

© Е.В. КОЧУРОВА, С.В. КОЗЛОВ, 2014

УДК 616-07:616.316-008.8-074

Е.В. Кочурова, С.В. Козлов

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СЛЮНЫ

ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Минздрава РФ, 119991, Москва

Слюна является клинически информативной биологической жидкостью, которая содержит множество биомаркеров, что делает возможным проведение многочисленных анализов для разработки способа тестирования пациента на месте, в том числе экспресс-тесты. Диагностика по слюне является новой областью более простого использования не только маркеров, но и анализаторов, что может быть полезно при диагностике заболеваний полости рта, в том числе и онкологических. Использование слюны расширяет перспективы для постановки клинического диагноза, динамики и мониторинга заболевания.

Ключевые слова: биомаркер, слюна, диагностика

E.V. Kochurova, S.V. Kozlov

THE DIAGNOSTIC POSSIBILITIES OF SALIVA

The I.M. Sechenov first Moscow medical university of Minzdrav of Russia, 119119021, Moscow, Russia

Saliva is a clinically informative biological fluid which contains multitude of bio-markers. This characteristic makes it possible to carry out numerous analyzes for developing mode to test patient in situ, express-tests included. The diagnostic by saliva is a new area of more simple application both markers and analyzers that can be useful in diagnostic of diseases of oral cavity, oncological diseases included. The using of saliva expands perspectives for making clinical diagnosis and establishment of dynamics and monitoring of disease.

Key words: bio-marker, saliva, diagnostic

Введение. До недавнего времени использование слюны в диагностических целях было затруднено, что объясняется следующим: недостаточно изучен гематосаливарный барьер, низкий уровень определения, сложность обнаружения, не всегда получаемые показатели коррелируют с таковыми в плазме крови, а также отсутствие внимания к методике сбора и хранения проб данного материала до проведения анализа. Эти проблемы были в значительной степени устранены в результате тщательного изучения физиологии слюнных желез, разработки чувствительных методов амплификации, методологии забора и обработки образцов слюны. Последние достижения в диагностике по слюне были обусловлены новыми молекулярными подходами (протеомики, геномики и транскриптомики) и метагеномными анализами.

Слюна легко собирается и хранится, идеально подходит для диагностики, так как содержит специфические растворимые биологические маркеры (биомаркеры) [1], имеет осмотическое давление и гидратацию [2]. Возрастает интерес к использованию слюны и других образцов из полости рта для диагностики системных заболеваний и болезней полости рта. Это особенно важно в ряде популяций и при обследовании детей и престарелых, при ограниченном доступе к медицинской помощи в удаленных географических районах, где забор крови невозможен. Для обоснования концепции о том, что слюварный диагностический тест предпочтительнее по сравнению с инвазивными альтернативами, достаточно напомнить об успешном использовании орального термометра, который полностью заменил своего предшественника, ректальный термометр [3, 4].

Образцы из ротовой полости, используемые для диагностики системных заболеваний, – слюна, десневая жидкость, мазок, зубной налет и испарения из полости рта. Опубликованные данные указывают также на успешное применение слюварных образцов для выявления и прогнозирования восприимчивости к системным заболеваниям [5]. Способ-

ность точно оценивать биомаркеры в образцах, полученных из полости рта, зависит от биохимического характера маркеров, определения источника, типа образца и механизма, с помощью которого маркер попадает в ротовую полость [6, 7]. В 2006 г. стали применять слюну для разработки портативных диагностических платформ для быстрого обнаружения и анализа стоматологических биомаркеров – РОС (point-of-care) [8].

Анализ слюны для экспертизы ДНК. Наиболее широко используемый вид образца из полости рта – это мазок, при исследовании которого можно получить дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) образца. Это используется многие годы в судебно-медицинских исследованиях [6, 7], а в последнее время – для анализа одиночных нуклеотидных полиморфизмов мутаций, связанных со специфическими заболеваниями [9]. За счет выделения ДНК из слюны возможно типирование АВО. К. Аки и соавт. показали, что достаточно простой и широко используемый в судебно-медицинской области метод проточной цитометрии может быть полезен для сравнения различий между экспрессией антигенов А и/или В и Н красных кровяных клеток с различным фенотипом и методом PASA для определения генотипа cisA(2)B(3) родословной [10]. Образец ДНК может быть взят из различных областей в/на теле человека, а проба слюны удобна для использования: ротовой ершик помещают в стабилизированную для транспортировки среду и отправляют в лабораторию для анализа. Генотипирование лиц с нарушением последовательности ДНК имеет коммерческий успех, однако его медицинское значение спорно и не отвечает научной точности [5].

Определение гормонов в слюне. Анализ образцов из полости рта для определения кортизола, эстриола, эстрогена, тестостерона не только является коммерчески более доступным, но и обеспечивает точное обнаружение этих гормонов [11]. Уровень стероидных гормонов (например, сульфатированные стероиды DHEA-S) достоверно определяется в слюне, а титрование отражает его уровень в плазме крови, однако эти показатели не очень точно коррелируют между собой. Данный факт свидетельствует о необходимости качественного сравнения количественного анализа биомаркеров, а для получения количественного результата, например при ана-

Для корреспонденции:

Кочурова Екатерина Владимировна, науч. сотр.

Адрес: 119991, Москва, ул. М. Трубецкая, 8

E-mail: evkochurova@mail.ru

лизе уровня глюкозы или ДНЕА-S, необходимо определять соотношение слюна/плазма [5]. G. Лас и соавт. измеряли уровень дегидроэпиандростерон-сульфата и кортизола в слюне при психопатических расстройств, связанных с буллингом на работе, у 41 пациента (группа BW) и у 28 психически здоровых людей (группа C). Образцы слюны собирали при пробуждении (7 ч утра), через 30 и 60 мин после пробуждения, а также через каждые 2 ч до 13 ч. У пациентов группы BW концентрация дегидроэпиандростерон-сульфата была более высокой, разницы в уровне кортизола не наблюдали [12].

Биомаркеры слюны для диагностики инфекционных заболеваний. Многие молекулы, полученные из слюны или десневой жидкости, используются в качестве диагностических биомаркеров заболеваний полости рта, включая состояния, вызванные грибами (*Candida*), вирусами папилломы человека (ВПЧ), вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловирусом (ЦМВ) и бактериями (несколько видов, участвующих в заболеваниях пародонта и кариесе).

Орофарингеальный кандидоз является одним из наиболее распространенных заболеваний полости рта, чаще всего вызван *Candida Albicans*, изначально был описан как псевдомембранозный, гиперпластический и эритематозный, а хроническое наличие наблюдается также на коже и слизистых оболочках [13, 14]. Недавнее исследование показало, что микрофлора слюны состоит из *Candida* – 75%, *Cladosporium* – 65%, *Aureobasidium* и *Saccharomycetales* – 50%, *Aspergillus* – 35%, *Fusarium* – 30% и *Cryptococcus* – 20% [15]. Диагноз орального кандидоза основывается на наличии культуры возбудителя в пробе или идентификации путем визуализации под микроскопом. На сегодняшний день слюна применяется в основном для выделения возбудителя, о наборе для обнаружения антигена *Candida* уже сообщалось [16]. Экспериментальные попытки были также сделаны для обнаружения слюнных IgA- или IgG-антител к *Candida* [17], но иммунодиагностика остается недостижимой из-за различия в чувствительности и специфичности различных анализов при обнаружении различных антигенов *Candida*.

Распространенными являются заболевания полости рта, вызванные ВПЧ, вирусами простого герпеса типа 1 и 2, ЦМВ, вирусом ветряной оспы (афтозный тип), вирусом герпеса человека 8. Эти вирусы более часто встречаются у пациентов с иммунодефицитом, особенно с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)/синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), не получающих высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) [18, 19]. Во многих случаях возбудитель вызванного заболевания полости рта был представлен оппортунистической или вторичной инфекцией и считался ранним проявлением СПИДа у пациентов, инфицированных ВИЧ. Частота многих связанных со СПИДом оральных проявлений меняется, но увеличивается в отсутствие ВААРТ [20], и может свидетельствовать о неадекватном лечении ВААРТ, развитие лекарственной устойчивости или о терапевтической неудаче [5]. Ученые подтвердили, что слювенный тест для выявления антител к ВИЧ так же чувствителен и специфичен, как и анализ крови [3, 4], что привело к значительному увеличению тестирования на ВИЧ в различных местах, в том числе в отделениях неотложной помощи, в клиниках при заболеваниях, передающихся половым путем, в центрах здоровья населения, в банях, а в последнее время и на установках и инструментах в стоматологических кабинетах. Возможность точного определения антител к ВИЧ говорит о возможности выявления антител и ко многим другим патогенам. По последним данным литературы, это большое число вирусных и бактериальных патогенов [21, 22]. Стандартный подход к клинической лабораторной диагностике ВИЧ – это тестирование сыворотки или плазмы крови на иммуноферментном анализаторе и при положительном результате – вестерн-блот. Слюна успешно используется в лабораторной диагностике для выявления ВИЧ-антигена и антител в различных нуклеиновых и иммунологических форматах и микрофлюидных диагностических приборах [8, 23].

Используя экспериментальные методики, обнаружили дефензины в слюне, что может быть автоматизировано [24]. Экспериментально обнаружен ВПЧ в образцах слюны с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [25], и эта методика была также использована для обнаружения различных типов ВПЧ [19], результаты были обнадеживающие, что говорит о необходимости оптимизации тестирования [26]. Отклонения ДНК при ВЭБ, обнаруженные методом ПЦР, показали в крови и слюне аналогичные результаты у ВИЧ-инфицированных пациентов [27]. Нестимулированная слюна также является надежным методом обнаружения ЦМВ [28] с помощью ПЦР в поддесневых бляшках у больных с хроническим периодонтитом [29]. Образцы слюны были успешно использованы для прямого генотипирования штаммов ЦМВ новым методом ПЦР-полиморфизма длины рестрикционных фрагментов в сочетании с капиллярным электрофорезом фрагментов для генотипирования [30].

Заключение. Слюна является клинически информативной биологической жидкостью, но необходимо дальнейшее развитие и проверка этих биомаркеров для внедрения в клиническую диагностику с целью оказания помощи в ранней диагностике рака, для оценки рисков и реагирования на терапию. Усовершенствование списка биомаркеров слюны зависит от их стабильности и точности обнаружения, включая чувствительность и воспроизводимость анализов, простоту их выполнения, высокую чувствительность и специфичность, легкое определение количества в клинической лаборатории и экономическую эффективность целостности клинико-диагностических алгоритмов. Тем не менее эти новые системы обнаружения требуют дальнейшей оптимизации и проверки до внедрения в рутинную клиническую диагностику.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Malamud D., Niedbala R.S.* Oral-based diagnostics. Boston: New York Academy of Sciences; Published by Blackwell Pub. on behalf of the New York Academy of Sciences; 2007.
2. *Santos M.T., Batista R.* et al. Salivary osmolality and hydration status in children with cerebral palsy. *J. Oral. Pathol. Med.* 2011; 40 (7): 582–6.
3. *Parisi M.R., Soldini L., Di Perri G.* et al. Offer of rapid testing and alternative biological samples as practical tools to implement HIV screening programs. *New Microbiol.* 2009; 32 (4): 391–6.
4. *White D.A., Scribner A.N., Huang J.V.* A comparison of patient acceptance of fingerstick whole blood and oral fluid rapid HIV screening in an emergency department. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2009; 52 (1): 75–8.
5. *Malamud D.* Saliva as a diagnostic fluid. *Dental Clin. North Am.* 2011; 55 (1): 159–78.
6. *Lijnen I., Willems G.* DNA research in forensic dentistry. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2001; 23 (9): 511–7.
7. *Virkler K., Lednev I.K.* Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic. Sci. Int.* 2009; 188 (1–3): 1–17.
8. *Abrams W.R., Barber C.A., McCann K.* et al. Development of a microfluidic device for detection of pathogens in oral samples using upconverting phosphor technology (UPT). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1098: 375–88.
9. *Kohnemann S., Pfeiffer H.* Application of mtDNA SNP analysis in forensic casework. *Forens. Sci. Int. Genet.* 2011; 5 (3): 216–21.
10. *Aki K., Izumi A., Hosoi E.* The evaluation of histo-blood group ABO typing by flow cytometric and PCR-amplification of specific alleles analyses and their application in clinical laboratories. *J. Med. Invest.* 2012; 59 (1–2): 143–51.
11. *Gerritsen L., Geerlings M.I., Beekman A.T.* et al. Early and late life events and salivary cortisol in older persons. *Psychol. Med.* 2009; 1–10.
12. *Lac G., Duthel F., Brousse G., Triboulet-Kelly C., Chamoug A.* *Brain Gogn.* 2012; 80 (2): 277–81.
13. *Richardson R., Antilla V.J.* Diagnosis and treatment of oral candidosis. *Duodecim.* 2010; 126 (2): 174–80.

14. *Samaranayake L.P., Keung Leung W., Jin L.* Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* – 2000. 2009; 49: 39–59.
15. *Ghannoum M.A., Jurevic R.J., Mukherjee P.K.* et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (1): e1000713.
16. *Kurita H., Kamata T., Zhao C.* et al. Usefulness of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit for *Candida* mannan antigen for detecting *Candida* in oral rinse solutions. *Oral Surg.* 2009; 107 (4): 531–4.
17. *Naglik J.R., Scott J., Rahman D.* et al. Serum and saliva antibodies do not inhibit *Candida albicans* Sap2 proteinase activity using a BSA hydrolysis assay. *Med. Mycol.* 2005; 43 (1): 73–7.
18. *Andrews E., Seaman W.T., Webster-Cyriaque J.* Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral Oncol.* 2009; 45 (6): 486–91.
19. *Andrews E., Shores C., Hayes D.N.* et al. Concurrent human papillomavirus-associated tonsillar carcinoma in 2 couples. *J. Infect Dis.* 2009; 200 (6): 882–7.
20. *Ramirez-Amador V.A., Espinosa E., Gonzalez-Ramirez I.* et al. Identification of oral candidosis, hairy leukoplakia and recurrent oral ulcers as distinct cases of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Int. J. STD AIDS.* 2009; 20 (4): 259–61.
21. *Greenberg B.L., Glick M., Frantsve-Hawley J.* et al. Dentists' attitudes toward chairside screening for medical conditions. *J. Am. Dent. Assoc.* 2010; 141 (1): 52–62.
22. *Wong D.T.* Point-of-care diagnostics for infectious diseases. In: Wong D.T., ed. *Salivary diagnostics*: Wiley-Blackwell; 2008: 243–54.
23. *Chen D., Mauk M., Qiu X.* et al. An integrated, self-contained microfluidic cassette for isolation, amplification, and detection of nucleic acids. *Biomed. Microdevices.* 2010; 12 (4): 705–19.
24. *Gardner M.S., Rowland M.D., Siu A.Y.* et al. Comprehensive defensin assay for saliva. *Anal. Chem.* 2009; 81 (2): 557–66.
25. *Adamopoulou M., Vairaktaris E., Panis V.* et al. HPV detection rate in saliva may depend on the immune system efficiency. *In Vivo.* 2008; 22 (5): 599–602.
26. *Cameron J.E., Snowwhite I.V., Chaturvedi A.K.* et al. Human papillomavirus-specific antibody status in oral fluids modestly reflects serum status in human immunodeficiency virus-positive individuals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10 (3): 431–8.
27. *Idesawa M., Sugano N., Ikeda K.* et al. Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004; 19 (4): 230–2.
28. *Yamamoto A.Y., Mussi-Pinhata M.M., Marin L.J.* et al. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J. Clin. Virol.* 2006; 36 (3): 228–30.
29. *Imbronito A.V., Grande S.R., Freitas N.M.* et al. Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. *J. Oral Sci.* 2008; 50 (1): 25–31.
30. *Grosjean J., Hantz S., Cotin S.* et al. Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples. *J. Clin. Virol.* 2009; 46 (4): 43–8.
7. *Virkler K., Lednev I.K.* Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic. Sci. Int.* 2009; 188 (1–3): 1–17.
8. *Abrams W.R., Barber C.A., McCann K.* et al. Development of a microfluidic device for detection of pathogens in oral samples using upconverting phosphor technology (UPT). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1098: 375–88.
9. *Kohnemann S., Pfeiffer H.* Application of mtDNA SNP analysis in forensic casework. *Forens. Sci. Int. Genet.* 2011; 5 (3): 216–21.
10. *Aki K., Izumi A., Hosoi E.* The evaluation of histo-blood group ABO typing by flow cytometric and PCR-amplification of specific alleles analyses and their application in clinical laboratories. *J. Med. Invest.* 2012; 59 (1–2): 143–51.
11. *Gerritsen L., Geerlings M.I., Beekman A.T.* et al. Early and late life events and salivary cortisol in older persons. *Psychol. Med.* 2009: 1–10.
12. *Lac G., Dutheil F., Brousse G., Triboulet-Kelly C., Chamoux A.* *Brain Cogn.* 2012; 80 (2): 277–81.
13. *Richardson R., Antilla V.J.* Diagnosis and treatment of oral candidosis. *Duodecim.* 2010; 126 (2): 174–80.
14. *Samaranayake L.P., Keung Leung W., Jin L.* Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* – 2000. 2009; 49: 39–59.
15. *Ghannoum M.A., Jurevic R.J., Mukherjee P.K.* et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (1): e1000713.
16. *Kurita H., Kamata T., Zhao C.* et al. Usefulness of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit for *Candida* mannan antigen for detecting *Candida* in oral rinse solutions. *Oral Surg.* 2009; 107 (4): 531–4.
17. *Naglik J.R., Scott J., Rahman D.* et al. Serum and saliva antibodies do not inhibit *Candida albicans* Sap2 proteinase activity using a BSA hydrolysis assay. *Med. Mycol.* 2005; 43 (1): 73–7.
18. *Andrews E., Seaman W.T., Webster-Cyriaque J.* Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral Oncol.* 2009; 45 (6): 486–91.
19. *Andrews E., Shores C., Hayes D.N.* et al. Concurrent human papillomavirus-associated tonsillar carcinoma in 2 couples. *J. Infect Dis.* 2009; 200 (6): 882–7.
20. *Ramirez-Amador V.A., Espinosa E., Gonzalez-Ramirez I.* et al. Identification of oral candidosis, hairy leukoplakia and recurrent oral ulcers as distinct cases of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Int. J. STD AIDS.* 2009; 20 (4): 259–61.
21. *Greenberg B.L., Glick M., Frantsve-Hawley J.* et al. Dentists' attitudes toward chairside screening for medical conditions. *J. Am. Dent. Assoc.* 2010; 141 (1): 52–62.
22. *Wong D.T.* Point-of-care diagnostics for infectious diseases. In: Wong D.T., ed. *Salivary diagnostics*: Wiley-Blackwell; 2008: 243–54.
23. *Chen D., Mauk M., Qiu X.* et al. An integrated, self-contained microfluidic cassette for isolation, amplification, and detection of nucleic acids. *Biomed. Microdevices.* 2010; 12 (4): 705–19.
24. *Gardner M.S., Rowland M.D., Siu A.Y.* et al. Comprehensive defensin assay for saliva. *Anal. Chem.* 2009; 81 (2): 557–66.
25. *Adamopoulou M., Vairaktaris E., Panis V.* et al. HPV detection rate in saliva may depend on the immune system efficiency. *In Vivo.* 2008; 22 (5): 599–602.
26. *Cameron J.E., Snowwhite I.V., Chaturvedi A.K.* et al. Human papillomavirus-specific antibody status in oral fluids modestly reflects serum status in human immunodeficiency virus-positive individuals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10 (3): 431–8.
27. *Idesawa M., Sugano N., Ikeda K.* et al. Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004; 19 (4): 230–2.
28. *Yamamoto A.Y., Mussi-Pinhata M.M., Marin L.J.* et al. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J. Clin. Virol.* 2006; 36 (3): 228–30.
29. *Imbronito A.V., Grande S.R., Freitas N.M.* et al. Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. *J. Oral Sci.* 2008; 50 (1): 25–31.
30. *Grosjean J., Hantz S., Cotin S.* et al. Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples. *J. Clin. Virol.* 2009; 46 (4): 43–8.

REFERENCES