

## ABSTRACT

## Spytbaseret diagnostik af sygdomme i mundhulen

Det er velkendt, at spytet spiller en afgørende rolle for opretholdelse af mundhulens homeostase, og derfor har spytet også haft en central position i forskellige aspekter af odontologisk forskning gennem tiderne. Indenfor de seneste årtier har der været særlig fokus på anvendelse af spytet som biomateriale til screening for potentielle biomarkører, der kan anvendes til diagnostik og sygdomsmonitorering. Spyt er velegnet til dette formål, idet det i modsætning til andre biologiske prøvematerialer som blod og dentale plakprøver kan indsamles let og non-invasivt. Spytet udmærker sig desuden ved, at det indeholder et væld af biologisk materiale i form af afstødte humane celler, bakterier, DNA, RNA og proteiner, som potentielt kan sladre om tilstedeværelse af sygdomme i mundhulen og i resten af kroppen. Endvidere har den teknologiske udvikling betydet, at spytet især indenfor det seneste årti har været genstand for omfattende biomarkørforskning til diagnostik af en række orale sygdomme, herunder caries, marginal parodontitis og oral cancer, men også systemiske sygdomme som Sjögrens syndrom.

# Hvad kommer spytbaseret diagnostik til at betyde i klinisk odontologi fremover?

Daniel Belstrøm, adjunkt, ph.d., Sektion for Parodontologi og Oral Mikrobiologi, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Anne Marie Lynge Pedersen, lektor, ph.d., Sektion for Oral Patologi og Medicin, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Accepteret til publikation den 3. marts 2017

Gennem årtier har forebyggelse fremfor behandling haft høj prioritet inden for odontologisk klinik og forskning. Interessen for at identificere biomarkører er således øget markant de seneste årtier indenfor såvel oral som almen sundheds- og sygdomsforskning. I 1970 blev der publiceret 50 internationale artikler omhandlende biomarkøranalyser, mens dette tal var steget til 19.367 artikler i 2015 (Fig. 1). Det er formålet med denne fokusartikel at give et indblik i den seneste udvikling indenfor brug af spyt som fremtidigt biologisk materiale til screening og identifikation af orale sygdomme. Det er udenfor rammerne af denne fokusartikel at give en udtømmende fremstilling af dette forskningsfelt, men den præsenterer centrale eksempler på den nyeste udvikling indenfor spytbaseret screening af orale sygdomme og systemiske sygdomme med indflydelse på spytkirtelfunktionen.

### Hvorfor bruge spyt til biomarkøranalyser?

Blodprøver har traditionelt været benyttet til biomarkørstudier af mundslimhindelidelser som fx oral lichen planus, mens plakprøver (såvel supragingivale som subgingivale) har været de foretrukne prøvematerialer til studier af ætiopatogenetiske forhold ved caries og marginal parodontitis. Disse prøvematerialer har det til fælles, at de kan være teknisk vanskelige at indsamle, og mange patienter kan grundet nålefofi have vanskeligt ved at få taget en blodprøve. Den åbenlyse for-

### EMNEORD

Saliva; biomarker; microRNA; bacteria; microbiome

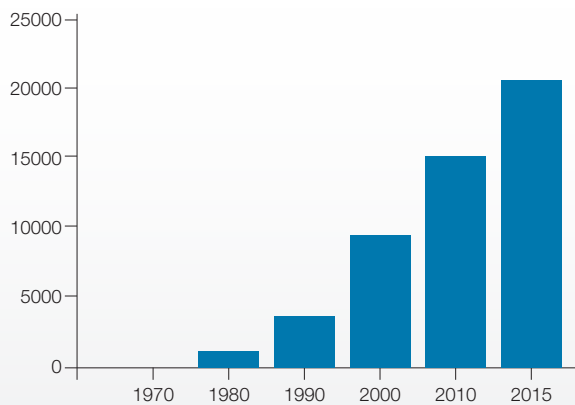
hold ved caries og marginal parodontitis. Disse prøvematerialer har det til fælles, at de kan være teknisk vanskelige at indsamle, og mange patienter kan grundet nålefofi have vanskeligt ved at få taget en blodprøve. Den åbenlyse for-



Henvisning til forfatter:  
Daniel Belstrøm, email: dbel@sund.ku.dk



## Biomarkørstudier



**Fig. 1.** Antal internationale videnskabelige artikler vedrørende biomarkører publiceret i årene 1970, 1980, 1990, 2000, 2010 og 2015 (Kilde: www.pubmed.com).

**Fig. 1.** Number of international biomarker-associated scientific papers published in years 1970, 1980, 1990, 2000, 2010 and 2015 (www.pubmed.com).

del ved at anvende spyt fremfor blod eller plakprøver til diagnostik er, at helspyt kan indsamles på en let og non-invasiv måde, hvilket betyder, at de fleste personalegrupper på klinikken kan indgå aktivt i indsamling af spytp prøver. Spytoppsamling er ikke forbundet med ubehag, hvilket gør, at de fleste patientkategorier, herunder børn, kan acceptere at få taget en spytp prøve (1).

Studier har vist, at spyt indeholder en række biologiske substanser, som potentielt kan benyttes som biomarkører. Spyt indeholder mere end 2.200 forskellige proteiner, hvoraf over 1.100 er unikke for spytet, og der kan således ikke screenes for disse i en blodprøve (2). Derudover er mikrobiomet (bakterier, gærsvampe og virus) i spyt særdeles mangfoldigt. En milliliter spyt indeholder mere end 100 millioner bakterier, og der er som oftest mere end 200 forskellige typer bakterier til stede i en spytp prøve (3). Endelig indeholder spyt humant biologisk materiale i form af DNA og RNA, bl.a. fra afstødte mundslimhindeepitelceller, leukocytter og erythrocytter. Den lette prøveindsamling og det rige indhold af biologisk materiale gør således spytet særdeles velegnet som medium for biomarkøranalyser.

### Hvad er den nyeste udvikling indenfor spytbaseret biomarkørforskning?

#### Marginal parodontitis og caries

Der er som udgangspunkt en tæt sammenhæng mellem de patogenetiske mekanismer ved en given sygdom, og hvilke biologiske komponenter der anses som relevante biomarkører for den selvsamme sygdom. På denne baggrund er det således ikke overraskende, at den bakterielle sammensætning i spyt har væ-

## KLINISK RELEVANS

Hyppige orale sygdomstilstande som caries og marginal parodontitis, men også mere alvorlige sygdomme som oral cancer og Sjögrens syndrom diagnosticeres ofte på et relativt sent tidspunkt, og ofte når der er opstået komplikationer. Dette medfører også en dårligere prognose for behandling. Der er således behov for udvikling af nye diagnostiske metoder til tidlig identifikation af orale sygdomme og sygdomme med påvirkning af mundhu-

len for at kunne iværksætte en tidlig og individualiseret forebyggende behandling. Helspyt, dvs. det blandede sekret, som findes i mundhulen, og som udgør det samlede bidrag af spyt fra alle spytkirtler, kan relativt nemt og billigt indsamles af tandlægen, hvorfor det er oplagt, at tandlægen i fremtiden som supplement til den kliniske og radiologiske undersøgelse rutinemæssigt vil benytte analyse af spyt til diagnostik af orale sygdomme.

ret rigt undersøgt hos patienter med marginal parodontitis og caries, da orale bakterier menes at have en central betydning for udvikling af disse sygdomme. Et nyere finsk studie har vist, at den samtidige tilstedeværelse af *Porphyromonas gingivalis* og *Tannerella forsythia* i spyt var associeret med en odds-ratio på 2,61 for marginal parodontitis (4). Et andet nyere kinesisk studie af 40 børn med og uden caries viste, at *Streptococcus mutans* var signifikant hyppigere til stede i spyt fra børn med caries (5). Ligeledes fandt et nyligt publiceret studie fra 2016 baseret på analyse af tyggestimulerede helspytp prøver fra KRAM-undersøgelsen en forskellig bakteriell sammensætning i spyt hos voksne personer med og uden caries (6). Den inflammatoriske reaktion, der kendetegner gingivitis og marginal parodontitis, har ligeledes været genstand for biomarkøranalyser, og resultaterne af to nyligt publicerede studier antyder, at der i spyt fra personer med marginal parodontitis kan påvises forhøjede niveauer af interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (7) samt forøget aktivitet af komplementsystemet (8) sammenlignet med raske kontrolpersoner. På baggrund af disse lovende resultater synes det plausibelt, at tandlægen i fremtiden kommer til at bruge screening af spyt for indholdet af en kombination af specifikke bakterier og inflammatoriske markører i forbindelse med risikovurdering for udvikling af caries og marginal parodontitis.

#### Oral cancer

Præmaligne mundslimhindelidelser og maligne tilstande som det orale planocellulære karcinom har været genstand for intens biomarkørrelateret forskningsaktivitet. Spytets indhold af

humant DNA, RNA, microRNA (miRNA) og protein har været undersøgt som potentielle biomarkører for oralt planocellulært karcinom. Det er i den forbindelse værd at fremhæve et nyligt publiceret studie, som på baggrund af kortlægning af indholdet af immunrelaterede spytpoteiner kunne identificere oralt planocellulært karcinom med en sensitivitet på 90 % (9). Endvidere viste en undersøgelse af 180 personer fra Taiwan, at screening af spyt for syv forskellige messenger RNA (mRNA) og to spytpoteiner kunne anvendes til at diskriminere patienter med oralt planocellulært karcinom fra raske kontrolpersoner med et AUC (area under curve) på 0,87 (10). Der er således meget, der tyder på, at det på sigt vil være muligt at anvende analyse af spyt for udvalgte biomarkører ved screening for oral cancer.

### Sjögrens syndrom

Sjögrens syndrom er en relativt almindelig forekommende systemisk autoimmun bindevævssygdom, der angriber de eksokrine kirtler, herunder især spytkirtlerne (11). Diagnosen stilles ofte med års forsinkelse, hvilket primært skyldes, at sygdommen er forbundet med en række uspecifikke symptomer og varierende grad af organinvolvering. Udredningen for Sjögrens syndrom er ressourcekrævende og besværlig og indebærer invasive indgreb som læbespytkirtelbiopsi og blodprøver. Eftersom der ikke er påvist sygdomsspecifikke kliniske eller laboratoriemæssige markører for Sjögrens syndrom, er det væsentligt at få identificeret biomarkører, der dels muliggør differentiering mellem patienter med Sjögrens syndrom og patienter, der ikke har Sjögrens syndrom, men Sjögren-lignende symptomer, dels bidrager til tidligere diagnostik af sygdommen for derved at kunne forebygge konsekvenserne af bl.a. nedsat tåre- og spytksekretion.

Et stigende antal studier tyder på, at patienter med primært Sjögrens syndrom har en række kvantitative og kvalitative ændringer i serum, spyt og spytkirtelvæv, men det er endnu ikke lykkedes at finde markører, der er tilstrækkelig sensitive og sygdomsspecifikke (12). Et nyere studie har vist, at spytets indhold af profilin var tre gange forøget og kulsyreanhydrase I (CA-I) halvanden gang mindsket hos patienter med primært Sjögrens syndrom sammenlignet med raske kontrolpersoner (13). Studiet omfattede dog et begrænset antal patienter, og den diagnostiske sensitivitet og specificitet blev ikke angivet. I et andet studie med anvendelse af proteom-analysemetoder påvistes signifikant forøgede niveauer af interleukin 4 (IL-4), IL-5 og clusterin i spyt fra patienter med primært Sjögrens syndrom sammenlignet med patienter med reumatoid arthritis og raske kontrolpersoner (14). Kombinationen af forøget IL-4, IL-5 og clusterin kunne prædikere 93,8 % af sygdomstilfældene. Der indgik imidlertid en mindre gruppe patienter i studiet, og yderligere testning og validering af disse biomarkører er nødvendig. I et andet nyligt studie påvistes antistoffer rettet mod en specifik receptor, den muskarine, kolinerge type 3-receptor, hos 119 yngre patienter med primært Sjögrens syndrom. Den diagnostiske sensitivitet var 88 % (15). Studiet er interessant, idet

tilstedeværelsen af intakte muskarine receptorer af typen M3 er centrale for igangsættelse af spytksekretionen med et højt vand- og proteinindhold. Hæmning af denne receptor kan således bidrage til den betydeligt reducerede spytksekretion, der er hos patienter med Sjögrens syndrom (16). Yderligere validering af dette fund er nødvendig, men rummer spændende perspektiver ikke blot i relation til tidlig og korrekt diagnostik, men også i relation til behandlingsmuligheder.

### MikroRNA (miRNA)

MiRNA (ikke-kodende DNA) spiller en afgørende rolle for genekspressionen i celler af hæmatopoetisk oprindelse, idet miRNA kan påvirke celledifferentieringen samt cellernes immunologiske respons, bl.a. i forbindelse med autoimmunitet og en række cancertyper (17). Analyser af miRNA-ekspressionen i spyt er derfor naturligt nok genstand for omfattende forskning indenfor bl.a. autoimmune sygdomme og cancer. I serum og spyt er hovedparten af detekterbare miRNA indkapslet og koncentreret i exosomer (18).

Nogle af disse studier tyder på, at der finder en dysregulering sted af miRNA-ekspressionen ved Sjögrens syndrom. Dette er hovedsageligt påvist i perifere blodceller, hvor miRNA-146a er fundet opreguleret og miRNA-155 nedreguleret hos patienter med primært Sjögrens syndrom i forhold til raske kontrolpersoner (19) og i spytkirtelvæv, hvor miRNA-profilen også er fundet ændret hos patienter med Sjögrens syndrom (20). Tilsvarende har et nyt studie vist opregulering af miRNA-203 i mundslimhindebiopsier fra patienter med oral lichen planus, men dette har ikke været muligt at påvise i helspyt ved brug af PCR-analyser (21). Der er ingen tvivl om, at udviklingen af mere sensitive metoder vil gøre det muligt i fremtiden at anvende miRNA-profilen i spyt som biomarkør for en lang række sygdomme (22).

### Hvilke udfordringer er der i forhold til anvendelse af spyt til screening af sygdomme i fremtiden?

På trods af de indlysende fordele ved at kunne anvende spyt frem for blod som biologisk materiale til påvisning af biomarkører og det stigende antal studier, som har påvist relevante biomarkører i spyt til identifikation af orale sygdomme, er der dog fortsat forhold, som begrænser anvendelsen af spyt til rutinemæssig screening og diagnostik i den odontologiske klinik. Det er således nødvendigt at teste sensitiviteten og specificiteten af potentielle biomarkører i større populationer og i nogle tilfælde også i relation til blod og væv. Herudover er der fortsat en række teknologiske begrænsninger, idet mange af de benyttede analysemetoder er særdeles omstændelige og omkostningstunge. Det vil i praksis betyde, at hvis tandlægen skulle implementere de nuværende metoder til daglig brug i praksis, ville det kræve omfattende investeringer i større molekylærbiologiske laboratorier og omfattende videreuddannelse i betjeningen af disse. På nuværende tidspunkt er det således ikke rentabelt at introducere spytbaseret diagnostik og screening i tandklinik-

ken. De fremtidige udfordringer ligger i udviklingen af *point of care*-teknologi, som let og billigt sikrer relevant diagnostik af en given biomarkør i tandlægestolen. Screening for diabetes er et godt eksempel på, hvorledes dette kan fungere i praksis. I stedet for brug af fastebloodsukker anvendes i dag en priktest, hvor glykosyleret hæmoglobin (HbA1c) aflæses direkte på klinikken indenfor få minutter. Denne udvikling betyder, at det nu i teorien er muligt for tandlægen at screene risikopatienter for diabetes, hvilket for nylig blev afprøvet i et studie på Tandlægeskolen i København (23). Som anført pågår der en intens forskning in-

denfor identifikation af potentielle biomarkører i spyt, og som følge heraf er der også mange kommercielle interesser på spil. Der sælges allerede i dag en lang række spytbaserede tests bl.a. på internettet, hvoraf flere er uden videnskabelig evidens og deres praktiske anvendelighed særdeles tvivlsom.

Et af de hurtigst voksende områder inden for spytforskning er kortlægning af spyttets proteom og mikrobiom, og der er ingen tvivl om, at disse kortlægninger vil bidrage til identifikation af en lang række biomarkører, som i fremtiden vil kunne give information om det enkelte individs orale og almene sundhedstilstand.

## ABSTRACT (ENGLISH)

### What will saliva based diagnostics mean in clinical odontology in the future

Saliva is critical for maintenance of oral homeostasis, which is why saliva has been widely focused upon within various aspects of research. During past decades, much attention has been paid to screening of saliva for the content of potential biomarkers to identify and monitor the presence of various diseases. As compared to blood and dental plaque sampling, saliva is highly suitable for biomarker analysis, because saliva can be

easily and non-invasively collected. Moreover, the tremendous technological development in molecular biological methods that can be applied to saliva samples containing human cells, bacteria, DNA, RNA and proteins, may lead to new ways to reveal presence of oral and medical diseases. This development has fuelled a comprehensive research activity on biomarkers for identification of oral diseases such as periodontitis, dental caries and oral cancer, but also medical diseases including Sjogren's syndrome.

## Litteratur

- Yoshizawa JM, Schafer CA, Schaf-er JJ et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:781-91.
- Loo JA, Yan W, Ramachandran P et al. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res* 2010;89:1016-23.
- Belstrom D, Paster BJ, Fiehn N-E et al. Salivary bacterial fingerprints of established oral disease revealed by the Human Oral Microbe Identification using Next Generation Sequencing (HOMINGS) technique. *J Oral Microbiol* 2016;8:30170.
- Salmiinen A, Kopra KA, Hyvarinen K et al. Quantitative PCR analysis of salivary pathogen burden in periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:69.
- Ma C, Chen F, Zhang Y et al. Comparison of oral microbial profiles between children with severe early childhood caries and caries-free children using the human oral microbe identification microarray. *PLoS One* 2015;10:e0122075.
- Belstrøm D, Holmstrøm P, Fiehn N-E et al. Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience. *J Oral Microbiol* 2017;9:1270614.
- Liukkonen J, Gursøy UK, Pussinen PJ et al. Salivary concentrations of Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-17A, and IL-23 vary in relation to periodontal status. *J Periodontol* 2016;87:1484-91.
- Belstrøm D, Jersie-Christensen RR, Lyon D et al. Metaproteomics of saliva identifies human protein markers specific for individuals with periodontitis and dental caries compared to orally healthy controls. *PeerJ* 2016;4:e2433.
- Winck FV, Prado Ribeiro AC, Ramos DR et al. Insights into immune responses in oral cancer through proteomic analysis of saliva and salivary extracellular vesicles. *Sci Rep* 2015;5:16305.
- Wang X, Kaczor-Urbanowicz KE, Wong DT. Salivary biomarkers in cancer detection. *Med Oncol* 2017;34:7.
- Pedersen AML. Diseases causing oral dryness. In: Carpenter G, ed. *Dry Mouth: A Clinical Guide on Causes, Effects and Treatments*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2014;7-31.
- Fleissig Y, Deutsch O, Reichenberg E et al. Different proteomic protein patterns in saliva of Sjögren's syndrome patients. *Oral Dis* 2009;15:61-8.
- Deutsch O, Krief G, Kontinen YT et al. Identification of Sjögren's syndrome oral fluid biomarker candidates following high-abundance protein depletion Rheumatology (Oxford) 2015;54:884-90.
- Delaleu N, Mydel P, Kwee I et al. High fidelity between saliva proteomics and the biologic state of salivary glands defines biomarker signatures for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:1084-95.
- Jayakanthan K, Ramya J, Mandal SK et al. Younger patients with primary Sjögren's syndrome are more likely to have salivary IgG anti-muscarinic acetylcholine receptor type 3 antibodies. *Clin Rheumatol* 2016;35:657-62.
- Pedersen AM, Dissing S, Fahrenkrug J et al. Innervation pattern and Ca<sup>2+</sup> signalling in labial salivary glands of healthy individuals and patients with primary Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med* 2000;29:97-109.
- Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol* 2016;231:25-30.
- Gallo A, Tandon M, Alevizos I et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 2012;7:e30679.
- Shi H, Zheng LY, Zhang P et al. miR-146a and miR-155 expression in PBMCs from patients with Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med* 2014;43:792-7.
- Alevizos I, Alexander S, Turner JR et al. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 2011;63:535-44.
- Lundegard M, Nylander K, Danielsson K. Difficulties detecting miRNA-203 in human whole saliva by the use of PCR. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015;20:e130-4.
- Fehlmann T, Ludwig N, Backes C et al. Distribution of microRNA biomarker candidates in solid tissues and body fluids. *RNA Biol* 2016;13:1084-1088.
- Holm NC, Belstrøm D, Ostergaard JA et al. Identification of individuals with undiagnosed diabetes and pre-diabetes in a Danish cohort attending dental treatment. *J Periodontol* 2016;87:395-402.