

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Fogászati és Szájsebészeti Klinika,
Maxillofaciális Részleg

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

DR. JANCSIK VERONIKA ÁGNES, DR. MÁRK LÁSZLÓ, DR. GELENCSÉR GÁBOR, DR. OLASZ LAJOS

A szájüregi laphámrák morbiditási és mortalitási rátája folyamatosan növekvő tendenciát mutat világszerte, ezért a betegség korai felismerése kiemelkedő szerepet játszik. A diabétesz és a laphámrák kapcsolatát ez idáig epidemiológiai és állatkísérletes modelleken bizonyították. Szerzők célja ennek az összefüggésnek az igazolása volt, humán nyálból izolált, nem invazív detektáló módszerrel nyerhető biomarkerek segítségével.

Kulcsszavak: 2-es típusú diabétesz, Nyál biomarkerek, Proteomika, Orális laphámkarcinóma

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 folyamatokat [1, 2].

Az ún. „omics” technológiákkal ma már nem csak biopsziából nyerhető szövettani mintákat tudunk elemezni, hanem vérből és nyálból izolálható peptideket, fehérjéket, biomarkereket is 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 [3, 4].

Vizsgálatainkban ezt az újszerű technikát alkalmaztuk annak kiderítésére, hogy a 2-es típusú diabéteszben szenvedő páciensek nyálában azonosíthatóak-e szájüregi laphámkarcinómára utaló biomarkerek.

Kérdésfelvetésünk alapja különböző epidemiológiai és állatkísérletes vizsgálatok eredményei voltak [17], 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 szájhigiéné, a nyál szekreció ráta és a PH-csökkenés kedvező körülmény a szájnyalakahártya megbetegedéseinek (leukoplakia, lichen oris, illetve a nyelv hát nyálkahártyájának elváltozásai) kialakulásában. *Újpal és mtsai* 2003-as vizsgálatai alapján elmondható, hogy a prekancerózus állapotok gyakori-

sága cukorbetegség körében elérte a 8%-ot [8, 9, 10, 11, 13, 14].

Ma Magyarországon a cukorbetegség népbetegségnek számít. A lakosság közel 10%-a szenved a diabétesz 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 [5, 6, 7]. Ezért mind prevenció, mind a korai diagnosztika szempontjából fontos lehet olyan korai biomarkerek azonosítása, melyekkel a szájüregi laphámkarcinóma időben, korai stádiumban felismerhető, de akár megelőzhető is lenne.

Vizsgálataink céljából a diabéteszes populáció nyál-mintájának vizsgálatát tűztük ki, esetlegesen előforduló szájüregi laphámrákra utaló biomarkerekre vonatkozóan. Ehhez 45 önkéntes nyál-mintáját elemeztük SDS-PAGE elektroforézissel, majd MALDI TOF/TOF tömegspektrométer segítségével. Kutatásunk során arra kerestük a választ, hogy vajon előfordulhatnak-e nyál-mintákban olyan biomarkerek, melyek makroszkóposan és más rutin diagnosztikai módszerrel nem detektálható laphámkarcinóma daganatsejtek, vagy malignus transzformációban levő sejtek jelenlétére utalhatnak.

Módszerek

A vizsgálatba bevont

diabetes mellitusban szenvedő páciensek

Vizsgálatunkba 45 önkéntest vontunk be. A DM csoportba soroltuk a 2-es típusú diabetesben szenvedő pácienseket.

seket (n=25), míg a H csoportba a velük kor/nem relációban hasonló, egészséges egyedek kerültek (n=20).

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

1. Mentális problémák
2. Dohányzás
3. Ismert rákos megbetegedés, vagy rákot megelőző prekancerózus lézió
4. Nem kontrollált diabétesz
5. Szájüregi aktív fertőzés vagy gyulladás
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 sztomato-onkológiai szűrővizsgálaton esett át.

2012. január 4. és 2012. november 30. között 45 nyálmintát vettünk az önkéntesektől. A férfiak–nők aránya: 55–45%. A diabéteszes betegcsoportban 12 férfit és 13 nőt vontunk be a vizsgálatokba, az átlag életkor 62,3 év. A kontrollcsoportban 10 férfit és 10 nőt involáltunk, az ő átlag életkoruk 62,1 év volt.

A mintavétel standardizált körülmények között zajlott: délelőtti órákban, nem stimulált nyálmintát vettünk

a bukkális és szublingvális területről egyszer használatos fecskendővel [15]. A gyűjtött mintákat ezután rögtön jégen hűtöttük, majd 1 perces centrifugálást követően a felülúszót további felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

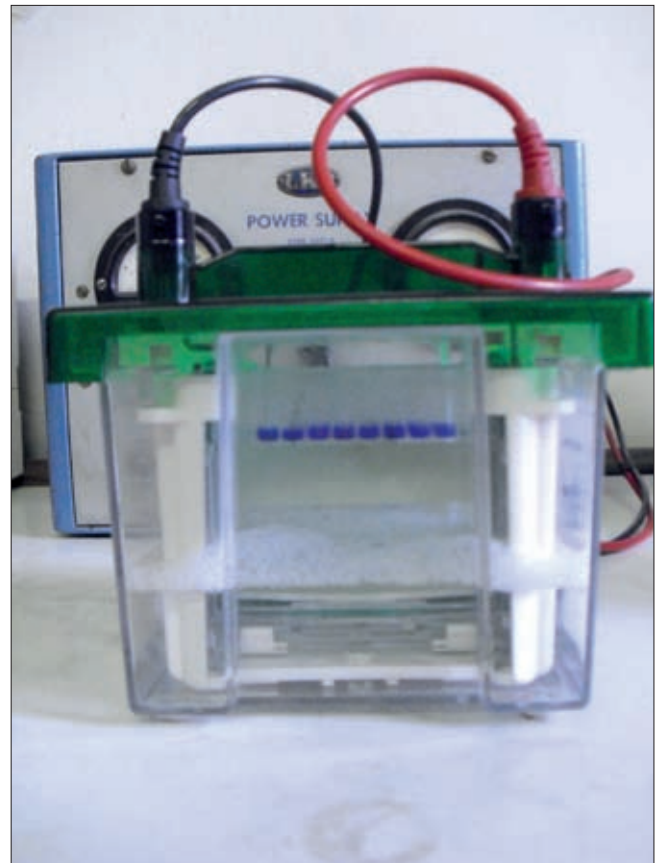
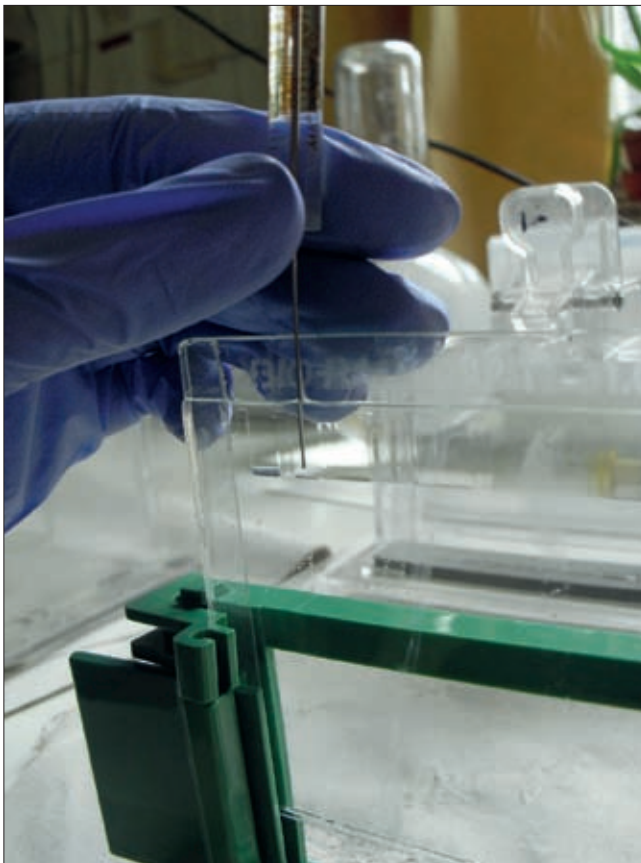
Proteomikai módszerek bemutatása

1. SDS-PAGE Elektroforézis

A biomarker fehérjék azonosításához 100 μL 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 percre forraltuk, ezután centrifugáltuk (8000 g, 2 min). SDS-PAGE elektroforézist végeztünk, melyhez 12%-os gélt készítettünk, *Laemmli* módszere szerint [16, 25]. A molekulatömeg meghatározásához Pharmacia alacsony móltömeg kalibrációs kivet használtunk.

A géleket 30 Coomassie brilliant 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



1. ábra. Minták felvitele géltre, fehérjék futtatása

perces, 200 µL 50%-os (v/v) acetonitril, és 50 mM NH₄HCO₃ oldatban.

2. 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 tálca minden egyes 1 µL térfogatú mintaoldathoz 1 µL telített mátrix oldatot kevertünk. A mátrixoldatot 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, Bre-

segségével 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.

Eredmények bemutatása

A diabetészes és egészséges önkéntesek géljeit összehasonlítva sok különbséget találtunk. A két csoportban eltérő spotokat tömegspektrometria segítségével azonosítottuk. Több mint 900 peptidet sikerült azonosítani. A következő táblázatban csak a diabetészes betegekre jellemző, laphámrákra utaló fehérjéket összegeztük. Ezek közül választottunk ki 3, korábban már laphámkarcinómás betegek nyálmintájában azonosított biomarkert, melyeknek előfordulását megvizsgáltuk az egészséges csoportban is. Eredményeinket a 2. táblázat foglalja össze. A vizsgált diabetészes betegek mintájában, 64%-ban (n=16 minta) azonosítottuk mind a három biomarkert. Minden mintában sikerült azonosítsuk az annexin csoport A8-as tagját, és 84%-nál (n= 21 minta) találtunk peroxiredoxin 2-t, melyeket korábban már összefüggésbe hozták szájüregi laphámrákkal, és azonosították is rákos betegek nyálmintájában. A tirozin-protein kináz a minták 80%-ban volt azonosítható. Érdekes eredmény továbbá, hogy a típusos biomarkerek önállóan nem voltak jelen a nyálmintákban.

1. Táblázat

Identifikált fehérjék

Szám	Név	Azonosító kód	Elméleti móltömeg (Da)	Szekvencia fedettség%
1.	Annexin A8-like 2 [Homo sapiens]	gi 55666310	36,84	47,63
2.	Annexin A8-like 1.- Homo sapiens (Human).	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

men, Germany). A mérések során m/z 800 és 5000 között detektáltuk a tömegspektrumokat, és minden egyes mérési eredményt 500 egymást követő lézervégzés 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 Bio Tools 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)

Az identifikált fehérjék bemutatása

Annexin A8

Az annexinek fontos celluláris és fiziológias 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 is megtalálhatóak. Annexinokat találhatunk a fibrinolízis, koaguláció, gyulladások és az

apoptotikus folyamatokban. Az annexin A11 és A8 overexpresszióját leírták már colorectalis daganatokban [18, 19, 20, 21].

Az annexin csoport A2-es tagját Szántó Ildikó és munkacsoportja azonosította már korábban laphám-karcinómás betegek nyálmintájában. Ezért vizsgálataink során arra következtethetünk – minden nyálmintában találtunk Annexin A8-at –, hogy a biomarker esetlegesen egy korai orális laphám karcinóma jelenlétére utalhat.

2. Táblázat

A szájjüregi laphámrákra jellemző 3 fehérje előfordulása a diabéteszes és a kontrollcsoportban

Nr- DM n= 25	Biomarker	Nr- H n= 20	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	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		

1: Annexin A8

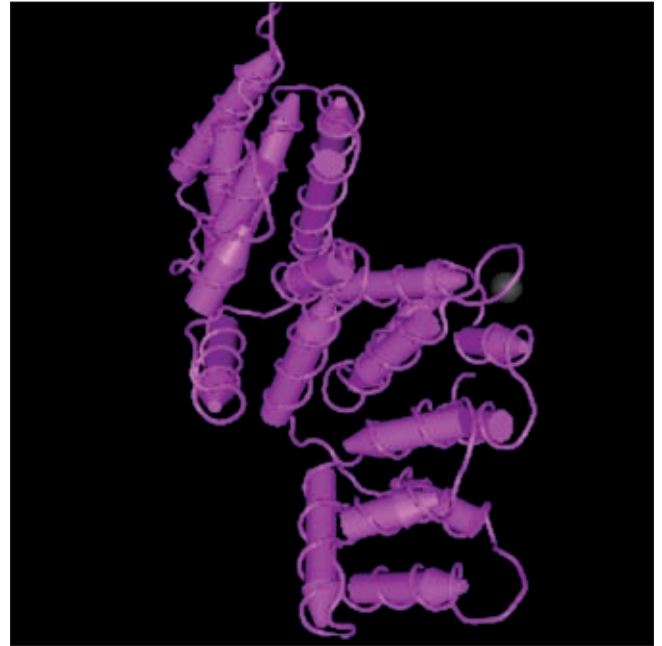
2: Peroxiredoxin-2

3: Tirozin-protein kináz

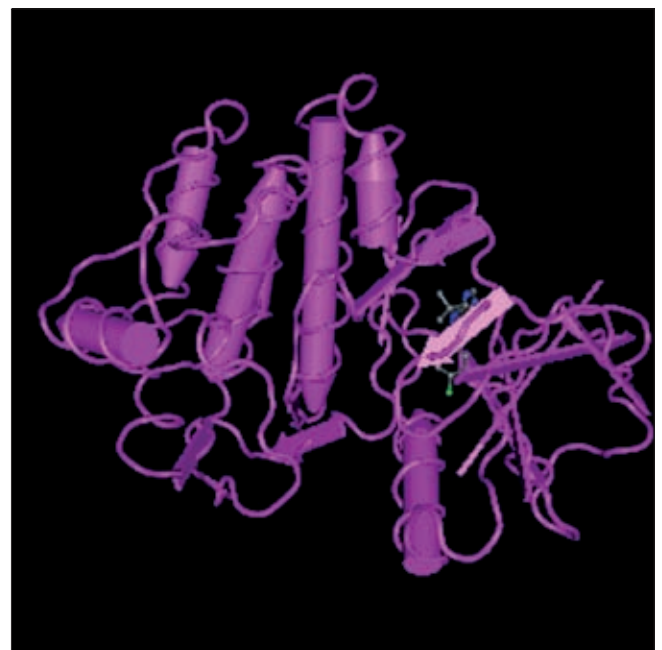
Neg: keresett biomarker nem kimutatható

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 formá-



2. ábra. Annexin A8 struktúrája
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=31354>

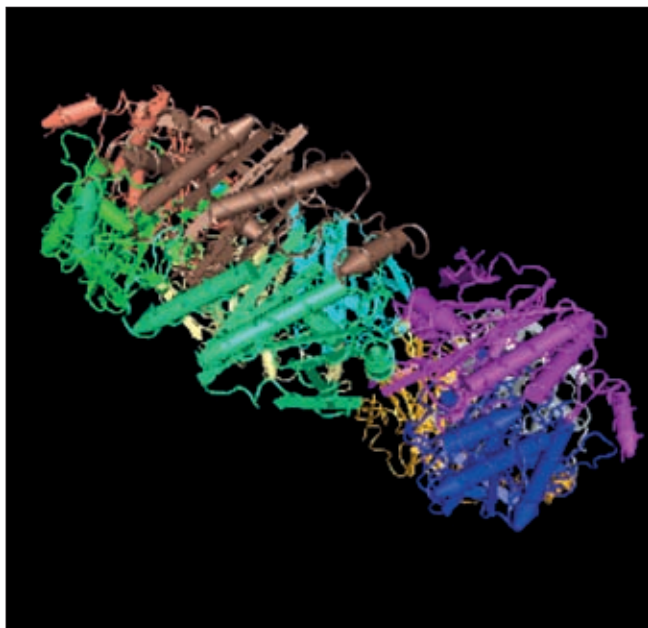


3. ábra. Tirozin-protein kináz 3D-képe
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=93770>

ját korábban összefüggésbe hozták már mesenchyma eredetű tumorokkal, krónikus myeloid leukémiával [24, 26]. Pontos szerepük az orális laphám karcinóma kialakulásában, progressziójában még nem ismert, de a betegcsoport nyálmintájában való gyakori előfordulásuk miatt – a vizsgált minták 80%-ában találtunk tirozin protein kinázt – feltételezzük, hogy fontos szerepet játszhat.

Peroxiredoxin 2

A thioredoxin peroxidáz család, vagy peroxiredoxinok elsődleges feladata az intracelluláris szabadgyökök, mint a H_2O_2 redukálása. Nagy érzékenységgű és gyorsan reagáló molekulák. Hat izoformája ismert, valamennyi szerepet kap a különböző lokalizációjú tumorok kialakulásában [22, 23]. A peroxiredoxin 2-t korábban *Szántó és mtsai* azonosították szájjüregi laphámkarinómás betegek nyálából.



4. ábra. Peroxiredoxin 3D-struktúrája

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=13774>

Vizsgálatainkban azt figyeltük meg, hogy a betegek átlagosan: 12,19 éve szenvedtek diabetes mellitusban, 42,8% férfi (n=9), 57,1% nő (n=12) volt. Megfigyelésünk eredményeit a 3. táblázat foglalja össze.

Megbeszélés

A diabetes elterjedése a mai civilizált társadalomban egyre ijesztőbb méreteket ölt. Az elmúlt két évtizedben rohamosan nőtt az újonnan diagnosztizált betegek 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 egytizedét érinti. Érdekes párhuzamot vélhetünk felfedezni a diabetes és szájjüregi laphámkarinóma gyakoriságában. Az elmúlt négy évtizedben az intenzív kutatások, és gyógyszerfejlesztések és a szűrőprogramok kihangsúlyozása ellenére, több mint négyszeresére nőtt a szájjüregi laphámkarinómával diagnosztizált páciensek száma. A helyzet, több mint aggasztó: Magyarország Európában első helyet foglal el a rák statisztikai vizsgálata-

3. Táblázat:

A peroxiredoxin 2 előfordulása a diabéteszes csoportban

Bevonási szám	Nem	DM diagnózis 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

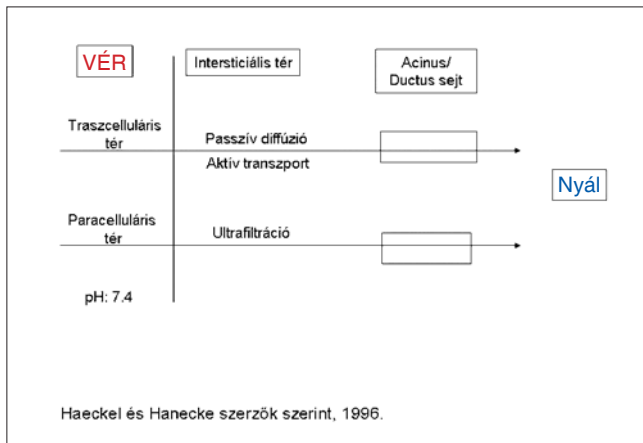
tokban. Ezen belül is a szájjüregi laphámkarinóma rendszerint az első három helyen található. Ennek hátterében sok tényező állhat. Az etiológiai faktorok közül kiemelkedő a magyar társadalom dohányzási szokása és a tömény szeszes italok fogyasztásának túlzott mennyisége. De nem elhanyagolható faktor a súlyos szisztémás betegségek következtében kialakuló szövődmények sem.

Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy az epidemiológiai és állatkísérletes vizsgálatok eredményeit, sejtéseit felhasználva kimutathatók-e korai laphámokra utaló biomarkerek diabéteszes betegek nyálmintáiban.

A nyál mint diagnosztikus rendszer régóta intenzív kutatások középpontjában áll. A nyál egy komplex folyadék, melyben nagy számban találhatóak különféle metabolitok, fehérjék, mRNS-ek, DNS-ek, enzimek, antitestek, mikrobák, de növekedési faktorokat is sikerült már azonosítani. Továbbá a proteomikai eszközök fejlődésével egyre több szisztémás betegségre utaló biomarker jelenlétére derült fény. Ide tartozik többek között a HIV, a reumatoid arthritis, hepatitis A, B, C, szájjüregi laphámkarinóma biomarkerei is. A nyálminták elemzését pedig már gyakorlatban is használják marihuana-, kokain- és alkoholfogyasztás detektálására is.

A biomarkerek és analitikumok széles skálájának nagy része a véráramom keresztül szekretálódik a három pár nagy nyálmirigyen keresztül a nyálba.

A szakirodalomban fellelhető cikkek alapján is kijelenthetjük, hogy egyre nagyobb az érdeklődés a nyálban található analitikumok elemzésére.



5. ábra. Analitikumok transzportja a véráramon keresztül

A kaliforniai UCLA egyetem munkatársai már 2002 óta foglalkoznak a szájjüregi laphámkarzinóma biomarkereinek vizsgálatával. Feltételezésük szerint a jövőben nyálvizsgálatokkal biomarkerek segítségével már képesek leszünk a teljes emberi szervezet egészségi állapotának feltérképezésére.

Diabéteszes betegek nyálából izolált laphámkarzinómával összefüggésbe hozható biomarkereket először a mi munkacsoportunknak sikerült azonosítani. A megnövekedett Annexin A8, peroxiredoxin-2 szint, és a tirozin-protein kináz jelenlétét nyálmintákban ez eddig tumoros betegek nyálmintáiban azonosították. Prekancer állapotokban ezt eddig nem sikerült igazolni. Eredményeink tükrében feltételezzük, hogy a diabetes mellitus nem csak prekancer állapot, de valószínűsíthetően premalignus állapotnak is tekinthető. Minden nyálmintában találtunk korábban már a szakirodalomban leírt, laphámkarzinóma daganatsejtek által expresszált fehérjét. Ez az eredmény különös fontosságú, hiszen a vizsgálatba bevont önkénteseknél korábban nem diagnosztizáltak laphámrákot vagy prekancerózus elváltozást.

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, hogy a kötelező sztomatológiai szűrésen túl, lehetőségünk nyílik már korai fázisban kimutatni laphámrákra utaló fehérjéket.

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

Munkacsoportunk jövőbeli céljai közé tartozik, hogy még nagyobb populáción validáljuk eredményeinket.

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom mentoraimnak, Dr. Márk László egyetemi docensnek, Dr. Gelencsér Gábor főorvosnak és Prof. Dr. Olasz Lajosnak, akik nélkül ez a munka nem születhetett volna meg. Köszönet illeti továbbá, minden kedves munkatársamat, akik segítettek e dolgot megírásában.

Irodalom

1. WONG DT: Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Ass.* 2006; 137: 313–321.
2. SEGAL A, WONG DT: Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. *Eur J Dent Educ.* 2008.12 (suppl): 22S–29S.
3. SZANTO I, MARK L, BONA A, MAASZ G, SANDOR B, GELENCSEER G, TURI Z, GALLYAS F JR.: High-throughput screening of saliva for early detection of oral cancer: a pilot study. *Technol Cancer Res Treat.* 2012; 11 (2): 181–188.
4. JARAI T, MAASZ G, BURIAN A, BONA A, JAMBOR E, GERLINGER I, MARK L: Mass Spectrometry-Based Salivary Proteomics for the Discovery of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2012; 18 (3): 623–628.
5. PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.
6. ARGIRIS A, KARAMOUZIS MV, RABEN D ET AL: Head and neck cancer. *Lancet*, 2008; 371: 1695–1709.
7. DECKER J, GLODSTEIN JC: Risk factors in head and neck cancer. *N Engl J Med* 1982; 306:1151–1155.
8. HINTAO J, TEANPAISAN R, CHONGSUWIVATWONG V ET AL: The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22:175–1781.
9. LAMSTER IB, LALLA E, BORGNACKE WS, TAYLOR GW: The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Ass* 2008; 139: 19S-24S.
10. American Academy of Periodontology. Position paper: diabetes and periodontal diseases [CD-ROM]. *J Periodontol* 1996; 67: 166–167.
11. NEGRATO CA, TARZIA O: Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 2010; 15: 2–3.
12. LU H, OUYANG W, HUANG C: Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4 (4):221–233.
13. UJPÁL M, MATOS O, BÍDOK G, SOMOGYI A, SZABÓ G, SUBA Z: Diabetes and oral tumors in Hungary. *Diabetes Care* 2004; 27: 770–774.
14. ALBRECHT M, BÁNÓCZY J, DINYA E, TAMÁS JR G: Occurrence of oral leukoplakia and lichen planus in diabetes mellitus. *J Oral Path Med* 1992; 21: 364–365.
15. NAVEESH M: Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci* 1993; 694: 72–77.
16. LAEMMLI UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
17. VAIRAKTARIS E: Diabetes and Oral Oncogenesis, *Anticancer Research* 2004; 27: 4185–4194.
18. FARNAES L, DITZEL HJ: Dissecting the cellular functions of annexin XI using recombinant human annexin XI-specific autoantibodies cloned by phage display. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (35): 33120–33126.
19. TOMAS A, FUTTER C, MOSS SE: Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 2004;165 (6):813– 822.
20. RAND JH: The annexinopathies: a new category of diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1498:169–173.

21. PAWELETZ CP, ORNSTEIN DK, ROTH MJ, BICHSEL VE, GILLESPIE JW, CALVERT VS, VOCKE CD, HEWITT SM, DURAY PH, HERRING J, WANG QH, HU N, LINEHAN WM, TAYLOR PR, LIOTTA LA, EMMERT-BUCK MR, PETRICOIN EF: Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. *Cancer Res.* 2000; 60: 6293–6297.

22. WOOD ZA, POOLE LB, KARPLUS PA: Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Scienc.* 2003; (300) 650–653.

23. LU Y, LIU J, CHENGZHAO L, WANG H, JIANG Y, WANG Y, YANG P, HE F: Peroxiredoxin a potential biomarker for early diagnosis of Hepatitis

B Virus related liver fibrosis identified by proteomic analysis of the plasma. *BMC Gastroenterol.* 2010; 10: 115.

24. HANKS SK, QUINN AM, HUNTER T: The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* 1998; 241 (4861): 42–52.

25. COX M, NELSON DR: Lehninger: *Principles of Biochemistry* (fifth ed.). W H Freeman & Co.

26. WEINBERG RA: *The Biology Of Cancer*. New York, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 757–759.

JANCSIK VÁ, MÁRK L, GELENCSÉR G, OLASZ L:

Investigation on oral squamous cell carcinoma biomarkers isolated from patients suffering from type-2 diabetes

According to the latest epidemiological data the occurrence of oral squamous cell carcinoma has increased recently in the last 4 decades. In spite of the great emphasis and effort in the field of prevention, novel medication therapy, our knowledge has to be enlarged in the development of this serious disease. Recent conducted epidemiological studies and animal experiments have shown that there is a relationship between type-2 diabetes and oral squamous cell carcinoma. Our goal was to screen human saliva samples for possible biomarkers for oral malignancies in diabetic patients.

Key words: Proteomics, oral squamous cell carcinoma, salivary biomarkers, type-2 diabetes