

# Povezanost izražaja hijaluronske kiseline i njenog receptora CD44 s prisustvom upalnog infiltrata u uzorcima gingive pacijenata oboljelih od uznapredovalog generaliziranog parodontitisa

---

Ćavar, Ivna

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:853736>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivna Čavar**

**POVEZANOST IZRAŽAJA HIJALURONSKE KISELINE I NJENOG  
RECEPTORA CD44 S PRISUSTVOM UPALNOG INFILTRATA U UZORCIMA  
GINGIVE PACIJENATA OBOLJELIH OD UZNAPREDOVALOG  
GENERALIZIRANOG PARODONTITISA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2019./2020.**

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

**Split, rujna 2020.**

## **SADRŽAJ**

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Svojstva i metabolizam hijaluronske kiseline .....	2
1.2. Uloga hijaluronske kiseline i receptora za hijaluronsku kiselinu CD44 u regulaciji upalnog odgovora .....	4
1.3. Uloga hijaluronske kiseline i receptora za hijaluronsku kiselinu CD44 u regulaciji upalnog odgovora u parodontitisu.....	5
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>8</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>10</b>
3.1. Ustroj i protokol istraživanja .....	11
3.2. Uzorci .....	11
3.3. Alcian Blue bojenje .....	11
3.4. Imunofluorescentno bojenje .....	12
3.5. Fotografiranje i obrada panoramskih slika preparata .....	13
3.6. Statistička analiza .....	14
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>15</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>23</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>28</b>
<b>7. POPIS CITIRANE LITERATURE</b> .....	<b>30</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>35</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>37</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>40</b>

*Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Darku Keri na iznimnoj predanosti prilikom izrade ovog diplomskog rada i znanju koje mi je strpljivo prenosio.*

*Također zahvaljujem Roku Duplančiću, dr. med. dent. na pomoći prilikom pisanja rada.*

*Hvala mojoj sestri i svim prijateljima koji su mi godinama bili podrška.*

*Na kraju, posebna zahvala mojim roditeljima bez kojih ništa ne bi bilo moguće.*

## **POPIS KORIŠTENIH KRATICA:**

**HA** – hijaluronska kiselina (engl. *hyaluronic acid*)

**GAG** – glikozaminoglikan

**ECM** – ekstracelularni matriks (engl. *extracellular matrix*)

**Hyal-1** – Hijaluronidaza-1

**Hyal-2** – Hijaluronidaza-2

**HAS1, HAS2, HAS3** – hijaluronan sintaze 1, 2 i 3

**PAI-1** – inhibitor aktivatora plazminogena 1 (engl. *plasminogen activator inhibitor 1*)

**PTEN** – engl. *phosphatase and tensin homolog*

**NO** – dušikov (II) oksid (engl. *nitric oxide*)

**MMP** – matriksne metalopeptidaze

**Hsp-72** – engl. *heat shock protein 2*

**HSF1** – engl. *heat shock factor 1*

**HMWHA** – hijaluronska kiselina visoke molekularne težine (engl. *high molecular weight hyaluronic acid*)

**LMWHA** – hijaluronska kiselina niske molekularne težine (engl. *low molecular weight hyaluronic acid*)

**IBD** – upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*)

**OE** – oralni epitel

**OSE** – oralni sulkusni epitel

**JE** – spojni epitel (engl. *junctional epithelium*)

**CT** – vezivno tkivo (engl. *connective tissue*)

**CEJ** – caklinsko-cementno spojište (engl. *cementoenamel junction*)

**E** – caklina (engl. *enamel*)

**CTP** – papile vezivnog tkiva (engl. *connective tissue papillae*)

**ER** – zupci pile (engl. *epithelial ridges*)

**PMN** – polimorfonuklearni neutrofil

**IHC** – imunohistokemijsko bojanje (engl. *immunohistochemistry*)

**IF** – imunofluorescencija

**CAL** – klinički gubitak pričvrstka (engl. *clinical attachment loss*)

**RBL** – radiološki gubitak kosti (engl. *radiographic bone loss*)

**PBS** – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

**ge** – gingivni epitel

**st** – subepitelna stroma

**ak** – alveolarna kost

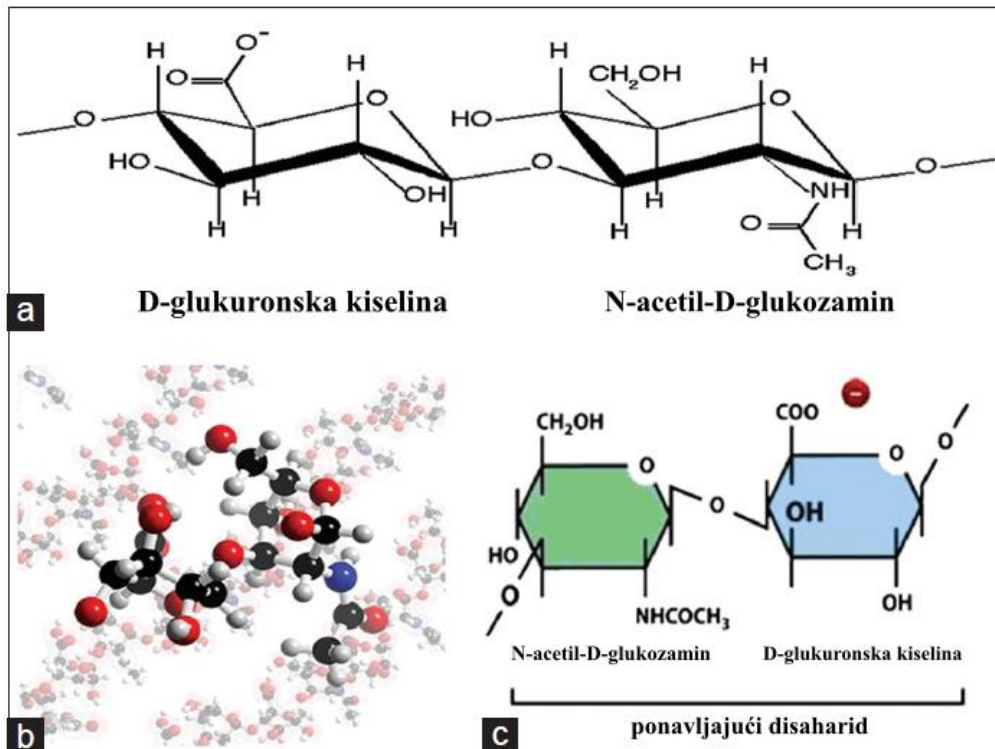
**inf** – upalni infiltrat

**TSG-6** – engl. *tumor necrosis factor-stimulated gene-6*

## **1. UVOD**

## 1.1. Svojstva i metabolizam hijaluronske kiseline

Hijaluronska kiselina (hijaluronan, HA) je glikozaminoglikan (GAG) izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix* – ECM) koji se sastoji od ponavljajućih disaharida sastavljenih od D-glukuronske kiseline i N-acetil-D-glukoamina (Slika 1.). Nativna molekula HA se prosječno sastoji od 25,000 disaharidnih jedinica koje tvore linearni polimer velike molekularne mase ( $\sim 1 \times 10^7$  Da) (1).



**Slika 1.** a) Kemijska struktura hijaluronske kiseline. b) 3D model hijaluronske kiseline c) Prikaz ponavljajuće disaharidne jedinice. Preuzeto i prilagođeno iz (2).

S obzirom na viskoelastična svojstva native molekule HA i sposobnosti da veže velike količine tkivne vode (hidrirana HA može zauzeti i do 1000 puta veći volumni udio od obujma samog linearnog polimera), HA su u početku pripisivane pasivne strukturne uloge popunjavanja prostora u ECM-u i održavanja fizičkog integriteta tkiva (3). Iako se sinteza HA odvija u različitim tipovima stanica i tkiva, najveći udio HA u ljudskom organizmu se nalazi u koži i sluznicama (4, 5, 6). U sintezi HA sudjeluju tri enzima (hijaluronan sintaze) – HAS1, HAS2 i HAS3 koji su odgovorni za sintezu lanaca HA različite duljine (6). HA je jedini GAG koji se sintetizira izvan Golgijevog tijela i to na unutarnjoj strani stanične membrane nakon čega se kao gotovi polimer egzocitozom premješta i uklapa u ECM (7). Razgradnja HA odvija se pod utjecajem nekoliko enzima hijaluronidaza (Hya1-4, PH-20) među kojima se Hyal-1 i Hyal-2



smatraju glavnim hijaluronidazama za katabolizam HA u tkivima (3). Slično obrascu opisanom za djelovanje HA sintaza, hijaluronidaze su odgovorne za razgradnju HA na fragmente različitih duljina, pri čemu Hyal-1 razgrađuje HA na male tetra- ili heksa-saharide, dok je Hyal-2 odgovorna za razgradnju HA na veće oligosaharide (~50 disaharidnih jedinica) (8).

<b>VELIČINA (SAHARIDI)</b>	<b>FUNKCIJA</b>
<b>HA velike molekularne mase &gt; 1000-5000</b>	Supresija angiogeneze Supresija imunog sustava Inhibicija fagocitoze Supresija sinteze HA
<b>HA fragmenti:</b>	
<b>~ 1000</b>	Indukcija upalnih citokina Stimulacija PAI-1 Stimulacija urokinaze
<b>10-40</b>	Indukcija cijepanja CD44 Poticanje migracije stanica tumora
<b>8-32</b>	Stimulacija angiogeneze Stimulacija neovaskularizacije tumora
<b>~ 15</b>	Supresija proliferacije stanica glatkih mišića
<b>12</b>	Diferencijacija endotelnih stanica Povećanje PTEN u tumorskim stanicama
<b>10</b>	Premještanje matriksne HA na površinu oocita Premještanje proteoglikana s površine stanica
<b>6</b>	Supresija formiranja HA kablova Indukcija NO i MMP u hondrocitima Indukcija HAS2 u hondrocitima
<b>4-6</b>	Indukcija sinteze citokina u dendritičkim stanicama
<b>4</b>	Transkripcija MMP-aza Povećanje ekspresije Hsp 72 Supresija apoptoze Indukcija kemotaksije Povećanje HSF1 Povećanje ekspresije Fas receptora Supresija sulfacije proteoglikana

**Tablica 1.** Uloge različitih fragmenata HA u fiziološkim procesima u tkivu (djelomični popis). Preuzeto i prilagođeno iz (10).

Potrebno je napomenuti da je u fiziološkim uvjetima brzina katabolizma HA tkivno specifična i može se odvijati u rasponu od nekoliko minuta (krv, tkivne tekućine), sati (koža, sluznice) do

nekoliko dana (hrskavica), ali za sada nije poznato na koji način se to regulira (9). Međutim, iz ovoga proizlazi da se u svakom trenutku HA u tkivima nalazi u omjeru dva osnovna oblika – kao nativna molekula velike molekularne mase (engl. *high molecular weight HA* – HMWHA), te kao različiti fragmenti manje molekularne mase (engl. *low molecular weight HA* – LMWHA) (5, 10). Stupanj fragmentiranosti je bitna odrednica fiziološke funkcije HA pri čemu HMWHA i LMWHA mogu imati suprotstavljene uloge u održavanju homeostaze tkiva, te procesima poput cijeljenja rana i reguliranja upalnog odgovora u tkivu. Tako se HMWHA pripisuje antiangiogeno, imunosupresivno i protuupalno djelovanje, dok LMWHA djeluje angiogeno, imunostimulatorno i općenito promovira upalni odgovor u tkivima (Tablica 1.).

## **1.2. Uloga hijaluronske kiseline i receptora za hijaluronsku kiselinu CD44 u regulaciji upalnog odgovora**

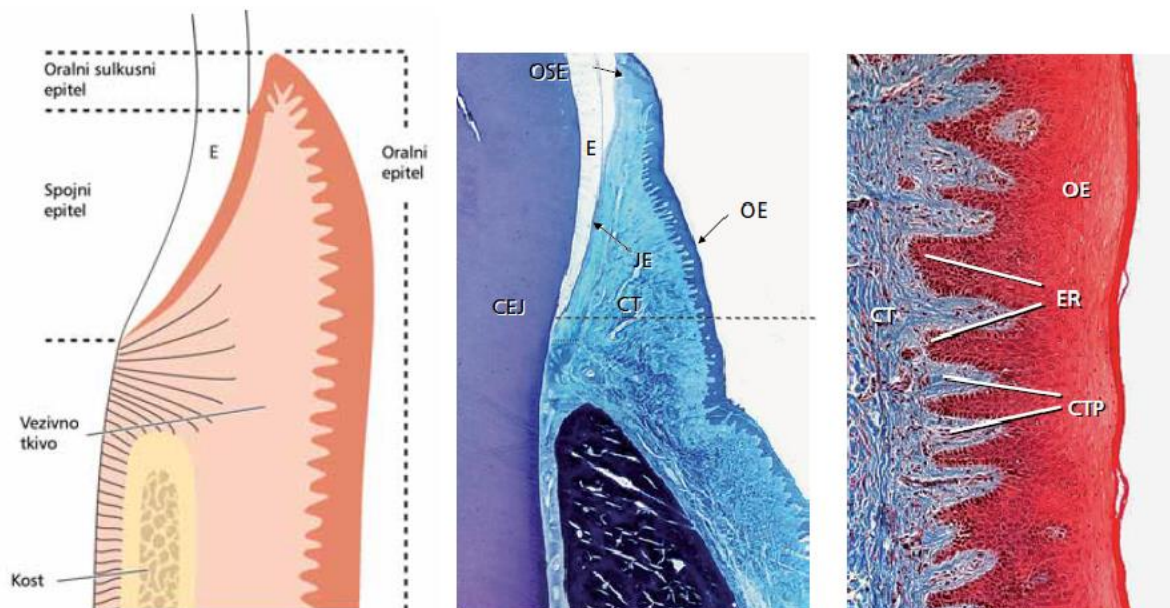
Da HA i promjene u metabolizmu HA mogu imati regulatornu ulogu u cijeljenju rana i odvijanju upalnog odgovora potvrđuju nalazi pojačanog nakupljanja HA u tkivima nakon ozljeda (mehaničkih, termičkih, kemijskih) kao i tijekom različitih upalnih (akutnih i kroničnih) bolesti. Pojačano nakupljanje HA je opisano u ovojnica zglobnih površina tijekom reumatoidnog artritisa, u bolestima krvožilnog sustava, bubrežnom tkivu oboljelih od dijabetičke nefropatije, različitim oblicima upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease* – IBD), te eksperimentalnim životinjskim modelima osteoartritisa i kolitisa (4, 5, 11-13). Prema dosadašnjim spoznajama HA izravno sudjeluje u mehanizmima prirodene i stečene imunosti počevši od aktivacije različitih subpopulacija leukocita, njihove migracije i formiranja gradijenata medijatora upale i infiltrata upalnih stanica u tkivu, do rezolucije upalnog odgovora (3). Iako regulatorna uloga HA u upalnom odgovoru uvelike ovisi o odnosu HMWHA i LMWHA (a u uvjetima upale općenito dolazi do pojačane fragmentacije HMWHA), jednako tako je važna i raspoloživost različitih staničnih receptora za HA u tkivima putem kojih HMWHA i LMWHA utječu na ponašanje stanica kao odgovor na zbivanja u neposrednom mikrookolišu. Do sada je opisano nekoliko staničnih receptora za HA od kojih su neki sekvestracijski, tj. eliminacijski budući da sudjeluju u katabolizmu HA (poput HARE i LYVE-1 receptora), neki su važni za migraciju stanica posredovanu HA (RHAMM) ili su ubikvitarni poput CD44 jer imaju afinitet za vezivanje i HMWHA i LMWHA, kojeg osim upalnih (neutrofili, makrofazi, limfociti) izražavaju i drugi tipovi stanica (epitelne stanice, stanice vezivnog tkiva). CD44 se općenito smatra glavnim staničnim receptorom za HA, a brojnim istraživanjima je potvrđeno da interakcija CD44 i HA ima veliku važnost u svim aspektima metabolizma HA (što znači da može preuzeti funkcije specijaliziranih receptora za HA) kao i

u staničnim procesima u tkivu vezanima za upalni odgovor (poput adhezije i migracije leukocita te aktivacije makrofaga i T-limfocita) (14-16). CD44 je transmembranski glikoprotein koji se strukturno sastoji od tri domene – kratkog citoplazmatskog repa, transmembranske domene i varijabilne ektodomene na kojoj se nalazi vezno mjesto za HA. Od ukupno 12 izoformi CD44, u tkivima je najzastupljenija tzv. standardna ili hematopoetska izoforma (CD44s ili CD44H). Poznato je da različite izoforme CD44 nemaju jednaki afinitet za vezivanje HA, a budući da je uloga CD44 u tkivnim procesima povezana sa sposobnošću vezivanja HA ni fiziološka funkcija pojedinih izoformi CD44 nije istovjetna (17). Važnost interakcije između CD44 i HA za regulaciju upalnog odgovora je najbolje pokazana na eksperimentalnim životinjskim modelima osteoartritisa i IBD-a (18-20). Ovisno o načinu izazivanja upale te mehanizmu blokiranja funkcije CD44 kao receptora za HA (korištenjem protutijela na CD44 ili knockout-om gena koji kodira CD44) opisani su protuupalni učinci, ali i egzacerbacije upalnog odgovora iako je u upalnim lezijama potvrđeno pojačano nakupljanje HA. Sukladno tome, CD44 se kao glavni receptor za HA može smatrati modulatorom upalnog odgovora.

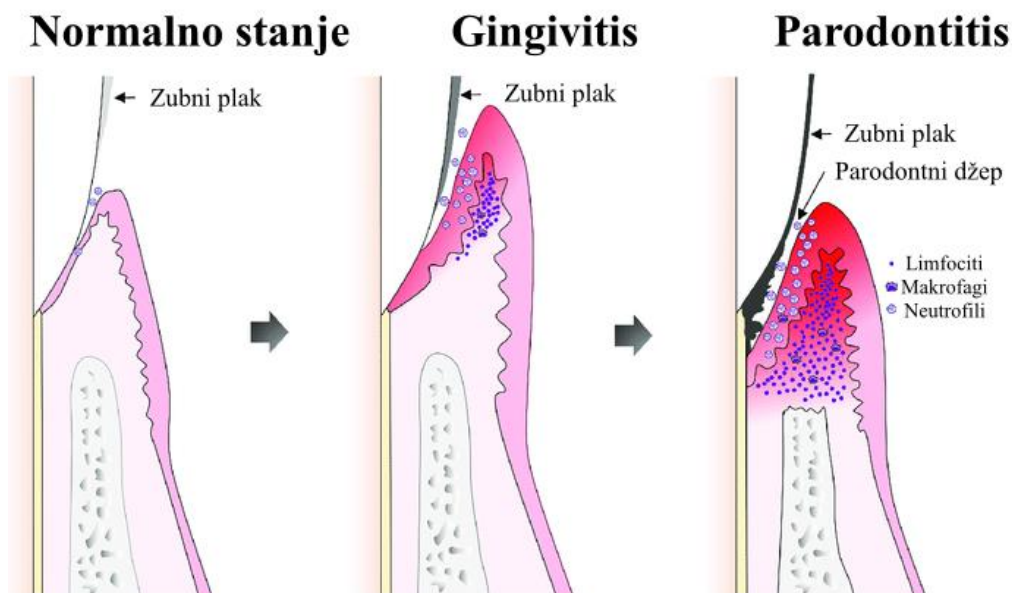
### **1.3. Uloga hijaluronske kiseline i receptora za hijaluronsku kiselinu CD44 u regulaciji upalnog odgovora u parodontitisu**

Parodontitis je kronična multifaktorijalna upalna bolest (21) visoke prevalencije od koje na globalnoj razini boluje 10-15% svjetske populacije (22). Iako je osnovni preduvjet za razvoj bolesti parodonta obrambena reakcija domaćina na prisutnost mikrobnog biofilma na površini zuba, ireverzibilna destrukcija potpornih mekih i tvrdih tkiva zuba (Slika 2.) nastaje zbog poremećene regulacije upalnog odgovora (Slika 3.).

Prema tome, parodontna bolest se od gingivitisa (kao reverzibilnog stanja u kojem je upala strogo ograničena) može tijekom vremena razviti u generalizirani parodontitis koji za posljedicu ima gubitak zubi. Općenito, razvoj parodontne bolesti teče kroz četiri stadija i to inicijalnu, ranu, uspostavljenu i uznapredovalu leziju. Za navedene stadije je, uz histološki nalaz različito opsežnih patoloških promjena u potpornom tkivu zuba (parodontu), karakteristično i prisustvo pojedinih subpopulacija upalnih stanica pri čemu, primjerice, u inicijalnoj leziji dominiraju polimorfonuklearni neutrofilni (PMN), dok se u uspostavljenoj i uznapredovalo leziji (kada je vidljiva destrukcija alveolarne kosti i struktura mekog tkiva gingive znatno izmijenjena) upalni infiltrat većim dijelom sastoji od plazma stanica i T-limfocita (23).



**Slika 2.** Epitel koji sačinjava slobodnu gingivu dijeli se na oralni epitel (OE) koji je u kontaktu s usnom šupljinom, oralni sulkusni epitel (OSE) koji je okrenut prema zubu, ali nije u neposrednom dodiru s njim te spojni epitel (JE) koji osigurava tijesnu vezu gingive i zuba. Na slici su označeni i vezivno tkivo (CT), caklinsko cementno spojište (CEJ), caklina zuba (E), papile vezivnog tkiva (CTP) i zupci pile (ER). Preuzeto i prilagođeno iz (23).



**Slika 3.** Kao odgovor na nakupljanje zubnog plaka, domaćinov imunološki sustav mobilizira neutrofile na mjesto rane ili već uspostavljene gingivalne lezije. Napredovanjem ovog procesa, na mjesto progredirajuće lezije dolaze i makrofagi i limfociti T. Dolazi do destrukcije parodontnih tkiva i formiranja parodontnog džepa, to jest razvoja parodontne lezije. Preuzeto i prilagođeno iz (24).

Regulatorna uloga HA i čimbenika funkcionalno povezanih sa HA u patogenezi parodontitisa je slabo istražena. Većina istraživanja odnosi se na ispitivanje učinkovitosti pripravaka HA kao pomoćnog sredstva u različitim oblicima terapije parodontnih bolesti (inicijalna i kirurška terapija) i konceptualno se ne razlikuje od ispitivanja uloge HA u cijeljenju rane iz čega proizlazi polovično shvaćanje da je HA negativni regulator upalnog odgovora u parodontitisu (25). Prema pregledanoj literaturi, pronađena su samo dva istraživanja iz 90-ih godina prošlog stoljeća u kojima je analiziran izražaj HA i njenog glavnog receptora CD44 metodom imunohistokemijskog (IHC) bojenja uzoraka gingive (26, 27). Izražaj je analiziran kvalitativno s obzirom da u to doba nisu postojale napredne tehnike digitalne mikroskopske fotografije i kvantifikacije IHC bojenja zbog čega i dalje postoji potreba za detaljnijim opisom obrazaca izražaja HA i CD44 u zdravom i bolesnom tkivu parodonta te prostornoj povezanosti ova dva čimbenika s prisustvom infiltrata upalnih stanica. U ovom istraživanju, izražaj HA i CD44 u uzorcima ljudske gingive ispitan je metodom imunofluorescencije (IF) te analiziran metodama računalne kvantifikacije IF signala. Rezultati su stavljeni u kontekst dosadašnjih saznanja o općenitoj ulozi HA i CD44 u regulaciji upalnog odgovora kao i potencijalnoj ulozi ovih čimbenika u patogenezi parodontitisa.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost izražaja hijaluronske kiseline i njenog receptora CD44 s upalnim infiltratom u uzorcima gingive pacijenata koji boluju od generaliziranog uznapredovalog parodontitisa.

Hipoteze ovog istraživanja su sljedeće:

1. Ukupni izražaj HA povećan je u gingivi ispitanika sa uznapredovalim generaliziranim parodontitisom u odnosu na gingivu ispitanika sa zdravim parodontom.
2. Ukupni izražaj CD44 povećan je u gingivi ispitanika sa uznapredovalim generaliziranim parodontitisa u odnosu na gingivu ispitanika sa zdravim parodontom.
3. Prostorne promjene u ukupnom izražaju HA i CD44 (prostorni gradijent) pozitivno koreliraju s pojačanim prisustvom upalnog infiltrata u gingivi ispitanika sa uznapredovalim generaliziranim parodontitisom.
4. HA i CD44 sudjeluju u regulaciji upalnog odgovora u uznapredovalom generaliziranom parodontitisu.

### **3. MATERIЈALI I METODE**



### **3.1. Ustroj i protokol istraživanja**

Istraživanje je provedeno u razdoblju od listopada 2019. do ožujka 2020. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu te na Mediteranskom institutu za istraživanje života.

Za istraživanje korišteni su uzorci gingive iz arhivske zbirke Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Kontrolnu skupinu činili su uzorci gingive ispitanika sa zdravim parodontom, a ispitnu skupinu činili su uzorci gingive ispitanika kojima je dijagnosticiran uznapredovali generalizirani parodontitis stadija III i IV. Dijagnoza parodontitisa je postavljena prema novoj klasifikaciji parodontnih bolesti i stanja iz 2017. godine (28). Težina zahvaćenosti parodontnih tkiva mjerena je kliničkim parametrima kao što su klinički gubitak pričvrstka (CAL), radiološki gubitak kosti (RBL), način gubitka kosti, gubitak zuba koji se prvenstveno pripisuje parodontitisu, dubina sondiranja, mobilnost zuba, zahvaćenost račvišta korjenova, mastikatorna disfunkcija i defekt grebena (29).

### **3.2. Uzorci**

Detaljni postupak uzorkovanja i primarne obrade uzoraka gingive opisan je prethodno (29). Uzorci gingive korišteni za ovo istraživanje obuhvaćali su područje tzv. slobodne gingive koje seže od gingivnog ruba (prema koronarno) do sučelja s rubom alveolarne kosti (prema apikalno). Uzorci su bili pohranjeni i fiksirani tijekom 24-48 h u 4% paraformaldehidu te na strani oralnog epitela slobodne gingive (vestibularnoj strani) obojani tkivnom bojom radi pravilne orijentacije prilikom uklapanja u parafinske blokove. Uzorci su potom serijski rezani mikrotomom na rezove debljine 5  $\mu\text{m}$  i postavljeni na predmetna stakalca. Rezovi su pregledani pod svjetlosnim mikroskopom kako bi se potvrdila pravilna orijentacija uzorka – na svakom rezu trebali su biti vidljivi oralni i sulkusni epitel slobodne gingive te subepitelna stroma koja se nalazi između dvaju epitela. Uz postojeće orijentacijske preparate bojane hemalaun/eozinom iz arhivske zbirke dodatno su izdvojeni i novi preparati (svako deseto stakalce) za Alcian Blue bojenje kojim se prikazuju ukupni mucini (uključujući i sve klase GAG-ova). Za svaku skupinu odabrano je 20 uzoraka, što čini ukupno 40 uzoraka slobodne gingive obrađenih za potrebe istraživanja.

### **3.3. Alcian Blue bojenje**

Za prikaz sadržaja mukosupstanci u uzorcima gingive korišten je „*Alcian Blue Stain Kit*“ (pH 1,0) (ab150661, Abcam, UK), a postupak bojenja je proveden prema preporukama proizvođača.

Ukratko, rezovi su deparafinirani i hidrirani, a potom kratko inkubirani u octenoj kiselini (3 min). Nakon toga, rezovi su inkubirani u Alcian Blue boji tijekom pola sata i isprani vodom te inkubirani u Nuclear Fast Red boji (5 min) za stanične jezgre i pozadinu. Rezovi su još jednom isprani vodom, osušeni i preklopljeni. Ovim bojenjem u tkivima se zasićene mukosupstance prikazuju plavom bojom, stanične jezgre crvenom bojom, a pozadina svijetlo ružičastom bojom.

### **3.4. Imunofluorescentno bojenje**

Imunofluorescentno (IF) bojenje napravljeno je prema standardiziranom protokolu laboratorija na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju (30, 31). Postupak bojenja započeo je deparafiniranjem preparata ksilenom te etanolom u silaznim koncentracijama od 100%, 95% i 70% nakon čega su rehidrirani u destiliranoj vodi. Preparati su zatim kratko isprani u fosfatnom puferu (PBS) i stavljani u natrijev citratni pufer. Slijedilo je zagrijavanje u parnoj kupelji na 95°C tijekom 25 minuta nakon čega su preparati ostavljeni kako bi se ohladili na sobnu temperaturu. Ponovljeno je ispiranje PBS-om i provedeno blokiranje pozadine inkubiranjem preparata na 25 minuta protein blokom (ab64226, Abcam, UK) prije postavljanja primarnih protutijela.

Koristila su se ova primarna protutijela: ovčje poliklonsko protutijelo na HA (Anti-Hyaluronan) (1:200; ab150181, Abcam, UK), zečje poliklonsko protutijelo na CD44 (Anti-CD44) (1:500; ab150077, Abcam, UK) i mišje monoklonsko protutijelo na opći upalni biljeg CD45 (Anti-CD45) [MEM-28] (1:200; ab8216, Abcam, UK). Inkubacija preparata primarnim protutijelima u vlažnoj komori trajala je 24 sata na 4 °C. Sekundarna protutijela su: kozji Alexa Fluor 488 (ZELENO; ab150077, Abcam, UK) i magareći Alexa Fluor 488 (ZELENO; ab150105, Abcam, UK). Inkubacija preparata sekundarnim protutijelima u vlažnoj komori je trajala 1 sat. Za bojenje staničnih jezgri, preparati su na 2 minute inkubirani 4'6'-diamidno-2-fenilindolom (DAPI). Preparati su potom isprani destiliranom vodom i preklopljeni pokrovnim stakalcima. Za provjeru očuvanosti rezova i signala na primarna protutijela preparati su pregledani pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus BX61) (Olympus, Tokyo, Japan). Za provjeru obrasca izražaja primarnih protutijela (citoplazmatski, jezgreni) napravljeno je nekoliko ciljanih snimki za epitelne i stromalne tkivne odjeljke. Snimke su analizirane „color-scatter“ plotovima prema prethodno opisanom postupku (32, 33).

### 3.5. Fotografiranje i obrada panoramskih slika preparata

Preparati su pregledani i fotografirani tehnikom panoramskog snimanja pri povećanju  $\times 10$  (IF), odnosno  $\times 20$  (Alcian Blue) pod invertnim epifluorescencijskim mikroskopom (Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Njemačka) i fiksnim manualnim postavkama digitalne kamere (Zeiss AxioCam 506) za okvir (full-frame:  $2752 \times 2208$  piksela (px)) i osjetljivost senzora (ISO: 100). Za fotografiranje (IF) postavljena je ekspozicija od 500 ms (anti-HA i anti-CD44), 35 ms (DAPI), a za bojenje Alcian Blue (svjetlosna mikroskopija) postavljena je ekspozicija od 8 ms. Spajanje pojedinačnih mikro-fotografija u panoramske slike provedeno je korištenjem ZEN 2.5 programa (Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Njemačka).

Završna obrada panoramskih slika uključujući rotiranje i formatiranje dimenzija provedena je u programu Adobe Photoshop® CC (2019) na podlozi s visokom razlučivosti (600 dpi) kako je prethodno opisano (29) da bi se sačuvala razlučivost podataka unatoč smanjenju ukupnih dimenzija slike.

Za mjerenje histometrijskih parametara poput ukupne površine reza te površine epitelnog i stromalnog odjeljka na panoramskim slikama korišten je alat *Wizard Tool* (Adobe Photoshop® CC (2019)). Digitalni grafički predložak s olovkom (graphic pen-tablet Wacom Intuos PRO; Wacom Co, Saitama, Japan) korišten je za maskiranje odjeljaka. Mjere navedenih histometrijskih parametara prvo su izražene u pikselima (px), a zatim preračunate u postotke (%) od ukupne površine reza, odnosno tkivnog odjeljka.

Histogrami za izračun i analizu izražajnih domena IF signala (relativna površina koju zauzima signal) u čitavom rezu te epitelnim i stromalnim tkivnim odjeljcima, kao i 2D plotovi za prikaz i analizu distribucije prostornih gradijenata IF signala u čitavom rezu napravljeni su u programu ImageJ (NIH, Public Domain) i pohranjeni u obliku tablica (Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA)). Pojedine panoramske IF slike su dodatno obrađene tako da se različiti intenziteti IF signala prikažu u četiri boje („heatmap“) prema zadanim rasponima (plava: 10-59 px; zelena: 60-149 px; crvena: 150-254 px; žuta: 255 px). Donji granični prag za mjerenje površine signala (cut-off) je postavljen na 10 px pri čemu se površina izražajne domene dobije zbrajanjem ukupnog broja piksela pridruženih pojedinačnim vrijednostima inteziteta na skali od 10-255 px. Ukupne površine izražajnih domena IF signala (HA, CD44) kao i površine izražajnih domena signala u odjeljcima su naknadno izražene u postotcima (%) kako bi se olakšala njihova usporedba između pojedinih skupina uzoraka (kontrolne/ispitna skupina). 2D plotovi kojima se distribucija prostornog gradijenta IF signala

prikazuje prosječnim vrijednostima intenziteta IF signala za svaki red piksela na panoramskoj slici (dimenzije reda:  $1\text{px} \times \text{širina slike}$ ) su napravljeni u smjeru skeniranja od marginalno prema apikalno (gore-dolje plot). Za IF signale općeg upalnog biljega CD45 korišteni su tablični histogrami i 2D plotovi iz postojeće baze podataka.

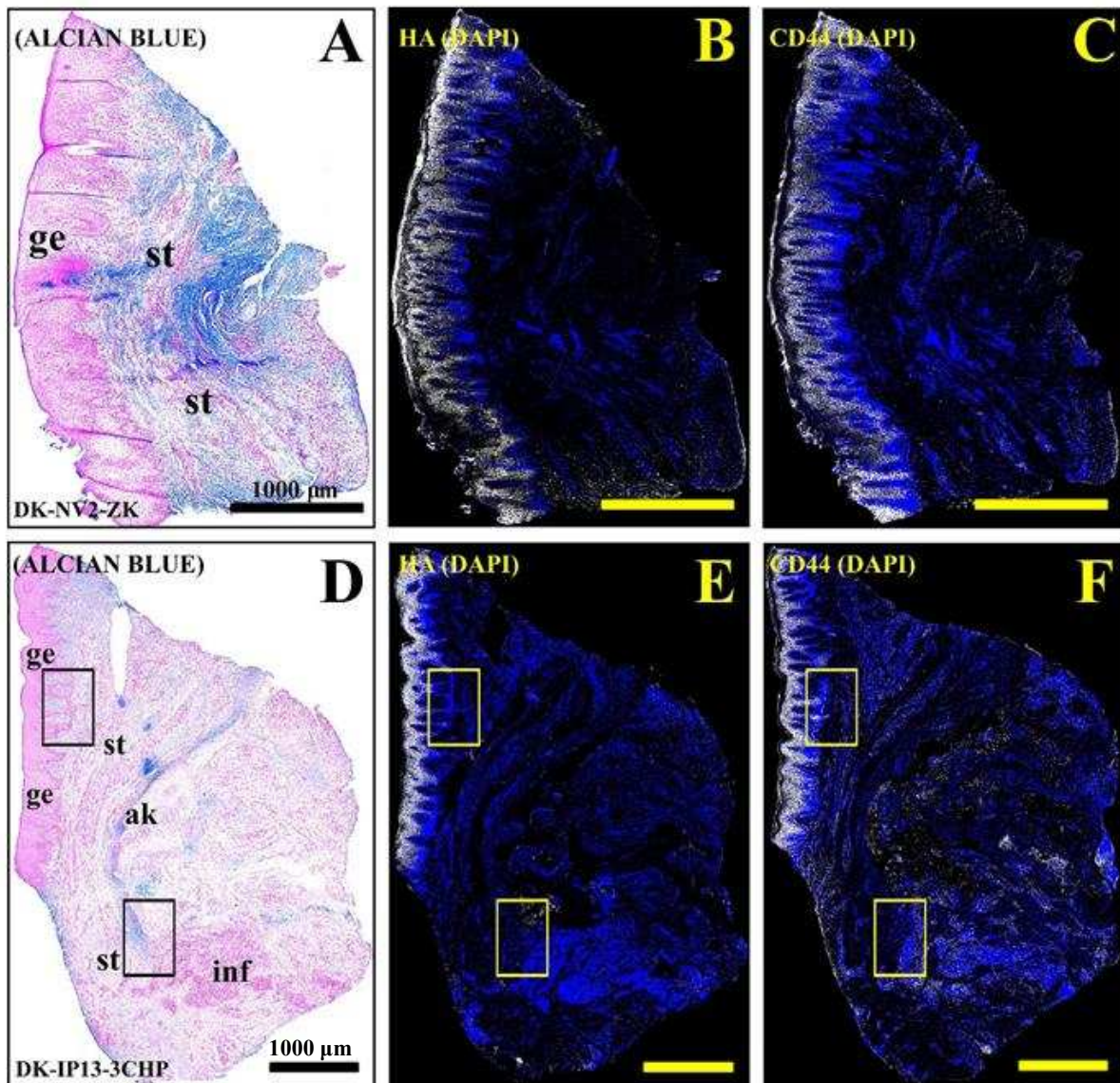
### 3.6. Statistička analiza

Test analize varijance (ANOVA) korišten je za analizu izražajnih domena ispitivanih čimbenika. Uz to, napravljena je i korelacija prostorne distribucije izražaja HA i CD44 (neovisne varijable) s distribucijom upalnog infiltrata (izražaj CD45; zavisna varijabla) testom multiple linearne regresije za ispitnu skupinu. Za usporedbu izražajnih domena HA i CD44 korišteni su grupni prosjeci prikazani frakcijski u tabličnim histogramima. Korelacija prostorne distribucije izražaja HA i CD44 (neovisne varijable) s distribucijom upalnog infiltrata (CD45 kao zavisna varijabla) napravljena je testom multiple linearne regresije. Regresijski model je dodatno iskorišten kako bi se predvidjela priroda uloge HA i CD44 na regulaciju prisustva upalnog infiltrata (protuupalna ili proupalna uloga). Za statističku analizu korišteni su programi Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) i GraphPad v8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Za analizu izražajnih domena statistička značajnost ( $\alpha$ ) postavljena je na 0,01 ( $p < 0,01$ ), a za analizu distribucije prostornih gradijenata IF signala statistička značajnost ( $\alpha$ ) je postavljena na  $10^{-8}$  ( $p < 10^{-8}$ ).

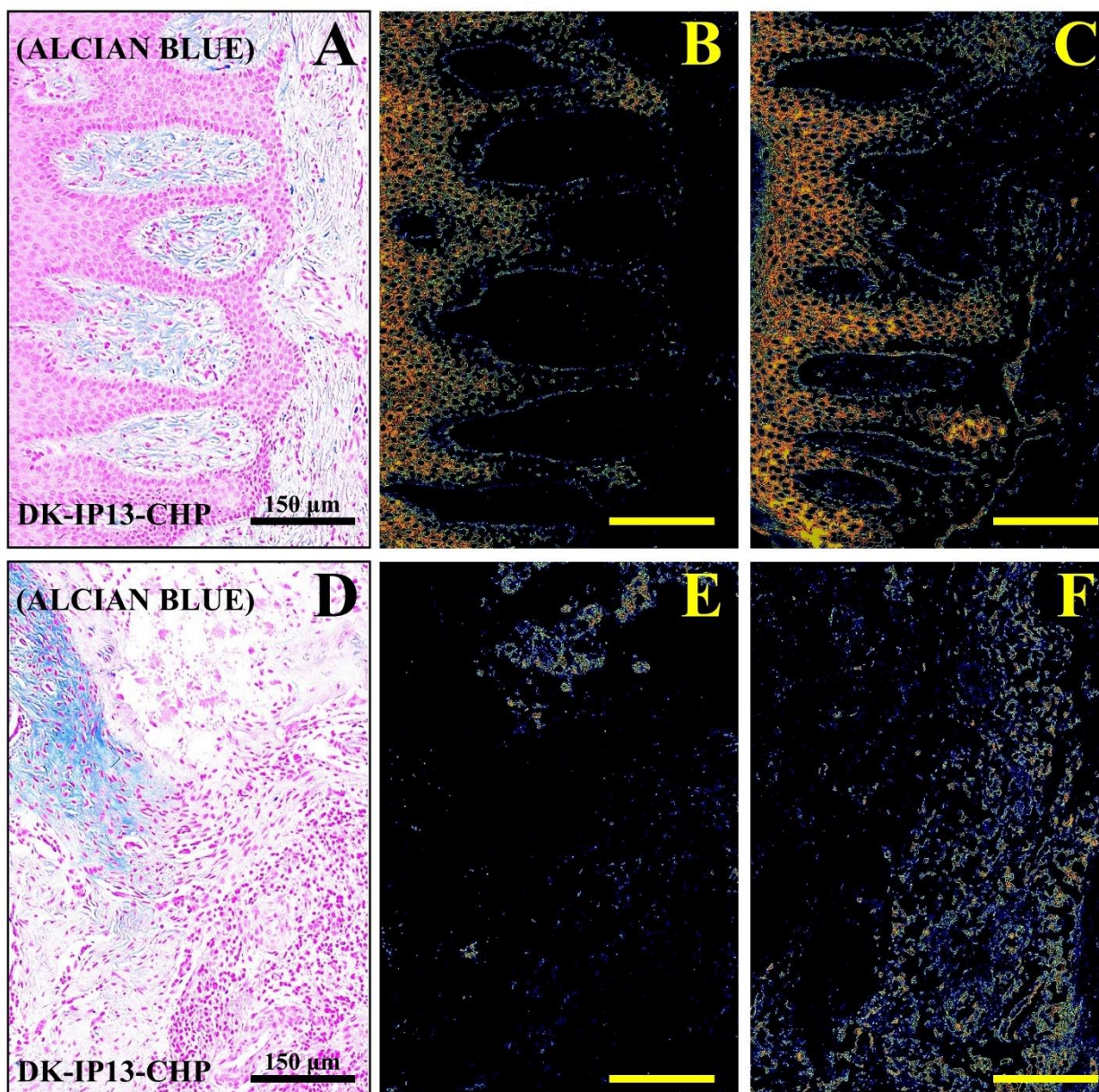
#### **4. REZULTATI**

U zdravoj gingivi izražaj HA i CD44 najviše se zamjećuje u spinoznom sloju gingivnog epitela. Izražaj HA i CD44 je također vidljiv i u subepitelnoj stromi iako je manje intenzivan u odnosu na gingivni epitel. U gingivi ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom, izražaj HA i CD44 ima sličan obrazac kao i u zdravoj gingivi s tim da su oba čimbenika pojačano izražena u subepitelnoj stromi (Slika 4; Slika 5) i ta razlika je statistički značajna (Tablica 2; Slika 6; Slika 7). Prema usporedbi udjela epitelnih i stromalnih IF signala u ukupnom izražaju unutar pojedine skupine uzoraka gingive, međusobni omjer HA i CD44 u tkivnim odjeljcima (epitel, stroma) je sličan u kontrolnoj i ispitnoj skupini i iznosi približno 1:1 (Slika 8). Uz epitelne stanice, HA i CD44 izražavaju i različite populacije stanica subepitelne strome uključujući fibroците, stanice endotela krvnih žila te upalne stanice (dominantno plazma-stanice i limfociti u uzrocima gingive ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom).

Prema analizi izražaja općeg biljega upalnih stanica CD45 iz prethodnog istraživanja, prisutnost stromalnog upalnog infiltrata je značajno povećana u uzorcima gingive ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom u odnosu na zdravu gingivu u kojoj je upalni infiltrat oskudan i usko ograničen na perivaskularno tkivo (29). S obzirom da HA i CD44 imaju regulatornu ulogu u stvaranju i održavanju upalnog infiltrata, ispitana je korelacija prostornih gradijenata ukupnog izražaja HA i CD44 s prostornim gradijentom ukupnog izražaja CD45 za uzorke gingive ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom (Slika 9). Nije pronađena korelacija prostornih gradijenata ukupnog izražaja ni HA ( $R = 0,0573$ ;  $R^2 = 0,0033$ ;  $p = 7,9081 \times 10^{-57}$ ) ni CD44 ( $R = 0,0573$ ;  $R^2 = 0,0004$ ;  $p = 6,5721 \times 10^{-8}$ ) s prisustvom upalnog infiltrata što se može objasniti činjenicom da su oba istraživana čimbenika ubikvitarno izražena u svim tkivima gingive pa prema tome imaju i prostorno puno raspršeniji izražaj u odnosu na izražaj općeg biljega upalnih stanica CD45. Dodatno, prema predviđanju početnim ( $R = 0,0591$ ;  $R^2 = 0,0591$ ;  $p = 0$ ) i prilagođenim regresijskim modelom ( $R = 1$ ;  $R^2 = 1$ ;  $p = 0$ ) u kojem su HA, CD44 i CD45 istovremeno uključeni i kao nezavisne i kao zavisne varijable, virtualni *knockout* HA bi uzrokovao smanjenje, a virtualni *knockout* CD44 povećanje prisustva upalnog infiltrata. Prema tim modelima HA ima proupalnu, a CD44 protuupalnu regulatornu ulogu u gingivi ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom. Također, ispitana je i korelacija prostornih gradijenata HA i CD44 prema kojoj je utvrđeno da se ovi čimbenici prostorno umjereno preklapaju ( $R^2 = 0,3034$ ;  $p = 0$ ) što upućuje na mogućnost da CD44 djelomično posreduje učinke i sudjeluje u metabolizmu HA u gingivi ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom.



**Slika 4.** Alcian blue i IF panoramske slike uzorka gingive iz kontrolne skupine (DK-NV2-ZK) (A-C) i uzorka gingive iz skupine s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom (DK-IP13-3CHP) (D-F). U zdravoj gingivi vidljiv je zdravi zadebljani gingivni epitel (**ge**) i subepitelna stroma (**st**) s oskudnim perivaskularnim upalnim infiltratom (A). U ispitnoj skupini bolesnika s parodontitisom vidimo stanjeni gingivni epitel. U dijelu subepitelne strome na sučelju s alveolarnom kosti (**ak**) vidljiv je i obilni upalni infiltrat (**inf**) koji razgrađuje alveolarnu kost (D). Izražaj HA i CD44 (B, C, E, F) statistički značajno se razlikuje samo u odjeljku subepitelne strome. Na slikama uzorka ispitne skupine kvadratima su označena područja gingivnog epitela i subepitelne strome koja su uvećana i pobliže opisana na višebojnim (engl. heatmap) IF panoramskim slikama na Slici 5. Povećanje (A-F):  $\times 10$ ; mjerilo (A-F):  $\times 1000 \mu\text{m}$ .

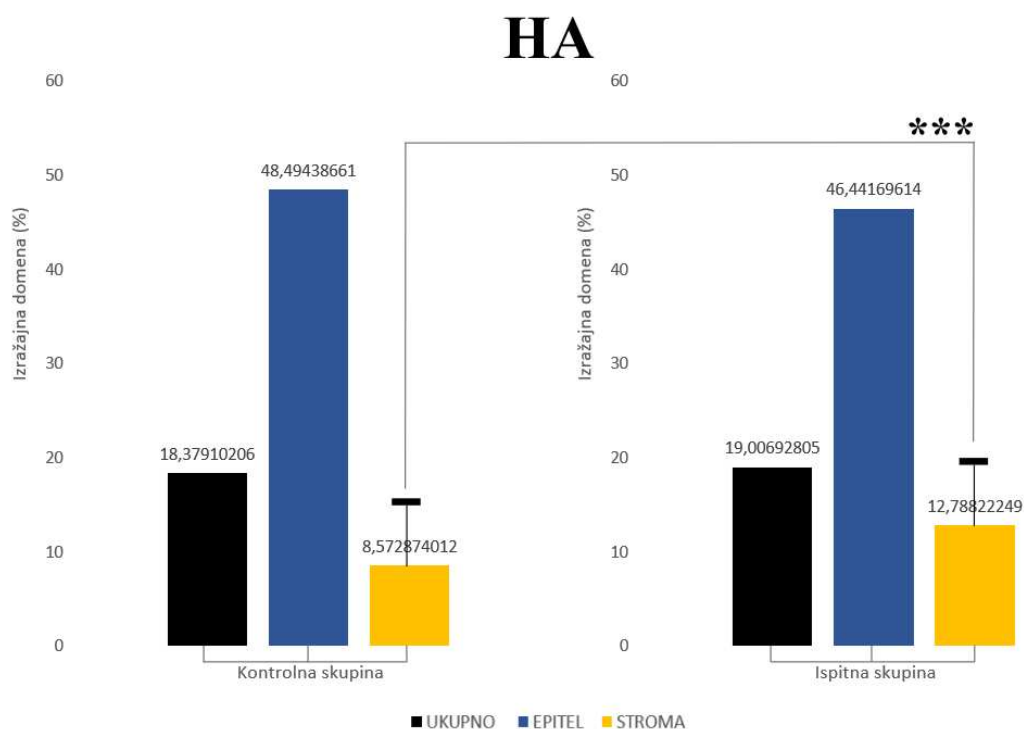


**Slika 5.** Alcian blue i višebojne (engl. heatmap) slike IF bojenja uzorka gingive DK-IP13-CHP. Prikazani su uvećani detalji gingivnog epitela (A-C) i subepitelne strome uzorka (D-F) područja unutar okvira sa Slike 4. U gingivnom epitelu izražaj HA i CD44 je intenzivan i prostorno se dobro preklapa. Na sučelju subepitelne strome, upalnog infiltrata i ruba alveolarne kosti, CD44 prikazuje intenzivniji izražaj u odnosu na HA i to poglavito u stanicama upalnog infiltrata (iako sve stanične populacije iz prikazanog područja izražavaju i HA i CD44). Povećanje (A-F):  $\times 10$ ; mjerilo (A-F): 150  $\mu\text{m}$ . Raspon intenziteta IF signala na višebojnim mapama: plavo (10-49 px); zeleno (50-149 px); crveno (150-254 px); žuto (255 px).



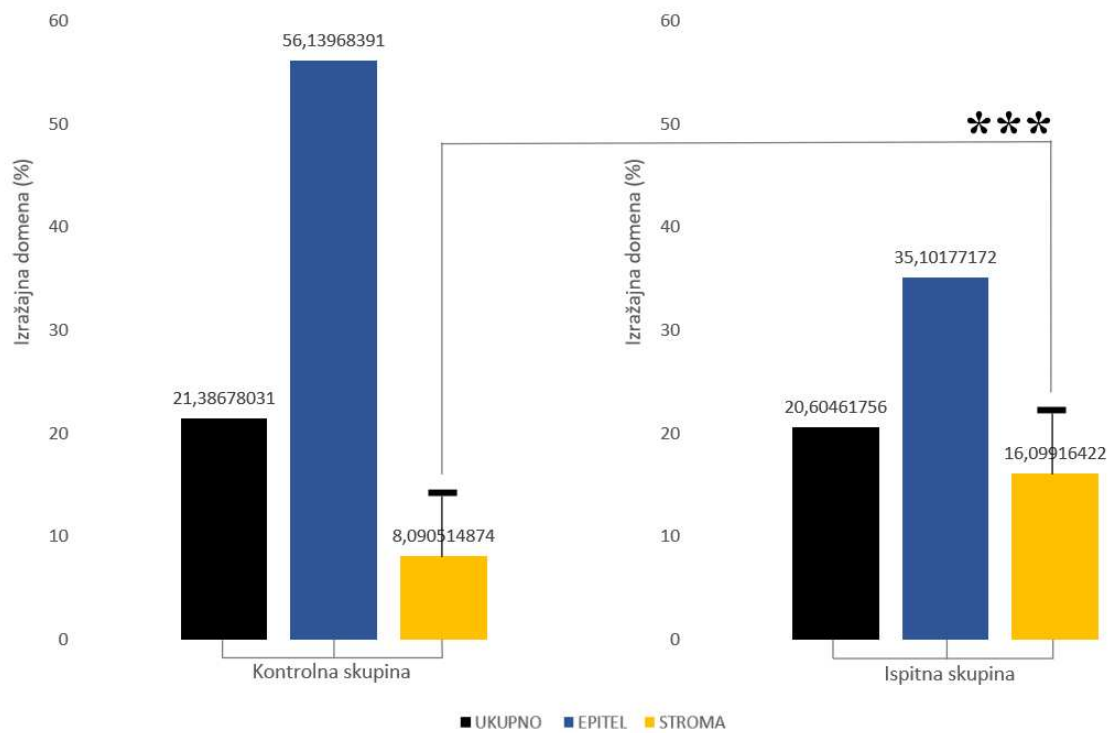
Čimbenik	Tkivni odjeljak	F	P
HA	UKUPNO	0,025405293	0,873426996
	EPITEL	0,019867673	0,887965209
	<b>STROMA***</b>	<b>6,890886078</b>	<b>0,00893431</b>
CD44	UKUPNO	0,049247026	0,824471181
	EPITEL	3,792789291	0,052044587
	<b>STROMA***</b>	<b>23,75143989</b>	<b>1,48279 × 10<sup>-6</sup></b>

**Tablica 2.** Statistička analiza ukupnih, epitelnih i stromalnih izražajnih domena HA i CD44 u uzorcima gingive kontrolne i ispitne skupine (One-way ANOVA test). Izražajne domene su se uspoređivale kao prosječne vrijednosti u postotcima od ukupne površine reza ili tkivnog odjeljka (epitel, stroma) za pojedinu skupinu uzoraka gingive (kontrolna i ispitna skupina) prikazanih frakcijski pomoću tabličnih histograma na skali od 10-255 px. Razina značajnosti ( $\alpha$ ) postavljena je na  $\alpha = 0,01$  (\*\*\*)  $p < 0,01$ ;  $F_{crit} = 6,686878$ ).

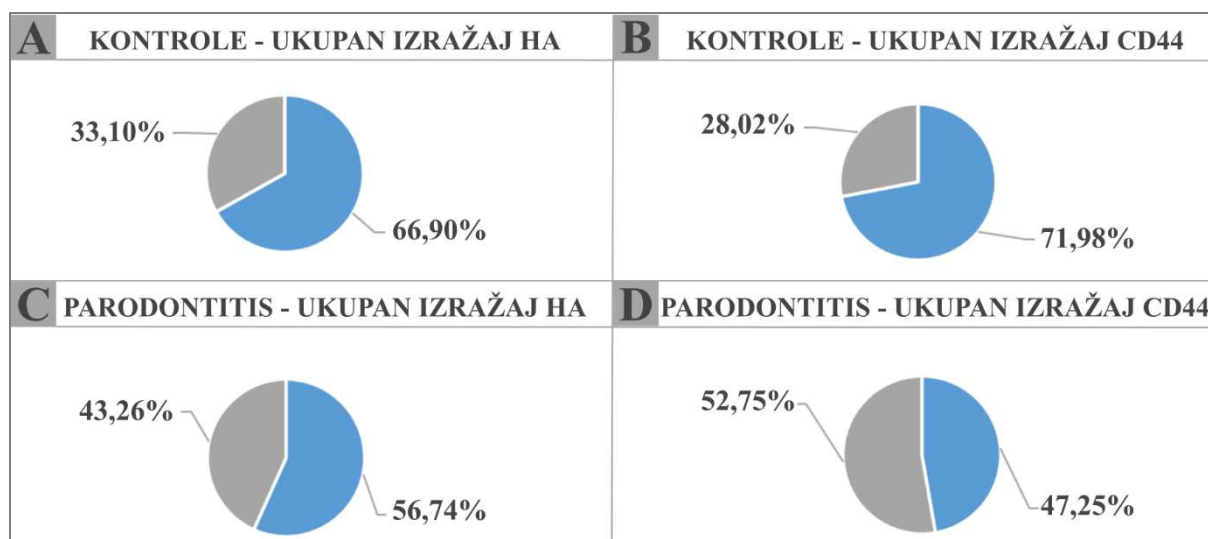


**Slika 6.** Usporedba prosječnih grupnih vrijednosti izražajnih domena HA izražene u postotcima od ukupne površine histoloških rezova (ukupna izražajna domena), odnosno površine tkivnih odjeljaka (epitelna i stromalna izražajna domena) u uzorcima gingive iz kontrolne i ispitne skupine. Statistički značajna razlika među skupinama pronađena je usporedbom prosječne stromalne izražajne domene HA (\*\*\*)  $p = 0,00893431$ ,  $\alpha = 0,01$ ).

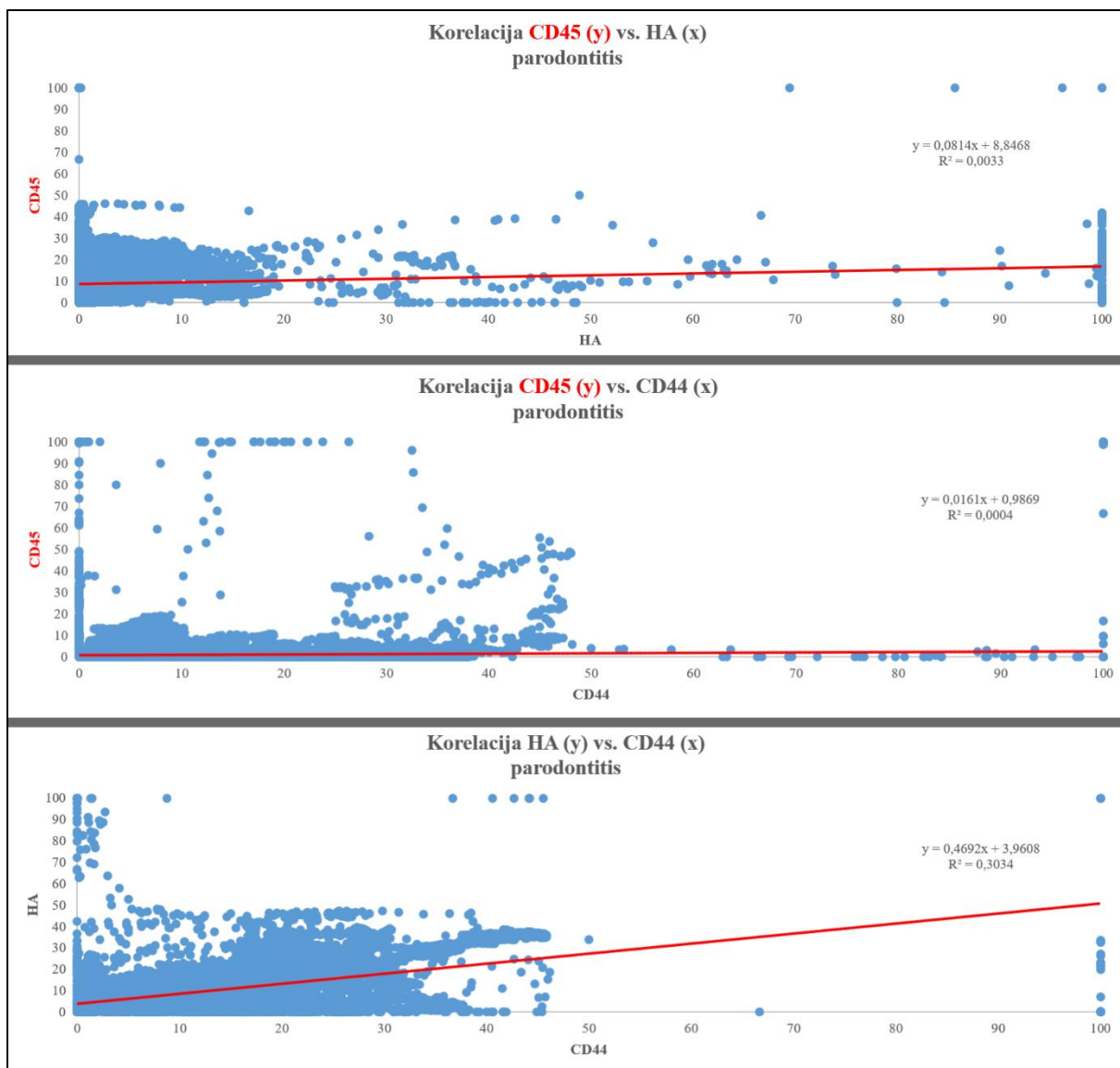
## CD44



**Slika 7.** Usporedba prosječnih grupnih vrijednosti izražajnih domena CD44 izražene u postocima od ukupne površine histoloških rezova (ukupna izražajna domena), odnosno površine tkivnih odjeljaka (epitelna i stromalna izražajna domena) CD44 u uzorcima gingive iz kontrolne i ispitne skupine. Statistički značajna razlika među skupinama pronađena je usporedbom prosječne stromalne izražajne domene CD44 (\*\*\*)  $p = 1,48279 \times 10^{-6}$ ,  $\alpha = 0,01$ ).



**Slika 8.** Raspodjela epitelnih (plavo) i stromalnih (sivo) signala u ukupnim izražajnim domenama HA i CD44 u uzorcima gingive kontrolne (A i B) i ispitne skupine (C i D) prikazana u obliku kružnih grafikona. Iako među uzorcima gingive kontrolne i ispitne skupine nema razlike u ukupnom izražaju HA i CD44, raspodjela epitelnih i stromalnih signala u ukupnom izražaju u uzorcima gingive ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom se razlikuje u odnosu na zdravu gingivu. Razlika u raspodjeli epitelnih i stromalnih signala posljedica je pojačanog stromalnog izražaja, ali i nešto slabijeg epitelnog izražaja oba čimbenika u gingivi ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom. Međutim, usporedbom unutar pojedinih skupina, odnos epitelnih i stromalnih signala HA i CD44 zadržava približno jednaki omjer (~1:1).



**Slika 9.** Korelacija prostornih gradijenata izražaja HA, CD44 i CD45 u uzorcima gingive ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom. Na x-osi su prikazane nezavisne varijable, a na y-osi zavisne varijable prema prostorno uparenim unosima iz 2D plotova (100 000 unosova). Razina značajnosti ( $\alpha$ ) je postavljena na  $\alpha = 10^{-8}$ . Nije pronađena korelacija između prostornih gradijenata HA i CD45 ( $R = 0,0573$ ;  $R^2 = 0,0033$ ;  $p = 7,9081 \times 10^{-57}$ ) te CD44 i CD45 ( $R = 0,0195$ ;  $R^2 = 0,0004$ ;  $p = 6,57 \times 10^{-8}$ ). Umjerena korelacija pronađena je za prostorne gradijente izražaja HA i CD44 ( $R = 0,5508$ ;  $R^2 = 0,3034$ ;  $p = 0$ ,  $\alpha = 0,00000001$ ).



U ovom presječnom istraživanju analiziran je ukupni izražaj HA i njenog glavnog receptora CD44 u uzorcima zdrave gingive i gingive ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom. Također, provedena je i korelacijska analiza prostorne distribucije izražaja HA i CD44 s prisustvom upalnog infiltrata prikazanog bojenjem na opći biljeg upalnih stanica CD45. Potencijalna priroda uloge HA i CD44 vezana za regulaciju upalnog infiltrata (protuupalna i proupalna uloga) ispitana je virtualnim *knockout*-om na temelju regresijskog modela.

Zbog svojih mehaničkih svojstava i sposobnosti da apsorbira velike količine tkivne vode, HA (kao komponenti izvanstaničnog matriksa) su se dugo vremena isključivo pripisivale uloge popunjavanja prostora među stanicama te održavanja rezilijencije, fizičkog integriteta i hidracije tkiva (36). Uz pasivne strukturne uloge, HA također sudjeluje u regulaciji fizioloških i patoloških procesa na što su prije svega upućivala opažanja pojačane akumulacije ovog glikana na mjestima ozljede tkiva, kao i brojna istraživanja kojima je utvrđeno da molekule HA različite veličine (od native HA (HMWHA) do fragmenata HA (LMWHA)) mogu na različite načine modulirati tijekom upalnog odgovora, kako tijekom cijeljenja tkiva tako i u upalnim bolestima (9). Regenerativna svojstva native HA potvrđena su lokalnom terapijskom primjenom pripravaka baziranih na HMWHA na mjestima ozljeda i različitim upalnim bolestima. Jednako tako, u kirurškom i nekirurškom liječenju parodontne bolesti, ovi pripravci se koriste u sklopu lokalne adjuvantne terapije, a korist njihove primjene potvrđuju i podatci o popravljanju određenih kliničkih parametara parodontne bolesti poput smanjenja dubine sondiranja parodontnih džepova, povećanja razine kliničkog pričvrstka te smanjenje indeksa krvarenja pri sondiranju (34). Međutim, zbog saznanja o učincima kliničke primjene pripravaka native HA u liječenju parodontne bolesti, raširena je polovična predodžba o HA kao o univerzalnom protuupalnom agensu, a zanemaruje se činjenica da upalni odgovor u sklopu cijeljenja parodontnog tkiva (kao ishoda nekirurške ili kirurške terapije) te kronični upalni odgovor u patogenetskoj podlozi parodontne bolesti nisu istovjetni procesi. Istraživanja o utjecaju HA na tijek upalnog odgovora u drugim kroničnim upalnim bolestima (od različitih oblika artritisa do kroničnih upalnih bolesti probavnog trakta) pokazuju da HA može istovremeno djelovati kao protuupalni i kao proupalni čimbenik (3). Razlozi koji se povezuju s proturječnim ulogama HA u modulaciji upalnog odgovora prije svega proizlaze iz činjenice da je HA u tkivima polidisperzna, tj. postoji u obliku HMWHA koja ima protuupalno djelovanje, ali i u obliku fragmenata različite veličine koji se povezuju s proupalnim djelovanjem. Jednako tako, na fiziološke uloge HA utjecaj ima i tkivna raspoloživost njezinih receptora, počevši od CD44 (kao glavnog receptora za HA) do RHAMM, LYVE-1 i HARE receptora koji vezivanjem

HA mogu posredovati različite učinke i čiji se izražaj u bolesnim tkivima mijenja u odnosu na zdrava tkiva (37). Dodatni čimbenik je i sastav HA s obzirom na pridružene proteine (hijaladherini) koji mogu lokalno modulirati afinitet HA za njezine receptore, a time i fiziološke učinke HA. Prema pregledanoj literaturi, ima vrlo malo podataka o izražaju HA u bolesti parodonta zbog čega postoji potreba detaljnijeg mapiranja i analize promjene obrazaca izražaja HA i povezanih čimbenika u zdravom i bolesnom tkivu parodonta (25, 26). Znanje o tome bi trebalo doprinijeti potpunijem razumijevanju patogeneze parodontitisa, što je ujedno i preduvjet razvoju potencijalno novih pristupa u liječenju bolesti parodonta.

Iako se prema podacima iz pregledane literature očekivalo da bi ukupni izražaj HA i CD44 trebao biti povećan u gingivi ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom u odnosu na gingivu zdrave ispitanike, rezultati usporedbe izražajnih domena su pokazali da je ukupni izražaj HA i CD44 jednak u zdravoj i bolesnoj gingivi. Sukladno tome, ukupna raspoloživost liganda (HA) prema dostupnosti glavnog receptora (CD44) je u zdravoj i bolesnoj gingivi slična. Međutim, analizom raspodjele signala po tkivnim odjeljcima (epitelne i stromalne izražajne domene) utvrđeno je da je izražaj HA i CD44 u epitelu bolesne gingive nešto smanjen, a istovremeno i statistički značajno pojačan u subepitelnoj stromi u odnosu na zdravu gingivu. Stoga se, kumulativno gledajući, promjene u stromalnom izražaju HA i CD44 u subepitelnoj stromi gingive ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom zbivaju istovremeno i s pojačanim prisustvom upalnog infiltrata kako je prethodno opisano (29). S druge strane, nije utvrđena nikakva korelacija ukupne prostorne raspodjele ni HA ni CD44 s prisustvom upalnog infiltrata u bolesnoj gingivi što se može objasniti time što su HA i CD44 ubikvitarno izraženi u oba tkivna odjeljka gingive – uz upalne stanice i ostale populacije stanica u gingivi (epitelne stanice, stanice endotela krvnih žila, fibrociti) izražavaju ove čimbenike. Također, rezultati korelacije prostorne distribucije izražaja HA, CD44 i CD45 upućuju na to da ponešto drugačijem obrascu raspodjele izražaja HA i CD44 u tkivnim odjeljcima bolesne gingive u usporedbi sa zdravom gingivom većim dijelom doprinose ostale populacije stanica, a ne toliko upalne stanice.

Rezultati korelacije prostorne distribucije izražaja HA i CD44 s prisustvom upalnog infiltrata se moraju sagledati i s obzirom na metodološka ograničenja istraživanja. Imunohistokemijskim bojenjem tkiva na HA ne može se utvrditi točan odnos HMWHA i LMWHA u tkivima budući da protutijelo korišteno u ovom istraživanju podjednako prepoznaje polidisperznu HA. Prema tome, nije bilo moguće utvrditi postoji li razlika u odnosu HMWHA prema LMWHA (pa prema tome i razlika u metabolizmu HA) u zdravoj gingivi u usporedbi s gingivom ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom. Imunohistokemijski,

ovaj aspekt bi se mogao ispitati neizravno bojenjem tkiva gingive protutijelima na Hyal-1 i Hyal-2, koji su glavni enzimi za katabolizam HA. Pojačani izražaj Hyal-1 i Hyal-2 bi mogao upućivati na pojačanu razgradnju HA i prisustvo različitih fragmenata LMWHA za koje je općenito poznato da imaju proupalno djelovanje. Dodatno, za rasvjetljavanje sastava HA, potrebno je napraviti i bojenje na neke hijaladherine poput TSG-6 (engl. tumor necrosis factor-stimulated gene-6). Naime, vezivanjem TSG-6 za HA može se modulirati afinitet HA za receptore na staničnoj površini, kao i općenito adhezivnost same HA što ima utjecaja na aktivaciju, migraciju i zadržavanje upalnih stanica u tkivu (3, 35). S obzirom da je u gingivi ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom povećana prisutnost upalnih stanica, može se očekivati i da se prisutnost kompleksa HA sa pojedinim hijaladherinima razlikuje u odnosu na zdravu gingivu.

Slično kao i HA, struktura njezinog glavnog receptora CD44 je heterogena te ovisi o vrsti stanica koje izražavaju CD44 te dinamici fizioloških procesa koji se odvijaju u tkivu. CD44 je izrazito podložan posttranslacijskim modifikacijama što podrazumijeva različite stupnjeve glikozilacije tog receptora – osim HA, na izvanstaničnu domenu CD44 se mogu vezati i drugi tipovi GAG-ova koji čak mogu modulirati afinitet vezivanja HA za CD44 (4). Dodatno, opisane su i različite izoforme CD44. Uz najzastupljeniju standardnu izoformu (CD44s) postoje i druge, tzv. varijabilne izoforme (CD44v1-10) koje nastaju alternativnim izrezivanjem (engl. *alternative splicing*) prilikom transkripcije gena za CD44 (4). Epitelne stanice i aktivirane upalne stanice mogu (uz CD44s) istovremeno izražavati i kombinacije nekoliko različitih varijabilnih izoformi pri čemu se neke od varijabilnih izoformi (poput CD44v7) povezuju s patogeneom kroničnih upalnih bolesti i malignom alteracijom tkiva (38). Za bojenje uzoraka gingive na CD44 u ovom istraživanju korišteno je primarno protutijelo koje se veže za epitop na citoplazmatskoj domeni ovog receptora i prema tome nespecifično boja sve izoforme CD44. Kako bi se preciznije opisali prostorni odnosi između izražaja ovog receptora i prisustva upalnog infiltrata u gingivi tijekom uznapredovalog generaliziranog parodontitisa, u narednim istraživanjima bi trebalo provesti dodatna bojenja dostupnim komercijalnim protutijelima za pojedine varijabilne izoforme CD44. Zbog svega navedenog, potrebno je oprezno tumačiti rezultate regresijske analize provedene u ovom istraživanju i predviđanja prirode uloge CD44 u regulaciji tijekom upale u uznapredovalom parodontitisu virtualnim *knockout*-om prema kojemu bi CD44 trebao imati protuupalnu ulogu. Uz dodatna bojenja protutijelima na čimbenike za biosintezu i metabolizam HA te protutijelima na izoforme CD44 i druge receptore za HA, postojeći model bi se mogao poboljšati, a predviđanja biti preciznija. Također, potrebno je uzeti u obzir da i dosadašnja istraživanja na modelima različitih



upalnih bolesti na eksperimentalnim životinjama pokazuju kako CD44 (slično kao i HA) može igrati dvojnu ulogu u regulaciji upale. Naime, ovisno o mehanizmu izazivanja nokse te o načinu blokiranja aktivnosti CD44 (protutijelima ili klasičnim *knockout*-om gena za CD44) mogu se postići i protuupalni i proupalni učinci (13). Zanimljivo je pritom da opisane učinke blokiranja CD44 na tijek upale ne prate uvijek i promjene u metabolizmu/katabolizmu HA u smislu ukupne količine HA u tkivima, iako se CD44 pripisuje i uloga eliminacijskog receptora za HA (37).

U zaključku, ovo istraživanje je pokazalo da nema razlike u ukupnom izražaju HA i CD44 u zdravoj gingivi i gingivi ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom. Nepostojanje razlika u izražaju HA i CD44 između zdrave i bolesne gingive može se objasniti određenim smanjenjem izražaja ovih čimbenika u epitelnom tkivnom odjeljku, te kompenzatornim povećanjem njihovog izražaja u subepitelnoj stromi u uzorcima bolesne gingive. Iako se ukupni prostorni gradijenti izražaja HA i CD44 ne mogu izravno povezati s prisustvom upalnog infiltrata u subepitelnoj stromi bolesne gingive, ispitanici čimbenici se ipak mogu okarakterizirati kao potencijalni regulatori tijeka upalnog odgovora u uznapredovalom generaliziranom parodontitisu. Ovaj zaključak se temelji na opažanju da i upalne stanice (slično kao i ostale populacije stanica gingive) izražavaju HA i CD44. Iako se predviđanjem prema regresijskom modelu HA pripisuje proupalna, a CD44 protuupalna uloga, potrebna su daljnja istraživanja kojima će se rasvijetliti utjecaj ovih čimbenika na tijek upale u uznapredovalom generaliziranom parodontitisu, a time i unaprijediti poznavanje patogenetskih mehanizama u podlozi bolesti parodonta. Kako bi predviđanja regresijskim modelom bila što preciznija, u budućnosti bi u isti trebalo ugraditi i podatke o prostornom izražaju svih čimbenika koji su uključeni u metabolizam i stanično signaliziranje preko HA (enzimi za biosintezu HA i postbiosintetske modifikacije HA, hijalderini i stanični receptori za HA). U kliničkoj praksi, preparati nativne HA se koriste kao pomoćna sredstva nakon kirurške i nekirurške terapije parodontitisa (25). Djelotvornost tih preparata se bazira na pozitivnim učincima povećanja tkivne količine HA zbog bržeg postoperativnog cijeljenja parodontnog tkiva. Iako se zbog ograničenja ovog istraživanja nije mogao utvrditi međusobni odnos HMWHA i LMWHA u gingivi tijekom uznapredovalog generaliziranog parodontitisa, dobiveni rezultati upućuju na to da pojačana akumulacija ukupne tkivne HA nije povezana s odvijanjem upale u uznapredovalom generaliziranom parodontitisu. To znači da bi budući farmakoterapijski pristupi moduliranja upalnog odgovora u bolesti parodonta bazirani na HA za potrebe kliničke prakse trebali uzeti u obzir i druge aspekte vezane za metabolizam i stanično signaliziranje HA.

## **6. ZAKLJUČAK**

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati moguću regulatornu ulogu HA i CD44 u upalnom procesu generaliziranog uznapreovalog parodontitisa preko izražaja ovih čimbenika u uzorcima zdrave gingive i gingive ispitanika s uznapreovalim generaliziranim parodontitisom. Prostorna distribucija izražaja HA i CD44 korelirana je s prisustvom upalnog infiltrata prikazanog bojenjem na opći biljeg upalnih stanica CD45.

Prema rezultatima istraživanja izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Nema značajne razlike u ukupnom izražaju HA i CD44 u gingivi ispitanika s uznapreovalim generaliziranim parodontitisom u odnosu na zdravu gingivu.
2. Postoji statistički značajno povećanje izražaja HA i CD44 u subepitelnoj stromi gingive ispitanika s uznapreovalim generaliziranim parodontitisom u odnosu na zdravu gingivu.
3. U gingivi ispitanika s uznapreovalim generaliziranim parodontitisom prostorni gradijenti izražaja HA i CD44 ne koreliraju s prisustvom upalnog infiltrata prikazanog bojenjem na opći biljeg upalnih stanica CD45.
4. U gingivi ispitanika s uznapreovalim generaliziranim parodontitisom prostorni gradijenti HA i CD44 međusobno umjereno koreliraju što upućuje na to da bi CD44 mogao samo djelomično posredovati učinke i sudjelovati u metabolizmu HA u bolesnoj gingivi.
5. Prema predviđanju na temelju regresijskog modela, HA i CD44 bi mogli imati suprotstavljene uloge u regulaciji upalnog odgovora u uznapreovalom generaliziranom parodontitisu pri čemu bi HA mogla djelovati kao proupalni, a CD44 kao protuupalni čimbenik.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Viola M, Vigetti D, Karousou E, D'Angelo ML, Caon I, Moretto P, et al. Biology and biotechnology of hyaluronan. *Glycoconjugate journal*. 2015;32(3-4):93-103.
2. Dahiya P, Kamal R. Hyaluronic acid: A boon in periodontal therapy. *North Am J Med Sci* 2013;5:309-15.
3. Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Frontiers in immunology*. 2014;5:101.
4. Kavasi RM, Berdiaki A, Spyridaki I, Corsini E, Tsatsakis A, Tzanakakis G, et al. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2017;101:128-38.
5. Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds : a compendium of clinical research and practice*. 2016;28(3):78-88.
6. Ruffel B. 2008. Regulation and function of hyaluronan binding by CD 44 in the immune system. A doctoral dissertation. The University of British Columbia. Vancouver.
7. Bartold PM, Page RC. The effect of chronic inflammation on gingival connective tissue proteoglycans and hyaluronic acid. *Journal of oral pathology*. 1986;15(7):367-74.
8. Schnaar RL. Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2016;99(6):825-38.
9. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-endocrinology*. 2012;4(3):253-8.
10. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *European journal of cell biology*. 2006;85(8):699-715.
11. Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan in inflammatory bowel disease: Cross-linking inflammation and coagulation. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2019;78-79:314-23.
12. Iturriaga V, Bornhardt T, Manterola C, Brebi P. Effect of hyaluronic acid on the regulation of inflammatory mediators in osteoarthritis of the temporomandibular joint: a systematic review. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2017;46(5):590-5.
13. Naor D, Nedvetzki S, Walmsley M, Yayon A, Turley EA, Golan I, et al. CD44 involvement in autoimmune inflammations: the lesson to be learned from CD44-targeting by antibody or from knockout mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1110:233-47.

14. Govindaraju P, Todd L, Shetye S, Monslow J, Pure E. CD44-dependent inflammation, fibrogenesis, and collagenolysis regulates extracellular matrix remodeling and tensile strength during cutaneous wound healing. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2019;75-76:314-30.
15. Nagy N, Kuipers HF, Marshall PL, Wang E, Kaber G, Bollyky PL. Hyaluronan in immune dysregulation and autoimmune diseases. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2019;78-79:292-313.
16. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(7):4589-92.
17. Biddle A, Gammon L, Fazil B, Mackenzie IC. CD44 staining of cancer stem-like cells is influenced by down-regulation of CD44 variant isoforms and up-regulation of the standard CD44 isoform in the population of cells that have undergone epithelial-to-mesenchymal transition. *PloS one*. 2013;8(2):e57314.
18. Hoffmann U, Heilmann K, Hayford C, Stallmach A, Wahnschaffe U, Zeitz M, et al. CD44v7 ligation downregulates the inflammatory immune response in Crohn's disease patients by apoptosis induction in mononuclear cells from the lamina propria. *Cell death and differentiation*. 2007;14(8):1542-51.
19. Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Frontiers in immunology*. 2015;6:201.
20. Farkas S, Hornung M, Sattler C, Anthuber M, Gunthert U, Herfarth H, et al. Short-term treatment with anti-CD44v7 antibody, but not CD44v4, restores the gut mucosa in established chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clinical and experimental immunology*. 2005;142(2):260-7.
21. Kononen E, Gursoy M, Gursoy UK. Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(8).
22. Gross AJ, Paskett KT, Cheever VJ, Lipsky MS. Periodontitis: a global disease and the primary care provider's role. *Postgraduate medical journal*. 2017;93(1103):560-5.
23. Lindhe J, Lang NP, Berglundh T, Giannobile WV, Sanz M, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Sixth edition. Chichester, West Sussex ; Ames, Iowa: Wiley Blackwell; 2015. 1 p.
24. Kriebel, Katja & Hieke, Cathleen & Müller-Hilke, Brigitte & Nakata, Masanobu & Kreikemeyer, Bernd. (2018). *Oral Biofilms from Symbiotic to Pathogenic Interactions and*

Associated Disease –Connection of Periodontitis and Rheumatic Arthritis by Peptidylarginine Deiminase. *Frontiers in Microbiology*. 9. 10.3389/fmicb.2018.00053.

25. Casale M, Moffa A, Vella P, Sabatino L, Capuano F, Salvinelli B, et al. Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2016;29(4):572-82.
26. Oksala O, Haapasalmi K, Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Expression of heparan sulphate and small dermatan/chondroitin sulphate proteoglycans in chronically inflamed human periodontium. *Journal of dental research*. 1997;76(6):1250-9.
27. Shibutani T, Imai K, Kanazawa A, Iwayama Y. Use of hyaluronic acid binding protein for detection of hyaluronan in ligature-induced periodontitis tissue. *Journal of periodontal research*. 1998;33(5):265-73.
28. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018 Jun;89:S159–72.
29. Duplancic R, Roguljic M, Puhar I, Veccek N, Dragun R, Vukojevic K, et al. Syndecans and Enzymes for Heparan Sulfate Biosynthesis and Modification Differentially Correlate With Presence of Inflammatory Infiltrate in Periodontitis. *Frontiers in physiology*. 2019;10:1248.
30. Kero D, Cigic L, Medvedec Mikic I, Galic T, Cubela M, Vukojevic K, et al. Involvement of IGF-2, IGF-1R, IGF-2R and PTEN in development of human tooth germ - an immunohistochemical study. *Organogenesis*. 2016;12(3):152-67.
31. Kero D, Kalibovic Govorko D, Medvedec Mikic I, Vukojevic K, Cigic L, Saraga-Babic M. Analysis of expression patterns of IGF-1, caspase-3 and HSP-70 in developing human tooth germs. *Archives of oral biology*. 2015;60(10):1533-44.
32. Kero D, Vukojevic K, Stazic P, Sundov D, Mardesic Brakus S, Saraga-Babic M. Regulation of proliferation in developing human tooth germs by MSX homeodomain proteins and cyclin-dependent kinase inhibitor p19(INK4d). *Organogenesis*. 2017;13(4):141-55.
33. Kero D, Bilandzija TS, Arapovic LL, Vukojevic K, Saraga-Babic M. Syndecans and Enzymes Involved in Heparan Sulfate Biosynthesis and Degradation Are Differentially Expressed During Human Odontogenesis. *Frontiers in physiology*. 2018;9:732.
34. Eliezer M, Imber J-C, Sculean A, Pandis N, Teich S. Hyaluronic acid as adjunctive to non-surgical and surgical periodontal therapy: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Invest*. 2019 Sep;23(9):3423–35.

35. Baranova NS, Nilebäck E, Haller FM, Briggs DC, Svedhem S, Day AJ, et al. The Inflammation-associated Protein TSG-6 Cross-links Hyaluronan via Hyaluronan-induced TSG-6 Oligomers. *J Biol Chem*. 2011 Jul 22;286(29):25675–86.
36. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers* (2018) 10;701.
37. Kaya G, Augsburger E, Stamenkovic I. Decrease in Epidermal CD44 Expression as a potential Mechanism for Abnormal Hyaluronate Accumulation in Superficial Dermis in Lichen Sclerosus et Atrophicus. *Journal of Investigative Dermatology* (2000).
38. Thorne RF, Legg JW, Isacke CM. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *Journal of Cell Science* (2004)





## **Cilj istraživanja**

Cilj istraživanja bio je ispitati moguću povezanost između izražaja hijaluronske kiseline (HA) i njenog receptora CD44 s prisustvom upalnog infiltrata u uzorcima tkiva gingive pacijenata oboljelih od uznapredovalog generaliziranog parodontitisa.

## **Materijali i metode**

U svrhu istraživanja metodom imunofluorescencije (IF) obrađeno je 20 uzoraka gingive ispitanika sa zdravim parodontom (kontrole, n = 20) i 20 uzoraka gingive ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom stadija 3 i 4 (ispitna skupina, n = 20). Za IF bojenje korištena su primarna protutijela na HA i CD44 te na opći biljeg upalnih stanica CD45 za prikazivanje upalnog infiltrata. Preparati su fotografirani tehnikom panoramskog snimanja. Obrada panoramskih snimki provedena je u programu Adobe Photoshop® CC (2019). Izračun izražajnih domena i prostornih gradijenata IF signala napravljen je u programu ImageJ (NIH, Public Domain). Za statističku analizu podataka korišteni su Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) i GraphPad v8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## **Rezultati**

U uzorcima gingive obje skupine, HA i CD44 izražavaju različite populacije stanica uključujući i upalne stanice. Nije nađena razlika u ukupnom izražaju HA i CD44 u zdravoj i bolesnoj gingivi. Međutim, raspodjela signala na HA i CD44 prema tkivnim odjeljcima (epitel, subepitelna stroma) u bolesnoj gingivi je bila različita što se pokazalo statistički značajnim povećanjem stromalnog izražaja oba ispitivana čimbenika u gingivi ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom. Ni HA ni CD44 prostorno ne koreliraju s prisustvom upalnog infiltrata što se može objasniti njihovim ubikvitarnim izražajem u gingivi u usporedbi sa znatno ograničenijim izražajem općeg biljega upalnih stanica CD45. Nađena je umjerena međusobna prostorna korelacija izražaja HA i CD44 u bolesnoj gingivi što upućuje na to da CD44 samo djelomično posreduje učinke i/ili sudjeluje u metabolizmu HA u gingivi ispitanika s uznapredovalim generaliziranim parodontitisom.

## **Zaključak**

Navedeni rezultati ne isključuju ulogu HA i CD44 u regulaciji upalnog odgovora u uznapredovalom generaliziranom parodontitisu, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se priroda te uloge rasvijetlila.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Correlation of expression of hyaluronic acid and its receptor CD44 with the presence of inflammatory infiltrate in gingiva samples of patients diagnosed with advanced generalized periodontitis

### **Objectives**

The aim of the study was to investigate association between the expression of hyaluronic acid (HA) and its main receptor CD44 with the presence of inflammatory infiltrate in gingiva samples of patients suffering from advanced generalized periodontal disease.

### **Material and Methods**

For this study, 20 samples of gingival tissue from healthy donors (controls, n = 20) and patients suffering from advanced generalized periodontitis stage 3 and 4 (test group, n = 20) were obtained. For the immunofluorescence (IF) staining, primary antibodies against HA, CD44 and general inflammatory cell marker CD45 were used. The microscopic slides were photographed using panoramic technique. Editing of panoramic images was performed in Adobe Photoshop® CC (2019). Quantification of IF signals' expression domains and spatial gradients was performed in ImageJ (NIH, Public Domain). For statistical analysis Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) and GraphPad v8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) software packages were used.

### **Results**

In healthy and diseased gingiva, different types of cells (including the inflammatory cells) express HA and CD44. No difference in the total expression of HA and CD44 in healthy and diseased gingiva was found. However, the pattern of distribution of HA and CD44 signals was somewhat different between two groups of samples with regard to increased stromal expression of HA and CD44 in diseased gingiva compared to healthy gingiva. No spatial correlation between HA and CD44 expression with the presence of inflammatory infiltrate was found, which might be explained by the fact that HA and CD44 are ubiquitously expressed in gingival tissue. Moderate spatial correlation between HA and CD44 was found in diseased gingiva, implying its partial involvement in HA signaling and HA metabolism during the advanced generalized periodontitis.

### **Conclusion**

HA and CD44 might play a role in regulation of inflammatory response in advanced generalized

periodontitis. However, further studies are needed in order to properly characterize such role of both investigated factors.



## **OSOBNI PODATCI**

**Ime i prezime:** Ivna Ćavar

**Datum rođenja:** 28.2.1996.

**Mjesto rođenja:** Split

**Državljanstvo:** hrvatsko

**E-mail:** ivnacavar96@gmail.com

## **OBRAZOVANJE:**

- 2002.-2010. Osnovna škola Majstora Radovana, Trogir
- 2010.-2014. Srednja škola Ivana Lucića (smjer opća gimnazija), Trogir
- 2014.-2020. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studijski program Dentalna medicina

## **JEZICI:**

- Engleski jezik
- Njemački jezik

## **AKTIVNOSTI:**

- Urednica studentskog časopisa DentiST
- Članica Studentskog zbora Medicinskog fakulteta u Splitu
- Demonstratorica na Katedri za protetiku dentalne medicine
- Članica Hrvatskog katoličkog liječničkog društva
- Članica studentske udruge Zubolina