

Πρωτεομική ανάλυση του υγρού της ουλοδοντικής σχισμής και του σάλιου στην Περιοδοντολογία

Proteomic analysis of gingival crevicular fluid and saliva in Periodontology

Περίληψη

Η πρωτεομική ανάλυση αναφέρεται στην αναγνώριση και ποσοτική εκτίμηση όλων των πρωτεϊνών, αλλά και των τροποποιημένων μορφών τους, που παράγονται από ένα μονοκύτταρο ή πολυκύτταρο οργανισμό σε συγκεκριμένη φάση της κυτταρικής ζωής του. Η πρωτεομική ανάλυση μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στις Ιατρικές Επιστήμες, σε ότι αφορά την διάγνωση, πρόγνωση, την θεραπεία ασθενειών, ιδιαίτερα μέσω της ανακάλυψης νέων φαρμάκων αλλά και την ανακάλυψη βιολογικών δεικτών σε υγρά και ιστούς. Η εν λόγω ανάλυση έγινε εφικτή, με την σημερινή της μορφή, χάρη στις τεχνολογικές εξελίξεις, όπως η φασματομετρία μαζών, οι μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών και η βιοπληροφορική. Στην Οδοντιατρική, οι βιολογικοί δείκτες έχουν αναζητηθεί σε τρία κυρίως πεδία: την τερηδόνα, την περιοδοντική νόσο και τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας. Η ανάλυση του σάλιου και του υγρού της ουλοδοντικής σχισμής έχει εφαρμοσθεί εκτεταμένα για την αναζήτηση βιολογικών δεικτών που σχετίζονται με την περιοδοντική νόσο, χωρίς ωστόσο να καταλήξει στην εξέλιξη διαγνωστικών δοκιμασιών που να μπορούν εύκολα να εφαρμοσθούν στην κλινική πράξη. Η πρωτεομική ανάλυση μεγάλης κλίμακας, που εφαρμόζεται κυρίως μετά το 2010, προσφέρει την δυνατότητα αντικειμενικής ανάλυσης και αναγνώρισης πολλαπλών πρωτεϊνών σε δείγματα από ασθενείς με διαφορετική κλινική περιοδοντική κατάσταση. Σκοπός αυτών των τεχνικών είναι η αναγνώριση ομάδας αξιόπιστων βιολογικών δεικτών που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους κλινικούς, αφού πρώτα αξιολογηθούν κατάλληλα και εξελιχθούν σε απλή, χαμηλού κόστους εργαστηριακή δοκιμασία. Τα μέχρι στιγμής ευρήμα-

Δήμητρα Σακελλάρη¹, Χριστόδουλος Φλούδας²,

¹ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Εργαστήριο Προληπτικής Οδοντιατρικής, Περιοδοντολογίας και Βιολογίας Εμφυτευμάτων, Οδοντιατρική Σχολή Α.Π.Θ.

² Καθηγητής, Department of Chemical and Biological Engineering Princeton University, U.S.A.

Dimitra Sakellari¹, Christodoulos Floudas²,

¹ Associate Professor, Department of Preventive Dentistry, Periodontology and Implant Biology, Dental School, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

² Professor, Department of Chemical and Biological Engineering, Princeton University, U.S.A.

Abstract

Proteomic analysis is the identification and quantification of all the proteins and their modifications produced by a unicellular or a multicellular organism at a specific time point of their cellular life. Proteomic analysis can be very important in biological sciences, regarding diagnosis, prognosis and treatment of diseases, especially by guiding the discovery of new drugs and the identification of biomarkers in biological fluids or tissues. Proteomic analysis, in its current form, has been accomplished due to technological developments such as mass spectrometry, protein microarrays and bioinformatics. In Dentistry, the search for biomarkers has covered three fields: caries, periodontal disease and oral cancer. Analysis of salivary and gingival crevicular fluid samples has been extensively applied in order to identify such biomarkers for periodontal disease, but only a limited number of such chair side tests have been applied to clinical praxis so far. Large-scale proteomic analysis, applied mainly after 2010, can greatly enhance these research efforts by means of an objective and unbiased identification of proteins in samples from different periodontal conditions. The aim of these techniques is to identify a set of reliable biomarkers which shall then be used by clinicians after the proper validation and development of convenient, low-cost techniques. Currently, a limited

τα από την εφαρμογή τεχνικών πρωτεομικής ανάλυσης συγκλίνουν στην άποψη ότι, η προσέγγιση αυτή θα ενισχύσει σημαντικά την έρευνα για τον εντοπισμό βιολογικών δεικτών για την περιοδοντική νόσο, στο σάλιο και το υγρό της ουλοδοντικής σχισμής.

Περιοδοντολογικά Ανάλεκτα 2011-2012, 22:31-44

Λέξεις κλειδιά: πρωτεομική ανάλυση, βιολογικοί δείκτες, σάλιο, υγρό ουλοδοντικής σχισμής, περιοδοντική νόσος

Εισαγωγή

Ο όρος “πρωτέωμα” είναι συνδυασμός των όρων πρωτεΐνη και γονιδίωμα και αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται από ένα συγκεκριμένο οργανισμό -κατ’ αντιστοιχία με το γονιδίωμα που αναφέρεται στο σύνολο των γονιδίων του. Ο όρος “πρωτεομική ανάλυση”, προτάθηκε από τον Αυστραλό γενετιστή Marc Wilkins και χρησιμοποιείται μετά το 1996 κατ’ αναλογία με τον όρο γονιδιωματική ανάλυση που είχε μόλις εισαχθεί στην βιβλιογραφία (Wilkins και συν. 1996 α, β). Ο όρος αναφέρεται στην αναγνώριση και ποσοτική εκτίμηση όλων των πρωτεϊνών, αλλά και των τροποποιημένων μορφών τους, που παράγονται από ένα μονοκύτταρο ή πολυκύτταρο οργανισμό σε συγκεκριμένη φάση της κυτταρικής ζωής τους (Wilkins και συν. 1996 α, β). Σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ανάλυση του πρωτεώματος και του γονιδιώματος ενός οργανισμού είναι ότι το δεύτερο θεωρείται σχετικά στατικό, ενώ το πρωτέωμα ενός οργανισμού είναι σε συνεχή δυναμική κατάσταση, ανάλογα με τα ερεθίσματα της συγκεκριμένης χρονικής στιγμής.

Η πρωτεομική ανάλυση μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην Ιατρική Επιστήμη, σε ότι αφορά την διάγνωση, πρόγνωση αλλά και την θεραπεία ασθενειών, ιδιαίτερα μέσω της ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Πολλά νέα φάρμακα είναι τα ίδια πρωτεΐνες ή έχουν σαν στόχο πρωτεΐνες που σχετίζονται με ασθένειες. Εξάλλου, όπως θα αναλυθεί στην συνέχεια, η πρωτεομική ανάλυση θεωρείται πολύτιμο εργαλείο για την ανακάλυψη βιολογικών δεικτών, οι οποίοι θα μπορούν με ακρίβεια να διαγνώσουν ή να σταδιοποιήσουν συγκεκριμένες ασθένειες. Μέχρι σήμερα στην Ιατρική αλλά και στην Οδοντιατρική λίγες από τις εργαστηριακές δοκιμασίες που βασίζονται μόνο σε μία πρωτεΐνη έχουν αποδειχθεί αξιόπιστες (Loos και Tjoa, 2005). Κατά συνέπεια, η πρωτεομική ανάλυση με την δυνατότητα που προσφέρει, για την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών πρωτεϊνών, θα συνεισφέρει στην εξέλιξη αξιόπιστων τέτοιων δοκιμασιών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων προσπαθειών είναι ο καρκίνος, όπου γίνονται εκτεταμένες προσπάθειες για τον προσδιορισμό βιολογικών δεικτών που θα βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση αλλά και την εξέλιξη αποτελεσματικών θεραπευτικών διαδικασιών.

Μέθοδοι πρωτεομικής ανάλυσης

Η πρωτεομική ανάλυση έγινε εφικτή με την σημερινή της μορφή χάρη στις τεχνολογικές εξελίξεις (Pandey και Mann 2000, Aebersold και Mann 2003).

number of such studies exist in literature and they all suggest that this approach can assist in biomarker research.

Analecta Periodontologica 2011-2012, 22:31-44

Key words: proteomic analysis, saliva, gingival crevicular fluid, biomarkers, periodontal disease

Introduction

The term “proteome” is a combination of the terms proteins and genome, and refers to the total of proteins produced by a specific organism - like the term genome which refers to the total of an organism’s genes.

The term “proteomic analysis” was introduced in literature by the Australian geneticist Marc Wilkins in 1996, respectively to the term “genomic analysis”, and refers to the identification and quantification of all the proteins and their modifications produced by a unicellular or a multicellular organism at a specific time point of their cellular life (Wilkins et al. 1996 a, b). An important difference between the proteomic and genomic analysis of an organism is that the latter is considered rather static, while the proteome is constantly dynamic, depending on the stimuli of the specific time point of analysis.

Proteomic analysis can be very important in biological sciences, regarding diagnosis, prognosis and also treatment of diseases, especially by guiding the discovery of new drugs. Many new drugs are proteins themselves or target-specific, disease-associated proteins. Besides, as analyzed later in the text, proteomic analysis is a valuable tool for the discovery of biological markers which will be able to identify and categorize various diseases in a specific and sensitive way. So far in Medicine and Dentistry, a confined number of laboratory tests based on a single protein have been proven a reliable tool (Loos and Tjoa, 2005). Thus, proteomic analysis will greatly assist in developing such tests by offering the possibility for the simultaneous analysis of multiple proteins. An example of this approach is cancer research, where a considerable number of efforts target the identification of biomarkers for early diagnosis and the development of effective therapeutic procedures.

Techniques for Proteomic Analysis

Proteomic analysis, in its current form, has been accomplished due to technological developments

Ενδεικτικά, η φασματομετρία μαζών, οι μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών και η βιοπληροφορική είναι τεχνολογίες που συνέβαλαν στην πρωτεομική ανάλυση, κάνοντάς την ένα διαδραστικό πεδίο συνεργασίας πολλών επιστημονικών κλάδων.

Η φασματομετρία μαζών είναι ένα σύνολο τεχνικών ακριβείας, που προσφέρει την δυνατότητα αναγνώρισης και ποσοτικής εκτίμησης πρωτεϊνών σε πολύπλοκα βιολογικά υγρά ή ιστούς. Βασίζεται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί στο λόγο μάζα προς φορτίο. Βασικά στοιχεία ενός φασματόμετρου είναι η πηγή των ιόντων, ο αναλυτής μαζών και ο ανιχνευτής που καταγράφει τον αριθμό των ιόντων στο λόγο μάζα προς φορτίο. Ο αναλυτής μαζών είναι το κεντρικό στοιχείο της τεχνικής και απαραίτητες ιδιότητές του θεωρούνται η υψηλή διακριτική ικανότητα, η ευαισθησία και η δυνατότητα να παράγει μεγάλο αριθμό φασμάτων από θραύσματα πεπτιδίων. Η φασματομετρία μαζών έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με ηλεκτροφόρηση και πιο πρόσφατα, με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Η αναγνώριση των φασμάτων και στη συνέχεια των πεπτιδίων και πρωτεϊνών επιτυγχάνεται από ειδικά, πολύπλοκα λογισμικά. Ακολουθούνται συνήθως δύο προσεγγίσεις: η προσέγγιση “bottom up”, που σημαίνει ανασύνθεση και αναγνώριση των πρωτεϊνών από θραύσματα πεπτιδίων και η τεχνική “top down”, που σημαίνει απομόνωση των πρωτεϊνών από το μείγμα τους σε ένα βιολογικό υγρό και στη συνέχεια ανάλυση των πεπτιδίων από τα οποία αποτελούνται. Με τις τεχνικές “top down”, θεωρείται ότι είναι πιθανή η απώλεια δεδομένων και θεωρούνται πλέον λιγότερο ευαίσθητες. Στη συνέχεια, η αναγνώριση των πρωτεϊνών γίνεται με την βοήθεια διεθνών βάσεων δεδομένων, όπως για παράδειγμα η βάση UniprotKB/SwissProt (<http://www.uniprot.org>), όπου ο οποιοσδήποτε ερευνητής μπορεί να αντιστοιχίσει τα ευρήματά του με καταγεγραμμένες πρωτεΐνες από άλλους ερευνητές και κατά συνέπεια να δώσει συγκεκριμένο όνομα στις πρωτεΐνες που ανίχνευσε. Τα βασικά βήματα μίας τεχνικής πρωτεομικής ανάλυσης υψηλής απόδοσης («shotgun») με εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας και φασματογραφίας μαζών και ανάλυση “bottom-up” παρουσιάζονται σχηματικά στα Σχήματα 1 και 2. Μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών, κατ’ αντιστοιχία με εκείνες των γονιδίων, είναι μικρές συσκευές που έχουν επιστρωμένη την επιφάνειά τους με ουσίες που αντιδρούν αποκλειστικά με συγκεκριμένες πρωτεΐνες επιτρέποντας την αναγνώρισή τους. Θεωρούνται χρήσιμες για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλαπλών πρωτεϊνών, γεγονός πολύτιμο για κλινικές εφαρμογές. Μειονέκτημα της τεχνικής είναι ότι η αναγνώριση αφορά συγκεκριμένες πρωτεΐνες που έχουν προεπιλεγεί ως μέλη των μικροσυστοιχιών, αποκλείοντας την αναγνώριση νέων, δυνητικά σημαντικών πρωτεϊνών, σε ένα κλινικό δείγμα (Σχήμα 3).

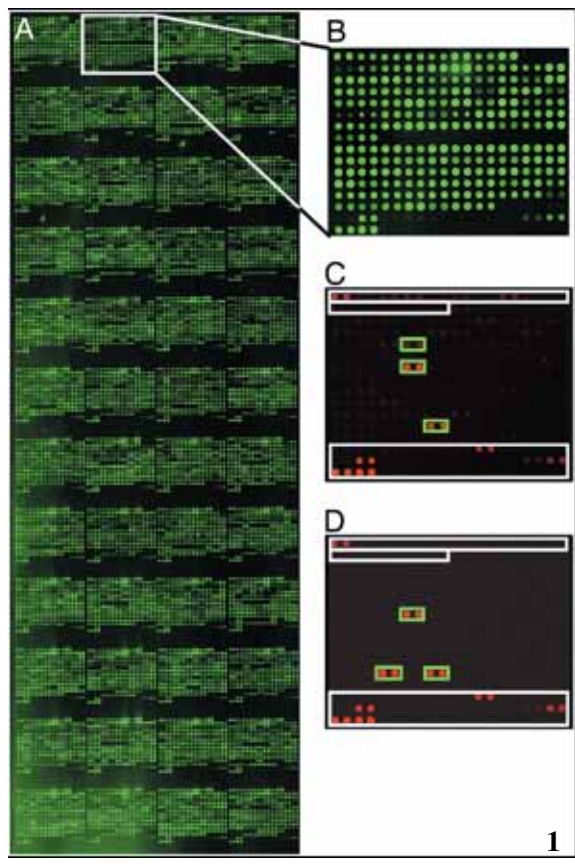
Οι παραπάνω τεχνικές που καταλήγουν στην εξαγωγή μεγάλου όγκου δεδομένων, δεν θα μπορούσαν να είναι χρήσιμες στην κλινική πράξη αν δεν υποστηρίζονταν από αντίστοιχες εξελίξεις στην βιοπληροφορική, η οποία θεωρώντας τα βιολο-

(Pandey and Mann 2000, Aebersold and Mann 2003).

Indicatively, mass spectrometry, protein microarrays and bioinformatics are techniques which have greatly contributed to proteomic analysis, which is considered an interactive sector for different scientific fields.

Mass Spectrometry (MS) is a family of precision techniques offering the possibility to identify and quantify proteins in complex biological fluids or tissues. Mass spectrometry is based on the ionization of atoms or molecules and the measuring of their mass-to-charge ratios. The fundamental components of a mass spectrometer are the ion source, the mass analyzer and the detector which calculates the abundance of each ion present. The mass analyzer is the core component of the technique and must possess a high discriminating ability, sensitivity and the capacity to produce an expanded number of spectra from peptide fragments. Mass spectrometry has been applied in combination with gel electrophoresis and, more recently, High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The recognition of spectra and then peptides and proteins is accomplished by means of a specialized complex software. Two approaches for proteomic analysis are usually applied: the approach termed “bottom-up” referring to the recognition of proteins from peptide fragments and the approach termed “top-down” referring to the isolation of proteins from a complex mixture and the analysis of peptide fragments. “Top-down” techniques are currently considered less sensitive. The recognition of proteins is accomplished with the assistance of international free-access databases such as, for example, UniprotKB/Swissprot (<http://www.uniprot.org>), where any researcher can relate their findings with protein sequences already deposited by other researchers in the database and therefore identify them. The basic steps of a wide-scale (“shotgun”), bottom-up proteomic analysis, using HPLC, an Orbi-trap mass analyzer and software for peptide and protein identification, are presented in Figures 1 and 2.

Protein microarrays, like gene microarrays, are small devices whose surfaces are covered with substances which react only with specific proteins allowing for their recognition. Protein microarrays are considered valuable for the simultaneous recognition of multiple proteins and therefore can be very useful in clinical praxis. A disadvantage of the technique is that protein recognition covers only proteins pre-selected as components of the microarray, thus excluding the possibility of identifying new potentially important proteins in a clinical sample (Figure 3).



Εικόνα 1: Μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών για την ανίχνευση καρκίνου ωοθηκών.

A. Μικροσυστοιχία που περιέχει 5.005 πρωτεΐνες GST

B. Μεγέθυνση περιοχής της που έχει επωαστεί με αντισώματα αντι-GST

Γ. Περιοχή που έχει επωαστεί με ορό ασθενών με καρκίνο ωοθηκών

Δ. Περιοχή που έχει επωαστεί με ορό υγιών γυναικών

Παρατηρείται διαφορετικό χαρακτηριστικό «προφίλ» πρωτεϊνών Επιτρεπόμενη αναδημοσίευση από Hudson και συν. (2007)

Figure 1: Protein microarrays to detect ovarian cancer.

A. Microarray containing 5.005 GST proteins.

B. Magnification of an area probed with specific anti-GST antibodies

C. Area probed with serum from ovarian cancer patients

D. Area probed with serum from healthy women

A different profile can be observed.

Allowed reproduction from Hudson et al. (2007)

Σχήμα 2: Εξελιγμένες τεχνολογίες για πρωτεομική ανάλυση. Υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών. Στο ένθετο, φωτογραφία του αναλυτή μαζών Orbitrap®. Πηγή: Computer-Aided Systems Laboratory, Department of Chemical and Biological Engineering, Princeton University.

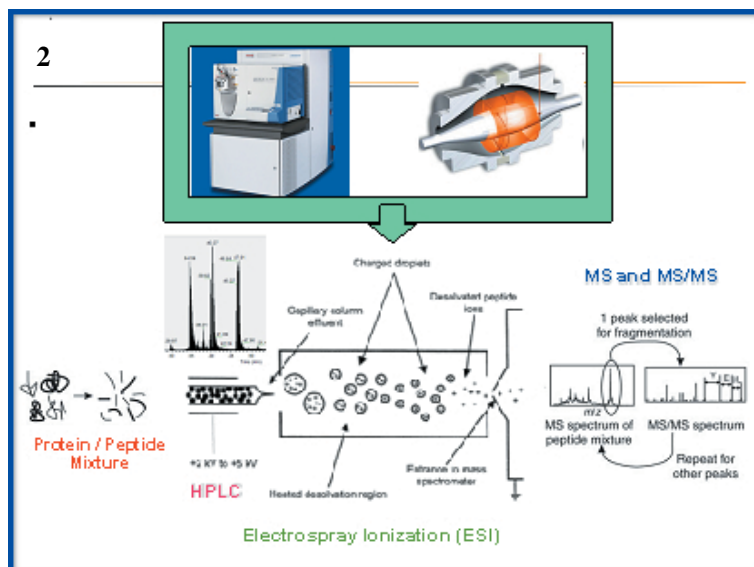


Figure 2: Advances in high-throughput experimentation. High-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS). A photograph of an Orbitrap® mass analyzer is also included. Source: Computer-Aided Systems Laboratory, Department of Chemical and Biological Engineering, Princeton University

γικά δεδομένα (DNA, RNA, πρωτεΐνες) ως ψηφιακή πληροφορία, εφαρμόζει σύνθετους αλγορίθμους για την επεξεργασία τους και την εξαγωγή συμπερασμάτων με αποδοτικό τρόπο.

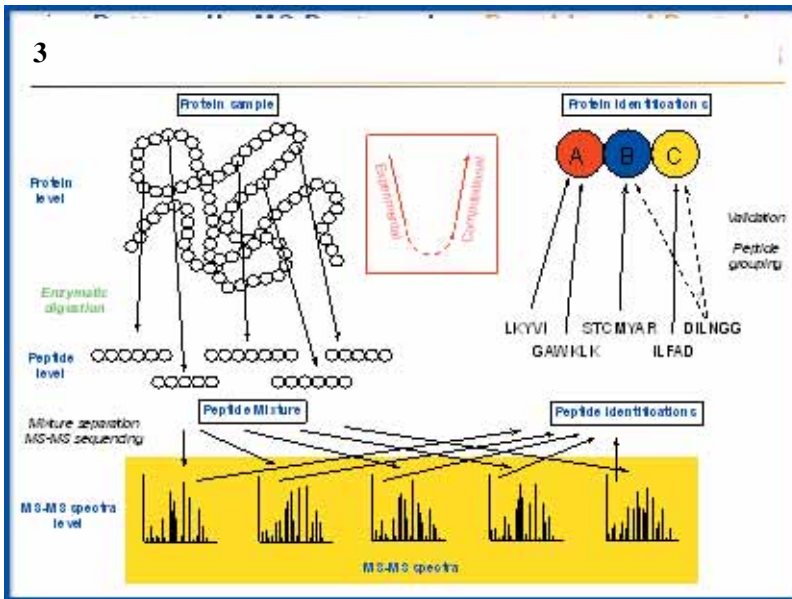
Βιολογικοί δείκτες στην Οδοντιατρική (Ιατρική)

Ως βιολογικός δείκτης ορίζεται ένα χαρακτηριστικό που είναι αντικειμενικά μετρήσιμο και εκτιμά φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες ή την φαρμακολογική ανταπόκριση σε θεραπευτικές παρεμβάσεις (Biomarkers Definition Group, 2011). Εξ' ορισμού οι βιολογικοί δείκτες είναι πολύτιμοι για την έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση αλλά και για τον έλεγχο της επιτυχίας μιας θεραπευτικής αγωγής.

The above-mentioned techniques which generate a substantial number of data could not have been useful for clinical applications without the parallel developments in Bioinformatics, a scientific field which, by considering biological data (DNA, RNA, proteins) as digital information and applying complex algorithms, can effectively extrapolate conclusions.

Biomarkers in Dentistry

A biomarker or biological marker is in general a substance used as an indicator of a biological state. It is an attribute that is objectively measured and



Σχήμα 3: Πρωτεομική ανάλυση τύπου “Bottom Up” με φασματομετρία μάζας. Αναγνώριση και ποσοτική εκτίμηση πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Πηγή: Computer-Aided Systems Laboratory, Department of Chemical and Biological Engineering, Princeton University.

Figure 3: “Bottom Up” Mass Spectrometry (MS) Proteomics: Peptide and Protein Identification and Quantification via Mass Spectrometry. Source: Computer-Aided Systems Laboratory, Department of Chemical and Biological Engineering, Princeton University.

Συγκεκριμένα, οι βιολογικοί δείκτες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε έξι διαφορετικούς τύπους και να χρησιμοποιηθούν για τις εξής λειτουργίες:

1. Έγκαιρη αναγνώριση μιας (συγκεκριμένης) νόσου.
2. Διάγνωση παρουσίας ή απουσίας μιας νόσου.
3. Πρόγνωση της πορείας της νόσου και πιθανή ομαδοποίηση των ασθενών με σκοπό συγκεκριμένες θεραπευτικές αγωγές.
4. Πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος
5. Αναγνώριση των ασθενών που θα ανταποκριθούν καλά σε συγκεκριμένη θεραπεία
6. Εναλλακτικοί δείκτες στη θέση της κλινικής εξέτασης για την λήξη μιας θεραπευτικής αγωγής (Biomarkers Definition Group, 2011)

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεσματικού βιολογικού δείκτη είναι το PSA (Prostate Specific Antigen) μιας πρωτεΐνης που αναγνωρίζει έγκαιρα τον προστατικό καρκίνο με ευαισθησία και ειδικότητα και έχει διεθνώς ευρύτατη διαγνωστική χρήση. Άλλο αξιόλογο παράδειγμα είναι ο γονιδιακός έλεγχος για πολυμορφισμούς των γονιδίων που κωδικοποιούν δύο ηπατικά ένζυμα στο κυτόχρωμα P-450, τα οποία μεταβολίζουν φάρμακα όπως για παράδειγμα την βαρφαρίνη. Ο γονιδιακός έλεγχος αυτός που είναι εγκεκριμένος σαν διαγνωστικό test (AmpliChip®, Roche) μπορεί να βοηθήσει τον κλινικό δείχνοντάς του με ποιά ρυθμό κάθε συγκεκριμένος ασθενής μεταβολίζει το συγκεκριμένο φάρμακο και να ρυθμίσει κατά συνέπεια την σωστή δοσολογία για αποτελεσματική δράση, χωρίς παρενέργειες. Άλλα χαρακτηριστικά παραδείγματα, αφορούν γονιδιακούς ελέγχους για τον καρκίνο του μαστού. Εκτός από τον έλεγχο για μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA 1 και BRCA 2 που χρησιμοποιείται όλο και συχνότερα λόγω της προγνωστικής του αξίας για κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, έχουν πλέον εγκριθεί γονιδιακές εργαστηριακές δοκιμασίες (OncotypeDx®, MammaPrint®) που βοηθούν στον κα-

evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes or pharmacologic responses to a therapeutic intervention (Biomarkers Definition Group, 2011).

By definition, biomarkers are valuable for the early diagnosis, prognosis and evaluation of the outcomes of a specific treatment modality.

Specifically, biomarkers can be categorized in six different types and applied to the following processes:

1. Early diagnosis of a disease.
2. Diagnosis of the presence or absence of a disease.
3. Prognosis of disease progression and possible stratification of patients in order to apply a specialized treatment.
4. Prediction of a treatment outcome.
5. Identification of patients who will respond to treatment.
6. “Surrogate” markers instead of clinical evaluation for the cessation of treatment (Biomarkers Definition Group, 2011)

A characteristic example of an effective biomarker is PSA (Prostate Specific Antigen), a protein which effectively identifies prostate cancer in a specific and sensitive way and is widely applied in clinical praxis. Another example is the genomic test for polymorphisms in the genes, encoding two liver enzymes in cytochrome P-450 which metabolize drugs like warfarin. This genetic test is approved under the name AmpliChip® (Roche) and can guide clinicians by showing the rate of drug metabolism for each specific patient. Therefore, the clinician can regulate the correct drug dose in order to achieve effectiveness without side effects. Besides genetic testing for the presence of mutations of two

θορισμό της πρόγνωσης συγκεκριμένων τύπων καρκίνου του μαστού, του οφέλους από την χημειοθεραπεία και του κινδύνου υποτροπής (Amur και συν. 2008).

Στην Οδοντιατρική, οι βιολογικοί δείκτες έχουν αναζητηθεί σε τρία κυρίως πεδία: την τερηδόνα, την περιοδοντική νόσο και τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας. Στην συνέχεια του κειμένου θα εστιασθούμε στην αναζήτηση βιολογικών δεικτών που αφορούν στην περιοδοντική νόσο μέσω πρωτεομικής ανάλυσης στο σάλιο και το υγρό της ουλοδοντικής σχισμής.

Πρωτεομική ανάλυση στο σάλιο

Το σάλιο προσφέρεται ιδιαίτερα ως βιολογικό υγρό για διαγνωστική χρήση (Giannobile και συν. 2009) λόγω της ευκολίας συλλογής του. Εξάλλου, είναι γνωστό ότι αν και παράγεται από την παρωτίδα, τους υπογνάθιους και τους υπογλώσσους αδένες, περιλαμβάνει συστατικά του ορού και σε μικρότερο βαθμό, του υγρού της ουλοδοντικής σχισμής. Κατά συνέπεια το σάλιο μπορεί, δυνητικά, να περιέχει συστατικά που βοηθούν στη διάγνωση και άλλων συστηματικών νοσών. Πράγματι, μετά το 2000 υπάρχουν πολλαπλές αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία που δεν αφορούν μόνο στην Οδοντιατρική (Πίνακας 1). Ήδη η χρήση του σάλιου για ελέγχους που αφορούν τον ιό HIV, τα επίπεδα διαφόρων φαρμάκων ή της κοτινίνης σε καπνιστές, θεωρείται σαν αξιόπιστο και εύχρηστο εργαλείο που δεν απαιτεί εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό (Zhang και συν. 2009 α, β).

Η πρωτεομική ανάλυση του σάλιου με τις σύγχρονες, ιδιαίτερα ακριβείς τεχνολογίες όπως περιγράφηκαν παραπάνω, έδωσε τεράστια ώθηση στην αναζήτηση βιολογικών δεικτών που αφορούν και σε ασθένειες εκτός στοματικής κοιλότητας όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και αυτοάνοσα συστηματικά νοσήματα. Ήδη, βρίσκεται σε εξέλιξη η δημιουργία του ανθρώπινου πρωτέωματος του σάλιου, δηλαδή μιας βάσης δεδομένων που θα περιλαμβάνει όλες τις πρωτεΐνες του σάλιου στην υγεία αλλά και σε διάφορες ασθένειες (<http://www.skb.ucla.edu>). Σκοπός αυτού του προγράμματος που χρηματοδοτείται από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των Η.Π.Α. είναι αρχικά ο εντοπισμός βιολογικών δεικτών για την τερηδόνα, την περιοδοντική νόσο και τον στοματικό καρκίνο, και στη συνέχεια η εξέλιξη διαγνωστικού τεστ που θα μπορεί με χαμηλό κόστος, ευαισθησία και ειδικότητα να αναγνωρίσει αυτές τις ασθένειες. Στη μεγαλύτερη μελέτη που περιγράφει το πρωτέωμα του σάλιου έχουν αναγνωρισθεί 2340 διαφορετικές πρωτεΐνες ενώ υπολογίζεται ότι το 20% από αυτές είναι κοινές με εκείνες που αναγνωρίζονται στον ορό (Badanakhavi και συν. 2009).

Ο αριθμός των μελετών με πρωτεομική ανάλυση, που αφορά την αναζήτηση βιολογικών δεικτών για την περιοδοντική νόσο στο σάλιο, είναι μέχρι στιγμής. Στις περισσότερες από αυτές δεν έχουν εφαρμοσθεί οι νεώτερες πρωτεομικές τεχνικές υψηλής απόδοσης τύπου “shotgun” και αναφέρουν περιορισμένες διαφορές μεταξύ της περιοδοντικής υγείας και της πε-

genes, BRCA 1 and BRCA 2, which is increasingly used due to its prognostic value for breast cancer, two other tests are currently available in the market (OncotypeDx®, MammaPrint®), which can assist in defining the prognosis of specific types of breast cancer, benefits from chemotherapy and the risk of cancer recurrence (Amur et al. 2008).

In Dentistry, the search for biomarkers has covered three fields: caries, periodontal disease and oral cancer. In the present text, we shall focus on the investigation of biomarkers for periodontal disease by means of the proteomic analysis of saliva and gingival crevicular fluid.

Proteomic Analysis in Saliva

Saliva is particularly suitable as a biological fluid for diagnostic applications due to its convenient collection (Giannobile et al. 2009). Besides, it is well known that, although saliva is mainly a product of the parotid, the submandibular and sublingual glands, it includes components of serum and, to a lesser extent, of gingival crevicular fluid. Therefore, saliva can potentially contain substances that assist in diagnosing other systemic diseases. Since 2000, there has been a substantial number of references available in literature, which do not refer exclusively to Dentistry (Table 1). The use of saliva in tests for HIV infection, the levels of various medications or cotinine in smokers is considered a reliable and easy-to-use test not requiring specialized medical personnel (Zhang et al. 2009 a, b).

Proteomic analysis of saliva, together with the currently available contemporary high precision “shotgun” techniques described above, has greatly reinforced research related to biomarkers in saliva not only connected to diseases of the oral cavity but to systemic diseases as well, like Sjogrens disease or diabetes mellitus.

The mapping of human salivary proteome, i.e. a comprehensive database including all salivary proteins in health or diseases, is already under way (<http://www.skb.ucla.edu>).

The final aim of this project, which is financed by the National Institutes of Health in the U.S., is the identification of biomarkers for caries, periodontal disease and oral cancer and, thereafter, the development of diagnostic tests which can identify these diseases at a low cost but in a highly specific and sensitive way. In the most extensive study describing the human salivary proteome so far, 2,340 different proteins have been identified, 20% of which are the same as the proteins identified in serum (Badanakhavi et al. 2009).

Πίνακας 1. Διαγνωστικές εφαρμογές του σάλιου

Καρκίνος μαστού (Arellano και συν. 2009, Streckfus και συν. 2009)

Ηπατίτιδα C (Elsana και συν. 2008, 2009)

Λοίμωξη HIV (Hodinka και συν. 1998)

Σύνδρομο Sjögren (Hu και συν. 2009)

Καθορισμός επιπέδων ορμονών όπως οιστραδιόλη, προγεστερόνη, κορτιζόλη, τεστοστερόνη (Groschl, 1998)

Παρουσία απαγορευμένων ουσιών όπως κοκαΐνη, μεθαμφεταμίνες, οπιούχα (Zhang και συν. 2009)

Προσδιορισμός επιπέδων φαρμάκων όπως διγοξίνη, μεθαδόνη (Zhang και συν. 2009)

Table 1. Applications of saliva diagnostics

Breast Cancer (Arellano et al. 2009, Streckfus 2009)

Hepatitis C (Elsana et al. 2008, 2009)

HIV infection (Hodinka et al. 1998)

Sjögren's syndrome (Hu et al. 2009)

Determination of hormone levels (estradiol, progesterone, cortisol, testosterone) (Groschl, 1998)

Detection of prohibited substances (cocaine, methamphetamines, opioids) (Zhang et al. 2009)

Determination of levels of drugs (digoxin, methadone) (Zhang et al. 2009)

ριοδοντικής νόσου (Wu και συν. 2009, Haigh και συν. 2010, Goncalves και συν. 2010, 2012, Loo και συν. 2010). Αν και η συλλογή του σάλιου προσφέρει τα πλεονεκτήματα που προαναφέρθηκαν και επομένως είναι κατάλληλο και για μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες, ωστόσο το υγρό της ουλοδοντικής σχισμής παρέχει πληρέστερες πληροφορίες σε ότι αφορά το περιοδοντικό περιβάλλον και μάλιστα για συγκεκριμένα σημεία περιοδοντικής προσβολής. Εξάλλου, η βιοχημεία του σάλιου είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και επηρεάζεται από περιβαλλοντικά ή/και ψυχολογικά ερεθίσματα (Chapple 2009). Κατά συνέπεια, το υγρό της ουλοδοντικής σχισμής παρά τα συγκριτικά μειονεκτήματα στην συλλογή του, σε σχέση με το σάλιο, παραμένει σταθερά το βιολογικό υγρό εκλογής σε ότι αφορά τις μελέτες των περιοδοντικών νόσων.

Όπως προαναφέρθηκε, στις περισσότερες από τις μελέτες για την περιοδοντική νόσο, με πρωτεομική ανάλυση στο σάλιο, δεν χρησιμοποιήθηκαν μέχρι σήμερα οι τεχνικές υψηλής απόδοσης («shotgun») που ήδη χρησιμοποιήθηκαν για το υγρό της ουλοδοντικής σχισμής. Σε πρόσφατη μελέτη με εφαρμογή αυτών των τεχνικών, ανιχνεύθηκαν 344 πρωτεΐνες στο σάλιο περιοδοντικά υγιών ατόμων και ασθενών με περιοδοντίτιδα από τις οποίες 20 παρουσίαζαν 1.5 φορά μεγαλύτερη συγκέντρωση στους περιοδοντικούς ασθενείς και είναι υποψήφιοι βιολογικοί δείκτες. Σε αυτές ενδεικτικά περιλαμβάνονται ουσίες γνωστές για την συμμετοχή τους στην φλεγμονή όπως

A limited number of studies applying proteomic analysis exist in literature regarding the identification of biomarkers for periodontal disease in saliva. In most of these studies, newer “shotgun” approaches have not been applied and their findings regarding differences between periodontal health and disease remain rather inconclusive (Wu et al. 2009, Haigh et al. 2010, Goncalves et al. 2010, 2012, Loo et al. 2010). Although saliva has the previously mentioned advantages of easy collection and handling, and might thus be suitable for large-scale epidemiological studies, gingival crevicular fluid offers more comprehensive information regarding the periodontal environment which can be site-specific.

Besides, salivary biochemistry is extremely complex and can be affected by environmental and/or psychological stimuli (Chapple 2009). Therefore, the gingival crevicular fluid remains the biological fluid of choice for studies of periodontal disease.

As previously mentioned, in most periodontal disease-associated studies in saliva using proteomic analysis, high-throughput “shotgun” approaches already applied in gingival crevicular fluid research have not been used yet. In a recent study, 344 proteins

οι μεταλλοπρωτεΐνάσες της εξωκυττάριας ουσίας MMP-8 και MMP-9, το συστατικό του συμπληρώματος C3 και η α-2 μακροσφαιρίνη ενώ άλλες πρωτεΐνες όπως η κερουλοπλασμίνη, η πλαστίνη-2, η προφιλίνη-1 και η λακτοτρανσφεράση ήταν μέχρι στιγμής περιορισμένου ενδιαφέροντος στην έρευνα των περιοδοντικών νόσων (Salazar και συν. 2013).

Πρωτεομική ανάλυση στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής

Η αναζήτηση βιολογικών δεικτών για την περιοδοντική νόσο στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής, είναι από τα πεδία με την πλουσιότερη βιβλιογραφία στην Περιοδοντολογία, ήδη από την δεκαετία του 1980. Ο αναγνώστης παραπέμπεται σε εμπειριστατωμένες βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις που αφορούν την αναζήτηση διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής (Champagne και συν. 2003, Heitz - Mayfield, Loos & Toja 2005, Lamster & Ahlo 2007, Buduneli & Kinane 2011). Η ευκολία συλλογής του δείγματος με ατραυματική μεθοδολογία και το γεγονός ότι περιέχει συστατικά του ορού, των περιοδοντικών ιστών και του υποουλικού βιοϋμενίου είναι μερικά από τα σημαντικά πλεονεκτήματά του. Μέχρι το 2005, έχουν αξιολογηθεί τουλάχιστον 90 τέτοιοι δείκτες, όπως για παράδειγμα διάφορες κυταροκίνες, πρωτεολυτικά ένζυμα, προϊόντα μεταβολισμού βακτηρίων ή προϊόντα αποδόμησης των περιοδοντικών ιστών. Εκτιμώντας τα αντίστοιχα δεδομένα προκύπτει ότι την πιο αξιόλογη τεκμηρίωση φαίνονται να έχουν ανάμεσα τους η αλκαλική φωσφατάση, η β-γλυκουρονιδάση και η καθεψίνη-B με >77% ακρίβεια στην πρόγνωση μελλοντικής περιοδοντικής καταστροφής, ενώ οι MMP-8 και -9, η ελαστάση των ουδετεροφίλων και οι διπεπτιδυλ-πεπτιδάσες II και IV φαίνεται να συσχετίζονται με την παρουσία ή/και εξέλιξη της νόσου (Loos και Toja 2005, Chapple 2009).

Ωστόσο, ελάχιστοι από αυτούς τους πιθανούς δείκτες έχουν φθάσει στην καθημερινή πράξη με την μορφή κάποιας τυποποιημένης διαγνωστικής δοκιμασίας ή κάποιας εύχρηστης εργαστηριακής ανάλυσης ενώ και οι απόψεις των κλινικών προς το παρόν παραμένουν άγνωστες. Εξάλλου η -μέχρι στιγμής- αδυναμία μιάς μοναδικής πρωτεΐνης να λειτουργήσει μόνη της ως διαγνωστικός ή προγνωστικός δείκτης για την περιοδοντική νόσο, υποδεικνύει την ανάγκη αναγνώρισης πολλαπλών πρωτεϊνών που θα λειτουργούν σε συνδυασμό, σαν αξιόπιστος βιολογικός δείκτης. Νεότερες τεχνολογίες, όπως ανοσοολογικοί προσδιορισμοί μεγάλης κλίμακας (π.χ. τεχνική Luminex) έκαναν δυνατή την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών βιολογικών δειγμάτων για τον εντοπισμό πολλαπλών πρωτεϊνών-βιολογικών δεικτών. Τα ευρήματα των μελετών επιβεβαίωσαν την ανάγκη προσδιορισμού πολλαπλών βιολογικών δεικτών, και όχι ενός, για την διάκριση της περιοδοντικής υγείας από την νόσο, με ακριβή τρόπο (Offenbacher και συν. 2010, Teles και συν. 2010).

Αντίθετα, η πρωτεομική ανάλυση δίνει την δυνατότητα πιάς αντικειμενικής αξιολόγησης των συστατικών του υγρού της

were identified in the saliva of periodontally healthy or diseased subjects by applying such techniques. 20 of those were present at levels 1.5 times higher in periodontitis patients and can therefore be considered as candidate saliva biomarkers for periodontal disease. Among them, indicatively, proteins known for their involvement in inflammation such as the extracellular matrix metalloproteinases MMP-8 and -9, complement component C3 and a-2 macroglobulin are included, while other proteins such as ceruloplasmin, plasmin-2, profilin-1 and lactotransferase have not been previously widely investigated for the diagnosis of periodontal disease (Salazar et al. 2013).

Proteomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid

Research for biomarkers regarding periodontal disease in gingival crevicular fluid (GCF) is one of the fields in Periodontology with the richest literature since the 1980s. The reader is referred to well-documented relevant literature reviews (Champagne et al. 2003, Heitz -Mayfield, Loos & Toja 2005, Lamster & Ahlo 2007, Buduneli & Kinane 2011). The easy collection in a non-traumatic methodology, and the fact that it contains components of serum, periodontal tissues and the subgingival biofilm are some of the advantages of GCF. Up to 2005, at least 90 such biomarkers have been evaluated, including various cytokines, proteolytic enzymes and products of bacterial metabolism or by-products of periodontal tissue destruction. The evaluation of relevant data has demonstrated that among these potential biomarkers, alkaline phosphatase, b-glucuronidase and cathepsin-B can offer over 77% precision in predicting periodontal destruction, while MMP-8, MMP-9, neutrophil elastase and dipeptidyl-peptidases II and IV appear to correlate with the presence and/or activity of periodontal disease (Loos and Toja 2005, Chapple 2009).

However, very few of these potential biomarkers have been applied to clinical practice as diagnostic chair side kits or as convenient laboratory assays, and the attitude of clinicians towards already existing tests is currently unknown. Besides, the inability of a single protein to act as a diagnostic or prognostic biomarker for periodontal disease suggests that multiple such proteins should be identified which, when combined, can act as a reliable biomarker. More recent technologies, like highthroughput immunological assays (e.g. Luminex) have made the simultaneous analysis of multiple biological samples for more proteins-potential biomarkers feasible. Findings from relevant studies have also suggested the need for the

ουλοδοντικής σχισμής ως βιολογικών δεικτών, γιατί δεν απαιτεί προεπιλογή από τους ερευνητές των πρωτεϊνών που θα εξετασθούν, αλλά αναγνωρίζει με ακρίβεια - ανάλογα φυσικά με την διακριτική ικανότητα της εφαρμοζόμενης τεχνικής - όλο το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του βιολογικού δείγματος.

Στην Περιοδοντολογία, τεχνικές πρωτεομικής ανάλυσης είχαν αρχικά χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών, όπως οι ντεφενσίνες. Στην συνέχεια, εφαρμόστηκαν τεχνικές φασματομετρίας σε συνδυασμό με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση που διαθέτουν μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα και μετά το 2010 τεχνικές πρωτεομικής ανάλυσης μεγάλης κλίμακας ("shotgun approaches"). Οι μελέτες αυτές αφορούσαν άτομα με περιοδοντική υγεία, σύγκριση ασθενών με χρόνια ή επιθετική περιοδοντίτιδα και περιοδοντική υγεία, αλλά και τις μεταβολές του πρωτεώματος στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής σε μοντέλο πειραματικής ουλίτιδας (Bostanci και συν. 2010, 2013, Grant και συν. 2010, Carneiro και συν. 2012, Baliban και συν. 2012, 2013). Κοινό σημείο των παραπάνω μελετών είναι η αναγνώριση μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών ανθρώπινης αλλά και βακτηριακής προέλευσης στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής, από τις οποίες πολλές αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά. Χαρακτηριστικά ευρήματα από τις αντίστοιχες μελέτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Ένα εύλογο ερώτημα για τον κλινικό οδοντίατρο είναι πως θα ήταν δυνατόν να αξιοποιηθεί αυτός ο τεράστιος αριθμός στοιχείων και δεδομένων που προκύπτει από αυτές τις υψηλές αναλύσεις, όπως για παράδειγμα, πόσες και ποιές από τις πρωτεΐνες έχουν κλινική αξία ως βιολογικοί δείκτες. Στο σημείο αυτό υπεισέρχεται η Βιοπληροφορική η οποία, χρησιμοποιώντας ανώτερα μαθηματικά και εξελίσσοντας αλγόριθμους και λογισμικά καταλήγει σε συγκεκριμένα συμπεράσματα. Ο σκοπός εξάλλου αυτού του τύπου των μελετών είναι να εντοπισθεί ένας μικρός αριθμός πρωτεϊνών που σε συνδυασμό θα λειτουργούν σαν αξιόπιστοι δείκτες. Στη συνέχεια, αφού εντοπισθεί αυτή η ομάδα πρωτεϊνών θα μπορεί να ανιχνεύεται στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής, όχι απαραίτητα με υψηλής τεχνολογίας πρωτεομική ανάλυση αλλά με οποιαδήποτε τεχνική προσφέρει ακρίβεια, ευκολία και χαμηλό κόστος για την κλινική εφαρμογή (Σχήμα 4). Χαρακτηριστικά αναφέρουμε το παράδειγμα των μελετών των Baliban και συνεργατών (2012, 2013). Στις μελέτες αυτές έγινε προσπάθεια εντοπισμού βιολογικών δεικτών που θα διακρίνουν μέσω του υγρού της ουλοδοντικής σχισμής, άτομα που είναι περιοδοντικά υγιή από ασθενείς με χρόνια περιοδοντίτιδα. Μετά από ανάλυση των δειγμάτων με φασματομετρία μάζας η αναγνώριση των πρωτεϊνών έγινε με το ειδικό λογισμικό που έχει αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Χημικών Μηχανικών και Βιομηχανικής του Πανεπιστημίου του Princeton (Baliban και συν. 2010). Στη συνέχεια δημιουργήθηκε συγκεκριμένο μαθηματικό μοντέλο που αναγνώριζε συνδυασμό πρωτεϊνών που εμφανίζεται αποκλειστικά και μόνο στα άτομα με περιοδοντική υγεία ή στα περιστατικά χρόνιας περιοδοντίτιδας. Με το μαθηματικό μοντέλο αυτό, εντοπίστηκαν 7 ανθρώπινες και 3 βακτηριακές πρωτεΐνες

identification of multiple and not single biomarkers, which can discriminate periodontal health from disease in a highly sensitive and specific way (Offenbacher et al. 2010, Teles et al. 2010).

Proteomic analysis offers by definition the possibility of a more objective evaluation of components of GCF as biomarkers, since the pre-selection of proteins to be investigated by researchers is not required and the outcomes of the analysis depend solely on the discriminating ability of the applied technique.

In Periodontology, proteomic analysis in GCF has been originally applied in order to identify specific proteins, such as the defensins. Mass spectrometry techniques combined with two-dimensional gel electrophoresis which offer enhanced analytical properties have been applied later, followed by the large-scale "shotgun" proteomic approaches after 2010. The latter have referred to subjects with periodontal health, have compared periodontally healthy individuals with aggressive and chronic periodontitis patients, or have investigated changes in the experimental gingivitis model (Bostanci et al. 2010, 2013, Grant et al. 2010, Carneiro et al. 2012, Baliban et al. 2012, 2013). A common finding of the above mentioned studies has been the identification of a substantial number of both human and bacterial proteins in GCF. Many of these proteins have been identified for the first time in GCF. The findings of these studies are displayed in Table 2.

A reasonable question for the clinician is how the substantial number of data deriving from these highly analytical techniques can be evaluated, like for example how many and which specific proteins have clinical value as biomarkers for periodontal disease. At this point, bio-informatics, using advanced mathematics and developing algorithms and software, can extrapolate specific conclusions. Besides, the primary aim of this kind of studies is to identify a small group of proteins which can act as reliable biomarkers (Figure 4). After their identification, this group of proteins can be detected in GCF, not necessarily by applying advanced techniques of proteomic analysis but rather techniques that offer a combination of accuracy, convenience and low cost for clinical application.

The example of the studies by Baliban and co-workers (2012, 2013) is reported. In the above mentioned studies, researchers have identified proteins which could discriminate periodontally healthy subjects from chronic periodontitis patients. After analyzing GCF samples with mass spectrometry, the recognition of proteins was accomplished by specific software developed by the Department of Chemical and Biological Engineering of Princeton

Πίνακας 2. Μελέτες πρωτεομικής ανάλυσης μεγάλης κλίμακας στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής

Έτος	Συγγραφέας	Πληθυσμός Μελέτης	Αριθμός Πρωτεΐνων που Ανιχνεύθηκαν
2010	Bostanci και συν.	Επιθετική περιοδοντίτιδα n=5 Περιοδοντικά υγιείς n=5	154
2010	Grant και συν.	Πειραματική ουλίτιδα σε 10 άτομα	202
2012	Baliban και συν.	Χρόνια περιοδοντίτιδα n=12 Περιοδοντικά υγιείς n=12	462
2012	Carneiro και συν.	Περιοδοντικά υγιείς n=9	199
2013	Baliban και συν.	Χρόνια περιοδοντίτιδα n=51 Περιοδοντικά υγιείς n=45	462
2013	Bostanci και συν.	Πειραματική ουλίτιδα σε 20 άτομα	287

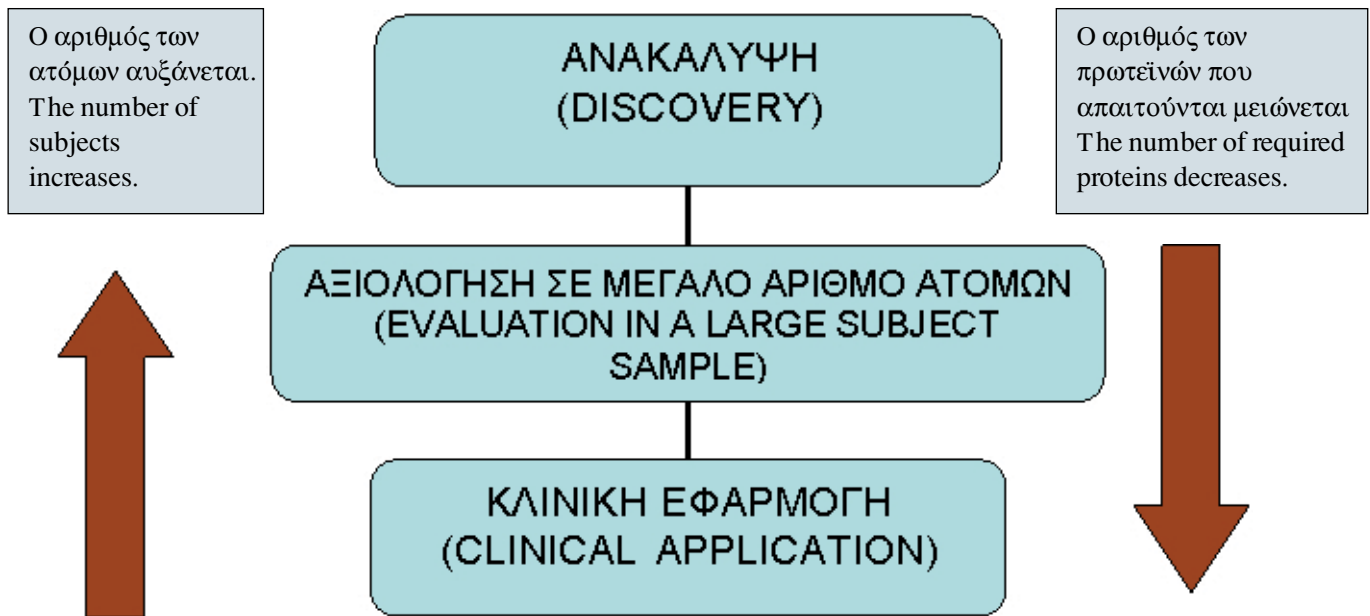
Table 2. Proteomic analysis in gingival crevicular fluid using «shotgun» proteomic analysis

Year of publication	Authors	Subject sample	Number of identified proteins
2010	Bostanci et al.	Aggressive periodontitis n=5 Periodontally healthy n=5	154
2010	Grant et al.	Experimental gingivitis in 10 volunteers	202
2012	Baliban et al.	Chronic periodontitis n=12 Periodontally healthy n=12	462
2012	Carneiro et al.	Periodontally healthy n=9	199
2013	Baliban et al.	Chronic periodontitis n=51 Periodontally healthy n=45	462
2013	Bostanci et al.	Experimental gingivitis in 20 volunteers	287

που διαχωρίζουν την περιοδοντική υγεία από την νόσο. Οι συνδυασμοί αυτοί των πρωτεϊνών, εφαρμόστηκαν στην συνέχεια σε 55 κωδικοποιημένα δείγματα και η αναγνώριση της κλινικής κατάστασης έγινε με ακρίβεια >95% ανοίγοντας την προοπτική για εξέλιξη ενός διαγνωστικού τεστ που θα αφορά τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες και μόνο. Το επόμενο βήμα για την αξιολόγησή τους όπως φαίνεται στο Σχήμα 4 είναι ο έλεγχος αυτού του προτεινόμενου συνδυασμού βιολογικών δεικτών, σε μεγάλο αριθμό ατόμων, ώστε να αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά τους και να μπορούν πλέον να ενταχθούν στην κλινική πράξη της Οδοντιατρικής ως διαγνωστικό τεστ.

Όπως συμβαίνει και στις γονιδιωματικές αναλύσεις μεγάλης κλίμακας, τα ευρήματα μερικές φορές είναι μη αναμενόμενα. Για παράδειγμα, ο έλεγχος 23 γονιδίων και όχι μεμονωμένων πολυμορφισμών γονιδίων 600 ατόμων με επιθετική περιοδοντίτιδα στην Ευρώπη, απεκάλυψε την πιθανή συσχέτι-

University, U.S.A. (Baliban et al. 2010). A mathematical model was then created, which recognizes a combination of proteins appearing exclusively in periodontally healthy or diseased individuals. With the application of this mathematical model, seven human and three bacterial proteins were identified. These combinations of proteins were applied in 55 coded samples and the recognition of periodontal status was accomplished with a degree of accuracy over 95%, thus creating the possibility of developing a diagnostic test based on these specific proteins. The next phase in the evaluation of these proteins as biomarkers is testing these biomarkers in a large number of subjects (Figure 4). Similar to large-scale genomic tests, findings are sometimes unexpected.



Σχήμα 4: Σχηματική παρουσίαση της διαδικασίας ανακάλυψης βιο-δεικτών.

Η πρωτεομική ανάλυση μπορεί να βοηθήσει ιδιαίτερα στα αρχικά βήματα (Βασισμένο στη Grant 2012).

Figure 4: Schematic representation of the procedure for biomarker discovery. Proteomic analysis can assist especially in the first steps (Based on Grant 2012).

σή της με τον μονοσημειακό πολυμορφισμό rs61815643 στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ιντερλευκίνη-10 που δεν είχε διερευνηθεί ποτέ στην οδοντιατρική βιβλιογραφία (Schaeffer και συν. 2013). Αντίθετα, στην Περιοδοντολογία, είναι γνωστή η εκτεταμένη έρευνα, όπως και η ύπαρξη αντίστοιχου εμπορικού διαγνωστικού τεστ, που ελέγχει την παρουσία δύο μόνων πολυμορφισμών των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυταροκίνες ιντερλευκίνη-1α και -1β, γνωστές για την συμμετοχή τους στην παθογενετική διαδικασία της περιοδοντικής νόσου. Υπό το πρίσμα των τεχνολογικών εξελίξεων που προσφέρει την δυνατότητα αντικειμενικής αναζήτησης βιολογικών δεικτών σε μεγάλη κλίμακα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, οι αρχικές -πρωτοποριακές για το 2000- προσπάθειες γονιδιακών ελέγχων, μετά από μια δεκαπενταετία εφαρμογής τους, φαίνονται πλέον περιορισμένης αξίας για τον προσδιορισμό βιολογικών δεικτών.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της μελέτης των Baliban και συνεργατών (2013), στην ομάδα των βιολογικών δεικτών που προσδιορίστηκαν σε άτομα με χρόνια περιοδοντίτιδα, δεν συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες που είναι ήδη γνωστές για την συμμετοχή τους στην παθογενετική διαδικασία της νόσου (π.χ. η ιντερλευκίνη-1β ή ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α) και είχαν διερευνηθεί εκτεταμένα στο παρελθόν ως πιθανοί βιολογικοί δείκτες περιοδοντικής καταστροφής, στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής. Ως παράδειγμα αναφέρουμε ότι η λυσοζύμη C, και η υπομονάδα δ της αιμοσφαιρίνης είναι δύο από τις πρωτεΐνες που εμφανίζονται σταθερά στα δείγματα από περιοδοντικούς ασθενείς.

For example, the mapping of 23 genes and not the evaluation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in 600 subjects with aggressive periodontitis in Europe has revealed the possible correlation of this periodontal disease with the SNP rs61815643 in the gene encoding interleukin-10 which has never been previously investigated in Periodontology (Schaeffer et al. 2013). In contrast, the contribution of two SNPs in the genes encoding interleukins -1a and -1b to periodontal disease initiation and progression has been extensively investigated, and a commercial diagnostic test based on these two polymorphisms is available for clinicians. Taking into account technological evolutions, which offer the possibility of an objective whole-genome investigation for biomarkers, the initial -innovative for 2000- efforts now -after 15 years- appear to have a rather limited value in biomarker research.

Similar to data from large-scale genomic research, findings from the Baliban et al. study (2013) suggest that in the group of biomarkers identifying chronic periodontitis subjects, proteins known to participate in the pathogenesis of periodontal disease (e.g. interleukin-1b or tumor necrosis factor-α) and previously widely investigated as potential biomarkers in GCF, are not included. As an example, lysozyme C and the d subunit of haemoglobin are two of the proteins constantly appearing in GCF samples from chronic periodontitis patients.

Συνδυάζοντας όλα τα παραπάνω, διαπιστώνουμε ότι, μετά το 2010, άνοιξαν νέα πεδία στην Περιοδοντολογία, για τον εντοπισμό αξιόπιστων βιολογικών δεικτών στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής και το σάλιο. Η εφαρμογή τεχνικών υψηλής τεχνολογίας και η συνεργασία διάφορων επιστημονικών κλάδων, δίνει νέα ώθηση στην έρευνα που αφορά την έγκαιρη διάγνωση, τον σωστό καθορισμό της πρόγνωσης και τον προγραμματισμό και έλεγχο του κατάλληλου θεραπευτικού σχεδίου των περιοδοντικών ασθενών.

Collectively, the above mentioned data suggest that, since 2010, new approaches have been available in periodontal research regarding the identification of reliable biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid. The application of high technology and the collaboration of various scientific fields greatly enhance the research related to the early diagnosis, correct prognosis, therapy and evaluation of treatment outcomes.

Βιβλιογραφία - References

- Amur, S., Frueh, F.W., Lesko, L.J. & Huang, S. (2008) Integration and use of biomarkers in drug development, regulation and clinical practice: a US regulatory perspective. *Biomarkers in Medicine* **2**, 305-311.
- Arellano, M., Jiang, J., Zhou, X., Zhang, L., Ye, H., Wong, D.T. & Hu, S. (2009) Current advances in identification of cancer biomarkers in saliva. *Frontiers in Bioscience* **1**, 296-303.
- Baliban, R. C., DiMaggio, P. A., Plazas-Mayorca, M. D., Young, N. L., Garcia, B. J. & Floudas, C. A. (2010) A novel approach for untargeted post-translational modification identification using integer linear optimization and tandem mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **9**, 764-779.
- Baliban, R.C., Sakellari, D., Li, Z., DiMaggio, P.A., Garcia, B.A. & Floudas, C.A. (2012) Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 203-212.
- Baliban, R.C., Sakellari, D., Li, Z., Guzman, Y., Garcia, B.A. & Floudas, C.A. (2013) Discovery of biomarker combinations that predict periodontal health or disease with high accuracy from GCF samples based on high-throughput proteomic analysis and mixed-integer linear optimization. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 131-139.
- Biomarkers Definition Group (2001) Biomarkers and surrogate end-points: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **69**, 89-95.
- Bostanci, N., Heywood, W., Mills, K., Parkar, M., Nibali, L. & Donos, N. (2010) Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *Journal of Proteome Research* **9**, 2191-2199.
- Buduneli, N. & Kinane, D. F. (2011) Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 85-105.
- Carneiro, L.G., Venuleo, C., Oppenheim, F.G. & Salih, E. (2012) Proteome data set of human gingival crevicular fluid from healthy periodontium sites by multi-dimensional protein separation and mass spectrometry. *Journal of Periodontal Research* **47**, 248-262.
- Champagne, C. M., Buchanan, W., Reddy, M. S., Preisser, J. S., Beck, J. D. & Offenbacher, S. (2003) Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontology 2000* **31**, 167-180.
- Chapple, I. L. C. (2009) Periodontal diagnosis and treatment-where does the future lie? *Periodontology 2000* **51**, 9-24.
- Elsana, S., Sikuler, E., Yaari, A., Shemer-Avni, Y., bu-Shakra, M., Buskila, D., Katzman, P., Naggan, L. & Margalith, M. (1998) HCV antibodies in saliva and urine. *Journal of Medical Virology* **55**, 24-27.
- Giannobile, W.V., Beikler, T., Kinney, J.S., Ramseier, C.A., Morelli, T. & Wong, D.T. (2009) Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontology 2000* **50**, 52-64.
- Goncalves, L.R., Soares, M.R., Nogueira, F.C., Garcia, C., Camisasca, D.R., Domont, G., Feitosa, A.C., Pereira, D.A., Zingali, R.B. & Alves, G. (2010) Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *Journal of Proteomics* **73**, 1334-1341.
- Grant, M. M., Creese, A. J., Barr, G., Ling, M. R., Scott, A. E., Matthews, J. B., Griffiths, H. R., Cooper, H. J. & Chapple, I. L. C. (2010) Proteomic Analysis of a Noninvasive Human Model of Acute Inflammation and Its Resolution: The Twenty-one Day Gingivitis Model. *Journal of Proteome Research* **9**, 4732-4744.
- Grant, M. M. (2012) What do 'omic technologies have to offer periodontal clinical practice in the future? *Journal of Periodontal Research* **47**, 2-14.
- Heitz-Mayfield, L.Z.A. (2005) Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **32** (suppl 6), 196-209.
- Hodinka, R.L., Nagashunmugam, T. & Malamud, D. (1998) Detection of Human Immunodeficiency Virus Antibodies in Oral Fluids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **5**, 419-426.
- Hu, S., Zhou, M., Jiang, J., Wang, J., Elashoff, D., Gorr, S., Michie, S.A., Spijkervet, F.K., Bootsma, H., Kallenberg, C.G., Vissink, A., Horvath, S. & Wong, D.T. (2009) Systems biology analysis of Sjogren's syndrome and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in parotid glands. *Arthritis Rheumatism* **60**, 81-92.
- Lamster, I. B. & Ahlo, J. K. (2007) Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1098**, 216-229.
- Loo, J. A., Yan, W., Ramachandran, P. & Wong, D. T. (2010) Comparative Human Salivary and Plasma Proteomes. *Journal of Dental Research* **89**, 1016-1023.
- Loos, B. G. & Tjoa, S. (2005) Host-derived diagnosis markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontology 2000* **39**, 53-72.
- Ngo, L. H., Veith, P. D., Chen, Y.-Y., Chen, D., Cardy, I. B. & Reynolds, E. C. (2010) Mass Spectrometric Analyses of Peptides and Proteins in Human Gingival Crevicular Fluid. *Journal of Proteome Research* **9**, 1683-1693.
- Salazar, M.G., Jehmlich, N., Murr, A., Dhople, V.M., Holtfreter, B., Hammer, E., Volker, U. & Kocher, T. (2013)

- Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 825-832.
- Schaefer, A.S., Bochenek, G., Manke, T., Nothnagel, M., Graetz, C., Thien, A., Jockel-Schneider, Y., Harks, I., Staufenbiel, I., Wijmenga, C., Eberhard, J., Guzeldemir-Akcakanat, E., Cine, N., Folwaczny, M., Noack, B., Meyle, J., Eickholz, P., Trombelli, L., Scapoli, C., Nohutcu, R., Bruckmann, C., Doerfer, C., Jepsen, S., Loos, B.G. & Schreiber, S. (2013) Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 563-572.
- Streckfus, C., Bigler, L., Dellinger, T., Dai, X., Kingman, A. & Thigpen, J.T. (2000) The Presence of Soluble c-erbB-2 in Saliva and Serum among Women with Breast Carcinoma: A Preliminary Study. *Clinical Cancer Research* **6**, 2363-2370.
- Teles, R. P., Gursky, L. C., Faveri, M., Rosa, E. A., Teles, F. R., Feres, M., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2010) Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 313-323.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L. & Hochstrasser, D.F. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology* **14**, 61-65.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F. & Williams, K.L. (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **13**, 19-50.
- Wong, D.T. (2006) Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *Journal of the American Dental Association* **137**, 313-321.
- Yaari, A., Tovbin, D., Zlotnick, M., Mostoslavsky, M., Shemer-Avni, Y., Hanuka, N., Burbea, Z., Katzir, Z., Storch, S. & Margalith, M. (2006) Detection of HCV salivary antibodies by a simple and rapid test. *Journal of Virology Methods* **133**, 1-5.
- Zhang, L., Xiao, H. & Wong, D.T. (2009) Salivary biomarkers for clinical applications. *Molecular Diagnosis and Therapy* **13**, 245-259.
- Zhang, L., Henson, B.S., Camargo, P.M. & Wong, D.T. (2009) The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease *Periodontology 2000* **51**, 25-37.
- Επικοινωνία:** Δήμητρα Σακελλάρη, Εργαστήριο Προληπτικής Οδοντιατρικής, Περιοδοντολογίας και Βιολογίας Εμφυτευμάτων, Οδοντιατρική Σχολή, Α.Π.Θ., e-mail:dimisak@med.auth.gr
- Correspondence:** Dimitra Sakellari, Department of Preventive Dentistry, Periodontology and Implant Biology, Dental School, Aristotle University of Thessaloniki, Greece, e-mail: dimisak@med.auth.gr