

MALDI TOF tömegspektrometria alkalmazása szájüregi daganatos megbetegedések proteomikai vizsgálatában

Rudolf Péter¹, Márk László^{1,2}

¹Kromat Kft. 1112 Budapest, Péterhegyi u. 98.

²Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, 7624 Pécs, Szigeti út 12.

A kutatás-fejlesztési projekt a Nemzeti Fejlesztési, Kutatási és Innovációs Hivatal támogatásával jött létre: Kedvezményezett: "KROMAT" Műszerforgalmazó Kft, Projekt címe: Kis mintaigényű (néhány mikroliter), enzimátikus átalakulások kvalitatív és kvantitatív vizsgálatára alkalmas chip kifejlesztése, Megvalósítás időtartama: 2017.01.01. - 2018.12.31., Projekt kód: KFI_16-1-2016-0191.

Bevezetés

A teljes nyál (whole saliva) tartalmazza a szájüregben lévő, és a külvilágból bekerülő baktériumokat, valamint epitheliális sejteket, ételmaradékokat, vérből származó anyagokat. Összetételét tekintve 99,3% vizet, és 0,7% szárazanyagot tartalmaz, mely anorganikus sókból (nátrium, kálium, foszfát, bikarbonát stb.), és organikus anyagokból (amiláz, maltáz, mucin, serum albumin, globulin, stb.) áll.

A nyál összetétele nem állandó, folyamatosan változik a kor előrehaladtával, egyes gyógyszerek adagolásával összefüggésben, szisztémás-, autoimmun megbetegedések, különféle infekciók esetén illetve malignus folyamatokban. A nyálban található fehérjék, fehérjetöredékek, és egyéb patológiás biomarkerek analitikai vizsgálata nagyban hozzájárul a modern diagnosztika fejlődéséhez.

Anyag és módszer

A mintavétel előtt a betegek szájukat hideg csapvízzel öblítették át. A nyálmintákat a nem-stimulált szájüregben a buccalis redőből, illetve a nyelv alatti területről 5 ml-es fecskendővel vettük, majd Eppendorf csőben jégen tároltuk. Ezt követően a mintákat 2500/min fordulaton, 12 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A nyálminták felülúszóját további vizsgálatokig -80°C-on tároltuk.

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.

Eredmények

Az azonosított fehérjék között megtalálható az előzetes munkáinkban is kimutatott számos fehérje. Az Annexin A2 biomarkerként való értékelése már korábbi vizsgálatainkból ismert. Ígéretes eredmény a számos hiszton variáns kimutatása, amely a hiszton és annak acetilált változatainak diagnosztikus értékét mutatja. Ugyancsak korábbi eredményeinkben megtalálható volt az itt is kimutatott S100 A8 fehérje, amely megnövekedett koncentrációban van jelen a fej-nyaki eredetű neoplasztikus elváltozásokban is.

Konklúzió

Vizsgálataink alapján a következő következtetéseket tettük:

- A kidolgozott módszer alkalmas a különböző állapotú tumoros betegek és az egészséges minták elkülönítésére.
- A módszer nem invazív, egyszerű és olcsó
- A módszer nagy áteresztőképességű (kb. 5000 minta/nap)
- A proteomikai eredmények kimutatták többek között az Annexin A2, Hiszton 3 és 4 valamint az S100 A8 fehérjék megemelkedett mennyiségét a tumoros nyálmintákban.