Nagy átbocsátóképességű diagnosztikai módszer szájüregi daganatok korai felismerésére

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:

Dr. Balásné Dr. Szántó Ildikó

PTE KK Fogászati és Szájsebészeti Klinika

Doktori Iskola vezetője:

Dr. Sümegi Balázs egyetemi tanár

PTE ÁOK Biokémiai Intézet

Kutatási témavezető:

Dr. Gallyas Ferenc egyetemi tanár

PTE ÁOK Biokémiai Intézet

Klinikai témavezető:

Dr. Olasz Lajos egyetemi tanár

PTE KK Fogászati és Szájsebészeti Klinika

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Pécs

2011

Tartalom

Rövidítések jegyzéke 4

1. Bevezetés 5

1.1. Epidemiologiai adatok 6

1.2. A korai diagnózis jelentősége 9

1.3. Az etiológiai faktorok jelentősége 10

1.3.1. Dohányzás 10

1.3.2. Alkohol fogyasztás 10

1.3.3. Rossz szálhygiéne 11

1.3.4. Vírusok 11

1.3.5. Alultápláltság 11

1.3.6. Immunszupresszív állapotok 11

1.3.7. Gombás fertőzések 12

1.4. A prevenció lehetőségei 12

1.4.1. Primer prevenció 12

1.4.2. Szekunder prevenció 12

2. Elméleti hátér 14

2.1. A sejtciklus lépései 14

2.2. A sejtciklus szabályozása 14

2.3. A progentior, maturált és daganatsejtek jellemzői 16

2.3.1. Maturált sejt 16

2.3.2. Progenitor sejt 16

2.3.3. Tumorsejt 17

2.3.4. Tumormarkerek 17

2.4. A nyál, mint diagnosztikai rendszer 18

2.4.1. A nyál összetétele 19

2.4.2. A nyál fehérjék 20

3. A dolgozat célkitűzései 21

4. Anyagok és módszerek 22

4.1. A vizsgálatba bevont személyek 22

4.2. Mintavétel és feldolgozás 24

4.3. A minták feldolgozásához használt módszerek 25

4.3.1. Elektroforézis 25

4.3.2. Tömegspektrometriás vizsgálat 25

4.3.2.1. A tömegspektrométer felépítése 25
4.3.2.2. Mintaelőkészítés 26
4.3.2.3. Ionforrások 27
4.3.2.4. Analizátor 28
4.3.3. Fehérjék elválasztása 29
4.3.4. Triptikus emésztés és MALDI TOF/TOF MS 30
4.3.5. A spektrogram értékelése 31
4.3.6. Célzott peptid analízis 31
5. Eredmények 32
5.1. A mintavétel egyszerűsítése 32
5.2. A reprezentatív minták vizsgálata 33
5.2.1. A tumor marker fehérjék kijelölése 35
5.2.2. A vizsgálatban identifikált fehérjék tömegspektrumai 37
5.2.3. A vizsgálatban identifikált fehérjék leírása 46
5.2.3.1. Annexin csoport 46
5.2.3.2. Cornulin 47
5.2.3.3. Peroxiredoxin csoport 48
5.2.3.4. A thioredoxin rendszer 50
5.3. Natív nyál triptikus emésztése 51
5.4. A teljes mintakollekció vizsgálata célzott peptid analízissel 51
6. Megbeszélés 52
7. Az eredmények összefoglalása 56
8. Tudományos közlemények 57
8.1. A témához kapcsolódó tudományos közlemény és előadás 57
8.2. Egyéb tudományos közlemények 57
8.3. Kongresszusi és továbbképző előadások és prezentációk 58
9. Köszönetnyilvánítás 61
10. Irodalomjegyzék 62
11. Függelék 67

Rövidítések jegyzéke

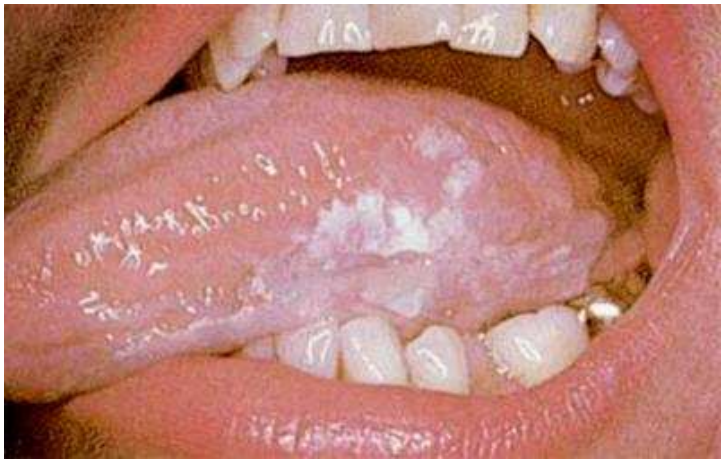
AIDS	szerzett immunhiányos tünetegyüttes
ANX	annexin
APCI	atmoszférikus nyomáson kémiai ionizáció
APPI	atmoszférikus nyomáson fotoionizáció
ASR	age-sex-relation: kor és nem szerinti összefüggés
BNO	betegségek nemzetközi osztályozása
CDK	ciklin-dependens kináz
CI	kémiai ionizáció
CID	collision-induced decay: részecske ütközés indukált hasadás
CLL	krónikus limfoid leukémia
DE OEC	Debreceni Egyetem Orvos Egészségügyi Centrum
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
EBV	Epstein-Barr vírus
EDC	epiderma-differenciálódás-komplex
EDTA	etilén dioxid tetra acetát
EI	elektron ionizáció
ELFO	elektroforézis
ESI	elektrospray ionizáció
FAB	gyors atom ütköztetés
FD	térdeszorpció
FI	térionizáció
FIB	gyors ion ütköztetés
HCV	Hepatitis C vírus
HIV	Humán immunoszupresszív vírus
HPLC	magas nyomású folyadék kromatográfia
HPV	Humán papilloma vírus
HSP	heat shock protein: hősokk fehérje
HV6	Herpesz vírus 6 típus
JCV	"John Cunningham" vírus
kDA	kilo-dalton
KSH	Központi Statisztikai Hivatal
LDI	lézer deszorpciós ionizáció
LTB	Lasertechnik Berlin GmbH
m/z	tömeg/töltés arány
MALDI	mátrix-segítette lézer deszorpció
MS	mass sectrometry: tömeg spektrometria
MTP	massive target plate: mintatartó lemez
NLC	„nano liquid chromatography:nanotechnológiás folyadék kromatográfia
NM	Népjóléti Minisztérium
OHL	szájüregi hajas leukoplákia
PD	plazma deszorpció
PMF	peptide mass fingerprint: peptid „ujjlenyomat”
PRX	peroxiredoxin
PSD	post source decay: indulástól kezdődő hasadás
PTE ÁOK	Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
RNS	ribonukleinsav
SDS	nátrium dodecil szulfát
SELDI	felület-segítette lézer deszorpciós ionizáció
SIMS	szekunder ion tömegspektrometria
TGR	thioredoxin/glutation reduktáz enzim
TOF	time-of-flight: repülési idő
TRX	thioredoxin
TRXR	thioredoxin reduktáz enzim
TS	termospray
USA	Egyesült Államok
WHO	Egészségügyi Világszervezet

1. Bevezetés

Napjainkban Magyarországon az orofaciális malignus daganatok morbiditási és mortalitási adatai folyamatosan romló tendenciát mutatnak, ami feltétlen gondolkodásra és cselekvésre serkenti az ebben a szakágban dolgozó kutató és gyógyító orvosokat. Gyakorló orvosi munkánk során felmerül a kérdés, hogy mi az oka ennek a jelenségnek, mivel lehetne a betegek számát, de legalább az elváltozások súlyosságát csökkenteni. Tovább rontja a mutatókat, hogy egyre fiatalabb nemzedék érintett a megbetegedésekben. Saját klinikai tapasztalataik alapján láthatjuk, hogy ma már mindennapos dolog a dohányzás és az alkoholfogyasztás az általános iskolás gyermekek között is.

A PhD értekezés kérdésfeltevése ebből a gondolatból fakadt: szükség lehet egy módszerre, ami a daganatok nagyon korai diagnosztikájára alkalmas.

Az *1. ábrán* a nyelv nehezen látható, laterális felszínén lévő leukoplákiát ábrázoltunk. Ez az elváltozás rákmegelőző állapot, az esetek 5-10%-ban szájüregi daganat fejlődik belőle.



1. ábra: Leukolpákia

1.1. Epidemiológiai adatok

Világszerte évi 500 000 új megbetegedést mutatnak a szájüregi laphám eredetű rákokról szóló statisztikai adatok, a WHO 2011 évben hozzáférhető adatai szerint a világban az ajak és szájüregi daganatok incidenciája 2008-ban 263.020 újonnan felfedezett beteget (ASR 3.8), mortalitása pedig 127.654 esetszámot (ASR 1.9) jelent (GLOBOCAN 2008 *Section of Cancer Information*).

Hazánkban a hat leggyakoribb kiemelt haláloki csoport közül a kardiovaszkuláris eredetű után másodikként a daganatok okozta halálozás szerepel. Európában Magyarország az első helyen áll a férfiak összes daganatos halálozási arányát illetően, a nőknél pedig a második helyezett [37,38]. A daganatos halálozási arány egyre növekszik, 1965 és 1990 között az összes daganatos mortalitás háromszorosára növekedett [48], a szájüregi daganatok mortalitása pedig 1965 és 2000 között az ötszörösére nőtt [3].

Magyarországon napjainkban kb. 300 ezer daganatos beteg él (az összes lokalizációt tekintve) és kb. évente 30 ezer haláleset fordul elő daganatos megbetegedés miatt. Ez 10%-kal jobb az előző éveknél, ez a nagyfokú javulás azonban valószínű látszólagos, az adatfeldolgozás automatizálásából következhet. [30]

Európában évről évre emelkedik az új daganatos megbetegedések előfordulásának gyakorisága, 2005-ben 3,2 millió új daganatos megbetegedést diagnosztizáltak, ami 300 ezerrel több, mint az előző évben volt. Magyarországon – a háziorvosok nyilvántartása szerint – 1999 és 2005 között mindkét nem esetében 30 százalék körüli növekedés mutatható ki. [56] Az *1. táblázatban* különböző lokalizációkban előforduló daganatok halálozási aránya látható egy korábbi felmérés adatai szerint. A táblázat zárójelben lévő számai Magyarország akkori helyét jelzik az országok közötti sorrendben.

1.táblázat: A rosszindulatú daganatok halálozási aránya (100 000 lakosra) különböző lokalizációkban, 46 országban, 1992-1995 között készült felmérésben.[37]

A CARCINOMA LOKALIZÁCIÓJA	FÉRFI		NŐ	
Tüdő és bronchus	84,0	(1)	17,9	(5)
Vastag és végbél	32,0	(2)	19,0	(1)
Emlő			23,9	(8)
Gyomor	22,1	(14)	5,0	(8)
Szájüreg és garat	18,5	(1)	2,4	(1)
Prostata	15,5	(16)		
Leukaemia	7,2	(2)	4,7	(1)
Méh			11,3	(8)

A különböző lokalizációjú tumorok halálozási adatait illetően riasztó a helyzet mindkét nem szájüregi daganatainál. Magyarország az európai országok között mortalitásban az első helyen áll mindkét nem esetében egyaránt. Mortalitásban és incidenciában, valamint az esetszámok növekedési dinamikájában is európai listavezetők vagyunk [30]. A *2. táblázatban* piros színnel jelöltük a szájüregi rákok mortalitásának feltűnően magas növekményét az 1975-ös és 1999-es értékek között, valamint a növekmény további változásait a 2004-es évig.

2. táblázat: 6 nagy halálozási gyakoriságú rosszindulatú daganat mortalitásának növekedési dinamikája 1975, 1999 és 2004 között Magyarországon [30].

Daganat	*esetszám*		*növekmény*	*növekmény változás 2004-ig*
Lokalizáció	**1975**	**1999**	**%**	**%**
1 ajak- és szájüreg	462	1608	250	+15
2 légcső, hörgő, tüdő	4169	7883	89	+9
3 vastagbél, végbél	3025	4912	62	+2
4 pancreas	1076	1562	45	+11
5 emlő	1650	2381	44	- 6
6 prosztata	1196	1387	16	- 9

A *3. táblázatban* kivonatoltuk a KSH adatait, miszerint a szájüregi daganatos halálozási idősoraiban az adatgyűjtés korai időszakához képest az esetszámok riasztó növekedése észlelhető. Az elmúlt években itt is látható egy látszólagos stagnálás, ez azonban valószínűleg az adatfelvétel standardizációja miatt látható. [22, 30]

3. táblázat: *Szájüregi daganat, mint a halál oka 1975-ben, 2001-ben és 2004-ben Magyarországon.* [22, 30]

Év	**Férfiak esetszáma**	**Nők esetszáma**
1975	383	79
2001	1432	305
2004	1416	274

A szervezet különböző területeire lokalizálódó malignomák közül a szájüregi daganatok - a gyomor, a tüdő, az emlő, a vastagbél és a cervix carcinomák után - gyakorisági

sorrendben a fejlett országokban a hatodik, a fejlődő országokban a harmadik helyen állnak. Európában az összes carcinomák 1-5 százalékát, az Amerikai Egyesült Államokban 4 százalékát teszik ki, Magyarországon az összes malignus tumorok mintegy 5 százaléka a szájüregre lokalizálódik [4] . Egyéb kutatásokban is fellelhető adatok szerint Magyarországon az elmúlt 32 évben a fej-nyak területi rák miatti mortalitás 387%-kal emelkedett [13].

A szájüregi daganat alatt ez esetben a betegségek nemzetközi osztályozása (BNO) szerint az ajak, a szájüreg és a garat C00-C14 kódszámokkal jelölt malignus daganatait értjük.

Hazánkban a Nemzeti Rákregiszter az incidencia, a Központi Statisztikai Hivatal pedig a mortalitás adatait rögzíti. A két adatbázis szerint 2005-ben 3895 volt az újonnan diagnosztizált szájüregi daganatos beteg, és 1567 haláleset történt. 2007-ben 1292 szájüregi daganatos férfi és 289 nő halálát regisztrálták. 2008-ban 1651 haláleset történt.
A Nemzeti Rákregiszter hozzáférhető adatai szerint a 2008-as, 2009-es és 2010-es évben Magyarországon az újonnan felfedezett daganatok számát (mindkét nem adatait összesítve) a *4. táblázatban* szemléltettük:

4. táblázat: Szájüregi daganatok incidenciája, a különböző kódjelű diagnosztizált és bejelentett daganatok esetszámai

		2008		2009		2010	
		ffi	nő	ffi	nő	ffi	nő
C00	Az ajak rosszindulatú d.	170	80	162	97	127	102
C01	A nyelvgyök rosszindulatú d.	288	73	249	61	286	60
C02	A nyelv e.k.m.n. ri.d.	249	89	223	67	258	73
C03	A fogíny rosszindulatú d.	49	37	50	34	51	29
C04	A szájfenék rosszindulatú d.	187	73	179	51	181	52
C05	A szájpad rosszindulatú d.	87	58	83	57	104	57
C06	A száj egyéb részeinek ri.d.	72	48	44	47	71	40
C07	A fültőmirigy ri. d.	90	68	100	83	84	76
C08	E.k.m.n.nagy nyálmirigyek ri.d.	39	44	33	38	41	28
C09	A mandula rosszindulatú d.	199	47	189	61	208	52
C10	A szájgarat rosszindulatú d.	378	101	383	84	341	109
C11	Az orrgarat rosszindulatú d.	94	35	66	44	69	37
C12	A körte formájú öböl ri.d.(sinus	42	4	47	9	51	15
C13	Az algarat ri.d.	569	98	586	86	540	85
C14	Ajak,szájür.és garat k.m.n.r.ri.	233	80	270	85	287	83

1.2. A korai diagnózis jelentősége

A száj-garatüregi rákok magas mortalitásának egyik oka, hogy a betegek a daganat késői stádiumában kerülnek észlelésre, és kezelésre, pedig az ötéves túlélés lehetősége a daganat lokalizált formájában relatíve kedvező. Az USA Nemzeti Rák Intézetének statisztikái szerint a szájüregre lokalizált tumorok esetében 82%, regionális metastasis esetén 45%, távoli metastasisok esetében 21% az ötéves túlélés aránya [68,75]. A szájüregi daganatok további jellemzője, hogy a recidívák viszonylag korán, 1-2 éven belül kialakulnak, a daganat esetleges gyógyulása után 5-10 évvel később, 5-20%-ban viszont második primer tumor kifejlődésével kell számolni. [75]

Mivel ismert tény, hogy korai diagnózis esetén a szájüregi daganatok nagy része gyógyítható, és a túlélési arány jelentősen javítható, indokolt a kérdés, hogyan lehetne a korábban felvázolt helyzeten változtatni [81].

A Népjóléti Minisztérium 1996-ban kiadott egy 48/1996. (XII. 17.) NM 2. § számú rendeletet, amelyben a szájüreg és a maxillo-faciális régió szűrővizsgálatát kötelezővé tették a fogászati rendelésen megjelenő betegek számára. A jelenleg is érvényben lévő stomato-onkológiai módszertani levél (1997) [1] célja volt, hogy a korai diagnózist elősegítse, azon meggondolás alapján, hogy az ország lakosságának túlnyomó többsége fogászati kezelés kapcsán a fogorvosnál előbb-utóbb megfordul. Ez a feltételezés azonban nem vált be, mivel nagy populációs mintán végzett vizsgálatok szerint az ország lakosságának mintegy 5-10 százaléka soha, 50 százaléka csak erős fogfájás esetén keresi fel a fogorvost [4]. Ezáltal a szájüregi, illetve a maxillo-faciális régió daganatainak korai diagnosztikája nem valósult meg, a tumoros esetek felét - kétharmadát későn diagnosztizálták, és észlelésük idején már irreszekábilis állapotban voltak. A korábbi módszertani levél mellett napjainkban az Onkoterápiás Protokoll című könyv tartalmazza a követendő irányelveket. [30]

Ezek a rendelkezések azonban nem tudnak változtatni azon, hogy a magyar lakosság szájhigiénéje és fogászati egészségtudata igen alacsony szintű, és a lakosság 50-90 százaléka nem keresi fel rendszeresen fogorvosát, éppen a carcinoma kialakulás szempontjából legveszélyeztetettebb rétegek nem jutnak el évekig fogorvoshoz. A száj-garatüregi daganatok rendkívül magas hazai halandóságának oka elsősorban a késői diagnózis, melynek okait a következőkben kereshetjük:

- a személyi feltételek (kellően jártas szakemberek) hiánya,
- a rákmegelőző állapot megítélésének hiánya [68],
- a daganatok gyors növekedése (az évenkénti szűrővizsgálat nem elegendő),
- a veszélyeztetett populáció tájékozatlansága és megközelítésének nehézsége,
- a fogorvosi szűrővizsgálatok hiánya illetve nem kellő alapossága (alapos szűrés elmaradása, fogorvoshoz nem-járás)

1.3. Az etiológiai faktorok jelentősége

1.3.1. Dohányzás

A legfontosabb oki tényező a dohányzás. Tudva, hogy a dohányzás egy másik, népegészségügyi szempontból szintén „előkelő" helyen lévő tumornak, a tüdődaganatnak is fő rizikótényezője, különösen riasztó adatok kerültek napvilágra. Míg 2000-2003 között az általános daganatos mortalitás emelkedése csökkent, szinte a stagnált, addig a női tüdőrákok töretlen emelkedést mutattak [46], és mutatnak azóta is [30]. Kiterjedt hazai és nemzetközi irodalma van a daganatos betegségek (ezen belül a tüdő és a szájüreg daganatai) és a dohányzás közötti összefüggéseknek, de valamennyi vizsgálat és mérés közösen azt a konklúziót vonja le, hogy a dohányfogyasztás minden formája alapvető kóroka az orális, és más lokalizációjú rákok kialakulásának [28].

1.3.2. Alkoholfogyasztás

A következő, szintén alapvető etiologiai tényező az alkoholfogyasztás minden formája. A hazánkban sajnos jellemző alkoholfogyasztási szokások kedveznek a daganatok kialakulásának. Fontos az elfogyasztott alkohol minősége: Magyarországon jellemző a tömény szeszes italok és a sör ivása. Az italok mennyisége sem elhanyagolható, a paraméterként is felhasználható „egyszerre elfogyasztott mennyiség" Magyarországon 0.47 dl/férfi és 0.25 dl/nő.

Szembetűnő korreláció figyelhető meg a májcirrózisos halálozás és a szájüregi daganatok okozta halálozás magyarországi területi megoszlásában [48].

Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a két betegség kialakulása hasonló oki tényezőkkel magyarázható.

1.3.3. Rossz szálhygiéne

A rossz szájhygiéne önmagában is mechanikai irritatív tényező (kárieszes fogak, törött gyökerek, elégtelen fogművek, fogkő és plakk akkumuláció). Kutatások szerint a plakk baktériumok képesek az alkoholból acetaldehid előállítására, ami jelentős kémiai karcinogén hatással bír [48].

Feltehetően a fentebb felsorolt oki tényezők önmagukban is, de együttes fennállásuk esetén nem egyszerűen szummálódva, hanem multiplikálódva képesek a daganatos folyamatok iniciációját illetve progresszióját elősegíteni.

1.3.4. Vírusok

Egyre több tanulmány foglalkozik a daganatok virális eredetével. Ma már jól ismert az ún. onkogén vírusok csoportja (pl.: HPV, EBV, HCV, adenovírusok, HV6). Igen nagy populációkon mért eredmények mutatják, hogy a fejlett országokban a dohányzás és az önpusztító életmód visszaszorulásával csökkennie kellene a daganatos morbiditásnak és mortalitásnak, ezzel ellentétben az adatok legfeljebb stagnálást mutatnak. Ez a vírusos eredetű, vagy más kórokozók által okozott daganatokra tereli a figyelmet. A nemzetközi szakirodalom igen kiterjedten vizsgálja a problémát, számos tudományos publikáció jelent meg ebben a témában. Szignifikáns összefüggést mutattak ki a HPV vírusok vagy vírus ellenes antitestek jelenléte és a szájüregi daganatok kifejlődése között [5,26,61,20]. Más tanulmányok szerint a HPV, az EBV ill. a JCV együttes vagy külön jelenléte összefüggésbe hozható a hám eredetű szájüregi daganatokkal. Több vírus infekció illetve a HIV pozitivitás fennállása emeli a malignus szájüregi daganatok kifejlődését [12].

1.3.5. Alultápláltság

A felszívódási zavarok kb 10-15 %-ban lehetnek a szájüregi daganatok okai [54].

Többféle módon is kialakulhat egy szervezetben a malnutríciós állapot: egyenes következménye lehet az önpusztító életmódnak, ami akár tudatos, akár a páciens élethelyzetéből adódhat. Jól ismert az alkoholisták alultáplált állapota, amikor a szervezet számára szükséges tápanyagoknak csak igen kis része jut be. Ez tovább rontja az alkoholbeteg általános állapotát, fokozva a szájüregi daganat kialakulásának rizikóját.

1.3.6. Immunszupresszív állapotok

Az immunrendszer károsodása – akár betegség akár „mellékhatás” miatt – okozhatja a rosszindulatú szájüregi daganatok kifejlődését. Nagyszámú populációkon végzett vizsgálatokból kiolvasható, hogy pl. a vesetranszplantáció utáni állapot rizikófaktora a szájüregi daganatoknak [24]. Esetbemutatásban található példa az immunszupresszió

talaján kialakult OHL, ami rákmegelőző állapot [64]. A Crohn-betegség miatti ledált immunrendszer és a szájüregi daganat között szintén találhatunk összefüggést [76].
AIDS betegek kezelése után késői következményként írták le bizonyos tumorféleségek (köztük a szájüregi daganatok) számának növekedését [69].

1.3.7. Gombás fertőzések

Epidemiologiai vizsgálatban mutatták ki, hogy a Candida albicans mellett más ritkább candida fajok, mint C. glabrata , C. tropicalis, C. krusei és C. parapsilosis is felelősek lehetnek az szájüregi daganatok kialakulásában [7,66] . Tapasztalatok mutatták, hogy a terbafine gombaellenes gyógyszer gátolja a szájüregi daganatok növekedését. [10].

1.4. A prevenció lehetőségei

1.4.1. Primer prevenció: a rizikófaktorok kiküszöbölése

A nemzetközi irodalom tapasztalatai szerint a dohányzás és az alkoholfogyasztás hatása nem egyszerűen szummálódik, hanem multiplikálódik, együttes hatásuk ezért fokozottan károsítja a szájüregi és garatszöveteket. Magyarország az összes károsító tényező vonatkozásában a statisztikák élén jár, ami részben magyarázhatja a száj és garattumorok magas mortalitását.
A primer prevenciós tevékenység hatékonyságának vitathatatlan bizonyítéka az USA California államában lezajlott dohányzásellenes kampány, amelynek során az egy főre eső cigaretta fogyasztás felére csökkent, és az ezt követő években a tüdőrák incidenciája mindkét nem esetében erősen csökkent, férfiaknál több mint 50 %-kal [47].

1.4.2. Szekunder prevenció: a korai felismerést és kezelésbe vételt jelenti.

A maxillofacialis tájék és a szájüreg jól megközelíthető lokalizációt jelent: szemmel látható és kézzel tapintható. Elvileg tehát mind a daganatok mind a rákmegelőző léziók és állapotok már kezdeti stádiumban, klinikailag jól felismerhetők, kezelésbe vehetők, így progressziójuk jó eséllyel meggátolható.
A szekunder prevenció hatékony eszközét képezhetik a megfelelően alkalmazott stomatoonkológiai szűrővizsgálatok. Ezeket a következő módokon lehet elvégezni:

1. **teljes népességen** vagy mintán végzett vizsgálatok: költséges megoldás
2. **klinikák, kórházak** fekvő és járó betegeit érintő: nem célpopuláció
3. **munkahely**i (például ipari üzemekben végzett), különösen azokon a munkahelyeken, amelyek az epidemiologiai adatok szerint veszélyforrást jelentenek: sporadikus
4. **célcsoport**okat (például hajléktalanokat) vizsgáló: nehezen szervezhető
5. **más szűrővizsgálatokhoz** kapcsolódó (multifázisos szűrés): ígéretes, kezdetleges
6. **alkalmi, egyéni** - az orvosi, illetve fogorvosi rendelőben: ma már kötelező, de kevés páciens érintett [3].

Mint a felsorolás mellett látható kritikákból kitűnik, nehéz ideális megoldást találni, napjainkban a magyar lakosság nem kielégítő egészségtudata mellett legalább az ún. rizikópopuláció vizsgálata érdekében szinte „az orvosnak kell a beteg után kutatnia” [58].

A ráfordítás/hasznosság (cost/benefit) arányt figyelembe véve Magyarországon a felsorolás két utóbbi módszerének megvalósítása ajánlható [48,58,].

A prekancerózus léziók identifikálására leginkább klinikai módszerek alkalmasak. Különböző fogorvosi iskolák kialakítottak klinikai protokollokat, amelyek valamilyen úton diagnózishoz vezetnek: jó példa erre a DE OEC, Fogorvostudományi Kar, Arc- Állcsont és Szájsebészeti Tanszéken írt OTKA Pályázat, ahol a klinikai vizsgálat mellé jól értékelhető kérdőívet is kidolgoztak. Nemzetközi irodalomban található leírás hasonló irányelveket mutat, nagy populáció vizsgálata alapján a leghatékonyabbnak a megtekintést és tapintást tartják. [6,62] .

A klinikai módszerek mellett a laboratóriumi analitikai módszerek is egyre több létjogosultságot, valamint elismertséget élveznek napjainkban. Nagy előnyük az abszolút objektivitás, a mérések standardizálhatósága, relatív alacsony költsége.

A dolgozat tárgyát képező proteomikai vizsgálat különösen alkalmas a nagy áteresztőképességet igénylő szűrővizsgálatok elvégzésére, hiszen a mérőeszköz akár napi 6500 db mérésre ad lehetőséget. Non invazív módszerrel nyerhető mintán célzott peptid analízist végezhetünk, ami a keresett fehérje minőségi kimutatására alkalmas. A vizsgálat könnyedén elvégezhető nagy populáción is, ideértve a különböző okokból veszélyeztetett betegeket , vagy akár az egészségesnek tartott pácienseket is.

2. Elméleti háttér

A klasszikus sejtfunkciók, amelyek az emberi szervezet összes sejtjére jellemzőek, a következők: növekedés és metabolizmus, új sejtek képzése, valamint a fehérje szintézis. Ez utóbbi a sejt funkciójától, életciklusától, pillanatnyi feladataitól függően erősen változik. A sejt genomjában, környezetében beállt változások véglegesen megváltoztathatják az addig jellemző fehérjeproduktumokat. Legismertebb és leginkább kutatott sejt átalakulás típus a malignus transzformáció, amely a sejt addigi proteoszintézisében is változásokat mutat.

2.1. A sejtciklus lépései

Az önreprodukció az eukarióta sejtek alapvető képessége. A sejt növekszik, megkettőzi anyagait és genetikai információit, majd kettéosztódva a két utódsejt (leánysejt) között osztja el ezeket. Mivel az utódsejtek is képesek az osztódásra, a folyamat ciklusosan ismétlődhet. A sejtosztódás végétől a következő sejtosztódás végéig tartó időszakot nevezzük sejtciklusnak. (ld. Függelék: A sejtciklus lépéseinek részletes leírása)

2.2. A sejtciklus szabályozása

Az utóbbi évtizedekben kiderült, hogy a sejtciklus fő szabályozói olyan fehérjekomplexek, amelyek **egy katalitikus** hatású, és **egy regulátor** alegységből állnak. A katalitikus alegységek ún. fehérjekinázok, amelyek más fehérjék egyes aminosav-molekuláihoz foszfátcsoportot képesek kapcsolni, ezzel pedig megváltoztatni e fehérjék aktivitását. A katalitikus alegységek mennyisége a sejtciklus során normális esetben nem változik, de önmagukban alig mutatnak aktivitást. Ha azonban a regulátor-alegységek (ciklinek) is hozzájuk kötődnek, és kialakulnak a ciklin-dependens-kinázok (CDK), a komplexek aktivitása mintegy tízezerszeresére növekszik.

Mind a ciklineknek, mind a ciklin-dependens-kinázoknak több formája létezik. Egy-egy konkrét ciklin és CDK összekapcsolódása révén alakulnak ki a fent említett, a sejtciklus szabályozásában főszerepet játszó fehérjekomplexek, amelyek különböző típusai a sejtciklus különböző pontjain fejtik ki hatásukat. Felépülésüket a ciklin mennyiségének növekedése előzi meg, amely viszont általában valamilyen más serkentő tényezőnek (például növekedési faktoroknak) az eredménye.

A különféle ciklin- és CDK-molekulákat kódoló gének onkogénként működhetnek - meghibásodásuk olyan folyamatokat indíthat el, amely a sejtet tumorsejtté változtathatja.

A felépült fehérjekomplexek olyan biokémiai folyamatokat indítanak el, amelyek a sejtciklus egy adott fázisából a következőbe viszik át a sejtet. Alapvető fontosságú, hogy az egyes fázisok a megfelelő sorrendben következzenek, s a sejt csak akkor tudjon átlépni egy következőbe, ha az előzőt tökéletesen befejezte. Ellenkező esetben a genetikai anyag eloszlásában zavarok léphetnek fel. Elveszhetnek kromoszómák vagy kromoszómarészletek, vagy egyenlőtlenül oszolhatnak el a két utódsejt között. A tumorsejteknél gyakran jellemzők ilyen elváltozások.
Éppen ezért az eukarióta sejtekben olyan ellenőrző mechanizmusok fejlődtek ki, amelyek meghatározott pontokon - ún. ellenőrző pontokon - leállítják a sejtciklust addig, amíg az előző fázis eseményei tökéletesen be nem fejeződtek. Az egyik ilyen például a G1 ellenőrzési pont: ha a genetikai állományt károsodás éri, akkor a ciklin-dependens-kinázokat gátló fehérjék megállítják a sejtciklust, ami lehetőséget teremt a hibák kijavítására, mielőtt a DNS-állomány megkettőződik. (Ilyenkor jutnak szerephez például a daganatelnyomó fehérjék, köztük a központi jelentőségű p53) [72, 32].

Kimutatták, hogy egyes emberi daganatokban a ciklin- és CDK-molekulák megnövekedett szintje jellemző. Már folyamatban vannak olyan klinikai célú tudományos kísérletek, amelyek a CDK-molekulák sejtosztódást szabályozó pontos szerepét hivatottak leírni [72].

Klinikai jelentőségű a kérdés, hiszen a daganatgyógyszerek kutatása központi szerepet játszik a tudományos kutatásokban. Bizonyos gyógyszerkombinációkkal már elérték, hogy a CDK4 enzim szupressziójával a vesedaganat sejtek növekedését gátolják [65] .

Más összefoglaló tanulmányban a CLL gyógyításában remélnek eredményeket a CDK enzimek gátlásával [23].

2.3. Progenitor és maturált sejtek közötti különbségek

2.3.1. Maturált sejt:

Érett sejt, vagyis életfolyamatai kiegyensúlyozottak, a differenciáció végleg befejeződött, a transzmembrán anyagáramlás mindkét irányban többé kevésbé kiegyensúlyozott. A fehérjeszintézis a sejt életciklusától függően jellemző, mérhető és prognosztizálható. A maturált sejt jellemzően G0, illetve hosszan elnyúlt G1 fázisban van leginkább, ekkor történik a sejtben a speciális, funkcionális fehérjék szintézise. A maturált sejtek nem, vagy csak speciális (megváltozott) miliőben képesek osztódni.

2.3.2. Progenitor sejt:

Az őssejtekhez hasonlóan a progenitor sejtek is képesek specifikus differenciációra, de velük ellentétben a progenitor sejtnek „előre meghatározott" célirányos differenciálódás a feladata [15]. Az őssejtek végtelen számban képesek osztódni, a progenitor sejtek osztódási képessége ezzel szemben limitált. Elnevezésük néha más: az őssejteket embrionális őssejteknek, míg a progenitor sejteket felnőttkori őssejteknek is nevezik. A progenitor sejtek fő feladata egy kifejlett szervezetben a gyógyulási, reparációs mechanizmusokban van [44]. Az *5. táblázataban* összefoglaltuk a fent leírt sejttípusok jellemző tulajdonságait.

5. táblázat: Őssejtek és progenitor sejtek tulajdonságainak összehasonlítása

	Őssejt	**Progenitor sejt**
Osztódás in vivo	Végtelen számú	Limitált
Osztódás in vitro	Végtelen számú	Limitált
Differenciálódási készsége	Multipotens	Unipotens, néha multipotens
Sejtosztódási képesség megtartása	Jellemző	Nem jellemző
Sejtpopuláció	Eléri a maximális sejtszámot a differenciáció előtt	Kisebb sejtpopuláció is képes differenciálódni

2.3.3.Tumorsejt:

Bármely típusú sejt genomjában történhetnek olyan változások, amelyek az addig szoros biokémiai kontroll alatt álló sejtosztódást regulálatlanná teszik. Az ilyen sejtek ciklusa jelentősen rövidül, szabálytalanná válik, megszűnik a sejt addigi életére jellemző transzkripció-transzláció rend. Lényegesen kevesebb fehérjét szintetizálnak, és a produkált fehérjék eltérnek az addig jellemző összetételtől. Valamennyi tumorsejt közös tulajdonsága, hogy az irreguláris osztódások során néhány jellemző fehérjét több-kevesebb mennyiségben termelnek.

Ezen különbségek alapján joggal feltételezhetjük, hogy a három sejttípus (progenitor és maturált sejt, valamint a tumorsejt) más jellegű fehérjéket termel, illetve más–más fehérjék jelezhetik sejtcikluson belüli helyzetüket

2.3.4. Tumormarkerek

Ezzel a gyűjtőfogalommal azon agyagok csoportját jelöljük, amelyek valamely módon a szervezetben előforduló rosszindulatú (differenciálatlan és kontroll nélkül osztódó) sejtek működését jelzik. Többnyire fehérje természetű anyagok, amelyek a sejtciklus más-más időpontjában termelődnek, és a különböző emberi testfolyadékokból változó mennyiségben és nagy időbeli szórásban kimutathatók. A szakirodalom szerint számos ilyen fehérjét azonosítottak már, jelen tanulmányban a nyálból kimutatható fehérjéket vizsgáltunk [14, 15].

A megváltozott DNS állományú sejtek jelenlétének kimutatására más módszerek is rendelkezésünkre állnak. Genomikai vizsgálat a DNS, illetve a DNS mintán képződő RNS kimutatásán alapszik, de a proteomikai méréseknek ezzel szemben jelentős előnyei vannak. A genomikai vizsgálat hátrányai:

1. Mindig sebészileg kimetszett szövetmintából vagy vérmintából készül az analízis (invazivitás).
2. A minták feldolgozásának viszonylagos bonyolultsága miatt több ponton történhet eltérés, vagy hiba, ami a mérés pontosságát rontja (Southern blot, Northern blot).
3. Az analízis költségei magasabbak.

A proteomikai vizsgálat előnyei:

1. Nem invazív.
2. Egyszerűbb a minta előkészítése és feldolgozása
3. A vizsgálat relatíve olcsó, az ár/érték arány kedvező.

Mindezek mellett mégsem elhanyagolhatóak a genomikai vizsgálatok, hiszen napjainkban is messze mutató eredmények és értékelések születnek ezen mérések talaján [43]. Feltehetőleg a módszereket variálva, egyik és másik előnyeit kihasználva kaphatjuk a valóságot leginkább megközelítő eredményeket.

A kétfajta vizsgálati módszerben fellelhető különbségek valószínűleg a modernebb, újabb fejlesztésű, proteomikai módszer felé terelik a kutatók érdeklődését.

A nyál diagnosztikájában a biomarkerek egyre szélesebb körű kutatása (proteomikai és genomikai szemlélet) a technológiai fejlesztésekkel szoros kapcsolatban komoly diagnosztikai és prognosztikai eszközt adhat az orvosok, fogorvosok kezébe, hogy klinikailag jó döntéseket hozhassanak a kezelés várható kimenetele szempontjából [14].

2.4. A nyál, mint diagnosztikai rendszer

A nyál jelen pillanatban a szakirodalom szerint is az egyik legígéretesebb vizsgálati anyag, éppen a gyűjtés noninvazív jellege miatt [11,57].
Az is tény, hogy a nyál gyűjtése nem standardizált, a legtöbb tudományos méréshez néhány (4-5) eddig leírt módszert alkalmaznak a kutatók. Általában nem jelent gondot ez a módszertani sokféleség, de a bonyolultabb mintagyűjtést a nagy áteresztőképességű vizsgálatok esetén nehezebb megvalósítani. Néhány példa a mintagyűjtésre:

1. Fogmosás után 3 percig a tiszta, fogkrém nélküli fogkefével történő stimuláció után köpőcsészébe gyűjtés, ezután Eppendorf csőben tárolás a feldolgozásig (szükséges hozzá a vizsgált személy fogkeféje, fogkrém, steril köpőcsésze, Eppendorf cső) [11, 57].

2. Stimulált nyálminta: fogmosás után 3-5 percig viasz rágatásával serkentjük a nyálelválasztást, majd a nyálat köpőcsészébe gyűjti a páciens, ezután Eppendorf csőben tároljuk a feldolgozásig (szükséges hozzá a vizsgált személy fogkeféje, fogkrém, fogászati viasz, steril köpőcsésze, Eppendorf cső).

3. A beteggel ízmentes rágógumit rágatva, felszólítjuk, hogy 5 percen keresztül ritmusos rend szerint, előre kalibrált egyszerhasználatos köpőcsészébe gyűjtse a keletkezett nyálát. Az előírt idő után mennyiségi mérést is végezhetünk (szükséges hozzá ízmentes rágógumi, speciális köpőcsésze, alkalmas időmérő) [42].

A nyálban található fehérjék, fehérje töredékek, és egyéb patológiás biomarkerek analitikai vizsgálata nagyban hozzájárul a modern diagnosztika fejlődéséhez. Napjainkban számos olyan kutatás folyik, amely a betegségekre jellemző fehérjék és egyéb biomarkerek kimutatását célozza meg.

Három pár nagy nyálmirigy található az emberi szájüregben, ezek a glandula parotidea, a glandula submandibularis, és a glandula sublingualis, melyek a kivezető csöveiken keresztül kapcsolódnak a szájüreghez [19, 71]. Ezeken kívül számos kis nyálmirigy található még az oralis mucosa alatti laza kötőszövetben – ezek együttes működése termeli az orális folyadék teljes mennyiségét. Az emberi nyálmirigyek anatómiai képe megtalálható a Függelékben.

Az emberi nyálmirigyek 1000-1500 ml nyálat termelnek naponta, melynek összetétele: a víz, proteinek, és kis molekulatömegű anyagok, főleg elektrolitok.

A nyálat alapvetően feloszthatjuk a nyálmirigy specifikus nyálra, és a teljes nyálra, amely már tartalmazza a szájüregben lévő, és a külvilágból bekerülő baktériumokat, az epitheliális sejteket, ételmaradékokat, valamint a vérből származó anyagokat [27].

2.4.1. A nyál összetétele

A kevert nyál normálisan 99,3% vizet, és 0,7% szárazanyagot tartalmaz, mely döntő mértékben fehérjékből és anorganikus sókból (pl.: nátrium, kálium, foszfát, bikarbonát) áll. Hipotóniás oldat, melynek pH-ja 6,4 és 7,0 között változik. Egyéb, nyomokban fellelhető összetevői a zsírok, hormonok, növekedési faktorok, valamint úgynevezett testidegen anyagok (pl.: gyógyszerek, higany, ólom, kén, jód) Patológiás körülmények között a mirigyek kiválasztanak különböző vírusokat is, így például az Epstein-Barr, Poliomyelitis, Coxackie, Hepatitis, és HIV-vírust [19,71]. A nyál összetételének sematikus ábrája megtalálható a Függelékben.

A nyál összetétele dinamikusan változik a napszakkal, életkorral, táplálkozással, folyadékfogyasztással, psychés állapottal, gyógyszer fogyasztással, szájhygiénés anyagok használatával és szisztémás megbetegedéssel (öröklött, autoimmun, malignitás, infekció) szinkronban.

Adott páciens esetében ha az intrinsic faktorokat állandónak tekintjük, az extrinsic anyagok befolyásoló hatásának csökkentésével érhetünk el relatív standard körülményeket. Másik megoldás a minták szinkronizálására az időtényező figyelembe vétele. Szájöblítő használata esetén például 3-4 óra eltelte után már nem mutathatók ki a nyálban az öblítőanyag nyomelemei. [21]

2.4.2. A nyál fehérjék

A humán kevert nyál fehérje koncentrációja normálisan 1-3 g/l, és ezen érték külső stimulációra nem változik szignifikánsan, a szekréció szoros neurológiai kontroll alatt van. A pszychés állapot erősen befolyásolja a nyál fehérjék megoszlását (szerózus ill. mucinózus nyál). A nyálfehérjék körülbelül 53%-a a vérből, és más szövetekből származik, 5% az epitheliumból, a fennmaradó rész a nyálmirigyek szekrétuma. A teljes nyál protein tartalma alkalmas sokféle fiziológiai és biokémiai vizsgálatra. Lényeges protein modifikáció megy végbe az orális környezetben, ahol számos gazdaszervezetből és baktériumoktól származó enzim hat a proteinekre, melyek a nyálmirigyekből kiáramolnak. Tehát a nyálproteinek bioszintézise a nyálmirigyekben kezdődik transzkripcióval, és transzlációval. Ezt poszttranszlációs módosulások követik: ezek glikoziláció, foszforiláció, és proteolízis. Ezután a nem steril szájüregben további változások történnek: proteolítikus hasadás, részleges deglikoziláció és protein-protein komplex formáció [72].

3. A dolgozat célkitűzései

Számos tudományos vizsgálat foglalkozik a nyál analízissel, de az elérhető szakirodalomban nem találtunk olyan vizsgálatot, amely az eddig leírt vizsgálatok egyszerűsítésével, nagy betegszám esetén is alkalmazható módszert ír le.

1. Egyszerű, könnyen, gyorsan és olcsón kivitelezhető nyál mintavétel kidolgozása, összehasonlítása a szakirodalomban leírt módszerekkel.

2. Humán vizsgálati anyagból tömegspektrometriás vizsgálattal egy vagy több marker típusú jelátviteli fehérjét identifikációja, ami szájüregi, vagyis a tápcsatorna kezdetén lévő tumorokra jellemző.

3. Egyszerűsített proteomikai módszer kidolgozása a szűrővizsgálatok céljából.

4. A kiválasztott fehérjékre jellemző peptidek kimutatásának validációja nagyobb egészséges kontroll és daganatos beteg populáción, az egyszerűsített és rövidített nyál mintavétellel és proteomikai módszerrel.

2. ábra: A minták felcseppentése a targetlemezre (illusztráció)

4. Anyagok és módszerek

4.1. A vizsgálatba bevont személyek

A vizsgálat kezdetén 25 fő, klinikailag szájüregi daganatos beteget, és kontrollként 20 fő, velük kor/nem relációban hasonló, jó egészségi állapotban lévő, nem tumoros egyéneket kerestünk, akik mindannyian önként vettek részt a felmérésben. A PTE Regionális Kutatásetikai Bizottsága 2007 évben engedélyezte a vizsgálatot.

A teljes vizsgálatba bevont betegek nem, születési idő, szövettani diagnózis szerinti felsorolását a *6. táblázat* mutatja.

6.táblázat: *A vizsgálatba bevont, klinikailag rosszindulatú tumoros betegek adatai*

	NŐ/FÉRFI	SZÜLETÉSI IDŐ	KOR	SZÖVETTANI DIAGNÓZIS
1	F	1956.12.17	54 ÉV	carcinoma planocellulare
2	F	1956.06.14	54 ÉV	carcinoma planocellulare
3	F	1959.10.15	51 ÉV	carcinoma planocellulare
4	F	1942.04.14	68 ÉV	carcinoma planocellulare
5	N	1955.04.12	55 ÉV	mucoepidermoid carcinoma
6	F	1933.05.13	77 ÉV	carcinoma planocellulare
7	N	1937.08.30	73 ÉV	lobos nyálkahártya részlet
8	F	1934.05.23	76 ÉV	carcinoma planocellulare
9	N	1950.08.30	60 ÉV	carcinoma planocellulare
10	N	1945.07.20	65 ÉV	carcinoma planocellulare
11	F	1954.12.29	56 ÉV	fibroepitheliális polyp
12	N	1936.05.09	74 ÉV	carcinoma planocellulare
13	N	1951.11.05	59 ÉV	kiérő többrétegű el nem sz laphám
14	F	1957.09.15	53 ÉV	carcinoma planocellulare
15	F	1949.05.11	61 ÉV	carcinoma planocellulare
16	F	1953.03.15	57 ÉV	carcinoma planocellulare
17	F	1964.04.12	46 ÉV	carcinoma planocellulare
18	F	1956.05.13	54 ÉV	carcinoma planocellulare
19	F	1957.09.07.	57 ÉV	carcinoma planocellulare
20	N	1950.07.21	60 ÉV	carcinoma planocellulare
21	N	1941.10.27	69 ÉV	carcinoma planocellulare
22	N	1936.02.28	74 ÉV	laphám metaplasia dyskeratosis
23	N	1939.02.08	71 ÉV	carcinoma planocellulare
24	F	1954.08.24	56 ÉV	carcinoma planocellulare
25	F	1946.02.14	64 ÉV	carcinoma planocellulare

A tumoros betegek valamennyien a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Fogászati és Szájsebészeti Klinika Szájsebészeti Osztályán diagnosztizált, vagy kezelt páciensek. Random betegcsoport mintáit használtuk, függetlenül attól, hogy milyen stádiumban volt a kezelés. A kritérium annyi volt, hogy a klinikai diagnózis (megtekintés, tapintás alapján) „szájüregi tumor” legyen.

A műtétek és esetenként a próbaexcíziók utáni szövettani diagnózis alapján 3 páciens (7., 11., 13., a táblázatban sárga színnel jelölve) kiesett a vizsgálatból, mivel a preoperatív, illetve a diagnosztikai időszakban a klinikailag tumornak tűnő elváltozás a teljes szövettani feldolgozás után mégsem mutatott rosszindulatú jeleket. A 22. számú páciens szövettani diagnózisa: metaplasia, dyskeratosis, ami nem az egyértelműen malignus jeleket mutató szövettani vizsgálati lelet. A határ a jó- és rosszindulatú elváltozások között mégsem éles, sokszor a próbaexcízió sem a legjellemzőbb területről történik, esetleg nem mutatja a valóban fennálló malignitást. Emiatt nem vettük ki a vizsgálatból a pácienst, és végül a proteomikai mérés is azt mutatta, hogy megjelent a nyálmintájában a többi tumoros betegnél is identifikált fehérje.

A nyálmintákat a perioperatív időszakban vettük, 17 beteg estében a műtét után, 1 héten belül, 8 esetben pedig közvetlenül a műtét előtti napon, vagy a próbaexcízió napján. Feltételezéseink szerint a nyál protein szekréció nem rapidan változik, ezért a vizsgálatban nem alkottunk külön csoportokat a többfajta mintavételi idő szerint.

A betegek nemek szerinti megoszlása: 14/8 ffi/nő, életkori átlaga 61,6 év (46-77 év).

A férfiak átlag életkora 59,14 év, a nők átlag életkora 66 év.

A szövettani diagnózis szerinti megoszlás: cc.planocellulare: 14 ffi és 6 nő, laphám metaplasia: 1 nő, mucoepidermoid cc: 1 nő. A betegek szövettani diagnózisok és életkorok szerinti megoszlását a *7. táblázat* foglalja össze.

7. táblázat: A betegek szövettani diagnózisok és életkorok szerinti megoszlása

	carcinoma planocellulare		**laphám metaplasia dyskeratosis**		**mucoepidermoid carcinoma**	
		átlag életkor(év)		**átlag életkor(év)**		**átlag életkor(év)**
FÉRFI	**14**	**59,14**	**0**		**0**	
NŐ	**6**	**66,5**	**1**	**55**	**1**	**74**

Kontroll csoportként a tumoros betegekkel nem és kor szerint egyező, nem tumoros populációt választottunk. A vizsgált nem tumoros csoport nemek szerinti megoszlása: 12/8 ffi/nő, a 46 és 74 év közötti páciensek életkori átlaga 58.1 év.

4.2 Mintavétel

A pácienseket délelőtti időben vizsgáltuk, reggeli étkezés, és a szokásos otthoni szájápolás után. A mintavétel előtt nem történt invazív beavatkozás (röntgen sem).

Rövid beszélgetés során a betegeket tájékoztattuk a vizsgálat lényegéről, próbáltuk oldani a vizsgálattal együtt járó stressz szituációt. A stressz helyzet a szervezet egészét érintő reakció, ami a nyálelválasztást is jelentősen befolyásolja.

A szájüreget kétszer öblíttettük hideg csapvízzel. Steril fecskendőbe gyűjtöttünk 1-1.5 ml nyálat, ami a fecskendő érintésére – mint taktilis ingerre képződött (ld. *2.ábra*). A mintákat Eppendorf csövekbe helyeztük (*ld. 3. ábra*), és azonnal -80 ^{o}C hőmérsékletre hűtöttük, itt tároltuk a laboratóriumi vizsgálatig.

A mintavételhez szükséges időt mértük az első öblítés kezdetétől a fagyasztókonténerbe helyezés befejeztéig.

3. ábra: Mintavétel és Eppendorf cső

Felhasznált szükséges anyagok: öblítőpohár, egyszerhasználatos fecskendő, Eppendorf cső.

A kontrollcsoportból 10-10 pácienst felkértük, hogy a taktilis mintavétel után engedélyezzék, hogy a másik kettő (fentebb leírt 1. illetve 2. módszer, 18. oldal) mintavételi módszerrel is gyűjthessünk nyálmintát. Minden esetben mértük az időt a stimuláció illetve a viaszrágás megkezdésétől a minta fagyaszókonténerben való elhelyezéséig.

4.3. A minták feldolgozásához használt módszerek

4.3.1. Elektroforézis

Az elektroforézis olyan szeparációs technika, melynek lényege, hogy a vizes közegben létrehozott elektromos térben a töltéssel rendelkező molekulák elmozdulnak az ellentétes töltésű elektród felé, és ha vándorlásuk iránya vagy sebessége különböző, egymástól fizikailag elválaszthatók. A vándorlás sebessége függ a molekula töltésétől, tömegétől és alakjától függő súrlódási együtthatótól, továbbá az elektromos tértől. Akrilamid és biszakrilamid polimerizációjával, kovalens kötésekkel térhálósított, kitűnő fizikai tulajdonságokkal rendelkező elektroforetikus mátrix készíthető. A monomerek koncentrációjával szabályozható a gél pórusnagysága. A poliakrilamid géleket általában két üveglap között, géllemez formájában polimerizálják, az elektroforézis függőleges helyzetben történik. A fehérjéket nátrium-dodecil-szulfát (SDS) jelenlétében denaturálják, így egymástól elválaszthatók lesznek tömegük alapján. Az SDS kötődik a polipeptid lánc apoláris oldalláncához és így a fehérjének nagy negatív töltése lesz. Ha a fehérje több láncból épül fel, akkor például: merkaptoetanol segítségével a láncok elválaszthatók és relatív tömegük meghatározható. A fehérjék vizualizálás (festés, autoradiográfia) után foltokként jelennek meg a gél-képen.

4.3.2. Tömegspekrometriás vizsgálat

A tömegspektrometria (mass spectrometry, MS) szerves és szervetlen komponensekből képződött ionok tömeg/töltés (m/z) arányának mérésén alapuló nagyhatékonyságú szerkezetvizsgáló és analitikai módszer. A módszer azon alapul, hogy az elemzett anyag részecskéiből a gép ionokat állít elő, majd ezeket relatív tömegük és töltésük hányadosa szerint az analitikus rendszere szétválasztja.

4.3.2.1. A tömegspektrométer felépítése és működése (*ld. 4. ábra*):

A tömegspektrométer részei: mintaelőkészítő-bevivő rendszer, ionforrás, analizátor és detektor, valamint az ezekhez kapcsolódó számítógépes adatfeldolgozó és irányító rendszer. Az analizátor, a detektor és az ionforrások viszonylag jelentős vákuum (10^{-4}–10^{-7} mbar) mellett üzemeltethetők. A nagyvákuum az ionizáció hatékonyságának növelését, másrészt az ion-molekula ütközések minimalizálását szolgálja. Ezek a nem kívánt kölcsönhatások módosíthatnák az ionok repülési pályáit, részben vagy teljesen kiolthatnák töltésüket, így reprodukálhatatlanná tehetnék a tömegspektrumot. A nagyvákuum alkalmazása nagyban növeli az érzékenységet és a felbontást is.

4.ábra: A tömegspekrometriás készülék

4.3.2.2. Mintaelőkészítés

Tömegspektrometriával elméletileg bármilyen halmazállapotú sokkomponensű rendszer vizsgálható, azonban ezt nagyban befolyásolja az alkalmazott mintabeviteli és ionizációs technika. Illékony vegyületeket (például: gázok, könnyen párolgó anyagok) közvetlenül be lehet vezetni a forrásba, ahol az ionizáció megtörténik. Ha a vegyület nem ilyen, akkor először fel kell oldani, oldat formájában cseppenteni a target lemezre (*ld. 5. ábra*), majd valamilyen alkalmas megoldással gázfázisba juttatni; ez történhet elektromos erőtér vagy porlasztás és szárítógáz segítségével. Az oldószer helyes megválasztása alapvetően befolyásolja a tömegspektrum minőségét. Általánosságban kerülendő a pufferek és a nem illékony sók alkalmazása.

5. ábra: Minták felcseppentése a target lemezre

4.3.2.3. Ionforrások

A méréshez szükség van a vizsgált részecskék ionizálására, mivel a készülékben való mozgatásuk az elektromos töltésükre gyakorolt hatás alapján történik. Optimális ionizálási feltételek kellenek a megfelelő érzékenység eléréséhez, a maximális szerkezeti információ kinyeréséhez. Az ionizációs technika megválasztását főként a vizsgálandó molekula és az azt körülvevő mátrix határozza meg. Mivel univerzálisan alkalmazható ionizációs technika nincs, így a készülékek fejlődésénél meghatározó szerepű a különböző ionforrások cseréjének gyorsasága és egyszerűsége.

A legrégibb és igen gyakran alkalmazott eljárás az elektron-ionizáció (EI). Ilyenkor a minta egy fűtött katódból kilépő elektronnyalábbal találkozik és az ütközések révén elektronok lépnek ki, így pozitív ionok jönnek létre. A módszer jól alkalmazható a könnyen gázfázisba vihető szerves vegyületek széles körének vizsgálatára kb. 1000 Da molekulatömegig. Hátránya, hogy megfelelő eredményességgel csak a viszonylag illékony, kis molekulatömegű, stabil vegyületek esetében alkalmazható, valamint a jelentős fragmentáció miatt a tömegspektrum bonyolult lehet. Lágy ionizációs technikák alkalmazásánál, amelyek kevesebb fragmentumot hoznak létre a spektrum egyszerűbb, könnyebben értelmezhető.

A lágy ionizációs módszereket három csoportba soroljuk (*ld. 8. táblázat*): részecske ütközéses technikák, párolgáson-porlasztáson alapuló módszerek és lézer deszorpciós módszerek. A részecske ütközésen alapuló technikák közé tartozik a kémiai ionizáció (CI), a szekunder ion tömegspektrometria (SIMS), a gyors atom és ionütköztetés (FAB, FIB) és a plazma deszorpció (PD). A párolgáson-porlasztáson alapuló eljárások a térdeszorpció (FD) és térionizáció (FI), termospray (TS) atmoszférikus nyomáson lejátszódó kémiai ionizáció és fotoionizáció (APCI, APPI) és elektrospray (ESI). A lézer deszorpciós (LDI) technikák közül a jelentősebbek a mátrix-segítette lézer deszorpció (MALDI) és a felület-segítette lézer deszorpciós ionizáció (SELDI).

8. táblázat: *Az ionizációs technikák összefoglalása*

Ionizációs technikák		
elektron ionizáció	lágy	
	részecske ütközés	CI
		SIMS
		FAB
		FIB
		PD
	párolgás-porlasztás	FD
		FIB
		TS
		APCI
		APPI
		ESI
	lézer deszorpciós	MALDI
		SELDI

4.3.2.4. Analizátor

Az analizátorban a képződött ionok szétválasztása történik a tömegük és a töltésük hányadosa szerint. Minél kisebb az ion tömege és minél nagyobb a töltése, annál nagyobb sebességre képes szert tenni egy adott gyorsítófeszültség hatására. Tulajdonképpen ezt használják ki az ionok transzportján alapuló módszerek. Az újabb, modernebb készülékek inkább az ionok szelektív tárolása révén választják szét a részecskéket. Az analizátor jellemző paraméterei a maximális vizsgálható tömeg, az áteresztőképesség (a detektált és a képződött ionok számának hányadosa), illetve a maximális felbontóképesség. A legfejlettebb tömegspektrométerek esetében az utóbbi érték elérheti az egymilliót is.

Az egyik legelterjedtebb analizátor típus az ún. quadrupol tömegszűrő elven működik. Itt az ionok négy párhuzamos hengeres rúd között haladnak, amelyekre egyenáramot és nagyfrekvenciás váltóáramot kapcsoltak. A szemben lévő rudak azonos, a szomszédosak ellentétes polaritásúak, így közöttük oszcilláló elektromos tér alakul ki. Az ide bejutó ionok különböző amplitúdójú kitéréseket végezve haladnak, a rudak közti ideális pályát csak meghatározott m/z értékű ionok képesek tartani. A quadrupol készülékek viszonylag egyszerűbben működtethetők, gyorsak, jól kombinálhatók különféle ionforrásokkal. Hátrányuk, hogy tömegpontosságuk és felbontóképességük viszonylag alacsony. Hasonló elven működik az ioncsapda is.

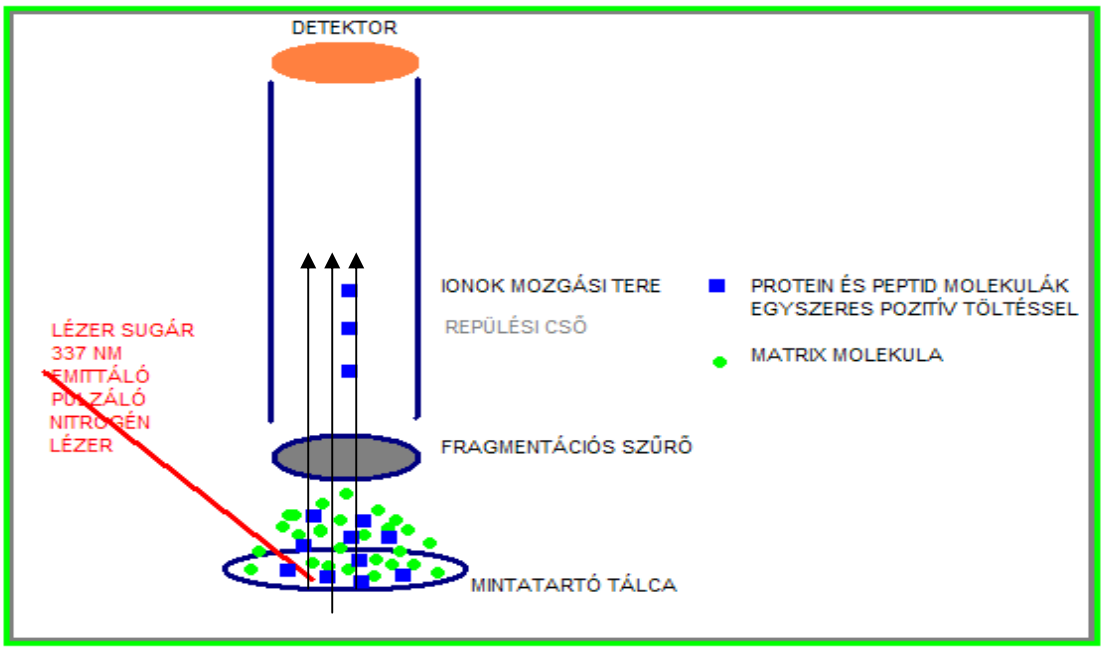
Az elektrotechnika fejlődésével lehetővé vált igen kicsiny időkülönbségek pontos észlelése, amely a repülési időn (time-of-flight, TOF) alapuló elválasztás alapját képezi. A TOF készülékekkel ma már igen jó felbontóképesség, széles mérési tartomány érhető el, viszonylag egyszerűek és olcsók; megfelelő ionforrással (MALDI) kombinálva a nagyobb biomolekulák vizsgálatában nélkülözhetetlenek [73].

Vizsgálatainkban MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight) típusú eszközt használtunk a mérések elvégzésére. Ez a technika a nem illékony biopolimerek, peptidek, fehérjék, valamint szintetikus rendszerek szerkezetének komplex tanulmányozására kitűnően alkalmas. A tömegspektrométerek rendkívül kis anyagmennyiségű minták (femtomol-nyi mennyiségben) gyors, pontos, megbízható analízisére alkalmasak, az elválasztás-technikában használatos módszerekkel jól kombinálható készülékek.

Minőségi analízist végezhetünk, a gép alkalmas a nagy áteresztőképességet igénylő mérésekre (high throughput típus), hiszen akár napi 6500 mérést is képes elvégezni automatizált üzemmódban. Használatával szekvencia információkhoz juthatunk, és

kémiai módosítások pontos kimutatására valamint verifikációra is alkalmas. Mennyiségi mérésre nem használható, erre inkább kromatográfiás méréseket alkalmazhatunk. A vizsgált minták áttekintő felmérése (screening) egyszerűen és gyorsan elvégezhető. Az eszköz fenntartása relatíve olcsó, működési elvéből fakadóan nem jellemző a meghibásodása.

A MALDI TOF tömegspektrométer működésének sematikus rajzát a *6. ábra* mutatja.



6. ábra: A MALDI TOFtömegspektrométer működésének sematikus rajza [73].

4.3.3. A fehérjék elválasztása

A tumor marker fehérjék identifikálásához négy, szövettanilag reprezentatív tumoros beteg, és 5 kontroll páciens fagyasztott nyálmintáját felolvasztottuk, 200 µL mennyiséget felhasználva homogenizáltuk pH 7,4-es, 20 mM Tris/HCl puffer, 3 mM EDTA, 5 mM betamercaptoethanol és 1% SDS közegben, Ultra Turrax homogenizátorral. Egy % bromphenolkék hozzáadása után a mintákat 2 percig forraltuk, majd centrifugáltuk (8000 g, 2 min). Tizenkét %-os SDS gélen elektroforézist végeztünk. A molekulatömeg meghatározásához Pharmacia alacsony móltömeg kalibrációs kitet használtunk, amely a tumoros betegek géljén az 1. oszlopban látható. További kalibrációként a 10. oszlopban marha szérumalbumint használtunk. A géleket

Coomassie brillant blue R-250-nel festettük, a festékkivonó oldat 5% (v/v) ecetsavat és 16% (v/v) methanolt tartalmazott.

Az elektroforetikus futtatás után az extra sávokat, amelyek a betegek mintáiban keletkeztek, szikével kimetszettük. Minden oszlopból a 10mm, 22,5mm és a 36,5mm magasságban történt a sáv kiemelése. Azért ezeknél az értékeknél, mivel szemmel láthatóan ezeken a pontokon találtunk extra sávokat a betegek mintáiban. A kimetszett sávokat Eppendorf csőbe helyeztük, festékmentesítettük 3x10 perces, 200 µL 50%-os (v/v) acetonitril, és 50 mM NH_4HCO_3 oldatban.

4.3.4. Triptikus emésztés és MALDI TOF/TOF MS

A gél darabokat szobahőmérsékleten dehidráltuk, majd 10 µL tripszin (0.04 mg × mL^{-1}) Tris puffer (2.5 mM, pH 8.5) oldattal 37℃-on 1 éjszakán át inkubáltuk. A kivont peptideket 15 perces ultrahangos fürdőben 15 µL acetonitril és hangyasav (49/50/1 v/v/v) vizes oldatban tartottuk. Az oldatból való kivonás után a peptideket liofilizáltuk, és újrafeloldottuk vízben. A liofilizált fehérje triptikus emésztményének vizes oldatát a mintatartó lemezre (MTP 384 massive target plate, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) vittük fel. A mintatartó tálcán minden egyes 1 µL térfogatú mintaoldathoz 1 µL telített mátrix oldatot kevertünk. A mátrix oldatot minden felhasználás előtt frissen készítettük: α-ciano-4-hidroxi-fahéjsavat (CHCA) acetonitril /0.1% TFA (1/2 v/v)-ben oldva.

A tömegspektrometriás méréshez Autoflex II TOF/TOF típusú (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) készüléket használtuk. A MALDI TOF “peptid mass fingerprint (PMF)” elkészítésére a LIFT mode for PSD (post source decay) és CID (collision-induced decay) fragmentációt alkalmaztuk automatizált üzemmódban, FlexControl 2.4 számítógépes program vezérlésével. A PMF-hez 20 kV gyorsítófeszültséget használtunk. A műszer 337 nm-en emittáló pulzáló nitrogén lézert alkalmaz a minta és a mátrix elpárologtatásához és ionizációjához (model MNL-205MC, LTB Lasertechnik Berlin GmbH., Berlin, Germany). Minden egyes mérés előtt külső tömegkalibrációt végeztünk a Bruker Peptide Calibration Standard szet segítségével (#206195 Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A mérések során m/z 800 és 5000 között detektáltuk a tömegspektrumokat, és minden egyes mérési eredményt 500 egymást követő lézer lövés egyesített adataiból számoltunk ki.

A fehérjék PMF azonosítása MSDB (Swiss-Prot) és NCBInr adatbázisok alkalmazásával, majd MASCOT adatbázis (MASCOT Server 2.2 search engine, Matrix

Science Ltd., London, UK) kereső motor és Bruker BioTools 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) segítségével történt. A keresés során az egyszeresen pozitív töltésű monoizotópos peptidcsúcsokat vettük figyelembe, keresési hibahatárnak 100 ppm-et, illetve 1 kihagyott triptikus hasítási helyet adtunk meg. Az adatok további feldolgozását a Bruker FlexControl 2.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) és a Bruker FlexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) programok segítségével végeztük el. A MALDI-TOF/TOF tömegspektrometria felhasználásával azonosítottuk azokat a fehérjéket, melyek jelenléte kimutatható a betegségek manifesztációja során, illetve amik diagnosztikai értékűek lehetnek. A meghatározás során rögzítettük az elsődleges tömegspektrumot, majd ezt követően a nagyobb intenzitású, vagy diagnosztikailag jelentős peptideket PSD,- vagy CID-fragmentációval tovább bontottuk. Így tudtuk meghatározni a peptidek pontos elsődleges szerkezetét és annak módosulásait.

4.3.5. A spektrogram értékelése

Minden minta analízise során egy grafikont készít a számítógép, aminek az értékelésével határozhatjuk meg magát a keresett fehérjét. A grafikon y tengelyén a jel intenzitása (egyenes arányban az adott peptid mennyiségével), az x tengelyen a móltömeg/töltés látható. Ennek megfelelően minden mintából készült ábra segítségével leolvasható, hogy milyen móltömegű peptid milyen arányban volt jelen. Az ábrán csúcsok láthatóak, amelyek 1-1 azonos móltömegű peptid mennyiségét jelzik. Ennek a grafikonnak, és az adatbázisban hozzáférhető fehérjék spektrogramjának összehasonlításával azonosíthatjuk a mintában lévő fehérjéket.

4.3.6. Célzott peptid analízis

Ezt az analitikai módszert azért választottuk, hogy a fent leírt módszer helyett egy időben rövidebb, ráfordításban olcsóbb eljárást keressünk, a nagy áteresztőképesség érdekében. Nem szükséges hozzá az elektroforetikus futtatás és peptid kivonás a gélből, direkt nyálminta felhasználással végeztük a méréseket, és az előzőleg kimutatott fehérjékre fokuszáltunk.

A célzott peptid analízishez 50 µl mennyiségű nyálat higítottunk 100 µl 50 mM koncentrációjú NH_4HCO_3 oldattal, ezt követően végeztük a tripszines emésztést, illetve a MALDI TOF/TOF MS analízist a korábbiakban leírtaknak megfelelően.

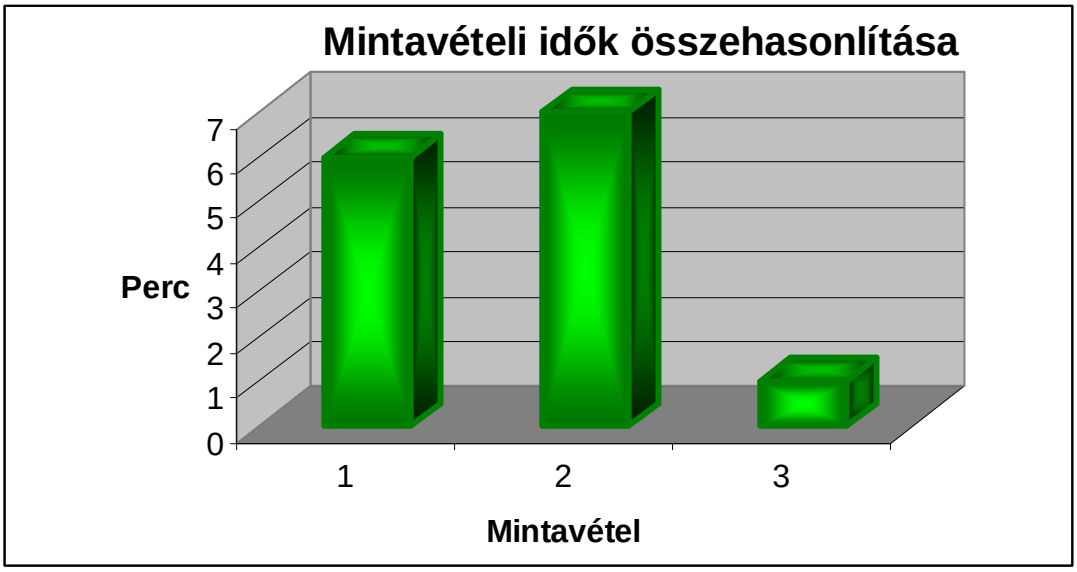
5. Eredmények

5.1. A mintavétel egyszerűsítése

Korábbi tudományos közleményekben fellelt stimulációs nyál mintavételi módszereket összehasonlítva az általunk alkalmazott módszerrel, kimutattuk, hogy ez kevesebb eszközt igényel, rövidebb idő alatt elvégezhető. A mért eredményeket a 9*. táblázatban és a 7. ábrán* szemléltettük.

9. táblázat: A különböző mintavételi módszerek összehasonlítása idő és eszközigény szempontjából.

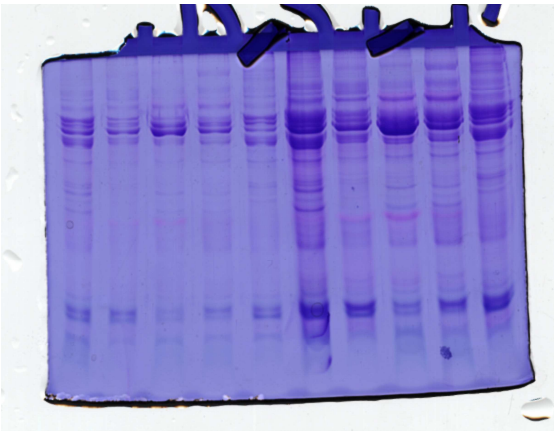
	stimulációs módszer (1)	**viaszrágásos módszer (2)**	**saját „taktilis" módszerünk (3)**
időigény átlag	6 perc	7 perc	1 perc
eszközigény	fogkefe, fogkrém, öblítőpohár, steril köpőcsésze, Eppendorf cső	fogkefe, fogkrém, öblítőpohár, fogászati viasz, steril köpőcsésze, Eppendorf cső	öblítőpohár, egyszerhasználatos fecskendő, Eppendorf cső

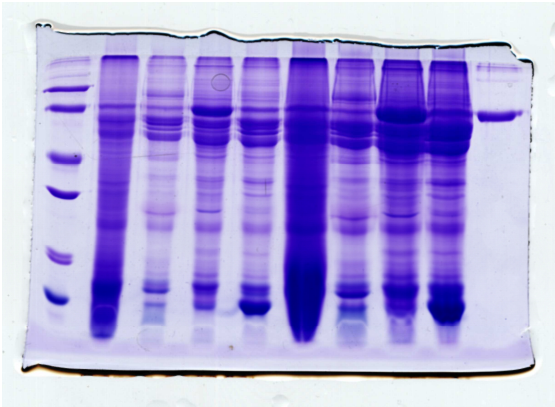


7. ábra: a mintavételi idők összehasonlítása

5.2. Reprezentatív minták vizsgálata

A szövettanilag csoportosított mintákból reprezentatív módon (a szövettani típusok szerint) kiválasztott 4 tumoros és 5 egészséges páciens nyálmintájának fehérjéit elektroforézissel elválasztottuk, majd megfestettük (*ld. 8.a. ábra, 8.b ábramagyarázat*).





8.a. ábra: Kontroll páciensek gélje Tumoros betegek gélje

Kontroll páciensek gélje										Tumoros betegek gélje									
1. páciens	2. páciens	3. páciens	4.páciens	5. páciens	1. páciens	2. páciens	3. páciens	4. páciens	5. páciens	móltömeg kalibrációs kit	1. páciens, cc.planocellulare, ffi	2. páciens, cc.planocellulare, nő	3. páciens, metaplasia	4. páciens, mucoepidermoid cc	1. páciens, cc.planocellulare, ffi	2. páciens, cc.planocellulare, nő	3. páciens metaplasia	4. páciens, mucoepidermoid cc	marha szérum albumin kontroll
alacsony festék koncentráció					magas festék koncentráció						alacsony festék koncentráció				magas festék koncentráció				

8.b. ábramagyarázat : Az ELFO géleken látható oszlopok tartalma.

A kimetszett sávokban lévő peptidekről készült tömegspektrometriás vizsgálatban fehérjéket identifikáltunk, amelyek összesített listája a *10. táblázatban* látható.

10. táblázat: *Az összes kimutatott fehérje proteomikai paraméterei*

Fehérje neve	***Adatbázis kód***	***Mért peptidek***	***Elméleti móltömeg (Da)***	***Mascot érték***	***Szekvencia átfedés***
Annexin 1	gi|74756691	14	38690	164	50
Annexin 1	gi|442631	10	35018	114	37
Annexin 2	gi|113950	15	38552	137	42
Annexin A1	gi|113944	14	38559	163	50
Annexin A2	gi|113950	8	38449	87	26
Annexin A2	gi|73909156	16	40503	150	45
Cornulin Tumor related protein Squamous epithelial heat shock protein 53	gi|74761891	6	53502	89	30
Hypotetical protein (Annexin A2 homolog)	gi|34364597	16	40328	146	43
Keratin 1	gi|7331218	12	65978	80	29
Peroxiredoxin 1	gi|32455266	7	22096	80	27
Peroxiredoxin-2	gi|2507169	7	21747	84	28
Thioredoxin peroxidase	gi|9955007	7	21795	80	28
Neutrophil cytosolic factor 1	gi|115298672	6	44624	63	18
Adaptor-related protein complex 3	gi|5803000	7	46947	57	19
Serum albumin, chain A	gi|3212456	12	65695	129	21

A táblázatban piros színnel jelöltük azokat a fehérjéket, amelyek minden tumoros mintában előfordultak.

5.2.1 A tumor marker fehérjék kijelölése

A *11. táblázatban* foglaltuk össze a tumoros betegek és a kontrollcsoport mintáinak vizsgálati eredményeit. Itt lehet látni, hogy van két olyan fehérje, amely minden beteg mintájában előfordult, illetve minden nem tumoros páciens mintájából hiányzott. Mindkét fehérjének fontos szerepe van a tumorgenezis illetve a tumorprogresszió folyamatában.

11.táblázat: A fehérjék előfordulása a különböző mintákban

A fehérje neve	***Kontroll páciensek***	***Tumoros betegek***
Annexin 1	0/5	4/4
Annexin 1*	0/5	3/4
Annexin 2	0/5	3/4
Annexin A1	0/5	3/4
Annexin A2	0/5	3/4
Annexin A2*	0/5	3/4
Cornulin Tumor related protein Squamous epithelial heat shock protein 53	3/5	3/4
Hypotetical protein (Annexin A2 homolog)	0/5	3/4
Keratin 1	5/5	4/4
Peroxiredoxin 1	0/5	3/4
Peroxiredoxin-2	0/5	4/4
Thioredoxin peroxidase	0/5	2/4
Neutrophil cytosolic factor 1	1/5	3/4
Adaptor-related protein complex 3	4/5	3/4
Serum albumin, chain A	5/5	4/4

* Az adott fehérje néhány aminosavban eltérő változata

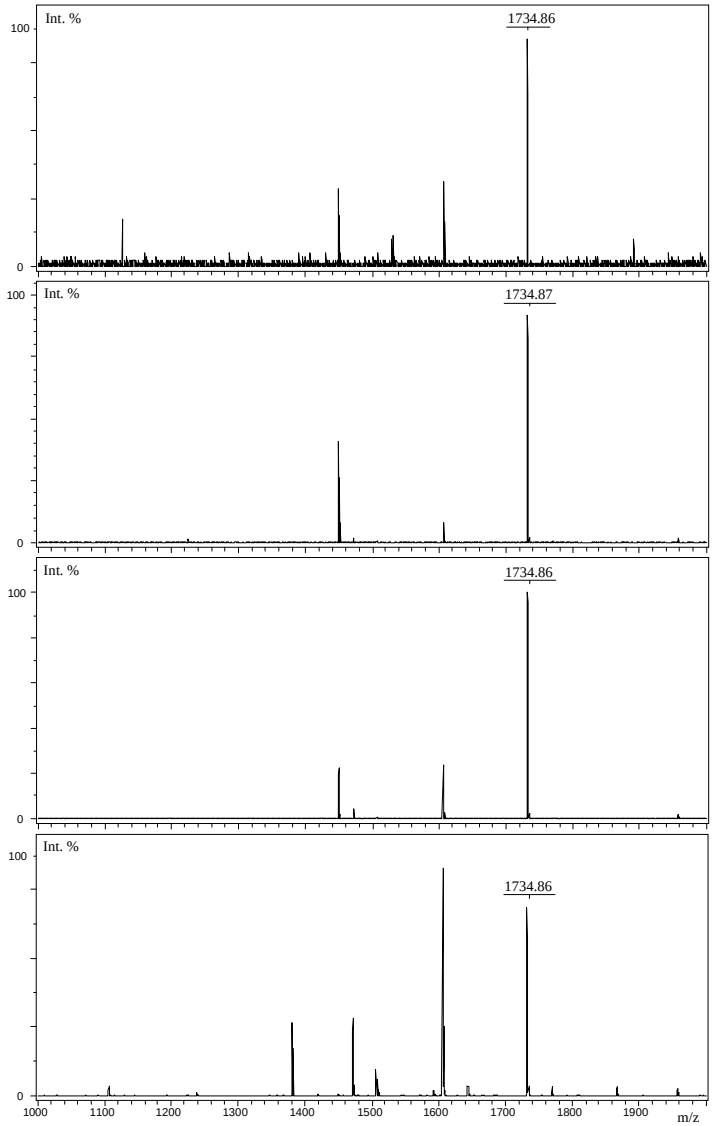
A táblázatban piros színnel jelöltük azokat a fehérjéket, amelyek minden tumoros mintában előfordultak, és minden nem tumoros mintából hiányoztak. Ezeket a fehérjéket tekintettük a vizsgálatainkban fellelhető legjobb tumormarkereknek.

A *12. táblázatban* összefoglaltuk a kiválasztott fehérjék analitikai tulajdonságait.

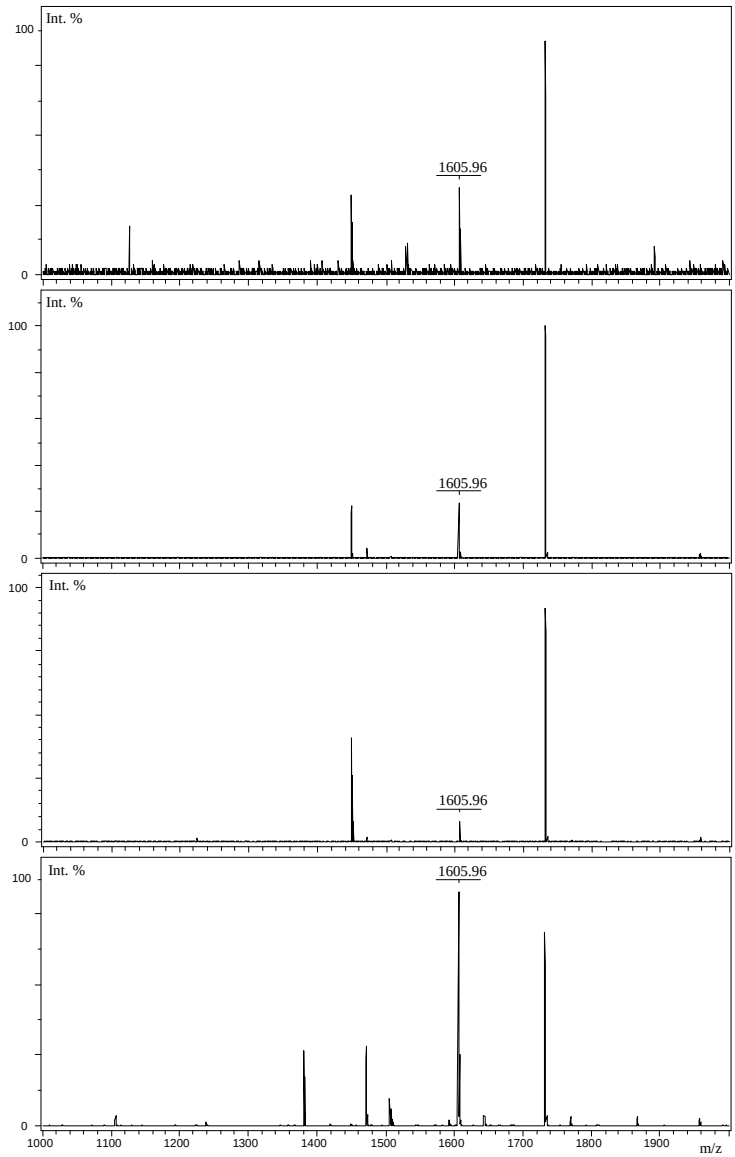
12.táblázat: A kiválasztott fehérjék analitikai tulajdonságai

Fehérje neve	***Szekvencia tartomány***	***Peptidszekvencia***	***Elméleti móltömeg(Da)***	***Mért móltömeg (Da)***
Annexin 1	[99-113]	ALTGHLEEVVLALLK	1605.957	1605.96
Peroxiredoxin-2	[92-108]	EGGLGPLNIPLLADVTR	1734.862	1734.86

Négy reprezentatív pácienst választottunk a szövettani típusok és a férfi/nő reláció figyelembevételével (ld 23.oldal 7.táblázat). A *9. és 10. ábrán* látható a kiválasztott daganatos betegek nyálmintájából készített spektrogram.



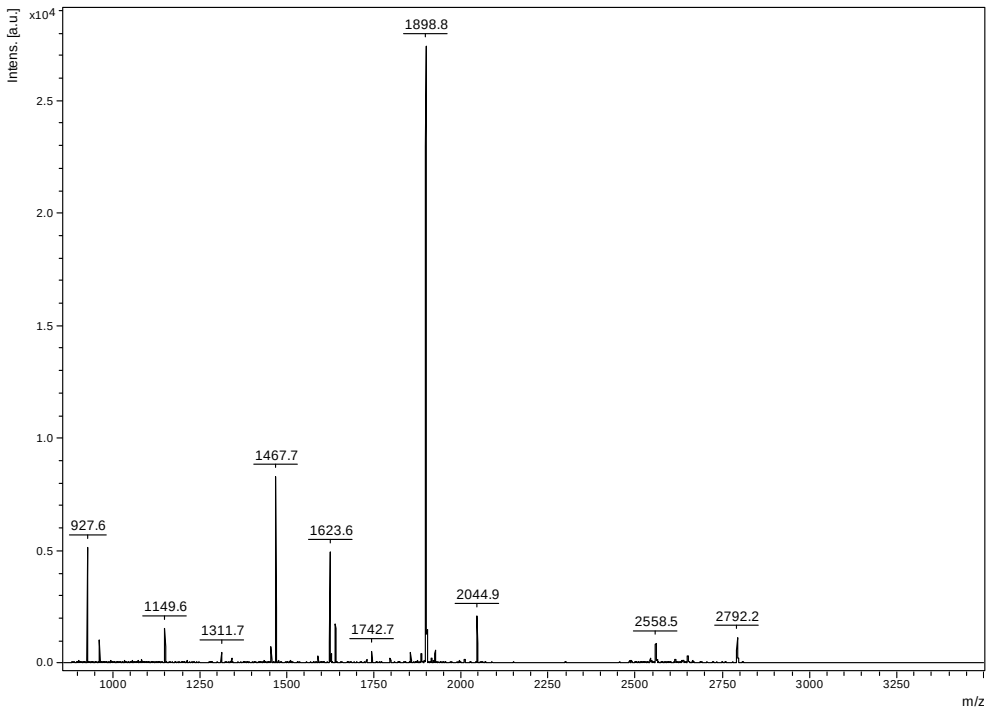
9. ábra: 4 reprezentatív tömegspektrogram, ahol a tumoros betegek mintáiban keresett annexin 1 megtalálható.



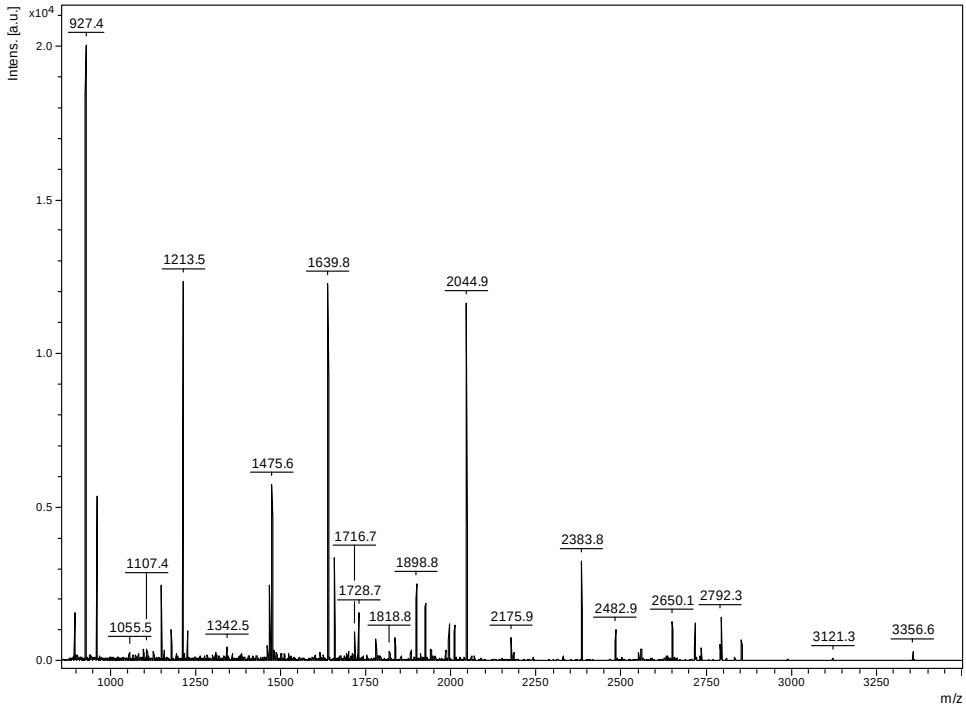
10. ábra: 4 reprezentatív tömegspektrogram, ahol a tumoros betegek mintáiban keresett peroxiredoxin-2 peptidet identifikáltuk..

5.2.2. A vizsgálatokban identifikált fehérjék tömegspektrumai

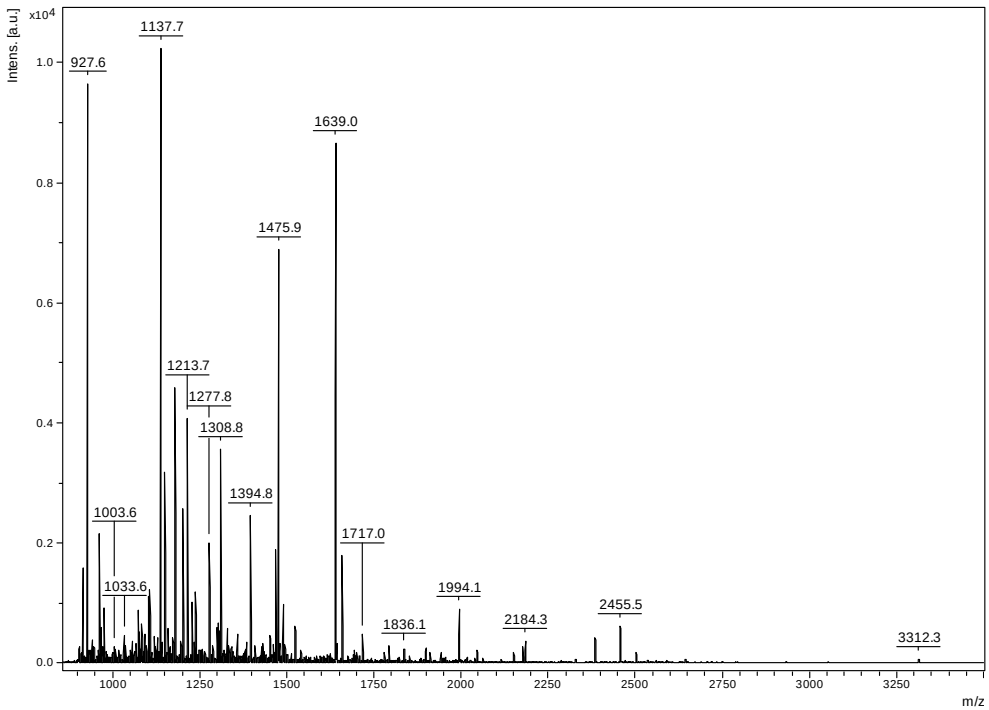
A következő oldalakon (a *11-22. ábrákon*) látható a vizsgálatok során identifikált fehérjék jellemző tömegspektrumai. A felsorolás sorrendjét a fehérjék mólsúlya szerint állítottuk össze.



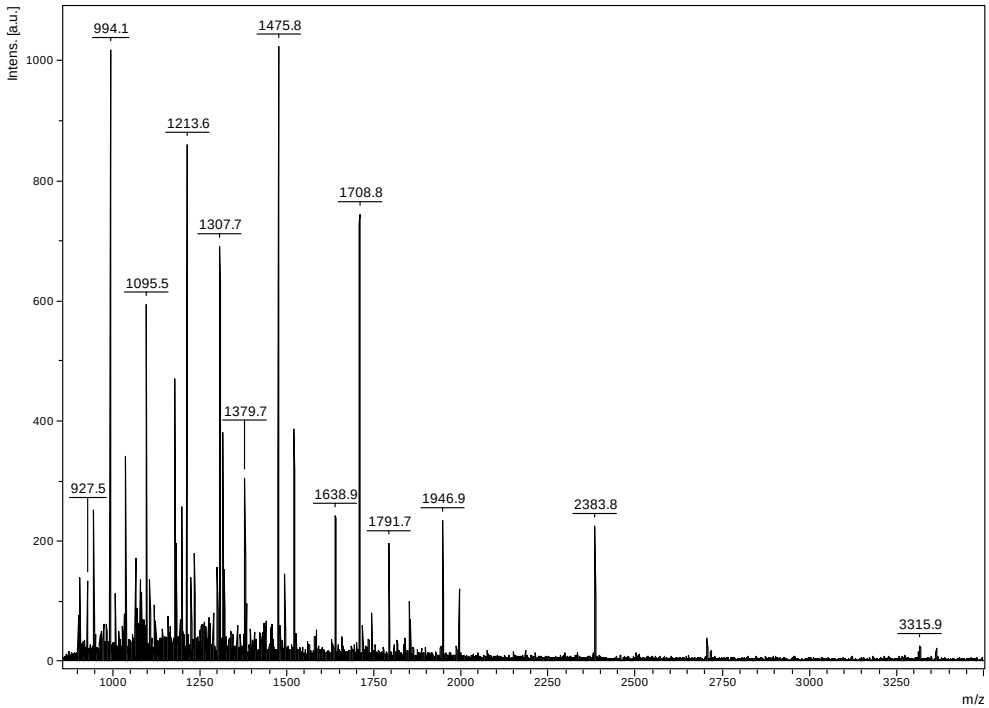
11.ábra: gélelektroforézis során elválasztott **humán szérum albumin A lánc** tipikus spektruma



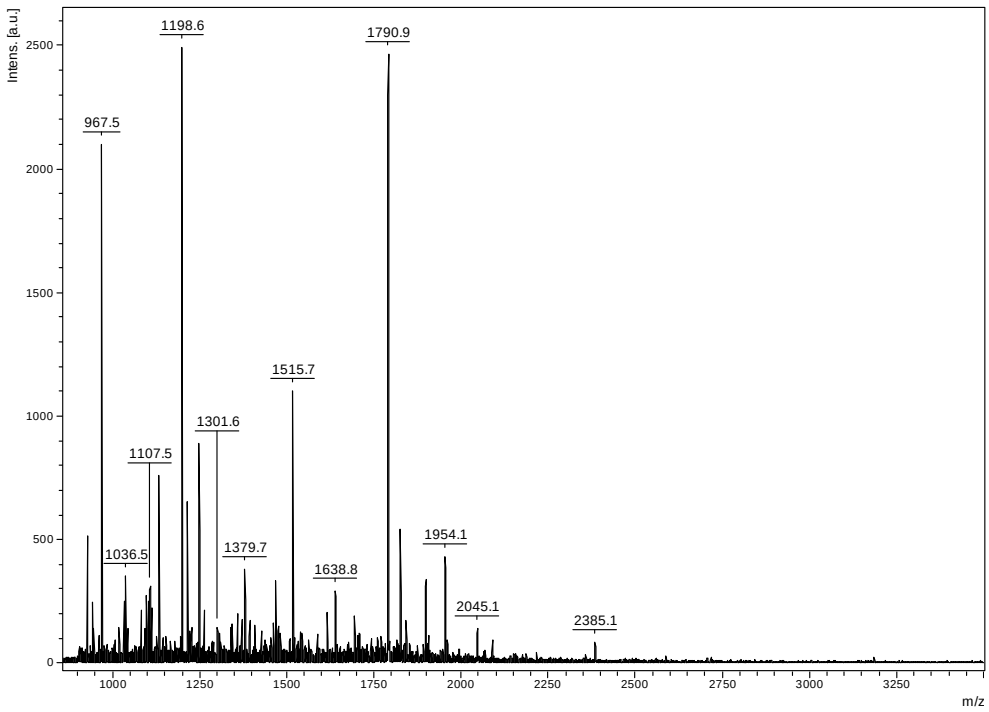
12.ábra: gélelektroforézis során elválasztott **cornulin + keratin 1** tipikus spektruma. A két fehérje móltömege egymáshoz nagyon hasonló, ezért jelennek meg együtt, egy tipikus spektrumon.



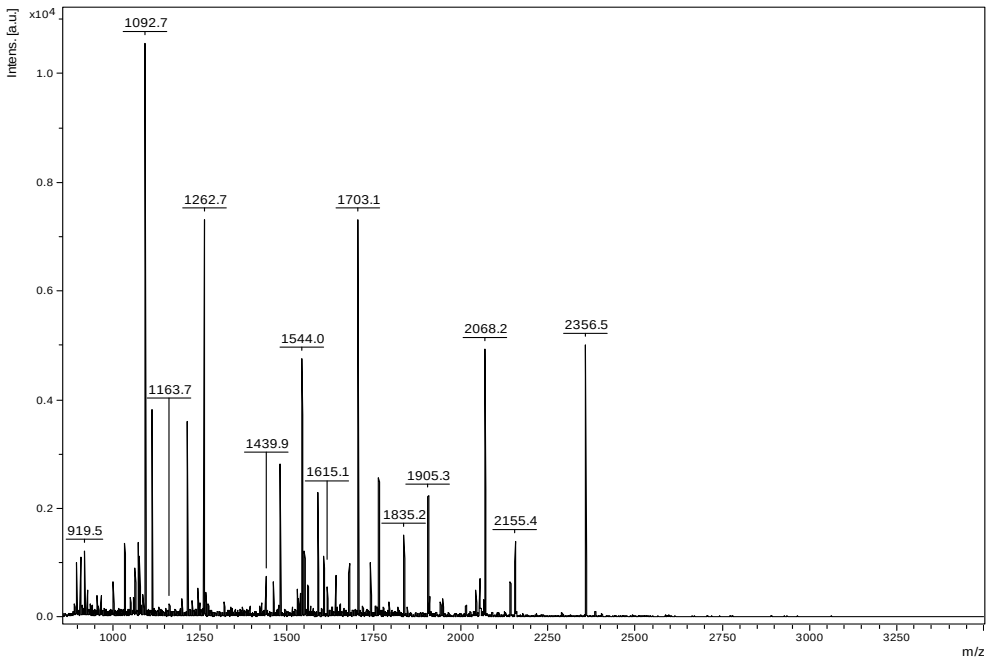
13.ábra: gélelektroforézis során elválasztott **szérum albumin + keratin 1** tipikus spektruma. A két fehérje móltömege egymáshoz nagyon hasonló, ezért jelennek meg együtt, egy tipikus spektrumon.



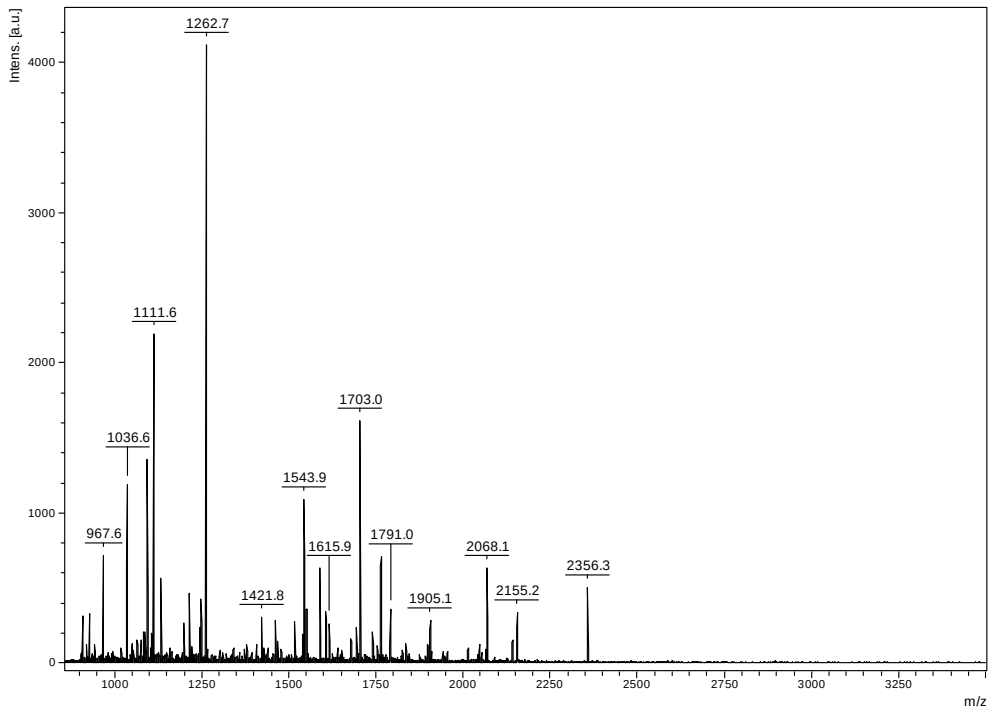
14.ábra: gélelektroforézis során elválasztott **keratin 2** tipikus spektruma



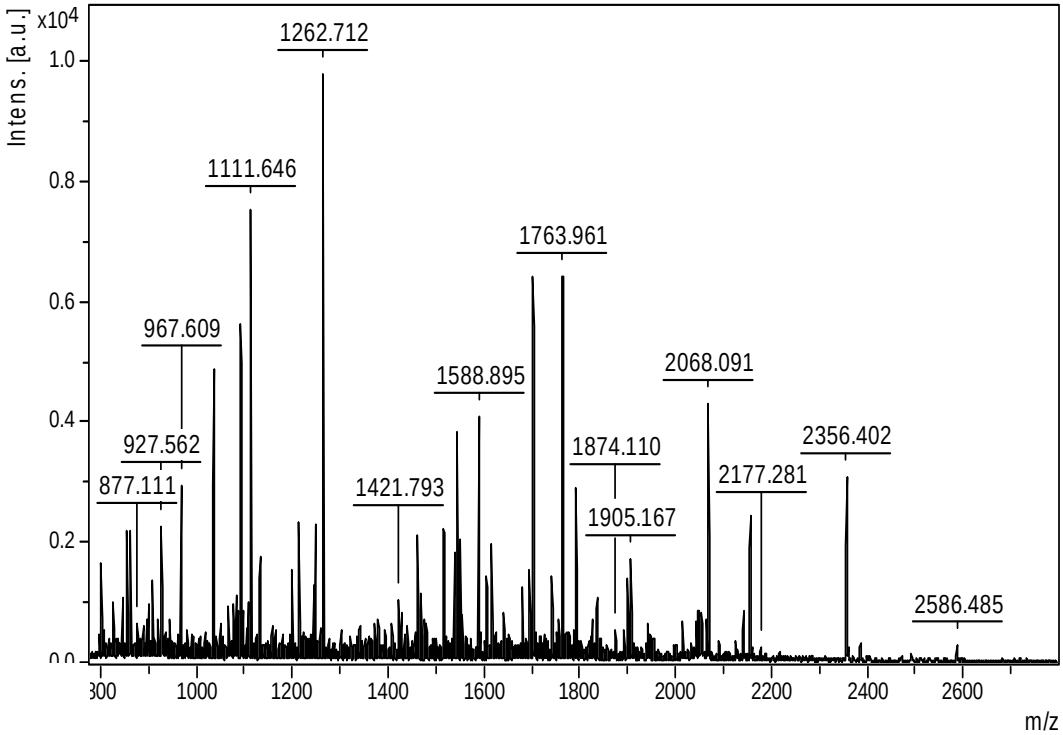
15.ábra: gélelektroforézis során elválasztott **keratin 13** tipikus spektruma



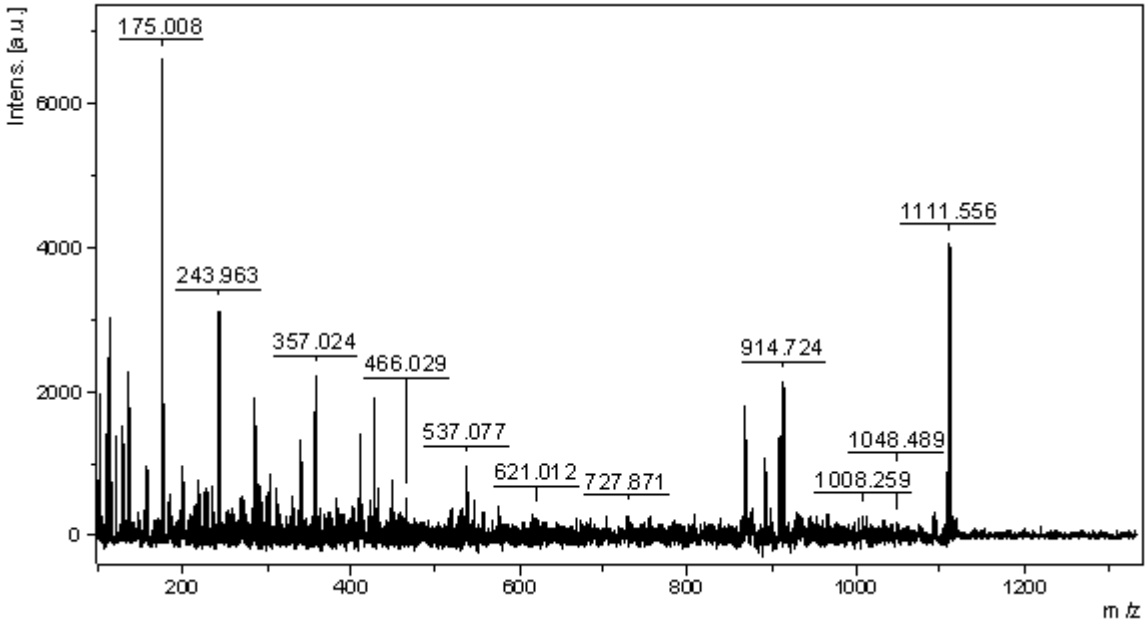
16. ábra: gélelektroforézis során elválasztott **keratin 2** tipikus spektruma



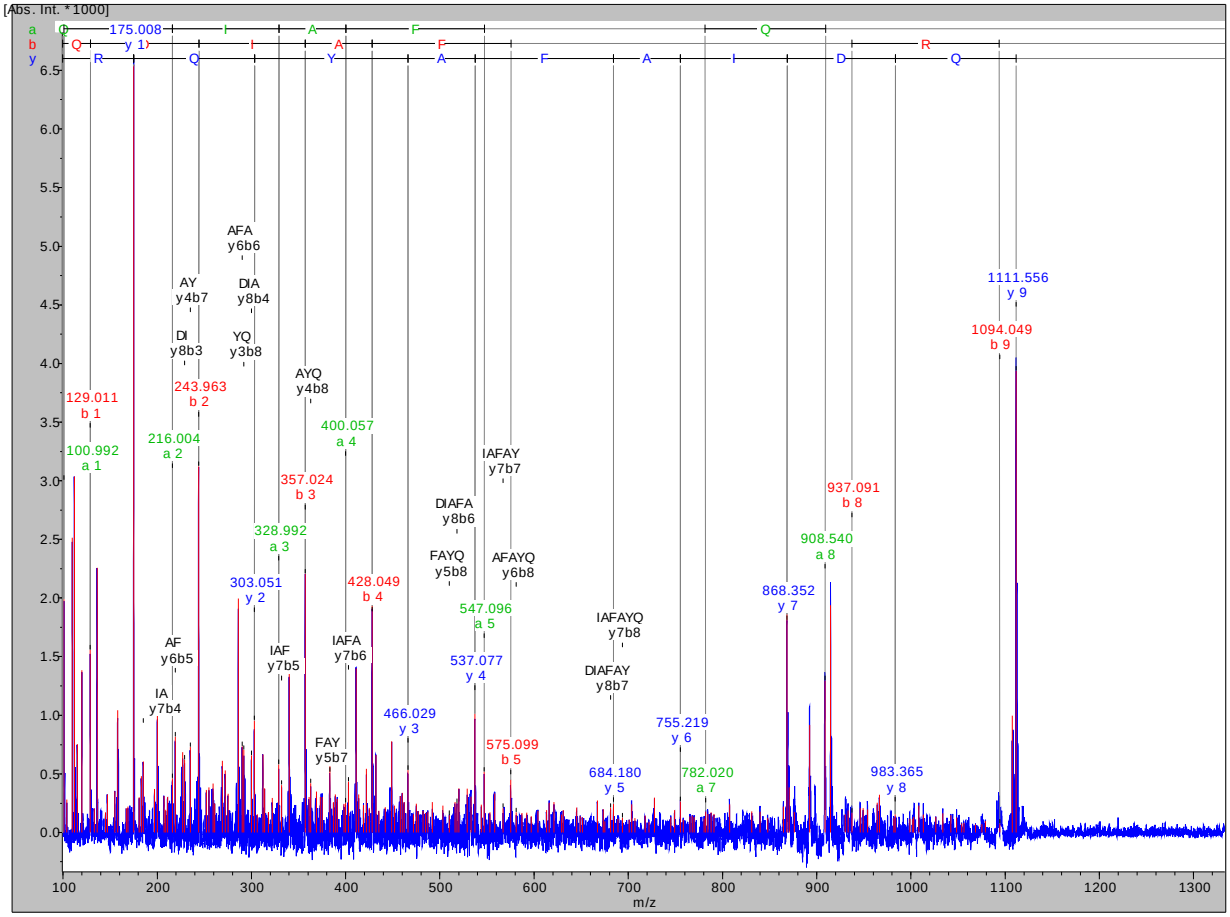
17.ábra: gélelektroforézis során elválasztott **annexin A1 + annexin A2** tipikus spektruma. A két fehérje móltömege egymáshoz nagyon hasonló, ezért jelennek meg együtt, egy tipikus spektrumon.



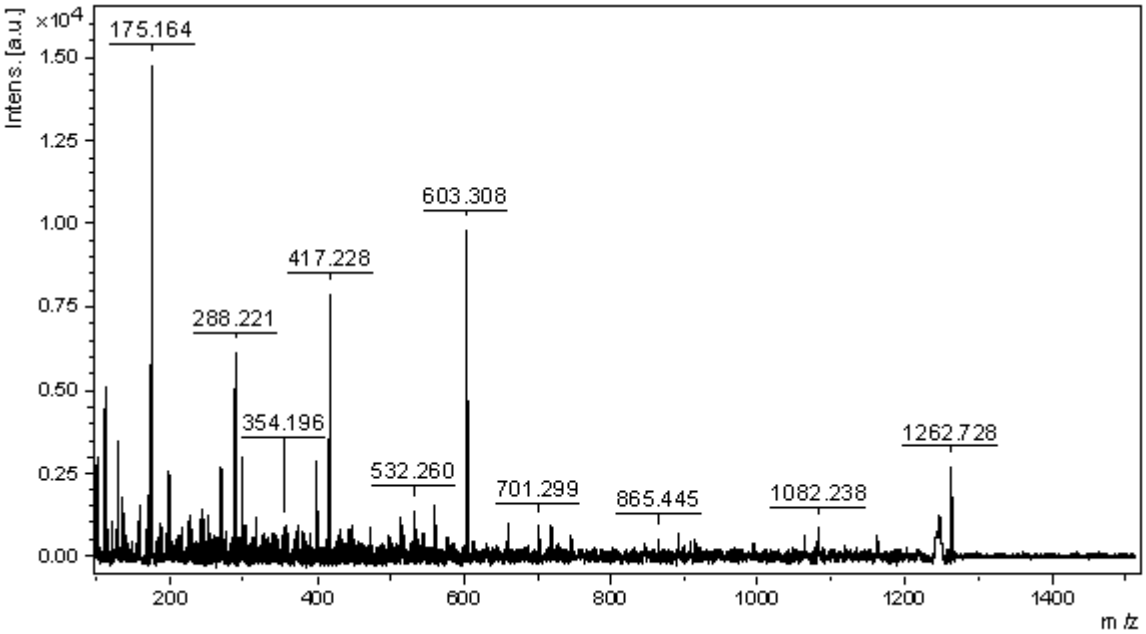
18.ábra: gélelektroforézis során elválasztott **annexin 1** tipikus spektruma



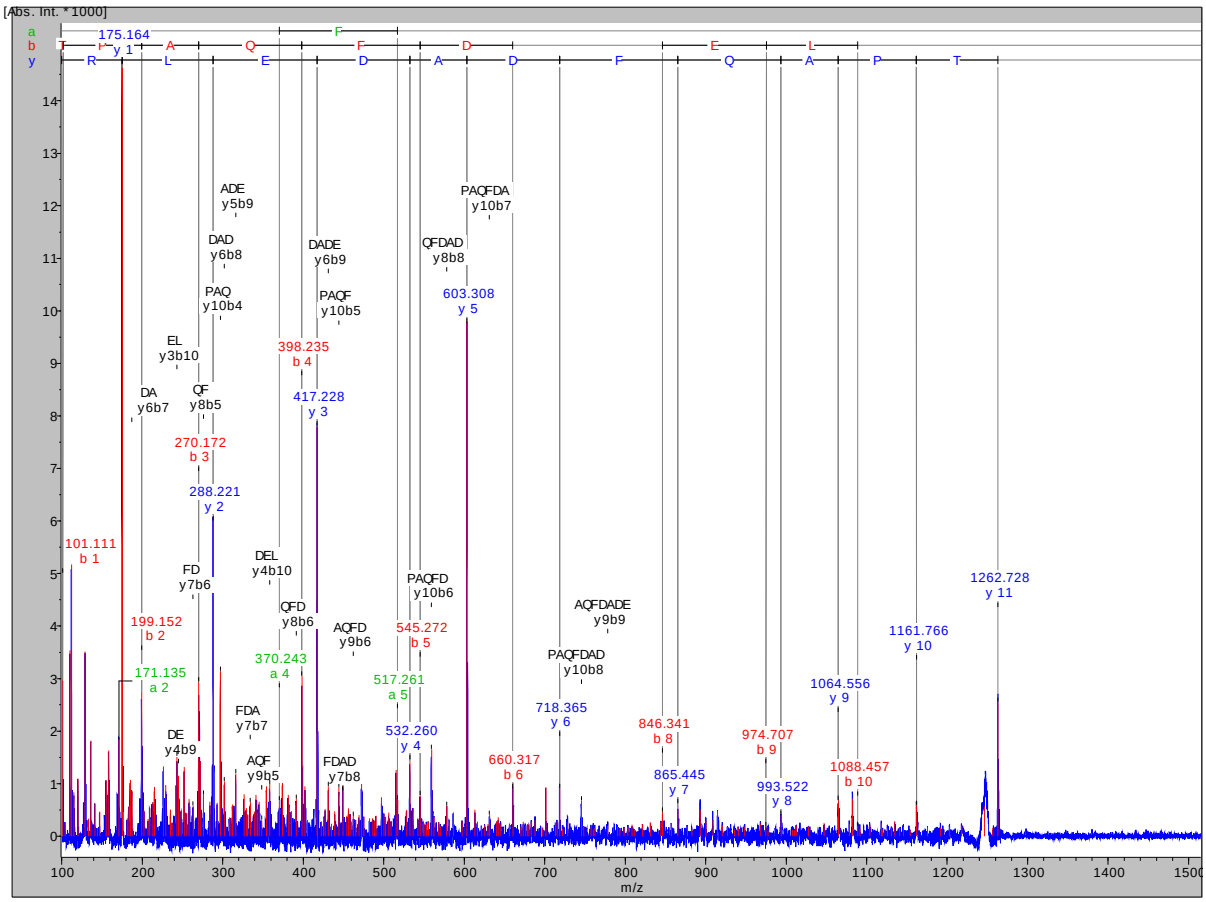
19/a ábra: **annexin A2** QDIAFAYQR peptid fragmentjének nyers MS/MS spektruma



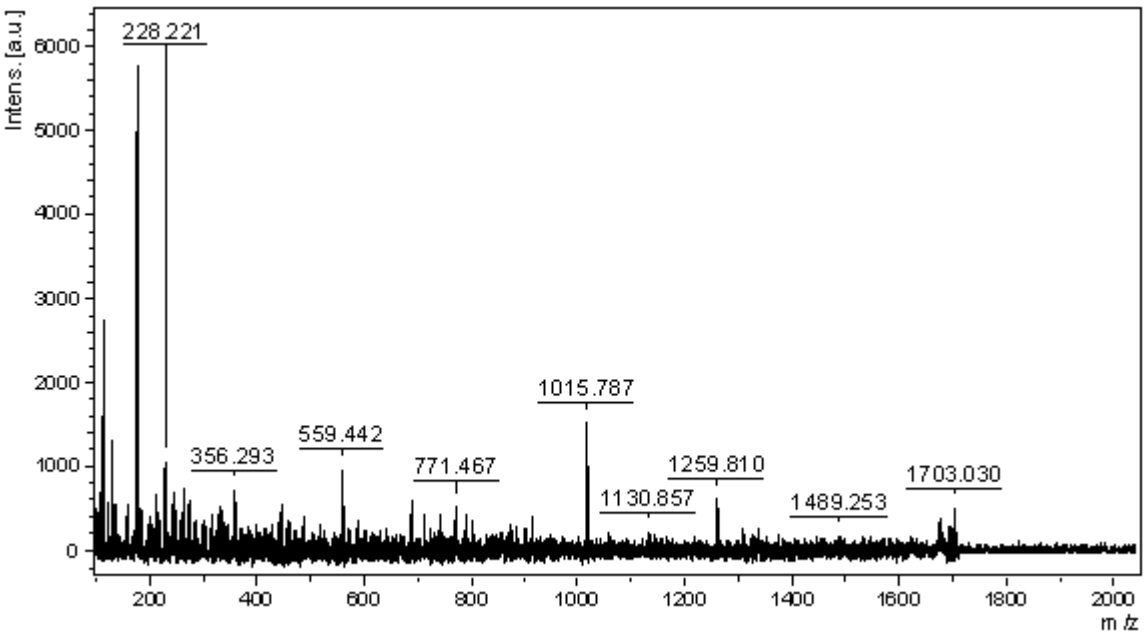
19/b. ábra: **annexin A2** QDIAFAYQR peptid fragmentjének feldolgozott MS/MS spektruma



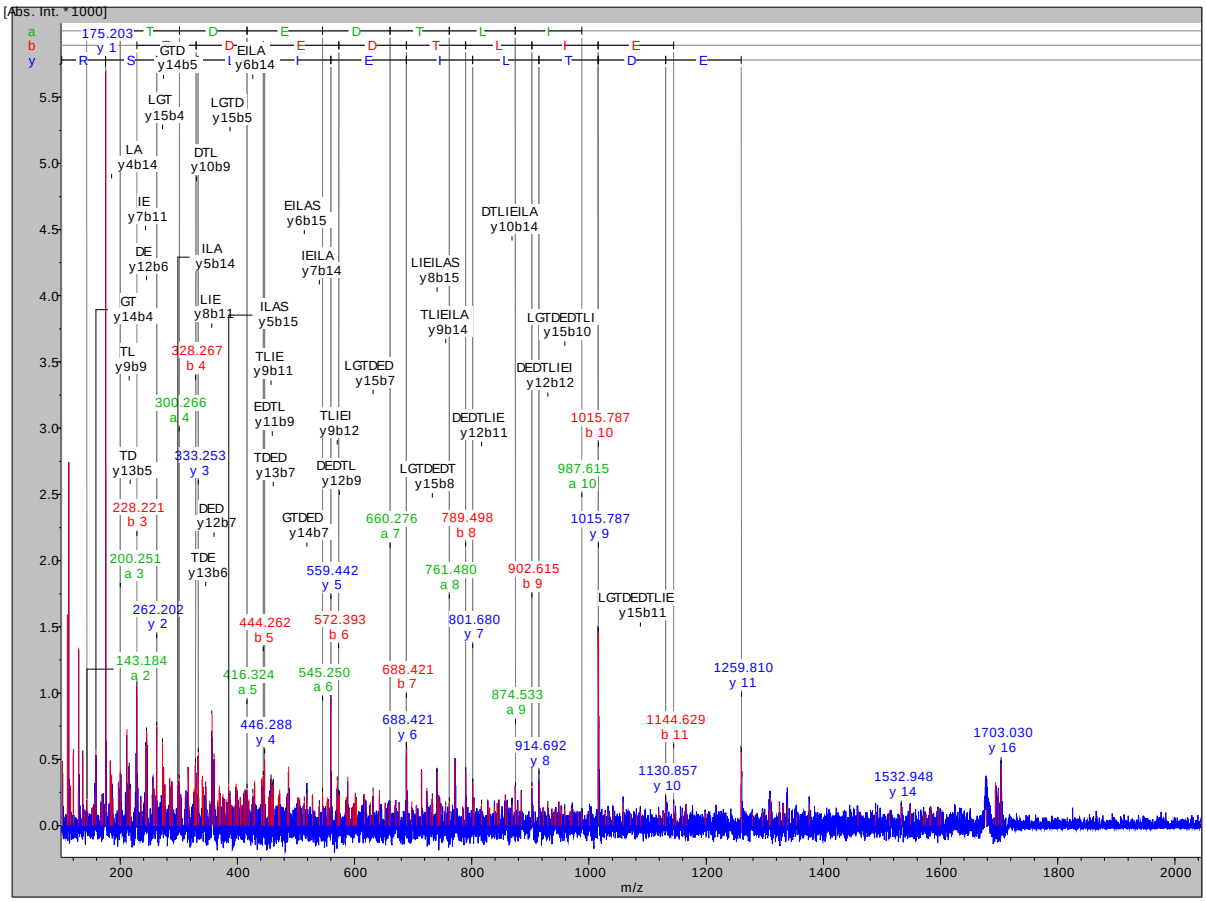
20/a. ábra: **annexin A1** TPAQFDADELR peptid fragmentjének nyers MS/MS spektruma



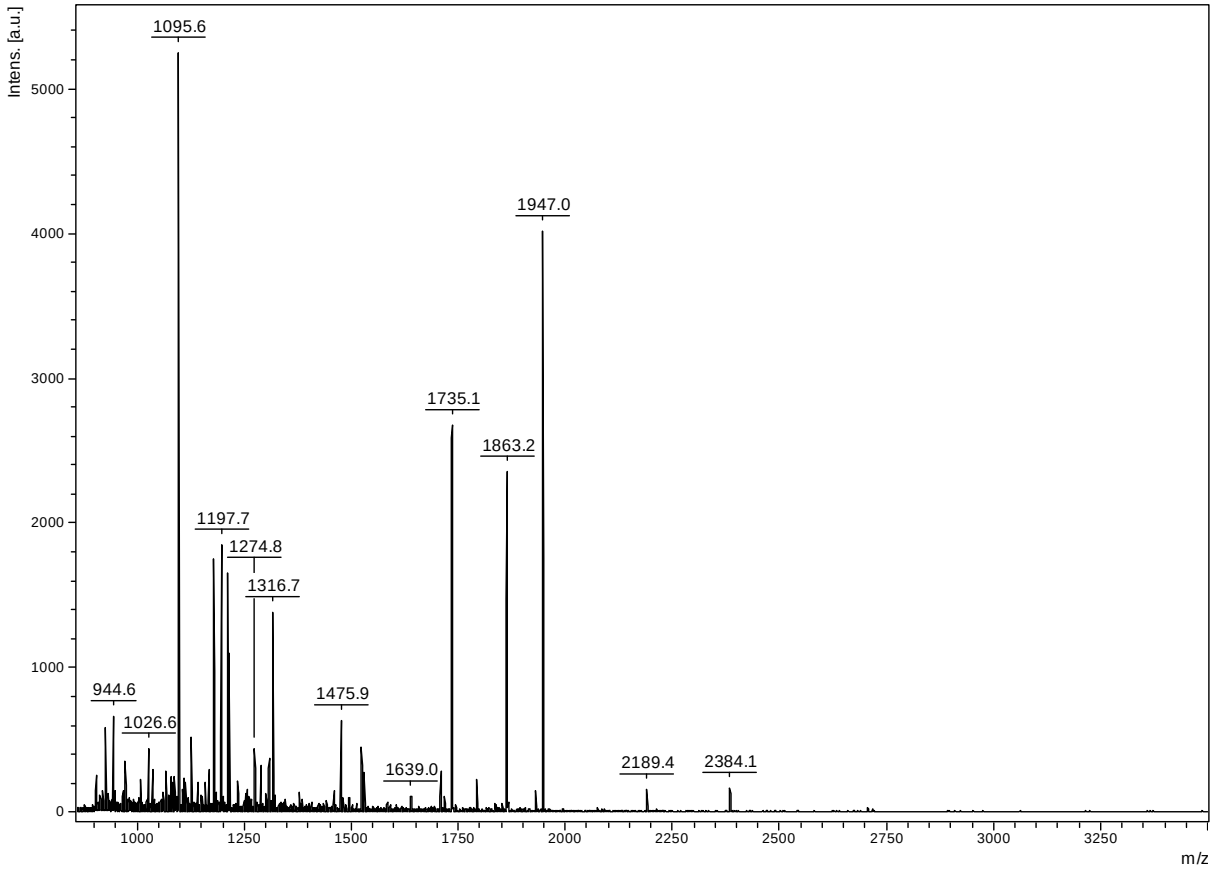
20/b. ábra: **annexin A1** TPAQFDADELR peptid fragmentjének feldolgozott MS/MS spektruma



21/a. ábra: **annexin A1** GLGTDEDTLIEILASR peptid fragmentjének nyers MS/MS spektruma



21/b. ábra: **annexin A1** GLGTDEDTLIEILASR peptid fragmentjének feldolgozott MS/MS spektruma



22.ábra: gél elektroforézis során elválasztott **peroxiredoxin 2 + thioredoxin** tipikus spektruma. Ez a két fehérje móltömege egymáshoz nagyon hasonló, ezért jelennek meg együtt, egy tipikus spektrumon.

5.2.3. A vizsgálatban identifikált fehérjék leírása

5.2.3.1. Annexin csoport

Az adatbázisokban csoport, illetve „superfamily” jelzővel illetett fehérjék valójában egymáshoz aminosav összetételükben, és funkcióikban is nagyon hasonló peptidek összessége. A csoportok tagjait izoform peptideknek nevezzük. Meglévő adatbázisból (Swissprot és NCBi) kiemelve a következő leírás található az ANX A2 fehérjéről:

P07355
Fehérje neve: Annexin A2 Human
Szinonimák: annexin-2, annexin II, lipocortin II, calpactin I nehéz lánc, chromobindin-8, p36, protein I, placental anticoagulans protein IV
Leírás:
Az annexin A2, egy Ca^{2+}-dependens foszfolipid kötő fehérje, amely részt vesz a p53 mediálta apoptózisban és a sejtproliferáció szabályozásában.
Overexpressziója figyelhető meg több különféle ráktípusban, többek között a squamosus-sejt carcinómában. Minden dysplasiás szövet szignifikánsan csökkent annexin expressziót mutatott a normális szövethez képest. Összefüggéseket találtak a csökkent annexin szint és a csökkent szövettani differenciáltság, valamint a nagyobb kiterjedésű tumorok és a nyirokcsomó metasztázisok megjelenése között.

Az ANX A1 gyulladáscsökkentő, Ca dependens fehérje, amelynek fontos regulációs szerepe van a tumor kialakulásában és progressziójában. Biológiailag aktív szerepét kimutatták különböző gyulladásos pathomechanizmusok lezajlásakor, a sejt proliferáció működtetésében, a sejtpusztulás szignalizációjakor, illetve jelen kutatás legfontosabb aspektusaként a carcinigenezisben is. A fehérje differenciált expressziója sokfajta szövet tumoros transzformációjakor megfigyelhető: ilyen lehet a szájüregi rákok mellett a prostata, ovarium, hólyag, emlő, oesophagus, gége, pancreas. Ez a sokoldalúság az ANX A1 fehérjét a jól használható tumormarkerek közé emeli [29,35,39,52,53].

Az annexin csoport tagjaira jellemző, hogy a túlprodukció, illetve a normális szinthez képesti alulprodukció egyaránt malignus transzformáció jele lehet. Az ANX A2 molekula emlőkarcinoma esetén például jellegzetes mennyiségi növekedést mutat, míg prostata vagy gége rák esetén csökken a szintje [63].

Az ANX A2 hasonló variabilitást mutat az oralis laphámrákok vonatkozásában is. In vitro vizsgálatok kimutatták, hogy a kevésbé differenciált tumorok esetén magasabb ANX A2 expressziót tapasztaltak, míg a klinikai mintákban a fehérje megjelenése és mennyisége negatív korrelációt mutatott a szövettani stádiumbeosztással.

Mindezek alapján az ANX A2 fehérje inkább addicionális tumor markernek fogható fel, a jelenlétéből illetve mennyiségéből eredő tumor prognózist óvatosan kell kezelni. [35]

5.2.3.2. Cornulin csoport

Swissprot és NCBi adatbázisban fellelhető leírás a Cornulin HSP csoport fehérjéiről:

Q9UBG3
Fehérje neve: Cornulin
Szinonimák: tumor-related protein, squamosus epiteliális, hőshokk protein 53
53 kDa squamosus epithel indukálta stressz fehérje, 58 kDa hőshokk fehérje, 53 kDa feltehetőleg Ca^{2+} kötő fehérje
Leírás:
A fuzionált gének családjának új tagja. A késői epidermális differenciáció alatt expresszálódik (ennek lényegében markere). Nyelőcső specifikus, a tumor fejlődés markere. Keratinocitákban expresszálódik.
A humán cornulin mRNS elsődlegesen az epidermis felső rétegében, a stratum spinosum-ban expresszálódik. Jellegzetesen együtt transzportálódik a transzglutaminase 1-gyel, és kálciumot köt.

Az emberi gének térképezésekor az 1q21 kromoszómasávban a 2-Mb régióban leírtak egy epiderma-differenciálódás-komplex (EDC) elnevezésű szakaszt. Az innen transzkriptálódó fehérjéknek a hámsejtek végső kiérésében vezető szerepük van.

Az EDC géncsoport a következő funkciójú géneket tartalmazza: 1. prekurzor fehérjék transzkripciója az elszarusodó hámsejtek felszínének közelében, 2. kálcium kötő fehérjék képzése, és 3. ún. fúziós gének, amelyeket korábban oesophagus specifikus, illetve tumorokhoz kapcsolódó géneknek neveztek. Ezen 3. géncsoportról íródik át a cornulinnak nevezett fehérje, ami bizonyítottan az elszarusodó laphám végső differenciációjának fontos eleme. [63]

A cornulint fontos biomarkernek tekintjük. Korábban leírták, hogy az elszarusodó laphám eredetű tumorok anatómiai lokalizációjának vonatkozásában a proteomikai spektrum nem mutatott szignifikáns eltérést, de a cornulin a fej-nyak területi elszarusodó laphám rákok és az egészséges populáció összehasonlítása esetén megbízhatóan jelezte a tumor differenciálódás fokát. [40]

A cornulin szinonímái között megtalálhatjuk az ún. „heat shock protein (HSP)" elnevezést is, a rövidítés után írt számok a fehérjék kDa-ban mért molekulasúlyát jelzik (pl. HSP70, HSP27). Az elnevezés onnan ered, hogy ezek a fehérjék, illetve az ezeket expresszáló gének sokféle sejtfunkciót képviselnek: környezeti stresszhatásokra (**hő**, UV sugárzás, oxidatív folyamatok), endogén stresszhatásokra

(infekció, ischaemia), valamint stresszmentes körülmények között is (sejtciklus) képződnek. Különböző abnormális sejtműködések során (mint a carcinogenesis) érdekes módon néha emelkedett, néha csökkent fehérjeszintézist tapasztaltak, de statisztikailag már kimutatott tény, hogy a HSP gének expressziója pozitív korrelációt mutat a daganatos betegség túlélési esélyeivel. A HSP 27 fehérje például a legjobb prognosztikus jel a nyirokcsomó metasztázisokat illetően. [33]

Immunhisztokémiai módszerekkel kimutatható, hogy a cornulin, illetve néhány izoform változata (p53 és HSP 72/73) egymással öszekapcsolódva a tumorgenezis korai stádiumának jelzője. [32]

Leukoplakiák (precancer stadium) esetén végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a sebészi kimetszés határain tapasztalható cornulin, keratin 4 és keratin 13 expresszió csökkenése valószínűsíti a tumor megjelenését. A leukoplakiák felületén foltokban vagy a teljes területen klinikailag gyakran megfigyelhető a hyperkeratózis jelensége, ami feltehetően megváltoztatja ezen peptidek transzlációját. Tudományosan kimutatható, hogy ez a megváltozott fehérje mintázat már a korai stádiumban is jelzi az aberráns szöveti differenciációt a szájüregi tumorokat megelőző állapotokban. [74]

5.2.3.3. Peroxiredoxin csoport

Ismert tény, hogy az oxidatív ágensek (szabad gyökök) a tumorgenezis folyamatának legfontosabb iniciátorai, a tumoros lézió progressziójának okozói. Az emlős sejtekben kifejlődött egy kiterjedt védelmi mechanizmus: egy enzimatikus védelmi vonal, amelynek aktív ágensei pl. a katalázok, szuperoxid-dizmutázok, peroxidázok illetve a kísérleteinkben is kimutatott peroxiredoxin csoport [77,60].

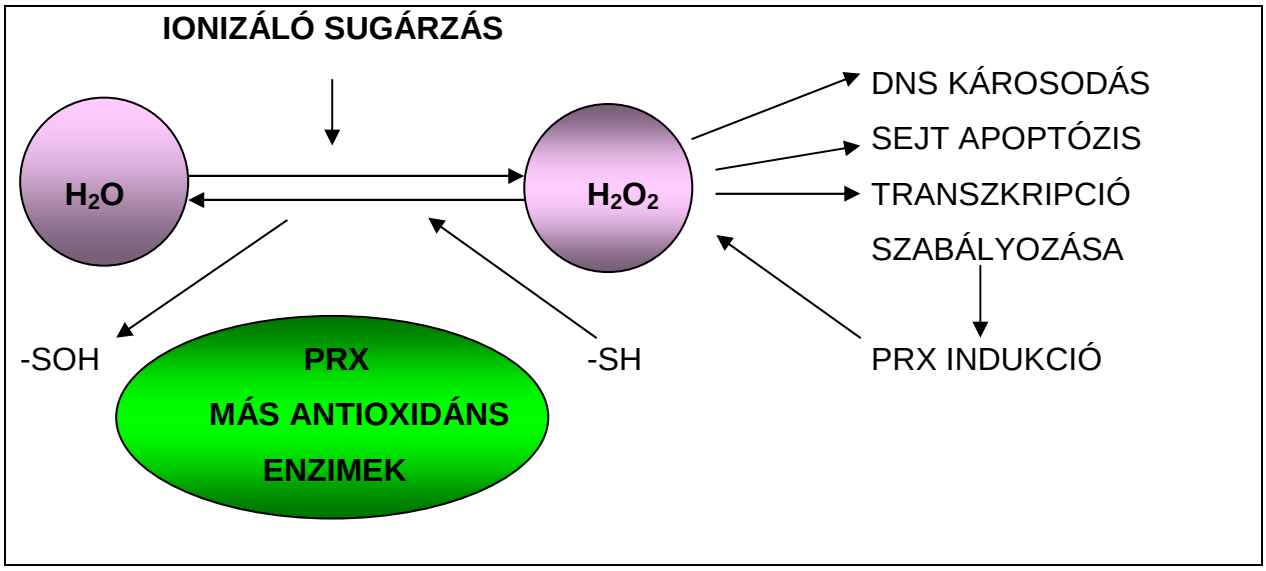
Ezek az enzimek főként az ionizáló sugárzás hatására kialakuló oxidatív ágensek eliminációjára differenciálódtak. A PRX 27 fehérjét először élesztőben felfedezték fel, specifikus védelmi szerepe van mindenféle oxidációs folyamat ellen. Hat izoformája ismert, valamennyi szerepet kap a különböző lokalizációjú tumorok kialakulásában. A *13. táblázatban* felsoroltuk az egyes PRX izoformák szerepét a különböző rosszindulatú daganatok genezisében.

13. táblázat: *A PRX izoform fehérjék kimutatása a különböző lokalizációjú tumorok esetén* [78]

PRX izoform fehérjék	**Jellemző daganat**
PRX-I	Pajzsmirigy,szájüreg, tüdő, hólyag, emlő, nyelőcső, hasnyálmirigy, mesothelioma, nyelv
PRX-II	Emlő, máj, hólyag, melanoma, mesothelioma
PRX-III	Tüdő, mesothelioma, emlő, máj
PRX-IV	Emlő, prosztata, hasnyálmirigy, agy, gyomor
PRX-V	Mesothelioma, emlő
PRX-VI	Mesothelioma, emlő, oligodendroglioma

További kérdés a tumorok radioszenzitivitása. Kimutatták, hogy bizonyos PRX-ok megnövekedett expressziója fordított összefüggésben van a különböző fajta tumorsejtek sugárzás iránti érzékenységével. Minél nagyobb a PRX II szint, annál kevésbé érzékeny az adott kísérleti sejtvonal az ionizáló sugárzásra. Ezzel együtt az is bebizonyosodott, hogy a csökkent PRX V funkció megnövekedett sugárérzékenységet eredményezett, ami a sugárzás okozta apoptózisok számát növelte [78]. Az összefüggések sematikus rendszere a *23. ábrán* látható.

Ezek alapján kimondhatjuk, hogy a tumorok radioszenzitivitása nagyban függ a PRX rendszer pontos működésétől, és a tumor terápia egyik fő célja lehet a PRX transzláció regulációja az ép sejtek védelmében, a tumorsejtek elpusztítására.



23. ábra: Az ionizáló sugárzás okozta károsodások, és a PRX fehérjék hatásának sematikus ábrája

5.2.3.4. A thioredoxin rendszer

Valamennyi emlős sejt tartalmazza ezt a komplex fehérjerendszert, amelynek alapvetően 5 fő alkotója van: Thioredoxinok (TRX1 és TRX2), Thioredoxin-reduktázok (TRX R1 és TRX R2) valamint a thioredoxin/glutation reduktáz (TGR). Intracelluáris reduktív folyamatok katalizátorai, valamint a peroxiredoxinokkal együtt a sejtekben zajló redox reakciók szignalizációjában és kontrolljában szerepelnek. Fontos szerepet töltenek be a DNS szintézisben (TGR), és a sejtek oxigénellátását biztosító angiogenezisben (közvetlen kapcsolat a hypoxiát érzékelő komplexekkel).

Korábbi alapkutatások szerint a rák kiejlődésében a sejtek hat biológiai jellegű átalakulást szenvednek: 1./ a növekedési tulajdonságok önszabályozása,

2./ a növekedésgátló iniciátorok iránti csökkent érzékenység,

3./ apoptosis,

4./ kontroll nélküli replikáció,

5./ megtartott angiogenezis,

6./ szöveti invázió [25].

Valamennyi tumor-specifikus változás során kimutatták a TRX rendszer működésének szignifikáns változását.

Kimutatott tény, hogy a TRX rendszer működése szoros kapcsolatot mutat a tumorok prevenciójának és a terápiás a protokolloknak a hatékonyságával [18].

. A TRX rendszer 3 speciális módon játszik szerepet a terápiás folyamatokban:

1. Szelén vegyületek megkötése, felhasználása. A szelén, mint ismert tumor protektív anyag a TRX fehérjék transzlációjához elengedhetetlen komponens, jelenlétében aktiválódnak a korábban leírt védelmi funkciók, amelyek a TRX rendszerhez köthetők.
2. Mivel a TRX rendszer ismert módon több növekedési sejtmechanizmusnak is része, felmerül a gondolat, hogy vajon valamely izoform inhibitorainak lehetnek-e rákellenes hatásai. A kérdés eldöntése még további tudományos vizsgálatok tárgya.
3. TRX R gátlása elektrofil ágensekkel, amik napjainkban már használt, klinikailag effektív tumorellenes szerek. Ezek hatásossága a molekuláris szintű változások tükrében még nem teljesen tisztázott, a tumorgenezis folyamatában további kutatást igényelnek. [18]

5.3. Natív nyál triptikus emésztése

A célzott peptid analízishez 50 µl mennyiségű natív nyálat higítottunk 100 µl 50 mM koncentrációjú NH_4HCO_3 oldattal, ezt követően végeztük a tripszines emésztést, illetve a MALDI TOF/TOF MS analízist a korábbiakban leírtaknak megfelelően. Az előző fázisban kimutatott fehérjéket ezzel a feldolgozási módszerrel is ki tudtuk mutatni.

5.4. A teljes mintakollekció vizsgálata célzott peptid analízissel

A *14. táblázatban* szemléltettük az összes minta vizsgálatának eredményeit. Valamennyi tumoros beteg nyálmintájában, különböző arányban megtaláltuk mindkét keresett fehérje peptidfragmentumait, míg a kontroll mintákban ugyanazon két peptid koncentrációja a detektálási határ (100 ppm, illetve 1 kihagyott triptikus hasítási hely) alatt volt.

14..táblázat: *Az összes minta vizsgálatának eredménye (célzott peptid analízis)*

Daganatos betegek		**Kontroll páciensek**	
kód	ANX1és PRX2 együttes kimutatása	kód	ANX1és PRX2 együttes kimutatása
1	pozitív	1	negatív
2	pozitív	2	negatív
3	pozitív	3	negatív
4	pozitív	4	negatív
5	pozitív	5	negatív
6	pozitív	6	negatív
7	nem vizsgáltuk	7	negatív
8	pozitív	8	negatív
9	pozitív	9	negatív
10	pozitív	10	negatív
11	nem vizsgáltuk	11	negatív
12	pozitív	12	negatív
13	nem vizsgáltuk	13	negatív
14	pozitív	14	negatív
15	pozitív	15	negatív
16	pozitív	16	negatív
17	pozitív	17	negatív
18	pozitív	18	negatív
19	pozitív	19	negatív
20	pozitív	20	negatív
21	pozitív		
22	pozitív		
23	pozitív		
24	pozitív		
25	pozitív		

6. Megbeszélés

A mintavétel a nyálból egy egyszerű, első lépésben végezhető beavatkozás, ami az utóbbi kb. 10 évben került előtérbe. Feltétlenül előnye a nem invazív technika, a relatív olcsóság, valamint az egyszerűség. Gyermekek és mentálisan retardált páciensek esetén is könnyen használható [2,51,55,67].

Céljait tekintve lehetséges a teljes nyál gyűjtés, vagy a szelektív gyűjtés adott nyálmirigyből. Jó diagnosztikus eszköz az orvosok kezében az összes nyál mennyiség mérése adott időn belül, vagy bizonyos stimuláció hatására képződő nyál mennyiségi iletve minőségi vizsgálata.

Mindezen előnyei mellett a szakirodalomban nem található általános standardizálási kísérlet, minden tanulmány leírja a céljainak legmegfelelőbb gyűjtési módszert. 4-5 módszer vált általánossá, de a vizsgálataink során alkamazott taktilis technikát sem magyar, sem nemzetközi szakiodalomban nem találtuk. Először alkalmaztuk és közöltük ezt a módszert, amely az amúgy is egyszerű technikát még gyorsabbá és olcsóbbá tette. Az általunk használt metódus jelentősen rövidebb idő alatt elvégezhető, jelentősen kevesebb anyag szükséges hozzá. Ez a szűrővizsgálatok esetén szükséges gyűjtéseknél válik fontossá.

A szűrővizsgálatokkal kapcsolatos, Magyarországon jellegzetes alap problémák persze továbbra is fennállanak [4,58]. A továbbiakban sem megoldott a magyar lakosság teljes átszűrése, de még a részleges populáció vizsgálatok is nehézségekbe ütköznek. Hazánkban 1962 és 2002 között 10, egyenként nagy populációkat érintő sztomato-onkologiai szűrővizsgálatot végeztek [75], de ezek is kiemelt csoportokkal foglalkoztak, a lakosság teljes vizsgálata nem volt kivitelezhető. Továbbra sem remélhetjük, hogy kormányszintű illetve az egészségügyi felsővezetés szintjén hozott segítő döntések nélkül akár csak a veszélyeztetett pácienseket rendszeresen vizsgálni tudjuk. A dolgozat keretein belül csak a konkrét nyálvizsgálatot elemeztük, a kivitelezését modelleztük.

Az idő és a felhasznált anyag csekély igénye mellett további előnynek tekintjük, hogy a taktilis módszer előtt nem közvetlenül, hanem órákkal korábban történik étkezés illetve szájápolás. Feltételezzük, hogy az ételekben és a fogkrémben lévő hatóanyagok, gyógyszerek, íz- és illatanyagok befolyásolhatják a szekretált nyál összetételét, ez a hatás azonban a vizsgálatig eltelő 2-3 óra alatt megszűnik. [21]

A vizsgálat első laboratóriumi szakaszában elsőként 4, szövettenilag igazolt szájüregi daganatos beteg és 5 nem tumoros páciens nyálmintáját vizsgáltuk hagymányos proteomikai módszerrel. Az elektroforézist követő tripszines emésztés és MALDI TOF tömegspektrográfia pontos, de meglehetősen időigényes vizsgálat. A módszert már korábban publikálták, általánosan használt eljárás a proteomikai laboratóriumokban, mégis erre esett a választásunk a megbízhatósága miatt.

A szakirodalom igen széles körben foglalkozik a proteomika lehetőségeivel, folyamatosan újabb és újabb módszereket publikálnak. Az elmúlt időszak igen jelentős genomikai kutatásai után előtérbe került, és folyamatosan fejlődik [9]. A szinte kimeríthetetlen lehetőségek közül csak néhány példa: alkalmas, automatizált üzemmódban való használatra, gyógyszerszint mérésre illetve a tumorkutatás kiváló eszközévé vált. [16,41,45,59].

A korábban bevált eljárástól reméltük, hogy pontos eredményt kapunk a nyálminták peptid mintázatáról. A mérések befejeztével az elvárt eredményt kaptuk, a géleken a szemmel látható különbségeket értékeltük és kimutattuk a daganatos nyálmintákban azokat a fehérjéket, amelyek egyértelműen tumoros transzformáció jelenlétét jelzik. A két fehérje együttes megjelenését minden daganatos mintában kimutattuk.

Ezt a vizsgálatot követte a második laboratóriumi munkafázis, amikor kidolgoztunk egy egyszerűsített módszert. Az általunk elérhető hazai és nemzetközi szakirodalomban nem találtunk a tumorkutatás területén olyan laboratóriumi módszert, amely az általunk kidolgozott és publikált direkt tripszines emésztést és az azt követő MS-t írja le.

A tripszines emésztés általánosan használt módszer. Különlegessége abban rejlik, hogy speciális helyen (mindig arginin mellett) bontja a fehérje láncokat, emiatt

nevezzük a folyamatot szelektív proteolízisnek. Ezt az eljárást alkalmazhatjuk az elektroforetikus elválasztás után is, saját vizsgálatainkban azonban a natív nyálmintában végeztük el. Az eljárást saját laboratóriumi méréseinkhez dolgoztuk ki, és alkalmaztuk elsőként a a nyálminták vizsgálatához. Találtunk utalást faj specifikus fehérjék gyors monitorozására hasonló módszerrel, de a lízist itt ultrahanggal segítették, ami kissé bonyolította az eljárást [8].

Az általunk végzett kísérletekben az az újdonság, hogy lényegesen egyszerűsítettük a laboratóriumi eljárást. Ez időben, anyagfelhasználásban, műszerhasználatban és emberi erőforrásban is kisebb ráfordítást jelent.

Munkánk harmadik laboratóriumi szakaszában a kiválasztott fehérjére jellemző peptidek kimutatására fókuszáltunk, az összes nyálmintában, immár célzott analízissel, direkt tripszines emésztést követően. Vak kísérlet módszerével végeztük el az eredmények validációját, beteg (n=22) és egészséges (n=20) mintákon. Kérdésfeltevésünk az volt, hogy kimutathatóak-e specifikusan a 2 kiválasztott fehérje jellemző triptikus peptidfagmentjei a natív mintából, csupán egy relatíve egyszerű, könnyedén automatizálható tripszines emésztés után, MALDI-TOF analízissel.

Mivel a bonyolult, időt és ráfordítást igénylő, a korábbiakban leírt analitikai módszer önmagában nem alkalmas a nagy populációt érintő, szűrés jellegű vizsgálatokra, ezért dolgoztuk ki, és alkalmaztuk elsőként ezt a mérési módszert. Ez a kísérlet megmutatta, hogy a három ponton (mintavétel, mintafeldolgozás, és értékelés) történt egyszerűsítések ellenére a nagy átbocsátóképességet igénylő szűrővizsgálatoknál is előremutató eredményt adnak. Ez előrevetíti, hogy sokkal nagyobb populáció vizsgálatakor is valid eredményeket kapunk a tumor genezisére vagy progressziójára vonatkozóan.

Ezekkel a mérésekkel kimutattuk, hogy létezik olyan, relatíve egyszerű és nagy populáción is könnyen elvégezhető vizsgálati módszer, ami képes kimutatni azokat a proteomikai változásokat, amelyek tumoros transzformáció jelenlétét jelzik. Ezen dolgozat vezérgondolata a klinikailag is alkalmazható vizsgálatok és módszerek logikus egyszerűsítése volt. Több irányban kerestük az egyszerűsítés útját: a mintavételi technikát változtattuk, és kimutattuk, hogy ezzel a metódussal is értékelhető mintát nyerünk. Magát a proteomikai procedúrát is rövidítettük: mindkét eljárásnál bebizonyosodott, hogy az egyszerűsítés nem járt információveszteséggel,

az előzőekben alkalmazott idő- és anyagigényes, bonyolult módszer ugyanazt az eredményt mutatta.

Kutatómunkánkat és a dolgozat megírását széleskörű indíttatás, és nagyon sok tényező sürgette. Az epidemiológiai statisztikák a szájüregi tumoros megbetegedések témájában Magyarország súlyos érintettségét jelzik. A kutató és gyógyító orvosok szinte minden nap találkoznak azzal a nehezen elfogadható ténnyel, hogy vannak olyan előrehaladott betegségek, amikor az elváltozás inkurábilis, a páciens nem gyógyítható. A dolgozatban igyekeztünk rávilágítani, hogy fontos olyan módszerek kutatása, ami ennél a végleges állapotnál korábbi stádiumban képes kimutatni a betegséget.

További célkitűzések is megfogalmazhatóak a dolgozattal kapcsolatban. Az általunk leírt munka alapján elindulhatnak olyan követéses vizsgálatok, ahol az érintett betegcsoportokban a gyógyulási (vagy progesszív) folyamattal párhuzamosan a korábban jelként használt fehérjék nyálban való korai előfordulását (minőségi vizsgálat), valamint annak mennyiségi változásait kutatjuk. A célzott mennyiségi peptid analízishez a legcélravezetőbb vizsgálati módszerek állnak rendelkezésünkre: a magas nyomású folyadék kromatográfiával (HPLC) és „nano liquid chromatography”-val (NLC) végzett elválasztást követő ESI-MS detektálás. Ilyen típusú utánvizsgálatok már folyamatban vannak a PTE ÁOK Biokémiai Intézetében karöltve a gyakorló orvosokkal.

Távolabbi lehetőség, hogy nagy populáción validáljuk eredményeinket, és azokat preventív diagnosztikai vizsgálatként elfogadtassuk (ld. veszélyeztetett csoportok). A kimutatott és vizsgált fehérjék korai kimutatásával, protokoll és könnyen használható kit kifejlesztésével akár a tumor előrejelzése is lehetséges lehet. Ez a vizsgálat azonban témájánál, terjedelménél és időigényénél fogva ennek a kutatásnak nem volt része, de további komoly tudományos exploráció tartalma lehet.

7. Az eredmények összefoglalása

1. Egyszerű, könnyen kivitelezhető nyál mintavételi módszert dolgoztunk ki, alkalmaztuk és vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a módszer rövidebb időt, kevesebb anyagot igényel, mint a korábbiak.

2. A tumoros betegek mintáiból tömegspektrometriás vizsgálattal kettő marker típusú jelátviteli fehérjét identifikáltunk, ami szájüregi, vagyis a tápcsatorna kezdetén lévő tumorokra jellemző.

3. Kidolgoztunk, és elsőként alkalmaztunk egy tripszines emésztési módszert a natív daganatos nyálmintában.

4. A natív minták vizsgálata során a daganatos mintákból kimutattuk ugyanazokat a fehérjéket, mint az ELFO szeparálás után.

5. Az automatizálható módszer valid eredményeket hozott. Valamennyi tumoros beteg nyálmintájában megjelent az előzetesen identifikált fehérje, és valamennyi nem tumoros páciens mintája negatív volt. Ez előrevetíti a szűrővizsgálatok lehetőségét.

8. Tudományos közlemények

8.1. A témához kapcsolódó tudományos közlemény és prezentációk

1.Szántó I., Sándor B., Márk L., Bona A., Maász G., Gelencsér G., Turi Z., Gallyas F.:
High-throughput proteomic analysis of saliva for monitoring putative tumor markers: A pilot study
Technology in Cancer Research & Treatment 2011, IF.:2.023
Közlésre elfogadva 2011.05.

2. Szántó I., Gallyas F., Márk L., Olasz L**.:**
Szájüregi tumoros betegek nyálának proteomikai vizsgálata
Magyar Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Társaság Kongresszusa
Balatonalmádi 2007

3. Szántó I., Gelencsér G., Sábdor B., Gallyas F.:
Screening of oral Cancer by Using Mass Spectrometry Method
45th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research (CED-IADR) with the Scandinavian Division
Budapest, 2011

8.2. Egyéb tudományos közlemények

1. Szabó G.,Tóth G., **Szántó I.**:
Protézis alapanyagok vízfelvétele és vízoldékonysága
Fogorvosi szemle 87. 209-215

2. Szentpétery A, Szabó G, Marada G, **Szántó I**, John MT:
The Hungarian version of the Oral Health Impact Profile.
Eur J Oral Sci. 2006 Jun;114(3):197-203. I.F.: 1.8

3. Szabó G, John MT, **Szántó I**, Marada G, Kende D, Szentpétery A.

Impaired Oral health-related quality of life in Hungary

Acta Odontol Scand. 2010 Dec 9. I.F.: 1.8

4.Komáromy H., Kovács N., **Szántó I.,** BalásI., Kövér F.:

Comparison of accuracy of 1 and 3 Tesla stereotactic MRI-based target coordinates in DBS targeting

Bulletin of the Hungarian Pain Society. 2010. No.16.

8.3. Kongresszusi és továbbképző előadások és prezentációk

1. Szabó Gy.,Tóth Gy., **Szántó I.**:

Protézis alapanyagok vízfelvétele és vízoldékonysága

MFE Fogpótlástani és Implantologiai Társaságainak Vándorgyűlése, Sopron1994

2. Szántó I.:

Organisation of school dentistry in Hungary

Ch. Clifford Dental Hospital, Sheffield, UK. 1996

3.Szántó I., Szabó Gy.**:**

Mikroszkópos tapasztalatok borítókoronák készítésekor .

MFE Fogpótlástani és Implantologiai Társaságainak Vándorgyűlése, Szeged 1997

4. Szántó I., Mukics A.:

Szisztémás sclerosisban szenvedő beteg kezelésének nehézségei POSTER

MFE Fogpótlástani és Implantologiai Társaságainak Vándorgyűlése, Pécs1999

5. Szántó I., Visegrády K.:

A nyálkahártya csont alapzat tehermentesítése POSTER

MFE Fogpótlástani és Implantologiai Társaságainak Vándorgyűlése, Pécs1999

6. Szántó I, Szentirmai M, Bán Á, Mukics A:
Kivehető fogpótlást viselő Sjögren szindrómás betegek panaszai és terápiája.
MFE Fogpótlástani Társaság XIV., Magyar Fogorvosok Implantológiai Társasága IV., Magyar Parodontológiai Társaság XII. kongresszusa, Debrecen, 2001. aug. 23-26.

7. Bán Á, Szentirmai M, **Szántó I**, Mukics A:
Az instruálás szerepe a Sjögren-szindrómás betegek gondozásában.
MFE Fogpótlástani Társaság XIV., Magyar Fogorvosok Implantológiai Társasága IV., Magyar Parodontológiai Társaság XII. kongresszusa, Debrecen, 2001. aug. 23-26.

8. Mukics A, **Szántó I**, Szentirmai M, Bán Á:
Kivehető fogpótlást viselő Sjögren szindrómás betegek panaszai és terápiája.
Magyar Fogorvostanhallgatók Kongresszusa, Pécs, 2002. október 11-13.

9. Szántó I:
Antibiotikumok alkalmazása gyermekkorban. Rizikó faktorok és terápiás döntések
Magyar Fogorvosok Egyesülete Gyermekfogászati és Fogszabályozási Társaság Tóth Pál Vándorgyűlése, Debrecen 2005

10. **Szántó I.,** Lukács D., Nyárády Z., Kövesi T., Szabó Gy.:
Mentális retardált páciensek műtéti ellátása
Magyar Fogorvosok Egyesülete Gyermekfogászati és Fogszabályozási Társaság Tóth Pál Vándorgyűlése, Pécs 2007

11. Szántó I.:
Iskolafogászati ellátás a dél-dunántúli régióban
Magyar Fogorvosok Egyesülete Gyermekfogászati és Fogszabályozási Társaság Tóth Pál Vándorgyűlése, Szeged 2009

12. Sándor, B.; Hóbor, D.; Kiss, P.; Szabadfi, K.; Brubel, R.;Horváth, G.; Lubics, A.; Gábriel, R.; **Szántó, I**.; Nagy, Á.; Reglődi, D.; Tamás, A.
Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on tooth development in wild type and PACAP deficient mice
Magyar Idegtudományi Társaság (MITT) XIII. Konferenciája Budapest 2011.01.20-22

13. Jobbágy-Óvári G., Páska C., Stiedl P., Hontvári D., Trimmel D., Soós B., Hermann P., Tóth Z., Martonosi M., **Szántó I**., Nagy Á, Nagy D, Kerekes-Máthé B, Hadadi É., Szalai C., Hullám G., Temesi G., Antal P., Madléna M., Tarján I., VargaG.:
Genetic Determinants of Tooth Agenesis in the Hungarian Population
45th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research (CED-IADR) with the Scandinavian Division
Budapest, 2011

14. Sándor B., Kende D., Lempel E.,Jeges S., **Szántó I**.,Krajczár K.:
In vivo Comparison of Electronic and Combined Working Length Determination
45th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research (CED-IADR) with the Scandinavian Division
Budapest, 2011

PTE Fogászati és Szájsebészeti Klinika által szervezett Posztgraduális kurzus előadások:

13. A teljes foghiányok klinikuma 2001
14. A kerámiák helye a fogpótlások tervezésében 2001
15. Lágyszöveti management rögzített fogpótlások készítésekor 2001
16. Csonkrestauráció a rögzített fogpótlások készítésekor 2001
17. Fog és szájbetegségek megelőzése gyermekkorban 2007
18. Fluoridok hatásmechanizmusa 2007
19. Gyermekkori foghiányok, sérülések 2007
20. Fogászati eredetű fájdalmak gyermekkorban 2010

9. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőimnek, Dr. Gallyas Ferenc és Dr. Olasz Lajos egyetemi professzoroknak a PTE ÁOK Biokémiai Intézetéből és a PTE KK Fogászati és Szájsebészeti Klinikáról, valamint Dr. Márk László adjunktusnak a PTE ÁOK Biokémiai Intézetéből, akik odaadással segítették dolgozatom megalkotását. Mindkét Intézet számos dolgozóját köszönet illeti a kísérletek és a klinikai vizsgálatok háttérmunkálatainak elvégzéséért.

Korábbi és jelenlegi intézetvezetőim, Dr. Szabó Gyula professzor és Dr. Nagy Ákos igazgató urak biztosították számomra, hogy a mindennapi klinikai munka mellett időt fordíthassak a tudományos munkára is.

A legtöbb hálámat a körülöttem élő családomnak szeretném kifejezni, és elmondani nekik, hogy milyen sokat segítettek a türelmükkel, szeretetükkel. Férjem, Dr. Balás István idegsebész egyetemi docens, gyermekeink: Kinga, Dani és Csongor, valamint a bennünket körülvevő Család bíztatása és áldozatvállalása mindenben segített.

Dolgozatomat édesapám emlékének ajánlom.

10. Irodalomjegyzék

[1]. A maxillo-facialis regio daganatmegelőző állapotainak és rosszindulatú daganatainak komplex kezelése a stomato-onkológiai konzultációs munkacsoport számára. Módszertani levél / [közread. Központi Stomatológiai Intézet]

[2]. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S.: Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. Proteomics 2011 Jun;15(6):353-61.

[3]. Bánóczy J., Dombi Cs., Bakó A., Ember I.,Kósa Zs., Sándor J., Szabó Gy.: Stomato-onkológiai szűrővizsgálatok: a korai diagnózis lehetőségei. Magyar Onkologia 2001 (45):143-148

[4]. Bánóczy J.: Az orális carcinomák korai diagnosztikája. Kinek a feladata..Lege Artis Medicinae 1998. (8). 882-883.

[5]. Barwad A, Sood S, Gupta N, Rajwanshi A, Panda N, Srinivasan R.: Human papilloma virus associated head and neck cancer: A PCR based study. Diagn Cytopathol. 2011 Apr 6.

[6]. Brocklehurst P, Kujan O, Glenny AM, Oliver R, Sloan P, Ogden G, Shepherd S.: Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2010 10;(11):CD004150.

[7]. Canković M, Bokor-Bratić M.: Candida albicans infection in patients with oral squamous cell carcinoma. Vojnosanit Pregl. 2010 67(9):766-70.

[8]. Carrera M, Cañas B, López-Ferrer D, Piñeiro C, Vázquez J, Gallardo JM.:Fast Monitoring of Species-Specific Peptide Biomarkers Using High-Intensity-Focused-Ultrasound-Assisted Tryptic Digestion and Selected MS/MS Ion Monitoring. Anal Chem. 2011 Jun 17.

[9]. Chait BT.:Mass spectrometry in the postgenomic era. Annu Rev Biochem. 2011 7;80:239-46.

[10]. Chien MH, Lee TS, Kao C, Yang SF, Lee WS.: Terbinafine inhibits oral squamous cell carcinoma growth through anti-cancer cell proliferation and anti-angiogenesis Carcinog. 2011 May 11

[11]. Chun-Ming Huang.: Comparative proteomic analysis of human whole saliva. Archives of Oral Biology 2004 (49), 951—96

[12]. Correnti M, González X, Avila M, Perrone M, Rivera H.: Human papillomavirus and Epstein Barr virus in oral hairy leukoplakia among HIV positive Venezuelan patients. Acta Odontol Latinoam. 2010;23(2):117-23.

[13]. Csejtei A, Tibold A, Koltai K, Varga Z, Szanyi I. et al,: Association between XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer in a Hungarian population. Anticancer Res. 2009 29 (10):4169-73.

[14]. David T. Wong, DMD, DMSc **.:** Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics .This study was supported by U.S. Public Health Service grants UO1 DE-15018, UO1 DE-16275 and RO1 DE-15970 and the University of California, Los Angeles, Jonsson Comprehensive Cancer Center.

[15]. Definition: progenitor cell from Online Medical Dictionary. http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd?progenitor+cell. Retrieved 2008-09-10.

[16]. Doherty MK, Whitfield PD.: Proteomics moves from expression to turnover: update and future perspective. Expert Rev Proteomics. 2011 ;8(3):325-34.

[17]. Dombi Cs., Bánóczy J.: A szájüregi daganatok megelôzésének lehetôségei stomato–onkológiai szűrôvizsgálatokkal. Magyar Fogorvos. VII. évf. 98. 11-12.

[18]. Elias S.J. Arn´er ∗, Holmgren A.: The thioredoxin system in cancer. Cancer Biology 2006 (16) 420–426

[19]. Fehér E: Maxillofaciális anatómia. A nyálmirigyek anatómiája és szöveti szerkezete. Medicina, Budapest, 2006; 97-103.

[20]. Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Marnewick JC, Meyerov R, Lemmer J.: HPV-associated oral warts.SADJ. 2011 ;66(2):82-5.

[21]. G.J. Harrap, J.S. Best and C.A. Saxton. Human oral retention of zinc from mouthwashes containing zinc salts and its relevance to dental plaque control. Unilever Research, Gibbs Dental Division, Colworth Laboratory, Sharnbrook, Bedford MK44 1LQ, England, U.K.

[22]. Gaudi I., Kásler M.: A rosszindulatú daganatos halálozás változása 1975 és 2001 között Magyarországon. Magyar Onkológia 2002 (46) :291–295,

[23]. Gitendra Wickremasinghe R, Prentice AG, Steele AJ.: Aberrantly activated anti-apoptotic signalling mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia cells: clues to the identification of novel therapeutic targets. Br J Haematol. 2011 ;153(5):545-56.

[24]. Güleç AT, Haberal M.: Lip and oral mucosal lesions in 100 renal transplant recipients.J Am Acad Dermatol. 2010 62(1):96-101

[25]. Hanahan D,Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;(100):57–70.

[26]. Hocking JS, Stein A, Conway EL, Regan D, Grulich A, Law M, Brotherton JM: Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. Br J Cancer. 2011 ;104(5):886-91.

[27]. Huq LN, Cross JK, Ung M, Myroforidis H, Veith DP, Chen D,et al.: A Rewiev of the Salivary Proteome and Peptidome and Saliva-derived Peptide Therapeutics. Int J Pept Res Ther 2007; (13): 547-564.

[28]. Johnson, Newell W.: Az oralis carcinomák etiológiája és rizikófaktorai, különös tekintettel a dohányzásra és az alkoholfogyasztásra. Magyar Onkológia 2001 (45):115-122,

[29]. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M.: An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. 2005;100(1):39–48.

[30]. Kásler M. (szerk): Onkoterápiás protokoll. Springer, Budapest 1994

[31]. KáslerM., Ottó Sz.:Európai és hazai kihívások az onkologiában.Magyar Onkologia2008(52) 21-33

[32]. Kaufman E, Lamster IB.: The diagnostic applications of saliva- A Review. Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13(2): 197-212.

[33]. Kaur J., Srivastava A., Ralhan R.: p53-HSP70 complexes in oral dysplasia and cancer: potential prognostic implications. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1996 ;32B(1):45-9.

[34]. Kensyu K., Hitoshi S., Yuichiro D., Isao S., Masatoshi I., Masahiko Y. et al.: Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. Cancer, 1999, (85): 1649-57.

[35]. Lai-ping Zhong Kui-jie Wei Xiao Yang Lei Zhang Xiao-jian Zhou Hong-ya Pan et al.: Increased expression of Annexin A2 in oral squamous cell carcinoma.Arch of oral biology 2009 (54) 17-25

[36]. Lamkin MS, Oppenheim FG.: Structural Features of Salivary Function. Crit Rev Oral Biol Med 1993; 4(3/4): 251-259.

[37]. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA.: Cancer statistics, 1998. CA Cancer J Clin. 1998 48(1):6-29

[38]. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA.: Cancer statistics,1999. CA Cancer J Clin. 1999 49(1):8-31

[39]. Lim LH, Pervaiz S.: Annexin 1: the new face of an old molecule. FASEB J 2007; 21(4):968–75.

[40]. Mark A., Merkley P.M., Weinberger, MD, Lana L., Jackson, MD,et al.: 2D-DIGE proteomic characterization of head and neck squamous cell carcinoma Otolaryngology–Head and Neck Surgery 2009 (141), 626-632

[41]. Meesters RJ, den Boer E, Mathot RA, de Jonge R, van Klaveren RJ, Lindemans J, Luider TM.: Ultrafast selective quantification of methotrexate in human plasma by high-throughput MALDI-isotope dilution mass spectrometry. Bioanalysis. 2011 ;3(12):1369-78.

[42]. Navasesh M, Christensen C.: A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurements. J. Dent. Res.1982 (61)1158–1162

[43]. Németh Á.: Molekuláris biomarkerek vizsgálata oro-faringeális daganatokban. Állatkísérletes és humán molekuláris epidemiológiai vizsgálatok. PhD értekezés 2006.

[44]. Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR : Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. Arch. Neurol. 2007 64 (5): 639–42.

[45]. Osiri JK, Shadpour H, Witek MA, Soper SA.: Integrated Multifunctional Microfluidics for Automated Proteome Analyses. Top Curr Chem. 2011 Jun 16.

[46]. Ottó Sz, Kásler M.: A hazai és nemzetközi daganatos halálozási és megbetegedési mutatók alakulása. A népegészségügyi programok jellegzetességei és várható eredményei. Magyar Onkológia 49:99–107, 2005

[47]. Ottó Sz, Kásler M.: A rosszindulatú daganatok morbiditási és mortalitási helyzete. MOTESZ Magazin 2:14–21, 2007

[48]. Ottó Sz., Kásler M.: Rákmortalitás és -incidencia hazánkban, az európai adatok tükrében. Magyar Onkologia 2002 (2) 111-117

[49]. Ottó Sz.: A hazai „népegészségügyi szűrővizsgálatok” programjának epidemiológiai indoklása. Orvosi Hetilap 48:2347–2351, 2003

[50]. Páldy A., Nádor G., Vincze I. et al.: Az ajak, szájüreg és garat rosszindulatú daganatos betegsége miatti halálozás valamint a morbiditás területi különbségei Magyarországon. Magyar Onkologia 2001 (45) 106-114

[51]. Peplies J, Günther K, Bammann K, Fraterman A, Russo P, Veidebaum T., et al.: Influence of sample collection and preanalytical sample processing on the analyses of biological markers in the European multicentre study IDEFICS. Int J Obes (Lond). 2011. 35 Suppl 1:S104-12.

[52]. Perretti M, D’Acquisto F.: Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol 2009;9(1):62–70.

[53]. Perretti M, Flower RJ.: Annexin 1 and the biology of the neutrophil.J Leukoc Biol 2004;76(1):25–9.

[54]. Petti S.: Lifestyle risk factors for oral cancer. Oral Oncol. 2009 Apr-May;45(4-5):340-50.

[55]. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C.: Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. Clin Chem. 2011 57(5):675-87.

[56]. Polónyi Katalin, Székely Gáborné: Társadalmi ellátórendszerek, 2006 Központi Statisztikai Hivatal kiadványa 2007 A kézirat lezárva: 2007. szeptember 19.

[57]. Raymond G. Schipper E.,Silletti M.,H. Vingerhoeds.: Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. Archives of oralbiology 2007 (52) 1114 –1135

[58]. Remenár É.: Javaslat a szájüreg és a garat rosszindulatú daganatainak korai felismerésére a veszélyeztetett populáció célzott szűrésével.Magyar Onkologia. 2001(45):149-151.

[59]. Remily-Wood ER, Liu RZ, Xiang Y, Chen Y, Thomas CE, Rajyaguru N. et al.:A database of reaction monitoring mass spectrometry assays for elucidating therapeutic response in cancer. Proteomics Clin Appl. 2011 Apr 20.

[60]. Rhee S., Jeong W., Chang T., Woo H.: Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance,Kidney Int. Suppl. 106 (2007) S3–S8.

[61]. Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, et al.:. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. Int J Epidemiol. 2011 40(2):489-502.

[62]. Richards D.: Clinical recommendations for oral cancer screening. Evid Based Dent. 2010 11(4):101-2.

[63]. Romuald Contzler, Bertrand Favre, Marcel Huber, and Daniel Hohl.: Cornulin, a New Member of the ‘‘Fused Gene’’ Family, Is Expressed During Epidermal Differentiation. J Invest Dermatol 124:990 –997, 2005

[64]. Rushing EC, Hoschar AP, McDonnell JK, Billings SD.: Iatrogenic oral hairy leukoplakia: report of two cases. J Cutan Pathol. 2011 38(3):275-9.

[65]. Sato A, Asano T, Horiguchi A, Ito K, Sumitomo M, Asano T.: Antitumor effect of suberoylanilide hydroxamic acid and topotecan in renal cancer cells. Oncol Res. 2011;19(5):217-23.

[66]. Schelenz S, Abdallah S, Gray G, Stubbings H, Gow I, Baker P, Hunter PR.: Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. J Oral Pathol Med. 2011 40(1):83-9.

[67]. Silva Marques DN, Mata AD, Patto JM, Barcelos FA, Almeida Rato Amaral JP, Oliveira MC, Ferreira CG.: Effects of gustatory stimulants of salivary secretion on salivary pH and flow in patients with Sjögren's syndrome: a randomized controlled trial. J Oral Pathol Med. 2011 Apr 11.

[68]. Silverman S Jr.: Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. J Am Dent Assoc. 2001 ;132 Suppl:7S-11S

[69]. Simard EP, Pfeiffer RM, Engels EA.: Spectrum of cancer risk late after AIDS onset in the United States. Arch Intern Med. 2010 170(15):1337-45.

[70]. Streckfus, Ch., F., Dubinsky, W. P.: Proteomic analysis of saliva for cancer diagnosis Expert Rev. Proteomics 4 2007 (3): 329-332

[71]. Szabó Gy, Németh Zs.: Szájsebészet, maxillofaciális sebészet. Nyálmirigy betegségek Semmelweis, Budapest, 2004; 125-129.

[72]. Szeberényi J. Molekuláris sejtbiológia. Dialóg Campus Kiadó 2004.

[73]. Talián M., Márk L, Melegh B: In: Kovács LG, Debreceni L (szerk.): Tömegspektrometria. Gyakorlati laboratóriumi medicina, Literatúra medicina 2008.

[74]. Tieneke B.M., Schaaij-Visser, Jantine F., Bremmer, Boudewijn J.M. Braakhuis, et al.: Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia . Oral Oncology 2010 (46) 123–127

[75]. Ujpál M.:A szájüregi daganatok és a diabetes mellitus összefüggései. PhD értekezés 2004

[76]. Williams JV, Revington PJ.: Facial basal cell carcinoma in a young patient with Crohn disease. J Craniofac Surg. 2010 6):1996-8.

[77]. Z.A. Wood, L.B. Poole, P.A. Karplus .: Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. Science 2003 (300) 650–653.

[78]. Zhang B, Wang Y, Su Y.: Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy Cancer Letters 2009 (286) 154–160

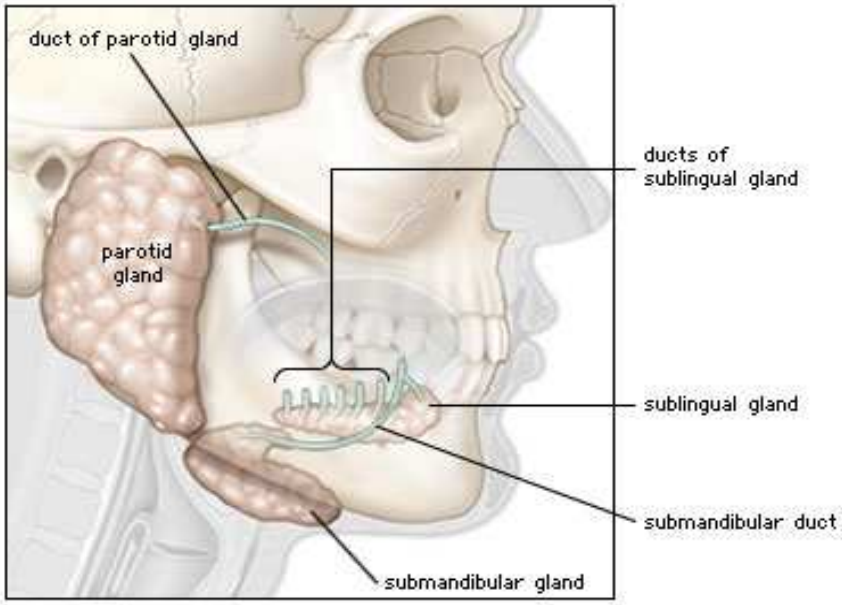
[79]. Zhang L, Yang X, Zhong LP, Zhou XJ, Pan HY, Wei KJ, et al.: Decreased expression of Annexin A1 correlates with pathologic differentiation grade in oral squamous cell carcinoma . J Oral Pathol Med;38(4):362–70. 2009

[80]. Zheng Y, Xia P, Zheng HC, Takahashi H, Masuda S, Takano Y.: The screening of viral risk factors in tongue and pharyngolaryngeal squamous carcinoma. Anticancer Res. 2010 (4):1233-8.

[81]. Zhi Wang,[#1] Xiaodong Feng,[#1] Xinyu Liu,[2] Lu Jiang,[1] Xin Zeng,[1] Ning Ji,[1] et al.: Involvement of potential pathways in malignant transformation from Oral Leukoplakia to Oral Squamous Cell Carcinoma revealed by proteomic analysis. BMC Genomics. 2009 (10): 383.

11. Függelék

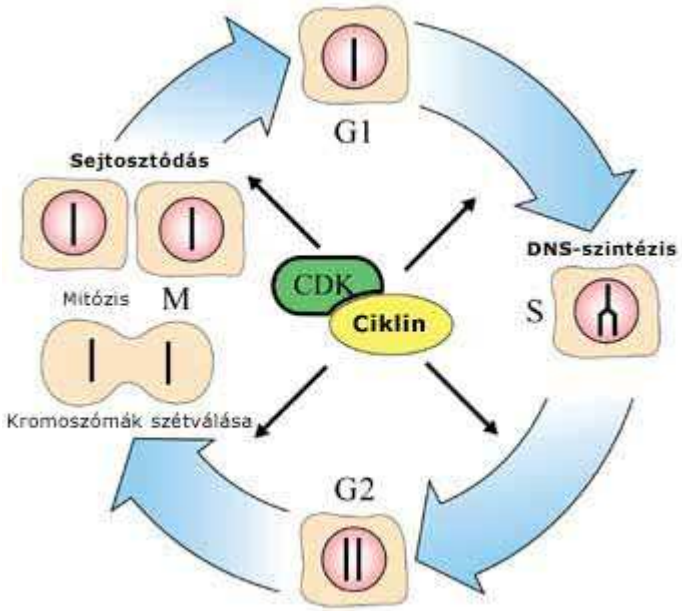
A nyálmirigyek elhelyezkedése



© 2003 Encyclopædia Britannica, Inc.

(http://www.britannica.com/EBchecked/topic/519405/salivary-gland)

A sejtciklus lépései



Eukariótáknál a sejtciklus fázisai (M,G1, S, G2) szabályos ritmus szerint ismétlődnek. A G1-fázis időtartama a sejt típusától és a külső körülményektől függően erősen változik. Gyorsan osztódó sejteknél a G1 rövid, sőt korai embrionális őssejtekben teljesen kimaradhat. A kifejlett szervezet legtöbb szövetére hosszú G1-fázis jellemző: a sejtek gyakorlatilag kilépnek a sejtciklusból és G0-fázisba kerülnek. Egyes sejteknél ez a végleges állapot (pl. idegsejtek). Az S-fázisban a sejt tehát megkettőzi a DNS-állományát, pontosan ügyelve arra, hogy minden DNS lemásolódjon, de mindegyik csak egyszer. Ez az ellenőrzés biztosítja, hogy az utódsejtekben se génhiány, se géntöbblet ne forduljon elő. A DNS-szintézissel párhuzamosan más folyamatok is zajlanak, például a DNS térszerkezetéhez nélkülözhetetlen ún. hisztonfehérjék szintézise és a sejtmagba történő transzportja.

A nyál fő funkcióinak felsorolása

1.A szájüreg fiziko-mechanikai tisztítása

2. Folyadékfilm képzés a szöveteken, ennek célja a lubrikáció, és permeabiltási barrier létrehozása, amelyek a lágyszöveteken nyálkarétegként, protektív molekulákkal jelennek meg, a keményszöveten aquiralt pellikulaként jelentkezik, valamint teljes felületen proteináz gátló funkciója van.

3. A szájüregi flóra összetételének dinamikus modulációja, ami a mikrobiális flóra szelektív tisztítását jelenti.

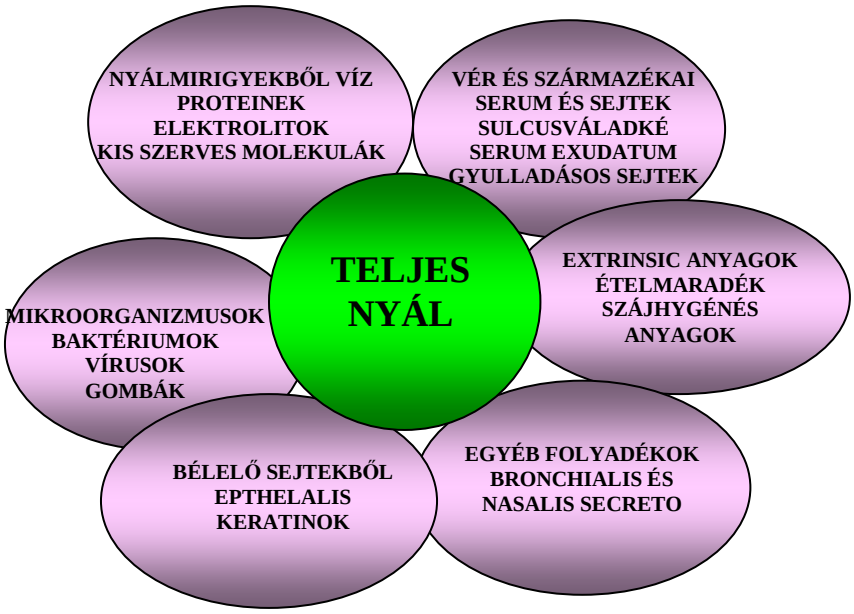
4. A káros anyagok savasítása, és semlegesítése pufferkapacitás, bázisképzés és komplex képzés révén.

5. Kálcium/foszfát egyensúly szabályozása intracellulárisan a szekréciós granulumok érése során valamint extracelluláris mineralizáció révén.

6. Emésztés: ízanyagok oldása, nyelőcső tartalom semlegesítése regurgitáció esetén, a falat nedvesítése, a gyomortartalom hígítása és a keményítő első lépésben történő bontása.

7. A nyálmolekulák extracelluláris poszttranszlációja

8. A fogak védelme a fluoridkörnyezet egyensúlyozásával. [31,36]



A nyál összetételének sematikus ábrája

Korábbi epidemiologiai adatok

Európára vonatkozó 2000 évi felmérések szerint a vizsgált 38 európai ország között Magyarországon volt a legmagasabb a szájüregi daganat mortalitása és incidenciája, mindkét nemben (*a. és b. táblázat*). A halálozási arány, valamint az évenként újonnan felfedezett betegek száma is messze meghaladta a tőlünk keletre fekvő országokét [48].

a. táblázat: ***Halálozási arány*** *(ASR) 2000-ben, 100 000 lakosra vonatkoztatva, szájüreg- és garatrákoknál. A táblázatban a vizsgált 38 európai ország első 10 helyezettje látható.*[48]

Férfi			**Nő**		
	ország	**ASR**		**ország**	**ASR**
1	Magyarország	10,3	1	Magyarország	1,4
2	Szlovákia	8,9	2	Dánia	1,0
3	Horvátország	6,9	3	Finnország	0,9
4	Moldva	6,0	4	Szlovákia	0,8
5	Ukrajna	5,3	5	Észtország	0,8
6	Észtország	5,3	6	Norvégia	0,8
7	Oroszország	5,0	7	Lengyelország	0,7
8	Fehéroroszország	4,7	8	Románia	0,7
9	Lettország	4,5	9	Oroszország	0,7
10	Litvánia	4,5	10	Litvánia	0,7

b. táblázat: A szájüreg- és garatrákok korfüggő (ASR) ***incidenciája****, 2000-ben, 100.000 lakosra. A táblázatban 38 európai ország első 10 helyezettje látható*. [48]

férfi			**nő**		
	ország	**ASR**		**ország**	**ASR**
1	Magyarország	15,5	1	Magyarország	5,3
2	Horvátország	15,4	2	Luxemburg	4,5
3	Franciaország	14,9	3	Belgium	3,7
4	Szlovákia	14,1	4	Izland	3,4
5	Spanyolország	13,8	5	Németország	3,3
6	Németország	13.0	6	Dánia	3,2
7	Bosznia-H	11	7	Hollandia	3,1
8	Portugália	11	8	Horvátország	3
9	Belgium	10,8	9	Svédország	2,7
10	Albánia	10,8	10	Ausztria	2,7