

# Nagy átbocsátóképeségű 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. Sümegei 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**



# 1. Bevezetés

Napjainkban Magyarországon az orofaciális malignus daganatok morbiditási és mortalitási adatai folyamatosan romló tendenciát mutatnak, egyre fiatalabb nemzedék érintett a megbetegedésekben.

PhD dolgozatom kérdésfeltevése ebből a gondolatból fakadt: szükség van egy módszerre, ami a daganatok nagyon korai diagnosztikájára alkalmas.

## 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*).

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.

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 fejnagy területi rák miatti mortalitás 387%-kal emelkedett.

## 1.2. A korai diagnózis jelentősége

Mivel ismert tény, hogy **korai diagnózis esetén a szájtumorok nagy része gyógyítható**, és a túlélési arány jelentősen javítható, indokolt a kérdés, hogyan lehetne ezen a helyzeten változtatni.

Az ország lakosságának mintegy 5-10 százaléka soha, 50 százaléka csak erős fogfájás esetén keresi fel a fogorvost. Ezáltal a szájüregi, illetve a maxillo-faciális régió daganatainak korai diagnosztikája nem valósul meg, a tumoros esetek felét - kétharmadát későn diagnosztizálták, és észlelésük idején már inoperábilis állapotban

voltak. A magyar lakosság szájhigiéniája és fogászati egészségtudata igen alacsony szintű, és éppen a carcinoma kialakulás szempontjából legvesélyeztetettebb rétegek nem jutnak el éveket 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 ,
- a daganatok gyors növekedése (az évenkénti szűrővizsgálat nem elegendő),
- a veszélyeztetett populáció tájékozatlansága és megközelítésének nehézsége,
- a fogorvosi szűrővizsgálatok hiánya illetve nem kellő alaposága (alapos szűrés elmaradása, fogorvoshoz nem-járás)

## 1.3. Az etiológiai faktorok jelentősége

### 1.3.1. Dohányzás

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 .

### 1.3.2. Alkohol fogyasztás

Fontos az elfogyasztott alkohol minősége: Magyarországon jellemző a tömény szeszes italok és a sör ivása. Az „egyszerre elfogyasztott mennyiség” Magyarországon 0.47 dl/férfi és 0.25 dl/nő.

Szembetűnő korreláció figyelhető meg a májcirrózisos halálozás és a szájüregi tumorok okozta halálozás magyarországi területi megoszlásában, feltételezhetjük, hogy a két betegség kialakulása hasonló oki tényezőkkel magyarázható.

### 1.3.3. Rossz szájhigiéne

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

### 1.3.4. Vírusok

Szignifikáns összefüggést mutattak ki a HPV vírusok vagy vírus ellenes antitestek jelenléte és a szájüregi daganatok kifejlődése között . 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.

### **1.3.5. Alultápláltság**

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

### **1.3.6. Immunszuppresszív 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

### **1.3.7. Gombás fertőzések**

Epidemiológiai 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. Tapasztalatok mutatták, hogy a terbafine gombaellenes gyógyszer gátolja a szájüregi daganatok növekedését. .

## **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 kumulálódik, együttes hatásuk ezért fokozottan károsítja a szájüregi és garatszöveteket.

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

A szekunder prevenció hatékony eszközét képezhetik a megfelelően alkalmazott stomatoonkológiai szűrővizsgálatok. Ezeket a következő módokon lehet elvégezni:

1. **teljes népességen**
2. **klinikák, kórházak** fekvő és járó betegei
3. **munkahelyi**
4. **célcsoport**
5. **más szűrővizsgálatokhoz**
6. **alkalmi, egyéni**

A szűrésre alkalmas laboratóriumi analitikai módszerek nagy előnye az abszolút objektivitás, a mérések standardizálhatósága, relatív alacsony költsége.

A proteomikai méréseknek jelentős előnyei vannak:

1. Mindig non invazív
2. A minták feldolgozásának egyszerűsége miatt a mérés pontos
3. A peptid analízis költségei jóval alacsonyabbak, az ár/érték arány jobb.

## 2. Elméleti háttér

### 2.1. A sejtciklus lépései

A sejtosztódás végétől a következő sejtosztódás végéig tartó időszakot nevezzük sejtciklusnak.

### 2.2. A sejtciklus szabályozása

A sejtciklus fő szabályozói olyan fehérjekomplexek, amelyek **egy katalitikus** hatású, és **egy regulátor** alegységből állnak. A katalitikus alegységek ún. fehérjekinázok, a regulátor-alegységek (ciklinek) hozzájuk kötődnek. Kialakulnak a ciklin-dependens-kinázok (CDK). Kimutatták, hogy egyes emberi daganatokban a ciklin- és CDK-molekulák megnövekedett szintje jellemző.

### 2.3. Progenitor és maturált sejtek közötti különbségek

#### 2.3.1. Maturált sejt:

Érett sejt, vagyis életfolyamatai kiegyensúlyozottak. A fehérjeszintézis a sejt életciklusától függően jellemző, mérhető és prognosztizálható.

#### 2.3.2. Progenitor sejt:

A progenitor sejtek képesek specifikus differenciációra, „előre meghatározott” célirányos differenciálódás a feladatuk. Osztódási képességük limitált. A progenitor sejteket felnőttkori őssejteknek is nevezik, fő feladatuk a reparációs mechanizmusokban van.

#### 2.3.3. Tumorsejt:

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.

#### 2.3.4. Tumormarkerek

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.

## 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, bár a nyál gyűjtése nem standardizált, a legtöbb tudományos méréshez néhány (4-5) eddig leírt módszert alkalmaznak a kutatók.

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

### 2.4.1. A nyál összetétele

99,3% vizet, és 0,7% szárazanyagot tartalmaz, fehérjékből és anorganikus sókból áll, pH-ja 6,4 és 7,0 között változik. Egyéb összetevői a zsírok, hormonok, növekedési faktorok, testidegen anyagok (gyógyszerek, jód) vírusok. Az összetétele dinamikusan változik.

## 3. A dolgozat célkitűzései

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 azonosítása, ami szájüregi, vagyis a tápcsatorna kezdetén lévő tumorokra jellemző.
3. Egyszerűsített proteomikai módszer kidolgozása a szűrővizsgálatok céljából.
4. A kiválasztott fehérjékre jellemző peptidok kimutatásának validációja nagyobb egészséges kontroll és daganatos beteg populáción, az egyszerűsített és rövidített nyál mintavétellel és proteomikai módszerrel.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. A vizsgálatba bevont személyek

A vizsgálat kezdetén 25 fő 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 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 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

Steril fecskendőbe gyűjtöttünk 1-1.5 ml nyálat. A mintákat Eppendorf csövekbe helyeztük, és azonnal  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékletre hűtöttük, itt tároltuk a laboratóriumi vizsgálatig. A mintavételhez szükséges időt mértük.

A kontrollcsoportból másik kettő mintavételi módszerrel is gyűjtöttünk 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

.Poliakrilamid géleket használtunk, ahol a fehérjéket nátrium-dodecil-szulfát (SDS) jelenlétében denaturálják, így egymástól elválaszthatók lesznek tömegük alapján. A fehérjék vizualizálás (festés, autoradiográfia) után foltokként jelennek meg a gélképen.

### 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

A tömegspektrométer részei: mintaelőkészítő-bevivő rendszer, ionforrás, analizátor és detektor, valamint az ezekhez kapcsolódó számítógépes adatfeldolgozó és irányító rendszer.

#### 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 párologó anyagok) közvetlenül be lehet vezetni a forrásba, ahol az ionizáció megtörténik.

#### **4.3.2.3. Ionforrások**

A méréshez szükség van a vizsgált részecskék ionizálására. 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.

#### **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.

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

#### **4.3.3 Fehérjék elválasztása**

Négy, szövettanilag reprezentatív tumoros beteg, és 5 kontroll páciens fagyasztott nyálmintájából SDS gélen elektroforézist végeztünk.

#### **4.3.4. Triptikus emésztés és MALDI TOF/TOF MS**

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. A kimetszett sávokat festékmentesítettük, majd tripszin oldattal inkubáltuk, mintatartó lemezre vittük fel. A tömegspektrometriás méréshez Autoflex II TOF/TOF típusú készüléket használtuk. A MALDI TOF 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 mérések során  $m/z$  800 és 5000 között detektáltuk a tömegspektrumokat.

A fehérjék PMF azonosítása MSDB és NCBI nr adatbázisok alkalmazásával, majd MASCOT adatbázis kereső motor és Bruker BioTools 3.0 software segítségével történt. 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 tovább bontottuk. Így tudtuk meghatározni a peptidek pontos elsődleges szerkezetét és annak módosulásait.



#### 4.3.5 A spektrogram értékelése

Minden mintából készült görbe segítségével leolvasható, hogy milyen móltömegű peptid milyen megoszlásban volt jelen. Ennek a grafikonnak, és az adatbázisban hozzáférhető fehérjék spektrogramjának összehasonlításával azonosíthatjuk a mintában lévő fehérjéket.

#### 4.3.6. Célzott peptid analízis

A célzott peptid analízishez 50 µl mennyiségű nyálat hígítottunk 100 µl 50 mM koncentrációjú NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 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

Kimutattuk, hogy az általunk használt mintavételi eljárás kevesebb eszközt igényel, rövidebb idő alatt elvégezhető..

	<b>stimulációs módszer</b>	<b>viaszragásos módszer</b>	<b>saját „taktilis” módszerünk</b>
időigény átlag	6 perc	7 perc	1 perc
eszköz igény	fogkefe, fogkrém, öblítőpohár, steril köpöcsésze, Eppendorf cső	fogkefe, fogkrém, öblítőpohár, fogászati viasz, steril köpöcsésze, Eppendorf cső	öblítőpohár, egyszerűhasználatos fecskendő, Eppendorf cső

### 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. A kimetszett sávokban lévő peptidekről készült tömegspektrometriás vizsgálatban fehérjéket identifikáltunk, és megállapítottuk, hogy van két olyan fehérje, amely minden, itt vizsgált daganatos beteg nyálában együttesen megtalálható.

#### 5.2.1 A tumor marker fehérjék kijelölése

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

### **5.2.2. A vizsgálatokban identifikált fehérjék tömegspektrumai**

### **5.2.3. A vizsgálatban identifikált fehérjék leírása**

#### **5.2.3.1. Annexin csoport**

#### **5.2.3.2. Cornulin csoport**

#### **5.2.3.3. Peroxiredoxin csoport**

#### **5.2.3.4. A thioredoxin rendszer**

## **5.3. Natív nyál triptikus emésztése**

A célzott peptid analízishez 50 µl mennyiségű natív nyálat hígítottunk 100 µl 50 mM koncentrációjú  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  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**

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.

# **6. Megbeszélés**

Méréseinkkel 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.

## 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 szájúregi, 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.:

**Szájúregi tumoros betegek nyálának proteomikai vizsgálata**

Magyar Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Társaság Kongresszusa  
Balatonalmádi 2007

**3. Szántó I.,** Gelencsér G., Sándor B., Gallyas F.:

**Screening of oral Cancer by Using Mass Spectrometry Method**

45<sup>th</sup> 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 vízdékonysága**  
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.**, Balás L., 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 vízdékonysága**  
MFE Fogpótlástani és Implantológiai Társaságainak Vándorgyűlése, Sopron 1994
2. **Szántó I.:**  
**Organisation of school dentistry in Hungary**  
Ch. Clifford Dental Hospital, Sheffield, UK. 1996
3. **Szántó I.**, Szabó Gy.:  
**Mikroszkópos tapasztalatok borítókronák készítésekor .**  
MFE Fogpótlástani és Implantológiai Társaságainak Vándorgyűlése, Szeged 1997
4. **Szántó I.**, Mukics A.:  
**Szisztémás sclerosisban szenvedő beteg kezelésének nehézségei POSTER**  
MFE Fogpótlástani és Implantológiai Társaságainak Vándorgyűlése, Pécs 1999
5. **Szántó I.**, Visegrády K.:  
**A nyálkahártya csont alapzat tehermentesítése POSTER**  
MFE Fogpótlástani és Implantológiai Társaságainak Vándorgyűlése, Pécs 1999
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.; Gábrriel, 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**

45<sup>th</sup> 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**

45<sup>th</sup> 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. Gyermekkorai 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 segítettek 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 biztatása és áldozatvállalása mindenben segített.

*Dolgozatomat édesapám emlékének ajánlom.*

# High throughput diagnostic method to early detection of oral cancer

PhD thesises

Author

**Dr. Balásné Dr. Szántó Ildikó**

University of Pécs, Dental Department

Consultant:

**Dr. Gallyas Ferenc egyetemi tanár**

University of Pécs, Institute of Biochemistry

Clinical consultant:

**Prof. Dr. Olasz Lajos**

University of Pécs, Dental Department

**University of Pécs**

**Medical Faculty**

**Pécs**

**2011**



# 1. Introduction

The incidence and mortality data of orofacial malignant cancer in Hungary show continuously increasing tendency, these facts drive researchers and clinicians in this field to do their task urgently. These serious diseases are caused by heavy smoking, bad oral hygiene and a huge alcohol consumption, mainly the summation of these effects.

The aim of this PhD work is necessary to find a method which is simple, low cost, and available for early diagnosis of the cancers.

## 1.1. Etiology

Worldwide 500 000 new patients are registered in statistical data of epithelium originated oral cancers. In the list of the first 6 most common group of mortality the second is the cancer mortality directly behind the cardiovascular lethality. The frequency of cancer death increased permanently, between 1965 and 1990 the worldwide data show 3 times increasing of cancer mortality.

Among the different regions of human body the oral malignomas - next to stomach, lung, breast, colon and cervix carcinomas – are in the 6th place in the frequency list of developed countries, and the 3rd place in the 3rd world. Oral cancers are 1-5% of all carcinomas in Europe, 4% in the USA, and 5% in Hungary, it means 2500 death cases yearly.

New published European epidemiological data show that the morbidity and mortality of oral cancer of the both gender is the highest in Hungary among the measured 38 European countries. The death rate and the number of newly diagnosed patients are higher than any other East-European countries.

## 1.2. The importance of early diagnosis

The main reason of this high mortality of oral cancers, that patients are detected, diagnosed and treated in late stadium of the cancer development, but it is a fact, that the chance of the 5-years-survive is relatively high, if the cancer is localized, histologically carcinoma in situ. After the National Cancer Institute of USA statistics the ratio of 5-years-survive is 82% in cases of localized tumors, 45% in cases of regional metastasises and 21% in cases of distant metastasises.



Because these facts mentioned above are well known, the early detected tumors are mainly curable, the ratio of survive is highly controllable, we have a question, how we can change the nowadays sensed bad situation?

The 5-10% of Hungarian population never, the 50 % of people have visited the dentist in case of serious tooth ache. Though the early diagnosis of the oral and maxillo-facial tumors are not available, the half or two-third of the cancer cases are detected too late, in incurable stadium. The dental education and the oral hygienic culture of Hungarian population is very low, and the people in highest cancer risk have not been examined by dentist for a long years ago. The main reason of extremely high mortality of oropharyngeal cancers in Hungary is the late diagnosis. The reasons of the late diagnosis are the follows:

- a lack of highly educated medical personnel
- a lack of perfect diagnosis of precancerous lesion
- the rapid progression of tumors
- the non informed risk patients
- the lack of regular screening

### 1.3. The importance of etiologic factors

#### 1.3.1. Smoking

We have a worldwide known scientific data of the correlation between cancer diseases (lung, oral region) and smoking, but all researches show the conclusion that all the forms of tobacco consumption is the basic of tumor development in any localisation..

#### 1.3.2. Alcoholic drink consumption

In all cases very important the quality and quantity of drinks: typical costume in Hungary the high concentrated alcoholic beverages and beer consumption. The data of one-time-consumed amount is 0.47 dl/male and 0.25 dl/female.

We can see a correlation of geographic localisation between the mortality of liver fibrotic cirrhosis and oral tumor death cases. May be the etiologic factors are the same in the both diseases.

#### 1.3.3. Bad oral hygiene

The bad oral hygiene is an irritative agent itself, (caries teeth, radices, old-fashioned dentures, calculus or plaque accumulation). After some new scientific research we can see, that plaque bacteria are able to create acetaldehyde which is an important chemical carcinogen agent.

#### **1.3.4. Viruses**

There is a significant correlation between the presence of HPV viruses or antibodies and the development of oral tumors. More virus infection and HIV positivity increases the development of oral tumors.

#### **1.3.5. Malnutrition**

#### **1.3.6. Immunosuppressed condition**

Sometimes caused by medication side effect.

#### **1.3.7. Fungal infections**

Some Candida species are responsible of the development of oral tumors.

### **1.4. The opportunities of prevention**

#### **1.4.1. Primary prevention: to eliminate the risk factors**

According to the literature the effect of smoking and alcoholic drinks not only summated, but also cumulated, their combined impairment completely destroy the oral tissues.

#### **1.4.2. Secondary prevention: early diagnose and treatment**

The best tool of secondary prevention is the annual stomato-oncologic screening. The following methods are suggested:

1. total population
2. patients of clinics and hospitals
3. workplaces
4. risk patients
5. connected to other screenings
6. individual

The analytical laboratory methods, which are available for screening are absolute objective, standardizable and relatively low cost.

The proteomic measurement has benefits as follows:

1. Non invasive
2. Exact measurement because the method is simple
3. The costs of peptid analysis are relatively low, the cost/benefit ratio is good

## 2. Theoretical background

### 2.1. The steps of cell cycle

The cell cycle is a period from the end of replication till the end of the next replication.

### 2.2. The regulation of cell cycle

The main regulatory agents are protein complexes which contain two subcomplements: one catalytic and one regulatory part. The catalytic part is a so-called protein-kinases, the regulatory parts are the cyclines binding to each other, and creating a new molecule, the cyclin-dependent-kinases (CDK). It is shown that the level of cyclines and CDK molecules are higher in some human cancers.

### 2.3. The odds between progenitor and matured cells

#### 2.3.1. Matured cell:

Matured cell, the biologic procedures are balanced. The protein synthesis according to the location of the cell cycle is typical, measurable and should be prognosticised.

#### 2.3.2. Progenitor cell:

The progenitor cells are able to do a specific differentiation, their task is the „predisposed“ targeted differentiation. The capacity of duplication is limited. The progenitor cells are the so-called adult stem cells, their main functions are in the repair and healing mechanisms.

#### 2.3.3. Tumor cell:

The cycle of these cells are shortened remarkably, become irregular and stops the typical order of transcription-translation. They synthesise substantially less proteins, and the properties of the produced peptides are different. The common property of all tumor cells, that during the irregular duplications they produce more-or-less typical proteins.

#### 2.3.4. Tumor markers

These sign molecules show the activity of malignant (non differentiated and no controlled replicated) cells. These molecules are mainly proteins, which are produced in different positions of cell cycle, and detectable from any body fluids.

### 2.4. The saliva, as a diagnostic material

The saliva is one of the most promising examination fluids, because the collection is non-invasive. The collection is not standardized, the most scientific research uses the common 4-5 methods written in the scientific papers.

The analytical examinations of proteins, peptides and any other pathologic biomarkers of saliva is promising.

#### **2.4.1. The composition of saliva**

The saliva contains 99,3% water, and 0,7% dry material (mainly proteins and anorganic salts). The pH is between 6,4 and 7,0. Other components are fats, hormones, growing factors, bodystranger materialstes (medicaments, viruses). The composition changes dinamically.

### **3. The aims of this study**

1. To create and standardize a simple, fast easy-to-do saliva collection method which can shorten and cheapen the examination.
2. To identify a marker protein from hysologically different tumor samples using the mass spectrometry method.
3. To create a simple proteomical method.
4. The validation of this previous results in a greater tumor patient's and heathy patient's population. We made this measuring with a simple and fast protemic method called mass spectometry after tryptic digestion for high throughput screening.

### **4. Materials and methods**

#### **1. The patients**

We started the examinations in 25 persons with clinically oral cancer and 20 non cancer persons int he same age/sex relation, and in good oral condition, as volunteers.

According to the hystopathological diagnosis following the operation three patients removed, because the clinically seems tumor didn't show malignant signs.

In the oral cancer group we had 14/8 male/female, main age was 61,6 years (46-77 years). Average age of males: 59,14 years, females: 66 years.

According to the hystological results we had: cc.planocellulare: 14 males and 6 females, epitelial metaplasia: 1 female, mucoepidermoid cc: 1 female .

The non-cancer patients were: 12/8 male/female, the age was 58,1 years(46-74 years).

## 4.2 Sample collection

We collected 1-1.5 ml saliva to a disposable syringe using the tactile method. The samples were taken to an Eppendorf tube, and were frozen to -80 °C urgently, than were stored until the laboratory process. The time of collection was measured.

The controll patients were asked to give a sample according to the tactile method, and with two different methods too. The time was also measured.

## 4.3. The methods of the laboratory process

### 4.3.1. Electrophoresis

.Polyacrilamid gel was used. The proteins were denaturated with sodium-dodecil-sulphate (SDS) , so they will be separable according to their mass. After visualisation (staining, autoradiography) the proteins will show a spot int he picture of gel.

### 4.3.2. Mass spectrometry

The mass spectrometry (MS) is an effective analitical method based on the measure of mass/charge ratio of organic and anorganic ions. The basic of the measure, that the machine creates ions of the examined material, than separates the ions according to the ratio of mass and charge. The given data are analised with computer databases.

#### 4.3.2.1. The parts and function of MS machine

The parts: sample-preparation-lifting system, source of ions, analisator and detector, combined with the data analising and controlling system.

#### 4.3.2.2. Sample preparation

Any kind of materials are monitorable using the MS, but it is limited because of the aggregate, than the ionosation technique. Volatile compounds (gaseous moleculas) could be driven to the space of ionisation, solide or liquide compounds must be transformed to gas phase.

#### 4.3.2.3. Sources of ions

We need the ionisation of detectable particles. To choose the best ionisation technique is determinated according to the measurable molecula on surrounding matrix. No universal technique of ionisation, though the speed and severity of change the ion sources is deteminative in the quality of the machine.

#### 4.3.2.4. Analisator

The analisator separates the ions according to their mass/charge ratio. As the smaller the mass and as the bigger the charge of the ion, as higher speed could be fastened in the flying tube.

We can do qualitative analysis, the machine is available to do the high throughput measuring. Daily 6500 measuring is possible in automatised way.

#### **4.3.3. The separation of proteins**

SDS gel electrophoresis

#### **4.3.4. Tryptic digestion and MALDI TOF/TOF MS**

After the electrophoretic procedure the extra bands were seen in the samples of the tumor patients, we sectioned. Every columns were sectioned in the 10mm, 22,5mm and 36,5mm height. The band were destained, an incubated in trypsin solution and after some laboratory procedure were dropped to the target plate. To MS analysis we used Autoflex II TOF/TOF type machine. To make the MALDI TOF PMF we used a LIFT mode for PSD (post source decay) and CID (collision-induced decay) fragmentation in automatised way with controlling of FlexControl 2.4 software. We detected the spectra between m/z 800 and 5000.

The PMF of proteins were detected with MSDB and NCBI nr databases, and MASCOT and Bruker BioTools 3.0 software. With MALDI-TOF/TOF MS we identified the proteins, which were detectable in case of tumor manifestation, or which would have diagnostic benefits. During the identification at first we made a primary mass spectra, following this procedure we dissociated towards the diagnostic important or high intensity peptides. we could determinate the perfect primary structure and variations of peptides.

#### **4.3.5. The valuation of spectra**

The mass and the apportionment of the peptides are detectable on the curves. With the comparison of these spectra and the database of the used software we could identify the proteins of the saliva samples.

#### **4.3.6. Targeted peptide analysis**

We diluted 50 µl of saliva samples in 100 µl, 50 mM concentrated  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  solution, than we made the trypsin digestion, and MALDI TOF/TOF MS analysis according to written above.

# 5. Results

## 5.1. The simplifying of collection

We presented, that our sample collection needs shorter time and less equipment:

	<b>Stimulation</b>	<b>Wax method</b>	<b>Tactile method</b>
Average time	6 min	7 min	1 min
Equipment which is necessary	toothbrush, toothpaste, mug, sterile container for collection, Eppendorf tube	toothbrush, toothpaste, dental wax, mug, sterile container for collection, Eppendorf tube	Mug, disposable syringe, Eppendorf tube

## 5.2. The examination of representative samples

According to the hystological groups we made ELFO and staining of proteins of 4 tumor and 5 healthy patient's samples. There was a difference of pattern between healthy and tumor patients. We cut this bands using simple blades, and made the mass spectrometry. We found the proteines (Annexin 1, Peroxiredoxin-2) which were seen in all tumor samples, and were absent from all non-tumor samples.

### 5.2.1. The appointed tumor marker proteins

After identification we collected the results of tumor and controll samples in a chart. This chart is the evidence, that there were two proteins, which were seen in all tumor samples, and were absent from all non-tumor samples. The both proteins have operative role in tumorigenesis and tumor progression.

<i>name</i>	<i>Control patientsl</i>	<i>Tumorpatients</i>
<u>Annexin 1</u> xxx	0/5	4/4
<u>Peroxiredoxin-2</u> xxx	0/5	4/4

### 5.2.2. The identified proteins

#### 5.2. 3.1. Annexin group

#### 5.2.3.2. Cornulin group

#### 5.2.3.3. Peroxiredoxin group

#### 5.2.3.4. A thioredoxin system

### 5.3. Tryptic digestion of native saliva

We diluted the 50 uL of saliva with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  solution, than digested.

### 5.4. The examination of the total sample collection with targeted peptide analysis

The third aim of this study was a targeted analysis of the choosen peptides in all samples. We asked that is it possible to detect the peptide sequence from native samples, only following a simple, easy-to-automatise triptic digestion using MALDI-TOF. We focused to the tipical peptide fragments of the two previously detected proteins. We found the peptides in all tumor samples, and the occurence of the same peptides in controll samples were under the sensitivity of detection.

## 6. Discussion

## 7. The summary of the results

1. We elaborated a simple, low cost collection method, and demonstrated that this method is available to collect the saliva samples of numerous patients.
2. We identified two tipical oral cancer proteins from tumor patients samples using the mass spectrometry.
3. We elaborated and used at first a direct triptic digestion method in native saliva examination.
4. To compare the results of the native and prepared samples, we presented the same proteins.
5. We validated the representative results in numerous oral cancer and healthy population. On behalf of the high throughput screening this measuring was made with a simplified and shorten proteomic method, and the spectra were analisad in blind method. According to our examinations this automatisable method added valuable results and these outcomes project the possibilities of simple and low cost screening method..