

Ocena stężenia lizozymu i laktoferyny w ślinie pacjentów będących w późnym okresie po allogenicznnej transplantacji komórek hematopoezy (HCT)

An evaluation of salivary levels of lysozyme and lactoferrin in patients in the late period after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT)

¹Department of Conservative Dentistry, Medical University of Gdańsk

Head of Department: Associate Professor Barbara Kochańska, MD, PhD

²Department of Integrated Dentistry, Department of Conservative Dentistry, Medical University of Warsaw

Head of Department: Izabela Strużycka, MD, PhD

³Department of Hematology and Transplantation, Medical University of Gdańsk

Head of Department: Professor Andrzej Hellman, MD, PhD

SŁOWA KLUCZOWE

allograftacja komórek krwiotwórczych, lizozym, laktoferyna, ślina

STRESZCZENIE

Wstęp. Transplantacja komórek hematopoezy (ang. *hematopoietic cell transplantation* – HCT) często łączy się z występowaniem powikłań w jamie ustnej, niejednokrotnie zagrażających zdrowiu i życiu pacjentów. Zaburzenia jakościowe i ilościowe czynników nieswoistej odporności zawartych w ślinie, takich jak lizozym i laktoferyna, mogą przyczynić się do rozwoju tych powikłań.

Cel pracy. Analiza stężenia lizozymu i laktoferyny w ślinie pacjentów będących w późnym okresie (powyżej setnej doby) po allogenicznnej transplantacji komórek krwiotwórczych, z uwzględnieniem czasu, jaki upłynął od transplantacji oraz szybkości wydzielania śliny.

Materiał i metody. Zbadano 45 osób będących 3,5 miesiąca do 5 lat po HCT. Do oznaczenia stężenia lizozymu i laktoferyny w ślinie spoczynkowej i stymulowanej zastosowano metodę ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*).

Wyniki. Średnie stężenie lizozymu i laktoferyny w ślinie nie zmieniło się istotnie w zależności od upływu czasu po przeszczepieniu. Obserwowano znaczne wahania stężenia lizozymu. Nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem lizozymu a szybkością wydzielania śliny. Średnie stężenie laktoferyny było istotnie statystycznie wyższe w grupie pacjentów po HCT w porównaniu z grupą kontrolną i wzrastało istotnie wraz ze spadkiem szybkości wydzielania śliny spoczynkowej i stymulowanej.

Wnioski. W każdym okresie po HCT należy spodziewać się znaczących wahań stężenia czynników odpornościowych zawartych w ślinie, szczególnie u pacjentów poddawanych immunosupresji, z zaburzeniami wydzielania śliny i/lub z chorobą „przeszczep przeciwko gospodarzowi”. Wysokie stężenie laktoferyny w ślinie może stanowić wskaźnik stanu zapalnego w obrębie tkanek miękkich jamy ustnej.

KEYWORDS

allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, lysozyme, lactoferrin, saliva

SUMMARY

Introduction. Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) is often associated with oral complications, which frequently affect the health and even lives of patients. Quantitative and qualitative impairment of salivary immunological factors, such as lactoferrin and lysozyme, can contribute to the development of these complications.

Aim. An analysis of salivary lysozyme and lactoferrin levels in patients in the late period (more than 100 days) after allogeneic stem cell transplantation. The time elapsed since transplantation and salivary flow rate were also taken into consideration.

Material and methods. A total of 45 patients 3.5 months to 5 years after HSCT were evaluated. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine saliva lactoferrin and lysozyme levels.

Results. No significant relationship was found between mean saliva lysozyme and lactoferrin levels and the time elapsed since HSCT. Significant differences in lysozyme levels were observed. No correlation was found between lysozyme levels and salivary flow rate. Mean lactoferrin levels were statistically significantly higher in post-HSCT patients compared to the control group and increased with a decrease in the stimulated and non-stimulated salivary flow rate.

Conclusions. Significant variations in the levels of immunological salivary factors should be always expected after HSCT, particularly in patients under immunosuppression and/or those with graft-versus-host disease. High levels of salivary lactoferrin can be an indicator of oral inflammation.

WSTĘP

Transplantacja komórek hematopoezy (ang. *hematopoietic cell transplantation* – HCT) stanowi obecnie coraz szerzej stosowaną metodę leczenia wielu schorzeń, w tym m.in. chorób rozrostowych układu krwiotwórczego oraz wrodzonych zaburzeń metabolicznych i immunologicznych (1). Do przeszczepienia wykorzystywane są komórki własne pacjenta (przeszczepienie autologiczne – autoHCT, ang. *autologic HCT*) lub komórki pochodzące od dawcy (przeszczepienie allogeniczne – alloHCT, ang. *allogeneic HCT*). Regeneracja układu krwiotwórczego po alloHCT jest procesem długotrwałym. U większości chorych przez długi czas utrzymują się zaburzenia jakościowe i ilościowe odporności komórkowej i humoralnej (2). Pomimo znacznego postępu w terapii, transplantacja komórek hematopoezy łączy się z występowaniem szeregu powikłań, które u większości pacjentów obejmują również jamę ustną (2, 3). Do najpoważniejszych należą zapalenie błony śluzowej jamy ustnej oraz zmniejszenie wydzielania śliny (3, 4). Obniżenie sekrecji śliny skutkuje zmianą jej składu, w tym również zmianą stężenia nieswoistych i swoistych czynników odpornościowych (5-7), co z kolei może znacząco przyczyniać się do rozwoju procesów chorobowych w jamie ustnej (8).

Jednym z najistotniejszych czynników nieswoistej odporności zawarty w ślinie są lizozym i laktoferyna (8-10). Lizozym (muramidaza) to kationowe białko, którego źródłami w ślinie są: wydzielina komórek surowiczych gruczołów ślinowych, płyn szczeliny dziąsłowej oraz ziarnistości neutrofilii, monocytów i makrofagów. Enzym ten posiada szeroki zakres niespecyficznego oddziaływania na drobno-ustroje patogenne. Działa on głównie na bakterie Gram-do-

INTRODUCTION

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an increasingly used therapeutic method in a number of diseases, such as hematopoietic proliferative diseases and congenital metabolic and immune disorders (1).

Patient's own cells (autologous HSCT) or donor's cells (allogeneic HSCT) are used for transplantation. The regeneration of hematopoietic system after allo-HSCT is a slow process. Quantitative and qualitative impairment of cellular and humoral immunity persists for a long time in most patients (2). Despite significant therapeutic advances, hematopoietic stem cell transplantation involves the risk of a number of complications, which also affect the oral cavity in most patients (2, 3). The most serious complications include inflammation of the oral mucosa and reduced saliva production (3, 4). Reduced salivary secretion leads to changes in saliva composition, including altered levels of nonspecific and specific immune factors (5-7), which may in turn significantly contribute to the development of pathological processes in the oral cavity (8).

Lysozyme and lactoferrin belong to the most important nonspecific salivary immune factors (8-10). Lysozyme (muramidase) is a cationic protein found in the secretion from the serous cells of the salivary glands, gingival crevicular fluid as well as neutrophils, monocytes and macrophages. The enzyme has a broad spectrum of non-specific action on pathogenic microorganisms. It acts primarily on gram-positive bacteria (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*), to a lesser degree on gram-negative bacte-

datnie (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*), w mniejszym stopniu na bakterie Gram-ujemne (np. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*) i niektóre gatunki grzybów (np. *Candida* spp.) (3, 11). Lizozym powoduje rozpad komórek drobnoustrojów poprzez hydrolizę wiązań pomiędzy N-acetylo-glukozaminą i kwasem N-acetylo-muraminowym peptydoglikanu w ścianie komórkowej bakterii (12). Dodatkowo wykazuje zdolność aktywowania bakteryjnych autolizyn oraz zdolność do hamowania absorpcji glukozy i produkcji kwasów przez bakterie (11, 12). Jak stwierdzono, lizozym może także powodować agregację drobnoustrojów oraz inaktywować niektóre wirusy (11). Muramidaza działa również przeciwwapalnie, hamując chemotaksję leukocytów oraz bezpośrednio modulując reakcję dopełniacza (10). Ponadto uczestniczy w mechanizmach produkcji gammaglobulin i przyspieszania tworzenia ziarniny (12) oraz posiada właściwości przeciwnowotworowe (13).

Laktoferyna to glikoproteina należąca do transferyn, wytwarzana przez komórki nabłonkowe, powszechnie występująca w wydzielinach takich jak mleko, ślina, łzy, wydzielina przewodu pokarmowego (14). Stanowi ona także jeden z głównych składników ziarnistości neutrofilii, z których zostaje uwolniona podczas reakcji zapalnej (15), stąd podwyższony poziom tego białka uważany jest przez niektórych autorów za istotny wskaźnik procesu zapalnego (9, 15). Źródłem laktoferyny w ślinie są komórki nabłonkowe ślinowych gruczołów surowicznych. Pochodzić może ona również z osocza przesączającego się do śliny w trakcie stanów zapalnych błony śluzowej i/lub ślinianek (6), a także stanowić produkt rozpadu granulocytów umiejscowionych w szczelinie dziąsłowej (4). Laktoferyna działa biostatycznie lub biobójczo wobec wielu gatunków bakterii (w tym *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*), grzybów (*C. albicans*) oraz wirusów (HPV1) (9, 16). Działanie przeciwdrobnoustrojowe laktoferyny wiąże się m.in. z jej wysoką zdolnością do wiązania jonów żelaza, uniemożliwiającą wykorzystanie tego pierwiastka przez patogeny (13, 17). Dodatkowo, laktoferyna rozpadając się pod wpływem pepsyny uwalnia peptydy mające bezpośrednie działanie bakteriostatyczne i przeciwiwgrzybiczne (12). Laktoferyna wywiera również działanie immunomodulujące m.in. przez pobudzenie limfocytów do wzmożonej produkcji cytokin TNF- α i INF- γ , a także poprzez stymulowanie neutrofilii do fagocytozy oraz wydzielanie interleukiny II-8 (18). Ponadto laktoferyna reguluje produkcję GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) przez makrofagi (14) oraz zaburza przyleganie drobnoustrojów do tkanek, w tym *Streptococcus mutans* do hydroksyapatytu szkliwa zębów (18).

CEL PRACY

Celem pracy była analiza stężenia wybranych nieswoistych składników systemu obronnego śliny mieszanej, tj. lizozymu i laktoferyny, u pacjentów będących w późnej fazie (tzn. powyżej setnej doby) po allogeniczej transplantacji komórek

ria (e.g. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*) and some fungal species (e.g. *Candida* spp.) (3, 11). Lysozyme causes microbial cell lysis by hydrolysing the bonds between N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid in cellular wall peptidoglycan (12). Additionally, it can activate bacterial autolysis as well as inhibit bacterial glucose absorption and acid production (11, 12). It was found that lysozyme can also induce microbial aggregation and inactivate some viruses (11). Muramidase also acts as an anti-inflammatory agent by the inhibition of leukocyte chemotaxis and a direct modulation of complement reaction (10). Additionally, the agent is involved in the production of gamma globulins, it accelerates granulation tissue formation (12) and has anticancer properties (13).

Lactoferrin is a glycoprotein belonging to the transferrin family, produced by epithelial cells, which is very common in secretory fluids such as milk, saliva, tears or gastrointestinal secretion (14). It is also one of the main components in the granules of neutrophils, from which it is released during inflammation (15), therefore an increased level of this protein is considered by some authors to be an important indicator of inflammation (9, 15). Salivary lactoferrin is produced in the epithelial cells of the serous salivary glands. It may be also derived from plasma penetrating into saliva during inflammation of the mucosa and/or salivary glands (6) or form as a product of degradation of granulocytes located in the gingival sulcus (4). Lactoferrin has biostatic and biocidal effects against a number of bacteria (including *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*), fungi (*C. albicans*) and viruses (HPV1) (9, 16). The antimicrobial activity of lactoferrin is related to e.g. its high capacity of binding iron ions, and thus depriving pathogens of this element (13, 17). Additionally, when degraded by pepsin, lactoferrin releases peptides showing direct bacteriostatic and antifungal activity (12). Lactoferrin also exerts immunomodulating effects, e.g. by stimulating lymphocytes to increase TNF- α and INF- γ cytokine production as well as by stimulating neutrophil phagocytosis and the release of interleukin (II)-8 (18). Furthermore, lactoferrin regulates the production of GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) in macrophages (14) and impairs microbial adhesion to tissues, including the adhesion of *Streptococcus mutans* to tooth enamel hydroxyapatite (18).

AIM

The aim of the study was to analyse the levels of selected non-specific immune components of mixed saliva, i.e. lysozyme and lactoferrin, in patients in the late period (i.e. more than 100 days) after allogeneic hematopoietic cell transplantation. It was also evaluated whether there were significant differences in mixed saliva levels of lysozyme

krwiotwórczych. Oceniano również, czy stężenie lizozymu i laktoferyny w ślinie mieszanej zmieniało się istotnie w zależności od czasu, jaki upłynął od momentu transplantacji. Ponadto badano zależność między stężeniem lizozymu i laktoferyny w ślinie mieszanej a szybkością jej wydzielania.

MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto 45 osób (17 kobiet i 28 mężczyzn), znajdujących się w okresie od 3,5 miesiąca do 5 lat po alloHCT, będących pod opieką Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Katedry Stomatologii Zachowawczej GUMed. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki GUM nr NKEBN/886/2004. Badania wykonano zgodnie z zaleceniami Konwencji Helsińskiej.

Pacjentów podzielono na trzy grupy w zależności od czasu, jaki upłynął od zabiegu przeszczepienia, uwzględniając w ten sposób stopniowy proces rekonstrukcji układu krwiotwórczego po alloHCT. Grupę I stanowiły osoby znajdujące się w okresie od 3,5 do 10 miesięcy po transplantacji (tzn. w fazie znacznej niedojrzałości układu krwiotwórczego). Grupa II obejmowała pacjentów będących w okresie od 12 do 24 miesięcy po transplantacji (tj. w fazie postępującej stabilizacji układu krwiotwórczego). Grupę III stanowiły osoby będące w okresie powyżej 24 miesięcy po transplantacji (tj. w okresie osiągniętej pełnej dojrzałości układu krwiotwórczego). Grupę kontrolną stanowiło 27 zdrowych osób, które wyraziły zgodę na przeprowadzenie badania (tab. 1).

Od każdego pacjenta pobierano ślinę mieszaną spoczynkową i stymulowaną, w godzinach przedpołudniowych,

and lactoferrin, depending on the time elapsed since transplantation. Furthermore, the relationship between mixed saliva levels of lysozyme and lactoferrin and the salivary flow rate was assessed.

MATERIAL AND METHODS

A total of 45 patients (17 women and 28 men) 3.5 months up to 5 years after allogeneic HSCT, remaining under the care of the Department of Haematology and Transplantation at the Medical University of Gdańsk and the Department of Conservative Dentistry at the Medical University of Gdańsk were included in the study. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Gdańsk (No. NKEBN/886/2004). All tests were performed in accordance with the recommendations of the Helsinki Convention.

Patients were divided into three groups, depending on the time elapsed since transplantation, to include the gradual process of hematopoietic reconstitution after allogeneic HSCT in the assessment. Group I included patients 3.5 to 10 months after transplantation (i.e. in the phase of significant hematopoietic immaturity). Group II included patients 12 to 24 months after transplantation (i.e. in the phase of progressive stabilization of the hematopoietic system). Group III included patients more than 24 months after transplantation (i.e. in the phase of full hematopoietic maturity). Control group included 27 healthy individuals who consented to participate in the study (tab. 1).

Tab. 1. Charakterystyka pacjentów z uwzględnieniem czasu, jaki upłynął od alloHCT

Grupa	Liczba osób		Czas po alloHCT (miesiące)			Wiek badanych osób (lata)		
	n	$\bar{x} \pm \delta$	Me	zakres	$\bar{x} \pm \delta$	Me	zakres	
I	20	5,9 ± 2,3	6	3,5-10	41,6 ± 10,4	46	22-54	
II	14	19,1 ± 3,2	18,5	12-24	31,4 ± 7,7	30	21-46	
III	11	36,9 ± 10,8	36	27-66	40,4 ± 10,8	40	19-54	
Razem	45	17,6 ± 13,7	17	3,5-66	38,1 ± 10,1	38	19-54	

Tab. 1. Patient characteristics, taking into account the time elapsed since allogeneic HSCT

Group	Number of subjects		Time since allo-HSCT (months)			Age (years)		
	n	$\bar{x} \pm \delta$	Me	range	$\bar{x} \pm \delta$	Me	range	
I	20	5.9 ± 2.3	6	3.5-10	41.6 ± 10.4	46	22-54	
II	14	19.1 ± 3.2	18.5	12-24	31.4 ± 7.7	30	21-46	
III	11	36.9 ± 10.8	36	27-66	40.4 ± 10.8	40	19-54	
In total	45	17.6 ± 13.7	17	3.5-66	38.1 ± 10.1	38	19-54	

przy czym przez 2 godziny poprzedzające zbieranie materiału pacjent powstrzymywał się od jedzenia, mycia zębów, palenia papierosów, żucia gumy, a ponadto od spożywania płynów, o ile pozwalał na to stan ogólny chorego oraz stopień nasilenia uczucia suchości jamy ustnej. Zbieranie śliny spoczynkowej polegało na jej gromadzeniu w ustach przez okres 2 minut, a następnie odpluwaniu do kalibrowanej probówki typu Corning. Czynność tę powtarzano trzykrotnie, uzyskując łączny czas pobierania równy 6 minut. Całkowitą objętość zebranej śliny spoczynkowej dzielono następnie przez 6, otrzymując ilość śliny wydzielonej w ciągu jednej minuty (ml/min). Pobudzenie wydzielania śliny stymulowanej uzyskiwano poprzez żucie przez pacjenta kostki parafiny w czasie 6 minut. Pierwszą partię śliny, wydzieloną po 1 minucie stymulacji, chory połykał, kolejne porcje śliny odpluwał w trakcie 5 minut żucia do probówki. Całkowitą objętość uzyskanej śliny stymulowanej przeliczano następnie na ilość wydzieloną w ciągu jednej minuty (ml/min). W odwirowanej ślinie mieszanej spoczynkowej i stymulowanej (10 000 x g; 10 min) oznaczano stężenie laktoferyny i stężenie lizozymu. Badania biochemiczne śliny zostały przeprowadzone w laboratorium Katedry i Zakładu Stomatologii Zachowawczej GUMed. Do oznaczenia stężenia lizozymu i laktoferyny wykorzystano dwuetapową metodę immunoenzymatyczną opartą na teście ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) (19). Jako wzorzec zastosowano lizozym z ludzkiego mleka (Sigma-Aldrich). Uzyskane wyniki przedstawiono w $\mu\text{g/ml}$.

Do analizy statystycznej wykorzystano test nieparametryczny U Manna-Whitneya oraz korelację Spearmana. Za poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.

WYNIKI

W tabeli 2 przedstawiono stężenie lizozymu, a w tabeli 3 stężenie laktoferyny w ślinie mieszanej spoczynkowej i stymulowanej 45 pacjentów poddanych alloHCT oraz u 27 osób z grupy kontrolnej. Analizując parametry śliny u osób po transplantacji stwierdzono, że zarówno średnie stężenie lizozymu, jak i laktoferyny w ślinie mieszanej spoczynkowej oraz stymulowanej nie zmieniało się istotnie w zależności od upływu czasu po przeszczepieniu.

Średnie stężenie lizozymu w ślinie spoczynkowej pacjentów po transplantacji było zbliżone do stężenia w ślinie osób z grupy kontrolnej (tab. 2). Natomiast średnie stężenie lizozymu w ślinie stymulowanej osób po transplantacji było nieistotnie statystycznie wyższe w porównaniu ze stężeniem w ślinie osób zdrowych (tab. 2). Jak zauważono, w grupie pacjentów po alloHCT występowały znaczne wahania stężenia lizozymu i duży ich rozrzut – szczególnie dotyczyło to pacjentów z grupy I. Natomiast w grupie kontrolnej wahania badanego parametru były niewielkie. Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem lizozymu a szybkością wydzielania śliny spoczynkowej i stymulowanej zarówno u pacjentów po alloHCT, jak i w grupie kontrolnej (tab. 2).

Stimulated and resting mixed saliva was taken from all patients before noon (the patients refrained from eating, tooth brushing, smoking, chewing gum, and also drinking, unless precluded by their general condition or the degree of mouth dryness, for two hours before taking samples). Collection of resting saliva involved 2-minute salivary accumulation in the mouth followed by spitting into a calibrated test tube of a Corning type. This activity was repeated three times, which gave the total time of saliva collection equal to 6 minutes. The total volume of the collected resting saliva was divided by 6 to obtain the amount of saliva secreted during one minute (ml/min). Salivary stimulation involved chewing a paraffin block for 6 minutes. The first portion of saliva (after 1-minute stimulation) was swallowed by the patient, while the subsequent portions, secreted during the remaining 5 minutes of chewing, were collected in the test tube. Next, the amount secreted during one minute (ml/min) was calculated based on the total volume of the collected stimulated saliva. Lactoferrin and lysozyme levels were assayed in the centrifuged mixed resting and stimulated saliva (10,000 x g; 10 min). Biochemical salivary testing was performed in the laboratory of the Department of Conservative Dentistry at the Medical University of Gdańsk. A two-step method based on ELISA was used for lysozyme and lactoferrin level assessment (19). Human milk lysozyme (Sigma-Aldrich) was used as a reference. The obtained results are given in $\mu\text{g/ml}$. The non-parametric Mann-Whitney U test and Spearman's rank correlation were used in statistical analysis. The level of significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Table 2 shows lysozyme levels and table 3 shows lactoferrin levels in mixed resting and stimulated saliva from 45 patients after allogeneic HSCT and 27 controls. The analysis of salivary parameters in post-transplant patients revealed that the mean lysozyme and lactoferrin levels in mixed resting and stimulated saliva did not change significantly depending on the time elapsed since transplantation.

The mean resting salivary levels of lysozyme in post-transplant patients were comparable to those in patients in the control group (tab. 2). The mean stimulated salivary levels of lysozyme in post-transplant patients were statistically insignificantly higher compared to those in healthy individuals (tab. 2). It was noted that significant fluctuations and a large scatter in lysozyme levels occurred in post-allo-HSCT patients, particularly in Group I, whereas only minor differences in the same parameter were found in the control group. No statistically significant relationship was found in lysozyme levels and resting/stimulated

Tab. 2. Stężenie lizozymu w ślinie spoczynkowej i stymulowanej z uwzględnieniem czasu, jaki upłynął od alloHCT, oraz szybkości wydzielania śliny, i w porównaniu z grupą kontrolną

Badana grupa	Liczba badanych	Czas po alloHCT (miesiące)	Stężenie lizozymu					
			Ślina spoczynkowa (µg/ml)			Ślina stymulowana (µg/ml)		
			$\bar{x} \pm \delta$	Me	zakres	$\bar{x} \pm \delta$	Me	zakres
I	20	3,5-10	19,5 ± 23,9	12,4	0,8-101,0	20,4 ± 31,6	10,7	3,1-124,8
II	14	12-24	11,2 ± 7,9	9,9	0,42-21,9	12,0 ± 8,7	9,2	2,4-33,2
III	11	27-66	10,1 ± 5,8	8,5	1,86-16,3	16,4 ± 10,5	19,2	0,54-33,1
Razem	45	3,5-66	14,6 ± 17,6	10,9	0,42-101,0	16,8 ± 22,2	11,0	0,54-124,8
Grupa kontrolna	27	-	12,8 ± 9,5	10,3	1,1-24,7	10,4 ± 7,8	7,7	0,49-27,48
Korelacja pomiędzy stężeniem lizozymu w ślinie a szybkością wydzielania śliny		Pacjenci po alloHCT	r = -0,078; p = 0,608 (NS)			r = -0,091; p = 0,553 (NS)		
		Grupa kontrolna	r = 0,063; p = 0,751 (NS)			r = -0,061; p = 0,758 (NS)		
Korelacja pomiędzy stężeniem lizozymu w ślinie a czasem po alloHCT			r = -0,120; p = 0,431 (NS)			r = 0,053; p = 0,729 (NS)		

Istotność różnic oceniana testem U Manna-Whitneya
Współczynnik korelacji Spearmana, NS – korelacja nieistotna

Tab. 2. Resting and stimulated salivary levels of lysozyme in terms of the time elapsed since allogeneic HSCT as well as the salivary flow rate vs. control group

Study group	Number of subjects	Time since allo-HSCT (months)	Lysozyme levels					
			Resting saliva (µg/mL)			Stimulated saliva (µg/mL)		
			$\bar{x} \pm \delta$	Me	range	$\bar{x} \pm \delta$	Me	range
I	20	3,5-10	19,5 ± 23,9	12,4	0,8-101,0	20,4 ± 31,6	10,7	3,1-124,8
II	14	12-24	11,2 ± 7,9	9,9	0,42-21,9	12,0 ± 8,7	9,2	2,4-33,2
III	11	27-66	10,1 ± 5,8	8,5	1,86-16,3	16,4 ± 10,5	19,2	0,54-33,1
In total	45	3,5-66	14,6 ± 17,6	10,9	0,42-101,0	16,8 ± 22,2	11,0	0,54-124,8
Controls	27	-	12,8 ± 9,5	10,3	1,1-24,7	10,4 ± 7,8	7,7	0,49-27,48
Correlation between salivary levels of lysozyme and salivary flow rate		Post-allo-HSCT patients	r = -0,078; p = 0,608 (NS)			r = -0,091; p = 0,553 (NS)		
		Controls	r = 0,063; p = 0,751 (NS)			r = -0,061; p = 0,758 (NS)		
Correlation between salivary levels of lysozyme and time since allo-HSCT			r = -0,120; p = 0,431 (NS)			r = 0,053; p = 0,729 (NS)		

The significance of differences was evaluated based on the Mann-Whitney U test
Spearman's correlation coefficient, NS – insignificant correlation

Średnie stężenie laktoferyny w ślinie mieszanej spoczynkowej oraz stymulowanej było istotnie statystycznie wyższe w całej badanej grupie pacjentów po alloHCT w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,01$ i $p < 0,001$) (tab. 3). Zwraca uwagę, że średnie stężenie laktoferyny zarówno w ślinie

salivary flow rate between post-allo-HSCT patients and controls (tab. 2). Mixed resting and stimulated salivary levels of lactoferrin were statistically significantly higher in the whole group of post-allo-HSCT patients compared to controls ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) (tab.3). It should

Tab. 3. Ocena stężenia laktoferyny w ślinie spoczynkowej i stymulowanej z uwzględnieniem czasu, jaki upłynął od alloHCT, oraz szybkości wydzielania śliny, i w porównaniu z grupą kontrolną

Badana grupa	Liczba badanych	Czas po alloHCT (miesiące)	Stężenie laktoferyny					
			Ślina spoczynkowa (µg/ml)			Ślina stymulowana (µg/ml)		
			$\bar{x} \pm \delta$	Me	zakres	$\bar{x} \pm \delta$	Me	zakres
I	20	3,5-10	46,1 ± 49,0 ^c	23,9	0,83-169,3	29,4 ± 22,6 ^d	26,8	0,99-96,5
II	14	12-24	28,5 ± 30,4	19,9	3,4-116,8	21,4 ± 26,5	13,7	3,9-105,9
III	11	27-66	38,5 ± 35,0 ^e	27,0	5,91-96,0	30,4 ± 28,5 ^f	25,2	2,0-65,9
Razem	45	3,5-66	38,8 ± 40,6 ^a	22,8	0,83-169,3	27,2 ± 25,1 ^b	24,6	0,99-105,9
Grupa kontrolna	27	-	18,9 ± 30,3 ^{a,c,e}	11,2	0,62-147,5	10,5 ± 13,8 ^{b,d,f}	7,1	1,8-74,5
Korelacja pomiędzy stężeniem laktoferyny w ślinie a szybkością wydzielania śliny		Pacjenci po alloHCT	r = -0,290; p < 0,05*			r = -0,350; p < 0,05*		
		Grupa kontrolna	r = -0,393; p < 0,05*			r = -0,780; p = 0,371 (NS)		
Korelacja pomiędzy stężeniem laktoferyny w ślinie a czasem po alloHCT			r = -0,044; p = 0,773 (NS)			r = -0,112; p = 0,463 (NS)		

Istotność różnic oceniana testem U Manna-Whitneya **p < 0,01 a-a, ***p < 0,001; b-b, **p < 0,01 c-c, ***p < 0,001 d-d, *p < 0,05 e-e, *p < 0,05 f-f

Korelacja Spearmana, NS – korelacja nieistotna

Tab. 3. An assessment of resting and stimulated salivary levels of lactoferrin in terms of the time elapsed since allogeneic HSCT as well as the salivary flow rate vs. control group

Study group	Number of subjects	Time since allo-HSCT (months)	Lactoferrin levels					
			Resting saliva (µg/mL)			Stimulated saliva (µg/mL)		
			$\bar{x} \pm \delta$	Me	range	$\bar{x} \pm \delta$	Me	range
I	20	3,5-10	46.1 ± 49.0 ^c	23.9	0.83-169.3	29.4 ± 22.6 ^d	26.8	0.99-96.5
II	14	12-24	28.5 ± 30.4	19.9	3.4-116.8	21.4 ± 26.5	13.7	3.9-105.9
III	11	27-66	38.5 ± 35.0 ^e	27.0	5.91-96.0	30.4 ± 28.5 ^f	25.2	2.0-65.9
In total	45	3,5-66	38.8 ± 40.6 ^a	22.8	0.83-169.3	27.2 ± 25.1 ^b	24.6	0.99-105.9
Controls	27	-	18.9 ± 30.3 ^{a,c,e}	11.2	0.62-147.5	10.5 ± 13.8 ^{b,d,f}	7.1	1.8-74.5
Correlation between salivary levels of lactoferrin and salivary flow rate		Post-allo-HSCT patients	r = -0.290; p < 0.05*			r = -0.350; p < 0.05*		
		Controls	r = -0.393; p < 0.05*			r = -0.780; p = 0.371 (NS)		
Correlation between salivary levels of lactoferrin and time since allo-HSCT			r = -0.044; p = 0.773 (NS)			r = -0.112; p = 0.463 (NS)		

The significance of differences was evaluated based on the Mann-Whitney U test **p < 0.01 a-a, ***p < 0.001; b-b, **p < 0.01 c-c, ***p < 0.001 d-d, *p < 0.05 e-e, *p < 0.05 f-f

Spearman's correlation coefficient, NS – insignificant correlation

spoczynkowej, jak i w stymulowanej było szczególnie wysokie w okresie najwcześniejszym po transplantacji (grupa I) oraz w okresie najpóźniejszym (grupa III) i różniło się istotnie statystycznie od średniego stężenia w grupie kontrolnej. W grupie osób po alloHCT, jak i w grupie kontrolnej stężenie laktoferyny wzrastało istotnie statystycznie wraz ze spadkiem szybkości wydzielania śliny spoczynkowej ($p < 0,05$). Natomiast w przypadku śliny stymulowanej taka zależność dotyczyła tylko osób po alloHCT ($p < 0,05$) (tab. 3).

DYSKUSJA

W aspekcie oceny patologii jamy ustnej pacjentów będących w późniejszym okresie po alloHCT, interesująca była odpowiedź na pytanie, czy dochodzi do zmian stężenia wybranych parametrów śliny, wchodzących w skład jej mechanizmów obronnych. Wyniki badań własnych wskazują, że średnie stężenie lizozymu zarówno w ślinie spoczynkowej, jak i w stymulowanej nie różniło się istotnie statystycznie pomiędzy ogółem pacjentów po alloHCT a grupą kontrolną. Natomiast zauważono, że w grupie pacjentów po alloHCT występowały bardzo zróżnicowane wartości stężenia lizozymu i duży ich rozrzut, z przesunięciem w kierunku wysokich wartości. Szczególnie dotyczyło to osób będących w pierwszym roku po transplantacji. Jak wiadomo, w okresie tym środowisko jamy ustnej zostaje poddane działaniu wielu czynników, które potencjalnie mogą regulować poziom lizozymu w ślinie. Według niektórych autorów wpływ taki wywierają przede wszystkim leki immunosupresyjne (20). W badaniu przeprowadzonym przez Pajari i wsp. (20) stwierdzono istotne podwyższenie stężenia muramidazy w ślinie zmierzone w trakcie trwania chemioterapii. Przeciwnie, wyniki badań Karolewskiej i wsp. przeprowadzonych w grupie dzieci leczonych z powodu białaczki, nie wykazały istotnych różnic pomiędzy stężeniem lizozymu w ślinie spoczynkowej tych osób przed rozpoczęciem terapii i w trakcie jej trwania. Zaobserwowano jednak nieznaczną tendencję wzrostową stężenia lizozymu w miarę postępu leczenia, co według autorów miało związek z grzybicą jamy ustnej (21). Duże znaczenie w regulacji stężenia lizozymu w ślinie przypisuje się także występowaniu niektórych chorób miejscowych oraz ogólnoustrojowych, w tym zwłaszcza tych o podłożu zapalnym (22, 23). Rathnayake i wsp. stwierdzili podwyższone stężenie muramidazy w ślinie pacjentów z zapaleniem przyzębia (23). Podobne zmiany występowały u osób z wrzodzącym zapaleniem jelita grubego, chorobami układu mięśniowo-stawowego, układu krążenia oraz z cukrzycą (22). W prezentowanej przez nas pracy ponad 70% badanych osób miało objawy zapalenia w obrębie błony śluzowej jamy ustnej. Obserwowano je zwłaszcza u pacjentów będących w pierwszym roku po alloHCT. Obecność zmian zapalnych, a także współistnienie chorób ogólnoustrojowych wraz z ich leczeniem mogło mieć wpływ na zróżnicowany poziom lizozymu w ślinie. W badaniach własnych nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy szybkością wydzielania śliny spoczynkowej i stymulowanej a poziomem

byłoby to, że zarówno w spoczynkowej, jak i w stymulowanej ślinie poziom laktoferyny był szczególnie wysoki w okresie najwcześniejszym po transplantacji (grupa I) oraz w okresie najpóźniejszym (grupa III) i różnił się istotnie statystycznie od średniego stężenia w grupie kontrolnej. W grupie osób po alloHCT, jak i w grupie kontrolnej stężenie laktoferyny wzrastało istotnie statystycznie wraz ze spadkiem szybkości wydzielania śliny spoczynkowej ($p < 0,05$). Natomiast w przypadku śliny stymulowanej taka zależność dotyczyła tylko osób po alloHCT ($p < 0,05$) (tab. 3).

DISCUSSION

In terms of oral cavity pathology in patients in the late period after allogeneic HSCT, the answer to the question whether there was a change in the levels of selected salivary parameters, representing salivary defence mechanisms, was interesting. Our findings indicate that there was no statistically significant difference in the mean resting or stimulated salivary levels of lysozyme between all post-allo-HSCT patients and the controls. It was noted that the levels of lysozyme in post-allo-HSCT patients were very varied and dispersed, in favour of higher values, particularly in patients in the first year after transplantation. It is a known fact that the oral environment is subjected to a variety of factors, which can potentially modulate salivary lysozyme levels. According to some authors, such effects are primarily caused by immunosuppressants (20). Pajari et al. (20) found significantly increased salivary levels of muramidase during chemotherapy in their study. On the contrary, Karolewska et al. showed no differences between resting salivary levels of lysozyme before and during therapy in their study in children treated for leukemia. However, a minor tendency of lysozyme levels to increase with the treatment progress was observed, which, according to the authors, was related to oral mycosis (21). The occurrence of some of the local and systemic diseases, inflammatory in particular, is believed to be of significant importance (22, 23). Rathnayake et al. found increased muramidase levels in the saliva from patients with periodontitis (23). Similar changes were observed in patients with ulcerative colitis, musculoskeletal and cardiovascular diseases and diabetes (22). Our study showed that more than 70% of patients developed the symptoms of oral mucosa inflammation. The symptoms occurred particularly in patients in the first year after allogeneic HSCT. Inflammatory lesions as well as the coexistent systemic diseases and their treatment could have accounted for the differences in the levels of salivary lysozyme. We have not found a statistically significant correlation between resting and stimulated salivary flow rate and lysozyme levels. Such a correlation was also absent in the studies presented by Zipp et al., who

lizozymu. Podobny brak zależności wykazali Zipp i wsp., którzy oceniali wydzielanie śliny stymulowanej u chorych z zespołem Sjögrena (24). Natomiast Zalewska i wsp., badając 30 pacjentów obciążonych reumatoidalnym zapaleniem stawów, stwierdzili wyższe stężenia lizozymu w ślinie osób chorych z obniżeniem sekrecji, przy równoczesnym niższym wyrzucie tego enzymu w porównaniu do grupy bez zaburzeń wydzielania śliny. Jak wyjaśniają, wzrost całkowitego stężenia lizozymu może mieć związek z naciekiem ślinianek przez komórki zapalne oraz uwalnianiem białka z tych komórek. Równocześnie obniżony „wyrzut” lizozymu może wynikać z uszkodzenia gruczołów przez procesy patologiczne, takie jak np. zwłóknienie czy atrofia (25). Należy zwrócić uwagę, że podobne zmiany w gruczołach ślinowych obserwuje się często również u pacjentów poddawanych alloHCT, dotkniętą chorobą „przeszczep przeciwko gospodarzowi” (26).

Analizując poziom laktoferyny, stwierdzono, że zarówno w ślinie spoczynkowej, jak i stymulowanej był on istotnie statystycznie wyższy w grupie pacjentów po alloHCT, w porównaniu z grupą kontrolną. Średnie stężenie laktoferyny u pacjentów po przeszczepieniu utrzymywało się na poziomie zbliżonym do tego, jakie obserwowali Eliasson i wsp. u osób z zespołem Sjögrena (27). Również Imanguli i wsp. badając ślinę osób będących 6 miesięcy po alloHCT, stwierdzili liczne zmiany w profilu białkowym w porównaniu do okresu przed transplantacją, w tym między innymi znacząco podwyższone stężenie laktoferyny (28). Wyniki badań własnych wskazują, że stężenie laktoferyny zależało istotnie statystycznie od szybkości wydzielania śliny zarówno spoczynkowej, jak i stymulowanej (była to korelacja ujemna). Na podobną zależność zwrócili uwagę Sikorska i wsp., badając poziom tego białka w ślinie osób zdrowych (17). Analiza piśmiennictwa oraz wyników badań własnych sugeruje, że przyczyną podwyższenia stężenia laktoferyny w grupie pacjentów po alloHCT mógł być m.in. stan zapalny dziąseł. Jak stwierdzono, objawy zapalenia dziąseł o różnym stopniu zaawansowania miało aż 56,8% osób po transplantacji, badanych w niniejszej pracy (dane nieujęte w tabeli). Również Almståhl i wsp., oceniając stan zdrowia jamy ustnej pacjentów z zespołem Sjögrena, sugerowali zapalenie przyzębia brzęznego jako możliwą przyczynę wzrostu stężenia laktoferyny w ślinie tych osób (8). Dodds i wsp. uważają, że wysokie stężenie laktoferyny w ślinie może wynikać ze stanu zapalnego toczącego się w obrębie ślinianek (6). Według innych autorów na wzrost poziomu laktoferyny w ślinie wpływa zmieniona przepuszczalność błony śluzowej jamy ustnej dla składników osocza, która występuje u osób z długo utrzymującym się obniżonym wydzielaniem śliny (27). Patomechanizm tego rodzaju mógł mieć miejsce również w przypadku grupy pacjentów prezentowanej w niniejszej pracy, ponieważ, jak to przedstawiono we wcześniejszych publikacjach, aż u 39 spośród 45 badanych występowały kliniczne objawy świadczące o niedoborze śliny (4). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że czas, jaki upłynął od alloHCT, nie wpływał decydująco na stężenie laktoferyny. Natomiast Izutsu i wsp., badając osoby po transplantacji,

assessed stimulated salivary flow rate in patients with Sjögren's syndrome (24). Zalewska et al. found in their study in 30 patients with rheumatoid arthritis that patients with reduced secretion and, at the same time, lower lysozyme secretion compared to patients with unimpaired salivary secretion, had high salivary levels of lysozyme. The authors postulate that the increase in the total lysozyme levels may be related to salivary gland infiltration by inflammatory cells and their release of proteins. The simultaneous reduction in the release of lysozyme may result from glandular impairment due to pathological processes, such as fibrosis or atrophy (25). It should be noted that similar changes in the glandular function are also often observed in patients after allogeneic HSCT with graft-versus-host disease (26).

The analysis of resting and stimulated salivary levels of lactoferrin revealed that the levels were statistically significantly higher in post-allo-HSCT patients compared to controls. The mean lactoferrin levels in post-transplant patients were comparable to those observed by Eliasson et al. in patients with Sjögren's syndrome (27). Imanguli et al., who analysed saliva in patients 6 weeks after allogeneic HSCT, found numerous changes in the protein profile compared to the pre-transplantation period, including e.g. significantly increased lactoferrin levels (28). Our findings indicate that lactoferrin levels were statistically significantly correlated with both resting and stimulated salivary flow rate (negative correlation). A similar relationship was noted by Sikorska et al., who assessed salivary lactoferrin levels in healthy individuals (17). The analysis of literature and own findings suggests that the increased levels of lactoferrin in post-allo-HSCT patients could be due to e.g. gingival inflammation. It was found that up to 56.8% of post-transplant patients participating in our study had gingival inflammation of varying degrees (data not included in the table). Almståhl et al., who assessed oral health in patients with Sjögren's syndrome, also suggested marginal periodontitis as a possible reason for the increased salivary lactoferrin levels in these patients (8). Dodds et al. believe that high salivary levels of lactoferrin may be due to salivary gland inflammation (6). According to other authors, increased salivary levels of lactoferrin are caused by altered permeability of the oral mucosa to plasma components, which is found in patients with chronic reduction in salivary flow (27). Such a pathomechanism could be also found in our patients as up to 39 out of 45 subjects developed clinical symptoms indicating salivary deficiency, as shown in previous publications (4). Based on the results, it was found that the time elapsed since allogeneic HSCT had no decisive influence on lactoferrin levels. Izutsu et al., who investigated post-transplant patients, found

stwierdzili stopniowy wzrost stężenia tej glikoproteiny w ślinie w miarę upływu czasu po transplantacji (26).

WNIOSKI

Stężenie lizozymu w ślinie spoczynkowej i stymulowanej osób poddanych alloHCT nie różniło się istotnie od stężenia w ślinie osób zdrowych. Natomiast zwracały uwagę znaczne wahania stężenia lizozymu i duży ich rozrzut występujące w ślinie zarówno spoczynkowej, jak i stymulowanej osób po alloHCT. W każdej z trzech grup, utworzonych w zależności od czasu po transplantacji, można było spotkać osoby z bardzo wysokim stężeniem lizozymu w ślinie mieszanej. Stężenie laktoferyny w ślinie mieszanej spoczynkowej oraz stymulowanej pacjentów po alloHCT było wysokie oraz istotnie statystycznie wyższe w porównaniu ze stężeniem w ślinie osób zdrowych. Stężenie zarówno lizozymu, jak i laktoferyny w ślinie mieszanej spoczynkowej oraz stymulowanej nie zależało istotnie od upływu czasu po zabiegu transplantacji. Stężenie laktoferyny wzrastało istotnie statystycznie wraz ze spadkiem szybkości wydzielania śliny zarówno spoczynkowej, jak i stymulowanej.

a gradual increase in salivary levels of this glycoprotein over time after transplantation (26).

CONCLUSIONS

No differences were found in resting and stimulated salivary levels between post-allo-HSCT patients and healthy individuals. Significant fluctuations and scatter in the levels of lysozyme in both resting and stimulated saliva were noticeable in post-allo-HSCT patients. Individuals with very high mixed salivary lysozyme could be identified in each of the three groups formed based on the time elapsed since transplantation. Mixed resting and stimulated salivary levels of lactoferrin were very high and statistically significantly higher in post-allo-HSCT patients compared to healthy individuals. Mixed resting and stimulated salivary levels of lysozyme and lactoferrin did not depend statistically significantly on the time elapsed since transplantation. The levels of lactoferrin increased statistically significantly with a decrease in resting and stimulated salivary flow rate.

KONFLIKT INTERESÓW CONFLICT OF INTEREST

Brak konfliktu interesów
None

ADRES DO KORESPONDENCJI CORRESPONDENCE

*Agnieszka Bogusławska-Kapała
Zakład Stomatologii Zintegrowanej
Katedra Stomatologii Zachowawczej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa
tel. +48 (22) 502-20-32
fax +48 502-20-38
agaka@op.pl

PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

1. Hołowiecki J: Transplantacja szpiku w Polsce i na świecie. *MediWeb.pl*, 21.10.2007.
2. Piekarska A: Wpływ rekonstrukcji immunologicznej na kształtowanie się odporności przeciwwzakaznej u chorych po przeszczepieniach allogenicznych komórek macierzystych hematopoezy. Praca na stopień doktora nauk medycznych. Klinika Hematologii Akademii Medycznej w Gdańsku, 2008.
3. Schubert MM, Correa ME: Oral graft-versus-host disease. *Dent Clin North Am* 2008; 52: 79-109.
4. Bogusławska-Kapała A, Kochańska B, Piekarska A et al.: Symptoms of xerostomia on physical examination of patients in late period after allogenic hematopoietic cell transplantation. *J Stoma* 2011; 64: 643-655.
5. Cackowska-Lass A, Kochańska B, Naumiuk Ł, Samet A: Wydzielanie śliny a występowanie niektórych drobnoustrojów w jamie ustnej u chorych z zespołem Sjögrena. *Czas Stomatol* 2010; 63: 79-89.
6. Dodds M, Johnson DA, Yeh CK: Health benefits of saliva: a review. *J Dent* 2005; 33: 223-233.
7. Kusiak A: Zmiany patologiczne jamy ustnej oraz właściwości fizykochemiczne śliny u kobiet z zespołem Turnera. Rozprawa habilitacyjna, *Ann Acad Med Gedan* 2007; 37.
8. Almståhl A, Wikström M, Groening J: Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 345-352.
9. Soukka T, Lumikari M, Tenovuo J: Combined Bactericidal Effect of Human Lactoferrin and Lysozyme Against *Streptococcus mutans* serotype c. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2009; 4: 259-264.
10. Gajda E, Bugla-Płoskońska G: Lizozym – występowanie w przyrodzie, właściwości biologiczne i możliwości zastosowań. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68: 1501-1515.
11. Yeh CK, Dodds WJ, Zuo P, Johnson DA: A population-based study of salivary lysozyme concentrations and candidal counts. *Arch Oral Biol* 1997; 42: 25-31.
12. Tenovuo J: Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Dis* 2002; 8: 23-29.
13. Sava G, Benetti A, Ceschia V, Pacor S: Lysozyme and cancer: role of exogenous lysozyme as anticancer agent (review). *Anticancer Res* 1989; 9: 583-591.
14. Carpenter GH: The secretion, components, and properties of saliva. *Ann Rev Food Sci Technol* 2013; 4: 267-276.
15. van't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Ligtenberg AJ: Antimicrobial defence systems in saliva. *Monogr Oral Sci* 2014; 24: 40-45.
16. Albar AH, Almehdar HA, Uversky VN, Redwan EM: Structural heterogeneity and multifunctionality of lactoferrin. *Curr Protein Pept*

Sci 2014; 28: 778-797. 17. Sikorska M, Mielnik-Błaszczak M, Kapeć E: The relationship between the levels of SigA, lactoferrin and α proteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-years-olds. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17: 272-276. 18. Artym J: Udział laktoferyny w gospodarce żelazem w organizmie. Część II. Działanie przeciwmikrobiologiczne i przeciwzapalne poprzez sekwestrację żelaza. *Postepy Hig Med Dosw* 2010; 64: 604-616. 19. Lequin RM: Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 2005; 51: 2415-2418. 20. Pajari U, Poikonen K, Larmas M, Lanning M: Salivary immunoglobulins, lysozyme, pH, and microbial counts in children receiving anti-neoplastic therapy. *Eur J Oral Sci* 1989; 97: 171-177. 21. Karolewska E, Pupek M, Konopka T, Chaber R: Mucositis in children with leukemia and salivary defence factors. *Dent Med Probl* 2007; 44: 30-36. 22. Quarnstrom M, Janket S-J, Jones JA et al.: Association of salivary lysozyme and C-reactive protein with metabolic syndrome. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 805-811. 23. Rathnayake N, Åkerman S, Klinge B et al.: Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Diseases. *PLoS One* 2013 Apr 24; 8(4): e61356. 24. Zipp MM, Yasbin L, Al-Hashimi I: The effect of parotid salivary flow rate on the levels of salivary antimicrobial proteins in patients with Sjögren's syndrome. *Quintessence* 1999; 30: 700-705. 25. Zalewska A, Waszkiewicz N, Szajda SD, Waszkiel D: Wpływ przepływu, stężenia i „wyrzutu” lizozymu w ślinie na zdrowie jamy ustnej pacjentów reumatoidalnych. *Postepy Hig Med Dosw* 2011; 65: 40-45. 26. Izutsu KT, Menard TW, Schubert MM et al.: Graft Versus Host Disease-Related Secretory Immunoglobulin A Deficiency in Bone Marrow Transplant Recipients. *Lab Invest* 1985; 52: 293-297. 27. Eliasson L, Almståhl A, Lingström P et al.: Minor gland saliva flow rate and proteins in subjects with hyposalivation due to Sjögren's syndrome and radiation therapy. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 293-299. 28. Imanguli MM, Atkinsosn JC, Harvey KE et al.: Changes in salivary proteome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2007; 35: 184-192.

nadesłano/submitted:

15.04.2016

zaakceptowano do druku/accepted:

05.05.2016