

Anne Marie Lynge Pedersen

# Saliva som diagnostisk redskab – muligheder og begrænsninger

En oversiktsartikel

Der er en lang række indlysende fordele ved at kunne anvende spyt i stedet for blod i forbindelse med sygdomsopsporing, diagnostik samt monitorering af sygdomsprogression og behandlingseffekt. Blodets sammensætning reflekteres i vist omfang i spyt, spyt er let at opsamle, opbevare og transportere, opsamling kræver ikke specialuddannet personale og infektionsrisikoen er mindre end ved håndtering af blodprøver. Hos børn og patienter med nåleskræk vil det være en betydelig fordel at tage en spytp prøve frem for en blodprøve. Spytopsamling er nemmere at gentage over tid, fx et døgn, og det er i en kost-effektiv metode der er velegnet til screening af større befolkningsgrupper.

**D**er har især indenfor de sidste 10 år været en rivende udvikling indenfor molekylærbiologiske teknikker som har bidraget til at øge sensitiviteten og specificiteten af nogle af de genetiske, biokemiske og cellulære markører, der kan påvises i spyt, og det har naturligt nok øget interessen betydeligt for den potentielle anvendelse af spyt som diagnostisk redskab. Der er ingen tvivl om at udviklingen inden for især proteomics og genomics vil øge mulighederne for at vi i fremtiden i højere grad kan anvende spyt som biomateriale til påvisning af genetisk disposition til sygdom, biomarkør for sygdomsopsporing og -progression samt til monitorering af behandlingseffekt i langt større omfang end i dag. Det skal dog understreges, at der er forhold som begrænser anvendelsen af spyt, og det er nødvendigt at teste sensitiviteten og specificiteten af flere af de biomarkører der er påvist på et større biomateriale fra fx biobanker og på større populationer i prospektive studier, og i forhold til blod, før det bli-

ver en realitet, at tandlægen opsamler en spytp prøve med henblik på screening af patientens almene helbredstilstand i forbindelse med et almindeligt tandeftersyn.

Nærværende artikel er en gennemgang af de potentielle biomarkører der er påvist ved en række orale og almene sygdomme samt spyttets anvendelse til påvisning af rusmidler, monitorering af hormonniveauer, herunder stress.

## Hvorfor er spyt anvendeligt som diagnostisk redskab?

Det spyt der secernerer til mundhulen indeholder en lang række proteiner. Disse kan være secerneret direkte til spyttet af spytkirtlernes celler; de kan være passeret fra blodet gennem spytkirtlernes celler til spyttet via forskellige transportmekanismer eller de kan stamme fra afstødte epitelceller fra spytkirtlerne eller mundslimhinden (1). Transport af substanser fra blod til spyt kan foregå transcellulært eller paracellulært ved passiv eller aktiv transport og afhænger af bl.a. af substansernes pH, ladning, proteinbinding samt vand- og fedtopløselighed (2). Det antages at de fleste lavmolekylære proteiner kan passere frit igennem spytkirtelcellerne. Der synes således at være et oplagt og stort potentiale i at anvende spyt til udvikling af redskaber der kan anvendes i klinikken med henblik på tidlig sygdomsopsporing, optimeret diagnostik, sygdomsforebyggelse og behandling. Der er også en rivende udvikling i gang og der i dag identificeret biomarkører i spyt som allerede anvendes indenfor diagnostik og behandling. En biomarkør er defineret som en effekt eller karakteristisk, der

## Klinisk relevans

Spyt indeholder ligesom blod, en lang række forskellige proteiner og molekyler som afspejler kroppens helbredstilstand. Der er langt flere fordele ved at kunne anvende spyt frem for blod i forbindelse med diagnostik, sygdomsopsporing samt monitorering af sygdomsprogression og behandlingseffekt. Det er nemt, billigt, sikkert og ikke-invasivt at opsamle spyt, og med den hastige udvikling inden for omics teknologier, der kan fremme validiteten af biomarkører i spyt, vil spyt utvivlsomt få langt større udbredelse som diagnostisk redskab i klinikken i fremtiden, hvilket også vil berøre tandlægers kliniske praksis.

### Forfatter

Anne Marie Lynge Pedersen, lektor, tandlæge, ph.d. Sektion for Oral Medicin, Klinisk Oral Fysiologi, Oral Patologi Et Anatomi, Odontologisk Institut, Det Sundhedsfaglige Fakultet, Københavns Universitet

**Tabel 1. Forskellige OMICS teknologier og hvad de kan anvendes til at påvise i bl.a. spyt**

**Genomics** – anvendes til at kortlægge vores gener og undersøge cellernes arvemasse, DNA, undersøges. Kan bruges til at bestemme om man er genetisk disponeret for en bestemt sygdom.

**Epigenomics** – anvendes til påvisning af ændringer i vores DNA, som er opstået ved DNA methylation og histone modifikation. Disse ændringer kan skyldes ydre faktorer (mutagener) som kost og forurening og medføre øget risiko for at udvikle sygdom.

**Transcriptomics** – DNAet transkriberes via forskellige RNA molekyler. Herved kommer det pågældende DNA til udtryk. Anvendes til påvisning af fx microRNA, som biomarkører for sygdomme.

**Proteomics** – DNAet er transkriberet via RNA, og der måles nu på proteiner, deres struktur og funktion, som kan være ændret pga. sygdom, fx cytokinprofilen.

**Metabolomics** – anvendes til at analysere metabolitter, dvs. forskellige molekyler, som er en del af metabolismen i kroppen. Det kan fx være aminosyrer og kulhydrater.

kan måles og evalueres objektivt som en indikator for normale biologiske processer, patogene processer eller farmakologiske responser på terapeutiske interventioner (3).

En lang række af de proteiner/molekyler der findes i spytet kan være potentielle markører for vores genetiske disposition for forskellige sygdomme, fx cancer og autoimmune sygdomme; for sygdoms- eller miljømæssigt betingede ændringer i vores gener, eller markører for hvad der gået galt i «proteinsystemerne», når sygdom er opstået, og hvorledes sygdommen udvikler sig samt hvorledes kroppen reagerer på en given behandling. Det er udviklingen inden for OMICS der har betydet at interessen for brug af spyt som påvisning af forskellige biomarkører er øget. OMICS er teknologiske metoder der omfatter genomics, epigenomics, transcriptomics, proteomics og metabolomics (4). Tabel 1 viser hvad de forskellige OMICS kan anvendes til.

### Begrænsningerne ved at anvende spyt

Hovedparten af de biomarkører vi kender i dag er fundet i blodprøver og ikke i spyt, og vores viden om sammenhæng mellem forskellige sygdomme og ændringer i ekspressionen af forskellige molekyler er primært baseret på studier der anvender blodprøver, og disse sammenhænge kan ikke nødvendigvis påvises ved anvendelse af spytprøver. Endvidere afspejler spytet i større grad end blodet kroppens aktuelle tilstand, idet spytets sekretionshastighed og sammensætning varierer betydeligt i løbet af døgn, og visse substansers tilstedeværelse i spytet er meget afhængig af spytsekretionshastigheden (2). Ud over døgnvariationen i spytets biokemiske sammensætning, kan selve op-

samlingsmetoden og håndtering af spytprøven være af afgørende betydning for fortolkning af resultaterne og dermed påvisning af en valid biomarkør (1,5). Hos patienter med svært nedsat spytsekretion kan det være vanskeligt at opsamle tilstrækkelig mængde spyt til analyse, især ustimuleret helspyt, ligesom det kan være afgørende at opsamle spyt selektivt fra fx glandula parotidea for at monitorere sygdomsaffektionen i bestemte spytkirtler, fx ved Sjögrens syndrom (6). I forbindelse med påvisning af biomarkører i spyt (og sammenholde fundene med tilsvarende i blodprøver), er det nødvendigt at anvende standardiserede metoder til opsamling af ustimuleret og tygge-stimuleret helspyt (2,5). Den hyppigst anvendte er den såkaldte «afløbsmetode» (2). Såfremt spyt skal anvendes i fremtiden til mere udbredt diagnostik og screening af store befolkningsgrupper, herunder kunne anvendes i udviklingslandene, er det vigtigt at kunne anvende helspyt der er nemt at opsamle frem for spyt opsamlet fra specifikke spytkirtler, da metoden til dette er teknisk vanskeligere at udføre. Endvidere er det vigtigt at spytprøven håndteres og opbevares korrekt dvs. anbringes på is og nedfryses hurtigst muligt for at undgå potentiel enzymatisk nedbrydning af visse molekyler. I forbindelse med proteom og transkriptom analyser kræves ofte tilsætning af enzymhæmmere som protease og ribonuklease for at kunne påvise bestemte labile komponenter, fx microRNAs i spytet (5).

Udviklingen af følsomme molekylærbiologiske analysemetoder har været og er fortsat af afgørende betydning for påvisning af biomarkører med høj sensitivitet og specificitet og i det hele taget muligheden for påvisning af molekyler hvis koncentration i spyt kan være flere hundrede gange lavere end i blod, fx visse proinflammatoriske cytokiner. Påvisning af ændret cytokinprofil ved en given systemisk sygdom, fx ved Sjögrens syndrom kan i øvrigt være påvirket af at patienten har andre inflammatoriske sygdomme, herunder marginal parodontitis, hvilket naturligvis skal inddrages i fortolkningen af analyseresultaterne. Også anvendelsen af *high throughput* DNA-sekventering til karakterisering af de orale mikroorganismer og det humane orale microbiom er et vigtigt fremskridt (for yderligere detaljer se online database: [www.homd.org](http://www.homd.org)). Karakterisering af det humane spytproteom har afsløret over 3000 proteiner (se online database: [www.hspp.ucla.edu](http://www.hspp.ucla.edu)).

### Biomarkører i spyt og deres kliniske anvendelse

Spyt indeholder en stor mangfoldighed af potentielle biomarkører (tabell 2). Anvendeligheden af disse biomarkører i diagnostik af specifikke sygdomme er beskrevet nedenfor.

#### *Marginal parodontitis, iskæmisk hjertesygdom og diabetes*

Marginal parodontitis (MP) er en bakterielt induceret, kronisk inflammatorisk sygdom (7). Sygdomsmønstret er præget af perioder med hhv. eksacerbation og remission karakteriseret ved sygdomsaktivitet og -inaktivitet. MP er en multifaktoriel sygdom, hvor genetiske og miljømæssige faktorer spiller en rolle (7). Identifikation af mikrobielle og genetiske biomarkører samt markører for værtsrespons vil kunne bidrage til at identificere, prædiktere

Tabel 2. Eksempler på potentielle biomarkører i spyt

Biomarkør type	Eksempler
Mikroorganismer	Bakterier, vira, svampe, protozoer
Celler	Epitelceller, neutrofile granulocytter
Organeller	Mikropartikler (0,1–1 µm), exosomer (<0,1 µm)
Muciner	MUC5B og MUC7 MUC1 og MUC4 (membranbundne)
Proteiner	Prolin-rige proteiner, cystatin S, cathelicidin, alfa-defensiner
Mindre proteiner/peptider	Nedbrydningsprodukter fra histaminer, statherin og prolin-rige proteiner
Antistoffer	Secretorisk immunoglobulin A, immunoglobulin G
Enzymer	Kulsyreanhydrase 6, amylase, kallikrein
Peptidhormoner og cytokiner	Epithelial growth factor, leptin, melatonin, interleukiner bl.a. IL-8 og IL-6
DNA	Humant og bakterielt
mRNA og miRNA	Human cellulært og cellefrit (exosomal); bakterielt
Steroider	DHEA (dihydroepiandrosteron), kortisol; østrogen, progesteron
Lipider	Glycerofosfolipider, kolesterol
Elektrolytter/ioner	Hypotone koncentrationer af natrium og klorid, calciummætning, bikarbonat, nitrat, thiocyanat

og monitorere patienter med risiko for alvorlig sygdomsprogression, patienter der ikke responderer på konventionel behandling samt patienter der er i risiko for at udvikle komplicerende systemiske sygdomme. Den inflammatoriske tilstand i det parodontale væv og nedbrydningen af knoglevæv udløser øget produktion af en række molekyler som kan påvises i såvel pochevæsken som i helspyt. Disse omfatter cytokiner (interleukin- (IL-) 1b, IL-6, tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) og prostaglandiner samt matrixmetalloproteinaser (MMP-8, -9 og -13), alkalisk fosfatase, osteocalcin og osteonectin (8,9). Nogle af disse markører (IL-1b, osteoprotegerin og MMP-8) er fundet forøget i helspyt hos patienter med MP, og korreleret til sygdommens sværhedsgrad (10).

En undersøgelse har vist, at det ved kombination af mikrobielle markører (forhøjede niveauer af *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* og *Campylobacter rectus*) og værtsresponsmarkører (osteoprotegerin, MMP-8, MMP-9 og IL-1b) er muligt at gruppere patienter i forhold til sygdomsprogression (11). Ligeledes er forhøjede niveauer af *Porphyromonas gingivalis*, IL-1b og MMP-8 fundet relateret til sygdommens sværhedsgrad (12). MP resulterer også i et målbart systemisk inflammatorisk respons, der forårsager stigning i cirkulerende C-reaktivt protein

og IL-6, og parodontal behandling har en gunstig effekt herpå (8). Disse observationer sandsynliggør at der en kausal sammenhæng mellem den systemiske inflammation udløst af MP og risiko for kardiovaskulær sygdom.

Der findes spyt-baserede biomarkører for akut myokardieinfarkt (AMI) som omfatter C-reaktivt protein, myoglobin, og myeloperoxidase (13). Der er påvist forøgede værdier af MMP-8 i spyt hos patienter med AMI (14), og forhøjet CPK (kreatinin fosfokinase, en markør for AMI) er fundet korreleret til cirkulerende niveauer af CPK i blodet 24 og 48 timer efter AMI (15).

Der er påvist sammenhæng mellem forekomsten af MP og diabetes (16) og der er også påvist en rækkes fælles biomarkører. Således er MMP-8 og osteoprotegerin fundet forøget i spyt hos diabetikere, uafhængig af tilstedeværelsen af MP (17). Hos patienter med type 2 diabetes, men uden gingivitis, er der påvist opregulering af proteinase inhibitorerne  $\alpha$ -2-makroglobulin,  $\alpha$ -1-antitrypsin and cystatin C (18). Hos børn med type 1 diabetes, er der fundet opregulering af  $\alpha$ -defensiner men nedregulering af statherin og beslægtede peptider (19).

#### Oral lichen planus

Oral lichen planus (OLP) er en kronisk inflammatorisk mundslimhinde- og hudsygdom. Ætiologien er endnu ukendt. Det antages, at autoreaktive cytotoxiske CD8+ T-celler, udløser keratinocyt apoptose og produktion af cytokiner, som har betydning for sygdomsaktiviteten (20). Det er tidligere vist, at patienter med erosiv OLP har forøgede niveauer af IFN- $\gamma$  (interferon-gamma), TNF- $\alpha$  og TNF-receptor-2 i deres spyt sammenlignet med raske kontrolpersoner, som falder signifikant efter behandling med systemisk prednison (21). Andre studier har også fundet forhøjede niveauer af spyt-TNF- $\alpha$  hos patienter med OLP samt forhøjede niveauer af IL-1 $\alpha$ , IL-6 og IL-8 (22,23). Desuden tyder undersøgelsesresultaterne på, at ændringen i disse NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer af aktiverede B-celler)-afhængige cytokiner i helspyt delvist kan afspejle den øgede risiko for malign transformation af OLP, og at måling af disse cytokiner fremover kan være anvendelige i monitoreringen af det behandlingsmæssige respons (23).

#### Oral cancer, bryst- og pancreas-cancer

Oralt planocellulært karcinom (OSCC) er den hyppigste cancerform i mundhulen, og som ved andre typer af cancer, er tidlig diagnose vigtig for hurtig behandling og dermed bedre prognose. Adskillige undersøgelser har vist, at spyt fra patienter med OSCC indeholder forhøjede niveauer af visse proteiner, herunder IL-1, IL-6, IL-8, CD44, carcinoembryonisk antigen (CEA),  $\alpha$ -defensin-1 og TNF- $\alpha$  (24–28), men også fibronectin cytotokeratin 19-fragment, *tissue polypeptidantigen* (TPA), endothelin-1, Cyfra 21–1, cancerantigen CA125, M2BP, MRP14, profilin, CD59 og katalase, som alle anses for at være potentielle markører for oral cancer (23–29).

Patienter med orale præmaligne tilstande har lavere niveauer af TNF- $\alpha$ , IL-1- $\alpha$ , IL-6 og -8 i spyt end patienter med OSCC, men højere niveauer af disse proinflammatoriske cytokiner end raske

kontrolpersoner (23,25,30). Ved hjælp af microarray-baserede analyser og kvantitativ polymerase kædereaktion (qPCR), er det vist, at DUSP1, H3F3A, IL-1 $\beta$ , IL-8, OAZ1, SAT og S100P er forhøjede hos patienter med OSCC sammenlignet med raske kontrolpersoner (31). Sensitiviteten og specificiteten ved brug af kombinationer af disse biomarkører er høj (31). Desuden synes disse spyt biomarkører at være uafhængige af etnicitet (32). Studier tyder på, at spyt-transkriptomet er bedre til at påvise oral cancer end serum transkriptom, og en række spyt-transkriptom biomarkører bliver i øjeblikket testet og valideret i større befolkningsgrupper (33). Analyser af microRNA i spyt har vist lavere niveauer af miR-125a og miR-200a hos patienter med OSCC end hos raske kontrolpersoner (34). Endvidere er der fundet højere koncentrationer af MMP-1 og MMP-3 i spyt hos patienter med OSCC end hos raske kontrolpersoner, og disse koncentrationer øges i takt med sygdommens omfang (35).

Tidligere studier antyder, at måling af CA 125 og epidermal growth factor (EGF) i spyt kan have diagnostisk potentiale ved ovarie- (36) og brystkræft (37). Tumormarkørerne c-erbB-2 og cancerantigen 15-3 i spyt er signifikant højere hos kvinder med brystkræft end hos kvinder med benigne tumorer og raske kontrolpersoner (38). Omvendt er niveauet af tumor suppressor proteinet og onkogenproteinet 53 (p53) i spyt lavere hos kvinder med brystkræft end hos dem med benigne tumorer (38). Atter andre microRNA biomarkører og protein biomarkør er blevet valideret og har vist en sensitivitet på 83 % og specificitet på 97 % på et præklinisk valideringsmateriale (39).

I en nyere undersøgelse blev der identificeret fire mRNA biomarkører (KRAS, MBD3L2, ACRV1 og DPM1), som muliggjorde skelnen mellem patienter med pancreas cancer, kronisk pancreatitis og raske kontrolpersoner (sensitivitet 90 % og specificitet 95 %) (40).

#### *Virusinfektioner*

Spyttest med måling af HIV-specifikt IgG-antistof er en anerkendt og veletableret metode til diagnostik af infektion med HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). Sensitiviteten og specificiteten er høj (mellem 95 % og 100 %) og på niveau med serumtest (41–43). Anvendelse af helspyt til diagnostik af HIV infektion har åbenlyse fordele, herunder den betydeligt reducerede infektionsrisiko for sundhedspersonale og fremme af diagnostik hos børn og store befolkningsgrupper. Desuden er det muligt at diagnosticere hepatitis A, B og C ved hjælp af antistofanalyser i spyt, og desuden at analysere for induceret immunitet efter vaccination. Specificiteten og sensitiviteten høj (mellem 98,7 og 100 %) og på niveau med serumtests (44,45). Antistofniveauer ved rubella, morbilli og epidemisk parotitis kan også med stor nøjagtighed påvises i spyt (46–48).

#### *Sjögrens syndrom*

Sjögrens syndrom (SS) er en kronisk, inflammatorisk autoimmun bindevævssygdom karakteriseret ved tilstedeværelsen af lymfocytære infiltrater i de eksokrine kirtler. Det er hovedsageligt tåre- og spytkirtler, som afficeres, og nedsat tåre- og spytsekretion an-

ses for forbundet med en progredierende lymfocyt-medieret destruktion af kirtelparenkymet (49). Sialokemiske undersøgelser har vist at patienter med primært SS har høje koncentrationer af natrium og klorid, men lave koncentrationer af fosfat i helspyt, parotisspyt og spyt fra gll. submandibularis/sublingualis på trods af lave sekretionshastigheder (50,51). Disse fund tyder på en dysfunktion i de ductale cellers evne til at reabsorbere salte, som kan være betinget af ændrede signaleringsmekanismer og/eller ændret forekomst af involverede transportproteiner (51). Endvidere er MMP-9 og dens vigtigste inhibitor TIMP-1 fundet øget i spyt fra patienter med SS sammenlignet med raske kontrolpersoner, men relationen til symptomintensitet og sygdomsvarighed er endnu uafklaret (52). Også en række cytokiner er blevet undersøgt og IL-10 og IL-6 er fundet i øgede koncentrationer i spyt hos patienter med SS i forhold til raske kontrolpersoner, og IL-6 er fundet korreleret til både mund- og øjentørhed (53). Det er desuden vist, at 16 forskellige peptider i helspyt er udtrykt signifikant anderledes hos patienter med SS sammenlignet med raske kontrolpersoner (54). Nyere studier viser at anvendelse af kombinationen af protein markøren beta-2-microglobulin og mRNA biomarkørerne myeloid cell nuclear differentiation antigen og guanylate binding protein 2 ikke blot gør det muligt meget nøjagtigt af skelne SS patienter fra raske kontrolpersoner men også fra patienter med systemisk lupus erytematosus (55,56).

#### *Hormoner*

Måling af hormonniveauer i spyt har været anvendt længe i klinisk sammenhæng. Bestemmelse af variationer i hormonniveauer over døgn eller måneder kræver opsamling af flere prøver med bestemte intervaller, hvilket betyder at det er nemmere at anvende spytprøver fremfor blodprøver, idet det er uden gener for patienten og spytopsamlingen kan foregå i hjemmet. De fleste hormoner fx steroider, er fedtopløselige, og passerer således fra blodet ud i spyttet via passiv diffusion. Hormonniveauet i blodet, dvs. den frie andel af hormon i blod, afspejles direkte i spyttet, hvilket gør spyt attraktivt af anvende. Det frie hormon er identisk med det biologisk aktive hormon, og derfor kan anvendelse af spyt have højere diagnostisk værdi end blod. Måling af spytkortisol har længe været anvendt som en markør for stress (57). Kortisol frigives via HPA-aksen (hypothalamus-hypofyse-binyreaksen), og måling af spytkortisol kan således afspejle en dysfunktion i HPA-aksen, som kan være tilfældet ved langvarig stress, adfærdsforstyrrelser og visse endokrine sygdomme. Monitorering af kønshormoner som østradiol, østriol, progesteron og testosteron i spyt anvendes i vidt omfang til vurdering af bl.a. fertilitet, ægløsningstidspunkt, fostervækst, prædiktion af for tidlig fødsel, sportspræstationer, misbrug af anabole steroider samt vækst- og adfærdsforstyrrelser hos børn (58).

#### *Monitorering medicin og rusmidler*

Niveauet af et givent lægemiddel kan også bestemmes i spyt, og afspejler som for hormonernes vedkommende den frie, ikke-protein-bundne andel af lægemidlet i blodet. Da den frie, ikke-proteinbundne del af lægemidlet kan være pH-afhængig, vil resul-

tatet af målingen afhænge af spytsekretionshastigheden og dermed ændringer i spytets pH, hvilket kan medføre variationer i spyt-/plasmaforholdet, og dermed indskrænke spytts diagnostiske værdi.

Spyt er derimod hensigtsmæssigt at anvende i forbindelse med måling af euforiserende stoffer, idet der her ofte blot er behov for undersøge om et givent rusmiddel er til stede i kroppen eller ej. Spyt er således blevet anvendt til at afdække misbrug af cannabis, kokain, opioider og indtagelse af alkohol (59).

## Konklusion

Gennem det seneste årti har interessen for brug af spyt som et diagnostisk redskab været stigende. Spyt har en række indlysende fordele i forhold til blod, da det kan opsamles non-invasivt og gentagne gange af ikke-specialuddannede personer. Desuden er det en kost-effektiv metode til screening af store befolkningsgrupper. Den rivende udvikling inden for omics teknologier giver nye muligheder og øger validiteten af mange af de nye biomarkører der kan påvises i spyt. Det gør spyt til et brugbart redskab til tidlig diagnose, overvågning af sygdomsprogression og evaluering af terapeutisk intervention ved en lang række orale og almenne sygdomme. Imidlertid er der behov yderligere videnskabelig validering af mange af de påviste biomarkører, før de kan anvendes i den nuværende kliniske praksis.

## English summary

*Pedersen AML.*

### Saliva as a diagnostic tool – possibilities and limitations

Nor Tannlegeforen Tid. 2015; 125: 112–8

Saliva has for a long time been considered an important diagnostic fluid. Thus, unlike blood and other body fluids, the use of saliva in diagnostics offers an easy, inexpensive and painless method to early diagnosis, and monitoring disease progression and the effect of therapeutic intervention. However, the use of salivary diagnostics has been hindered by the lack of sensitive and specific methods, lack of correlation between the biomolecules in the blood and saliva, and the circadian and flow dependent variations in saliva. During the last decade, omic technologies have improved, especially with regard to genomics and proteomics, but also metabolomics. Consequently, the use of salivary diagnostics in clinical settings is becoming a reality. The most significant landmark in salivary diagnostics is to identify the disease biomarkers and to transfer it from the laboratory to the clinical practice.

## Referencer

1. Ekström J, Khosravani N, Castagnola M, Messana I. Saliva and the Control of Its Secretion. In: Dysphagia. Ekberg O, editors. Berlin Heidelberg: Springer Verlag 2012; p.19–40.
2. Bardow A, Pedersen AML, Nauntofte B. Saliva. In: Miles TS, Nauntofte B, Svensson P, editors. Clinical Oral Physiology. Copenhagen: Quintessence Publishing Co Ltd. 2004; p. 17–51.
3. De Gruttola VG, Clax P, DeMets DL, Downing GJ, Ellenberg SS, Friedman L, Gail MH, Prentice R, Wittes J, Zeger SL. Considerations

in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials. Summary of a National Institutes of Health workshop. Control Clin Trials 2001; 22: 485–502

4. Horgan RP, Kenny LC. SAC review 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. The Obstetrician & Gynaecologist. 2011; 13: 189–95.
5. Veerman ECI, Vissink A, Wong DT, van Amerongen AN. Processing and storage of saliva samples. In: Wong D.T, editors. Salivary Diagnostics. Wiley-Blackwell 2008; p. 69–76.
6. Pedersen AM, Bardow A, Nauntofte B. Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjögren's syndrome. BMC Clin Pathol 2005; 5: 4
7. Hansen GM, Holmstrup P, Tolker-Nielsen T, Køllgaard T, Nielsen CH, Givskov M, Hansen PR. Mulig sammenhæng mellem marginal parodontitis og iskæmisk hjertesygdom. Ugeskr Læger 2014; 176: V01140065
8. Giannobile WV, Beikler T, Kinney JS, Ramseier CA, Morelli T, Wong DT. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. Periodontol 2009; 50, 52–64.
9. Kinney JS, Ramseier CA, Giannobile WV. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. Oral-Based Diagnostics 2007; 1098: 230–51.
10. Sexton WM, Lin YS, Kryscio RJ, Dawson DR, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. J Clin Periodontol 2011; 38: 434–41.
11. Kinney JS, Morelli T, Braun T, Ramseier CA, Herr AE, Sugai JV, Shelburne CE, Rayburn LA, Singh AK, Giannobile WV. Saliva/Pathogen Biomarker Signatures and Periodontal Disease Progression. J Dent Res 2011; 90: 752–8.
12. Gursoy UK, Kononen E, Pussinen PJ, Tervahartiala T, Hyvarinen K, Suominen AL, Uitto VJ, Paju S, Sorsa T. Use of host- and bacteria-derived salivary markers in detection of periodontitis: A cumulative approach. Dis Markers 2011; 30: 299–305.
13. Floriano PN, Christodoulides N, Miller CS, Ebersole JL, Spertus J, Rose BG, Kinane DF, Novak MJ, Steinhubl S, Acosta S, Mohanty S, Dharshan P, Yeh CK, Redding S, Furmaga W, McDevitt JT. Use of Saliva-Based Nano-Biochip Tests for Acute Myocardial Infarction at the Point of Care: A Feasibility Study. Clin Chem 2009; 55: 1530–8.
14. Buduneli E, Mantyla P, Emingil G, Tervahartiala T, Pussinen P, Baris N, Akilli A, Atilla G, Sorsa T. Acute Myocardial Infarction is Reflected in Salivary Matrix Metalloproteinase-8 Activation Level. J Periodontol 2011; 82(5): 716–25. Erratum in: J Periodontol. 2011; 82: 1219.
15. Mirzaii-Dizgah I, Jafari-Sabet M. Unstimulated whole saliva creatine phosphokinase in acute myocardial infarction. Oral Dis. 2011; 17: 597–600
16. Deschner J, Haak T, Jepsen S, Kocher T, Mehnert H, Meyle J, Schumm-Draeger PM, Tschöpe D. Diabetes mellitus and periodontitis. Bidirectional relationship and clinical implications. A consensus document. Internist. 2011; 52: 466–77.
17. Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB, Souza SLS, Grisi MFM, Novaes AB, Taba M. Salivary Interleukin-6, Matrix Metalloproteinase-8, and Osteoprotegerin in Patients With Periodontitis and Diabetes. J Periodontol. 2010; 81, 384–91.
18. Rao PV, Reddy AP, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, Biggs E, Roberts CT, Nagalla SR. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes. J Proteome Res. 2009; 8: 239–45.
19. Cabras T, Pisano E, Mastinu A, Denotti G, Pusceddu PP, Inzitari R, Fanali C, Nemolato S, Castagnola M, Messana I. Alterations of the Salivary Secretory Peptidome Profile in Children Affected by Type 1 Diabetes. Mol Cell Proteomics. 2010; 9: 2099–2108.
20. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ, Bigby M. The pathogenesis of oral lichen planus. Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13: 350–65.

21. Ghallab NA, el-Wakeel N, Shaker OG. Levels of Salivary IFN-gamma, TNF- $\alpha$ , and TNF Receptor-2 As Prognostic Markers in (Erosive) Oral Lichen Planus. *Mediators Inflamm*. 2010; E-pub. doi: 10.1155/2010/847632.
22. Zhang Y, Lin M, Zhang S, Wang Z, Jiang L, Shen J, Bai J, Gao F, Zhou M, Chen Q. NF- $\kappa$ B-dependent cytokines in saliva and serum from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population. *Cytokine*. 2008; 41: 144–9.
23. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Miller L, Ho V, Ondrey F. The feasibility of monitoring NF- $\kappa$ B associated cytokines: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in whole saliva for the malignant transformation of oral lichen planus. *Mol Carcinog*. 2005; 44 : 77–82.
24. Chen YC, Li TY, Tsai MF. Analysis of the saliva form patients with oral cancer by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Sectrom*. 2002; 16: 16: 364–9.
25. St John MA, Li Y, Zhou X, Denny P, Ho CM, Montemagno C, Shi W, Qi F, Wu B, Sinha U, Jordan R, Wolinsky L, Park NH, Liu H, Abemayor E, Wong DT. 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. Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NF- $\kappa$ B dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect Prev*. 2005; 29: 42–5.
27. Franzmann EJ, Reategui EP, Pedroso F, Pernas FG, Karakullukcu BM, Carraway KL, Hamilton K, Singal R, Goodwin WJ. Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007; 16: 1348–55.
28. 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(6B): 4645–9.
29. Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar G, Feinmesser R, Savulescu D, Borovoi I, Gavish M, Nagler RM. Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *Br J Cancer*. 2009 6; 101: 1194–8.
30. Brailo V, Vucicevic-Boras V, Cekic-Arambasin A, Alajbeg IZ, Milenovi A, Lukac J. The significance of salivary interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with oral leukoplakia. *Oral Oncol*. 2006; 42: 370–3.
31. Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC, Eisele D, Abemayor E, Elashoff D, Park NH, Wong DT. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*. 2004 15; 10(24): 8442–50.
32. Brinkmann O, Kastratovic DA, Dimitrijevic MV, Konstantinovic VS, Jelovac DB, Antic J, Nestic VS, Markovic SZ, Martinovic ZR, Akin D, Spielmann N, Zhou H, Wong DT. Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. *Oral Oncol*. 2011; 47: 51–5. Epub 2010 Nov 24.
33. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis*. 2011; 17: 345–54.
34. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 5473–7.
35. Stott-Miller M, Houck J, Lohavanichbutr P, Mendez E, Upton M, Futran N, Schwartz SM, Chen C. Tumor and salivary matrix metalloproteinase levels are strong diagnostic markers of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011; Sep 29. [Epub ahead of print]
36. Chen DX, Schwartz PE, Li FQ. Saliva and serum CA 125 assays for detecting malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 701–4.
37. Navarro MA, Mesia R, Diez-Gilbert O, Rueda A, ojeda b, alonso ma. Epidermal growth factor in plasma and saliva of patients with active breast cancer and breast cancer patients in follow-up compared with healthy women. *Breast Cancer Res Treat*. 1997; 42: 83–6.
38. 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.
39. Zhang L, Xiao H, Karlan S, Zhou H, Gross J, Elashoff D, Akin D, Yan X, Chia D, Karlan B, Wong DT. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. *PLoS One*. 2010 31; 5(12): e15573.
40. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, Chia D, Wong DT. *Gastroenterology*. 2010; 138(3): 949–57.
41. Tamashiro H, Constantine NT. Serological diagnosis of HIV infection using oral fluid samples. *Bull World Health Organ*. 1994; 72: 135–43.
42. Emmons W. Accuracy of oral specimen testing for human immunodeficiency virus. *Am J Med*. 1997; 102: 15–20.
43. Malamud D. Oral diagnostic testing for detecting human immunodeficiency virus-1 antibodies: a technology whose time has come. *Am J Med*. 1997; 102: 9–14.
44. Ochnio JJ, Scheifele DW, Ho M, Mitchell LA. New, ultrasensitive enzyme immunoassay for detecting vaccine- and disease-induced hepatitis A virus-specific immunoglobulin G in saliva. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 98–101.
45. Thieme T, Yoshihara P, Piacentini S, Beller M. Clinical evaluation of oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 1076–9.
46. Perry KR, Brown DW, Parry JV, Panday S, Pipkin C, Richards A. Detection of measles, mumps, and rubella antibodies in saliva using antibody capture radioimmunoassay. *J Med Virol*. 1993; 40: 235–40.
47. Brown DW, Ramsay ME, Richards AF, Miller E. Salivary diagnosis of measles: a study of notified cases in the United Kingdom, 1991–3. *BMJ*. 1994; 308: 1015–7.
48. Thieme T, Piacentini S, Davidson S, Steingart K. Determination of measles, mumps, and rubella immunization status using oral fluid samples. *JAMA*. 1994; 272: 219–21.
49. Pedersen AM, Nauntofte B. Primary Sjögren's syndrome: oral aspects on pathogenesis, diagnostic criteria, clinical features and approaches for therapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2001; 2: 1415–36.
50. Kalk WWI, Vissink A, Spijkervet FKL, Bootsma H, Nieuw Amerongen AV, Kallenberg CGM. Sialometry and sialochemistry: a non-invasive approach for diagnosing Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61: 137–44.
51. Pedersen AM, Bardow A, Nauntofte B. Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjögren's syndrome. *BMC Clin Pathol*. 2005; 1: 4.
52. Asatsuma M, Ito S, Watanabe M, Takeishi H, Nomura S, Wada Y, Nakano M, Gejyo F, Igarashi A. Increase in the ratio of matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in saliva from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Chim Acta*. 2004; 345: 99–104.
53. Boras VV, Cikes N, Lukac J, Cekic-Arambasin A, Virag M, Bosnjak A. The significance of salivary and serum interleukin 6 and basic fibroblast growth factor levels in patients with Sjogren's syndrome. *Coll Antropol*. 2004; 28 Suppl 2: 305–9.
54. Hu S, Wang J, Meijer JM, Jeong S, Xie Y, Yu T, Zhou H, Henry S, Vissink A, Pijpe J, Kallenberg CG, Elashoff D, Loo JA, Wong DT. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2007; 56 (11): 3588–3600.
55. Hu S, Gao K, Pollard R, Arellano M, Zhou H, Zhang L, Elashoff D, Kallenberg CG, Vissink A, Wong DT. Preclinical validation of salivary biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Care Res (Hoboken)*; 2010a; 62(11): 1633–8.

56. Hu S, Vissink A, Arellano M, Kallenberg CG, Wong DT. Identification of autoantibody biomarkers for primary Sjögrens syndrome using protein microarrays. *Proteomics* 2010b; 11(8): 1499–1507.
57. Törnåge CJ. Salivary cortisol for assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Neuroimmunomodulation*. 2009; 16(5): 284–9.
58. Oh J-A, Shin H-S. Rapid determination of natural steroidal hormones in saliva for the clinical diagnoses. *Chemistry Central Journal*. 2012; 6: 22.
59. Garg U, Presley L. Role of saliva in detection of substance abuse. In: Wong D.T, editor. *Salivary Diagnostics*. Oxford: Wiley-Blackwell 2008; p. 169–79.

*Adresse: Anne Marie Lyng Pedersen, Sektion for Oral Medicin, Klinisk Oral Fysiologi, Oral Patologi Et Anatomi, Odontologisk Institut, Nørre Allé 20, DK-2200 København N, Danmark. E-mail: amlp@sund.ku.dk*

*Artikkelen har gennemgået eksternt faglig vurdering.*

*Pedersen AML. Saliva som diagnostisk redskab – muligheder og begrænsninger. En oversiktsartikel. *Nor Tannlegeforen Tid*. 2015; 125: 112–8.*