Review Article

Saliva Protein Composition: An Approach to Study Biomarkers

Elnaz Naderi [1], Sodabeh Jahanbakhsh-Ghodehkahriz [2], Ashraf Mohamadkhani [3]

[1]Researcher,University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2]Assistant Professor, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[3]Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

ABSTRACT

Saliva is multifunctional; it is a lubricant for speech, aide for food digestion, and protective against microorganisms. It is voluntarily accessible, composed of proteins and electrolytes, and is ideal for the early detection of a wide range of diseases. Because of a complex protein mixture, saliva proteomics has the potential to be a novel approach in the search for protein biomarkers. Most salivary proteomics research has been performed in academic institutions that study oral health. However, saliva offers a promising clinical strategy for characterizing the association between salivary protein markers and pancreatic cancer. In this review we focus on the protein composition of saliva as it represents an important field, both for the oral environment, as well as disease diagnosis and monitoring.

Keywords : Protein biomarker; Saliva; Proteomics

Please cite this paper as:
Naderi E, Jahanbakhsh-Ghodehkahriz S, Mohamadkhani A. Saliva Protein Composition: An Approach to Study Biomarkers. *Govaresh* 2012;17:98-108.

Corresponding author:
Ashraf Mohamadkhani, PhD
Digestive Disease Research Center,Shariati Hospital,
Tehran University of Medical Science, North Kargar Ave.
Tehran 14117, Iran
Tel: + 9821 8241 5400
Fax: + 9821 8241 5300
E-mail: mohamadkhani.ashraf@gmail.com
Received : 05 Mar.2012
Edited : 04 May 2012
Accepted : 05 May 2012

مقاله مروری

ترکیب پروتئینی بزاق دهان؛ راهبردی در جهت مطالعه‌ی بیومارکرها

الناز نادری[۱]، سدابه جهانبخش گده کهریز[۲]، اشرف محمدخانی[۳]

[۱] پژوهشگر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۲] استادیار، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۳] پژوهشگر، مرکزتحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

بزاق مایع بیولوژیکی است که بیانگر وضعیت سلامتی فرد و فراهم کننده فعالیت‌های مهمی چون امکان سخن گفتن، هضم غذا و حفظ اکوسیستم دهان می‌باشد. بزاق به سهولت قابل دسترسی است و ترکیب اصلی آن پروتئین‌ها و الکترولیت‌ها هستند که برای مطالعه طیف وسیعی از بیماری‌ها دارای ارزش می‌باشد. به دلیل ترکیب پیچیده آن- پروتئومیک بزاق- به راهکاری ویژه و منحصر به فرد برای مطالعه بیومارکرهای موجود در بزاق تبدیل شده است. اگرچه اغلب مطالعات پروتئومیک بزاق مربوط به تحقیقات بیماری‌های دهان و دندان می‌باشد، با این وجود این مایع بیولوژیک شرایط بررسی مطالعات ارتباط پروتئین‌های بزاق و بیماری‌هایی چون سرطان پانکراس را نیز فراهم آورده است. در این مطالعه هدف ما مروری بر ترکیب پروتئینی بزاق و حیطه جدیدی از تحقیقات بیو مارکرهای بزاق و امکان کاربرد آن در سرطان پانکراس بوده است.

کلید واژه: بزاق، پروتئینی بیومارکر، پروتئومیکس

گوارش/ دوره ۱۷، شماره۲/ تابستان ۱۳۹۱/ ۱۰۸-۹۸

زمینه و هدف:

بسیاری از محققین معتقدند بزاق آینه‌ی منعکس کننده از تصویر وضعیت عمومی و سلامت بدن است و این ویژگی سبب استفاده‌ی روز افزون از آن به عنوان ابزار اساسی و غیر تهاجمی در مطالعات تشخیصی شده است.(۱) بزاق یک مایع شفاف منحصر به فرد با طیفی از ترکیبات مختلف شامل الکترولیت‌ها، ایمونوگلوبولین‌ها، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها می‌باشد. نقش اصلی بزاق، حفاظت از غشای مخاطی در حین غذا خوردن است و علاوه بر این به طور مستقیم عملکردهای زیر را انجام می‌دهد:

نویسنده مسئول: اشرف محمدخانی
مرکزتحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، تهران، ایران
کد پستی ۱۴۱۱۷
تلفن : ۸۲۴۱۵۴۰۰-۰۲۱
نمابر : ۸۲۹۰۱۰۰۰-۰۲۱
پست الکترونیک : mohamadkhani.ashraf@gmail.com

تاریخ دریافت : ۹۰/۱۲/۵
تاریخ اصلاح نهایی : ۹۱/۲/۱۵
تاریخ پذیرش : ۹۱/۲/۱۶

- فعالیت حفاظتی و پاک‌سازی محیط دهان
- نگهداری از دندان‌ها و کل مخاط
- انجام فعالیت‌های ضد باکتری و ضد ویروسی
- و از همه مهمتر قدرت چشایی و قابلیت هضم

در طی ده سال گذشته، بزاق یکی از موضوعات مهم مورد توجه‌ی محققین بوده است، تمامی مطالعات منتشر شده مواردی هستند که از بزاق به عنوان یک نمونه‌ی زیستی برای مطالعه‌ی سوء مصرف داروها، تشخیص انواع بیماری‌های دهان و بیماری‌های سیستمیک بهره برده‌اند.(۲) دلیل اهمیت استفاده از نمونه‌های بزاق نسبت به سایر نمونه‌ها (خون و بیوپسی) دسترسی غیر تهاجمی و ساده به آن است که امکان بررسی طیف وسیعی از مولکول‌ها و بیومارکرها را در مقایسه با خون فراهم می‌کند .(۳)

بیومارکرها، مولکول‌های خاصی هستند که در درون بدن وجود داشته و به سبب ویژگی‌های منحصر به فردشان می‌توان از آن‌ها با استفاده از سنجش‌های فارموکولوژیکال یا فیزیولوژیکال به عنوان ابزاری برای پیشگویی یک عارضه، اندازه‌گیری مراحل پیشرفت بیماری و اثرات درمان استفاده کرد .(۴)

شایان ذکر است که حفره‌ی دهان مخزن بسیار بزرگی از باکتری‌هاست که بیش از ۷۰۰ گونه (فیلوتیپ) باکتری را در برمی‌گیرد. بسیاری از این

باکتری‌ها و عفونت‌های ناشی از آن‌ها، ارتباط مستقیم و معنی‌داری با خطر ابتلا به انواع سرطان‌های دستگاه گوارش از جمله سرطان پانکراس را دارا هستند.(۵) در طی ۳۰ سال گذشته، پروتئین‌ها و پپتیدهای اصلی بزاق شناسایی شده‌اند، این در حالی است که خصوصیات بیوشیمیایی آن‌ها همچنان ناشناخته است. مطالعات اولیه‌ی پروتئومیکسی بزاق انسان سبب تعیین خصوصیات ۴ خانواده از پروتئین‌های تراوشی بزاق شد که عبارتنداز: پروتئین‌های غنی از پرولین، استاترین‌ها، سیتاتین‌ها و هیستاتین‌ها. این پروتئین‌ها علیه عفونت لثه، کاهش التهاب و خونریزی لثه، پوسیدگی دندان‌ها و سرطان حفره‌ی دهان نقش داشته و اختلاف معنی‌داری با دیگر پروتئین‌های دفاعی بزاق دارند .(۶)

هدف از مطالعات پروتئومیکسی بزاق انسان، یافتن تمام ترکیبات پروتئینی بزاق، نقش آن‌ها در سلامتی انسان، آگاهی از عملکرد هرکدام از ترکیبات پروتئینی و شناسایی ایزوفرم‌های مختلف آنزیم‌های موجود در بزاق می‌باشد. امروزه اثبات شده است که بسیاری از مواد که در خون وجود دارد در بزاق نیز البته با غلظت کمتر نسبت به خون وجود دارد که با استفاده از روش‌های جدید و تکنولوژی‌هایی با حساسیت بالا (به کارگیری تکنولوژی‌های نانو از جمله نانوپروتئومیکس) می‌توان غلظت، کمیت و کیفیت مواد موجود در بزاق را در دقیقا برآورد کرد و این خود روشی بسیار مناسب و تازه در شناسایی سریع سرطان‌ها، مراحل پیشرفت بیماری و روند رشد و بهبودی بیماری است.(۴و۷و۸) بعد از کاربرد بزاق در بیماری‌های دهان و دندان، بزاق بیشترین کاربرد را در بیماری‌های دستگاه گوارش از جمله انواع سرطان‌ها دارد. سرطان پانکراس یکی از انواع سرطان‌های دستگاه گوارش است که به صورت شایع در سراسر جهان وجود دارد. عدم تشخیص در مراحل اولیه سرطان و تشخیص بیماری در مراحل پیشرفته دلیل غیر قابل درمان و مرگ آور بودن این بیماری است .(۵ و۹)

ترکیبات بزاق

آب ترکیب اصلی بزاق را تشکیل داده است (۹۹/۴٪ – ۹۵٪) و املاح معدنی مختلف، الکترولیت‌ها، هورمون‌ها، آنزیم‌ها، ایمونوگلوبین‌ها، آنتی اکسیدان‌ها و سایر ترکیبات با فراوانی‌های مختلف در آن وجود دارند که میزان آن‌ها به سهم غدد ترشحی بستگی دارد و این سبب شده که بزاق یک مایع ناهمگن باشد.(۱۰) مویرگ‌های خونی که از طریق غدد بزاقی می‌گذرند ورود آنالیت‌ها را از خون به غدد بزاقی تسهیل می‌کنند. اکثر خانواده‌های پروتئینی مهم موجود در بزاق انسان، تغییرات پس از ترجمه آن‌ها و سهم متفاوت هرکدام در ترشحات غدد بزاقی با کاربرد تکنیک‌های پروتئومیک مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیقات ارتباطات موقتی پروتئین‌ها و تغییراتی که پروتئین‌ها متحمل شده‌اند به واسطه‌ی سنتز در ترشحات بزاق نیز بررسی شده است.(۴و۱۱و۱۲)

اولین گروه پروتئینی شناسایی شده در بزاق سیستاتین‌ها بودند که ۵ نوع از آن در بزاق شناسایی شد که خاص بزاق بوده (S, S۱, S۲, SA, SN) و ۲ نوع دیگر از آن‌ها (C , D) که هم در بزاق هم در سایر مایعات بدن نیز شناسایی شدند. برای شناسایی این پروتئین‌ها از تکنیک HPLC-ESIMS استفاده کردند. این پروتئین‌های چند عملکردی نقش‌های مختلفی را در محیط دهان بازی می‌کنند. اثبات شده است که همه‌ی سیستاتین‌های شناخته شده در بزاق به استثناء سیتاتین 'C' به صورت ایزوفرم‌هایی با تغییرات پس از ترجمه وجود دارند.

دسته‌ی دوم کمپلکس پروتئین‌های غنی از پرولین [1] (PRP) موجود در بزاق هستند که به وسیله‌ی روش RP-HPLC-ESI-MS و MALDI-TOF MS شناسایی شده‌اند. چندین ترکیب از این پپتیدها و برخی استثناءهای این پروتئین‌ها در بزاق دیده شده‌اند. اگرچه برخی از موارد شناسایی شده را نمی‌توان به طور قطعی به PRP های اساسی نسبت داد و جزء استثناءهای تغییر یافته از PRP ها هستند که به عنوان پپتید جدیدی بنام P-J پپتید معرفی شده‌اند.

استفاده از تکنیک مشابه در شناسایی دسته‌ی سوم یا همان استاترین‌ها منجر به شناسایی این پپتیدهای درگیر در هومئواستاز کلسیم شد. قطعات مختلف مشتق شده‌ای از استاترین و پپتید P-J در بزاق انسان شناسایی شدند. ردیابی این قطعات این احتمال را می‌دهد که استاترین و پپتید P-J در تقسیمات پروتئولیتیک بعد از ترجمه که در گروه‌های دیگری از پروتئین‌های بزاقی رخ می‌دهد نقش دارند. به تازگی با به کارگیری تکنیک‌های پروتئومیک یک فرم جدید از استاترین بزاق انسان که از تغییر فرم استاترین به وسیله‌ی واکنش ترانس گلوتامیناز در چرخه‌های فرعی ایجاد می‌شود شناسایی شده است، که حدود ۱٪ از استاترین شرایط طبیعی را دربر می‌گیرد که به سیکلو استاترین ۳۷ شهرت یافته است.

گروه آخر هیستاتین‌ها هستند که با استفاده از روش انگشت نگاری جرمی مطالعه شده‌اند. در بزاق انسان ۱۳۶ قطعه منشأ یافته از هیستاتین ۳ شناسایی شده که ۲۴ پپتید مختلف از آن جداسازی شده است. محققین عنوان کرده‌اند که پیدایش پپتیدهای مرتبط با هیستاتین ۳، یک فرآیند تصادفی نیست بلکه از یک مسیر قطعه قطعه شدن دائمی تبعیت می‌کند.

پروتئین‌های درگیر در عملکرد دفاعی بزاق

در بزاق به طور روز افزون فاکتورهایی در حال شناسایی اند که دارای نقش حفاظتی در میزبان بوده و امروزه میزان آن‌ها بیش از فاکتورهای هضمی است. مطالعات بسیاری نشان دادند که نیاز به یک حفره دهانی عاری از بیماری از اهمیت بسزایی برخوردار است. تعداد بیشماری از مکانیسم‌های دفاعی در بزاق وجود دارند که در برگیرنده ترکیبات موثر در دفاع ایمنی از جمله، تولید ایمونوگلوبولین‌ها، ایزوزیم‌ها، آنتی اکسیدانت‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی و غیره هستند و در ادامه به شرح آن خواهیم پرداخت.(۲)

1. Proline-rich protein

ایمونوگلوبولین‌ها

ایمونوگلوبولین‌ها برای اولین بار در دهه‌ی ۱۹۶۰ در بزاق شناسایی شدند و IgA ها در میان سایر فرم‌های ایمونوگلوبولین‌ها به میزان بیشتری وجود دارند. IgA تراوشی به عنوان یکی از سدهای دفاع ذاتی اولیه در مکانیسم دفاعی انسان مطرح است.(۱۳) لیزوزیم‌ها را نیز به عنوان یک خانواده از آنزیم‌های ضد میکروبی (دارای کاتیون فعال) می‌شناسند که سبب صدمه به دیواره سلولی باکتری‌ها می‌شوند و در ترشحات مخاطی بدن مانند بزاق و اشک وجود دارند. باید توجه داشت که باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن لیپوساکاریدها در دیواره سلولی خود به این نوع از آنزیم‌ها مقاومند. موسین‌ها، گلیکوپروتئین‌هایی هستند که قدرت چسبندگی بالایی دارند و نسبتا نامحلول‌اند که سبب محافظت کردن تمام غشاء درونی دهان در شرایط زبر و خشن و صدمات مکانیکی می‌شود، دومین جنبه مثبت آن این است که باعث چسبیدن انتخابی عوامل باکتریایی، قارچی و شکل گیری آن‌ها می‌شود. موسین‌ها به سبب فراهم آوردن بافت نرم و ایمن، خطر ساییدگی (خراش) به طریق لیز کردن پوشش بافت‌ها را به حداقل می‌رسانند.(۱۴و۱۵)

پپتیدهای ضد میکروبی

یک بخش از پاسخ ایمنی، پپتیدهای ضد میکروبی[1] هستند که در دهه‌های اخیر به عنوان یک خانواده از عوامل ضد میکروبی که در مکانیسم دفاعی طبیعی انسان وجود دارند شناخته شده اند. این پپتیدها در اکثر مایعات بدن وجود دارند و در دهان نیز نقش مهمی را در تعادل بین سلامتی و بیماری بازی می‌کنند. علاوه براین آن‌ها را به عنوان پپتیدهای دفاعی میزبان یا آلارمین ها[2] می‌شناسند که امروزه در اکثر ارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان، حشرات، دوزیستان و پستانداران (مثل انسان) شناسایی شده‌اند و در طی ۳۰ سال گذشته بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته‌اند. امروزه، چندین پایگاه اطلاعاتی در مورد پپتیدهای ضدمیکروبی تشکیل شده‌اند که به طور مداوم به دنبال شناسایی این پپتیدها هستند. پایگاه اطلاعاتی دانشگاه تریتس[3] ، شامل اطلاعات مربوط به بیش از هزار نوع از این پپتیدهاست. معمولا، پپتیدهای ضد میکروبی مطرح‌اند که دارای ریشه‌هایی با بار مثبت‌اند مانند آرژنین یا لیزین و یا در محیط‌های اسیدی دارای هیستیدین‌اند با این حال پپتیدهای با بار منفی نیز حضور دارند. علاوه براین پپتیدهای ضد میکروبی دارای یک ناحیه‌ی بزرگ هیدروفوبیک نیز می‌باشند.(۱۶و۱۷)

پپتیدهای ضد میکروبی را براساس ساختار دوم به ۴ گروه طبقه‌بندی می‌کنند:

۱- پپتیدهای دارای ساختار توسعه یافته از آلفاهلیکس‌ها؛ ۲- پپتیدهایی که به وسیله‌ی ساختار صفحات بتا شناسایی می‌شوند و باندهای دی سولفید در آن‌ها سبب متصل شدن رشته‌های بتا به همدیگر می‌شود؛ ۳- زنجیره‌ی پپتیدی با ساختار حلقوی که بتاهرپین نام گرفته‌اند و حضور یک پیوند دی‌سولفید سبب حلقوی شدن زنجیره می‌شود؛ ۴- پپتیدهایی که اغلب با یک آمینواسید خاص به شکل غالب توسعه یافته‌اند.

وجه مشترک تمام مطالعاتی که روی پپتیدهای ضد میکروبی انجام شده این است که همه‌ی آن‌ها از پپتیدهای پیشساز اولیه‌ی بزرگ‌تر که اصطلاحاً "توالی پیشساز" نامیده می‌شوند منشأ گرفته‌اند و برای ایجاد ساختار پپتید فعال به صورت پروتئولیتیک بایستی در قسمت N- انتهایی تقسیم شوند. پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند به صورت مداوم تراوش شوند و یا این که به عنوان یک پاسخ دفاعی بعد از یک محرک خاص ترشح شوند. در تعداد زیادی از این حالت‌ها، فرم پیشساز این پپتیدها به صورت یک فرم غیر فعال تا موقع نیاز ذخیره شده است.

در یک مکانیسم دو مرحله‌ای، ریشه‌ی با بار مثبت مسئولیت انجام قسمت اول واکنش پپتیدهای ضد میکروبی یعنی واکنش با غشاءهای با بار منفی را برعهده دارد و به دنبال آن ورود به درون بخش هیدروفوبیک درونی غشاءها را سبب می‌شود. واکنش آن‌ها با غشاءها یک خصوصیت ضروری آن‌ها است، اگرچه لزوماً هدف نهایی آن‌ها واکنش با غشاءها نیست اما جزئی از مکانیسمی است که اجازه ورود DNA یا RNA به درون سلول‌ها را می‌دهد. مدل‌های متفاوتی برای نحوه‌ی عمل آن‌ها برروی غشاء مطرح شده است و فاکتور مشترک در تمام این مدل‌ها این است که شکل موقتی منفذها سبب کاهش نفوذپذیری غشاء می‌شود که توأم با کاهش شرایط نامطلوب سلولی مانند، pH، غلظت نمک و گرادیان الکتریکی است. انواعی از پپتیدهای ضد میکروبی که در ادامه به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود از سطح مخاطی که در مواجه با عفونت می‌باشند ترشح می‌شود و علاوه بر این تعدادی از آن‌ها می‌توانند از نوتروفیل منشأ بگیرد.(۱۷و۱۸) نوتروفیل‌ها منبعی از ۲ خانواده‌ی بزرگ از پپتیدهای ضد میکروبی پستانداران یعنی کاتلیسیدین‌ها[4] و آلفا دفنسین[5] می‌باشند.

کاتلیسیدین:

اعضای این خانواده از پلی پپتیدهای ضد میکروبی در بسیاری از جنس‌های پستانداران به سبب ویژگی بارزشان جداسازی شده‌اند. ویژگی بارز آن‌ها داشتن یک دومن به شدت حفاظت شده (N- ترمینال کاتلین) و در میان گونه‌های مختلف یک دومن بشدت متغییر (C- ترمینال کاتلین) است. به همین سبب ساختار پپتیدهای چندگانه و متفاوت به لحاظ اندازه، توالی و ساختار می‌شود که البته در انسان فقط با اصطلاح hCAP۱۸ مطرح شده است. hCAP۱۸، یک ماده‌ی پیشساز که بعد از تقسیم AMPLL-۳۷ را تولید می‌کند، از خود فعالیت‌های ضد باکتری، ویروسی و قارچی نشان می‌دهد. نکته قابل توجه این است که کاتلیسیدین‌ها فقط در نوتروفیل‌ها و بافت‌های مخاطی حفره‌ی دهان بیان نمی‌شود بلکه در مجاری تنفسی و دیواره معده و روده نیز وجود دارد.(۱۹و۲۰)، عملکرد ضد

1. Anti microbial peptide (AMP)
2. Alarmins
3. Trieste
4. Cathelicidins
5. α-defensin

میکروبی LL-۳۷ فقط مختص به کشتن پاتوژن‌ها نیست بلکه هم نقش تنظیم کننده‌ی پاسخ ایمنی را داراست و هم سبب توسعه‌ی بهبود یافتن جراحات و زخم‌ها می‌شود .(۲۱)

دفنسین‌ها:

جزء اولین پپتیدهای ضد میکروبی شناسایی شده هستند که سایز کوچکی دارند (۲۰-۱۵ ریشه)، دارای بار مثبت و غنی از سیستئین و محتوی ۳ جفت باند دی‌سولفید درون مولکولی می‌باشند که درون مهره داران و بی مهرگان با یک طیف وسیع از فعالیت وجود دارند. سه فرم از آن‌ها درون پستانداران شناسایی شده که براساس نحوه تشکیل پیوند دی‌سولفید نامگذاری شده اند. آلفادفنسین، بتادفنسین و سیکلیک تتا دفنسین که فرم اخیر به ندرت وجود دارد. اگرچه خانواده‌های آلفا و بتا قطعات توالی مشابه ندارند ولی به وسیله‌ی ژن‌های مجاور هم کد شده‌اند و عقیده بر این است که از یک ژن دفاعی رایج از پستانداران اولیه مشتق شده اند. در غلظت فیزیولوژیکی از نمک، کاهش فعالیت‌های مستقیم ضد میکروبی آلفادفنسین و بتادفنسین در in vivo اثبات گردید و سبب شد این فرضیه مطرح شود که این پپتیدها دارای قدرت یونی کمی هستند، بنابراین در فاگوسیت‌ها و روی غشاءهای مخاطی وجود دارند.(۲۰و۲۲و۲۳)

آلفادفنسین‌ها در انسان‌ها، میمون‌ها و چندین جنس از جوندگان وجود دارد. فعالیت ضد میکروبی آن‌ها تنها متکی به حضورشان نیست بلکه این‌ها به صورت همکار با کاتلیسیدین در محیط اطراف سلول از خود فعالیت‌های ضد میکروبی نشان می‌دهند. بتادفنسین‌ها در ابتدا در مخاط گاوی شناسایی شدند که یک طیف وسیع از فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد قارچی از خود نشان دادند که بعدها در غدد بزاقی و بزاق انسان شناسایی شده‌اند. بتادفنسین‌های انسانی در همه‌ی بافت‌های مخاطی انسان و از جمله در لثه‌ها، زبان، غدد بزاقی و در موکوس شناسایی شده‌اند. سطوح متفاوتی از دفنسین‌های انسانی در نمونه‌های بزاق دارای التهاب دهان و سرطان‌های دهانی ملاحظه شده است و کاهش آن عموما سبب افزایش حساسیت باکتریایی در مکان‌های عفونی می‌شود. افزایش بیان پپتیدهای ضد میکروبی زبانی در اثر جراحت های زبان، صدمه یا التهاب شدید در مخاط به صورت طبیعی رخ می‌دهد. مطالعات مختلف ارتباط بین بیماری‌های التهابی اطراف دندان‌ها و بیماری‌های سیستمیک مانند بیماری رگ‌های قلبی و بیماری‌های دهانی را نشان می‌دهد که دارای اهمیت است.(۱۷و۱۹و۲۱و۲۳)

آدرنومدولین[1]:

پپتید شناخته شده دیگر در سلول‌های سطحی مخاط آدرنومدولین است که چند عملکرد را داراست و جزء عوامل ضد باکتریایی (باکتری گرم مثبت و گرم منفی) بشمار می‌رود. پپتید آدرنومدولین متشکل از ۵۲ آمینواسید است که یک پیوند دی‌سولفید داخل مولکولی دارد. شباهت آن به پپتید ژن کلسیتونین سبب واکنش آن با گیرنده‌ی کلسیتونین می‌شود، از اینرو برخی عنوان کرده‌اند که می‌تواند در کنترل حلقوی شدن عملکردی مشابه هورمون را دارا باشد.(۱۹و۲۴)

هیستاتین[2]:

خانواده هیستاتین‌ها شامل یک گروه متشکل از ۱۲ هیستاتین و ۸ پپتید مشتق شده از آن‌هاست که دارای تعداد زیادی از ریشه‌های هیستادین هستند و توسط غدد بناگوشی و ساب مندیبولار ترشح می‌شوند. فراوانی هیستاتین ۱و ۳و ۵ در بزاق انسان نسبت به سایرین بیشتر است. توالی اولیه آن‌ها محتوای مقدار بالایی از شارژ مثبت خالص است و در چندین فرآیند زیستی که سبب تعمیر و نگهداشت حفره دهان می‌شوند نقش دارند. هیستاتین۱، یک نقش محدود کننده در تشکیل کریستال هیدروکسیل اپتایت و حفاظت از سلامت بزاق انسان را داراست و به عنوان یکی از مکانیسم‌های دفاع ذاتی اولیه محسوب می‌شود که بعد از سن ۴۵ سالگی میزان آن کاهش می‌یابد.(۱۲و۲۵)

لاکتوفرین[3]:

لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین متعلق به خانواده ترانسفرین است که در ابتدا به عنوان پروتئین متصل شونده به آهن در شیر گاو شناسایی شده است. بعدها این پروتئین نه تنها در شیر بلکه در سایر ترشحات برون تراوای بدن ازجمله بزاق شناسایی شده است. اگرچه در ابتدا عقیده براین بود که این پروتئین در متابولیسم آهن نقش دارد و یک حامل آهن به حساب می‌آمد اما امروزه عملکردهای مختلفی از آن شناسایی شده است. از میان عملکردهای چندگانه که برای لاکتوفرین تعریف کرده اند، فعالیت ضد میکروبی آن بحث برانگیزتر است. لاکتوفرین توانایی جداکردن آهن در ترانسفرین‌های دیگر را داراست. اما ویژگی‌های بیوفیزیکی مختلف آن سبب می‌شود که توانایی آن در حفظ کردن آهن به جهت متعادل کردن شرایط اسیدی مطرح باشد. اثر دیگر آن می‌تواند نقش آن در پاک کردن (تمیز کردن) آهن در حفره دهانی باشد.(۲۶و۲۷)

کالپروتکتین[4]:

کالپروتکتین که به نام‌های Calgranulin A, CFA, MRP-۱۴, MRP-۸ نیز نامیده می‌شود، یک پروتئین حاوی کلسیم و روی است که از ۲ زیر واحد ۸ و ۱۴ کیلو دالتونی تشکیل شده است و در شرایط التهابی مانند بیماری‌های محیط دهان توسط نوتروفیل‌ها آزاد می‌شود. علاوه بر بزاق کالپروتکتین در خون و مایع بین بافتی در پی چندین نابهنجاری مسری، التهاب و زیان آور شناسایی شده است. بیان این پروتئین در سلول‌های تشکیل دهنده مخاط دهان و سلول‌های مخاطی توسعه یافته اتفاق می‌افتد. فعالیت‌های ضد میکروبی زیادی از کالپروتکتین به اثبات رسیده است و یک احتمال وجود دارد که فعالیت ضد میکروبی آن به سبب محروم کردن میکروارگانیسم‌ها از عنصر روی باشد. وجود کالپروتکتین در مدفوع یک ابزار تشخیصی برای بیماری‌های التهابی روده به شمار می‌رود.(۲۸و۲۹)

1. Adrenomedullin

2. Histatins
3. Lactoferrin
4. Calprotectin

آنتی اکسیدان‌های بزاق

آنتی اکسیدان‌ها یکی از مکانیسم‌های دفاعی بدن به جهت خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و بی اثر کردن استرس اکسیداتیو هستند و در تمام بافت‌ها و مایعات بدن از جمله بزاق وجود دارند. بزاق حاوی سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی است. آنتی اکسیدان‌های اولیه شامل: اسید اوریک، آلبومین، آسکوربیک اسید، گلوتاتیون ، α- توکوفرول، فلاونوئیدها، β- کاروتن و ترکیباتی دیگر است و از بین آنتی اکسیدان‌های آنزیمی می‌توان به سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز اشاره کرد. پروتئین‌های بزاقی که اکثراً ویژگی‌های ضد باکتریایی دارند به صورت مداوم محیط دهان و دندان را پاکسازی می‌کنند و بزاق به عنوان یک محلول پاک کننده، یک منبع یونی، یک لیزکننده و یک بافر مطرح است. اخیرا اثبات شده است که عدم توازن بین رادیکال‌های آزاد و انواع اکسیژن انفعالی (واکنشی) با آنتی اکسیدان‌ها، نقش بسیار مهمی را در حمله و گسترش چندین پاتوژن عامل بیماری، به ویژه بیماری‌های التهابی دهان و بسیاری از سرطان‌ها ایفا می‌کند. وجود آنتی اکسیدان‌ها سبب فعالیت آپوپتوسیس و فعالیت ضد تومورزایی شده و نقش آن‌ها در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد به اثبات رسیده است.(۳۰ و ۳۱)، در مطالعه سرطان پانکراس، مشاهده شده که در نمونه بزاق بافت فرد بیمار در مقایسه با بزاق فرد سالم مقادیر کمتری از آنتی اکسیدان‌های آنزیمی منگنز سوپر دیسموتاز (MnSOD) که رادیکال سوپر اکسید (O^{-}_{2}) را به هیدروژن پراکسید (H_2O_2) تبدیل می‌کند و آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) که در ادامه هیدروژن پر اکسید را به آب تبدیل می‌کند وآن را بی خطر می‌کند وجود دارد. مطالعات اخیر هم چنین نشان داده که افزایش بیان ژن‌های MnSOD و GPx می‌تواند تأثیر سرکوب کننده‌ی تومور را در سرطان پانکراس داشته باشد و دریافت هرکدام از این ژن‌ها به تنهایی و یا همراه با یکدیگر برای توقف و درمان سرطان پانکراس می‌تواند مفید باشد.(۴و۹)

از نقطه نظر بیوشیمیایی، یک آنتی اکسیدان به عنوان یک ماده تعریف شده است که حتی در غلظت‌های کم یک سد محافظ در مقابل اکسیداسیون ایجاد می‌کند و یا شروع اکسیداسیون را به تأخیر اندازد. از میان طبقه بندی‌های متفاوت برای آنتی اکسیدان‌ها، طبقه بندی براساس روش عمل آن‌ها می‌تواند مفیدتر واقع شود که بر این اساس آنتی اکسیدان‌های دفاعی در شرایط in vivo به ۳ دسته تقسیم می‌شوند(۹و۳۲و۳۳):

الف- آنتی اکسیدان‌های پیشگیری کننده: که شکل گیری رادیکال‌های آزاد را سرکوب می‌کنند، مانند: پراکسیداز دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، S-ترانسفراز، کاروتنوئید، ترانسفرین، آلبومین، بیلی روبین، هاپتوگلوبین و سرولوپلاسمین.

ب- آنتی اکسیدانت‌های پاک کننده: که سبب شکستن زنجیره و عدم گسترش و انتشار رادیکال‌های جذب شده می‌گردد مانند: آلبومین، بیلی روبین، کارتنوئیدها، یوبی کونیون، اوریک اسید، ویتامین A, C و E.

ج- آنزیم تعمیر کننده و سنتز کننده: که صدمات وارد شده به غشاءها و سایر بخش‌ها در اثر ترانسفراز رادیکال‌های آزاد را ترمیم می‌کنند مانند آنزیم‌های تعمیر DNA، لیپاز، پروتئاز و ترانسفراز.

رادیکال‌های آزاد:

اکسیژن به عنوان یک ماده مغذی گازی مطرح است که نیاز به آن نمی‌تواند با هیچ عنصر دیگر جایگزین شود و این عنصر برای تأمین انرژی همه‌ی پستانداران مورد نیاز است. از دست دادن هریک از ۱و ۲و ۳و ۴ الکترون عنصر اکسیژن به صورت زیستی سبب بالا رفتن میزان رادیکال‌های آزاد یا انواع اکسیژن انفعالی[1] می‌گردد. رادیکال‌های آزاد به عنوان یک اتم یا مولکول مختلف با یک یا بیشتر الکترون جفت نشده در ساختارشان تعریف می‌شوند که می‌تواند دارای بار مثبت و منفی و یا به صورت الکتریکی خنثی باشند. مهم ترین رادیکال‌ها در سیستم‌های زیستی آن‌هایی هستند که از اکسیژن مشتق شده اند مانند: OH, OOH, O^{-}_{2} در حال حاضر RO, ROO, RCOO, RCOOO, Ar O, Ar OO, تعداد بیشتری از ترکیبات انفعالی به عنوان ROS شناخته شده‌اند که تنها شامل رادیکال‌های آزاد اکسیژن نیستند بلکه سایر مشتقات غیر رادیکالی اکسیژن را مانند: $O_2, O_2, H_2O_2, HOCl$ را نیز در بر می‌گیرند.(۳۳و۳۴)

رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مشتقات غیر رادیکالی آن تنها رادیکال‌های آزاد موجود نیستند هرچند اولین نوع های شناسایی شده‌اند. تعداد دیگری از ترکیبات از جمله نیتریک اسید، نیتریک دی اسید، رادیکال‌های Thiyl و هم چنین رادیکال‌هایی با هسته‌ی کربن که از حمله رادیکال‌های اکسید کننده به اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای چرب و یا بازهای DNA بدست آمده‌اند نیز جزء FR/ROS ها به حساب می‌آیند. از نقطه نظر شیمیایی، اکسیداسیون به این صورت تعریف می‌شود "از دست دادن الکترون" بنابراین یک اکسیدان یا عامل اکسید کننده ماده‌ای است که الکترون را می‌پذیرد و سبب اکسیداسیون می‌گردد. اصطلاح پرو اکسیدان یک اصطلاح مترادف برای ROS است که منظور یک ماده سمی است که می‌تواند سبب خطر اکسیداتیو در نمونه‌های زیستی شود .(۳۲و ۳۵)

اهمیت بالینی بزاق بر اساس مطالعات انجام شده

آستانه‌ای و همکاران، ظرفیت کل آنتی اکسیدانت، سطوح فاکتور رشد اپیدرمی و نیتریک اکسید در نمونه‌های خون و بزاق بیماران دیابتی وابسته به انسولین (نوع اول) مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنان نشان داد که سطح TBARS[2] (به عنوان مارکری برای بررسی پراکسیداسیون لیپید) بین ۲ گروه مورد مقایسه اختلاف معنی داری دارند. قدرت آنتی اکسیدانت و سطح نیتریک اکسید در نمونه‌های بزاق و پلاسما بیماران دیابت نوع ۲ بیشتر از جمعیت کنترل بود، درحالی که غلظت فاکتور رشد اپیدرمی در بزاق افزایش یافته بود اما در پلاسما کاهش نشان می‌داد.(۳۶) هم چنین بررسی ارتباط بین قدرت آنتی اکسیدانت و سطوحی از فاکتور رشد اپیدرمی و نیتریک اکسید در نمونه‌ی بزاق افراد دارای بیماری التهاب روده مطالعه‌ای

1. Reactive Oxygen Species (ROS)
2. Thiobarbituric acid-reactive substances

بود که توسط جهان‌شاهی و همکاران در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت و نشان داده شد سطح TBARS در نمونه‌های دارای بیماری کرون در مقایسه با کولیت اولسراتیو دارای افزایش معنی داری بود. آنالیز قدرت آنتی اکسیدانت نشان داد که نمونه‌های بزاق بیماران کرون قدرت آنتی اکسیدانتی کمتری نسبت به نمونه‌های سالم دارند اما غلظت فاکتور رشد اپیدرمی در نمونه‌های بزاق این افراد نسبت به افراد سالم بیشتر بود. سطوح نیتریک اکسید در نمونه‌ی بزاق هر دو بیماری کرون و کولیت السراتیو افزایش یافته بود. (۳۷)، مشایخی وهمکاران در سال ۲۰۰۵، ارتباط بین سطوح نوکلئوتیدهای حلقوی و استرس اکسیداتیو در نمونه‌های بزاق بیماران پریودنتیت[1] را مورد مطالعه قرار دادند. cAMP و cGMP دو پیامبر هستند که نقش‌های مهمی را در عملکرد غدد بزاقی ایفا می‌کنند. نمونه‌های بیماران کاهش cAMP ، cGMP، TAP و افزایش سطوح TBARS را نسبت به کنترل نشان دادند.(۳۸)، تأثیر درمان کوتاه مدت کارویدیلول[2] که بر روی بزاق و پارامترهای استرس اکسیداتیو پلاسما و سطح گلوکز پلاسما در دیابت نوع-۲ توسط لاریجانی و همکاران در سال ۲۰۰۶ مورد بررسی قرار گرفت، نشان داد اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و بیماران مبتلا به دیابت نوع-۲ وجود ندارد.(۳۹)، در مطالعه رضایی و همکاران به بررسی ارتباط بین آنتی اکسیدانت‌های بزاق با سطوح نیتریک اسید و فاکتور رشد تغییردهنده‌ی بتا-۱ در نمونه‌های بزاق افراد مبتلا به بیماری کرون پرداختند. آن‌ها گزارش کردند که کاهش معنی‌داری در میزان ظرفیت کل آنتی اکسیدانت، آلبومین و اوریک اسید در نمونه‌های بزاق بیماران نسبت به افراد سالم مشاهده شده است. هم چنین میزان فاکتور رشد تغییردهنده‌ی بتا-۱ افزایش معنی داری نسبت به نمونه‌های کنترل (سالم) نشان داده و در سطوح نیتریک اکسید این افزایش ۴ برابر و در سطوح پراکسیداسیون لیپید ۵ برابر بوده است. این نتایج نشان داد که نمونه‌های بزاق افراد مبتلا با بیماری کرون دارای ویژگی‌های غیرطبیعی ناشی از استرس اکسیداتیو می‌باشد.(۴۰)، وضعیت استرس اکسیداتیو و غلظت فاکتور رشد تغییردهنده‌ی بتا-۱ پژوهشی بود که توسط یوسف‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۶ برروی نمونه خون و بزاق زنان مبتلا به پوکی استخوان انجام شد و نشان دادند میزان توانایی کل آنتی اکسیدانت در نمونه خون و بزاق بیماران به صورت معنی‌داری کمتر از شاهد و میزان TBARS به صورت معنی‌داری بیشتر بود. علاوه بر این در میزان فاکتور رشد تغییردهنده بتا-۱ در پلاسما و بزاق این افراد تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. آن‌ها بیان کردند که که افراد با بیماری پوکی استخوان افزایش استرس اکسیداتیوی را نشان می‌دهند که همراه با تغییر در سطوح فاکتور رشد تغییردهنده بتا-۱ نیست.(۴۱)

پس از آن ارتباط بین شاخص فعالیت بیماری و فاکتور رشد تغییردهنده بتا-۱ و نیتریک اکسید نیز در بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو مورد بررسی قرار گرفت. این پژوهش که توسط رضایی و همکاران در سال ۲۰۰۷ صورت گرفت به مقایسه میان سطوح نیتریک اکسید و فاکتور رشد تغییردهنده‌ی بتا-۱ در نمونه بزاق افراد بیمار و سالم پرداختند و بیان کردند که میزان این دو در نمونه‌های بیمار به صورت معنی داری بیشتر از افرا سالم است. (۴۲)، در مطالعه ای که توسط آقا حسینی و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی پراکسیداسیون لیپید بزاقی در نمونه‌های انسانی با بیماری لیکن پلان دهانی[3] و از طریق سنجش مالون دی آلدهید (MDA) و (TBARS) برای بررسی مطالعه‌ی ظرفیت کل آنتی اکسیدانت و پراکسیداسیون لیپید بهره بردند مشان دادند میانگین سطوح MDA بزاقی و نه TBARS در نمونه‌های بیماران به صورت معنی داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود. (۴۳)

اهمیت و روش‌های مطالعه بیومارکرها

امروزه پروتئومیک[4] کمی به عنوان ابزاری برای تشخیص و تمایز و پروتئین‌هایی که پتانسیل بیومارکر بودن برای بیماری‌هایی چون سرطان و عفونت‌ها و هم چنین پیشگویی و شناسایی پروتئین‌ها به کار گرفته می‌شود.(۴۴و۴۵)، با تکمیل پروژه ژنوم انسان مشخص شد که مکانیسم مولکولی رفتار سلول‌ها در شرایط مختلف را نمی‌توان از روی توالی ژن‌های آن پیشگویی کرد. رفتار سلولی و تمام فعالیت‌هایی که در سلول انجام می‌شود برعهده پروتئین‌ها است. در واقع برای ارتباط ژنوم با رفتار سلول‌ها باید پروتئین‌های سلول‌ها را شناخت. به کلیه پروتئین‌هایی که در یک سلول در یک زمان مشخص بیان می‌شود، پروتئوم آن سلول گفته می‌شود و این پروتئوم است که فاصله بین ژنوم و مکانیسم مولکولی رفتار سلولی را پر می‌کند. برخلاف ژنوم، برای هر ارگانیسم نمی‌توان یک پروتئوم واحد تعریف کرد. پروتئوم سلول‌های مختلف با یکدیگر متفاوتند. یعنی سلول‌ها علاوه بر پروتئین‌های ضروری که در همه انواع سلول‌ها بیان می‌شوند، دارای یکسری پروتئین‌های اختصاصی نیز هستند. سلول در برابر شرایط مختلف محیطی و پیام‌هایی که از سلول‌های اطراف دریافت می‌کند، پروتئین‌های مختلفی را بیان و در شرایطی آن‌ها را در محیط آزاد می‌کند. به عبارت دیگر هر سلول تحت شرایط مختلف پروتئوم‌های متفاوتی دارند. بنابراین برای شناسایی مکانیسم مولکولی رفتار سلولی و واکنش‌های زیستی، لازم است پروتئین‌هایی که در یک سلول بیان می‌شود، تغییرات آن‌ها در شرایط مختلف، عملکرد آن‌ها و هم چنین برهمکنش‌های بین پروتئین‌های مختلف در یک سلول و محیط اطراف آن بررسی شود، به مجموعه این بررسی‌ها پروتئومیک گفته می‌شود. رویکرد سیستمیک برای کشف بیومارکرهای مایعات بدن مانند سرم یا پلاسما که بتوانند در تشخیص بیمارانی که در معرض خطر آینده هستند و یا پیگری وضعیت درمان یا بیماری کاربرد داشته باشند، به شدت مورد توجه است. آنالیز پروتئوم بزاق انسان بسیار بحث برانگیز است چرا که پروتئوم بزاق محتوای تعداد زیادی پروتئین داخل یک محدوده‌ی غلظت خیلی گسترده می‌باشد. نخستین بیومارکرهای یافت شده با استفاده از تکنیک‌های پروتئومیک که بر پایه‌ی طیف سنجی

1. Periodontitis
2. Carvedilol
3. Oral Lichen Planus
4. Proteomics

جرمی[1] (MS) استوارند، شناسایی شده اند. در این تکنیک‌ها هر لکه برروی ژل یک نشانه برای تکنیک طیف سنجی جرمی است. امروزه با استفاده از تکنیک‌های پروتئومیک می‌توان نمونه‌ها را باهم مقایسه، تغییرات سطوح بیانی و پروتئین‌های منحصر به فرد را در آن‌ها بررسی و محاسبه کرد. در این مطالعات امکان جداسازی و شناسایی بیومارکرهای خاص در حالت‌های پاتولوژیکی منحصر به فرد یک سلول یا بافت و یا مایع بیولوژیک نیز وجود دارد.(۴۵-۴۷)

۴ تکنیک مختلف و پرکاربرد برای شناسایی و جداسازی پروتئین‌ها از جمله بیومارکرها به شرح ذیل است(۴۶و۴۸):

۱- الکتروفورز ژل ۲ بعدی[2] (۲-DE) که ترکیبی از SDS-PAGE[3] همراه با نقطه‌ی ایزوالکتریک[4] (IEF) است که قادر است مخلوط چندین هزار پروتئین را تنها برروی یک ژل منفرد جداسازی و قابل شناسایی کند. بررسی مقالات حاکی از این است که تکنیک ۲-DE پرکاربردترین تکنیک عمومی برای آنالیز جهانی است. اکثر مطالعات از ۲-DE به عنوان یک مرحله‌ی نخست برای جداسازی پروتئین به وسیله‌ی Tandem MS (MS/MS) نام برده‌اند. از معایب این روش این است که، قابلیت تکثیر ژل به ژل آن ضعیفی است، مقدار زیادی نمونه لازم دارد، وقت گیر است، حجم کاری بالایی دارد و از حساسیت پائینی برخوردار است.

۲- تکنیک LC/MS[5]، این دومین تکنیک استفاده شده در بررسی پروتئین‌هاست. این تکنولوژی توانایی شناسایی پروتئین به صورت چند بعدی را داراست که جستجوی زیرواحدهای پروتئینی از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی مانند MASCOT و SEQUEST اطلاعات با ارزشی را در اختیار محققین قرار می‌دهد. روش‌های کروماتوگرافی مایع (LC) به صورت مکمل با طیف سنجی جرمی (MS) یا LC-MS / MS برای جداسازی و شناسایی مولکول‌هایی با وزن پائین کاربرد دارند. اگرچه استفاده از این تکنیک‌ها تقریبا بی‌فایده است، چراکه با در نظر گرفتن میزان پروتئین‌های شناسایی شده از این طریق و مشقات انجام این روش‌ها کاربرد آن‌ها منطقی نیست. البته با بهبود یافتن تکنولوژی کروماتوگرافی می‌توان از این تکنیک‌ها به صورت کارآمد بهره مند شد(۴۹).سیستم‌های نانوکروماتوگرافی که امروزه در قالب تلفیق نانوتکنولوژی و پروتئومیکس روی کار آمده است این مشکل را برطرف کرده است.(۷و۸)

۳- تکنیک MALDI-TOF / MS[6]، این تکنیک دارای مزایایی مانند حساسیت بالا برای محدوده‌ی وسیع از جرم‌ها (Mass)، شرح ساده و قابلیت تفکیک بالای جرمی است. این روش در بسیاری از مطالعات که قبلا توسط تکنیک LC-MS انجام شده برای ارزیابی و شناسایی دقیق به کار می‌رود. علاوه براین در تحقیقات به عنوان روش اصلی همراه با ۲-DE نیز کاربرد دارد.(۵۰)

۴- تکنیک SELDI-TOF / MS[7]، این تکنیک در برخی از حالت‌ها که ماتریکس نمونه (protein chip) نقش فعالی را در خالص‌سازی، یونیزاسیون و جداسازی پروتئین نمونه دارد. از این تکنیک برای تعیین کمیت می‌توان استفاده کرد و قابل تکرار بودن نتایج از مزایای آن است.(۴و۴۸)

سرطان پانکراس از بیماری‌های مطرح جهت یافتن بیومارکرها

بنابر تعریفی که قبلاً درباره‌ی بیومارکرها گفته شد ویژگی خاص آن‌ها سبب می‌شود در هر عارضه به صورت متفاوت باشند، به عبارت دیگر "هر عارضه و بیماری می‌تواند بیومارکرهای خاص خود را داشته باشد" و از این رو با استفاده از همین ویژگی از آن‌ها به عنوان یک ابزار تشخیصی تازه توسعه یافته به صورت تنها و یا با سایر روش‌های قدیمی استفاده می‌کنند. سرطان پانکراس که اغلب اشاره به بخش برون ریز پانکراس دارد از سرطان‌های شایع در جهان و نسبتاً غیر قابل درمان به حساب می‌آید زیرا معمولا تومور سرطانی در مرحله پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شود. روش تشخیص نهایی سرطان پانکراس، نمونه‌برداری از بافت در طی اندوسکوپی می‌باشد که روشی تهاجمی بوده و در مواردی با عوارض جانبی برای بیمار همراه است. در حال حاضر بررسی پروتئین‌های CA۱۹-۹ (CEA) و DUPAN-۲ به عنوان شاخص بالینی و یا عود بیماری پس از جراحی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در مواردی با نتایج کاذب همراه می‌باشد. روش‌های متعددی جهت مطالعه بیومارکرها در این بیماری به کارگرفته شده است. برای مثال انجام الکتروفورز ژل ۲ بعدی به منظور مطالعه پروفایل پروتئین‌های سرم در بیماران سرطان پانکراس در مقایسه با افراد کنترل نشان داد دو پروتئین مانوز باندینگ لکتین ۲[8] و پروتئین کینازی زنجیره کوتاه میوزین ۲[9] می‌توانند به عنوان بیومارکر مطرح باشند.(۵۱)، بیومارکرهای این بیماری با روش‌های دیگری چون نشان دار کردن ایزوتوپ‌های اسیدهای آمینه در محیط کشت[10] نیز بررسی شد. در این روش که به منظور مقایسه پروتئین‌های ترشحی یا سکروتوم از سلول‌های کشت داده شده سرطان پانکراس با سلول‌های کشت داده شده طبیعی مجاری پانکراس صورت گرفت نشان داده شد که ۱۴۵ پروتئین به شکل متمایزی (تغییر بیشتر از ۱/۵ برابر) ترشح شده‌بودند. که در بین آن‌ها پروتئین‌هایی چون کاتاپسین D، فاکتور محرک کلنی ماکروفاژها و رسپتور فیبرونکتین با افزایش و پروتئین‌هایی چون پروفیلین ۱ و پروتئین متصل شونده به فاکتور رشد انسولینی با کاهش ترشح همراه بودند.(۵۲)، امروزه مطالعه RNA های کوچک فاقد کدهای پروتئینی[11] نیز مورد توجه بوده

1. Mass Spectrometry
2. Two-dimensional gel electrophoresis
3. Sodium dodecyl sulfate polyacryamide gel electrophoresis
4. Isoelectric focusing
5. D-liquid chromatography / Mass spectrometry
6. Matrix-assisted laser desportion / ionization time-of-flight mass spectrometry
7. Surface enhanced laser desportion / ionization time-of-flight / mass spectrometry
8. Mannose-binding lectin 2
9. Myosin light chain kinase 2
10. Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)
11. Small non-coding RNA

است. این RNA ها نقش مهمی در تنظیم فعالیت سلولی چون مهاجرت سلول سرطانی و تهاجم آن به عهده داشته و بررسی‌ها نشان داد دو miR-۲۰۰a و miR-۲۰۰b در خون بیماران قابل شناسایی است.(۵۳)

اگرچه این مطالعات به منظور بررسی الگوی پروتئینی سلول های سرطان پانکراس انجام گرفته است اما تغییر الگوی پروتئین‌های بزاق درتغییر اکوسیستم دهان و فراهم نمودن شرایط بیماری دارای اهمیت است. در حال حاضر بسیاری از مطالعات پروتئومیک به شناسایی و ردیابی بیومارکرهای موجود در بزاق با به کارگیری تکنیک پایه انگشت نگاری جرمی پرداخته اند. این مطالعات سبب شد که بسیاری از بیومارکرهای منحصر به فرد برای هر بیماری شناسایی شوند و بتوان از آن‌ها در تشخیص زود هنگام بیماری و مراحل پیشرفت و یا بهبود بیماری با استفاده از تست ساده بزاق استفاده کرد. با این وجود، انجام این مطالعات مستلزم انجام مراحل پیچیده استاندارد سازی جمع آوری نمونه بزاق، انتخاب روش مطالعه الگوی پروتئین‌ها، مقایسه با نمونه‌های کنترل مناسب و تائید نتایج بدست آمده است. با به کار بردن روش انگشت نگاری جرمی، سیگنال‌های خاص در ایجاد سرطان پانکراس در نمونه‌های بیماران قابل ردیابی است. این امید می‌رود که در آینده این روش‌ها در شناسایی عوامل ایجاد بیماری و تشخیص سرطان پانکراس به صورت موثر و کارآمد به کار گرفته شوند.

هم چنین بزاق به جهت یافتن بیومارکرها با به کار گیری دانش ترانسکریپتومیک[1] نیز مورد توجه بوده است. مطالعه انجام شده توسط زهانگ[2] و همکاران بروی سوپرنتانت بزاق افراد مبتلا به سرطان پانکراس در مقایسه با افراد کنترل وجود ۴ بیومارکر (Messenger RNA) mRNA را نشان داد. این بیومارکرها از ۱۲ مورد mRNA شناسایی شده بود که پس از آنالیز همبستگی ۴ مورد mRNAهای مربوط به ژن‌های KRAS، MBD۳۱۲، ACRV۱ و DPM۱ به عنوان بیومارکرهای تمایز سرطان پانکراس مطرح شدند.(۵۴)

نحوه جمع آوری بزاق در مطالعات پروتئومیک

عدم بروز تغییرات پس از نمونه‌گیری از مایعات بدن (مانند بزاق) مطلبی است که همگان بر آن تأکید دارند و عواملی مانند نحوه‌ی جمع آوری، رسیدگی و پردازش آن (به طور مثال استفاده از مهارکننده‌های پروتئاز بلافاصله بعد از نمونه گیری) تأثیر بسزایی در موفقیت مطالعات پروتئومیک دارد (هر چند که در مطالعات ژنومیک این مرحله از حساسیت کمتری برخوردار است). مزیت بزرگ استفاده کردن از بزاق به عنوان نمونه بیولوژیک، سادگی جمع آوری آن به عنوان یک مایع تشخیصی است که طرفداران بسیاری نیز دارد. در جمع آوری نمونه بزاق یکسری اقدامات احتیاطی لازم است که شامل موارد ذیل می‌باشد

- اول این که، بزاق برخلاف سرم به برخی فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به صورت موضعی و سیستمیک حساس است. هرکدام از این فرآیندها در نقاط مختلف بدن در طول روز رخ دهد برروی محتویات بزاق تأثیر خواهد داشت و بیشترین اثرات را خوردن، نوشیدن و بهداشت دهان در طی دوره‌های متناوب قبل از نمونه‌گیری برروی محتویات بزاق خواهند داشت. برای این که نتایج بررسی بزاق مورد قبول و قابل استناد باشد بایستی جمع آوری نمونه بزاق تحت شرایط استاندارد و یکسان صورت گیرد. در بسیاری از مطالعات نمونه‌گیری به صورت صبحها صورت گرفته و حداقل ۲ ساعت قبل از آن هیچ گونه خوردن و آشامیدنی صورت نگیرد.
- دوم این که، در سراسر بزاق میزان قابل توجه‌ای از سلول‌های مخاطی کنده شده، میکروارگانیسم‌ها، باقی مانده‌های غذا و سایر ذرات وجود دارد که حذف این مواد خارجی بسیار ضروری است. برای این منظور نمونه‌ها را سانتریفیوژ کرده و سوپرناتانت آن را مورد آنالیز قرار داده و به این طریق مواد خارجی را حذف می‌کنند. اگر مدت زمان نمونه گیری تا انجام سانتریفیوژ بیش از ۵ دقیقه به طول می‌انجامد بهتر است از مهارکننده‌های پروتئاز مانند تری فلورواستیک اسید استفاده و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شود، چرا که در بزاق چندین پروتئاز حضور دارند که قابلیت تخریب کردن پروتئین‌های موجود در بزاق از جمله بیومارکرها را دارند.

اثبات شده است که رها کردن نمونه‌های بزاق برای یک دوره‌ی زمانی بعد از نمونه برداری می‌تواند پروفایل‌های پروتئومیک و محتوای بیومارکرها را تغییر دهد. بنابراین بهتر این است که برای اجتناب از تولید محصولات فرعی در نمونه‌ها، زمان بین جمع آوری نمونه و آنالیز آن‌ها به حداقل برسد.(۳و۳۲).

نتیجه گیری:

از مطالب ذکر شده می‌توان به اهمیت بزاق بعنوان راهکاری در تشخیص و بررسی بیماری های مختلف بویژه بیماری های دهان و دندان و دستگاه گوارش پی برد که لزوم مطالعات بیشتر در این حیطه را می‌رساند. بررسی پروتئوم بزاق در شرایط بیماری های مختلف می‌تواند سبب کشف بیومارکرهای بزاقی خاص برای بیماری های مختلف و حتی مراحل مختلف بیماری گردد، علاوه براین با شناخت بهتر و بیشتر ترکیبات آنتی اکسیدانتی بزاق می‌توان مکانیسم دفاعی بدن را در برابر رادیکال های آزاد از طریق دهان (که اولین مسیر ورود رادیکال های آزاد به بدن است) تقویت کرد.

1. Transcriptomics
2. Zhang

REFERENCES

1. Abdollahi M, Radfar M. A review of drug-induced oral reactions. *J Contemp Dent Pract* 2003;4:10-31.
2. Bald E, Glowacki R. Analysis of saliva for glutathione and metabolically related thiols by liquid chromatography with ultraviolet detection. *Amino acids* 2005;28:431-3.
3. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 200;85:162-9.
4. Al-Tarawneh SK, Bencharit S. Applications of Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (SELDI-TOF) Mass Spectrometry in Defining Salivary Proteomic Profiles. *Open Dent J* 2009 3:74-9.
5. Farrell JJ, Zhang L, Zhou H, Chia D, Elashoff D, Akin D, et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut* 2012;61:582-8.
6. Lamkin MS, Oppenheim FG. Structural features of salivary function. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:251-9.
7. Dasilva N, Diez P, Matarraz S, Gonzalez-Gonzalez M, Paradinas S, Orfao A, et al. Biomarker discovery by novel sensors based on nanoproteomics approaches. *Sensors (Basel)* 2012;12:2284-308.
8. Nicolini C, Pechkova E. Nanoproteomics for nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* 2010;5:677-82.
9. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2010;6:78-95.
10. Abdollahi M, Rahimi R, Radfar M. Current opinion on drug-induced oral reactions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract* 2008;9:1-15.
11. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J* 1992;172:305-12.
12. Scarano E, Fiorita A, Picciotti PM, Passali GC, Calo L, Cabras T, et al. Proteomics of saliva: personal experience. *Acta otorhinolaryngologica Italica* 2010;30:125-30.
13. Smith DJ, King WF, Gilbert JV, Taubman MA. Structural integrity of infant salivary immunoglobulin A (IgA) in IgA1 protease-rich environments. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:89-96.
14. Smith DJ, Taubman MA. Emergence of immune competence in saliva. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:335-41.
15. Smith DJ, King WF, Taubman MA. Salivary IgA antibody to oral streptococcal antigens in predentate infants. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:57-62.
16. Marchal C, Schramm F, Kern A, Luft BJ, Yang X, Schuijt TJ, et al. Antialarmin effect of tick saliva during the transmission of Lyme disease. *Infect Immun* 2011;79:774-85.
17. Gorr SU. Antimicrobial peptides in periodontal innate defense. *Front Oral Biol* 2012;15:84-98.
18. Gorr SU, Abdolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2011;38:126-41.
19. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 2010;1:440-64.
20. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res* 2002;81:845-50.
21. De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 2005;27:1337-47.
22. Mizukawa N, Sugiyama K, Ueno T, Mishima K, Takagi S, Sugahara T. Defensin-1, an antimicrobial peptide present in the saliva of patients with oral diseases. *Oral Dis* 1999;5:139-42.
23. Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc* 2003;36:247-52.
24. Groschl M, Wendler O, Topf HG, Bohlender J, Kohler H. Significance of salivary adrenomedullin in the maintenance of oral health: stimulation of oral cell proliferation and antibacterial properties. *Regul Pept* 2009;154:16-22.
25. Castagnola M, Inzitari R, Rossetti DV, Olmi C, Cabras T, Piras V, et al. A cascade of 24 histatins (histatin 3 fragments) in human saliva. Suggestions for a pre-secretory sequential cleavage pathway. *J Biol Chem* 2004;279:41436-43.
26. Komine K, Kuroishi T, Ozawa A, Komine Y, Minami T, Shimauchi H, et al. Cleaved inflammatory lactoferrin peptides in parotid saliva of periodontitis patients. *Mol Immunol* 2007;44:1498-508.
27. Arslan SY, Leung KP, Wu CD. The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:411-6.
28. Schoepfer AM, Vavricka S, Zahnd-Straumann N, Straumann A, Beglinger C. Monitoring inflammatory bowel disease activity: Clinical activity is judged to be more relevant than endoscopic severity or biomarkers. *J Crohns Colitis* 2012;6:412-8.
29. Kleinegger CL, Stoeckel DC, Kurago ZB. A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:62-7.
30. Greabu M, Didilescu A, Puiu L, Miricescu D, Totan A. Salivary antioxidant biomarkers in non-ferrous metals mine workers - a pilot study. *J Oral Pathol Med* 2012.
31. Dodwad R, Betigeri AV, Preeti BP. Estimation of total antioxidant capacity levels in saliva of caries-free and caries-active children. *Contemp Clin Dent* 2011;2:17-20.
32. Takahama U, Hirota S, Yamamoto A, Oniki T. Oxygen uptake during the mixing of saliva with ascorbic acid under acidic conditions: possibility of its occurrence in the stomach. *FEBS Lett* 2003;550:64-8.
33. Courtois P, Majerus P, Mandelbaum I, Pourtois M. Antiseptic properties of saliva and metabolism of activated oxygen in neutrophils: comparison of the 2 enzymatic bactericidal systems and of their behavior in an acid environment. *Bull Mem Acad R Med Belg* 1990;145:175-82.
34. William K. Oxygen Consumption of Human Saliva and Its Relation to Dental Carie. *Dtsch Zahnarztl Z* 1965;20:785-94.
35. Sun S, Li X, Zhang G, Ma H, Zhang D, Bao Z. Determination of H2O2-dependent generation of singlet oxygen from human saliva with a novel chemiluminescence probe. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:440-4.

36. Astaneie F, Afshari M, Mojtahedi A, Mostafalou S, Zamani MJ, Larijani B, et al. Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients. *Arch Med Res* 2005;36:376-81.
37. Jahanshahi G, Motavasel V, Rezaie A, Hashtroudi AA, Daryani NE, Abdollahi M. Alterations in antioxidant power and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in saliva of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 2004;49:1752-7.
38. Mashayekhi F, Aghahoseini F, Rezaie A, Zamani MJ, Khorasani R, Abdollahi M. Alteration of cyclic nucleotides levels and oxidative stress in saliva of human subjects with periodontitis. *J Contemp Dent Pract* 2005;6:46-53.
39. Larijani B, Afshari M, Astanehi-Asghari F, Mojtahedi A, Rezaie A, Hosseinnezhad A, et al. Effect of short-term carvedilol therapy on salivary and plasma oxidative stress parameters and plasma glucose level in type II diabetes. *Therapy* 2006;3:119-23.
40. Rezaie A, Ghorbani F, Eshghtork A, Zamani MJ, Dehghan G, Taghavi B, et al. Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor-beta 1 in relation to disease activity in Crohn›s disease patients. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1091:110-22.
41. Yousefzadeh G, Larijani B, Mohammadirad A, Heshmat R, Dehghan G, Rahimi R, et al. Determination of oxidative stress status and concentration of TGF-beta 1 in the blood and saliva of osteoporotic subjects. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1091:142-50.
42. Rezaie A, Khalaj S, Shabihkhani M, Nikfar S, Zamani MJ, Mohammadirad A, et al. Study on the correlations among disease activity index and salivary transforming growth factor-beta 1 and nitric oxide in ulcerative colitis patients. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1095:305-14.
43. Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Mikaili S, Abdollahi M. Increased salivary lipid peroxidation in human subjects with oral lichen planus. *Int J Dent Hyg* 2009;7:246-50.
44. Mohamadkhani A, Shahnazari P, Minuchehr Z, Madadkar-Sobhani A, Tehrani MJ, Jazii FR, et al. Protein-x of hepatitis B virus in interaction with CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha)--an in silico analysis approach. *Theor Biol Med Model* 2011;8:41.
45. Marrocco C, Rinalducci S, Mohamadkhani A, D›Amici GM, Zolla L. Plasma gelsolin protein: a candidate biomarker for hepatitis B-associated liver cirrhosis identified by proteomic approach. *Blood Transfus* 2010;8:s105-12.
46. Na K, Lee MJ, Jeong HJ, Kim H, Paik YK. Differential gel-based proteomic approach for cancer biomarker discovery using human plasma. *Methods Mol Biol* 2012;854:223-37.
47. Mohamadkhani A, Jazii FR, Sayehmiri K, Jafari-Nejad S, Montaser-Kouhsari L, Poustchi H, et al. Plasma myeloperoxidase activity and apolipoprotein A-1 expression in chronic hepatitis B patients. *Arch Iran Med* 2011;14:254-8.
48. Zhong L, Taylor DL, Whittington RJ. Proteomic profiling of ovine serum by SELDI-TOF MS: optimisation, reproducibility and feasibility of biomarker discovery using routinely collected samples. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010;33:47-63.
49. Palmblad M, Bindschedler LV, Cramer R. Quantitative proteomics using uniform (15)N-labeling, MASCOT, and the trans-proteomic pipeline. *Proteomics* 2007;7:3462-9.
50. Karthik D, Ilavenil S, Kaleeswaran B, Sunil S, Ravikumar S. Proteomic analysis of plasma proteins in diabetic rats by 2D electrophoresis and MALDI-TOF-MS. *Appl Biochem Biotechnol* 2012;166:1507-19.
51. Rong Y, Jin D, Hou C, Hu J, Wu W, Ni X, et al. Proteomics analysis of serum protein profiling in pancreatic cancer patients by DIGE: up-regulation of mannose-binding lectin 2 and myosin light chain kinase 2. *BMC Gastroenterol* 2010;10:68.
52. Gronborg M, Kristiansen TZ ,Iwahori A, Chang R, Reddy R, Sato N, et al. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:157-71.
53. Li A, Omura N, Hong SM, Vincent A, Walter K, Griffith M, et al. Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer Res* 2010;70:5226-37.
54. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2010;138:949-57.