

CZU: 617.51/.53-006.04-085.849-053.2-06:616.314-002-053.2

<https://doi.org/10.52692/1857-0011.2023.2-76.04>

PROPRIETĂȚILE FLUIDULUI ORAL LA COPIII CU TUMORI MALIGNNE ÎN REGIUNEA CAPULUI ȘI GÂTULUI

¹SPINEI Aurelia, conf. univ., dr. hab. șt. med.²CHIRIAC Anca, prof. univ., dr. med.¹SPINEI Iurie, conf. univ., dr. șt. med.¹RAILEAN Silvia, conf. univ., dr. șt. med.³TOMA Vasilica, prof. univ., dr. med.³FOIA Liliana, prof. univ., dr. med.¹IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova²Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași, România³Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași, România*aurelia.spinei@usmf.md*

Rezumat.

Scopul prezentului studiu a fost estimarea relației dintre nivelul TNF- α și gradul de microcristalizare (GMC) a fluidului oral (FO) la copiii cu tumori maligne în regiunea capului și gâtului (RCG). În studiul de tip caz-martor au fost incluși 72 de copii cu vârste cuprinse între 1 și 18 ani repartizați în 2 loturi identice după structură. Lotul de cercetare (L_1) a fost constituit din 36 copii cu tumori maligne în RCG. În lotul martor (L_0) au fost incluși 36 de copii convențional sănătoși. S-au studiat biomarkerii combinați – morfologici (GMC al FO) și nivelul citokinei TNF- α în FO la copii cu tumori maligne în RCG și subiecții convențional sănătoși. TNF- α în FO a fost apreciat prin metoda de analiză imunoenzimatică. Analiza rezultatelor studiului a elucidat nivelul crescut al TNF- α , în FO al copiilor cu tumori maligne, comparativ cu subiecții sănătoși. Analiza corelațională a depistat relația inversă semnificativă ($r = -0,83$, $p < 0,01$) dintre nivelul TNF- α și GMC a FO la copiii cu tumori maligne în RCG în stadiile I și II. Totodată, la copiii convențional sănătoși, dar și la copiii cu tumori maligne în RCG în stadiile III și IV nu s-au observat interdependența dintre nivelul TNF- α în FO și GMC al FO.

Concluzii. Aprecierea biomarkerilor combinați în probele de FO (nivelului TNF- α și particularităților morfologice) reprezintă o analiză non-invazivă inovativă pentru depistarea precoce a tumorilor și evaluarea riscului la malignitate orală. Pentru utilizarea clinică a biomarkerilor FO este necesar să se elaboreze protocoale standardizate și să se efectueze studii ample în care să se excludă influența diferitelor variabile de confuzie.

Cuvinte cheie: biomarkeri, fluid oral, TNF- α , tumori maligne, regiunea cap și gât.

Summary. Oral fluid properties in children with head and neck malignant tumors.

The aim of the present study was to estimate the relationship between TNF- α level and degree of microcrystallization (DMC) of oral fluid (OF) in children with malignant tumors in the head and neck region (HNR). In the case-control study, 72 children aged between 1 and 18 were included, divided into 2 identical groups according to structure. The research group (L_1) consisted of 36 children with malignant tumors in the HNR. 36 conventionally healthy children were included in the control group (L_0). We studied the combined biomarkers in OF samples – morphological biomarkers (DMC of OF) and TNF- α cytokine level in OF in children with malignant tumors in HNR and conventionally healthy subjects. TNF- α in OF was evaluated by the immunoenzymatic analysis method. The analysis of the results of the study elucidated the increased level of TNF- α , in the OF of children with malignant tumors, compared to healthy subjects. Correlational analysis detected the significant inverse relationship ($r = -0.83$, $p < 0.01$) between TNF- α level and DMC of OF in children with malignant tumors in RCG in I and II stages. At the same time, in conventionally healthy children, but also in children with malignant tumors in III and IV stages, the interdependence between the level of TNF- α in OF and DMC of OF was not observed.

Conclusions. The assessment of combined biomarkers in OF samples (TNF- α level and morphological particularities) represents an innovative non-invasive analysis for the early detection of tumors and the assessment of the risk of oral malignancy. For the clinical use of OF biomarkers, it is necessary to develop standardized protocols and to perform extensive studies in which the influence of various confounding variables is excluded.

Keywords: biomarkers, oral fluid, TNF- α , malignant tumors, head and neck region.

Резюме. Свойства ротовой жидкости у детей со злокачественными новообразованиями головы и шеи.

Целью данного исследования было оценить взаимосвязь между уровнем ФНО- α и степенью микрокристаллизации (СМК) ротовой жидкости (РЖ) у детей со злокачественными опухолями области головы и шеи (ОГШ). В исследование случай-контроль были включены 72 ребенка в возрасте от 1 года до 18 лет, разделенных на 2 идентичные по структуре группы. Группу исследования ($Г_1$) составили 36 детей со злокачественными новообразованиями в ОГШ. В контрольную группу ($Г_0$) были включены 36 условно здоровых детей. Были изучены

комбинированные биомаркеры РЖ (-морфологические СМК) и уровень цитокина ФНО- α в РЖ у детей со злокачественными опухолями в ОГШ и у здоровых детей. ФНО- α в РЖ определяли методом иммуноферментного анализа. Анализ результатов исследования выявил повышенный уровень ФНО- α в РЖ детей со злокачественными опухолями по сравнению со здоровыми детьми. Корреляционный анализ выявил достоверную обратную зависимость ($r=-0,83$, $p<0,01$) между уровнем ФНО- α и СМК РЖ у детей со злокачественными новообразованиями ОГШ в I и II стадий. В то же время у условно здоровых детей, а также у детей со злокачественными опухолями ОГШ III и IV стадий взаимозависимости между уровнем ФНО- α в РЖ и СМК РЖ не наблюдалось.

Выводы. Оценка комбинированных биомаркеров в образцах РЖ (уровня ФНО- α и морфологических особенностей) представляет собой инновационный неинвазивный анализ для раннего выявления опухолей и оценки риска злокачественных новообразований полости рта. Для клинического использования биомаркеров РЖ необходима разработка стандартизированных протоколов и проведение исследований, в которых исключено влияние различных конфаундеров.

Ключевые слова: биомаркеры, ротовая жидкость, ФНО- α , злокачественные опухоли, область головы и шеи.

Introducere.

Biopsia lichidă este o abordare atractivă pentru diagnosticarea patologiilor multiple, oferind noi oportunități pentru implementarea metodelor neinvazive, rapide și rentabile, în identificarea, și monitorizarea tratamentului diverselor patologii [5, 14]. Utilizarea fluidelor corporale, cum ar fi sângele, saliva, urina și alte tipuri de probe în investigațiile clinice se datorează prezenței a numeroși potențiali biomarkeri care pot fi legați de diferite stadii ale bolii. Biopsiile lichide vizează analiza materialului circulant derivat din tumori, cunoscut sub numele de „circulomul tumoral”, ale căror componente pot fi utilizate ca potențiali biomarkeri direcți sau indirecti [5].

Fluidul oral (FO) reprezintă un mediu biologic specific foarte bine organizat, cu proprietăți unice, universale, este un mediu dinamic, care reflect toate schimbările din organism, inclusive și procesele patologice. În decursul ultimilor decenii s-au făcut primii pași în studierea manifestărilor diverselor maladii în organizarea structurală a FO [6]. Cercetătorii în domeniu fac eforturi pentru adoptarea utilizării mostrelor de FO și consolidarea utilizării acestui fluid în algoritmi de diagnosticare datorită unui șir de proprietăți:

- colectare non-invazivă;
- protocoale simple de colectare;
- probe neinfectate;
- eliminare ușoară;
- transportare simplă;
- profitabil din punct de vedere economic;
- colectare sigură și eficientă;
- o mai bună acceptare și colaborare a pacienților [12].

FO poate deveni un instrument de diagnostic util în depistarea precoce a diferitelor tipuri de cancer la nivelul capului și gâtului [3]. Utilizarea biomarkerilor FO pentru depistarea precoce a cancerului oral, cu rata de supraviețuire la cinci ani este încă foarte scăzută (62%), a trezit recent un mare interes în comunitatea științifică. Mai mult 90% dintre cancer

orale sunt carcinoame bucale cu celule scuamoase (Oral squamous cell carcinoma (OSCC), iar majoritatea OSCC sunt diagnosticate la stadii avansate, subliniind astfel necesitatea noilor abordări în diagnosticul clinic pentru detectarea precoce a acestora [10].

În prezent, în literatura de specialitate au fost raportați peste 100 de biomarkeri ai OSCC [11]. Acești biomarkeri sunt de tip transcriptom, proteom, metabolom, microbiom sau o combinație a acestora.

Proteinele tumorale salivare (*proteom*) pot fi folosite pentru a detecta anumite tipuri de cancer. Astfel, s-a raportat că creșterea antigenului tumoral CA15-3 și a anticorpilor pentru markerii proteici tumorali c-erbB2, CA-125 și P53 din salivă pot fi considerate și ca biomarkeri FO pentru cancerul oral și extra-oral. Proteinele inflamatorii precum IL-6 și IL-8 s-au dovedit a fi crescute la pacienții cu cancerul tractului digestiv și cu antecedente de cancer [16]. În mod similar, nivelurile de IL-4, IL-10, IL-13 și IL-1Ra sunt crescute în saliva pacienților cu OSCC. De notat, nivelul IL-1RA a fost cel mai ridicat în leziunile OSCC slab diferențiate, comparativ cu leziunile OSCC bine și moderat diferențiate. Un studiu similar a constatat că nivelurile de TNF- α au fost mai mari la pacienții cu tumori moderat și slab diferențiate decât cei cu tumori bine diferențiate și în stadiul IV. Mai mult, există o corelație pozitivă între gradarea histologică OSCC și TNF- α și alți biomarkeri cunoscuți, cum ar fi interferon-gamma (IFN- γ) și IL-1 β [26]. Alte studii au arătat că hialuronidază, supraexprimarea glico-proteinei zinc- α -2 în saliva pacienților cu cancer, precum și alte proteine (MRP14, M2BP, CD59, catalaza, profilină, M2BP, involucrină, histona H1, S100A12, și S100P) ar putea fi utilizate în diagnosticarea cancerelor orale [12, 26]. Acești biomarkeri, în ciuda unui potențial promițător, au o fiabilitate încă prea dependentă de metodele și tehnicile de analiză utilizate, dar și de starea inflamatorie a cavității bucale, ceea ce ar constitui o prejudecată în analiza aceste citokine determinând să ia în considerare aceste rezultate cu prudență [16].

Pacienții cu OSCC au un marker specific al stresului oxidativ, malondialdehida (MDA) (*metabolom*) prezent în saliva lor, care este mai sensibil și mai specific și pare a fi un instrument de diagnostic mai bun în comparație cu MDA seric. De asemenea, sunt prezente câteva variații ale altor molecule, cum ar fi factorul de creștere transformant-beta-1 (TGF- β 1), factorul de creștere epidermică (EGF), factorul de creștere endotelial vascular (VEGF) și endotelina [16]. În plus, modificările de concentrație ale valinei, acidului lactic și fenilalaninei au permis diferențierea între un subiect sănătos, un subiect bolnav și un subiect cu afecțiuni precanceroase, cu sensibilitate ridicată (90%) și o specificitate interesantă (83%). În mod similar, un studiu recent raportează diferențe semnificative în comparație cu subiecții sănătoși în concentrația de colină, betaină, acid pipercolinic (cu conținut ridicat de OSCC) și L-carnitină (scăzut în OSCC). În cele din urmă, noi tehnici analitice au identificat cinci markeri metabolici noi pentru OSCC, cum ar fi propionilcolina, N-acetil-L-fenilalanina, sfinganina, fitosfingozină și S-carboximetil-L-cisteina [11].

Odată cu dezvoltarea tehnologiei de secvențiere cu randament ridicat, cercetătorii și-au dat seama de importanța microorganismelor în dezvoltarea cancerului oral (Microbiomul). Diversitatea speciilor și abundența relativă a bacteriilor în saliva pacienților cu tumori bucale este mai mare decât la pacienții sănătoși, dar ar trebui luată în considerare o eliminare a factorilor de confuzie precum parodontoza [22, 26].

În unele studii, biomarkerii FO evaluați au fost mai predictivi în stadiile primare decât în stadiile avansate ale OSCC [8]. Combinația unora dintre acești biomarkeri (interleukină-8, colină, acid pipercolinic, L-fenilalanină și S-carboximetil-L-cisteină) poate îmbunătăți acuratețea testului de diagnostic [8]. Pe lângă asocierea a cinci proteine: M2BP, MRP14, profilină, CD59 și catalaza au fost capabile să discrimineze cancerul oral cu o precizie clinică de peste 90% (sensibilitate de 90% și specificitate de 83%). Biomarkerii ARN salivari pentru OSCC prin intermediul analizei microarray, inclusiv transcrierile IL8, IL-1 β , DUSP1, HA3, OAZ1, S100P și SAT discriminează cancerul oral cu 91% sensibilitate și 91% specificitate. Biomarkerii FO reprezintă o abordare promițătoare pentru detectarea cancerului oral. Cu toate acestea, există încă unele probleme de abordat pentru ca această abordare să fie o metodă de diagnosticare fiabilă, foarte sensibilă și specifică [4].

În de cursul ultimilor decenii au fost întreprinși primii pași în studiul manifestărilor diverselor maladii asupra organizării structurale a lichidelor biologice [6]. Astfel a fost implementată o nouă tehnologie de diagnosticare – cercetarea morfologică a lichidelor

biologice [20, 23]. Structurile lichidelor biologice investigate se obțin pe calea transferului fazic al acestora din starea lichidă în stare solidă prin deshidratare. Experimental s-a demonstrat că informația conținută în faza lichidă, la nivel molecular, în procesul de deshidratare este transferată la nivel macroscopic sub forma diferitor structuri, care devin vizibile pentru cercetător. Deși caracterizarea spectroscopică a FO în afecțiunile mucoasei orale potențial maligne și cancer oral a fost studiată pe larg, potențialul său ca biomarker imagistic este puțin explorat. Studiul efectuat de Sharma N. et al., 2021, pune în evidență acceptabilitatea imaginilor microscopice ale salivei arborizate în screening-ul rapid și rentabil al diferitelor leziuni orale, inclusiv al cancerului oral [19].

Așadar, toate aceste studii demonstrează că biomarkerii FO pot fi utilizați pentru a diagnostica mai multe tipuri de cancer oral, în special în stadiile incipiente. Cu toate acestea, nu toți biomarkerii au același grad de precizie și în prezent doar unii dintre ei au dovedit fiabilitatea. Utilizarea biomarkerilor combinați, pe de altă parte, pare să aibă ca rezultat o precizie mai bună, cu sensibilitate și specificitate mai ridicate, în comparație cu utilizarea biomarkerilor izolați. În prezenta lucrare ne-am propus să apreciem în FO al copiii cu tumori maligne în regiunea capului și gâtului (RCG) biomarkerii combinați –morfologiciși din grupul proteom, citokina TNF- α .

Scopul lucrării: estimarea relației dintre nivelul TNF- α și tipul de microcristalizare a fluidului oral la copiii cu tumori maligne în regiunea capului și gâtului.

Materiale și metode.

Studiul a fost realizat în perioada anilor 2020-2023 în cadrul realizării proiectului Programul de Stat: „Chirurgia modernă personalizată în diagnosticul și tratamentul complex al tumorilor la copii” (cifru: 20.80009.8007.06). Pentru realizarea obiectivului lucrării a fost efectuat un studiu clinic de tip caz-martor pe un eșantion de 72 de copii cu vârste cuprinse între 1 și 18 ani repartizați în 2 loturi identice după structură. Lotul de cercetare (L_1) a fost constituit din 36 de copii cu tumori maligne în regiunea capului și gâtului. În lotul martor (L_0) au fost incluși 36 de copii conventional sănătoși.

Criteriile de includere a copiilor în studiu:

copii cu vârsta cuprinsă între 1 și 18 ani, cu tumori maligne în regiunea capului și gâtului, acordul informat în formă scrisă a părinților sau reprezentanților legali pentru participarea copiilor în studiu.

Criteriile de excludere a copiilor din studiu:

lipsa acordului informat în formă scrisă a părinților sau reprezentanților legali pentru participarea copiilor în studiu.

Metode clinic și paraclinice de cercetare. S-au completat fișele de evidență statistică pentru 36 de copii cu tumori maligne în RCG, care au inclus datele colectate: anamneza, rezultatele examenului obiectiv, investigațiilor paraclinice, s-a înregistrat gradul de extindere a tumorii și a sadiului clinic, diagnosticul stability după rezultatul studiului morfologic, metodele de tratament ș.a [24, 25]. Pentru efectuarea investigațiilor imunochimice FO s-a colectat nesti-

mulat, dimineața à *jeun*, în eprubete de plastic sterile care au fost transportate în Laboratorul Științific de biochimie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și Laboratorul Institutului de Chimie Macromoleculara „Petru Poni”, Iași, România. TNF- α în FO a fost apreciat prin metoda de analiză imunoenzimatică pe suport solid. Studiul modificărilor cristalografice a FO a fost efectuat după metoda elaborată de Leous P., 2011 [27]. FO a fost

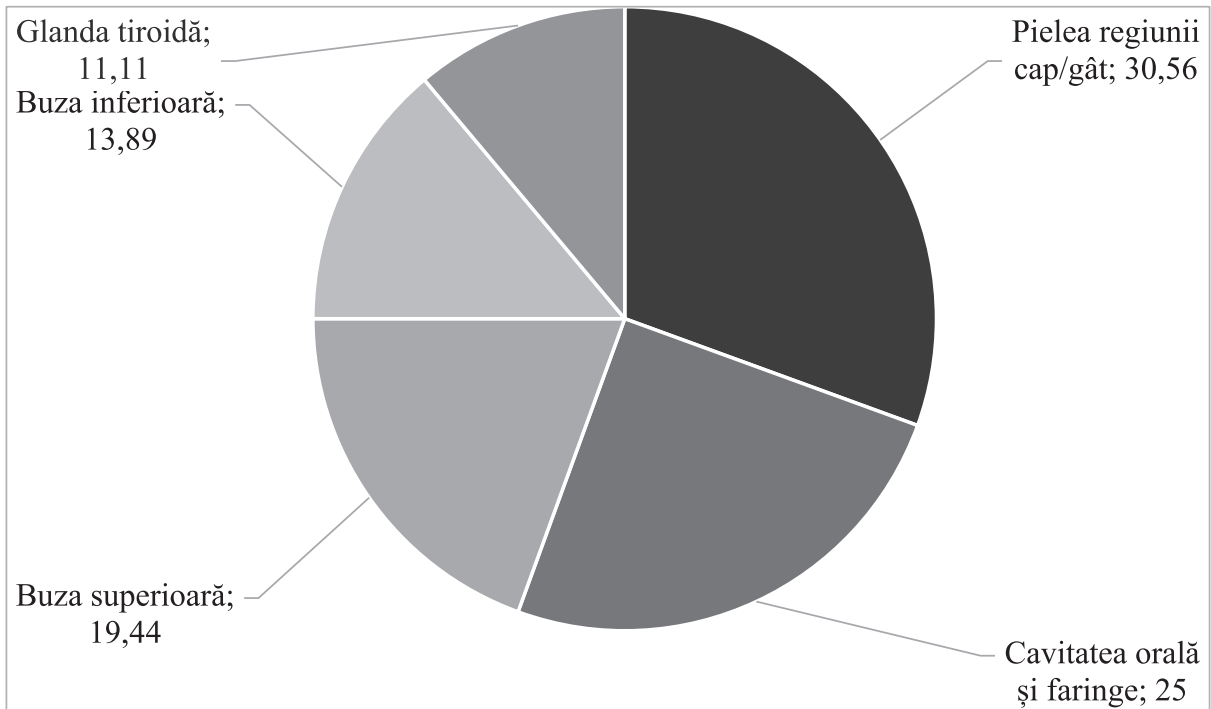


Figura 1. Distribuția tumorilor după localizare (%).

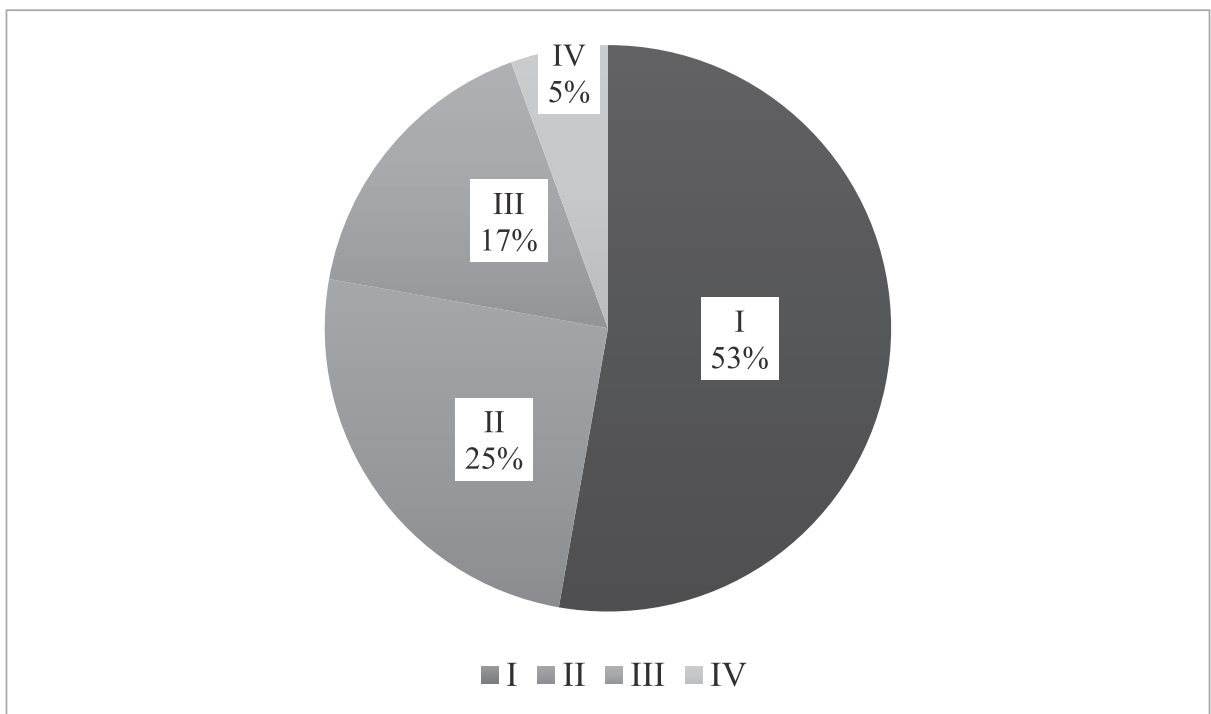


Figura 2. Distribuția tumorilor după stadii.

colectat cu o pipetă sterile în cantitate de 0,2-0,3 ml din zona planșeului cavității orale. Apoi, pe o lamă de sticlă au fost aplicate trei picături de FO. Deshidratarea picăturilor de FO s-a produs în thermostat la $t = 37^{\circ}\text{C}$, fiind protejate de praf. Micropreparatele au fost examinate la microscopul optic Am Scope B120C-E1. Studiul modificărilor cristalografice a inclus estimarea gradului de microcristalizare (GMC) după examinarea picăturilor uscate de FO, rezultatele fiind exprimate în puncta medii în funcție de tipurile identificate de formare a cristalelor: 0-1,0 – grad foarte scăzut, 1,1-2,0 – scăzut, 2,1-3,0 – satisfăcător, 3,1-4,0 – înalt, 4,1-5,0 – foarte înalt. Riscul devierii gradului de microcristalizare (GMC) a fost apreciat după formula: $\text{riscul devierii GMC} = (\text{RR}-1) / \text{RR} \times 100$, unde RR – riscul relativ [20].

Efectuarea studiului în cadrul Proiectului de cercetare „Chirurgia modernă personalizată în diagnostic și tratamentul complex al tumorilor la copii” a fost avizat favorabil de Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” (Avizul din 25.02.2021). Astfel, cercetarea a fost realizată în conformitate cu cerințele etice, cu obținerea acordului scris al părinților copiilor.

Analiza datelor ținute a fost efectuată folosind teste parametrice și non-parametrice a *Software Excel* și *Epi Info*, cu ajutorul funcțiilor și modulelor acestora. Procesarea statistică a rezultatelor a inclus metode operante de evaluare statistică, inclusiv criteriul *Student* cu stabilirea nivelului de semnificație „ $p < 0,05$ ”.

Rezultate.

Toți subiecții luați în observație sunt nativi și rezidenți în Republica Moldova. Loturile de cercetare și martor au prezentat o structură comparabilă după sexe, grupele de vârstă, mediul și condiții socio-economice de trai. În rezultatul examenului complex, copiii din lotul de cercetare au fost diagnosticați cu următoarele tumori maligne: limfoame în $33,33 \pm 9,62\%$ din cazuri, carcinoame cu celule scuamatoase – în $38,89 \pm 7,27\%$, rhabdomyosarcom al glandei parotide – $13,89 \pm 8,64\%$, limfom Hodgkin – $11,11 \pm 7,63\%$ și osteoblastoclastom în $2,78 \pm 4,96\%$ din cazuri. Distribuția tumorilor depistate după localizare și stadiile bolii sunt prezentate în figurile 1 și 2.

Analiza imunoenzimatică a depistat creșterea statistic semnificativă a nivelului TNF- α în FO al copiilor cu tumori maligne în RCG ($66,78 \pm 4,33 \text{ pg/ml}$, $p < 0,001$) în raport cu copiii convențional sănătoși ($5,47 \pm 1,21 \text{ pg/ml}$). Cele mai crescute valori ale acestei citokine au fost depistate în probele de FO colectate de copiii cu carcinoame cu celule scuamatoase ($59,34 \pm 6,62 \text{ pg/ml}$) și toate tipurile de tumori maligne în stadiile I ($73,11 \pm 3,28 \text{ pg/ml}$) și II ($62,97 \pm 3,46 \text{ pg/}$

ml), iar în stadiile III și IV nivelul TNF- α a fost redus substanțial ($34,21 \pm 7,12 \text{ pg/ml}$ și $33,63 \pm 4,66 \text{ pg/ml}$). În lotul de copii convențional sănătoși nivelul TNF- α în FO a fost în limitele normei ($5,47 \pm 1,21 \text{ pg/ml}$).

Studiul structurii cristaline, obținute în urma deshidratării picăturilor de FO, permite examinarea la microscopul optic a sedimentului rămas pe lama de sticlă, iar structura microcristalină a acestuia se modifică în dependență de starea de sănătate a cavității orale. Au fost cercetate zonele centrale, tranzitorii și periferice ale fasciilor de FO. De regulă, în zona centrală s-au observat acumularea structurilor cristalizate, în zona tranzitorie — cristalesolitare, iar în cea periferică — zona amorfă. Astfel, în zona periferică a fasciilor FO se observă prevalența figurilor de tip „cruciate” și „prismatice”. Tabloul dendritic din zona centrală este reprezentat prin formațiuni liniare, prin structuri de tip „coadacalului” sau „ferigă”.

La examinarea MCG FO copiilor convențional sănătoși s-au depistat structuri microcristaline cu o structură clară în formă de „arbore” sau „ferigă” (Figura 3, A). La subiecții cu tumori maligne în RCG predomină structura cruciată sau denaturată totalmente a microcristalelor de FO (Figura 3, D), cristalizarea patologică a compușilor minerali în mediul proteic (Figura 3, E) și o cantitate mare de incluziuni organice amorfă, zona periferică era lărgită și se observau elemente de distrugerea integrității structurale.

În baza rezultatelor obținute au fost specificate principalele tipuri de microcristalizare (MC) a FO (Figura 3). Pentru tipul de MC este caracteristică prezența structurilor cristaline prismatice de dimensiuni mari, fuzionate, având forma de „ferigă” (Figura 3, A). Pentru obiectivizarea cantitativă a datelor, tipul I de MC a fost apreciat cu 5 puncte. Structurile fractale fuzionate aleatoriu sunt caracteristice pentru tipul II de MC, apreciat cu 4 puncte (Figura 3, B). În cazul tipului III de MC, în zona centrală sunt prezente cristale separate cu formă stelată, iar la periferie se mențin cristalele fractale de dimensiuni mai mari (3 puncte, Figura 3, C). Tipul IV de MC este caracterizat prin prezența cristalelor separate în formă de ramură sau tijă, repartizate relativ uniform pe toată suprafața picăturii deshidratate (2 puncte, figura 3, D). O mare cantitate de cristale separate, de formă stelată, ovală și neregulate, situate izometric, sunt caracteristice pentru tipul V de MC (1 punct) (Figura 3, E). În cazul lipsei complete a cristalelor este constatată tipul VI de MC (0 puncte).

La copiii din lotul de cercetare s-a constatat gradul scăzut de microcristalizare a FO, constituind (GMC $L_1 = 1,31 \pm 0,52$ puncte) și fiind de 2,84 ori mai redus comparativ cu acest indicator apreciat la copiii din lotul martor (GMC $L_0 = 3,72 \pm 0,22$ puncte) ($p > 0,5$), datele, însă nefiind statistic semnificative. La copiii cu tumori

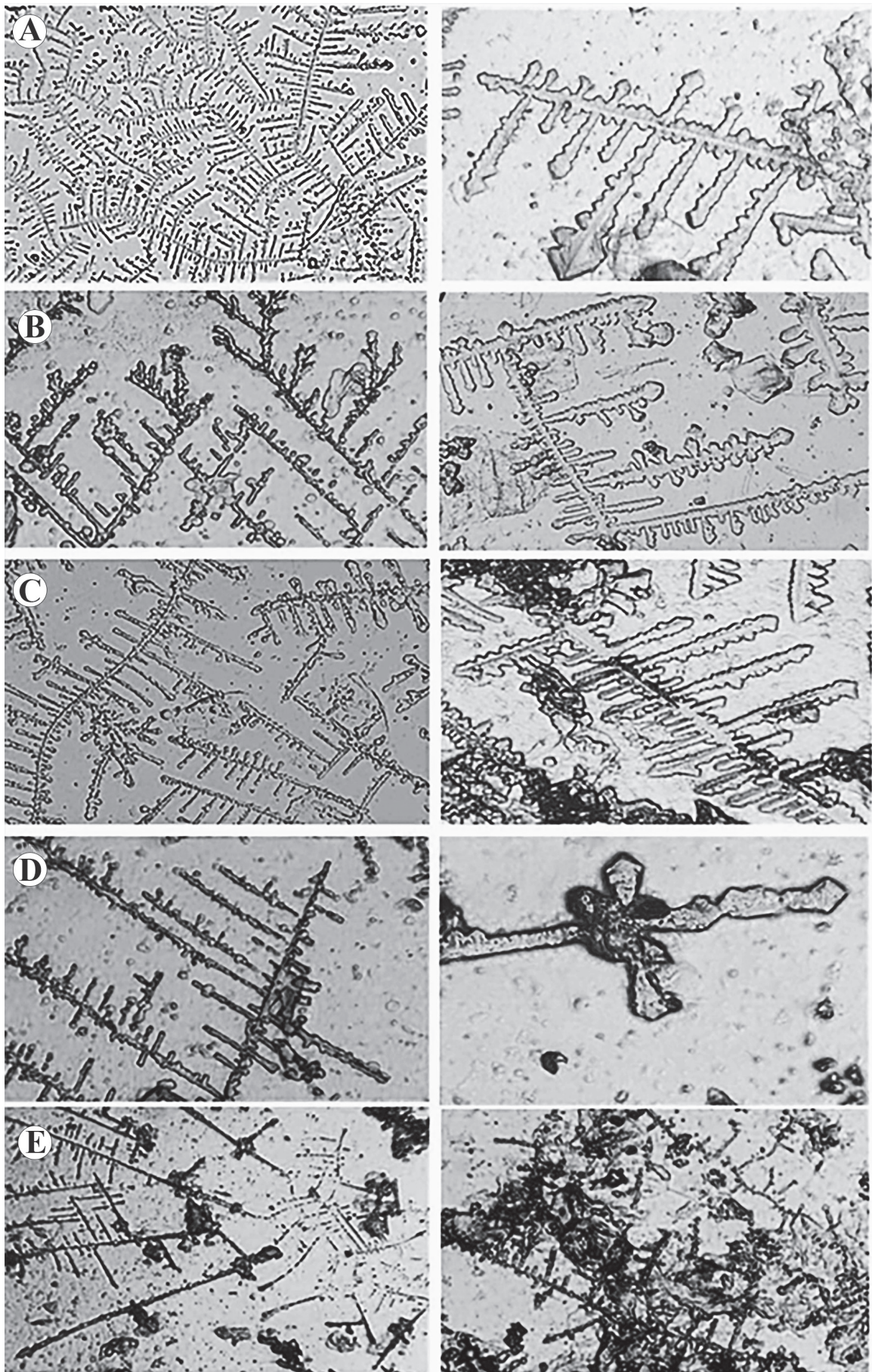


Figura 3. Tipurile de microcristalizare ale fluidului oral: A – tipul I; B – tipul II; C – tipul III;
D - tipul IV; E - tipul V.

maligne în RCG în stadiile I și II GMC FO este 3,07 ori mai redus ($p < 0,05$) în comparație cu valorile acestui indicator estimat la copiii convențional sănătoși.

Analiza structurii cristaline a FO a depistat unele modificări cristalografice specifice la copiii cu tumori maligne în RCG comparativ cu cei convențional sănătoși: predomină tipurile IV - V de microcristalizare, structura cristalelor este dereglată considerabil, pe întreaga suprafață a feței fiind prezente cristalele cruciate de dimensiuni diferite, iar zona periferică este lărgită și fisurată, depistându-se în abundență elemente de deteriorarea integrității structurii. Este cunoscut faptul că caracterul evidențiat, lărgit și fisurat al zonei periferice a picăturilor de FO reflectă conținutul majorat de proteine în lichidul oral și derularea proceselor patologice provocate de radicali liberi, iar gradul distrugerii feței variază ca urmare a perturbării integrității structurii studiate [23].

Analiza corelațională a depistat relația inversă semnificativă ($r = -0,83$, $p < 0,01$) dintre nivelul TNF- α în FO și GMC a FO la copiii cu tumori maligne în RCG în stadiile I și II. Totodată, la copiii convențional sănătoși, dar și la copiii cu tumori maligne în RCG în stadiile III și IV nu s-au observat interdependența dintre nivelul TNF- α în FO și GMC a FO.

Discuții.

Numărul tot mai mare de biomarkeri ai FO descoperiți, asociați cu analiza bazată pe tehnologii din ce în ce mai eficiente, permite să evidențiem saliva/fluidul oral în calitate de alternativă a utilizării sângelui pentru cercetarea clinică [1, 2, 7, 9,]. Posibilitatea utilizării biomarkerilor din FO în studiul stării de sănătate se datorează proprietăților acestui lichid biologic, care reflectă starea psihoemoțională, intensitatea metabolismului, gradul de severitate al proceselor inflamatorii ș.a [1, 2,]. Modificările din compoziția FO sunt asociate și cu administrarea unor medicamente. Principalele avantaje ale studiului FO – non-invasivitatea, simplitatea colectării și accesibilitatea prelevării substratului studiat – oferă noi perspective în cadrul studiilor clinice [13, 15, 20,].

Identificarea biomarkerilor FO face posibilă diagnosticarea bolilor în stadiul lor incipient, în special în diagnosticul cancerului oral. Cu toate acestea, cercetările asupra salivei și aplicațiile acesteia pentru diagnosticul bolilor sistemice sunt încă la etapa inițiale de cercetare [1, 2, 15, 21].

În prezenta lucrare am apreciat biomarkerii combinați – morfologici și din grupul proteom, citokina TNF- α în FO al copiilor cu tumori maligne în RCG. S-a depistat creșterea statistic semnificativă a nivelului TNF- α în FO al copiilor cu tumori maligne în RCG în raport cu copiii convențional sănătoși.

De menționat că cele mai crescute valori ale TNF- α au fost depistate în probele de FO colectate de copiii cu carcinoame cu celule scuamatoase și toate tipurile de tumori maligne în stadiile I și II. Studiul structurii cristaline, obținute în urma deshidratării picăturilor de FO, a depistat unele modificări cristalografice specifice la copiii cu tumori maligne în RCG comparativ cu cei convențional sănătoși. S-a depistat relația inversă semnificativă puternică (dintre nivelul TNF- α în FO și GMC a FO la copiii cu tumori maligne în RCG în stadiile I și II. Totodată, la copiii convențional sănătoși, dar și la copiii cu tumori maligne în RCG în stadiile III și IV nu s-au observat interdependența dintre nivelul TNF- α în FO și GMC a FO. Considerăm că stabilirea acestor semne distinctive a biomarkerilor combinați din FO ar putea fi folosite în diagnosticul precoce al formelor incipiente de tumori maligne în RCG. Supozițiile noastre sunt confirmate de cercetările mai multor autori care au depistat creșterea TNF- α în FO al bolnavilor cu forme incipiente de cancer oral, dat fiind faptul că TNF- α prezintă o gamă largă de funcții imunologice, atât efectoare, cât și reglatoare, iar efectele acesteia la nivelul țesuturilor și sistemelor biologice pot fi extrem de extinse și complexe. TNF- α este o citokină efector, producerea căreia în timpul răspunsului imun la orice stimul determină inițial dacă răspunsul va fi citotoxic, umoral, celular sau alergic [18, 21].

Stabilirea semnelor distinctive ale modificărilor cristalografice în FO, generate demodificările funcționale și metabolice, sporește exactitatea stabilirii diagnosticului și eficiența predicției maladiilor. Metoda de deshidratare (cristalizarea biolichidelor pe lama de sticlă) poate oferi o viziune de ansamblu a stării de sănătate a întregului organism. Modificarea formei cristalelor este consecința schimbărilor proprietăților fizico-chimice ale salivei [6, 14, 20, 23].

Identificarea particularităților morfologice ale fluidului oral poate servi drept test de predicție, care identifică dereglarea mecanismelor de protecție a cavității orale. Metoda de cercetare a cristalogenezei FO poate fi aplicată nu doar în diagnosticul și predicția afecțiunilor cavității orale, dar și în calitate de indicator sensibil al funcționalității întregului organism, contribuind astfel la elaborarea metodologiei înalt informative și neinvazive de diagnosticare a stărilor premorbide și de diagnostic oportun al modificărilor survenite în starea de sănătate a populației.

Concluzii.

1. Aprecierea biomarkerilor combinați în probele de FO (nivelului TNF- α și particularităților morfologice) reprezintă o analiză non-invazivă inovativă pentru depistarea precoce a tumorilor, evaluarea riscului

la malignitate orală, ce poate adăuga valoare rezultatului studiului histologic.

2. Identificarea moleculelor din FO sau din alte fluide legate direct sau indirect de tumorile din RCG are un potențial de predicție a evoluției tumorilor sau urmărirea răspunsului terapeutic într-un mod neinvaziv, permițând astfel dezvoltarea medicinei personalizate, iar cercetările suplimentare ar putea duce la progrese în aplicarea FO în oncologia de precizie în anii următori.

3. Pentru utilizarea clinică a biomarkerilor FO, este necesar, pe de o parte, să se elaboreze protocoale standardizate și, pe de altă parte, să se efectueze studii ample în care să se excludă influența diferitelor variabile de confuzie.

Articol realizat în cadrul Proiectului de Stat „Chirurgia modernă personalizată în diagnosticul și tratamentul complex al tumorilor la copii”. Cifra proiectului nr. 20.80009.8007.06. Perioada integrală de realizare a proiectului 2020–2023. Director proiect: dr. șt. med., conf. univ. Țibîrnă Andrei.

Bibliografia.

- Adeoye J., Alade A.A., Zhu W.Y., Wang W., Choi S.W., Thomson P. *Efficacy of hypermethylated DNA biomarkers in saliva and oral swabs for oral cancer diagnosis: Systematic review and meta-analysis*. Oral Dis. 2022; 28(3):541-558. doi: 10.1111/odi.13773.
- Araújo A., Santos-Silva A., Kowalski LP. *Diagnostic accuracy of liquid biopsy for oral potentially malignant disorders and head and neck cancer: an Overview of Systematic Reviews*. Curr Oncol Rep. 2023; 25(4):279-292. doi: 10.1007/s11912-023-01365-w.
- Cânjău S., Todea C., Sinescu C., Sîrbu O., Moatăr A., Bejinar C., Pricop M., Negruțiu M. L., Duma V.F. *MicroARN-urile salivare ca biomarkeri pentru malignitatea orală*. Revista Română de stomatology. 2016;62(3):69-74.
- Dahiya N., Acharya A.S., Bachani D., Sharma D., Gupta S., Hareesh K., Rath G. *Quality of life of patients with advanced cervical cancer before and after chemoradiotherapy*. Asian Pac J Cancer Prev. 2016;17(7):3095-3099. PMID: 27509935.
- De Rubis G., Krishnan S.R., Bebawy M. *Liquid biopsies in cancer diagnosis, monitoring, and prognosis*. Trends Pharmacol. Sci. 2019;40: 172-186.
- Dimitriu N., Spinei A. *Relația dintre microcristalizarea fluidului oral și afectarea copiilor prin carie dentară*. Medicina stomatologică. 2022;61(1):12-20.
- Elmahgoub F. *Could salivary biomarkers be useful in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders, and is there a relationship between these biomarkers and risk factors?* Evid Based Dent. 2022;23(1):30-31. doi: 10.1038/s41432-022-0249-8.
- Gualtero D.F., Suarez Castillo A. *Biomarkers in saliva for the detection of oral squamous cell carcinoma and their potential use for early diagnosis: a systematic review*. Acta Odontol Scand. 2016;74(3):170-177. doi: 10.3109/00016357.2015.1110249.
- Hema Shree K., Ramani P., Sherlin H., Sukumaran G., Jeyaraj G., Don K.R., Santhanam A., Ramasubramanian A., Sundar R. *Saliva as a diagnostic tool in oral squamous cell carcinoma - a systematic review with meta-analysis*. Pathol Oncol Res. 2019;25(2):447-453. doi: 10.1007/s12253-019-00588-2.
- Kaczor-Urbanowicz K.E., Martín Carreras-Presas C., Aro K., Tu M., Garcia-Godoy F., Wong D.T. *Saliva diagnostics - current views and directions*. Exp Biol Med (Maywood). 2017;242(5):459-472. doi: 10.1177/1535370216681550.
- Kaczor-Urbanowicz K.E., Martín Carreras-Presas C., Kaczor T., Tu M., Wei F., Garcia-Godoy F., Wong D.T. *Emerging technologies for salivaomics in cancer detection*. J Cell Mol Med. 2017;21(4):640-647. doi: 10.1111/jcmm.13007.
- Khurshid Z., Zohaib S., Najeeb S., Zafar M.S., Slowey P.D., Almas K. *Human Saliva collection devices for proteomics: an update*. Int J Mol Sci. 2016;17(6):846. doi: 10.3390/ijms17060846. PMID: 27275816; PMCID: PMC4926380.
- Nappier S.S., Speight P.M. *Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions; an overview of the literature*. J. Oral Pathol. Med. 2008;37(1):1-10.
- Nazarenko, I. *Extracellular Vesicles: Recent Developments in Technology and Perspectives for Cancer Liquid Biopsy*. Recent Results Cancer Res. 2020;215:319-344.
- Park N.J., Zhou H., Elashoff D. et al. *Salivary miRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection*. Clin. Cancer Res. 2009;15:5473-5477.
- Rapado-González Ó., Martínez-Reglero C., Salgado-Barreira Á., Takkouche B., López-López R., Suárez-Cunqueiro M.M., Muínelo-Romay L. *Salivary biomarkers for cancer diagnosis: a meta-analysis*. Ann Med. 2020;52(3-4):131-144. doi: 10.1080/07853890.2020.1730431.
- Roi A., Boia S., Rusu L., Roi C.I., Boia E.R., Riviș M. *Circulating miRNA as a Biomarker in Oral Cancer Liquid Biopsy*. Biomedicine. 2023;11:965. <https://doi.org/10.3390/biomedicine11030965>. <https://www.mdpi.com/2227-9059/11/3/965>
- Roșu M.C., Mihnea P.D., Ardelean A., Moldovan S.D., Popețiu R.O., Totolici B.D. *Clinical significance of tumor necrosis factor-alpha and carcinoembryonic antigen in gastric cancer*. J Med Life. 2022;15(1):4-6. doi: 10.25122/jml-2020-0098. PMID: 35186129.
- Sharma N., et al. *Multifractal Texture Analysis of Salivary Fern Pattern for Oral Pre-Cancers and Cancer Assessment*. IEEE Sensors Journal. 2021;21(7):9333-9340. doi: 10.1109/JSEN.2021.3053262.
- Spinei A., Picos A.M., Romanciuc I., Berar A., Mihailescu A.M. *The study of oral liquid micocrystallization in children with gastro-esophageal reflux disease*. Clujul Medical. 2014; 87(4):269-277.

21. Spinei A., Chiriac A., Spinei I., Toma V., Foia L. *Impactul Factorului de Necroză Tumorală-alfa asupra afectării prin carie dentară a copiilor cu tumori maligne*. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale, 2022; 73(2): p. 84-91.
22. Spinei A., Chiriac A., Spinei I., Țibîrnă Gh. *Rolul microbiomului oral în diagnosticul și prognosticul tumorilor cavității orale*. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2021; 70(2): p. 68-74.
23. Spinei A. *Oportunități în prevenirea cariei dentare la copiii cu dizabilități*. Teză de doctor habilitat în științe medicale. Chișinău 2018, 320 p.
24. Țibîrnă A., Țibîrnă Gh., Railean S., Spinei A., Guțul Gh. *Particularitățile adenomului și cancerului folicular al glandei tiroide la copii*. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2019; 64(4):137-140. ISSN 1857-0011.
25. Țibîrnă Gh., Gudumac E., Mereuță I., Railean S., Spinei A., Bernic J., et. al. *Epidemiologia tumorilor benigne și maligne la copii în Republica Moldova (1 an de activitate-2020)*. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2021; 70(2): p. 8-23.
26. Zhang A., Sun H., Wang P., Wang X. *Salivary proteomics in biomedical research*. Clin Chim Acta. 2013;415(16):261-265. doi: 10.1016/j.cca.2012.11.001.
27. Леус П.А. *Диагностическое значение гомеостаза слюны в клинике терапевтической стоматологии*. Минск: БГМУ, 2011, 67 с.