

УТИЦАЈ СКЛАДИШТЕЊА УЗОРАКА ПЉУВАЧКЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈУ БИОХЕМИЈСКИХ МАРКЕРА

Биљана Анђелски Радичевић¹, Иван Дожић²

THE INFLUENCE OF SALIVA SAMPLES STORAGE ON BIOCHEMICAL MARKERS LEVEL

Biljana Anđelski Radičević, Ivan Dožić

Сажетак

Анализа пљувачке је брза, једноставна и неинвазивна, па се пљувачка све чешиће користи као биолошки узорак за анализу различитих маркера. Начин чувања узорака пљувачке до анализе може да утиче на њихову концентрацију.

Циљ: Испитати утицај различитих услова чувања узорака пљувачке на концентрацију биомаркера.

Материјал и методе: Узорци нестимулисани пљувачке сакупљени су од 34 здрава добровољца, оба пола, старости 25–70 година, у специјалне епрувете – саливете. Анализирани су глукоза, уреа, мокраћна киселина, триглицериди, калцијум и гвожђе, методом спектрофотометрије, а калијум и натријум су одређени пламеном фотометријом. Анализа биохемијских маркера је урађена у свежем узорку пљувачке на собној температури, затим у узорку који је чуван седам дана на +4 °C и узорку који је чуван 30 дана на -20 °C.

Резултати: Средње вредности концентрација биохемијских маркера у свежем узорку пљувачке одговарале су вредностима које су добили други аутори. Након чувања пљувачке седам дана на +4 °C, концентрације глукозе (0,66 mmol/L), урее (5,3 mmol/L), мокраћне киселине (228 μmol/L), триглицерида (0,27 mmol/L), калцијума (2,11 mmol/L), гвожђа (8,5 μmol/L), калијума (14,9 mmol/L) и натријума (10,3 mmol/L) нису показале статистички значајну разлику ($p > 0,05$) у односу на њихове концентрације у свежем узорку пљувачке.

Summary

Salivary analysis is rapid, simple and non invasive, so it is often used as a sample for measuring levels of different biomarkers. Storage of saliva samples can influence their concentration.

Aim: To investigate the influence of different storage conditions of saliva samples on the level of various biomarkers.

Material and methods: Samples of unstimulated saliva were collected from 34 healthy volunteers, male and female, 25–70 years old, with the special test tubes – Salivette. We analysed glucose, urea, uric acid, triglycerides, calcium and iron, using spectrophotometric method. Sodium and potassium in saliva were measured by flame photometry. Biomarkers' analysis was done in native samples of saliva, then after seven days of storage on +4 °C, finally after thirty days of storage on -20 °C.

Results: Mean values of biomarkers' concentrations in native saliva were similar as results of other authors. After 7 days of storage on +4 °C, levels of glucose (0,66 mmol/L), urea (5,3 mmol/L), uric acid (228 μmol/L), triglycerides (0,27 mmol/L), calcium (2,11 mmol/L), iron (8,5 μmol/L), potassium (14,9 mmol/L) and sodium (10,3 mmol/L) didn't show statistically significant difference ($p > 0,05$) related to their concentrations in native saliva samples. Also, mean values of investigated biomarkers weren't statistically different in samples of native saliva and those stored 30 days on -20 °C.

¹ Prim. mr sc. ph. Биљана Анђелски Радичевић, Општа и орална биохемија, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду.

² Doc. dr sc. med. Иван Дожић, Општа и орална биохемија, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду.

Такође, нема статистички значајне разлике између средњих вредности концентрација испитиваних маркера у свежем узорку пљувачке и након 30 дана чувања на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Закључак: Различити услови чувања пљувачке нису утицали на концентрацију испитаних биохемијских маркера. Стабилност ових биомаркера указује да пљувачка има све више удела као дијагностичка течност.

Кључне речи: пљувачка, биохемијски маркери, складиштење.

Conclusion: Various storage conditions didn't influence on investigated biomarkers' levels. Stability of these biomarkers shows that saliva has big potential as a diagnostic fluid.

Key words: saliva, biomarkers, storage.

УВОД

Пљувачка (салива) је сложен секрет присутан у усној дупљи, који непрекидно влажи и спира зубе и оралну слузокожу. Представља мешавину секрета из три пара великих пљувачних жлезда (паротидне, подвличне и подјезичне), малих мукозних жлезда оралне слузокоже (усничне, образне, језичне, непчане) и гингивалне течности. Мешањем секрета из разних извора у усној дупљи формира се мешовита (укупна) пљувачка.

Лучење пљувачке започиње у ацинусним ћелијама пљувачних жлезда, ултрафилтрацијом крви, када се добија примарна пљувачка, која је изотонична са крвном плазмом. Примарна пљувачка пролази кроз систем каналића, где се поједине материје реапсорбују, а друге секретују и ствара се дефинитивна (коначна) пљувачка, која је хипотонична у односу на крвну плазму. На обим лучења пљувачке могу утицати: психичка стимулација, количина воде у организму, доба дана, лекови, положај тела, излагање светлости.

Пљувачка садржи састојке који могу потицати из пљувачних жлезда, крви или гингивалне течности. У пљувачки има и епителних ћелија, бактерија, гљивица, вируса, остатака хране. Најзаступљенији састојак је

вода (99%), док преостали део чине органски молекули и електролити. Од електролита, у пљувачки су присутни јони натријума, калијума, калцијума, магнезијума, хлорида, флуорида, јодида, фосфата, бикарбоната, сулфата, тиоцијаната. Постоје значајне разлике у концентрацији електролита у пљувачки у односу на серум, као и разлике између стимулисане и нестимулисане пљувачке. Органски састав пљувачке чине протеини, гликопротеини и липиди. Већина протеина и гликопротеина је продукт ацинусних и дуктусних ћелија пљувачних жлезда. Поједини молекули потичу из крви (албумини, мокраћна киселина, уреа), али је концентрација протеина у пљувачки мања него у крви. Поред главних органских састојака, протеина и гликопротеина, у пљувачки су присутни и липиди, као што су холестерол, триглицериди, диглицериди, слободне масне киселине и др.^(1, 2, 3)

Органски и неоргански састојци пљувачке имају улогу у одржавању оралне хомеостазе, тј. доприносе одржавању сталног састава унутрашње средине. Због тога је превасходна улога пљувачке у самочишћењу усне дупље (вода, амилаза), мастикацији, говору, гутању, одржавању стабилности протетских надокнада у усној дупљи, антимикуробној заштити (протеини и гликопротеини), пуферска улога (фосфати, бикарбонати), антиоксидативна

улога (мокраћна киселина, билирубин, глутатион). У последње време пљувачка се све више користи као биолошки материјал због једноставног, сигурног и безболног прикупљања узорака. Многе студије су анализирале биомолекуле у пљувачки како код оралних, тако и код системских обољења.⁽⁴⁾ Нестимулисана пљувачка се чешће испитује у односу на стимулисану, јер материјали који стимулишу лучење пљувачке могу да доведу до промене њеног биохемијског састава.

Процедура и време складиштења пљувачке углавном утичу на анализу биохемијских маркера. Нека једињења у пљувачки могу да имају кратак полуживот, тако да се узорак мора одмах анализирати, док друга једињења могу бити стабилна у пљувачки дуже време.⁽⁵⁾ Из тог разлога је веома важно да се током преаналитичке процедуре утврди стабилност молекула током поступка складиштења.

ЦИЉ

Циљ рада био је да се испита утицај различитих температура и услова складиштења узорака пљувачке на концентрацију органских (глукоза, триглицериди, уреа, мокраћна киселина) и неорганских биомаркера (калцијум, натријум, калијум, гвожђе).

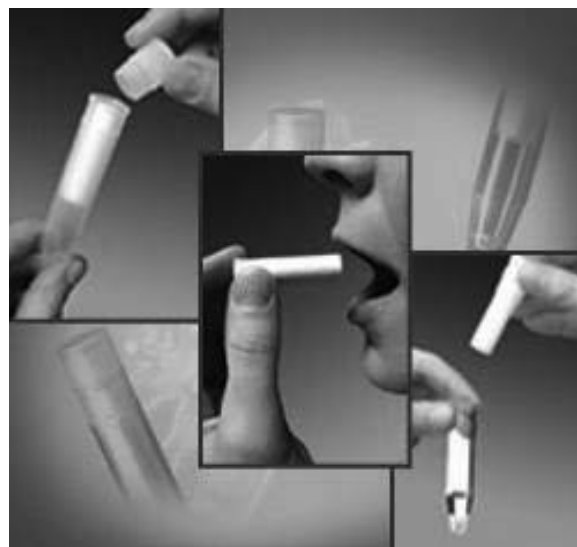
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Узорци нестимулисане мешовите пљувачке сакупљени су од 34 здрава добровољца, мушког и женског пола, старости 25–70 година. Испитаницима је пљувачка узимана у тачно одређено време (9–11 h) и објашњено им је да најмање 30 минута пре узимања пљувачке не треба да перу зубе, узимају храну, течност, ни гуму за жвакање.

Узорке пљувачке узимали смо помоћу специјалних епрувета – Salivette[®] (Sarstedt, Немачка, слика 1), чији је основни део пластична епрувета у којој се налази покретни перфорирани пластични уметак.

У уметку је памучни или полиестарски уложак који пацијент ставља испод језика 3–5 минута. За сакупљање нестимулисане пљувачке памучни уложак не садржи хемијско средство које би стимулисало лучење пљувачке. Када се памучни уложак натопи пљувачком, ставља се у пластични перфорирани уметак, а епрувета затвара запушачем.

Слика 1. Узимање пљувачке помоћу саливете.



Центрифуговање узорака пљувачке вршено је 10 минута на 3000 обрт/мин. На овај начин пљувачка се ослобађа муцина и осталих материја које би могле да ометају аналитички поступак. После центрифуговања, пластични уметак са памучним улошком је извађен, а садржај саливете је подељен у три епрувете: прва – свеж узорак пљувачке, одмах анализиран; друга – чува се седам дана на +4 °С; трећа – чува се 30 дана на -20°С.

Концентрације глукозе, урее, мокраћне киселине, триглицерида, калцијума и гвожђа у пљувачки мерене су спектрофотометријском методом на апарату Secomam Basic (Француска). Концентрације калијума и натријума у пљувачки одређене су на пламеном фотометру Hospitex Diagnostic (Италија). Све анализе су урађене у Лабораторији за биохемију и хематологију Стоматолошког факултета у Београду.

Резултати су статистички обрађени Студентовим т-тестом, разлике су утврђене за ниво значајности $p = 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ

Резултати овог истраживања показују да се средње вредности концентрација испитиваних маркера у свежем узорку пљувачке не разликују од вредности које су

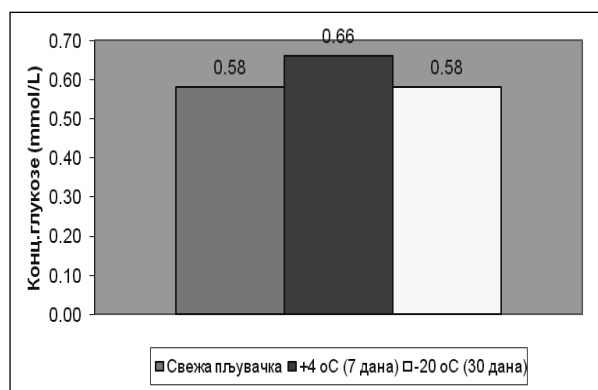
добили други аутори.⁽⁶⁾ Средње вредности концентрација испитиваних маркера у свежем узорку пљувачке и после стајања 30 дана на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, као и значајност разлика утврђених т-тестом су: уреа 6,2 и 6,3 mmol/L, ($t = 0,304$); триглицериди 0,25 и 0,41 mmol/L, ($t = 1,765$); гвожђе 9,0 и 9,6 $\mu\text{mol/L}$, ($t = 0,600$); калијум 14,6 и 15,2 mmol/L, ($t = 0,829$); натријум 12,3 и 12,7 mmol/L, ($t = 1,162$) (Табела 1).

Табела 1. Концентрација биохемијских маркера у узорку пљувачке при различитим условима чувања (средња вредност \pm стандардна девијација).

Биохемијски маркер	Пљувачка		
	Свеж узорак	7 дана ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$)	30 дана ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
Глукоза (mmol/L)	0.58 ± 0.12	0.66 ± 0.22	0.58 ± 0.15
Триглицериди (mmol/L)	0.25 ± 0.07	0.27 ± 0.07	0.41 ± 0.44
Уреа (mmol/L)	6.2 ± 1.89	5.3 ± 1.30	6.3 ± 2.26
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	235 ± 59.58	228 ± 76.17	227 ± 51.67
Калцијум (mmol/L)	2.04 ± 0.64	2.11 ± 0.93	1.95 ± 0.78
Натријум (mmol/L)	12.3 ± 0.12	10.3 ± 6.26	12.7 ± 6.88
Калијум (mmol/L)	14.6 ± 1.66	14.9 ± 0.44	15.2 ± 0.41
Гвожђе ($\mu\text{mol/L}$)	9.0 ± 1.10	8.5 ± 3.52	9.6 ± 1.76

За концентрацију глукозе у свежем узорку пљувачке добијена је средња вредност 0,58 mmol/L. Након складиштења седам дана на $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ измерена је средња концентрација 0,66 mmol/L ($t = 1,713$), а после стајања 30 дана на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ концентрација је била 0,58 mmol/L ($t = 0,056$) (Графикон 1).

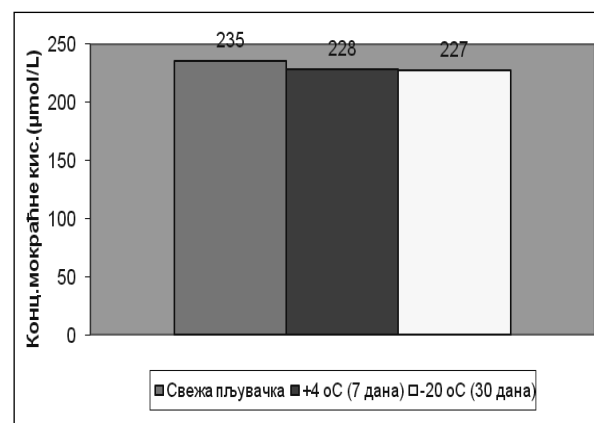
Графикон 1. Утицај складиштења пљувачке на концентрацију глукозе.



Средњавредност за концентрацију мокраћне киселине у свежем узорку пљувачке је 235 $\mu\text{mol/L}$. Након складиштења седам дана измерена је средња концентрација 228

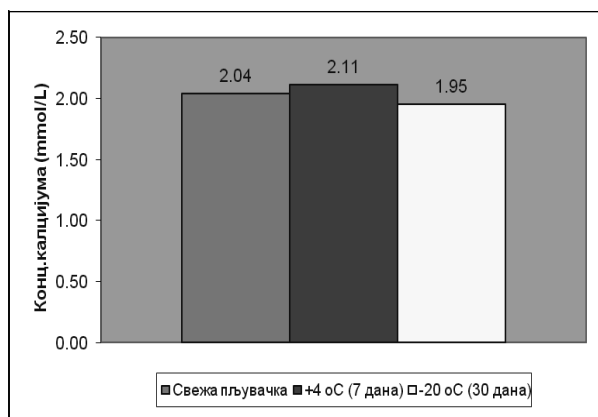
$\mu\text{mol/L}$ ($t = 1,093$), а после стајања 30 дана, 227 $\mu\text{mol/L}$ ($t = 1,218$) (Графикон 2).

Графикон 2. Утицај складиштења пљувачке на концентрацију мокраћне киселине.



За концентрацију калцијума у свежем узорку пљувачке добијена је средња вредност 2,04 mmol/L. Након складиштења на $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ измерена је средња концентрација 2,11 mmol/L ($t = 0,256$), а после стајања на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ концентрација је била 1,95 mmol/L ($t = 0,973$) (графикон 3).

Графикон 3. Утицај складиштења пљувачке на концентрацију калцијума.



ДИСКУСИЈА

Пљувачка је значајна као могући биолошки материјал у циљу увођења нових дијагностичких тестова који би допринели постављању дијагнозе и разјашњавању патогенезе многих обољења. Анализирање биомаркера у пљувачки може бити добар индикатор како код оралних, тако и системских обољења.^(4, 7, 8) У свету постоје стандардизоване методе за рутинско одређивање неких маркера у пљувачки, као што су опојна средства (дрогe),⁽⁹⁾ стероидни хормони,⁽¹⁰⁾ лекови.⁽¹¹⁾

Стандардизација поступака и контрола преаналитичких корака (узорковање, чување, припрема) веома су важни у циљу минимизирања преаналитичких варијација. Тренутно не постоје универзално прихваћене технике за узимање и складиштење узорака пљувачке, па ова чињеница може да утиче на поузданост добијених резултата.⁽⁴⁾ Подаци из литературе указују да методе сакупљања пљувачке код здравих испитаника утичу на проток пљувачке, концентрацију С-реактивног протеина, IgE, миоглобина,⁽¹²⁾ стероида, пептида, лекова.⁽¹³⁾ Током сакупљања пљувачке веома је важно да поступак складиштења не утиче на промену њеног састава. Већина аутора препоручује да се узорци пљувачке што пре замрзну на -20 °С, или још боље на -80 °С, а после одмрзавања поново центрифугују непосредно

пре анализе на апаратима. То је из разлога што се замрзавањем узорака пљувачке спречава разградња молекула и раст бактерија.^(5, 14) Концентрације укупних протеина, глутатиона, малондиалдехида, ткивног фактора активације и сијалинске киселине мерене су у свежем узорку пљувачке, и после 3, 7, 11, 15, 21 и 30 дана чувања на -20 °С. Аутори су закључили да су концентрације глутатиона и ткивног фактора активације стабилне после 30 дана чувања на -20 °С, док је остале маркере пожељно анализирати у свежем узорку.⁽¹⁵⁾

Пљувачка је засићена јонима који се налазе у равнотежном односу са јонима из хидроксиапатита зубне глеђи, посебно јонима калцијума (Са). У пљувачки се Са налази углавном у јонском облику (око 50%), а остатак у комплексу са органским јонима (цитрати) и протеинима пљувачке (статерин, хистатин, пролином-богати гликопротеини).⁽¹⁶⁾ Јони Са имају улогу посредника у везивању различитих неорганских и органских супстанци за површину глеђи, као и улогу у реминерализацији глеђи. Међутим, концентрација Са у пљувачки варира у зависности од концентрације протеина, протока пљувачке и секреције пљувачних жлезда.⁽¹⁷⁾ У нашем истраживању концентрација Са у нестимулисаној пљувачки се не мења при различитим температурама и времену складиштења. Супротно нашим резултатима, други аутори сматрају да је Са нестабилан, јер може да преципитира или гради комплексе са протеинима, фосфатима, цитратима и лактатима, па се препоручује анализа одмах после сакупљања узорака пљувачке.⁽¹⁴⁾

Наши резултати указују да су концентрације натријума (Na) и калијума (K) стабилне до анализе при различитим температурама чувања узорака пљувачке. Натријум пљувачке је важан у одржавању осмотског притиска у екстраћелијској течности. Студије су показале да код обољења пљувачних жлезда (Sjögren синдром) због поремећаја апсорпције на нивоу епителних

ћелија изводних каналића, концентрација Na у пљувачки је већа у односу на здраве испитанике.⁽¹⁸⁾ За разлику од Na, K има већу концентрацију у пљувачки здравих испитаника него у крви због измене Na и K на нивоу изводних канала пљувачних жлезда. Ми смо показали да период чувања узорака пљувачке до месец дана при различитим температурама (+4 °C, -20 °C) није утицао на концентрацију Na, K и Fe (гвожђе) у нестимулисаној пљувачки.

У литератури постоје различити подаци о повезаности концентрације глукозе у крви и концентрације глукозе у пљувачки. Глукоза је присутна у пљувачки здравих испитаника,^(19, 20) али механизам њене секреције још увек није познат. У нашем истраживању није показана статистички значајна разлика у концентрацији глукозе у узорцима пљувачке здравих испитаника, при различитим температурама складиштења. Lasisi и сар. 2012. су доказали већу концентрацију глукозе у пљувачки дијабетичара у односу на недијабетичаре и сматрају да је концентрација глукозе у пљувачки зависна од њене концентрације у серуму.⁽²¹⁾ Аутори сматрају да повећано присуство глукозе у пљувачки оболелих од дијабетеса може да фаворизује размножавање микроорганизама и подстиче њихову колонизацију на зубима и оралној мукози. Анализа глукозе у пљувачки је покушај да се пронађе неинвазиван и безболан начин за често праћење гликемије код дијабетесних болесника.

У пљувачки су преобладајући неполарни липиди, тако да је доказано присуство холестерида, холестерола, триглицерида, диглицерида, моноглицерида, слободних масних киселина. Од поларних липида у пљувачки су присутни: фосфатидил-холин, фосфатидил-етаноламин, сулфатиди.⁽²²⁾ Порекло липида пљувачке још увек није утврђено, као ни њихова физиолошка улога коју испољавају у овом секрету. Ми смо показали да се концентрација триглицерида у нестимулисаној пљувачки не мења на собној температури у односу на складиштење узорака седам дана на +4 °C и

30 дана на -20 °C. Како су у питању претежно неполарни молекули, нерастворљиви у води, поставља се питање њиховог опстанка у воденој фази пљувачке. Доказано је да липиди пљувачке не образују комплексне липопротеинске честице, као што је то случај у крвној плазми. Претпоставља се да липиди пљувачке образују специфичне „агрегате“ са саливарним протеинима и гликопротеинима, чија природа и функција тек треба да се установе. Интересантан је податак да ултрацентрифуговањем пљувачке није могуће издвојити поједине врсте липида, као што је то могуће када су у питању липиди крвне плазме.⁽²³⁾

Уреа је присутна у крви у концентрацији 1,7–8,3 mmol/L, а из крви се транспортује у пљувачку (1,4–3 mmol/L) и у дентални биофилм. Бактеријски ензим уреаза разлаже уреу на два молекула амонијака (NH₃) и један молекул угљен-диоксида (CO₂). Ослобођени амонијак у води даје базу амонијум-хидроксид (NH₄OH). Због тога, разлагање урее од стране бактерија има за последицу алкализацију микросредине биофилма. До сада није анализиран утицај складиштења узорака пљувачке на концентрацију урее. Други радови указују да време узорковања и пол не утичу на концентрацију урее у пљувачки, али је зависна од старости испитаника и нивоа урее у крвном серуму.⁽²⁴⁾ У нашем истраживању није показана разлика у концентрацији урее у пљувачки при различитим температурама складиштења.

Мокраћна киселина је производ метаболизма пуринских нуклеотида. Присуство мокраћне киселине у пљувачки није у потпуности разјашњено, али могуће је да се урати (соли мокраћне киселине) пасивном дифузијом транспортују из циркулације у пљувачку, или настају као последица оксидативног оштећења протеина локалног ткива. Без обзира на њено порекло, сматра се главним антиоксидансом пљувачке, јер учествује у око 70% укупног антиоксидативног капацитета у усној дупљи.^(25, 26) Наша спектрофотометријска анализа нестимулисане пљувачке указује да се концент-

нтрација мокраћне киселине не мења у зависности од начина складиштења и утицаја различитих температура.

ЗАКЉУЧАК

Проблеми преаналитичке фазе сакупљања пљувачке се могу превазићи претретманом узорака, као што је центрифуговање, ради уклањања бактерија и це-

луларног дебриса, и сакупљање и чување узорака на одговарајућим температурама. Узорци пљувачке се до анализе могу чувати на +4 °C до седам дана, а на -20 °C најмање 30 дана, а да не дође до значајне промене концентрације испитаних биохемијских маркера. Стабилност ових биомаркера указује да пљувачка може имати све више удела као дијагностичка течност.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тодоровић Т, Дожић И. Пљувачка и орално здравље. Београд, Чигоја штампа, 2009.
2. Анђелски-Радичевић Б. Упоредно испитивање биохемијског састава серума и саливе. Здравствена заштита 2010; 39(2): 39–44.
3. Andelski-Radičević B, Todorović T. Saliva as possible biochemical material. *Balkan Journal of Clinical Laboratory XVII*, 2009; 1: 123 PP–104.
4. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(4): 781–91.
5. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo E. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta* 2007; 383: 30–40.
6. Ferguson DB. *Oral Bioscience*. Toronto 1999. Churchill Livingstone.
7. Тодоровић Т, Дожић И, Павлица Д, Марковић Д, Ивановић М, Брајовић Г. et al. Могућности употребе пљувачке као дијагностичке течности у стоматологији. *Српски архив за целокупно лекарство* 2005; 133(7–8): 372–8.
8. Andelski-Radičević B, Dožić R, Todorović T, Dožić I. Biochemical Markers in Saliva of Patients with Diabetes Mellitus. *Serbian Dental Journal* 2012; 59(4): 198–204.
9. Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*. 2005; 150(2–3): 119–31.
10. Groschi M. The physiology role of hormones in saliva. *Bioassays* 2009; 31(8): 843–52.
11. Patsalos PN, Berry DJ. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs by use of saliva. *Ther Drug Monit* 2013; 35: 4–29.
12. Topkas E, Keith P, Dimeski G, Cooper-White J, Punyadeera C. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of proteins. *Clinica Chimica Acta* 2012; 413: 1066–70.
13. Groschl M. Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem* 2008; 54: 1759–69.
14. Schipper R, Silletti E, Vingerhoeds M. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *ScienceDirect* 2007; 52: 1114–35.
15. Emekli-Alturfan E, Yarat A, Caliskan-Ak E, Pisiriciler R, Kuru B, Noyan U. Determination of storage time of saliva samples obtained from patients with and without chronic periodontitis for the comparison of some biochemical and cytological parameters. *J. Clin. Lab. Anal.* 2013; 27: 261–6.

16. De Almeida PDV, Gregio AMT, Machado MAN, de Lima AAS, Azevedo LR. Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *J Contemp Dent Pract* 2008; (9)3: 72–80.
17. Larsen MJ, Pearce EI. Saturation of human saliva with respect to calcium salts. *Arch Oral Biol* 2003; 48(4): 317–22.
18. Delwiche J, O'Mahony M. Changes in secreted salivary sodium are sufficient to alter salt taste sensitivity: Use of signal detection measures with continuous monitoring of the oral environment. *Physiol Behav* 1996; 59: 605–11.
19. Jurysta C, Bulur N, Oguzhan B, Satman I, Yilmaz TM, Malaisse WY, et al. Salivary Glucose Concentration and Excretion in Normal and Diabetic Subjects. *J Biomed Biotechnol* 2009; 1–6.
20. Soares MSM, Batista-Filho MMV, Pimentel MJ, Passos IA, Chimenos-Kustner E. Determination of salivary glucose in healthy adults. *Med Oral Patol Oral Y Cir Bucal* 2009; 14(10): e510–3.
21. Lasisi TJ, Fasanmade AA. Salivary flow and composition in diabetic and non-diabetic subjects. *Niger J Physiol Sci* 2012; 27(1): 79–82.
22. Larsson B, Olivecrona G, Ericson T. Lipids in human saliva. *Arch Oral Biol* 1996; 41(1): 105–10.
23. Palmerini CA, Saccardi C, Ferracci F, Arienti S. Lipid patterns in the saliva of smoking young adults. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30(10): 1482–8.
24. Peng C, Xia Y, Wu Y, Zhou Z, Cheng P, Xiao P. Influencing factors for saliva urea and its application in chronic kidney disease. *Clin Biochem* 2013; 46(3): 275–7.
25. Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res* 1994; 21(6): 417–25.
26. Kondakova I, Lissi EA, Pizarro M. Total reactive antioxidant potential in human saliva of smokers and non-smokers. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47(6): 911–20.

Контакт: Prim. mg sc. ph. Биљана Анђелски Радичевић, Општа и орална биохемија, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду, Београд, Др Суботића 8, тел. 0112682373, e-mail biljana.andjelski@stomf.bg.ac.rs