

**Precancerosus állapot a proteomika tükrében- Diabetesben
szenvedő betegek nyálmintáinak vizsgálata**

Tézisfüzet

Dr. Jancsik Veronika Ágnes



Iskolavezető: Dr. Kovács L. Gábor, egyetemi tanár

Programvezető: Dr. Olasz Lajos, MTA doktora

Témavezető: Dr. Olasz Lajos, MTA doktora

Dr. Márk László, egyetemi docens

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Fogászati és Szájsebészeti Klinika

Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Tanszék

Pécs

2014.

1. Bevezetés

A klinikai proteomika egy relatíve fiatal diszciplína, mely az elmúlt egy évtized során igen nagy ütemben fejlődött. Ennek a technikai fejlődésnek köszönhetően ma már képesek vagyunk nem csak sejt szinten, de fehérjék és peptidok szintjén is vizsgálni az emberi szervezetben zajló folyamatok.

Az ún. „omics” technológiákkal ma már nem csak biopsziából nyerhető szövettani mintákat tudunk elemezni, de vérből és nyálból izolálható peptidokat, fehérjéket, biomarkereket tudunk azonosítani. A nyál, mint különböző betegségek diagnosztikai eszköze, régóta intenzíven kutatott célpontja az „omics”, ezen belül is a proteomikai vizsgálatoknak. Sok előnyös tulajdonsága között kiemelendő az egyszerűen kivitelezhető és nem- invazív gyűjtési módszer.

Vizsgálatainkban ezt az újszerű technikát alkalmaztunk annak kiderítésére, hogy a 2-es típusú diabetesben szenvedő páciensek nyálában azonosíthatóak-e szájüregi laphámcarcinomára utaló biomarkerek.

Kérdésselvetésünk alapja különböző epidemiológiai és állatkísérletes vizsgálatok eredményei voltak, melyek során összefüggést találtak a két betegség között. Már a 19. századból találunk olyan publikációkat, melyek a diabetes és a szájüreg betegségeinek kapcsolatát írják le. Irodalmi adatok szerint a cukorbetegségben észlelt rosszabb szájhygiéné, a nyálszekreciós ráta és a pH-csökkenés kedvező körülmény a szájnyálkahártya megbetegedéseinek (leukoplakia, lichen oris, illetve a nyelvhat nyálkahártyájának elváltozásai) kialakulásában. Újpál és mtsai 2003-as vizsgálatai alapján elmondható, hogy a precancerosus állapotok gyakorisága cukorbetegség körében elérte a 8%-ot.

Ma Magyarországon a kettes típusú cukorbetegség népbetegségnek számít. A lakosság közel 10%-a szenved a diabetes valamelyik formájában és ez a szám a következő évtizedekben valószínűsíthetően emelkedni fog. Érdekes párhuzam, hogy az intenzív kutatások és szűrőprogramok ellenére a szájüregi laphámrákban szenvedő páciensek száma az elmúlt évtizedekben is rohamosan gyarapodott. Ezért mind prevenció, mind pedig a korai diagnosztika szempontjából fontos lehet olyan

korai biomarkerek azonosítása, melyekkel a szájüregi laphámcarcinoma időben, korai stádiumban felismerhető, de akár megelőzhető is lenne.

2. Célkitűzések

1. Kutatásunk során arra kerestük a választ, hogy a praecancerosus állapotnak számító diabetes mellitusban szenvedő páciensek körében előfordulnak-e korai szájüregi laphámrákra utaló biomolekulák?

2. Van-e különbség a 10 éve vagy annál hosszabb ideje diabetesben szenvedő páciensek nyál biomarker mintázatában?

3. Célunk volt továbbá, hogy egy megbízható és egyszerű vizsgálati protokollt dolgozzunk ki, melyek a későbbiekben egy nagy betegszámú, multicentrikus tanulmány alapjául szolgálhatnak.

3. Módszerek

A vizsgálatba bevont diabetes mellitusban szenvedő páciensek

Vizsgálatunkba 45 önkéntest vontunk be. A DM csoportba soroltuk a 2-es típusú diabetesben szenvedő pácienseket, míg a H csoportba a velük kor / nem relációban hasonló, egészséges egyedek kerültek.

A DM csoportban levő betegek mind a Pécsi Tudományegyetem II. számú Belgyógyászati és Nephrológiai Klinika fekvőbetegei voltak. A vizsgálatban való részvétel kizárási kritériumait a következők voltak:

1.	Nem jól kontrollált diabetes
2.	Diagnosztizált tumoros megbetegedés, precancer lézió
3.	Rossz szájhygiéné
4.	Mentális problémák
5.	Szájüregi aktív fertőzés vagy gyulladás, CPITN index >3
6.	Kontroll vizsgálatokon való részvétel elutasítása

A mintavétel előtt az önkéntes résztvevők egy saját szerkesztésű, nem validált kérdőívet töltöttek ki, melyben az egészségük állapotáról, az általuk szedett gyógyszerekről, továbbá az alkoholfogyasztási szokásról és a dohányzási szokásról is kérdeztük őket. Ezt követően minden résztvevő egy stomatooncologiai szűrővizsgálaton esett át.

2012. január 4-e és 2012. november 30-a között 45 nyálmintát vettünk az önkéntesektől. A férfiak-nők aránya: 55-45% volt, az átlag életkor 62,3 év. A kontrollcsoportban 10 férfit és 10 nőt involváltunk vizsgálatunkba, az ő átlag életkoruk 62,1 év volt.

Mintavételi módszer

A mintavétel standardizált körülmények között zajlott: délelőtti órákban, nem stimulált nyálmintát vettünk a buccalis és sublingualis területről egyszer használatos fecskendővel. A gyűjtött mintákat ezután rögtön jégen hűtöttük, majd 1 perces centrifugálást követően a felülúszót további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Proteomikai módszerek bemutatása

1. SDS-PAGE Elektroforézis

A biomarker fehérjék azonosításához 100 μ L nyálmintát Ultra Turrax homogenizátorral 20 mM Tris/HCl pufferrel (pH: 7.4) homogenizáltuk. A puffer 3 mM EDTA-t, 5 mM betamercaptoetanol-t és 1% SDS-t tartalmazott. Ezt követően 1%-os brómfenolkék adtunk a mintákhoz, majd az elegyet 2 percig forraltuk, ezután centrifugáltuk (8000 g, 2 min). SDS-PAGE elektroforézist végeztünk, melyhez 12%-os gélt készítettünk, Laemmli módszere szerint [16]. A molekulatömeg meghatározásához Pharmacia alacsony móltömeg kalibrációs kitet használtunk.

A géleket 30 Coomassie brillant blue R-250-nel festettük, a festékkivonó oldat 5% (v/v) ecetsavat és 16% (v/v) metanolt tartalmazott.

Az elektroforetikus futtatás után a géleket bescanneltük, majd a vizuális összehasonlító elemzés után, az extra sávokat, amelyek a betegek mintáiban keletkeztek, szikével kimetszettük. A kimetszett sávokat Eppendorf csőbe helyeztük, festékmentesítettük 3x10 perces, 200 μ L 50%-os (v/v) acetónitril és 50 mM NH_4HCO_3 oldatban.

2. *Triptikus emésztés és tömegspektrométer (MALDI TOF/TOF)*

A gél darabokat szobahőmérsékleten dehidráltuk, majd 10 µL tripszin (0.04 mg × mL⁻¹) Tris puffer (2.5 mM, pH 8.5) oldattal 37°C-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 újra feloldottuk 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 (collisioninduced 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 szett 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.

3. *Peptidfragmentumok azonosítása*

A fehérjék PMF azonosítása MSDB (Swiss-Prot) és NCBI nr 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 egyszerűen 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.

4. Statisztikai módszerek

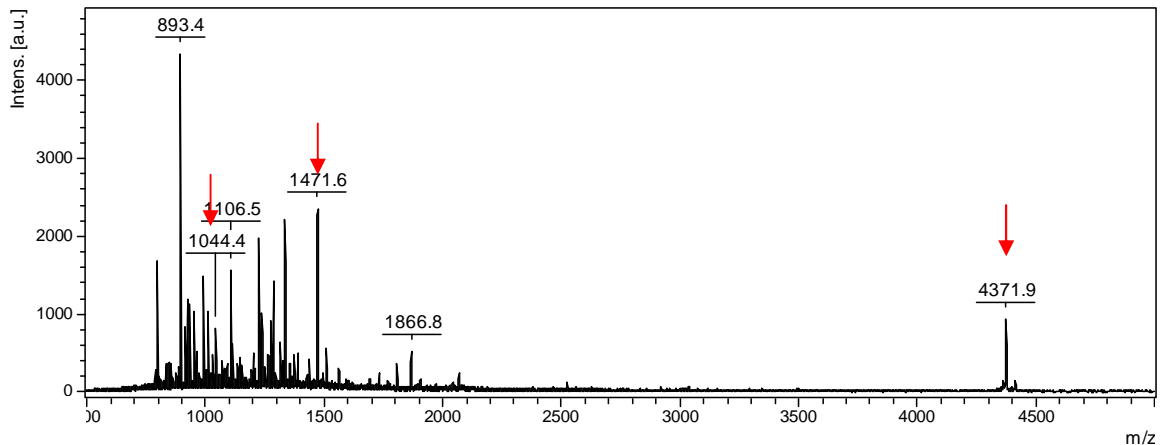
Vizsgálataink statisztikai elemzését a ClinProTools 3.0 nevű szoftverrel végeztük el (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A recalibrációra, a csúcsok normalizációjára, a csúcsok detektálására, a csúcsok kalkulációjára a szoftver automatikus beállításainak megfelelően került sor. The ClinProTools segítségével számos statisztikai próba végezhető el (t-próba, Wilcoxon- teszt, stb), mely prediktálja a jelentős diszkriminatív erővel bíró m/z értékeket.

4. Eredmények bemutatása

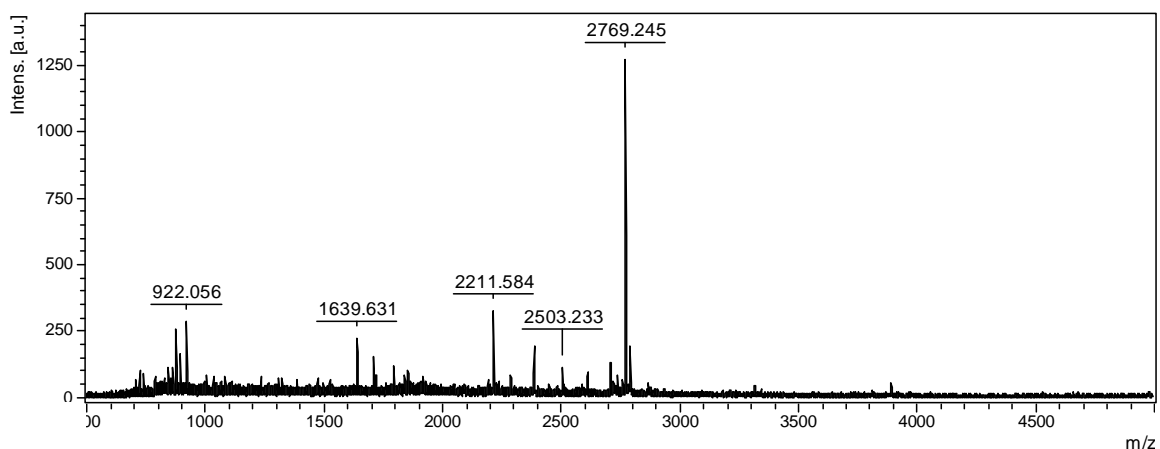
A diabeteses és egészséges önkéntesek géljeit összehasonlítva sok különbséget találtunk. A két csoportban eltérő spotokat tömegspektrometria segítségével azonosítottuk. Több mint 900 peptidet sikerült azonosítsunk. Különbséget találtunk a laphámcarcinoma jelenlétére utaló biomarkerek mennyiségében is (1. ábra). Ezeket az eredményeket a 2. és 3. táblázatban összegeztük.

1. ábra: Két jellegzetes tömegspektrogramban detektált különbségek. Az B képen egészséges mintán nem található egyik laphámcarcinomára utaló csúcs sem. Az A képen 18 éve diabeteses páciens mintájában mindhárom peptid csúcsa megtalálható.

A ábra: 18 éve diabetesben szenvedő, 61 éves női páciens mintájának képe, mindhárom jellegzetes laphámcarcinoma biomarkert tartalmazza.



B ábra: 58 éves egészséges női kontroll képe. nem tartalmazza egyik biomarkert sem.



2. táblázat: Laphámcarcinomára utaló biomarkerek összegzése

Szám	Név	Azonosító kód	Elméleti mólttömeg (Da)	Szekvencia fedettség%
1.	Annexin A8-like 2 [Homo sapiens]	gi 55666310	36,84	47,63
2.	Annexin A8-like Homo sapiens	Q5T2P8_HUMAN	36,86	32,72
3.	Tyrosine kinase	gi 473882	7,36	46,88
4.	AX969656 NID Homo sapiens	CAF14764	14,82	26,61
5.	Protein kinase [Homo sapiens]	gi 9886711	86,35	31,59
6.	Peroxiredoxin-2	gi 2507169	21,7	64
7.	Annexin A2	gi 113950	38,44	30

3. táblázat: Diabeteses és egészséges egyedek laphámcarcinoma biomarkerek előfordulásának összehasonlítása. 1- Annexin A8, 2- Peroxiredoxin2, 3- Tirozin kináz

Diabetes n=25		Kontroll n=20	
	Biomarker		Biomarker
D001	1,2,3	H001	neg
D002	1,2,3	H002	neg
D003	1,3	H003	neg
D004	1,2,3	H004	neg
D005	1,2	H005	neg
D006	1,2,3	H006	neg
D007	1,2,3	H007	neg
D008	1,2,3	H008	neg
D009	1,2,3	H009	neg
D010	1,2,3	H010	neg
D011	1,3	H011	neg
D012	1,2,3	H012	neg
D013	1,2,3	H013	neg
D014	1,2,3	H014	neg
D015	1,3	H015	neg
D016	1,2,3	H016	neg
D017	1,2	H017	neg
D018	1,2	H018	neg
D019	1,2,3	H019	neg
D020	1,2,3	H020	neg
D021	1,2,3		
D022	1,2,3		
D023	1,2		

D024	1,2,3		
D025	1,3		

Az identifikált fehérjék bemutatása

Annexin A8:

Az annexinek fontos cellularis és fiziológiás folyamatokban vesznek részt. Szerepük van a membránok scaffolding-jában, ami jelentősen összefügg a sejtek alakjával, formájával. Részt vesznek a vezikulák formálásában, továbbá megtalálhatók az endocitózis és exocitózis folyamatában is. Nem csak intracelluláris folyamatokban, de sejten kívül és megtalálhatóak. Annexinokat találhatunk a fibrinolízis, koaguláció, gyulladások és az apoptotikus folyamatokban. Az annexin A11 és A8 overexpresszióját leírták már colorectalis daganatokban, de vizsgálataink során arra következtethetünk, hogy ezek a biomarkerek esetlegesen egy korai orális laphám karcinóma jelenlétére utalhatnak.

Tirozin- protein kináz

Tirozin- protein kinázok, olyan enzimek, melyek katalizálják a foszfátcsoportok addícióját a tirozin specifikus aminosavakban. Ezek az enzimek kulcsfontosságú szerepet játszanak a szignáltranszdukcióban, a sejtek differenciálódásában és morfogenezisben. Aktivizált formáját korábban összefüggésbe hozták már mesenchyma eredetű tumorokkal, krónikus myeloid leukémiával. Pontos szerepük az orális laphám karcinómában kialakulásában, progressziójában még nem ismert.

Peroxiredoxin 2

A thioredoxin peroxidáz család, vagy peroxiredoxinok elsődleges feladata az intracelluláris szabadgyökök, mint a H₂O₂ redukálása. Nagy érzékenységű és gyorsan reagáló molekulák. Hat izoformája ismert, valamennyi szerepet kap a különböző lokalizációjú tumorok kialakulásában.

Vizsgálatainkban azt figyeltük meg, hogy az 5 vagy annál több éve diabetesben szenvedők esetében jelenik meg, amely arra enged következtetni, hogy esetlegesen

korai laphámcarcinoma biomarkernek tekinthető. Ennek részleteit a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: Peroxiredoxin 2 előfordulása a diabetes csoportban

Bevonási szám	Nem	DM Diagnosis felállítása (éve)
D001	nő	13
D002	nő	9
D004	férfi	15
D005	férfi	13
D006	nő	12
D007	nő	6
D008	férfi	25
D009	nő	11
D010	férfi	19
D012	nő	13
D013	nő	18
D014	nő	25
D016	nő	8
D017	nő	10
D018	férfi	6
D019	nő	14
D020	férfi	7
D021	nő	15
D022	férfi	16
D023	férfi	12
D024	férfi	5

5. Megbeszélés

A kettes típusú diabetes elterjedése a mai civilizált társadalomban egyre ijesztőbb méreteket ölt. Az elmúlt két évtizedben rohamosan nőtt az újonnan diagnosztizált betegeket száma, és a statisztikai előrejelzések szerint ezek a számok nemhogy csökkenni fognak, de rohamosan emelkednek a jövőben. Ma Magyarországon körülbelül egymillió fő szenved a cukorbetegség valamelyik formájában, ez a lakosság több mint egy tizedét érinti. Érdekes párhuzamot vélhetünk fel a diabetes és szájüregi laphámcarcinóma gyakoriságában. Az elmúlt négy évtizedben az intenzív kutatások, és gyógyszerfejlesztések és a szűrőprogramok kihangsúlyozása ellenére, több mint négyszeresére nőtt a szájüregi laphám karcinómával diagnosztizált páciensek száma. A helyzet, több mint aggasztó: Magyarország Európában első helyet foglal el a rák statisztikai vizsgálatokban. Ezen belül is a szájüregi laphámcarcinoma rendszerint az első három helyen található. Ennek hátterében sok tényező állhat. Az etiológiai faktorok közül kiemelkedő a magyar társadalom dohányzási szokása és a tömény szeszes italok fogyasztásának túlzott mennyisége. De nem elhanyagolható a faktor a súlyos szisztémás betegségek következtében kialakuló szövődmények sem.

Vizsgálataink során arra kerestük a válasz, hogy az epidemiológiai és állatkísérletes vizsgálatok eredményeit, sejtéseit felhasználva, diabeteses betegekben kimutathatók-e korai laphámrákra utaló biomarkerek.

A szakirodalomban erre az összefüggésre irányuló vizsgálatok nagy számban előfordulnak, de nyálból izolált laphám karcinómával összefüggésbe hozható biomarkerek először a mi munkacsoportunknak sikerült azonosítani.

A megnövekedett Annexin A8, peroxiredoxin-2 szint, és a tirozin-protein kináz jelenlétét nyálmintákban ez eddig tumoros betegekben azonosították. Precancerosus állapotokban ezt eddig nem sikerült igazolni.

A proteomikai módszerek fejlődésével, lehetőségünk nyílt arra, hogy a különböző vegyületeket, ne csak szerkezetükben, de funkciójuk során is elemezni tudjuk. Méréseink egyszerű kivitelezhetősége, mintagyűjtés non-invazivitása bebizonyította számunkra, hogy a kötelező stomato-oncológiai szűrésen túl, lehetőségünk van már korai fázisban kimutatni laphámrákra utaló fehérjéket.

Ennek fontossága egyáltalán nem elhanyagolható. Hiszen a korai stádiumban kiszűrt rákos megbetegedések, precancosuser léziók sokkal nagyobb valószínűséggel gyógyíthatók, jobb prognózissal rendelkeznek, mint az előrehaladott stádiumban levő tumoros elváltozások.

6. Eredmények összefoglalása:

1. Sikerült 3 biomarkert azonosítsunk diabeteses páciensek nyálában, mely szoros összefüggésbe hozható a szájüregi laphám carcinomával. Bár ezek pontos szerepe jelenleg még nem tisztázott a rák kialakulásában, gyanítható, hogy a carcinogenesis korai szakaszának biomarkereinek tekinthetők.

2. Megállapítottuk, hogy azokban a páciensek akik 10 vagy annál több éve szenvednek diabetesben magasabb százalékban fordul elő a peroxiredoxin-2 biomarker, mint azoknál a betegeknél, akik 10 évnél rövidebb ideje szenvedtek a betegségben.

3. Vizsgálati protokollunk egy jól működő, standardizálható folyamat, mely bármikor reprodukálható. Így a protokoll a későbbiek során egy nagy multicentrikus tanulmány alapjául szolgálhat.

7. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőimnek, Prof. Dr. Olasz Lajosnak és Dr. Márk Lászlónak a lehetőséget, hogy csatlakozhattam a doktori iskolához. Őszintén köszönöm önzetlen segítségüket, hasznos tanácsaikat és ösztönzésüket, mellyel támogattak dolgozatom megírásában.

Köszönetet mondok Prof. Dr. Wittmann Istvánnak, és Dr. Molnár Gergő belgyógyász kollégáknak, hogy engedélyezték és támogatták a diabetesben szenvedő páciensek vizsgálatát.

Külön köszönettel tartozom Dr. Nagy Ákos docens úrnak önzetlen segítségéért és támogatásáért.

Köszönet illeti meg az Orvosi Kémiai és Biokémiai Intézet munkatársainak segítségét a minták feldolgozásában, és elemzésében.

Nem utolsó sorban köszönöm a kollégák, asszisztensek fáradhatatlan munkáját, türelmét és segítőkészségét, amivel nagyban hozzájárultak e dolgozat megírásához.

Külön hálával tartozom Wenczler Máriának és Németh Tamásnének a PhD tanulmányaim során nyújtott segítségéért.

Végezetül köszönöm családom végtelen türelmét és biztatásukat.

8. Tudományos közlemények

8.1. Dolgozat alapjául szolgáló publikációk jegyzéke

1. **Jancsik VA**, Gelencser G, Maasz G, Schmidt J, Molnár GA, Wittmann I, Olasz L, Mark L:

Salivary proteomic analysis of diabetic patients for possible oral squamous cell carcinoma biomarkers

Pathology and Oncology Research, Vol. 19, Issue 4, Oct. 2013. DOI: 10.1007/s12253-013-9736-8, IF: 1,555

2. **Jancsik VA**, Márk L, Molnár GA, Wittmann I, Olasz L:

Nyálból izolált szájüregi laphámkarinóma biomarkerek vizsgálata 2-es típusú diabéteszes betegekben

Fogorvosi Szemle, 106. évf. 3. sz. 2013.

3. **Jancsik VA**, Márk L, Molnár GA, Wittmann I, Olasz L:

A szájüregi rák megelőzésének lehetőségei, új módszerek a diagnosztikában

Magyar Epidemiológia, 2013.

8.2. Absztraktok jegyzéke

1. **Jancsik VÁ**, Márk L, Wittmann I, Olasz L:

Application Proteomic methods in early cancer-related biomarkers in diabetic patients

J Dent Res 93(Spec Iss Abstract Book): a.id:182583, 2013. IF:3.826

2. **Jancsik VA**, Molnár GA, Wittmann I, Olasz L, Mark L:

Is Type 2 Diabetes a Risk Factor for Oral Squamous Cell Carcinoma? Analyzing Alterations of Salivary Biomarkers

73rd Scientific Sessions Abstract Book, the July 2013 supplement to the Journal Diabetes® a.id:2718-PO, IF:8.3

IF.: 1,555

Kumulatív IF absztraktokkal.: 16,681