

**REGIONALNI CENTAR ZA TALENTE VRANJE**

**IDENTIFIKACIJA MOGUĆIH PROTEINSKIH BIOMARKERA ZA  
DIJABETIS U PLJUVAČKI**

**IDENTIFICATION OF POTENTIAL PROTEIN BIOMARKERS FOR  
DIABETES IN SALIVA**

Autor: **MILICA SAVIĆ**

Učenica IV razreda gimnazije „Stevan Jakovljević“ u Vlasotincu

Mentor:

**NELA PETKOVIĆ**, profesor hemije

**GORAN MITULOVIĆ**, Ph.D

# **Identifikacija mogućih proteinskih biomarkera za dijabetes u pljuvački**

## **Identification of potential protein biomarkers for diabetes in saliva**

Autor: **MILICA SAVIĆ**

Učenica IV razreda gimnazije „Stevan Jakovljević“ u Vlasotincu

Mentor:

**NELA PETKOVIĆ**, profesor hemije

**GORAN MITULOVIĆ**, Ph.D

### **REZIME**

Pljuvačka je telesna tečnost sastavljena od složene smeše proteina, peptida, šećera, enzima i drugih supstanci. Nije samo važna za održavanje zdravlja usne duplje već predstavlja i bitan faktor u dobijanju informacija o oralnim i sistemskim bolestima. Sveobuhvatna analiza i identifikacija proteoma pljuvačke može doprineti razumevanju oralne patofiziologije i obezbediti osnovu za prepoznavanje potencijalnih biomarkera određenih bolesti. To znači da se rezultati analize proteoma pljuvačke mogu koristiti u opštoj medicinskoj ili stomatološkoj praksi. Prikupljanje uzoraka pljuvačke je neinvazivno, sigurno i jeftino. Međutim, jako je bitno da prikupljanje pljuvačke kao i svi postupci u obradi probe moraju biti pažljivo kontrolisani. U ovom radu, ukazaćemo na progres u analizi proteoma pljuvačke i sumiranja dijagnostičkih mogućnosti koja su istražena. Mere predostrožnosti u prikupljanju, čuvanju i preanalitičkoj pripremi pljuvačke se moraju uzeti u obzir da bi dijagnostički test bio opšte prihvaćen. To bi moglo doprineti postavljanju brže dijagnoze i razjašnjavanju patogeneze mnogih sistemskih oboljenja i metaboličkih poremećaja. U ovom radu opisujemo proteomiks analizu pljuvačke donora sa dijabetesom i bez dijabetes koristeći tri različite metode precipitacije proteina i identifikaciju mogućih biomarkera.

**Ključne reči:** Pljuvačka, analiza proteoma, dijagnostičke metode, oralne bolesti, biomarkeri

## SUMMARY

Saliva is a fluid body composed of a complex mixture of proteins, peptides, sugars, enzymes, and other substances. It is not only important for maintaining the health of the mouth but is also an important factor in obtaining information on oral and systemic diseases. Comprehensive analysis of the saliva proteome and identification can contribute to the understanding of the pathophysiology of oral and provide a basis for identifying potential biomarkers of certain diseases. This means that the results of the saliva proteome analysis can be used in general medical or dental practice. Collecting saliva samples is non-invasive, safe and cheap. However, it is important to collect saliva as well as all the procedures in the processing probe must be carefully controlled. In this paper, we will point out the progress in the analysis of saliva proteome and summarizing diagnostic possibilities that were explored. Precautions in the collection, preservation and preanalytical preparation saliva must be taken into account to a diagnostic test was generally accepted. This could contribute to the setting faster diagnosis and clarify the pathogenesis of many systemic diseases and metabolic disorders. In this paper we describe the analysis of saliva proteomics donors with diabetes and without diabetes using three different methods of protein precipitation and identification of potential biomarkers.

**Key words:** Saliva, the proteome analysis, diagnostic methods, oral diseases, biomarkers

## 1.UVOD

Proteini, molekularni proizvodi gena, su od vitalnog značaja za žive organizme pošto oni obuhvataju čitavu mašineriju neophodnu za funkcionisanje metabolizma. Proteinska ekspresija zavisi kako od ćelijskih tako i od uslova okoline, i kao posledica toga, proteini se sintetišu u različito vreme i pod različitim uslovima. Skoro dve decenije, proteomska istraživanje su pokušavala da utvrde identitet i odrede nivo ekspresije velikog broja proteina i proteinskih varijanti u različitim fiziološkim stanjima u ćeliji, telesnim tečnostima ili tkivima. Očekuje se da će ovi podaci pomoći u boljem razumevanju biološke funkcije pljuvačnih žlezda, ali i ukazati na značaj ovih molekula u dijagnostici određenih patoloških stanja.

Pljuvačka je tečnost sa mnogim biološkim funkcijama neophodnim za održavanje oralnog zdravlja i regulaciju i promociju varenja. U prošlosti su se naučnici više koncentrisali na proučavanje bioloških funkcija pljuvačke nego pokušaju da se proceni njena mogućnost i uloga kao jednog od indikatora

sistemskih ili oralnih bolesti. Nedavno razvijeni testovi u kojima se koristi pljuvačka za dijagnostiku imunodeficijencije, karcinoma u određenom broju tkiva, srčane i autoimune bolesti, pokazuje da pljuvačka može biti korisno pomoćno sredstvo u kliničkoj dijagnostici i detekciji bolesti. [1-4]

Pljuvačka je, uglavnom, smeša sekreta iz tri para glavnih pljuvačnih žlezda - parotidne, podvilične i podjezične pljuvačne žlezde - i svaka od njih je zadužena za lučenje karakterističnog tipa pljuvačke. Čak i relativni doprinosi različitih žlezda su promenljivi, zavise od vremena kao i od tipa i stepena stimulacije. Promenljiva priroda pljuvačne sekrecije znači da različiti pristupi moraju biti usklađeni i usvojeni u proučavanju njenog sastava ili mogućnosti korišćenja za detekciju biomarkera određenih bolesti. Razvoj proteomskih analiza pljuvačke, kao i dobijanje i analiza pljuvačke iz različitih žlezda, može dati bitne informacije o zdravlju usne duplje i ukazati na neku od sistemskih bolesti.

Raznovrsnost molekula prisutnih u pljuvačnom sekretu čine pljuvačku interesantnom kao mogući izvor biomarkera. Poslednjih godina, istraživači razvijaju dijagnostičke metode za dijagnozu i praćenje oralnih i sistemskih bolesti. Kao medijum za kliničku dijagnostiku, pljuvačka poseduje nekoliko prednosti u odnosu na serum i krvnu plazmu. Za razliku od krvi pljuvačka se ne zgrušava, što je cini lakšom za obradu. Tehnike prikupljanja pljuvačke su neinvazivne, čime se smanjuje nelagodnost pacijenata i anksioznost prilikom prikupljanja proba. Pljuvačka se, u poređenju sa krvlju, pokazala kao odličan izvor specifičnijih markera za oralne bolesti kao što je, na primer, spinocelularni karcinom usta.

Pljuvačka, kao telesna tečnost, čija bi analiza i upotreba u dijagnostičke svrhe bila zastupljena ekvivalentno krvi i urinu, a ne samo kao dodatak standardnim laboratorijskim testovima, i koja bi mogla da pruži specifične odgovore u dijagnostici određenih bolesti, se još uvek nalazi u početnoj fazi istraživanja. U poslednjim radovima je identifikovano nekoliko potencijalnih biomarkera u pljuvački [4-6] i pokrenut je razvoj specifičnih testova za koji bi se koristili za njihovu brzu detekciju. Ovi uređaji bi bili mali i jednostavni za rukovanje što bi doprinelo smanjenju analitičkih troškova i ubrzao proces dijagnostike kao jedan od ključnih tačaka medicinske nege.

Termin biomarker je u upotrebu kod nas ušao u poslednjih deset godina i označava određene molekularne vrste ili njihove kombinacije u biološkim uzorcima kao što su krv ili pljuvačka, jedinstven je i stoga pokazuje posebna fiziološka ili patološka stanja. Preciznije, termin se odnosi na jednu molekularnu vrstu koja je prisutna samo u uzorcima osoba sa određenim zdravstvenim stanjem.

Proteini i peptidi pljuvačke su proučavani raznim biohemijskim tehnikama, uključujući tečnu hromatografiju, gel ili kapilarnu elektroforezu, nuklearnu magnetnu rezonancu, masenu spektromeriju, imuno-testove i druge. I pored sveobuhvatnih pokušaja, celokupna analiza i identifikacija proteoma pljuvačke još nije završena, a potrebna je za razumavanje celokupne oralne patofiziologije, sa jedne

strane, i mogućnosti korišćenja proteina i peptida pljuvačke kao biomarkera sistemskih bolesti, sa druge strane.

### **1.1. Analiza proteoma pljuvačke**

U poslednjih 40 godina je otkriveno mnoštvo proteina pljuvačke sa širokim opsegom funkcionalnih svojstava [7]. Ovo uključuje proteine imunog odgovora (imunoglobulini IgA, IgG, IgM) i antimikrobne aktivnosti (lizozom, laktoferin, histatini, defenzini), kao i mucin za lubrikaciju i fizičku zaštitu oralnog tkiva. Prolinom bogati proteini, čije funkcije uključuju precipitaciju potencijalno opasnih tanina iz ishrane, javljaju se u mnogim izoformama i, kao i drugi proteini pljuvačke, predmet su proteolitičke aktivnosti kako pljuvačke tako i bakterijskih proteaza u ustima.

Da bi se proteini izolovali iz pljuvačke, moraju se izolovati putem taloženja (precipitacijom) i nakon toga razgraditi enzimima na peptide, koji se analiziraju metodama tačne hromatografije i masene spektrometrije. Precipitacija proteina u ekstraktu se može postići dodavanjem soli (isoljavanje), organskih rastvarača, ili organskih polimera, ili variranjem pH vrednosti ili temperature rastvora. Soli efikasno vezuju molekule vode, čime se povećava hidrofobni efekat u rastvoru, i doprinosi taloženju preko olakšanog udruživanja hidrofobnih površina. Organski rastvarači, kao što su metanol, aceton i drugi, doprinose precipitaciji proteina smanjujući aktivnost vode, odnosno oduzimajući molekule vode vezane za molekule proteina, usled čega dolazi do taloženja proteina. Svaki protein se, bez obzira na aminokiselinski sastav, može prevesti u oblik u kome je zbir negativnog i pozitivnog naelektrisanja jednak podešavanjem pH rastvora i ova pH vrednost se označava kao izoelektrični pH ili pI. Na tački pI dolazi do taloženja proteina, jer ne postoje odbojne sile između neutralnih molekula, te pri njihovom sudaranju u prostoru dolazi do agregacije i precipitacije. Organski polimeri funkcionišu na sličan način kao organski rastvarači.

Nakon precipitacije, proteini se mogu razložiti na peptide koristeći proteaze, a efikasna proteoliza je glavni uslov za analizu proteina masenom spektrometrijom. Najčešće korišćena proteaza je tripsin, ali je za dobijanje temeljnijih informacija o sekvenci proteina bolje koristiti kombinaciju više proteaza. Tripsin je najčešće korišćena proteaza u analizi proteina putem masene spektrometrije (MS), koristi svoju visoku specifičnost za cepanje amidnih veza, sa jakim C-terminalnim nabojem i specifično cepa amidnu vezu lizinskih i argininskih ostataka. Tripsin je jedan od najsnažnijih proteaza i odlikuje se efikasnom proteolizom, ali tipične tripsinske reakcije ne razlažu u potpunosti proteine, nedostaje 15-30% od mesta cepanja. Nepotpuna proteoliza ima više posledica, uključujući smanjenje broja identifikovanih proteina, kompromitovane analitičke reproduktivnosti, kvantifikacije proteina i drugo. Dopuna tripsina sa Glu-C kompenzuje većinu propuštenih rascepa i pomaže u identifikaciji proteina.. Glu-C je serin proteaza koja specifično prekida amidnu vezu na C-terminusu bilo asparaginske ili

glutaminske kiseline. Optimalna aktivnost Glu-C je pri pH vrednosti između 4 i 9 i ova vrednost se poklapa sa optimalnom vrednošću za korišćenje tripsina.

## 2. Materijal i metode

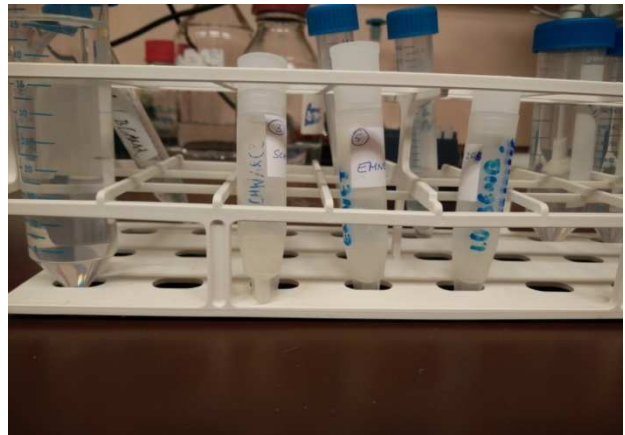
Pljuvačka je prikupljena koristeći Salivette sistem (Sarstedt, Beč, Austrija). Pamučni tupfer iz Salivete je žvakao dva minuta, po uputstvu proizvođača, da bi se sakupila najveća moguća količina pljuvačke (<https://www.sarstedt.com/en/products/diagnostic/salivasputum/>) i nakon toga je proba centrifugirana 10 minuta pri 10000 obrtaja u minuti i +4°C (Slike 1A i 1B).

Slika 1A. Salivete korišćene za prikupljanje uzorka



Picture 1A. Salivettes used to collect the sample

Slika 1B. Uzorak nakon centrifugiranja



Picture 1B. The sample after centrifugation

Po dva uzorka od dve osobe, jedne muškog i jedne ženskog pola, su korišćena za dalju obradu. Proteini iz pljuvačke su taloženi korišćenjem tri različita pristupa: precipitacija trihlor-sirćetnom kiselinom, precipitacija acetonom i precipitacija metanolom/dihlormetanom [8].

### 2.1 Precipitacija acetonom

Na 400  $\mu$ l uzorka dodato je 1600  $\mu$ l acetona i dobro promešano Vortex-om. Zatim je cela smeža ostavljena u zamrzivaču pri -20°C za vreme od 24h- vreme inkubacije potrebno za što efikasnije taloženje proteina. Nakon desetominutnog centrifugiranja istaloženih proteina, odstranjen je gornji sloj tečnosti i uzorak je 30 minuta sušen na vazduhu (isparavanje acetona). Proteini u uzorku su rastvoreni dodatkom 200  $\mu$ l 1% rastvora Rapigest-a (Rapidžest) (Waters, Beč, Austrija) rastvorenog u 50mM trietil amonijum bikarbonata (TEAB), pH 8.

## *2.2 Precipitacija metanolom*

Korišćeno je 1ml uzorka, 4ml metanola, 1ml dihlormetana (da bi se odvojili lipidi u tečnoj fazi iznad proteina) i 1ml vode. Inkubacija taloženja je vršena 30min u zamrzivaču na -20°C.

Nakon desetominutne centrifugacije pri 4°C i 10000 obrtaja u minuti, odvojene su organska i vodena faza, a protein se nalazi u međufazi kao tanka membrana. Nakon uklanjanja gornje (organske) faze, 3ml metanola je dodato preostaloj vodenoj fazi i proteinskom sloju i ponovo je izvršena tridesetominutna inkubacija u zamrzivaču. Nakon ponovnog centrifugiranja, istim postupkom kao i u prethodnoj metodi, nakon isparavanja metanola proteinski talog je rastvoren u Rapigest-u.

## *2.3 Precipitacija trihlor sirćetnom kiselinom (TCA):*

1 ml uzorka dodato je 110 µl 100% TCA. Nakon inkubacije od 16h pri -20°C, proteinski talog je odvojen centrifugiranjem i ispran sa 1ml 100% acetona. Ovo je ponovljeno 2 puta. Nakon isparavanja acetona, pelet je rastvoren u 200 µl Rapigest-a.

## *Merenje koncentracije proteina i enzimske razgradnje*

Merenje koncentracije proteina je izvršeno da bi odredili količinu enzima potrebnog za razgradnju. Merenje je izvršeno koristeći Direct Detect FT-IR (Millipore, Beč, Austrija). Dobijeni rezultati prikazani su tabelama. Enzimatska proteoliza je izvršena koristeći kombinaciju tripsina i Glu-C (Promega, Beč, Austrija). Pre dodatka enzima, disulfidne veze u proteinima su redukovane korišćenjem di-tiotreitola (2 µl, 50 mM) kod svih uzorka, a zatim je izvršena alkilacija jod-acetamidom (20 µl, 50mM) u mraku (1h) [9]. Na osnovu izmerene koncentracije proteina u probi, korišćeno je 50 µl uzoraka za proteolizu i odnos Glu-C prema proteinu je bio 1:20, a za tripsin/protein 1:50.

Na osnovu razmere i svođenja na 100 µg proteina svim uzorcima je dodato po 10 µl tripsina i 100 µl Glu-C. Uzorci su inkubirani 17h pri 37°C.

Rad enzima je zaustavljen dodatkom 1 µl 5% TFA.

Nakon toga, u 20 µl uzorka je dodato 30 µl 0,1% TFA i ova smeša je korišćena za injekciju.

Peptidi su analizirani metodom nano-hromatografije i masene spektrometrije (LC-MS/MS). Hromatografski sistem je UltiMate 3000nano RSLC i sastoji se od nano RSLC pumpe, termalne komore za kolonu sa dva ventila, UV-detektora i autoinjektora (Thermo Scientific, Germering, Nemačka).

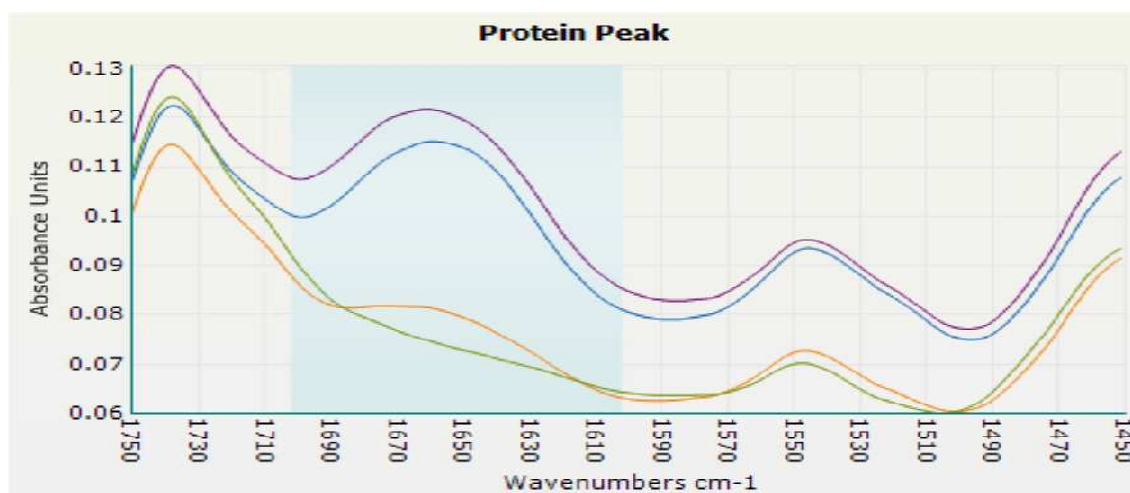
Detekcija masenim spektrometrom je urađena koristeći pozitivni naelektrisani elektrosprej, generisam u Captive Spray-u, na maXis Impact masenom spektrometru (Bruker, Bremen, Nemačka).

Sve probe su injicirane tri puta i rezultati su, nakon pojedinačne analize, objedinjeni.

Rezultati analize masenom spektrometrijom su analizirani korišćenjem „TheGPM“ X!Tandem platforme (i mogu se videti za probu dobijenu od ženskog donora i obrađenu nakon TCA precipitacije na internetu na sledećoj adresi: [http://human.thegpm.org/thegpm-cgi/plist.pl?path=/gpm/archive/GPM32100033840.xml&proex=-1&npep=0&filter=&d=20&order=&ltype=&omega\\_show=](http://human.thegpm.org/thegpm-cgi/plist.pl?path=/gpm/archive/GPM32100033840.xml&proex=-1&npep=0&filter=&d=20&order=&ltype=&omega_show=)). Na ovoj adresi se mogu pregledati i podaci vezani za Pathway analizu i pogledati pojedinačni peptidi i maseni spektri.

Venn-ov dijagram je urađen pomoću programa Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

## Rezultati



Grafik 1. Primer merjenja količine proteina u tri uzorka, na osnovu FT-IR spektra.

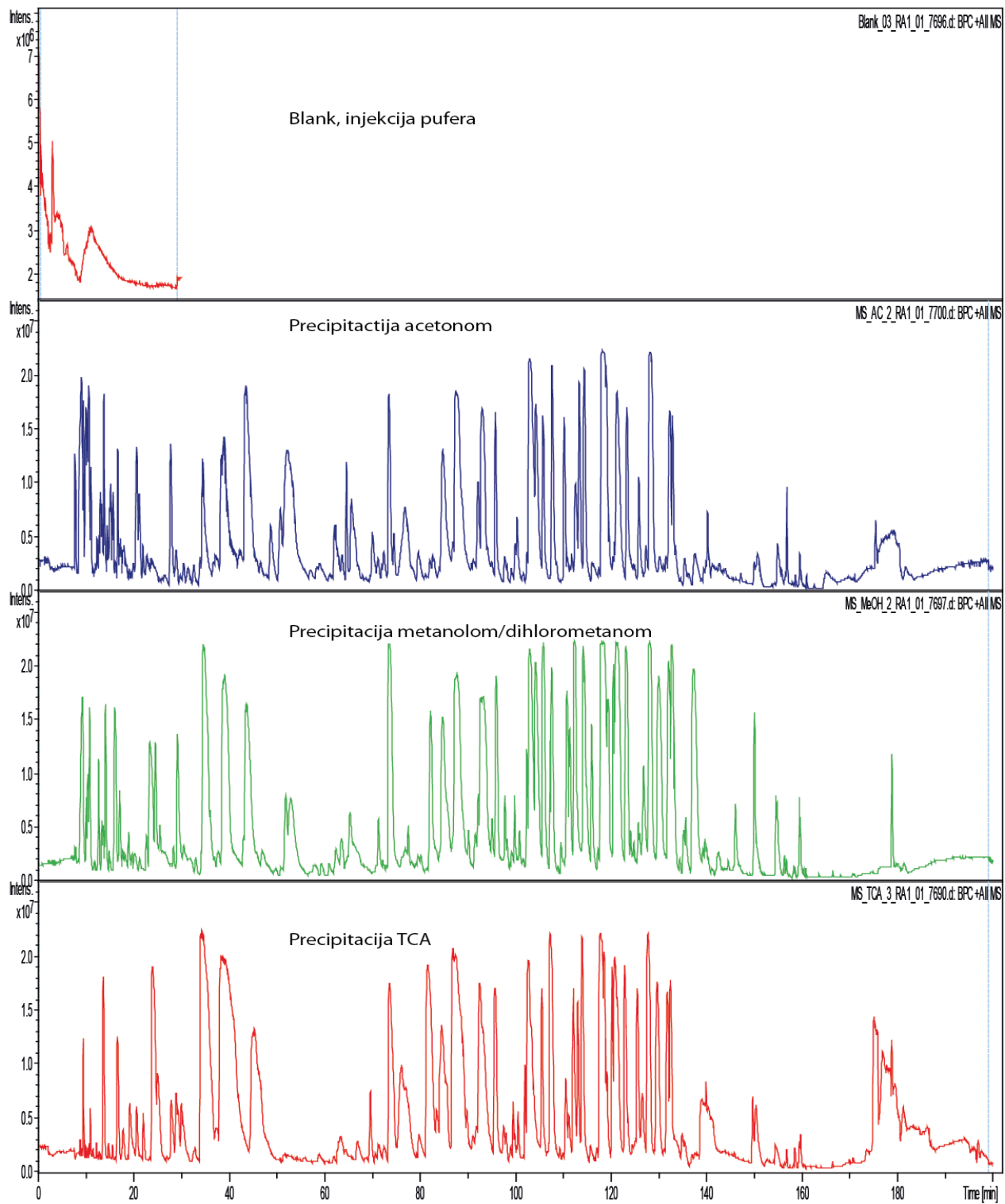
Chart 1. An example of measuring the amount of protein in three samples, on the basis of FT-IR spectrum.

	Boja krive	Type	Uzorak	Protein (mg/ml)
4	Žuta	Sample	GM MeOH	1.949
3	Plava	Sample	MS aceton	6.402
2	Ljubičasta	Sample	GM aceton	6.585
1	Zelena	Blank	Rapi	-----

Tabela 1. pokazuje količinu proteina izmerenu nakon upotrebe pojedinačnih metoda taloženja

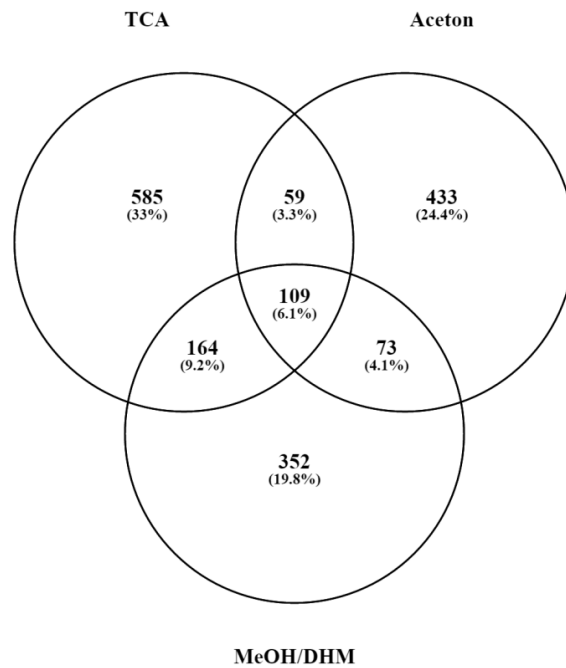
Table 1. shows the amount of protein measured after the use of individual methods of precipitation





Slika 3. Maseni hromatogram sa prikazom separacije peptida pljuvačke nakon precipitacije različitim agensima. Naziv agensa za precipitaciju je naveden u slici. Svi maseni hromatogrami su dobijeni korišćenjem pozitivne jonizacije u nano ESI modusu.

Picture 3. Mass chromatograph showing the separation of peptides saliva after precipitation with various agents. Name of the agent for the precipitation is stated in the picture. All mass chromatograms were obtained using the nano positive ionization mode ESI.



Slika 4. U zavisnosti od metode precipitacije, različit broj proteina je identifikovan u identičnom uzorku. Prikazani su rezultati analize ženskog donora.

Picture 4. Depending on the method of precipitation, the number of different proteins has been identified in the identical sample. The results of the analysis of the female donor.

Metod precipitacije	Broj proteina	Broj peptida
TCA	917	2012
ACETON	674	1052
Me-DHM	698	1350

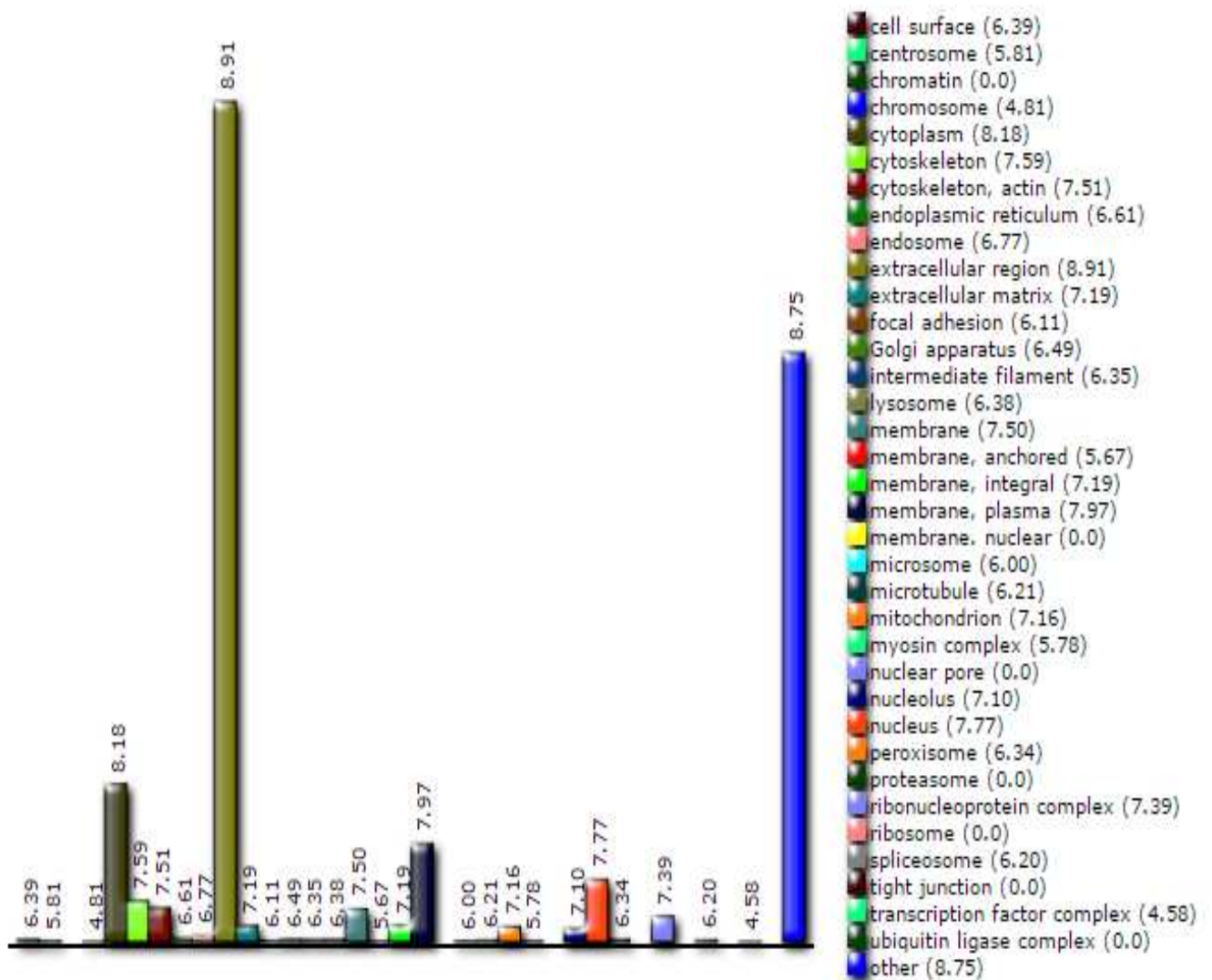
Tabela 2. Broj identifikovanih proteina i peptida nakon LC-MS/MS analize

Table 2. The number of identified proteins and peptides after the LC-MS / MS analysis



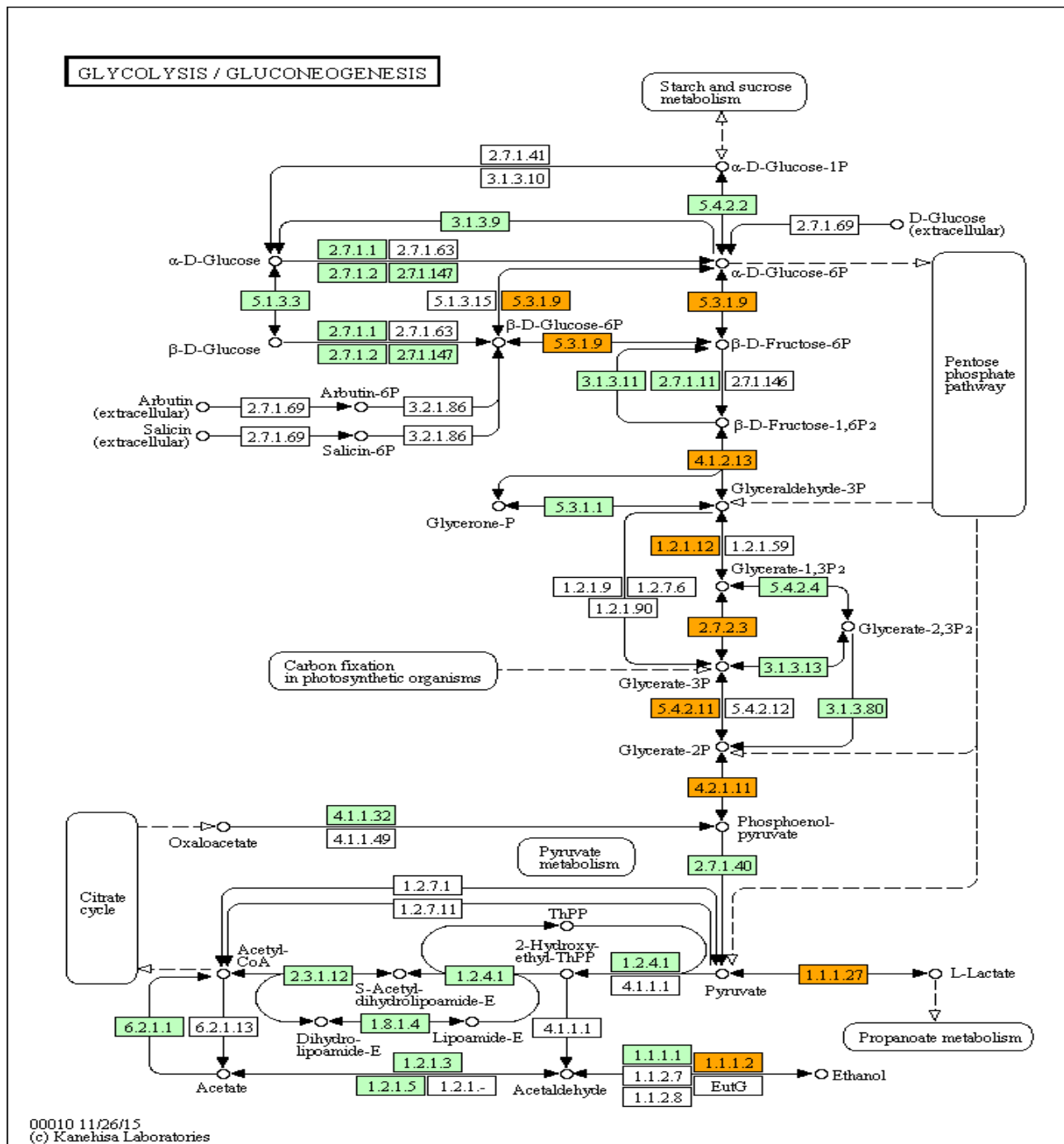
Models from 'MS\_TCA\_3\_RA1\_01\_7690.mgf': Gene Ontology display

Model: GPM32100033840



Slika 5. Ontologija gena asociiranih sa eksprimiranjem proteina identifikovanih uzorku u pljuvačke, nakon precipitacije metodom TCA u probi ženskog donora.

Picture 5. Ontology of genes associated with the expression of the proteins identified in saliva sample after TCA precipitation method in the trial of the female donor.



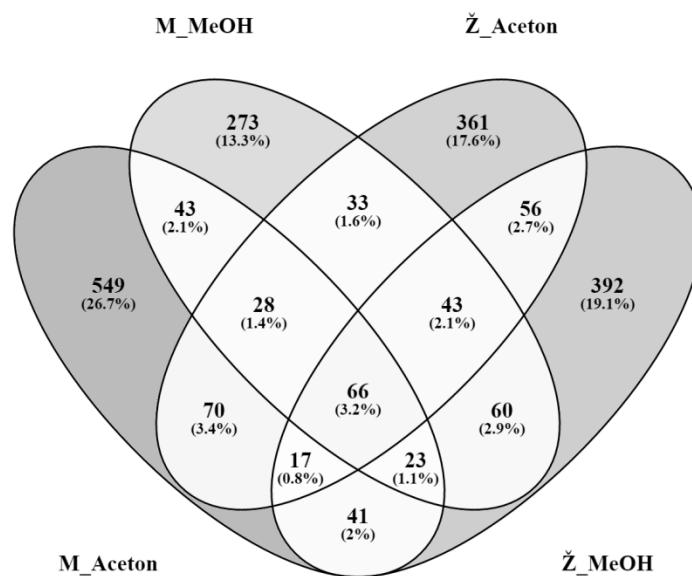
Slika 6. Primer pathway analize (KEGG) glikolize i glukoneogeneze u pljuvački ženskog donora na primeru overexpressed proteina u pojedinim bolestima. Najveći broj proteina je identifikovan u aktiviran u procesu glikolize i glukoneogeneze i u bolestima povezanim sa glikolizom. Povećana ekspresija proteina u pathway-u infekcije *E.coli* ukazuje na inflamatorne procese u organizmu i nisu nužno povezani sa bakterijskom infekcijom.

Figure 6. An example of pathway analysis (KEGG) glycolysis and gluconeogenesis in the saliva of female donors per case overexpressed proteins in certain diseases. The largest number of proteins have been identified in the active in the process of glycolysis and gluconeogenesis and in diseases related to glycolysis. Increased expression of the protein in the pathway in *E. coli* infection indicates the inflammatory processes in the body and do not necessarily correlate with bacterial infection.

Row	Accession	Protein	MW [kDa]
1	AMY1_HUMAN	Alpha-amylase 1 OS=Homo sapiens GN=AMY1A PE=1 SV=2	57.7
2	MUC5B_HUMAN	Mucin-5B OS=Homo sapiens GN=MUC5B PE=1 SV=3	596.0
3	PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4	83.2
4	AMY2B_HUMAN	Alpha-amylase 2B OS=Homo sapiens GN=AMY2B PE=1 SV=1	57.7
5	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	69.3
6	IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	37.6
7	ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1	41.8
8	IGHA2_HUMAN	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3	36.5
9	TRFE_HUMAN	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	77.0
10	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3	163.2
11	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	47.1
12	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	36.0
13	ACTC_HUMAN	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1	42.0
14	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	36.1
15	IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3	49.3
16	PIP_HUMAN	Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1	16.6
17	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1	11.6
18	TRFL_HUMAN	Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF PE=1 SV=6	78.1
19	SPRR3_HUMAN	Small proline-rich protein 3 OS=Homo sapiens GN=SPRR3 PE=1 SV=2	18.1
20	CYTS_HUMAN	Cystatin-S OS=Homo sapiens GN=CST4 PE=1 SV=3	16.2
21	ACTBL_HUMAN	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 PE=1 SV=2	42.0
22	MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	43.0
23	CAH6_HUMAN	Carbonic anhydrase 6 OS=Homo sapiens GN=CA6 PE=1 SV=3	35.3
24	DMBT1_HUMAN	Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Homo sapiens GN=DMBT1 PE=1 SV=2	260.6
25	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2	34.2
26	S10A9_HUMAN	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1	13.2
27	CO3_HUMAN	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	187.0
28	ILEU_HUMAN	Leukocyte elastase inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPINB1 PE=1 SV=1	42.7
29	IGHG4_HUMAN	Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1	35.9
30	PERL_HUMAN	Lactoperoxidase OS=Homo sapiens GN=LPO PE=1 SV=2	80.2

Tabela 2. Prikaz identifikovanih proteina u probi pljuvačke nakon precipitacije TCA. Prikazano je samo prvih trideset proteina.

Table 2. Only part of the identified proteins in saliva samples after TCA precipitation. Only the first thirty proteins.



Slika 7. Upoređivanje broja identifikovanih proteina u pljuvački dva donora (M = muški, Ž = ženski) dobijenih precipitacijom acetonom i metanolom.

Figure 7. Comparison of the number of identified proteins in saliva two donors (M = male, F = female) obtained by precipitation with acetone and methanol.

## Diskusija

Korišćenje različitih supstanci za precipitaciju proteina je istraživano ranije i rezultati su često bili kontradiktorni. Sudeći po rezultatima koji su dobijeni u aktuelnom radu, prinos proteina zaista zavisi od načina koji je izabran za precipitaciju. Metode precipitacije, koje su upoređivane, zahtevaju različito vreme za pripremu proba i ponekad izbor metode zavisi i od vremena koje stoji na raspolaganju. Ako se radi o kliničkim testovima, koji su akutne prirode, onda je najbolje izabrati metodu koja ne zahteva dugu inkubaciju preko noći. Naravno, za istraživačke potrebe uvek ćemo izabrati metodu koja daje najviše materijala za analizu, bez obzira na vreme trajanja oglada.

U prikazanom radu su korišćene tri metode za precipitaciju proteina od dva donora, različite starosne dobi i različitog pola. Uočljivo je da je kod starije osobe bilo količinski manje pljuvačke u odnosu na mlađeg donora. Iako je broj proba u ovom opitu mali, podaci dobijeni iz ranijih opita potvrđuju da je količina izlučene pljuvačke kod starijih osoba generalno niža u poređenju sa mlađim osobama. Metodom žvakanja se kod starijih donora dobije od 1,5 do 2 ml pljuvačke, a kod mlađih od 2,5 ml pa do

5 ml pljuvačke. Količina proteina u pljuvački zavisi od mnogo faktora i razlikuje se od doba dana kada je uzorak uziman, količine tečnosti koje je osoba uzimala i od opšteg zdravstvenog stanja.

Rezultati analiza u aktuelnom radu pokazuju da su u svim uzorcima identifikovani proteini karakteristični za pljuvačku, kao što su na primer alfa amilaza, mucin, aktin, imunoglobulini. Na slici 4 su pokazani rezultati dobijeni za proteine identifikovane u uzorku ženskog donora. Pathway analiza KEGG-om je pokazala da je najviše proteina obogaćeno u interakcijama pathway-a glikolize i glukogeneze. Na prvi pogled deluje čudno da je sledeći pathway onaj koji se vezuje za infekcije bakterijom Escheria coli. Međutim, ako se uzme u obzir da ženski donor ima dijabetes i da je kod dijabetesa izražen inflamatorni proces, ovakav rezultat je razumljiv i logičan.

Na osnovu aktuelne analize se ne može reći da su određeni proteini iz pljuvačke posebno pogodni za dijagnozu bolesti, ali se sa sigurnošću može reći da je analiza pljuvačke nedvosmisleno pokazala da je moguće identifikovati biološki proces u kome su proteini obogaćeni u odnosu na normalno stanje sistema. Rezultati pokazuju da je ovakav sistem analiza prikladan za otkrivanje mogućih biomarkera.

## **Zaključak**

Pljuvačka je obećavajući biološki materijal za korišćenje u kliničkim ispitivanjima sa značajnim potencijalom za dalji rast i razvoj. Uprkos tome što je dosta urađeno do sada, potrebno je još istraživanja da se potvrde otkriveni potencijalni biomarkeri za rano otkrivanje bolesti koje će dovesti do efikasnijeg lečenja. Korišćenjem proteomiks metoda, mogli smo da pokažemo da je moguće identifikovati proteine u pljuvački koji su obogaćeni samo u biološkom procesu vezanom za hronično stanje dijabetesa kod donora sa dijabetesom, a ne i kod donora bez dijabetesa.

Za sada je proteomiks metoda povezana sa intenzivnim pripremanjem uzoraka i dugotrajnim instrumentalnim analizama. Međutim, ako ovakve analize budu pomogle da se otkriju i verifikuju proteini karakteristični za određenu bolest, moguće je izraditi čip sa specifičnim antitelima i tako učiniti kontrolu šećera u krvi nezavisnom od uzimanja same krvi. Ovo bi doprinelo poboljšanju kvalitetu života pacijenta i ubrzalo dijagnostiku.

### **Skraćenice**

TCA: Trihlor-sirćetna kiselina

TEAB: Trietil-amonijum-bikarbonat

Glu-C: Glutamin-C

DTT: 1,4-disulfanil butan-2,3-diol

## Literatura

- [1] C.-C. Wu, H.-W. Chu, C.-W. Hsu, K.-P. Chang, H.-P. Liu, *Proteomics* (2015) n/a.
- [2] I. Messana, T. Cabras, F. Iavarone, B. Manconi, L. Huang, C. Martelli, A. Olianas, M.T. Sanna, E. Pisano, M. Sanna, M. Arba, A. D'Alessandro, C. Desiderio, A. Vitali, D. Pirolli, C. Tirone, A. Lio, G. Vento, C. Romagnoli, M. Cordaro, A. Manni, P. Gallenzi, A. Fiorita, E. Scarano, L. Calò, G.C. Passali, P.M. Picciotti, G. Paludetti, V. Fanos, G. Faa, M. Castagnola, *Journal of Proteome Research* 14 (2015) 1666.
- [3] A. Sai Sankar, B. Sujatha, E. Sridevi, M. Manoj Kumar, M. Sridhar, P.V.S. Lakshmi, *Diagnostic perspective of saliva in insulin dependent diabetes mellitus children: An *in vivo* study*, 2015.
- [4] J.M. Yoshizawa, C.A. Schafer, J.J. Schafer, J.J. Farrell, B.J. Paster, D.T.W. Wong, *Clinical Microbiology Reviews* 26 (2013) 781.
- [5] A. Caseiro, R. Ferreira, A. Padrão, C. Quintaneiro, A. Pereira, R. Marinheiro, R. Vitorino, F. Amado, *Journal of Proteome Research* (2013).
- [6] P.V. Rao, A.P. Reddy, X. Lu, S. Dasari, A. Krishnaprasad, E. Biggs, C.T. Roberts, S.R. Nagalla, *Journal of Proteome Research* 8 (2009) 239.
- [7] Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhost EJ. Salivary proteome and its genetics polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1098: 22-50.
- [8] D. Wessel, U.I. Flügge, *Analytical Biochemistry* 138 (1984) 141.
- [9] G. Mitulović, C. Stingl, I. Steinmacher, O. Hudecz, J.R.A. Hutchins, J.-M. Peters, K. Mechtler, *Analytical Chemistry* 81 (2009) 5955.