

# Rana dijagnostika karcinoma pločastih stanica usne šupljine

---

Đureković, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:785249>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-21**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu  
Stomatološki fakultet

Sara Đureković

# Rana dijagnostika karcinoma pločastih stanica usne šupljine

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2024. godina

Rad je ostvaren u: Zavod za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta u Zagrebu

Mentor rada: izv.prof.dr.sc Danica Vidović Juras

Lektor hrvatskog jezika: Mirjana Gašperov, prof., MBA

Lektor engleskog jezika: Adriana Čudina Ružić

Rad sadrži:   35  stranica

  1   tablicu

  0   slika

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora diplomskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihova podrijetla.

## **ZAHVALE**

Ovim putem htjela bih zahvaliti mentorici izv.prof.dr.sc. Danici Vidović Juras na strpljenju, potpori i usmjeravanju koji su uvelike doprinijeli pisanju i oblikovanju ovoga diplomskog rada.

Zahvaljujem svim profesorima i stručnjacima Stomatološkog fakulteta u Zagrebu na prenesenom znanju tijekom ovih šest godina.

Također, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci za vrijeme studiranja.

## **RANA DIJAGNOSTIKA KARCINOMA PLOČASTIH STANICA USNE ŠUPLJINE**

### **Sažetak**

Karcinom pločastih stanica usne šupljine je zloćudni tumor u regiji glave i vrata koji se može dijagnosticirati u najranijoj fazi, ali se u većini slučajeva dijagnosticira prekasno pa je praćen visokim morbiditetom i mortalitetom. Stomatolozi su u poziciji prepoznati oralne potencijalno zloćudne poremećaje kao i rani oralni karcinom. Za rano prepoznavanje važna je edukacija pacijenata i zdravstvenih djelatnika o ranim znakovima i simptomima zloćudne preobrazbe u usnoj šupljini. Stomatolozi trebaju poznavati trenutačno dostupne metode za ranu dijagnostiku karcinoma, tj. klinički pregled i biopsiju oralnih tkiva kao zlatni standard u dijagnostici, ali i dostupne pomoćne dijagnostičke metode, na bazi fluorescencije tkiva i vitalnih bojila. Ove metode nisu idealne pa se posljednjih godina razvija više novih metoda, manje invazivnih. Neke od tih metoda su analiza uzoraka ekfolijativne citologije i tekuće biopsije, slikovne metode temeljene na vizualizaciji strukture epitela uz pomoć ultrazvučnih signala ili refrakcije svjetlosti i nanočesticama ojačane konvencionalne spektroskopske metode. Iako obećavajuće, nove tehnike nisu još uvijek na stupnju razvoja kako bi se opravdala njihova komercijalna dostupnost i zahtijevaju dodatna istraživanja i edukaciju stručnjaka.

**Ključne riječi:** karcinom pločastih stanica, neoplazme usne šupljine, rana dijagnostika karcinoma

## **EARLY DIAGNOSIS OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

### **Summary**

Oral cavity squamous cell carcinoma is a malignant tumor located in the head and neck region. Although an early diagnosis is possible, in most cases it is made too late, resulting in high morbidity and mortality rates. Dental practitioners have an opportunity to detect potentially malignant oral disorders and early stages of oral carcinoma. Education of patients and healthcare professionals about the early signs and symptoms of malignant transformations in the oral cavity is crucial for early detection. Dental practitioners should be familiar with currently available methods for early diagnosis of carcinoma, clinical examination and oral tissue biopsy as the diagnostic gold standard, as well as with auxiliary diagnostic techniques based on tissue fluorescence and vital stains. Since these techniques are not perfect, newer, less invasive methods have emerged in recent years. Some of these methods include analysis of exfoliative cytology samples and liquid biopsy, imaging techniques based on visualization of epithelial structure using ultrasound signals or light refraction, and nanoparticle-enhanced conventional spectroscopy methods. Although promising, these new techniques have not yet been sufficiently developed to justify commercial availability and will require additional research and expert training.

**Key words:** squamous cell carcinoma, oral neoplasms, early diagnostics of cancer

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Planocelularni karcinom usne šupljine .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Potencijalno zloćudni poremećaji usne šupljine.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Važnost rane dijagnostike oralnog karcinoma .....</b>	<b>7</b>
<b>2. RANA DIJAGNOSTIKA ORALNOG KARCINOMA .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Dostupne metode rane dijagnostike.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.1. Klinički pregled .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.2. Biopsija.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.3. Brush biopsija i eksfolijativna citologija .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4.4. Vitalno bojenje.....</b>	<b>12</b>
<b>2.4.5. Tkivna fluorescencija .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5. Metode rane dijagnostike u razvoju .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5.1. Tekuća biopsija .....</b>	<b>15</b>
2.5.1.1. Salivarna dijagnostika .....	16
2.5.1.2. Serumska dijagnostika.....	18
<b>2.5.2. Slikovne tehnike.....</b>	<b>19</b>
2.5.2.1. Optička koherentna tomografija (OCT) .....	19
2.5.2.2. Snimanje uskim spektrom svjetlosti (NBI) .....	19
2.5.2.3. Konfokalna laserska endomikroskopija (CLE) .....	20
2.5.2.4. Ultrazvuk visoke rezolucije (US) .....	21
<b>2.5.3. Spektroskopske metode .....</b>	<b>21</b>
<b>3. RASPRAVA .....</b>	<b>22</b>
<b>4. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>26</b>
<b>5. LITERATURA.....</b>	<b>28</b>
<b>6. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>34</b>

## **Popis skraćenica**

OSCC – eng. *Oral Squamous Cell Carcinoma*, karcinom pločastih stanica

HPV – humani papiloma virus

DNA – eng. *Deoxyribonucleic Acid*, deoksiribonukleinska kiselina

OPMD – eng. *Oral Potential Malignant Disorders*, potencijalno maligni oralni poremećaji

OL – oralna leukoplakija

PVL – proliferativna verukozna leukoplakija

OE – oralna eritroplakija

OLP – oralni lihen planus

OLR – oralna lihenoidna reakcija

OSF – oralna submukozna fibroza

AH – aktinički heilitis

GVHD – eng. *Oral Graft Vs. Host Disease*, oralna bolest presatka protiv primatelja

DLE – diskoidni lupus eritematosus

TB – eng. *Toluidine Blue*, toluidinsko modriilo,

MB – eng. *Methylene Blue*, metilensko modriilo

LI – eng. *Lugol's iodine*, Lugolova jodna otopina

PDD – eng. *Photodynamic Diagnostics*, fotodinamička dijagnostika

CTC – eng. *Circulatory Tumor Cells*, cirkulirajuće tumorske stanice

MMP – matriksne metaloproteinaze

IL – interleukin

TNF – eng. *Tumor Necrosis Factor*, faktor tumorske nekroze

RNA – eng. *Ribonucleic Acid*, ribonukleinska kiselina

miRNA – mikro RNA

lnRNA – eng. *longchain noncoding RNA*, dugolančane nekodirajuće RNA

NBI – eng. *Narrow Band Imaging*, snimanje uskim spektrom svjetlosti

IPCL – eng. *Interpappillary Capillary Loops*, interpapilarne kapilarne petlje

OCT – eng. *Optical Coherence Tomography*, optička kompjutorizirana tomografija

CLE – eng. *Confocal Laser Endomicroscopy*, konfokalna laserska endomikroskopija

US – eng. *High Frequency Ultrasound*, ultrazvuk visoke rezolucije



RS – Ramanova spektroskopija

DRS – difuzna reflektivna spektroskopija

NP – eng. *nanoparticles* nanočestice

## **1. UVOD**

### 1.1. Planocelularni karcinom usne šupljine

Planocelularni karcinom usne šupljine ili karcinom pločastih stanica (eng. *Oral Squamous Cell Carcinoma*, OSCC) obuhvaća sve tumore pločastih stanica koji se pojavljuju u regiji usne šupljine, području od crvenog ruba usana do cirkumvalatnih papila i prednjih nepčanih lukova (1). OSCC čini 90% svih zloćudnih tumora usne šupljine. Ostalih 10% čine tumori malih žlijezda slinovnica, sarkomi, maligni odontogeni tumori, limfomi i drugi (2,3). Poznat i pod nazivom „oralni karcinom“, OSCC je s orofaringealnim karcinomima po učestalosti zloćudnih bolesti na šestom mjestu u svijetu, a dvije trećine oboljelih je iz azijskih zemalja (Šri Lanka, Pakistan, Bangladeš, Indija i Indonezija) (3). Više od 50% OSCC-a dijagnosticira se kada su već prisutne regionalne limfne metastaze, što dovodi do velikih postotaka smrtnosti pacijenata. U prošlosti je zabilježena veća incidencija u muškaraca starijih od 50 godina, ali novije studije prikazuju povećanu učestalost u mlađoj populaciji i tendenciju pojavljivanja u oba spola, što je vjerojatno uvjetovano promjenama životnih navika društva (4).

Veća učestalost pojave oralnog karcinoma u svijetu povezana je s raznim oblicima rizičnog ponašanja poput uživanja u alkoholu i duhanskim proizvodima, žvakanja *gutke*, izloženosti ultraljubičastom zračenju te perzistirajućih kroničnih upala i infekcija određenim virusima (5). Alkohol i pušenje te njihovo sinergističko djelovanje ubrajaju se u najzastupljenije provokirajuće faktore za razvoj OSCC-a (6). Alkohol povećava propusnost oralne sluznice razarajući lipidne komponentne epitela, uzrokujući tako atrofiju i oštećenje stanične DNA (deoksiribonukleinska kiselina, eng. *Deoxyribonucleic Acid*) (5). Razgradnjom etanola nastaju acetaldehidi i superoksidi koji mogu djelovati mutageno na stanice organizma. Također, etanol djeluje hepatotoksično, što može onemogućiti zadovoljavajuću jetrenu razgradnju kancerogenih tvari (5,6). U kombinaciji s duhanskim dimom (i drugim oblicima poput duhana za žvakanje ili šmrkanje), odnosno njegovim kancerogenim tvarima (policikličkim ugljikovodicima i nitrozaminima) može dovesti do povećane stope maligne transformacije oralnog epitela. Dokazan rizik za pojavu karcinoma proporcionalan je povećanom intenzitetu i vremenu korištenja duhanskih proizvoda. Prestanak pušenja može smanjiti navedeni rizik za 30% unutar 9 godina i za 50% nakon više od 9 godina. Potrebno je naglasiti da se rizik smanjuje, no nikada ne nestaje u potpunosti (1). Žvakanje *gutke*, kombinacije duhana, betelovog oraha, areka oraha i živog vapna, popularno u državama istočnoga dijela svijeta, stavlja OSCC na vrh njihovih ljestvica incidencije karcinoma (6).

Uloga infekcije HPV-om (humanim papiloma virusom) u nastanku oralnog karcinoma još uvijek je tema rasprave. HPV uzrokuje oštećenje stanične DNA, djeluje na disregulaciju

mehanizama apoptoze i može utjecati na proliferaciju tumorskih stanica (6). Serotipovi HPV-16 i HPV-18 dokazano su povezani s malignim transformacijama u orofaringealnoj regiji (tonzile i korijen jezika), no ne postoje jasni, statistički značajni rezultati koji ih povezuju s povećanom incidencijom OSCC-a (5,7).

Također, postoji pozitivna korelacija incidencije oralnog karcinoma sa stupnjem održavanja oralne higijene i perzistentnom traumatizacijom tkiva neadekvatnim mobilnim ili fiksnim protetskim nadomjescima (6).

S obzirom na prirodu navika navedenih ranije, OSCC se može smatrati preventabilnom bolešću. Primarna prevencija sastoji se od edukacije ljudi o ograničavanju rizičnog ponašanja, odvrćanju od uporabe duhana i ograničavanju unosa alkohola. Unatoč povećanoj svijesti javnosti o OSCC-u, posljednjih godina dokazana je smanjena incidencija isključivo u zemljama s visokim stupnjem obrazovanja (1–3).

OSCC pokazuje veliki klinički polimorfizam. Veliku prepreku u ranoj dijagnostici oralnog karcinoma predstavlja njegov rani asimptomatski stadij. Pacijenti najčešće ne zamijete rani stupanj zloćudne preobrazbe. OSCC u ranoj fazi može se manifestirati kao crvena, bijela ili crvenobijela mrlja na površini epitela koja je oštro ograničena od ostale sluznice. Najčešća mu je lokalizacija dno usne šupljine, retromolarno područje, lateralne strane jezika, nepčani lukovi i gingiva gornje i donje čeljusti, ali može se naći i u drugim dijelovima usne šupljine. Pacijenti najčešće odgađaju odlazak stomatologu do pojave simptoma koji se obično pojavljuju u kasnim stadijima bolesti. S vremenom lezija može poprimiti egzofitični ili ulkusni oblik induriranih i uzdignutih rubova. Također, može postojati osjećaj perzistirajuće boli i nelagode (8). Daljnji simptomi ovise o zahvaćenosti okolnih struktura (živaca, mišića i kosti). Moguća je pojava otežanog govora i kretnji mandibule, pomičnosti zuba, trizmusa, disfagije, disestezija i gubitka na tjelesnoj masi. Palpabilni nepomični limfni čvorovi vrata upućuju na progresiju inicijalne bolesti i pojavu eventualnih udaljenih metastaza (1).

Svaka oralna lezija koja ne pokazuje znakove regresije 14 dana nakon uklanjanja eventualnih lokalnih iritansa (neispravnih ispuna, oštih rubova protetskih nadomjestaka i drugih) smatrata se potencijalnom malignom promjenom i zahtijeva uzimanje bioptata tkiva (5). Svaki bi stomatolog za vrijeme obrazovanja trebao biti osposobljen za prepoznavanje ranih znakova i simptoma OSCC-a.

Najzastupljeniji oblik klasifikacije oralnog karcinoma je TNM klasifikacija. Uzima u obzir lokalnu proširenost tumora (T), stupanj zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i postojanje udaljenih metastaza (M). Detalji klasifikacije mogu se vidjeti u tablici 1. u nastavku (1,9).

Tablica 1: TNM klasifikacija karcinoma pločastih stanica usana i usne šupljine. Prema (9).

**Primarni tumor (T)**

<i>TX</i>	Primarni tumor ne može se procijeniti
<i>T0</i>	Nema dokaza primarnog tumora
<i>Tis</i>	<i>Carcinoma in situ</i>
<i>T1</i>	Tumor $\leq 2$ cm i dubina invazije (DOI) $\leq 5$ mm
<i>T2</i>	Tumor $\leq 2$ cm i dubina invazije (DOI) od 5 - 10 mm ili Tumor od 2 - 4 cm i dubina invazije $\leq 10$ mm
<i>T3</i>	Tumor $> 4$ cm ili dubina invazije (DOI) $> 10$ mm
<i>T4</i>	<b>T4a</b> – umjereno uznapredovala lokalna bolest:  usna – tumor prodire kroz kortikalis mandibule, zahvaća donji alveolarni živac ili dno usne šupljine ili kožu (obraza ili nosa)  usna šupljina – tumor prodire kroz kortikalis mandibule ili maksilarnog sinusa ili zahvaća kožu  <b>T4b</b> – vrlo uznapredovala lokalna bolest – tumor zahvaća bazu lubanje, žvačnu muskulaturu, pterigoidne nastavke i obuhvaća unutarnju karotidnu arteriju

**Regionalni limfni čvorovi (N)**

<i>NX</i>	Metastaze u limfnim čvorovima ne mogu se potvrditi
<i>N0</i>	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
<i>N1</i>	Metastaza u jedan ipsilateralni limfni čvor promjera $\leq 3$ cm bez ekстранodalne ekstenzije (ENE)
<i>N2</i>	<b>N2a</b> – Metastaze u jedan ipsilateralni limfni čvor promjera od 3 do 6 cm bez ekстранodalne ekstenzije (ENE)

	<p><b>N2b</b> – Mnogobrojne metastaze u više ipsilateralnih limfnih čvorova promjera <math>\leq 6</math> cm bez ekstranodalne ekstenzije (ENE)</p> <p><b>N2c</b> – Metastaze u ipsilateralnim i kontralateralnim limfnim čvorovima promjera <math>\leq 6</math> cm bez ekstranodalne ekstenzije (ENE)</p>
N3	<p>N3a – Metastaze u limfni čvor promjera <math>&gt; 6</math> cm bez ekstranodalne ekstenzije (ENE)</p> <p>N3b – Metastaze u jedan ili više limfnih čvorova s ekstranodalnom ekstenzijom (ENE)**</p>
<b>Udaljene metastaze (M)</b>	
MX	Udaljene metastaze ne mogu se potvrditi
M1	Nema udaljenih metastaza
M2	Udaljene metastaze

Ovaj sustav dijeli OSCC u četiri stadija. Stadij I i stadij II uključuju tumore do 4 cm veličine (T1 i T2) bez regionalnih (N0) i udaljenih metastaza (M0). Primarni tumor veći od 4 cm (T3) ili manji (T1 i T2), ali s pojavom regionalnih metastaza (N1) smatra se već stadijem III. U stadij IV spadaju: lokalno agresivni tumori (T4) sa ili bez prisutnih regionalnih i udaljenih metastaza, zatim tumori bilo koje veličine (T1-T4) s regionalnim i udaljenim metastazama. Niži stadij bolesti povezuje se boljom prognozom, a viši s lošijom i određuje odabir pristupa terapijskom liječenju (9). Stomatolog je u mogućnosti prepoznati OSCC u ranim stadijima temeljitim kliničkim pregledom usne šupljine.

### 1.2. Potencijalno zloćudni poremećaji usne šupljine

Bilo koje promjene na sluznici usne šupljine povezane sa statistički povećanim rizikom razvitka oralnog karcinoma nazivamo potencijalno zloćudnim poremećajima (eng. *Oral Potentially Malignant Disorders*, OPMD) (3,10,11). U tu skupinu poremećaja ubrajaju se oralna leukoplakija (OL), proliferativna verukozna leukoplakija (PVL), oralna eritroplakija (OE), oralni lihen planus (OLP), oralne lihenoidne reakcije (OLR), oralna submukozna fibroza (OSF), nepčane lezije kod obrnutog pušenja, aktinički heilitis (AH), oralna reakciju presatka protiv primatelja (eng. *Oral Graft Vs. Host Disease*, OGVHD), diskoidni lupus eritematosus (DLE) i urođena diskeratoza (11). Općenito govoreći OPMD-i su češći u muškaraca i neki od njih

povezani su s raznim etiološkim čimbenicima. Konzumacija alkohola i pušenje povezani su s pojavom nekih vrsta leukoplakija, dok se submukozna fibroza povezuje s konzumacijom gutke (10). Po posljednoj metaanalizi iz 2020. godine ukupni potencijal zloćudne transformacije OPMD-a procijenjen je na 7,9 % (12).

OL se definira kao bijeli plak ili mrlja upitnog rizika za koju su kao uzrok isključene druge poznate bolesti ili poremećaji (11). Patohistološki se radi o hiperkeratotičnoj leziji koja može ili ne mora imati prisutnu displaziju. Stupanj maligne transformacije procjenjuje se na 1,56 % godišnje (12). Češće se pojavljuje kod muškaraca (11). Klinički se može podijeliti na homogeni i nehomogeni oblik. Veća varijabilnost u strukturi (nodularna, egzofitična, plakozna, verukozna) i boji (crvena i bijela) povezana je s povećanim stupnjem maligniteta (11). Zasebni entitet predstavlja PVL s najvećim potencijalom za malignu transformaciju, od 49,5 % (10,12). Svaka OL treba se histološki verificirati biopsijom s redovitim praćenjem promjene (13). Drugi po redu postotak maligne transformacije (33,1 %) pokazala je OE, crvena baršunasta lezija sluznice najčešće na lateralnim stranama jezika, nepcu ili obraznoj sluznici (11).

OLP je kronična upalna bolest posredovana T limfocitima koja se najčešće pojavljuje u žena koje ne konzumiraju alkohol i duhanske proizvode (3,11). Klinički, na oralnoj sluznici razlikujemo 6 morfoloških tipova OLP-a: retikularni, erozivni, bulozni, papilarni, plakozni i atrofični. Karakteristični klinički nalaz predstavljaju Wickamove strije, blago uzdignute bjelkaste pruge koje se najčešće nalaze na bukalnoj sluznici i često imaju bilateralnu lokalizaciju u usnoj šupljini. Plakozni i papularni oblici nalikuju na OL zbog čega je potrebno potvrditi ovu bolest biopsijom. Težu kliničku sliku pokazuju erozivni, atrofični i bulozni podtipovi s bolnim promjenama i poteškoćama pri funkciji usta (13). Ipak, njegov rizik za malignu transformaciju je nizak (1,4 %) (12). Sličnu kliničku sliku, bijele pruge s hiperkeratotičnim plakom, mogu pokazivati i OLR i DLE. Čestorazliku predstavlja lokalizacija OLR-a koja je u neposrednoj blizini zuba s amalgamskim ispunom (11). Uklanjanjem provocirajućeg materijala, OLR bi se trebala povući (14). Lezije DLE-a također se mogu pojaviti na usnama i sličiti na AH (10). Pojavljivanje crvenila, induracija, erozija, suhoće usana i gubitak kožno-sluzničnog ruba usana ukazuju na moguću malignu transformaciju epitela (14).

OSF je kronična progresivna ožiljkasta bolest koja zahvaća sluznicu usne šupljine i orofarinksa te je najčešće povezana s konzumacijom *gutke* (11). Nakupljanjem alkaloida iz gutke dolazi do inhibicije kolagenaze, zbog čega se manje elastični kolagen tip 3 odlaže u mukozno i

submukozno tkivo. Simptomi bolesti ovise o stadiju bolesti. U početku se gubitak fibroelastičnosti tkiva prezentira blijedom bojom sluznice, petehijama i vezikulama. Pacijenti se žale na nemogućnost konzumacije ljute hrane zbog intenzivnog osjećaja pečenja. Vezikule se potom zamjenjuju palpabilnim fibroznim trakama na sluznici obraza i orofarinksa. Progresijom bolesti može doći do razvoja trizmusa, ograničene pokretljivosti mandibule, depapilacije jezika, depigmentacije gingive, atrofije uvule i gubitka sposobnosti govora ili sluha (10).

OPMD-e je važno prepoznati, dijagnosticirati i pratiti kako bi se zloćudna preobrazba prepoznala na vrijeme. Važno je naglasiti da će samo dio OPMD-a kroz vrijeme progredirati u karcinom (12). Redoviti pregledi, nekoliko puta godišnje, i adekvatna edukacija pacijenata o njihovom stanju može spriječiti odgađanje pregleda za prepoznavanje OSCC-a u ranoj fazi i progresiju karcinoma u kasne stadije radi zakašnjelog prepoznavanja i time povećati vjerojatnost preživljenja bolesnika.

### **1.3. Važnost rane dijagnostike oralnog karcinoma**

Stopa smrtnosti od OSCC-a je visoka. Godišnja stopa preživljenja bolesnika i dalje je manja od 50% zbog kasnog dijagnosticiranja bolesti (15,16). Jedan od najvažnijih faktora koji utječe na ishode liječenja je faza u kojoj je karcinom otkriven. Karcinomi dijagnosticirani u ranim stadijima, stadiju I i stadiju II, imaju veću stopu petogodišnjeg preživljenja, čak i do 80 % (16). Rezultati relevantnih istraživanja sugeriraju da je needuciranost javnosti o postojanju OSCC-a, njegovim simptomima i znakovima uvelike zaslužna za postavljanje dijagnoze u kasnim stadijima bolesti (17.) Rani stadiji bolesti često nemaju izražene simptome, stoga je neophodno podizanje svijesti o važnosti redovitih pregleda, pogotovo u populaciji visokog rizika (1). Također, potrebni tretmani liječenja u ranim stadijima su manje invazivni. U takvim slučajevima moguće je izvesti isključivo lokaliziranu operaciju sa ili bez potporne male doze zračenja. Kasni stadiji bolesti zahtijevaju kompleksnije zahvate s opsežnim operacijama i rekonstrukcijama te intenzivnim radioterapijama i kemoterapijama, zbog čega može doći do značajnog smanjenja kvalitete života pacijenta. Iz toga razloga i iz ekonomskog aspekta mnogo je isplativije rano postavljanje dijagnoze OSCC-a za društvo i samoga pacijenta jer daljnji postupci, nakon kasno postavljene dijagnoze, osim negativnog utjecaja na kvalitetu života, impliciraju i dodatne financijske troškove (1,18). Otprilike trećina pacijenata nakon provedene terapije ponovno razvije lokoregionalne simptome bolesti. Vjerojatnost razvitka drugog primarnog tumora je 4 % do 7 % godišnje i povećava se sukladno sa stadijem bolesti (1,19).



Svrha je ovoga rada objasniti važnost i načine rane dijagnostike karcinoma pločastih stanica usne šupljine i navesti aktualne *in vivo* i *ex vivo* dijagnostičke metode te dijagnostičke metode u razvoju i njihovu moguću primjenu u kliničkoj praksi.

## **2. RANA DIJAGNOSTIKA ORALNOG KARCINOMA**

## **2.4. Dostupne metode rane dijagnostike**

### **2.4.1. Klinički pregled**

Klinički pregled uz palpaciju usne šupljine i regija vrata jedna je od primarnih dijagnostičkih metoda u otkrivanju OSCC-a. S obzirom na odsutnost simptoma u ranim stadijima oralnog karcinoma, promjene ponekad znaju ostati nezamijećene, stoga se tijekom kliničkog pregleda mora temeljito vizualno prikazati cijelo područje oralne sluznice, zuba, parodonta, žlijezda slinovnica, orofaringealnog područja i cirkumvalatnih papila jezika. Kliničkom pregledu pristupa se uz dobro osvjetljenje halogene lampe dostupne u standardnoj stomatološkoj ordinaciji. Od instrumenata još je potrebno ogledalo i eventualno sterilna gaza za pregled jezika. Veliki naglasak stavlja se na područja visokog rizika pojave oralnog karcinoma. Područje takozvane „potkove“ ili „bazena sline“ uključuje dno usne šupljine, retromolarno područje, lateralne i ventralne strane jezika te donji dio bukalnog vestibuluma (19).

Zbog izražene invazivnosti OSCC-a potrebno je odrediti odnos istog s mandibulom i okolnim strukturama. Smanjena mobilnost ili devijacija jezika upućuju na zahvaćenost mišićnih struktura. Zbog sklonosti limfogenom metastaziranju, ukoliko su limfni čvorovi zahvaćeni, potrebno je odrediti prelazi li zahvaćenost limfnih čvorova medijalnu liniju regija vrata. Bilateralna zahvaćenost limfnih čvorova, kako smo ranije naveli u dijelu o TNM klasifikaciji OSCC-a, predstavlja nepovoljni prognostički faktor preživljenja bolesnika i zahtijeva hitno liječenje (1,15).

Pri sumnji na OSCC, za potrebu dijagnoze, uz klinički pregled, široko se primjenjuju slijedeće metode: standardna ekscizijska ili incizijska biopsija tkiva uz potporne metode tkivnih fluorescencija i vitalnih bojenja za jasniju vizualizaciju promjena oralnog epitela.

### **2.4.2. Biopsija**

Biopsija tkiva još uvijek predstavlja zlatni standard dijagnostike oralnih zloćudnih bolesti. Definiramo je kao uzimanje malog uzorka tkiva pod lokalnom anestezijom za daljnju detaljnu patohistološku analizu kako bi se odredio stupanj maligne transformacije samoga tkiva. Biopsija se može izvesti pomoću skalpela ili „punch igle“, posebno oblikovanog instrumenata koji izrezuje cilindar tkiva određenog promjera (2-8mm) (20). Mogu se koristiti i laseri (Er:YAG) i elektroskalpeli, no to nije preporučljivo zbog pojave određenih histoloških artefakata na rubu bioptata (11).

S obzirom na veličinu lezije, kliničar se može odlučiti na ekscizijsku ili incizijsku biopsiju. Ekscizijska biopsija najčešće se izvodi u pacijenata s manjim suspektim promjenama (najčešće

manje od 1 cm u promjeru) . Ideja je minimalizirati potrebu za sekundarnim postupkom ukoliko se biopat pokaže pozitivnim. Ukoliko postoji sumnja na neoplastičnu promjenu, potrebno je detaljno palpirati i odrediti rubove lezije. Marginalni rubovi bioptata obavezno moraju završavati u zdravome tkivu. Ukoliko su lezije veće od 1 cm u promjeru, heterogene strukture ili višestruke, preporučuje se multipla incizijska biopsija tkiva tumora s izbjegavanjem centralne nekrotične zone zbog nemogućnosti određivanja stadija diferencijacije. Izbor tehnike u znatnoj mjeri ovisi o iskustvu i procjeni kliničara (11,21) .

Bioptat tkiva uzima se oštrim skalpelom (najčešće veličine 15) i pincetom. Dva reza pod 45° sjedinjuju se u jednoj točki i stvaraju ranu eliptičnog ili V oblika. Ovakav oblik je potreban kako bi rana što lakše zacijelila. Također, potrebno je napraviti rez usporedno sa smjerom rastezanja sluznice kako ne bi došlo do dehiscencije rane. Uzorak bioptiranog tkiva stavlja se u fiksacijsku otopinu (10 % formalin) i šalje na patohistološku obradu, a rana se kirurški šiva (11).

Varijabilna klinička slika OSCC-a vjerojatno je uvjetovana različitim mehanizmima maligne transformacije keratinocita. Genetske mutacije TP53 gena, citokina, ciklina D1 i drugih molekula manifestiraju se citogenetskim promjenama i epigenetskim procesima koji mijenjaju procese staničnog ciklusa, mehanizme pretvorbe DNA, staničnu diferencijaciju i apoptozu. Izostanak apoptoze i povećana dioba stanica dovode do proliferacije tumorskog tkiva, odnosno rasta tumora. Daljnja akumulacija proizvoda tumorskih stanica u međustaničnom matriksu dovodi do promjene metabolizma fibroblasta i limfocita T koji se nalaze u tumorskom mikrookolišu. Rezultat navedenoga je povećano lučenje citokina i reaktivnih kisikovih spojeva s posljedičnom neoangiogenezom i imunosupresijom (5). Histološki se ove promjene očituju nepravilnom stratifikacijom epitela, gubitkom polarosti bazalnih stanica, pojavom kapljastih nabora epitela u *lamini propriae*, diskeratozom, abnormalnim površinskim mitozama i keratinskim nakupinama u epitelnim naborima. Displazija se prema stupnju dijeli na blagu (zahvaćena je donja trećina epitela), umjerenu (zahvaćena je i srednja trećina) i tešku displaziju (zahvaćena je cijela debljina oralnog epitela, do bazalne membrane). Teški oblik displazije još se naziva i *carcinoma in situ* (3,5).

#### **2.4.3. Brush biopsija i eksfolijativna citologija**

Razvoj novih metoda dijagnostike često proizlazi iz želje za smanjenjem boli i šanse za traumatiziranjem tkiva tijekom dijagnostičkog postupka. Tako se razvije i poseban oblik biopsije kojim se uzorak epitelnih stanica uzima posebno dizajniranom četkicom. Uzorak se

nakon fiksacije i bojanja mikroskopski pregledava pomoću računala. Glavna prednost ove metode je njezina neinvazivnost, zbog čega se može koristiti bez primjene lokalne anestezije, pogotovo kod pacijenata s dokazanom alergijom na lokalne anestetike. Rezultat analize može biti pozitivan, negativan ili atipičan. Osjetljivost ove metode po nekim istraživanjima je iznad 90 %, no analizom podataka također se zaključilo da postoji mogućnost lažno pozitivnih rezultata zbog čega se, ipak, savjetuje uzimanje klasičnoga bioptata radi potvrde nalaza (22,23). Nadalje, displazija se najčešće pojavljuje u dubljim slojevima epitela. S tim na umu, pri dijagnostici ranog OSCC-a, displastične stanice vjerojatno neće bit vidljive u uzorku (11).

Tehnika konvencionalne eksfolijativne citologije polako se mijenja u kompjuteriziranu citomorfometriju kroz mjerenje DNA indeksa, analizu mikrojezgri i procjenu regija organizacije jezgre. Dodavanje molekularnih metoda poput imunohistokemije i visokoprotočnih metoda poput real-time PCR-a i mikročipova može značajno poboljšati učinkovitost ove tehnike (22).

#### **2.4.4. Vitalno bojenje**

U današnjoj kliničkoj praksi često se uz klinički pregled koriste testovi bojenja tkiva. Ukoliko se bojenje tkiva bazira na aplikaciji bojila na samu površinu lezije u pacijentovim ustima, riječ je o *in vivo* bojenju. *Ex vivo* bojenje označava aplikaciju detektirajućeg bojila na uzorak tkiva izvan samog organizma. Danas se u kliničkoj praksi koriste sljedeća tri *in vivo* bojila: toluidinsko modrilo, metilensko modrilo i Lugolova jodna otopina. Važno je naglasiti da ove metode, iako su financijski povoljne i jednostavne za izvesti u standardnoj ordinaciji dentalne medicine, nisu definitivna dijagnostička metoda zbog svoje niske specifičnosti (14).

Toluidinsko modrilo (eng. *Toluidine Blue*, TB) je najčešća, neinvazivna i jeftina metoda bojenja i otkrivanja abnormalne funkcije stanica. To je plavo, metakromatsko, tiazinsko bojilo s velikim afinitetom prema fosfatnim, sulfatnim i karboksilatnim skupinama, kiselim komponentama nukleinskih kiselina (24,25). Abnormalni stanični ciklus malignih i premalignih stanica određen je većom količinom dioba, odnosno većom količinom DNA u usporedbi s okolnim tkivom. S obzirom na navedeno, TB će biti visoko osjetljiv na stanice karcinoma, ali obojat će i upalne promjene, ulceracije i granulacijsko tkivo (26). Postupak izvođenja testa je sljedeći:

1. ispiranje usne šupljine vodom radi eliminiranja ostataka hrane
2. ispiranje cijele usne šupljine ili čišćenje lezije štapićem namočenim u otopinu 2%-tne octene kiseline tijekom 30 sekundi
3. aplikacija 1%-tne otopine TB-a tijekom 30 sekundi

4. ponovna aplikacija 2%-tne otopine octene kiseline tijekom 30 sekundi
5. očitavanje rezultata

Značajna osobina TB-a jest metakromatsko bojenje, što u praksi daje vizualno različite nijanse plave s obzirom na intenzitet aktivnosti stanica obojane lezije. Suspektne lezije će, nakon primjene boje, biti intenzivno tamno plave boje. Svjetlije nijanse najčešće ne označavaju područja s velikom staničnom aktivnosti (26). Toluidinski test pokazao se relativno visokosenzitivnim, s osjetljivošću od 92.5 % i specifičnošću od 63.7 % (15). Nedovoljno visoka razina specifičnosti rezultat je osjetljivosti na upalne promjene oralnog epitela. Ukoliko nakon kliničkog pregleda postoji sumnja da je uočena promjena upalnog karaktera, preporučuje se primjena protuupalne terapije 14 dana nakon koje se ponavlja test (3).

Metilensko modriilo (eng. *Methylene blue*, MB) je fenotijazinsko bojilo s kemijskim sastavom i svojstvima sličnim TB-u. U ranijoj kliničkoj praksi koristilo se za detekciju različitih oblika intestinalnih displazija i karcinoma prostate, želuca, jednjaka i mokraćnog mjehura. Danas, zbog jeftinije kupovne cijene, manje toksičnosti i veće osjetljivosti postoji mogućnost da postane zamjena TB-u. Točan mehanizam vezanja bojila za maligne stanice gotovo je isti kao i kod TB-a; povećana kiselost medija uz povećanu količinu nukleinskih kiselina uzrokuje vezanje bojila i vizualnu detekciju lezije. Bojilo se može nanijeti na dva načina: direktnim nanošenjem na leziju pomoću gaze ili korištenjem 1% gargarizme za oralnu šupljinu. MB je pokazalo veću osjetljivost i specifičnost od TB-a, čak i do 90 % i 66.6 %, zbog čega postoji potencijal da postane sve češće bojilo izbora u probirnim studijama karcinoma (27,28).

Rjeđe korištena, ali potencijalno učinkovita metoda *in vivo* rane dijagnostike, je Lugolova jodna otopina (eng. *Lugol's iodine*, LI). (11) LI je dokazana kao korisna metoda intraoperativnog označavanja ruba lezija pri disekciji malignih lezija glave i vrata (29). Mehanizam vezanja bojila bazira se na povezivanju glikogena u stanicama s jednom komponentom ovog bojila. Preneoplastične i neoplastične stanice zbog svoje povećane aktivnosti sadrže značajno manje glikogena u usporedbi s normalnim tkivom, zbog čega će promijenjeno tkivo ostati blijede boje, dok će se ostatak zdravog tkiva obojiti u čokoladno smeđu boju (30). Komparativna studija TB-a i LI-e predlaže istovremeno korištenje istih zbog veće osjetljivosti i manje specifičnosti TB-a te manje osjetljivosti i veće specifičnosti LI-e. Rezultat zajedničke primjene otopina bio bi smanjenje vjerojatnosti za pojavu lažno pozitivnih rezultata. Ipak, navedene metode uvijek treba komplementirati biopsijom i patohistološkom analizom tkiva radi postavljanja definitivne dijagnoze (31).

#### 2.4.5. Tkivna fluorescencija

Ranih 2000-tih godina razvili su se novi sustavi svjetlosne detekcije displastično promijenjenog epitela koji se temelje na različitoj apsorpciji i refleksiji obasjavajućeg svjetla porijeklom iz ekstrinzičnog izvora. Biološka svojstva neoplastičnog tkiva su promijenjena, a time i njihova optička svojstva. Uređaji koji će biti spomenuti u nastavku danas se koriste za procjenu granica kancerogenog tkiva, što je iznimno važno prilikom uzimanja bioptata i pri kirurškoj sanaciji. Smanjenjem cijene i popularizacijom svjetlosnih uređaja omogućila bi se rana detekcija OSCC-a i smanjenje stope mortaliteta (32).

Pojam autofluorescencije označava sposobnost molekula da obasjani svjetlošću određene valne duljine fluoresciraju, odnosno svijetle. Spomenutu karakteristiku posjeduju i neke tkivne molekule poput kolagena, elastina, nikotinamid adenin dinukleotida (NADH), flavin adenin dinukleotida (FAD) te keratina (3). Molekule s navedenom osobinom imaju skupni naziv endogeni fluorofori (15). Pomoću ručnog uređaja (VELScope®) koji emitira svjetlost od 400 do 460 nm valne duljine obasjavaju se potencijalno kancerogene lezije. Zdravo tkivo bit će svijetlozelene boje, dok će OPMD i OSCC biti tamnozeleno do crvene boje. Preglednim prikazivanjem rubova lezije može se pristupiti biopsiji (32). Prednost je ove tehnike jednostavnost, brza detekcija i neinvazivnost. Osjetljivost i specifičnost su procijenjene na 91 % i 72 % (11). Potrebno je naglasiti da će molekule navedene kao fluorofori biti prisutne i u upalnim tkivnim lezijama što može dovesti do krive interpretacije rezultata (3,33). Hemoglobin i melanin mogu smanjiti tkivnu fluorescenciju zbog čega neupalne vaskularne promjene i pigmentirane lezije također mogu biti prikazane kao tamne mrlje (11).

Identafi 300® je sondoliki uređaj za probirno testiranje OPMD-a uveden 2009. godine. Radi na principu trovalentne svjetlosti, bijele, ljubičaste (405nm) i zelene (545nm) za pomoćno dijagnosticiranje lezija u usnoj šupljini (32). Koristi dvije već prethodno spomenute metode: detekciju pod bijelom svjetlosti i autofluorescenciju fluorofora tkiva pomoću ljubičaste svjetlosti. Novitet predstavlja zelena svjetlost koja će metodom refleksijske spektroskopije eksitirati hemoglobinom zasićena područja na taj način prikazujući vaskularne spletove unutar tkiva. To se pokazalo iznimno korisnim zbog činjenice da se povećana angiogeneza pojavljuje već u početnim stadijima razvoja displastičnih promjena. Brzina i učinkovitost ove metode ipak uvelike ovise o iskustvu i znanju patologije samog kliničara (34).

Tehnika kemiluminiscencije temelji se na kemijskoj reakciji između vodikova peroksida i acetilsalicilne kiseline unutar ručnog uređaja (VizLite®, VizLite Plus® i Macrolux/DL®).

Stvara se bijela/plava svjetlost (430 do 580 nm) pomoću koje se može otkriti razlika u omjeru jezgre i citoplazme stanice (33). Pregled treba provesti u zamračenoj prostoriji i s prethodnim jednominutnim ispiranjem usne šupljine 1%-tnom octenom kiselinom za uklanjanje glikoproteinskog sloja radi bolje vidljivosti. Slikovna dokumentacija promjene je poželjna zbog kratkog vremena trajanja kemijske reakcije unutar uređaja (10 minuta). Bijela boja lezije s jasno ograničenim rubovima smatra se pozitivnim rezultatom. S obzirom na to da se displazija najčešće pojavljuje u dubokim slojevima epitela, smatra se da bi ovi uređaji bili učinkovitiji u detekciji benignih i hiperkeratotičnih promjena (35). Kako bi se povećala točnost rezultata, u praksu se uvodi istovremeno vitalno bojenje TB-om (VizLite Plus®). Iako se specifičnost testa ovime povećala, ona je još uvijek ispod 80%, što ovu dijagnostičku metodu ne čini dovoljno dobrim samostalnim dijagnostičkim alatom (32,35).

Fotodinamička dijagnostika (eng. Photodynamic Diagnostics, PDD) koristi fotosenzitirajuće bojilo, 5-aminolevulinsku kiselinu (5-ALA) i njene derivate kako bi omogućila otkrivanje lezije pod plavim svjetlom. 5-ALA se nakon topikalne primjene metabolizira u protoporfirin IX u kancerogenim stanicama i u tom obliku emitira jaku fluorescenciju pri osvjetljavanju. Displastične lezije imat će veći omjer crvenog obojenja naspram zelenog obojenja okolnoga tkiva. Specifičnost i osjetljivost ove metode pokazala se redom 82.3% i 88.9% što čini PDD posebno korisnim za identifikaciju i lokalizaciju prekanceroznih lezija i ranog stadija oralnog karcinoma (36).

Ova metoda rane dijagnostike, kao i sve prethodno navedene, uključujući i vitalna bojila, koristi se za prikazivanje lezije prije uzimanja uzorka tkiva (36).

## **2.5. Metode rane dijagnostike u razvoju**

### **2.5.1. Tekuća biopsija**

Američki nacionalni institut za istraživanje tumora definirao je tekuću biopsiju kao „uzorak krvi u kojemu se pomoću različitih metoda traže cirkulirajuće tumorske stanice ili produkti tumorskih stanica“ (37). Cilj joj je jednostavno, neinvazivno i brzo praćenje ili dijagnosticiranje bolesti i iz tog je razloga postala inovacija u današnjoj onkologiji. Slina, krv i urin lako su dostupni uzorci i ne zahtijevaju invazivni zahvat na pacijentima kako bi se osigurali. Cirkulirajuće tumorske stanice (eng. *Circulatory Tumor Cells*, CTC), izvanstanične vezikularne strukture (egzosomi) i njihov sadržaj te cirkulirajuće ribonukleinske kiseline (ctDNA, lncRNA i miRNA) smatraju se glavnim elementima u konceptu tekuće biopsije (38,39). S obzirom na



nisku koncentraciju traženih molekula, za sad, se ova metoda pokazala nisko osjetljivom i može davati lažno negativne rezultate (20).

#### 2.5.1.1. Salivarna dijagnostika

Veliki potencijal i napredak očekuje se u razvoju dijagnostike putem sline. Identifikacija raznih salivarnih biomarkera povezanih s OSCC-om može dovesti do ranije dijagnoze, a posljedično i bolje prognoze preživljenja bolesnika (20). Ono što čini ovu metodu boljom od ostalih jest jednostavnost prikupljanja i skladištenja uzorka, niska invazivnost, cijena i brzina provođenja same analize u obliku *chairside* protokola, a samim time i manji utjecaj postupka na psihološko stanje pacijenta. S druge strane, kliničar nije izložen uzorcima (poput krvi) pogodnijima za prijenos raznih zaraznih bolesti (3). Slina bi mogla biti korisna u dijagnostici OPMD-a i OSCC-a zbog bliskog kontakta s lezijom. Molekularne studije identificirale su oko 100 potencijalnih biomarkera zloćudnih zbivanja; neki od njih su virusi, enzimi, citokini, proteinski receptori i DNA i RNA markeri (40,41). Stoga salivarnu dijagnostiku možemo podijeliti na proteomiku, metabolomiku, transkriptomiku, genomiku i mikrobiomiku (42).

Proteomika se bavi proučavanjem i analizom proteina u ljudskom i životinjskom organizmu. Proteini, poput enzima, citokina, hormona i protutijela važne su komponente tjelesnih tekućina koje imaju značajnu ulogu u metabolizmu, rastu i diferencijaciji stanica (43). Do danas je pronađeno više od 2000 proteina usko povezanih s razvojem raznih sistemskih bolesti (42). Inicijacija i napredak OSCC-a povezan je s kompleksnim staničnim signalnim kaskadama koje uzrokuju poremećeni ciklus diferencijacije i apoptoze. Proteini, glavni glasnici spomenutih puteva, mogu služiti kao prospektivni dijagnostički čimbenik (44). Identificirano je više od 1000 proteina povezanih s OSCC-om. Zadnjih godina istraživanja su se usmjerila na analizu citokina, točnije interleukina (IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8), faktora tumorske nekroze- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transferina, matriksnih metaloproteaza (MMP9 i MMP2) te  $\alpha$ -amilaza. Navodi se značajno povećanje IL i TNF- $\alpha$ , faktora povezanih s kontrolom upale, migracije i apoptoze stanica. Iako se, s obzirom na navedena svojstva, može zaključiti da će upalni parametri biti visoki i pri drugim upalnim bolestima usne šupljine, pokazalo se da će isti kod pacijenata s OSCC-om biti znatno viši (44).

Metabolomika je znanost koja se bavi molekulama nastalim metabolizmom stanica (metabolitima). Već se pokazala uspješnom u ranom otkrivanju bubrežnih bolesti, hepatobilijarnog i kolorektalnog karcinoma (45). S obzirom na stalni kontakt sline s tumorskim stanicama pretpostavlja se da je slina idealan medij za otkrivanje tumorskih metabolita. Cilj je

analiziranjem uzorka sline rano prepoznati OSCC i pravovremeno reagirati terapijom. Tijekom tumorogeneze stanice prolaze kroz razne metaboličke promjene među kojima je ekstenzivno reprogramiranje aminokiselina i lipida (44,46). Prepoznato je više od 50 spojeva koji su u uskoj povezanosti s OSCC-om, a neki od njih su putrescin, karnitin, valin, laktat, fenilalanin, n-eikosanoidna kiselina, prolin, ketoni, aldehidi, alkoholi i drugi (44,47). Unatoč tome, dijagnostički potencijal salivarnih metabolita još uvijek je tema rasprave jer postoje određene razlike u salivarnom metabolomu ovisno o spolu, tipu sline (stimulirana ili nestimulirana), pridruženim rizičnim faktorima (kao što je pušenje ili žvakanje betelova oraha) i cirkadijanoj varijaciji sastava sline i dobi (45). Stabilnost ovih metabolita još uvijek je upitna te je za njihovu upotrebu kao dijagnostičkog alata potrebno provesti mnoga istraživanja kako bi se detektirali oni specifični za OSCC (44).

Transkriptomika predstavlja granu salivaomike koja se bavi proučavanjem RNA markera proizvedenih u određenim okolnostima. Tehnike prepoznavanja spomenutih mikromolekula uključuju *microarray* tehnologiju, lančanu reakciju polimeraze (PCR), sekvenciranje nove generacije i druge (43). Proteini su se prije smatrali polazišnom točkom analize tumorskih biomarkera. Daljnjim istraživanjima ustanovljeno je da oni nastaju samo od malog dijela cjelokupnog RNA prisutnog u slini. Ostale RNA molekule čine nekodirajuće sekvence RNA, točnije mikro-RNA (miRNA) i nekodirajuće dugolančane RNA (lncRNA). Iako su spomenuti transkripti nekodirajući, mogu djelovati na stotine gena i glasničkih RNA kako bi održali ključne biološke procese proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Budući da djeluju na različite fiziološke procese, njihova disregulacija utječe na ukupne stanične funkcije i time može postati suptilna veza u složenim događajima onkogene transformacije. Iako obećavajuća, ova metoda zahtijeva daljnja klinička istraživanja (48).

Prisutnost slobodno cirkulirajućih molekula DNA u serumu i drugim tkivnim tekućinama identificirana je još u prošleme stoljeću i dio je grane koju nazivamo genomika. Abnormalne metilacije, mutacije mitohondrijske DNA, somatske mutacije u onkogenima i genima tumorskih supresora, mikrosatelitske promjene te virusne tumorske DNA dokazano su povezane s razvojem karcinoma unutar organizma (44). Korištenje selektivnih genetskih markera, poput gubitka heterozigotnosti (LOH), u kombinaciji s drugim biomarkerima kao što su D3S1234, D17S79 i D9S156, može biti korisno za rano otkrivanje karcinoma pločastih stanica glave i vrata, posebno u populacijama s visokim rizikom. Mitohondrijska DNA, poput citokrom c oksidaze I i II, može se koristiti za provjeru oštećenja DNA, što može pomoći u otkrivanju OSCC-a. Prisutnost metilacije na genima HOXA9, NID2, ECAD, RARb, MGMT,

FHIT i drugima uvelike se može povezati s razvojem OSCC-a (49). Rano otkrivanje promjena na genskoj razini može dovesti i do adekvatne kliničke skrbi pacijenta i prije pojave fenotipskih obilježja tumora, no za to je ipak potrebna osjetljivija tehnologija koja će se vjerojatno razviti u budućnosti.

Čest klinički nalaz kod pacijenata s OSCC-om je i loša oralna higijena. Salivarna mikrobiomika u OSCC-u često analizira infiltraciju oralnog miljea bakterijama *Fusobacterium nucleatum* i *Porphyromonas gingivalis*. Njihova povećana količina dovodi organizam u stanje perzistirajuće kronične upale. Prisutni bakterijski toksini mogu djelovati na reprogramiranje metabolizma epitelnih stanica destabilizacijom proizvodnje E-kadherina i adhezina, subverzije imunobrambenih mehanizama i promjena u nekim enzimskih sustavima (MMP) s rezultatom odgađanja apoptoze i povećanog staničnog umnažanja (3).

#### 2.5.1.2. Serumska dijagnostika

Serumske biomarkere definiramo kao tvari u serumu koje se kvantitativno mijenjaju u razvoju tumorigeneze. Kancerogene stanice na svojoj površini sintetiziraju ili otpuštaju određene supstance u cirkulaciju organizma. Ovi markeri mogu se koristiti za prognozu recidiva tumora ili metastaza jer razvoj malignog tumora mijenja njihove koncentracije. Mogu biti tumor specifične ili tumorski posredovane tvari, a uključuju različite proteine, enzime, imunoglobuline i hormone (41,50).

Različite medicinske discipline uvrstile su serumsku dijagnostiku među ostale opće prihvaćene dijagnostičke metode, no kad je riječ o OSCC-u, još ne postoji konsenzus vezan uz serumske markere specifične za OSCC. U literaturi se navode adiponektin, ciklin D1, *Decoy receptor 3* (DcR3), hemoglobin (Hb), karcinom specifični karcinoembrionalni antigen (CEA), već spomenuti proinflammatorni citokini (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , VEGF), MMP2, MMP8, CYFRA 21-1, CA125 i drugi (51,52).

Imunološkim metodama detekcije pomoću antitijela mogu se izolirati i CTC-i, stanice koje su se odvojile od primarnog tumora i ušle u krvnu ili limfnu cirkulaciju. One pokazuju mutacije na TP53 genu, genu specifičnom za skvamozni karcinom glave i vrata. Otkrivanje spomenutih stanica u krvotoku označava potencijalno metastaziranje karcinoma i često je povezano s lošijom prognozom, no može se iskoristiti i u praćenju učinkovitosti kemoterapijskih lijekova (52).

### 2.5.2. Slikovne tehnike

Konvencionalne metode slikovne dijagnostike tkiva, kao što su ortopantomografija (OPG), kompjutorizirana tomografija (CT), magnetna rezonancija (MR), ultrazvuk (US) te pozitronska emisijska tomografija (PET) dugo su činile standard u procjeni zahvaćenosti tkiva patološkim promjenama. Odabir slikovne pretrage ovisi o tipu bolesti, kliničkim simptomima i stadiju bolesti (53). Navedenim metodama, iako su iznimno visoke rezolucije, nije moguće postaviti dijagnozu ranog OSCC-a. Pokazale su se korisnijima u procjeni stadija kod progrediranih simptoma oralnog karcinoma. S obzirom na potrebu diferencijacije ranog OSCC-a od OPMD-a i drugih promjena, u novije doba počele su se razvijati preciznije metode lezijske i perilezijske vizualizacije epitela. Ove metode uključuju optičku koherentnu tomografiju (eng. *Optical Coherence Tomography*, OCT), snimanje uskim spektrom svjetlosti (eng. *Narrow band imaging*, NBI), konfokalnu lasersku endomikroskopiju (eng. *Confocal Laser Endomicroscopy*, CLE) i ultrazvuk visoke rezolucije (eng. *High Resolution Ultrasound*, US) (41,54).

#### 2.5.2.1. Optička koherentna tomografija (OCT)

Rano dijagnosticiranje OSCC-a predstavlja imperativ pri poboljšanju terapijske prognoze i stope preživljenja bolesnika. Tome uvelike doprinosi procjena stupnja lokalne infiltracije tumorskih stanica.

OCT je valjan alat za generiranje slika slojeva tkiva mjerenjem intenziteta povratno raspršene svjetlosti. Prvi put u medicinske svrhe koristila se u oftalmologiji za pregled stanica mrežnice, a u posljednja dva desetljeća široko se primjenjuje u onkologiji, kardiologiji i razvojnoj biologiji. OCT osigurava visoku aksijalnu i lateralnu rezoluciju procijenjenu na 13 - 17  $\mu\text{m}$  i 17 - 22  $\mu\text{m}$ , s dubinom prodiranja između 1 i 2 mm, ovisno o ispitivanim tkivima. Brojna istraživanja pokazala su da različita tkiva pokazuju različite načine refleksije zraka svjetlosti. Rezultat je različiti vremenski interval nastalog elektromagnetskog vala, čime uređaj može procijeniti makroskopske karakteristike epitelnih, subepitelnih i bazalnih membranskih struktura. (55) Patološki promijenjeno tkivo pokazat će povećani vaskularni crtež, varijacije debljine epitelnog sloja i gubitak integriteta bazalne membrane (56,57). Osjetljivost i specifičnost OCT-a u *in vivo* studijama su redom 95 % i 97 % (58). Rigidnost i veličina uređaja zasad su otegotna okolnost pri pregledu teže dostupnih mjesta usne šupljine (54).

#### 2.5.2.2. Snimanje uskim spektrom svjetlosti (NBI)

NBI je tehnika koja se koristi za pregled vaskularnih obrazaca malignih lezija u praćenju faringealnog i ezofagealnog karcinoma (54). Kombinacijom uobičajenog endoskopa s

povećanjem i sekvencioniranim emitiranjem zelene (od 525 do 555 nm valne duljine) i plave svjetlosti (od 400 do 430 nm valne duljine) omogućuje se površinska i dubinska analiza krvnih žila (11). Prethodno navedeno je moguće zbog snažne sposobnosti hemoglobina da apsorbira zelenu i plavu svjetlost. Kraće valne duljine dovode do manjeg prodiranja svjetlosti kroz tkivo ističući površinski sustav kapilara, dok dulje valne duljine prodiru dublje u tkivo i poboljšavaju vizualizaciju krvnih žila ispod sluznice (11,59). NBI analizira intraepitelne papilarne kapilarne petlje (eng. *Intrapapillary capillary loop*, IPCL) koje se nalaze blizu vezivnih papila oralne sluznice s karakterističnom arhitekturom za zdravu i patološki promijenjenu sluznicu (41,60).

Po nekim autorima klasifikacija IPCL-a oralnog pločastog epitela je sljedeća:

- tip I (normalna sluznica i pravilne smeđe mrlje),
- tip II (dilatacija i križanje krvnih žila),
- tip III (produljenje i vijugavost krvnih žila),
- tip IV (uništenje strukture IPCL-a i vijugave krvne žile) (60).

Povećanje obrazaca IPCL-a može biti pozitivno povezano s povećanjem epitelne displazije. Ova metoda pokazala je visoku razinu specifičnosti (92.3 %) i osjetljivosti (88.2 %). Ipak, nema još dovoljno znanstvenih podataka koji bi opravdali uporabu ove tehnike pri dijagnostici (11,60,61).

#### 2.5.2.3. Konfokalna laserska endomikroskopija (CLE)

Uzimajući u obzir minimalnu invazivnost, financijsku dostupnost, brzinu provođenja i analizu dobivenih podataka mogli bismo reći da bi CLE mogla postati superiorna dijagnostička metoda. Prvotno korištena u oftalmologiji, zatim u dermatologiji, gastroenterologiji i pulmologiji za analiziranje strukture epitela, dobiva na velikoj važnosti i u stomatološkoj dijagnostici (54).

CLE se koristi laserskom svjetlošću određene valne duljine koja nije štetna kako bi stimulirala emisiju fluorescentne i refraktirane svjetlosti i time dala u realnom vremenu histološku sliku promatranog tkiva (11). Koristi se fluorescentnim kontrastom, fluoresceinom, kako bi se učinkovito vizualizirala epitelna arhitektura sluznice. CLE možemo nazvati i „optičkom biopsijom“ zbog njezine iznimne rezolucije na staničnoj razini. Veliku zapreku ovoj metodi predstavljaju slojevi keratinizirane i gustatorne sluznice zbog povećane debljine oralnog epitela. Slina i krv mogu ometati snimanje slike. Također, kako bi se analizirala histološka slika, potrebna je edukacija kliničara ili prisutnost histopatologa, što u nekim okolnostima nije moguće ostvariti. Daljnji razvoj ove tehnike gravitira ka unaprjeđenju programa analize slike uz pomoć umjetne inteligencije, kako bi se isključila spomenuta problematika (62).

#### 2.5.2.4. Ultrazvuk visoke rezolucije (US)

Za razliku od OCT-a koji analizira prirodu reflektirane svjetlosti, ultrazvučna dijagnostika temelje pronalazi u analizi reflektiranih zvučnih signala emitiranih od piezoelektričnih kristala. (41) Iako se ultrazvuk rutinski koristi u raznim granama medicine, primjena ove tehnike u usnoj šupljini je rjeđa. Različite svrhe zabilježene su u literaturi: od proučavanja periimplantacijskih tkiva do kliničke i kirurške evaluacije benignih i malignih lezija oralne sluznice. Prednost ove tehnike su izravan kontakt s regijom interesa sa zadržavanjem karakteristika neinvazivnosti, brzine provođenja i ponovljivosti testa (53). OSCC se na US-u prikazuje kao hipoehogena lezija s nepravilnim i nejasnim rubovima (54). Mogućnost mjerenja dubine invazivnosti tumora mogla bi se primijeniti u kirurško terapijske svrhe (63).

#### 2.5.3. Spektroskopske metode

Istraživanjem reflektirajućih i apsorptivnih karakteristika tkiva u dijagnostici se su pojavile nove modificirane spektroskopske metode, Ramanova spektroskopija (RS) i difuzna reflektivna spektroskopija (DRS).

RS i DRS su vibracijske tehnike koje ispituju energetska stanja molekula po principu neelastičnog raspršenja svjetlosti; promjena valne duljine raspršene svjetlosti ukazuje na strukturalne stanične promjene promatranog tkiva (39). U RS-u nastaju takozvani „signalni otisci“ koji se razlikuju za svako promatrano tkivo: u ovom slučaju za zdravi epitel, za OPMD i za OSCC (64). *In vivo* studije pokazale su osjetljivost od 93.7 % do 100 % i specifičnost od 76.7 % do 77 % (64).

Povećana osjetljivost spomenutih metoda postigla se korištenjem zlatnih nanočestica (eng. *nanoparticles*, NP). Nakon što se nanočestice apsorbiraju na površinu promatranog tkiva, zahvaćene molekule odašilju pojačani signal, što poboljšava kontrast slike. Dodatna mogućnost jasnije vizualizacije maligniteta je konjugacija NP s bojilom bengalske ruže. Nastali kompleks pokazuje dobru optičku apsorpciju, stabilnost u vodenoj otopini i visoku specifičnost za stanice OSCC-a. Međutim, potreba za specijaliziranom opremom ograničava upotrebu ove metode na dobro opremljene laboratorije i kliničke uvjete (64).

### **3. RASPRAVA**

Razvijeno je nekoliko metoda za rano otkrivanje neoplastičnih promjena usne šupljine, no mnogi aspekti njihove primjene i dalje su predmet rasprave. Svrha je ovoga rada naglasiti važnost rane dijagnostike OSCC-a i navesti te se kritički osvrnuti na dostupne tehnike otkrivanja ranog OSCC-a. Stomatolozi su često prvi stručnjaci koji se susreću sa neoplastičnim promjenama usta i trebali bi biti educirani u dijagnostici OSCC-a, pogotovo u njegovim ranim fazama razvoja. Prepoznavanje i kontinuirano praćenje OPMD-a omogućava i rano otkrivanje maligniteta. Postavljanje dijagnoze OSCC-a praćno je s nekoliko izazova koji mogu ometati rano otkrivanje bolesti. Kao što je ranije spomenuto, ti izazovi uključuju odsutnost simptoma u ranim fazama bolesti, poteškoće u vizualizaciji usne šupljine, ograničene resurse, nedovoljnu svijest populacije o bolesti i etiološkim čimbenicima, nedostatak odgovarajućih dijagnostičkih alata i poteškoće u razlikovanju benignih od malignih lezija (3). Klasični vizualni klinički pregled ima nekoliko ograničenja: često nemogućnosti razlikovanja benignih od neoplastičnih promjena i uočavanja patohistoloških i staničnih promjena unutar oralnog epitela golim okom. Iz tog razloga njegova osjetljivost i specifičnost procjenjuje se redom između 60 % do 97 % i 75 % do 99 % te je ovisna je o iskustvu i znanju kliničara koji obavlja sami pregled (17). Kako bi se isključila mogućnost liječničke pogreške, razvijaju se sustavi umjetne inteligencije za analizu prikupljenih podataka (18). Današnji zlatni standard je još uvijek biopsija tkiva (11). Prednost ima ekscizijska biopsija nad incizijskom. Ukoliko se bioptat pokaže pozitivnim, eliminira se potreba za sekundarnim postupkom (15). Biopsija nije idealna metoda za postavljanje dijagnoze pri rutinskom radu u stomatološkoj ordinaciji zbog sljedećih razloga: neke institucije i ordinacije nisu u blizini patohistoloških laboratorija, zbog čega ponekad biopsija tkiva zahtijeva odlazak pacijenta daleko od mjesta stanovanja. To dovodi do gubitka na vremenu pri postavljanju dijagnoze. Nadalje, tu se ubraja invazivnost postupka, krvarenje i potencijalna infekcija nakon traumatizacije tkiva (20).

Upotrebom vitalnih bojila i fluorescentnih metoda, ciljane lezije mogu se bolje prikazati i adekvatnije bioptirati. Iako su financijski prihvatljive, brze i jednostavne, najveći nedostatak vitalnih bojila jest njihova osjetljivost na upalne poremećaje (17). Osjetljivost i specifičnost svih navedenih metoda relativno je niska, do 87 % i do 50 %, što ih zasad čini isključivo potpornim metodama dijagnostike OSCC-a (16). Komercijalno najdostupnija metoda je još uvijek TB sa osjetljivosti i specifičnosti redom 92.5 % i 63.7 % (15). Specifičnost ovog testa, prema nekim autorima, može se povećati dualnom upotrebom TB-a i LI-a. TB obojat će samu leziju plavom bojom dok će LI obojati zdravo tkivo smeđom bojom, čime će se jasno označiti



rubovi lezije (31). MB, iako jeftinije i manje toksično bojilo, za sad još ne može zamijeniti TB zbog nedostatka kliničkih istraživanja (11,28).

Tkivne fluorescencije nailaze na sličan problem. Upalna tkiva, pigmentirane lezije i vaskularne promjene pokazuju povećanu koncentracije fluorofora. Oslanjanjem isključivo na osvjetljavanje i fluoresciranje lezije može doći do lažno pozitivnih rezultata, zbog čega je poznavanje kliničkih simptoma i znakova imperativ. Po nedavnim metaanalizama, autoflorescentne metode u usporedbi s kemiluminiscentnim metodama pokazuju veću osjetljivost i specifičnost (90% i 72% u usporedbi s 72% i 31%). Iskusnim kliničarima autoflorescentni uređaji mogu biti korisni u dijagnosticiranju OPMD-a i OSCC-a. Uređaji koji koriste kemiluminiscenciju mogu se koristiti kako bi istaknula obilježja lezija kao što su boja i razgraničenje rubova (11).

Eksfolijativna citologija i tekuća biopsija krvi i sline mogle bi predstavljati budućnost brze minimalnoinvazivne dijagnostike ranog OSCC-a. Eksfolijativna citologija zahtjeva posebno dizajnirane četkice za atraumatsko prikupljanje transepitelijalnih stanica sluznice koja se zatim šalju na računalnu patohistološku analizu (15.) S druge strane, bliski kontakt sline s OSCC-om čini ju idealnim medijem za detekciju tumorskih markera (40). Prikupljanje uzoraka i dobivanje rezultata na spomenuti način brzo je i učinkovito. Transformacije staničnog ciklusa mogu se otkriti putem CTC-a, maligno alteriranih stanica unutar tumorskog okoliša, mutiranih nukleinskih kiselina i proteina te povećanom razinom citokina i promjenom u staničnom mikrobiomu (38). Budućnost donosi potencijal za usavršavanje ordinacijskih jedinica za analizu salivarnih biomarkera i uzoraka *brush* biopsije radi brze i točne dijagnostike OSCC-a. Iako korisne i funkcionalne metode, ove metode su još uvijek u začetcima razvoja te su podaci o njima oskudni (18).

Drugu opciju u dijagnostici neoplastičnih promjena epitela donose nove metode slikovne dijagnostike. Temeljene na obasjavanju lezija svjetlošću različitih valnih duljina i/ili mjerenjem njihove refrakcije, mogu jasno prikazati vaskularne strukture i displastične promjene epitela te time dati histološku i/ili vaskularnu sliku sluznice u realnom vremenu. Proces maligne transformacije karakteriziran je neoangiogenezom s promjenama u arhitekturi krvnih žila. Uvidom u vaskularne karakteristike mukoze i submukoznog tkiva pomoću NBI-a može se procijeniti nepravilnost IPCL-a i time odrediti začetak neoplastičnih promjena. (60) US, OCT i CLE za sad nemaju dovoljno kliničkih istraživanja kako bi se procijenio potencijal u dijagnostici ranog OSCC-a, no nisu isključene kao opcija u budućnosti. (55) Nanočesticama

ojačane RS i DRS trenutačno ne postoje kao sustavi za komercijalnu upotrebu, međutim, zbog obećavajućih rezultata *in vitro* i *in vivo* istraživanja mogle bi biti primjenjive u budućnosti. (11,64) Ako ove metode postanu komercijalno dostupne, idući korak bit će osigurati adekvatnu edukaciju kliničara za analizu slikovnih podataka. Napretkom tehnologije očekuje se razvitak sustava *chairside* uređaja koji bi omogućavali trenutnu analizu slika bez potrebe za pristupom velikim bolničkim sustavima ili ambulantama s adekvatnom opremom. (39)

Sve navedene metode iziskuju još mnogo istraživanja i unaprjeđenja kako bi mogle zamijeniti konvencionalnu biopsiju kao zlatni standard u ranoj dijagnostici OSCC-a.

#### **4. ZAKLJUČAK**

OSCC je bolest koja bi se u najvećem broju slučajeva mogla spriječiti, ali i dijagnosticirati u najranijoj fazi. Unatoč tome, ova bolest nije rijetka i većinom se otkriva u uznapredovaloj fazi. Veliku ulogu u većoj incidenciji i stopi smrtnosti igraju nepovoljne navike pacijenata, rani asimptomatski stadij s odgođenim posjetom stomatologu i nedovoljna educiranost kliničara u pravodobnom prepoznavanju ove zloćudne bolesti. Uz klinički pregled, zlatni standard za postavljanje dijagnoze oralnog karcinoma je biopsija. Zahvaćanje cijele lezije ili reprezentabilnog dijela olakšavaju potporne dijagnostičke metode na bazi vitalnih bojila (TB, MB i LI) i fluorescencije tkiva (autoluminiscencije, kemiluminiscencije i PPD). Rani asimptomatski stadij i sličnost kliničke slike OSCC-a i OPMD-a potaknula su razvijanje novih minimalno invazivnih molekularnih i slikovnih tehnologija. Serumski, salivarni i ekfolijativnociološki uzorci oralne sluznice u kombinaciji s molekularnom dijagnostikom mogu dati uvid u metaboličke i strukturalne promjene stanica prije pojave težih simptoma i progresije bolesti. Slikovne tehnike u razvoju kao što su OCT, US, NBI, CLE te RS i DRS u kombinaciji s nanočesticama samo su neke od potencijalnih metoda koje bi se mogle koristiti za prikazivanje staničnih i vaskularnih promjena oralnog epitela i tkiva, a time i stupnjevanje maligne promjene. Većina ovih metoda kliničarima nisu dostupne, stoga se veliki naglasak stavlja na edukaciju stomatologu o znakovima i simptomima oralnog karcinoma te rano prepoznavanje korištenjem komercijalno dostupnih metoda.

## **5. LITERATURA**

1. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):491–508.
2. Wong T, Wiesenfeld D. Oral Cancer. *Aust Dent J*. 2018;63 Suppl 1:S91–9.
3. Abati S, Bramati C, Bondi S, Lissoni A, Trimarchi M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(24):9160.
4. Gupta N, Gupta R, Acharya AK, Patthi B, Goud V, Reddy S et al. Changing Trends in oral cancer – a global scenario. *Nepal J Epidemiol*. 2016;6(4):613–9.
5. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11884–94.
6. Nokovitch L, Maquet C, Crampon F, Taihi I, Roussel LM, Obongo R et al. Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Risk Factors: State of the Art. *J Clin Med*. 2023;12(9):3264.
7. Hübbers CU, Akgül B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence*. 2015;6(3):244–8.
8. Laskaris G. Atlas oralnih bolesti. Dijagnoza i liječenje. 2. hrv. izd. Jastrebarsko: \_Naklada Slap; 2020.
9. Mattavelli D, Ferrari M, Taboni S, Morello R, Paderno A, Rampinelli V et al. The 8th TNM classification for oral squamous cell carcinoma: What is gained, what is lost, and what is missing. *Oral Oncol*. 2020.;111:104937.
10. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis*. 2021;27(8):1862–80.
11. Albuquerque R, Andabak Rogulj A, Barreira E, Boralevi F, Brailo V, Carey B. et al. Oral potentially malignant disorders: Healthcare professional training [Internet]. 1st edition. London; 2022 [Cited 14th June 2024] Available from: [https://opmdcare.com/wpcontent/uploads/oral-potentially-malignant-disorders-healthcare-professional-training--english-version\\_compressed.pdf](https://opmdcare.com/wpcontent/uploads/oral-potentially-malignant-disorders-healthcare-professional-training--english-version_compressed.pdf).
12. Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, De Virgilio A et al.. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck*. 2020;42(3):539–55.
13. Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018;125(6):582–90.
14. Kumari P, Debta P, Dixit A. Oral Potentially Malignant Disorders: Etiology, Pathogenesis, and Transformation Into Oral Cancer. *Front Pharmacol*. 2022;13:825266.
15. Carreras-Torras C, Gay-Escoda C. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20(3):e305–15.
16. Lau J, O G, Warnakulasuriya S, Balasubramaniam R, Frydrych A, Kujan O. Adjunctive aids for the detection of oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant

- disorders: A systematic review of systematic reviews. *Jpn Dent Sci Rev.* 2024;60:53–72.
17. Chakraborty D, Natarajan C, Mukherjee A. Advances in oral cancer detection. *Adv Clin Chem.* 2019;91:181–200.
  18. Dixit S, Kumar A, Srinivasan K. A Current Review of Machine Learning and Deep Learning Models in Oral Cancer Diagnosis: Recent Technologies, Open Challenges, and Future Research Directions. *Diagnostics (Basel)* 2023;13(7):1353.
  19. Li R, Koch WM, Fakhry C, Gourin CG. Distinct Epidemiologic Characteristics of Oral Tongue Cancer Patients. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;148(5):792–6.
  20. Yang G, Wei L, Thong BKS, Fu Y, Cheong IH, Kozlakidis Z et al. A Systematic Review of Oral Biopsies, Sample Types, and Detection Techniques Applied in Relation to Oral Cancer Detection. *BioTech.* 2022;11(1):5.
  21. Epstein JB. Rak usne šupljine. U: Greenberg M, Glick M, urednici. *Burketova oralna medicina, dijagnoza i liječenje.* Zagreb: Medicinska naklada; 2006. str. 194–234.
  22. Casparis S, Borm JM, Tomic MA, Burkhardt A, Locher MC. Transepithelial Brush Biopsy – Oral CDx® – A Noninvasive Method for the Early Detection of Precancerous and Cancerous Lesions. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(2):222–6.
  23. Neumann FW, Neumann H, Spieth S, Remmerbach TW. Retrospective evaluation of the oral brush biopsy in daily dental routine — an effective way of early cancer detection. *Clin Oral Investig.* 2022;26(11):6653–9.
  24. Panta P, Rich LJ, Seshadri M. Oral Cancer Screening: Application of Vital Stains as Adjuncts to Clinical Examination. U: Panta P, urednik. *Oral Cancer Detection: Novel Strategies and Clinical Impact [Internet].* Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 9th June 2024.]. str. 153–66. Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-61255-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-61255-3_7)
  25. Richart RM. A clinical staining test for the in vivo delineation of dysplasia and carcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol.* 1963;86:703–12.
  26. Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(2):251–5.
  27. Hwang SH, Kim SW, Song EA, Lee J, Kim DH. Methylene Blue as a Diagnosis and Screening Tool for Oral Cancer and Precancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2021;164(2):271–6.
  28. Riaz A, Shreedhar B, Kamboj M, Natarajan S. Methylene blue as an early diagnostic marker for oral precancer and cancer. *SpringerPlus.* 2013;2(1):95.
  29. McCaul JA, Cymerman JA, Hislop S, McConkey C, McMahan J, Mehanna H et al. LIHNCS - Lugol's iodine in head and neck cancer surgery: a multicentre, randomised controlled trial assessing the effectiveness of Lugol's iodine to assist excision of moderate dysplasia, severe dysplasia and carcinoma in situ at mucosal resection margins of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: study protocol for a randomised controlled trial. *Trials.* 2013;14:310.

30. Petruzzi M, Lucchese A, Baldoni E, Grassi FR, Serpico R. Use of Lugol's iodine in oral cancer diagnosis: an overview. *Oral Oncol.* 2010;46(11):811–3.
31. Epstein JB, Scully C, Spinelli J. Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. *J Oral Pathol Med.* 1992;21(4):160–3.
32. Mascitti M, Orsini G, Tosco V, Monterubbianesi R, Balercia A, Putignano A et al. An Overview on Current Non-invasive Diagnostic Devices in Oral Oncology. *Front Physiol.* 2018;9:1510.
33. Nagi R, Reddy-Kantharaj YB, Rakesh N, Janardhan-Reddy S, Sahu S. Efficacy of light based detection systems for early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: Systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(4):e447–55.
34. Messadi DV, Younai FS, Liu HH, Guo G, Wang CY. The clinical effectiveness of reflectance optical spectroscopy for the in vivo diagnosis of oral lesions. *Int J Oral Sci.* 2014;6(3):162–7.
35. Rashid A, Warnakulasuriya S. The use of light-based (optical) detection systems as adjuncts in the detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(5):307–28.
36. Tatehara S, Sato T, Takebe Y, Fujinaga M, Tsutsumi-Arai C, Ito Y et al. Photodynamic Diagnosis Using 5-Aminolevulinic Acid with a Novel Compact System and Chromaticity Analysis for the Detection of Oral Cancer and High-Risk Potentially Malignant Oral Disorders. *Diagnostics.* 2022;12(7):1532.
37. Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, Roehrl MHA, Barrera-Saldaña HA. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget.* 2018;9(2):2912–22.
38. Marrugo-Ramírez J, Mir M, Samitier J. Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):2877.
39. Kaur J, Srivastava R, Borse V. Recent advances in point-of-care diagnostics for oral cancer. *Biosens Bioelectron.* 2021;178:112995.
40. Bastías D, Maturana A, Marín C, Martínez R, Niklander SE. Salivary Biomarkers for Oral Cancer Detection: An Exploratory Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2024;25(5):2634.
41. Menditti D, Santagata M, Imola G, Staglianò S, Vitagliano R, Boschetti CE et al. Personalized Medicine in Oral Oncology: Imaging Methods and Biological Markers to Support Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC): A Narrative Literature Review. *J Pers Med.* 2023;13(9):1397.
42. Wong DTW. Salivaomics. *J Am Dent Assoc.* 2012;143:19S-24S.
43. Madhura MG, Rao RS, Patil S, Fageeh HN, Alhazmi A, Awan KH. Advanced diagnostic aids for oral cancer. *Dis Mon.* 2020;66(12):101034.



44. Roi A, Ioan Roi C, Riviş M, Rusu LC, Cosmina Ardelean L, Victoria Tigmeanu C. Salivary diagnostics in oral cancer [Internet]. *Molecular Diagnostics of Cancer* [Working Title]. IntechOpen; 2024. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1003679>
45. Beger RD. A Review of Applications of Metabolomics in Cancer. *Metabolites*. 2013;3(3):552–74.
46. Takeda I, Stretch C, Barnaby P, Bhatnager K, Rankin K, Fu H et al. Understanding the human salivary metabolome. *NMR Biomed*. 2009;22(6):577–84.
47. Nijakowski K, Gruszczyński D, Kopała D, Surdacka A. Salivary Metabolomics for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis: A Systematic Review. *Metabolites*. 2022;12(4):294.
48. Wong DTW. Salivary Extracellular Non-Coding RNA: Emerging Biomarkers for Molecular Diagnostics. *Clin Ther*. 2015;37(3):540–51.
49. Solanki M, Patankar S, Sridharan G. A Review on Salivary Genomics in Oral Cancer. *Acta Sci Dent Sciencs*. 2023;61–5.
50. Yotsukura S, Mamitsuka H. Evaluation of serum-based cancer biomarkers: A brief review from a clinical and computational viewpoint. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;93(2):103–15.
51. Fernandez-Olavarria A, Mosquera-Perez R, Diaz-Sanchez R, Serrera-Figallo M, Gutierrez-Perez J, Torres-Lagares D. The role of serum biomarkers in the diagnosis and prognosis of oral cancer: A systematic review. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(2):e184-93.
52. Pekarek L, Garrido-Gil MJ, Sánchez-Cendra A, Cassinello J, Pekarek T, Fraile-Martinez O et al. Emerging histological and serological biomarkers in oral squamous cell carcinoma: Applications in diagnosis, prognosis evaluation and personalized therapeutics (Review). *Oncol Rep*. 2023;50(6):1–12.
53. Pałasz P, Adamski Ł, Górska-Chrzęstek M, Starzyńska A, Studniarek M. Contemporary Diagnostic Imaging of Oral Squamous Cell Carcinoma - A Review of Literature. *Pol J Radiol*. 2017;82:193–202.
54. Romano A, Di Stasio D, Petruzzi M, Fiori F, Lajolo C, Santarelli A, Lucchese A, Serpico R, Contaldo M. Noninvasive Imaging Methods to Improve the Diagnosis of Oral Carcinoma and Its Precursors: State of the Art and Proposal of a Three-Step Diagnostic Process. *Cancers(Basel)*. 2021;13(12): 2864
55. Gentile E, Maio C, Romano A, Laino L, Lucchese A. The potential role of in vivo optical coherence tomography for evaluating oral soft tissue: A systematic review. *J Oral Pathol Med*. 2017;46(10):864–76.
56. Jerjes W, Hamdoon Z, Yousif AA, Al-Rawi NH, Hopper C. Epithelial tissue thickness improves optical coherence tomography's ability in detecting oral cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;28:69–74.

57. Stasio DD, Lauritano D, Iquebal H, Romano A, Gentile E, Lucchese A. Measurement of Oral Epithelial Thickness by Optical Coherence Tomography. *Diagnostics(Basel)*. 2019;9(3):90.
58. Khong B, Ferlito S, Quek S, Conte G, Ingrassia A, Lechien JR et al. Past, Present, and Future Diagnostic Methods for the Early Noninvasive Detection of Oral Premalignant Lesions: A State of the Art and Systematic Review. *Ear Nose Throat J*. 2024;1455613241245204.
59. Vu AN, Farah CS. Efficacy of narrow band imaging for detection and surveillance of potentially malignant and malignant lesions in the oral cavity and oropharynx: a systematic review. *Oral Oncol*. 2014;50(5):413–20.
60. Zhang Y, Wu Y, Pan D, Zhang Z, Jiang L, Feng X et al. Accuracy of narrow band imaging for detecting the malignant transformation of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. *Front Surg*. 2022;9:1068256.
61. Saraniti C, Greco G, Verro B, Lazim NM, Chianetta E. Impact of Narrow Band Imaging in Pre-Operative Assessment of Suspicious Oral Cavity Lesions: A Systematic Review. *Iran J Otorhinolaryngol*. 2021;33(116):127–35.
62. Sethi S, Ju X, Logan RM, Sambrook P, McLaughlin RA, Jamieson LM. Diagnostic Accuracy of Confocal Laser Endomicroscopy for the Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(23):12390.
63. Caprioli S, Casaleggio A, Tagliafico AS, Conforti C, Borda F, Fiannacca M et al. High-Frequency Intraoral Ultrasound for Preoperative Assessment of Depth of Invasion for Early Tongue Squamous Cell Carcinoma: Radiological-Pathological Correlations. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(22):14900.
64. Shrivastava PK, Kumar A, Aggarwal Y, Kumar A, Agrawal A, Rai A. Diagnostic accuracy of Vibrational spectroscopy in the diagnosis of oral potentially malignant and malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Ther*. 2023;19(2):151-8.

## **6. ŽIVOTOPIS**

Sara Đureković rođena je 08.10.1999. godine u Milanu. Pohađala je Osnovnu školu Frana Galovića u Novom Zagrebu od 2006. do 2014. godine. Srednjoškolsko obrazovanje stječe u Školi za suvremeni ples Ane Maletić 2017. godine i u Petoj Gimnaziji u Zagrebu 2018. godine. Iste godine upisuje Stomatološki fakultet u Zagrebu. Članica je Studentske sekcije za oralnu kirurgiju putem koje vodi radionice na studentskim simpozijima prethodnih godina.