

EWA GANOWICZ

Wykorzystanie śliny w diagnostyce chorób jamy ustnej

Salivary Diagnostics – Diseases of the Oral Cavity

Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia, Instytut Stomatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Łatwe i nieinwazyjne pobieranie sprawia, że ślina jest płynem biologicznym, który może znaleźć zastosowanie w diagnostyce chorób, monitorowaniu ich postępu i leczenia oraz wykrywaniu obecności substancji niedozwolonych w organizmie człowieka. W tym celu ocenia się m.in. obecność i stężenie białek, kwasów nukleinowych, leków i ich metabolitów, wirusów, bakterii, przeciwciał, hormonów, enzymów i in. Dla stomatologa najważniejsza jest możliwość diagnozowania chorób nowotworowych oraz zapalenia przyzębia. Wczesne rozpoznanie ma zawsze istotne znaczenie dla możliwości terapeutycznych i przeżywalności pacjentów z chorobami nowotworowymi. Zidentyfikowano wiele biomarkerów obecnych w ślinie pozwalających na badania przesiewowe pod kątem raka jamy ustnej, takich jak: DNA HPV16, CEA, przeciwciała przeciwko p53, HNP 1–3 i in. W przypadku zapalenia przyzębia można wykrywać biomarkery typowe dla 3 procesów charakterystycznych dla tej choroby: reakcji zapalnej, degradacji tkanki łącznej i remodelingu kości. Procesy te nie są patognomoniczne dla zapalenia przyzębia, ale jednoczesna obecność biomarkerów należących do wszystkich trzech grup pozwala identyfikować pacjentów dotkniętych zapaleniem przyzębia bez czasochłonnego badania sondą periodontologiczną (**Dent. Med. Probl. 2011, 48, 3, 421–430**).

Słowa kluczowe: ślina, diagnostyka, badania przesiewowe, biomarkery, zapalenie przyzębia, rak jamy ustnej.

Abstract

Human saliva can be collected in an easy and non-invasive way. Thus it is a very promising body fluid for use in diagnosing of disease, monitoring of general health or treatment and performing drug tests. The biomarkers present in saliva comprise proteins, nucleic acids, drugs and their metabolites, viruses, bacteria, immunoglobulins, hormones, enzymes etc. For dentists the two most interesting areas of salivary diagnostics are oral cancer and periodontitis. Early diagnosis is always of utmost importance for therapeutic benefit and survival of cancer patients. A whole range of salivary biomarkers of oral squamous cell carcinoma (OSCC) were identified, including HPV16 DNA, CEA, anti-p53 Ig, HNP 1–3 etc. In patients suffering from periodontitis three groups of biomarkers were identified. Each group conforms to one of the characteristic processes leading to periodontal disease: inflammation, connective tissue destruction and bone remodelling. None of these biomarkers is pathognomonic of periodontitis, yet the concomitant assessment can assure high sensitivity and specificity of salivary diagnosis of periodontal disease (**Dent. Med. Probl. 2011, 48, 3, 421–430**).

Key words: saliva, diagnosis, screening, biomarkers, periodontal disease, oral cancer.

Współczesne metody diagnostyczne odmieniły oblicze medycyny. Lekarz nie musi polegać wyłącznie na tym, co usłyszy, zobaczy lub zbada palpacyjnie, ale ma do dyspozycji wiele badań laboratoryjnych i obrazowych, ułatwiających postawienie rozpoznania i różnicowanie chorób. Badania biochemiczne wymagają pobrania próbki tkanek lub płynu ustrojowego, w którym występują poszukiwane biomarkery. Najbardziej uniwersalnym materiałem jest krew, w zależności

od potrzeb wykorzystuje się także płyn mózgowo-rdzeniowy, moczu i pot, a także ślinę [1].

Ślina jest jednym z najłatwiej dostępnych płynów ustrojowych. Można ją pobrać w całości nieinwazyjny sposób, również wielokrotnie od tego samego pacjenta. Ułatwia to np. powtarzanie badania kilkakrotnie w ciągu dnia w celu określenia zmian dobowych lub średnich wartości dobowych stężenia określonych biomarkerów. Możliwość nieinwazyjnego, wielokrotnego badania doskona-

le wpisuje się w obecny nurt zindywidualizowanego leczenia, zależnego od sytuacji konkretnego pacjenta, w tym jego profilu genetycznego, a nie tylko od przyjętych zunifikowanych schematów. Brak konieczności pobierania krwi może skłonić do badań przesiewowych pacjentów, którzy boją się wkłucia, a nie odczuwają żadnych dolegliwości (lub je lekceważą). Znacznie ułatwia także przeprowadzenie badań u dzieci oraz u chorych z zaburzeniami krzepnięcia [2]. Pobieranie śliny jest mniej kłopotliwe i krępujące dla pacjenta niż pobieranie i przekazywanie do badania próbki moczu. Ślina jest też łatwiejsza w przechowywaniu, transporcie i obróbce, ponieważ w przeciwieństwie do krwi nie krzepnie. Pobieranie śliny nie naraża pracowników opieki zdrowotnej na zakażenie wirusem HIV lub wirusami zapalenia wątroby [3]. W przypadku niektórych chorób wykorzystanie śliny może pozwolić uniknąć narażenia pacjenta na działanie promieniowania jonizującego, z jakim są związane inne metody diagnostyczne. Nie dziwi więc to, że coraz częściej ślina jest wykorzystywana w badaniach diagnostycznych [4].

W ślinie można znaleźć wiele mało- i wielocząsteczkowych związków obecnych w surowicy krwi. Nad ich identyfikacją pracują m.in. grupy badaczy kierowane i finansowane przez National Institute of Dental & Craniofacial Research (NIDCR) [5]. Wynik pracy tych grup to opublikowana w 2008 r. lista *Human Salivary Proteome* zawierała 1166 białek obecnych w ślinie zdrowych osób [3]. Badania śliny wymagają jednak opracowywania specjalnych metod o bardzo wysokiej czułości, ponieważ stężenia niezwiązanej, bioaktywnej frakcji wymienionych biomarkerów w ślinie są zwykle znacznie niższe niż ich całkowite stężenie we krwi.

Przenikanie jonów, związków wielocząsteczkowych i elementów komórkowych do śliny następuje w kilku różnych mechanizmach, które determinują rodzaj substancji możliwych do oznaczania w ślinie [3]. Dotychczas poznano następujące mechanizmy przechodzenia substancji do przewodów ślinianek [6]:

- filtracja przez pory w błonach komórkowych – wyłącznie najmniejsze cząsteczki o masie < 400 Da (woda, elektrolity);
- przechodzenie przez przestrzenie między komórkami pęcherzyka surowiczego ślinianki – wyłącznie cząsteczki o stosunkowo małej masie < 1900 Da, np. woda, elektrolity, hormony steroidowe;
- selektywny transport przez błony komórkowe:
 - bierna dyfuzja cząsteczek lipofilnych, np. hormonów steroidowych;
 - aktywny transport przez kanały białkowe, np. peptydy;

- pinocytoza – przenikanie przez błonę komórkową w postaci wakuoli, powstałej z fragmentu tej błony; np. większe białka, takie jak enzymy;
- kanały jonowe, aktywnie pompujące określone jony (K^+ , Na^+);
- egzocytoza z wykorzystaniem egzosomów (m.in. białka, mRNA, wirusy, np. HIV, priony [6]).

Od mechanizmu przenikania danej substancji do śliny zależy jej przydatność w diagnostyce. Jeśli stężenie substancji w ślinie jest znacznie mniejsze niż we krwi, jej identyfikacja i precyzyjne monitorowanie będzie znacznie utrudnione. Dla niektórych biomarkerów stężenie w ślinie jest nawet większe niż we krwi. Należą do nich m.in. IL-1 β , IL-6, troponina-I czy TNF- α [1]. Jest również pewna grupa substancji, dla których stosunek stężenia w ślinie i we krwi jest zmienny i zależy od różnych parametrów wpływających na aktywny transport tych substancji. Najbardziej przydatne w diagnostyce są te związki, których stężenie w ślinie i we krwi jest zbliżone [7]. Nowoczesne metody jednak pozwalają na wykrywanie bardzo małych stężeń lub wręcz pojedynczych cząsteczek, co można wykorzystać w badaniach jakościowych w kierunku zakażenia (wirusy HIV, HAV, HBV i HCV, swoiste przeciwciała) oraz substancji uzależniających (narkotyki, alkohol, tytoń) [3].

W diagnostyce wykorzystuje się głównie ślinę niestymulowaną, ponieważ ślina stymulowana ma często zmienione pH (stymulacja chemiczna z wykorzystaniem kwasu cytrynowego), a także ma większą zawartość wody, co oznacza mniejsze stężenie poszukiwanych substancji [1, 8]. Dlatego też ślinę stymulowaną wykorzystuje się zasadniczo tylko u pacjentów ze sialopenią [3].

Zazwyczaj ślinę pobiera się przez jej bierne spływanie do naczynia. Można także stosować waciki, które nasąca się śliną, takie jak Salivette®. Stosując rozwiązania takie jak Salivette, należy jednak wziąć pod uwagę, że niektóre biomarkery (m.in. hormony) są wiązane przez podłoże, prowadząc do uzyskania wyników fałszywie ujemnych [9, 10].

Należy także pamiętać, że w celu uzyskania czystej wydzieliny gruczołów ślinowych (zawierającej produkty pochodzące z krwiobiegu oraz produkty wydzielnicze ślinianek) należy ją pobierać bezpośrednio z przewodów wyprowadzających ślinianek. W innych przypadkach pobrany materiał zawiera nie tylko wydzielinę tych gruczołów, ale także płyn dziąsłowy, przesięk z powierzchni błony śluzowej, wysięk zapalny, złuszczone komórki, bakterie i resztki pokarmowe [1, 11]. Interpretując wyniki badania śliny, zwłaszcza w przypadku substancji, których stężenie we krwi jest wielokrotnie większe, należy zawsze brać pod uwagę

możliwość skażenia śliny krwią pacjenta. W celu zminimalizowania stopnia zanieczyszczenia pacjent powinien przed pobraniem śliny starannie oczyścić jamę ustną i dokładnie wypłukać ją wodą [12]. Czystość próbki można potwierdzić po wirowaniu, oceniając pod mikroskopem obecność komórek, drobnoustrojów lub resztek pokarmowych [13].

Nowe technologie w badaniach śliny

Pierwsze powstające urządzenia do badania śliny były możliwe do wykorzystania tylko w laboratoriach specjalistycznych. Wynikało z tego, że wymagały zasilania prądem o wysokim napięciu w celu wymuszenia przepływu elektrokinetycznego, stosowania pomp i mechanicznych wirników [14]. Aby w jeszcze większym stopniu wykorzystać potencjał, jaki kryje w sobie ślina, opracowuje się przenośne urządzenia, pozwalające na wykonanie analiz w dowolnym miejscu, bez użycia dodatkowego specjalistycznego sprzętu i bez konieczności dodawania odczynników [1, 15]. Idealnym miejscem wykorzystania takich systemów byłyby gabinety stomatologiczne, gdzie na podstawie wywiadu i/lub obrazu klinicznego lekarz dentysta mógłby sugerować pacjentowi przeprowadzenie badań przesiewowych w kierunku różnego rodzaju chorób, dotyczących nie tylko jamy ustnej. Należy pamiętać bowiem, że dla wielu pacjentów dentysta jest lekarzem pierwszego kontaktu, przynajmniej do czasu, kiedy nasilone dolegliwości każą im szukać specjalisty z innej dziedziny.

Przykładowe tego typu urządzenie, wykorzystujące technologię nanobiochipów, jest wyposażone w wiele mikrodołków w silikonowej matrycy, wypełnionych różnymi reagentami. W ten sposób tworzy się cyfrowy „odcisk palca”, gdzie każdy punkt odczytu odpowiada innej cząsteczce lub atomowi. Odczynniki są wysuszone i ulegają reaktywacji pod wpływem roztworu nanoszonego w chwili badania. Oprócz tego biochip zawiera także dołki kalibrujące oraz dołki stanowiące kontrolę negatywną. Bardziej zaawansowane urządzenia dodatkowo separują komórki, bakterie i ich przetrwalniki. Do przeprowadzenia badania wystarczy zaledwie 100–300 μ l śliny, całe badanie trwa 5–15 min. Chip ma wbudowany pojemnik na odpady, do którego trafia po badaniu materiał biologiczny, tak że można go po użyciu w całości wyrzucić [1].

Od 2002 r. dzięki pomocy National Institute of Dental & Craniofacial Research (NIDCR) trwają prace nad opracowaniem i wdrożeniem do komercyjnych zastosowań systemów do diagnostyki śli-

ny, opartych m.in. na mikroprzepływach i systemach mikroelektryczno-mechanicznych (MEMS) oraz nanoelektryczno-mechanicznych (NEMS) [3, 5]. Wspierane przez NIDCR prototypy służą m.in. do pomiaru obecności DNA, produktów transkrypcji genowej (mRNA), białek, elektrolitów i substancji drobnocząsteczkowych, w tym także do oceny ogólnego profilu w kierunku określonej choroby, np. chorób układu sercowo-naczyniowego. Wszystkie te badania są wykonywane w czasie rzeczywistym. Technologie NEMS pozwalają wykrywać najmniejsze ilości biomarkerów, wręcz pojedyncze cząsteczki [3].

Jedno z powstających przenośnych urządzeń to Oral Fluid NanoSensor Test[®] (OFNASET). Można wykorzystywać różne metody analizy (w tym określanie stężenia różnego rodzaju białek i kwasów nukleinowych) do oznaczania łącznego ryzyka raka jamy ustnej u danego pacjenta. Zgodnie z prognozami prototyp urządzenia będzie gotowy około 2012 r. [3].

Badania wykazują, że jednoczesna ocena występowania kilku biomarkerów zapewnia znacznie większą czułość i swoistość niż zbadanie tylko jednego markera, minimalizując liczbę wyników fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich [16]. Możliwa jest jednoczesna ocena biomarkerów różnych typów, np. białek, kwasów nukleinowych i innych, mniejszych cząsteczek. Przykładowo opracowano platformę CARDIUS, służącą do szybkiej diagnostyki przypadków zatrzymania akcji serca i zawierającą 4 wysoko swoiste przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko mioglobinie, białku C-reaktywnemu, mieloperoksydazie i IL-1 β [1].

Większość współcześnie opracowywanych systemów do mikrobiagnostyki wykorzystuje techniki immunologiczne – wysoko swoiste przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko poszukiwanym cząsteczkom [14], stosowane w kanapkowej technice ELISA. Alternatywną metodą o porównywalnej przydatności jest użycie sensorów elektrochemicznych [16]. Wszystkie te techniki wymagają jednak kolejnego dodawania nowych odczynników i usuwania ich niezwiązanych/niewykorzystanych pozostałości, co stanowi wyzwanie w przypadku gotowych chipów do niemal bezobsługowego użycia poza laboratorium [14].

Odpowiedź na ten problem może stanowić urządzenie opisane przez Hosokawę et al. [17]. Jest to mikrochip do badań immunologicznych, działający bez zasilania zewnętrznego. Odczynniki są stopniowo uwalniane dzięki działaniu sił kapilarnych. Na potrzeby analizy DNA urządzenie można rozbudować o pompy elektrochemiczne [18]. Inne, jednorazowe i ekonomiczne kasety do wykorzystania poza laboratorium, oparte na zastosowaniu sprężyn i sterowane niedrogim ręcznym

timerem wielokrotnego użytku, stworzyli Liu et al. [14]. Timer nie ma kontaktu z materiałem biologicznym i może być niezwłocznie używany do analizy kolejnych próbek. Aby uaktywnić kasety, wystarczy usunąć aluminiową folię, co powoduje domknięcie obwodu transportu materiałów.

Dla lekarza stomatologa najważniejsze jest zastosowanie śliny w diagnostyce i monitorowaniu leczenia chorób jamy ustnej – przede wszystkim chorób nowotworowych i chorób przyzębia. Celem pracy jest przedstawienie współczesnego stanu wiedzy w tej dziedzinie.

Diagnostyka raka jamy ustnej

W przypadku chorób nowotworowych odpowiednio wczesne rozpoznanie ma podstawowe znaczenie dla rokowania i możliwości terapeutycznych. Pięcioletnia przeżywalność pacjentów z rakiem kółczystokomórkowym jamy ustnej wynosi średnio 50%. Może jednak się zwiększyć do 80%, jeśli choroba zostanie rozpoznana na bardzo wczesnym etapie [19]. Metaplazję nowotworową można rozpoznać za pomocą badania histopatologicznego. Jest ono jednak inwazyjne, stosunkowo kosztowne, a przede wszystkim niechętnie akceptowane przez pacjentów, zwłaszcza gdy zmiany przednowotworowe utrzymują się latami i byłoby wskazane okresowe powtarzanie badania. W przypadku zmian rozległych lub mnogich pewną trudność może stanowić też dobór miejsca pobrania materiału, ponieważ stopień dysplazji nie zawsze koreluje z makroskopowym wyglądem zmian [19]. To wszystko sprawia, że zastosowanie śliny w diagnostyce raka jamy ustnej jest przedmiotem intensywnych badań [15].

Wybrane biomarkery, które mogą okazać się przydatne w diagnostyce raka jamy ustnej i okolic przedstawiono w tabeli 1.

Podobnie jak w wielu innych przypadkach, największą czułość i swoistość w diagnostyce raka jamy ustnej można uzyskać, oceniając jednocześnie kilka biomarkerów. Na przykład badanie w kierunku biomarkerów mRNA, będących transkryptami genów *IL8*, *IL1B*, *DUSP1*, *HA3*, *OAZ1*, *S100P* i *SAT*, pozwala wykrywać raka jamy ustnej z czułością 0,91 i swoistością 0,91 [29]. Inną kombinacją biomarkerów, zapewniającą dużą czułość i swoistość diagnostyki raka jamy ustnej, jest połączenie 2 biomarkerów białkowych (tiodoksyny i IL-8) oraz 4 biomarkerów mRNA (*SAT*, *ODZ*, *IL8* i *IL1B*) [31].

Najważniejszym predyktorem przeżycia pacjentów chorych na raka kółczystokomórkowego

jamy ustnej (OSCC) jest zajęcie węzłów chłonnych. Identyfikacja chorych z przerzutami do węzłów chłonnych pozwoliłaby na podjęcie właściwych decyzji terapeutycznych bez zbędnej zwłoki. Jednym z takich markerów oznaczanych w ślinie może być tetranektyna, której stężenie jest wyraźnie mniejsze u pacjentów z przerzutami w porównaniu z chorymi na OSCC bez przerzutów do węzłów chłonnych [32].

Stężenie niektórych substancji w ślinie może także być pomocne w identyfikacji osób należących do grupy podwyższonego ryzyka nowotworów złośliwych. Takim biomarkerem jest naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), wykazujący działanie modulujące wzrost komórek nowotworowych. Jego stężenie w ślinie jest mniejsze u osób dotkniętych kółczystokomórkowym rakiem jamy ustnej [33].

Ważnym aspektem we wczesnej diagnostyce raka jamy ustnej jest również możliwość odróżnienia stanów przednowotworowych od wczesnych zmian nowotworowych. Takimi markerami mogą być aktyna i miozyna, których stężenie w ślinie jest znacznie większe u osób, u których doszło do metaplazji nowotworowej [19].

Nie wszystkie markery sprawdzające się w badaniach krwi nadają się również do wykorzystania w badaniach śliny. Na przykład receptory dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, Her-1) oraz Her-2 wykazują w raku kółczystokomórkowym jamy ustnej (OSCC) nadekspresję w surowicy wynoszącą do 58%, ich stężenie jednak w ślinie nie różni się w porównaniu z osobami zdrowymi [33].

Diagnostyka chorób przyzębia

Podejmowane są także próby wykorzystania badania śliny w diagnostyce chorób przyzębia. Diagnostyka kliniczna zapalenia przyzębia jest metodą sprawdzoną i skuteczną, jest jednak czasochłonna i wykrywa dopiero bardziej zaawansowane zmiany. Ponadto jednorazowe badanie, zarówno kliniczne, jak i radiologiczne, świadczy raczej o dotychczasowym przebiegu choroby niż o aktualnym stopniu nasilenia stanu zapalnego i przewidywanym rokowaniu [1].

Początkowo diagnostykę stanu przyzębia poszerzano o badanie płynu dziąsłowego, pobieranego za pomocą papierowych sączków z kieszonek przyzębnych [34]. Technika ta jest jednak bardzo czasochłonna, kosztowna i wymagająca technicznie, niezbędne jest posiadanie urządzeń kalibrujących i mierzących objętość próbki. Sączki łatwo zanieczyścić krwią, śliną lub płytką nazębną. Ta metoda zasadniczo nie pozwala na ocenę przy fotelu pacjenta [1].

Tabela 1. Wybrane biomarkery i ich potencjalne znaczenie w diagnostyce raka jamy ustnej, głowy i szyi**Table 1.** Selected biomarkers and their importance for head and neck cancer

Biomarker (Biomarker)	Źródło (Data source)	Przydatność diagnostyczna (Diagnostic utility)	Ograniczenia (Limitations)
DNA wirusa HPV 16 (HPV 16 DNA)	Zhao 2005 [20], Smith 2004 [21]	zakażenie wirusem HPV16 występuje u około 50% chorych na raka kółczystokomórkowego głowy i szyi	mała czułość badania śliny (30,4%), mimo dużej swoistości (98,3%), mniejsza przydatność u palaczy (większy odsetek zachorowań niezależnych od zakażeń HPV)
CEA (antygen nowotworowy) CA-50 Carcinoembryonic antigen	He 2009 [22]	istotnie większe stężenie w przypadkach nowotworów złośliwych jamy ustnej i ślinianek w porównaniu z nowotworami łagodnymi i osobami zdrowymi, większa czułość badania śliny w porównaniu z surowicą	
Przeciwciała przeciwko p53 (Anti-p53)	Warnakulasuriya 2000 [23]	przeciwciała obecne w ślinie towarzyszą przeciwciałom w surowicy	przeciwciała w surowicy obecne tylko u 27% pacjentów chorych na raka głowy i szyi
HNP 1 (defensyna 1) (Defensin 1)	Mizukawa 1998 [24]	małe stężenie w ślinie osób zdrowych, podwyższone u pacjentów z rakiem kółczystokomórkowym jamy ustnej (OSCC), stężenie się zmniejsza po chirurgicznym usunięciu nowotworu (z 12,3 do 6,5 µg/ml)	podwyższone stężenie w ślinie także w przebiegu zapalenia przyzębia oraz nienowotworowych chorób błony śluzowej jamy ustnej
Telomeraza (Telomerase)	Zhong 2005 [25]	aktywność telomerazy koreluje z obecnością raka kółczystokomórkowego jamy ustnej (wynik dodatni w 75% OSCC oraz u 6,67% osób zdrowych)	brak różnic w ekspresji telomerazy między wczesnym i zaawansowanym stadium choroby oraz między pacjentami z przerzutami do węzłów chłonnych i bez takich przerzutów
Cytokeratyna 19 (mRNA) oraz jej rozpuszczalny fragment, Cyfra 21-1 (Cytokeratin 19 mRNA and its soluble fragment, Cyfra 21-1)	Zhong 2007 [26]	podwyższone stężenie w ślinie w przebiegu raka kółczystokomórkowego jamy ustnej (Cyfra 21-1: 85,95 ± 78,00 µg/ml vs 42,27 ± 40,84 µg/ml). Cyfra 21-1 jest także markerem późnych nawrotów raka (130,95 ± 66,38 µg/ml). mRNA dla CK19 ponad 2-krotnie podwyższone w przypadkach raka w porównaniu ze stanami przedrakowymi	
Rozpuszczalna frakcja CD44 (Soluble CD44 fraction)	Franzmann 2007 [27]	z dużą swoistością różnicuje między rakiem głowy i szyi a łagodnymi zmianami w obrębie górnego odcinka przewodu pokarmowego	samo badanie w kierunku solCD44 wykazuje małą czułość (zwłaszcza gdy ognisko raka lub przerzutu jest położone dalej od jamy ustnej); można to skorygować, badając dodatkowo stopień metylacji genu dla CD44
Tioredoksyna (Thioredoxin)	Hu 2007 [28]	stężenie ok. 3-krotnie większe u pacjentów chorych na raka jamy ustnej w porównaniu z grupą kontrolną (p < 0,01, czułość i swoistość równa 70,8%)	
IL-8 oraz mRNA IL8 (IL-8 and IL8 mRNA)	Li 2004 [29], St John M.A. 2004 [30]	większe stężenie IL-8 w ślinie osób chorych na raka jamy ustnej (czułość 86%, swoistość 97%); 24-krotny wzrost ekspresji mRNA IL8 w raku kółczystokomórkowym jamy ustnej (czułość 88%, swoistość 81%)	bardzo dużą czułość i swoistość (czułość 99%, swoistość 90%) można uzyskać, łącząc analizę IL-8 w ślinie z badaniem IL-6 w surowicy

Ślina jest dużo łatwiejsza do pobrania w większych ilościach, co znacznie ułatwia zdobycie materiału do badań. Należy jednak pamiętać, że badanie śliny ma nieco inną wartość diagnostyczną. Pozwala na ocenę ogólnego stopnia dotknięcia pacjenta chorobą, nie zaś na precyzyjne diagnozowanie sytuacji w poszczególnych

kieszonkach, co może być zarówno zaletą, jak i wadą [1].

Ślina zawiera wiele biomarkerów związanych z zapaleniem przyzębia. Można je podzielić w zależności od fazy choroby, dla której są charakterystyczne fazy zapalenia, fazy degradacji tkanki łącznej i fazy przebudowy kości.

Biomarkery stanu zapalnego

Przewlekły stan zapalny tkanek przyzębia prowadzi do zwiększenia stężenia markerów zapalenia w płynie dziąsłowym i ślinie. Są to m.in. [1]:

- β -glukoronidaza, zwiększone stężenie β -glukoronidazy w ślinie koreluje z liczbą kieszonek o głębokości powyżej 5 mm [35],

- białko C-reaktywne (CRP), jest to białko ostrej fazy, którego stężenie w ślinie jest kilkanaście razy większe u chorych z zapaleniem przyzębia w porównaniu z osobami o zdrowym przyzębiu i zachowanych zębach [36, 37],

- Il-1 β – cytokina prozapalna, indukująca m.in. ekspresję cyklooksygenaz i metaloproteinaz oraz resorpcję kości, zwiększone stężenie Il-1 β w ślinie koreluje z różnego rodzaju wskaźnikami stanu przyzębia, takimi jak: krwawienie podczas zgłębnikowania, poziom przyczepu łącznotkankowego, obecność głębokich kieszonek przyzębnych i ogólny stopień zaawansowania przewlekłego zapalenia przyzębia [38]. Zwiększone stężenie Il-1 β w ślinie obserwowano także w przebiegu agresywnego zapalenia przyzębia [39],

- Il-6 – cytokina ta indukuje ekspresję białek ostrej fazy, wzrost i różnicowanie limfocytów B i T oraz aktywację osteoklastów. Wyniki badań nie są jednak jednoznaczne co do przydatności Il-6 w diagnostyce chorób przyzębia [40, 41],

- MIP-1 α (białko zapalne makrofagów 1 α), jest to chemokina wydzielana przez komórki zapalne, związana z adhezją i migracją komórek, stymuluje dojrzewanie osteoklastów i jest charakterystyczna dla agresywnego zapalenia przyzębia. U osób dotkniętych tą chorobą jej stężenie w ślinie było zwiększone w porównaniu z grupą kontrolną [39], nie zaobserwowano natomiast takiej różnicy w przypadku przewlekłego zapalenia przyzębia [38],

- TNF- α (czynnik martwicy nowotworów α) to cytokina prozapalna i regulująca przebieg stanu zapalnego, związana także z resorpcją kości. Wywiera działanie stymulujące Il-1 i GM-CSF, hamujące syntezę kolagenu oraz indukujące działanie kolagenazy i różnicowanie osteoklastów. Jej stężenie w ślinie jest stosunkowo małe i trudne do wykrycia, koreluje jednak z obecnością zapalenia przyzębia, w tym z krwawieniem podczas zgłębnikowania, liczbą głębokich kieszonek i zębów dotkniętych utratą przyczepu łącznotkankowego [41, 42],

- α -defensyny (HNP 1–3) to substancje obecne w ślinie, o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym, wytwarzane przez komórki nabłonka. Ich stężenie w ślinie jest istotnie statystycznie większe u pacjentów z umiarkowanym i ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia

w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie defensyn w surowicy nie zależy od występowania zapalenia przyzębia [43]. Stężenie HNP-1 w ślinie jest zwiększone także w przebiegu chorób błony śluzowej jamy ustnej, takich jak liszaj płaski i afty przewlekłe nawracające [44],

- markery oksydacji, takie jak aldehyd dimalonowy (MDA), 8-hydroksydeзокsyguanozyna (8-OHdG), witamina C i E [45, 46], ich stężenie w ślinie może świadczyć nie tylko o stanie przyzębia, ale również o ryzyku rozwoju raka w obrębie zmian przednowotworowych, takich jak leukoplakia. U pacjentów z zapaleniem przyzębia dochodzi do zaburzenia równowagi między działaniem reaktywnych pochodnych tlenu (ROS) a aktywnością antyoksydantów w ślinie i płynie dziąsłowym [46]. Większemu nasileniu zapalenia przyzębia towarzyszą m.in. zmniejszenie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej śliny [47] oraz zwiększenie stężenia 8-OHdG, będącego markerem tlenowym uszkodzenia DNA [48].

Biomarkery degradacji tkanki łącznej

Degradacja tkanki łącznej jest skutkiem niszczenia matrycy międzykomórkowej pod wpływem proteinaz. Jednym z czynników determinujących postęp przewlekłego zapalenia przyzębia jest prawdopodobnie zaburzenie równowagi między proteinazami i ich inhibitorami. Biomarkerami ślinowymi stanu tego układu są m.in. [1]:

- metaloproteinazy 8 i 9 (MMP-8, MMP-9), są to enzymy proteolityczne, degradujące kolagenową matrycę międzykomórkową i biorące udział w gojeniu tkanek. Szczególnie stężenie MMP-8 silnie koreluje z występowaniem aktywnej klinicznie choroby przyzębia, ponieważ w tkankach podtrzymujących zęby przeważa degradowany przez nią kolagen typu I i III [49]. Zwiększone stężenie metaloproteinaz w ślinie obserwuje się zarówno w przewlekłym, jak i agresywnym zapaleniu przyzębia [50, 51]. Poziom tej kolagenazy koreluje z głębokością kieszonek przyzębnych [52]. Stężenie MMP-8 zmniejszało się po leczeniu mechanicznym zapalenia przyzębia, a także po zastosowaniu doksycykliny [53]. Wydaje się więc, że ten enzym można także wykorzystać w monitorowaniu skuteczności terapii,

- tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP) regulują aktywność enzymów MMP. Zaburzenie równowagi między nimi może prowadzić do degradacji macierzy łącznotkankowej. Stężenie TIMP-1 w ślinie zwiększa się po leczeniu mechanicznym w połączeniu z doksycykliną [53],

– α 2-makroglobulina – inaktywująca wiele proteinaz, w tym metaloproteinazy. Wyniki badań dotyczących jej stężenia w ślinie nie są jednak spójne. Pederson et al. [37] stwierdzili pozytywną korelację między stopniem zaawansowania zapalenia przyzębia a stężeniem α 2-makroglobuliny. Tymczasem Rao et al. [54] opisują zmniejszone stężenie α 2-makroglobuliny w ślinie u osób dotkniętych przewlekłym zapaleniem przyzębia. Zdaniem Millera et al. [38] taki wynik wskazuje na brak równowagi między proteinazami i ich inhibitorami, co może wiązać się z występowaniem zapalenia dziąseł i przewlekłego zapalenia przyzębia,

– aminotransferazy (AST, ALT) to enzymy cytoplazmatyczne, które w praktyce klinicznej wykorzystuje się jako wskaźnik rozpadu komórek. Są obecne w ślinie w stężeniu większym nawet niż w surowicy. W przebiegu chorób przyzębia ich stężenie się zwiększa wskutek martwicy komórek [38, 55]. Szczególnie stężenie AST koreluje z natężeniem choroby, występowaniem krwawienia z dziąseł oraz wysięku ropnego. Stężenie aminotransferaz ślinowych zmniejsza się natomiast po leczeniu zapalenia przyzębia [56],

– katepsyna i elastaza neutrofilowa – enzymy związane ze stanem zapalnym i niszczeniem tkanki łącznej. Ich stężenie w ślinie jest zwiększone u osób z zapaleniem przyzębia [37]. Stężenie elastazy szybko się zmniejsza po osiągnięciu klinicznej poprawy stanu przyzębia [57].

Biomarkery przebudowy kości

Przebudowa kości występuje okresowo w przebiegu choroby przyzębia, dlatego biomarkery tych procesów nie są stale obecne w ślinie, a ich wykrycie może wymagać wielokrotnego powtarzania badania. Utrudnia to również prowadzenie badań naukowych i znacznie podnosi koszty takiej diagnostyki. Bardziej przewidywalne jest wykrycie tych biomarkerów u osób dotkniętych agresywnym zapaleniem przyzębia. Rozpoznane dotychczas i wykrywalne w ślinie biomarkery wzmoczonej przebudowy kości to m.in. [1]:

– fosfataza alkaliczna (ALP), jest to nieswoisty enzym hydrolityczny, związany z procesami wapnienia i remodelingu kości. Jego stężenie w ślinie jest znacząco większe w przebiegu zapalenia przyzębia w porównaniu z osobami zdrowymi lub z zapaleniem dziąseł [58],

– C-końcowe produkty degradacji kolagenu typu I (β CTX i ICTP) to markery resorpcji kości. W ślinie są zwykle obecne w stężeniach niepozwalających na ich wykrycie, niektórzy badacze natomiast stwierdzili ich mierzalne stężenia u osób dotkniętych chorobą przyzębia [42],

– ligand receptora aktywującego jądrocy czynnik NF- κ B (RANKL), indukujący różnicowanie osteoklastów. Rozpuszczalna postać RANKL może być trudna do wykrycia w ślinie (ze względu na degradację oraz wiązanie z osteoprotegeryną), choć opisywano zwiększenie jej stężenia u osób z nieleczonym zapaleniem przyzębia [42],

– osteoprotegeryna (OPG) wiąże się z RANKL i w ten sposób hamuje jego działanie, dzięki temu ma zapobiegać resorpcji kości [59]. Dane dotyczące jej stężenia u osób z chorobą przyzębia nie są jednak jednoznaczne – niektórzy autorzy opisują korelację między stężeniem OPG a głębokością kieszonek, utratą przyczepu i krwawieniem podczas zglębniowania [1]. Inni stwierdzili większe stężenie w fazie podtrzymującej leczenia w porównaniu z nieleczonymi osobami z zapaleniem przyzębia [60],

– osteokalcyna i osteonektyna. Osteokalcyna jest wydzielana przez osteoblasty i reguluje powstawanie kryształów hydroksyapatytu podczas tworzenia i mineralizacji matrycy kości. Osteonektyna uczestniczy w remodelingu kości, biorąc udział w interakcjach między komórkami i macierzą. Ich stężenie wykazuje odwrotną korelację z utratą kości u pacjentów z zapaleniem przyzębia [40, 41, 46],

– czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) to cytokina pochodzenia nabłonkowego i kostnego, pełniąc różnorodne funkcje – m.in. stymuluje naciekanie macierzy tkanki łącznej oraz reguluje angiogenezę, regenerację tkanek i aktywację osteoklastów. Opisywano zwiększone stężenia HGF u osób z zapaleniem przyzębia [40].

Żaden z wymienionych biomarkerów nie jest swoisty dla zapalenia przyzębia. W szczególności białko CRP jest uniwersalnym wskaźnikiem toczącego się stanu zapalnego i jego stężenie w ślinie, podobnie jak w surowicy, zwiększa się w przebiegu zapaleń różnych narządów. Dlatego w diagnostyce klinicznej jest wskazane wykorzystanie biomarkerów z kilku grup w celu zwiększenia swoistości badania i wykluczenia innych przyczyn nieprawidłowości w obrazie śliny. Stosowano np. jednoczesną ocenę stężenia MMP-8 i Il-1 β . Łączne uwzględnienie tych 2 wskaźników daje 4-krotnie większą skuteczność w rozpoznawaniu pacjentów dotkniętych zapaleniem przyzębia [42]. Pozytywna wartość prognostyczna z zastosowaniem tylko jednego markera wynosiła nieco ponad 90%, a użycie obu biomarkerów dawało wartość 96% [1].

Na zakończenie należy wspomnieć o aspekcie, na jaki zwracają uwagę Vernillo i Wolpe [49]. Zauważają oni, że każda próbka pobierana od pacjenta niesie ze sobą ryzyko nadużyć, chociażby badań genetycznych, których wynik mógłby być

przyczynkiem do naruszenia prywatności i dyskryminacji genetycznej. Kwestie te są już w znacznym stopniu uregulowane w odniesieniu do badań z krwi. Wobec trwających intensywnych badań

nad powszechnym wykorzystaniem w diagnostyce śliny wydaje się, że należałoby zapewnić także ochronę praw pacjenta, które mogłyby zostać naruszone z wykorzystaniem próbek śliny.

Piśmiennictwo

- [1] MILLER C.S., FOLEY J.D., BAILEY A.L., CAMPBELL C.L., HUMPHRIES R.L., CHRISTODOULIDES N., FLORIANO P.N., SIMMONS G., BHAGWANDIN B., JACOBSON J.W., REDDING S.W., EBERSOLE J.L., MCDEVITT J.T.: Current developments in salivary diagnostics. *Biomark. Med.* 2010, 4, 171–189.
- [2] POLONI T.R., OLIVEIRA A.S., ALFONSO H.L., GALVAO L.R., AMARILLA A.A., POLONI D.F., FIGUEIREDO L.T., AQUINO V.H.: Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Viol. J.* 2010, 7, 22–25.
- [3] LEE J., GARON E., WONG D.: Salivary diagnostics. *Orthod. Craniofac. Res.* 2009, 12, 206–211.
- [4] AI J., SMITH B., WONG D.T.: Saliva ontology: an ontology-based framework for salivaomics knowledge base. *BMC Bioinform.* 2010, 11, 302–309.
- [5] WONG D.T.: Saliva – the body’s mirror. *Dimen. Dent. Hyg.* 2006, 4, 14–17.
- [6] PALANISAMY V., SHARMA S., DESHPANDE A., ZHOU H., GIMZEWSKI J., WONG D.T.: Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS ONE* 2010, 5, e8577.
- [7] HAECKEL R., HÄNECKE P.: Application of saliva for drug monitoring. An *in vivo* model for transmembrane transport. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996, 34, 171–191.
- [8] JACH M., GOŃDA M., LISIECKA K., BOBER J., MOKRZYCKA M., KUCZAK M.: Wykorzystanie wybranych badań fizykochemicznych śliny w diagnostyce stomatologicznej – na podstawie piśmiennictwa. *Czas. Stomatol.* 2008, 61, 353–358.
- [9] WHETZEL C.A., KLEIN L.C.: Measuring DHEA-S in saliva: time of day differences and positive correlations between two different types of collection methods. *BMC Res. Notes* 2010, 3, 204–208.
- [10] KOZAKI T., LEE S., NISHIMURA T., KATSUURA T., YASUKOUCHI A.: Effects of saliva collection using cotton swabs on melatonin enzyme immunoassay. *J. Circadian Rhythms* 2011, 9, 1–4.
- [11] PINK R., SIMEK J., VONDRAKOWA J., FABER E., MICHL P., PAZDERA J., INDRAK K.: Saliva as a diagnostic medium. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009, 153, 103–110.
- [12] LEE Y.H., WONG D.T.: Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am. J. Dent.* 2009, 22, 241–248.
- [13] SIVAKUMAR T., HAND A.R., MEDNIEKS M.: Secretory proteins in the saliva of children. *J. Oral. Sci.* 2009, 51, 573–580.
- [14] LIU C., QIU X., ONAGNA S., CHEN D., CHEN Z., ABRAMS W.R., MALAMUD D., CORSTJENS P.L.A.M., BAU H.H.: A timer-actuated, immunoassay cassette for detecting molecular markers in oral fluids. *Lab. Chip* 2009, 9, 768–776.
- [15] RUSLING J.F., KUMAR C.V., GUTKIND J.S., PATEL V.: Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. *Analyst* 2010, 135, 2496–2511.
- [16] WEI F., PATEL P., LIAO W., CHAUDHRY K., ZHANG L., ARELLANO-GARCIA M., HU S., ELASHOFF D., ZHOU H., SHUKLA S., SHAH F., HO C.M., WONG D.T.: Electrochemical sensor for multiplex biomarkers detection. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15, 4446–4452.
- [17] HOSOKAWA K., OMATA M., SATO K., MAEDA M.: Power-free sequential injection for microchip immunoassay toward point-of-care testing. *Lab. Chip* 2006, 6, 236–241.
- [18] LIU R.H., MUNRO S.B., NGUYEN T., SIUDA T., SUCIU D., BIZAK M., SŁOTA M., FUJI H.S., DANLEY D., MCSHEA A.: Integrated microfluidic custom array device for bacterial genotyping and identification. *J. Assoc. Lab. Autom.* 2006, 11, 360–367.
- [19] DE JONG E.P., XIE H., ONSONGO G., STONE M.D., CHEN X.B., KOOREN J.A., REFSLAND E.W., GRIFFIN R.J., ONDREY F.G., WU B., LE C.T., RHODUS N.L., CARLIS J.V., GRIFFIN T.J.: Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. *PLoS ONE* 2010, 5, e11148.
- [20] ZHAO M., ROSENBAUM E., CARVALHO A.L., KOCH W., JIANG W.W., SIDRANSKY D., CALIFANO J.: Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. *Int. J. Cancer* 2005, 117, 605–610.
- [21] SMITH E.M., RITCHIE J.M., SUMMERSGILL K.F., HOFFMAN H.T., WANG D.H., HAUGEN T.H., TUREK L.P.: Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004, 96, 449–455.
- [22] HE H., CHEN G., ZHOU L., LIU Y.: A joint detection of CEA and CA-50 levels in saliva and serum of patients with tumors in oral region and salivary gland. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2009, 135, 1315–1321.
- [23] WARNAKULASURIYA S., SOUSSI T., MAHER R., JOHNSON N., TAVASSOLI M.: Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. *J. Pathol.* 2000, 192, 52–57.
- [24] MIZUKAWA N., SUGIYAMA K., FUKUNAGA J., UENO T., MISHIMA K., TAKAGI S., SUGAHARA T.: Defensin-1, a peptide detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res.* 1998, 18, 4645–4649.
- [25] ZHONG L.P., CHEN G.F., XU Z.F., ZHANG X., PING F.Y., ZHAO S.F.: Detection of telomerase activity in saliva from oral squamous cell carcinoma patients. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005, 34, 566–570.

- [26] ZHONG L.P., ZHANG C.P., ZHENG J.W., LI J., CHEN W.T., ZHANG Z.Y.: Increased Cyfra 21-1 concentration in saliva from primary oral squamous cell carcinoma patients. *Arch. Oral Biol.* 2007, 52, 1079–1087.
- [27] FRANZMANN E.J., RAETEGUI E.P., PEDROSO F., PERNAS F.G., KARAKULLUKCU B.M., CARRAWAY K.L., HAMILTON K., SINGAL R., GOODWIN W.J.: Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007, 16, 1348–1355.
- [28] HU S., YU T., XIE Y., YANG Y., LI Y., ZHOU X., TSUNG S., LOO R.R., LOO J.A., WONG D.T.: Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. *Cancer Genomics Proteomics* 2007, 4, 55–64.
- [29] LI Y., JOHN M.A.R.S., ZHOU X., KIM Y., SINHA U., JORDAN R.C.K., EISELE D., ABEMAYOR E., ELASHOFF D., PARK N.H., WONG D.T.: Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 8442–8450.
- [30] ST JOHN M.A., LI Y., ZHOU X., DENNY P., HO C.M., MONTEMAGNO C., SHI W., QI F., WU B., SINHA U., JORDAN R., WOLINSKY L., PARK N.H., LIU H., ABEMAYOR E., WONG D.T.: Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2004, 130, 929–935.
- [31] GAU V., WONG D.: Oral fluid nanosensor test (OFNASET) with advanced electrochemical-based molecular analysis platform. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007, 1098, 401–410.
- [32] ARELLANO-GARCIA M.E., LI R., LIU X., XIE Y., YAN X., LOO J.A., HU S.: Identification of tetranectin as a potential biomarker for metastatic oral cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 3106–3121.
- [33] BERNARDES V.F., GLEBER-NETTO F.O., SOUSA S.F., SILVA T.A., AGUIAR M.C.: Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: a case control study. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2010, 29, 40–46.
- [34] GIŁOWSKI Ł., WIENCH R., PŁOCICA I., KRZEMIŃSKI T.F.: Płyn dziąsłowy – czym jest i co umożliwia? *Czas. Stomatol.* 2007, 60, 171–178.
- [35] LAMSTER I.B., KAUFMAN E., GRBIC J.T., WINSTON L.J., SINGER R.E.: β -glucuronidase activity in saliva: relationship to clinical periodontal parameters. *J. Periodontol.* 2003, 74, 353–359.
- [36] CHRISTODOULIDES N., FLORIANO P.N., MILLER C.S., EBERSOLE J.L., MOHANTY S., DHARSHAN P., GRIFFIN M., LENNART A., BALLARD K.L., KING C.P. JR., LANGUB M.C., KRYSZCIO R.J., THOMAS M.V., McDEVITT J.T.: Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007, 1098, 411–428.
- [37] PEDERSON E.D., STANKE S.R., WHITENER S.J., SEBASTIANI P.T., LAMBERTS B.L., TURNER D.W.: Salivary levels of alpha 2-macroglobulin, alpha 1-antitrypsin, C-reactive protein, cathepsin G and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. *Arch. Oral Biol.* 1995, 40, 1151–1155.
- [38] MILLER C.S., KING C.P. JR., LANGUB M.C., KRYSZCIO R.J., THOMAS M.V.: Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J. Am. Dent. Assoc.* 2006, 137, 322–329.
- [39] FINE D.H., MARKOWITZ K., FURGANG D., FAIRLIE K., FERRANDIZ J., NASRI C., MCKIERNAN M., DONNELLY R., GUNSOLLEY J.: Macrophage inflammatory protein-1 α : a salivary biomarker of bone loss in a longitudinal cohort study of children at risk for aggressive periodontal disease? *J. Periodontol.* 2009, 80, 106–113.
- [40] SCANNAPIECO F.A., NG P., HOVEY K., HAUSMANN E., HUTSON A., WACTAWSKI-WENDE J.: Salivary biomarkers associated with alveolar bone loss. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007, 1098, 496–497.
- [41] NG P.Y., DONLEY M., HAUSMANN E., HUTSON A.D., ROSSOMANDO E.F., SCANNAPIECO F.A.: Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and in vitro studies. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007, 49, 252–260.
- [42] FRODGE B.D., EBERSOLE J.L., KRYSZCIO R.J., THOMAS M.V., MILLER C.S.: Bone remodelling biomarkers of periodontal disease in saliva. *J. Periodontol.* 2008, 79, 1913–1919.
- [43] HOFMAN J., SZKARADKIEWICZ A.K., KARPIŃSKI T.M.: Ocena występowania defensyn (HNP 1-3) w ślinie i surowicy osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia. *Czas. Stomatol.* 2008, 61, 881–885.
- [44] KUCUKKOLBASI H., KUCUKKOLBASI S., DURSUN R., AWILDIZ F., KARA H.: Determination of defensin HNP-1 in human saliva of patients with oral mucosal diseases. *J. Immunoassay Immunochem.* 2011, 32, 284–295.
- [45] RAI B., KAUR J., JACOBS R., SINGH J.: Possible action mechanism for curcumin in pre-cancerous lesions based on serum and salivary markers of oxidative stress. *J. Oral. Sci.* 2010, 52, 251–256.
- [46] KRÓL K., GROCHOLEWICZ K.: Wybrane białka śliny jako biomarkery miejscowych i ogólnych procesów chorobowych. *Przegląd piśmiennictwa. Ann. Ac. Med. Stetinensis* 2007, 53, 78–82.
- [47] KONOPKA T., GMYREK-MARCINIAK A., KOZŁOWSKI Z., KACZMAREK U., WNUKIEWICZ J.: Potencjał antyoksydacyjny śliny u pacjentów z zapaleniem przyzębia i rakiem płaskonabłonkowym dna jamy ustnej. *Dent. Med. Probl.* 2006, 43, 354–362.
- [48] TAKANE M., SUGANO N., IWASAKI H., IWANO Y., SHIMIZU N., ITO K.: New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals. *J. Periodontol.* 2002, 73, 551–554.
- [49] VERNILLO A.T., WOLPE P.R.: Property and privacy paradigms of “marketable spit”: an ethical and legal counterpart to blood? *J. Can. Dent. Assoc.* 2010, 76, 51–55.
- [50] NĘDZI-GÓRA M., GÓRSKA R.: Stężenie metaloproteinazy 9 w ślinie pacjentów z zapaleniem przyzębia – doniesienie wstępne. *Dent. Med. Probl.* 2002, 39, 47–53.
- [51] INGMAN T., TERVAHARTIALA T., DING Y., TSCHESCHE H., HAERIAN A., KINANE D.F., KONTTINEN Y.T., SORSA T.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* 1996, 23, 1127–1132.
- [52] NĘDZI-GÓRA M., GÓRSKA R.: Poziom metaloproteinazy -8 i -9 oraz ich inhibitora TIMP-1 we krwi obwodowej i ślinie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. *Czas. Stomatol.* 2004, 57.

- [53] NĘDZI-GÓRA M., GÓRSKA R.: Wpływ wstępnej fazy leczenia oraz niskich dawek doksycyliny na poziom MMP-8, MMP-9 i TIMP-1 w ślinie i krwi obwodowej pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. *Czas. Stomatol.* 2005, 58, 562–570.
- [54] RAO R.N., BALAMURALIKRISHNAN K., VASANTKUMAR A., KARANTH K.S., BHAT M.K., AROOR A.R.: A study of antitrypsin and macroglobulin levels in serum and saliva of patients with gingivitis. *Indian J. Dent. Res.* 1995, 6, 41–46.
- [55] ZAPPACOSTA B., MANNI A., PERSICHILLI S., BOARI A., SCRIBANO D., MINUCCI A., RAFFAELLI L., GIARDINA B., DE SOLE P.: Salivary thiols and enzyme markers of cell damage in periodontal disease. *Clin. Biochem* 2007, 40, 661–665.
- [56] NOMURA Y., TAMAKI Y., TANAKA T., ARAKAWA H., TSURUMOTO A., KIRIMURA K., SATO T., HANADA N., KAMOI K.: Screening of periodontitis with salivary enzyme tests. *J. Oral Sci.* 2006, 48, 177–183.
- [57] UITTO V.J., NIEMINEN A., COIL J., HURTTIA H., LARJAVA H.: Oral fluid elastase as an indicator of periodontal health. *J. Clin. Periodontol* 1996, 23(1), 30–37.
- [58] TOTAN A., GREABU M., TOTAN C., SPINU T.: Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: possible markers in periodontal diseases? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006, 44(5), 612–615.
- [59] STAWIŃSKA N., ZIĘTEK M., KOCHANOWSKA I.: Molekularne procesy resorpcji kości i ich potencjał terapeutyczny w leczeniu chorób przyzębia i osteoporozy. *Dent. Med. Probl.* 2005, 42, 627–635.
- [60] BUDUNELI N., BIYIKOGLU B., SHERRABEH S., LAPPIN D.F.: Saliva concentrations of RANKL and osteoprotegerin in smoker versus non-smoker chronic periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* 2008, 35, 846–852.

Adres do korespondencji:

Ewa Ganowicz
Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia IS WUM
ul. Miodowa 18
00-246 Warszawa
tel./faks: 022 502 20 36
e-mail: sluzowki@wum.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 7.07.2011 r.
Po recenzji: 30.07.2011 r.
Zaakceptowano do druku: 22.09.2011 r.

Received: 7.07.2011
Revised: 30.07.2011
Accepted: 22.09.2011