

Диагностическая значимость исследования ротовой жидкости в онкологии

В.Н. Николенко, С.В. Козлов, Е.В. Кочурова

ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

Контакты: Екатерина Владимировна Кочурова evkochurova@mail.ru

Заболеваемость населения России злокачественными новообразованиями (ЗН) челюстно-лицевой области увеличивается каждый год на 1,53 %. Прирост за период с 2000 по 2010 г. составляет 16,39 %. Высокий уровень заболеваемости актуализирует проблему ранней диагностики. В этом плане определение биомаркеров в слюне является новым подходом к проблеме диагностики ЗН полости рта, стадий развития, включая начальный процесс, распространение, рецидив и лечение.

Ключевые слова: ротовая жидкость, онкология, новообразования челюстно-лицевой области

Diagnostic abilities of the oral fluid in oncology

V.N. Nikolenko, S.V. Kozlov, E.V. Kochurova

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia

The incidence of the population of Russia malignant tumors of maxillofacial region increase every year by 1.53%. Increase of morbidity for the period from 2000 to 2010 is 16.39%. A high level of prevalence can be included to the problem of early diagnosis. Detection of biomarkers in saliva has emerged as a novel approach for the diagnosis of malignant tumors of the oral cavity and its developmental stages including, initial process, invasion, recurrence and treatment.

Key words: salivary fluid, oncology, maxillofacial region

Введение

Несмотря на то, что знания о профилактике и лечении злокачественных новообразований (ЗН) существенно пополняются с каждым годом, число новых случаев также продолжает увеличиваться [1]. В России с начала третьего тысячелетия ежегодно регистрируется более 450 000 новых случаев ЗН. Так, в 2010 г. выявлено 516 874 новых случая (женщины — 54 %, мужчины — 46 %); абсолютное число впервые в жизни установленных диагнозов ЗН составило: полости рта у мужчин — 5251, у женщин — 2106; губы: у мужчин — 2469, у женщин — 887. Средний возраст заболевших 50–60 лет. Ежегодная динамика заболеваемости с 2000 по 2010 г. составила 1,53 %. Прирост заболеваемости за последние 10 лет — 16,39 % [2]. По статистическому прогнозу США, около 40 250 новых случаев рака полости рта будут диагностированы в 2012 г. и, по оценкам экспертов, 7850 человек умрут от этой болезни [3].

Выживаемость пациента при обнаружении рака на ранней стадии составляет от 80 до 90 %. Несмотря на раннюю диагностику и большие успехи в лечении, Всемирная организация здравоохранения констатирует, что рак полости рта имеет один из самых высоких уровней смертности по сравнению с другими ЗН, а также 45 % смертности за 5 лет с момента постановки диагноза [4]. Такой высокий уровень заболеваемости

связывают с проблемой ранней диагностики [5], для решения которой необходимы национальная программа скрининга и наличие удовлетворяющих биологических маркеров раннего выявления рака [6–8], в том числе челюстно-лицевой области. Отсутствие маркеров приводит к диагностике рака на поздней стадии [9].

Влияние биомаркеров на диагностику новообразования

Поиск биомаркеров при различных ЗН продолжается уже в течение нескольких десятилетий. После обнаружения биомаркеров в плазме крови стал естественным поиск этих же маркеров в слюне. Возможность выявления специфических маркеров, которые имеют более ранние признаки, в частности для злокачественных опухолей, таких как рак яичников и рак поджелудочной железы, имеет огромное влияние на выживаемость. Мутации опухолевых супрессоров p53 были впервые описаны при аденоме слюнной железы в 1992 г. [10], затем в экспериментальном исследовании слюны у пациентов с раком молочной железы [11]. Впоследствии появились сообщения о повышенном уровне антигена рака, CA15-3 и онкогена c-erbB2 у женщин с раком молочной железы по сравнению с контрольной группой [11–14]. D.X. Chen et al. выявили опухолевый маркер CA-125 в слюне пациентов со злокачественными опухолями яичников [15]. Другие исследования

показали подавление опухолевых супрессоров DMBT1 при опухоли молочных желез у мышей [16] и человека [17]. L. Zhang et al. определили 4 биомаркера мРНК, которые отличают больных раком поджелудочной железы от больных панкреатитом и группы контроля [18]. Предполагается повышение усилий для обобщения и распространения данных результатов для различных солидных опухолей с целью разработки раннего диагностического профиля [19].

Нуклеиновые кислоты и белки, связанные с раковыми клетками, были обнаружены в плазме/сыворотке крови [20–22], моче [23, 24], слюне [25, 26], бронхоальвеолярной [20], спинномозговой [27] и других жидкостях тела человека. Эти нуклеиновые кислоты и белки используются в качестве молекулярных маркеров для ранней диагностики заболевания [26, 28, 29], маркеров рецидивирования [30], прогнозирования выживаемости, метастазирования [31, 32] и предопределения терапевтического подхода [33, 34].

Плоскоклеточный рак полости рта является наиболее распространенным ЗН среди онкологических заболеваний челюстно-лицевой области, на которые приходится более 90 % клинических случаев, а рейтинг входит в десятку во всем мире [35]. Рак слюнных желез, миндалин и придаточных пазух носа насчитывается в меньших количествах [36]. Это связано с факторами риска, включая табак, алкоголь, возбудителями инфекции в полости рта, факторами окружающей среды и плохой гигиеной полости рта [37].

Диагностика злокачественных образований челюстно-лицевой области

Клинический диагноз рака полости рта основывается на визуальной оценке и пальпации [38, 39], а затем на результатах биопсии и гистопатологической оценки [40, 41]. Эта клиническая оценка была расширена за счет использования магнитно-резонансной томографии и компьютерной томографии [36]; окрашивания толудиновым синим [42–44], светового метода обнаружения [45], хемилюминесценции [46, 47] и флуоресценции [48].

Применение слюны для диагностики системных заболеваний получило мощный толчок в 2002 г. в результате финансирования программы Национального института стоматологических и черепно-лицевых исследований (NIDCR) Development and Validation Technologies for Saliva Based Diagnostics (Разработка и апробация технологий для диагностики на основе слюны). Целью программы является создание совместных научно-исследовательских групп, включающих инженеров с навыками в области нанотехнологий и микрофлюидных методов и ученых, занимающихся изучением биологии полости рта, для разработки портативных РОС (Point-of-Care – диагностика у постели больного) диагностических платформ для быстрого обнаружения и анализа стоматологических биомаркеров [49].

Относительно недавно определение биомаркеров в слюне стало новым подходом к диагностике ЗН полости рта, этапов развития, включая начальный процесс, распространение, рецидив и лечение: онкогены (C-myc, c-Fos, C-Jun), анти-онкогены (p53, p16), цитокины (TGF- β 1, IL-8, и IL-1 β), факторы роста (VEGF, EGF и IGF), матриксные металлопротеиназы (ММП), подавляющие внеклеточный матрикс (ММП-1, ММП-2, ММП-9), маркеры гипоксии (HIF- α , CA-9), маркеры эпителиально-мезенхимального перехода (например, E-кадгерин, N-кадгерин и β -катенин), факторы эпителиальной опухоли (CYFRA 21-1), цитокератины (CK13, 14 и 16), микро-РНК молекулы и гиперметилирование генов, связанных с раком (p16 и DAP-K) [50–57].

Уровень биомаркеров ММП-8 и ММП-9 был повышен у пациентов с прогрессирующим периодонтитом, что было очевидно при оценке различных сочетаний биомаркеров полости рта (например, ММП-8 и -9 и остеопротегерин) вместе с красным комплексом анаэробных патогенов пародонта (*Porphyromonas gingivalis* или *Treponema denticola*). Тяжесть заболевания также была предсказана при получении повышенных уровней в слюне ММП-8 и биопленки *T. denticola*. Этот подход доказал целесообразность мониторинга слюнных биомаркеров и реакции организма на болезни полости рта. Также исследования ведутся для применения этого подхода к длительному прогнозированию активности заболевания [58]. Ранее аналогичный РОС диагностический подход был разработан в качестве портативного микрофлюидного устройства, состоящего из чипов на основе иммуноанализа для выявления биомаркеров заболеваний пародонта в слюне [59]. S. Kakoei et al. исследовали ксеростомию у 63 больных и ее эффект на качество жизни у больных раком головы и шеи после лучевой терапии. Нестимулированную слюну собирали в начале лечения, через 2, 4 и 6 нед и через 6 мес после окончания лечения. Результаты показали, что качество жизни ухудшилось по прошествии времени ($p = 0,0001$), ксеростомия усугубилась ($p = 0,0001$), но количественного изменения объема слюны не наблюдали ($p = 0,23$) [60].

Выводы

Благодаря возможности получить аналогичную или идентичную информацию из образцов, взятых из полости рта, которые легко собрать и которые не требуют инвазивных процедур, в заборе крови пропадает необходимость. Диагностика по слюне является динамично развивающимся направлением медицины и превратилась в междисциплинарную науку, составляя большую часть области молекулярной диагностики [19].

Эти биомаркеры были определены с использованием молекулярного, транскриптомного, геномного и фенотипического методов, протеомики, метаболо-

мики. Необходимо дальнейшее развитие и проверка этих биомаркеров для реализации в клинической диагностике с целью оказания помощи в ранней диагностике ЗН, оценки рисков и ответа на проведенное лечение. Усовершенствование списка биомаркеров ротовой жидкости зависит от их стабильности, точно-

сти обнаружения, включая чувствительность и воспроизводимость анализов в клинической лаборатории, легкость их выполнения, высокую специфичность для определения заболевания и стадии его развития и экономическую эффективность целостности клинко-диагностических алгоритмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Petersen P.E. Strengthening the prevention of oral cancer: the WHO perspective. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33(6):397–9.
2. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012.
3. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2012.
4. Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D.M. GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Version 1.0. Lyon: IARC Press, 2001.
5. Peacock Z.S., Pogrel M.A., Schmidt B.L. Exploring the reasons for delay in treatment of oral cancer. *J Am Dent Assoc* 2008;139(10):1346–52.
6. Schantz S.P. Biologic markers, cellular differentiation, and metastatic head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993;250(8):424–8.
7. Schantz S.P. Carcinogenesis, markers, staging, and prognosis of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 1993;5(3):483–90.
8. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(3):210–9.
9. Ellison M.D., Campbell B.H. Screening for cancers of the head and neck: addressing the problem. *Surg Oncol Clin N Am* 1999;8(4):725–34.
10. Azuma M., Kasai Y., Tamatani T., Sato M. Involvement of p53 mutation in the development of human salivary gland pleomorphic adenomas. *Cancer Lett* 1992;65(1):61–71.
11. Streckfus C., Bigler L., Tucci M., Thigpen J.T. A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women with breast carcinoma. *Cancer Invest* 2000;18(2):101–9.
12. Corstjens PLAMMD. Point-of-care Diagnostics for infectious diseases. In: Wong D.T., editor. *Saliva Diagnostics*. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. Pp. 243–254.
13. Farnaud S.J., Kostis O., Getting S.J., Renshaw D. Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease. *Scientific World Journal* 2010;10:434–56.
14. Streckfus C., Bigler L. The use of soluble, salivary c-erbB-2 for the detection and post-operative follow-up of breast cancer in women: the results of a five-year translational research study. *Adv Dent Res* 2005;18(1):17–24.
15. Chen D.X., Schwartz P.E., Li F.Q. Saliva and serum CA 125 assays for detecting malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 1990;75(4):701–4.
16. Blackburn A.C., Hill L.Z., Roberts A.L. et al. Genetic mapping in mice identifies DMBT1 as a candidate modifier of mammary tumors and breast cancer risk. *Am J Pathol* 2007;170(6):2030–41.
17. Braidotti P., Nuciforo P.G., Mollenhauer J. et al. DMBT1 expression is down-regulated in breast cancer. *BMC Cancer* 2004;4:46.
18. Zhang L., Hynson B.S., Camargo P.M., Wong D.T. The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2009;51:25–37.
19. Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am* 2011;55(1):159–78.
20. Schmidt B., Engel E., Carstensen T. et al. Quantification of free RNA in serum and bronchial lavage: a new diagnostic tool in lung cancer detection? *Lung Cancer* 2005;48(1):145–7.
21. Kopreski M.S., Benko F.A., Gocke C.D. Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:172–8.
22. Hasselmann D.O., Rappl G., Rössler M. et al. Detection of tumor-associated circulating mRNA in serum, plasma and blood cells from patients with disseminated malignant melanoma. *Oncol Rep* 2001;8(1):115–8.
23. Bryzgunova O.E., Skvortsova T.E., Kolesnikova E.V. et al. Isolation and comparative study of cell-free nucleic acids from human urine. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:334–40.
24. Yoneda K., Iida H., Endo H. et al. Identification of Cystatin SN as a novel tumor marker for colorectal cancer. *Int J Oncol* 2009;35(1):33–40.
25. St. John M., Li Y., Zhou X. et al. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130(8):929–35.
26. Li Y., St. John M.A., Zhou X. et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8442–50.
27. De Bont J.M., van Doorn J., Reddingius R.E. et al. Various components of the insulin-like growth factor system in tumour tissue, cerebrospinal fluid and peripheral blood of pediatric medulloblastoma and ependymoma patients. *Int J Cancer* 2008;123(3):594–600.
28. Johnson P.J., Lo Y.M. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem* 2002;48(8):1186–93.
29. Neves A.F., Araújo T.G., Biase W.K. et al. Combined analysis of multiple mRNA markers by RT-PCR assay for prostate cancer diagnosis. *Clin Biochem* 2008;41(14–15):1191–8.
30. Honma H., Kanda T., Ito H. et al. Squamous cell carcinoma-antigen messenger RNA level in peripheral blood predicts recurrence after resection in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery* 2006;139(5):678–85.
31. El-Abd E., El-Tahan R., Fahmy L. et al. Serum metastasin mRNA is an important survival predictor in breast cancer. *Br J Biomed Sci* 2008;65(2):90–4.
32. Voorzanger-Rousselot N., Goehrig D., Journe F. et al. Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases. *Br J Cancer* 2007;97(7):964–70.
33. Siddiqua A., Chendil D., Rowland R. et al. Increased expression of PSA mRNA during brachytherapy in peripheral blood of patients with prostate cancer. *Urology* 2002;60(2):270–5.
34. Ogawa O., Iinuma M., Sato K. et al. Circulating prostate-specific antigen mRNA during radical prostatectomy in patients with localized prostate cancer: with special reference to neoadjuvant hormonal therapy. *Urol Res* 1999;27(4):291–6.
35. Zheng M., Li L., Tang Y.L. et al. Biomarkers in tongue cancer: understanding the molecular basis and their clinical implications. *Postgrad Med J* 2010;86(1015):292–8.
36. Petersen P.E. Oral cancer prevention and control – the approach of the World Health

- Organization. *Oral Oncol* 2009;45(4–5): 454–60.
37. Meurman J.H. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. *Oral Oncol* 2010;46(6):411–3.
38. Fedele S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. *Head Neck Oncol* 2009 Jan 30;1:5.
39. Zakzerwska J.M., Hindle I., Speight P.M. Practical considerations for the establishment of an oral cancer screening programme. *Commun Dent Health* 1993;10(1):79–85.
40. Christian D.C. Computer-assisted analysis of oral brush biopsies at an oral cancer screening program. *J Am Dent Assoc* 2002;133(3):357–62.
41. Mehrotra R., Hullmann M., Smeets R. et al. Oral cytology revisited. *J Oral Pathol Med* 2009;38(2):161–6.
42. Güneri P., Epstein J.B., Ergün S., Boyacıoğlu H. Toluidine blue color perception in identification of oral mucosal lesions. *Clin Oral Investig* 2011;15(3):337–45.
43. Onofre M.A., Spoto M.R., Navarro C.M. Reliability of toluidine application in the detection of oral epithelial dysplasia and in situ and invasive squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(5):535–40.
44. Zhang L., Williams M., Poh C.F. et al. Toluidine blue staining identifies high-risk primary oral premalignant lesions with poor outcome. *Cancer Res* 2005;65(17):8017–21.
45. Seoane Leston J., Diz Dios P. Diagnostic clinical aids in oral cancer. *Oral Oncol* 2010;46(6):418–22.
46. Kerr A.R., Sirois D.A., Epstein J.B. Clinical evaluation of chemiluminescent lighting: an adjunct for oral mucosal examinations. *J Clin Dent* 2006;17(3):59–63.
47. Epstein J.B., Silverman S. Jr, Epstein J.D. et al. Analysis of oral lesion biopsies identified and evaluated by visual examination, chemiluminescence and toluidine blue. *Oral Oncol* 2008;44(6):538–44.
48. Onizawa K., Saginoya H., Furuya Y., Yoshida H. Fluorescence photography as a diagnostic method for oral cancer. *Cancer Lett* 1996(1);108:61–6.
49. Floriano P.N., Christodoulides N., Miller C.S. et al. Use of saliva-based nano-biochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: a feasibility study. *Clin Chem* 2009;55(8):1530–8.
50. Zimmermann B.G., Park N.J., Wong D.T. Genomic targets in saliva. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:184–91.
51. Xie H., Onsongo G., Popko J. et al. Proteomics analysis of cells in whole saliva from oral cancer patients via value-added three-dimensional peptide fractionation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2008;7(3):486–98.
52. Williams M.D. Integration of biomarkers including molecular targeted therapies in head and neck cancer. *Head Neck Pathol* 2010;4(1):62–9.
53. Sugimoto M., Wong D.T., Hirayama A. et al. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2010;6(1):78–95.
54. Lee J.M., Garon E., Wong D.T. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res* 2009;12(3):206–11.
55. Hu S., Arellano M., Boonthueung P. et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res* 2008;14(19):6246–52.
56. Bigler L.R., Streckfus C.F., Dubinsky W.P. Salivary biomarkers for the detection of malignant tumors that are remote from the oral cavity. *Clin Lab Med* 2009;29(1):71–85.
57. Bilodeau E., Alawi F., Costello B.J., Prasad J.L. Molecular diagnostics for head and neck pathology. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2010;22(1):183–94.
58. Ramseier C.A., Kinney J.S., Herr A.E. et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol* 2009;80(3):436–46.
59. Herr A.E., Hatch A.V., Giannobile W.V. et al. Integrated microfluidic platform for oral diagnostics. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:362–74.
60. Kakoei S., Haghdoust A.A., Rad M. et al. Xerostomia after radiotherapy and its effect on quality of life in head and neck cancer patients. *Arch Iran Med* 2012;15(4):214–8.