

Pentru materialul de laborator, corespondenta se realizeaza cu titularul de laborator, la adresa de email buzatu.ramona@umft.ro

Laboratorul 11

INVESTIGAȚII BIOCHIMICE ALE SALIVEI. DETERMINAREA AMILAZEI SALIVARE.

1. Saliva. Investigații biochimice.

Cavitatea bucală constituie prima porțiune a tubului digestiv. Glandele salivare sunt principale și accesorii. Cele trei glande mari sunt: glanda parotidă – cea mai voluminoasă, glanda submandibulară – a doua ca mărime, situată sub planșeul bucal, glanda sublinguală – cea mai mică. Mai mult de 90% din salivă este produsă de aceste glande. Glandele accesorii produc 10% din saliva. Sunt 800-1000, răspândite în mucoasa bucală și palatine.

Tipul salivei variază în funcție de glanda secretoare. Saliva parotidiană este seroasă. Saliva submandibulară și sublinguală conține diferite glicoproteine (mucine) și este mai vâscoasă decât cea parotidiană.

Secreția salivei este controlată prin mecanisme nervoase vegetative, reflexul salivator superior și inferior și este influențată de unii hormoni și alte substanțe.

Saliva este un lichid incolor, transparent sau opalescent, vâscos sau seros, care la centrifugare se separă în trei straturi:

- strat superior aerat, spumos
- supernatant lichid opalescent
- sediment alburiu cu leucocite, bacterii și celule epiteliale descumate

Secreția salivară totală este în cantitate medie de 700 ml/24 ore (cu variații de 300-1500 ml). Fluxul salivar scade de 10 ori în timpul somnului.

pH-ul mediu al salivei este cuprins între 6 și 7, cu variație în funcție de alimentație (glucidele scad pH-ul; unele legume, spanacul, cresc pH-ul), e mai acid în timpul nopții, e mai alcalin la copii și mai acid la vârstnici.

Saliva conține 99,5% apă, 0,5% substanță uscată: Ca, Mg, Na, K, NH_4 , Cl și aminoacizi, glucoză, uree, acizi grași. Substanțele organice din salivă sunt azotate proteice (proteine, mucine, enzime) și neproteice (uree, acid uric, creatinină, amoniac), glucide (glucoza), lipide simple și complexe.

Glicoproteinele salivare sunt constituenții majoritari ai secrețiilor vâscoase având ca rol lubrefierea bolului alimentar. Mucinele favorizează formarea plăcii dentare care se mineralizează formând tartrul dentar. Alte proteine fac parte din pelicula de la suprafața smalțului contribuind la menținerea unei concentrații constante de Ca^{2+} . Enzimele provin din bacterii, glande salivare, fluid gingival, leucocite. Lizozimul are acțiune bactericidă, fiind un factor de apărare salivar.

Rolurile salivei:

- funcția digestivă: pregătirea alimentelor prin insalivare, formarea bolului, pasajul bolului alimentar prin faringe și esofag, digestia (amilaza salivară).

- medierea senzației gustative și întreținerea reflexelor salivare prin stimularea mugurilor de gust.

- funcția protectivă: asigură lubrefierea (umidificarea) structurilor moi și dure ale cavității bucale, asigură integritatea dinților și a parodonțiului, are proprietăți antiseptice, asigură elementele minerale pentru formarea smalțului și dentinei, protejează dinții prin

depunerea pe suprafața lor a unui strat subțire de mucină, împiedică solubilizarea smalțului, prin acțiunea sa antibacteriană și prin acțiunea mecanică de spălare protejează dinții față de procesul carios, asigură reparația mucoaselor, menține echilibrul microbian prin lizozim.

- are acțiune de lavaj (spalare) a cavității cu eliminarea resturilor alimentare.

Saliva ca fluid diagnostic:

- principalul factor de apărare din cavitatea bucală, cu importanță în diagnosticul unor afecțiuni locale sau generale.

- avantaje: determinări rapide, neinvazive, probe în cantități reduse, costuri scăzute față de analize din ser și urină, risc redus de expunere la virusuri ca HIV sau hepatitic.

Saliva este un lichid biologic util pentru abordări noi de prognostic, diagnostic de laborator sau clinic și monitorizarea și gestionarea pacienților cu boli orale și sistemice. Este ușor de colectat și depozitat și ideal pentru detectarea precoce a bolii, deoarece conține biomarkeri specifici.

Următorii biomarkeri sunt printre cei care pot fi măsurați prin teste ale salivei:

- alfa amilaza, în boli inflamatorii, stresul acut, boli renale

- glutamat oxaloacetat transaminaza, fosfatază alcalină, în boala parodontală

- cortizolul pentru afecțiuni suprarenale, cum ar fi boala / sindromul Cushing și boala

Addison

- estradiolul, progesteronul și hormonul luteinizant pentru dereglări hormonale, cum ar fi sindromul ovarului polichistic, menopauză

- testosteronul și dehidroepiandrosterona (DHEA) pentru dereglări hormonale, cum ar fi hipogonadismul / andropauză și stări hiperestrogenice

- albumina, acidul uric, cromogranina A, lizozimul pentru tulburări metabolice, cum ar fi rezistența la insulină, diabetul zaharat și sindromul metabolic

- transferina, Cyclin D1, CA15-3 pentru neoplasme benigne și metastatice precum cancerul de sân, cancerul de pancreas și cancerul oral

- anticorpi (ex: anti-HIV, antigen de suprafață HBV și anticorpi anti-VHC, anti-H salivar) pentru afecțiuni infecțioase precum HIV, hepatită virală, amebioză și infecție cu helicobacter pylori

- Imunoglobuline A pentru afecțiuni alergice, cum ar fi alergiile alimentare

- hidroxiprolina și calciul pentru parodontită

- proteina C reactivă, oxid nitric pentru boli cardiovasculare

- etanol, metanol, etilenglicol și dietilen glicol pentru intoxicație cu etanol

- amfetamină, benzodiazepine, canabis, cocaină pentru detectarea drogurilor

2. Determinarea amilazei salivare (ptialina)

Ptialina sau amilaza salivară este rapid inactivată de pH-ul puternic acid al stomacului. Ea **realizează digestia amidonului preparat (fierț sau copt) până la dextrine, maltoză și glucoză**. Prezența salivară a enzimei depinde de specie, ea există la om, primate, șobolan, șoarece. Activitatea enzimatică a salivei este foarte crescută la pacienții cu parodontopatii.

În corpul uman, α -amilazele provin din diferite organe: amilaza pancreatică este produsă de pancreas și eliberată în tractul intestinal; **amilaza salivară este sintetizată în glandele salivare și secretată în salivă**. α -amilazele sunt metaloenzime cu calciu. Aparține clasei hidrolazelor (glicozidaze).

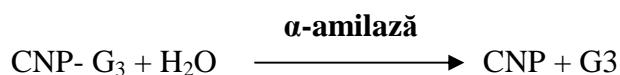
Amilaza prezentă în sânge este excretată în urină. Prin urmare, creșterea activității serice se reflectă într-o creștere a activității amilazei urinare. Măsurarea α -amilazei în ser și urină este utilizată în principal pentru diagnosticul tulburărilor pancreatice, precum și pentru detectarea dezvoltării complicațiilor. În pancreatita acută, activitatea amilazei din sânge crește în câteva ore după debutul durerii abdominale, este maximă după aprox. 12 ore și revine la valori de referință după 5 zile. Specificitatea α -amilazei pentru afecțiunile pancreatice nu este foarte mare, deoarece nivelurile crescute apar de asemenea în parotidită (o inflamație a uneia

sau a ambelor glande parotide, glandele salivare majore) și insuficiență renală. Prin urmare, pentru confirmarea unei pancreatite acute, măsurarea lipazei trebuie efectuată suplimentar.

Secreția α -amilazei de glandele salivare este controlată de semnale nervoase autonome, iar α -amilaza salivară este o corelație a activității simpatice în condiții de stres. **Activitatea α -amilazei salivare crește într-o varietate de condiții fizice de stres (exerciții fizice, căldură și frig) și de stres psihic.**

Aplicația practică

Oligozaharide artificiale de tipul CNP-G₃ (2-cloro-4-nitrofenil maltotriozid) sunt hidrolizate sub acțiunea catalitică a α -amilazelor prezente în ser sau urină. Intensitatea culorii CNP format este direct proporțională cu activitatea α -amilazei și se măsoară spectrofotometric.



CNP = cloro-nitrofenol

G = Glucoză

Reactivi

1. Reactivul R1 (SUBSTRATUL) conține: Tampon MES cu pH = 6.0 - 100 mmol/L; NaCl - 350 mmol/L; Acetat de Ca - 6 mmol/L; Tiocianat de potasiu - 900 mmol/L; CNP-G₃ - 2.27 mmol/L; Stabilizatori și detergenți > 0.1%.

2. Material biologic: saliva (diluție 1:200)

Materiale și aparatură

- Pipete automate 100 - 1000 μ l și 20 - 200 μ l, vârfuri pentru pipeta automată 100 - 1000 μ l și 20 - 200 μ l
- Spectrofotometru UV-VIS, cuve spectrofotometru (pentru 1 ml volum amestec reacție)

În cuva de spectrofotometru se pipetează reactivii conform tabelului:

Reactivi, μ l	Volum
Reactiv de lucru	1000
Probă ser	20

Se amestecă și se măsoară absorbția de radiație inițială a probei (A_0) la timpul zero, față de aer la **405 nm** (420 nm). Cuva se lasă în spectrofotometru și se măsoară absorbția de radiație din nou, după exact 1 (A_1), 2 (A_2) și 3 minute (A_3). Se calculează $\Delta A/\text{min}$:

$$\Delta A/\text{min} = [(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)]/3$$
$$\text{U/L Amilază} = \Delta A/\text{min} \times 10256$$

unde: 10256 = factor derivat din coeficientul molar de absorbție

Valori normale:

27 - 144 UI/L