

Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra chemie a didaktiky chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Sledování změn v proteomickém složení slin
Monitoring of changes in proteomic composition of saliva

Michael Szalay

Vedoucí práce: doc. Mgr. Ing. Štěpánka Kučková, Ph.D.

Studijní program: Specializace v pedagogice

Studijní obor: B BI-CH

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Sledování změn v proteomickém složení slin potvrzuji, že jsem ji vypracoval pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Praha 12. 7. 2019

Tímto bych chtěl poděkovat své vedoucí bakalářské práce doc. Mgr. Ing. Štěpánce Kučkové, Ph.D., za trpělivost, cenné rady a veškerý čas, který mi poskytla.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá zjišťováním rozdílů mezi slinami muže a ženy, ženy v průběhu měsíčního cyklu a ženy gravidní pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) s následným vyhodnocením analýzou hlavních komponent (PCA, Principal Component Analysis) a LC-ESI-Q-TOF (Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Quadrupole – Time of Flight Mass Spectrometry). Pro tyto metody bylo odebráno 69 vzorků slin. 60 vzorků slin muže a ženy bylo štěpeno trypsinem při laboratorní teplotě po dobu dvou hodin. Následně byly přečištěny pomocí ZipTip C₁₈ reverzní fáze. Tímto krokem byly vyextrahovány peptidy, které byly dále smíchány s matricí (2,5-dihydroxybenzoovou kyselinou). Poté byla celá směs nanášena na destičku určenou k měření. Každý vzorek byl nanášen na tři pozice a jednotlivě proměřen. Všechna získaná spektra z měření byla extrahována do počítačového programu R, ve kterém probíhalo vyhodnocování pomocí analýzy hlavních komponent. Výsledkem byly grafy prokazující či neprokazující rozlišení vzorků. Vzorky jsem hodnotil jednotlivě a poté mezi sebou. Rozlišení mezi slinami muže a ženy se neprokázalo, protože mají stejný bílkovinný základ. Ale i přesto můžeme označit tuto metodu za úspěšnou. Pro LC-ESI-Q-TOF bylo použito 9 vzorků. Tři od muže, tři od ženy a tři od gravidní ženy. Touto metodou jsme zjistili nejzastoupenější proteiny ve všech devíti vzorcích.

KLÍČOVÁ SLOVA

sliny, proteiny, enzymové štěpení, hmotnostní spektrometrie, analýza hlavních komponent

ABSTRACT

The bachelor thesis is focused on finding differences between man's and women's saliva using mass spectrometry MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) coupled with PCA (Principal Component Analysis) evaluation and LC-ESI-Q-TOF (Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Quadrupole – Time of Flight Mass Spectrometry). Total amount of 69 saliva samples were collected, 60 of those were broken down by trypsin acting for two hours at laboratory temperature. Consequently the peptide mixtures were cleaned by ZipTip C₁₈ reverse phase. This step was used for peptide extraction and then it was mixed with matrix (2,5-dihydroxybenzoic acid).. Every sample was put into three different positions on measuring plate and separately measured. All data were transferred into software R and analysed by principlecomponent analysis. The results were displayed as graphs which show that there are no differences between man's and woman's saliva, because the protein composition is very similar. Using LC-ESI-Q-TOF nine samples were analysed – three samples coming from man and three from woman, and three from pregnant woman. This method was used to show the most common proteins in all nine samples.

KEYWORDS

saliva, proteins, enzyme digestion, mass spectrometry, Principal Component Analysis

Obsah

Úvod	8
1 Slina	9
1.1 Tvorba slin	9
1.2 Slinné žlázy úst (<i>glandulae salivariae</i>)	10
1.2.1 Žláza příušní (<i>glandula parotis</i>)	10
1.2.2 Žláza podčelistní (<i>glandula submandibularis</i>)	11
1.2.3 Žláza podjazyková (<i>glandula sublingualis</i>)	11
1.3 Funkce slin	11
1.4 Stimulace produkce slin	12
1.4.1 Nervové řízení produkce slin	13
1.4.2 Faktory ovlivňující slinnou sekreci	14
1.4.3 Stádium ovulace	15
1.5 Chemické složení slin	16
1.5.1 Anorganické látky	16
1.5.2 Organické látky	17
1.5.3 Bílkoviny	17
1.5.4 Aminokyseliny	17
1.5.5 Hormony	20
1.5.6 Antimikrobiální složky	21
1.5.7 Inhibitory srážení vápníku a fosfátu	23
1.6 Proteomické metody zkoumání slin	24
1.6.1 Enzymově spojený imuno-sorbentní test (ELISA)	24
1.6.2 HPLC-MS	25
1.6.3 Dvourozměrná elektroforéza s MALDI-TOF/MS	25

1.6.4	Analýza hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF	26
1.6.5	Princip metody MALDI-TOF MS	26
1.6.6	Vyhodnocení výsledků pomocí PCA (Principal Component Analysis).....	26
1.6.7	Enzymatické štěpení trypsinem	27
1.6.8	ZipTip – reverzní fáze C ₁₈	27
1.7	Analýza slin pomocí LC-ESI-Q-TOF hmotnostní spektrometrie.....	27
2	Experimentální část	29
2.1	Použité chemikálie pro experiment.....	29
2.2	Použité přístroje a pomůcky.....	29
2.3	Odběr vzorků	29
2.4	Enzymatické štěpení vzorků	30
2.5	Přečišťování vzorků	30
2.6	Příprava vzorku pro měření	31
2.7	Měření na MALDI-TOF MS	31
2.8	Měření pomocí LC-ESI-Q-TOF MS.....	31
2.9	Vyhodnocení vzorků metodou PCA	32
3	Výsledky a diskuze.....	33
3.1	Výsledky měření na MALDI-TOF	33
3.1.1	Vzorky slin muže.....	33
3.1.2	Rozlišení slin muže a ženy	34
3.1.3	Sliny ženy	35
3.2	Výsledky měření na LC-ESI-Q-TOF.....	36
3.2.1	Složení ranních slin muže.....	36
3.2.2	Složení ranních slin muže v druhém dni	37
3.2.3	Složení odpoledních slin muže	38

3.2.4	Složení ranních slin ženy.....	39
3.2.5	Složení ranních slin ženy z dalšího dne.....	40
3.2.6	Složení odpoledních slin ženy.....	40
3.2.7	Sliny gravidní ženy.....	41
4	Závěr.....	44
5	Seznam zkratek.....	46
6	Seznam použité literatury.....	47

Úvod

Funkce a využití slin v živočišné říši je velice široké. Například plazi, kteří ve svých slinách mají obsaženy jedy, jsou jimi schopni usmrctvat svou kořist. Přezvýkavci, tvoří obrovské množství slin ke zpracování potravy z pastvin. Někteří ptáci si stavějí hnízda za pomoci slin anebo jsou savci (např. kočkovité šelmy), kteří využívají sliny k čištění a dezinfekci srsti. Pro člověka, ale i řadu dalších živočichů, mají sliny značný význam pro jejich život. Díky slinám jsme schopni trávit některé látky přijímané v potravě. Sliny chrání měkké tkáně ústní dutiny před vysycháním, jejich penetrací, tvorbou vředů, přímé bakteriální aktivité, či jiným mikroorganismům v podobě hub či virů a neutralizují reflux kyselin do jícnu. Slouží také k udržení stálosti pH v ústech tím, že přispívají k regulaci pH vytvářeného mikroorganismy tvořící zubní plak. Bakterie, které v něm žijí, metabolizují zbytky potravy v ústech a produkují kyselé metabolity, které snižují pH. Sliny svým neutrálním až lehce zásaditým pH neutralizují tyto kyseliny. Rovněž přispívají k údržbě integrity zubů, a to za pomoci mechanického a karbohydrátového čištění, umožňují remineralizaci zubní skloviny a zabraňují poškozením způsobeným kyselinami. Je tedy zřejmé, že sliny mají značný význam pro naše tělo.

V této bakalářské práci rozebírám proteinové složení slin, jejich funkci a také porovnávám rozdíly mezi slinami muže a ženy. Všechny vzorky byly odebírány stejným způsobem po dobu jednoho měsíce a poté byly podrobeny dvěma různým proteomickým technikám, které jsou založeny na měření hmotnostních spekter s vysokým rozlišením. První z využitých analýz byla metoda MALDI – TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry). Jedná se o metodu, kdy je směs matrice a vzorku ionizována laserem. Nabité ionty se uvolní, vstoupí do vakua v trubici detektoru letu, kde letí rychlostí danou jejich hmotností a nábojem. Měřena je doba letu částice. Získaná data byla podrobena vyhodnocení analýzou hlavních komponent (PCA, Principal Component Analysis). Druhou hmotnostně spektrometrickou metodou byla LC-ESI-Q-TOF MS (Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Quadrupole – Time of Flight Mass Spectrometry).

1 Slina

Slina je bezbarvá nebo lehce zakalená zpěněná tekutina, která se permanentně tvoří v našich ústech. Denně naše tělo vyprodukuje 1,5 až 2 litry slin. Jejich produkce je silně ovlivněna charakterem naší stravy (Mourek, 2012). Jedná se o první z trávicích šťáv, se kterou se sousto dostane do styku. Obsahuje 99,5 % vody a 0,5 % sušiny. pH v ústech je proměnlivé, převážně slabě alkalické a pohybuje se v rozmezí 6,65–7,15. Ve slinách nalezneme jak organické, tak i anorganické látky (Mazánek, 2015).

1.1 Tvorba slin

Produkce slin probíhá ve slinných žlázách a drobných žlázkách v dutině ústní. Ta je ohraničena rty, za kterými se nacházejí zuby, tvrdé a měkké patro a svalstvo spodiny ústní. Na spodině ústní se nachází jazyk. Dutina ústní je vystlána sliznicí, která je bohatě prokrvena a inervována. Sliznice obsahuje vrstevnatý dlaždicový krycí epitel, který chrání sliznici před poškozením při rozměšňování potravy a vrstvičku kolagenního vaziva, ve kterém jsou uloženy drobné smíšené seromucinózní slinné žlázy (Vacek, 1995).

Tři hlavní velké slinné žlázy jsou párové a mají rozdílné složení sekretu; jsou to podjazykové podčelistní a příušní žlázy. Malé slinné žlázy jsou pyskové, tvářové, stoličkové, patrové, jazykové a Ebnerovy (Mazánek, 2015).

Slina vzniká ve dvou fázích. V první dochází k sekreci primární sliny, která probíhá v acinárních buňkách z krevního séra. Tato slina obsahuje H_2O , Na^+ , Cl^- , K^+ a HCO_3^- . Její složení je podobné plazmě, vůči které je izotonická. Ve druhé fázi dochází k úpravě složení slin ve vývodném systému slinných žláz. V nich se resorbují sodné a chloridové ionty z předešlé fáze a secernují hydrogenuhličitan draselný ($KHCO_3$). Výsledná slina obsahuje vyšší koncentraci draslíku a bikarbonátu, než slina primární. Její pH je vyšší a je hypotonická (Trojan, 2003).

Sekrece slin je řízena vegetativním nervovým systémem. Stimulací parasymptiku¹ dojde ke zvýšení prokrvení ve žlázách a tím se zvýší produkce slin, které jsou řidší, tekutější a chudší na obsah α -amylázy. Naopak sympatikus řídí produkci slin hustších, viskózních a bohatých

¹ nervstvo, jehož funkce nepodléhá naší vůli

na mucin a enzymy (Pedersen et al., 2002). U různých emočních stavů, jako jsou strach, obavy, stres, může dojít ke značnému snížení tvorby slin (Yamazaki, 2010).

1.2 Slinné žlázy úst (*glandulae salivariae*)

Slinné žlázy vznikají z epithelu ústní sliznice, jsou obaleny hustým kolagenním vazivem, ze kterého vybíhají vazivová septa do jednotlivých lalůčků (Čihák et al., 2002). Septy probíhají cévy a nervová vlákna, která vedou výživu buněk a vzruchy vegetativního nervového systému. Tyto žlázy jsou exokrinního typu a obsahují exokrinní buňky, což znamená, že sekret, který vyprodukují, je veden do cílového místa. Rozeznáváme tři typy těchto buněk: serózní, které tvoří aciny², ty mají tvar pyramid a jsou bazofilní. Svým širokým zakončením jsou připojeny na bazální laminu a v apikální části se nachází zymogenní granula, která exocytózou vypouští serózní buňky do dutiny ústní. Tyto buňky secernují především proteiny, a to díky bohatě vyvinutému endoplazmatickému retikulu.

Druhým typem jsou buňky mucinózní. Ty produkují především hlen. Od serózních buněk se liší tvarem. Jsou kubického nebo cylindrického tvaru a tvoří mucinózní tubuly. Taktéž mají velmi vyvinuté endoplazmatické retikulum a tvoří proteiny (Martínek & Vacek, 2008).

Třetím typem jsou buňky myoepitelové. Jedná se o ploché epitelové buňky ležící mezi bazální laminou a sekreční buňkou. Jsou schopny kontrakce, a to za pomoci aktinových a myozinových filament. Díky tomu je sekreční buňce umožněno rychleji vypudit sekret. Tento typ buněk se označuje jako svalový epitel, který má stejnou strukturu jako hladká svalovina (Čihák et al., 2002).

1.2.1 Žláza příušní (*glandula parotis*)

Je největší slinnou žlázou. Nachází se na povrchu žvýkacího svalu, směřuje k ušnímu boltci a přechází až za krček a hlavici mandibuly³ k chrupavčitému zvukovodu (Čihák et al., 2002). Její vývod je dlouhý 5–6 cm, přechází přes přední okraj žvýkacího svalu a ústí do ústní dutiny ve výšce druhé horní stoličky. Příušní žláza produkuje přibližně jednu třetinu celkového množství slin s vysokým obsahem α -amylázy. Jedná se o složenou žlázu alveolární, čistě serózní, tudíž je slina řídká, vodnatá a bohatá na enzym ptyalín neboli α -

² serózní alveoly – zakončení vývodu serózní žlázy s hustě nakupenými buňkami

³ spodní čelist

amylázu (Dylevský, 2009). Příušní žláza je složena z laloků a lalůček, které jsou tvořeny z rozvětvených alveolů, vystlaných serózními buňkami. Z nich vycházejí vsunuté vývody, vystlané jednovrstevným epitelem a na ně navazují vývody žíhané, které obsahují epitel cylindrický s eozinofilní cytoplazmou (Vacek, 1995).

1.2.2 Žláza podčelistní (*glandula submandibularis*)

Je oploštělá, oválného tvaru a nachází se v podčelistním trojúhelníku (*trigonum submandibulare*). Jedná se o žlázu seromucinózní, slina je hustší, vazká a bohatá na hlen (Vacek, 1995). Obsahuje jak serózní alveoly se vsunutými a žíhanými vývody, tak i mucinózní tubuly (Čihák et al., 2002).

1.2.3 Žláza podjazyková (*glandula sublingualis*)

Tato žláza má protáhlý tvar a tvoří skupinu deseti až dvanácti žláz. Laterálně naléhá na spodní čelist a shora na jazykočelistní sval. Hlavním vývodem je *ductus submandibularis*, který je společným vývodem i pro žlázu podčelistní. Spadá mezi seromucinózní žlázy s převahou složky mucinózní (Čihák et al., 2002). Lalůčky se skládají z tuboalveolárních žlázek, které jsou vystlány mucinózními buňkami, zatímco alveolární rozšíření je vystláno buňkami serózními (Vacek, 1995).

1.3 Funkce slin

Sliny zastávají mnoho funkcí pro tělo, a to hlavně svým specifickým složením. Spadá sem funkce mechanická. Ta spočívá ve zvlhčování sousta a povrchu sliznice, podporuje artikulaci, usnadňuje čištění ústní dutiny, formuje bolus⁴ a napomáhá žvýkání (Pedersen et al., 2002). Další funkcí je funkce trávící s chemickým účinkem. Ta zajišťuje enzymatické štěpení škrobu na maltózu a dextrin, pomocí trávících enzymů. Hlavními složkou je amyláza což je glykolytický ferment a také ferment proteolytický a lipolytický, jako je proteáza a lipáza. To je velice užitečné pro kojence, protože mateřské mléko obsahuje mnoho tuků.

Sliny také slouží k ochraně před infekcemi a tvorbě kazu. Sliny obsahují fluor a vápník. Oba tyto prvky začleňují do skloviny a tím ji vytvrzují. Pokud je sklovina omývána slinou,

⁴ sousto

dochází k neustálé výměně vápenatých a fosfátových iontů mezi slinou a povrchem skloviny. Při neutrálním pH se ustaví rovnováha mezi minerály ve slině a plaku a minerály skloviny. Pokud dojde k narušení této rovnováhy organickými kyselinami, které se vytvořily jako produkty metabolismu bakterií, sklovina se rozpouští a přichází o minerály. Fosfáty a vápník opouštějí sklovinu a dochází k její demineralizaci. Slina tyto organické kyseliny neutralizuje, snižuje rychlost demineralizace a brání tak vzniku zubního kazu. Tuto schopnost nazýváme pufrací kapacita sliny a je vyjádřena množstvím neutrálních látek ve slině. Ve slinách rozeznáváme tři systémy vyrovnávající pH, tzv. pufrů: bikarbonátové, fosfátové a bílkoviny. Při příjmu potravy se nejvíce uplatňuje pufr bikarbonátový ($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$), který je zodpovědný až za 90 % pufrací kapacity. Během nestimulovaného slinného průtoku je jeho koncentrace téměř rovna koncentraci fosfátového pufru, a tak k vyrovnání pH přispívají oba téměř stejnou měrou. Při nízkém pH (nižší než 5) se především uplatňují bílkoviny (Bardow et al., 2000; Lilienthal, 1955). Tudíž sliny zachovávají stabilní pH v prostředí ústní dutiny a udržují mikrobiální symbiózu. Obsahují látky, které jsou bakteriostatické, ale také baktericidní. Mezi baktericidní látky patří lysozym, mucin, properdin a tropiny (Mourek, 2012). Po polknutí v ústech zůstávají zbytkové sliny, které vytváří na povrchu zubů a sliznice tenký film – pelikulu. Ta se ihned po čištění vytváří na zubních ploškách. Obsahuje mucin, enzymy, antibakteriální proteiny a imunoglobuliny. Pelikula chrání povrch skloviny, díky schopnosti odolávat slabým kyselinám a slouží jako zásobník vápenatých a fosfátových iontů.

Další je funkce vylučovací. Pomocí slin jsme schopni vylučovat různé chemické prvky, jako jsou halogeny, vápník, stříbro, zlato, arzen, rtuť, železo, olovo či bismut. Dalšími látkami, které sliny vylučují, jsou amoniak a různé zbytky antibiotik, jako je penicilin, tetracyklin a sulfonamidy. Ve slinách můžeme také nalézt látky, které mají bezprostřední vztah k některým autoimunitním chorobám, k poruchám homeostázy vodního prostředí a k onemocnění štítné žlázy. Takovými to látkami jsou především gamaglobuliny, draslík a jód (Rokyta, 2000).

1.4 Stimulace produkce slin

Hlavními podněty k produkci slin jsou čichové a zrakové vjemy. Stejným způsobem mohou fungovat i podněty abstraktní, jakou jsou představy, či hovory o jídle. Další mohou být

mechanické podněty, jako je podráždění sliznice soustem, nebo vjem chuti na jazykovém pohárku (Machová, 2008).

1.4.1 Nervové řízení produkce slin

Produkce je řízena pomocí podmíněných a nepodmíněných reflexů vegetativního nervového systému, tudíž sympatikem a parasympatikem. Centrum pro řízení tvorby slin se nalézá v prodloužené míše, kam se přenáší signály hlavně z hypothalamu a koncového mozku. Tudíž se zde musí uplatňovat oba oddíly receptorů pro vegetativní nervový systém (Rokyta, 2000). Pro sympatikus to jsou receptory α -adrenergní a β -adrenergní, kde dochází pomocí noradrenalinu k aktivaci adenylátcyklázy, která mění adenosintrifosfát (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). cAMP zaktivuje proteinkinázu A katalyzující fosforylaci proteinů. Tímto procesem se vytvoří vazká slina s vysokým obsahem mucinu. Z parasympatiku je uvolňován acetylcholin, který se naváže na receptory cholinergní muskarinového typu a receptory peptidergní. Tím dojde k aktivaci fosfolipázy C, která bude dále štěpit fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol (Trojan, 2003). Hlavními mediátory, které přenáší informace ze salivačního centra prodloužené míchy jsou u parasympatiku acetylcholin a substance P ⁽⁵⁾ a u sympatiku se jedná o noradrenalin (Campbell et al., 2006). K tvorbě dochází pomocí srážení molekul neurotransmiterů (acetylcholinu a norepinefrinu) na proteiny receptoru buněčného povrchu. Tyto neurotransmitery se váží na muskarin-cholinergní a α -adrenergní receptory. Transdukce extracelulárního signálu vyžaduje integrální membránový protein schopný vázat guanosintrifosfát (GTP), G protein, který specificky interaguje s receptorem (Baum et al., 1993). Přeprava tekutin a elektrolytů je řízena transepiteliálním pohybem chloridových iontů. Otevření chloridových kanálů v apikální membráně acinárních buněk slinných žláz iniciuje proces sekrece tekutin. Zatímco aktivace chloridových kanálů v apikálních i bazolaterálních membránách duktálních buněk je nezbytný pro re-absorpci chloridu sodného. Rychlost proudění a složení se značně liší v závislosti na typu stimulace. Ve slinných buňkách bylo nalezeno až pět tříd chloridových kanálů se zřetelnými gatingovými mechanismy. Jeden z nich je aktivován intracelulárním vápenatým kationtem, zatímco druhý je řízen cAMP. Zvýšení intracelulární volné koncentrace vápenatých iontů je dominantním

⁵ polypeptid s neuropřenašecovou funkcí v mozkové tkáni

mechanismem spouštějícím sekrety tekutiny z acinárních buněk. Zatímco cAMP může být vyžadován pro účinnou re-absorpci chloridu sodného v mnoha duktálních buňkách (Melvin, 1999).

1.4.2 Faktory ovlivňující slinnou sekreci

Existuje mnoho faktorů, které mají podíl na ovlivnění slinné sekrece, například pohlaví, věk, denní doba, světlo, kouření, tělesná aktivita, stupeň hydratace organismu a další. Množství vyprodukovaných slin se proto může mezi jednotlivci lišit i za různých okolností.

Nejpodstatnějším faktorem ovlivňujícím slinnou sekreci je míra hydratace organismu. Dospělý muž má v těle 63 % vody z jeho celkové hmotnosti, u žen je to o 10 % méně. Pokud v organismu dojde ke ztrátě vody o 6–10 %, slinná sekrece se sníží téměř na nulu, naopak při hyperhydrataci se zvýší (Dawes, 1987).

Sekrece slin se mění s denním rytmem. Nestimulovaná dosahuje svého maxima během odpoledne, kolem 16:30, naopak nejméně jsou sliny vylučovány v noci (Dawes, 1972).

Dalšími vlivy na slinnou sekreci mají světlo a kouření. Pokles slinné sekrece o 30–40 % vykazovali lidé, kteří byli umístěni do temné místnosti, nebo ti, kteří měli zavázané oči. Nicméně u nevidomých lidí byla slinná sekrece stejná, v porovnání s lidmi se zdravým zrakem, což nasvědčuje přizpůsobení oka nevidomého na nedostatek světla, které vstupuje do očí (de Almeida et al., 2008). Opačným stimulantem je tabák, který svými dráždivými účinky vylučování slin zvyšuje (Maier et al., 1988), nestimulovaná slinná sekrece je u kuřáků výrazně vyšší než u nekuřáků (Axelsson et al., 1998).

Tělesný pohyb je dalším faktorem, který může zvyšovat sekreci a vyvolávat změny ve složení slinných komponent, jako jsou hormony, imunoglobuliny, proteiny a elektrolyty, zejména Na^+ a K^+ (Chicharro et al., 1998). Navíc při vyšší fyzické zátěži narůstá hladina α -amylázy.

Spojitosť slinné sekrece s pohlavím nebyla nijak prokázána (Shern et al., 1993). Ale existují dvě teorie, které popisují nižší sekreci u žen. V první je uvedeno, že ženy mají ve srovnání s muži menší slinné žlázy, a proto produkují méně slin. Druhá je založena na hormonálních změnách žen, které mohou přispívat k omezení slinné sekrece (Percival et al., 1994). Ovšem menopauza ani užívání hormonální antikoncepce nejsou spojeny s dysfunkcí slinných žláz

(Ghezzi et al., 2000). Navíc nebyly prokázány žádné rozdíly mezi zdravými ženami před a po menopauze a mezi ženami po menopauze s hormonální léčbou a bez ní (Ship et al., 1991).

Vliv stárnutí na produkci slin je zatím nejasný kvůli protichůdným vyjádření v odborné literatuře. Analýzy tkání prokázaly postupné nahrazování tkáně slinných žláz tukem a fibrovaskulární⁶ tkání a snižování počtu acinů (Azevado et al., 2005). Navzdory tomu funkční studie ukazují, že stárnutí samo o sobě nemusí vést ke snížení funkce slinných žláz (Nagler, 2004). (Navazesh et al., 1992) zjistil, že nestimulovaná slinná sekrece je mnohem nižší u zdravých pacientů ve věku 65–83 let, než u pacientů ve věku 18–35 let. Avšak celková stimulovaná slinná sekrece byla u starších osob výrazně vyšší.

1.4.3 Stádium ovulace

Lidské sliny obsahují mnoho molekul, které mají různé funkce. Mezi nimi jsou proteiny, které slouží jako biomarkery různých fyziologických anebo patologických stavů. Ve srovnání s jinými tělními tekutinami je slina jedním z nejvhodnějších materiálů pro výzkum a monitorování. Pro dnešní dobu je důležité, aby se našla neinvazivní metoda pro identifikaci doby ovulace, k zajištění úspěšného oplodnění a pro vyvíjející se strategie pro plánování rodiny. Výzkum (Saibaba et al., 2016) se pokoušel identifikovat jeden nebo více proteinů v lidské slině, které by byly indikátorem ovulace. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) slinných proteinů vykazovala sedm prominentních pásů během různých fází menstruačního cyklu. Zvláště v průběhu ovulační fáze byl vysoce exprimován jeden z pásů. V něm bylo identifikováno jedenáct proteinů, z nichž deset bylo vysoce specifických pro ovulační fázi. Mezi těmito proteiny byla intenzivní exprese cystatiny-S. Také bylo odhaleno vysoké procento proteinů, které se účastní vazebných a regulačních aktivit. Tyto výsledky ukazují, že slinné proteiny, zejména ty, které jsou přítomny během ovulační fáze, mohou být použity jako biomarkery pro období ovulace. Studie (Alagendran et al., 2013) ukázala, že ferninng⁷ je způsoben tvorbou krystalů chloridu sodného (NaCl) s přítomností mucinů, což je spojeno s hormonálními změnami estrogenů během období menstruačního cyklu. Dále bylo vypořádováno, že celková

⁶ tvořený vazivem a cévami

⁷ tzv. „kapradinový test“ sloužící k prokázání přítomnosti plodové vody a pro nepřímý důkaz ovulace a plodnosti

koncentrace slinných proteinů je významně vyšší v ovulační fázi ve srovnání s preovulační a postovulační fázi. Párové testy odhalily významné rozdíly mezi ovulační a preovulační a ovulační a postovulační fázi. Nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi preovulační a postovulační fázi, což naznačuje specifický účinek ovulace na koncentraci slinných proteinů. Variace koncentrace proteinů může být způsobena tvorbou nárůstu luteinizačního hormonu, který napodobuje estrogen v den před ovulační fázi.

1.5 Chemické složení slin

Slina se skládá z 99,5 % vody a 0,5 % anorganických a organických látek. V širším slova smyslu je slina směsí sekretu slinných žláz, transudátu⁸ ústní sliznice, gingivální tekutiny⁹, hlenu z nosní dutiny a hltanu, orálních bakterií, odloupaných buněk epitelu a zbytků jídla (Edgar, 1992).

1.5.1 Anorganické látky

Mezi anorganické látky obsažené ve slině patří: fosfát, fluorid, hydrogenuhličitanový aniont, vápník, sodík, chlorid, lithium, olovo, kadmium, thiokyanatan, měď a další. Vápník, fosfát a fluor jsou podrobněji popsány v navazujícím textu, a to z důvodu jejich remineralizačního potenciálu, díky kterému napomáhají chránit zub před tvorbou zubního kazu (Lukáčová, 2007).

Vápník se vyskytuje v podobě dvojmocného kationtu anebo jako neionizovaný v závislosti na pH. Ionizovaný vápník je potřebný pro neustálou výměnu vápenatých iontů mezi slinou a povrchem zubu, čímž napomáhá k udržování integrity zubní skloviny. Vápník, který je ionizovaný, je součástí anorganických sloučenin (fluorid vápenatý) a organických makromolekul (proteinů bohatých na prolin, statherinů). Vápník je také nezbytný pro funkci amylázy. Koncentrace vápenatých kationtů ve slinách stoupá se zvyšujícím se objemem vylučované sliny (de Almeida et al., 2008).

Fosfát je solí kyseliny fosforečné, která se ve slině vyskytuje v několika sloučeninách. Jendou z nejdůležitějších funkcí fosfátu je zvyšování odolnosti zubní skloviny proti

⁸ nezánětlivá tekutina hromadící se v tělních dutinách

⁹ dásňová tekutina

působení kyselin produkovaných bakteriemi. Dále působí jako pufr. V případě zvýšení slinného průtoku koncentrace fosfátu ve slině klesne (de Almeida et al., 2008).

Fluor je nejúčinnějším prvkem působícím proti zubnímu kazu. Jeho schopnost ukládat se do skloviny, kde nahrazuje hydroxylovou skupinu hydroxyapatitu za vzniku fluorohydroxyapatitu, který je odolnější vůči kyselinám. Jeho koncentrace ve slině závisí na místní a systémové aplikaci. Systémově je fluor přijímán ve vodě, soli, potravinách a v případě nedostatku ve fluoridových tabletách. V dnešní době se využívá lokální aplikace. A to zejména využíváním zubních past, ústních vod s fluoridy, aplikací fluoridových roztoků, laků a gelů. Hlavním cílem je dosáhnout ochranné koncentrace fluoridů ve vrstvě skloviny a zvýšit její odolnost vůči kyselinám (Humphrey & Williamson, 2001).

1.5.2 Organické látky

Ve slině můžeme naléznout širokou škálu organických sloučenin. Patří mezi ně bílkoviny, trávící enzymy lipáza a amyláza, mucin, antimikrobiální látky a látky bránící samovolnému srážení vápenatých a fosfátových solí. Dále se ve slině nachází hormony, mastné kyseliny, glukóza, močovina, amoniak a mnoho dalších organických látek (de Almeida et al., 2008).

1.5.3 Bílkoviny

Jsou makromolekulární látky vzniklé proteosyntézou z aminokyselin. V jedné molekule bílkoviny se vyskytuje více než sto aminokyselin, které jsou vzájemně spojeny peptidovou vazbou. Mezi nejčastěji se vyskytující bílkoviny ve slinách patří enzym amyláza, glykoproteiny a muciny, imunologicky lze detegovat prealbumin, imunoglobuliny, albumin, transferin a další (Thomas, 1998).

1.5.4 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou základním kamenem všech proteinů a peptidů. V každé molekule aminokyseliny se nalézá aminoskupina ($-NH_2$) a skupina karboxylová ($-COOH$). Nejčastěji se v různých proteinech organismů vyskytuje dvacet tzv. proteinogenních aminokyselin. Všech dvacet aminokyselin krom glycinu, jsou opticky aktivní, což znamená, že jsou schopny stáčet rovinu polarizovaného světla. Tyto látky jsme schopni rozeznat kvůli výskytu chirálního uhlíku v jejich struktuře. Nejdůležitějšími aminokyselinami pro tělo živočichů

jsou tzv. esenciální aminokyseliny. Tyto látky si tělo neumí samo vyrobit a musí je přijímat potravou. Mezi tyto aminokyseliny patří leucin, valin, isoleucin, lysin, threonin, methionin, fenylalanin a tryptofan.

Proteosyntéza

Proteosyntéza je biologicko-chemický děj, při kterém vznikají proteiny. První fází syntézy je transkripce neboli přepis. V této fázi dochází k syntéze molekuly RNA podle matrice DNA, která nese kódovanou informaci. Nasyntetizovaná molekula RNA, která určuje sekvenci aminokyselin, se nazývá messenger RNA (mRNA) nebo také informační RNA. Dále dochází k posttranskripčním úpravám molekuly. Po těchto úpravách se molekula RNA naváže na ribozom (obsahující ribozomální RNA – rRNA), kde dochází k procesu translace. Tento proces se zahájí připojením aminokyseliny methioninu na transferovou RNA (tRNA) a jeho přenesením na mRNA, kde se stane první aminokyselinou v nově syntetizovaném proteinovém řetězci. Děj translace končí ve chvíli, kdy se objeví sekvence UAA, UAG, UGA neboli stop-kodony. Tímto procesem vznikne tzv. polypeptidové vlákno, které se dále v buňce upravuje tzv. posttranslačními úpravami na určitou bílkovinu (Šípek, 2014).

Struktura bílkovin

U bílkovin rozlišujeme čtyři typy struktur: primární, sekundární, terciární a kvarterní. U primární struktury rozlišujeme pouze sekvence aminokyselin vázané peptidovou vazbou (-CO-NH-). Sekundární struktura je typická stáčením a sklápěním primární struktury. Ty nazýváme šroubovice, neboli α -helix a β -struktura skládaného listu. Skládáním a spojováním sekundární struktury vzniká struktura terciální. Kvarterní struktura vzniká spojením polypeptidů terciální struktury. Tato struktura je tvořena stejnými anebo odlišnými podjednotkami. Podjednotky jsou mezi sebou vázané kovalentními nebo nekovalentními vazbami. Některé bílkoviny mohou ve své molekule obsahovat nepeptidovou část. Takovouto částí mohou být kovové ionty nebo organické molekuly.

Amyláza (α -amyláza, ptyalin) je jedním z nejdůležitějších trávicích enzymů obsažených ve slinách. Většina amylázy je vylučována průšňí slinnou žlázou a její koncentrace se zvyšuje se slinným průtokem (Noble, 2000) (Almstáhl et al., 2001). V těle se vyskytuje ve dvou formách, jako slinný pankreatický izoenzym, podle toho, jakým orgánem je vylučován.

Schopností amylázy je rozkládat škrob na jednodušší cukry. První fáze rozkladu se odehrává v ústech, druhá v horní části tenkého střeva v okamžiku, kdy se bolus setká s pankreatickou α -amylázou. Ideální pH pro funkci pankreatické amylázy je kolem 6,8 (Rosenblum et al., 1988).

Lingvální lipáza je trávicí enzym vylučovaný Ebnerovými žlázkami, které jsou umístěny na kořeni jazyka pod hrazenými papilami (Hamosh & Scow, 1973). Podobně jako amyláza, i lipáza je produkována pankreatem. Již v dutině ústní a žaludku štěpí složené tuky na jednodušší tuky a mastné kyseliny (Hamosh & Burns, 1977). Tato lipáza má pro dospělé nevýznamnou funkci, ale naopak pro novorozence je nepostradatelná. Po narození je totiž tuk, obsažený v mateřském mléce, hlavním zdrojem výživy. Jeho absorpce je ale nižší než u dospělých díky nedostatečnému množství pankreatické lipázy. Proto je lingvální lipáza hlavním enzymem katalyzující rozklad tuků v potravě u novorozenců (Smith et al., 1986).

Mucin patří mezi glykoproteiny, který v ústech zastává několik funkcí. Poskytuje ochranou bariéru tvrdým a měkkým zubním tkáním před vnějším prostředím, lubrikuje povrchy ústní dutiny, napomáhá při žvýkání, polykání a řeči (Tabak, 1995). V lidských slinách se nacházejí převážně dva geneticky odlišné typy mucinu: vysokomolekulární mucin (MG1) a nízkomolekulární mucin (MG2) (Levine et al., 1987). Vysokomolekulární mucin patří do skupiny mucinů, které jsou hlavní složkou hlenové vrstvy pokrývající sliznici trávicího traktu, urogenitálního traktu a dýchacích cest (Sharma et al., 1998). Mají funkci bariéry, která brání sliznici před mechanickým poškozením a přímému vstupu bakterií a virů do organismu. Vysokomolekulární mucin tvoří v dutině ústní hlavní složku pelikuly, která chrání zubní tkáň před kyselým prostředím a ovlivňuje bakteriální kolonizaci. Výzkumy zaměřené na identifikaci bakterií vážících se na MG1 odhalily jen několik málo druhů schopných této vazby, např. *Helicobacter pylori* a *Haemophilus parainfluenza* (Bosch et al., 2000). Nízkomolekulární mucin (MG2) je jedním z hlavních aglutinačních faktorů ve slinách, které zapříčiňují shlukování bakterií. Několik studií prokázalo vazbu MG2 k *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus sanguis*, *mitis*, *gordonii* a *Escherichia coli* (Groenink et al., 1996; Moshier et al., 1996; Murray et al., 1992).

1.5.5 Hormony

Jsou sloučeniny sloužící jako chemický přenašeč. Obecně jsou produkovány v tělech mnohobuněčných organismů. Působení hormonu závisí na detekci buňkou, musí proto interagovat se specifickým buněčným receptorem, který následně spustí kaskádu sekundárních reakcí, které vedou až pro hormon typické odezvě (Silbernagl, 1993). Lidské hormony jsou produkty žláz s vnitřní sekrecí, nebo tkání produkující hormony, vylučované přímo do krevního oběhu. Mají specifický účinek, tzn. že nemohou být nahrazeny žádnou jinou látkou (Trojan, 2003).

Kortizol patří mezi glukokortikoidy a je produkován kůrou nadledvin. Produkce kortizolu je silně stimulována adrenokortikotropním hormonem (ACTH), který je vylučován adenohypofýzou. Funkcí kortizolu je zvyšovat celkovou pohotovost organismu při zátěžových v situacích. Má katabolické účinky a je zúčastněn u všech přeměn základních živin. Stimuluje glukoneogenezi, lipolýzu, glykogenezi, snižuje vstřebávání glukózy ve svalech a trávicím traktu, čímž ji šetří pro mozek. Stimuluje centrální nervovou soustavu a zvyšuje její dráždivost a emoční labilitu. Ovlivňuje vstřebávání vápníku a způsobuje také retenci sodíku a tím i zadržování vody v organismu. V průběhu zánětu snižuje propustnost kapilár a stabilizuje lyzozomální membránu a snižuje koncentraci lymfocytů. Nepůsobí na příčinu zánětu, ale zmírňuje jeho příznaky (Ledvina, 2004).

Thyroxin je hormon produkován buňkami štítné žlázy. Jeho funkcí je vázat jód v těle a ovlivňuje jeho výměnu v tělních buňkách. Samotný thyroxin je prohormon, vlastní účinný hormon se z něj vytvoří až v cílových tkáních v podobě trijodtroniinu. V cílových tkáních pak řídí oxidaci živin. Ovlivňuje činnost nervstva a pohlavních žláz (Rokyta, 2000).

Melatonin je hormon produkován nadvěskem mozkovým (epifýzou) a to především v noci. Svou vysokou rozpustností v tucích i vodě lehce prochází skrz buněčnou membránu. Po jeho uvolnění se dostává do tělních tekutin, jako jsou sliny, moč, mozkomíšní mok, sperma a mateřské mléko. Jeho vlivem na hypotalamo-hypofyzární systém má za následek nutkání ke spánku. Podílí se na regulaci celoročního rytmu. Má také silné antioxidační účinky, vychytává vysoce toxické hydroxylové a kyslíkové radikály. Zvyšuje hladiny antioxidačních enzymů, jako je například peroxidáza (Carpentieri et al., 2012).

1.5.6 Antimikrobiální složky

Během vývoje byla dutina ústní v kontaktu s celou řadou mikrobů, proto jsou ve slině obsaženy různé druhy makromolekul s antimikrobiálními účinky. Způsob jejich antimikrobiálního působení se liší a některé látky mají více než jednu funkci (J Tenovuo et al., 1991).

Lysozym je vyměšován z malých a velkých slinných žláz, gingivální tekutiny a slinných leukocytů (Lagerlöf, 1994). Jeho specifické antibakteriální vlastnosti jsou založeny na schopnosti rozložit vazby mezi složkami buněčné stěny grampozitivních bakterií (Edgar, 1992; Humphrey et al., 2001). Další vlastností lysozymu je schopnost aktivovat bakteriální autolytické enzymy, které zničí bakteriální buněčné komponenty (Laible & Germaine, 1982). Gramnegativní bakterie jsou odolnější vůči lysozymu díky své vnější lipopolysacharidové vrstvě (Edgar, 1992; Humphrey & Williamson, 2001).

Laktoferin je glykoprotein s multifunkčními vlastnostmi secernovaný serózními buňkami slinných žláz (Lagerlöf, 1994). Je obsažen nejen ve slinách, ale také v sekretech žlučníku, slinivky břišní, slzách a mateřském mléce. Má baktericidní, bakteriostatické, fungicidní, antivirové, protizánětlivé a imunomodulační účinky (Edgar, 1992; Humphrey & Williamson, 2001). Bakteriostatický efekt funguje na principu vychytávání železa, které je nezbytnou součástí bakteriální výživy, ze slizničních povrchů (Végh, 2009). Baktericidní působení laktoferinu se vyznačuje schopností navázat se na povrch bakteriálních buněk, narušit jejich integritu a zapříčinit tak aglutinaci např. *Streptococcus mutans* (R. Arnold et al., 1980; R. R. Arnold & Cole, 1977; R. R. Arnold et al., 1982). Laktoferin také působí proti několika dalším lidským a zvířecím virům, např. proti HIV (Harmsen et al., 1995), herpes simplex viru (Fujihara & Hayashi, 1995), viru hepatitidy C (Azzam et al., 2007) a cytomegaloviru (Andersen et al., 2001). Naváže se na jejich povrch a zamezí vstupu do hostitelských buněk.

Agglutiny jsou proteiny komunikující s bakteriemi prostřednictvím antigenů. Zapříčiňují jejich shlukování do větších celků, které jsou následně slinou spláchnuty z úst při polykání (Tenovuo & Lagerlöf, 1994). Agregují a odstraňují streptokoky z dutiny ústní a jsou tak důležitým modulátorem tvorby zubního plaku v počáteční fázi jeho tvorby (Carlen et al.,

1998). I jiné proteiny, než aglutininy mají aglutinační schopnost. Jsou to např. lysozym, mucin nebo sekreční imunoglobuliny A (Tenovuo, 2002).

Peroxidázový systém (peroxidáza) se skládá ze dvou enzymů: laktoperoxidázy, která je produkována buňkami slinných žláz, a myeloperoxidázy vytvořené leukocyty. Ty do dutiny ústní migrují z gingiválního sulku (Lagerlöf, 1994). Laktoperoxidáza rozkládá peroxid vodíku (H_2O_2), ten je produktem metabolismu aerobních bakterií úst, na kyslík a vodu. Hlavní funkcí peroxidázového systému je antimikrobiální činnost a ochrana buněk hostitele před toxicitou peroxidu vodíku (Tenovuo & Pruitt, 1984). Peroxidáza také katalyzuje reakci peroxidu vodíku se slinným thiokyanatanem za vzniku volných radikálů toxických pro bakterie (Carlsson, 1987; Thomas et al., 1981).

Imunoglobuliny (Ig) tvoří největší antimikrobiální složku slin. Jedná se o protilátky, které jsou součástí imunitního systému. Účastní se boje proti bakteriálním antigenům a jsou schopny bakterie agregovat nebo inhibovat jejich adheenci v ústech. Nejčastěji se vyskytujícím imunoglobulinem je slizniční IgA, který je produkován plazmatickými buňkami slinných žláz. Po jeho sekreci na povrch sliznice dochází k neutralizaci antigenů (Tappuni & Challacombe, 1994). Tvorba specifických IgA proti určitým bakteriím koreluje s bakteriální kolonizací ústní dutiny. U novorozenců IgA ve slině chybí, ale po prvním týdnu života se již začne tvořit (Cole et al., 1998). Během 1. a 2. měsíce věku lze ve slinách kojence rozeznat specifické IgA proti *Streptococcus mitis* a *salivarius*, které se během vývoje v prvních letech kvalitativně i kvantitativně zvyšují. Specifické IgA proti streptokokům vyžadují pro svou kolonizaci tvrdé povrchy, příkladem jsou protilátky proti *Streptococcus mutans* a *sanguis*. Ty se začínají tvořit po erupci zubů (Smith & Taubman, 1992). Oproti tomu IgG lze nalézt již ve slinách novorozenců, protože jako jediný z imunoglobulinů může být transportován přes placentu a chránit tak plod před choroboplodnými zárodky. Po narození jeho koncentrace ve slině klesá na nepatrnou hladinu a znovu jej lze zaznamenat až po erupci zubů (Lenander-Lumikari & Loimaranta, 2000).

Cytokiny jsou malé proteiny, které jsou produkovány různými typy buněk odpovídající za imunitní odpověď, jako jsou makrofágy, B lymfocyty, T lymfocyty a endotelové buňky (Lackie, 2010). Působí na cílové buňky nesoucí receptory pro specifický cytokin. Mohou působit autokrinně na stejnou buňku, která je sekretovala, nebo parakrinně na vedlejší buňky,

nebo endokrinně a ty se pak váží na buňky vzdálené. Navázání cytokinu na buněčný receptor přinese signál do buňky a vede k aktivování a expresi genu. Jejich vlastností je regulace intenzity a trvání imunitní odpovědi stimulací a inhibicí proliferace různých buněk.

- **Interleukin 8** je hojně zastoupeným cytokinem ve slinách. Primárně je produkován monocyty a má různé účinky na neutrofilů. V jeho přítomnosti neutrofilů přilnou k endotelním buňkám cév a migrují z krve do tkání proti koncentračnímu spádu. Interleukin 8 signalizuje, kde se nachází místo poškození či infekce, a tedy kam mají neutrofilů migrovat (Hoffmann et al., 2002).

Kalprotektin je protein schopný vázat vápník a zinek. Je nezbytný pro růst mikroorganismů, díky schopnosti vychytávat zinek. Jeho produkci zprostředkovávají buňky imunitního systému (granulocyty, monocyty a makrofágy), sulkulární tekutina a povrch ústního epitelu. Při zánětlivých onemocněních, např. paradontóze jeho koncentrace stoupá, a proto se při diagnostice využívá jako jejich ukazatel. Zvýšení koncentrace kalprotektinu lze i pozorovat u pacientů, kteří trpí orální kandidózou (Sweet et al., 2001).

1.5.7 Inhibitory srážení vápníku a fosfátu

V dutině ústní dochází k přesycování slin solemi vápníku a fosfátu. Přesto však nikde nedochází k jejich spontánnímu srážení (Hay et al., 1982). Tuto rovnováhu zajišťuje určitá skupina proteinů: statherinů, proteinů bohatých na prolin, cystatiny a histatiny. Tyto bílkoviny také reagují s některými mikroorganismy (Lamkin & Oppenheim, 1993).

Statheriny mají vysokou afinitu k fosforečnanu vápenatému, a tím zabraňují růstu krystalů a samovolnému srážení tohoto minerálu. Tímto způsobem znemožňují hromadění škodlivých usazenin na povrchu zubů a ve slinných žlázách. K tomu zřejmě dochází tak, že se navážou na nově vznikající pevné jádro krystalu a zabrání dalšímu připojování iontů fosforu a vápníku ke sraženině (Hay & Moreno, 1979). Statheriny se také dokáží silně vázat k hydroxyapatitu, což umožňuje vytvářet vazby s *Actinomyces viscosus* a podporovat tak kolonizaci této bakterie v ústech (Gibbons & Hay, 1988).

Proteiny bohaté na prolin stejně jako statheriny zabraňují samovolné tvorbě fosforečnanu vápenatého a růstu krystalů. Aby toho ovšem byly schopny, musí vytvářet vazby s hydroxyapatitem (Hay & Moreno, 1979; Hay & Oppenheim, 1974).

Histatiny mají schopnost inhibovat růst krystalů fosforečnanu vápenatého, ale nedokáží inhibovat jeho spontánní srážení (Oppenheim et al., 1986). Ve studii (Yukitaka Murakami et al., 1990) zjistil, že histaminy inhibují hemaglutinaci *Porphyromonas gingivalis* a tím zabraňují osídlení dutiny ústní touto bakterií (Murakami et al., 1990). Histatiny také působí proti některým kmenům *Streptococcus mutans* a zastavuje růst *Candidy albicans* (MacKay et al., 1984; Xu et al., 1991). Tyto baktericidní účinky jsou podmíněny schopností porušit stavbu buněčné membrány a změnit tak její propustnost. Při poklesu pH v ústech vlivem organických kyselin produkovaných bakteriemi na povrchu zubů, mohou způsobit zvýšení pH (Mandel, 1987).

Cystatiny udržují optimální hladinu vápníku ve slinách (Lamkin & Oppenheim, 1993). Dále přispívají k udržování minerální rovnováhy mezi sklovinou a slinou, protože na sebe váží vápník, inhibují aktivitu proteáz, které jsou jedním z faktorů podílejících se na ničení tkání parodontu (Lamkin & Oppenheim, 1993).

1.6 Proteomické metody zkoumání slin

Proteomické metody se zabývají kvalitativním i kvantitativním stanovením proteinů, a tak mohou být použity i na vzorky pocházející z lidského těla, jako je krev, sliny, séra, moč, gingivální tekutiny a různé tkáně (sklovina, dentin, cementum, dřeň, gingiva a sliznice) v patologických i normálních fyziologických stavech (Chiappelli, 2010).

1.6.1 Enzymově spojený imuno-sorbentní test (ELISA)

Jedná se o jednu z nejpoužívanějších imunologických metod, které slouží k detekci a stanovení koncentrace antigenů nebo protilátek. Principem jsou imunoenzymatické reakce bezbarvého substrátu, který je následně přeměněn na barevný produkt a lze jej tak měřit spektrofotometrickými metodami. Intenzitu zbarvení ovlivňuje koncentrace zjišťovaného antigenu nebo protilátky (Tijssen, 1985). (Hu et al., 2008) pomocí této metody identifikovali ve slině tyto proteiny: MRP14, M2BP, CD59, katalázu, profilin, M2BP, inyplukrin, histon H1, S100A12 a S100P. Většina těchto proteinů má schopnost vázat určité chemické látky

v těle. Takový profilin je protein vážící aktin a je důležitým při tvorbě cytoskeletu. MRP14, S100A12, S100P a M2BP váží vápník v těle.

1.6.2 HPLC-MS

Technika HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) je analytická metoda kombinující fyzikální separační schopnosti kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Toto tandemové spojení je vysoce efektivní, a to z důvodu individuální schopnosti každé z technik. Kapalinová chromatografie odděluje směsi s více složkami, hmotnostní spektrometrie poskytuje strukturní identitu samotných složek s vysokou molekulovou specifikou a detekční citlivostí (Dass & Chhabil, 2007). (Guowei et al., 2014) ve své studii uvedli, že pomocí této tandemové metody identifikovali tyto proteiny: matrix metallopeptidáza-9 (MMP9), která napomáhá rozpadu matrice v normálních fyziologických procesech, jako je embryonální vývoj, reprodukce, vývoj kostí, migrace buněk, hojení ran, učení a paměť (Wang & Tsirka, 2005), mucin-7 (MUC7), laktotransferin (LTF) – jedná se o multifunkční, globulární glykoprotein, který se hojně vyskytuje v různých sekrečních tekutinách, jako je mléko, slzy, sliny a nosní sekrece (Sanchez, Calvo & Brock, 1992), uhličitá anhydráza 6 (CA6) a azurocidin (AZU), který je antimikrobiálním proteinem schopný vázat heparin.

1.6.3 Dvourozměrná elektroforéza s MALDI-TOF/MS

Metoda dvourozměrné elektroforézy (2-DE) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF MS (matricí asistovanou laserovou desorpcí a ionizací) je velmi využívaná technika separace a identifikace velké sady proteinů současně. Přispívá k experimentální analýze a vizualizaci stovek proteinů najednou. Bílkoviny separované dvourozměrnou elektroforézou se následně zkoumají pomocí hmotnostní spektrometrie, která vzorky dále identifikuje a charakterizuje (Bernardo et al., 2002). Touto metodou provedli (Rao et al., 2009) výzkum slin člověka s diabetem typu 2 a našli tyto biomarkery: α -1-antitrypsin (A1AT), α -2 makroglobulin (A2MG), transthyretin (TTR), slinnou α -amylázu (AMYS), cystatin C (Cys-C). Antitrypsin je protein tvořený v játrech, odkud je uvolňován do krevního oběhu. Jeho nedostatkem může dojít ke vzniku plicního emfyzému¹⁰ a při jeho vysoké

¹⁰ nahromadění vzduchu v tkáních

produkcí může dojít k cholestickému onemocnění jater (cirhóze jater, hepatomu), a to díky jeho nahromadění se v hepatocystech (Stradling et al., 2010). Transthyretin je transportní protein v séru a mozkomíšním moku, který nese tyroxin, a protein vázající retinol. Je produkován játry do krevního řečiště a následně do mozkomíšního moku.

1.6.4 Analýza hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF

Tato bakalářská práce se zabývá rozlišením slin muže a ženy a také se zaměřuje na změnu složení sliny u ženy v průběhu jednoho měsíce a ženy gravidní. K tomuto výzkumu bylo využito metody MALDI-TOF MS. Všechna získaná spektra byla vyhodnocena pomocí metody PCA (Principal Component Analysis).

1.6.5 Princip metody MALDI-TOF MS

Získané vzorky jsou nejprve v analyzátoru ionizovány. K tomu dochází za pomoci laseru a přítomnosti pomocné látky, tzv. matrice, která je se vzorkem smíchána. Na jednotlivé molekuly vzorku se přenáší energie z matrice, která ji přijala z laserového ozáření. Během tohoto procesu dochází k desorpci a ionizaci. Protony z matrice jsou přeneseny na analyt. Výsledným produktem ionizace jsou ionty, které mají vysokou molekulovou hmotnost a dále vstupují do separátoru. U metody MALDI-TOF MS je využíván průletový separátor neboli (Time-of-Flight), který funguje na principu oddělování iontů na základě odlišných rychlostí iontů s odlišným poměrem m/z (hmotnost/náboj). Následně u dopadajících iontů dochází k přeměně energie na elektrický signál, který se zaznamenává a zpracovává v počítači (Záruba, 2016).

1.6.6 Vyhodnocení výsledků pomocí PCA (Principal Component Analysis)

Principem analýzy hlavních komponent (PCA) je snížit rozsah dat, která obsahují vysoké množství proměnných a zároveň zachovat co největší množství odchylek. Tato metoda umožňuje výrazné zjednodušení statistické analýzy. PCA při identifikaci jednotlivá data porovnává a vyhledává mezi nimi podobnosti a rozdíly, vizualizuje vztahy mezi proměnnými a zjišťuje jejich vzájemnou propojenost. Tento princip je zachován přeměnou na nové proměnné, neboli hlavní komponenta, které nejsou ve vzájemném vztahu a jsou uspořádány tak, aby první z těchto proměnných měly zachované původní odchylky (Jolliffe, 2011).

1.6.7 Enzymatické štěpení trypsinem

Trypsin (EC 3.4.21.4) patří mezi trávicí enzymy ze třídy hydroláz, specifičtěji do skupiny proteáz. K jeho syntéze dochází ve slinivce břišní v neaktivní formě trypsinogenu, který se po vyloučení ze slinivky do dvanáctníku zaktivuje. K aktivaci dochází odštěpením N-koncového hexapeptidu pomocí řady reakčních kaskád. Trypsin je hlavně využíván pro svou štěpnou specifitu a vysokou proteolytickou aktivitu. Štěpí peptidové vazby na karboxylovém konci za bazickými aminokyselinami, jako jsou lysin nebo arginin. Pokud se ovšem za nimi v řetězci aminokyselin nachází prolin, ke štěpení nedojde. Vazby s argininem se štěpí rychleji než vazby s lysinem. Další výhodou trypsinu je jeho odolnost v extrémních podmínkách.

Nevýhodou využívání trypsinu je jeho neúplné štěpení u pevně složených bílkovin. Tyto proteiny jsou schopné odolat proteolýze, čímž může dojít k přeskočení štěpného místa za argininem nebo lysinem.

1.6.8 ZipTip – reverzní fáze C₁₈

Získané peptidy po enzymovém rozkladu proteinů byly ze vzorků následně izolovány pomocí pipetovací špičky ZipTip o maximálním objemu 10 μ l. Na hrotu této špičky se nachází chromatografické médium tvořené reverzní fází C₁₈. Peptidy ze vzorku se naváží na reverzní fázi a zbylé anorganické látky a jiné nečistoty zůstanou v roztoku vzorku, kterým je špička promývána. Po promytí reverzní fáze elučním roztokem dojde k uvolnění peptidů (Millipore, 2005).

1.7 Analýza slin pomocí LC-ESI-Q-TOF hmotnostní spektrometrie

Další využitou metodou v této práci byla LC-ESI-Q-TOF hmotnostní spektrometrie. Tato metoda je kombinací kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem využívající elektrosprej (ESI) jako zdroj ionizace. Elektrosprej je tvořen kapilárou, která je uchovávána pod vysokým napětím za atmosférického tlaku. ESI ionizuje vzorek z roztoku. Na konci kapiláry dojde ke vzniku nabitých kapek. Pro získání suchého aerosolu je zapotřebí postupně odpařovat rozpouštědlo, čímž dojde k rozpadu kapiček a k přechodu vysoce nabitých iontů do plynné fáze. Rozdílem této metody a metody MALDI je vznik mnohonásobně nabitých iontů. Ionizační zdroj je tandemově propojen s kvadrupólovým analyzátozem. Kvadrupól je

složen ze čtyř keramických tyčí, z nichž na dvě protilehlé je připojen kladný a na zbylých dvou záporný pól stejnosměrného napětí. Dále je na každou dvojici vloženo střídavé napětí, které se liší fázovým posunem. V tomto systému dochází k výběru iontů na základě hodnoty poměru hmotnosti a náboje m/z . Následně se ionty přesunou do kolizní cely, kde dojde k jejich fragmentaci srážením iontů s kolizním plynem. Poté dojde k detekci v průletovém analyzátoru (TOF). Toto zařízení je navíc vybaveno reflektorem, který sjednotí různé kinetické energie iontů se stejným poměrem m/z . Ionty jsou posléze separovány jen na základě rozdílné hmotnosti. Lehčí ionty dorazí k detektoru dříve než ionty těžké. Záznamem je celkový čas průletu iontů trubicí. Konečná identifikace analytu je prováděna porovnáváním naměřených spekter se spektry, která jsou tabelována v databázi (Záruba, 2016).

2 Experimentální část

V této části bakalářské práce se zaměřím na vlastní měření a vyhodnocování, které bylo prováděno v laboratořích Vysoké školy chemicko-technologické pod vedením doc. Mgr. Ing. Štěpánky Kučkové, Ph.D. Během jednoho týdne jsem v této laboratoři prováděl komplexní měření vzorků, které provázelo zpracování, enzymatické štěpení vzorku, přečišťování, vlastní měření na přístroji MALDI-TOF MS a vyhodnocování výsledků.

2.1 Použité chemikálie pro experiment

- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (Sigma)
- Acetonitril (Sigma)
- Hydrogenuhličitan amonný (Fluka)
- Kalibrační standard II (Bruker)
- Kyselina trifluoroctová (Sigma)
- Trypsin (PierceTM Trypsin Protease, MS-Grade)

2.2 Použité přístroje a pomůcky

- Analytická kolona AcclaimPepMap RSLC C18 (75 μm x 150 mm, Dionex)
- Hmotnostní spektrometr ESI-Q-TOF MaxisImpact (Bruker Daltonics)
- Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics)
- Kapalinový chromatograf Ultimate 3000 RSLC nano (Dionex, Německo)
- Zachytávací kolona AcclaimPepMap 100 (100 μm x 2 cm, Dionex)
- Zip-Tip pipetovací špičky s reverzní fází C18 (Milipore, USA)

2.3 Odběr vzorků

Pro tento experiment bylo po dobu jednoho měsíce odebráno 60 vzorků slin jednoho muže a jedné ženy. K těmto vzorkům bylo přidáno dalších pět vzorků slin gravidní ženy. Sliny byly vždy odebírány ráno ihned po probuzení, tak aby nebyly kontaminovány např. jídlem, zubní pastou, či jinými látkami. Odebírání probíhalo „samovolně“ tak, že se každá slina

samovolně vytvořila a stekla do připravené zkumavky typu eppendorf. Každá zkumavka byla popsána datem odběru a poznámkou, zdali se jedná o slinu muže nebo ženy. U ženy se dále poznamenávalo období, ve kterém se nachází, konkrétně jestli ovuluje nebo menstruuje. Přidaných pět vzorků gravidní ženy byly z období, kdy se žena nacházela ve druhém trimestru. Všechny vzorky, které byly odebrány, jsem nechal přikryté papírovým ubrouskem a nechal schnout po dobu 24 hodin. Následně jsem vzorky uzavřel a nechal zamrazit.

2.4 Enzymatické štěpení vzorků

Každý vzorek slin byl štěpen roztokem trypsinu, kdy ke vzorku bylo přidáno 10 µl roztoku trypsinu (4 µl trypsinu o koncentraci 1 mg/ml a 200 µl NH_4HCO_3) a to tak, aby navážené vzorky byly zcela ponořené v roztoku. Enzymatické štěpení probíhalo dvě hodiny při laboratorní teplotě.

2.5 Přečišťování vzorků

Po enzymatickém štěpení vzorků jsem pokračoval jejich přečišťováním. Přečištění vzorků probíhalo v několika fázích za pomoci Zip-Tip špičky s reverzní fází C₁₈. V první fázi přečišťování jsem reverzní fázi navlhčil 50% acetonitrilem (tzv. wetting). V druhé fázi jsem reverzní fázi ekvilibroval. Ekvilibrační roztok obsahoval 20 µl kyseliny trifluoroctové a 1000 µl destilované vody. Třetí fází byla tzv. eluce, kdy docházelo k uvolňování peptidů, které byly navázané na reverzní fázi špičky. Eluční roztok obsahoval 500 µl ekvilibračního roztoku smíchaného s 500 µl 50% acetonitrilu. Každou fází jsem provedl pětkrát. Po pátém opakování – nasátí na špičku, jsem přešel k fázi následné.

Celý proces přečišťování jsem prováděl za pomoci mikro-pipet se špičkou Zip-Tip. V první fázi přečištění jsem odpipetoval pětkrát 10 µl acetonitrilu do odpadu (wetting). Následovala ekvilibrace reverzní fáze jejím pětinasobným promytím ekvilibračním roztokem. Následným krokem bylo desetinasobné propláchnutí reverzní fáze naštěpeným vzorkem (10 µl). Poté jsem opět odpipetoval pětkrát 10 µl ekvilibračního roztoku do odpadu. Finálním krokem přečišťování bylo odpipetování 8 µl elučního roztoku do zkumavky mikro-eppendorf, ve které byl proveden proplach reverzní fáze s elučním roztokem.

Pro další vzorek byla použita buď stejná špička, která byla pětkrát pročištěna odpipetováním 10 μ l elučního roztoku anebo úplně nová. Pokud byla využita již použitá špička, tak se celý proces opakoval, ale bez prvního kroku (wettingu), protože špička už byla zvlhčená.

2.6 Příprava vzorku pro měření

Pro stanovení vzorku byla připravena matrice s obsahem 9–10 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB) rozpuštěné ve 150 μ l 30% acetonitrilu, 250 μ l ekvilibračního roztoku a ve 100 μ l destilované vody.

Všechny přečištěné vzorky na přidání matrice byly uchovány ve zkumavkách mikro-ependorf. Ke každému vzorku o objemu 8 μ l, bylo přidáno 10 μ l matrice DHB. Poté jsem na MALDI destičku z nerezové oceli dávkoval 2,2 μ l vzorku s matricí. Každý vzorek, o stejném objemu, jsem nanášel na tři pozice. Po nanesení vzorků jsem nechal destičku na vzduchu o laboratorní teplotě, aby vzorky vykrytalizovaly. V určitých intervalech jsem na destičku nanášel peptidový kalibrační standard II.

2.7 Měření na MALDI-TOF MS

Po vykrytalizování vzorků jsem destičku vložil do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF (Autoflex Speed, Bruker Daltonics, Německo). Nejprve došlo k provedení kalibrace, kdy byl k jednotlivým hodnotám přiřazen kalibrační pík. Během vlastní analýzy vzorků, bylo mířeno laserem na jednotlivé krystaly vzorku na určité pozici, čímž došlo k ionizaci vzorku a pomocí detektoru se změřila rychlost pohybu iontů. Analýza hmotnostním spektrem probíhala v rozsahu 900–4500 Da a intenzita laseru byla 75 %. Z každé pozice na MALDI destičce byla uložena tři spektra určitého vzorku.

2.8 Měření pomocí LC-ESI-Q-TOF MS

K měření tandemových hmotnostních spekter došlo na hmotnostním spektrometru typu ESI-Q-TOF Maxis Impact, který byl připojen ke kapalinovému chromatografu Ultimate 3000 RSLC. Vybrané vzorky, které byly připravené stejným způsobem jako pro měření na MALDI-TOF jen neobsahovaly přídavek matrice DHB, byly rozpuštěny v 10 μ l 3 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí. K analýze byly nanесeny 3 μ l této směsi na zachytávací kolonu Acclaim PepMap 100 při průtoku 5 μ l/min 3 % fáze B po dobu 5 minut. Mobilní fází A byl roztok vody a 0,1 % kyseliny mravenčí. Mobilní fáze B byla tvořena

acetonitrilem a 0,1 % kyselinou mravenčí. Následně docházelo k separaci peptidů, která byla provedena na analytické koloně Acclaim PepMap RSLC C18 pomocí gradientu acetonitrilu. Separované peptidy byly vyeluovány přímo do elektrosprejového zdroje Captivy Spray. Sběrání fragmentačních spekter proběhlo v DDA modu (Data dependent analysis). V rozsahu 400–1400 m/z byly vybrány prekurzory pro fragmentaci, přičemž až deset z těchto prekurzorů mohlo být z každého hmotnostního spektra fragmentováno. Detekce fragmentů probíhala v rozsahu 50–2200 m/z . Z vyšších surových dat byla extrahována hmotnostní spektra programem DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics) a nahrána do Proteinscape verze 3.1. K identifikaci proteinů došlo pomocí serveru Mascot verze 2.4 (Matrix Science). Získané sekvence byly porovnávány se sekvencemi v databázi UniProt.

2.9 Vyhodnocení vzorků metodou PCA

Všechny vzorky byly vyhodnoceny pomocí metody PCA (Principal Component Analysis), tedy metodou analýzy hlavních komponent. Zpracování informací z dat přístroje proběhlo pomocí počítačového programu R, který je schopen i 3D zobrazení grafů s hlavními komponentami. Samotné vzorky byly porovnávány mezi sebou na třech hlavních komponentách, na kterých se vzorky nejvíce lišily. Za pomoci PCA byla zjištěna variabilita vzorků na jednotlivých komponentách a také variabilita porovnávaných vzorků při určité hmotnosti peptidu.

3 Výsledky a diskuze

V této bakalářské práci jsem zjišťoval, zda je možné využít MALDI-TOF MS a LC-ESI-Q-TOF MS pro rozlišení složení slin muže a ženy a podrobnějšímu zkoumání slin ženy v průběhu měsíčního cyklu.

Všech 65 vzorků slin muže, ženy a ženy těhotné bylo usušeno a následně laboratorně zpracováno. Tyto vzorky byly rozštěpeny trypsinem, přečištěny pomocí reverzní fáze ZipTip C₁₈ a nakonec smíchány s matricí DHB, pokud měly být měřeny pomocí MALDI-TOF MS. Vzorky s matricí byly nanášeny na ocelovou destičku a analyzovány hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF a vzorky bez matrice byly změřeny pomocí hmotnostní spektrometrie LC-ESI-Q-TOF. Získaná data z přístrojů byla extrahována do počítače a zpracována s využitím matematického software R a skriptem multiMS-toolbox [<http://uprt.vscht.cz/ms/>].

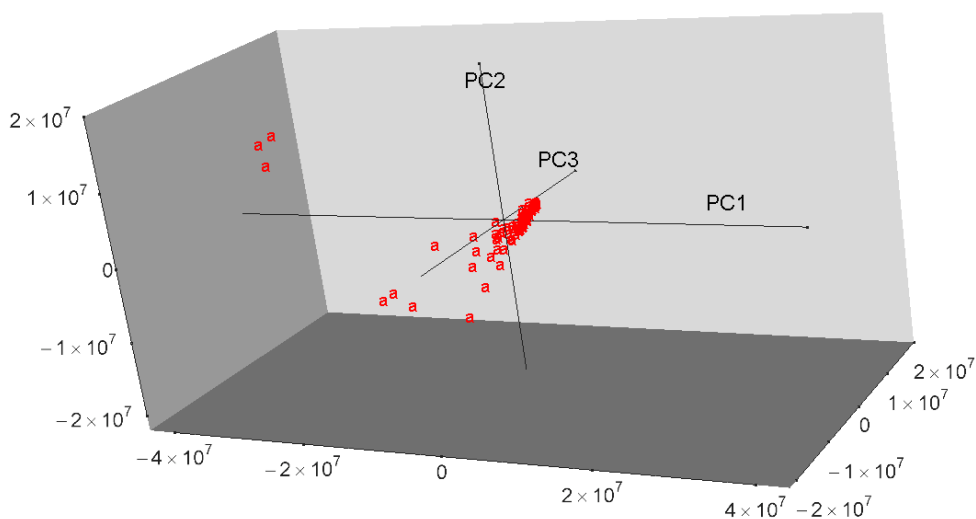
Za pomoci počítačového programu R jsem se snažil nalézt jednotlivé rozdíly mezi slinami muže a ženy a také rozdíl ve slinách během menstruace a ovulace.

3.1 Výsledky měření na MALDI-TOF

Po změření spekter u všech vzorků slin byla získaná data extrahována do programu R, ve kterém jsem provedl veškeré další operace se získanými spektry. Tato spektra byla v počítačovém programu porovnána na třech hlavních komponentách.

3.1.1 Vzorky slin muže

Na **obrázku 1** je původně třírozměrný (3D), nyní ale převedený na dvojrozměrný (2D), graf se zobrazenými výsledky (červená písmenka a) všech vzorků slin muže. Můžeme pozorovat, že se některé vzorky (písmenka a) liší, a jsou proto vzdáleny od velké skupiny. Důvodů odlišnosti vzorků může být několik, vzhledem k tomu, že na obsah slin má vliv více faktorů. Rozdíl může záviset na příjmu tekutin v předešlém dni, a to i na druhu nápoje, jaký zkoumaný jedinec vypil. Velikou roli hraje konzumace alkoholu, dále to může být ovlivněno tím, zdali si dotyčný vyčistil zuby před spaním. Také to, jestli je dárce vzorků kuřák. V neposlední řadě může záležet na stresové zatíženosti zkoumaného.

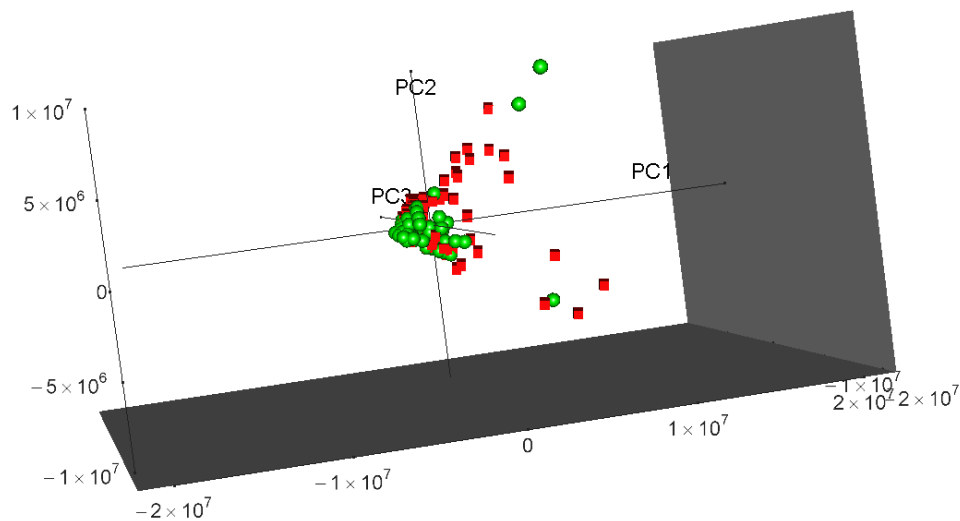


Obrázek 1 Původně třírozměrný graf zobrazení výsledků analýzy vzorků slin muže

Tím, že vzorky byly vždy odebírány ráno, tak se dotyčný mohl špatně vyspat. Možností je několik, proto bych příště volil při tomto sledování alespoň měsíční deník, do kterého by si zkoumaný zapisoval objem přijatých tekutin a zvláště alkohol, příjmy potravy, a i jaké povahy (bohaté na proteiny, nebo naopak chudé) byly potraviny, které požil. Zdali se jedná o kuřáka, v jakém psychickém rozpoložení se nachází a také jestli si před spaním vyčistil zuby.

3.1.2 Rozlišení slin muže a ženy

Na obrázku 2 můžeme vidět, že se sliny obou pohlaví převážně podobají. Zelené kuličky náleží ženě a červené čtverce muži. V grafu můžeme naleznout několik odchylek. Ty mohou být zapříčiněny stejnými vlivy jako u muže (obr. 1). Proto jsem se více zaměřil na sliny ženy. Hlavní hypotézou bylo najít rozdíly v obsahu slin mezi mužem a ženou a ženou samotnou v průběhu jejího měsíčního cyklu.



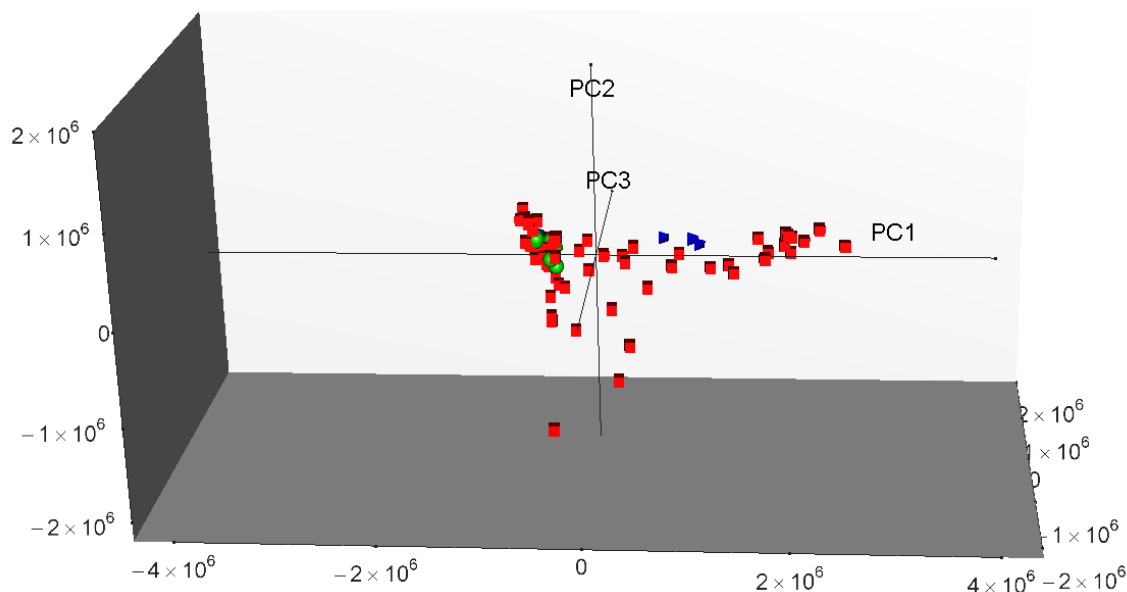
Obrázek 2 Trojrozměrný graf z PCA zobrazující porovnání proteinového složení slin muže a ženy.

To, že se sliny ve větším případě od sebe neliší (prakticky všechny body v grafu tvoří jedno velké uskupení), příkládám stejným vývojovým genům druhu a tím pádem i prakticky stejnému bílkovinnému složení slin u obou pohlaví. Zatímco rozdílné výsledky (kuličky anebo čtverce jsou vzdáleny od centrální skupiny) mohly být způsobeny konzumací alkoholu, určitým emočním výkyvem, nebo rozdílným pitným režimem.

3.1.3 Sliny ženy

Na obrázku 3 můžeme vidět barevně odlišené určité fáze měsíčního cyklu ženy. Červenou barvou jsou označeny běžné dny, modrou dny ovulace ženy a zelenou dny menstruace. Je očividné, že se sliny během menstruace nijak nelišily od většiny slin v průběhu běžných dnů. U ovulace je zřejmá menší odchylka, která ovšem nemá výpovědní hodnotu, protože můžeme vidět sliny běžného dne, které se mezi sebou liší mnohem více. Jedním z důvodů může být již zmiňovaný stres. Všechny vzorky této ženy byly odebírány v době, kdy zkoumaná dokončovala bakalářské studium při zaměstnání. Tyto výsledky by mohly být ovlivněné, jak nedostatkem spánku, tak i nepříznivými emocemi, které na sliny mají vliv. Jelikož jsou sliny první tekutinou, které přicházejí do styku s nepřeberným množstvím cizorodých látek, potravin a tekutin, označil bych je za velice proměnlivé, a proto bych příště

zvolil větší počet sledovaných, kteří by si vedli záznam o konzumaci, emoční náladě, režimu spánku a jiných faktorů ovlivňující obsah slin.



Obrázek 3 Grafické zobrazení porovnání výsledků slin ženy sledovaných v průběhu jednoho měsíce.

3.2 Výsledky měření na LC-ESI-Q-TOF

Pro měření na LC-ESI-Q-TOF bylo použito celkem devět vzorků. Tři vzorky byly odebrány muži, a to v období rána, odpoledne a rána druhého dne. Stejně tak byly odebrány další tři vzorky od negravidní ženy a poslední tři vzorky byly odebrány od gravidní ženy. Výsledkem metody LC-ESI-Q-TOF byla tabulka pro každý vzorek s vypsáním proteiny, které se ve vzorcích nacházely. Pro nás bylo stěžejním zjištěním obsah peptidů daného proteinu. Z každé tabulky jednoho vzorku jsem vybral deset nejzastoupenějších (podle nejvyššího počtu detekovaných peptidů, kterými byly proteiny identifikovány) a ve výsledné tabulce porovnal výskyt peptidů proteinů se všemi vzorky.

3.2.1 Složení ranních slin muže

Z **tabulky 1** lze vidět, že nejzastoupenějším proteinem byl statherin, který především znemožňuje hromadění škodlivých usazenin na povrchu zubů a ve slinných žlázách. Dalšími hojně zastoupenými bílkovinami byly základní proteiny bohaté na slinný prolin (basic

salivary proline-rich protein 1, 2, 3 a 4), ty zabraňují samovolné tvorbě fosforečnanu vápenatého a růstu krystalů. Dalšími jsou androgenem regulovaný protein submaxilární žlázy (submaxillary gland androgen-regulated protein 3B), polymerní receptory pro imunoglobuliny (polymeric immunoglobulin receptor), které váží polymerní IgA a IgM na bazolaterální povrch epitelových buněk. Tento komplex je pak transportován přes buňku, aby byl vylučován na apikálním povrchu. Během celého procesu dochází ke štěpení, které odděluje extracelulární od transmembránového segmentu. Dále je pak mucin a aktin obsažený v cytoplazmě. Tento cytoplazmatický aktin je vysoce konzervovaný protein, který polymeruje za vzniku filamentů, které tvoří síť v cytoplazmě buněk.

Tabulka 1 Obsah proteinů v ranních slinách muže

Pořadí	Přístupový kód	Protein	Počet peptidů
1	STAT_HUMAN	Statherin	72
2	PRB2_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 2	68
3	PRP1_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 1	66
4	SMR3B_HUMAN	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	43
5	PRPC_HUMAN	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	30
6	PRB4_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 4	15
7	PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	15
8	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmatic 1	15
9	MUC7_HUMAN	Mucin-7	12
10	PRB3_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 3	9

3.2.2 Složení ranních slin muže v druhém dni

V **tabulce 2** můžeme vidět, že se nejčastěji zastoupené proteiny neliší od vzorků předešlého rána. Nejzastoupenějšími byly fosfoproteiny bohaté na slinné kyseliny (salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2), ty působí jako vysoce účinné inhibitory růstu krystalů fosforečnanů vápenatých. Poskytují ochranné a reparační prostředí pro zubní sklovinu, která je důležitá pro integritu zubů. Dalšími byly androgenem regulované proteiny submaxilární žlázy a statheriny. Jedinými nově se vyskytujícími proteiny jsou annexiny. Annexiny hrají důležitou roli v přirozené imunitní reakci jako efektory odezvy zprostředkované glukokortikoidy a jsou regulátory zánětlivého procesu. Podporují chemotaxi granulocytů a monocytů prostřednictvím aktivace formylpeptidových receptorů. Nadále přispívají

k adaptivní imunitní reakci zlepšením signálních kaskád, které jsou aktivovány aktivací T-buněk a také regulují jejich diferenciaci a proliferaci.

Tabulka 2 Obsah proteinů v ranních slinách muže

Pořadí	Přístupový kód	Protein	Počet peptidů
1	PRPC_HUMAN	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	54
2	SMR3B_HUMAN	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	41
3	STAT_HUMAN	Statherin	40
4	PRB2_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 2	18
5	PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	16
6	PRP1_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 1	16
7	MUC7_HUMAN	Mucin-7	14
8	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	11
9	PRB3_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 3	4
10	ANXA1_HUMAN	Annexin A1	3

3.2.3 Složení odpoledních slin muže

Tabulka 3 nám jen potvrzuje, že obsah proteinů zůstává velmi podobný. Nejzastoupenějšími jsou statheriny, následují základní proteiny bohaté na slinný prolin (vasic salivary proline-rich protein 1, 2 a 4) a androgenem regulované proteiny submaxilární žlázy. Nově zastoupenými proteiny jsou histatiny. Ty jsou považovány za hlavní prekurzory protektivní struktury proteinu na povrchu zubu (sklovinové pelikule). Dále také vykazují antibakteriální a protiplísňové účinky.

Tabulka 3 Obsah proteinů v odpoledních slinách muže

Pořadí	Přístupový kód	Protein	Počet peptidů
1	STAT_HUMAN	Statherin	63
2	PRB2_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 2	38
3	SMR3B_HUMAN	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	36
4	PRP1_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 1	30
5	HIS1_HUMAN	Histatin-1	17
6	PRPC_HUMAN	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	13
7	MUC7_HUMAN	Mucin-7	7
8	PRB4_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 4	7
9	PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	4
10	PROL4_HUMAN	Proline-rich protein 4	3

3.2.4 Složení ranních slin ženy

V **tabulce 4** si můžeme povšimnout, že nejzastoupenějším je fosfoprotein bohatý na slinné kyseliny (salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2). Dalším je androgenem regulovaný protein submaxilární žlázy a hyperpolarizačně aktivovaný iontový kanál (potassium/ sodium hyperpolarization-activated cyclicnucleotide gated channel), ten vykazuje slabou selektivitu pro draselné ionty než pro ionty sodné. Přispívá k nativním chodům v srdci a v neuronech, transportuje amonium v distálním nefronu a vytváří velký okamžitý proud. Dále se ve vzorku vyskytl homebox proteinu Hox-B4. Jedná se o sekvenčně specifický transkripční faktor, který je součástí vývojového regulačního systému, který poskytuje buňkám specifické poziční identity na přední a zadní ose. Znovu se objevuje polymerní imunoglobulinový receptor a po něm následuje výčet nových proteinů. Protein PRRC2A, který může hrát roli v regulaci sestřihu pre-mRNA. Dalším je protein aladin, tento protein napomáhá k normálnímu vývoji periferního a centrálního nervového systému a je také vyžadován pro správnou lokalizaci aurora kinázy AUKRA, což je protein spojený s rakovinou. Obvykle se podílí na regulaci mitózy a lokace mikrotubulů. Ve vzorku byl také nalezen transkripční korelátork SKI rodiny 1. Tento korelátork působí jako korepresor LBX1 (transkripční faktor) a inhibuje signalizaci BMP (kostní morfogenetické proteiny). A posledním nalezeným byl protein s obsahem zinku a proteinu BTB 7C, který může být supresorovým genem tumoru.

Tabulka 4 Obsah proteinů v ranních slinách ženy

Pořadí	Přístupový kód	Protein	Počet peptidů
1	PRPC_HUMAN	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	8
2	SMR3B_HUMAN	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	7
3	HCN2_HUMAN	Potassium/ sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel	6
4	HXB4_HUMAN	Homebox protein Hox-B4	5
5	PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	4
6	PRC2A_HUMAN	Protein PRCA2	3
7	AAAS_HUMAN	Aladin	3
8	SKOR1_HUMAN	SKI family transcriptional corepressor 1	3
9	DAAM2_HUMAN	Disheveled-associated activator of morphogenesis 2	2
10	ZBT7C_HUMAN	Zinc finger and BTB domain-containing protein 7C	2

3.2.5 Složení ranních slin ženy z dalšího dne

V **tabulce 5** vidíme, že nejzastoupenějšími proteiny jsou polymerní receptory pro imunoglobuliny, které na sebe váží polymerní IgA a IgM. Dále jsou to androgenem regulované proteiny submaxilární žlázy, fosfoproteiny bohaté na slinné kyseliny, mucin, cytoplasmický aktin, řada druhů základních proteinů bohatých na slinný prolin a nově se vyskytující WAS/WASL interagující člen rodiny proteinů 2, který indukuje mobilizaci a reorganizaci systému aktinových filamentů a tím je důležitý pro tvorbu výstupků buněčného povrchu.

Tabulka 5 Obsah proteinů v ranních slinách ženy

Pořadí	Přístupový kód	Protein	Počet peptidů
1	PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	42
2	SMR3B_HUMAN	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	37
3	PRPC_HUMAN	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	29
4	MUC7_HUMAN	Mucin-7	20
5	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	17
6	PRB2_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 2	16
7	PRB4_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 4	16
8	PRB3_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 3	14
9	WIPF2_HUMAN	WAS/WASL-interacting protein family member 2	10
10	PRR12_HUMAN	Proline-rich protein 12	10

3.2.6 Složení odpoledních slin ženy

Z **tabulky 6** lze vyčíst, že nejzastoupenějšími byly androgenem regulované proteiny submaxilární žlázy, statherin, fosfoproteiny bohaté na slinné kyseliny, proteiny bohaté na slinný prolin, histatiny, mucin, receptory pro polymerní imunoglobuliny a uhličitá anhydráza, která dokáže reverzibilně hydratovat oxid uhličitý.

Tabulka 6 Obsah proteinů v odpoledních slinách ženy

Pořadí	Přístupový kód	Protein	Počet peptidů
1	SMR3B_HUMAN	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	37
2	STAT_HUMAN	Statherin	35
3	PRPC_HUMAN	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	25
4	PRB2_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 2	22
5	HIS1_HUMAN	Histatin-1	19
6	MUC7_HUMAN	Mucin-7	19
7	PRP1_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 1	18
8	PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	8
9	CAH6_HUMAN	Carbonic anhydrase 6	5
10	PROL4_HUMAN	Proline-rich protein 4	4

Po porovnání všech tří vzorků ženy, jsem usoudil, že první vzorek není plně kompetentní. Výskyt peptidů je velice nízký a téměř vůbec se nesuslučuje s ostatními. Z výčtu vyskytujících se proteinů ve slině by se dalo předpokládat, že vzorek obsahoval buňky, které se počínaly dělit. To mohlo být z důvodu tvorby nového tkáňového epitelu, jako náhrada starého, anebo v rámci regenerace tkáně po poškození, například dásně, anebo samotné ústní dutiny.

3.2.7 Sliny gravidní ženy

Sliny gravidní ženy byly odebrány v jeden den ve třech od sebe časově rozdělených krocích. Z prvního vzorku byly nejčastěji zastoupenými proteiny **tabulky 7** a to cytoplasmický aktin, zymogenový granulovaný protein 16. chromosomu homologu B, dále histon H2B, který je strukturálním proteinem, pomáhající organizovat eukaryotickou DNA, reguluje transkripci, replikaci a opravy DNA. Konkrétně pomáhá regulovat strukturu a funkci chromatinu prostřednictvím post-translačních modifikací a specializovaných variant histonů. Tuto vlastnost mají i následující histony H2A obou dvou typů. Dalším je protein S100-A9, jedná se o protein vázající vápník a zinek, který hraje významnou roli v regulaci zánětlivých procesů a imunitní reakce. Může indikovat chemotaxi neutrofilů, zvýšit baktericidní aktivitu neutrofilů podporou fagocytózy. Alfa-enoláza je multifunkční enzym, který hraje svou úlohu v glykolýze, tak také v různých procesech, jako je kontrola růstu, tolerance hypoxie a alergické reakce. Může také fungovat, jako receptor a aktivátor plazminogenu na buněčném povrchu leukocytů a neuronů. Stimuluje produkci imunoglobulinů. Desmoplakin je velký

protein, který se podílí na ukotvení intermediálních vláken do desmosomů. Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza je klíčovým enzymem v glykolýze, který katalyzuje první krok dráhy konverzí D-glyceraldehyd-3-fosfátu na 3-fosfo-D-glycerofosfát.

Tabulka 7 Obsah proteinů ve slinách gravidní ženy

Pořadí	Přístupový kód	Protein	Počet peptidů
1	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	25
2	ZG16B_HUMAN	Zymogen granule protein 16 homolog B	13
3	H2B1B	Histone H2B type 1-B	13
4	S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	11
5	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	10
6	H2A1D_HUMAN	Histone H2A type 1-D	10
7	H2A1B_HUMAN	HistoneH2A type 1-B/E	10
8	MUC7_HUMAN	Mucin-7	10
9	DESP_HUMAN	Desmoplakin	10
10	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8

V **tabulce 8** nalezneme nečastější proteiny druhého vzorku gravidní ženy. Nejzastoupenějšími byly fosfoproteiny bohaté na slinné kyseliny, androgenem regulované proteiny submaxilární žlázy, statherin, cytoplasmický aktin, zymogenový granulovaný protein 16. chromosomu homologu B, aktin z hladkého svalu aorty, mucin, receptory polymerních imunoglobulinů, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza a protein S100-A9. Všechny funkce těchto proteinů již byly zmíněny v předešlém textu.

Tabulka 8 Obsah proteinů ve slinách gravidní ženy

Pořadí	Přístupový kód	Protein	Počet peptidů
1	PRPC_HUMAN	Salivary acidic prolin-rich phosphoprotein 1/2	44
2	SMR3B_HUMAN	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	42
3	STAT_HUMAN	Statherin	42
4	ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	39
5	ZG16B_HUMAN	Zymogen granule protein 16 homolog B	30
6	ACTA_HUMAN	Actin aortic smooth muscle	21
7	MUC7_HUMAN	Mucin-7	13
8	PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	10
9	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	10
10	S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	9

V **tabulce 9** můžeme vidět nejzastoupenější proteiny třetího vzorku gravidní ženy. Nejčastěji vyskytujícím proteinem byl statherin, androgenem regulované proteiny submaxilární žlázy, aktin, fosfoproteiny bohaté na slinné kyseliny, zymogenový granulovaný protein 16. chromosomu homologu B, mucin, protein S100-A9 a proteiny bohaté na slinný prolin.

Tabulka 9 Obsah proteinů ve slinách gravidní ženy

Pořadí	Přístupový kód	Protein	Počet peptidů
1	STAT_HUMAN	Statherin	41
2	SMR3B_HUMAN	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	39
3	ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2	32
4	PRPC_HUMAN	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	30
5	ZG16B_HUMAN	Zymogen granuleprotein 16 homolog B	17
6	MUC7_HUMAN	Mucin-7	14
7	S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	10
8	PRP1_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 1	9
9	PRB2_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 2	8
10	PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	7

4 Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na rozpoznání slin muže a ženy, ženy v průběhu měsíčního cyklu a slin gravidní ženy pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF s vyhodnocením PCA a hmotnostní spektrometrie LC-ESI-Q-TOF. Použité vzorky v této bakalářské práci byly odebírány po dobu jednoho měsíce jedním mužem a jednou ženou. Celkem bylo odebráno 60 vzorků. Vzorky pro LC-ESI-Q-TOF byly odebrány mužem a ženou v průběhu dvou dnů a vzorky gravidní ženy v jednom dni ve třech časem rozdělených úsecích. Celkem bylo pro tuto metodu použito devět vzorků. Všechny vzorky byly zpracovány v laboratořích VŠCHT pod vedením doc. Mgr. Ing. Štěpánky Kučkové, Ph.D. Vzorky byly jednotlivě enzymaticky naštěpeny pomocí trypsinu, který byl připraven ve směsi s hydrogenuhličitanem amonným. Po dvouhodinovém štěpení za laboratorní teploty byly všechny vzorky přečištěny pomocí ZipTip C₁₈ reverzní fáze. Tento krok se skládal z několika kroků: wetting, ekvilibraci a eluce. Po eluci jednotlivých vzorků následovalo promíchání s matricí. Tou byla DHB (2,5-dihydroxybenzoová kyselina). Směs vzorků a matrice byly nanášena na ocelovou destičku vždy na tři pozice. Samotné měření na přístroji MALDI-TOF obnášelo míření laseru na jednotlivé krystaly vzniklé na ocelové destičce. Výsledkem měření byla jednotlivá spektra pro každý vzorek slin. Po naměření všech vzorků byla data extrahována do počítačového programu R se skriptem multiMS-toolbox. Tento program vygeneroval grafy – trojrozměrné grafy vzorků mezi třemi hlavními komponenty. Vyhodnocování vzorků jsem prováděl pomocí těchto grafů neboli analýzy hlavních komponent. Nejzajímavější byly tři hlavní komponenty – PC1, PC2 a PC3. Tyto komponenty poskytovaly osy, ve kterých jsme mohli pozorovat jednotlivé body vzorků v prostoru. Hypotézu, že sliny muže a ženy jsou rozdílné, se nám povedlo vyvrátit. A to z toho důvodu, že mají stejný bílkovinný základ. Mírné odchylky skupin vzorků mohly být způsobeny řadou vlivů, které se podílejí na změně složení slin. Takovými to faktory mohou být pitný režim, kouření cigaret, konzumace alkoholu, emoční stav jedince. Druhou hypotézou bylo prokázat rozdílnost slin ženy v průběhu měsíčního cyklu. Ani tato hypotéza se nám nepovedla s určitou přesností potvrdit. Období ovulace vykazovalo určitou odchylku, ale tak stejně i vzorky běžných dnů. Tento rozdíl lze znovu přisoudit již zmíněným faktorům.

Druhým využitým přístrojem této bakalářské práce byl LC-ESI-Q-TOF. Tento přístroj nám zjistil nejčastěji se vyskytující proteiny ve slinách muže, ženy a ženy gravidní. Ve většině výsledků jsme si mohli povšimnout, že nejčastěji se vyskytujícími proteiny byly proteiny bohaté na slinný prolin 1, 2, 3 a 4, fosfoproteiny bohaté na slinné kyseliny, statherin, androgenem regulované proteiny submaxilární žlázy, cytoplasmický aktin, mucin a androgenem regulované proteiny submaxilární žlázy, a to jak u muže, ženy, tak i ženy v těhotenství.

Metoda MALDI-TOF MS s vyhodnocením PCA nebyla pro rozpoznání slin obou pohlaví úspěšná. Pouze jsme prokázali, že muž i žena mají podobný obsah bílkovin ve slinách. Pro přesnější zjišťování rozdílů ve slinách bych pro příští výzkum použil více pokusných osob, delší sledování a také deník, do kterého bych zapisoval veškeré příjmy potravy, tekutin, druhu tekutin, emoční stav zkoumaného, informaci ohledně kouření cigaret, věku, pohlaví a energetickém výdeji.

5 Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát / adenosine triphosphate
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát/ cyclic adenosine monophosphate
DDA	analýza závislá na datech / data dependent analysis
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina / 2,5-dihydroxybenzoic acid
DNA	deoxyribonukleová kyselina / (deoxyribonucleic acid
ELISA	enzymový imunologický test / Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
GTP	guanosintrifosfát / guanosine triphosphate
HPLC	vysokotlaká/vysokoúčinná kapalná chromatografie / High Performance Liquid chromatography)
LC-ESI-Q-TOF	kapalinová chromatografie ionizace elektrosprejem kvadrupól s detektorem doby letu / Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Quadrupole – Time of Flight)
MALDI-TOF	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu / Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight
PCA	analýza hlavních komponent / Principal Component Analysis
RNA	ribonukleová kyselina / ribonucleic acid
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného / Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

6 Seznam použité literatury

- Alagendran, S., Saibaba, G., Muthukumar, S., Rajkumar, R., Guzman, R. G., & Archunan, G. (2013). Characterization of salivary protein during ovulatory phase of menstrual cycle through MALDI-TOF/MS. *Indian Journal of Dental Research*, 24(2), 157.
- Almståhl, A., Wikström, M., & Groenink, J. (2001). Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. *Oral microbiology and immunology*, 16(6), 345-352.
- Andersen, J. H., Osbakk, S. A., Vorland, L. H., Traavik, T., & Gutteberg, T. J. (2001). Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Research*, 51(2), 141-149.
- Arnold, R., Brewer, M., & Gauthier, J. (1980). Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infection Immunity*, 28(3), 893-898.
- Arnold, R. R., & Cole, M. F. (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*, 197(4300), 263-265.
- Arnold, R. R., Russell, J. E., Champion, W. J., Brewer, M., & Gauthier, J. J. (1982). Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infection Immunity*, 35(3), 792-799.
- Axelsson, P., Paulartder, J., & Lindhe, J. (1998). Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(4), 297-305
- Azevedo, L. R., Damante, J. H., Lara, V. S., & Lauris, J. R. P. (2005). Age-related changes in human sublingual glands: a post mortem study. *Archives of Oral Biology*, 50(6), 565-574.
- Azzam, H., Goertz, C., Fritts, M., & Jonas, W. (2007). Natural products and chronic hepatitis C virus. *Live International*, 27(1), 17-25.
- Bardow, A., Moe, D., Nyvad, B., & Nauntofte, B. (2000). The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂. *Archives of Oral Biology* 45(1), 1-12.
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., & Brooks, H. (2009). Ganong's review of medical physiology. 23. NY: McGraw-Hill Medical.

- Baum, B. J., Dai, Y., Hiramatsu, Y., Horn, V. J., & Ambudkar, I. S. (1993). Signaling mechanisms that regulate saliva formation. *Critical Reviews in Oral Biology Medicine*, 4(3), 379-384.
- Bernardo, K., Pakulat, N., Macht, M., Krut, O., Seifert, H., Fleer, S., ... & Krönke, M. (2002). Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*, 2(6), 747-753.
- Bosch, J. A., de Geus, E. J., Ligtenberg, T. J., Nazmi, K., Veerman, E. C., Hoogstraten, J., & Amerongen, A. V. N. (2000). Salivary MUC5B-mediated adherence (ex vivo) of *Helicobacter pylori* during acute stress. *Psychosomatic Medicine*, 62(1), 40-49.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., & Mar, J. J. M. P. S. (2006). *Biologie. 8., Aktualisierte Auflage.*
- Carlen, A., Bratt, P., Stenudd, C., Olsson, J., & Strömberg, N. (1998). Agglutinin and acidic proline-rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surfaces. *Journal of Dental Research*, 77(1), 81-90.
- Carlsson, J. (1987). Salivary peroxidase: an important part of our defense against oxygen toxicity. *Journal of Oral Pathology Medicine* 16(8), 412-416.
- Carpentieri, A., Díaz de Barboza, G., Areco, V. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research*. April 2012, roč. 65, čís. 4, s. 437-444
- Chicharro, J. L., Lucía, A., Pérez, M., Vaquero, A. F., & Ureña, R. (1998). Saliva composition and exercise. *Sports Medicine*, 26(1), 17-27
- Cole, M. F., Bryan, S., Evans, M. K., Pearce, C. L., Sheridan, M. J., Sura, P. A., . . . Bowden, G. H. (1998). Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary antibodies reactive with *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 during colonization. *Infection Immunity* 66(9), 4283-4289.
- Čihák, R., Grim, M., Druga, R., & Helekal, I. (2002). *Anatomie: Grada.*
- de Almeida, P. D. V., Gregio, A., Machado, M., De Lima, A., & Azevedo, L. R. J. J. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *Contemp Dent Pract*, 9(3), 72-80.
- Dass, C. (2007). *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry* (Vol. 16). John Wiley & Sons.

- Dawes, C. (1972). Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *The Journal of Physiology*, 220(3), 529-545
- Dawes, C. (1987). Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *Journal of Dental Research*, 66(2_suppl), 648-653.
- Dylevský, I. (2009). *Funkční anatomie*: Grada Publishing as.
- Edgar, W. (1992). Saliva: its secretion, composition and functions. *British Dental Journal*, 172(8), 305.
- Fujihara, T., & Hayashi, K. (1995). Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infection to mouse cornea. *Archives of Virology* 140(8), 1469-1472.
- Ghezzi, E. M., Wagner-Lange, L. A., Schork, M. A., & Metter, E. J. (2000). on Parotid Flow Rates in Healthy Women. *Journal of Gerontology*, 55(1), M34-M42.
- Gibbons, R., & Hay, D. (1988). Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infection Immunity* 56(2), 439-445.
- Groenink, J., Ligtenberg, A., Veerman, E., Bolscher, J., & Amerongen, A. N. (1996). Interaction of the salivary low-molecular-weight mucin (MG2) with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(1), 79-87.
- Guowei, Y., Wenming, H., Honglei, X., Yuhuan, J., & Deqin, Y. (2014). Relationship between dental caries and salivary proteome by electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry in children aged 6 to 8 years. *West China Journal of Stomatology*, 32(3).
- Hamosh, M., & Burns, W. (1977). Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). 37(6), 603-608.
- Hamosh, M., & Scow, R. O. (1973). Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid. *The Journal of Clinical Investigation*, 52(1), 88-95.
- Harmsen, M. C., Swart, P. J., Béthune, M.-P. d., Pauwels, R., Clercq, E. D., The, T. B., & Meijer, D. K. (1995). Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *Journal of Infectious Diseases*, 172(2), 380-388.

- Hay, D., & Moreno, E. (1979). Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatitic surfaces. *Journal of Dental Research* 58(2_suppl), 930-942.
- Hay, D., & Oppenheim, F. (1974). The isolation from human parotid saliva of a further group of proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology* 19(8), 627-IN629.
- Hay, D., Schluckebier, S., & Moreno, E. (1982). Equilibrium dialysis and ultrafiltration studies of calcium and phosphate binding by human salivary proteins. Implications for salivary supersaturation with respect to calcium phosphate salts. *Calcified Tissue International* 34(1), 531.
- Hu, S., Arellano, M., Boontheung, P., Wang, J., Zhou, H., Jiang, J., Elashoff, D., Wei, R., Loo, J., & Wong, D. T. (2008). Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clinical Cancer Research*, 14(19), 6246-6252.
- Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., & Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(5), 847-855.
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 85(2), 162-169.
- Jolliffe, I. (2011). *Principal Component Analysis*: Springer.
- Kodíček, M. (2004). *Biochemické pojmy: výkladový slovník*: Vysoká škola chemicko-technologická.
- Kodíček, M., Valentová, O., & Hýnek, R. (2015). *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*
- Lackie, J. (2010). *A dictionary of biomedicine*. Oxford University Press.
- Lagerlöf, F. (1994). Caries-protective factors in saliva. *Advances in Dental Research*, 8(2), 229-238.
- Laible, N. J., & Germaine, G. R. (1982). Adsorption of lysozyme from human whole saliva by *Streptococcus sanguis* 903 and other oral microorganisms. *Infection*, 36(1), 148-159.
- Lamkin, M. S., & Oppenheim, F. G. (1993). Structural features of salivary function. *Critical Reviews in Oral Biology Medicine* 4(3), 251-259.
- Ledvina, M.: *Biochemie pro studující medicíny. II. díl*. Praha: Karolinum, 2004, s. 433-436.

- Lenander-Lumikari, M., & Loimaranta, V. (2000). Saliva and dental caries. *Advances in Dental Research*, 14(1), 40-47.
- Levine, M., Reddy, M., Tabak, L., Loomis, R., Bergey, E., Jones, P., Cohen, R., Stinson, M., & Al-Hashimi, I. (1987). Structural aspects of salivary glycoproteins. *Journal of Dental Research*, 66(2), 436-441.
- Lilienthal, B. (1955). An analysis of the buffer systems in saliva. *Journal of Dental Research* 34(4), 516-530.
- Lukáčová, I. (2007). *Nutriční aspekty zubního zdraví*. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta,
- MacKay, B. J., Denepitiya, L., Iacono, V., Krost, S., & Pollock, J. (1984). Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infection Immunity* 44(3), 695-701.
- Machová, J. (2008). *Biologie pro učitele, Praha: Karolinum, 2008*.
- Maier, H., Born, I. A., & Mall, G. (1988). Effect of chronic ethanol and nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands. *Klinische Wochenschrift*, 66, 140-150.
- Mandel, I. (1987). The functions of saliva. *Journal of Dental Research* 66(1_suppl), 623-627.
- Martínek, J., & Vacek, Z. (2008). *Histologický atlas*: Grada Publishing as.
- Mazánek, J. (2015). *Stomatologie pro dentální hygienistky a zubní instrumentárky*: Grada publishing as.
- Melvin, J. (1999). Chloride channels and salivary gland function. *Critical Reviews in Oral Biology*, 10(2), 199-209.
- Millipore. (2005). User guide reversed-phase ZipTip. Retrieved from <http://personal.rhul.ac.uk/upba/211/Zip-tip.pdf>
- Moshier, A., Reddy, M. S., & Scannapieco, F. A. (1996). Role of type 1 fimbriae in the adhesion of *Escherichia coli* to salivary mucin and secretory immunoglobulin A. *Current Microbiology*, 33(3), 200-208.
- Mourek, J. (2012). *Fyziologie-Učebnice pro studenty zdravotnických oborů-2., doplněné vydání*: Grada Publishing as.

- Murakami, Y., Amano, A., Takagaki, M., Shizukuishi, S., Tsunemitsu, A., & Aimoto, S. (1990). Purification and characterization from human parotid secretion of a peptide which inhibits hemagglutination of *Bacteroides gingivalis* 381. *FEMS Microbiology Letters* 72(3), 275-279.
- Murakami, Y., Takeshita, T., Shizukuishi, S., Tsunemitsu, A., & Aimoto, S. (1990). Inhibitory effects of synthetic histidine-rich peptides on haemagglutination by *Bacteroides gingivalis* 381. *Archives of Oral Biology* 35(9), 775-777.
- Murray, P., Prakobphol, A., Lee, T., Hoover, C., & Fisher, S. (1992). Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins. *Infection Immunity* 60(1), 31-38.
- Nagler, R. M. Salivary glands and the aging process: mechanistic aspects, health – status and medicinal – efficacy monitoring. *Biogerontology*. 2004. vol. 5. no. 4. p. 223-33
- Navazesh, M., et al. Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy Caucasian young and aged adults. *Journal of Dental Research*. June 1992. vol. 71. no. 6. p. 1275 – 8
- Noble, R. E. (2000). Salivary α -amylase and lysozyme levels: A non-invasive technique for measuring parotid vs submandibular/sublingual gland activity. *Journal of Oral Science*, 42(2), 83-86.
- Oppenheim, F., Yang, Y.-C., Diamond, R., Hyslop, D., Offner, G., & Troxler, R. (1986). The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 261(3), 1177-1182.
- Percival, R. S., Challacombe, S. J., & Marsh, P. D. (1994). Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *Journal of Dental Research*, 73(8), 1416-1420
- Pedersen, A., Bardow, A., Jensen, S. B., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*, 8(3), 117-129.
- Rao, P. V., Reddy, A. P., Lu, X., Dasari, S., Krishnaprasad, A., Biggs, E., ... & Nagalla, S. R. (2009). Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *Journal of Proteome Research*, 8(1), 239-245.

- Rokyta, R. (2000). *Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*: ISV.
- Rosenblum, J. L., Irwin, C. L., & Alpers, D. H. (1988). Starch and glucose oligosaccharides protect salivary-type amylase activity at acid pH. *American Journal of Physiology*, 254(5), G775-G780.
- Saibaba, G., Rajesh, D., Muthukumar, S., Sathiyarayanan, G., Padmanabhan, P., Akbarsha, M. A., Balázs Gulyás & Archunan, G. (2016). Proteomic analysis of human saliva: An approach to find the marker protein for ovulation. *Reproductive Biology*, 16(4), 287-294.
- Sanchez, L., Calvo, M., & Brock, J. H. (1992). Biological role of lactoferrin. *Archives of Disease in Childhood*, 67(5), 657.
- SILBERNAGL, Stefan; DESPOPOULOS, Agamemnon. *Atlas Fyziologie Člověka*. [s.l.]: [s.n.], 1993.
- Sharma, P., Dudus, L., Nielsen, P. A., Clausen, H., Yankaskas, J. R., Hollingsworth, M. A., & Engelhardt, J. F. (1998). MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology* 19(1), 30-37.
- Shern, R. J., Fox, P. C., & Li, S. H. (1993). Influence of age on the secretory rates of the human minor salivary glands and whole saliva. *Archives of Oral Biology*, 38(9), 755-761.
- Smith, D. J., & Taubman, M. A. (1992). Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. *Critical Reviews in Oral Biology Medicine* 3(1), 109-133.
- Smith, L. J., Kaminsky, S., & D'souza, S. (1986). Neonatal fat digestion and lingual lipase. *Acta Paediatrica* 75(6), 913-918.
- Stradling, J., Stanton, A., Rahman, N. M., Nickol, A. H., & Davies, H. E. (2010). *Oxford Case Histories in Respiratory Medicine*. Oxford University Press.
- Sweet, S., Denbury, A., & Challacombe, S. (2001). Salivary calprotectin levels are raised in patients with oral candidiasis or Sjögren's syndrome but decreased by HIV infection. *Oral Microbiology Immunology* 16(2), 119-123.
- Šípek, A. (2014). Základní metody genetického inženýrství. *Genetika-Biologie*.

- Tabak, L. A. (1995). In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annual Review of Physiology* 57(1), 547-564.
- Tappuni, A., & Challacombe, S. (1994). A comparison of salivary immunoglobulin A (IgA) and IgA subclass concentrations in predentate and dentate children and adults. *Oral Microbiology Immunology* 9(3), 142-145.
- Tenovuo, J. (2002). Antimicrobial agents in saliva—protection for the whole body. *81*(12), 807-809.
- Tenovuo, J., & Lagerlöf, F. (1994). Saliva. *Textbook of clinical cariology. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard*, 17-43.
- Tenovuo, J., Lumikari, M., & Soukka, T. (1991). Salivary lysozyme, lactoferrin and peroxidases: antibacterial effects on cariogenic bacteria and clinical applications in preventive dentistry. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia*, 87(2), 197-208.
- Tenovuo, J., & Pruitt, K. M. (1984). Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 13(6), 573-584.
- Thomas, E., Bates, K., & Jefferson, M. (1981). Peroxidase antimicrobial system of human saliva: requirements for accumulation of hypothiocyanite. *Journal of Dental Research*, 60(4), 785-796.
- Tijssen, P. (1985). *Practice and theory of enzyme immunoassays* (Vol. 15). Elsevier.
- Trojan, S. (2003). *Lékařská fyziologie*: Grada Publishing as.
- Vacek, Z. (1995). Histologie a histologická technika I, II. In: Brno: IDVPZ.
- Végh, V. (2009). Laktoferin-multifunkční imunomodulační protein. *Edukafarm-Farmí news*, 046-047.
- Vodrážka, Zdeněk. *Biochemie*. Praha: Academia, 2007. ISBN 978-80-200-0600-4.
- Wall M. J., Crowell A. M. J., Simms G. A., Liu F., Doucette, A. A.: *Anal. Chim. Acta* 703, 194 (2011).
- Wang, J., & Tsirka, S. E. (2005). Neuroprotection by inhibition of matrix metalloproteinases in a mouse model of intracerebral haemorrhage. *Brain*, 128(7), 1622-1633.
- Xu, T., Levitz, S., Diamond, R., & Oppenheim, F. (1991). Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infection Immunity* 59(8), 2549-2554.

Yamazaki, J. (2010). *Tissue-wide coordination of saliva production by the autonomic nervous system and a local mediator*. Paper presented at the *Journal of Physiological Sciences*.

Záruba, K. (2016). *Analytická chemie 1. díl*. Praha: Vysoká škola chemico-technologická

Židek, L. (2010). *Elektronické skripta k přednášce C Strukturní biochemie*. Brno: Masarykova univerzita.