СЛЮНКата КАТО ОСНОВЕН БИОЛОГИЧЕН МАРКЕР

Христиана Маджова

Катедра по консервативно зъболечение и орална патология,
Факултет по дентална медицина, Медицински университет - Варна

SALIVA AS A PRIMARY BIOLOGICAL MARKER

Christiana Madjova

Department of Conservative Dental Treatment and Oral Pathology,
Faculty of Dental Medicine, Medical University of Varna

Въведение: Слюнката е основната биологична орална среда, в която се осъществяват процесите в устната кухина. Наличието ѝ има роля за поддържане на здрави орални тъкани и защита на зъбните тъкани.

Цел: Целта е да се направи актуален прочит на проучванията на български и чужди автори и да се обобщят данните от научната литература и от собствени проучвания, с оглед разкриване на клиничния потенциал на слюнката за пълноценното ѝ използване.

Материал и методи: В Google scholar, Web of Science, PubMed, Scopus и Science direct е проведено търсене за период от 31 години. Ключови думи: слюнка, изследвания, биологичен маркер, орално здраве.

Резултати: Слюнката има редица преимущества – едно от най-големите е наличието в нея на вещества, които постъпват от гингивалната течност и от локалното кръвоснабдяване на слюнчените жлези и затова промените в нейните компоненти са пропорционални на тези в кръвния серум. Тя е най-достъпният и неинвазивен биофлуид на човешкото тяло. Слюнката предлага много предимства като диагностична течност – лесно може да се събере, не е необходимо специално устройство или апарат и съдържа компоненти от серума.

Заклучение: Слюнката има клиничен потенциал за пълноценното ѝ използване в много области на медицината. Това е бъдещото развитие на денталната наука - в добрия синхрон и съдействие между нея и медицината. Така ще се подобри не само оралното, но и общото здраве на хората.

Background: Saliva is the main biological oral environment in which the oral cavity processes take place. Its presence has a role in maintaining healthy oral tissues and protecting dental tissues.

Aim: The aim is to make an up-to-date reading of the studies of Bulgarian and foreign authors and to summarize the data from scientific literature and from own researches in order to reveal the clinical potential of saliva for its full use.

Materials and Methods: In Google scholar, Web of Science, PubMed, Scopus and ScienceDirect a search is conducted for a period of 31 years. The keywords are: „saliva“, „research“, „biological marker“, „oral health“.

Results: Saliva has many advantages - one of the largest is the presence therein of substances that come from the gingival fluid, and the local blood flow of the salivary glands. Therefore changes in its components are proportional to those in the blood serum. It is the most affordable and non-invasive biofluid the human body. Saliva offers many advantages as a diagnostic fluid - it can easily be assembled, no special device or device is required and it contains serum components.

Conclusion: Saliva has clinical potential for its full use in many areas of medicine. This is the future development of dental science - good synergy and cooperation between it and medicine. This will improve not only the oral but also the general health of the people.

Ключови думи: слюнка, биологичен маркер, изследвания, орална патология, орално здраве

Keywords: saliva, biological marker, research, oral pathology, oral health

ВЪВЕДЕНИЕ

Слюнката е основната биологична орална среда, в която се осъществяват процесите в устната кухина. Тя е най-достъпният и неинвазивен биофлуид на човешкото тяло (6). Слюнката има изключително значение за поддържането на добро орално здраве – както на твърдите зъбни тъкани, така и на меките тъкани (мукозата). Слюнката предлага много предимства пред серума и кръвта като диагностична течност – лесно може да се събере, не е необходимо специално устройство или апарат и съдържа компоненти от серума (4). Редица биологични показатели могат да бъдат изследвани чрез слюнката. Себестойността на проучването е ниска, тъй като изследваните сами отделят пробите (5).

Статията представя резултатите от литературен обзор и данни от собствени изследвания. Целта е да се направи актуален прочит на проучванията на български и чужди автори и обобща данните от научната литература с оглед разкриване на клиничния потенциал на слюнката за пълноценното ѝ използване.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В Google scholar, Web of Science, PubMed, Scopus и Science direct е проведено търсене за период от 31 години. Ключовите думи са: „слюнка“, „изследвания“, „биологичен маркер“, „орално здраве“. Научните статии са селектирани по заглавие, година на излизане на научния труд, микробиологични методи на изследване, резултати и обсъждане. Включената литература е от избрани 18 статии на български и английски език.

РЕЗУЛТАТИ

Кисели храни или такива с високо захарно съдържание са забранени в деня на изследването, защото биха могли да компрометират изследването като понижат рН на слюнката и засилят бактериалния растеж. За да се минимизират тези фактори, устната кухина се изплаква с вода 10 мин преди събирането на материала.

1. Оценка на функцията на слюнните жлези:

1. Визуално определяне ниво на хидратация – Намаленото количество слюнка оказва влияние върху оралната патология. При пациенти с ксеростомия препоръчваме да дъвчат дъвки без захар (съдържащи ксилитол) и да се хидратират обилно; прием на течности по време на хранене, както и самото им ядене да е с висока хранителна стойност; да се избягва прием на полуфабрикати, нехранителни и сухи храни.
2. Определяне на консистенция (вискозитет) – Вискозитет се определя клинично визуално или с вискозиметър. Слюнката се събира в епруветка сутрин, 2 часа след нахранване. За отчитане на резултатите пациентите се формират в 3 групи: с нормална вискозност; средно изразена повишена вискозност и с повишена вискозност. Повишеният вискозитет на слюнката води до повишен риск от кариес. Понякога повишеният вискозитет се дължи на синусит, катарални инфекции на гърлото, гъбични заболявания, алергии, заболявания на устната кухина, заболявания на слюнчените жлези, заболявания на стомашно-чревния тракт, ендокринни заболявания или хормонални промени
3. Събиране на проби от нестимулирана смесена слюнка – Събирането на слюнката се прави обикновено сутрин на гладно между 9,30–11,30 часа; за 5 минути, по метода на плюенето, пациентите да не закусват в деня на изследването, по време на събирането на пробите да не говорят, за да се избегнат допълнителни стимули.
4. Количествено определяне на нивото на слюнчения поток
 - ♦ Измерване на количеството на нестимулирана слюнка – пациентът плюе през равни интервали в мерителна чашка в продължение на 5 минути. Приема се, че нормата за средно ко-

личество нестимулирана слюнка е 0,3 мл/мин.

- ♦ Измерване на количеството на стимулирана слюнка – пациентът трябва да дъвче парче восък в продължение на 5 минути и плюе на равни интервали в градуиран контейнер. Количеството се определя в mL и резултатът се определя като:

- ♦ много ниско количество на стимулирана слюнка – по-малко от 3,5mL
- ♦ ниско количество на стимулирана слюнка – 3,5–5,0mL
- ♦ нормално количество на стимулирана слюнка – над 5,0mL.

5. Интраорално определяне на pH на слюнка – за да се избегнат промени, се отчита непосредствено след събирането ѝ. Нормално pH на слюнката в покой се поддържа между 6,7 и 7,4. Тестът е с изключително прецизна индикация и много чувствителен. Използват се универсални pH-индикаторни лентички, а самото измерване е колориметрично определяне по скала на фирмата производител. Резултатите се получават след 15 секунди.

Фиг. 1. Оценка на pH на слюнка на пациент

- ♦ висока киселинност – 5,0–5,8
- ♦ умерена киселинност – 6,0–6,6
- ♦ нормална слюнка – 6,8–7,8.

6. Термометриране на слюнка - Определянето на температурата се прави in vitro, заедно с определяне на pH. Изследването е малко проучено и застъпено. Използва се дигитален pH метър с термосонда в неразредена нестимулирана слюнка (3).

7. Определяне на буферния капацитет на слюнка – използваме амбулаторен тест за оценка на количеството и качеството на слюнката – на системата на GC Saliva Check Buffer или лентички CRT® buffer - система на Ivoclar-Vivadent® (Фиг. 2 и Фиг. 3).

Фиг. 2. GS Saliva-Check BUFFER, GC EUROPE N.V. за оценка на количеството и качеството на слюнката (15)

Фиг. 3. CRT buffer test, Ivoclar-Vivadent® за оценка на качество и количество на слюнката (17)

При първия тест проба от слюнката на пациентите се поставя върху лентичката. Резултатите се изчисляват по цвятоскала: червено – 0 точки; червено-синьо – 1 точка; синьо – 2 точки; синьо-зелено – 3 точки и зелено – 4 точки. Всички точки се сумират и се отчита:

- ◇ 0-5 точки – много ниски буферни възможности;
- ◇ 6-9 точки – ниски буферни възможности;
- ◇ 10-12 точки – нормални/високи буферни възможности.

Вторият тест се отчита след 5 минути по фабрично зададената скала:

- ◇ При оцветяване в синьо – слюнката е с висок буферен капацитет;
- ◇ При оцветяване в зелено – слюнката е с междинен буферен капацитет;
- ◇ При оцветяване в жълто – слюнката е със слаба буферна способност.

II. Определяне на орален въглехидратен клирънс на обща смесена слюнка

Оралният въглехидратен клирънс на слюнката и рН се повлияват от наличието на зъбна плака. Въглехидратният клирънс на слюнката е строго индивидуален, варира в тесни граници и е константен за дълъг период от време (1). Определя се като се използват продукти, съдържащи глюкоза: разтвор (5% разтвор на захароза в дестилирана вода), таблетка или бисквита. Вземат се няколко поредни проби слюнка – една преди започване на изследването и 5 стойности след едноминутно използване на глюкозен продукт. Измерват се с индикаторни стандартни рН-ленти (7).

III. Оценка на кариесогенната микрофлора в слюнка

Използват се опростени микробиологични тестове - CRT®-bacteria (Ivoclar Vivadent) за определяне количествата на

Фиг. 4. CRT®-bacteria (Ivoclar Vivadent) (17)

Фиг. 5. Saliva-Check Mutans (GC Europe) (16)

Streptococcus Mutans и Lactobacilli; както и Saliva-Check Mutans (GC Europe) (Фиг. 4 и Фиг. 5).

При теста CRT®-bacteria проба от слюнката се накапва върху двете среди за култивиране съответно на M. Streptococci (зелена среда) и Lactobacilli (синя среда). След култивиране 48 ч. в термостат (на 37 C°), се отчита броят на колонии, като се сравняват със съответната находка.

Saliva-Check Mutans използва много специфичен имунохроматографски процес, който не зависи от растежа на бактериите, той открива селективно само видо-

Фиг. 6. Сухи тестове за нитрити (Dirui Industrial Co. Ltd)

вете *S.mutans*. Резултатите се получават за 15 минути, като не са необходими инкубатори или други устройства.

IV. Определяне на нитрати и нитрити в слюнка

В наши проучвания изследваме нитрити като използвахме сухи тестове (Dirui Industrial Co. Ltd) (Фиг. 6), а резултатите отчитаме апаратно и колориметрично. Освен наличие на негативна/позитивна реакция, определяме и степента на позитивност на нитритите след 60 секунди. Сензитивността на теста е между 13-22 $\mu\text{mol/L}$.

V. Изследване на вкуса – нарушен вкус за захароза (*dysgeusia*)

Нормалното вкусово усещане се дължи на нормалното състояние на вкусовия анализатор. Много често при пациенти, които имат гъбични инфекции, се наблюдава и промяна във вкуса. Изследването е органолептично и може да се извършва във всеки дентален кабинет чрез капков метод.

VI. Изследване на халитоза

В наши изследвания използваме специален апарат HC-212SF FitScan Breath Checker на Tanita Corporation of America, Inc. (Фиг. 7) за определяне наличието на халитоза при пациенти.

Фиг. 7. Апарат за определяне на халитоза – HC-212SF FitScan Breath Checker (Tanita Corporation of America, Inc.)

Тестът се базира на устройството, което определя количествено летливите серни съединения (сероводород (H_2S) и меркаптан (CH_3SH), както и диметилсулфит ($\text{CH}_3\text{-S-CH}_3$) и въглеродород от устата. Органолептична скала от 0 до 5 спомага за оценката на лошата миризма (Табл. 1) (8).

VII. Микробиологични изследвания на слюнка

Пробите се слюнка се събират сутрин между 9,30–11,30 часа, на гладно; след това се изпращат в клинична лаборатория. Ма-

Табл. 1. Органолептична скала за оценяване на халитозата

Код	Описание
0	Липса на лош дъх
1	Едва забележима миризма
2	Лека, но ясно забележима лоша миризма
3	Умерена лоша миризма
4	Силен лош дъх
5	Изключително силна халитоза

териалите се култивират върху кръвен и шоколадов агар, Мак Конки агар и среда на Сабуро. Инокулираните хранителни среди се инкубират за 24 часа на 35°C. Видовата идентификация на изолатите се извършва с помощта на полуавтоматизирана система BBL Crystal (Becton Dickinson) чрез използване на GB панели.

VIII. Изследване на биохимични параметри в слюнка

Слюнката се събира при еднакви условия – по едно и също време на деня, 2 часа след нахранване в стерилни епруветки за време от 5 минути, за да се стандартизират. В деня на изследването, пробите се центрофугират на 1500 x g – 3000 rpm за 15 мин.

1. Определяне на неорганичен калций и фосфор в смесена слюнка.

Слюнката се събира чрез плюене, като пробите се транспортират до биохимична лаборатория в хладилна чанта (4°–8°C). Последващата обработка е чрез центрофугиране за 10 минути на 12 000 оборота/мин. Полученият супернатант се изследва с автоматичен биохимичен анализатор.

2. Определяне на ензими в слюнка: α -амилаза, кисела и алкална фосфатаза.

Условията са същите като при изследването на калций и фосфор.

3. Изследване на цитозолни ензими в слюнка като маркери за клетъчно увреждане (AST, ALT, GGT, ALP, LDH)

Изследването на цитозолните ензими в слюнката става с помощта на биохимичен анализатор от типа Mindray BS-200 (Фиг. 8). Резултатите се изчисляват в U/L.

4. Изследване на имуноглобулини в слюнка: sIgA, Ig G и Ig M.

♦ Секреторен IgA – референтните стойности при здрави контроли е $120,01 \pm 10,43 \mu\text{g/ml}$

♦ Имуноглобулин G (IgG) – нормалните стойности на IgG са $50,4 \pm 40,4 \text{mg/l}$

♦ Имуноглобулин M (IgM) – референтните стойности са $24,0 \pm 23,8 \text{mg/l}$.

5. Изследване на глюкоза.

Изследването се прави сутрин, на гладно (след хранителна пауза от 8-10 часа). Пробите се центрофугират и глюкозата се определя в порцията супернатант.

ДИСКУСИЯ

Слюнката има редица преимущества – едно от най-големите е наличието в нея на вещества, които постъпват от гингивалната течност и от локалното кръвоснабдяване на слюнчените жлези и затова промените в нейните компоненти са пропорционални на тези в кръвния серум (2). Ролята на биомаркерите в диагностиката на заболяванията в устната кухина е голяма. Различни микроорганизми, техните продукти; имуновъзпалителни продукти, ензими от клетки, получени при разпад на съединителна тъкан и костна резорбция, могат да бъдат пародонтални маркери (9). За всички тези биомаркери се използва слюнка, гингивална кревикуларна течност, зъбна плака и серум. Смесената слюнка е предпочитан метод за изследване. Той е неинвазивен и създава по-малко дискомфорт на пациента.

За поддържане на здрави орални тъкани и защита на зъбните тъкани роля има наличието на слюнка. Тя действа като резервоар за възстановяването им. Деминерализацията на зъбната структура започва при понижаване на pH на слюнката. Микроорганизмите от зъбната плака застрашават твърдите зъбни тъкани, създавайки киселинна среда. Поддържането на наситеността на слюнката с калций и фосфат е благодарение на слюнчени протеини като пролин-богати протеини (PRPs) и статерин (10,12). Буферният капацитет на слюн-

ката е от основно значение за способността на слюнката да неутрализира киселини и основи.

Температурата на слюнката оказва влияние върху нивата на калция, фосфора, алкалната и киселата фосфатаза, титъра на *S. mutans* и *Lactobacillus* при кариес-активни и кариес-резистентни лица. Промени в биохимичния и микробиологичния състав се наблюдават при намалената температура на слюнката при лица с повишена кариозна активност. Изследванията показват, че се нарушава равновесието между реминерализационния и деминерализационния потенциал на слюнката (3).

При повишаване нивото на слюнчения поток се наблюдава тенденция към по-бързо отстраняване на въглехидратите от устата и към раздвижване на много финия биофилм, който покрива повърхностите на зъбите и устната лигавица, докато слабата секреция на слюнката често е съпроводена от ниска буферна способност и развитие на голямо количество *Str. mutans*. Киселинното pH на слюнката благоприятства деминерализацията на емайла. При пациенти, които имат множество кариозни лезии, изследванията на слюнката им показват $\text{pH} < 7$. Обратно, алкалното pH е благоприятно за отлагане на калциев фосфат, стимулирайки минерализацията на плаката. Тази среда е благоприятна и за протеолитичната активност на *Porphyromonas gingivalis*. Това предразполага развитие на пародонтално заболяване (18). При тези пациенти се установява и увеличен слюнчен поток (13).

Високият прием на захари, комбинирани често с ниските стойности на pH, водят до увеличение на броя на стрептококите (*S. mutans* и *S. Sobrinus*) в устната кухина. За развитието на дентален кариес основните отговорни микроорганизми са лактобацилите. Броят им започва да се увеличава при наличието на стрептококи, които произвеждат благоприятна киселинна среда за развитието им (11). При намален слюнчен поток и ксеростомия се създават условия за размножаване на патогенна флора. В нашите изследвания се потвърди, че паци-

енти с хипосаливация имат сигнификантно по-високи нива на *Streptococcus Mutans*, *Lactobacilli* и *Candida*. Хипосаливацията понякога води и до халитоза. В 80% от случаите интраоралната причина за бактериите, които обитават гърба на езика, произвеждат летливи серни съединения, които в 80% от случаите са причина за интраоралния произход на халитозата (14).

Устната кухина е среда, в която има постоянно количество на нитрати. Те се абсорбират в стомашно-чревния тракт и достигат до слюнчените жлези чрез кръвта. Секретират се и частично се редуцират до нитрити от микроорганизми като *Streptococcus salivarius*, *S. mitis* и *S. bovis*. Слюнчените нитрити имат положителен ефект – цитолитичен и цитостатичен върху основните патогенни щамове бактерии. Концентрацията на нитрити в граници от 20 до 200 mmol/L (mM) има високо сигнификантен инхибиторен ефект ($p < 0,001$) върху способността на *S. Mutans* да понижава слюнченото pH.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностичните тестове, базирани на слюнката, имат редица предимства – точност, ефикасност, лекота на използване и ефективност на разходите. Слюнката може да е основен биологичен маркер за диагностика на множество орални и системни заболявания.

ЛИТЕРАТУРА

- Ботева Е, Караяшева Д, Пейчева К. Орален клирънс на хранителни продукти с високо съдържание на мазнини. Наука Диететика 2014; 3–4 : 42-47
- Караяшева Д. Роля на слюнката в етиопатогенезата на зъбния кариес; София 2015
- Караяшева Д, Ботева Е. Температурата като фактор в състава, качествата и количеството на слюнката и в кариесната активност. Сп. Наука Ендокринология 2014; 2: 65- 67
- Караяшева Д., Маринова М., Ботева Е. Слюнка – секрция, диагностична среда, хранене и орална патология. Сп. Нови диагностични методи 2012; 4:125-137
- Константинова Д, Ненова-Ноголчева А, Танчева С, Слюнката като алтернативна среда за изследване на секреторен имуноглобулин а (siga) в слюнка при пациенти в терминален стадий на хронично бъбречно заболяване на заместително лечение. Сп. Варненски медицински форум 2017, 6 (2): 54-58
- Abbate J., Guynup Sh. Oral health goes modern. Journal Scientific American October 19, 2016; 315 (4)
- Crossner CG1, Hase JC, Birkhed D. Oral sugar clearance in children compared with adults. Caries Res. 1991;25(3):201-6.
- Greenman J et al Study on the organoleptic intensity scale for measuring oral malodor J. Dent Res. 2004 ;83 ;81–5
- Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. J Oral Pathol Med. 1990 Mar; 19 (3): 119-25
- Moreno EC, Varughese K, Hay DI: Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. Calcif Tissue Int 1979; 28:7–16
- Newbrun E. Preventing dental caries. Current and prospective strategies. Journal of the American Dental Association 1992; 123: 68–73
- Schlesinger DH, Hay DI: Complete covalent structure of a proline-rich phosphoprotein, PRP-2, an inhibitor of calcium phosphate crystal growth from human parotid saliva. Int J Peptide Res 1986; 27:373–379
- Sinor Z, Azirrawani A. Association between salivary parameters and periodontal disease. Int Med J. 2013; 20: 1–5
- Van den Broek A, Feenstra L, de Baat C, A review of the current literature on management of halitosis; Oral Dis. 2008; 14, 30–39
- www.gcamerica.com/storage/dps_c/GCA_Saliva-Check_BUFFER-iPad.pdf
- www.gceurope.com/products/salivacheckmutans
- www.ivoclarvivadent.com/en/p/
- Zilm PS, Mira A, Bagley CJ, Rogers AH Effect of alkaline growth pH on the expression of cell envelope proteins in *Fusobacterium nucleatum*. Microbiology. 2010 Jun; 156 (Pt 6):1783-94

Адрес за кореспонденция:

гл.ас. д-р Христиана Маджова, д.м.
Факултет по Дентална медицина,
МУ "Проф. д-р П. Стоянов" – Варна
Катедра „Консервативно зъболечение и
орална патология“
бул. Цар Освободител 84, 9000 Варна
e-mail: christiana.madjova@gmail.com