

© БЕЛЬСКАЯ Л.В., 2019

Бельская Л.В.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СЛЮНЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Омский государственный педагогический университет, 644043, Омск, Россия

Применение слюны в клинической лабораторной диагностике является перспективным, а также неинвазивным, простым и недорогим методом для выявления ряда заболеваний. Интеграция комплекса методов, включая исследование генома, эпигенома, транскриптома, протеома, метаболома и микробиома, позволяет обнаружить и количественно определить ряд биомаркеров в слюне. Исследование слюны относится к неинвазивным методам и проводится для оценки возрастного и физиологического статуса, выявления соматических заболеваний, патологии слюнных желёз и тканей полости рта, генетических маркёров, мониторинга лекарственных средств и др. В настоящем обзоре рассмотрены последние данные по применению слюны для диагностики онкологических заболеваний.

Ключевые слова: слюна; клиническая лабораторная диагностика; геном; протеом; метаболом; транскриптом; микробиом.

Для цитирования: Бельская Л.В. Возможности применения слюны для диагностики онкологических заболеваний. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6):333-336

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-333-336>

Bel'skaya L.V.

POSSIBLE APPLICATIONS OF SALIVA FOR THE DIAGNOSIS OF CANCER

Omsk State Pedagogical University, Omsk, 644043, Russian Federation

Use of saliva in the clinical laboratory diagnosis is promising, and non-invasive, simple and inexpensive method for the detection of diseases. Integration of complex techniques, including genomic research, epigenome, transcriptome, proteome, metabolome and microbiome, can detect and quantify the number of biomarkers in saliva. Research saliva relates to non-invasive techniques and conducted to evaluate the age and physiological status, detection of somatic diseases, diseases of the salivary glands and oral tissues, genetic markers, drug monitoring, and others. In this review, recent data on the use of saliva to diagnose cancers examined.

Key words: saliva; clinical laboratory diagnostics; genome; proteome; metabolome; transcriptome; microbiome.

For citation: Bel'skaya L.V. Possible applications of saliva for the diagnosis of cancer. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (6): 333-336 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-333-336>

For correspondence: Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Associate Professor; e-mail: ludab2005@mail.ru

Information about author:

Bel'skaya L.V., <http://orcid.org/0000-0002-6147-4854>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 20.03.2019

Accepted 20.04.2019

В последнее время возросло внимание исследователей к изучению свойств слюны человека как материала с уникальными свойствами и диагностическими возможностями. Исследование слюны относится к неинвазивным методам и проводится для оценки возрастного и физиологического статуса, выявления соматических заболеваний, патологии слюнных желёз и тканей полости рта, генетических маркёров, мониторинга лекарственных средств и др. [1-4].

Слюна содержит множество биологических молекул, в том числе ДНК, матричную РНК (мРНК), микроРНК, белок, метаболиты и микробиоту. Изменение их концентрации в слюне может быть использовано для выявления системных заболеваний и заболеваний полости рта на ранних стадиях, а также для оценки прогноза течения заболеваний и контроля ответа на лечение [5]. В 2008 го-

ду предложен термин «саливаомика», который объединяет знания о различных компонентах в слюне, включая геном, эпигеном, транскриптом, протеом, метаболом и микробиом [6, 7].

Наиболее перспективным направлением является применение слюны для ранней диагностики онкологических заболеваний. Для этих целей могут быть использованы все пять составляющих саливаомики (см. рисунок).

Целью работы являлось обобщение существующего опыта применения слюны для лабораторной диагностики онкологических заболеваний.

Геном и эпигеном. Слюнной геном состоит одновременно из ДНК человека и микроорганизмов полости рта (70 и 30 % соответственно). Качество слюнной ДНК хорошее, что позволяет для 72-96% образцов провести генотипирование, 84% могут быть амплифицированы, 67% могут быть секвенированы [8]. При этом образцы слюны могут сохраняться длительное время без существенной деградации [9]. Генетический и эпигенетический ана-

Для корреспонденции: Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук; e-mail: ludab2005@mail.ru



Базовые направления диагностики по слюне.

лиз слюны позволяет обнаружить аномальные профили транскрипции генов, которые отражают патологические генетические процессы [10]. К эпигенетической составляющей генома можно отнести метилирование ДНК – это модификация молекулы ДНК без изменения самой нуклеотидной последовательности. Метилирование ДНК изменяется с возрастом, а также под воздействием факторов окружающей среды [11]. Аномальное метилирование генов (например, гиперметилирование) часто встречается при онкологических заболеваниях [10].

Транскриптом (мРНК и микроРНК). Исследования транскриптома сосредоточены в основном на матричной РНК и микроРНК, которые секретируются из клеток и попадают в ротовую полость из различных источников, в том числе слюнных желез и десневой жидкости [12]. Матричная РНК содержит информацию о первичной структуре (аминокислотной последовательности) белков, синтезируется на основе ДНК в ходе транскрипции, после чего, в свою очередь, используется в ходе трансляции как матрица для синтеза белков. Тем самым мРНК играет важную роль в «проявлении» (экспрессии) генов. МикроРНК – группа малых некодирующих РНК (от 19 до 25 нуклеотидов), которые кодируются генами, но не переводятся в белки. МикроРНК централизованно принимает участие в различных биологических процессах, в том числе дифференцировке и пролиферации клеток. Транскрипция специфических мРНК и микроРНК изменяется при многих заболеваниях. Недавние исследования обнаружили более 3000 видов мРНК в слюне здоровых субъектов [13]. Особо важно, что 180 из них являются общими для здоровых субъектов, они составляют обычное ядро слюнного транскриптома.

Анализ транскриптома слюны человека впервые проведен Вонгом с использованием технологии микрочипов, что позволяет обеспечить высокую пропускную способность, а также простую стабилизацию слюнной РНК для прямого анализа без дальнейшей обработки [14]. Показана применимость слюнных мРНК для обнаружения рака поджелудочной железы, рака полости рта, рака легких, рака молочной железы, рака яичников и других системных заболеваний [15-17]. Многие исследования показывают отклонения в экспрессии микроРНК в опухолевых тканях по сравнению со здо-

ровыми. МикроРНК являются более стабильными, чем мРНК, а степень изменения микроРНК между раковыми и нормальными клетками достаточно велика [18].

Протеом. Слюна является ультрафильтратом плазмы крови и содержит белки, которые синтезируются в слюнных железах или попадают в нее из крови. На сегодняшний день исследователи выявили 2340 белков в протеоме слюны, из которых 20-30% также обнаружены в крови [19], что является обнадеживающим показателем клинической полезности слюны. В отличие от плазмы крови, протеом которой на 99% от общего содержания белка формируется за счет 22 основных белков, тогда как в слюне 20 основных белков составляют лишь 40% от общего содержания белка [20]. Таким образом, обнаруживать биомолекулы с высокой чувствительностью и специфичностью в слюне практически проще, чем в крови. Слюна также может быть использована для обнаружения веществ, поступающих из крови, например, стероидных гормонов [21].

При изучении белкового состава слюны показано, что 1166 белков секретируются большими слюнными железами, из которых 914 из околоушной и 917 из подчелюстной и подъязычной слюнных желез, 57% этих белков являются одинаковыми для всех желез. Секретция малых слюнных желез человека включает 56 белков. В отличие от относительно стабильного состояния в сыворотке крови, белки, содержащиеся в слюне, более восприимчивы к биохимическим процессам и деградации [22]. Однако стабилизация протеома слюны ингибиторами протеазы позволяет увеличить стабильность белков до 2-х недель при хранении при 4°C [23]. В настоящее время основной технологией для идентификации белков является масс-спектрометрия благодаря высокой чувствительности и точности измерения массы пептидов.

Протеом слюны становится приемлемой средой для обнаружения различных заболеваний. В основном это связано с достижениями в области методов для разделения и идентификации белков. Например, выявлено пять биомаркеров плоскоклеточного рака полости рта (M2BP, MRP14, CD59, каталаза и профилин) [24], а также показана применимость CD44 для скрининга плоскоклеточного рака головы и шеи [25].

Метаболом. Метаболом включает группу эндогенных и экзогенных метаболитов, в том числе липиды, аминокислоты, пептиды, нуклеиновые кислоты, органические кислоты, витамины, тиолы и углеводы. Он является ценным инструментом для обнаружения биомаркеров, мониторинга физиологического состояния и выбора тактики лечения [26].

При исследовании дискриминационных метаболитов у пациентов с раком ротовой полости, поджелудочной и молочной железы выявлены более 50 прогнозирующих метаболитов каждого отдельного заболевания [27]. Среди них наиболее значимыми являются аланин и лейцин, что свидетельствует об изменении метаболических путей гликогенных аминокислот и кетонных тел [28]. Комбинация из трех слюнных метаболитов (фенилаланин, валин и молочная кислота) может отличить пациентов с плоскоклеточным раком полости рта от здоровых людей с высокой чувствительностью и специфичностью (86,5% и 82,4%, соответственно) [29]. Набор из пяти биомаркеров слюны (интерлейкин-8, холин, пипеколиновая кислота, L-фенилаланин и S-карбоксиметил-L-цистеин) продемонстрировали превосходную точность для выявления ранних стадий рака головы и шеи [30].

Микробиом. Ротовая полость представляет собой разнообразную среду обитания бактерий и других микроорганизмов. Ряд данных свидетельствует о том, что дисбиоз может привести к болезням полости рта, таких как пародонтит и кариес [31], а также рак и другие системные заболевания [32, 33]. В настоящее время известно более 10000 видов микроорганизмов полости рта [34]. Использование бактериальных микрочипов и других новых методов может продвинуть исследование слюнного микробиома и определить связь между бактериями и микроорганизмами при отдельных системных заболеваниях, а также заболеваниях полости рта. Так, в слюне у пациентов с плоскоклеточным раком полости рта и здоровых испытуемых обнаружена комбинация из трех микроорганизмов (*Campytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* и *Streptococcus mitis*), которые могут быть использованы в качестве диагностических биомаркеров с 80 % чувствительностью и 82% специфичностью [35]. Аналогично две бактерии (*Neisseria elongate* и *Streptococcus mitis*) позволяют отличить пациентов с раком поджелудочной железы от здоровых с 96,4% чувствительностью и 82,1 % специфичностью [36].

Применение слюны для ранней диагностики рака. Раннее обнаружение является ключевым фактором, определяющим благоприятный прогноз лечения практически для всех типов рака [37]. Слюна используется для диагностики плоскоклеточного рака полости рта, для этого определяют белки, мРНК и ДНК [38, 39]. Экспрессия микроРНК связана с раком легкого, молочной и предстательной желез. Первым биомаркером, обнаруженным в слюне, был HER2/Neu для рака молочной железы [40]. Для выявления рака яичников мРНК биомаркерами в слюне являются AGPAT1, B2M, VASP2, IER3 и IL1B [16]. Слюнные мРНК (CCNI, EGFR, FGF19, FRS2 и GREB1) могут быть использованы для неинвазивной диагностики рака легких [15]. Показана статистически значимая избыточная экспрессия белковых маркеров HP, AZGP1 и калпротектина у больных раком легкого [41]. Отмечены более высокие уровни белков с молекулярной массой 6556.81 и 7081.17 Да в слюне группе пациентов с раком желудка по сравнению со здоровыми людьми. Белок p53 представляет собой опухолевый супрессор, продуцируемый в ответ на различные типы повреждений ДНК в клетках. Инактивация белка p53 в процессе мутации является одной из ведущих причин антител развития рака. Антитела к p53 могут быть обнаружены в сыворотке крови и слюне больных с диагнозом плоскоклеточный рак полости рта [2, 13]. Опухолевый маркер CA15-3 был обнаружен в слюне женщин с диагнозом рак молочной железы [42]. Он используется для контроля распространения и метастазирования опухоли. CA 125 представляет собой ассоциированный с опухолью антиген, который обнаружен в сыворотке крови и слюне пациентов с раком полости рта, молочной железы и яичников [43]. Концентрации в слюне фактора роста фибробластов (FGF2 и FGFR1) значительно повышены у пациентов с раком слюнной железы, что позволяет рассматривать их как потенциальный биомаркер в ранней диагностике опухолей слюнных желез [44]. Простат-специфический антиген (ПСА) является установленным маркером аденокарциномы предстательной железы. Слюнный уровень ПСА коррелирует с сывороточным уровнем у пациентов с раком предстательной железы [45]. Также было установлено, что уровень кортизола и лактатдегидрогеназы в слюне может быть значительно увеличен в плазме и слюне па-

циентов с плоскоклеточным раком полости рта [46]. Повышенные уровни нитратов и нитритов в слюне были обнаружены у пациентов с раком ротовой полости [47]. Активность аденозиндезаминазы (ADA) значительно повышается при плоскоклеточном раке языка [48]. Описано применение слюны в онкогематологии. Показано, что высокий уровень нейтрофилов в слюне может указывать на успех пересадки костного мозга [49].

Таким образом, существует достаточно большое количество маркеров опухолевого процесса, которые могут быть определены в слюне человека. Природа биомаркеров может быть различна, включая генетические, эпигенетические и транскриптомные маркеры, а также вещества белковой природы, метаболиты опухолевого процесса и микробиологические показатели. Часть описанных маркеров уже получила клиническое подтверждение эффективности для диагностики онкологических заболеваний на ранней стадии, часть требует проведения дальнейших исследований. Однако, даже в случае если применимость для ранней диагностики не будет доказана, возможно их применение для проверки эффективности проводимой терапии, мониторинга течения заболевания, идентификации резидуальных опухолей, а также прогнозирования клинического течения и выбора эффективной терапевтической практики [50].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.2-49 см. REFERENCES)

1. Кочурова Е.В. Диагностические возможности слюны. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 1: 13–6.
50. Кушлинский Н.Е., Любимова Н.В. Опухолевые маркеры. Общая характеристика, клинического значение и рекомендации по использованию. *Поликлиника*. 2016; 8: 62-77.

REFERENCES

1. Kochurova Ye.V. Diagnostic capabilities of saliva. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 1: 13–6. (in Russian)
2. Kaur J., Jacobs R., Huang Y., Salvo N., Politis C. Salivary biomarkers for oral cancer and pre-cancer screening: a review. *Clinical Oral Investigations*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2337-x>
3. Nair S., Tang K.D., Kenny L., Punyadeera C. Salivary exosomes as potential biomarkers in cancer. *Oral Oncology*. 2018; 84: 31–40.
4. Porto-Mascarenhas E.C., Assad D.X., Chardin H., Gozal D., De Luca Canto G., Acevedo A.C., Guerra E.N.S. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017; 110: 62–73.
5. Spielmann N., Wong D.T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*. 2011; 17: 345-54.
6. Zhang Y., Sun J., Lin C., Abemayor E., Wang M.B., Wong D. The Emerging Landscape of Salivary Diagnostics. *OHDM*. 2014; 13 (2): 200-10.
7. Wong D.T. Salivaomics. *Journal of the American Dental Association*. 2012; 143: 19S-24S.
8. Looi M.L., Zakaria H., Osman J., Jamal R. Quantity and quality assessment of DNA extracted from saliva and blood. *Clinical Laboratory*. 2012; 58: 307-12.
9. Bonne N.J., Wong D.T. Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches. *Genome Medicine*. 2012; 4: 82.
10. Carvalho A.L., Henrique R. Jeronimo C., Nayak C.S., Reddy A.N., et al. Detection of promoter hypermethylation in salivary rinses as a biomarker for head and neck squamous cell carcinoma surveillance. *Clinical Cancer Research*. 2011; 17: 4782-9.
11. Bryan A.D., Magnan R.E., Hooper A.E., Harlaar N., Hutchison

- K.E. Physical activity and differential methylation of breast cancer genes assayed from saliva: a preliminary investigation. *Annals of Behavioral Medicine*. 2013; 45: 89-98.
12. Momen-Heravi F., Trachtenberg A.J., Kuo W.P., Cheng Y.S. Genomewide Study of Salivary MicroRNAs for Detection of Oral Cancer. *J Dent Res*. 2014; 93 (7): 86S-93S.
 13. Brinkmann O., Wong D.T. Salivary transcriptome biomarkers in oral squamous cell cancer detection. *Adv Clin Chem*. 2011; 55: 21-34.
 14. Lee Y.H., Zhou H., Reiss J.K., Yan X., Zhang L., et al. Direct saliva transcriptome analysis. *Clinical Chemistry*. 2011; 57: 1295-1302.
 15. Zhang L., Xiao H., Zhou H., Santiago S., Lee J.M., Garon E.B., Yang J., Brinkmann O., Yan X., Akin D., Chia D., Elashoff D., Park N-H., Wong D.T.W. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012; 69 (19): 3341-50.
 16. Lee Y.H., Kim J. H., Zhou H., Kim B.W., Wong D.T. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma. *Journal of Molecular Medicine*. 2012; 90 (4): 427-34.
 17. Li F., Yoshizawa J.M., Kim K.M., Kanjanapangka J., Grogan T.R., Wang X., Elashoff D.E., Ishikawa S., Chia D., Liao W., Akin D., Yan X., Lee M.S., Choi R., Kim S.M., Kang S.Y., Bae J.M., Sohn T.S., Lee J.H., Choi M.G., Min B.H., Lee J.H., Kim J.J., Kim Y., Kim S., Wong D.T.W. Discovery and Validation of Salivary Extracellular RNA Biomarkers for Noninvasive Detection of Gastric Cancer. *Clin Chem*. 2018; 64(10): 1513-21.
 18. Matse J.H., Yoshizawa J., Wang X., Elashoff D., Bolscher J.G.M., Veerman E.C.I., Bloemena E., Wong D.T.W. Discovery and Prevalidation of Salivary Extracellular microRNA Biomarkers Panel for the Noninvasive Detection of Benign and Malignant Parotid Gland Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2013; 19(11): 3032-8.
 19. Jagtap P., McGowan T., Bandhakavi S., Tu Z.J., Seymour S., Griffin T.J., Rudney J.D. Deep metaproteomic analysis of human salivary supernatant. *Proteomics*. 2012; 12(7): 992-1001.
 20. Loo J.A., Yan W., Ramachandran P., et al. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res*. 2010; 89: 1016-23.
 21. Goswami Y., Mishra R., Agrawal A.P., Agrawal L.A. Salivary Biomarkers-A Review of Powerful Diagnostic tool. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. 2015; 14 (3): 80-7.
 22. Schulz B.L., Cooper-White J., Punyadeera C.K. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2013; 33: 246-59.
 23. Xiao H., Wong D.T. Method development for proteome stabilization in human saliva. *Analytica Chimica Acta*. 2012; 722: 63-9.
 24. Alejandro I. Lorenzo-Pouso, Mario Pérez-Sayáns, Susana B. Bravo, Pia López-Jornet, María García-Vence, Manuela Alonso-Sampedro, Javier Carballo, Abel García-García. Protein-Based Salivary Profiles as Novel Biomarkers for Oral Diseases. *Dis Markers*. 2018; 6141845. doi: 10.1155/2018/6141845
 25. Franzmann E.J., Reategui E.P., Pereira L.H., Pedrosa F., Joseph D., Allen G.O., Hamilton K., Reis I., Duncan R., Goodwin W.J., Hu J.J., Lokeshwar V.B. Salivary protein and solCD44 levels as a potential screening tool for early detection of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2012; 34 (5): 687-895.
 26. Zhang A., Sun H., Wang P., Han Y., Wang X. Recent and potential developments of bio fluid analyses in Metabolomics. *Journal of Proteomics*. 2012; 75: 1079-88.
 27. Ishikawa S., Sugimoto M., Kitabatake K., Sugano A., Nakamura M., Kaneko M., Ota S., Hiwatari K., Enomoto A., Soga T., Tomita M., Iino M. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Scientific Reports*. 2016; 6:31520.
 28. Grimaldi M., Palisi A., Rossi G., Stillitano I., Faiella F., Montoro P., Rodriguez M., Palladino R., D'Ursi A.M., Romano R. Saliva of patients affected by salivary gland tumour: An NMR metabolomics analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018; 160: 436-42.
 29. Wei J., Xie G., Zhou Z., Shi P., Qiu Y., et al. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *International Journal of Cancer*. 2011; 129: 2207-17.
 30. Guerra E.N.S., Acevedo A.C., Leite A.F., Gozal D., Chardin H., De Luca Canto G. Diagnostic capability of salivary biomarkers in the assessment of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology*. 2015; 51(9): 805-18.
 31. Burne R.A., Zeng L., Ahn S.J., Palmer S.R., Liu Y., et al. Progress dissecting the oral microbiome in caries and health. *Advances in Dental Research*. 2012; 24: 77-80.
 32. Schwabe R.F., Jobin C. The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2013; 13: 800-12.
 33. Acharya A., Chan Y., Kheur S., Jin L.J., Watt R.M., Mattheos N. Salivary microbiome in non-oral disease: A summary of evidence and commentary. *Archives of Oral Biology*. 2017; 83: 169-73.
 34. Yoshizawa J.M., Schafer C.A., Schafer J.J., Farrell J.J., Paster B.J., et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; 26: 781-791.
 35. Hu X., Zhang Q., Hua H., Chen F. Changes in the salivary microbiota of oral leukoplakia and oral cancer. *Oral Oncol*. 2016; 56: e6-e8.
 36. Farrell J.J., Zhang L., Zhou H., Chia D., Elashoff D., et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut*. 2012; 61: 582-8.
 37. Malathi N., Mythili S. and Vasanthi H.R. Salivary Diagnostics: A Brief Review. *ISRN Dentistry*. 2014, Article ID 158786, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/158786>
 38. Tang H., Wu Z., Zhang J., Su B. Salivary lncRNA as a potential marker for oral squamous cell carcinoma diagnosis. *Molecular Medicine Reports*. 2013; 7 (3): 761-6.
 39. Yoshizawa J. M., Wong D.T.W. Salivary microRNAs and oral cancer detection. *Methods in Molecular Biology*. 2013; 936: 313-24.
 40. De Abreu Pereira D., Areias V.R., Franco M.F., Benitez M.C.M., do Nascimento C.M., de Azevedo C.M., Alves G. Measurement of HER2 in Saliva of Women in Risk of Breast Cancer. *Pathol. Oncol. Res*. 2013; 19: 509-13.
 41. Xiao H., Zhang L., Zhou H., Lee J.M., Garon E.B., Wong D.T. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using twodimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11(2): 111-21.
 42. Agha-Hosseini F., Mirzaii-Dizgah I., Rahimi A. Correlation of serum and salivary CA15-3 levels in patients with breast cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009; 14: 521-4.
 43. Balan J.J., Rao R.S., Premalatha B.R., Patil S. Analysis of tumor markers CA 125 in saliva of normal and oral squamous cell carcinoma patients: a comparative study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2012; 13 (5): 671-5.
 44. Huang Y.Q., Li Y.D., Li G.K., Jin Z., Ma J. The evaluation of basic fibroblast growth factor and fibroblastic growth factor receptor 1 levels in saliva and serum of patients with salivary gland tumor. *DNA and Cell Biology*. 2012; 31 (4): 520-3.
 45. Shiiki N., Tokuyama S., Sato C. et al. Association between saliva PSA and serum PSA in conditions with prostate adenocarcinoma. *Biomarkers*. 2011; 16 (6): 498-503.
 46. Bernabe D.G., Tamae A.C., Miyahara G.I., Sundefeld M.L., Oliveira S.P., Biasoli E. R. Increased plasma and salivary cortisol levels in patients with oral cancer and their association with clinical stage. *Journal of Clinical Pathology*. 2012; 65 (10): 934-9.
 47. Shetty S. R., Chadha R., Babu S., Kumari S., Bhat S., and Achalli S. Salivary lactate dehydrogenase levels in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: a biochemical and clinic pathological study. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2012; 8 (2): 123-5.
 48. Rai B., Kaur J., Jacobs R., Anand S.C. Adenosine deaminase in saliva as a diagnostic marker of squamous cell carcinoma of tongue. *Clinical Oral Investigations*. 2011; 15 (3): 347-9.
 49. Saxena V., Yadav N.S., Juneja V., Singh A., Tiwari V., Santha B. Saliva: a miraculous biofluid for early detection of disease. *J. Oral Health Comm. Dent*. 2013; 7(1): 64-8.
 50. Kushlinskiy N.Ye., Lyubimova N.V. Tumor markers. General characteristics, clinical significance and recommendations for use. *Poliklinika*. 2016; 8: 62-77. (in Russian)