

УДК 616.31.614

ВОЗМОЖНОСТИ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПУТЁМ АНАЛИЗА
МЕТАБОЛИТОВ СЛЮНЫ.

Прокопьева С.Р., Шамитова Е.Н., Николаева Н.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»

(428000, Российская Федерация, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Московский проспект 45

Медицинский университет имени И.Н.Ульянова),

e-mail: pii75@rambler.ru

Ключевые слова: экспресс-диагностика; ротовая жидкость; метаболизм; биомаркеры

Многие столетия человечество стремится создать приспособления, которые смогли бы упростить или вовсе решить поставленную задачу за человека. Для этого исследователи и врачи все больше уделяют внимание изучению слюнных желез.

Анализ слюны — это современный метод диагностики, который используется для определения различных инфекций в организме. В настоящее время раннее выявление заболевания играет решающую роль в успешной терапии. Чем раньше выявляется болезнь, тем вероятней ее успешное лечение. Исследования слюны является одним из перспективных направлений в клинической лабораторной диагностике для выявления различных заболеваний и наблюдений состояния здоровья. С каждым днем большую актуальность приобретает использование слюны вместо крови в качестве нетрадиционного материала для клинико-лабораторной диагностики инфицирования вирусами СПИДа, гепатита типа В и др. Это в первую очередь простота сбора материала, не инвазивность и безболезненность этой процедуры, а также отсутствие риска инфицирования и возможность многократного получения проб. Таким образом, слюна все шире используется не только в клинической практике, но и для проведения гигиенических и токсикологических исследований, также при изучении фармакодинамики лекарственных средств или при обследовании человека в экстремальных условиях.

POSSIBILITIES OF EARLY DIAGNOSTICS OF DISEASES BY SALIVARY METABOLITES ANALYSIS .

Prokopyeva S.R., Shamitova E.N., Nikolaeva N.V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "I.N. Chuvash State University
Ulyanova

(428000, Russian Federation, Chuvash Republic, Cheboksary, Moskovsky Prospect 45

Medical University named after IN Ulyanov),

e-mail: pii75@rambler.ru

Key words: express diagnostics, oral fluid, metabolism, biomarkers

For many centuries, mankind has sought to create devices that could simplify or completely solve the task for a person. To this end, researchers and doctors are increasingly paying attention to the study of the salivary glands.

Saliva analysis is a modern diagnostic method that is used to detect various infections in the body. Currently, early detection of the disease plays a crucial role in successful therapy. The earlier the disease is detected, the more likely its successful treatment. The study of saliva is one of the promising areas in clinical laboratory diagnostics for the detection of various diseases and health status observations. Every day, the use of saliva instead of blood as an unconventional material for the clinical and laboratory diagnosis of infection with the AIDS virus, hepatitis type B, etc., becomes more important. This is, first of all, simplicity of material collection, not invasiveness and painlessness of this procedure, as well as no risk of infection and the possibility of multiple samples. Thus, saliva is increasingly being used not only in clinical practice, but also for carrying out hygienic and toxicological studies, also when studying the pharmacodynamics of drugs or when examining a person under extreme conditions.

Развитие методов диагностики слюны идет в двух направлениях:

- 1) Расширяется диапазон исследуемых биомаркеров различных заболеваний в компонентах слюны.
- 2) Благодаря постоянному развитию технологий повышается чувствительность к биомаркерам заболеваний.

Люди знают о важности регулярных медицинских осмотров; однако большинство хронических заболеваний не диагностируется, пока болезненные симптомы не станут очевидными на поздней стадии. Чтобы преодолеть эту проблему, медицинские исследователи направляют свою работу на поиск биомаркеров молекулярных заболеваний, которые диагностируют заболевание на ранней стадии. Этими маркерами могут быть ДНК, РНК или белковые молекулы, которые действуют как индикаторы, отражающие определенные физиологические состояния. За прошедшее десятилетие ученые продемонстрировали, что генетические изменения человека могут быть обнаружены как внутриклеточно, так и внеклеточно с помощью молекулярной диагностики. Много работ ученых было посвящено выделению нуклеиновых кислот или специфических белков из различных биологических материалов (слюна, моча, кал и спинномозговая жидкость) [1,2]. За последние десятилетия молекулярная диагностика доказала свою ценность в клинических применениях [3,4].

С 2002 года Национальный институт стоматологических и черепно-лицевых исследований (НИСиЧЛИ) США занимается изучением пероральных жидкостей в качестве

диагностического инструмента для оценки состояния здоровья и заболеваемости. Слюна, ротовая жидкость, которая содержит большое количество белков, генетических молекул, легко доступных с помощью абсолютно не инвазивного подхода. Разработка быстрых, неинвазивных и недорогих методов определения инфекционных заболеваний и критических состояний организма является одним из важных направлений в развитии экспресс-диагностики, основанной на анализе маркеров непосредственно у постели больного. Методы экспресс-диагностики позволяют диагностировать вне лаборатории некоторые патологические состояния организма в достаточно короткие сроки. «Быстрый анализ» приобретает особое значение в тех областях, где лабораторные услуги недоступны для населения из-за расстояний или финансовых возможностей населения. Несомненным преимуществом является сокращение времени с момента постановки диагноза до начала лечения или оказания первой неотложной помощи. Для пациентов, особенно детей, минимальный риск заражения и отсутствие физического и эмоционального дискомфорта является первостепенным значением при сдаче анализа. Целью данной работы является анализ и обобщение современных научных данных, представленных в отечественных и зарубежных источниках и в базах данных PubMed-NCBI ([https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)), eLibrary (<https://elibrary.ru/>), которые посвящены методам и инструментальному обеспечению экспресс-определения показателей метаболизма в РЖ.

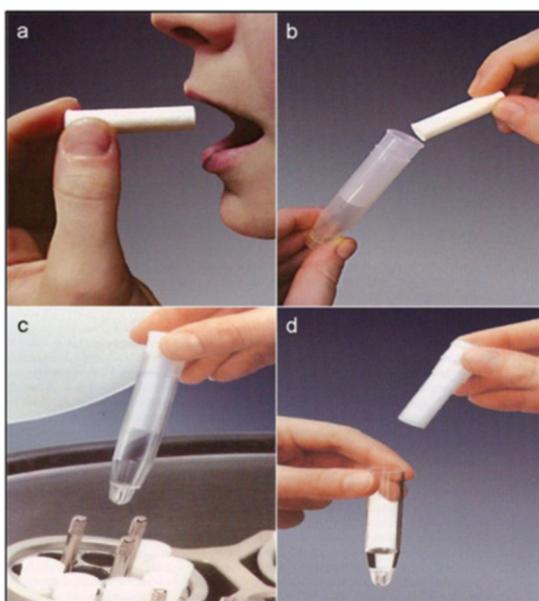
Свойства слюны как диагностическая жидкость

Слюна представляет собой прозрачную, слегка кислую (pH = 6,0–7,0) биологическую жидкость, состоящую из выделений слюнных желез: околоушных, подчелюстных и подъязычных, а также множества мелких желез, включая губные, щечные, язычные и небные ткани. Секрет слюнных желез дополняют компоненты сыворотки крови, интактные или разрушенные клетки слизистых оболочек, иммунные клетки, а также интактные или разрушенные микроорганизмы ротовой полости [5,6]. Многие из них попадают в слюну из крови, проходя через межклеточные пространства, через клетки (пассивный внутриклеточный диффузный и активный транспорт) или парацеллюлярные пути (внеклеточная ультрафильтрация) [7,8]. Следовательно, большинство соединений, содержащихся в крови, также присутствуют в слюне, поэтому она функционально эквивалентна сыворотке крови, отражающая физиологическое состояние организма, включая эмоциональные, гормональные, пищевые и метаболические изменения.

Если слюна содержит разнообразные компоненты с диагностическими свойствами, то их низкая концентрация по сравнению с уровнями в крови [9] может помешать диагностике слюны быть клинически практичным; Однако с развитием новых и очень чувствительных

методов (например, молекулярная диагностика, нанотехнологии), низкая концентрация аналитов в слюне больше не ограничена. На сегодняшний день растет число проверочных тестов, они были созданы с использованием слюны для мониторинга заболеваний или состояний организма, таких как ВИЧ-инфекция [10], иммунный ответ на вирусные инфекции (например, гепатит А, В и С) [11,12], системный уровень наркотиков [7] и выявление незаконного употребления наркотиков [13,14].

Одним из главных преимуществ слюны является то, что сбор образцов является простым и неинвазивным, таким образом, резко уменьшается дискомфорт, связанный со сбором крови. Состав ротовой жидкости варьируется в зависимости от методов сбора анализа и степени слюноотделения. Различные методы сбора слюны могут быть классифицированы в зависимости от способа стимуляции слюноотделения. Стимулированную слюну обычно собирают, вызывая жевательное действие на парафиновый воск или жевательную резинку (т.е. абсорбирующий метод, рис.1)



Сбор слюны абсорбирующим методом:

(а) Слюна собирается, жуя ватный тампон.

(b) тампон, содержащий слюну, помещается в пробирку.

(с) Центрифугирование сборки.

(d) Слюна отделяется от тампона и готов к анализу.

рис.1

для увеличения слюноотделения. Этот метод значительно влияет на количество и pH ротовой жидкости и обычно используется только у пациентов, которые испытывают трудности с выработкой достаточного количества слюны. Нестимулированная слюна собирается без экзогенного воздействия, и скорость слюноотделения в основном зависит от степени гидратации. Тремя наиболее распространенными методами сбора этой слюны являются методы дренирования, сплевывания и свободного истечения [15]. Независимо от используемого метода, перед сбором слюны пациенты должны быть проинструктированы по поводу очищения полости рта путем тщательного полоскания водой, чтобы избежать загрязнения пробы.

Существуют некоторые причины для исследования слюны. Это требования недорогого неинвазивного и простого в использовании метода скрининга. В качестве диагностической пробы в клинике, жидкость имеет много преимуществ с точки зрения сбора, хранения, доставки и объемного отбора проб. По сравнению с кровью, слюна легче обрабатывается во время диагностических процедур, так как она не свертывается, таким образом уменьшается количество требуемых манипуляций. Более того, сбор анализа слюны безопаснее сбора анализа сыворотки для медицинских работников, которые подвергаются риску заражения болезнями, передаваемыми через кровь. Для пациентов неинвазивный сбор анализов может значительно сократить беспокойство и дискомфорт. В свою очередь увеличит их готовность проходить медицинские осмотры и контролировать их общее состояние здоровья на протяжении определенного времени, а также диагностировать заболевания на ранней стадии.

Исследование слюны

В течение последних двух десятилетий для мониторинга заболеваний полости рта, таких как заболевания пародонта [16] и для оценки риска возникновения кариеса [17] были разработаны диагностические методы с использованием слюны. В последнее время благодаря сочетанию новых биотехнологий и маркеров, содержащихся в слюне, постепенно появляется больше возможностей для диагностики различных заболеваний, включая рак [18,19,20], аутоиммунные [21,22], вирусные [11,12,23], бактериальные [24] и сердечно-сосудистые заболевания [25], а также ВИЧ [10]. Эти возможности расширили спектр тестов на основе слюны от полости рта до всей физиологической системы. Таким образом, исследование слюны находится на переднем плане диагностических технологий и в ближайшем будущем может быть предложена врачам в качестве надежной альтернативы инвазивных технологий для использования и принятия клинических решений до и после лечения заболевания.

Открытие биомаркеров слюны с помощью протеомной технологии.

Протеом является белковым дополнением генома, а протеомика — это анализ той части генома, которая экспрессируется. Протеомы в жидкостях организма ценны из-за их высокого клинического потенциала в качестве источников маркеров заболеваний. В принципе, глобальный анализ протеомов слюны человека может обеспечить полный спектр здоровья полости рта и общего здоровья. Кроме того, анализ протеомов слюны при возникновении и развитии осложнений может выявить признаки заболеваемости на ранней стадии и отслеживать прогрессирование заболевания.

В течение последних трех десятилетий для мониторинга изменений в экспрессии белка применяются подходы на основе протеома. Как правило, экспрессию белка в основном

анализируют с помощью одно- или двухмерного электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE). Чтобы изучить сложный состав слюны, 2-D PAGE позволяет разделять не только разные молекулы с одинаковыми молекулярными массами, но также различные модификации или изоформы одного и того же белка. Наряду с разработкой и введением масс-спектрометрии (МС), белки, разделенные на ПААГ, могут быть более точно охарактеризованы и идентифицированы, что приводит к более широкому спектру применения протеомных анализов. Белки, которые в первую очередь идентифицируются с помощью MS, могут быть дополнительно охарактеризованы методами ионизации, такими как электрораспылительная ионизация (ESI) и матричная лазерная десорбционная ионизация (MALDI). Кроме того, сочетание ESI и MALDI с масс-анализаторами, такими как квадрупольная / линейная ионная ловушка, время выключения (TOF), квадрупольное TOF (QTOF), ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье (FT-ICR) и Orbitrap, может улучшить чувствительность, разрешение, точность и эффективность определения последовательности белка. На сегодняшний день технология MS позволила получить более полное представление о характеристиках протеомов слюны и предоставила убедительные доказательства, подтверждающие использование слюны как диагностического инструмента [26].

В некоторых случаях, однако, простое различие повышающей и / или понижающей регуляции экспрессии специфических белков не может напрямую отражать обстоятельства физиологических состояний или прогрессирования заболевания. Это связано с тем, что биологические функции белков могут изменяться вследствие посттрансляционных модификаций, которые происходят без изменения уровня белка [27,28]. Было продемонстрировано, что многие функциональные изменения белков происходят в результате посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, гликозилирование, ацетилирование и метилирование [29,30]. Эти посттрансляционно модифицированные белки могут представлять собой сигнатуры при некоторых заболеваниях, таких как расстройство аутистического спектра [31] и рак шейки матки [32]. Для оценивания потенциала посттрансляционно модифицированных белков в качестве диагностических биомаркеров, дендример-ассоциированная MS/MS, MALDI-MS и целевой ВЭЖХ -ESI-MS/MS предоставляют комплексные аналитические методы для белков с различными типами посттрансляционных модификаций [33,34].

По состоянию на январь 2009 года, в основных слюнных железах [26] были идентифицированы более тысячи слюнных белков. Для большинства этих белков их экспрессия в слюне довольно отлична от таковой в сыворотке или слезной жидкости, и они уже продемонстрировали клинические диагностические значения для заболеваний,

проявляющихся в полости рта. Например, синдром Шегрена (SS), хроническое аутоиммунное заболевание, которое клинически распознается по сухости во рту (ксеростомия) и сухости глаз (кератоконъюнктивит), связан с изменениями в специфических компонентах слюны, таких как увеличение количества воспалительных белков (например, α -енолаза, карбоангидраза I и II, фрагменты α -амилазы слюны) и снижение ацинарных белков (например, лизоцима С, полимерного рецептора иммуноглобулина (pIgR), кальгранулина А) по сравнению с профилем у лиц без SS [21]. Другие исследования показали, что слюна является важным инструментом для выявления плоскоклеточного рака полости рта (OSCC). Три опухолевых маркера (Cyfra 21-1, тканевый полипептидный антиген (TPA) и раковый антиген СА125) значительно повышены в слюне по сравнению с сыворотками пациентов [35]. Недавно наша лаборатория открыла и утвердила группу биомаркеров слюны, очень важную для выявления рака полости рта. Было показано, что пять белков слюны (M2BP, MRP14, профилин, CD59 и каталаза) способны распознавать рак ротовой полости с клинической точностью более 90% [20]. Помимо SS и OSCC, слюнные протеомные компоненты также способны обнаруживать сильные системные нарушения. Например, было показано, что измерение антител к ВИЧ в слюне является точным, как измерение в сыворотке, так и анализ слюны были коммерциализированы как продукт под названием OraQuick. Более того, ранние исследования предполагают, что измерение СА125 в слюне и эпидермального фактора роста может иметь диагностический потенциал для рака яичников [36] и рака молочной железы [37], соответственно.

Современные усилия по выяснению протеом из цельной слюны или отдельной железистой (например, околоушной, поднижнечелюстной и подъязычной) слюны быстро прогрессировали вместе с развитием MS и методов разделения белка. Исследовательская группа UCLA (www.hspp.ucla.edu) создала центральную базу данных белков слюны, в которой мы собрали полученные протеомные данные и обменялись результатами исследований с группами по всему миру. Интеграция современной информации продолжается, и ведутся обширные сравнения белков в слюне и других жидкостях организма. Эта всесторонняя классификация слюнных протеомов станет важным ресурсом для исследователей, изучающих химию белка, особенно в области оральной биологии и диагностики слюны, и будет полезна для анализа того, как изменяется экспрессия протеинов слюны при разных заболеваниях, и, следовательно, для определения соответствующих слюнных биомаркеров, связанных с заболеванием.

Открытие слюнных биомаркеров с помощью транскриптомной технологии.

В 2004 году в дополнение к протеому слюны мы обнаружили слюнные транскриптомы (молекулы РНК), которые необычайно стабильны в слюне [29]. Они включали молекулы мРНК, которые клетки используют для передачи инструкций, которые несет ДНК для последующего производства белка. Это открытие представило второй диагностический шрифт в слюне и открыло дверь в другой путь транскриптомной диагностики слюны. Хотя транскрипт слюны является новой концепцией, в UCLA мы создали надежную платформу для исследований РНК слюны, включая автоматическое выделение, очистку, амплификацию и высокопроизводительный скрининг микрочипов. Важно отметить, что мы также разработали инструменты статистики и информатики, предназначенные для обнаружения и проверки биомаркеров слюны. Кроме того, Сеть исследований ранних болезней (EDRN), подразделение Национального института рака (NCI), только что завершила независимое валидационное исследование биомаркеров РНК слюны для выявления рака полости рта. Это исследование подтвердило клиническую трансляционную ценность слюнной РНК для выявления рака полости рта. В течение последних 5 лет активно проводились исследования природы, происхождения и характеристики мРНК слюны [19,21,39]. В настоящее время основной стратегией идентификации транскриптомных биомаркеров слюны является использование микроматрицы. Хотя было продемонстрировано, что матрица на основе 3', использующая прайминг поли-dT и два цикла амплификации транскрипции *in vitro* (IVT), хорошо работает для профилирования транскриптов слюны, все еще необходимо преодолеть некоторые ловушки. Например, большая часть информации теряется, потому что приблизительно 50% молекул РНК слюны фрагментированы [39], поэтому они не несут поли-А-хвост и не защищены от деградации. Кроме того, подход случайного примирования в амплификации РНК может вызывать дополнительное укорочение фрагментов, что приводит к дальнейшей потере молекул РНК во время процедуры. Чтобы решить эти проблемы, мы недавно внесли существенные улучшения в транскриптомный скрининг слюны с использованием новой 3'-поли(А)-зависимой технологии амплификации для восстановления всех фрагментов слюнной РНК (ExpressArt TRinucleotide mRNA Amplification Kita) с последующим профилированием всех фрагментов на платформе Affymetrix All Exon Array (AEA). Этот новый подход позволяет исследовать слюну транскриптом на более высоком уровне разрешения путем обнаружения отдельных экзонов. Теоретически, увеличенное разрешение может обнаружить больше генов и, следовательно, увеличить возможности различать маркеры болезни. До сих пор мы определили транскриптом ядра экзона слюны (SECT), который содержит 1370 наборов зондов, представляющий 851 уникальный ген, который

присутствует в более 85% протестированных образцов слюны [40]. Пилотные исследования рака полости рта и поджелудочной железы с использованием АЕА согласуются с предыдущими результатами с использованием традиционных анализов (то есть, Affymetrix's Анализ генома человека U133A), и показывают, что АЕА действительно расширяет число последовательности и гены, которые могут быть обнаружены. Количественная ПЦР в реальном времени (КПЦР) в настоящее время - золотой стандарт для количественного определения нуклеиновых кислот. Этот метод идеально подходит для проверки ранскриптомных биомаркеров после профилирования микрочипом, и он не ограничен длиной РНК, даже для фрагментированной РНК. Тем не менее, небольшое количество РНК в слюне сильно препятствуют их производительности в КПЦР. Чтобы преодолеть эту проблему, был разработан новый метод предварительной амплификации мультиплексной обратной транскриптазы-ПЦР, который позволяет сделать точную количественную оценку более 50 целей из одной реакции. Этот метод значительно увеличивает возможности количественного анализа, который расширяется примерно в шесть раз для величины целевого ввода [40], и приспособлен к короткому характеру РНК слюны. Он также предлагает хорошее время и экономическую эффективность, выполняя одновременные обратные реакции транскриптазы для различных целей при небольшом объеме продукта предварительной амплификации, который будет использоваться для последующего измерения КПЦР.

Исследования автором Am J Dent, Колсанов А.В., Чаплыгин С.С., Власов М.Ю., Мякишева Ю.В. биомаркеров мРНК слюны у пациентов с первичным T1 / T2 OSCC показали многообещающие результаты и продемонстрировали диагностический и трансляционный потенциал транскриптома слюны [19]. Данные, объединяющие профилирование микрочипов и валидацию КПЦР, показали семь мРНК, уровни экспрессии которых у пациентов были повышены по крайней мере в 3,5 раза по сравнению со здоровыми аналогами. Эти мРНК являются транскриптами DUSP1, H3F3A, OAZ1, S100P, SAT, IL-8 и IL-1 β . В первоначальном исследовании сочетание этих биомаркеров показало 91% чувствительности и специфичности (ROC = 0,95), что свидетельствует о высокой достоверности дискриминации OSCC. Для дальнейшей проверки транскриптомных биомаркеров слюны и для выявления рака полости рта мы сравнили слюну и транскриптомы крови от одних и тех же пациентов с точки зрения их способности распознавать заболевания. Исследование показало, что группа из пяти транскриптомных биомаркеров в сыворотке может быть последовательно подтверждена и выделена OSCC с чувствительностью 91% и специфичностью 71% (ROC = 0,88). Транскрипт слюны является более точным инструментом для выявления рака полости рта,

чем транскрипт сыворотки. К настоящему времени было протестировано более 220 дополнительных пациентов с раком полости рта, и клиническая точность биомаркеров мРНК слюны остается на уровне > 82% (Wang et al., Неопубликованные данные), что указывает на то, что они являются одними из самых диагностических панелей для скрининга OSCC на сегодняшний день.

Разработка точечных технологий для диагностики слюны

В сентябре 1999 года NIDCR инициировал исследовательский семинар, посвященный применению микрофлюидики и микро / наноэлектромеханической системы (MEMS / NEMS) для диагностики слюны. MEMS / NEMS представляет собой интегрированную систему, которая состоит из центрального блока для обработки данных (то есть микропроцессора) и нескольких других компонентов, которые соединяются с внешним интерфейсом, таким как микросенсоры. В принципе, несколько аналитов в капле слюны могут быть одновременно измерены и проанализированы с помощью высокочувствительных биосенсоров. В этом семинаре приняли участие ученые из научных кругов, правительств и промышленности, и он охватывал междисциплинарные области, включая устную биологию, химию, приборостроение, инженерию и клинические науки. Чтобы продолжить развитие технологий диагностики слюны, в 2002 году NIDCR профинансировал семь проектов, в которых изучались различные системы оказания медицинской помощи для выявления слюнных аналитов, и предоставил общий профиль, который коррелирует с конкретным болезненным состоянием: электрохимическое зондирование, ПЦР / ОТ-ПЦР на чипе, на основе микросфер нано-биочип,-микросферный волоконно-оптический массив, высокопроизводительный микрочип ДНК (то есть проверка ДНК-чипа первого поколения), оптическая система поверхностного плазмонного резонанса, и электрофоретический иммуноанализ микрочипа. В 2006 году четыре группы получили еще 5 лет поддержки для дальнейшей разработки соответствующей технологии для производства, анализа и клинической проверки прототипа. UCLA является одной из четырех финансируемых групп. Совместный исследовательский центр UCLA по диагностике оральной жидкости, в партнерстве с инженерами Школы инженерии UCLA, разработал платформу электрохимического обнаружения на основе MEMS, которая в режиме реального времени является сверхчувствительным сверхспецифичным мультиплексным детектированием биомаркеров слюнного белка и РНК. Предполагалось, что продукт был отмечен тестом нано-сенсора для оральной жидкости (OFNASET). OFNASET представляет собой автоматизированную и простую в использовании интегрированную систему для ухода за больными, которая позволяет одновременно и точно определять множество белков и нуклеиновых кислот слюны. Кроме того, эта

система является портативной и может использоваться не только в кабинете врача, но и в любом другом медицинском учреждении для мгновенной диагностики на месте оказания медицинской помощи.

При нынешних темпах прогрессирования диагностика слюны может стать ключевым методом в рутинном мониторинге здоровья в ближайшем будущем и обеспечить раннее обнаружение заболевания с помощью простого и эффективного анализа.

Заключение: слюна, как и кровь, содержит множество молекул белка и нуклеиновых кислот, что отражает физиологический статус; однако, в отличие от других биологических жидкостей, диагностика слюны предлагает простой, недорогой, безопасный и неинвазивный подход для выявления заболеваний и обладает высоким потенциалом для развития следующего поколения диагностики. Таким образом, диагностика слюны не только спасет жизни, но и сохранит качество спасенных жизней.

Список литературы :

1. Khurshid Z., Zohaib S., Najeeb S. et al. Human saliva collection devices for proteomics: an update. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 846.
2. Lazaro A.S., Mussavira S., Bindhu O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochemia Medica.* 2015; 25(2): 177–92.
3. Thorn L., Hucklebridge F., Evans P., Clow A. The cortisol awakening response, seasonality, stress and arousal: a study of trait and state influences. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 34: 299–306.
4. Stalder T., Evans P., Hucklebridge F., Clow A. Associations between psychosocial state variables and the cortisol awakening response in a single case study. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 35: 209–14.
5. Robles T.F., Sharma R., Harrell L. et al. Saliva sampling method affects performance of a salivary α -amylase biosensor. *Am. J. Hum. Biol.* 2013; 25(6): 719–24.
6. Murdock R.C., Shen L., Griffin D.K. et al. Optimization of a paperbased ELISA for a human performance biomarker. *Anal. Chem.* 2013; 85: 11634–42.
7. Johnson N., Ebersole J.L., Kryscio R.J. et al. Rapid assessment of salivary MMP-8 and periodontal disease using lateral flow immunoassay. *Oral Dis.* 2016; 22(7): 681–7.
8. Jyoti B., Devi P. Detection of human immunodeficiency virus using oral mucosal transudate by rapid test. *Indian J. Sex. Transm. Dis.* 2013; 34(2): 95–101.
9. Gaydos C.A., Solis M., Hsieh Y.H. et al. Use of tablet-based kiosks in the emergency department to guide patient HIV self-testing with a point-of-care oral fluid test. *Int. J. STD AIDS.* 2013; 24(9): 716–21.

10. Visseaux B., Larrouy L., Calin R. et al. Anti-hepatitis C virus antibody detection in oral fluid: influence of human immunodeficiency virus co-infection. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(2): 385–90.
11. Kuwayama K., Miyaguchi H., Yamamuro T. et al. Effectiveness of saliva and fingerprints as alternative specimens to urine and blood in forensic drug testing. *Drug. Test. Anal.* 2016; 8(7): 644–51.
12. Jaspard M., Le Moal G., Saberan-Roncato M. et al. Finger-stick whole blood HIV-1/2 home-use tests are more sensitive than oral fluidbased in-home HIV tests. *PLoS One.* 2014; 9(6): e101148.
13. Rakesh N., Shetty S., Sujatha S. et al. Assessment of the accuracy of whole blood/serum Point-of-care HIV three-dot test for oral fluid specimens. *Curr. HIV Res.* 2016; 14(4): 354–9.
14. Warrener L., Slibinskas R., Chua K.B. et al. A point-of-care test for measles diagnosis: detection of measles-specific IgM antibodies and viral nucleic acid. *Bull. World Health Organ.* 2011; 89(9): 675–82.
15. Old J.B., Schweers B. A., Boonlayangoor P.W., Reich K.A. Developmental validation of RSIDTM-Saliva: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of saliva. *J. Forensic Sci.* 2009; 54(4): 866–73.
16. Du Y., Zhang W., Wang M.L. An on-chip disposable salivary glucose sensor for diabetes control. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2016. 10(6): 1344–52.
17. Mishra S., Saadat D., Kwon O. et al. Recent advances in salivary cancer diagnostics enabled by biosensors and bioelectronics. *Biosens. Bioelectron.* 2016; 81: 181–97.
18. Wanklyn C., Burton D., Enston E. et al. Disposable screen-printed sensor for the electrochemical detection of delta-9-tetrahydrocannabinol in undiluted saliva. *Chem. Cent. J.* 2016; 10: eCollection 2016.
19. Aydin E.B., Aydin M., Sezginturk M.K. A highly sensitive immunosensor based on ITO thin films covered by a new semi-conductive conjugated polymer for the determination of TNF α in human saliva and serum samples. *Biosens. Bioelectron.* 2017; 97: 169–76.
20. Anderson K., Poulter B., Dudgeon J. et al. A Highly sensitive nonenzymatic glucose biosensor based on the regulatory effect of glucose on electrochemical behaviors of colloidal silver nanoparticles on MoS₂. *Sensors (Basel).* 2017; 17(8): pii: E1807.
21. Du Y., Zhang W., Wang M.L. An on-chip disposable salivary glucose sensor for diabetes control. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2016; 10(6): 1344–52.
22. Dutta G., Nagarajan S., Lapidus L.J., Lillehoj P.B. Enzyme-free electrochemical immunosensor based on methylene blue and the electro-oxidation of hydrazine on Pt nanoparticles. *Biosens Bioelectron.* 2017; 92: 372–7.

23. Adornetto G., Fabiani L., Volpe G. et al. An electrochemical immunoassay for the screening of celiac disease in saliva samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015; 407(23): 7189-96.
24. Liu C., Geva E., Mauk M. et al. An isothermal amplification reactor with an integrated isolation membrane for point-of-care detection of infectious diseases. *Analyst.* 2011; 136(10): 2069–76.
25. Chen Z., Zhu H., Malamud D. et al. A rapid, self-confirming assay for HIV: simultaneous detection of anti-HIV antibodies and viral RNA. *J. AIDS Clin. Res.* 2016; pii: 540.
26. Chotiwan N., Brewster C.D., Magalhaes T. et al. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. *Sci Transl Med.* 2017; 9(388): pii: eaag0538.
27. Mauk M.G., Song J., Bau H.H., Liu C. Point-of-care molecular test for Zika infection. *Clin. Lab. Int.* 2017; 41: 25–7.
28. Barbosa A.I., Reis N.M. A critical insight into the development pipeline of microfluidic immunoassay devices for the sensitive quantitation of protein biomarkers at the point of care. *Analyst.* 2017; P. 142(6): 858–82.
29. Morbioli G.G., Mazzu-Nascimento T., Stockton A.M., Carrilho E. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) – a review. *Analytica Chimica Acta.* 2017; 970: 1–22.
30. Mou L., Jiang X. Materials for microfluidic immunoassays: a review. *Adv. Healthc. Mater.* 2017; 6(15): 1601403.
31. Dong T., Pires N.M.M. Immunodetection of salivary biomarkers by an optical microfluidic biosensor with polyethylenimine-modified polythiophene-C70 organic photodetectors. *Biosens. Bioelectron.* 2017; 94: 321–7.
32. Pinto V., Sousa P., Catarino S.O., Correia-Neves M., Minas G. Microfluidic immunosensor for rapid and highly-sensitive salivary cortisol quantification. *Biosens Bioelectron.* 2017; 90: 308–13.
33. Guo L., Wang Y., Zheng Y., et al. Study on the potential application of salivary inorganic anions in clinical diagnosis by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2016; 1014: 70–4.
34. Zilberman Y., Sonkusale S.R. Microfluidic optoelectronic sensor for salivary diagnostics of stomach cancer. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 67: 465–71.
35. Oncescu V., O'Dell D., Erickson D. Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva. *Lab. Chip.* 2013; 13(16): 3232–8.
36. Carrio A., Sampedro C., Sanchez-Lopez J.L. et al. Automated lowcost smartphone-based lateral flow saliva test reader for drugs-of-abuse detection. *Sensors (Basel).* 2015; 15(11): 29569–93.

37. Zhang D, Liu Q. Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection. *Biosens. Bioelectron.* 2016; 75: 273–84.
38. Jung Y., Kim J., Awofeso O. et al. Smartphone-based colorimetric analysis for detection of saliva alcohol concentration. *Appl. Opt.* 2015; 54(31): 9183–9.
39. Roda A., Guardigli M., Calabria D. et al. A 3D-printed device for a smartphone-based chemiluminescence biosensor for lactate in oral fluid and sweat. *Analyst.* 2014; 139(24): 6494–501.
40. Calabria D., Caliceti C., Zangheri M., et al. Smartphone-based enzymatic biosensor for oral fluid L-lactate detection in one minute using confined multilayer paper reflectometry. *Biosens. Bioelectron.* 2017; 94: 124–30.