

Ślina jako materiał biologiczny przydatny w diagnostyce alergii na pokarmy

Saliva as a useful biological material in the diagnosis of food allergies

WOJCIECH KOWALCZYK, KINGA LIS, MAGDALENA ŻBIKOWSKA-GÖTZ, ZBIGNIEW BARTUZI

Katedra i Klinika Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych CM w Bydgoszczy UMK w Toruniu

Streszczenie

Szacuje się, że około 27% białek zawartych w ślinie pochodzi z krwi. Ze względu na specyfikę alergii pokarmowej, ślina wydaje się być niezwykle miarodajnym materiałem do badań laboratoryjnych, o dużej przydatności klinicznej. Jest to materiał łatwo dostępny i prosty do pobrania różnymi technikami, w tym z zastosowaniem standaryzowanych probówek do pozyskiwania śliny. Z dostępnych danych literaturowych wynika, że aktualnie stosowane metody pobierania śliny nie mają znaczącego wpływu na uzyskiwane wyniki mierzonych parametrów laboratoryjnych, w tym stężenia całkowitego IgE. Obiecujące są również wyniki odnoszące się do stężenia IgE swoistych dla różnych alergenów pokarmowych w ślinie w porównaniu do wartości zmierzonych w surowicy, jednak skąpość dostępnych w piśmiennictwie badań ogranicza wnioskowanie. Ślina wydaje się być dobrym materiałem do diagnostyki alergii na pokarmy i z pewnością temat ten wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: ślina, diagnostyka alergii pokarmowej, IgE

Summary

It is estimated that about 27% of the saliva proteins are derived from blood. Due to the specificity of food allergies, saliva seems to be extremely reliable material for laboratory tests, with high clinical usefulness. This material is easily available and simple to collect by various techniques, including using standardized saliva collection tubes. Available literature data show that currently used saliva collection methods do not have a significant impact on the results of measured laboratory parameters, including total IgE concentration. The results for IgE specific for various food allergens in saliva compared to the values measured in serum also seem promising, although a small number of studies available in the literature limits conclusion. Saliva seems to be a good material for diagnosis food allergies, although this subject certainly requires further research.

Keywords: saliva, food allergy diagnosis, IgE

© Alergia Astma Immunologia 2020, 25 (1): 19-23

www.alergia-astma-immunologia.pl



Adres do korespondencji / Address for correspondence

mgr Wojciech Kowalczyk

Katedra i Klinika Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych CM w Bydgoszczy UMK w Toruniu 85-164 Bydgoszcz, ul. Ujejskiego 75, Tel. 52 36 55 552 e-mail: immunologia.biziel@gmail.com

Wstęp

Ślina stanowi fizjologiczny płyn wytwarzany w śliniankach przyusznych, podżuchwowych oraz podjęzykowych o pH mieszczącym się w przedziale 6,2-7,4. Bierze udział we wstępnym trawieniu pokarmu, ochronie i utrzymaniu integralności górnej części błony śluzowej przewodu pokarmowego, wykazuje działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe. W rzeczywistości ślina stanowi mieszaninę płynu powstającego w śliniankach, płynu dziąsłowego oraz przesięku osocza krwi. Wyróżniamy ślinę spoczynkową i stymulowaną, wydzielaną w odpowiedzi na różne bodźce np. żucie, zapach czy smak pokarmów. Skład śliny spoczynkowej i stymulowanej różni się. Ślina w około 99% złożona jest z wody, w której są rozpuszczone związki nieorganiczne i organiczne takie jak enzymy trawienne, cytokiny, immunoglobuliny, peptydy przeciwbakteryjne, sole, pierwiastki i związki o małej masie cząsteczkowej. Ślinianki podżuchwowe odpowiadają za produkcję około 70% śliny w stanie spoczynku i 25% śliny po pobudzeniu np. smakiem pokarmu. Ślinianki przyuszne odpowiadają za produkcję około 25% śliny spoczynkowej i 70 % śliny sty-

mulowanej. Ślinianki podjęzykowe produkują około 7-8% całkowitej objętości śliny, której dziennie powstaje około 1 do 1,5 litra [1, 2, 3, 4, 5].

Na osobniczy skład śliny może wpływać wiele czynników wśród których wyróżnia się wiek, płeć, cykl dobowy, palenie tytoniu, sposób odżywiania, przyjmowane leki, czy stan patofizjologiczny. W obszarze przewodów ślinowych zachodzi wymiana składników pomiędzy osoczem krwi a śliną. Szacuje się że około 27% białek zawartych w ślinie pochodzi z krwi. Ze względu na szybką wymianę składników rozpuszczonych między śliną a osoczem krwi, płyn ten dobrze odzwierciedla stan zdrowia organizmu. Jednocześnie produkowany jest w dużych ilościach, zaś jego pobranie jest nieinwazyjne dla pacjenta. Coraz częściej zwraca się uwagę na szeroką możliwość zastosowania tego materiału biologicznego w diagnostyce wielu chorób i do oceny ogólnego stanu zdrowia [1, 2, 6, 7].

Obecnie istnieje możliwość oznaczania w ślinie stężenia kortyzolu, markerów zakażenia wirusem HIV (*human immunodeficiency virus*), prątkiem gruźlicy czy *Helicobacter pylori*.

Ze względu na specyfikę alergii pokarmowej pojawia się przypuszczenie, że ślina może być niezwykle miarodajnym materiałem, użytecznym w diagnostyce tego rodzaju nadwrażliwości. Dotychczas pojawiło się kilka publikacji, których autorzy porównują stężenie przeciwciał IgE w ślinie oraz surowicy próbując znaleźć zależności pomiędzy uzyskanymi wynikami badań laboratoryjnych a występowaniem choroby alergicznej, zarówno w odniesieniu do alergii pokarmowych jak i wziewnych [8]. Aby możliwe było ujednoczenie prowadzonych badań warto też zwrócić uwagę na prace, które w sposób szczegółowy opisują techniki pobrania śliny oraz jej preparatyki przed wykonaniem analiz.

Ślina jako materiał przydatny w diagnostyce alergii pokarmowej

Mohamed R. i wsp. (współpracownicy) podjęli próbę oceny metody pobierania śliny oraz sposobu jej przetwarzania. W tym celu od 25 osób (12 kobiet oraz 13 mężczyzn) pobrano ślinę za pomocą trzech technik, w każdym przypadku dążąc do uzyskania około 2 ml płynu.

Badanie zakładało zebranie próbek śliny spoczynkowej polegające na odpluwaniu do pojemnika śliny samoistnie gromadzącej się w jamie ustnej, w celu uzyskania zakładanej objętości oraz śliny stymulowanej, gdzie zastosowano dwa sposoby pobudzania (mechaniczny i chemiczny).

Stymulacja mechaniczna polegała na pobudzaniu wydzielania śliny poprzez żucie silikonowej, utwardzonej rurki, o długości 200 mm o średnicy 1,6 mm i grubości ściany 1,4 mm. Ślina zbierająca się w jamie ustnej była odpluwana do pojemnika co 30 sekund, aż do uzyskania zakładanej objętości.

Do pobudzania chemicznego wydzielania śliny posłużono się roztworem kwasu cytrynowego, do zastosowań spożywczych. W tym celu każdy uczestnik badania musiał dwukrotnie, przez 15 sekund, płukać jamę ustną 0,25% roztworem spożywczego kwasu cytrynowego, a następnie wypłuć płyn płuczący. Po 30 sekundach od wypłucia kwasu rozpoczynano kolekcjonowanie śliny, podobnie jak to miało miejsce w poprzedniej metodzie.

W celu zminimalizowania dobowych zmian w składzie śliny próbki pobierano zawsze między godziną 9.00 a 12.00. Przed pobraniem każdy uczestnik badania przepłukiwał usta wodą na 10 minut przed rozpoczęciem zbierania śliny. U wszystkich badanych zastosowano ten sam schemat kolejności zbierania próbek. Najpierw kolekcjonowano ślinę spoczynkową, następnie stymulowaną mechanicznie zaś jako ostatnia była zbierana porcja po stymulacji chemicznej. Pomiedzy kolejnymi pobraniami zachowano 5–10 minutowe odstępy.

Ponadto, aby zminimalizować wpływ ewentualnych resztek jedzenia, lub innych substancji, które mogłyby interferować w pomiarach analitycznych, pierwsza porcja śliny niestymulowanej w każdym przypadku została odrzucona. Kolekcję materiału rozpoczęto od porcji drugiej.

W każdym przypadku ślinę zbierano, w wygodnej dla pacjenta, siedzącej pozycji pionowej, z lekkim pochyleniem do przodu, aby ułatwić odpluwanie śliny gromadzącej się w jamie ustnej. Próbkę śliny za każdym razem zbierano do sterylnego pojemnika umieszczonego w lodzie, aby zminimalizować degradację zawartych w niej białek [9].

Aby ograniczyć wpływ związanych z wiekiem różnic w składzie biomolekularnym badanego materiału na ostateczne wyniki analizy porównawczej, wszyscy uczestnicy badania byli osobami dorosłymi w wieku poniżej 35 lat [9].

Wszystkie pozyskane próbki zostały następnie zamrożone i rozmrożone w celu rozbicia mukopolisacharydów i zmniejszenia lepkości materiału. Następnie podzielono je na trzy części:

- nie wirowane oraz nie poddane zateżeniu
- odwirowane przy 10000G przez 10 min w 4°C, nie poddane zateżeniu
- odwirowane przy 10000G przez 10 min w 4°C oraz poddane zateżeniu przy pomocy filtrów zagęszczających Amicon Ultra 30 K (Milipore, USA)

We wszystkich próbkach oznaczono stężenie białka całkowitego, białka C-reaktywnego (CRP), całkowite stężenie immunoglobuliny E (IgE) oraz stężenie mioglobiny. Stężenie białka całkowitego wykonano metodą z wykorzystaniem kwasu bicinechinowego (BCA), zaś pozostałe parametry oznaczono komercyjnie dostępnymi, gotowymi zestawami ELISA [9].

Największą objętość śliny uzyskano przy wykorzystaniu metod pobudzających jej wydzielanie, przy czym technika stymulacji mechanicznej była bardziej efektywna niż stymulacji chemicznej. Sposób pobierania śliny nie miał znaczącego wpływu na stężenie całkowitego IgE w tym materiale (tab. 1). Wirowanie śliny nie miało znaczącego wpływu na stężenie IgE w badanych próbkach. Zateżenie próbek śliny spowodowało nieznaczny wzrost obserwowanego stężenia IgE w próbkach nie stymulowanych oraz uzyskanych po stymulacji chemicznej oraz znaczny wzrost w próbkach uzyskanych po stymulacji mechanicznej (tab. 1), co autorzy badania uznali za zgodne z oczekiwaniami [9].

Pineda-Martinez S. i wsp. jako cel swoich badań postawili sobie z kolei znormalizowanie i uproszczenie stosowanych metod przesiewowych badania noworodków w kierunku chorób zakaźnych, przy użyciu przeciwciał swoistych w klasach IgA, IgM i IgE. Za istotne uznali zarówno określenie całkowitych stężeń tych immunoglobulin we krwi noworodka jak i próbę zastosowania śliny, jako materiału pobieranego w sposób nieinwazyjny, do tego typu badań. Aby zrealizować postawione cele zmierzili (techniką ELISA) i porównywali stężenie immunoglobulin, w tym IgE, w ślinie oraz osoczu u 53 zdrowych noworodków urodzonych w General Manuel Gea González, Mexico City [10].

Wszystkie próbki od noworodków pobrano po 2-godzinym poście. Całą niestymulowaną ślinę (100 µl) uzyskano przy użyciu sterylnych pipet z polipropylenu i umieszczono

Tabela I. Średnie stężenie IgE (pg/mL) uzyskane przez Mohamed R. i wsp. [9].

Metody	Nieprzetwarzana	Wirowana	Wirowana i zateżona
Niestymulowana	142 (56-368)	133 (47-382)	155 (57-497)
Mechaniczna	152 (42-246)	151 (37-254)	355 (98-711)
Kwas cytrynowy	139 (46-221)	123 (43-197)	193 (84-632)

no w próbkach z dodatkiem inhibitora proteaz (Sigma P2714; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), celem zapobiegnięcia rozkładowi białek. Próbki śliny transportowano na lodzie do laboratorium, gdzie wirowano przy 176 g przez 5 minut. Próbki krwi żyłnej zostały pobrane techniką standardową do heparynizowanych probówek uzyskano Vacutainer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). Zarówno supernatanty śliny jak i osocze przechowywano w temperaturze -80°C do czasu analizy.

Pineda-Martinez S. i wsp. zauważyli, że stężenie IgE zarówno w ślinie jak i osoczu badanych noworodków było prawie niewykrywalne i średnio wynosiło $0,5 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$ dla osocza oraz $0,5 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$ dla śliny (tab. 2). Autorzy podkreślają, że stężenie IgE w pierwszym tygodniu życia badanych noworodków było zerowe albo prawie zerowe, co według nich może mieć w przyszłości, po dokładniejszym zbadaniu tego tematu, praktyczne przełożenie kliniczne w przypadku zaobserwowania wartości podwyższonych w tej grupie wiekowej [10].

Jafarzadeh A. i wsp., celem oceny zależnych od wieku i płci zmian stężenia IgA i IgE w ślinie osób zdrowych, przebadali grupę 103 mężczyzn oraz 100 kobiet w wieku 1-70 lat pod względem stężenia IgE w ślinie. Do badania włączono osoby bez chorób ostrych lub przewlekłych. Nawracające infekcje, astma, alergia lub inne zaburzenia immunologiczne w wywiadzie oraz palenie papierosów lub zażywanie jakichkolwiek narkotyków stanowiły kryteria wyłączenia [11].

Wszystkie próbki śliny pobierano rano, pomiędzy godziną 10 a 11. Przed pobraniem śliny badani nie jedli ani nie

pili przez co najmniej 1 godzinę. Około 1 godziny przed pobraniem próbek śliny uczestnicy umyli zęby i przepłukali jamę ustną sterylizowaną wodą. Niestymulowane próbki śliny pobierano przez swobodne odpluwanie w ciągu 5 minut. Ślinę zbierano bezpośrednio do sterylizowanych probówek umieszczonych na lodzie. Wszystkie próbki wirowano przez 15 minut przy 10000 g w temperaturze 4°C . Supernatanty śliny przechowywano w temperaturze -70°C do momentu analizy. Stężenie IgE oznaczono przy pomocy komercyjnie dostępnych, gotowych zestawów ELISA [11].

Autorzy w swoim badaniu analizowali tylko wyniki od osób u których IgE było wykrywalne, co stanowiło najmniej 25% osób w grupie 1-10 lat oraz 68,75% w grupie 31-40 lat, ponadto zaobserwowano, że odsetek osób z dodatnimi wynikami IgE wzrastał w stopniowo wraz z wiekiem. Także stężenie IgE w ślinie wzrastało wraz z wiekiem badanych osób i u dorosłych było wyższe niż u dzieci. U kobiet zaobserwowano nieznacznie wyższe stężenie IgE w ślinie niż u mężczyzn w porównywalnych grupach wiekowych (tab. 3) [11].

Nunes M. i wsp. w swoim badaniu skupili się na możliwości wykorzystania śliny do wykrywania IgE i IgG1 w diagnozie alergii pokarmowej. Aby zrealizować założony cel badania porównywali stężenie IgE swoistych dla 14 pokarmów (mleko, krewetka, białko jaja kurzego, kiwi, mąka pszenna, soja, kukurydza, orzech nerkowca, orzeszki arachidowe, kakao, ryba, pomidor, banan, papaja) w ślinie oraz surowicy krwi pobranej od 36 pacjentów w wieku 0-5 lat z rozpoznaną alergią na białka mleka krowiego oraz 20 osób z porównywalnej wiekiem populacji zdrowej [8].

Tabela II. Stężenie IgE ($\mu\text{g/ml}$) w ślinie i osoczu uzyskane przez Pineda-Martinez S. i wsp. [10].

Materiał	Średnia \pm SD	Minimum	Maximum
Osocze	$0,5 \pm 1,2$	0,0	5,0
Ślina	$0,5 \pm 0,7$	0,0	2,7

Tabela III. Stężenie IgE (IU/dL) w ślinie wg. Jafarzadeh A. i wsp [11].

Grupa wiekowa	Płeć	Liczba osób	Odsetek dodatniego IgE	IgE Średnia + SD
1 - 10 lat	Mężczyzna	14	4 (28,6%)	$18,80 \pm 22,15$
	Kobieta	14	3 (21,4%)	$23,70 \pm 16,28$
11 - 20 lat	Mężczyzna	16	8 (50%)	$70,03 \pm 63,93$
	Kobieta	15	4 (26,7%)	$151,90 \pm 298,73$
21 - 30 lat	Mężczyzna	16	9 (56,25%)	$79,03 \pm 137,97$
	Kobieta	15	6 (40%)	$135,33 \pm 217,79$
31 - 40 lat	Mężczyzna	16	9 (56,25%)	$61,97 \pm 80,97$
	Kobieta	16	11 (68,75%)	$187,96 \pm 157,72$
41 - 50 lat	Mężczyzna	17	9 (52,94%)	$152,72 \pm 306,57$
	Kobieta	15	10 (66,66%)	$83,73 \pm 91,93$
51 - 60 lat	Mężczyzna	14	7 (50%)	$100,28 \pm 153,00$
	Kobieta	14	5 (35,7%)	$177,76 \pm 339,47$
61 - 70 lat	Mężczyzna	10	4 (40%)	$89,92 \pm 73,63$
	Kobieta	11	4 (36,4%)	$72,97 \pm 123,10$

Ślinę zebrano rano w sposób niestymulowany, przy pomocy wacika do zbierania śliny, który następnie odwirowano (8000g przez 5 minut w temp. 4°C). Krew pobrano w sposób standardowy celem pozyskania surowicy. Zarówno supernatanty śliny jak i surowice przechowywano w temperaturze -20°C do czasu analizy. W zebranym materiale oznaczono stężenie swoistych IgE dla wymienionych wcześniej pokarmów. Ekstrakty alergenowe do testów ELISA autorzy pozyskiwali samodzielnie ze świeżych źródeł pokarmowych. Celem przeprowadzenia analiz wykorzystano gotowe przeciwciała przeciw ludzkiej IgE (Sigma A9667) lub przeciw ludzkiej IgG1 (Sigma B6775) w odpowiednich rozcieńczeniach [8].

Nunes M. i wsp. zaobserwowali, że wyrażone wartością absorbancji, swoiste IgE dla krewetki, białka jaja kurzego, soi, pszenicy, orzecha nerkowca, orzeszków ziemnych, kiwi, bananów, pomidorów oraz kakao w ślinie i w surowicy były porównywalne. Dla mleka oraz papai stwierdzono znamienne wyższe wartości absorbancji dla sIgE w ślinie niż w surowicy, natomiast dla ryby i kukurydzy te wartości sIgE w ślinie był statystycznie istotnie niższy niż w surowicy (tab. 4) [8].

Ślina jako materiał przydatny w diagnostyce alergii wziewnej

Miranda D.O. i wsp. oceniali występowanie przeciwciał IgE specyficznych dla alergenów roztoczy kurzu domowego *Dermatophagoides pteronyssinus* oraz komponent Der p 1 oraz Der p 2 w surowicy i ślinie 72 dzieci w wieku od 5 do 15 lat potwierdzoną alergią na roztocze kurzu domowego *D. pteronyssinus*. Dzieci rekrutowane do badania nie były wcześniej poddawane immunoterapii, jak również nie przyjmowały leków przeciwhistaminowych w ciągu 7 dni przed badaniem i doustnych lub miejscowych kortykosteroidów do 2-3 tygodni przed badaniem. Grupę kontrolną stanowiło 14 dzieci bez alergii w wywiadzie oraz z nega-

tywnymi testami skórnymi dla podstawowych alergenów wziewnych, w porównywalnym przedziale wiekowym [12].

Krew do badań laboratoryjnych pobrano w sposób standardowy, celem pozyskania surowicy. Niestymulowane próbki śliny (1-1,5 ml) zbierano z jamy ustnej dzieci przy użyciu gotowych probówek do pobierania śliny Salivette (Sarstedt AG & Co., Numbrecht, Niemcy) przez około 3 minuty. Próbki śliny odwirowano (3000xG przez 10 minut w temperaturze 4°C). Supernatanty śliny oraz surowice przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania testów.

Miranda D.O. wraz ze współpracownikami zaobserwowali, że chociaż w surowicy stężenie sIgE dla wszystkich badanych alergenów było znamienne wyższe u dzieci alergicznych niż u dzieci zdrowych to swoiste IgE w ślinie w obu tych grupach było niewykrywalne [12].

Podsumowanie

Ślina jest materiałem biologicznym coraz częściej rozpatrywanym jako odpowiedni do badania w wielu różnych przypadkach klinicznych. Jest materiałem łatwym do pozyskania w sposób nieinwazyjny i w miarę komfortowy dla pacjenta. Pomimo, że technika pobrania śliny nie wydaje się mieć wpływu na wyniki badań, to warto zauważyć, że aktualnie dostępne są komercyjne, gotowe probówki do pobierania śliny co pozawala na wystandaryzowanie sposobu pozyskiwania tego materiału.

W przypadku alergii pokarmowej ślina wydaje się być ponadto materiałem szczególnie atrakcyjnym ze względu na specyfikę tej reakcji. Jama ustna jest bowiem miejscem rozległego kontaktu pokarmu z układem immunologicznym zaś wiele pokarmowych reakcji alergicznych zachodzi jedynie w obrębie jamy ustnej.

Na podstawie przedstawionych analiz można przypuszczać, że ślina wydaje się być użytecznym materiałem

Tabela IV. Porównanie średniego poziomu sIgE w ślinie i surowicy dla 14 źródeł pokarmowych wg. Nunes M. i wsp. [8].

Pokarm	Materiał	Średnia (O.D.) ± SD	Pokarm	Materiał	Średnia (O.D.) ± SD
Mleko krowie	Surowica	0,43 ± 0,08	Orzech arachidowy	Surowica	0,19 ± 0,05
	Ślina	0,46 ± 0,08		Ślina	0,18 ± 0,05
Ryba	Surowica	0,46 ± 0,13	Kukurydza	Surowica	0,21 ± 0,07
	Ślina	0,38 ± 0,08		Ślina	0,18 ± 0,06
Krewetka	Surowica	0,20 ± 0,06	Kakao	Surowica	0,15 ± 0,03
	Ślina	0,18 ± 0,04		Ślina	0,15 ± 0,03
Białko jaja kurzego	Surowica	0,22 ± 0,09	Kiwi	Surowica	0,17 ± 0,04
	Ślina	0,20 ± 0,05		Ślina	0,17 ± 0,04
Soja	Surowica	0,22 ± 0,07	Papaja	Surowica	0,17 ± 0,04
	Ślina	0,22 ± 0,06		Ślina	0,21 ± 0,05
Pszenica	Surowica	0,22 ± 0,06	Banan	Surowica	0,19 ± 0,05
	Ślina	0,22 ± 0,07		Ślina	0,19 ± 0,06
Orzech nerkowca	Surowica	0,20 ± 0,06	Pomidor	Surowica	0,17 ± 0,04
	Ślina	0,20 ± 0,06		Ślina	0,16 ± 0,04

biologicznym do badań w przypadku diagnostyki alergii na pokarm. W wielu przypadkach stężenie sIgE dla pokarmów w ślinie było porównywalne do zmierzonego w surowicy. Warto zauważyć, że w przypadku alergii na alergeny wziewne nie obserwowano swoistych dla nich IgE w ślinie przy równocześnie wysokim stężeniu w surowicy, co dodatkowo wydaje się potwierdzać przydatność śliny w

diagnostyce alergii na pokarmy. Niemniej z powodu nikłej dostępności literatury w zakresie zastosowania śliny jako materiału badanego w przypadku diagnostyki alergii pokarmowej trudno o jednoznaczne wnioskowanie. Warto natomiast zwrócić uwagę na taką możliwość i konieczność prowadzenie dalszych badań w tym zakresie.

Piśmiennictwo

1. Tóthová L, Kamodyová N, Červenka T i wsp. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5 (73).
2. Dame ZT, Aziat F, Mandal R i wsp. The human saliva metabolome. *Metabolomics* 2015; 11 (6), 1864-1883.
3. Jańczuk Z. Stomatologia zachowawcza – Zarys kliniczny. Podręcznik dla studentów stomatologii. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007: 94-128.
4. Scarano E, Fiorita A, Picciotti PM i wsp. Proteomics of saliva: personal experience. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2010; 30 (3), 125-130.
5. Matczuk J, Żendzian-Piotrowska M, Maciejczyk M i wsp. Salivary lipids: A review. *Adv Clin Exp Med* 2017; 26 (6), 1021-1029.
6. Zolotukhin S, Metabolic hormones in saliva: origins and functions. *Oral Dis* 2013; 19 (3), 219-229.
7. Pels E, Comparison of saliva interleukin-2 concentration to the condition of gums in children with acute lymphoblastic leukaemia during anti-tumour treatment. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015; 76 (1), 205-210.
8. Nunes MPO, Tilburg MF, Floean EO i wsp. Detection of serum and salivary IgE and IgG1 immunoglobulins specific for diagnosis of food allergy. *PLoS One* 2019; 14 (4), e0214745.
9. Mohamed R, Campbell J-L, Cooper-White J i wsp. The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and Myoglobin immunoassays. *Clin Transl Med*. 2012; 1, 19.
10. Pineda-Martinez S, Hernández-Islas JL, Escobedo-Torres MP i wsp. Immunoglobulin Concentrations in Plasma and Saliva During the Neonatal Period. *Elsevier Taiwan LLC* 2016; 57 (3), 213-218.
11. Jafarzadeh A, Sadeghi M, Karam GH i wsp. Salivary IgA and IgE levels in healthy subjects: relation to age and gender. *Braz. Oral res* 2010; 24 (1), 21-27.
12. Miranda DO, Silva DA, Farnandes JFC i wsp. Serum and Salivary IgE, IgA, and IgG4 Antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* and Its Major Allergens, Der p1 and Der p2, in Allergic and Nonallergic Children. *Clin. Dev. Immunol* 2011; 11, 1-11.