УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ-СКОПЈЕ

Киро ИВАНОВСКИ, Катарина ДИРЈАНСКА,
Соња МИНДОВА, Стевица РИСТОСКА

ОРАЛНА БИОХЕМИЈА

- П Р А К Т И К У М -

Скопје, 2012

ОРАЛНА БИОХЕМИЈА – ПРАКТИКУМ

Киро ИВАНОВСКИ, Катарина ДИРЈАНСКА, Соња МИНДОВА, Стевица РИСТОВСКА

Издавач:
Киро Ивановски и сор.

Рецензенти:
Проф. д-р Златанка Белазелкоска
Проф. д-р Мирјана Поповска
Проф. д-р Ицко Ѓорѓевски

Печати:
РИ ГРАФИКА - Скопје

Тираж:
500 примероци

CIP - Каталогизација во публикација
Национална и универзитетска библиотека "Св. Климент Охридски", Скопје

612.31.015(075.8)(075.6)

ОРАЛНА биохемија : практикум / Киро Ивановски ... [и др.]. - Скопје : Стоматолошки факултет, 2012. - 108 стр. : илустр. ; 22 см

Автори: Киро Ивановски, Катарина Дирјанска, Соња Миндова, Стевица Ристовска. - Библиографија: стр. 105-108

ISBN 978-608-65478-1-3
1. Ивановски, Киро [автор]
а) Орална биохемија - Високошколски учебници - Вежби, лабораториски
COBISS.MK-ID 92411146

Одобрено од Наставно-научниот Совет на Стоматолошкиот факултет, на 21-таредовна седница, одржана на ден 14.12.2011

Предговор

Учебното помагало ,, Орална биохемија–практикум" е конципирано од два дела. Првиот дел е наменет за студентите на додипломските студии по предметите орална биохемија и орална физиологија, а е именуван како ,,Основни биохемиски испитувања на оралниот медиум". Вториот дел, насловен како ,,Плунката како дијагностички медиум", одговара на наставната содржина на предметот плунката како дијагностички медиум, на постдипломските студии.

Методските единици се напишани на осмислен начин, со доволен број на графички прикази, илустрации и табели кои овозможуваат потполно разбирање на проблематиката. Притоа, секоја методска единица е посебна целина која се надоврзува на следната, правејќи две систематизирани целини-делови на учебното помагало. Првиот дел е сочинет од 9 глави, а вториот дел од 2 глави. Вкупната презентирана содржина се вклопува во постојната програма за практична настава по предметите орална биохемија и орална физиологија. Вториот дел од Практикумот ги дава најновите сознанија за употребата на плунката како течност со дијагностички потенцијал и токму овој дел ќе биде од голем интерес за студентите на вториот циклус студии.

Ракописот содржи материјал што треба да послужи како учебно помагало за студентите на студиската програма за доктори по дентална медицина, како и за студентите на студиските програми за стручни забни техничари и стручни стоматолошки сестри при Стоматолошкиот факултет во Скопје. По обемот и содржината, тој во целост одговара на програмата на Стоматолошкиот факултет.

Проф. д-р ***Киро Ивановски***

С О Д Р Ж И Н А

ПРВ ДЕЛ - ОСНОВНИ БИОХЕМИСКИ ПРЕТРАГИ НА ОРАЛНИОТ МЕДИУМ 5

1. **МЕТОДИ ЗА КОЛЕКЦИЈА НА ПЛУНКА 7**
2. **КОЛЕКЦИЈА НА НЕСТИМУЛИРАНА ПЛУНКА 13**
3. **КОЛЕКЦИЈА НА СТИМУЛИРАНА ПЛУНКА 15**
4. **МЕТОДИ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА САЛИВАРНИТЕ ПРОТЕИНИ 29**
5. **ДОКАЖУВАЊЕ НА ДЕЛУВАЊЕТО НА САЛИВАРНАТА АМИЛАЗА 37**
6. **САЛИВАРНИ ПУФЕРИ И ОДРЕДУВАЊЕ НА pH НА ПЛУНКАТА 45**
7. **САЛИВАРНИТЕ МУЦИНИ И НИВНОТО ДОКАЖУВАЊЕ ВО ПЛУНКАТА 55**
8. **ЕЛЕКТРОЛИТИ ВО ПЛУНКАТА И МЕТОДИ ЗА НИВНО ОДРЕДУВАЊЕ 63**
8. **ГИНГИВАЛЕН ФЛУИД И МЕТОДИ ЗА ДОБИВАЊЕ НА ГИНГИВАЛЕН ФЛУИД ЗА БИОХЕМИСКА АНАЛИЗА 73**

ВТОР ДЕЛ - ПЛУНКАТА КАКО ДИЈАГНОСТИЧКИ МЕДИУМ 79

1. **КОРИСТЕЊЕ НА ПЛУНКАТА КАКО ДИЈАГНОСТИЧКИ МЕДИУМ ВО СТОМАТОЛОГИЈАТА 81**
2. **КОРИСТЕЊЕ НА ПЛУНКАТА КАКО ДИЈАГНОСТИЧКИ МЕДИУМ ВО МЕДИЦИНАТА 95**

ЛИТЕРАТУРА 105

ПРВ ДЕЛ

ОСНОВНИ БИОХЕМИСКИ ПРЕТРАГИ НА ОРАЛНИОТ МЕДИУМ

1 МЕТОДИ ЗА КОЛЕКЦИЈА НА ПЛУНКА

Општи препораки при колекционирањето на плунката

Draining method (метод на истекување)
Spitting method (Метод со плукање)
Suction method (метод на вшмукување)
Absorbent method (апсорбирачки метод)

Орална хомеостаза претставува збир на механизми кои учествуваат во одржувањето и зачувувањето на здравјето на сите орални структури. Одржувањето на оралната хомеостаза е овозможено со непреченото функционирање на севкупниот жлезден апарат во оралната празнина. Него го сочинуваат трите пара големи плунковни жлезди: *glandulae parotis, glandulae submandibulares, glandulae sublinguales*, како и бројните мали мукозни жлезди кои влегуваат во состав на оралната мукоза. Сите овие жлезди го излачуваат својот секрет во оралната празнина, каде што секретот се меша, при што се формира *мешана плунка* (мешана салива). Процесот на излачување на плунка (салива) се нарекува *саливација.*

Целокупната хумана салива претставува комплексен биолошки флуид, кој не се состои само од плунковниот секрет, туку содржи и гингивална течност, дебрис, како и клетки кои не се по потекло од плунковните жлезди. Главна предност на вкупната плунка како медиум за истражување е лесниот и неинвазивен метод на колекција. Методот е ослободен од стрес (како при земање крв) и приватност (како при собирање урина). Прецизното мерење на протокот на плунката и нејзиниот биохемиски состав е од суштинско значење за многу клинички, експериментални и дијагностички цели. Колекцијата на плунка е неинвазивен метод кој може да ни послужи за проследување на активноста на различни заболувања, како и за одредување на нивото на одредени медикаменти и хормони. Како при секое клиничко истражување и при колекционирањето на плунка постојат одредени ограничувања, вклучувајки ги следниве :

- Плунката ги влажни и подмачкува оралните површини. Колекција на вкупната салива значи, собирање на течност која истекува надвор од оралната празнина,што не го претставува целокупното количество на плунка бидејќи, сепак дел од неа се задржува на оралните површини
- Плунковните фракции се губат во процесот на колекционирањето, што се должи на испарување и задржување на флуид (течност) во колекционите уреди
- Секрецијата на плунка варира во текот на денот и е под силно влијание на надворешната температура, сезоната, хидратациониот статус на индивидуата, моменталната здравствена состојба (вклучувајќи го и внесот на лекови) како и расположението. Така, иста индивидуа веројатно ќе излачи различно количество на плунка во различни услови.

Условите (состојбите) за собирање на плунка не се апсолутни. Една нестимулирана состојба не може да биде потполно без стимулации, бидејќи и мали орални движења или моменталната психичка состојба на субјектот може да предизвикаат значително зголемување на плунковна секреција. Од друга страна пак, невозможно е да се стандардизира интензитетот на стимулација. Сепак вредноста на плунката како дијагностички медиум е се повеќе призната.Затоа и покрај ограничувањата, колекционирањето на плунката станува се почеста дијагностичка процедура која бара стандардизација и точност.

Општи препораки при колекционирањето на плунката

Поради варијациите на плунковната секреција во текот на денот важно е да се користат стандардизирани услови при нејзината колекција. 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, како и времетраењето на колекцијата. Многу кратки (<1 min) или многу долги (>15 min) периоди на собирање можат да дадат нереални вредности за просечниот проток на плунка. Покрај тоа,често се забележува дека во текот на првите минути на собирање, на пример, левата паротидна жлезда произведува повеќе плунка од десната жлезда, додека во останатиот дел од колекциониот период (обично 10min) овие разлики исчезнуваат. Препораки за стандардизирана колекција на вкупната и гландуларната салива се:

- Примероците на плунка треба да се колекционираат секогаш во исто време од денот, по можност помеѓу 9:00 и 11:00 часот.
- 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)
- Да се исплакне устата со дејонизирана вода пред колекционирањето
- Испитаникот треба да седи удобно, со отворени очи, а главата да е навалена благо кон напред.

Најчести методи кои се користат за колекционирање на вкупната плунка се:

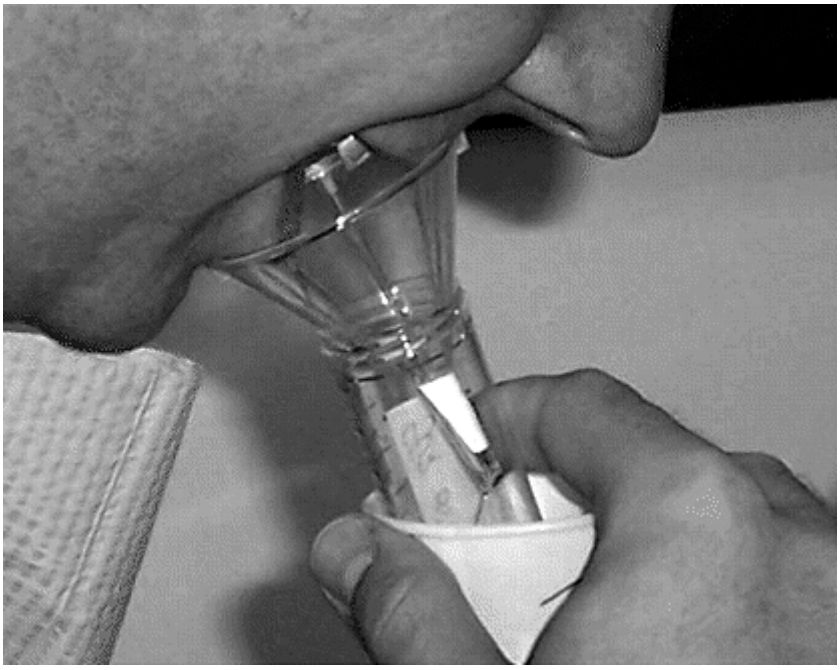
- методот на истекување (исцрпување, дренажа)- draining method
- методот на исплукување-spitting method
- вшмукување (аспирација)- suction method и
- впивање со помош на стапчиња(absorbent)метод.

Како најчести стимулуси кои се користат при колекционирањето на плунката се цвакањето на парафинско топче или гума за цвакање (механичка стимулација), а исто така може да се користи и лимонската киселина како густативен стимулус.

Draining method (методот на истекување)

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/cm^3) или со читање на скалата на градуираната епрувета (слика 1.1).



Слика1.1: Draining method (методот на истекување на плунката)

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 60 секунди 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.

Suction method (метод на вшмукување)

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.

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. Кај пациенти со силно изразена ксеростомија, проследувањето на степенот на хипосаливација, може да се

изврши со помош на апсорбирачкиот (брис) методот. Овој метод се користи за да се впие целокупната плунка во усната празнина, дури и она количество што се задржува на забите или на 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.

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 памучно или на волнено крпче. Примерокот плунка за испитување се добива со враќање на крпчето 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, на хормони или мониторинг на стероиди.

КВИЗ

1. Што се подразбира под поимот орална хомеостаза?

2. Кои се трите пара на големи плунковни жлезди кои учествуваат во одржувањето на оралната хомеостаза?

3. Што претставува мешаната плунка?

4. Што претставува саливација?

5. Зошто плунката се повеќе се користи за биохемиска анализа?

6. Кои се најчести методи кои се користат за колекционирање на вкупната плунка?

7. Кои фактори влијаат врз секрецијата и составот на плунката?

8. Колку време треба да трае колекциониот период?

9. Наброј ги условите за стандардизирана колекција на вкупната салива....

10. Објасни го spitting методот!

2 КОЛЕКЦИЈА НА НЕСТИМУЛИРАНА ПЛУНКА

Мали плунковни жлезди
Лабијална и букална плунка
Палатинална плунка
Филтрациона хартија
Отпечаток од палатумот
Индивидуална протеза за колекционирање

ЛАБОРАТОРИСКА ВЕЖБА

Колекција на нестимулирана плунка за биохемиска анализа

Нестимулираната мешана плунка претставува производ на севкупниот жлезден апарат во услови на нестимулација, односно, кога не делуваат никакви нутритивни супстанции врз густативните рецептори, ниту механичка стимулација на механо-рецепторите во оралната празнина. Сепак, оваа дефиниција треба критички да се земе во предвид, бидејќи апсолутно нестимулирана плунка речиси не постои, особено во будна состојба, кога постои потполна активност на кората на големиот мозок. Добро е познато дека состојбата на примарниот центар за саливација, кој се наоѓа во продолжениот мозок (medulla oblongata), зависи од активноста на повисоките центри во таламусот и кората на големиот мозок. Како директна последица на влијанието на повисоките центри врз примарниот центар за саливација, претставува т.н. *психичко лачење* на плунката, кога доаѓа до зголемена саливација без било какви дразби во оралната празнина (пр. при помисла на храна, мирис на храна итн.) Кога имаме за цел да колекционираме нестимулирана плунка, треба да се има во предвид дека самиот акт на плукање може да има одреден стимулативен ефект врз протокот на плунка.

Значаен момент, особено при многу низок саливарен проток е, губењето на плунката преку испарување, за време на колекциониот период. Затоа, условите за колекционирање треба да бидат дизајнирани на таков начин, што испарувањето на примерокот да е минимално, барем кај пациентите со многу низок саливарен проток. Затоа, кај пациентите со ксеростомија се препорачува spitting (исплукување) методот при колекционирањето на плунката, бидејќи се смета дека настанува помало испарување на плунката во споредба со методот на истекување, со што би се обезбедиле повеќе и пореални податоци за степенот на секрецијата. Методот со аспирирање и апсорбирачкиот метод исто така можат да имаат одреден степен на стимулација и варијабилност и затоа не се препорачуваат за колекција на нестимулирана плунка. Апсорбирачкиот метод се смета дека е најмалку точен. Draining и spitting методот обезбедуваат сличен и речиси најточен проток на вкупната нестимулирана салива. Затоа методот на исплукување најчесто се препорачува за колекционирање на нестимулирана плунка.

Најголемо количество на нестимулирана плунка потекнува од субмандибуларните плунковни жлезди и тоа некаде околу 60-65% од вкупната нестимулирана салива и затоа овие жлезди уште се нарекуваат и ,,дежурни жлезди" во оралната празнина. При колекцијата на нестимулирана плунка, важат истите препораки како при колекцијата на вкупната салива. На пациентите им се препорачува да се воздржуваат од јадење и пиење најмалку 90 минути пред тест-сесијата, како и да избегнуваат голтање и орални движења во тек на колекционирањето. За да се минимизираат ефектите од дневните варијации во продукцијата на плунка, се препорачува колекционирањето на сите примероци да се врши во исто, фиксно време од денот. Но, во клинички услови тоа не е секогаш возможно и затоа мора да се собираат последователни примероци плунка од ист пациент, во исто време од денот.

Во некои студии проследено е влијанието на климатските услови врз плунковниот проток. Утврдено е дека саливарната секреција е повисока во зима отколку во лето. Протокот на плунка се намалува како резултат на зголемувањето на

надворешната температура. Собната температура е исто така важен фактор кој ја афектира плунковната секреција.

Значаен феномен кој треба да биде земен во предвид при колекционирање на вкупната салива е практичниот ефект. Откако луѓето ќе бидат запознаени со постапките при собирањето на плунка, секрецијата на нестимулирана плунка се зголемува за околу 15% во споредба со првото искуство при колекционирање. Овој ефект не се појавува кога, на пример, паротидната плунка се колекционира под стимулирачки услови.

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.

Лабијална и букална плунка

Плунката од малите лабијални и букални жлезди може да се колекционира со помош на апсорпциона филтер хартија. Тенки стрипови со димензии 2,2 x 4,4mm од филтер хартија (Perio-paper strips) или 6x16mm 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 µL/min/cm2 на мукозна површина.

Палатинална плунка

После 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.

Отпечаток од палатумот

Покрај користењето на филтер хартија или на 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 што 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.

Индивидуална протеза за колекционирање на плунка

Овој индивидуален сегрегатор за колекционирање на ПАЛ салива го препокрива тврдото непце и предната третина на мекото непце. Секретот се акумулира во комората, а потоа протекува преку цевче како резултат на секреторниот притисок или внимателното аспирирање со шприц (слика 2.1).

Слика2.1: Индивидуална протеза за колекционирање на плунка

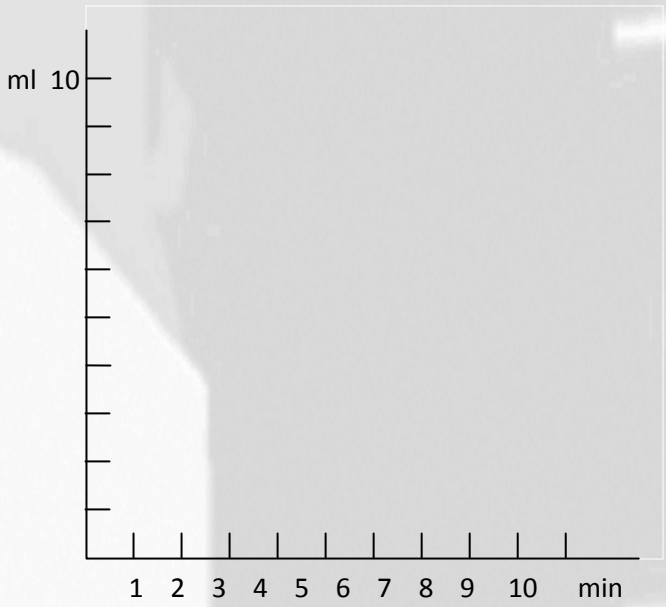
Лабораториска вежба*:* Колекција на нестимулирана плунка за биохемиска анализа

Практична работа: да се определи количеството на спонтано излачена плунка, без било каква стимулација.

Потребно за изведување: сталак за епрувети, градуирани епрувети и инки.

Изведување на вежбата: испитаникот плука во градуирана епрувета со инка на секои 2 минути, во текот на 10 мин. На графиконот се забележува количеството на излачена мешана плунка, која се зема како контролна плунка (како однос на време и количество). Количеството на излачена плунка се искажува во mL/min.

Графикон 1: Контролна секреција на нестимулирана плунка



Објаснување на резултатите: Количеството на плунка се изразува во милилитри за 1 минута. На тој начин се добива просечното лачење плунка за една минута и од добиената вредност може да се пресмета колку плунка се лачи за 24 часа.

Препорака за изведување на вежбата: Студентот кој плука треба да седи на столче во осветлена просторија и кон него да не се насочува вниманието на останатите студенти од групата.

КВИЗ

1. Што претставува нестимулираната мешана плунка?

2. Настанува ли лачење на плунка без било каква дразба во усната празнина? Како се нарекува тоа лачење и објасни како последица на што настанува!

3. Која жлезда лачи најголемо количество на нестимулирана плунка?

4. Кои методи обезбедуваат најточни податоци за протокот на нестимулираната плунка?

5. Како се колекционира букалната и лабијалната салива?

6. Со што се мерат малите количества на флуид?

7. Како се колекционира плунката од палатиналните плунковни жлезди?

8. Кој метод за колекција на вкупната салива се препорачува кај пациентите со силно изразена ксеростомија и зошто?

3 КОЛЕКЦИЈА НА СТИМУЛИРАНА ПЛУНКА

Lashley cup/Carlson–Crittenden cup
Субмандибуларна и сублингвална салива (SM/SL)
Сегрегатор (индивидуална протеза)
Метод на вшмукување (аспирација)
Wolff апарат

Лабораториска вежба:

Колекција на стимулирана плунка за биохемиска анализа

Стимулираната мешана плунка настанува како последица на делување на различни фактори, директно во оралната празнина врз бројните рецептори и/или индиректно делување преку сетилата за вид, слух и мирис. На тој начин настанува засилено излачување на плунка.

Стимулираната мешана плунка наједноставно се добива со механичка стимулација, која се постигнува со џвакање на парафински топчиња или мека гума. На тој начин се дразнат механорецепторите присутни во усната празнина. Но, најобемна секреција на мешана плунка настанува со стимулација на густативните рецептори (рецептори на сетилото за вкус). Протокот на плунка може да биде стимулиран со примена на 0,1-0,2mol/L лимонска киселина (2-4% тежина/волумен), билатерално на јазикот во фиксни интервали(пр. 15-60 сек.). Плунката се собира најмалку пет минути, но се препорачуваат 10 минути (особено кај здравите контролни испитаници, бидејќи периодот од 5 мин. може да биде недоволен за точно одредување на саливарната секреција и нејзиниот состав). Недостаток при примената на вкусовите стимуланси е дека тие може да интерферираат со некои саливарни анализи. Освен тоа, стимулансите можат да предизвикаат постојан проток на плунка, што би довело до нејзино разводнување. Спротивно на густативната, механичката (мастикаторна) стимулација со помош на стандардна големина на гума за џвакање или парафинско топче (1,5g mp=42^0 C) нема да доведе до контаминација на плунката со егзогени супстанции. За да се стандардизира механичката стимулација во текот на колекциониот период, фреквенцијата на џвакањето може да биде контролирана со користење на метроном со околу 70 џвакања/минута. Со стимулирање на саливарната секреција до нејзини максимални можности, се зголемува саливацијата од сите расположиви извори на жлезениот апарат во оралната средина. Но, бидејќи жлезениот потенцијал на паротидната жлезда е најголем, нејзиниот придонес претставува 50% од вкупно излачената стимулирана мешана плунка. Паротидната жлезда претставува еден вид на резервен потенцијал на жлезениот апарат, кој се користи во текот на џвакањето кога храната се подготвува за голтање.

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 3.1). При колекционирањето, тенко цевче може да се вметне во дуктусот преку отворот на Стеноновата папила, кое може да се фиксира со сутура, за попрецизно колекционирање.

Слика **3.1:** Papilla Stenoni на паротидната жлезда е локализирана на букалната лигавица во висина на првиот/вториот максиларен молар

Lashley cup/Carlson–Crittenden cup

Овие колектори за плунка се лесни за аплицирање, дури и од страна на необучен персонал (слика 3.2 и слика 3.3). 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. 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.

Слика 3.2: Lashley cup/Carlson–Crittenden cup- колектори за плунка

Слика 3.3: Колекција на плунка од паротидната жлезда

Субмандибуларна и сублингвална салива

Субмандибуларна и сублингвална жлезда учествуваат со 30-60% од волуменот на вкупната стимулирана салива, зависно од степенот на стимулација. Додека колекционирањето на паротидната плунка е релативно лесно со веќе востановените методи, сеуште не постојат широко прифатени техники за колекција на субмандибуларна и сублингвална плунка. Затоа најголем број студии се ограничени на истражувањата спроведени на паротидната плунка или на вкупната салива. Секретот од субмандибуларната и сублингвалната 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. Ѕидот на изводниот канал, бидејќи тој е многу тенок.

Сегрегатор (индивидуална протеза)

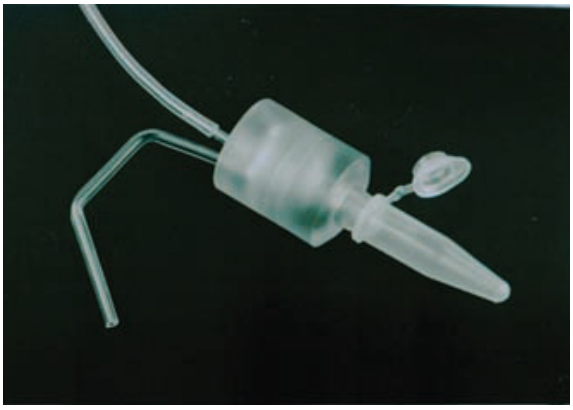
Schneyer го вовел методот за колекционирање на изолирана субмандибуларна и сублингвална плунка кај човекот. Овој индивидуален сегрегатор за колекционирање на субмандибуларна и сублингвална плунка има централен дел кој служи за собирање на субмандибуларната салива и два латерални дела за колекционирање на секретот од сублингвалната плунковна жлезда. Колекторот се аплицира на долниот алвеоларен гребен. Со помош на полиетиленски цевчиња латералните делови се поврзани со собирната туба (слика 3.4) Бидејќи отворите на главните изводни канали на субмандибуларна и сублингвална плунковна жлезда се наоѓаат многу блиску еден до друг, со користењето на овој 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.

Слика 3. 4: Индивидуален сегрегатор за колекционирање на субмандибуларна и сублингвална плунка

Метод на вшмукување (аспирација)

Едноставен метод кој се користи за собирање на субмандибуларна и сублингвална 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. Користејќи го овој метод плунката од двете (субмандибуларна и сублингвална) 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(слика 3.5). 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.

Слика 3.5: Метод на вшмукување (аспирација)



Слика 3. 6: Wolff апарат

Wolff апарат

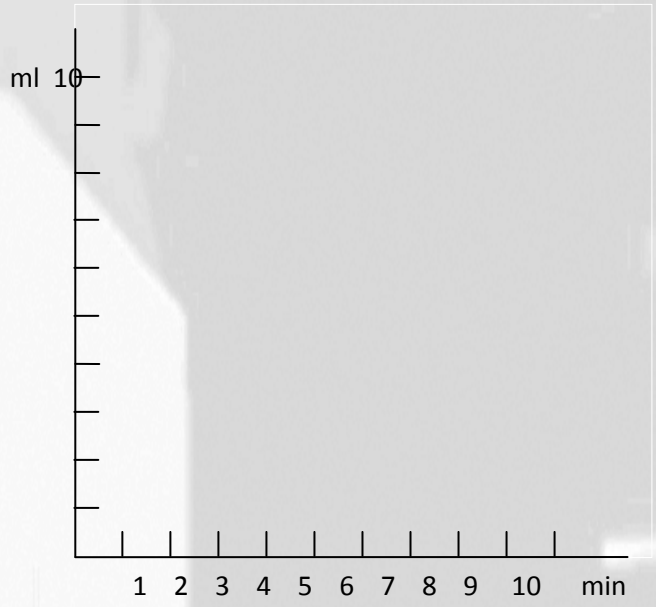
Системот за колекционирање на субмандибуларна и сублингвална плунка развиен од страна на Wolff и сор.се состои од цевчиња за собирање, сад за потиснување, комора за складирање и дел (уред) за вшмукување (слика 3. 6). Колекционите цевчиња се изградени од целулоза ацетат битурат и можат да се стерилизираат во воздушен автоклав. Сите компоненти од овој систем се поврзани и безбедно прицврстени со отворите на садот за потиснување кој е со должина 4 cm и ширина 2,5 cm изработени од поликарбонат.

Тема: Лабораториска вежба: колекција на стимулирана плунка за биохемиска анализа

Практична работа: Да се определи количеството на излачена плунка, под влијание на механичка стимулација, густативна стимулација и условна стимулација.
Потребно за изведување: сталак за епрувети, градуирани епрувети, инки, гуми за џвакање, готварска сол и лимон.

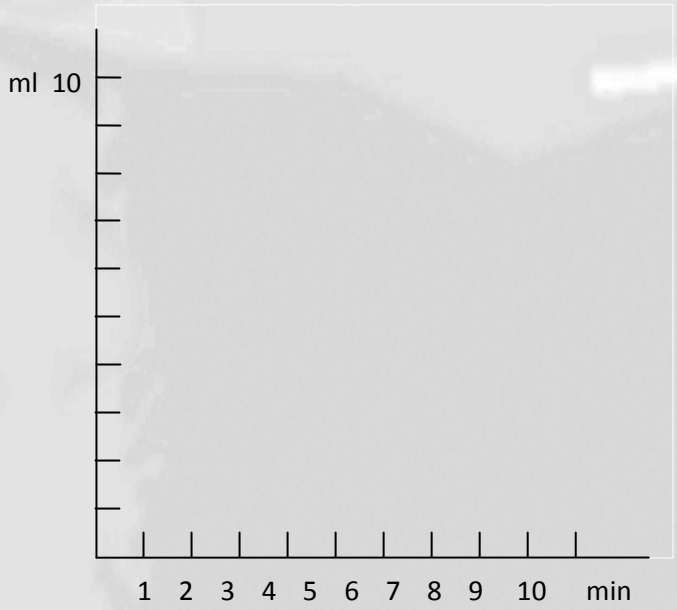
Изведување на вежбата:
А) **Механичка стимулација:** испитаникот џвака мастика во траење од 5 минути. Плука во градуирана епрувета со инка во оној момент кога во устата ќе се насобере доволно количество плунка. На графиконот се забележува количеството на излачена мешана плунка. Количеството на излачена плунка се искажува во милилитри на плунка за одреден временски период.

Графикон 1: Секреција на стимулирана плунка (механичка стимулација)



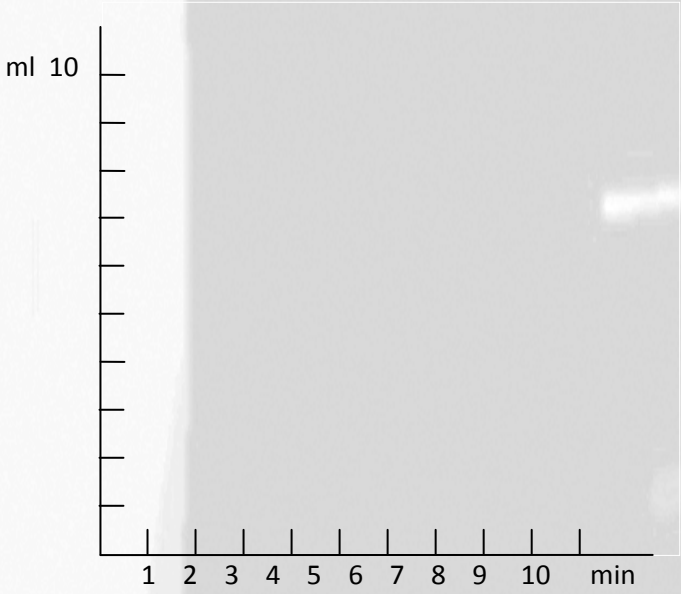
Б) Густативна стимулација (солено): На врвот на јазикот на испитаникот се става мало количество на готварска сол. Плука во градуирана епрувета со инка во оној момент кога во устата ќе се насобере доволно количество плунка. На графиконот се забележува количеството на излачена мешана плунка. Количеството на излачена плунка се искажува во милилитри на излачена плунка за одреден временски период.

Графикон 2: Секреција на стимулирана плунка (густативна стимулација-солено)



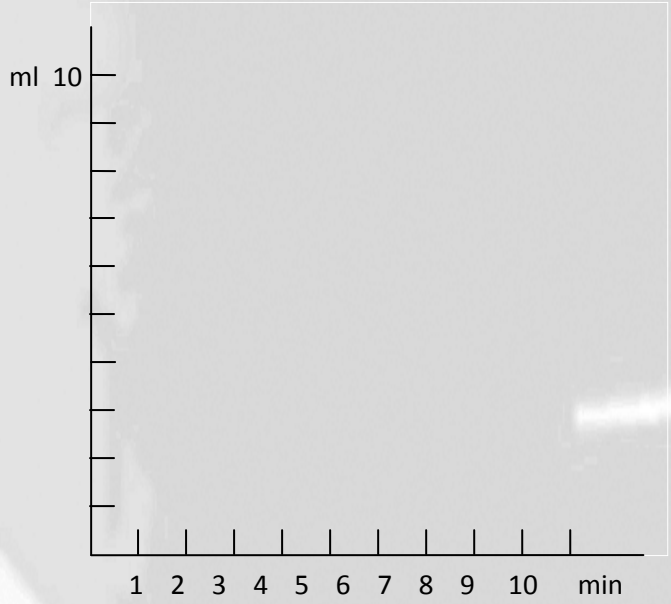
В) Густативна стимулација (кисело): На врвот на јазикот на испитаникот се капнува 1-2 капки лимон. Плука во градуирана епрувета со инка во оној момент кога во устата ќе се насобере доволно количество плунка. На графиконот се забележува количеството на излачена мешана плунка. Количеството се изразува во милилитри на плунка за одреден временски период.

Графикон 3: Секреција на стимулирана плунка (густативна стимулација-кисело)



Г) Условна стимулација: Пред очите на испитаникот се истискува парче лимон. Плука во градуирана епрувета со инка, во оној момент кога во устата ќе се насобере доволно количество плунка. На графиконот се забележува количеството на излачена мешана плунка. Количеството на излачена плунка се искажува во мililитри на плунка за одреден временски период.

Графикон 4: Секреција на стимулирана плунка (условна стимулација)



Објаснување на резултатите: Количеството на излачена плунка под влијание на одредени стимуланси повеќекратно се зголемува. Најголемо количество на стимулирана плунка се добива при густативна стимулација и тоа со кисели вкусови.

КВИЗ

1. Што претставува стимулираната плунка?

2. Кои се најзначајните фактори кои ја стимулираат саливарната секреција?

3. Која жлезда лачи најголемо количество на стимулирана плунка и зошто?

4. Каде се наоѓа Стеноновата папила и кои видови колектори можат да се користат за колекционирање на паротидната салива?

5. Какво е дејството на храната врз рецепторите во усната празнина при лачење на стимулирана плунка?

6. Од вкусовите дразби најзначајно влијание врз лачењето на плунката има:
   а) соленото
   б) киселото
   в) благото
   г) горчливото
   д) лутото

7. Каде се излева секретот од субмандибуларните и сублингвалните плунковни жлезди и колкав е нивниот придонес во лачењето на стимулирана плунка?

8. Дали е можна изолирана колекција на субмандибуларна и сублингвална салива и зошто се јавуваат потешкотии при нивното колекционирање?

9. Опиши го индивидуалниот сегрегатор по Schneyer!

10. Кои други методи на колекција на субмандибуларна и сублингвална салива постојат?

4 МЕТОДИ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА САЛИВАРНИТЕ ПРОТЕИНИ

Краток опис на протеините присутни во плунка
Методи за одредување на протеини во плунката
- **Квантитативно одредување на вкупните протеини**
- **Квалитативно одредување на саливарните протеини**

Краток опис на протеините присутни во плунка

Протеините се високо молекуларни соединенија составени од аминокиселини, поврзани со пептидни врски. Благодарение на својата структура протеините се одликуваат со низа хемиски и физички својства, со кои се овозможуваат значајни физиолошки и биолошки функции. Плунката содржи голем број различни протеини. Тие, воглавно се продукт на плунковните жлезди, а дел од нив, како што се: албумините, имуноглобулините и хормоните, потекнуваат од крвната плазма.

Синтезата на саливарните протеини се одвива во ацинусниот епител, во плазма клетките на жлезениот интерстициум и во дуктусните клетки на плунковните жлезди. Синтезата почнува во рибозомите, кои се составен дел на ендоплазматскиот ретикулум (ЕПР), локализизирани во базалниот дел на клетките. Новосоздадените протеини се одвојуваат од цистерните на (ЕПР), а потоа се транспортираат во вакуолите на Голџиевиот апарат. Во Голџиевиот апарат, кој е присутен во клетките кои лачат мукозни супстанции, се синтетизира и јагленохидратниот дел на саливарните протеини, кои во вид на странични синџири се врзуваат за основниот пептиден синџир. Овој процес го овозможува ензимот гликозил-трансфераза, присутен во Голџиевиот апарат. Голџиевиот апарат на серозните ацинусни клетки се претвара во цистерни, во кои се пакува протеинскиот материјал. Во текот на овој процес вакуолите се полнат, созреваат во гранули и достигнуваат до апикалниот дел на клетката, а потоа се излачуваат во нејзиниот лумен.

Протеините, пептидите и гликопротеините, кои влегуваат во состав на плунката, потекнуваат од плунковните жлезди. Во оваа група се вбројуваат:

- Ензимите: амилаза, липаза, лизозим, орална пероксидаза, каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза;
- Останати протеини и гликопротеини во плунката се: цистатинот, факторите на раст, фибронектинот, хистатинот, дефензините, муцинот, кателицидините, пролин-богатите протеини, статеринот, имуноглобулините.

Во групата на протеини кои имаат функција на ензими припаѓа и **саливарната амилаза**, која потекнува од паротидната плунковна жлезда. Таа е квантитативно најзастапен протеин на паротидната плунка и изнесува 30% од вкупните протеини на овој секрет. По структура таа е мономерен протеин и во нејзиниот состав има калциумови јони, кои ја одржуваат конформацијата на молекулата и се неопходни за извршување на ензимската активност. Основната функција на саливарната амилаза е да учествува во разградбата на заостанатите скробни честички во усната празнина. Скробот е полисахарид застапен во секојдневната исхрана на човекот, кој што водата од плунката не може да го раствори, па затоа е важно неговото ефикасно отстранување по секој оброк, особено при одржување на лоша орална хигиена.

Во плунката е докажано и присуството на ензимот **лингвална липаза**, која ја лачат Ебнеровите жлезди на јазикот. Овој ензим ја почнува разградбата на триглицеридите, со раскинување на естерските врски помеѓу вишите масни киселини и

глицеролот. Делувањето на овој ензим е мало, поради краткото задржување на храната во устата и отсуството на емулгаторите на солите на жолчните киселини.

Саливарната карбоанхидраза по структура е протеин, а по функција ензим. Во плунката е присутен како изоензим карбоанхидразаVI(CAVI) и е локализиран во секреторните гранули на ацинусните клетки на паротидната и на субмандибуларните плунковни жлезди. Во паротидната плунка неговата концентрација изнесува 47,0±39,2mgl^{-1} и претставува 3% од вкупните протеини на овој секрет. Во мешаната плунка концентрацијата на (CA VI) изнесува 5,0±0,2mgl^{-1} и зависи од количеството на излачената плунка. Со зголеменото лачење на плунка, линеарно се зголемува и концентрацијата на овој ензим во саливарниот секрет. Основната функција на саливарната карбоанхидраза е да го овозможи одржувањето на физиолошките вредности на pH на оралната средина, бидејќи учествува во создавањето на бикарбонатните јони, како еден од главните пуфери на плунката.

Лизозимот како ензим на плунката потекнува од големите и од малите плунковни жлезди, леукоцитите и од гингивалниот флуид. Концентрацијата на лизозимот во мешаната плунка е поголема отколку во субмандибуларната и сублингвалната плунка. Најниска концентрација лизозимот има во паротидната плунка. Во нестимулираната плунка неговата концентрација е поголема во однос на стимулираната секреција и изнесува од 100-200 µg/ml. Забележано е дека кај жените има поголема концентрација на лизозим во однос на мажите. Најзначајна функција на лизозимот е неговото учество во неспецифичната антибактериска заштита на оралната средина.

Оралната пероксидаза, каталазата, супероксид дисмутазата, глутатион пероксидазата и глутатион редуктазата се ензими на плунката задолжени за антиоксидативната заштита. Антиоксидативната заштита на организмот ги опфаќа сите органски и неоргански молекули кои можат да ги неутрализираат слободните радикали, а се класифицираат во две групи: ензимски и неензимски. Слободните радикали се високо реактивни транзиторни хемиски супстанции (атом, јон или молекул), кои во својата структура имаат еден или повеќе неспарени електрони. Тие реагираат со различни биомолекули (протеини, липиди, липопротеини), при што предизвикуваат нивна оксидација и на тој начин ја пореметуваат нивната структура и функција. Најпознати се слободните радикали на кислородот: O_2 - супероксидниот анјон; HOO - перхидроксилниот радикал; H_2O_2 - водородниот пероксид; OH - хидроксилниот радикал и др. Помеѓу антиоксидативната одбрана и создавањето на слободните радикали перзистира постојана рамнотежа.

Оралната пероксидаза е најзначаен ензимски антиоксидант на плунката. Оралната пероксидаза ја сочинуваат два пероксидазни ензими: саливарната пероксидаза и миелопероксидазата. Саливарната пероксидаза воглавно ја секретира паротидната жлезда. Овој ензим во својот активен центар содржи селен. Улогата на саливарната пероксидаза е во неспецифичната антибактериска заштита, но овој ензим учествува и во ефикасното отстранување на водородниот пероксид од оралната средина.

Во плунката се присутни и протеините и гликопротеините кои не потекнуваат од плунковните жлезди Тоа се протеините: лактоферин и калпротектин.

Лактоферинот е гликопротеин присутен во плунката, кој потекнува од епителните клетки на оралната мукоза и од леукоцитите. Концентрацијата на лактоферинот во стимулираната мешана плунка изнесува 8,5-24 g/ml. Тој е железо врзувачки протеин. Лактоферинот, со врзувањето на железото, го истакнува своето антиоксидативно дејство. Основната улога на лактоферинот во плунката е: антибактериското, антивирусното и антифунгицидното дејство.

Калпротектинот е антимикробен протеин, присутен во крвната плазма, урината, плунката. Главен извор на овој протеин во плунката е гингивалната течност, мукозниот трансудат и гингивалните кератиноцити. Калпротектинот, освен антимикробното дејство, има и цитотоксично дејство, при што го инхибира растот и размножувањето на туморските клетки

Во групата **останати протеини и гликопротеини** се вбројува и **муцинот**. Тој се состои од два дела - протеински и јагленохидратен Тој во плунката е присутен во висока концентрација, бидејќи се синтетизира од страна на ацинусните клетки на плунковните жлезди. Постојат два типа на секреторен муцин: високомолекуларен MG_1 и нискомолекуларен MG_2, кои претставуваат 26% од вкупните протеини во мешаната плунка. Примарно се секретира од страна на субмандибуларните и сублингвалните плункови жлезди. Субмандибуларните плунковни жлезди секретираат 30% од муцинот во плунката, а сублингвалните, лабијалните и палатиналните жлезди секретираат 70% муцин. Улогата на муцинот се состои во одржување на оралната хомеостаза и во неспецифичната антибактериска заштита на оралната средина.

Пролин – богатите протеини (ПРП) содржат аминокиселина пролин и во зависност од наелектризираноста и присуството на јагленохидратите, се делат на три групи: кисели, базни и гликолизирани (ПРП). Киселите (ПРП) се откриени во паротидната и субмандибуларната плунка. Базните (ПРП) присутни се во паротидната плунка. Нивната улога во оралната средина се состои во тоа да го заштитуваат емајлот на забот, учествуваат во формирањето на стекнатата забна пеликула, ги врзуваат диететските танини, заедно со хистатините и имаат антибактериско и антивирусно дејство.

Хистатините се пептиди богати со базни аминокиселини. Главен извор на хистатините се големите плунковни жлезди. Во плунката се присутни во релативно ниски концентрации во однос на содржината на вкупните протеини. Во паротидната плунка нивната концентрација изнесува од 30-425μg/ml, а во субмандибуларниот/сублингвалниот секрет 55-347μg/ml. Хистатинот, како и (ПРП), учествува во формирањето на стекнатата забна пеликула, ги врзува диететските танини, а има и антибактериско дејство. Но, хистатинот има способност да ги врзува јоните на металите во плунката и да ги инхибира поедините протеолитички ензими и медијатори на инфламацијата.

Цистатините по хемиска структура се протеини. Врз основа на големината на полипептидните синџири и присуството или отсуството на дисулфидните врски, цистатините се поделени во три фамилии: I, II и III.Во фамилијата I (stefini) се цистатините А и В. Цистатинот А е локализиран во епителните клетки и полиморфонуклеарните леукоцити, додека цистатинот В е присутен речиси во сите ткива. Цистатините од фамилијата II во високи концентрации се присутни во плунката, солзите, урината, семиналната плазма и во цереброспиналната течност. Основната функција на цистатинот е да го инхибира ензимот цистеин протеаза и на тој начин ткивните

протеини се заштитуваат од нефизиолошкото разградување. Овие протеини имаат и други значајни улоги, како: антибактериска, антиинфламаторна, а влегуваат и во состав на стекнатата забна пеликула.

Статерините се мали кисели протеини, присутни во паротидната и во субмандибуларната плунка. Нивната концентрација во стимулираната мешана плунка изнесува 4,30± 3,11 µg/ml. Главна улога им е да го оневозможат таложењето на калциум-фосфатите во изводните каналчиња на плунковните жлезди и на тој начин го спречуваат создавањето на камен во овие структури.

Фибронектинот е екстраклеточен гликопротеин и го има во крвта и плунката, како во физиолошки, така и во патолошки услови. Неговата концентрација во вкупната нестимулирана плунка изнесува од 0,2 - 2,0 mg/l. Фибронектинот потекнува од дуктусните клетки на плунковните жлезди. Тој претставува дел од неспецифичната антибактериска одбрана на оралната средина. Таа се состои во тоа што фибронектинот ги врзува бактериите и потоа ефикасно ги отстранува од оралната средина со помош на испирачкото дејство на плунката. Исто така, фибронектинот учествува во формирањето на забната пеликула и на биофилмот.

Дефанзините и кателицидините се истакнуваат со антибактериско делување. Дефанзините се пептиди поделени на две групи: алфа дефензини и бета дефензини. **Кателицидините** се присутни во кожата и во мукозата, како и во плунката и потта. Во оралните ткива ги има на јазикот, букалната слузница, гингивата и во плунковните жлезди. Но, кателицидините учествуваат и во процесите на зараснување на ткивата и го инхибираат оштетувањето на ткивата, предизвикано од штетното делување на слободните радикали.

Методи за одредување на протеини во плунката

Пред секоја лабораториска анализа потребно е да се изврши т.н.предтретман на примероците на плунката, како што се центрифугирањето (за да се отстранат бактериите и клеточниот дебрис), собирањето и чувањето на примероците на соодветна температура.

Потребно е примероците плунка да се замрзнат, за да се спречи деградацијата на молекулите, како и растот и размножувањето на бактериите.Ова е многу важно, бидејќи бактериските ензими, како протеазите, може да разградат некои од саливарните протеини. Така, нпр., sIgA се разградува на собна температура со дејството на протеазите. Нивото на sIgA се намалува за 10%, после инкубација на плунката од 8 часа на -30ºC. Со чувањето на плунката на собна температура, во времетраење од една недела, нивото на IgA во плунката, со примена на ELISA тестот, не се намалува значително.

Во зависност од тоа на кој начин се чуваат примероците плунка, некои ензими во плунката ја менуваат својата активност Активноста на алфа-амилазата во плунката е стабилна неколку дена на температура од +4ºC. Но, ако се замрзне, помала количина од овој протеин може да преципитира. Активноста на саливарната амилаза може да се одреди со колориметриски метод. Изоензимските облици на саливарната амилаза се детектираат со помош на електрофореза, како сино обоени фракции. Тие можат кванти-

тативно да се измерат со помош на рефлексен дензитометар на бранова должина од 620 nm.

Активноста на карбоанхидразата, може да се измени со промена на pH на плунката и на пуферскиот капацитет. Активноста на саливарната естераза значително се намалува со центрифугирање. Па затоа примероците од плунка треба да се чуваат на -20 ºC, во краток временски период.

Замрзнувањето и центрифугирањето на примероците плунка може да предизвикаат редукција на лизозимот. Ако примероците плунка се третираат со киселини или со бази, по центрифугирањето значително се намалува концентрацијата на лизозимот. Активноста на лизозимот најчесто се одредува според неговата способност да ги разложува 1,4 гликозидните врски на гликопротеините во бактерискиот sид, во суспензија со позната концентрација. При тоа густината на суспензијата во бактериите се намалува и тоа пропорционално на концентрацијата на каталитичката активност на лизозимот во реакционата смеса. Потоа со спектрофотометар се мери активноста на лизозимот на бранова должина од 450 nm.

Активноста на саливарната пероксидаза се менува со заматување и центрифугирање на плунката, но таа останува стабилна, ако е замрзната и неколку месеци. Активноста на бактериската глукозидаза е стабилна при краткотрајно замрзнување на плунката на температура од -20 ºC. Активноста на саливарните протеази, коишто потекнуваат од леукоцитите, епителните клетки или од оралните бактерии, се намалуваат по центрифугирањето. Протеазите се многу стабилни во плунката, а само некои од нив може да ја изгубат својата активност со долготрајното замрзнување на плунката на температура од -20 ºC. Концентрацијата на протеинската содржина во плунката е многу пониска во однос на крвниот серум, па поради тоа во најголем број на случаи, пред секоја анализа потребно е плунката да се концентрира.

Квантитативно одредување на вкупните протеини

За одредување на вкупните протеини во плунката во клиничките лаборатории, најчесто се користи **Биуретскиот метод**. Методот се темели на реакцијата помеѓу пептидните врски и јоните на бакар во алкална средина, при што се добива обоен со виолетова боја комплекс. Биуретската реакција е специфична за пептидите, полипептидите и протеините. Биуретската реакција зависи од создавањето на комплексите помеѓу јоните на бакарот и четирите пептидни N–атоми во алкални услови. Интензитетот на добиената виолетова боја е пропорционален на бројот на пептидните врски, кои реагираат и со бројот на присутните молекули во реакцискиот систем. Интензитетот на бојата се мери на бранова должина од 546nm. Биуретскиот метод се изведува на апаратот спектрофотометар.

Квалитативното одредување на саливарните протеините

За квалитативното одредување на протеините во плунката се користат техниките на радијална имунодифузија и микроимуноелектрофореза, со примена на моно и полиспецифичен антисерум. Со овие имунолошки методи може да се одреди и активноста на лизозимот.

КВИЗ

1. Синтезата на саливарните протеините почнува во:
   а. Јадрото
   б. Голџиевиот апарат
   в. Рибозомите
   г. Секреторните гранули

2. Синтезата на јаглерохидратниот дел на саливарните протеини се одвива во:
   а. Рибозомите
   б. Митохондриите
   в. Голџиевиот апарат
   г. Јадрото

3. Саливарната карбоанхидраза е локализирана во:
   а. Секреторните гранули на паротидната и субмандибуларните плунковни жлезди
   б. Сублингвалните плунковни жлезди
   в. Лабијалните плунковни жлезди
   г. Палатиналните плунковни жлезди

4. Најзначајната функција на лизозимот е:
   а. Учеството во неспецифичната антибактериска заштита
   б. Формирањето на забна пеликула
   в. Формирањето на биофилм
   г. Одржувањето на физиолошките вредности на pH

5. Лактоферинот потекнува од:
   а. Паротидната жлезда
   б. Сублингвалната жлезда
   в. Леукоцитите
   г. Малите мукозни жлезди

6. Лактоферинот своето антиоксидативно дејство го истакнува со врзување на:
   а. Железо
   б. Цинк
   в. Олово
   г. Селен

7. Наброј ги ензимите на антиоксидативна заштита:

8. Саливарната пероксидаза во својот активен центар содржи:
   а. Бакар
   б. Селен
   в. Железо
   г. Цинк

9. Базните пролин-богатите протеини присутни се во:
   а. Паротидната жлезда
   б. Леукоцитите
   в. Сублингвалната жлезда
   г. Субмандибуларната жлезда.

10. Основната функција на цистатините е:
    а.Инхибиција на ензимот цистеин протеаза
    б. Инхибиција на ензимот гликозил-трансфераза
    в. Способност за врзување на јоните на цинк и бакар
    г. Врзуваат железо

11. Која функција е карактеристична за дефензините?

12. Активноста на алфа-амилазата во плунката е стабилна на температура од:
    а. +4ºC
    б. +10ºC
    в. – 4ºC
    г. -20ºC

13. Ако се замрзнат примероците на плунка алфа- амилазата ќе преципитира:
    а. Да
    б. Не

14. Редукцијата на лизозимот може да настане ако примероците плуна се:
    а. Чуваат неколку часа на собна температура
    б. Чуваат неколку часа на студено
    в. Чуваат на собна температура
    г. Замрзнуваат и центрифугираат

15. Вкупните протеини во плунката се одредуваат со:
    а. Колориметрискиот метод
    б. Биуретскиот метод
    в. Ензимскиот метод
    г. Хроматографскиот метод

5 ДОКАЖУВАЊЕ НА ДЕЛУВАЊЕТО НА САЛИВАРНАТА АМИЛАЗА

Саливарна амилаза
Лабораториски вежби
Докажување на делувањето на саливарната амилаза

За одржување на оралното здравје е неопходен физиолошкиот механизам на самочистење на оралната празнина. Со овој физиолошки механизам се отстрануваат заостанатите честички од храна од оралните структури. Тоа е предуслов за да не настанат оштетувања на цврстите забни супстанции и на меките орални ткива.

Ефектите од отсуство на самочистење на оралната празнина се најдобро евидентни при т.н. унилатерално џвакање. На страната на која не се џвака, отсуствува самочистењето. На таа страна може да се забележи поголемо количество на меки и цврсти наслаги на забите, поголема застапеност на кариозни заби како и поизразено воспаление на гингивата.

Произлегува дека за физиолошко функционирање на самочистењето во оралната празнина непроценливо значење има главниот орален медиум-плунката. Таа со своето растворувачко дејство, кое се должи на универзалниот растворувач-водата, и со своето испирачко дејство учествува во овој физиолошки процес значаен за оралната хомеостаза.

Освен растворувачкото и испирачкото дејство на плунката, во процесот на самочистење на оралната празнина, значајна улога му се придава и на саливарниот фосфатен пуфер. Фосфатниот пуфер, како составна компонента на пуферскиот капацитет на плунката, е особено значаен за отстранување на наталожените саливарни протеини кои влегуваат во состав на денталната пеликула. Денталната пеликула во вид на тенок филм ги прекрива површините на забите и на тој начин ги штити од прекумерна загуба на цврстата забна супстанција. Но освен нејзината позитивна улога овој протеински филм може да им послужи на оралните микроорганизми како одлична хранлива подлога. Прекумерното размножување на бактериите во самата дентална пеликула ќе овозможи создавање на бактериски биофилм кој има штетни последици за оралните структури. Поради тоа фосфатниот пуфер, чија концентрација се зголемува во услови на нестимулација во оралната празнина, учествува во десорпција на апсорбираните протеини во состав на денталната пеликула. Затоа овој пуфер уште се нарекува и „чистач“ на оралната средина.

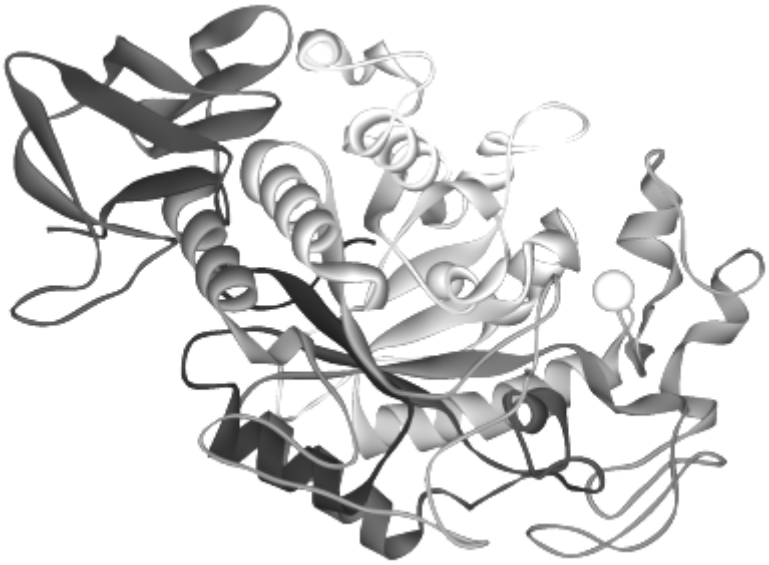
Растворувачкото и испирачкото дејство на плунката, како и улогата на фосфатниот пуфер се значајни само за хидросолубилните честички во оралната празнина. Но што станува со оние заостанати честички во оралната празнина кои не се растворливи во вода? Дали тие можат да бидат отстранети во текот на физиолошкиот процес на самочистење на оралната празнина? Одговорот е да, благодарение на дејството на саливарната амилаза. Таа има извонредно значајана улога за биохемиските процеси кои се одвиваат во текот на физиолошкиот процес на самочистење на оралната празнина.

Саливарна амилаза

Саливарната амилаза припаѓа во групата на металоензими бидејќи содржи јон на Ca^{2+}кој има клучна улога за конформацијата на молекулата на овој ензим. Освен тоа калциумовиот јон е значаен и за остварувањето на каталитичката активност на саливарната амилаза. Освен тоа потребно е и присуство на Cl^- анјон, кој

делува како активатор на саливарната амилаза. α-амилазата е еден од ретките ензими за чија активација е потребен анјон.

Саливарната амилаза е присутна во две форми: гликолизирана со молекулска маса 62 000-63 000 Da и негликолизирана форма со молекулска маса од 56 000-59 000 Da. Гликолизираната форма на саливарната амилаза содржи странични јаглехидратни синџири кои се поврзани за аспарагинската киселина од основниот полипептиден синџир. Оваа форма исто така содржи две SH и четири дисулфидни врски. Полипептидниот синџир на α-амилазата е изграден од 496 аминокиселини, а најзастапени се: 1. хидрокси-аминокиселините (треонин и серин), 2. дикарбонските аминокиселини (аспарагинска и глутаминска) и 3. ароматични аминокиселини (триптофан и тирозин). Како и останатите глобуларни протеини и саливарната амилаза има секундарна структура во вид на алфа хеликс, која е стабилизирана воглавно со водородни врски. Водородните врски особено се стабилни во хидрофобната внатрешност на протеинот.

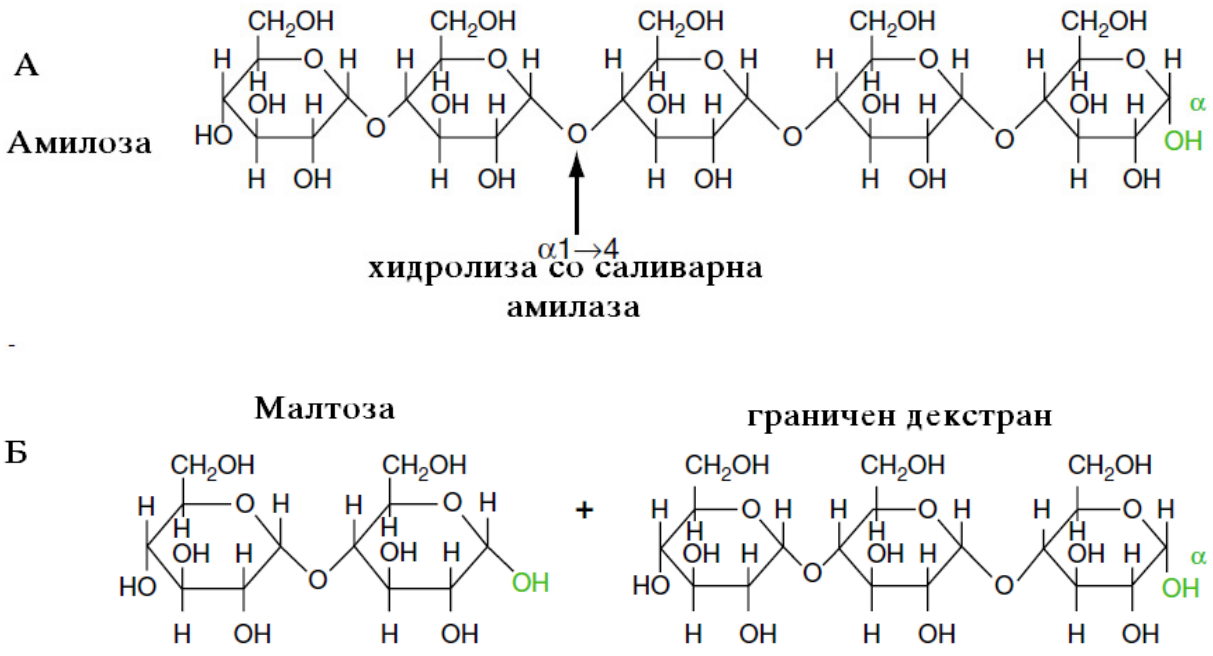


Слика 5.1: Структура на саливарната α-амилаза

Протеинскиот дел на саливарната амилаза содржи 3 домени: домен А, домен В и домен С. Доменот А (амино-киселински резидуи 1-99 и 170-404) го содржи активното место на ензимот кое е претставено со амино киселините Asp-197, Glu-233 и Asp-300. Доменот В (амино-киселински резидуи 100-169) го содржи местото на врзување на калциумовиот јон. Доменот С (амино-киселински резидуи 405-496) е независен домен и неговата улога се уште не е потополно разјаснета.

Основната улога на саливарната амилаза е разградба на заостанатите скробни честички во оралната празнина. Овој ензим ја раскинува α (1-4)-гликозидната врска, во внатрешноста на молекулата на скробот (ендогликозидаза). Раскинувањето на α (1-4)-гликозидната врска во маркромолекулата на скробот се одвива во неколку фази, при што се добиваат следниве производи: малтоза, малтотриоза и

изомалтоза (слика 5.2). Првата фаза од разградбата на скробот претставувава гликозилација на ензимот со каталитичкото дејство на аспарагинската киселина (AsP-197). Притоа се добива ковалентен интермедиер. Во втората фаза ковалентниот интермедиер предизвикува хидролизација, односно доаѓа до дегликозилација на ензимот во присуство на вода и со помош на аспаргинската киселина (AsP-300), глутаминска (Glu-233) киселина и со присуство на анјонот на хлорот. Двете фази имаат за цел создавање на оксо-карбониум јон, како преодна состојба.



Слика 5.2: А-хидролитичко раскинување на α1-4 гликозидната врска во молекулата на амилозата. Б-добиени продукти при хидролитичката разградба на амилозата:малтоза и граничен декстран

Лабораториски вежби: докажување на делувањето на саливарната амилаза

Практична работа: да се изврши хидролиза на скробот под дејство на ензимот саливарна амилаза.

Потребно за изведување: сталак за епрувети, епрувети, инки, профилтрирана мешана плунка, скроб, Луголов раствор.

Изведување на вежбата:
А) Во 1-та епрувета се налева 1-2 ml раствор на скроб и се додава 1 капка Луголов раствор. Со ладење растворот на скробот се бои сино,а со загревање оваа боја се губи. Се работи за адсорбција на агрегати на молекуларен јод за колоиднта мицела на скробот. Со загревање агрегатите се распаѓаат и растворот се обезбојува.

Б) Во 2-та епрувета се налева 5 ml растворен скроб, се додаваат 10 капки профилтрирана мешана плунка и се додава капка Луголов раствор. Епруветата се става во водена бања, а температурата се контролира да биде 38-40° С. Растворот веднаш се бои сино, подоцна со напредување на хидролизата, бојата станува виолетова, па црвена и на крај се обезбојува.

Објаснување на резултатот: саливарната амилаза е амилолитичен ензим, ја раскинува α 1-4 гликозидната врска во молекулата на полисахаридот скроб, при што тој се разградува на малтоза и гликоза.

КВИЗ

1**.**Во одржувањето на самочистењето на оралната празнина учествуваат:

-
-
-

2. Ефектите на самочистење во оралната празнина се најслабо изразени на:
а.
б.

3. Во самочистењето на оралната празнина учествува плунката со својата најзастапена компонента
-

4.На кои својства на плунката се должи самочистењето на оралната шразнина
-

5. Стимулираната секреција на плунка е поголема од нестимулираната
а. Да
б. Не

4. На кои две својства на мешаната плунка се должат ефектите на самочистење
-
-

5. Кои пуфери имаат влијание врз ефектите на самочистење наброј ги:
-
-

6. Кој пуфер е доминантен при стимулирана секреција
-

7. Пуфер-чистач на оралната средина е:
а. Пуферот на уреата
б. протеинскиот
в. Фосфатниот
г. Бикарбонатниот
д.флоридниот

8. Зошто растворувачкото и испирачкото дејство на плунката не се доволни за отстранување на скробните честички од ретенционите места на забите?

9. Саливарната амилаза ја раскинува следната врска:

а. пептидната

б.гликозидната

в. α 1-4 гикозидната

г. Дисулфидната

д. Ниеден одговор не е точен

10. Скробното зрно е изградено од:

а.

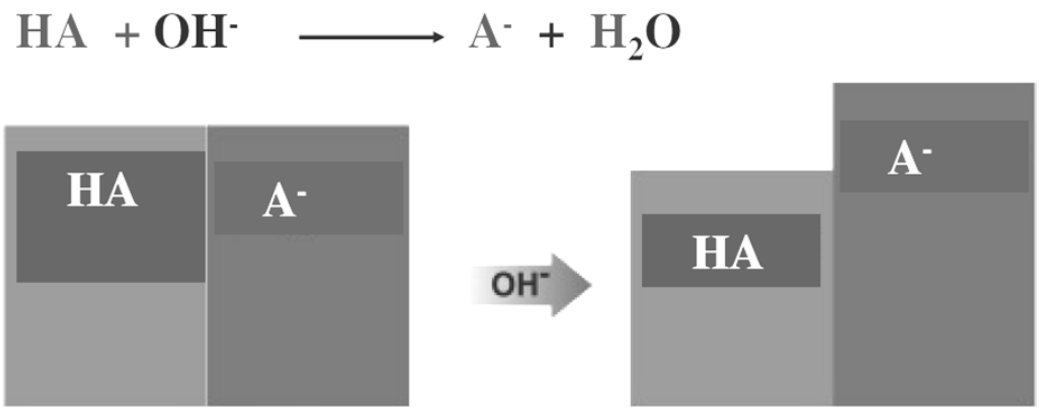
б.

6 САЛИВАРНИ ПУФЕРИ И ОДРЕДУВАЊЕ НА pH НА ПЛУНКАТА

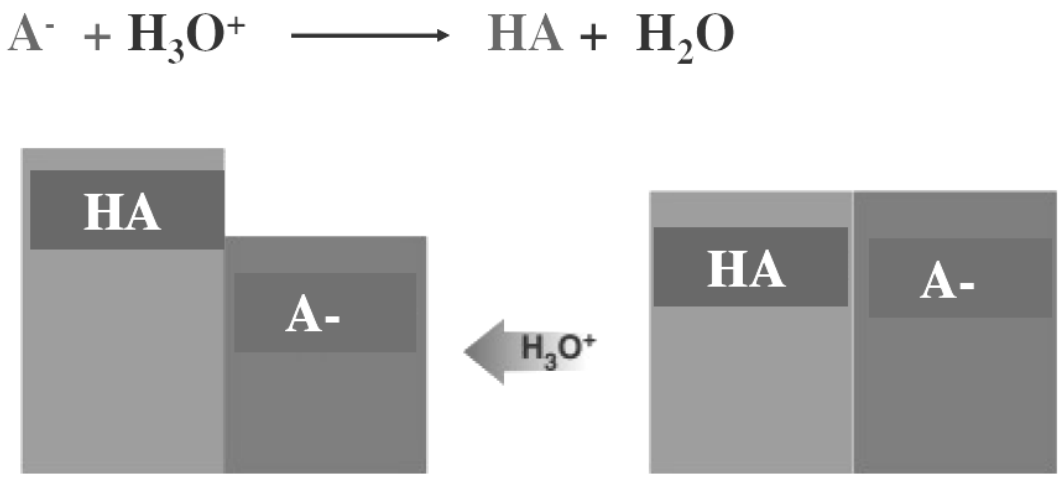
Протеинскиот пуфер
Фосфатниот пуфер
Бикарбонатниот пуфер
Методи за одредување на pH на средината (плунката)
Лабораториска вежба
- **Одредување на pH на плунката**
- **Докажување на влијанието на pH на плунката врз активноста на саливарната амилаза**

Пуферите се регулатори на електрохемиската реакција на плунката. Тие претставуваат комбинација од слаби киселина (односно слаба база) и од нивните соли или претставуваат аморфни соединенија кои реагираат со јаки киселини или бази при што се добиваат слаби киселини или слаби бази.

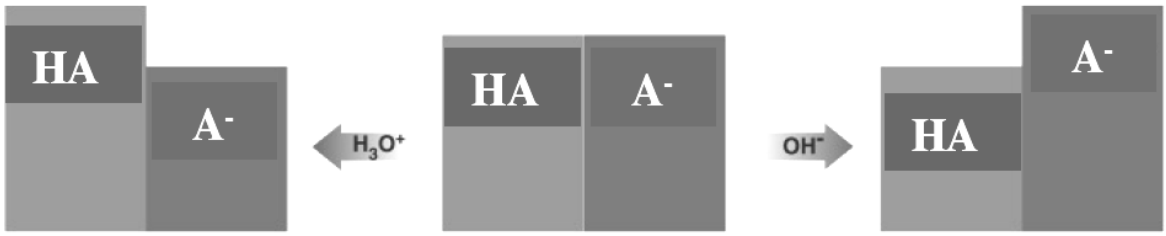
Слика 6.1: Вредности на pH на кисела, неутрална и базна средина



Слика 6.2: Слабата киселина од пуферот има функција да ја неутрализира базата



Слика 6.3: Коњугираната база од пуферот има улога да го неутрализира H_3O^+ од киселината



Слика 6.4: Слабата киселина на пуферот ја неутрализира додадената база; Коњугираната база на пуферот ја неутрализира додадената киселина; pH вредноста на растворот останува непроменета

Изохидрија е хомеостатски параметар кој подразбира одржување на вредностите на pH на плунката во границите од 6,0-7,5. Овие граници на pH на плунката се одржуваат со помош на пуферите кои се присутни во плунката.

Меѓу најзначајните пуфери во плунката се вбројуваат: бикарбонатниот и фосфатниот пуфер. Но и останатите пуфери, какви што се протеинскиот, пуферот на уреа и превентивно-профилактичкиот пуфер на саливарната амилаза се присутни во плунката и партиципираат во пуферизацијата на оралната средина.

Бикарбонатниот пуфер е најзначајниот пуферски систем во стимулираната саливарна секреција и е најважниот пуфер кој ги неутрализира киселините во денталниот биофилм. Јаглен-диоксидот потекнува од плунката и од меурчињата на воздух во оралната празнина. Карбоанхидразата во ацинусните клетки ја катализира реверзибилната хидрација на јаглен диоксидот во јаглеродна киселина (H_2CO_3). Концентрацијата на бикарбонатите во плунката варира и зависи од тоа дали лачењето на плунката е стимулирано или нестимулирано. Во нестимулираната саливарна секреција, неговата концентрација изнесува 1 mmol/L, а во текот на стимулираната саливарна секреција неговата концентрација ја достигнува вредноста од 60 mmol/L. Намалувањето на концентрацијата на бикарбонатниот пуфер во нестимулирана саливарна секреција се должи на реапсорпцијата на HCO_3^- од страна на дуктусните клетки при бавниот проток на плунката низ системот на собирни и одводни каналчиња.

Во стимулираната плунка, концентрацијата на бикарбонатите се зголемува поради што pH на стимулираната плунка се искачува до 7,8. Стимулираната плунка има поголема концентрација на HCO_3^-, иако концентрацијанта на HCO_3^- зависи од концентрацијата на јаглен диоксид и од метаболизмот на плунковните жлезди. Поради зголемениот проток на плунка низ системот на собирни и одводни каналчиња се зголемува секрецијата на HCO_3^- јонот. Индивидуите со ксеростомија (сува уста) имаат ниски вредности на pH на плунката и ниски вредности на пуферскиот капацитет на плунката поради ниската концентрација на бикарбонатите.

Фосфатниот пуфер е најефикасен кога pH на планкута изнесува 6,8 и неговото учество во пуферскиот капацитет на нестимулираната плунка изнесува 50%. Неговото значење се согледува во тоа што предизвикува десорпција на апсорбираните саливарни протеини во состав на стекнатата дентална пеликула. На тој начин

учествува во самочистењето на оралната празнина, односно го попречува поголемото наталожување на денталниот плак. Исто така заначајно е неговото дејство во самиот дентален плак, бидејќи предизвикува неутрализација на ослободените базни метаболити во наслагите на забите. Секако ова е возможно само ако денталниот плак е незрел и не се создадени екстраклеточните полисахариди. Тогаш плакот е порозен и можно е навлегување на саливарните фосфати во денталниот биофилм.

Протеинскиот пуфер не влијае значително во регулацијата на pH на плунката бидејќи протеините се со мал процент застапени во плунката, во споредба со нивната застапеност во крвната плазма. Плунката содржи голем број на различни протеини со специфични биолошки функции. Но, иако плунката располага со голем број на различни протеини сепак нивната улога како регулатори на електрохемиската реакција на оралниот медиум е ограничена.

Функционирање на протеинскиот пуфер: амино киселински групи, донори и рецептори на протони:

$$-COOH + OH^- \leftrightarrows -COO^- + H_2O$$
$$-COO^- + H^+ \leftrightarrows -COOH$$
$$-NH_2 + H^+ \leftrightarrows -NH_3^+$$
$$-NH_3^+ + OH^- \leftrightarrows -NH_2 + H_2O$$

Базните групи на амино киселините се спротивставуваат на промена на концентрацијата на H^+ јони:

$$Pr - NH_2 + H^+ \leftrightarrows Pr - NH_3^+ \qquad Pr - COO^- + H^+ \leftrightarrows Pr - COOH$$

Киселите групи на амино киселините се спротивставуваат на промена на концентрацијата на OH^- јони:

$$Pr - COOH + OH^- \leftrightarrows Pr - COO^- + H_2O$$
$$Pr - NH_3^+ + OH^- \leftrightarrows Pr - NH_2 + H_2O$$

Методи за одредување на pH на средината (плунката)

Мерењето на актуелната киселост (pH) на биолошките течности (плунка, крв, интерстицијалната течност) има големо значење во медицината и стоматологијата. Познато е дека секој ензим својата активност ја остварува при одредена pH вредност на средината (примерот со саливарната амилаза). Од pH вредноста зависи и пропустливоста на клеточните мембрани, а во крвта pH вредноста влијае и врз врзувањето на кислородот за хемоглобинот во еритроцитите.

Одредувањето на pH на средината може да се изврши на два начина:

1. електрометриско, и
2. со помош на индикатори.

За електрометриско одредување на pH на средината се употребува pH - метар. Тоа е апарат кој со голема прецизност ја мери актуелната киселост на испитуваниот раствор. Границата на чувствителност на овој апарат е до pH =0,01.

Методата која користи индикатори за одредување на pH е поедноставна, но прецизноста на оваа метода е помала во споредба со електрометриско одредување на pH на средината. Индикаторите претставуваат слаби киселини или бази, кои во зависност од актуелната киселост, преминуваат во дисоцирана или недисоцирана состојба. При тоа доаѓа до промена на бојата на индикаторот, што се зема како знак за одредена концентрација на водородни јони, односно pH на средината. Точноста на оваа метода може да се подобри, доколку испитуваниот раствор се споредува со пуфери кои имаат точно определена pH вредност и доколку промената на бојата се регистрира со колориметар, а не со голо око.

Според чувствителноста индикаторите се делат на индикатори за киселини и индикатори за бази. Индикатори за киселина се: метилвиолетово, метилпортока-лпво и метилцрвено. Индикатори за бази се: ализарин жолто, фенолфталеин и неутрално црвено.

Лабораториска вежба: 1. Одредување на pH на плунката

Практична работа: да се одреди pH на плунката, електрометриски и со помош на индикатори.

Потребно за изведување: сталак за епрувети, епрувети, инки, мешана плунка, pH -метар и индикатори.

Изведување на вежбата: во 2 различни епрувети се зема доволно количество на нестимулирана и стимулирана мешана плунка. И во двете епрувети се одредува pH на плунката со помош на двете методи.

Резултати:

1. pH вредноста на нестимулираната плунка, мерена со pH-метар изнесува:

2. pH вредноста на нестимулираната плунка, мерена со индикатори изнесува:

3. pH вредноста на стимулираната плунка, мерена со pH-метар изнесува:

4. pH вредноста на стимулираната плунка, мерена со индикатори изнесува:

Лабораториска вежба: 2. Докажување на влијанието на pH на плунката врз активноста на саливарната амилаза

Практична работа: да се докаже влијанието на pH на плунката врз активноста на саливарната амилаза.

Потребно за изведување: сталак за епрувети, епрувети, инки, капалка, профилтрирана мешана плунка, скроб, HCl (хлороводородна киселина), NaOH (натриум хидроксид), Фелинг I, Фелинг II (раствори).

Изведување на вежбата:
А) Во 1-та епрувета се налеваат 2-3 mL раствор на скроб и се додаваат 5-6 капки профилтрирана мешана плунка.
Б) Во 2-та епрувета се налеваат 2 mL HCl, се додаваат 2-3 mL раствор на скроб и на крај се додаваат 5-6 капки профилтрирана мешана плунка.
В) Во 3-та епрувета се налеваат 2 mL NaOH, се додаваат 2-3 ml раствор на скроб и на крај се додаваат 5-6 капки профилтрирана мешана плунка.

Сите три епрувети се инкубираат во водена бања десетина минути, на температура од 38-40 ^{0}C. После инкубацијата се изведува Фелинговата реакција во сите три епрувети.

Фелингова реакција се изведува со додавање на растворите Фелинг I и Фелинг II (1 mL), во епруветите. Епруветите со растворите се загреваат на шпиртна ламба до вриење.

Резултати:

а) Во првата епрувета Фелинговата реакција е позитивна (бојата од сина се менува во кафеава), зошто?

б) Во втората епрувета Фелинговата реакција е негативана (бојата останува сина), зошто?

в) Во третата епрувета Фелинговата реакција е негативана (бојата останува сина), зошто?

КВИЗ

1. Пуферскиот механизам на плунката го сочинуваат:

2. Во текот на стимулираната саливарна секреција најголема е концентрација на еден од следниве пуфери. Кој е тој?
   а. фосфатниот
   б. уреата
   в. бикарбонатниот
   г. јаглеродната киселина
   д. натриумбикарбонат

3. Во текот на нестимулираната саливарна секреција најголема е концентрација на еден од следниве пуфери. Кој е тој?
   а. фосфорната киселина
   б. уреата
   в. бикарбонатниот
   г. јаглеродната киселина
   д. фосфатниот

4. Напиши ја реакцијата на бикарбонатниот пуфер во присуство на јака киселина:

5. Напиши ја реакцијата на фосфатниот пуфер во присуство на јака база:

6. Флуоридите ја намалуваат можноста од закиселуваење на средината во плакот на тој начин што имаат афинитет кон ензимот енолаза кој значен на процесот на:
   а. гликогенеза
   б. гликогеногенеза
   в. гликолиза
   г. гликогенолиза
   д. синтеза на аминокиселините во плакот

7. Напиши ја хемиската реакција на алкализација на средината со помош на уреата:

8. Адсорбцијата на саливарните гликопротеини врз површината на забите настанува кога вредноста на pH на плунката е:
   а. 5
   б. 2
   в. под 7
   г. над 7
   д. меѓу 5 и 6

9. Кој пуфер има значајна улога во поттикнување на процесот на реминерализација на забите?
   а. фосфатниот
   б. уреата
   в. бикарбонатниот
   г. јаглеродната киселина
   д. натриумбикарбонат

10. Што претставува бикарбонатниот пуфер според својот биохемиски состав?

7 САЛИВАРНИТЕ МУЦИНИ И НИВНОТО ДОКАЖУВАЊЕ ВО ПЛУНКАТА

Муцини
Лабораториска вежба
Демонстрација на растворливост на сиаломуцинот

Муцините (MG) се високо молекуларни гликопротеини кои што се изградени од два дела: протеински и јаглехидратен дел. Јаглехидратниот дел доминира во молекулата на муцините, процентуално е позастапен (повеќе од 50%). Големата застапеност на муцините во плунката му даваат на овој секрет вискозен карактер. Муцините се карактеризираат со голема молекулска маса од 100.000 до неколку милиони Da. Овие саливарни гликопротеини примарно се создаваат од страна на субмандибуларните и сублингвалните плунковни жлезди. Се разликуваат два типа на муцини: MG_1 и MG_2. Муцинот, тип MG_1, се карактеризира со голема молекулска маса ($>10^6$), додека пак, муцинот тип MG_2 има значително помала молекулска маса ($2x10^5$).

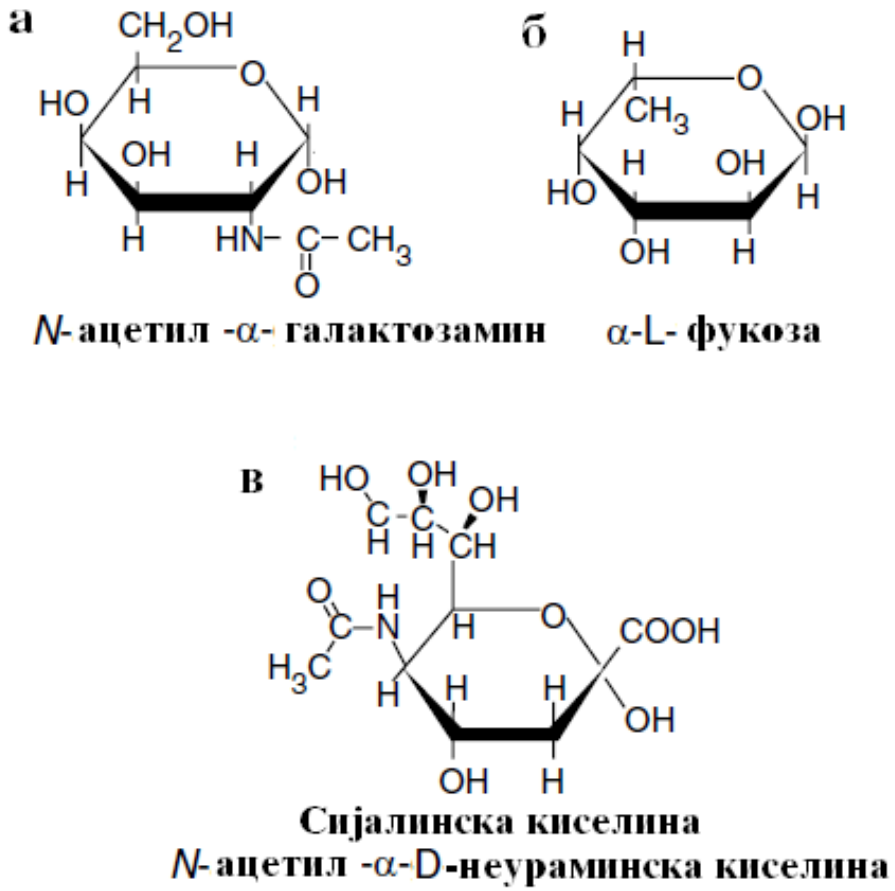
Протеинскиот дел на муцините се состои од еден полипептиден синџир во кој што амино киселините се поврзани помеѓу себе со помош на пептидни врски.

MG_1 е изграден од околу 5.000 амино киселини кои се распоредени во три домени: N-терминален домен, централен домен и C-терминален домен. N-терминалниот домен е изграден од околу 450 амино киселини. Во него цистеинот е една од позастапените амино киселини а присутни се и потенцијални места за N-гликозилација. Централниот домен содржи 3570 амино киселини а најзастапени се амино киселините треонин, серин и пролин. Овој домен се состои од 19 суб-домени. C-терминалниот домен содржи 804 или 808 амино киселини, а најзастапени се цистеинот и пролинот. Овој домен има слична структура со von Willebrand-овиот фактор. Врз основа на оваа сличност, забележано е дека во C-терминалниот домен се присутни шест суб-домени.

Се издвојуваат три групи на амино киселини кои што се најзастапени во протеинскиот дел на муцинот:

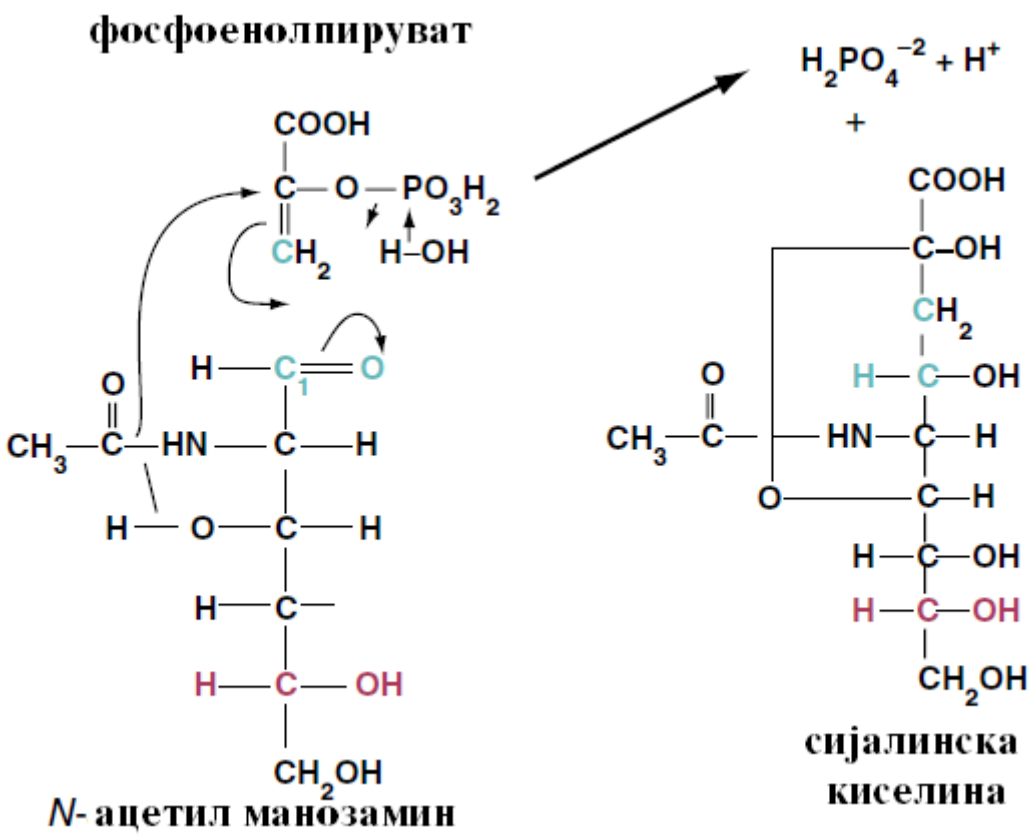
1. Хидроксиамино киселини: серин и треонин;
2. Дикарбонски аминокиселини: аспаргинска и глутаминска;
3. Пролин, глицин и аланин.

Во бочните синџири на муцините првото место во најголем број на случаите го заземаат N-ацетилирани хексозамини (N-ацетил-гликозамин, N-ацетил-галактозамин). Нивната улога е да ги поврзат јаглехидратните синџири со полипептидниот синџир. Се разликуваат три типа на врски помеѓу јаглехидратните синџири и полипептидниот синџир: гликозидни, естерски и амидни врски. Најбројни се гликозидните врски, а тие се реализираат помеѓу хидрокси-амино киселините и хексозамините. Естерските врски се реализираат помеѓу дикарбонските амино киселини и соодветните хексозамини. Амидните врски, пак, се реализираат помеѓу глутаминот или аспаргинот и хексозамините. Последно место (терминална позиција) во бочните синџири на муцините и припаѓа на сијалинската киселина (слика 7.1).



Слика 7.1: Хемиска структура на главните моносахариди во муцинот. а) N-ацетил-α-галактозамин б) α-L-фукоза в) Сијалинска киселина (N-ацетил-α-неураминска киселина).

Местото кое го зазема сијалинската киселина во јаглехидратниот синџир на сиаломуцините е од големо значење за нивните функции и нивната стабилност (слика 7.2). Тие функции се должат токму на функциите на сијалинската киселина. Имено, ниската вредност на pK=2,6 (изоелектрична точка) на сијалинската киселина овозможува дисоцијација на нејзината карбоксилна група и вон физиолошките вредности на pH на плунката. Тоа пак, обезбедува меѓусебно одбивање на исторо-дно наелектризираните резидуи на сијалинската киселина со што се обезбедува максимална екстендираност (раширеност) на молекулите на сијаломуцините, нивна максимална стабилност во растворот и остварување на нивните биолошки функции. Спротивен ефект ќе настане ако се оневозможи дисоцијацијата на сијалинската киселина со делување на некоја појака минерална киселина (pH 2). Во таков случај ќе се изгуби наелектизираноста на молекулите на муцините, ќе дојде до ”склопчува-ње“ и до исталожување на нивните молекули.



Слика 7.2: Синтеза на сијалинска киселина. Лево-реакција на супстратите фосфоенопируват и N-ацетил манозамин. Десно-сијалинска киселина (продукт).

Муцините се присутни со висока концентрација во плунката, имаат локално потекло бидејќи се синтетизираат од страна на ацинусните клетки на плунковните жлезди. Во плунковниот секрет се присутни два типа на секреторни муцини: високомолекуларен MG_1 и нискомолекуларен MG_2. 26% од вкупните протеини на мешаната плунка припаѓаат на муцините. Субмандибуларната плунковна жлезда, која содржи мукозни ацинусни клетки (го произведуваат MG_1) и серозни ацинусни клетки (го произведуваат MG_2), продуцира 30% од саливарниот муцин. Сублингвалната, лабијалните и палатиналните плунковни жлезди, кои содржат воглавно мукозни ацинусни клетки, ги продуцираат останатите 70% од саливарниот муцин. Саливарниот секрет на паротидната жлезда не содржи муцини.

MG_2 е саливарен гликопротеин со мала молекулска маса од 20-250 кDa. Го продуцираат воглавно серозните клетки на серомукозните плунковните жлезди (субмандибуларните, сублингвалните, лабијалните и палатиналните). Утврдено е дека постојат два вида на овој муцин:MG_2a и MG_2b. Овие два вида на нискомолекуларен муцин не се разликуваат според амино киселинскиот состав, туку според содржината на сијалинската киселина и на фукоза во јаглехидратниот дел. MG_2a

содржи 14% на сијалинска киселина и 16% на фукоза, додека пак MG_2b содржи 27% на сијалинска киселина и 7% на фукоза.

MG_1 е саливарен гликопротеин со голема молекулса маса (>1.000 kDa). Неговата структура е посложена од структурата на MG_2. MG_1 е тетрамер каде што мономерните единици на муцинот се поврзани со дисулфидни врски.

Саливарните муцини имаат поголем број на значајни функции во одржувањето на оралната хомеостаза:

- обезбедуваат лигав изглед и вискозност на саливарниот секрет;
- ја обложуваат оралната лигавица со заштитен филм и на тој начин ја заштитуваат од мацерација (оштетување) која би настанала во константно влажна средина;
- го обложуваат болусот (залакот) и го овозможуваат неговото полесно голтање;
- ги олеснуваат движењата на јазикот и говорот;
- во дигестивниот тракт (каде што муцинот е присутен) ја спречуваат автодигестијата на цревната лигавица, која би настанала под влијание на бројни протеолитички ензими од дигестивните сокови;
- учествуваат во агрегацијата на бактериите, со што се овозможува нивната неутрализација и попречување на патогената активност;
- спречување на атхеренцијата на бактериите за оралната лигацица.

Лабораториска вежба: демонстрација на растворливост на сиаломуцинот

Практична работа: да се демонстрира растворливоста на сиаломуцинот.

Потребно за изведување: сталак за епрувети, епрувети, инки, мешана плунка, концентрирана оцетна киселина CH_3COOH и концентрирана база - NaOH.

Изведување на вежбата: Мешаната плунка се дели во две епрувети. Во првата се додава концентрирана оцетна киселина, а во втората епрувета се додава разредена база - NaOH. Во првата доѓа до исталожување на сиаломуцинот, а во втората не се добива талог.

1. Објаснете зошто во првата епрувета се формира талог?

2. Објаснете зошто во втората епрувета не се формира талог?

КВИЗ

1. Од кои плунковни жлезди потекнуваат муцините?

2. Каква е плунката во која доминираат муцините?

3. Колку типови на муцин се присутни во плунката?

4. Кои се најзастапените амино киселини во протеинскиот дел на муцинот?

5. Со кои молекули се поврзуваат јаглехидратните синџири на муцинот со полипептидниот синџир на муцинот?

6. Со кои врски се поврзуваат јаглехидратните синџири и полипептидниот синџир?

7. Што се наоѓа на терминалната позиција во бочните синџири на муцините?

8. Која молекула од муцините има најголемо значење за функциите на муцинот и за неговата стабилност?

9. Колкава е изоелектричната точка на сијалинската киселина?

10. Саливарните муцини имаат локално потекло
    а. Да
    б. Не

11. Во саливарниот секрет на паротидната жлезда се присутни муцините?
    а. Да
    б. Не

12. MG_2 е гликопротеин со мала молекулска маса. Кој го произведува овој саливарен муцин?
    а) субмандибуларните ацинусни клетки
    б) сублингвалните ацинусни клетки
    в) лабијалните ацинусни клетки
    г) палатиналните ацинусни клетки
    д) сите одговори се точни
    ѓ) сите одговори се неточни

13. Наброј ги функциите на саливарните муцини!

14. Кој тип на врски ја овозможуваат интеракцијата помеѓу епителните клетки на оралната лигавица и муцинот?

15. На кој тип на муцин се должи антимикробното дејство на муцинот?

8 ЕЛЕКТРОЛИТИ ВО ПЛУНКАТА И МЕТОДИ ЗА НИВНО ОДРЕДУВАЊЕ

Калциум (Ca)
Фосфати
Бикарбонати
Магнезиум (Mg)
Натриум (Na)
Хлор (Cl)
Калиум (K)
Флуор (F)
Нитрати и нитрити
Бакар (Cu)
Токсични Метали

Методи за одредување на електролити во плунката

Плунката содржи голем број на електролити, како што се: калциумот, фосфатите, бикарбонатите, магнезиумот, натриумот, хлорот, калиумот, флуорот, тиоцијанатите, нитратите и нитритите, бакарот и токсичните метали.

Концентрацијата на електролитите во плунката значително се разликува од нивната концентрација во крвната плазма. Исто кака постојат разлики и во концентрацијата на електролитите помеѓу стимулираната и нестимулираната плунка.

Улогата на електролитите во плунката е следна:

- учествуваат во процесот на одонтогенеза,
- спречуваат деминерализација, а овозможуваат реминерализација на емајлот на забот,
- тие го намалуваат растворувачкото дејство на водата,
- ја одржуваат pH на оралната средина во физиолошки вредности,
- спречуваат појава на кариес на забите,
- учествуваат во одржувањето на оралната бактериска флора,
- делуваат како активатори на ензимите во плунката.

Калциум (Ca)

Од крвната плазма јоните на Ca^{2+} се транспортираат во плунката. Нивната концентрација во плунката се разликува во поедините плунковни жлезди.

	Паротидна плунка	Субмандибуларна плунка	Сублингвална плунка	Мали плунковни жлезди	Мешана плунка
Нестимулирана плунка	1,5± 0,35	1,56 ± 0,45	-	2,29 ± 0,47	1,35 ± 0,45
Стимулирана плунка	1,6± 0,8	2,4 ± 0,6	2,1 ± 0,4	2,03 ± 0,38	1,70 ± 1,0

Табела 8. 1. Концентрација на Ca^{2+} во плунка (mmol/L)

Плунката е заситена со јони на калциум и тие се во рамнотежа со јоните во хидроксиапатитот на емајлот. Оваа рамнотежа го намалува растворувачкото дејство на водата од плунката. Покрај тоа, јоните на калциумот имаат посредничка улога, а тоа е да ги врзуваат различните неоргански и органски супстанции за површината на емајлот. Јоните на калциумот имаат улога и во реминерализацијата на емајлот. Се смета дека одредени протеини од плунката се врзуваат за Ca^{2+} и во алкална средина се исталожуваат на оштетените места од површинските слоеви на емајлот. Освен протеините и јоните на флуорот, се врзуваат со јоните на калциумот, при што се создава Ca- флуорид, којшто се наталожува на површината на емајлот.

Јоните на Ca^{2+} учествуваат во формирањето на биофилмот и во формирањето на забниот камен, кој претставува минерализиран биофилм.

Фосфати

Фосфатите во плунката потекнуваат од крвната плазма. Концентрацијата на фосфатите во нестимулираната плунка е поголема од нивната концентрација во крвната плазма. Најголема концентрација на фосфатите има во нестимулираната паротидна плунка и таа изнесува 9,0 ± 0,35 mmol/L. Фосфатите во нестимулираната плунка имаат улога да ги отстрануваат адсорбираните саливарни гликопротеини од површината на емајлот. Новите истражувања укажуваат на тоа, дека овој начин на отстранување на забната пеликула не е доволно ефикасен и дека адсорбираните гликопротеини и понатаму се задржуваат на површината на емајлот. Па, поради тоа, тие може да им послужат на бактериите како енергетски материјал во формирање-то на биофилмот.

Бикарбонати

Бикарбонатните јони во организмот имаат ендогено потекло. Синтезата на бикарбонатните анјони исто така се одвива и во епителните клетки на плунковните жлезди. Овие анјони претставуваат составен дел на бикарбонатниот пуфер, кој ја регулира pH на оралната средина. Концентрацијата на бикарбонатите во плунката зависи од интензитетот на лачењето на овој секрет. Концентрацијата на бикарбо-натите се зголемува со стимулација на саливацијата и во стимулираната паротидна плунка неговата концентрација изнесува 3,0 ± 9,6 mmol/L.

Бикарбонатите имаат значајна улога во пуферизацијата на незрелиот биофилм. Ослободените кисели метаболити од бактериите во микросрединаата на незрелиот биофилм брзо се неутрализираат, поради можноста за дифузија на плунката и на бикарбонатите, коишто ја алкализираат средината. Поради тоа pH во незрелиот биофилм не се менува значително во однос на pH на плунката или пак овие промени се краткотрајни.

Магнезиум (Mg)

Магнезиумот од крвната плазма преку ацинусните клетки на плунковните жлезди се транспортира во плунката. Тој во висока концентрација е присутен во цврстите забни ткива и во коските. Магнезиумот во овие ткива е застапен како комплексен јон (MgOH), кој што е голем да влезе во кристалната решетка и тој се адсорбира на површината на решетката Основна улога на магнезиумот е да учествува во активацијата на многу ензими во клетката како на пр. на киназите. Магнезиумот влијае на процесот на минерализацијата, на растот и развојот на забите. Во случај на недостаток на магнезиум, се намалува формирањето на емајлот и на дентинот. Забележана е инхибиција на растот на алвеоларната коска и атрофија на клетките на периодонталниот лигамент. Магнезиумот влијае и на растворливоста на емајлот, а според некои автори учествува и во патогенезата на забниот кариес.

Натриум (Na)

Во текот на транспортот на примарната плунка во каналите на плунковните жлезди се врши реапсорпција на Na^+ и Cl^-, па нивната концентрација во дефинитивната плунка е пониска отколку во примарната плунка и во крвната плазма.

Главната улога на Na^+ во плунката е да го одржува осмотскиот притисок. Концентрацијата на овој електролит во плунката се зголемува кај лицата коишто имаат некое заболување на плунковите жлезди. Ова се случува како резултат на пореметувањето во реапсорпцијата на Na^+ на ниво на епителните клетки на каналите на плунковните жлезди.

Хлор (Cl)

Јоните на Cl^- од крвта се транспортираат во епителните клетки на плунковните жлезди, а потоа преку хлоридните канали, коишто се локализирани на апикалната мембрана на овие клетки, се транспортираат во луменот на ацинусите, каде што влегуваат во состав на примарната плунка. Јоните на Cl^- ги следат јоните на Na^+, во текот на реапсорпцијата во каналите на плунковните жлезди. Па поради тоа концентрацијата на Cl^- во дефинитивната плунка е многу пониска во однос на концентрацијата на Cl^- во крвта. Јоните на Cl^- во вкупната плунка учествуваат во активацијата на ензимите на саливарната алфа-амилаза, како и во одржувањето на осмотскиот притисок на плунката.

Калиум (K)

Познато е дека K^+ претставува главен катјон во интраклеточните течности, неговата концентрација во екстраклеточните течности е значително пониска. Плунката е секрет кој е најбогат со K^+. Оваа висока концентрација на K^+ е резултат на измената на Na^+ со K^+ на нивото на изводните каналчиња на плунковните жлезди. Калиумот има значајна улога во минерализацијата на дентинот, при што се активираат голем број на ензими, коишто вршат катализа на фосфотрансферазните реакции.

Флуор (F)

Во организмот флуорот се внесува со флуорираната вода, со таблети коишто содржат флуор и на други начини. Тој се ресорбира во дигестивниот тракт, а потоа преминува во циркулацијата и од таму се распоредува по сите ткива и органи. Во крвната плазма флуорот се сретнува во два облика: како јонски (слободен) и врзан за плазма протеините. Јоните на флуорот имаат голем афинитет кон минерализираните ткива. Па според тоа повеќе од 99% од вкупната количина на флуорот во организмот е депониран во коските и цврстите забни ткива Од крвта флуорот достигнува до плунката и тука неговата концентрација е директно зависна од концентрацијата на флуорот во крвната плазма. Концентрацијата на F во мешаната плунка е пониска отколку во крвната плазма и изнесува од 1,5 до 5

μmol/L. Јоните на флуорот во цврстите забни ткива се вградуваат во три фази. Во првата фаза јоните на флуорот навлегуваат во хидратециониот слој на хидроксиапатитот. Во втората фаза настанува измена на хидроксилните групи со јоните на флуорот на површината на кристалите од хидроксиапатитот. Во третата фаза, јоните на флуорот од површинските слоеви на цврстото ткиво мигрираат во подлабоките делови во текот на рекристализацијата. Флуорот којшто еднаш е вграден во дентинот, цементот и во најповршинските слоеви на емајлот, има константна концентрација, затоа што овие забни ткива не подлежат на ремоделирање, како што е случај со коските. Цементот содржи најголема концентрација на флуор, дури поголема и од коскемото ткиво.

Со години се сметало дека флуорот вграден во кристалите на хидрокси апатиот има профилактичко дејство во однос на појавата на забниот кариес. Меѓутоа, новите истражувања покажале дека вградувањето на флуорот во кристалната решетка на емајлот, дали со системска или со локална примена, не е најважниот механизам за неговото превентивно делување во однос на забниот кариес. Постојат многу отворени прашања кој што се однесуваат на механизмот на делување на антикариозната флора. Флуорот на различни начини влијае на метаболизмот на кариогените и на другите бактерии од оралната средина. Флуорот од плунката преминува во течноста од биофилмот и тоа 5% како јонски. Концентрацијата на флуорот во биофилмот зависи од неговата концентрација во плунката и од pH на биофилмот. Забележана е пониска концентрација на флуорот во биофилмот , кој што има пониски вредности на pH.

Докажано е дека флуорот има бактериостатско дејство, а во високи концентрации има и бактерициден ефект. Но, високите концентрации на флуорот не се присутни во усната празнина, затоашто тие се токсични за човековиот организам. Точниот механизам на бактериостатското делување на флуорот сеуште не е во потполност разјаснето. Едно од објаснувањата е дека присуството на флуороводородот предизвикува намалување на pH во течноста на биофилмот. Ниските вредности на pH се неповолни за функционирање на бактериските ензими.Флуорот го инхибира дејството на некои ензими кака што се: енолазата, уреазата, каталазата. Енолазата ја инхибира гликолизата и со тоа го спречува ослободувањето на киселите метаболити, и тоа на лактатот, коишто е одговорен за намалувањето на вредноста на pH на биофилмот и за деминерализација на емајлот. Со инхибирањето на гликолизата бактериите немаат доволно енергија, во вид на АТП, за нивно размножување. Флуорот ја инхибира и бактериската каталаза, врзувајќи се со хемот на овој ензим. На тој начин се намалува антиоксидативната заштита на бактериите и настанува собирање на слободните радикали и оксидативно оштетување на бактериските структури. Со инхибиција на уреазата се пореметува метаболизмот на азотните материи во бактериите.

Денес се смета дека локалната апликација на концентрирани раствори на флуор имаат значајна улога во превенцијата на кариес, бидејќи представуваат депоа на флуорни и на калциумови јони кои се активираат во услови на намален pH во микросредината на биофилмот.

Нитрати и нитрити

Нитратите се ресорбираат од тенкото црево во крвотокот. Потоа активно се транспортираат од крвта во плунковните жлезди и нивната концентрација во плунката е 10 пати поголема отколку во крвната плазма. Саливарните нитрати стапуваат во контакт со бактериите во оралната средина и тие со своите ензими (нитрат редуктаза), вршат редукција на нитратите во нитрити, коишто го овозможуваат фукционирањето на респираторниот синџир во анаеробни услови. Се смета дека во услови на зголемена концентрација на нитрити во оралната средина, растот и развојот на оралните бактерии е ограничен, а со тоа значително се намалува формирањето на биофилмот. Кај лица со зголемена концентрација на саливарните нитрати и нитрити, значително се намалува бројот на кариозните заби.Нитритите во присуство на киселите метаболити формираат азотна киселина, којашто е нестабилна, па таа спонтано се разлочува на азотен- моноксид (NO) и азотен-диоксид (NO_2).

Бакар (Cu)

Cu^{2+} коишто се присутни во плунката, како и останатите електролити, потекнуваат од крвната плазма. Бакарот е кароистатски биоелемент и ја спречува појавата на забниот кариес. Овој ефект бакарот го истакнува на тој начин што го спречува формирањето на биофилмот, бидејќи ги инхибира ензимите важни за бактерискиот метаболизам. Инхибиторната активност на Cu^{2+} се остварува со оксидацијата на тиолните групи (SH) во ензимите, кои се вклучени во катаболитичките и во анаболитичките процеси во биофилмот. Исто така, Cu^{2+} можат со електростатските сили да се врзат со киселите метаболити во биофилмот и на тој начин да влијаат на намалувањето на растворливоста на површинските слоеви на емајлот.

Токсични Метали

Во плунката е докажано присуството на токсичните метали, олово и кадмиум, како резултат на контаминација на животната средина. Концентрацијата на токсичните метали во плунката зависи од нивната концентрација во околната средина и е во корелација со нивната концентрација во крвта и во одделни ткива и органи. Па поради тоа, плунката може да ни користи како дијагностичка течност во проценката на загаденоста на животната средина со овие токсични елементи.

Методи за одредување на електролити во плунката

Пред да се применат методите за одредување на електролитите во плунката, потребно е примероците на плунка да се центрифугираат, замрзнат и да се чуваат на соодветна температура.

Концентрацијата на Ca^{2+} треба да се одредува веднаш после собирањето на примероците плунка, бидејќи Са е лабилен или е склон на преципитација.

Многу е тешко точно и прецизно да се одреди калциумот. За анализирање на калциумот најчесто се користи спектрофотометрискиот метод, којшто се темели на формирање на обоен комплекс помеѓу калциумот и о-крезол фталеинот. Во алкална средина се формира комплекс со виолетова боја, кој има максимална ресорпција на бранова должина од 578nm. Оваа постапка овозможува одредување на вкупниот калциум.

Со центрифугирање на плунката се намалува концентрацијата на фосфатите за 10%, а со замрзнување содржината на овие електролити се намалува од 5-30%.

Неорганскиот фосфор се одредува спектрофотометриски, со примена на амониум-молибдат. Неорганскиот фосфор реагира со амониум-молибдатот, при што настанува амониум-фосфомолибдат, кој во алкална средина се редуцира и настанува хетерополимер со сина боја. Интензитетот на бојата е пропорционален на концентрацијата на фосфатите. А ресорпцијата се мери на бранова должина од 700nm.

Нивото на саливарните бикарбонати може да се измени во зависност од условите во кои се собира и чува плунката, а исто така CO_2 од воздухот може слободно да дифундира во плунката. Концентрацијата на Na, K, Cl не се менува кога свежите примероци на плунка се чуваат на собна температура или се замрзнати.Со центрифугирањето на примероците на плунка, содржината на флуоридите се намалува до 15%, а замрзнувањето не влијае на нивото на овој електролит. Нивото на нитратите и нитритите во свежите примероци плунка може значително да се намали, затоа што нив ги користат бактериите. Со користењето на бази се стабилизира нивото на нитратите и нитритите во текот на две недели на собна температура. Со заматувањето на примероците плунка не може да се одреди нивото на тиоцијанати и хипотиоцијанати со спектрофотометриски метод. Нивото на овие електролити се намалува кога плунката се чува неколку часа на студено. Замрзнатите примероци плунка се попогодни за анализа на овие електролити.

За одредување на останатите електролити како што се: Na, K, Cl, Mg и Cu се користи спектрофотомерискиот метод.

КВИЗ

1. Наброј ги електролитите во плунка.

2. Електролитите во плунката потекнуваат од:
   а. Гингивалниот флуид
   б. Крвната плазма
   в. Крвниот серум
   г. Епителните клетки на оралната мукоза

3. Која е улогата на електролитите во плунката?

4. Концентрацијата на Ca^{2+} јони во паротидната плунка е поголема од концентрацијата на Ca^{2+} јони во субмандибуларната плунка.
   а. Да
   б. Не

5. Најголема концетрација фосфатите имаат во:
   а. Нестимулирана паротидна плунка
   б. Нестимулирана субмандибуларна плунка
   в. Стимулирана сублингвална плунка
   г. Стимулирана субмандибуларна плунка

6. Бикарбонатните јони претставуваат составен дел на:
   а. Фосфатниот пуфер
   б. Бикарбонатниот пуфер
   в. Протеинскиот пуфер
   г. Превентивниот пуфер од типот на саливарната амилаза

7. Магнезиумот учествува во активацијата на ензими во клетката од типот
   а. Кинази
   б. Протеази
   в. Урези
   г. Каталаза

8. Магнезиумот учествува во процесот на минерализација на забите.
   а. Да
   б. Не

9. Na^+ јони во плунката во плунката учествуваат во:
   а. Одржувањето на осмотскиот притисок
   б. Патогенетските механизми на забниот кариес
   в. Процесот на растварање на емајлот
   г. Атрофија на клеточните елементи на периодонталниот лигамент.

10. Концентрацијата на хлорните јони во дефинитивната плунка е пониска во однос на концентрацијата на хлорните јони во крвта.
   а. Да
   б. Не

11. Плунката е секрет којашто содржи најмала концентрација на калиумови јони.
   а. Да
   б. Не

12. Флуорот го инхибира дејството на ензимот:
   а. Киназа
   б. Протеаза
   в. Гликозил трансвераза
   г. Енолаза

13. Високата концентрација на нитрати во оралната средина предизвикува формирање на поголемо количество биофилм.
   а. Да
   б. Не

14. После собирањето плунка концентрацијата на Ca^{2+}треба да се одреди:
   а. кога примероците плунка се чуваат долг временски период на собна температура
   б. кога примероците се замрзнуваат
   в. се одредуваат веднаш
   г. кога примероците на плунка се чуваат краток временски период на собна температура

15. Содржината на флуоридите се зголемува со центрифугирање.
   а. Да
   б. Не

16. Со примена на киселини се стабилизира нивото на нитрати и нитрити.
   а. Да
   б. Не

17. Методот за одредување на вкупниот калциум во плунка е колориметриски:
   а. Да
   б. Не

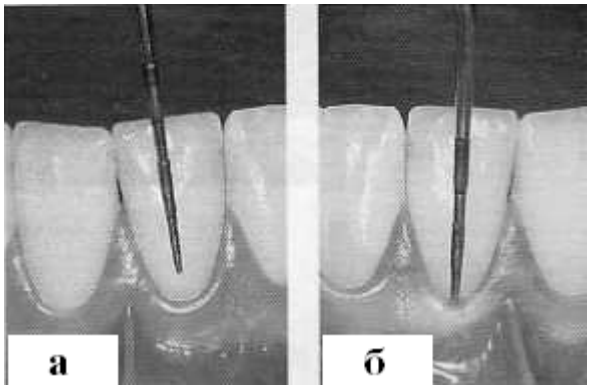
9 ГИНГИВАЛЕН ФЛУИД И МЕТОДИ ЗА ДОБИВАЊЕ НА ГИНГИВАЛЕН ФЛУИД ЗА БИОХЕМИСКА АНАЛИЗА

Гингивален сулкус и гингивален флуид
Методи за добивање на гингивален флуид за биохемиска анализа

Гингивален сулкус и гингивален флуид

Гингивалниот флуид или гингивалната течност е гингивален трансудат, кој потекнува од крвните садови (венули) на сврзното ткиво на гингивата. Тој потоа поминува низ припојниот епител во гингивалниот сулкус.

Гингивалниот сулкус претставува плиток капиларен простор сместен помеѓу внатрешната површина на слободната гингива и забот. Гингивалниот сулкус почнува од работ на слободната гингива и во апикален правец се протега до коронарниот крај на припојниот епител. На гингивалниот сулкус се разликуваат: 1. надворешна страна (мек ѕид) - претставена со слободната гингива; 2. внатрешна страна (тврд ѕид) - претставена со емајлот на забот; 3. дно - претставено со припојниот епител, којшто се наоѓа на емејлово-цементната граница и 4. отвор, кој се отвара кон оралната празнина. Длабочината на гингивалниот сулкус изнесува од 1-2 мм и низ него циркулира гингивалниот флуид (слика 9.1).



Слика 9.1 : а)сонда насочена кон гингивалниот сулкус б)сондата навлегува помеѓу емајлот на забот и внатрешната страна на слободната гингива во гингивалниот сулкус.

Гингивалниот трансудат е сличен на крвниот серум. Составни компоненти на гингивалниот флуид се: серумските протеини, имуноглобулините (A; G; M), комлементот, цитокините, албумините, амино киселините, лизозимот, ензимите (кисела фосфатаза, колагеназа, хијалуронидаза, еластаза, арил сулфатаза, бета глукоронидаза), натриумот, калиумот, калциумот, фосфорот, метаболитите на арахидонската киселина (простагландини, тромбоксани, леукотриени), микроорганизмите, десквамираните епителни клетки и леукоцитите.

Мислењата за присуството на гингивалниот флуид во сулкусот се уште се поделени. Некои автори сметаат дека кај индивидуи со здрава гингива во сулкусот нема течност. Тие се на мислење дека гингивалниот флуид се појавува при инфламација на гингивата. Зголемувањето на количеството на гингивалната течност е прв знак на воспаление на гингивата. Со мерење на количеството на гингивалната течност може да се процени интензитетот на гингивалната инфламација. Со помош на филтер хартија може да се собере гингивалната течност, а потоа да се проучи

нејзиниот квалитативен и квантитативен состав. На овој начин со помош на различити маркери може да се утврди активноста на пародонтопатијата. Бидејќи гингивалната течност воглавно потекнува од пародонталните ткива (гингивата, периодонциумот, алвеоларната коска и цементот), биохемиската анализа на оваа течност може да укаже на одредени патолошки промени на пародонталните ткива, пред тие клинички да се манифестираат.

Улогата на гингивалната течност не е потполно разјаснета. Лачењето на оваа течност може да претставува одбранбен механизам: таа го плакне гингивалниот сулкус, ги отстранува микроорганизмите и туѓите тела. На тој начин механички се чисти сулкусот. Бидејќи гингивалниот флуид содржи антитела, полиморфонуклеарни леукоцити, макрофаги, ензими, можна е негова хуморална одбранбена реакција. Гингивалната течност содржи и некои лепливи протеини на плазмата, кои може да помогнат во адхезија на сулкусниот епител за површината на забот.

Гингивалната течност има и несакани дејства. Така, таа може да послужи и како подлога за размножување на микроорганизми во сулкусот и да биде извор за создавање на меки и цврсти наслаги на забите. Кога на забите ќе се создаде дентален плак, флуидот ја потпомага неговата минерализација.

Кога постои инфламација на гингивата, оваа течност е и трансудат и ексудат и нејзиното количество е зголемено, па се семета дека е пропорционална на тежината на инфламацијата.

(Трансудатот настанува како последица на промените во пермеабилноста на мембраните или хидростатскиот притисок на мембраните, а ексудатите се последица на инфекции или малигни состојби и содржат голем број на леукоцити и малигни клетки).

Методи за добивање на гингивален флуид за биохемиска анализа

Собирањето на гингивалниот флуид од гингивалниот сулкус се изведува со помош на капиларни цевчиња или со лентички од филтер хартија (Whatman 3 MM Chromatography). Кој метод ќе биде избран зависи од тоа каква анализа на гингивалниот флуид ќе се спроведе. Ако е потребно поголемо количество на гингивален флуид, тогаш собирањето со капиларни цевчиња е најадекватниот метод. Сепак, најмногу се применува методот на собирање на гингивалниот флуид со филтер хартија. Филтер хартијата се сече на лентички со димензии: должина од1 см, а широчина од 0,5 см. Една лента на филтер хартијата се насочува кон работ на гингивалниот сулкус, којшто претходно, со ватеролни е изолиран од плунката. Филтер хартијата се поставува во сулкусот/џебот, се додека не се почуствува отпор и се остава да стои во него 2 минути. После тоа лентичките се вадат и на нив се одбележува висината на столбот, којшто е натопен со гингивална течност и се мери со милиметарска хартија. Резултатот се искажува во mm^2. Колекционираната гингивална течност може да се измери со апаратот „Periotron- 6.000“. Ако сакаме да ја одредиме вредноста на некоја од составните компоненти на гингивалниот флуид се користат одредени лабораториски методи. На пример, за да се одреди вредноста

на ензимот еластаза, насобраниот гингивален флуид прво треба 60 минути да се центрифугира на собна температа, а потоа за негово одредување се користи имунотурбидиметрискиот метод.

Вредноста на овој ензим во гингивалниот флуид кај пациенти со инфламирана гингива ќе биде поголема во однос на оние испитаници кои немаат гингивална инфламација.

Практична работа: да се определи количеството на гингивалниот флуид кај студент со инфламирана гингива и кај студент со неинфламирана гингива. Да се споредат резултатите добиени кај првиот студент со резултатите добиени кај вториот студент.

Потребно за изведување на вежбата: филтер хартија, ножички, милиметарска хартија, ватеролни и комлет за стоматолошки преглед (сонда, огледалце и пинцета).

КВИЗ

1. Што претставува гингивалниот флуид?

2. Внатрешната страна (тврдиот ѕид) на гингивалниот сулкус го сочинува:
   а. Цементот на коренот на забот
   б. Емајлот на забот
   в. Внатршната страна на слободната гингива
   г. Припојниот епител

3. Длабочината на гингивалниот сулкус изнесува:
   а. 3 мм
   б. 5 мм
   в. 1-2 мм
   г. 3-4 мм

4. Наброј ги составните компоненти на гингивалниот флуид:

5. Кое е значењето на биохемиската анализа на гингивалниот флуид?

6. Кои се несаканите дејства на гингивалниот флуид?

ВТОР ДЕЛ

ПЛУНКАТА КАКО ДИЈАГНОСТИЧКИ МЕДИУМ

1 КОРИСТЕЊЕ НА ПЛУНКАТА КАКО ДИЈАГНОСТИЧКИ МЕДИУМ ВО СТОМАТОЛОГИЈАТА

Можност за употреба на плунката во процена на ризикот за настанок на кариесот

Можности за користење на плунката во дијагностицирање на пародонтопатиите

Можности за користење на плунката во дијагностицирање на оралниот карцином

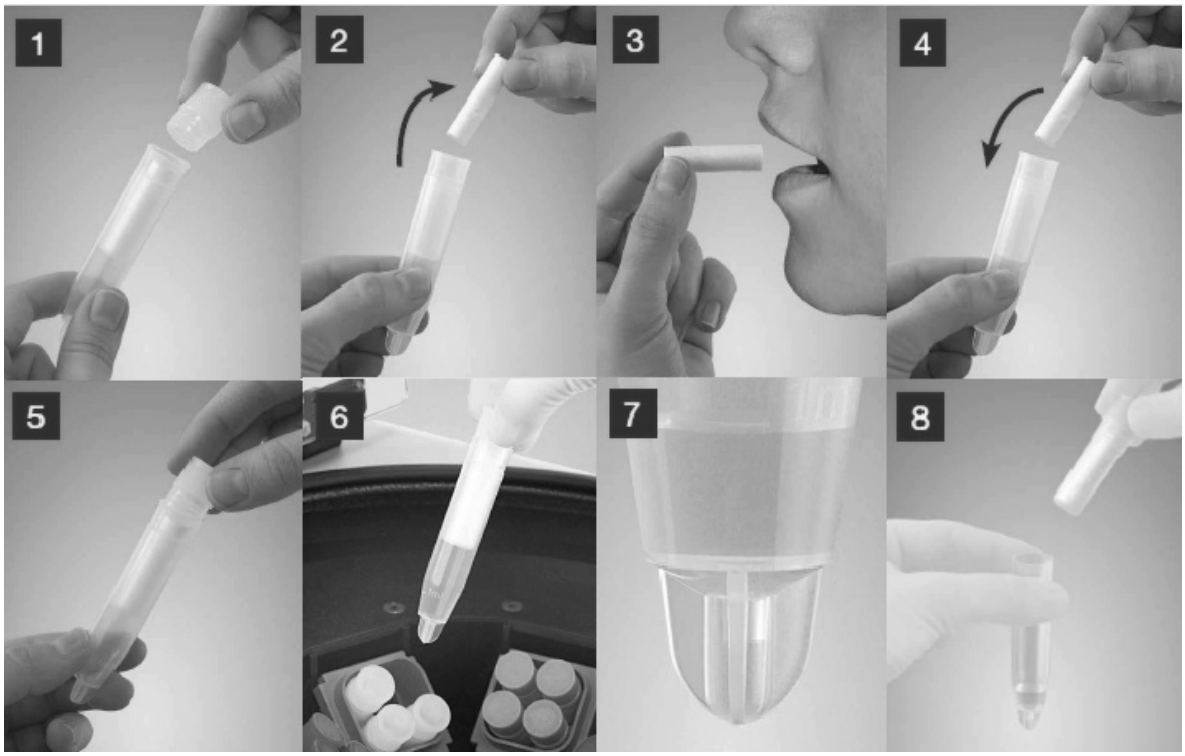
Можности за користење на плунката во дијагностицирање на заболувањата на оралната мукоза

Плунката е во непосреден контакт со оралните ткива поради што сите случувања во овие ткива имаат влијание врз главниот орален медиум. Тоа е причина за голем број на автори, плунката да ја нарекуваат "огледало на оралното здравје". Анализата на биохемискиот состав на плунката е значајно во стоматологијата. Целта на анализата е проценка на ризикот за појава на одредено орално заболување, дијагностика, следење на текот на болеста како и контрола на резултатите од спроведената терапија кај различни орални заболувања.

Во последните години установена е процедурата за собирање и чување на примероците на плунката како биолошки материјал. На пациентот задолжително треба детално да му се објасни протоколот на земање на примероците на плунката:

- потребно е да му се укаже на значењето на точното време на земање на плунката,
- најмалку 30 минути пред земањето на плунката, пациентот не треба да ги мие забите, не треба да зема храна или било каква течност, ниту пак да џвака мастика за џвакање.

Примероците од плунката се земаат со помош на специјални епрувтети SALIVETE SARSTEDT (Germany), кои се состојат од повеќе делови (слика 1.1).



Слика 1.1.: Инструкции за употреба на Salivette®: Пациентот го отстранува капачето и ја вади памучната влошка (сл. 1 и 2). Ја става памучната влошка во устата и ја чува до 45 секунди за да го стимулира лачењето на плунката (сл. 3) и повторно ја враќа назад со апсорбираната плунка (сл. 4). Пациентот ја затвара тубата (сл.5). Се врши центрифугирање на плунката 3 минути на 3000 вртежи во минута (сл. 6). Муцинот и останатите материи кои можат да ја попречат аналитичката процедура се собираат во специјално дизајнираниот дел на Salivette® (сл. 7). Се отстранува капачето и плунката е спремна за анализа (сл 8).

Основниот дел е пластична епрувета, во која е сместен подвижен перфориран пластичен додаток. Во додатокот се наоѓа памучна или полиестерска влошка, која се поставува под јазикот на пациентот во временски интервал од 30-45 секунди. За собирањето на нестимулираната плунка, памучната влошка не содржи хемиско средство кое би предизвикало стимулирано лачење на плунката. Стимулираната плунка се собира со памучна влошка која содржи хемиско средство за стимулирање на саливацијата (најчесто лимонска киселина). Меѓутоа, со лимонската киселина треба да се внимава, бидејќи може да влијае врз резултатите на имунолошките анализа на хормоните (лимонската киселина реагира со антителата). Кога памучната влошка ќе се натопи со плунка, истата се става во пластичниот перфориран додаток и епруветата се затвора со затварач. Центрифугирањето на примерокот на плунката се врши три минути на 3.000 вртежи во минута. На овој начин плунката се ослободува од муцинот и од останатите материи кои можат да ја попречат аналитичката процедура. После центрифугирањето се вади пластичниот додаток заедно со памучната влошка, а епруветата со примерокот од плунката може да се замрзне до времето потребно за анализирање.

Замрзнувањето на примероците на плунката го спречува деградирањето на молекулите, како и растот и размножувањето на бактериите. Ова е значајно бидејќи бактериските ензими, какви што се протеазите, можат да разградат некои од саливарните протеини. Така, на пример, sIgA може да биде разграден на собна температура под дејство на бактериските протеази. Истражувањата покажале дека нивото на sIgA се намалува за 10% после 8 часа инкубација на плунката на -30 ^{0}C. Од друга стана пак, докажано е дека нивото на sIgG во плунката, одредуван со ELISA тестот, значително се намалува ако плунката се чува на собна температура во текот на една недела.

Одделни ензими на плунката ја менуваат нивната активност во зависност од условите на чување на примероците. Активноста на алфа-амилазата во плунката е стабилна неколку дена на температура од +4^{0}C. Меѓутоа, по замрзнувањето, помала количина од овој протеин може да преципитира. Активноста на карбоанхидразата може да се смени во услови на промена на pH на плунката и на пуферскиот капацитет. Значително намалување на активноста на саливарната естераза се забележуваат после центрифугирање на плунката. Меѓутоа, примероците со плунка можат да чуваат на -20^{0}C, кратко време, без значително намалување на активноста на овој ензим. Центифугирањето и замрзнувањето на примероците на плунката предизвикуваат редукција на содржината на лизозимот. Третирање на примероците на плунката со киселини или со бази, после центрифугирањето, значително ја намалува концентрацијата на лизозимот. Активноста на саливарната пероксидаза се менува при заматување и центрифугирање на плунката, додека пак, активноста на овој ензим е стабилна неколку месеци при замрзнување на плунката. Активноста на бактериските гликозидази е стабилна при краткотрајно замрзнување на плунката на температура од -20^{0}C. Активноста на саливарните протеази, кои потекнуваат од леукоцитите, епителните клетки или оралните бактерии, се намалува по центрифугирањето на плунката. Генерално, протеазите се многу стабилни во плунката и само некои пептидази можата да ја загубат својата активност при долготрајно замрзнување на примероците на плунката на температура од -20^{0}C.

Концентрацијата на електролитите се менува после центрифугирањето и замрзнувањето на примероците од плунката. Калциумот е "лабилен" и има склоност да преципитира. Поради тоа концентрацијата на калциумот треба да се одредува веднаш после собирањето на примероците на плунката. Нивото на саливарните бикарбонати може да се менува во зависност од условите на собирање и на чување на примероците од плунката. Исто така CO_2 од воздухот може слободно да дифундира во плунката. Нивото на нитритите во свежите примероци на плунка, исто така може битно да се менува бидејќи истите можат да бидат искористени од микроорганизмите. Со користење на бази може да се стаблизира нивото на нитратите и нитритите на собна температура во текот на две недели. Заматувањето на примероците на плунката може да го попречи спектрофотометриското одредување на тиоцијанатите и хипотиоцијанаите. Освен тоа, нивото на овие електролити значително се намалува ако примероците на плунката се чуваат на ладно неколку часови. Замрзнатите примероци од плунката се погодни за анализа на тиоцијанатите и хипотиоцијанатите. Концентрацијата на Cl, Na и K не се менува доколку примероците на плунката се држат на собна температура или пак се замрзнати. Создавање на преципитати во плунката го отежнува колориметриското одредување на фосфатите. Центрифугирањето на плунката предизвикува намалување на концентрацијата на фосфатите за околу 10%, додека пак замрзнувањето на плунката предизвикува намалување на содржината на овие електролити 5-30%. Центрифугирање на примероците на плунката предизвикува намалување на содржината на флуоридите до 15%, додека пак замрзнувањето нема никакво влијание врз нивото на овој електролит. Пуферскиот капацитет на плунката е стабилен 48 часа после собирањето на примероците, а се зголемува доколку примероците на плунката се чуваат на собна температура или на -18^{0}C. Ако плунката е изложена на воздух се намалува pH на плунката поради губење на CO_2.Поради тоа одредувањето на pH на плунката мора да се изврши веднаш после земањето на примероците или пак примероците треба да се замрзнат на -80^{0}C.

Останатите составни компоненти на плунката, какви што се катехоламините, имаат краток биолошки полуживот и имаат можност брзо да се деградираат. Концентрацијата на кортизолот во плунката е ралативно стабилна. Доколку плунката се чува 30 дена на собна температура концентрацијата на овој хормон ќе се намалу за 9,2%. Чувањето на плунката на 5^{0}C. нема никакво влијание врз концентрацијата на кортизолот во текот на 3 месеци.

Интересен е податокот дека периодичното замрзнување и одмрзнување на плунката не влијае врз концентрацијата на саливарниот кортизол. Концентрацијата на прогестеронот во плунката е стабилна 3 месеци на собна температура.

- При анализирање на плунката се јавуваат три главни проблеми:
- тешко е да се определи кои компоненти се од локално потекло (од плунковните жлезди), а кои компоненти потекнуваат од епителните клетки или од бактериите.
- како резултат на бактерискиот метаболизам, значително се менува биохемискиот состав на плунката.
- присуството на клеточниот дебрис и заматувањето на плунката може да попречи некои аналитички процедури.

Овие проблеми можат да бидат надминати со претретман на примероците на плунката.Тоа подразбира центрифугирање за отстранување на бактериите и на целуларниот дебрис, како и собирање и чување на примероците на соодветна температура.

Вискозноста на плунката може да биде голем проблем при многу аналитички процедури. Овој проблем може да се реши со отстранување на високомолекуларните вискозни муцини со ултрацентрифугирање или со преципитација користејќи цетилтриметиламониум-бромид, трифлуорна киселина или пак гуанидин.

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 ^{0}C плунката се чува доколку анализата се спроведе во рок од 3-6 часа. Примероците на плунката се чуваат на -20^{0}C (или подобро на -80^{0}C) ако анализата се спроведува после 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.

Можност за употреба на плунката во процена на ризикот за настанок на кариесот

Забниот кариес претставува најчесто орално заболување со комплексна етиологија кое се јавува во секоја животна возраст. Дијагнозата се поставува релативно лесно, врз основа на клиничкиот и радиографскиот преглед. Но, анализирањето на плунката од аспект на кариесот, е во процена на ризикот за настанок на ова заболување. Врз основа на физичко-хемиските особини на плунката (количината на излачена плунка, пуферскиот капацитет), како и микробиолошкиот мониторинг на овој секрет (степен на колонизација на оралната средина со кариогени видови бактерии), можат да се откријат пациентите кај кои постои зголемен ризик за настанок на кариесот. Тоа би овозможило навремена примена на превентивни мерки за намалување на ризикот за настанок на ова заболување.

Количината на излачена плунка зависи од тоа дали се лачи стимулирана или нестимулирана плунка, а при тоа постојат индивидуални варијации. Зголеменото лачење на плунка овозможува ефикасно отстранување на заостанатите честички храна од усната празнина (самочистење). Меѓутоа, со зголемувањето на количеството излачена плунка, се зголемува и концентрацијата на бикарбонатните јони, кои се главни пуфери во плунката, со што се намалува штетниот ефект на киселите производи од храната. Намалената количина на излачена плунка влијае

директно на зголемување на ризикот за настанок на забниот кариес, што особено се забележува кај пациентите со ксеростомија. Плунката со својот пуферски капацитет е во можност да ја оджува вредноста на pH на оралната средина во физиолошки граници (pH 6,1-7,8) и притоа не доаѓа до деминерализација на емајлот на забот. Врз основа на пуферскиот капацитет на плунката може да се процени ризикот од појава на кариес на забот. Постојат повеќе стандардизирани постапки за определување на пуферскиот капацитет на плунката кои се едноставни за примена и во амбулантни услови. Еден од најчесто користените тестови е Dentobuff (Vivadent, Liechtenstein/ Europe).

Исто така во процена на ризикот за настанок на забниот кариес значајно е и одредувањето на степенот на колонизација на усната празнина со кариогени бактерии од типот на Streptococcus mutans и Lactobacillus. Овие бактерии поседуваат кариогени карактеристики, затоа што нивните кисели метаболни продукти можат да допринесат кон настанок на почетни кариозни лезии во емајлот на забот, односно ширење на кариесот во дентинот. Зголемениот степен на колонизација на усната празнина со овие микроорганизми укажува на присуство на лоша орална хигиена. Најчести стандардизирани тестови кои се користат за одредување на степенот на колонизација на оралната празнина со кариогените видови бактерии се Dentocult-Streptococcus mutans и Dentocult- Lactobacillus (Vivadent, Liechtenstein/ Europe) и CRT- Caries Risk Test (Vivadent, Liechtenstein/ Europe). Овие плунковни тестови се од огромна помош во стоматологијата за проценка на ризикот за настанок на забниот кариес, затоа што овозможуваат навремено планирање на мерките за превенција, а пациентите додатно да се мотивираат за подобро одржување на оралната хигиена.

Можности за користење на плунката во дијагностицирање на пародонтопатиите

Пародонтопатијата претставува многу често, бактериски индуцирано, хронично инфламаторно заболување, кое го деструира потпорниот апарат на забите, доведувајќи до конечен губиток на забите. Дијагнозата на пародонтопатијата првенствено се базира на клиничкиот пародонтолошки преглед (плак индекс, гингивален индекс, длабочина на продонталниот џеб, индекс на крвавење на гингивата, губиток на пародонталниот припој) и на радиографски параметри (степенот на губиток на алвеоларната коска). Овие клинички параметри корисни се за дијагнозата на пародонталната болест, но даваат ограничени информации за субклиничките форми на заболувањето, за прогнозата на болеста и за проценката на ефектот од спроведената терапија. Анализата на биохемискиот состав на плунката може да биде значаен дополнителен дијагностички тест. Во неа можат да се докажат бројни биохемиски показатели на патолошките процеси во пародонталните ткива (ензими, имуноглобулини, фактори на раст, антимикробни пептиди, показатели на липидната пероксидација и оксидационото оштетување на ДНК и др.).

Испитувањето на протеините во плунката со примена на модифицирани електрофоретски методи, базирани врз разликите во електрофоретската подвижност и различниот pH градиент, овозможува да се согледа и оцени состојбата на пародонталните ткива во различни стадиуми на заболувањето. Електрофорезата на

вкупните саливарни протеини, иако дава одредени информации, сепак претставува релативно груб аналитички метод. Попрецизни информации можат да се добијат со анализа на поединечни протеини на плунката, а поради нивната улога во одредени физиолошки и патолошки процеси кои се одигруваат на молекуларно ниво во пародонталните ткива, голем број од протеините можат да се сметаат за потенцијални показатели на пародонталната болест. Тука спаѓаат бројни ензими по потекло од патогените бактерии, бактериски протеинази кои се директно одговорни за разградба на структурните протеини на пародонталните ткива, како што е колагеназата, еластазата, аргинин-протеиназа, кератиназа, фибронектин-деградирачки ензим, фосфолипаза А итн. Значајни се и хидролитичките ензими ослободени од неутрофилните леукоцити како одговор на организмот кон бактериската инфекција на пародонциумот, на локално ниво- еластаза, катепсин-G и катепсин-D, β-глукоронидаза, матриксметалопротеиназа-8 (MMP-8 и MMP-9), кои исто така ги деструираат структурните протеини на пародонталните ткива. Бидејќи активноста на поедини ензими во плунката кај пациените со пародонтопатија, значајно се намалува после применетата терапија, истражувачите истакнуваат дека проследувањето на овие ензими може да послужи како показател за успехот на спроведената терапија. Исто така, некои ензими можат да бидат показатели на степенот на активност на пародонтопатијата, бидејќи е утврдена позитивна корелација помеѓу нивната активност во плунката и вредностите на некои клинички параметри (индекс на крварење, длабочина на џеб итн). Покрај ензимите и останатите протеини во плунката како што се ендотелниот фактор на раст, лактоферин, фибронектин, цистатини, дефензини и многу други, може да се сметаат за потенцијални показатели на пародонталната болест, бидејќи нивната концентрација е зголемена кај заболените во однос на здравите индивидуи.

Во тек на пародонтопатијата настануваат квалитативни и квантитативни промени и на имуноглобулините, кои можат да се следат со анализа на гингивалниот флуид и плунката. Одредување на нивото на имуноглобулини во плунката е значајно од повеќе аспекти како, поставување на дијагноза, така и за прогноза и следење на ефектите од спроведената терапија. Едноставен и доста сензитивен Dot Blot Assay метод е погоден за откривање на поткласите на IgG во плунката и во гингивалниот флуид, а ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) за откривање на поткласите на IgA кои се значајни за проценка на степенот на гингивалната инфламација.

Една од значајните улоги на плунката во одржувањето на оралната хомеостаза е и антиоксидативната заштита на оралната средина, што се обезбедува со присуството на саливарната пероксидаза, супероксид-дизмутаза, глутатион-редуктаза, како и некои неензимски антиоксиданси (уреа, албумини, глутатион). Истражувањата укажуваат дека во плунката е зголемено нивото на малондиалдехид (MDA) кој е показател на степенот липидната пероксидација во ткивата, што оди во прилог на тоа, дека оксидативниот стрес има значајно место во патогенезата на пародонталната болест. Затоа во превенција на пародонтопатијата се препорачува и примена на антиоксиданси како што се витамините А, Ц, Е и селенот.

Лабораториските дијагностички тестови треба да бидат високоспецифични и сензитивни, како би можеле да бидат валидни за дијагностицирање на некое заболување. Земајќи ја во предвид комплексната етиопатогенеза на пародонталната болест,

испитувањето на само една состојка од плунката, нема да биде доволно специфично за поставување на дијагноза, прогноза и процена на ефектот на лечење. Меѓутоа, анализирањето на повеќе саливарни показатели би обезбедило многу попрецизни информации за ова заболување.

Можности за користење на плунката во дијагностицирање на оралниот карцином

Орален карцином е најчесто присутен малигном на главата и вратот, а неговата инциденција изнесува 300.000 нови случаи за една година во целиот свет. Се карактеризира со висок степен на морбидитет и морталитет (над 50%). Главен фактор на ризик за ова заболување е пушењето (повеќе од 90% од заболените се пушачи). Различни состојки на тутунскиот чад директно или индиректно ги оштетуваат епителните клетки на оралната мукоза. Тоа резултира во нивна мутација и малигна трансформација.

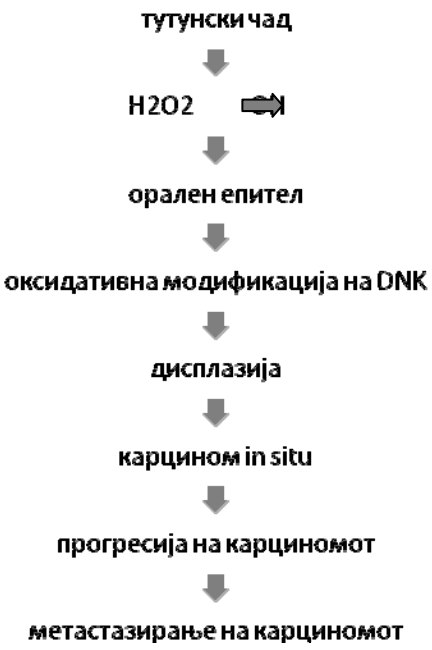
Директно оштетување на епителните клетки на оралната мукоза настанува под дејство на токсичните алдехиди (акролеин и ацет алдехид) кои се присутни во тутунскиот чад. За патогенезата на оралниот карцином значајно е и штетното дејство на слободните радикали кои предизвикуваат оксидативна модификација на биомолекулите. Тоа доведува до малигна трансформација на епителните клетки на оралната мукоза.

Слободните радикали на тутунскиот чад не ги оштетуваат директно епителните клетки на оралната мукоза бидејќи се ниско реактивни (водород пероксид и други). Меѓутоа, овие ниско реактивни слободни радикали во плунката се трансформираат во високо реактивни, каков што е хидроксилниот радикал. Тоа се случува со посредство на јони на метали со променлива валенца (железо) и со посредство на аскорбинска киселина која е присутна во плунката. Трансформацијата на нискореактивните слободни радикали во високо реактивни со посредување на железо во плунката се одвива по принципот на Fenton-овата реакција:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + 2OH$$

Освен споменатото дејство во засилувањето на активноста на слободните радикали, пушењето предизвикува и намалување на антиоксидативна заштита на оралната средина. Поради тоа, слободните радикали предизвикуваат оксидативна квалификација на DNK на оралните клетки, а тоа може да предизвика нивна малигна алтерација. Голем број на литературни податоци укажуваат на непроценливото значење на плунката во одржувањето на оралната хомеостаза (антиоксидативна заштита, специфична и неспецифична антимикробна заштита, самочистење на оралната средина, одржување на физиолошките вредности на pH, заштита на емајлот на забот од деминерализација, одржување на интегритетот на оралната мукоза и попречување на нејзината колонизација со микроорганизми...).

При неповолни околности, какво што е пушењето на цигари, плунката може да има "прооксидантна улога" што ќе резултира во оксидативно оштетување на оралните ткива.



Шема 1.1 :каскада на развојот на оралниот карцином

Токсичните компоненти од тутунскиот чад предизвикуваа промена на антиоксидативниот капацитет на оралната средина, а особено на антиоксидативниот капацитет на плунката.

Во тутунскиот чад е присутен хидроген цијанид (HCN) кој во црниот дроб се метаболира до SCN. Потоа јоните на SCN преку крвта се транспортираат до плунковните жлезди, од каде што со процесот на ултрафилтрација пристигнуваат во мешаната плунка. Концентрацијата на SCN во плунката на непушачите е од 0,3-1,5 mM, додека оваа концентрација кај пушачите изнесува од 1,4-4 mM. Јоните на SCN во присуство на орална пероксидаза реагираат со водородниот пероксид во оралната празнина. Но, утврдено е дека активноста на оралната пероксидаза значително се намалува кај пушачите во споредба кај нејзината активност кај непушачите. Намалената активност на овој ензим во оралната средина кај пушачите овозможува H_2O_2, во присуство на железо, да се трансформира во хидроксилен радикал (шема 1.1.).

Пушењето на цигарите предизвикува и намалување на концентрацијата на неензимски антиоксиданси во плунката, каков што е случајот со глутатионот. Авторите ова го објаснуваат со интеракцијата помеѓу алдехидите од тутунскиот чад и SH групите на глутатионот. Притоа се создаваат нефункционални коњугати. Особено е интересно анализирањето на концентрацијата на мочната киселина, која претставува главен неензимски антиоксидант и учествува со 70% во вкупниот антиоксидативен капацитет во плунката. Истражувањата покажале во плунката кај

пациентите со орален карционом, кои биле пушачи, значително е намалена концентрацијата на мочната киселина и на албумините во споредба со групата на здрави испитаници. Овие резултати се објаснуваат со зголемената потрошувачка на саливарните антиоксиданси за неутрализација на слободните радикали.

Произлегува заклучокот дека анализата на антиоксидативната способност на плунката може да биде корисен параметар за промоција на превентивните мерки за спречување на оралниот карцином. На сличен начин како и кај пародонтопатијата, се препорачува употреба на различни антиоксиданси.

Освен пушењето на цигари, како главен фактор на ризик за појава на оралниот карцином значајни се и други физичко-хемиски агенси како и онкогени вируси. Овие фактори имаат мутагена улога. Генот p53 (16-20 kbDNA) е локализиран во хуманиот хромозом 17 и содржи 11 егзони. Овој ген е еден од најпознатите гени кои имаат супресорска улога. Количеството на p53 во клетките на човековиот организам, во физиолошки услови е многу мала бидејќи не е неопходен за развојот и за функционирањето на клетката. Индивидуите со наследна мутација на генот p53 имаат предиспозиција за појава на различни тумори. Концентрацијата на p53 се зголемува при оштетување на DNK. Притоа, се нарушува клеточниот циклус, кој е неопходен за репарација на DNK. Доколку не настане оваа репарација индиректно се активираат гените задолжени за апоптоза. Процесот на канцерогенеза подразбира стекнување на онкогена активност и губиток на тумор-супресорската функција на генот p53. Кај голем број на малигноми откриени се абнормалности на генот p53. Мутацијата, инактивацијата и делецијата на генот p53 се вклучени и во патогенезата на оралниот карцином. Мутацијата или зголемената експресија на генот p53 е утврдена во плунката кај оралниот сквамозен карцином. Во примероците на плунка кај 71% од пациентите со орален карцином се откриени специфични мутации на генот p53.

Цитокините се фамилија на растворливи, нискомолекуларни протеини или гликопротеини. Тие имаат улога на медијатори и модулатори на имунолошкиот одговор, на инфламацијата и на хематопоезата. Неопходни се за неспецифичната и специфичната имунолошка реакција која се јавува при инфекции. Цитокините се синтетизираат во текот на ефекторната фаза на неспецифичната и специфичната имунолошка реакција. Се синтетизираат од различни клетки, пред се од одбранбени клетки (полиморфонуклеарни леукоцити, ткивни макрофаги, лимфоцити), како одговор на присутни патогени микроорганизми. Секрецијата на цитокините е значајна и за појавата и за развојот на малигните тумори. Интерлеукинот 6 (Il-6) и факторот на некроза на туморите (TNF-α) можат да делуваат како промотори на процесот на канцерогенезата. Il-6 го инактивира генот p53 на тој начин што ја фаворизира хиперметилацијата на неговиот промоторски регион. Тоа резултира во супресија на апоптозата и неконтролирана клеточна пролиферација. Во плунката е анализирана концентрацијата на Il-6 и TNF-α кај пациенти со леукоплакија и Il-1, Il-6, Il-8 и TNF-α кај пациенти со орален лихен планус. Во плунката кај пациентите со овие преканцерозни лезии е утврдено зголемено ниво на споменатите цитокини во споредба со нивото на овие цитокини во плунката кај здравите испитаници. Испитувањата покажале дека пациентите со орален карцином имаат зголемена концентрација на -1, Il-6 и TNF-α во плунката во споредба со здравите испитаници.

Произлегува дека саливарните цитокини можата да бидат валиден биохемиски маркер за дијагнозата, за прогнозата и за следењето на резултатите од спроведената терапија на преканцерозните лезии и на туморите во оралната средина.

Можности за користење на плунката во дијагностицирање на заболувањата на оралната мукоза

Оралната мукоза постојано е изложена на дејството на неповолни фактори на надворешната средина, меѓу кои се и голем број на микроорганизми. Основната улога на оралната мукоза е да го спречи продорот на микроорганизмите во внатрешноста на организмот. Самата хистолошка градба на оралната мукоза претставува бариера за продор на патогените микроорганизми. Меѓутоа оваа улога на оралната мукоза е можна само кога таа е интактна. Значајна улога во одржувањето на интегритетот на оралната мукоза има плунката. Во овој орален медиум се присутни бројни одбранбени протеини кои имаат антимикробна активност. Секреторните имуноглобулини се саливарни протеини кои имаат специфична антимикробна заштита. Саливарни протеини кои имаат неспецифична антимикробна заштита се: лизозим, муцин, протеини богати со пролин, дефензини, хистатини, калпротектин, кателицидин, лактоферин и фибронектин.

Поновите истражувања од областа на оралната биохемија укажуваат дека плунката може да се користи како примерок на биолошки материјал за мониторинг на заболувањата на оралната мукоза. Тоа е така бидејќи во саливарниот секрет можата да се докажат, но и квантитативно да се определат, бројни инфламаторни медијатори кои учествуваат во патогенезата на овие заболувања.

Леукоплакијата се манифестира со појава на бели плаки на непроменета орална лигавица. Етиологијата на ова заболување е непозната. Фактори за ризик за појава на ова заболување се:

- пушењето,
- конзумирањето на алкохол,
- неадекватните протетски изработки,
- деструираните заби и
- авитаминозата.

Кај пациенти со леукоплакија и орален лихен планус е анализирана концентрацијата на Il-6 и TNF-α во плунката. Утврдено е дека концентрацијата на овие цитокини во плунката кај пациентите со леукоплакија и орален лихен планус е зголемена во споредба со концентрацијата на овие цитокини во плунката кај здравите испитаници.

Лихен планус е мукокутано заболување кое најчесто се манифестира со појава на бели орални лезии. Се работи за хронично инфламаторно заболување на кожата и на оралната мукоза, а заболувањето има непозната етиологија. Се претпоставува дека дисфункцијата на клеточниот имунитет е вклучена во комплексната етиопатогенеза на ова заболување. Имунопатолошките збиднувања резултираат во

дегенерација, лиза и ликвефакција на базалните клетки на епителот на оралната мукоза. Во субепителниот регион доминира инфилтрација со Т-лимфоцити кои предизвикуваат понатамошно ослободување на хемокини и цитокини. Еден од нив е TNF-α, мултифункционален цитокин, кој има клучна улога во имунолошкиот одговор на ткивата во текот на инфламацијата. Бројни истражувања укажуваат на зголемена концентрација на TNF-α во плунката кај пациентите со лихен планус во споредба со здравите испитаници. Исто така, утврдено е дека концентрацијата на TNF-α варира кај различните клинички форми на лихен планус. Концентрацијата на TNF-α во плунката е значително повисока кај пациентите со ерозивна/атрофична форма на ова заболување во споредба со неговата концентрација кај ретикуларната форма. Присуството на високи концентрации на TNF-α во плунката може да придонесе за малигна трансформација на лезиите кај пациентите со орален лихен планус.

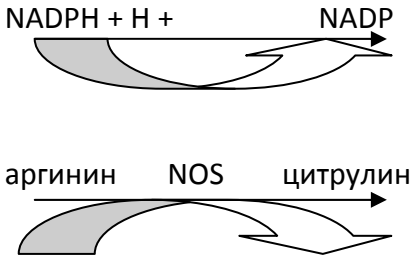
Во други истражувања е одредувана концентрацијата на интерлеукини во плунката, какви што се Il-1, Il-6 и Il-8, кои се познати потентни про-ангиогенетички фактори. Освен тоа овие цитокини се значајни и за процесот на клеточниот раст за афтоимуните заболувања за канцерогенезата и за инфламацијата. Резултатите покажале зголемена концентрација на овие медијатори на инфламацијата во плунката кај пациентите со лихен планус во споредба со контролната група. Интересни се и наодите дека нивото на споменатите цитокини било значително повисоко во плунката отколку во крвниот серум. Освен цитокините и факторите на раст имаат значајно место во патогенезата на орален лихен планус. Фибробластниот фактор на раст има улога во ангиогенезата, хематопоезата и зараснувањето на раните. Во плунката на пациентите заболени од орален лихен планус утврдена е значително повисока концентрација на овој фактор на раст во споредба со здравите испитаници.

Рекурентниот афтозен стоматит (РАС) е најчесто присутното заболување на оралната мукоза. Испитувањата покажале дека се работи за генетски предодредена имунолошка реактивност кон непознати антигени. Како етиолошки фактори за појава на РАС се спомнуваат стресот, траумите, како и недостатокот на одделни минерали и витамини. Во патогенезата на ова заболување се вклучуваат различни медијатори на инфламацијата и на имунолошкиот одговор. Истражувана е концентрацијата на PGE-2 и EGF во плунката кај пациенти со РАС. Простагландините се деривати на арахидонската киселина и има улога на локални ткивни хормони кои регулираат голем број на физиолошки процеси. Докажана е нивната цитопротективна улога во мукозата на гастроинтестиналниот тракт. Се претпоставува дека истиот ефект го имаат и во оралната мукоза. EGF претставува потентен митоген пептид кој има цитопротективна улога за епителните клетки на оралната мукоза. Тој учествува во процесите на зараснување на раните. Истражувањата покажале дека концентрацијата на PGE-2 и EGF во плунката на пациентите со РАС е значително редуцирана во споредба со контролната група. Исто така, утврдено е значително намалување на концентрацијата на PGE-2 во текот на активниот стадиум на РАС. Потоа, во реконвалесцентната фаза доаѓа до значително зголемување на концентрацијата на PGE-2. Но, зголемувањето на саливарниот EGF во текот на реконвалесцентната фаза на РАС е значително побавно во споредба со зголемувањето на концентрацијата на PGE-2.

Во патогенезата на голем број на орални заболувања значајна улога има оксидативниот стрес, односно, штетното дејство на слободните радикали. Поновите истражувања укажуваат дека оксидативниот стрес и намалувањето на антиоксидативната заштита на оралната мукоза имаа значајна улога во етиопатогенезата на РАС. Во плунката кај пациентите со ова заболување е утврдено намалување на концентрацијата на витамините кои имаат антиоксидативно дејство (А, С и Е). Од друга страна, пак, содржината на саливарниот малондиалдехид (NDA) е значително повисока кај пациентите со РАС во споредба со контролната група. Малондиалдехид е краен продукт на липидната пероксидација која се случува при оксидативниот стрес и штетното дејство на слободните радикали. Липидната пероксидација предизвикува оштетување на клеточната мембрана на клетките. Поради тоа, NDA претставува валиден биомаркер на степенот на липидна пероксидација во ткивата.

Еден од најзначајните хуморални медијатори на оралниот имунитет е секреторниот IgA. Тој е главен имуноглобулин во саливарниот секрет и има улога на одличен индикатор на имунолошкиот статус на оралната мукоза. Во плунката на пациентите со РАС е утврдена поголема концентрација на sIgA во споредба со испитаниците од контролната група. Исто така е утврдена разлика во концентрацијата на овој имуноглобулин во плунката кај истите пациенти со различни клинички стадиуми на заболувањето. Содржината на sIgA е значително поголема во текот на акутната фаза на заболувањето, додека пак неговата концентрација се намалува во фазата на ремисија на ова заболување.

Предмет на новите истражувања во областа на областа на оралната биохемија, е улогата на азот мохоксид (NO) во етиопатогенезата на лихен планус и РАС. Азот моноксидот, познатиот слободен радикал, кога е присутен со ниска концентрација има улога на медијатор во голем број на физиолошки и патофизиолошки процеси во организмот. Се синтетизира во клетките под дејство на специфични ензими NO синтази (NOS). Појдовно соединение за синтеза на азот моноксидот е амино киселината аргинин. За реакција на синтеза се потребни O_2 и NADPH + H^+. Притоа NADPH се оксидира и се добива NADP.



Создадениот NO има многу краток полуживот. Но, тоа не го намалува неговото значење во контролата на функциите на голем број на физиолошки системи. Најзначајните познати биолошки функции на NO се вазодилатација на крвните садови, спречување на агрегацијата на тробоцитите, неутротрансмисија и посре-

дување во бактерицидното дејство на макрофагите. Азот моноксидот делува и како слободен радикал бидејќи во својата структура има неспарени електрони. Овој податок укажува дека NO е особено реактивно соединение. Овој слободен радикал ја оштетува DNK и ензимите кои учествуваат во репарацијата на DNK. Исто така, NO реагира со металите, какви што се Zn и Fe, кои се присутни во хемопротеините и во ензимите. Тоа предизвикува инхибиција на одредени ензими, каква што е цитохром С-оксидазата. Како последица на инактивацијата на ензимот се намалува синтезата на ATP и доаѓа до смрт на клетката.

Нервните завршетоци се можни клеточни извори на саливарниот NO. Освен нервните завршетоци, NO потекнува и од клетките на плунковните жлезди и од макрофагите. Во плунката, кај пациентите со лихен планус и РАС, утврдена е зголемена концентрација на NO во споредба со контролната група на испитаници. Во саливарниот секрет кај овие пациенти е утврдена зголемена концентрација на кортизолот, што укажува на присуство на акутен психички стрес. Покрај другите фактори на ризик за настанување на овие орални заболувања и психичкиот стрес се поврзува со етиологијата на РАС и на лихен планус. Се претпоставува дека стресот предизвикува засилено ослободување на NO од нервните завршетоци.

Освен тоа, засиленото ослободување од NO кај лихен планус и РАС може да биде последица на влијанието на одделни медијатори на инфламацијата и на имунолошкиот одговор, какви што се цитокините. Вистинската улога на NO во плунката се уште не е доволно разјаснета. Истражувањата спроведени на култура од клетки, покажуваат дека NO предизвикува сериозни оштетувања на фибробластите, кератиноцитите и на оралните епителни клетки.

Оралната кандидијаза претставува инфективно заболување на оралната мукоза предизвикано од Candida albicans. Оваа габичка спаѓа во групата на патогени микроорганизми кои предизвикуваат локална и системска инфекција кај имуноком-промитирани индивидуи. Предуслов за настанување на оралната кандидијаза е адхезија на Candida albicans на површината на епителните клетки на оралната мукоза. Адхезијата, како и растот и размножувањето на овој патоген во оралната средина локално е регулирано не само од саливарните фагоцити, туку и од самата плунка, односно нејзините антимикробни пептиди и протеини, како што се: sIgA, секреторната компонента, муцинот, лизозимот, трансферинот, лактоферинот, хистатинот и дифензинот. Овие пептиди и протеини вршат супресија на растот и размножувањето на Candida albicans во оралната средина, и го спречуваат нејзино врзување за епителните клетки на оралната мукоза. Во одделни истражувања се испитувани овие пептиди кај индивидуи со орална кандидијаза. Утврдено е намалено количество на лактоферин, sIgA, α-дефензин-1 и β-дефензин-2 во плунката на болните во споредба со испитаниците од контролната група. Авторите на овие испитувања дошле до заклучок дека оралната кандидијаза е асоцирана со хипофункцијата на плунковните жлезди. Исто така, заклучуваат дека намалувањето на антимикробните саливарни пептиди го овозможуваат растот и развојот на Candida albicans во оралната средина.

2 КОРИСТЕЊЕ НА ПЛУНКАТА КАКО ДИЈАГНОСТИЧКИ МЕДИУМ ВО МЕДИЦИНАТА

Можности за користење на плунката во дијагностицирање на инфективните заболувања
Можности за користење на плунката како биолошки материјал во дијагностицирање на автоимуни заболувања
Можности за користење на плунката како биолошки материјал во мониторингот на хормонскиот состав
Можности за користење на плунката како биолошки материјал во мониторингот на лекови, дрога и токсини

Плунката се повеќе служи како биолошки материјал кој придонесува во поставување на дијагнозата и разјаснување на патогенезата на голем број на системски заболувања, а се со цел воведување на нови дијагностички тестови. Во последните декади на минатиот век, како и во првата декада на новиот милениум објавени се голем број на научно-истражувачки трудови во кои се утврдува валидноста на користењето на плунката како можна дијагностичка течност, односно за алтернативен биолошки материјал на крвниот серум. Авторите на голем број на трудови кои се занимаваат со проучувањето на плунката,популарно ја нарекуваат "огледало на општата здравствена состојба на организмот". Оваа констатација е поткрепена со тоа што плунката е одраз на:

- нивото на голем број на природни супстанци и различни соединенија во крвта кои се користат во тераписки цели (лекови) или пак се конзумираат без контрола на лекарот за постигнување на "психичка благостостојба" (дроги), односно добра физичка кондиција ("допинг средства", анаболици),
- хормонскиот статус,
- имунолошкиот статус,
- невролошкиот статус и
- нутритивниот односно метаболичкиот статус.

Голем број на истражувања се базираат на проценката на валидноста на користењето на плунката како биолошки материјал со цел да се дијагностицираат голем број на системски заболувања.

Можности за користење на плунката во дијагностицирање на инфективните заболувања

Крвниот серум и крвната плазма претставуваат примероци на биолошки материјал и се користат за широк спектар на серолошки тестови. Но, постапката на земање на крв кај пациентите е поврзана со различни проблеми:

- болка или нелагодност на пациентот во текот на постапката наречена венепункција;
- можност од трансмисија од различни инфективни агенси (HBV, HCV, HDV, HIV, CMV, T. palidum);
- релативно скапа опрема и инструменти за венепункцијата, за собирање на крвта и за постапката за одделување на серумот по пат на центрифугирање;

Поради наведените причини во последниве години се повеќе се бара замена за крвта, односно друг биолошки материјал, чие земање би било неинвазивно. Другиот биолошки материјал би требало да ги исклучи сите негативни фактори кои се поврзани со крвта, како биолошки материјал. Исто така, потребно е тој да има подеднаква валидност за регистрирање на различни параметри. Таков еден примерок на биолошки материјал, секако може да биде плунката бидејќи содржи сигнификантни концентрации на антитела, специфични кон инфективните агенси со кои организмот на домаќинот бил во контакт.

Некои составни компоненти на плунката се претставници на неспецифичната хуморална заштита (лактоферин, лизозим, муцин, пероксидаза, систем на комплементот и т.н.). Во плунката е докажано присуство и на некои цитокини (TNF), како и β_2 макроглобулин.

Потеклото на одделните класи на имуноглобулините во плунката е различно. Некои од класите на имуноглобулините воглавно потекнуваат од крвната плазма и преку гингивалната течност пристигнуваат во оралната празнина. Други, пак, класи на имуноглобулини влегуваат во состав на секретот на плунковните жлезди. Подолго време се поставувало прашањето на потеклото на саливарниот IgA кој претставува прва линија на специфична хуморална одбрана на мукозата. Дефинитивно е утврдено дека почетокот на лимфобластната трансформација на В-лимфоцитите се случува во Паеровите плочи на гастроинтестиналниот тракт. Но, трансформацијата на В-лимфоцитите се случува и во други ткива кои имаат слична функција. Завршната фаза од синтезата од секреторниот имуноглобулин А се одвива во плунковните жлезди. Таму овие антитела поминувајќи низ епителните клетки на ацинусите се здобиваат со секреторна компонента. Понатаму, како комплетирана молекула на sIgA, заедно со останатите саливарни компоненти, се транспортира преку саливарните дуктуси во оралната празнина. Изотиповите на антителата од класата на IgG и IgM во оралната празина пристигнуваат по пат на дифузија низ епителните клетки на гингивалниот сулкус. Меѓутоа, во некои понови истражувања утврдено е дека се присутни и секреторни, мономерни антитела на класта IgM, која е претставена со околу 10% од вкупното количество на овој имуноглобулин. Произлегува дека присуството на антителата од класата IgM во мешаната плунка е резултат на нивната дифузија од крвната плазма низ епителот на гингивалниот сулкус, но и резултат на нивна локална синтеза.

Концентрацијата на IgA, IgG и IgM во еден мililитар на нестимулирана плунка изнесува 0,19 mg, 0,014 mg и 0,002 mg. Овие концентрации одговараат на 1/10, 1/80 и 1/400 од нивниот серумски титар. За докажување на антителата од класите на IgM, IgG и IgA се користи нестимулирана плунка која се излачува во текот на поголемиот дел од денот и најверодостојно ја отсликува вредноста на концентрацијата на нејзините составни компоненти. Стимулираната плунка (која се излачува како последица на механичка, густативна и психичка стимулација) содржи поголемо количество на вода, а тоа предизвикува разредување на саливарните составни компоненти. Тоа е причината за добивање на лажно-негативни резултати при истражувањата кои се вршат во стимулираната салива.

Со воведувањето на субституентите, крвниот серум за серолошка дијагностика на инфективни заболувања, се појавил проблем на примената на соодветни тестови за детекција на специфични антитела во тие биолошки материјали. Серолошките тестови кои се користат треба да бидат многу специфични и чувствителни. Со нив не само што се докажува присуството на антитела кон некои инфективни агенси, туку треба да се изврши и нивна егзактна квантификација. Првите истражувања во кои се испитувале саливарните имуноглобулини биле базирани на две претпоставки кои се покажале како неточни. Првата претпоставка се однесува на тоа дека во плунката е присутен само IgA, а тоа плунката ја квалификува како несоодветен примерок за лабораториска дијагнос-

тика на инфективните болести. Со другата претпоставка се барало задолжително центрифугирање на плунката за докажување на одделни компоненти на плунката, па и докажување на антитела.

Како што беше споменато, во плунката се присутни и изотиповите на антитела IgG и IgM, кои воглавно потекнуваат од сулкусната течност. Докажувањето на присуството и одредувањето на концентрацијата на овие имуноглобулини и на IgA во плунката може да се користи како маркер на активноста на HIV инфекцијата кај новороденчиња или како маркер на имунитетот наспроти некои вируси (рота вирус, полио вирус, рино вирус). Втората претпоставка која се однесувала на концентрацијата на плунката, исто така се покажала како неточна заради подобрувањето на чувствителноста и специфичноста на користените течности.

Во почетокот на осумдесетите години од минатиот век започна воведувањето на имуиноензимските (ELISA) тестови во рутинската лабораториска дијагностика. Во почетокот тестовите кои секојдневно се користеле за серодијагностика на инфективните болести немале задоволителен степен на сензитивност и специфичност при користењето на плунката како биолошки материјал. Така, Archibald во 1984 година ја споредувал концентрацијата на анти HIV антителата во серумот и во плунката користејќи ја Western blot техниката. Во испитувањето било вклучено докажувањето на анти HIV IgG антителата, но резултатите не биле задоволителни. Незадоволителните разултати се толкувале со ниската концентрација на имуноглобулините во плунката и неможноста на нивното откривање со стандардни серолошки техники кои во тоа време рутински се користеле. Меѓутоа, со тек на време се подобрила нивната сензитивност и специфичност. Споредувајќи ги резултатите добиени со изолација на Herpes simplex вирусот (HSV) од култура на клетки со резултатите добиени по пат на регистрација на вирусните антигени со помош на ELISA тестот кај 457 примероци на плунка, Land и соработниците утврдиле висок степен на корелација помеѓу резултатите добиени со овие две методи. И во други истражувања се добиени резултати кои што биле охрабрувачки. Parry и соработниците во своите истражувања користеле ELISA тест и RIA (Radio imuno esey) за да во пралелните примероци на салива и серум ги регистрираат специфичните антитела наспроти вирусот на хепатит А (HAV), HIV и HBs вирусот. Притоа, помеѓу добиените вредности на концентрацијата на антителата во серум и салива со помош на ELISA тестот бил присутен висок степен на корелација за разлика од резултатите добиени со користење на RIA. Martines споредувајќи ги наодите на специфичните антитела кон HIV во примероците на плунка и на серум, исто така докажал висока специфичност и сензитивност на имуноензимскиот тест при користење на плунката како биолошки материјал. Слични резултати добил и Holmstron. При испитувањето на специфичните антитела кон HIV во 36 примероци на плунка регистрирал само само 1 лажно-негативен разултат, споредувајќи ги со резултатите добиени при користењето на серумот како биолошки материјал.

Во иднина развојот на методите за користење на плунката како неинвазивен материјал треба да биде насочено кон подобрување на чувствителноста и специфичноста на серолошките течности. Со тоа би се подобрил квалитетот на дијагнозата на инфективните заболувања. Со усовршувањето на методите би се овозможило детектирање на маркери на раната, примарната инфекција односно IgM антителата.

Освен тоа, усовршувањето на методите на користењето на плунката како биолошки материјал треба да се насочат кон дизајнирање на едноставни и сигурни серолошки тестови кои на лекарите би им овозможиле добивање на резултати и вон дијагностичката лабораторија.

Можности за користење на плунката како биолошки материјал во дијагностицирање на автоимуни заболувања

Плунката може да се користи и за дијагностицирање на автоимуни заболувања. Едно од тие автоимуните заболувања, каде плунката може да се користи како алтернатива на крвната плазма, е Сјогрен-овиот синдром. Ова заболување се карактеризира со сув коњуктивитис, ксеростомија, како и лимфоцитна инфилтрација на солзните и плунковните жлезди. Кај ова заболување значително е редуцирано лачењето на плунка, па затоа се мери количината на излачената плунка (сијалометрија). Покрај тоа, за поставување на дијагноза на Сјогрен-овиот синдром потребно е да се анализира и натриумот, хлоридите, калциумот, фосфатите, уреата, амилазата, лактоферинот, муцинот, вкупните протеини, pH вредноста, пуферскиот капацитет, бројот на лактобацилите и габичките. Најновите научно-истражувачки трудови укажуваат и на промена на концентрацијата на некои цитокини во плунката на испитаниците со ова автоимуно заболување. Резултатите од овие истражувања укажуваат дека значително е зголемено нивото на саливарниот Il-2 и Il-6 кај заболените во споредба со контролната група. Серолошките тестови на плунката можат да откријат специфични автоантитела (антинуклеарен фактор, ревматоиден фактор, антинуклеарни антитела SS-A (Ro) и SS-B).

Можности за користење на плунката како биолошки материјал во мониторингот на хормонскиот состав

Во плунката се присутни голем број на хормони, а нивната анализа може да се користи за анализирање и следење на хормонскиот статус.

Катехоламините во плунката се откриени во концентрација од 250-800 pg/mL. Во плунката катехоламините пристигнуваат од крвната плазма или пак потекнуваат од симпатичките нерви на плунковните жлезди. Поради тоа нивната концентрација во плунката е незначителна во споредба со концентрацијата на катехоламините во крвната плазма.

Присуството на стероидните хормони (минералокортикостероиди, гликокортикостероиди и полови хормони) во плунката е детектирано уште во 1966 година. Присутна е значително добра корелација на концентрацијата на овие хормони во плунката и во крвната плазма. Тоа се должи на транспортот на стероидните хормони од крвната плазма во плунковниот секрет. Имено, транспортот на стероидните хормони се одвива по пат на проста дифузија, а тоа е овозможено благодарение на нивната липофилност. Транспортот на стероидните хормони од крвната плазма во

плунката се одвива десет пати побрзо од брзината на лачењето на плунката. Заради простата дифузија на стероидните хормони, нивната концентрација во плунката не зависи од брзината на лачење на плунката. Концентрацијата на овие хормони е иста и во стимулираната и во нестимулираната плунка, а тоа не е случај со другите составни компоненти на саливарниот секрет. Предноста на анализирањето на стероидните хормони во плунката во споредба со нивната анализа во крвната плазма е и во тоа што во саливарниот секрет е присутна само нивната слободна (неврзана) фракција. Поради тоа, нивната концентрација во плунката е верна слика на метаболички активната фракција на стероидните хормони во крвната плазма. Со анализата на стероидните хормони во крвната плазма се добива вкупната концентрација и на врзаната и на неврзаната фракција на овие хормони. Мониторингот на стероидните хормони во плунката веќе не е предмет само на експериментални истражувања, туку се користи и како рутинска постапка во секојдневната клиничка пракса. Денеска постојат готови фабрички китови за детекција на овие хормони на саливарниот секрет. Еден таков кит е Hormone Profile Test Kit, 5Hormones 2RT Labs Saliva, кој овозможува истовремено одредување на естрогенот, тестостеронот, прогестеронот, DHEA-S и кортизолот.

Слика 2.1: Комерцијални китови за одредување на хормони во плунка

Еден друг тест, Evalu8 Personal Hormone Assessment Kit-Saliva Hormone Test by Lifeflo, овозможува одредување на естрадиол, естриол, етрон, прогестерон, дихидротестостерон, андростенанидион, тестостерон, DHEA-S, кортизол и нелатонин (слика 2.1).

Концентрацијата на саливарниот кортизол се користи во клиничката пракса за следење на Кушинг-овиот синдром. Концентрацијата на кортизолот во плунката е сигурен маркер на нивото на емотивниот стрес. Нивото на саливарниот кортизол, како и во крвната плазма, покажува дневни варијации, а се движи од 15 nmol/L во утринските часови до 3 nmol/L во вечерните часови. Концентрацијата на саливарниот алдостерон е во корелација со неговата концентрација во крвната плазма. Анализата на плунката може да се искористи за дијагностика на примарниот алдостеронизам. Исто така и тестостеронот се докажува во саливарниот секрет и утврдена е добра корелација на концентрацијата на овој хормон во плунката и во крвната плазма. Анализата на саливарниот тестостерон е значајна за проценка на тестикуларната функција. Женските полни хормони (естрадиол и прогестерон) исто така, се анализираат во плунката поради корелацијата на нивната концентрација во овој секрет со концентрацијата во крвната плазма.

Предноста на анализата на стероидните хормони во плунката се состои во лесната колекција на примерокот во неограничени количини. Исто така, колекцијата може да се изведе на било кое место (па и дома) и во било кое време. Земањето на примерок на крв на стероидните хормони е стресно за пациентот (особено за децата, старите и хендикепираните индивидуи). Познато е дека стресот влијае врз нивото на овие хормони, поради што се добиваат непрецизни резултати. Хормоните во плунката се извонредно стабилни, па примероците можата да се чуваат и на собна температура, една недела без значително намалување на нивната активност. Наспроти тоа, примероците на крвта се чуваат на многу ниски температури и секогаш постои можност од промена на активноста на хормоните. Конечно, со производството на готовите "кит-тестови", анализирањето на хормоните во плунката овозможува и нивна самоконтрола од страна на пациентот и без доаѓање во здравствената установа.

Во плунката е докажано и присуство на хормон на растот во концентрација од 8,6±11,1 μU/L. Оваа концентрација е од 100-1000 пати помала отколку во крвниот серум. Исто така докажано е дека постои линеарна корелација помеѓу серумското и саливарното ниво на хормонот на раст. Тоа укажува дека постои пасивна дифузија на овој хормон од крвта во плунката.

Останати хормони кои се откриени во плунката се: пролактин, мелатонин и инсулин. Концентрацијата на мелатонинот во плунката е во корелација со неговата концентрација во крвната плазма. Исто така, утврдена е позитивна корелација помеѓу саливарната концентрација на инсулинот и неговата концетрација во крвната плазма во текот на гликозо-толеранс тестот.

Можности за користење на плунката како биолошки материјал во мониторингот на лекови, дрога и токсини

Голем број на лекови и дроги, како и нивните метаболити се присутни во плунката. На табелата 2.1. се претставени лековите и дрогите кои можата да се анализираат во саливарниот секрет.

Параметар	
Дрога	Алкохол, амфетамини, баритурати, бензодиазепини, кокаин, LSD, марихуана, никотин, опијати
Токсини од окружување	Кадмиум, олово, жива
Лекови	Антипирин, карбамазепин, ципрофлоксацин, иринотекан, литиум метотрексат, фенитоин, фенобарбитал, теофилин

Табела 2.1: Дроги, лекови и токсини кои се анализираат во плунката.

Плунката претставува примерок на биолошки материјал за тераписко одредување на лекови и дроги, како и за фармакокинетички и фармакодинамички студии. Првите истражувања започнале уште пред 20 години, со анализирање на литиум и антиконвулзивни медикаменти во плунката. Лековите и дрогите во плунката пристигнуваат од крвта. Факторите од кои зависи транспортот на дрогите и лековите во плунката се: молекулската маса, липосолубилноста, pK, pH на плунката и брзината на лачење на плунката. Исто така, значаен фактор е и тоа дали дрогите и лековите се присутни во врзан или неврзан облик во крвта, како и константноста на соодносот на нивното ниво во крвта и во плунката. Дрогите и лековите во крвната плазма воглавно се врзани за транспортни протеини. Еден помал дел од дрогите и лековите се присутни како слободна фракција и токму оваа фракција ја претставува фармаколошки активната форма. Од плунката во крвната плазма, со проста дифузија, пристигнува само оваа активна фракција. Поради тоа, нивото на саливар-ните дроги и лекови е попрецизен показател на нивниот статус во организмот отколку вкупната концентрација во крвната плазма.

Слика 2.2: Комерцијални китови за одредување на дрога во плунката

Анализата на дрогите во плунката придонесува да се согледа статусот на внесената дрога и во квалитативна и во квантитативна насока. Оралниот начин на земање на дрога (вшмркување или пушење) предизвикува контаминација на оралната средина. Концентрацијата на дрогата во плунката е одраз на концентрацијата на слободната-неврзаната фракција на дрогата во крвта, бидејќи постои добра корелација на нивната концентрација во крвта и во плунката. Произведени се фабрички китови за одредување на повеќе видови на дрога во плунката. Saliva Confirm Multi-drug Saliva Test овозможува детекција на марихуана, кокаин, опијати и метаамфетамин. Test Saliva (Oral fluid) Multi-drug Screen Test Kit (6drugs) овозможува одредување на марихуана, метаамфетамин, амфетамин, опијати, кокаин и феноциклидин (слика 2.2).

Користењето на плунката како дијагностичка течност има одредени предности, но и недостатоци. Една од најголемите предности на плунката во споредба со крвта е што нејзината колекција е без последици на трауматично искуство кое е присутно при венепункцијата. Собирањето на плунката е многу едноставно, не се потребни посебни инструменти и обучен кадар. Треба да се истакне дека можноста на трансмисија на инфективни агенси со плунката значително се намалува. Таа претставува идеален примерок од аспект на епидемиолошки студии со кои се опфаќа вонболничка популација. Исто така, возможно е повеќекратно земање на плунката и тоа во неограничени количини. 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, заради присуството на мукополисахаридите и мукопротеините. Тоа може да ја попречува аналитичката процедура. Невозможно е или многу тешко е да се земе плунка кај пациенти кои заради различни причини имаат намалено лачење на плунката.

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

Литература

Alaluusua S, Kleemola-Kujala E, Gronroos L, Evalahti M. Salivary caries-related tests as predictors of future caries increment in teenagers. A three-year longitudinal study. Oral Microbiol Immunol 1990; 5:77-81.

Aps JKM, Martens LC. Review: The physology of saliva and transfer of drugs into saliva. Forensic Sci Internat 2005;I50:119-131

Aquirre A. Sialochemistry: a diagnostic tool? Crit Oral Biol Med 1993; 4:343-51.

Archibald DW, Zon LI, Gropman JE. Salivary antibodies as a means of detecting human T cell lymphotropic virus type III/ lymphadenopathy associated virus infection. J Clin Microbiol 1986; 24:873-5.

Archibald DW, Zon LI, Ygropman JE. Salivary antibodies as a means of detecting human T cell lymphotropic virus type III- lymphoadenopathy-associeted virus infection. J Clin Microbiol 1986; 24:873-857

Batino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. J Clin Periodontol 2002; 29:189-94.

Brajović G, Stefanović G. Immunoglobulins in gingival fluid ans saliva in reference to the degree of gingival inflamation. 9th Congress of the Balkan Stomatological Society. Ohrid; 2004.

Brandtzaeg P, Fjellanger I, Gjuruldsen ST. Human secretory immunoglobulins I. Salivary secrections in from individuals with normal or law levels of serum immunoglobulins. Scand J haematol 1970; 12 (Suppl): 1-83

Brandtzaeg P. Human secretory immunoglobulins II. . Salivary secrections in from individuals with normal or law levels of serum immunoglobulins. Clin Exp Immunol 1971; 8:66-70

Broock GR, Butterworth CJ,Matthews JB, Chapple ILC. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. J Clin Periodontol 2004; 31:515-21.

Cesco RT, Ito IY, Albuquerque RF. Levels of aspartate aminotransferase (AST) in saliva of patients with different periodontal conditions. J Clin Periodontol 2003; 30:752-5.

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

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva speciment: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. Clin Chim Acta 2007; 383:39-40

Crepin P, Audry L, Rotivel Y, Gacoin A, Caroff C, Bourhy H. Intravitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1998; 8:1117-21.

Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal disease. Clin Oral Investig 2003; 7:103-7.

Dodds MWJ, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva-a rew. J Dent 2004; 12:1-11

Drynner IG. Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. Forensic Sci Internat 2005;I50:133-142

Dubayova K, Kusnir J. Problems and perspectives of wider use of saliva for diagnostic purpose. Bratisl Lek Listy 1996; 5:304-7.

FDI Working Group 10 CORE. Saliva: Its role in health and disease. Int Dent J 1992; 42:291-304.

Garito ML, Prihoda TJ, McManus LM. Salivary PAF levels correlate with the severity of periodontal inflammation. J Dent Res 1995; 74:1048-56.

Grant RM, Piwowar EM, Katongole-Mbidde. Comparison of saliva and serum for human immunodeficiency virus type 1 antibody testing in Uganda using a rapid recombinant assay. Clin Diag Laboratory Immunol 1996; 8:640-4.

Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanism in carcinogenesis. Br Med Bull 1993; 49:523-44.

Haegewald SJ. Salivary IgA in response to periodontal treatment. Eur J Oral Sci 2003; 111:203-8.

Hall AF, Creanor SL, Strang R, Foye R. Determination of plaque pH changes within the trough of an in situ appliance used to study mineral changes in early carious lesions. Caries Res 1997; 31:50-4.

Henskens YM, van den Keibus PA, Veerman EC, et al. Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatin, albumin, amylase and IgA. J Periodontol Res 1996; 31:57-65.

Henskens YM, van derWeiden FA, van den Keibus PA, et al. Effect of periodontal treatment on the protein composition of whole and parotid saliva. J Periodontol 1996; 67:205-12.

Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz CJ. Biological factors in dental caries: Role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization. Clin Pediatr Dent 2003; 28:47-52.

Hofman LF. Human saliva as a diagnostic specimen. J Nutr 2001;131:1621-5.

Holmareion P, Synjianen S, Suni J. HIV antibodies in whole saliva detected by ELISA and Western lbod assays. J Med Virol 1990; 723:245-248

Holmstrom P, Synjianen S, Laine B, Valle SL, Suni J. HIV antibodies in whole saliva detected by ELISA and Western blot assays. J Med Virol 1990; 732:245-8.

Houte J. Microbiological predictors of caries risk. Adv Dent Res 1993; 7:87-96.

Jentsch H, Sievert Y, Gocke R. Lactoferrin and othermarkers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment. J Clin Periodontol 2004; 31:511-4.

Karin M. Saliva as an analytical tool in toxicology. International Journal of Drug Testing 2000; 1-33.

Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. J Clin Periodontol 2000; 27:453-65.

Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva-a review. Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13 (2):197-212

Lac G. Saliva assayes in clinical and research biology. Pathol Biol 2001; 49:660-7

Lamster IB, Kaufman E, Grbic JT, Winston LJ, Singer RE. Betaglucuronidase activity in saliva: relationship to clinical periodontal parameters. J Periodontol 2003; 74:353-9.

Land SA, Skurrie IJ, Gilbert GL. Rapid diagnosis of HSV infection by enzyme inked immunoabsorbent assay. J Clin Microbiol 1984; 19 (6): 865-869

Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: Noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. J CanDent Assoc 2002; 68:170-4.

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

Liao PH, Chang YC, Huang MF, Tai KW, Chou MY. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as molecular marker for oral squamous cell carcinomas. Oral Oncology 2000; 5:272-6.

Lucht E, Brytting M, Bjerregaard L, Julander I, Linde A. Shedding of cytomegalovirus and herpes viruses 6, 7, and 8 in saliva of human immunodeficiency virus type 1-infected patients and healthy controls. Clin Infect Dis 1998; 8:137-41.

Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. Br Med J 1992; 305: 207-8.

Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. Br Med J 1992; 305:207-8

Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. J Oral Pathol Med 1990;3:119-25

Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. J Oral Pathol Med 1990; 3:119-25.

Mandić B, Todorović T. Antioxidant status in oral cancer patients. Oral Oncology 2002; 8:38-42.

Martinez P, Ortez de Lejarazy R, Eiros JM, Perlodo E, Flores E. Comparation of two assays for detection of HIV antibodies in saliva. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 732:330-6.

Martinez P, Ortez de Lejarazy R, Eiros JM, Perlodo E, Flores E. Comparation of two assayes for detection of HIV antibodies in saliva. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 723:330-336

Messer LB. Assesing caries risk in children. Australian Dental Journal 2000; 45:10-6.

Mirković S. Elektroforetsko ispitivanje proteina humane pljuvačke [doktorska disertacija]. Beograd: Stomatološki fakultet; 1987.

Mizukawa N, Sugiyjama K, Ueno T,Mishima K, Tagaki S, Sugahara T. Levels of human defensin-1 an antimicrobial peptide in saliva of patients with oral inflammation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endot 1999; 87:539-43.

Moore S, Calder KA,Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. Free Radic Res 1994; 21:417-25.

Mortimer P, Parry JV. Non-invasive virological diagnosis: are saliva and urine specimens adequate substitutes for blood? Rev Med Virol 1991; 1:73-8.

Nagler MR, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. Free Radic Biol and Med 2002; 32:268-77.

Nishainan P, Aziz N, Chung J, Detels R, Fahej JL. Oral fluids as an alternative to serum for measurement of markers of immune status. Clinical and Diagnostic Immunology 1998; 5:507-12.

Nishainan P, Aziz N, Chung J, Detels R. Oral fluids as an alternative to serum for measurement of markers of immune status. Annals Of The New York Academy of Science 1987; 449:332-334

Numabe Y,Hisano A, Kamoi K, Yoshie H, Ito K, KuriharaH. Analysis of saliva for periodontal diagnosis andmonitoring. Dentistry in Japan 2004; 40:115-9.

OzmericN. Advances in periodontal disease markers. Clinica Chimica Acta 2004; 343:1-16.

Parry JV, Parry KR, Mortimer PP. Sensitive assay for viral antibodies in saliva an alternative to test on serum. The Lancet 1987; 11:72-76

Parry JV, Perry KR,Mortimer PP. Sensitive assay for viral antibodies in saliva an alternative to test on serum. The Lancet 1987; 33: 72-6.

Pavlica D, Todorović T. Pljuvačka – dijagnostička tečnost? SGS 2001; 48:137-41.

Pavlica D. Lokalni i sistemski humoralni imunski status kod pacijenata sa herpes simplex virusnominfekcijomorofaringealne regije [doktorska disertacija]. Beograd: Medicinski fakultet; 2000.

Pederson AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste mastication, swallowind and digestion. Oral Dis 2002; 8:117-129

Ramos J, Arce AY, Santos SI,Morones M,Mendoza J. Antigens and antibodies for HIV type 1 in serum, saliva and gingival fluid in patients with advanced disease [abstract]. Int Conf AIDS; 1994 Aug 7-12.

Rantonen P. Salivary flow and composition in healthy and diseased adults. Helsinki: Disseration; 2003.

Reznic AZ, Klein I, Eiserich JP, Kross EC,NaglerMR. Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke in vivo and in vitro studies. Free Radical Biology and Medicine 2003; 34:377-84.

Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. Arch Oral Biol 2007;52 (12):1114-1135

Sculley DV, Langley-Evans SC. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. Clinical Science 2003; 105:167-72.

Shellis RP, Dibdin GH. Analysis of the buffering systems in dental plaque. J Dent Res 1988; 672:438-46.

Sreebny LM. Saliva in health and disease: an approach and update. Int Dent J 2000; 3:140-61.

Stefanović G, Brajović G, Milošević-Jovčić N, Ilić V, Ćirić D. Immunoglobuline glycoforms in gingival fluid and saliva in periodontal disease. 9th Congress of the Balkan Stomatological Society. Ohrid; 2004.

Stefanović G, Ilić V, Ćirić D,Milošević-Jovčić N . DotBlot assay for quantitative measurement of human salivary IgG subclasses. 7th Congress of the Balkan Stomatological Society. Kushadasi; 2002.

Stefanović G,Milošević-Jovčić N, Ilić V, Ćirić D. Subclasses of salivary IgG. 6th Congress of the Balkan Stomatological Society. Bucharest; 2001.

Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. Oral Diseases 2002; 8:69-76.

Streckfus EF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. Oral Dis 2002; 8:69-76

Todorocic T, Dozic I. Pljuvacka i oralno zdravje. I izdanje. Zavod za ucbeniki, Beograd 2009

Todorovic T, Dozic I, Pavlica D, Markovic D. Brajovic G, Stefanovic G et all. Pljuvacka kao dijagnosticka tesnost u stomatologiji. Srp Arh Celok Lek 2005; 133 (7-8): 372-8

Todorović T, Jović P. Salivary malondialdehyde as amarker of periodontal disease. 6th Congress of the Balkan Stomatological Society. Bucharest; 2001.

Todorović T, Ljušković B, Jović P, Pejović J. Enzimi pljuvačke – mogući biohemijski markeri oboljenja parodontalnih tkiva. SGS 1999; 46:7-14.

Todorovic T. Oralna biohemija. II izdanje. Cigora stampa, Beograd 2006

Uitto VJ, Nieminen A, Coil J, Hurttia H, Larjava H. Oral fluid elastase as an indicator of periodontal health. J Clin Periodontol 1996; 23:30-7.

Vehkalahti M, Nikula-Sarakorpi E, Paunio I. Evaluation of salivary tests and dental status in the prediction of caries increment in caries susceptible teenagers. Caries Res 1996; 3:22-8.

Vulović M, Carević M, Ivanović M. Dijagnostika rizika za pojavu oralnih oboljenja. SGS 1993; 40:28-40.

Wong D. Salivary diagnostics. Wiley-Blackwell, 2008

Zappacosta B, Persichilli S, De Sole P, Mordente A, Giardina B. Effect of smoking one cigarette on antioxidant metabolites in the saliva of healthy smokers. Arch Oral Biol 1999; 44:485-8.