

Analiza proteinskog sastava mešovite pljuvačke starih osoba obolelih od paradontopatije

YU ISSN 0039-1743
UDK 616.31

Analysis of protein compounds in old persons whole saliva with parodontal diseases

KRATAK SADRŽAJ

Cilj ovog rada bio je da se utvrdi proteinski sastav mešovite pljuvačke osoba starih preko 50 godina sa manifestnim i terminalnim oblicima paradontopatije, u odnosu na kontrolnu grupu mladih zdravih osoba. Eksperimentalna i kontrolna grupa sastojale su se od po 30 pacijenata, a paradontalni status je određen primenom paradontalnih indeksa (Sillness-Loe). Ispitivanja su vršena elektroforetskom metodom na agaroznom gelu, koja kao rutinska metoda služi za ispitivanje proteina humanog seruma. Elektroforetskim ispitivanjem u baznim uslovima (pri pH = 11), kao i u kiselim (pri pH = 5.9) razdvojene su sve kisele i bazne proteinske frakcije mešovite pljuvačke. Dobijeni rezultati su pokazali da je u baznim uslovima razdvojeno više frakcija nego u kiseloj sredini (9 pojedinačnih frakcija). Identifikacija frakcija izvršena je metodom za određivanje relativnih molekularnih masa po Weberu i Osbornu. Molekulske mase frakcija u baznim uslovima, u odnosu na zdrav uzorak (Sz) ukazuju na destrukciju baznih proteina velikih molekularnih masa i značajnije prisustvo frakcija kiselih karakteristika, malih molekularnih masa do 60 000 (St), kao posledice paradontopatije nastale starenjem organizma. Može se zaključiti da promene proteinskog sastava pljuvačke mogu ukazati na tok i razvoj oboljenja paradoncijuma, ali i na promene vezane za starenje organizma.

Ključne reči: pljuvačka, proteini, pH

**Silvija Mirković¹, Obrad Zelić²,
Biljana Andelski¹**

¹Stomatološki fakultet, Beograd,
Institutski predmeti, Hemija

²Stomatološki fakultet, Beograd,
Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

ORIGINALNI RAD (OR)
Stom Glas S, 2002; 49:29-33

Uvod

Održavanje zdravlja svih oralnih tkiva - oralna homeostaza - sprovodi se uz pomoć raznovrsnih sastojaka objedinjenih u obliku neorganskih i organskih komponenti mešovite pljuvačke. Lučenje pljuvačke se odvija u kontinuitetu, ali sa različitim intenzitetom tokom 24h, pri čemu se vrši održavanje i zaštita mukozno-gledne barijere u fiziološkim uslovima.

Pljuvačka je veoma raznolikog sastava. Osnovne komponente mešovite pljuvačke zdravih osoba predstavljaju smešu neorganskih i organskih sastojaka sa fiziološkom ulogom u zaštiti svih oralnih tkiva. Neorganske komponente (99% u ukupnom sekretu), od kojih su najznačajnije voda, katjoni Na⁺, K⁺, i anjoni Cl⁻, HCO₃⁻, imaju ulogu u rastvaranju hrane tokom žvakanja i regulaciji pH-vrednosti oralne sredine.

Najznačajnije organske komponente pljuvačke su razni proteini (uglavnom glikoproteini). Neki od njih su enzimi (salivarna amilaza) koja obezbeđuje normalno funkcionisanje procesa varenja, koje počinje u ustima, kao i funkciju samočišćenja usne duplje. Sistemi imunoglobulina pljuvačke

neophodni su u očuvanju zdravlja svih oralnih tkiva, jer ispoljavaju antimikrobno delovanje.

Antibakterijsko i antivirusno dejstvo pljuvačka ostvaruje prvenstveno imunoglobulinima klase IgA i IgG, ređe IgM, kao i dejstvom **lizozima** u prisustvu komponenata komplemenata. Imajući u vidu da je pljuvačka u stalnom kontaktu sa svim tkivima usne duplje i da sadrži komponente sa zaštitnom ulogom, održavanje zdravlja oralne sluzokože i svih oralnih tkiva podrazumeva stalno prisustvo ovih sastojaka u fiziološkim uslovima u određenim koncentracijama.

Cilj ovog rada bio je da se ispita i analizira proteinski sastav mešovite pljuvačke starih osoba sa manifestnim i terminalnim oblicima paradontopatije, primenom rutinskih metoda za laboratorijsko-biohemijsko ispitivanje proteina humanog seruma.

Materijal i metod

Mešovita pljuvačka upotrebljena je kao osnovni materijal u ovom radu. Pljuvačka je u pojedinačnim slučajevima sakupljana gustativnom stimulacijom pomoću parafina. Uzorci pljuvačke uzimani su u isto doba dana, posle doručka

i posle detaljnog čišćenja zubnih površina, četkicom. Pljuvačka je uzimana u epruvete i posle centrifugovanja na 5000 obrtaja/min dijalizovana i pripremljena za analizu do odgovarajuće zastupljenosti proteina koju zahteva metoda.

Ekperimentalnu grupu činilo je 30 osoba starih preko 50 godina bez kariesnih lezija, sa terminalnim stadijumom oboljenja parodonticijuma, što je definisano odgovarajućim parodontalnim indeksima (Sillness-Loe).

U kontrolnoj grupi bilo je 30 osoba, od 19 do 21 godine, potpuno saniranih zuba, bez kariesnih lezija, sa početnim stadijumom parodontopatije. Od uzoraka kontrolne grupe sačinjen je pool. Elektroforetskom metodom na agaroznom gelu, urađeno je kvantitativno i kvalitativno određivanje proteina pljuvačke. Ova metoda, koja se u biohemijskim laboratorijama koristi za razdvajanje proteina seruma, modifikovana je za salivu¹.

Skeniranje je izvršeno na denzitometru marke Corning. Metoda je primenjena uz promenu uslova razdvajanja, (napon od 90 do 250 V), vremena trajanja elektroforeze (30, do 90), i promene zapremine ispitivanog uzorka² (0,8 - 1,2 μ l).

Ispitivanja su vršena u kiselim (pH=5,9) i baznim uslovima (pH=11), a zastupljenost frakcija u svakom gradijentu statistički je obrađena student T-testom. Upoređivanje rezultata razdvajanja vršeno je metodom određivanja molekulske mase po Weber-u i Osborn-u³.

Rezultati

Ispitivanjem elektroforetske pokretljivosti proteinskih frakcija mešovite pljuvačke u slabo kiselim uslovima pri pH =5,9 razdvojeno je od 2 do ukupno 5 frakcija proteina baznih karakteristika. Varirani su uslovi razdvajanja, napona od 90V do 250V i zapremine od 0,8 μ l do 1,2 μ l uzorka nanesenog na gel (slika 1).

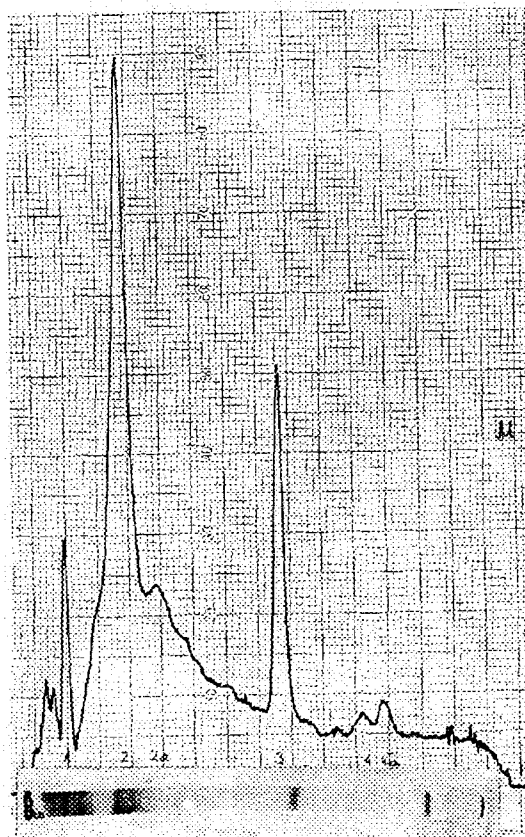
Najveću zastupljenost, u svim uzorcima imaju frakcije 1 i 2b koja je treća po rasporedu u denzitogramu i zastupljena u 20 uzoraka. Frakcije 2a i 3b imaju iztu zastupljenost, u 11 uzoraka, dok su frakcije 3a zastupljene samo u 4 pojedinačna uzorka. Najveću zastupljenost imaju frakcije 2b, kao i frakcije 3b. Najniže vrednosti procentualne zastupljenosti su kod frakcija 2a (slika 2).

Ispitivanjem elektroforetske pokretljivosti proteinskih frakcija mešovite pljuvačke u baznim uslovima pri pH = 11, razdvojeno je od 3 do 9 frakcija kiselih karakteristika. Denzitogram koji predstavlja razdvajanje proteina pod ovim uslovima prikazan je na slici 3.

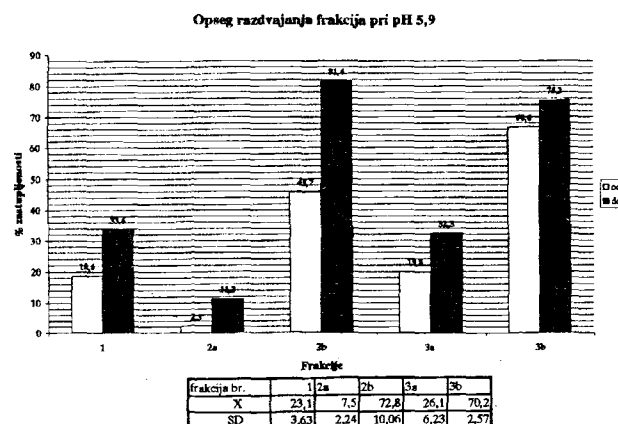
Broj kiselih frakcija bio je veći, a molekulske mase manje, što se zapaža na elektroforegramima i shemi na slici 4.

Poređenjem razlika u molekulske mase proteina mešovite pljuvačke starih osoba sa manifestnim (Sm) i terminalnim stadijumom parodontopatije (St) i referentnih grupa mladih osoba sa zdravim parodonticijumom (Sz i Sp), uočava se povećanje zastupljenosti frakcija malih molekulske mase od 12 000 do 22 000, kiselih karakteristika, na elektroforegramima koji pripadaju osobama kod kojih je parodontopatija u odmakloj fazi. Proteinske frakcije kiselih karakteristika

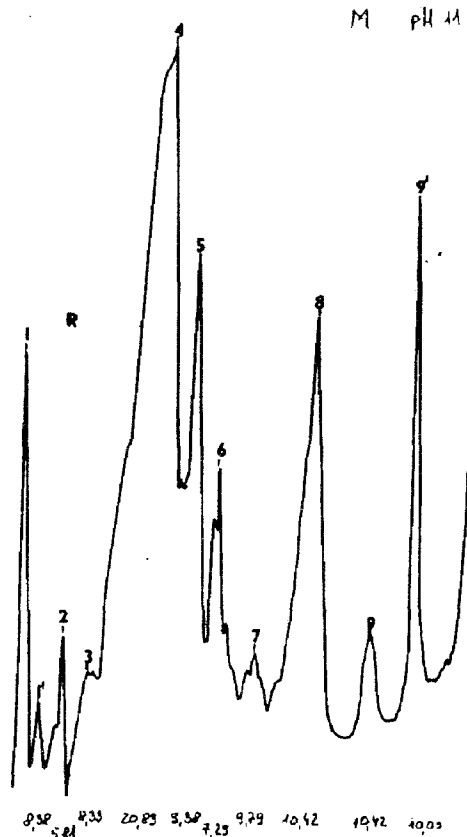
obuhvataju 5 oblasti, pri čemu su frakcije 2, 3 i 4 sa podfrakcijama. Najzastupljenije su 1, 2, 3 i 4 kao glavne frakcije, dok su im podfrakcije manje zastupljene. Najslabije su zastupljene frakcije 5, u tri uzorka i 3b, samo u dva uzorka. Opseg razdvajanja frakcija kiselih karakteristika pri pH = 11 pokazuje da su sa najvišim vrednostima frakcije 2b, 3b i 3c, dok ostale frakcije imaju manje vrednosti % zastupljenosti (slika 5)



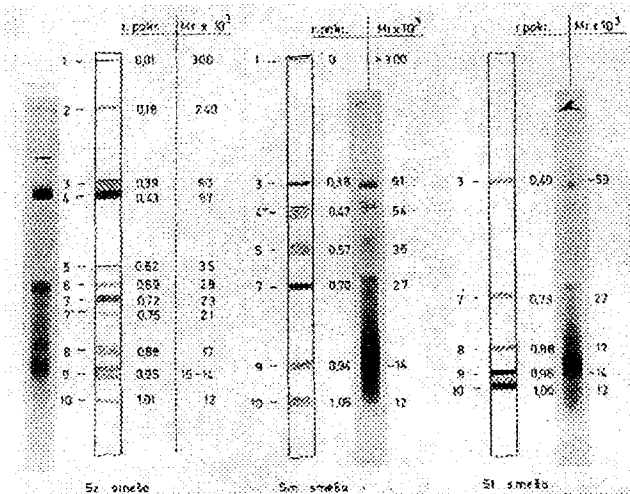
Slika 1. Denzitogram glikoproteina pool-a uzoraka mešovite pljuvačke osoba sa manifestnim i terminalnim stadijumom parodontopatije pri pH = 5,9
Figure 1. Denzitogram of glycoprotein pool of whole saliva samples of persons with manifest and terminal stage of periodontal disease at pH = 5.9.



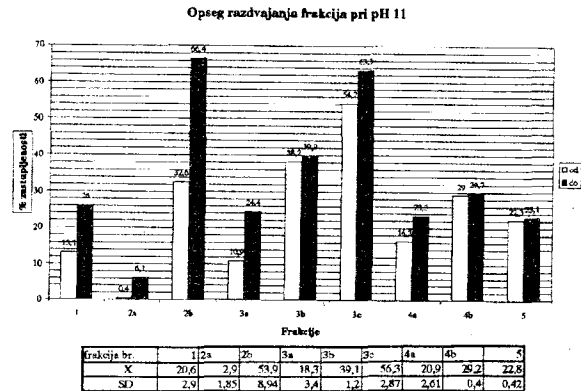
Slika 2. Statistička analiza baznih glikoproteinskih frakcija pojedinačnih uzoraka mešovite pljuvačke ispitivanih osoba pri pH = 5,9
Figure 2. Statistic analysis of alkaline glycoprotein fractions in individual samples of whole saliva at pH = 5.9.



Slika 3. Densitogram glikoproteina pool-a uzoraka mešovite pljuvačke osoba sa manifestnim i terminalnim stadijumom parodontopatije pri pH = 11.
Figure 3. Densitogram of glycoprotein pool of whole saliva samples of persons with manifest and terminal stage of periodontal disease pH = 11.



Slika 4. Određivanje molekularnih masa proteina mešovite pljuvačke starih osoba sa manifestnim i terminalnim stadijumom parodontopatije u poređenju sa referentnim uzorkom zdravih, mladih osoba, po metodi Weber-a i Osborna.
Figure 4. Molecular mass determination of whole saliva proteins of old persons with manifest and terminal stage of periodontal disease in comparison with referent sample of healthy, young persons, using Weber and Osborn method.



Slika 5. Statistička analiza kiselih glikoproteinskih frakcija pojedinačnih uzoraka mešovite pljuvačke ispitivanih osoba pri pH = 11.
Figure 5. Statistic analysis of acid glycoprotein fractions in individual samples of whole saliva at pH = 11.

Diskusija

Poznato je da proteinski sastav pljuvačke nije stalan i da zavisi od više faktora koji istovremeno deluju. Pljuvačka nastaje kao produkt lučenja tri para pljuvačnih žlezda i mnoštva malih, mukusnih žlezda rasutih po oralnoj površini. Sastav pljuvačke se menja tokom dana, tokom govora i mirovanja, a takođe i prisustvom izvesnih sistemskih oboljenja, kakva su diabetes mellitus, maligna oboljenja, ili nekih drugih bolesti praćenih promenama na nivou oralne mukoze ili gleđne površine zuba^{4,5,6}. Lokalne promene u ustima, usled povećanog prisustva patogenih i nepatogenih uzročnika, nastale kao odraz smanjenja odbrambenih sposobnosti organizma, takođe mogu izazvati promene sastava mešovite pljuvačke^{7,8}. Veći broj karijesnih lezija u ustima takođe doprinosi povećanju zastupljenosti bakterijskih sojeva koji utiču na sastav mešovite pljuvačke i na njenu zaštitnu ulogu u ustima⁶.

Najzastupljeniji protein u pljuvački je enzim **salivarna amilaza**. Salivarna amilaza^{9,10} je enzim amilolitičke aktivnosti i jedan od kvantitativno najznačajnijih komponenti parotidne pljuvačke. Izoelektričnim fokusiranjem utvrđmo je da se izoenzimi amilaze nalaze u slabo kiselj sredini u intervalu od pH 5,8 do pH 6,9¹.

Izuzetan značaj u očuvanju mukozno-gleđne barijere imaju mucini pljuvačke. Mucini su glikoproteini, čiji je najznačajniji izvor submandibularna i sublingvalna pljuvačka, kao i brojne mukozne žlezde koje se nalaze rasute po čitavoj površini oralne sluzokože^{11,12}.

Prisustvo **baznog glikoproteina**, koji predstavlja značajnu komponentu stimulisanе parotidne pljuvačke, važno je za očuvanje stabilnosti stanja svih oralnih tkiva u fiziološkim uslovima. Bazni glikoprotein pljuvačke pokazuje katodnu elektroforetsku pokretljivost^{13,14} i veliki afinitet prema zubnoj gleđi. U direktnoj vezi sa hidroksiapatitom omogućava se nastanak inicijalnog sloja zubne pelikle⁸.

Pljuvačka sadrži i **kisele gliko- i fosfo-proteine**, koji takođe poseduju afinitet prema kristalima hidroksiapatita gledi. Njihovo međusobno vezivanje nije direktno, već posredno preko prisutnih Ca^{2+} jona iz pljuvačke, čineći pritom zaštitni sloj na površini gledi^{15,16}.

Najvažniji sekretorni imunoglobulin pljuvačke je salivarni sIgA⁶ iz parotidne žlezde, čija je koncentracija u odnosu na IgG u pljuvački oko 400 puta veća nego u serumu. Smatra se da sIgA sprečava adherenciju mikroorganizama za oralnu sluzokožu, pri čemu istovremeno inaktivira i neke viruse¹⁷.

Sastav pljuvačke, međutim, menja se i sa godinama starosti. Pljuvačka sa starenjem organizma gubi svoje serozne karakteristike, pri čemu se znatno povećava udeo žlezda koje luče mukusni sekret. Posledica je smanjenje uticaja pljuvačke u samočišćenju usne duplje, a mukusne glikoproteinske komponente koje su kiselih karakteristika doprinose promeni pH sredine u ustima¹. Sa starenjem organizma dolazi do niza promena koje se mogu manifestovati nizom patoloških stanja (parodontopatije- promene vezane za razgradnju potpornog aparata zuba, a koje vode krezubosti ili potpunom gubitku zuba⁷). Takođe je poznato da parodontopatije mogu nastati još u detinjstvu ili adolescenciji, ali da se promene tkiva koje vode potpunoj destrukciji potpornog aparata zuba, gingive, periodoncijuma, alveolarne kosti i cementa korena zuba, naročito ubrzavaju i pojačavaju starenjem organizma^{18,19}. Promene stanja oralne sluzokože i funkcije pljuvačnih žlezda sa starenjem doprinose promenama i u sastavu pljuvačke sa kojom su u kontaktu^{19,20}.

Na to ukazuju i naša ispitivanja, jer kod starih osoba je elektroforetska raspodela proteina sa kiselim karakteristikama, malih molekularskih masa, zastupljena sa povećanim bro-

jem frakcija u odnosu na bazne proteinske komponente pljuvačke istih ispitanika.

Treba istaći da je starosna grupa ispitanika sa manifestnim i terminalnim stanjem oboljenja parodonticijuma definisana na osnovu vrednosti parodontalnih indeksa određenih kod svakog pojedinca. Ispitivanjem frakcija baznih karakteristika uočava se da je njihov broj smanjen. Imajući u vidu prisutnost imunoglobulina, naročito najzastupljenijih klasa IgA i IgG, baznih glikoproteina i lizozima, čija je $I_p=10,65$ u pljuvački, može se zaključiti da sa starenjem opada i zastupljenost frakcija sa najvećim značajem u održavanju mukozno-gledne barijere u fiziološkim uslovima.

Zaključak

Promene proteinskog sastava pljuvačke uprkos stalnom lučenju pljuvačke u ustima, mogu ukazati na razvoj oboljenja parodonticijuma, kao i na promene vezane za starenje organizma.

Promene proteinskog sastava i povećana zastupljenost proteinskih frakcija malih molekularskih masa $M_r \leq 60\ 000$ i kiselih karakteristika, ukazuje na moguću degradaciju frakcija velikih molekularskih masa $M_r \geq 160\ 000$, koje pripadaju imunoglobulinima. Promene proteinskog sastava ne nastaju samo kao posledica napredovanja parodontalnog oboljenja, već uporedo i sa starenjem organizma koje je praćeno smanjenjem uz postepeni potpuni gubitak funkcija svih zaštitnih elemenata u očuvanju oralnog zdravlja.

Primena elektroforetske tehnike na agaroznom gelu, za ispitivanje seruma u biohemijskim uslovima, moguća je pod uslovom da se uzorak pljuvačke prilagodi sadržaju ukupnih proteina normalnog humanog seruma, što se postiže liofilizacijom ili ukoncentrisavanjem.

Literatura.

- Mirković S. Elektroforetsko ispitivanje proteina humane pljuvačke. Dokt. Disert. Stomatološki fakultet, Beograd, 1987.
- Arneberg P. Quantitative determination of protein in saliva a comparison of analytical methods. Scand. J. Dent. Res, 1971; 70: 60-64.
- Weber K, Osborn M. J. Biol. Chem, 1969; 244: 4406-4412
- Lingstrom P, van-Ruyven FO, Van-Houte J, Kent R. The pH of dental plaque in its relation to early enamel caries and dental plaque flora in humans. J. Dent. Res, 2000 feb; 79(2): 770-777.
- Jensen JL, Barkvold P. Clinical implications of the dry mouth. Oral mucosal diseases, Ann. N. Y. Acad. Sci, 1998 apr 15; 842: 156-162.
- Zelić O. Savremena terapija progresivnih parodontopatija. Dokt. Disert. Stomatološki fakultet, Beograd 1978.
- Navazesh M, Mulligan RA, Kipnis V, Denny PA, Denny PC. Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy caucasian young and aged adults. J. Dent. Res, 1992; 71: 1275-1276.
- Slavkin HC. Toward molecularly based diagnostics for the oral cavity. J. Am. Dent. Assoc, 1998 aug; 129(8): 1138-1143.
- Heft MW, Baum BJ. Unstimulated and stimulated parotid salivary flow rate in individuals of different ages. J. Dent. Res, 1984; 63:1182-1185.
- Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA, Loomis RE, Bergey EJ. J. Dent. Res, 1987; 66:436-441.
- Denny PC, Denny PA, Klausner DK, Hong SH, Navazech M, Tabak LA. Age-related changes in mucins from whole saliva. J. Dent. Res, 1991; 70: 1320-1327.
- Lin B, Offner GD, Nunes DP, Oppenheim FG, Troxler RF. Muc 4 is a major component of salivary mucin MG1 secreted by the human submandibular gland. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1998; 250: 757-761
- Armstrong WG. Characterization studies of the specific human salivary proteins adsorbed in vitro by hydroxyapatite. Caries Res, 1971; 5: 215-227.
- Hay DI, Oppenheim FG. The isolation from human parotid saliva of a further group of proline-rich protein. Arch. Oral Biol, 1974; 19: 627-632.
- Rolla G, Kornstad L, Mathisen P, Povatong L. Selective adsorption of an acidic glycoprotein from human saliva to tooth surfaces. J. Periodont. Res, 1969; Suppl. 4: 8-9.
- Boat TF, Wiesman UN, Pallavicini JC. Purification and properties of the calcium precipitable protein in submaxillary saliva of normal and cystic fibrosis subjects. Ped. Res, 1974; 8: 531- 539.
- Bikandi J, Moragues M.D, Qindos G, Polonelli L and Ponto, n J. Influence of Environmental pH on the Reactivity of Candida albicans with Salivary IgA. J. Dent. Res. 2000; 79(6) : 1439-1442.
- Djajić D, Djukanović D, Zelić O, Ursu I. Parodontopatije 2. Izdanje. Dečje novine Gomji Milanovac, 1988.
- Tylenda CA, Ship JA, Fox PC, Baum BJ. Evaluation submandibular salivary flow rate in different age groups. J. Dent. Res, 1988; 67: 1225-1228.
- Ship JA, Baum BJ. Is reduced salivary flow rate normal in old people. Lancet, 1990; 336-1507

ANALYSIS OF PROTEIN COMPOUNDS IN OLD PERSONS WHOLE SALIVA WITH PARODONTAL DISEASES

SUMMARY

The purpose of this work was to determine the protein composition of whole saliva in 50 year-old patients and older with manifested and terminal stages of periodontal disease, in correlation with control group of young healthy persons. Experimental and control group consisted of 30 patients. The periodontal status was determined by using appropriate periodontal index (Silness-Loe). Investigations were led by electrophoretic method on agarose gel which was used as a routine method for investigation of human serum proteins. Investigating in very alkaline conditions (pH=11) as well as acid conditions (pH=5.9) resulted in separating alkaline and acid glycoprotein fractions in whole saliva. Results showed that there were more separated fractions within basic conditions than within acid conditions. The fraction identification was done by using relative molecule mass determination method by Weber and Osborne. Molecule mass fractions at basic conditions in comparison with the healthy sample (Sz) indicated the destruction of big molecular weight alkaline proteins as well as a significant presence of acid fractions, of little molecule masses up to 60 000 (St), consequences due to aging processes in human organism.

It can be concluded that changes in protein composition of whole saliva could point out to the direction and development of periodontal disease as well as changes concerning aging of human organism.

Key words: saliva, proteins, pH.

Silvija Mirković, Obrad Zelić,
Biljana Anđelki

Address for Correspondence

Silvija Mirković
29. novembra 110
11000 Belgrade

IZBOR IZ LITERATURE

FOTOPOLIMERIZACIJA KOMPOZITNIH MATERIJALA PRIMENOM ARGON LASERA

Fleming M. G., Wayne A. M.: Photopolymerisation of composite resin using the Argon laser. J Can Dent Assoc 1999., 65: 447 - 450

Obzirom na povećanu primenu svetlopolimerizujućih restaurativnih materijala, postoji potreba i za novim svetlosnim izvorima, koji iniciraju polimerizaciju. Jedan od tih novih izvora je i ARGON LASER, koji emituje zrak optimalne talasne dužine za pobuđivanje fotoinicijatora u kompozitnom materijalu.

Konvencionalni halogeni izvori emituju belu svetlost, kod koje se neželjene talasne dužine uklanjaju filterima, kako bi se proizveo polihromatski spektar plave svetlosti. Osim toga, sijalice, reflektori i svetlosni nastavci brzo propadaju, a

filteri stradaju zbog generisane toplote, što ima za posledicu nekvalitetnu polimerizaciju ispuna.

ARGON LASER proizvodi monohromatsku plavu svetlost, talasne dužine raspona 40 - 45 nm (za razliku od halogenih izvora, čiji je raspon 120 nm) i zrak sa fokusiranim svetlom, što rezultuje većom konzistencijom snage i gustine. Ovakav zrak utiče na bolje fizičke osobine polimerizovanog materijala u kavitetu (otpornost na smicanje i istezanje, modul elastičnosti). Osim toga, za polimerizaciju sloja materijala od 2 mm, potrebno je 10 sec za laser (40 sec za halogene izvore). Ovo skraćenje vremena značajno racionalizuje restaurativnu proceduru i naročito je korisno kod "nemirne" dece.

Nedostaci ARGON LASERA su: njegova visoka cena (12 - 20 000 dolara), generisanje velike količine toplote i prilično bučan sistem hlađenja.

Larisa Blažić