Internal Medicine Today
Gonabad University of Medical Sciences
January 2022. Vol 28. Issue 1

Research Paper

Comparing the Salivary Zinc Finger Protein 510 Concentration in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma and Healthy Individuals

Zahra Delavarian[1], Seyyed Issac Hashemi[2], Leyla Vazifeh Mostaan[3], Sina Mozaffari Jovin [4], Alireza Biabani[5], Ala Ghazi[1*]

1. Oral and Maxillofacial Diseases Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
2. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3. Department of ORL-Head & Neck Surgery, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4. Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
5. Dentist, Mashhad, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Ghazi A, Delavarian Z, Hashemi SI, Vazifeh Mostaan L, Biabani A. [Comparing the Salivary Zinc Finger Protein 510 Concentration in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma and Healthy Individuals (Persian)]. Internal Medicine Today. 2022; 28(1):128-139. https://doi.org/10.32598/hms.28.1.3487.1

https://doi.org/10.32598/hms.28.1.3487.1

CC BY NC

Received: 21 Oct 2020
Accepted: 25 Dec 2021
Available Online: 01 Jan 2022

Keywords:
Oral squamous cell carcinoma, Zinc finger protein 510, Saliva

ABSTRACT

Aims Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is the most frequent malignancy of oral cavity. Early diagnosis of OSCC can provide early treatment and increase the survival rate. Recently, the level of salivary biomarkers has been studied for the early diagnosis of different cancers. This study aims to assess the Zinc Finger protein 510 (ZNF510) concentration, a novel biomarker for the diagnosis of OSCC in early stages, in salvia of patients with OSCC and healthy individuals as

Methods & Materials In this study conducted in 2019, 21 OSCC patients and 21 healthy individuals participated and their unstimulated saliva were collected by the spitting method. The ZNF510 concentration was determined using the ELISA technique. All statitical analyses were performed in SPSS software, version 23. The significance level was set at 0.05 for all tests.

Findings The mean of ZNF510 protein was significantly higher in OSCC patients than in healthy subjects (P=0.019), but after considering age as a confounder variable, the difference was not significant (P=0.090). Moreover, in patients with OSCC, the mean of ZNF510 in those with grade II lesion was significantly higher than in those with lesion grade I (P=0.001).

Conclusion Age has an effect on the ZNF510 concentration in saliva. Therefore, further studies by consideration of age factor and using larger sample sizes are recommended.

* ***Corresponding Author:***
Ala Ghazi, PhD.
Address: Oral and Maxillofacial Diseases Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
Tel: +98 (915) 3025663
E-mail: ghazial@mums.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

One of the most important cancers (the sixth prevalent cancer) in the world is oral cancer. In 2018, about 300,000 new cases of oral cancer and a mortality number of 150,000 worldwide were reported [1, 2]. The prevalence of this cancer varies around the world geographically up to 20 times in different areas of the world [2, 3]. The prevalence of oral cancer is significantly higher in Asia compared to developed countries [2, 4]. The oral cancer prevalence in Iran and other countries in South Asia such as India, Pakistan and Bangladesh is 20-36.3 per 100,000 people [2].

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of oral cavity and accounts for at least 90% of all oral malignancies [4, 5]. Currently, the OSCC is diagnosed based on oral examination and histopathological findings [1, 6]. Biopsy of suspected malignancies is the standard method to determine their nature [6, 7]. In addition to the ailment caused by invasive biopsy, it is possible that precancerous non-homogenous lesions prevent determining the site of the biopsy which is significant in the histopathological assessment of oral cancer. Grading is the histopathological assessment of lesions' degree of similarity to normal squamous epithelium and a method for evaluating the amount of creatine production. Lesions are graded on a three-point (grade I, II, III) or four-point scales. Poorly differentiated lesions have higher grades [8]. Although there are significant advances in treatment of oral cancer including surgery, radiation therapy, chemotherapy, or their combination, but about 50% of patients suffering from oral cancer survive for 5 years [9, 10]. There is still no effective method to accurately and easily screen oral cancer.

Diagnosis of novel biomarkers is essential for the detection of early malignant oral lesions, especially in those at higher risk [11]. Saliva is a good candidate for detecting biomarkers of oral cancer. Saliva is produced by three main salivary glands including parotid glands, submandibular glands, and sublingual glands, and to a lesser extent by the sub-salivary glands in the lips, cheeks, tongue, palate, and glandular ducts [12]. Using saliva to screen oral cancer is an easier and less invasive method compared to blood sampling or biopsy. Moreover, it is more easily tolerated by patients [6].

Zinc finger protein 510 is a protein that is encoded by the ZNF510 gene in humans. ZNF510 protein is a member of a zinc-finger protein family with about 30 amino acids and zinc ions. It is involved in the control of cell growth, proliferation, differentiation, and programmed death. This protein has been observed in the saliva of patients with OSCC [9]. To our knowledge, only one study has assessed the level of ZNF510 in the saliva of patients with OSCC [9, 13]. In this regard, this study aims to compare the level of ZNF510, as a novel biomarker for diagnosis of OSCC in the early stages, in the saliva of patients with OSCC and healthy individuals.

Materials and Methods

This cross-sectional analytical study was conducted on patients with OSCC and healthy individuals referred to Omid and Imam Reza hospitals affiliated to Mashhad University of Medical Sciences in Iran in 2019. In patients with OSCC, clinical and pathological examination had confirmed the presence of disease and had other inclusion criteria; i.e. age >18 years, consent to participate in the study [9]. Exclusion criteria were any systemic autoimmune disease, existence of oral mucosal lesions other than OSCC, and pregnancy or lactation [9]. According to the results of Jou et al. [9] and at the confidence level of 95%, a test power of 80%, and a type I error level of 50%, the sample size was calculated 9 for each group. This number was increased to 21 for further confidence (21 patients with OSCC and 21 healthy individuals). Prior to study, the procedure was explained to participants, and they signed a written informed consent form to enter the study. Then, their demographic characteristics and the lesion characteristics in the patient group (including lesion type, lesion site, and the histopathology grade of lesion) were recorded. Saliva sampling was then performed. Unstimulated saliva was used for saliva sampling because stimulated saliva has a low concentration of biomarkers and makes it difficult to detect [14]. Participants were advised to avoid smoking and alcohol use for 24 hours before collecting saliva. On the day of sampling, patients were not allowed to smoke, eat, drink or brush for 1-1.5 hour before collecting samples. Spitting method was used to collect unstimulated saliva [15]. Participants were asked to collect saliva in their mouths and then put it into a sterile plastic falcon tube. This was done every 60 seconds for 5-15 minutes between 9-12 a.m. Approximately 5 mL of saliva was collected by this method. During sampling, participants were in a sitting position with slightly forward posture, feeling completely comfortable.

The samples kept in the ice flask were transferred to the central laboratory of Mashhad University of Medical Sciences and stored in a refrigerator at -20°C for up to 3 days. The samples were thawed at room temperature and were then centrifuged for 15 minutes (rpm at 3000) immediately after defrosting to separate squamous cells, debris and mucus. The supernatant solution was collected and poured into

1.5-mL microtubes and stored at -80°C in the refrigerator. In the next step, ZNF510 (part per million or PPM) values were evaluated using an ELISA Kit (ZellBio GmbH, Germany) and ELISA method. For this purpose, each sample was examined twice by an experienced technician who was unaware of allocation.

In summary, the expriment steps were as following: Preparation of samples and standardization, adding 40 µl of samples, 10 µl of ZNF510, 50 µl of standard solution, and 50 µl of Streptavidin-HRP and reacting for 60 minutes at 37°C, Washing the plate 5 times with 300 µl diluted buffer, adding 50 µl of chromogen solution A and 50 µl of solution B and incubating for 10 minutes at 37°C, adding 50 µl of stop solution, reading optical density within 10 minutes at a wavelength of 450 nm, performing calculations and presenting reports.

Collected data were analyzed in SPSS software, vertion .23. For this purpose, Mean±SD error of ZNF510 concentration were reported for saliva samples of healthy individuals and patients with OSCC. Kolmogorov-Smirnov, independent t-test, chi-square, Pearson correlation test, Kruskal-Wallis and analysis of covariance were used to analyze the data. Significance level was set at 0.05 in all statistical tests.

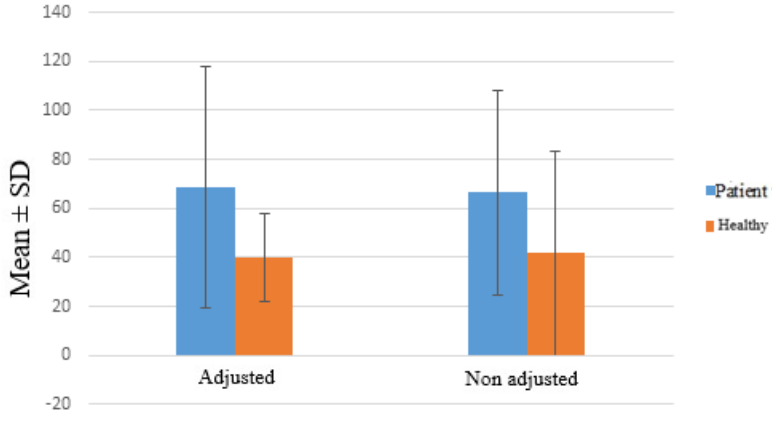
Results

In this study, 42 individuals participated including 29 women (69%) and 13 men (31%) with a mean age of 60.62±10.77 years ranged 42-75 years. There was no significant difference between the two groups in terms of gender (P=0.317), but the mean of age in the healthy group was significantly lower than in the patient group (P<0.001).

Table 1 and Figure 1, shows the mean and standard deviation of ZNF510 level. As can be seen, the mean of ZNF510 (ppm) in the patient group was significantly higher than in the healthy group according to the results of independent t-test (P=0.019); however, after considering age as a confounding variable, although the mean of ZNF510 in the patient group was higher, this difference was not significant (P=0.090). Therefore, age affected the amount of ZNF510. As it can be seen from Figure 2, in both groups, age had a direct but weak and insignificant relationship with ZNF510. In the patient group, the mean of ZNF510 was lower in women than in men, but the difference was not significant (P=0.555). In the healthy group, the mean of ZNF510 was higher in women than in men, but the difference was not significant (P=0.606).

The clinical examination of lesions showed that the lowest and highest mean of ZNF510 were related to ulcer and prominent lesions, respectively. The mean of ZNF510 was not significantly different in terms of lesion type (P=0.522). Furthermore, in terms of lesion site, the lowest and highest mean of ZNF510 were observed on the gums and lips, respectively. The mean of ZNF510 was not significantly different in terms of of lesion site (P=0.089).

Table 2 presents the mean, standard deviation, minimum, maximum, and mean of the ZNF510 level categorized by different grades of lesion histopathology in the patient group. In patients with histopathological grade I, the lowest and highest levels of ZNF510 were reported 12.5 and 83.75 ppm; and in patients with histopathology grade II, they were 107.7 and 167.5 ppm, respectively. The mean of ZNF510 in patients with lesion grade II was significantly higher than in those with lesion grade I (P<0.001). It should be noted that 6 patients had an unknown degree of lesion



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 1. Mean±SD of ZNF510 concentration in patient and healthy groups before and after controlling the effect of age factor

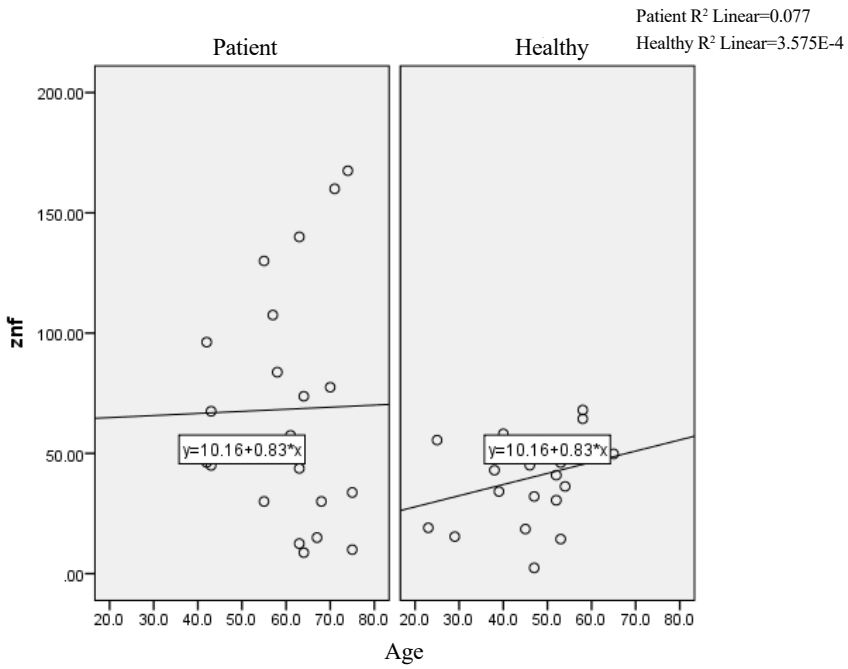


Figure 2. Relationship between age and ZNF510 concentration in each group

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

histopathology. Therefore, the information in Table 2 is related to 15 patients with OSCC.

Discussion

The current study aimed to measure the salivary ZNF510 protein concentration in patients with OSCC compared to healthy individuals. In patients with OSCC, the mean of ZNF510 in those with lesion grade II was significantly higher than in those with lesion grade I. Moreover, the concentration of ZNF510 protein with the prominent exophytic tupe was higher than other clinical features, and based on the lesion site, the mean of ZNF510 in patients with lip lesions was higher than in others. However, the mean of ZNF510 was not significantly different between the two groups in terms of lesion type and site.

Table 1. Comparison of ZNF510 concentration between patient and healthy groups (n=21)

Group	Mean±SD	
	Before Controlling Age Factor	After Controlling Age Factor
Patient	68.39±49.32	66.36±41.84
Healthy	39.77±17.98	41.84±41.80
Test results	T=2.50; P=0.019*	F=3.02; P=0.090**

*Independent t-test; **Analysis of covariance

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Table 2. Comparison of ZNF510 concentration between patients with different lesion grades

Lesion Grade	N	Mean±SD	Min	Max	Median	Independent t-test Result
Grade I	12	48.85±23.70	12.50	83.75	45.63	T=5.59 P<0.001
Grade II	3	138.133±30.03	107.50	167.50	140.00	

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

As mentioned before, oral cancer is the sixth most prevalent cancer worldwide, accounting for approximately 4% of all cancer cases [16]. Although the oral cavity may be examined directly, oral cancer sometimes is not diagnosed until the final stages. Biopsy and histopathological assessment are the gold standard methods for definitive diagnosis of oral cancer, including OSCC [6]. Studies have shown that saliva can be used for early diagnosis of OSCC along with biomarkers such as metallopeptidase-9 and Chemerin [12]. ZNF proteins are a group of proteins with a wide range of molecular functions involved in the regulation of several cellular processes, and their function is very different. The function of ZNF proteins seems to be related to the control of growth, proliferation, differentiation, and programmed death of cell (apoptosis) [17, 18]. Some studies have examined different types of ZNF proteins in head and neck cancers and OSCC [19-22]. One study by Jou et al. in 2011 examined the amount of ZNF510 protein in the saliva of patients with OSCC [9]. According to them, ZNF510 peptide levels were significantly increased in the saliva of patients with OSCC [9]. They indicated that ZNF510 level was significantly related to the oral cancer stages where it was higher in T3+ T4 stages compared to T1+ T2 stages. Moreover, they reported that the sensitivity and specificity in the early diagnosis and progression stage of the tumor was 96%. They concluded that the detection of ZNF510 peptide level is related to the progression of OSCC, and it is effective and useful for accurate and early diagnosis [9]. In our study, the mean of ZNF510 protein concentration in the saliva of patients with OSCC was significantly higher than in healthy individuals, but this difference was not significant between the two groups after controlling the age factor as a confounding factor, indicating that age factor affects the salivary ZNF510 concentration. Therefore, saliva protein levels are changed by increasing age, and there is an age-related effect on the secretion of a particular compound in saliva. Although the relationship between ZNF510 concentration and age in our study was weak, it can be claimed that the ZNF510 protein concentration in saliva increases by the increase of age.

Conclusion

The ZNF510 protein concentration is significantly higher in patients with OSCC compared to healthy individuals. However, after considering age as a confounding variable, this difference is not significant. It is recommended to conduct more studies by considering the effect of age factor.

It should be noted that the healthy group was selected from among the patients' healthy companions (first degree relatives) in order to homogenize the two groups in terms of heritage. One the other hand, the ZNF510 concentration was significantly higher in patients with lesion grade II compared to those with grade I. Therefore, ZNF510 in saliva may play a role as a possible biomarker for early diagnosis and progression of OSCC. However, more studies are needed with higher sample sizes and examinations of lesions grades III and IV in order to generalize the findings. The results of this study can be regarded as the beginning of further studies on the diagnostic methods of OSCC.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The study has an ethical approval obtained from the Research Ethics Committee of Mashhad University of Medical Sciences (Code: IR.MUMS.DENTISTRY.REC.1397.118).

Funding

This study was extracted from a dissertation in Dentistry approved by Mashhad Dental School. It was funded by the Deputy for Research of MasMashhad University of Medical Sciences.

Authors' contributions

Study design, data collection, writing, editing & review, and final approval: All authors; Conceptualization: Alla Ghazi.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Vice-Chancellor for Research of Mashhad University of Medical Sciences for the financial support, and all participants for their cooperation.

طب داخلی روز
فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی گناباد

مقاله پژوهشی

بررسی میزان Zinc Finger Protein 510 در بزاق افراد دارای کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و افراد سالم به‌عنوان یک نشانگر جدید برای تشخیص کارسینوم سلول سنگفرشی در مراحل اولیه

زهرا دلاوریان[۱]، سید اسحاق هاشمی[۲]، لیلا وظیفه مستعان[۳]، سینا مظفری جوین[۴]، علیرضا بیابانی[۵]، *آلا قاضی[۱]

۱. مرکز تحقیقات بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۲. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات جراحی سرطان، دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۳. گروه گوش، حلق و بینی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات جراحی سرطان، دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴. مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۵. دندانپزشک، مشهد، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Ghazi A, Delavarian Z, Hashemi SI, Vazifeh Mostaan L, Biabani A. [Comparing the Salivary Zinc Finger Protein 510 Concentration in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma and Healthy Individuals (Persian)]. Internal Medicine Today. 2022; 28(1):128-139. https://doi.org/10.32598/hms.28.1.3487.1

https://doi.org/10.32598/hms.28.1.3487.1

تاریخ دریافت: ۳۰ مهر ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۰۴ دی ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۱ دی ۱۴۰۰

چکیده

اهداف کارسینوم سلول سنگفرشی دهان شایع‌ترین بدخیمی در حفره دهان است. تشخیص زودهنگام این سرطان دهان به درمان به‌موقع و افزایش میزان بقای بیماران منجر می‌شود. اخیراً سطوح نشانگرهای موجود در بزاق به‌عنوان شاخصی برای تشخیص سرطان مورد توجه است. تحقیق حاضر با هدف تعیین مقادیر پروتئین Zinc Finger Protein 510 (ZNF510) در بزاق افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و افراد سالم به‌عنوان یک نشانگر جدید برای تشخیص این سرطان دهان در مراحل اولیه انجام شد.

مواد و روش‌ها این مطالعه بر روی ۲۱ بیمار مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و ۲۱ فرد سالم در سال ۱۳۹۸ صورت گرفت. نمونه‌های بزاق غیرتحریکی آن‌ها با روش Spitting جمع‌آوری شد. مقادیر ZNF510 با استفاده از روش ELISA اندازه‌گیری و تمام محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ تعیین شد.

یافته‌ها در مطالعه حاضر، میانگین غلظت ZNF510 در افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به‌طور معناداری بیشتر از افراد سالم بود (P=۰/۰۱۹)، اما بعد از در نظر گرفتن سن به‌عنوان متغیر مخدوشگر، با اینکه میانگین ZNF510 در گروه بیمار بیشتر از گروه سالم بود، اما مقدار اختلاف معنادار نبود (P=۰/۰۹۰). همچنین در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان میانگین ZNF510 در افراد دچار ضایعه با درجه هیستوپاتولوژی II به‌طور معناداری بیشتر از افراد دچار ضایعه با درجه I بود (P=۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری در این تحقیق، بعد از در نظر گرفتن سن به‌عنوان متغیر مخدوشگر، با اینکه میانگین ZNF510 در گروه بیمار از گروه سالم بیشتر بود، اما اختلاف معناداری مشاهده نشد. هرچند در این مطالعه سن با میانگین ZNF510 رابطه مستقیم و ضعیفی داشت، می‌توان بیان کرد تأثیر وابسته به سن بر ترشح ZNF510 در بزاق وجود دارد. ازاین‌رو مطالعات تکمیلی با در نظر گرفتن متغیر سن و حجم نمونه بالاتر توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، Zinc Finger Protein 510، بزاق

* **نویسنده مسئول:**
دکتر آلا قاضی
نشانی: مشهد، دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد، مرکز تحقیقات بیماری‌های دهان، فک و صورت.
تلفن: ۳۰۲۵۶۶۳ (۹۱۵) ۹۸+
رایانامه: ghazial@mums.ac.ir

مقدمه

سرطان دهان، یکی از مهم‌ترین انواع سرطان و ششمین سرطان شایع در جهان است. در سال ۲۰۱۸ حدود ۱۳۰۰ مورد جدید و ۱۵۰ هزار مرگ‌ومیر در سراسر جهان گزارش شده است [۱، ۲]. شیوع این سرطان ازنظر جغرافیایی در سراسر جهان تفاوت زیادی دارد و در مناطق مختلف جهان تا حدود ۲۰ برابر متفاوت است [۲، ۳].

شیوع سرطان دهان به‌طور قابل‌توجهی در آسیا نسبت به کشورهای صنعتی بالاتر است [۲، ۴]. شیوع این سرطان در ایران در کنار کشورهای منطقه جنوب آسیا چون هند، پاکستان و بنگلادش با شیوع ۲۰ تا ۳۶/۳ در هر ۱۰۰ هزار نفر قرار دارد [۲].

کارسینوم سلول سنگفرشی دهان[1]، شناخته‌شده‌ترین سرطان در حفره دهان است و حداقل ۹۰ درصد از تمام بدخیمی‌های دهان را شامل می‌شود [۴، ۵].

در حال حاضر تشخیص کارسینوم سلول سنگفرشی دهان براساس معاینه دهانی و بررسی‌های هیستوپاتولوژی است [۱، ۶]. بیوپسی ضایعات مشکوک روش استاندارد برای تعیین ماهیت آن‌هاست [۶، ۷]. علاوه بر ناراحتی ناشی از بیوپسی تهاجمی، ظهور غیریکنواخت ضایعات قبل از سرطان ممکن است مانع از تعیین محل بیوپسی شود که در بررسی هیستوپاتولوژیک سرطان دهانی بسیار مهم است.

بررسی هیستوپاتولوژی درجه شباهت ضایعه به اپی‌تلیوم سنگفرشی نرمال و میزان تولید کراتین را درجه‌بندی[2] می‌نامند. ضایعات با مقیاس سه‌عددی (grade I، II، III) یا چهارعددی درجه‌بندی می‌شوند. ضایعات با تمایز کمتر، اعداد بالاتر را به خود اختصاص می‌دهند [۸]. حتی با پیشرفت‌های قابل توجه در روش‌های درمان شامل جراحی، پرتودرمانی، شیمی‌درمانی یا ترکیبی از آن‌ها، بقای ۵ ساله برای سرطان دهان در حدود ۵۰ درصد است [۹، ۱۰]. هنوز روش مؤثری جهت غربالگری دقیق و آسان سرطان دهان وجود ندارد. تشخیص نشانگرهای جدید برای شناسایی ضایعات زودرس بدخیم دهانی به‌ویژه در افراد در معرض خطر ضروری است [۱۱].

در مورد سرطان دهان، بزاق، کاندیدای خوبی برای شناسایی نشانگرهاست. بزاق توسط غدد بزاقی اصلی شامل غدد پاروتید، غدد تحت فکی، غدد زیرزبانی و به میزان کمتر توسط غدد بزاقی فرعی در لب‌ها، گونه‌ها، زبان، کام و نیز توسط مجاری غدد تولید می‌شود [۱۲]. در مقایسه با نمونه خون یا بیوپسی، استفاده از بزاق برای غربالگری سرطان دهان روشی آسان‌تر و با تهاجم کمتر است. همچنین توسط بیماران راحت‌تر تحمل می‌شود [۶].

1. Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC)
2. Grading

پروتئین Zinc Finger Protein 510 (ZNF510) یک پروتئین است که در انسان توسط ژن ZNF510 کدگذاری می‌شود. پروتئین ZNF اعضای خانواده‌ای است که حاوی حدود سی اسیدآمینه و یون روی است. عملکرد پروتئین‌های ZNF در کنترل رشد، تکثیر، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول دخیل هستند. این پروتئین در بزاق بیماران دارای کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مشاهده شده است [۹].

باتوجه‌به اینکه مطابق بررسی‌های ما، تاکنون تنها یک مطالعه به بررسی سطح ZNF510 در بزاق افراد دچار کارسینوم سلول سنگفرشی دهان پرداخته است [۹، ۱۳]، مطالعه حاضر با هدف اندازه‌گیری میزان ZNF510 در بزاق افراد دارای کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و افراد سالم به‌عنوان یک نشانگر جدید برای تشخیص کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در مراحل اولیه طراحی می‌شود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش تحلیلی‌مقطعی روی افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و افراد سالم مراجعه‌کننده به بیمارستان امام رضا و امید دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد در سال ۱۳۹۸ صورت گرفت. این مطالعه بر روی بیمارانی که ابتلای آن‌ها به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان از طریق معاینه بالینی و بررسی آسیب‌شناسی تأیید شده بود و سایر معیارهای ورود به مطالعه را داشتند، انجام شد. سایر معیارهای ورود به مطالعه[3] شامل بیماران بالای ۱۸ سال، رضایت جهت شرکت در مطالعه و بیماران صلاحیت‌دار ایمنی [۹] بود. همچنین شرایط خروج افراد از مطالعه[4] شامل بیماران دچار شرایط سیستمیک مرتبط با اختلال ایمنی، وجود ضایعات مخاطی دهانی (به‌جز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان) و حاملگی یا شیردهی [۹] در نظر گرفته شد.

با در نظر گرفتن نتایج جو و همکاران [۹] و احتساب میزان اطمینان برابر ۹۵ درصد، توان آزمون معادل ۸۰ درصد و نیز سطح خطای نوع اول برابر با ۵ درصد، حجم نمونه برای هر گروه با استفاده از فرمول مقایسه دو میانگین، ۹ نفر به دست آمد که این تعداد در عمل و برای اطمینان بیشتر به ۲۱ نفر برای گروه کنترل و ۲۱ نفر برای گروه بیمار افزایش پیدا کرد.

تعداد ۲۱ بیمار مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و ۲۱ فرد سالم از همراهان بیماران انتخاب و ارزیابی شدند. در ابتدا برای افراد توضیحات کامل درخصوص این مطالعه ارائه شد. در صورت موافقت برای ورود به مطالعه، فرم رضایت‌نامه کتبی توسط آن‌ها تکمیل و امضا شد.

3. Inclusion Criteria
4. Exclusion Criteria

پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه و ورود به طرح، مشخصات فردی آن‌ها و در گروه بیمار مشخصات ضایعه (شامل شکل ضایعه، محل ضایعه و درجه هیستوپاتولوژی ضایعه) ثبت شد. سپس نمونه‌گیری بزاق از آن‌ها به عمل آمد. برای نمونه‌گیری بزاق از بزاق غیرتحریکی استفاده شد، زیرا بزاق تحریکی غلظت کمی از نشانگرهای زیستی دارد و تشخیص را دشوار می‌کند [۱۴].

به شرکت‌کنندگان توصیه شد ۲۴ ساعت قبل از جمع‌آوری بزاق از مصرف دخانیات و الکل اجتناب کنند. در روز نمونه‌گیری، بیماران از ۱ تا ۱/۵ ساعت قبل از جمع‌آوری بزاق از استعمال دخانیات، خوردن، آشامیدن یا مسواک زدن منع شدند. بزاق غیرتحریکی شرکت‌کنندگان با استفاده از روش Spitting جمع‌آوری شد [۱۵].

برای جمع‌آوری بزاق غیرتحریکی، از بیماران خواسته شد که بزاق را در دهان خود جمع و سپس آن را در یک لوله پلاستیکی استریل (Fal-con) بریزند. این کار معمولاً هر ۶۰ ثانیه و برای مدت ۵ تا ۵۱ دقیقه صورت گرفت. با این روش، حدوداً ۵ میلی‌لیتر بزاق جمع‌آوری شد. جمع‌آوری بزاق در موقعیت نشسته، کاملاً راحت و در حالتی که بیمار کمی به سمت جلو خم شده باشد، بین ساعات ۹ تا ۱۲ صبح انجام شد.

نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری در لوله آزمایش، درون فلاسک یخ به آزمایشگاه مرکزی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد منتقل شدند و حداکثر تا ۳ روز در یخچال با دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. پس از آن، نمونه‌ها در دمای اتاق دفریز شدند. نمونه‌های بزاق بلافاصله بعد از دفریز شدن، جهت جداسازی سلول‌های سنگفرشی، دبری‌ها و موکوس، به‌مدت ۱۵ دقیقه (۳۰۰۰ دور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ شدند. محلول رویی نمونه‌ها جمع‌آوری و در درون میکروتیوب ۱/۵ ریخته شد و سپس در یخچال ۸۰- درجه نگهداری شدند.

در مرحله بعدی، مقادیر ZNF 0(PPM) با استفاده از ZNF510 ELISA Kit (ZellBioGmbH، Germany) و روش ELISA ارزیابی و نتایج گزارش شد. برای این کار، هر نمونه ۲ بار توسط یک تکنسین باتجربه که هیچ اطلاعی از گروه‌بندی شرکت‌کنندگان نداشت، بررسی شد.

به‌صورت خلاصه، مراحل آزمایش شامل موارد زیر بوده است:

۱. آماده‌سازی نمونه‌ها و استانداردسازی آن‌ها،

۲. افزودن ۴۰ میکرولیتر از نمونه‌ها، ۱۰ میکرولیتر از ZNF510، ۵۰ میکرولیتر محلول استاندارد، از Streptavidin-HRP و ایجاد واکنش به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد،

۳. شست‌وشوی پلیت ۵ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر رقیق‌شده،

۴. افزودن ۵۰ میکرولیتر محلول کروموژن A و ۵۰ میکرولیتر از محلول B و انکوباسیون به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد،

۵. افزودن محلول Stop به میزان ۵۰ میکرولیتر،

۶. قرائت میزان Optical Density در عرض ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتری،

۷. انجام محاسبات و گزارش.

روش‌های آماری

برای تحلیل داده‌ها از نسخه ۲۳ نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد. برای این کار، میانگین، انحراف‌معیار و خطای معیار مقادیر غلظت 510 Zinc Finger Protein در نمونه‌های بزاق افراد سالم و افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان اندازه‌گیری و گزارش شد.

در تحلیل داده‌ها از آزمون‌های کولموگروف ـ اسمیرنف[5]، تی مستقل[6]، کای‌اسکوئر[7]، ضریب همبستگی پیرسون[8]، کروسکال والیس[9] و تحلیل کوواریانس[10] استفاده شد. سطح معناداری در آزمون‌های آماری برابر با ۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۴۲ نفر شامل ۲۹ زن (۶۹ درصد) و ۱۳ مرد (۳۱ درصد) با میانگین سنی ۱۰/۷۷±۶۰/۶۲ سال و دامنه سنی ۴۲ تا ۷۵ سال از نظر میزان 510 Zinc Finger Protein (ZNF510) و ارتباط آن با متغیرهایی همچون سن، جنس، شکل ضایعه، محل ضایعه و درجه هیستوپاتولوژی ضایعه در ۲ گروه بیماران مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و سالم بررسی شدند. توزیع جنسیت در گروه‌های موردمطالعه از نظر آماری، تفاوت معناداری با یکدیگر نداشت (P=۰/۳۱۷)، اما میانگین سن در گروه سالم به‌طور معناداری کمتر از میانگین سن در گروه بیمار بود (P>۰/۰۰۱).

در جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱، میانگین و انحراف‌معیار متغیر ZNF510 آورده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود در حالت عادی براساس آزمون تی مستقل میانگین (ZNF510 PPM) در گروه بیمار به طور معناداری بیشتر از گروه سالم بود (P=۰/۰۱۹)، اما بعد از در نظر گرفتن سن به‌عنوان متغیر مخدوشگر، با اینکه میانگین ZNF510 در گروه بیمار از گروه سالم بیشتر بود، اما این اختلاف معنادار نبود (P=۰/۰۹۰). بنابراین سن بر میزان ZNF510 تأثیرگذار است.

5. Kolmogorov-Smirnov
6. Independent t-test
7. Chi Square
8. Pearson correlation coefficient
9. Kruskal-Wallis
10. Analyze of Covariance (ANCOVA)

جدول ۱. مقایسه ZNF510 بین گروه‌های بیمار و سالم (n=۲۱)

گروه	میانگین±انحراف معیار	
	مشاهده‌شده	تعدیل‌شده
بیمار	۶۸/۳۹±۴۹/۳۲	۶۶/۳۶±۴۱/۸۴
سالم	۳۹/۷۷±۱۷/۹۸	۴۱/۸۴±۴۱/۸۰
نتیجه آزمون تی مستقل و تحلیل کوواریانس	T=۲/۵۰ P=۰/۰۱۹	F=۳/۰۲ P=۰/۰۹۰

افق دانش

جدول ۲. مقایسه ZNF510 بین انواع درجه ضایعه در گروه بیماران

درجه ضایعه	تعداد	میانگین±انحراف معیار	کمترین	بیشترین	میانه	نتیجه آزمون تی مستقل
I	۱۲	۴۸/۸۵±۲۳/۷۰	۱۲/۵۰	۸۳/۷۵	۴۵/۶۳	T=۵/۵۹ P<۰/۰۰۱
II	۳	۱۳۸/۳۳±۳۰/۰۳	۱۰۷/۵۰	۱۶۷/۵۰	۱۴۰/۰۰	

افق دانش

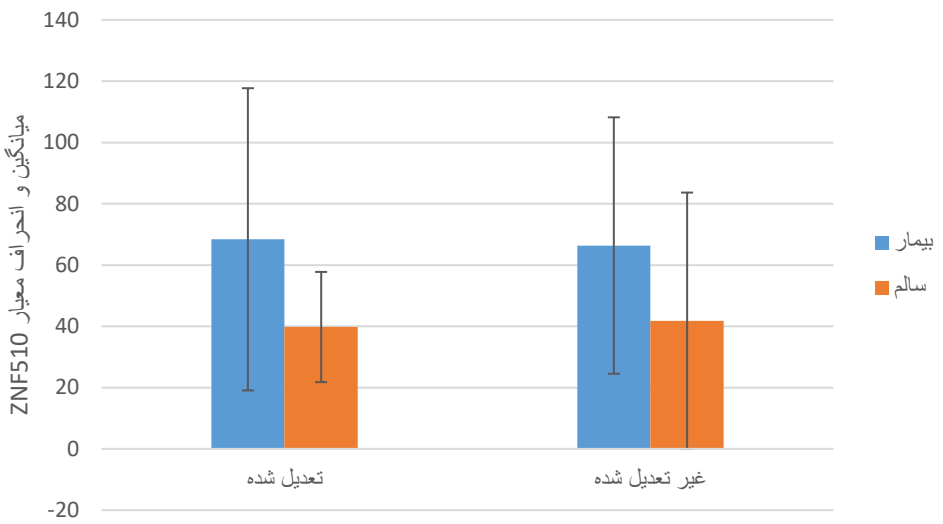
در مورد ارتباط متغیرهای سن و ZNF510، همان‌طور که در تصویر شماره ۲ مشاهده می‌شود در هر ۲ گروه بیمار و سالم، سن با ZNF510 رابطه مستقیم، ضعیف و غیرمعناداری داشت.

در این مطالعه، در گروه بیمار، میانگین ZNF510 در زنان کمتر از مردان بود، اما مقدار این اختلاف معنادار نبود (P=۰/۵۵۲). در گروه سالم، میانگین ZNF510 در زنان بیشتر از مردان بود، اما همچنان مقدار اختلاف معنادار نبود (P=۰/۶۰۶).

برحسب نمای بالینی ضایعات، کمترین و بیشترین میانگین ZNF510 به‌ترتیب مربوط به گروه‌های دچار زخم و ضایعه برجسته بود. میانگین ZNF510 بین انواع شکل‌های ضایعه اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند (P=۰/۵۲۲).

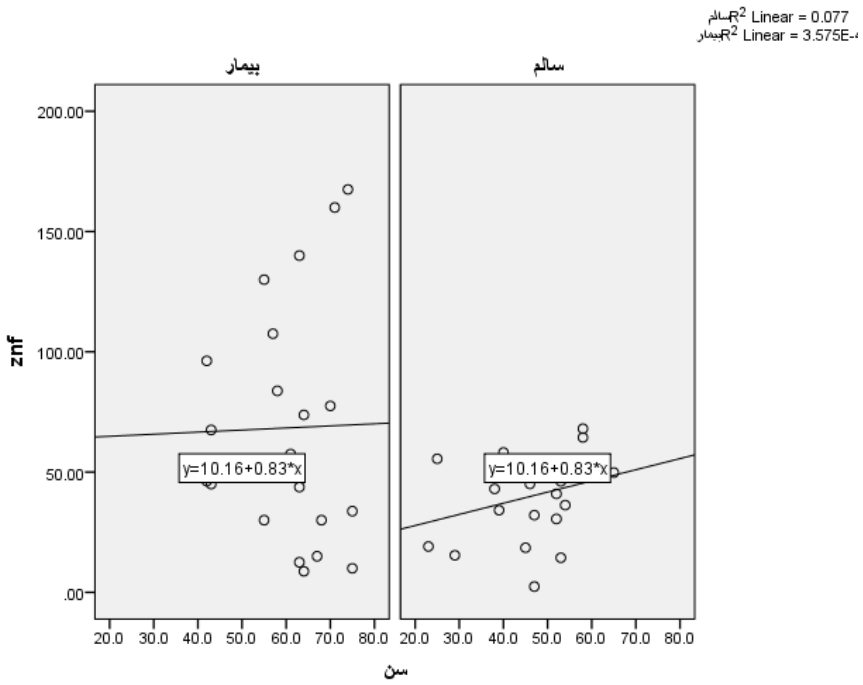
همچنین بر اساس مکان درگیری ضایعات، کمترین و بیشترین میانگین ZNF510 به‌ترتیب مربوط به محل‌های لثه و لب بود. میانگین ZNF510 بین انواع محل‌های ضایعه اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند (P=۰/۰۸۹).

در جدول شماره ۲، میانگین، انحراف‌معیار، کمترین، بیشترین و میانه متغیر ZNF510 به تفکیک انواع درجه هیستوپاتولوژی ضایعه در گروه بیماران ارائه شده است. همان‌گونه که مشاهده



افق دانش

تصویر ۱. میانگین و انحراف معیار ZNF510 در گروه‌های بیمار و سالم قبل و بعد از تعدیل متغیر سن



تصویر ۲. ارتباط بین سن با ZNF۵۱۰ به تفکیک گروه‌های بیمار و سالم

می‌شود کمترین و بیشترین مقدار ZNF510 در افرادی که ضایعه با درجه هیستوپاتولوژی I داشتند، ۱۲/۵و ۸۳/۷۵ و در افرادی که ضایعه با درجه هیستوپاتولوژی II داشتند، ۱۰۷/۵ و ۱۶۷/۵ گزارش شد. میانگین ZNF510 در افراد دچار ضایعه با درجه هیستوپاتولوژیک II به‌طور معناداری بیشتر از افراد با ضایعه درجه I بود (P>۰/۰۰۱). تعداد ۶ نفر از بیماران دچار درجه ضایعه نامشخص بودند. اطلاعات ارائه‌شده در این جدول مربوط به ۱۵ نفر از افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان است.

بحث

در مطالعه حاضر، میزان غلظت پروتئین ZNF510 در افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به‌طور معناداری بیشتر از افراد سالم بوده است. بعد از در نظر گرفتن سن به‌عنوان متغیر مخدوشگر، با اینکه میانگین ZNF510 در گروه بیمار از گروه سالم بیشتر بود، اما مقدار اختلاف معنادار نبود. در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان میانگین ZNF510 در افراد دچار ضایعه با درجه هیستوپاتولوژی II به‌طور معناداری بیشتر از افراد دچار ضایعه با درجه هیستوپاتولوژی I بود.

همچنین برحسب نمای بالینی، میزان غلظت پروتئین ZNF510 در نمای برجسته بیشتر از سایر نماها بود و براساس محل درگیری میانگین ZNF510 در بیماران دچار ضایعه در لب بیشتر از سایر بیماران گزارش شد، اما میانگین ZNF510 برحسب نمای بالینی و محل درگیری بین ۲ گروه تفاوت معناداری نداشت.

سرطان دهان، ششمین سرطان شایع در سراسر جهان است که تقریباً ۴ درصد از کل موارد سرطان را تشکیل می‌دهد [۱۶]. اگرچه حفره دهان ممکن است مستقیم معاینه شود، اما گاهی سرطان دهان تا مراحل انتهایی تشخیص داده نمی‌شود. بیوپسی و بررسی هیستوپاتولوژی تنها روش استاندارد طلایی تشخیص قطعی سرطان از جمله کارسینوم سلول سنگفرشی دهان است [۶].

هنوز روش مؤثری برای غربالگری دقیق و آسان سرطان دهان وجود ندارد. تشخیص نشانگرهای تومور جدید برای شناسایی ضایعات زودرس بدخیم دهانی به‌ویژه در افراد در معرض خطر ضروری است. اخیراً نشان داده شده است که بزاق، واسطه مهمی جهت تشخیص و ارزیابی بعضی از بیماری‌های سیستمیک به شمار می‌آید. مطالعات نشان داده‌اند که می‌توان از بزاق برای تشخیص زودرس کارسینوم سلول سنگفرشی دهان با نشانگرهایی مانند Chemerin، MMP-9 استفاده کرد [۱۲].

پروتئین‌های ZNF، یکی از گروه‌های پروتئینی هستند که دارای طیف گسترده‌ای از عملکردهای مولکولی هستند. این پروتئین‌ها در تنظیم چندین فرایند سلولی نقش دارند و عملکرد آن‌ها بسیار متفاوت است. عملکرد پروتئین‌های ZNF به نظر می‌رسد با کنترل رشد، تکثیر، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپوپتوز) مرتبط باشد [۱۷، ۱۸].

مطالعات دیگر، انواع دیگری از پروتئین‌های خانواده ZNF را در سرطان سر و گردن و سرطان سلول سنگفرشی دهان بررسی کرده‌اند [۱۹-۲۲]. مطابق بررسی‌های ما، تاکنون تنها یک مطالعه [۹] میزان پروتئین ZNF510 را در بزاق افراد دچار کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بررسی کرده است.

تحقیق حاضر با هدف اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین ZNF510 بزاقی در افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و افراد گروه کنترل سالم انجام شد.

در تحقیق جو و همکاران، مقادیر پپتیدی ZNF510 به میزان معناداری در بزاق افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان افزایش یافته بود [۹]. جو و همکاران نشان دادند که سطح ZNF510 به‌طور معناداری با مراحل سرطان دهان ارتباط دارد و در مراحل T3+T4 بیشتر از مراحل T1+T2 است. همچنین گزارش کردند که میزان حساسیت و ویژگی آن در تشخیص مرحله اولیه و پیشرفته تومور ۹۶ درصد است. آن‌ها نتیجه گرفتند شناسایی سطح پپتید ZNF510 مرتبط با پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بوده و برای تشخیص دقیق و زودهنگام مؤثر و مفید است [۹].

در این پژوهش نیز میانگین غلظت پروتئین ZNF510 در بزاق بیماران مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان با اختلاف معناداری بیشتر از افراد سالم بود. اگرچه بعد از در نظر گرفتن متغیر سن، میانگین ZNF510 در گروه آزمایش از گروه کنترل بیشتر بود، اما این اختلاف بین ۲ گروه معنادار نبود. ازآنجاکه پس از حذف سن به‌عنوان عامل مخدوشگر این اختلاف معنادار نیست، بنابراین سن بر میزان غلظت پروتئین ZNF510 بزاق مؤثر است. با افزایش سن ترکیبات بزاق ازجمله میزان پروتئین‌ها دستخوش تغییر می‌شود و تأثیر وابسته به سن بر ترشح یک ترکیب خاص در بزاق وجود دارد.

هرچند در مطالعه ما ارتباط میزان غلظت پروتئین ZNF510 با سن ضعیف و مستقیم است، اما می‌توان بیان کرد که با افزایش سن، میزان غلظت پروتئین ZNF510 بزاق نیز افزایش می‌یابد.

در این مطالعه جهت یکسان‌سازی ۲ گروه ازنظر وراثت، گروه کنترل از همراهان بیمار (خویشاوندان درجه ۱) انتخاب شدند. همچنین میانگین ZNF510 در افراد دچار ضایعه با درجه هیستوپاتولوژی II به‌طور معناداری بیشتر از افراد با ضایعه درجه I بود، بنابراین می‌توان اظهار کرد که ZNF510 موجود در بزاق ممکن است به‌عنوان یک نشانگر زیستی احتمالی جهت تشخیص اولیه و پیشرفت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نقش داشته باشد. برای تعمیم یافته‌ها نیاز به مطالعات و ارزیابی‌های بیشتر با حجم نمونه بالاتر و بررسی درجه‌های III و IV است، اما نتایج این‌مطالعه می‌تواند شروعی برای مطالعات بیشتر در زمینه روش‌های تشخیصی این بیماران باشد.

نتیجه‌گیری

میزان غلظت پروتئین ZNF510 در افراد بیمار مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به‌طور معناداری بیشتر از افراد سالم بوده است. بعد از در نظر گرفتن سن به‌عنوان متغیر مخدوشگر، با اینکه میانگین ZNF510 در گروه بیمار از گروه سالم بیشتر بود، اما این اختلاف معنادار نبود. بنابراین هرچند در این مطالعه سن با میانگین ZNF510 رابطه مستقیم و ضعیفی داشت، اما می‌توان بیان کرد که تأثیر وابسته به سن بر ترشح ZNF510 در بزاق وجود دارد. ازاین‌رو مطالعات تکمیلی با در نظر گرفتن متغیر سن و حجم نمونه بالاتر توصیه می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکترای عمومی علیرضا بیابانی رشته دندان‌پزشکی بـه شماره ۹۷۱۰۲۳ دانشکده دندان‌پزشکی مشهد است. پروتکل تحقیق در کمیته اخلاق شورای پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد (کد مصوب اخلاق: IR.MUMS.DENTISTRY.REC.1397.118) تصویب شده است.

حامی مالی

منابع مالی این پروژه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد تأمین شده است.

مشارکت نویسندگان

ایده اصلی: آلا قاضی؛ نوشتن نسخه اولیه، تأیید نهایی، بازبینی نهایی و طراحی مطالعه و گردآوری داده: همه نویسندگان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد که بی‌شک بدون حمایت‌های مالی و پشتیبانی آنان انجام این مطالعه امکان‌پذیر نبود، قدردانی می‌شود.

References

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018; 68(6):394-424. [DOI:10.3322/caac.21492] [PMID]

[2] Maleki D, Ghojazadeh M, Mahmoudi SS, Mahmoudi SM, Pournaghi-Azar F, Torab A, et al. Epidemiology of oral cancer in Iran: A systematic review. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2015; 16(13):5427-32. [DOI:10.7314/APJCP.2015.16.13.5427] [PMID]

[3] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncology. 2009; 45(4-5):309-16. [DOI:10.1016/j.oraloncology.2008.06.002] [PMID]

[4] Nasry WHS, Rodriguez-Lecompte JC, Martin CK. Role of COX-2/PGE2 mediated inflammation in oral squamous cell carcinoma. Cancers. 2018; 10(10):348. [DOI:10.3390/cancers10100348] [PMID] [PMCID]

[5] Andisheh-Tadbir A, Mehrabani D, Heydari ST. Epidemiology of squamous cell carcinoma of the oral cavity in Iran. Journal of Craniofacial Surgery. 2008; 19(6):1699-702. [DOI:10.1097/SCS.0b013e31818c04cc] [PMID]

[6] Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS, Najeeb S, Slowey PD, Rehman IU. Role of salivary biomarkers in oral cancer detection. Advances in Clinical Chemistry. 2018; 86:23-70. [DOI:10.1016/bs.acc.2018.05.002] [PMID]

[7] Feitosa SG, Viana KF, Luna ECM, Costa FWG, Cavalcante RB, Chaves FN, et al. Immunohistochemical evaluation of GLUT-3 and GLUT-4 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2018; 19(7):1779-83. [DOI:10.22034/APJCP.2018.19.7.1779]

[8] Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Tang CH, Huang SH, Tsai MH, et al. Salivary zinc finger protein 510 peptide as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma in early stages. Clinica Chimica Acta. 2011; 412(15-16):1357-65. [DOI:10.1016/j.cca.2011.04.004] [PMID]

[9] Thomson PJ. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention-proliferation, position, progression and prediction. Journal of Oral Pathology & Medicine. 2018; 47(9):803-7. [DOI:10.1111/jop.12733] [PMID]

[10] Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. Journal of the American Dental Association. 2006; 137(3):313-21. [DOI:10.14219/jada.archive.2006.0180] [PMID]

[11] Neville B, Damm DD, Allen C, Bouquot J. Oral and maxillofacial pathology.4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2016. https://books.google.com/books?id=tzc_vgAACAAJ&printsec=frontcover&dq=editions:ISBN1455770523

[12] Hema Shree K, Ramani P, Sherlin H, Sukumaran G, Jeyaraj G, Don KR, et al. Saliva as a diagnostic tool in oral squamous cell carcinoma: A systematic review with meta analysis. Pathology & Oncology Research. 2019; 25(2):447-53. [DOI:10.1007/s12253-019-00588-2] [PMID]

[13] Gualtero DF, Suarez Castillo A. Biomarkers in saliva for the detection of oral squamous cell carcinoma and their potential use for early diagnosis: A systematic review. Acta Odontologica Scandinavica. 2016; 74(3):170-7. [DOI:10.3109/00016357.2015.1110249] [PMID]

[14] Malamud D. Saliva as diagnostic fluid. BMJ. 1992; 305(6847):207-8. [DOI:10.1136/bmj.305.6847.207] [PMID] [PMCID]

[15] West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabetic Medicine. 2000; 17(3):171-80. [DOI:10.1046/j.1464-5491.2000.00259.x] [PMID]

[16] Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: Surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. International Journal of Clinical Oncology. 2014; 19(3):423-30. [DOI:10.1007/s10147-014-0689-z] [PMID]

[17] Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, et al. Zinc-finger proteins in health and disease. Cell Death Discovery. 2017; 3:17071. [DOI:10.1038/cddiscovery.2017.71] [PMID] [PMCID]

[18] Ladomery M, Dellaire G. Multifunctional zinc finger proteins in development and disease. Annals of Human Genetics. 2002; 66(Pt 5-6):331-42. [DOI:10.1017/S0003480002001215]

[19] Kurihara-Shimomura M, Sasahira T, Nakamura H, Nakashima C, Kuniyasu H, Kirita T. Zinc finger AN1-type containing 4 is a novel marker for predicting metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. Journal of Clinical Pathology. 2018; 71(5):436-41. [DOI:10.1136/jclinpath-2017-204770] [PMID]

[20] Wang H, Deng X, Zhang J, Ou Z, Mai J, Ding S, et al. Elevated expression of zinc finger protein 703 promotes cell proliferation and metastasis through PI3K/AKT/GSK-3β signalling in oral squamous cell carcinoma. Cellular Physiology and Biochemistry. 2017; 44(3):920-34. [DOI:10.1159/000485360] [PMID]

[21] Ma H, Yang F, Lian M, Wang R, Wang H, Feng L, et al. Dysregulation of zinc finger protein, X-linked (ZFX) impairs cell pro-liferation and induces apoptosis in human oral squamous cell carcinorma. Tumour Biology. 2015; 36(8):6103-12. [DOI:10.1007/s13277-015-3292-7] [PMID] [PMCID]

[22] Ko CP, Yang LC, Chen CJ, Yeh KT, Lin SH, Yang SF, et al. Expression of myeloid zinc finger 1 and the correlation to clinical aspects of oral squamous cell carcinoma. Tumour Biology. 2015; 36(9):7099-105. [DOI:10.1007/s13277-015-3419-x] [PMID]