УДК: 616.316–008.8

ПЛУНКА, МЕТОДИ ЗА НЕЈЗИНО КОЛЕКЦИОНИРАЊЕ И ПРОЦЕСИРАЊЕ

Ристоска С., Ивановски К., Пешевска С., Дирјанска К., Миндова С., Стефановска Е.

СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, Катедра за болести на устата и пародонтот

Оралниот флуид (вкупната хумана салива) претставува комплексен биолошки флуид, кој содржи голем број на неоргански компоненти и органски конституенти како (глико)протеини и пептиди кои имаат важни функции во одржувањето на оралното здравје. Релативно лесниот и неинвазивен начин на колекционирање како и добрата корелација на концентрациите на соодветните конституенти помеѓу плунката и плазмата, ја прави саливата атрактивен дијагностички флуид за мониторинг на општото здравје, рана детекција на заболувањата, биомониторинг на пестициди, мониторинг на медикаменти и хормони како и за различни клинички и форензични апликации. Меѓутоа, вкупната салива е микстура не само од плунковниот секрет, туку содржи и материи кои не се по потекло од плунковните жлезди, како гингивален флуид, десквамирани орални епителни клетки, назофарингеален секрет, партикли од храна како и бактерии и нивни продукти. Најчести методи за колекционирање на вкупната салива се методот на истекување (draining method), исплукување (spitting method), аспирирање (suction method) и апсорбирачкиот (absorbent method) метод. Значајно е тоа што, било кој метод да се примени за нејзино колекционирање, пациентот е ослободен од стрес(како при земање крв)и приватност (како при собирање урина). Понекогаш, поради различни финансиски, практични или методолошки причини не е возможно примероците плунка веднаш да се анализираат после колекционирањето. Затоа е потребно тие да се стабилизираат и чуваат во соодветни услови до понатамошна анализа.

Клучни зборови: плунка, плунковни жлезди, методи за колекционирање, дијагностички медиум.

Оралниот флуид (вкупната хумана салива) претставува комплексен биолошки флуид, кој содржи голем број на неоргански компоненти (Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}, фосфати и бикарбонати) и органски конституенти како (глико) протеини и пептиди кои имаат важни функции во одржувањето на оралното здравје. Плунката примарно се продуцира и се секретира од трите пара големи плунковни жлезди- паротидната, субмандибуларната и сублингвалната жлезда, како и бројните мали мукозни жлезди локализирани во мукозата на оралната празнина (4). Релативно лесниот и неинвазивен начин на колекционирање како и добрата корелација на концентрациите на соодветните конституенти помеѓу плунката и плазмата, ја прави саливата атрактивен дијагностички флуид за мониторинг на општото здравје, рана детекција на заболувањата, биомониторинг на пестициди, мониторинг на медикаменти и хормони (18) и различни форензични и клинички апликации (26). Меѓутоа, вкупната салива е микстура не само од плунковниот секрет, туку содржи и материи кои не се по потекло од плунковните жлезди, како гинги-

вален флуид, десквамирани орални епителни клетки, назофарингеален секрет, партикли од храна како и бактерии и нивни продукти (14). Поради тоа што е во близок контакт со ткивата во усната празнина, плунката е одраз и на се она што се случува во нив, било да се работи за физиолошки или патолошки состојби, па поради тоа голем број автори популарно ја нарекуваат „огледало на оралното здравје". Затоа анализирањето на биохемискиот состав на плунката може да биде од особено значење во стоматологијата, заради процена на ризикот за настанок на болеста, дијагностицирање, следење на текот на болеста и контрола на резултатите од применетата терапија на забниот кариес, пародонтопатијата, оралниот карцином и инфективните заболувања во оралната средина (12, 13).

Анализата на оралниот флуид обезбедува особено значајни (непроценливи) дијагностички информации, пред се, поради тоа што, колекционирањето на саливата претставува неинвазивен, брз и најевтин процес, протокот на саливата и нејзината јонска композиција се лесно мерливи со стандардни методи и што е особено важно, најновите сознанија во разјаснувањето на механизмите на саливација ќе помогнат да се потврди молекуларната основа на голем број заболувања и ќе обезбедат корисни податоци за развитокот на специфични и ефикасни тераписки модалитети (9, 10).

Постојат различни методи кои се достапни за колекционирање на вкупната салива. Значајно е тоа што, било кој метод да се примени за нејзино колекционирање, пациентот е ослободен од стрес (како при земање крв) и приватност (како при собирање урина). Независно од методот, постојат некои општи препораки при колекционирањето на саливата. Употребата на униформни стандардни методи и услови за колекционирање на плунка, во огромна мера ја олеснува компарацијата на резултатите помеѓу студиите спроведени од страна на различни истражувачки групи. Фактори коишто влијаат врз лачењето и составот на плунката се интервалот од денот кога се врши колекционирањето, собната температура, влажноста на воздухот, како и времетраењето на колекцијата (6, 22). Многу кратки (<1 min) или многу долги (>15 min) периоди на собирање можат да дадат нереални вредности за просечниот проток на плунка. Препораки за стандардизирана колекција на вкупната салива:

- Примероците плунка треба да се колекционираат секогаш во исто време од денот, по можност помеѓу 9:00 и 11:00 часот (поради варијациите на плунковната секреција во текот на денот),
- Пациентот да се воздржува од јадење и пиење барем 90 минути пред колекционирањето,
- Ако е можно, да се прекине употребата на медикаменти кои можат да влијаат врз секрецијата на плунка, најмалку 1 ден или подолго (доколку лекот има долг полуживот) (16),
- Да се исплакне устата со дејонизирана вода пред колекционирањето,
- Испитаникот треба да седи удобно, опуштено, со отворени очи, а главата да е навалена благо кон напред,
- Колекционирањето треба да трае 10 минути (25).

Најчести методи за колекционирање на вкупната салива се методот на истекување (draining method), исплукување (spitting method), аспирирање (suction method) и апсорбирачкиот (absorbent method) метод.

Draining method

Со овој метод плунката спонтано истекува надвор од оралната празнина преку долната усна, во градуирана тест туба (епрувета) или сад за колекционирање. Испитаникот на крајот на колекциониот период исплукува во епруветата.На нејзе може да биде поставена инка со цел да се олесни собирањето на плунката која истекува од усните. Количеството на плунка се утврдува со мерење на тежината (специфична тежина од

1 g/cm3) или со читање на скалата на градуираната епрувета (15).

Spitting method (метод со плукање)

Плунката се акумулира на подот на усната празнина, а потоа испитаникот исплукува во градуирана епрувета или во соодветен сад, секои 60s или тогаш кога ќе добие нагон да ја проголта течноста акумулирана на подот на усната празнина. На епруветата исто така може да се постави инка за да се олесни собирањето на плунката. Повторно, количеството на плунка се утврдува со мерење на тежината или се чита од скалата на градуираната епрувета (15).

Suction method (метод на вшмукување, аспирација)

Плунката континуирано се аспирира од подот на усната празнина во градуирана епрувета или соодветен сад, со помош на аспиратор. Количеството на плунка се определува со мерење на тежината или со читање на градуираната епрувета (15).

Absorbent method (апсорбирачки метод)

Плунката се апсорбира со помош на памучно топче, газа или сунѓерче, поставени во устата во предел на изводните канали на големите плунковни жлезди, кои се отстрануваат на крајот на колекциониот период (15). Кај пациенти со силно изразена ксеростомија, проследувањето на степенот на хипосаливација, може да се изврши со помош на апсорбирачкиот (брис) методот. Овој методот се користи за да се впие целокупната плунка во усната празнина, дури и она количество што се задржува на забите или протезите. Се користи сунѓерче чија тежина се мери пред и по колекционирањето. Од пациентите се бара да не консумираат течности или храна 2 часа пред тестирањето. Разликата во тежината на сунѓерчето овозможува проценка на степенот на хипосаливација (24).

Комерцијално достапен апсорбирачки систем за колекционирање на вкупната салива е Salivette method (Sarstedt, Numbrecht, Germany). Користејќи го овој метод, колекцијата на плунка се изведува со џвакање на памучна ролна. Примерокот плунка за испитување се добива со враќање на ватеролната во Sallivete системот и центрифугирање на садот. Добиената течност (флуид) потоа се користи за анализа. Овој метод воглавно се применува за испитување на составот на плунката, пример, присуство на одредени медикаменти, хормони или мониторинг на стероиди (2).

Секретот (плунка) од паротидната плунковна жлезда е наједноставен за колекционирање. Отворот на изводниот канал (ductus Stenoni) на паротидната жлезда е пристапен и лесен за манипулирање, па често при колекционирањето на него се аплицира Lashley или Carlsson–Crittenden колектор. Papilla Stenoni е локализирана на букалната лигавица во висина на првиот/вториот максиларен молар (слика 1). При колекционирањето, тенко цевче може да се вметне во дуктусот

Слика 1.

преку отворот на Стеноновата папила, кое може да се фиксира со сутура, за попрецизно колекционирање.

Lashley cup/Carlson–Crittenden cup

Овие колектори за плунка се лесни за аплицирање, дури и од страна на необучен персонал. Системот се состои од внатрешен и надворешен дел. Внатрешниот дел служи како сад за колекционирање и се поставува над отворот на изводниот канал на паротидната плунковна жлезда, а надворешниот дел го сочинуваат пластични цевчиња кои се припојуваат на внатрешниот дел (слика 2 и 3). Протокот на плунката јасно се следи преку пластичните цевчиња. Бидејќи протокот на нестимулирана паротидна плунка е многу низок, дури понекогаш и отсуствува, паротидната плунка најчесто се колекционира со стимулација. Како најчесто применуван стимулус е апликација на лимонска киселина на латералните делови на јазикот, во интервал од 30 или 60 секунди, со помош на памучно стапче (1, 15).

Слика 2. *Lashley cup/ Carlson- Crittenden cup*

Слика 3. *Lashley cup/ Carlson- Crittenden cup*

Субмандибуларна и сублингвална салива (SM/SL)

SM/SL жлезда учествуваат со 30-60% од волуменот на вкупната стимулирана салива, зависно од степенот на стимулација (23). Додека колекционирањето на паротидната плунка е релативно лесно со веќе востановените методи, сеуште не постојат широко прифатени техники за колекција на СМ/СЛ плунка. Затоа најголем број студии се ограничени на истражувањата спроведени на паротидната плунка или на вкупната салива. Секретот од СМ и СЛ плунковна жлезда навлегува во оралниот кавум преку заеднички канал кој се наоѓа на подот од усната празнина, па затоа се јавуваат потешкотии при потребата од изолирана колекција на секрет од некоја поединечна жлезда. Tapered polyethylen цевче (со пречник ~0,5-1,5 mm) може да се аплицира во Whartoni-овиот канал, но при тоа треба особено да се внимава со канилата да не се руптурира зидот на изводниот канал, бидејќи тој е многу тенок (15, 25).

Сегрегатор (индивидуална протеза)

Уште далечната 1955 година, Schneyer (18) го вовел методот за колекционирање на изолирана субмандибуларна и сублингвална плунка кај човекот. Овој индивидуален сегрегатор за колекционирање на СМ/СЛ плунка има централен дел кој служи за собирање на СМ салива и два латерални дела за колекционирање на секретот од СЛ плунковна жлезда. Колекторот се аплицира на долниот алвеоларен гребен. Со помош на полиетиленски цевчиња латералните делови се поврзани со собирната туба (слика 4.) Бидејќи отворите на главните изводни канали на СМ и СЛ плунковна жлезда се наоѓаат многу блиску еден до друг, со користењето на овој

Слика 4. *Сегрегатор - индивидуална протеза*

Слика 5. *Метод на аспирација (вшмукување)*

колектор субмандибуларната плунка која се насобира во централниот резервоар, сепак делумно ќе се измеша со сублингвалната плунка која се насобира во латералните делови, но, при тоа флуидот од латералниот колектор доминантно ќе содржи сублингвална плунка (21). Бидејќи ваквата направа треба да е индивидуално адаптирана, таа не може да се користи рутински во секојдневната пракса.

Метод на вшмукување (аспирација)

Едноставен метод кој се користи за собирање на СМ/СЛ плунка е преку блокирање на Стеноновиот изводен канал со помош на памучни ролни (ватеролни), при што Вартоновиот и Бартолиниевиот изводен канал остануваат слободни. Плунката која се насобира на подот на усната празнина се колекционира со помош на шприц, микропипетор или со внимателно аспирирање (слика 5). Користејќи го овој метод плунката од двете СМ и СЛ жлезди се колекционира заедно, бидејќи поединечната аспирација е особено тешка поради блиската анатомска врска помеѓу орифициумите (отворите) на двете жлезди и честото присуство на комуникациски каналчиња помеѓу главните изводни канали на субмандибуларните и сублингвалните плунковни жлезди. Плунковните жлезди можат да бидат стимулирани со 2-4% р-р на лимонска киселина која со помош на памучно стапче се аплицира на латералните делови на јазикот во интервал од 30-60 сек (23).

Wolff апарат

Системот за колекционирање на СМ/СЛ плунка развиен од страна на Wolff и сор. се состои од цевчиња за собирање, сад за потиснување, комора за складирање и дел (уред) за вшмукување (слика 6). Колекционите цевчиња се изградени од целулоза ацетат битурат и можат да се стерилизираат во воздушен автоклав. Сите компоненти од овој систем се поврзани и безбедно прицврстени со отворите на садот за потиснување кој е со

Слика 6. *Wolff - апарат*

должина 4 cm и ширина 2,5 cm изработени од поликарбонат (23).

Мали плунковни жлезди

Секретот од малите плунковни жлезди може да се колекционира со помош на пипетор, апсорбирачка филтер хартија, или специјално конструирани индивидуални колектори. Количеството на секрет се определува со Periotron (Oraflow, New York, USA) со кој се мерат мали волумени на флуид. За колекционирање на плунката од малите плунковни жлезди, оралната мукоза најпрво треба да се исуши, а по интервал од 2 мин., капките од плунка кои ќе се појават се собираат со апсорбирачка хартија. Количеството на плунка потоа се одредува со мерење на тежината, или со Periotron (19, 15,16).

Лабијална и букална салива

Плунката од малите лабијални и букални жлезди може да се колекционира со помош на апсорпциона филтер хартија. Тенки стрипови со димензии 2,2 x 4,4 mm од филтер хартија (Perio-paper strips) или 6x16 mm високо квалитетна хроматографска хартија (Whatman 3MM, Whatman International, Madistone, England), се аплицира во селектираните места во оралната празнина во тек на 5-30 сек. (dipstick method). Волуменот на насобраната плунка се мери електронски, со помош на Periotron. Протокот на плунката се пресметува во $\mu L/min/cm^2$ на мукозна површина (11, 19, 3).

Палатинална плунка

По испирање на устата со дејонизирана вода, палатиналните површини се сушат со ватеролни. Капките плунка кои што ќе се појават на отворите (орифициумите) на палатиналните плунковни жлезди, континуирано ќе бидат аспирирани користејќи соодветни пипетори.

Филтрациона хартија

Протокот на плунката од ПАЛ плунковни жлезди, може да се измери со помош на диск од филтер хартија со d=8мм (Rundfilter MN640d,Macherey-Nagel GmbH&Co KG, Duren, Germany), кој се аплицира билатерално во регионот на вторите максиларни молари. Колекционирањето на плунката трае околу 30 сек. Исто така и Periopaper, Sialopaper, или хроматографска хартија може да послужи за колекционирање на ПАЛ плунка, а волуменот се мери со Periotron. Студиите укажуваат дека палатиналната секреција е многу варијабилна дури и кај иста индивидуа и зависи од стимулацијата на ПАЛ плунковни жлезди (3, 11, 19).

Отпечаток од палатумот

Покрај користењето на филтер хартија или пипета, палатиналната плунка може да се колекционира и со изработка на индивидуален отпечаток од горната вилица. По отстранувањето на лажицата со отпечаточната паста, површината на отпечатокот која била во непосреден контакт со палатумот, е препокриена со тенок филм на плунка која доминантно се состои од палатинална салива. Овој тенок филм плунка потоа се собира и се користи за хемиски анализи. Овој метод не е погоден за проследување на протокот на палатиналната салива (20).

Индивидуална протеза за колекционирање

Овој индивидуален сегрегатор за колекционирање на ПАЛ салива го препокрива

Слика 7. *Индивидуална колекциона протеза*

тврдото непце и предната третина на мекото непце. Секретот се акумулира во комората, а потоа протекува преку цевче како резултат на секреторниот притисок или внимателно се аспирира со шприц (слика 7) (21).

Понекогаш, поради различни финансиски, практични или методолошки причини не е возможно примероците плунка веднаш да се анализираат после колекционирањето. Затоа е потребно тие да се стабилизираат и чуваат во соодветни услови до понатамошна анализа.

Врз основа на бројни истражувања предложен е следниот протокол на чување на примероците на плунката:

1. Примероците на плунката може да се чуваат на собна температура доколку анализата се спроведе во рок од 30-90 минути. На температура од 4^0C плунката се чува доколку анализата се спроведе во рок од 3-6 часа. Примероците на плунката се чуваат на -20^0C (или подобро на -80^0C) ако анализата се спроведува по 1 ден или после неколку месеци.
2. Брзо замрзнување на плунката во течен азот: се мешаат исти количини на плунка и 80% глицерол. Целта на оваа процедура е инхибиција на бактериските протеази.
3. Инхибиција на сите ензими присутни во плунката: се меша секој примерок на плунката со ензимски инхибитори во сооднос 10:1. Ензимски инхибитори се: леупептин, апротинин и 4-аминоетил-бензенсулфонил-флуорид.
4. Со додавање на Na-азид во примероците во плунката се забавува растот на бактериите.

Користењето на плунката како дијагностичка течност има одредени предности, но и недостатоци. Една од најголемите предности на плунката во споредба со крвта е, како што претходно споменавме, нејзината колекција која е атрауматично искуство, кое што е присутно при венепункцијата. Собирањето на плунката е многу едноставно, не се потребни посебни инструменти и обучен кадар. Но, недостаток на користењето на плунката како дијагностичка течност е, што таа не претставува вистински одраз на концентрацијата на сите присутни параметри во крвта. Проблем е и нејзината голема вискозност, поради присуството на мукополисахариди и мукопротеините. Тоа може да ја попречува аналитичката процедура. Невозможно е, или многу тешко да се земе плунка кај пациенти кои поради различни причини имаат намалено лачење на плунка (5, 7, 8).

Без оглед на овие ограничувања, голем број на истражувања кои се изведуваат со високо софистицирани техники, укажуваат дека сепак плунката претставува дијагностичка течност на иднината.

SALIVA, COMMON METHODS FOR COLLECTING, PROCESSING AND STORAGE SALIVA SAMPLES

Ristoska S., Ivanovski K., Peševska S., Dirjanska K., Mindova S., Stefanovska E.

Summary

Human saliva is a complex biological fluid, which contains a large number of inorganic and organic constituents with important functions for the maintenance of oral health. The relatively easy and noninvasive collection of saliva, make saliva an attractive diagnostic fluid for monitoring of general health, early disease detection, biomonitoring of pesticides, monitoring of drugs, hormones and various clinical and forensic applications. Whole saliva is a mixture of not only salivary secretions, but also contains gingival crevicular fluid,oral epithelial cells, food debris, bacteria and their products.There are different methods available for collecting whole saliva. Common methods include draining, spitting, suction and swab (absorbent) method. The methods are free

of stress (as experienced in blood collection) and prvacy issues (as in urine collection). Sometimes, due to practical, methodological or financial reasons, it is not always possible to analyze samples immediately after collection. Thus, storage and stabilization prior to analysis of the salivary samples is often needed.

Key words: saliva, salivary glands, methods for collecting, salivary diagnostics.

Литература

1. Burlage FR, Pijpe J, Coppes RP, et al. Variability of flow rate when collecting stimulated human parotid saliva. Eur J Oral Sci 2005; 113(5): 386-90.
2. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. Clinica Chimica Acta 2007; 383: 30-40.
3. Disabato- Mordarski T, Kleinberg I. Use of a paper-strip absorption method to measure the depth and volume of saliva retained in embrasures and occlusal fussae of the human dentition. Arch Oral Biol 1996; 41(8-9):809-20.
4. Guyton AC. Text Book of Medical Physiology, 11th edn. Philadelphia: Elsevier; 2006.
5. Hofman LF. Human saliva as a diagnostic specimen. J Nutr 2001;131:1621-5.
6. Kariyawasam AP, Dawes C. A circannuual rhythm in unstimulated salivary flow rate when the ambient temperature varies by only about 2 degrees C. Arch Oral Biol 2005; 50(10): 919-22.
7. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. J Clin Periodontol 2000; 27: 453-65.
8. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva-a review. Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13 (2):197-212
9. Lac G. Saliva assayes in clinical and research biology. Pathol Biol 2001; 49:660-7.
10. Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: Noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. J Can Dent Assos 2002; 68 (3): 170-174.
11. Lee SK, Lee SW, Chung SC, Kim YK, Kho HS. Analysis of residual saliva and minor salivary gland secretions in patients with dry mouth. Arch Oral Biol 2002; 47(9): 637-41.
12. Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. Br Med J 1992; 305:207-8.
13. Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. J Oral Pathol Med 1990;3:119-25.
14. Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. Annu Rev Physiol 2005; 67: 445-69.
15. Navazesh M. Methods for collecting saliva. Ann N Y Acad Sci 1993; 694: 72-7.
16. Navazesh M, Brightman VJ, Pogoda JM. Relationship of medical status, medications, and salivary flow rates in adults of different ages. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1996;81(2): 172-6.
17. Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. Arch Oral Biol 2007;52 (12):1114-1135
18. Schneyer L. Method for the collection of separate submaxillary and SL salivas in man. J Dent Res 1955; 34:257-61.
19. Shern RJ, Fox PC, Cain JL, Li SH. A method for measuring the flow of saliva from the minor salivary glands. J Dent Res 1990; 69(5): 1146-9.
20. Todorovic T. Oralna biohemija. II izdanje. Cigora stampa, Beograd 2006.
21. Veerman EC, van den Keybus PA, Vissink A, Nieuw Amerongen AV. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. Eur J Oral Sci 1996; 104(4(Pt1)): 346-52.
22. Vissink A, Spijkervet FK, Van Nieuw Amerogen A. Aging and saliva: a review of the literature. Spec Care Dentist 1996; 16(3): 95-103.
23. Wolff A, Begleiter A, Moskona D. A novel system of human submandibular/SL saliva collection. J Dent Res 1997; 76(11): 1782-6.
24. Wolff A, Herscovici D, Rosenberg M. A simple technique for the determination of salivary gland hypofunction. Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 94(2): 175-8.
25. Wong TD. Salivary diagnostics. Wiley-Blackwell, 2008
26. Zimmermann BG, Park NJ, Wong DT. Genomic targets in saliva. Ann N Y Acad Sci 2007; 1098:184-91.