR, Sandim V, Nogueira FC, Garcia CH et al. A proteomic approach to compare saliva from individuals with and without oral leukoplakia. *J Proteomics.* 2017; 151:43-52. doi: 10.1016/j.jprot.2016.07.29.
34. Tecles F, Tvarijonaviciute A, De Torre C, Carrillo JM, Rubio M, Garcia M et al. Total esterase activity in human saliva: Validation of an automated assay, characterization and behavior after physical stress. *Scand J Clin Lab Invest.* 2016;76(4):324-30. Doi: 10.3109/00365513.2016.1163417.
35. Langie SA, Szarc Vel Szic K, Declerck K, Traen S, Koppen G, Van Camp G et al. Whole-Genome Saliva and Blood DNA Methylation Profiling in Individuals with a Respiratory Allergy. *PLoS One.* 2016;11(3): e0151109. doi:10.1371/journal.
36. Jinno H, Murata T, Sunamura M, Sugimoto M. Investigation of potential salivary biomarkers for the diagnosis of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015; 33(28\_suppl): 145 doi: 10.1200/jco.2015.33.28\_suppl.145.
37. Rehman AS, Khurshid Z, Niazi HF, Naseem M, Al Waddani H, Sahibzada HA et al. Role of Salivary Biomarkers in Detection of Cardiovascular Diseases (CVD); *Proteomes,* 2017;7:5(3). pii: E21. doi: 10.3390/proteomes5030021.
38. Isaza-Guzman DM, Medina-Piedrahita VM, Gutierrez-Henao C, Tobon-Arroyave SI. Salivary Levels of NLRP3 Inflammasome-Related Proteins as Potential Biomarkers of Periodontal Clinical Status. *J Periodontal.* 2017; 10:1-13. doi: 10.1902/jop.2017.170244.
39. Justino AB, Teixeira RR, Peixoto LG, Juramillo OLB, Espindola FS. Effect of saliva collection methods and oral hygiene on salivary biomarkers. *Scand J Clin Lab Invest.* 2017; 77(6):415-422. doi: 10.1080/00365513.2017.1334261.
40. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis.* 1998;19(11):1853-61. doi: 10.1002/elps.1150191103.
41. Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis.* 1996; 17:443-453. doi:10.1002/elps.1150170303.



42. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins M et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 1995; 16:1090-1094. doi:10.1002/elps.11501601185.
43. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasseret DF et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1995;13:19-50. doi:10.1080/02648725.1996.10647923.
44. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405:837-846. doi:10.1038/35015709.
45. Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res*. 2010;89(10):1016-23. doi: 10.1177/0022034510380414.
46. Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Saliva a Dynamic Proteome. *Journal of Dental Research*. 2007; 86:680-693. doi: 10.1177/154405910708600802.
47. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*. 2011;17: 345–354. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x.
48. Lee YH, Wong DT. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*. 2009;22(4):241– 248.
49. Guo T, Rudnick PA, Wang W, Lee CS, Devoe DL, Balgley BM. Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS. *J Proteome Res*. 2006;5:1469–1478. doi: 10.1021/pr060065m.
50. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1098:323–329. doi: 10.1196/annals.1384.015.
51. Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res*. 2010;89(10):1016-23. doi: 10.1177/0022034510380414.
52. Bostanci N, Bao K. Contribution of proteomics to our understanding of periodontal inflammation. *Proteomics*. 2017;17:3-4. doi: 10.1002/pmic.201500518.
53. Aboodi GM, Sima C, Moffa EB, Crosara KT, Xiao Y, Siqueira WL et al. Salivary Cytoprotective Proteins in Inflammation and Resolution during Experimental Gingivitis - A Pilot Study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;5:92. doi: 10.3389/fcimb.2015.00092.
54. Zheng X, Chen F, Zhang Q, Liu Y, You P, Sun S et al. Salivary exosomal PSMA7: a promising biomarker of inflammatory bowel disease. *Protein Cell*.2017;8(9):686-695. doi: 10.1007/s13238-017-0413-7.
55. Kawahara R, Bollinger JG, Rivera C, Ribeiro AC, Brandão TB, Paes Leme AF et al. A targeted proteomic strategy for the measurement of oral cancer candidate biomarkers in human saliva. *Proteomics*. 2016;16(1):159-73. doi: 10.1002/pmic.201500224.

56. Sivadasan P, Gupta MK, Sathe GJ, Balakrishnan L, Palit P, Gowda H et al. Human salivary proteome - a resource of potential biomarkers for oral cancer. *J Proteomics*. 2015;127(Pt A):89-95. doi: 10.1016/j.jprot.2015.05.039.
57. Xiao H, Zhang Y, Kim Y, Kim S, Kim JJ, Kim KM et al. Differential Proteomic Analysis of Human Saliva using Tandem Mass Tags, Quantification for Gastric Cancer Detection. *Sci Rep*. 2016;6:22165. doi: 10.1038/srep22165.
58. Sun Y, Huo C, Qiao Z, Shang Z, Uzzaman A, Liu S et al. Comparative Proteomic Analysis of Exosomes and Microvesicles in Human Saliva for Lung Cancer. *J Proteome Res*. 2018;17(3):1101-1107. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00770.
59. Abrão AL, Falcao DP, De Amorim RF, Bezerra AC, Pombeiro GA, Guimarães LJ et al. Salivary proteomics: A new adjuvant approach to the early diagnosis of familial juvenile systemic lupus erythematosus. *Med Hypotheses*. 2016;89:97-100. doi: 10.1016/j.mehy.2016.02.010.
60. Ngounou Wetie AG, Wormwood KL, Russell S, Ryan JP, Darie CC, Woods AG. A Pilot Proteomic Analysis of Salivary Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. *Autism Res*. 2015;8(3):338-50. doi: 10.1002/aur.1450.
61. Iavarone F, Melis M, Platania G, Cabras T, Manconi B, Petruzzelli R, Cordaro M, Siracusano A, Faa G, Messina I, Zanasi M, Castagnola M. Characterization of salivary proteins of schizophrenic and bipolar disorder patients by top-down proteomics. *J Proteomics*. 2014;103:15-22. doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.020.
62. Ren R, Sun Y, Zhao X, Pu X. Recent advances in biomarkers for Parkinson's disease focusing on biochemicals. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(10):1495-506. doi: 10.1515/cclm-2014-0783.
63. Morzel M, Truntzer C, Neyraud E, Brignol H, Ducoray P, Lucchi G et al. Associations between food consumption patterns and saliva composition: Specificities of eating difficulties children. *Physiol Behav*. 2017; 173:116-123. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.02.005.
64. Xiao H, Wong DT. Method development for proteome stabilization in human saliva. *Anal Chim Acta*. 2012;722:63-9. doi: 10.1016/j.aca.2012.02.017.
65. Ghafouri B, Tagesson C, Lindhal M. Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics*. 2003; 3(6):1003-15. doi:10.1002/pmic.200300426.
66. Vitorino R, Lobo MJ, Ferrer-Correia AJ, Dubin JR, Tomer KB, Domingues PM, Amado FM. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics*. 2004;4(4):1109-15. doi: 10.1002/pmic.200300638.
67. Grassl N, Kulak NA, Pichler G, Geyer PE, Jung J, Schubert S et al. Ultra-deep and quantitative saliva proteome reveals dynamics of the oral microbiome. *Genome Medicine*. 2016;8:44. doi:10.1186/s13073-016-0293-0.

68. Schipper R, Loof A, De Groot J, Harthoorn L, Dransfield E, Van Heerde W. SELDI-TOF-MS of saliva: methodology and pre-treatment effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;15;847(1):45-53. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.10.005.
69. Sabino F, Hermes O, Auf dem Keller U. Body fluid Degradomics and Characterisation of Basic N-Terminome. *Methods Enzimol.* 2017; 585, 177-199. doi: 10.1016/bs.mie.2016.09.018.
70. Licier R, Miranda E, Serrano H. A Quantitative Proteomics Approach to Clinical Research with Non-Traditional Samples. *Proteomes.* 2016; Oct 17;4(4):31. doi: 10.3390/proteomes4040031.
71. Špalj S, Katalinić A, Varga S, Radica N. *Ortodontski priručnik.* Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 2012. p. 1-5.
72. Chen M, Feng ZC, Liu X, Li ZM, Cai B, Wang DW. Impact of malocclusion on oral health-related quality of life in young adults. *Angle Orthod.* 2015;85(6):986-991. doi.org/10.2319/101714-743.1.
73. Cunningham SJ, Garratt AM, Hunt NP. Development of a condition-specific quality of life measure for patients with dentofacial deformity: I. Reliability of the instrument. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000;28(3):195-201. doi: 10.1034/j.1600-0528.2000.280305.x.
74. Cunningham SJ, Hunt NP. Quality of life and its importance in orthodontics. *J Orthod.* 2001;28(2):152-8. doi: 10.1093/ortho/28.2.152.
75. Dimberg L, Arnrup K, Bondemark L. The impact of malocclusion on the quality of life among children and adolescents: a systematic review of quantitative studies. *Eur J Orthod.* 2015;37(3):238-47. doi: 10.1093/ejo/cju046.
76. Twigge E, Roberts RM, Jamieson L, Dreyer CW, Sampson WJ. The psycho-social impact of malocclusions and treatment expectations of adolescent orthodontic patients. *Eur J Orthod.* 2016;38(6):593-601. doi: 10.1093/ejo/cjv093.
77. Jiang N, Guo W, Chen M, Zheng Y, Zhou J, Kim SG et al. Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement. *Front Oral Biol.* 2016; 18: 1–8. doi: 10.1159/000351894.
78. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Ortodoncija.* Naklada Slap. Zagreb; 2010.p 331-343.
79. Reddy RS, Singaraju GS, Mandava P, Reddy VG. Biology of tooth movement. *Annals and Essences of Dentistry. Review Articles:* 5368/aedj.2015.7.4.3.2.
80. Burstone C.J. The biomechanics of tooth movement. In: Kraus B.S, Riedel R.A, ed. *Vistas in Orthodontics.* Lea and Febiger; Philadelphia: 1962.p. 197-213.
81. Asiry AM. Biological aspects of orthodontic tooth movement. *Saudi J of Biol Sciences.* 2018;25:(6)1027-1032. doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.03.008.
82. Di Domenico M, D’apuzzo F, Feola A, Cito L, Monsurro A, Pierantoni G M et al. Cytokines and VEGF Induction in Orthodontic Movement in Animal Models. *J of Biomedicine and Biotechnology.* 2012(5):201689 4 pages doi:10.1155/2012/201689.

83. Li Y, Jacox L, Little S, Ko C. The Kaohsiung Journal of Medical Science, Orthodontic tooth movement: The biology and clinication implications. 2018;34(4):207-214 doi.org/10.1016/j.kjms.2018.01.007.
84. Roberts We 2004. Sem Orthod Introduction; bone physiology in orthodontics. 2004; 10 ( 2) P99, 01. doi.org/10.1053/j.sodo.2004.01.002.
85. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T et al. Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C1 C12. Mol Cell Biol. 2000; 20(23):8783-92. doi:10.1128/MCB.20.23.8783-8792.
86. K Miyazono, K Kusanagi, H Inoue. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. J Cell Physiol. 2001;187(3):265-76. doi:10.1002/jcp.1080.
87. Zhu AJ, Scott MP. Incredible journey: how do developmental signals travel through tissue? Genes Dev. 2004;18(24):2985-97 doi: 10.1101/gad.1233104.
88. Hall M, Masella R, Majster M. PDL neuron-associated neurotransmitters in orthodontic tooth movement: identification and proposed mechanism of action. Today's FDA. 2001; 13(2):24-513.
89. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. Dent Clin North Am. 1988;32(3):411-35.
90. D'Apuzzo F, Cappabianca S, Ciavarella D, Monsurrò A, Silvestrini-Biavati A, Perillo L. Biomarkers of Periodontal Tissue Remodeling during Orthodontic Tooth Movement in Mice and Men: Overview and Clinical Relevance. 2013; ID 105873 | 8 pages doi.org/10.1155/2013/105873.
91. Tuncer BB, Özmeriç N, Tuncer C, Teoman I, Çakılcı, B, Yücel A et al. Levels of Interleukin-8 during tooth movement. Angle Orthod. 2005; 75 (4): 631–636.doi.org/10.1043/0003-3219(2005)75[631:LOIDTM]2.0.CO;2.
92. Capelli Jr, Kantarci A, Haffajee A, Teles RP, Fidel Jr, Figueredo CM. Matrix metalloproteinases and chemokines in the gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. European Journal of Orthodontics. 2011;33(6)705–711. doi.org/10.1093/ejo/cjq148.
93. Alfaqeeh SA, Anil S. Osteocalcin and N-telopeptides of type I collagen marker levels in gingival crevicular fluid during different stages of orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2011;139:e553–9.doi: 10.1016/j.ajodo.2011.03.005.
94. Basset, Baker. The Biochemistry and physiology of bone. Ed. Bourne GH. Atlanta Georgia:1971 (2nd Edition) Development and growth p. 1-76.
95. Navaro-Palacios A, Garcia-Lopez E, Meza-Rios A, Armendariz-Borunda J, Sandoval-Rodriguez A. Myeloperoxidase enzymatic activity is increased in patients with different levels of dental crowding after initial orthodontic activation. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2014;146(1)92-7. doi: 10.1016/j.ajodo.2014.04.015.

96. Atassi F, Awartani F. Oral hygiene status among orthodontic patients. *J Contemp Dent Pract.* 2010;11(4):E025-32.
97. Bonetti GA, Incerti Parenti S, Garulli G, Gatto MR, Checchi L. Effect of fixed orthodontic appliances on salivary properties. *Prog Orthod.* 2013;18;14:13. doi: 10.1186/2196-1042-14-13.
98. Sanpei S, Endo T, Shimooka S. Caries risk factors in children undertreatment with sectional brackets. *Angle Orthod.* 2010;80:509–14. doi: 10.2319/072909-431.1.
99. Chang HS, Walsh LJ, Freer TJ. The effect of orthodontic treatment on salivary flow, pH buffer capacity, and levels of mutans streptococci and lactobacilli. *Aust Orthod J.* 1999;15(4):229-34.
100. Lara-Carrillo E, Montiel-Bastida NM, Sánchez-Pérez L, Alanís-Tavira J. Effect of orthodontic treatment on saliva, plaque and the levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(6):e924-9. doi: 10.4317/medoral.15.e924.
101. Peros K, Mestrovic S, Anic-Milosevic S, Slaj M. Salivary microbial and nonmicrobial parameters in children with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod.* 2011;81(5):901-6. doi: 10.2319/012111-44.1.
102. Vanishree T, Panchmal GS, Shenoy R, Jodalli P, Sonde L, Kundapur N. Changes in the Oral Environment after Placement of Fixed Orthodontic Appliance for the Treatment of Malocclusion - a Descriptive Longitudinal Study. *Oral Health Prev Dent.* 2017;15(5):453-459. doi: 10.3290/j.ohpd.a38776.
103. Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. Roles of salivary proteins in the adherence of oral *Streptococci* to various orthodontic brackets. *J Dent Res.* 2002;81(6):411-5. doi: 10.1177/154405910208100611.
104. Lee SJ, Kho HS, Lee SW, Yang WS. Experimental salivary pellicles on the surface of orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;119(1):59-66. doi: 10.1067/mod.2001.110583.
105. Turssi CP, Silva CS, Bridi EC, Amaral FL, Franca FM, Basting RT. Kinetics of salivary pH after acidic beverage intake by patients undergoing orthodontic treatment. *Gen Dent.* 2015;63(3):26-30.
106. Zogakis IP, Koren E, Gorelik S, Ginsburg I, Shalish M. Effect of fixed orthodontic appliances on nonmicrobial salivary parameters. *Angle Orthodontist.* 2018;88:6:806-811.
107. Ahn SJ, Kho HS, Kim KK, Nahm DS. Adhesion of oral streptococci to experimental bracket pellicles from glandular saliva. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;124(2):198-205. doi: 10.1016/s0889-5406(03)00346-9.
108. Kundu R, Tripathi AM, Jaiswal JN, Ghoshal U, Palit M, Khanduja S. Effect of fixed space maintainers and removable appliances on oral microflora in children: An in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2016;34(1):3-9. doi: 10.4103/0970-4388.175498.

109. Mummolo S, Nota A, Caruso S, Quinzi V, Marchetti E, Marzo G. Salivary markers and microbial flora in mouth breathing late adolescents. *Hindawi, BioMed Research International*. 2018;8: ID8687608. doi:10.1155/2018/8687608.
110. Jurela A, Repic D, Pejda S, Juric H, Vidakovic R, Matic I, Bosnjak A. The effect of two different bracket types on the salivary levels of *S mutans* and *S sobrinus* in the early phase of orthodontic treatment. *Angle Orthod*. 2013;83(1):140-5. doi: 10.2319/030612-187.1.
111. Kim K, Jung WS, Cho S, Ahn SJ. Changes in salivary periodontal pathogens after orthodontic treatment: An in vivo prospective study. *Angle Orthod*. 2016;86(6):998-1003. doi: 10.2319/070615-450.1.
112. Buczek P, Szarmach I, Grycz M, Kasacka I. Caspase-3 as an important factor in the early cytotoxic effect of nickel on oral mucosa cells in patients treated orthodontically. *Folia Histochem Cytobiol*. 2017;55(1):37-42. doi: 10.5603/FHC.a2017.0004.
113. Lages RB, Bridi EC, Perez CA, Basting RT. Salivary level of nickel chromium, iron, and copper in patients treated with metal or esthetic fixed orthodontic appliances: Retrospective cohort study. *J Trace Elem Med Biol*. 2017;40:67-71. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.12.011.
114. Sahoo EN, Kailasam V, Padmanabham S, Chitharanjan AB. In vivo evaluation of salivary nickel and chromium levels in conventional and self-ligating brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140(3):340-5. doi: 10.1016/j.ajodo.2010.05.022.
115. Talic NF, Alnahwi HH, Al-faraj AS. Nickel and chromium levels in the saliva of a Saudi sample treated with fixed orthodontic appliances. *Saudi Dent J*. 2013;25(4):129-33. doi: 10.1016/j.sdentj.2013.10.001.
116. Nayak RS, Khanna B, Pasha A, Vinay K, Narayan A, Chaitra K. Evaluation of nickel and chromium iron release during fixed orthodontic treatment using inductively coupled Plasma-Mass Spectrometer: an in vivo study. *J Int Oral Health*. 2015;7(8):14-20.
117. Bhasin V, Pustake SJ, Joshi V, Tiwari A, Bhasin M, Punia RS. Assessment of changes in nickel and chromium levels in the gingival cervical fluid during fixed orthodontic treatment. *J Contemp Dent Pract*. 2017;18(8):675-678. doi: 10.5005/jp-journals-10024-2105.
118. Nanjannawar LG, Girme TS, Agrawal JM, Agrawal MS, Fulari SG, Shetti SS, Kagi VA. Effect of Mobile Phone Usage on Nickel Ions Release and pH of Saliva in Patients Undergoing Fixed Orthodontic Treatment. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(9):ZC84-ZC87. doi: 10.7860/JCDR/2017/27800.10679.
119. Sheibaninia A. Effect of thermocycling of nickel release from orthodontic arch wires: an in vitro study. *Biol Trace Elem Res*. 2014;162(1-3):353-9. doi: 10.1007/s12011-014-0136-z.
120. Hamzany Y, Feinmesser R, Shpitzer T, Mizrahi A, Hilly O, Hod R. Is human saliva an indicator of the adverse health effects of using mobile phones? *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:622-27. doi: 10.1089/ars.2012.4751.
121. Ionescu I-C, Ionescu E. Orthodontic archwires and brackets may interact with mobile phones in close proximity. *Proc. Rom. Acad. Series B*. 2012;2:135-142.

122. Gupta N, Pevzner PA. False Discovery Rates of Protein Identifications: A Strike against the Two-Peptide Rule. *J Proteome Res.* 2009. (9): 4173–4181. doi:10.1021/pr9004794.
123. Schulz BL, Cooper-White J, Punyadeera CK. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Crit Rev Biotechnol.* 2013; 33(3):246–259. doi:10.3109/07388551.2012.687361.
124. Pfeilschifter J, Pfister T, Ziegler R. Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *J Clin Invest.* 1995;96 (2):767-774. doi.org/10.1172/JCI118121.
125. Canalis E, Pash J, Gabbitas B, Rydziel S, Varghese S. Growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in bone cell cultures. *Endocrinology.* 1993; 133(1) 33–38. doi.org/10.1210/endo.133.1.8319580.
126. Eguchi K, Akiba Y, Akiba N, Ngasawa M, Cooper F.L. Uoshima K. Insulin-like growth factor binding Protein-3 suppresses osteoblast differentiation via bone morphogenetic protein-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2018;(507):1–4;465-47. doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.065.
127. Jones J I, Clemmons D R. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. *Endocrine Reviews.* 1995; (16) 3–34, doi.org/10.1210/edrv-16-1-3.
128. Zimmermann M E, Li L, Hoyt E C, Pucilowska J B, Lichtman S, Kay P. Cell-specific localization of insulin-like growth factor binding protein mRNAs in rat liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; 278: G447–G457. doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.3.G447.
129. Kawai M, Rosen CJ, The Insulin-Like Growth Factor System in Bone. *Endocrinol Metab Clin Nort Am.* 2012; (41) 2: 323–333. doi: 10.1016/j.ecl.2012.04.013.
130. Alkharobi H, Alhodhodi A, Hawsawi Y, Alkafaji H, Devine D, El-Gendy R, Beattie J IGFBP-2 and -3 co-ordinately regulate IGF1 induced matrix mineralisation of differentiating human dental pulp cells. *Stem Cell Res.* 2016; 17(3):517-522. doi: 10.1016/j.scr.2016.09.026.
131. Toia M, Galazzo R, Maioli C, Granata R, Scarlatti F. The IGF-I/IGFBP-3 system in gingival crevicular fluid and dependence on application of fixed force. *J Endocrinol Invest.* 2005; 28(11):1009-1014. doi.org/10.1007/BF03345340.
132. Bhattarai G, Lee YH, Lee MH, Park IS, Yi HK. Insulin-like growth factor binding protein-3 affects osteogenic efficacy on dental implants in rat mandible. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015; 55:490-6. doi: 10.1016/j.msec.2015.05.076.
133. Silha JV, Mishra S, Rosen CJ, Beamer WG, Turner RT, Powell DR, Murphy LJ. Perturbations in bone formation and resorption in insulin-like growth factor binding protein-3 transgenic mice. *J Bone Miner Res.* 2003;18(10):1834-41. doi.org/10.1007/BF03345340.
134. Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec.* 1996;245(2):327-41. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<327::AID-AR15>3.0.CO;2-R.

135. Kramer PR, Nares S, Kramer SF, Grogan D, Kaiser M. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *J Dent Res.* 2004; 83(1):27-34. doi:10.1177/154405910408300106.
136. Leong LM, Brickell PM. Bone morphogenic protein-4. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996; 28(12):1293-6. doi:10.1016/s1357-2725(96)00075-1.
137. Rosen V, Wozney JM. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. 1998; *Clin Orthop Relat Res.*(346):26-37.
138. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 1994; (5):651-9. doi:10.1002/jbmr.5650090510.
139. Ikegame M, Ishibashi O, Yoshizawa T, Shimomura J, Komori T, Ozawa H, Kawashima H. Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture. *J Bone Miner Res.* 2001;(1):24–32. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.1.24.
140. Sato M, Ochi T, Nakase A, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Yasui N. Mechanical Tension-Stress Induces Expression of Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 and BMP-4, but Not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, During Distraction Osteogenesis. *J Bone Miner Res* 1999;(14):1084–1095. doi:10.1359/jbmr.1999.14.7.1084.
141. Kawai M, Bessho K, Kaihara S, Sonobe J, Oda K, Iizuka T, Maruyama H. Ectopic bone formation by human bone morphogenetic protein-2 gene transfer to skeletal muscle using transcutaneous electroporation. *Hum Gene Ther.* 2003;14(16):1547-56. doi:10.1089/104303403322495052.
142. Kishimoto KN, Watanabe Y, Nakamura H, Kokubun S. Ectopic bone formation by electroporatic transfer of bone morphogenetic protein-4 gene. *Bone.* 2002;31(2):340-7. doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00825-6.
143. Kotajima S, Kishimoto KN, Watanuki M, Hatori M, Kokubun S. Gene expression analysis of ectopic bone formation induced by electroporatic gene transfer of BMP4. *Ups J Med Sci.* 2006;111(2):231-41. doi: 10.3109/2000-1967-044.
144. Luk KD, Chen Y, Cheung KM, Kung HF, Lu WW, Leong JC. Adeno-associated virus-mediated bone morphogenetic protein-4 gene therapy for in vivo bone formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308(3):636-45. doi: 10.1016/s0006-291x(03)01429-3.
145. Kim JY, Cho SW, Hwang HJ, Lee MJ, Lee JM, Cai J, Choi SH, Kim CK, Jung HS. Evidence for expansion-based temporal BMP4/NOGGIN interactions in specifying periodontium morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 2007;330(1):123-32. doi:10.1007/s00441-007-0434-2.



146. Xu WP, Shiba H, Mizuno N, Uchida Y, Mouri Y, Kawaguchi H, Kurihara H. Effect of bone morphogenetic proteins-4, -5 and -6 on DNA synthesis and expression of bone-related proteins in cultured human periodontal ligament cells. *Cell Biol Int*. 2004;28:675–82. doi: 10.1016/j.cellbi.2004.06.004.
147. Hosoya A, Ninomiya T, Hiraga T, Zhao C, Yoshida K, Yoshida N et al. Alveolar bone regeneration of subcutaneously transplanted rat molar. *Bone*. 2008;42(2):350-7. doi: 10.1016/j.bone.2007.09.054.
148. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(6):2220-4. doi: 10.1073/pnas.87.6.2220.
149. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242(4885):1528-34. doi:10.1126/science.3201241.
150. King GN, Hughes FJ. Effects of occlusal loading on ankylosis, bone, and cementum formation during bone morphogenetic protein-2-stimulated periodontal regeneration in vivo. *J Periodontol*. 1999;70(10):1125-35 doi:10.1902/jop.1999.70.10.1125.
151. Grgurevic L, Macek B, Mercep M, Jelic M, Smoljanovic T, Erjavec I et al. Bone morphogenetic protein (BMP)1-3 enhances bone repair. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2011;(408)25-31; doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.109.
152. Tsuchiya S, Chiba M, Kishimoto K N, Nakamura H, Tsuchiya M, Hayashi H. Transfer of the bone morphogenetic protein 4 gene into rat periodontal ligament by in vivo electroporation. *Archives of Oral Biol*. 2017;(74):123-132. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.11.013.
153. Rajshankar D, McCulloch C A G, Tenenbaum HC, Lekic P C. Osteogenic inhibition by rat periodontal ligament cells: modulation of bone morphogenetic protein-7 activity in vivo. *Cell and Tissue Research*. 1998;294(3):475-83. doi:10.1007/s004410051199.
154. Lee MY, Lim WH, Lee SH, Han JH. Smad, PI3K/Akt, and Wnt-Dependent Signaling Pathways Are Involved in BMP-4-Induced ESC Self-Renewal. *Stem Cells*. 2009;(27)8: 1858-1868. doi.org/10.1002/stem.124.
155. Ou M, Zhao Y, Zhang F, Huang X. Bmp2 and Bmp4 accelerate alveolar bone development. *Connect Tissue Res*. 2015;56(3):204-11. doi: 10.3109/03008207.2014.996701.
156. Maas R, Bei M. The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(1):4-39. doi:10.1177/10454411970080010101.
157. Salazar VS, Gamer WL, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(4):203-21. doi: 10.1038/nrendo.2016.12.
158. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell*. 1993;75(1):45-58.

159. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 2005;(5):301-16. doi: 10.1038/sj.cr.7290299.
160. Jia S, Zhou J, Gao Y, Baek JA, Martin JF, Lan Y, Jiang R. Roles of Bmp4 during tooth morphogenesis and sequential tooth formation. *Development.* 2013;140:423–432. doi: 10.1242/dev.081927.
161. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2006;(12):e216. doi:10.1371/journal.pgen.0020216.
162. Pregizer SK, Mortlock DP. Dynamics and cellular localization of Bmp2, Bmp4, and Noggin transcription in the postnatal mouse skeleton. *J Bone Miner Res.* 2015;(1):64-70. doi: 10.1002/jbmr.2313.
163. Yu M, Wang H, Fan Z, Xie C, Liu H, Liu Y, Han D, Wong S-W, Feng H. BMP4 mutations in tooth agenesis and low bone mass. *Arch Oral Biol.* 2019;103: 40–46. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.05.012.
164. Jani P, Liu C, Zhang H, Younes K, Benson DM, Qin C. The Role of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in Mouse Dentinogenesis. *Arch Oral Biol.* 2018;90:33–39. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.02.004.
165. Han D, Wang M, Yu Z, Yin L, Liu C, Wang J et al. FGF5 promotes osteosarcoma cells proliferation via activating MAPK signaling pathway. *Cancer Manag Res.* 2019;(11): 6457–6466. doi: 10.2147/CMAR.S200234.
166. Tenenbaum HC. Cellular origins and theories of differentiation of bone-forming cells. In: Hall BK (ed) *Bone*, vol 1: the osteoblast and osteocyte. 1990;Telford Press, Caldwell, NJ, pp 41–69.
167. Bernick S, Paule W, Ertl D, Nishimoto SK, Nimni ME. Cellular events associated with the induction of bone by demineralized bone. *J Orthop Res.* 1989;7:1–11. doi:10.1002/jor.1100070102.
168. Narayanan AS, Page RC. Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. *Coll Relat Res.* 1983;3(1):33–64.
169. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer.* 2000;7(3):165-97. doi:10.1677/erc.0.0070165.
170. Van Setten GB, Fagerholm P, Philipson B, Schultz. Growth factors and their receptors in the anterior chamber. *Ophthalmic Res.* 1996;28(6):361-4. doi:10.1159/000267930.
171. Van Setten GB. Basic fibroblast growth factor in human saliva: detection and physiological implications. *Laryngoscope.* 1995;105(6):610-2. doi:10.1288/00005537-199506000-00009.
172. Ishiazaki H, Westermark A, Van Setten G, Pyykko I. Basic fibroblast growth factor (bFGF) in salivary physiological and clinical implications. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2000;543: 193-5. doi:10.1080/000164800454378.

173. Szabo S, Folkmann J, Vattary P, Morales RE, Pinkurs GS, Kato K. Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutein of basic fibroblast growth factor in rat. *Gastroenterology*. 1994; 106(4):1106. doi.org/10.1016/0016-5085(94)90773-0.
174. Hankemeier S, Keus M, Zeichen J, Jagodzinski M, Barkhausen T, Bosch U, Krettek C, Van Griensven M. Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. *Tissue Eng*. 2005;11(1-2):41–49. doi:10.1089/ten.2005.11.41.
175. Takayama S, Yoshida J, Hirano H, Okada H, Murakami S. Effects of basic fibroblast growth factor on human gingival epithelial cells. *J Periodontol*. 2002;73(12):1467-73. doi:10.1902/jop.2002.73.12.1467.
176. Shimazu A, Morishita M. Basic fibroblast growth factor induces the expression of matrix metalloproteinase-3 in human periodontal ligament cells through the MEK2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Periodontal Res*. 2003;38(2):122-9. doi:10.1034/j.1600-0765.2003.01645.
177. Shimabukuro Y, Ichikawa T, Takayama S, Yamada S, Takedachi M, Terakura M, Hashikawa T, Murakami S. Fibroblast growth factor-2 regulates the synthesis of hyaluronan by human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*. 2005;203(3):557-63. doi.org/10.1002/jcp.20256.
178. Palmon A, Roos H, Reichenberg E, Grosskop A, Bar Kana I, Pitaru S, Redlich M. Basic fibroblast growth factor suppresses tropoelastin gene expression in cultured human periodontal fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2001;36(2):65-70. doi:10.1034/j.1600-0765.2001.360201.x.
179. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res*. 2003;38(1):97-103. doi.org/10.1034/j.1600-0765.2003.00640.
180. Lallier T E, Spencer A. Use of microarrays to find novel regulators of periodontal ligament fibroblast differentiation. *Cell Tissue Res*. 2007;(327),93–109. doi.org/10.1007/s00441-006-0282-5.
181. Itoh N, Ornitz DM: Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet*. 2004;(11):563-9. doi:10.1016/j.tig.2004.08.007.
182. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(3):235-53. doi: 10.1038/nrd2792.
183. Lee CH, Javed D, Althaus AL, Parent JM, Umemori H. Neurogenesis is enhanced and mossy fiber sprouting arises in FGF7-deficient mice during development. *Mol Cell Neurosci*. 2012;51(3-4):61-7. doi: 10.1016/j.mcn.2012.07.010.
184. Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoroventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of Chordin to BMP-4. *Cell*. 1996;86(4):589–598: doi:10.1016/s0092-8674(00)80132-4.

185. Larrain J, Bachiller D, Lu B, Agius E, Piccolo S, De Robertis E M. BMP-binding modules in chordin: a model for signaling regulation in the extracellular space. *Development* 2000; 127(4): 821-830.
186. Kelley R, Ren R, Pi X, Wu Y, Moreno I, Willis M et al. A concentration-dependent endocytic trap and sink mechanism converts Bmper from an activator to an inhibitor of Bmp signaling. *J Cell Biol.* 2009;184(4):597-609. doi: 10.1083/jcb.200808064.
187. Funari VA, Krakow D, Nevarez L, Chen Z, Funari TL, Vatanavicharn N et al. BMPER mutation in diaphanospondylodysostosis identified by ancestral autozygosity mapping and targeted high-throughput sequencing. *Am J Hum Genet.* 2010;87(4):532-7. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.08.015.
188. Serpe M, Umulis D, Ralston A, Chen J, Olson D J, Avanesov A et al. The BMP-binding protein Crossveinless 2 is a short-range, concentration-dependent, biphasic modulator of BMP signaling in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 2008;(6):940-53. doi: 10.1016/j.devcel.2008.03.023.
189. Mustonen T, Tümmers M, Mikami T, Itoh N, Zhang N, Gridley T, Thesleff I. Lunatic fringe, FGF, and BMP regulate the Notch pathway during epithelial morphogenesis of teeth. *Dev Biol.* 2002;248(2):281-93. doi:10.1006/dbio.2002.0734.
190. Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, Zelarayan LC, Alonso MT, Plikus MV et al. An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. *PLoS Biol.* 2007;(6):e159. doi.org/10.1371/journal.pbio.0050159.
191. Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev Cell.* 2004;7(5):719-30. doi:10.1016/j.devcel.2004.09.012.
192. Plikus MV, Zeichner-David M, Mayer JA, Reyna J, Bringas P, Thewissen JG et al. Morphoregulation of teeth: modulating the number, size, shape and differentiation by tuning Bmp activity. *Evol Dev.* 2005;7(5):440-57. doi:10.1111/j.1525-142X.2005.05048.x.
193. Bei M, Maas R. FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development.* 1998;125(21):4325-33.
194. Neubüser A, Peters H, Balling R, Martin GR. Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell.* 1997;90(2):247-55. doi:10.1016/s0092-8674(00)80333-5.
195. St Amand TR, Zhang Y, Semina EV, Zhao X, Hu Y, Nguyen L et al. Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of Pitx1 and Pitx2 in mouse tooth-forming anlage. *Dev Biol.* 2000;217(2):323-32. doi:10.1006/dbio.1999.9547.
196. Andl T, Ahn K, Kairo A, Chu EY, Wine-Lee L, Reddy ST et al. Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. *Development.* 2004;131(10):2257-68. doi: 10.1242/dev.01125.
197. Li L, Lin M, Wang Y, Cserjesi P, Chen Z, Chen Y; Bmpr1a is required in mesenchymal tissue and has limited redundant function with Bmpr1b in tooth and palate development. *Dev Biol.* 2011;349(2):451-61. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.10.023.

198. Hu X, Wang Y, He F, Li L, Zheng Y, Zhang Y, Chen YP. Noggin Is Required for Early Development of Murine Upper Incisors. *Journal of dental research*. 2012; 91(4):394-400. doi: 10.1177/0022034511435939.
199. Cao H, Jheon A, Li X, Sun Z, Wang J, Florez S et al. The Pitx2:miR-200c/141:noggin pathway regulates Bmp signaling and ameloblast differentiation. *Development*. 2013; 140(16): 3348–3359. doi: 10.1242/dev.089193.
200. Moser M, Binder O, Wu Y, Aitsebaomo J, Ren R, Bode C et al. BMPER, a novel endothelial cell precursor-derived protein, antagonizes bone morphogenetic protein signaling and endothelial cell differentiation. *Mol Cell Biol*. 2003; (16) 23: 5664–5679. doi:10.1128/mcb.23.16.5664-5679.2003.
201. Walshe TE, Dole VS, Maharaj AS, Patten IS, Wagner DD, D'Amore PA. Inhibition of VEGF or TGF- $\beta$  signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2009;29(8):1185–1192. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.186742.
202. Yao Y, Jumabay M, Ly A, Radparvar M, Wang AH, Abdmaulen R, Bostrom KI. Crossveinless 2 regulates bone morphogenetic protein 9 in human and mouse vascular endothelium. *Blood*. 2012; 119: (21) 5037–5047. doi: 10.1182/blood-2011-10-385906.
203. Willis M S, Dyer L A, Ren R, Lockyer P, Moreno-Miralles I, Schisler J C, Patterson C. BMPER regulates cardiomyocyte size and vessel density in vivo. *Cardiovascular Pathology*. 2013; 22(3):228240. doi.org/10.1016/j.carpath.2012.
204. Jumabay M, Zhumabai J, Mansurov N, Niklason K C, Guihard PJ, Fogelman A M et al. Combined effects of bone morphogenetic protein 10 and crossveinless-2 on cardiomyocyte differentiation in mouse adipocyte-derived stem cells. *J Cell Physiol*. 2018; 233(3): 1812–1822. doi:10.1002/jcp.25983.

## **8. ŽIVOTOPIS**

Mr. sc. Vojka Zgombić Popović, dr. dentalne medicine, specijalistica ortodoncije, rođena je 1962. godine u Rijeci. Diplomirala je dentalnu medicinu na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1986. Svoju prvu ordinaciju otvorila je 1989. Specijalizaciju iz ortodoncije počinje 2002. na Zavodu za ortodonciju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koju uspješno završava 2005. Iste godine magistrira iz područja biomedicinskih znanosti s temom „Mikrostrukturne promjene cakline uzrokovane različitim metodama jetkanja i lijepljenja ortodontskih bravica”. Poslijediplomski doktorski studij upisuje 2015. Ovlašteni je i stalni sudski vještak iz područja dentalne medicine. Godine 2012. otvara dentalnu polikliniku Orthonova, gdje obnaša dužnost ravnateljice. Uz dugogodišnji klinički rad, mnogo vremena i truda ulaže u edukaciju iz područja dentalne medicine i ortodoncije te svoj cijeli radni vijek sudjeluje na mnogobrojnim domaćim i inozemnim kongresima i seminarima. Članica je Hrvatskoga liječničkog zbora, Hrvatske komore dentalne medicine i Hrvatskog društva ortodonata te članica organizacijskog i znanstvenog odbora, jedna od moderatora mnogobrojnih kongresa i simpozija održanih u organizaciji HDO-a HLZ-a od 2012. do danas. Dugogodišnja je članica Rotary kluba Zagreb Maksimir, u čijim projektima humanitarno djeluje. Sretno je udana i ponosna majka studentice dentalne medicine na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Popis objavljenih radova:

- **Vojka Zgombić Popović**, Lovorka Grgurević, Vladimir Trkulja, Ruđer Novak, Dubravka Negovetić Vranić. Uloga novih tehnologija u određivanju proteoma sline nakon postavljanja fiksnog ortodontskog aparata - razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa. *Acta Clinica Croatica*, 2020. doi: 10.20471/acc.2020.59.03.12
- **Vojka Zgombić Popović**, Dino Alić, Vedran Jakupović, Enita Nakaš. Bruxism in dental students population. 4th International Congress of Croatian society of orthodontics, Zagreb, 6. – 8. prosinca 2018.
- **Vojka Zgombić Popović**, Silvija Kanižaj, Lovorka Grgurević, Dubravka Negovetić Vranić. Utjecaj fiksnog ortodontskog aparata na proteomski profil sline. Zagreb, Međunarodni kongres Hrvatski dani dječje stomatologije, 1. i 2. prosinca 2017.
- **Vojka Zgombić Popović**, Jurica Matijević, Paris Simeon. Miofunkcionalna naprava twin block u terapiji klase II u mladoj trajnoj denticiji – prikaz slučaja. 2<sup>nd</sup> International congress of the School of Dental Medicine, University of Zagreb and Academy of Operative Dentistry, Zagreb, 5. i 6. ožujka 2016.

