

© КОЛЕСОВ С.А., КОРКОТАШВИЛИ Л.В., 2015

УДК 616.316-008.839.6-074

Колесов С.А., Коркоташвили Л.В.

ПРОТЕОМ СЛЮНЫ И ЕГО ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ

ФГБУ «Приволжский Федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, 603950, г. Нижний Новгород

К настоящему времени опубликован ряд работ, свидетельствующих о необычайно высоком потенциале протеома слюны для диагностики многих заболеваний. Вместе с тем из этих публикаций можно сделать и другие заключения, в частности о том, что исследования протеома слюны сейчас находятся на стадии накопления данных, а отсутствие стандартизации в сборе материала, методике анализа и требований к репрезентативности выборок, на основании которых делаются заключения авторов, вносит разночтения в результаты, получаемые разными исследователями. Кроме того, еще недостаточно изучены физиология и биохимия слюны и слюнных желез, а также особенности взаимодействия белков слюны с микроорганизмами ротовой полости. Все это создает преграды для использования достижений в исследовании протеома слюны в диагностической практике. Решение этих проблем позволит сделать слюну идеальной биологической средой как для выявления заболеваний, так и прогноза их течения.

Ключевые слова: слюна; протеомика; диагностика; белки; маркеры.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (5): 54–58.

Kolesov S.A., Korkotashvili L.V.

THE PROTEOME OF SALIVA AND ITS DIAGNOSTIC POSSIBILITIES

The Nizhny Novgorod research institute of children gastroenterology of Minzdrav of Russia, 603950 Nizhny Novgorod, Russia

By the present time, a number of articles has been published testifying an extremely high potential of proteome of saliva for diagnostic of many diseases. At the same time, the conclusions can be made from these publications. In particular, to the effect that studies of proteome of saliva are at the stage of data accumulation only. Then, lacking of standardization in collection of samples, techniques of analysis and requirements to representativeness of samplings used as basis for conclusions carry in discrepancies into results acquired by different researchers. Furthermore, physiology and biochemistry of saliva are studied insufficiently as well as characteristics of interaction of proteins of saliva with micro-organisms of oral cavity. All of this establishes obstacles for implementations of achievements in studying of proteome of saliva in diagnostic practice. The solution of these problems will permit making saliva an ideal biological medium for both detection of diseases and prognosis of their course.

Keywords: saliva; proteomics; diagnostic; protein; marker

Citation: Klinicheskaya Laboratornaya diagnostika. 2015; 60(5): 54–58.

Слюна является экзокринным секретом и выделяется тремя парами крупных слюнных желез (околоушные, подъязычные и подчелюстные) и множеством мелких. В полости рта образуется так называемая смешанная слюна или ротовая жидкость, состав которой отличен от состава смеси слюны желез, поскольку в ней присутствуют также бактерии и продукты их жизнедеятельности, жидкость из десневой борозды, компоненты плазмы крови и продукты распада. Смешанная слюна является весьма привлекательной для целей диагностики, поскольку способ ее получения простой, неинвазивный, имеет минимальную стоимость, к тому же она требует минимальной обработки [1, 2].

Слюна была использована в клинической диагностике более 2000 лет назад – врачи китайской медицины считали слюну и кровь двойниками с одинаковым происхождением [3]. В XX веке исследования слюны получили широкое распространение, появилась специальная наука «саливология», были доказаны важное значение слюны в обеспечении общего гомеостаза и ее тесная связь с кровью [4–6]. Новый этап исследования слюны начался в последнее время в связи с появлением серии новых биологи-

ческих дисциплин (так называемых «омик»), основанных на иных методических подходах, и с использованием гораздо более чувствительных методов (прежде всего масс-спектрометрии). Наибольшее значение в исследовании слюны в качестве диагностической биологической жидкости сейчас имеют протеомика и биоинформатика [7, 8], поскольку основные прорывы осуществлены в области исследования белкового и пептидного состава слюны. В настоящем обзоре обобщены данные зарубежных работ по протеомике слюны (отечественные отсутствуют), опубликованных в последнее время.

Методической основой протеомных исследований слюны являются методы двойного электрофореза (2D-электрофорез) и масс-спектрометрия. Комбинируя эти методы между собой, а также с хроматографией, капельным электрофорезом, гель-фильтрацией и другими методами удалось достичь небывалых результатов в исследовании белкового состава слюны. Основы методологии протеомных исследований слюны изложены в ряде печатных работ [9–11].

Благодаря развитию биоинформатики и накоплению данных к настоящему времени созданы доступные базы данных по протеому слюны, например база «Salivaomic» [3,7].

Белки слюны. Совокупность белков слюны образует ее протеом. Результаты первого анализа протеома слю-

Для корреспонденции:

Колесов Сергей Алексеевич, sakdom2@mail.ru

ны, направленного на каталогизацию слюнных белков, были опубликованы в 2008 г. [12]. К настоящему времени белковый состав слюны полностью изучен, последние протеомные исследования показали, что в человеческой слюне присутствует более 2000 различных белков и пептидов [13, 14].

Каталогизация белков и пептидов слюны выявила обилие белков с широким диапазоном функциональных свойств: иммунный ответ обеспечивают иммуноглобулины; антимикробную активность – лизоцим, лактоферрин, сиалопероксидаза, гистатин, дефензины; смазку и физическую защиту тканей полости рта обуславливают муцины; пролин-богатые белки осаждают потенциально вредные вещества из рациона; другие белки (α -амилаза) осуществляют начальный этап пищеварительного процесса [15]. По данным Zheng-Zhi Wu и соавт. [16], из 309 белков слюны, выявленных в соответствии с их функциями, 21% связан с иммунитетом, 1,6% – с белковой репликацией, 4,8% – с подвижностью клеток и секрецией, 2,3% – с транскрипцией и рибосомами, 4,2% – с делением клеток и клеточным циклом, 9,7% – с сигнальной системой, 5,2% – с метаболизмом, 7,1% – с цитоскелетом, а 28,7% являются белками с неопределенными функциями.

По массе более 90% белков и пептидов слюны (200 белков и пептидов) являются производными от секреции трех пар слюнных желез (околоушных, подчелюстных и подъязычных). К ним относят богатые пролином пептиды, α -амилазу, цистатины, гистатин, муцины, секреторный IgA и карбоангидразу [17]. Все другие компоненты, обнаруженные в слюне, по массе представляют оставшиеся 10% [18]. Некоторые из них выделяются небольшими слюнными железами, эпителиальными клетками, жидкостью десневой борозды, микрофлорой полости рта, источники некоторых белков неизвестны [18–21]. В качестве примера большого диапазона концентраций белков в слюне можно указать, что концентрация α -амилазы в ней измеряется в мг/мл, а интерлейкинов 6 и 8 – в пг/мл [22].

Следует особо отметить, что белкам и пептидам слюны присуща большая изменчивость, вызванная наличием сложных посттрансляционных модификаций, включающих гликозилирование, фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование, метилирование, дезаминирование, сульфатирование и протеолитический процессинг [13, 23]. Среди таких модификаций гликозилирование особенно важно, поскольку оно добавляет большую сложность в изучение(?) протеома слюны. Гликаны, возможно, являются наиболее распространенным и структурно разнообразным классом молекул в природе, поэтому их выделяют в так называемый «glycome» слюны. Их функциональные роли и влияние на болезни человека в настоящее время становятся более понятными в результате современных исследований гликома [24].

Несмотря на большие сложности в понимании роли белков слюны, которые вносит посттрансляционное модифицирование протеинов, M. Castagnola и соавт. указывают, что многие их посттрансляционные модификации, происходящие во время секреции, находятся под действием ферментов, характерных для других экзокринных и эндокринных желез, и, поскольку концентрация некоторых белков может отражать их концентрации в крови, наличие этих модификаций открывает огромные перспективы для использования слюны в качестве биологической жидкости для диагностики и прогнозирования заболеваний [18].

Некоторые слюнные пептиды и белки выделяются всеми основными железами, в то время как секреция других осуществляется только конкретными. Например, основные пролин-богатые белки выделяются только околоушными железами, в то время как цистатин S-типа в основном выделяется подчелюстными и подъязычными железами; кислые пролин-богатые белки и статерин секретируются во всех железах, хотя и в разных относительных количествах [25].

Выяснено, что состав слюны изменяется в зависимости от различных физиологических условий: пик базальной саливации приходится на середину дня, стимулированная саливация также непостоянна и определяется пищевыми стимулами, а также гидратацией слизистой и движениями губ и языка. При стимуляции доминирующими становятся околоушные железы, которые стимулируют образование слюны в 2 раза больше, чем подчелюстные. Концентрация белка в слюне соответствует этому слюноотделению [18]. Возраст является еще одним важным параметром, влияющим на слюнную протеому: недавние исследования показали, что секреция специфических пептидов заметно различается у детей и взрослых [26, 27].

Саливарные белковые маркеры и использование слюны в диагностике. Анализ и идентификация белков слюны являются важным условием как для определения биомаркеров заболеваний, так и для лучшего понимания физиологии слюны. В настоящее время протеомный анализ слюны важен для диагностики и мониторинга, а также для профилактики различных патологических состояний [15]. В настоящее время слюна используется для обнаружения ряда вирусных заболеваний (парентеральных гепатитов и ВИЧ), определения уровня гормонов и наркотиков [28, 29].

Определенные успехи достигнуты в поиске слюнных маркеров целого ряда заболеваний, в том числе системных.

Онкологические заболевания. Наибольшие надежды возлагались на протеомные методы в области поиска ранних маркеров онкологических заболеваний и, действительно, с их помощью были найдены маркеры нескольких видов рака.

Рак головы и шеи является весьма злокачественным опухолевым заболеванием. При помощи метода масс-спектрометрии были обнаружены белки-маркеры этого заболевания: аннексин A1, β - и γ -актины, цитокератины 4 и 13, цинксодержащие белки (zinc finger proteins), клеточный опухолевый антиген P53 [1]. С помощью протеомных методов были определены 26 маркеров плоскоклеточного орального рака, к которым отнесен ряд белков и пептидов, например: раково-эмбриональный антиген, интерлейкин-1, α -дефензин 1, TNF α CD44, фибронектин, тиоредоксин, повышенные уровни которых были найдены у обследованных больных. Показано, что трансферрин в слюне был весьма специфическим, чувствительным и точным маркером для раннего выявления рака полости рта [8]. При использовании сочетаний этих маркеров чувствительность составила 90%, специфичность – 83% [1].

Выявлен специфический пептид слюны s-erbB-2, более высокий уровень которого характерен для больных раком молочной железы в сравнении со здоровыми женщинами и женщинами с доброкачественными новообразованиями молочной железы [17, 30].

Zheng-Zhi Wu и соавт. [16] при исследовании слюны больных раком желудка обнаружены четыре белка

(1472,78, 2936,49, 6556,81 и 7081,17 Да), которые отсутствуют у здоровых людей и на основании которых могут быть построены скрининговые исследования.

Сахарный диабет. Р. Рао и соавт. [31] в исследованиях протеома слюны пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и здоровых людей выявлены различия в уровнях концентрации 487 белков и пептидов (при этом 33% из них ранее в слюне не находили). Концентрация 65 белков превышала уровень у здоровых более чем в 2 раза. Большинство этих белков регулирует обмен веществ и иммунный ответ. При диабете 1-го типа отмечено снижение уровня α -амилазы слюны [17].

Синдром Шегрена. Синдром Шегрена (СШ) – наследственное аутоиммунное ревматическое заболевание, занимающее второе место среди подобных заболеваний по распространенности. Слюнные железы являются основными мишенями при СШ, поэтому слюна рассматривается в качестве идеальной биологической жидкости для его диагностики [32]. При исследовании слюны методом масс-спектрометрии у больных в сравнении со здоровыми в диапазоне 10–200 кДа выявлено восемь масс-спектрометрических пиков более чем с двукратно увеличенной интенсивностью, отмечен рост β_2 -микроглобулина, лактоферрина, иммуноглобулина каппа легкой цепи, полииммуноглобулинового рецептора, лизоцима С и цистатина С на всех этапах СШ; наоборот, α -амилаза и карбоангидраза VI при СШ были обнаружены в более низкой концентрации [33, 34]. Отмечено также повышенное содержание в слюне больных СШ β_2 -микроглобулина, γ -глутамилтрансферазы, растворимого рецептора интерлейкина 2, неоптерина и γ -интерферона [10].

Стоматологические заболевания. Как это не парадоксально, но к настоящему времени при помощи протеомики слюны мало что удалось сделать для диагностики стоматологических заболеваний [13]. Это может объясняться тем, что привычные стоматологические заболевания (например, кариес или пародонтит), по-видимому, не являются однородными и могут быть вызваны целым рядом причин (в том числе и нарушениями микрофлоры полости рта) [9]. Например, исследования протеомных маркеров кариеса и кариеса корня зуба практически не выявили общих маркеров для этих случаев [35, 36].

S. Al-Tawneh и соавт. [9] констатировали, что за время исследования биомаркеров в слюне (до 2011 г.) их было выделено около 180. При этом для 87 было установлено повышение их уровня, для 63 – снижение, концентрация 30 варьировала в зависимости от особенностей исследуемого заболевания. Выяснено также, что большего диагностического эффекта можно добиться в результате комбинации биомаркеров, причем имеются данные об успешном использовании для этих целей комбинации белковых маркеров и РНК, а также исследований особенностей микробиоты ротовой полости [1, 9, 13, 29].

Проблемы протеомики слюны. Несмотря на несомненные успехи, достигнутые в выявлении слюнных маркеров как инфекционных, так и системных заболеваний, в настоящее время есть проблемы, не позволяющие использовать слюнные белковые маркеры в качестве основных. Таких препятствий несколько.

Во-первых, нет консенсуса по методу сбора материала для проведения анализа – большинство исследователей используют смешанную слюну, являющуюся интегративным результатом деятельности всех слюнных желез, микробиоты ротовой полости, продуктов

эпителиального происхождения и десневой жидкости. Другие, наоборот, считают более продуктивным сбор слюны, секретлируемой определенными железами [10, 15]. Обработка полученной слюны также проводилась разными авторами различно: наличествовало или отсутствовало центрифугирование, использование консервантов, ингибиторов протеаз, хранение при низких температурах, также различались и критерии исключения [37–40].

Во-вторых, в опубликованных работах использованы различные методические приемы для оценки саливарного протеома, что также делает невозможным корректное сопоставление полученных результатов и обуславливает различия в полученных данных [9, 17, 18].

В-третьих, в исследованиях разных авторов использованы выборки изучаемого биоматериала различной величины и в ряде случаев явно недостаточные для получения репрезентативных результатов [9].

И, в-четвертых, явно мала теоретическая база для эффективного поиска протеомных маркеров в слюне, поскольку недостаточно исследованы физиологические и биохимические особенности функционирования слюнных желез, особенности посттрансляционных модификаций слюнных белков на разных этапах их существования и катаболизма, а также механизмы взаимодействия различных протеинов с микробиотой ротовой полости [15, 41, 42]. В настоящее время считается, что наиболее перспективным является использование при анализе слюны совместных данных протеомики, геномики и микробиологических исследований [3, 41].

Заключение. Несмотря на то что уже опубликовано много данных, свидетельствующих о необычайно высоком потенциале слюны для целей диагностики, изучение опубликованных работ, посвященных этой проблеме, позволяет сделать основное заключение, что исследование протеома слюны находится на стадии накопления данных. Отсутствие стандартизации в сборе материала, методиках анализа, а также требований к репрезентативности выборок, на основании которых делаются заключения, вносит «разногласицу» в получаемые разными исследователями данные и создает преграды для их практического использования. Кроме того, к настоящему времени еще недостаточно изучена физиология и биохимия слюны и слюнных желез, а также особенности взаимодействия белков слюны с микроорганизмами ротовой полости.

Решение этих проблем и прежде всего унификация методов сбора материала и определения биомаркеров, а также комплексирование данных протеомики с результатами микробиологических и геномных исследований позволит сделать слюну в действительности идеальной биологической средой как для выявления заболеваний, так и для прогноза их течения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang A., Sun H., Wang P., Wang X. Salivary proteomics in biomedical research. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 415: 261–5.
2. Кочурова Е.В., Козлов С.В. Диагностические возможности слюны. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2014; 1: 13–5.
3. Zhang L., Xiao H., Wong D.T. Salivary biomarkers for clinical applications. *Mol. Diagn. Ther.* 2009; 13(4): 245–59.
4. Комарова Л.Г., Алексеева О.П. Саливалогия: монография. Нижний Новгород: издательство Нижегородской медицинской академии; 2006.
5. Кортоташвили Л.В., Колесов С.А., Успенская И.Д., Глушкова О.А., Усанова О.С. Новый способ определения степени тяже-

- сти целиакии у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; 6: 41–3.
6. Колесов С.А., Кортоташвили Л.В., Широкова Е.Ю., Потехин П.П., Спиридонова А.Б., Усанова О.С. и др. Концентрация эпидермального фактора роста в биосубстратах и количество макрофагов при заживлении дефекта у детей и подростков с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; 11: 11–3.
 7. Ai J.Y., Smith B., Wong D.T. Bioinformatics advances in saliva diagnostics. *Int. J. Oral. Sci.* 2012; 4(2): 85–7.
 8. Ghafourian S., Sekawi Z., Raftari M., Ali M.S. Application of proteomics in lab diagnosis. *Clin. Lab.* 2013; 59(5–6): 465–74.
 9. Al-Tarawneh S.K., Border M.B., Dibble C.F., Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *OMICs*. 2011; 15(6): 353–61.
 10. Hu S., Loo J.A., Wong D.T. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev. Proteomics*. 2007; 4(4): 531–8.
 11. Castagnola M., Cabras T., Iavarone F., Vincenzoni F., Vitali A., Pisano E. et al. Top-down platform for deciphering the human salivary proteome. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2012; 25(Suppl. 5): 27–43.
 12. Choi M. Saliva diagnostics integrate dentistry into general and preventive health care. *Int. J. Prosthodont.* 2010; 23(3): 189.
 13. Ruhl S. The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. *Expert Rev. Proteomics*. 2012; 9(1): 85–96.
 14. Spielmann N., Wong D.T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral. Dis.* 2011; 17(4): 345–54.
 15. Schulz B.L., Cooper-White J., Punyadeera C.K. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2013; 33(3): 246–59.
 16. Wu Z.Z., Wang J.G., Zhang X.L. Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15(7): 865–70.
 17. Al Kawas S., Rahim Z.H., Ferguson D.B. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch. Oral. Biol.* 2012; 57(1): 1–9.
 18. Castagnola M., Cabras T., Iavarone F., Fanali C., Nemolato S., Peluso G. et al. The human salivary proteome: a critical overview of the results obtained by different proteomic platforms. *Expert Rev. Proteomics*. 2012; 9(1): 33–46.
 19. Siqueira W.L., Salih E., Wan D.L., Helmerhorst E.J., Oppenheim F.G. Proteome of human minor salivary gland secretion. *J. Dent. Res.* 2008; 87(5): 445–50.
 20. Pisano E., Cabras T., Montaldo C., Piras V., Inzitari R., Olmi C. et al. Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESI-MS. *Eur. J. Oral. Sci.* 2005; 113(6): 462–8.
 21. Inzitari R., Cabras T., Pisano E., Fanali C., Manconi B., Scarano E. et al. HPLC-ESI-MS analysis of oral human fluids reveals that gingival crevicular fluid is the main source of oral thymosins beta(4) and beta(10). *J. Sep. Sci.* 2009; 32(1): 57–63.
 22. St John M.A., Li Y., Zhou X., Denny P., Ho C.M., Montemagno C., Shi W. et al. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* 2004; 130(8): 929–35.
 23. Oppenheim F.G., Salih E., Siqueira W.L., Zhang W., Helmerhorst E.J. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2007; 1098: 22–50.
 24. Hart G.W., Copeland R.J. Glycomics hits the big time. *Cell.* 2010; 143(5): 672–6.
 25. Messana I., Cabras T., Pisano E., Sanna M.T., Olianias A., Manconi B. et al. Trafficking and postsecretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides: a proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics*. 2008; 7(5): 911–26.
 26. Cabras T., Pisano E., Boi R., Olianias A., Manconi B., Inzitari R. et al. Age-dependent modifications of the human salivary secretory protein complex. *J. Proteome Res.* 2009; 8(8): 4126–34.
 27. Castagnola M., Inzitari R., Fanali C., Iavarone F., Vitali A., Desiderio C. et al. The surprising composition of the salivary proteome of preterm human newborn. *Mol. Cell. Proteomics*. 2011; 10(1): M110.003467.
 28. Castagnola M., Cabras T., Vitali A., Sanna M.T., Messana I. Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends Biotechnol.* 2011; 29(8): 409–18.
 29. Yoshizawa J.M., Schafer C.A., Schafer J.J., Farrell J.J., Paster B.J., Wong D.T. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(4): 781–91.
 30. 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.
 31. Rao P.V., Reddy A.P., Lu X., Dasari S., Krishnaprasad A., Biggs E. et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J. Proteome Res.* 2009; 8(1): 239–45.
 32. Baldini C., Gallo A., Perez P., Mosca M., Alevizos I., Bombardieri S. Saliva as an ideal milieu for emerging diagnostic approaches in primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2012; 30(5): 785–90.
 33. Giusti L., Baldini C., Bazzichi L., Ciregia F., Tonazzini I., Mascia G. et al. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for rheumatic diseases—the example of Sjögren's syndrome. *Proteomics*. 2007; 7(10): 1634–43.
 34. Ryu O.H., Atkinson J.C., Hoehn G.T., Illei G.G., Hart T.C. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45(9): 1077–86.
 35. Preza D., Thiede B., Olsen I., Grinde B. The proteome of the human parotid gland secretion in elderly with and without root caries. *Acta Odontol. Scand.* 2009; 67(3): 161–9.
 36. Vitorino R., de Moraes Guedes S., Ferreira R., Lobo M.J., Duarte J., Ferrer-Correia A.J. et al. Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. *Eur. J. Oral. Sci.* 2006; 114(2): 147–53.
 37. Inzitari R., Cabras T., Rossetti D.V., Fanali C., Vitali A., Pellegrini M. et al. Detection in human saliva of different statherin and P-B fragments and derivatives. *Proteomics*. 2006; 6(23): 6370–9.
 38. Helmerhorst E.J., Sun X., Salih E., Oppenheim F.G. Identification of Lys-Pro-Gln as a novel cleavage site specificity of saliva-associated proteases. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(29): 19957–66.
 39. Messana I., Inzitari R., Fanali C., Cabras T., Castagnola M. Facts and artifacts in proteomics of body fluids. What proteomics of saliva is telling us? *J. Sep. Sci.* 2008; 31(11): 1948–63.
 40. Vitorino R., Lobo M.J., Duarte J.A., Ferrer-Correia A.J., Domingues P.M., Amado F.M. Analysis of salivary peptides using HPLC-electrospray mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 2004; 18(8): 570–5.
 41. Siqueira W.L., Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *Proteomics Clin. Appl.* 2011; 5(11–12): 575–9.
 42. Amado F., Lobo M.J., Domingues P., Duarte J.A., Vitorino R. Salivary peptidomics. *Expert. Rev. Proteomics*. 2010; 7(5): 709–21.

REFERENCES

1. Zhang A., Sun H., Wang P., Wang X. Salivary proteomics in biomedical research. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 415: 261–5.
2. Kochurova E.V., Kozlov S.V. Saliva diagnostic capabilities. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2014; 1: 13–5. (in Russian)
3. Zhang L., Xiao H., Wong D.T. Salivary biomarkers for clinical applications. *Mol. Diagn. Ther.* 2009; 13(4): 245–59.
4. Komarova L.G., Alekseeva O.P. *Salivalogy: Monography [Salivalogiya: Monografiya]*. Nizhny Novgorod: Izdatel'stvo Nizhegorodskoy meditsinskoy akademii. 2006. (in Russian)
5. Korkotashvili L.V., Kolesov S.A., Uspenskaya I.D., Glushkova O.A., Usanova O.S. A new method to determine celiac disease severity in children. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2009; 6: 41–3. (in Russian)
6. Kolesov S.A., Korkotashvili L.V., Shirokova E.Yu., Potekhin P.P., Spiridonova A.B., Usanova O.S. et al. Content of epidermal growth factor in biosubstrates and macrophage count in defect healing in children and adolescents with duodenal ulcer disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2010; 11: 11–3. (in Russian)
7. Ai J.Y., Smith B., Wong D.T. Bioinformatics advances in saliva diagnostics. *Int. J. Oral. Sci.* 2012; 4(2): 85–7.
8. Ghafourian S., Sekawi Z., Raftari M., Ali M.S. Application of proteomics in lab diagnosis. *Clin. Lab.* 2013; 59(5–6): 465–74.
9. Al-Tarawneh S.K., Border M.B., Dibble C.F., Bencharit S. Defining

- salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *OMICs*. 2011; 15(6): 353–61.
10. Hu S., Loo J.A., Wong D.T. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev. Proteomics*. 2007; 4(4): 531–8.
 11. Castagnola M., Cabras T., Iavarone F., Vincenzoni F., Vitali A., Pisano E. et al. Top-down platform for deciphering the human salivary proteome. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2012; 25(Suppl. 5): 27–43.
 12. Choi M. Saliva diagnostics integrate dentistry into general and preventive health care. *Int. J. Prosthodont.* 2010; 23(3): 189.
 13. Ruhl S. The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. *Expert Rev. Proteomics*. 2012; 9(1): 85–96.
 14. Spielmann N., Wong D.T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral. Dis.* 2011; 17(4): 345–54.
 15. Schulz B.L., Cooper-White J., Punyadeera C.K. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2013; 33(3): 246–59.
 16. Wu Z.Z., Wang J.G., Zhang X.L. Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15(7): 865–70.
 17. Al Kawas S., Rahim Z.H., Ferguson D.B. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch. Oral. Biol.* 2012; 57(1): 1–9.
 18. Castagnola M., Cabras T., Iavarone F., Fanali C., Nemolato S., Peluso G. et al. The human salivary proteome: a critical overview of the results obtained by different proteomic platforms. *Expert Rev. Proteomics*. 2012; 9(1): 33–46.
 19. Siqueira W.L., Salih E., Wan D.L., Helmerhorst E.J., Oppenheim F.G. Proteome of human minor salivary gland secretion. *J. Dent. Res.* 2008; 87(5): 445–50.
 20. Pisano E., Cabras T., Montaldo C., Piras V., Inzitari R., Olmi C. et al. Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESI-MS. *Eur. J. Oral. Sci.* 2005; 113(6): 462–8.
 21. Inzitari R., Cabras T., Pisano E., Fanali C., Manconi B., Scarano E. et al. HPLC-ESI-MS analysis of oral human fluids reveals that gingival crevicular fluid is the main source of oral thymosins beta(4) and beta(10). *J. Sep. Sci.* 2009; 32(1): 57–63.
 22. St John M.A., Li Y., Zhou X., Denny P., Ho C.M., Montemagno C., Shi W. et al. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* 2004; 130(8): 929–35.
 23. Oppenheim F.G., Salih E., Siqueira W.L., Zhang W., Helmerhorst E.J. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2007; 1098: 22–50.
 24. Hart G.W., Copeland R.J. Glycomics hits the big time. *Cell*. 2010; 143(5): 672–6.
 25. Messana I., Cabras T., Pisano E., Sanna M.T., Olianias A., Manconi B. et al. Trafficking and postsecretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides: a proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics*. 2008; 7(5): 911–26.
 26. Cabras T., Pisano E., Boi R., Olianias A., Manconi B., Inzitari R. et al. Age-dependent modifications of the human salivary secretory protein complex. *J. Proteome Res.* 2009; 8(8): 4126–34.
 27. Castagnola M., Inzitari R., Fanali C., Iavarone F., Vitali A., Desiderio C. et al. The surprising composition of the salivary proteome of preterm human newborn. *Mol. Cell. Proteomics*. 2011; 10(1): M110.003467.
 28. Castagnola M., Cabras T., Vitali A., Sanna M.T., Messana I. Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends Biotechnol.* 2011; 29(8): 409–18.
 29. Yoshizawa J.M., Schafer C.A., Schafer J.J., Farrell J.J., Paster B.J., Wong D.T. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(4): 781–91.
 30. 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.
 31. Rao P.V., Reddy A.P., Lu X., Dasari S., Krishnaprasad A., Biggs E. et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J. Proteome Res.* 2009; 8(1): 239–45.
 32. Baldini C., Gallo A., Perez P., Mosca M., Alevizos I., Bombardieri S. Saliva as an ideal milieu for emerging diagnostic approaches in primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2012; 30(5): 785–90.
 33. Giusti L., Baldini C., Bazzichi L., Ciregia F., Tonazzini I., Mascia G. et al. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for rheumatic diseases—the example of Sjögren's syndrome. *Proteomics*. 2007; 7(10): 1634–43.
 34. Ryu O.H., Atkinson J.C., Hoehn G.T., Illei G.G., Hart T.C. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45(9): 1077–86.
 35. Preza D., Thiede B., Olsen I., Grinde B. The proteome of the human parotid gland secretion in elderly with and without root caries. *Acta Odontol. Scand.* 2009; 67(3): 161–9.
 36. Vitorino R., de Moraes Guedes S., Ferreira R., Lobo M.J., Duarte J., Ferrer-Correia A.J. et al. Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. *Eur. J. Oral Sci.* 2006; 114(2): 147–53.
 37. Inzitari R., Cabras T., Rossetti D.V., Fanali C., Vitali A., Pellegrini M. et al. Detection in human saliva of different statherin and P-B fragments and derivatives. *Proteomics*. 2006; 6(23): 6370–9.
 38. Helmerhorst E.J., Sun X., Salih E., Oppenheim F.G. Identification of Lys-Pro-Gln as a novel cleavage site specificity of saliva-associated proteases. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(29): 19957–66.
 39. Messana I., Inzitari R., Fanali C., Cabras T., Castagnola M. Facts and artifacts in proteomics of body fluids. What proteomics of saliva is telling us? *J. Sep. Sci.* 2008; 31(11): 1948–63.
 40. Vitorino R., Lobo M.J., Duarte J.A., Ferrer-Correia A.J., Domingues P.M., Amado F.M. Analysis of salivary peptides using HPLC-electrospray mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 2004; 18(8): 570–5.
 41. Siqueira W.L., Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *Proteomics Clin. Appl.* 2011; 5(11–12): 575–9.
 42. Amado F., Lobo M.J., Domingues P., Duarte J.A., Vitorino R. Salivary peptidomics. *Expert Rev. Proteomics*. 2010; 7(5): 709–21.

Поступила 06.09.14

Received 06.09.14