

TÜKÜRÜK BİYOMARKERLARIN ERKEN TANIDAKİ ROLÜ

The Role of Salivary Biomarkers in Early Diagnostics

Melis ARAZ¹, Yeliz GÜVEN¹, Oya AKTÖREN¹

Makale Gönderilme Tarihi:03/08/2012

Makale Kabul Tarihi:28/12/2012

ÖZ

Erken tanı, başarılı bir tedavide önemli rol oynar. Birçok vakada, hastalığın erken tanısı ile başarılı bir tedavi ya da kontrol gerçekleştirilebilmektedir. Tükürük tanı yöntemleri, hastalık tanısında kolay, ucuz, güvenilir ve invazif olmayan uygulamaları içermektedir. Bu makale, ağız kanserleri, sistemik enfeksiyonlar, periodontal hastalık tanısında kullanılan tükürük biyomarkerlarına ilişkin genel bilgi içermektedir.

Anahtar kelimeler: *Biyomarker, tükürük, erken tanı*

ABSTRACT

Early detection of disease plays a crucial role in successful therapy. In most cases, the earlier the disease is diagnosed, the more likely it is to be successfully cured or well controlled. Salivary diagnostics offer an easy, inexpensive, safe and non-invasive approach for disease detection. This article presents an overview of salivary biomarkers for oral cancers, systemic infections and periodontal diseases.

Keywords: *Biomarkers, saliva, early detection of disease*

¹İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti A.D.

Giriş

Ağız içindeki birleşik sıvının genel adı olarak tanımlanan tükürük renksiz, kokusuz, hafif bulanık ve az kıvamlı bir sıvıdır. Tükürük, % 95-99,4'ü su olmak üzere çeşitli minerallerden, elektrolitlerden, hormonlardan, enzimlerden, immunglobulinlerden, sitokinlerden ve diğer komponentlerden oluşmaktadır. Tükürüğün tamamı homojen değildir ve birçok farklı kaynaktan salgılanmaktadır (1). Tükürüğün serum komponentleri, kaynağını karotid arterinden alan lokal damar ağundan elde edildiğinden, tükürük sistemik dolaşımda bulunan birçok molekülü içeren çok büyük bir sıvı kaynağıdır. Bu nedenle, tükürük hastalıkların erken tanısında çok değerli bir sıvı özelliği taşımaktadır (2).

Erken tanı, tedavi başarısında önemli bir rol oynamaktadır. Hastalığın erken aşamada saptanması, şiddetli etkilerin azalmasını, oluşacak komplikasyonların engellenmesini ya da geciktirilmesini sağlayabilmektedir (3). Düzenli sağlık kontrolü yaptırmanın önemi bilinmekle beraber, birçok hastalık ciddi semptomlar göstermeden teşhis edilememekte; bu nedenle, araştırmacılar gizli kalmış yaşam riskine ilişkin tehditlerin saptanmasında moleküler biyomarkerların önemini vurgulamaktadırlar (4,5,6,7).

Biyomarker, teşhis edilmiş ya da görülmüş normal, anormal ya da biyolojik sürecin hücresel, biyokimyasal, moleküler ve genetik değişiklikleridir. DNA, RNA ya da protein molekülleri olan biyomarkerlar doku, hücre ya da kan, üre ve serebrospinal sıvı gibi vücut sıvılarından ölçülebilmektedir. Bir biyomarker, salgılanan malign bir molekül olduğu gibi kanser varlığında vücudun verdiği spesifik bir cevap da olabilmektedir

(7,8). Son yıllardaki moleküler teşhisler klinik uygulamalarda da önem kazanmış, ancak tam bir moleküler tanının gerçekleştirilmesi üç majör etken nedeniyle sınırlı kalmıştır. Tanıyı zorlaştıran bu etkenler; hastalığa özgü moleküler biyomarker eksikliği, kolay ve ucuz örnekleme yönteminin eksikliği ve hassas, kullanılması kolay, portatif platform eksikliği olarak bildirilmektedir. Ulusal Dental ve Kraniofasial Araştırma Enstitüsü (NIDCR), 2002 yılından itibaren ağız sıvılarındaki bu kısıtlamaları ortadan kaldırmaya çalışmaktadır (9,10).

Tükürük, protein ve genetik moleküller içeren, noninvazif yaklaşım gerektiren, kolay, güvenilir örnekleme yöntemi ile çalışmayı sağlayabilen bir ağız sıvısıdır (2). Tükürük toplama, saklama, gönderme ve hacimli örnekleme açısından serum ve üreye göre çok daha ekonomiktir. Kanın pıhtılaşması gibi bir durum tükürükte olmadığından tükürüğün taşınması kolaydır; bu özelliklerin yanı sıra, tükürük testlerinde sağlık çalışanları için hastalığın bulaşma riski olmadığından seruma göre daha güvenilirdir; noninvazif bir yöntem olması da hastalarda endişe ve rahatsızlık oluşturmamaktadır. Tükürük biyomarkerlarındaki ve tükürük tanı yöntemlerindeki gelişmeler ile gelecekte hastalığa özgü moleküler biyomarker eksikliği ve hassas, kullanılması kolay, portatif platform eksikliğine ilişkin sorunların da ortadan kalkabileceği öne sürülmektedir. Son zamanlarda, biyoteknoloji ve tükürük tanı yöntemlerinin kombinasyonu ile tükürükte saptanan birçok değerli tıbbi maddenin kanser, otoimmün hastalıklar, viral hastalıklar, bakteriyel hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve HIV gibi çeşitli hastalıkların biyomarkerı olarak tanıda kullanılabildiği bildirilmektedir (3).

Tükürük biyomarkerların tanı amaçlı kullanımı:

A. Tükürükte ağız kanserlerinin saptanması:

Ağız kanserleri, çoğunlukla da oral skuamoz hücreli karsinoma, baş ve boyun bölgesinde dünyada yılda 300.000 insanı etkilediği ileri sürülmektedir. Amerikan Kanser Vakfı'na göre, 2006'da ağız kanseri, tüm kanserler içerisinde erkeklerde % 3, kadınlarda % 2 olarak belirtilmiştir. Son 15 yılda elde edilen epidemiyolojik ve moleküler veriler, servikal kansere neden olan Human Papillomavirus'un (HPV) baş ve boyun bölgesinde karsinogenezisi ilerlettiğini göstermektedir (11,12). Tükürüğün ağız kanserleriyle ilişkili bir sıvı olması, kolay toplanabilmesi ve minimal yayılım göstermesi, tükürük biyomarkerlarını ağız kanserlerinin saptanması ve ilerleyişinin görüntülenmesi açısından önemli kılmaktadır (13).

Tükürükte bulunan üç tümör marker'ı (TPA, CA125, Cyfra 21-1) kanser olgularında yüksek olarak saptanmıştır (4). Ağız kanseri biyomarkerı olarak çoğunlukla tümör supresör protein TP53'ün önemi vurgulanmakta ve P53 genindeki mutasyonların skuamoz hücreli karsinoma dahil kanserde en sık görülen mutasyonlar olduğu ve özellikle ilerlemiş safhalarda görüldüğü belirtilmektedir. Baş ve boyun kanserlerinde P53 mutasyonları, tükürük örneklerinin % 71'inde belirlenmiş ve tükürükten alınan her 100 hücreden 2-3'ünde P53 mutasyonu bulunduğu bildirilmiştir. Mutant P53'ün yarı ömrünün uzamasının tümör hücresi çekirdeğinde yüksek oranda inaktif TP53 proteinin birikimine sebep olduğu; bu durumda ise immün sistemin TP53'e karşı antijen üret-

meye yöneldiği ve P53 mutasyonuna sahip hastaların yaklaşık üçte birinin kanında TP53 antijenlerin bulunduğu öne sürülmektedir. Ağız kanserinde, TP53 antijen birikimi, belirlenemeyen neoplastik lezyonların oluşmasının ilk evresi olarak düşünülebilmekte ve TP53 antijenlerinin ölçümü, hastalığın şiddetinin ve sonucunun görülmesinde prognostik indikatör olarak kullanılabilir. Seropozitiflikle ilişkisinin % 50 olmasına rağmen, TP53 antijenlerinin tükürükte de bulunduğu bildirilmektedir (6).

Yüksek riskli HPV (HPV 16, HPV 18) epitelyal hücrelerde tümör yapıcı etkiye sahiptir. Tümör biyopsisi ile HPV DNA'sının tespiti, kanserlerin oral kavitedeki etkilerini göstermeyebilmektedir. HPV DNA'sı tükürükte PCR yöntemiyle saptanmış ve doku örneğinden elde edilen DNA ile benzer olduğu belirtilmiştir (13); Smith ve ark. (14) ise tükürükten ve dokudan alınan örneklerde HPV varlığının benzerlik göstermediğini bildirmişlerdir.

Endotelin1 (ET-1), keratinositler tarafından sentezlenen vazoaktif bir peptiddir; hipertansiyon gibi vasküler bozuklukların gelişiminde ve ilerlemesinde rol alması ile birlikte birçok malignitede fazla salınım yaptığı bulunmuştur. Sağlıklı bireylerde ET-1'in tükürükte sabit olarak bulunduğu ve ağız kanserinin tespitinde ELISA ile ET-1'in ölçüldüğü belirtilmektedir. Ayrıca, ET-1 gibi defensin, interleukin-6 ve interleukin-8'in de tükürükte ölçülerek ağız kanseri tespitinde yararlanılabileceği vurgulanmaktadır (13).

B. Tükürükte sistemik enfeksiyonların saptanması:

Primer patojenlerin etkin olduğu enfeksiyöz hastalıklar yüksek mortalite riski gös-

terebilmektedir. Bu nedenle, erken ve doğru tanı uygun tedavi seçeneğinin belirlenmesinde önemlidir (15).

Tanı yöntemleri (direkt patojenin tanısı, patojen nükleik asidin tanısı (DNA/RNA) ya da yükselmiş konak antijeni tanısı) patojenlere göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, peptik ülserin majör risk faktörü *Helicobacter Pylori*, pahalı ve yüksek invazif bir yöntem olan gastrik mukozal biyopsi ile saptanabilmektedir. *H. Pylori*, rDNA dizisinin tükürükte PCR ile güvenilir olarak belirlenebilmesi, gelecekte tükürüğün ucuz ve rutin bir şekilde *H. Pylori* bakterisinin tanısında kullanılabilceğini göstermektedir (16,17). *Mycobacterium Tuberculosis*'in direkt tanısının tükürükte PCR ile gerçekleştirilen bakteriyal DNA tanısından daha az etkili olduğu bildirilmektedir (15). HIV, spesifik IgG antikorunun tükürük ile tanısının da serum ile tanısı kadar güvenilir sonuçlar verdiği düşünülmektedir. Ayrıca HPV, herpes virüs, herpes simplex virüs, Epstein-Barr virüs, kızamık ve kabakulak virüsleri PCR ile DNA üzerinde ya da artmış IgG antikor seviyeleri ile saptanabileceği bildirilmektedir (13).

C. Tükürükte periodontal hastalığın saptanması:

Periodontal hastalık, yetişkinlerde diş kaybına neden olabilen genel ağız enfeksiyon hastalığıdır. Hastalığın tanısında kullanılan geleneksel yöntemler arasında dişeti cebinin derinliğinin ölçülmesi, ölçüm sırasındaki kanama varlığı, klinik ataşman kaybı seviyesi, plak indeksi, dişeti indeksi ve radyografik analizler bulunmaktadır. Bu parametreler, uygulanması kolay, noninvazif ve güvenilirlerdir. Ancak bu tanı yöntemleri

inflamasyonun başlangıcını ve periodontal hastalık riski taşıyan bireylerin saptanmasında yetersiz kalabilmektedir (18). Son 20 yılda ağız sıvıları, tükürük ve dişeti oluğu sıvısı, tanı amaçlı uygulamalarda alternatif yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır. Tükürük analitlerinin seviyesinin bu yöntemler ile saptanabilmesi mevcut hastalığın aktivitesi ve şiddetinin belirlenebilmesi açısından da avantaj oluşturmaktadır (19).

Periodontal teşhis için çalışılan tükürük markerları konak orijinli proteinler (enzimler, immünoglobulinler), fenotipik markerlar, konak hücreleri, hormonlar, bakteriler ve bakteriyel ürünler, iyonlar ve gaz haline gelebilen bileşiklerdir (2). Tablo 1'de periodontal hastalığın teşhisi için kullanılan tükürük markerları görülmektedir.

Tablo 1. Periodontal hastalığın teşhisi için kullanılan tükürük markerları (2).

Biyomarker	Biyolojik görev	Periodontal hastalıkta sağlıktakine göre konsantrasyonları
<i>İnflamatuvar</i>		
β -glukuronidaz	Nötrofil miktarı	artış
CRP	Akut faz göstergesi	artış
IL-1 β	Proinflamatuvar sitokin	artış
IL-6	Akut faz protein indüksiyonu, osteoklast aktivasyonu	artış
MIP1 α	B kemokinlerin osteoklast progenitorları uyarıp aktif osteoklast oluşumu	Agresif periodontitiste artış
TNF- α	Proinflamatuvar sitokinlerin IL-1 uyarması, kemik kollojen sentezinin engellenmesi ve kollegenazın indüklenmesi	artış
<i>Yumuşak doku yıkımı</i>		
α_2 -macroglobulin	proteozinin etkisiz hale getirilmesi	azalma
MMP-8	Nötrofil kollajenazın tip 1 ve tip 3 kollajenlerin niteliğini bozması	artış
AST	Hücre yaralanma markerı	artış
ALT	Hücre yaralanma markerı	artış
TIMPs	Metalloproteinaz inhibitörü	azalma
<i>Kemik remodeling</i>		
Alkalin fosfataz	Hidrolaz enziminin yer alması	artış
Osteoprotegerin	RANKL bağlanmasına müdahale etme	artış
Osteokalsin	Osteoblastlar tarafından salgılanır ve mineralizasyon ve kalsiyum iyon hemostazında rol oynar.	azalma
SPARC/osteonektin	Osteoblastlardan salgılanır	azalma
RANKL	Kemik rezorpsiyonunun indüklenmesi	belirsiz
HGF	Osteoklast aktivasyon faktörü	artış

Tükürük biyomarkerlerinin saptanması:

1. Tükürük biyomarkerlerinin proteomik teknoloji ile saptanması:

Proteom, genom tarafından kodlanan proteinleri tanımlar. Bir hücrenin, organın ya da organizmanın sahip olduğu tüm proteinlerin toplamıdır. Bir organizma, vücudun farklı bölgelerinde, hücre döngüsünün farklı evrelerinde ve farklı çevre koşullarında farklı protein ekspresyonlarına sahiptir (5). Vücut sıvılarındaki proteomlar, hastalık biyomarker

kaynağı olarak yüksek klinik potansiyele sahiptirler. Proteomik teknolojiler, tükürükte 1000'den fazla protein saptanmasına yol açmışlardır (20). Bu proteinlerin % 22'sinin parotid ya da submandibular/sublingual tükürük bezlerine özgü olduğu bulunmuştur. Tükürük proteomları, ağız sağlığı ve genel sağlık hakkında kapsamlı bilgi içerir. Ayrıca, çeşitli komplikasyonlar sırasında tükürük proteomlarının analizi ile erken dönemde morbidite işaretlerinin açıklanması ve hastalığın seyrinin görüntülenmesi sağlanabilir (13).

2. Tükürük biyomarkerlarının transkriptomik teknoloji ile saptanması:

Tükürük proteomlarına ek olarak, tükürük transkriptomlarının (RNA molekülleri) 2004 yılında saptanması ile tükürükte ikinci teşhis yöntemi olan tükürük transkriptomik teşhisi belirlenmiştir. Tükürük transkriptom analizleri, proteomdan daha çeşitlidir ve 3000'den fazla mRNA tükürükte tespit edilmiştir (21). Tükürük transkriptomunun gelişmekte olan bir yöntem olmasına karşın, UCLA'da tükürük RNA çalışmaları için bir platform kurulmuştur. Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute) Erken Hastalık Araştırma Ağı (Early Disease Research Network) tarafından ağız kanserlerinin teşhisinde tükürük biyomarkerların rolü araştırılmış ve tükürük RNA'sının ağız kanserleri için klinik öneminin yüksek olduğu bildirilmiştir (17,22,23). Başka bir çalışmada ise, tükürük mRNA'larından 4'ü (IL-8, OAZ1, SAT ve IL1 β) biyomarker olarak kullanılmış ve ağız kanseri olgularının tanısının konulmasında % 91 başarı elde edilmiştir. Gelecekte mRNA gruplarının sistemik hastalıkların biyomarkerları olarak belirlenmeleri ümit edilmektedir (24).

Sonuç

Tükürüğün protein ve nükleik asit gibi molekül içerikleri bakımından kan ile benzer özellikler taşıması ve diğer vücut sıvıları ile gerçekleştirilen tanı yöntemlerine göre tükürük ile gerçekleştirilen testlerin daha kolay, ucuz, güvenilir ve noninvazif olması hastalıkların belirlenmesinde tükürük biyomarkerlarının önemini ortaya koymaktadır. Tükürük tanı yöntemlerinin gelecekte yaygınlaştırılmasıyla, sosyoekonomik düzeyi

düşük bölgelerde etkili tarama programları gerçekleştirilebilecek, risk grubundaki hastaların saptanması, monitorize edilmesi ve tedavi edilmesi ile toplumun sağlık düzeyi yükseltilebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Marieb EN, Hoehn K. Human anatomy and physiology. 8th ed., San Francisco: Benjamin Cummings, 2009.
2. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campbell CL, Humphries RL, Christodoulides N, Floriano PN, Simmons G, Bhagwandin B, Jacobson JW, Redding SW, Ebersole JL, McDevitt JT. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med*, 2010; 4(1): 171-89.
3. Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*, 2009; 22(4): 241-48.
4. Nagler R, Bahar G, Shpitzer T, Feinmesser R. Concomitant analysis of salivary tumor markers: a new diagnostic tool for oral cancer. *Clin Cancer Res*, 2006; 12(13): 3979-84.
5. Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Sciences*, 1997; 278(5340): 1054-59.
6. Tavassoli M, Brunel N, Maher R, Johnson NW, Soussi, T. p53 antibodies in the saliva of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Cancer*, 1998; 78(3): 390-91.
7. Wagner P, Verma M, Srivastava S. Challenges for biomarkers in cancer detection. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1022: 9-16.
8. Wong LJ, Lueth M, Li XN, Lau CC, Vogel H. Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal

- fluid of medulloblastoma patients. *Cancer Res*, 2003; 63(14): 3866–71.
9. Kocík M, Vymetalová Y, Málek I. Cell-free human DNA in body fluids-potential for clinical applications. *Cas Lek Cesk*, 2007; 146(2): 96–101.
 10. Schrohl AS, Würtz S, Kohn E, Banks RE, Nielsen HJ, Sweep FC, Brünner N. Banking of biological fluids for studies of disease-associated protein biomarkers. *Mol Cell Proteomics*, 2008; 7(10): 2061–66.
 11. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92(9): 709–20.
 12. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 2003; 95(23): 1772–83.
 13. Farnaud SJ, Kosti O, Getting SJ, Renshaw D. Saliva: physiology and diagnostics potential in health and disease. *Scientific World Journal*, 2010; 10: 434–56.
 14. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*, 2004; 108(5): 766–72.
 15. Eguchi J, Ishihara K, Watanabe A, Fukumoto Y, Okuda K. PCR method is essential for detecting mycobacterium tuberculosis in oral cavity samples. *Oral Microbiol Immunol*, 2003; 18(3): 156–59.
 16. Ahmed KS, Khan AA, Ahmed I, Tiwari SK, Habeeb MA, Ali SM, Ahi JD, Abid Z, Alvi A, Hussain MA, Ahmed N, Habibullah CM. Prevalence study to elucidate the transmission pathways of helicobacter pylori at oral and gastroduodenal sites of a South Indian population. *Singapore Med J*, 2006; 47(4): 291–96.
 17. Park NJ, Li Y, Yu T, Brinkman BM, Wong DT. Characterization of RNA in saliva. *Clin Chem*, 2006; 52(6): 988–94.
 18. Giannobile WV, McDevitt JT, Niedbala RS, Malamud D. Translational and clinical applications of salivary diagnostics. *Adv Dent Res*, 2011; 23(4): 375–80.
 19. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, 2003; 31: 32–42.
 20. Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek Loo RR, Li Y, Loo JA, Wong DT. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics*, 2005; 5(6): 1714–28.
 21. Li Y, Zhou X, St John MA, Wong DT. RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology. *J Dent Res*, 2004; 83(3): 199–203.
 22. Hu S, Wang J, Meijer J, Leong S, Xie YM, Yu T, Zhou H, Henry S, Vissink A, Pijpe J, Kallenberg C, Elashoff D, Loo JA, Wong DT. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2007; 56(11): 3588–600.
 23. 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; 10(24):

8442–50.

24. Segal A, Wong DT. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. Eur J Dent Educ, 2008; 12 Suppl 1: 22-29.

Yazışma adresi :

Melis ARAZ

İstanbul Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi

Pedodonti A.D.

34093 Çapa-Fatih/İstanbul

Tel: 02124142020/ 30400

e-posta: araz_melis@hotmail.com