

# Mikrobiom i metabolom sline u pacijenata s karcinomom usne šupljine

---

**Komšo, Andrea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:127:770295>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Andrea Komšo

**MIKROBIOM I METABOLOM SLINE U  
PACIJENATA S KARCINOMOM USNE  
ŠUPLJINE**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2022.

Rad je ostvaren na Zavodu za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor rada: Ivan Salarić, doc. dr. sc. Zavod za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu

Lektor hrvatskog jezika: Ema Ivanković, magistra edukacije hrvatskog i latinskog jezika

Lektor engleskog jezika: Aleksandar Ignjatović, profesor engleskog jezika i književnosti

Sastav Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

Datum obrane rada: \_\_\_\_\_

Rad sadrži: 37 stranica

CD

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 jesu 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.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem svom mentoru, doc. dr. sc. Ivanu Salariću na pruženoj pomoći i stručnim savjetima pri pisanju ovog rada.*

*Mojim curama.*

*Mom Luki.*

*Mami i tati.*

*Hvala vam za sve. Podršku, ljubav, razumijevanje. Bez vas ne bih bila tu gdje jesam.*

## **MIKROBIOM I METABOLOM SLINE U PACIJENATA S KARCINOMOM USNE ŠUPLJINE**

### **Sažetak**

Karcinom usne šupljine predstavlja globalni zdravstveni problem. Uz dobro poznate etiološke čimbenike, kao što su alkohol i duhan, u novije vrijeme sve je veći broj dokaza u literaturi koji impliciraju to da bi ulogu u etiologiji karcinoma usne šupljine mogao imati i oralni mikrobiom. Usna šupljina obiluje različitim bakterijama, virusima, gljivama i arhejama. Ovi mikroorganizmi žive skladno te uspostavljaju međusobno složene odnose. Do bolesti eventualno može doći ako nastane poremećaj strukture oralnih komenzalnih zajednica – disbioza. Oralni mikrobiom mogao bi, uz druge biomarkere, poslužiti i u ranoj dijagnostici karcinoma usne šupljine. Mogući su dijagnostički biljezi i metaboliti – konačni proizvodi staničnih biokemijskih procesa. Izvrsnom tekućinom za procjenu mikrobioma i metaboloma usne šupljine pokazala se slina. S obzirom na to da se nalazi u neposrednoj blizini karcinoma, slina bi mogla odraziti i promjene mikrobiološkog i metaboličkog profila svojstvene oralnom karcinomu. Detekcija biomarkera u slini noviji je dijagnostički pristup koji je u posljednje vrijeme središte interesa mnogim istraživanjima. Do sada nije pronađen biljeg ili kombinacija različitih biljega koji bi s pouzdanom osjetljivošću i specifičnošću mogli detektirati karcinom usne šupljine. Međutim, polaže se nada u daljnja istraživanja, jer pronalazak odgovarajućih biomarkera povećao bi vjerojatnost rane dijagnoze karcinoma usne šupljine.

**Ključne riječi:** karcinom usne šupljine; salivarna dijagnostika; slina; biomarkeri; mikrobiom; metabolom

## **SALIVARY MICROBIOME AND METABOLOME IN ORAL CANCER PATIENTS**

### **Summary**

Oral cancer is a global health problem. In addition to well-known factors, such as alcohol and tobacco, there is a growing body of evidence in the literature that suggests that the oral microbiome may play a role in the etiology of oral cancer. The oral cavity contains diverse forms of microbes such as bacteria, viruses, fungi and archaea. These microorganisms live in harmony and establish complex relationships. The disease can eventually occur if there is a disruption to the balance of the oral commensal communities, known as dysbiosis. The oral microbiome could be, among other biomarkers, used in the early diagnosis of oral cancer. Other possible diagnostic markers are metabolites - the final products of cellular biochemical processes. Saliva proved to be an excellent fluid for assessing the microbiome and metabolome of the oral cavity. Since it is in close proximity to the cancer itself, saliva could also reflect changes in the microbiological and metabolic profile characteristic of oral cancer. Salivary biomarkers detection is a new diagnostic approach that has been the focus of much research recently. To date, no marker or combination of different markers that could detect oral cancer with reliable sensitivity and specificity has been found. However, high hopes are placed on further research, as finding adequate biomarkers would increase the likelihood of early diagnosis of oral cancer.

**Key words:** oral cancer; salivary diagnostics; saliva; biomarkers; microbiome; metabolome

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Karcinom usne šupljine.....	2
2. ORALNI MIKROBIOM .....	4
2.1. Eubioza.....	5
2.2. Disbioza.....	6
2.3. Uloga mikrobioma u etiologiji karcinoma usne šupljine .....	7
2.3.1. Bakterije .....	7
2.3.2. Virusi.....	9
2.3.3. Gljive.....	10
3. SLINA KAO DIJAGNOSTIČKI MEDIJ .....	12
3.1. Lučenje i funkcije sline .....	13
3.2. Salivama dijagnostika.....	14
3.2.1. Salivama metabolomika .....	15
3.2.2. Dijagnostička vrijednost oralnog mikrobioma.....	18
4. RASPRAVA.....	21
5. ZAKLJUČAK.....	24
6. LITERATURA .....	26
7. ŽIVOTOPIS .....	36

## **Popis skraćenica**

ADH – alkohol dehidrogenaza

CMV – cytomegalovirus

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EBV – Epstein-Barr virus

EMT – epitelno mezenhimalna tranzicija

GC-MS – engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, hrv. plinska kromatografija – masena spektroskopija

HPV – humani papiloma virus

HSV – herpes simplex virus

LC-MS – engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, hrv. tekućinska kromatografija masene spektroskopije

MW – engl. *mouth-rinsed water*

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

PMOP – potencijalno maligni oralni poremećaj

TNF – engl. *tumor necrosis factor*, hrv. faktor tumorske nekroze





## 1.1 Karcinom usne šupljine

Karcinomi glave i vrata heterogena su skupina tumora, a po učestalosti u svijetu nalaze se na 7. mjestu. Karcinom usne šupljine čini gotovo polovicu svih karcinoma glave i vrata (1). U više od 90 % slučajeva riječ je o planocelularnom karcinomu koji se razvija iz epitela oralne sluznice (2). Unutar usne šupljine mogu se razviti i maligne bolesti žlijezda slinovnica, sarkomi, mukozni melanomi te limfomi (3).

U 2020. godini dijagnosticirano je 377 713 karcinoma usana i usne šupljine u svijetu, a 177 757 osoba je preminulo. 65,8 % karcinoma otkriveno je u Aziji, dok je u Europi dijagnosticirano 17,3 % od ukupnog broja slučajeva (4).

Oralni karcinom moguće je prevenirati, s obzirom na to da je identificirana većina predisponirajućih čimbenika koji se vezuju uz njegov nastanak. Glavni egzogeni rizični čimbenici za razvoj karcinoma usne šupljine su pušenje cigareta, konzumacija alkohola i žvakanje betelova oraaha (5). Dodatni čimbenik oralne karcinogeneze genetska je osjetljivost pojedinca često povezana s nedostatkom mikronutrijenata iz prehrane (6 – 8). U posljednje vrijeme sve je više dokaza koji upućuju na to da bi oralni mikrobiom, koji podrazumijeva složenu zajednicu različitih bakterija, virusa, protozoa, gljiva i arheja, mogao imati ulogu u razvoju oralnog karcinoma (9). Nekoliko je mogućih načina na koje bakterije potiču karcinogenezu: indukcija kronične upale, inhibicija imunološkog odgovora, interferencija sa signalnim putevima i staničnim ciklusima te lokalni metabolizam karcinogena (10). Od virusa je najznačajniji humani papiloma virus (HPV), premda je njegova uloga izraženija u karcinogenezi orofaringealnog karcinoma (11).

S obzirom na visoku stopu mortaliteta, veliki značaj u prognozi bolesti ima rana dijagnostika. Leukoplakija, eritroplakija, oralni lihen planus i oralna submukozna fibroza najčešći su potencijalno maligni oralni poremećaji (PMOP). Rana detekcija PMOP-a i procjena rizika od njihove transformacije ključni su za praćenje, ali prvenstveno za sprečavanje nastanka karcinoma usne šupljine. Preporuka je obavljanje rutinskog kliničkog pregleda kojim je moguće identificirati lezije sluznice. Nedostatak je vizualnog i kliničkog pregleda taj što uvelike ovisi o iskustvu kliničara (12). Biopsija tkiva, uz patohistološku analizu, zlatni je standard u diferencijaciji i dijagnostici različitih tipova PMOP-a i oralnog karcinoma (13). Posljednjih se godina sve više pažnje posvećuje biomarkerima i njihovoj ulozi u detekciji i prognozi bolesti. Za identifikaciju biomarkera karcinoma usne šupljine mogu se koristiti slina, serum ili tkivo.

Interes u znanstvenoj literaturi o salivarnoj dijagnostici u porastu je, s obzirom na to da je, u usporedbi s drugim tehnikama, riječ o neinvazivnom i jeftinom pristupu (14).

Svrha je ovog rada opisati potencijalnu ulogu oralnog mikrobioma u nastanku karcinoma usne šupljine te prikazati značaj salivarne dijagnostike u ranom otkrivanju oralnog karcinoma, s naglaskom na metabolomiku i mikrobiomiku.

## **2. ORALNI MIKROBIOM**

## 2.1. Eubioza

Usna šupljina izazovno je okruženje za preživljavanje mikroorganizama, s obzirom na to da podliježe dnevnim fluktuacijama u temperaturi, vrijednosti pH, dotoku nutrijenata, mehaničkim silama i kemijskom sastavu (15). Zubi, gingivalni sulkus, obrazna sluznica, jezik i tonzile staništa su kolonizirana različitim mikroorganizmima – bakterijama, virusima, gljivama, protozoama i arhejama (16, 17). Budući da svi ovi mikroorganizmi obitavaju u neposrednoj blizini, međusobno uspostavljaju složene odnose čineći tako funkcionalnu cjelinu – oralni mikrobiom (18). Razlikujemo osnovni mikrobiom zajednički svim organizmima te varijabilni koji se razlikuje među pojedincima, a ovisi o njihovim genotipskim karakteristikama i načinu života (19). U zdravom organizmu oralni mikrobiom održava uravnotežene komenzalne odnose; postoji mikrobna homeostaza ili eubioza bez štetnih djelovanja prema mikroorganizmima ili domaćinu. Uloge ovih komenzalnih mikroorganizama otpor su patogenima, održavanje homeostaze i modulacija imunološkog sustava (20).

Više od 700 vrsta bakterija detektirano je unutar usne šupljine; 58 % ih je službeno imenovano, 16 % ih je neimenovano, ali kultivirano, a preostalih 26 % jesu nekultivirani filotipovi (21). Najviše je bakterija iz koljena *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* i *Fusobacteria*, a najzastupljeniji je rod *Streptococcus* (22, 23). Većina bakterija nalazi se unutar biofilma, ali mogu postojati i u planktonskom obliku. Biofilm je definiran kao zajednica međusobno agregiranih bakterija koje su uklopljene u ekstracelularni polimerni matriks te adheriraju na određenu površinu (24). Unutar biofilmova nalaze se različiti bakterijski rodovi, od kojih se pojedini nastanjuju na specifičnom mjestu, dok druge nalazimo u više oralnih habitata (25). Primjerice, rod *Veillonella* nastanjuje površinu jezika, zubi i keratinizirane gingive, a rodovi *Capnocytophaga* i *Corynebacterium* obitavaju isključivo unutar dentalnog plaka (26). Bakterije unutar biofilma mogu međusobno komunicirati kvorum signalizacijom. To je proces koji podrazumijeva bakterijsku proizvodnju i detekciju malih signalnih molekula te odgovor na njih (27).

Zajednice oralnih virusa variraju među pojedincima, a pokazuju razlike u odnosu na spol domaćina. Većina su virusa u usnoj šupljini bakteriofagi koji imaju stabilne litičke ili lizogene cikluse (28). Svojim litičkim ciklusom imaju sposobnost izmjene bakterijskih zajednica (28). Najčešće porodice bakteriofaga u zdravih su osoba *Siphoviridae*, *Myoviridae* i *Podoviridae* iz reda *Caudovirales* (29). Najrasprostranjeniji eukariotski virusi u asimptomatskih zdravih

pojedinaца jesu HPV, *Cytomegalovirus* (CMV), *Herpes simplex virus* (HSV) tip 1 i *Epstein-Barr virus* (EBV) (30).

*Candida* i *Malassezia* najčešće su gljive koje koloniziraju oralnu sluznicu. Predominacija jednog od rodova povezana je s određenim bakterijskim i kliničkim karakteristikama. Pripadnici roda *Candida* pojavljuju se u osoba s manjom raznolikošću bakterioma te prisutnošću acidogenih i acidurinih bakterija, kao što su laktobacili i propionibakterije (31). Osim toga, u osoba koje puše, primaju kortikosteroidnu terapiju, nose p optune proteze, imaju aktivni karijes ili visoki plak indeks vjerojatnija je kolonizacija sluznice kandidom (31). U pozadini ovih navoda spoznaja je da prehrana bogata ugljikohidratima, nedostatna oralna higijena te neadekvatan imunološki odgovor domaćina potiču kandidijalni rast (31). Najčešća je vrsta *Candida albicans* (*C. albicans*) (32). Zajednice kojima dominira rod *Malassezia* učestalije su u ljudi s raznovrsnijim bakterijskim koji je obogaćen bakterijama iz rodova *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* i *Leptotrichia* (31). Ove bakterije preživljavaju u asaharolitičkim uvjetima kao i *Malassezia*. Njen metabolizam zasniva se na lipidima (31).

U ljudskom gastrointestinalnom traktu otkriveno je više od 15 rodova protozoa (33). Njihova uloga u usnoj šupljini još je uvijek nejasna. Prema nedavnom istraživanju zapažena je veća prevalencija protozoa *Entamoeba gingivalis* i *Trichomonas tenax* u pacijenata s parodontitisom nego u zdravih pojedinaca što upućuje na njihovu moguću patofiziološku ulogu u parodontnoj bolesti (34).

Arheje su organizmi morfološki slični bakterijama, međutim, s eukariotima dijele više molekularnih karakteristika (35). Neke arheje stvaraju metan iz ugljikova dioksida te se nazivaju metanogenim (36). Identificirano je 5 različitih rodova metanogenih arheja u zdravih osoba – *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanosarcina*, *Thermoplasmata* i *Methanobacterium* (37).

## 2.2. Disbioza

Oralni mikrobiom posjeduje određeni stupanj tolerancije na promjene unutar njegova okruženja. Zahvaljujući toj sposobnosti moguće je održati stanje mikrobne homeostaze (38). Međutim, određenim djelovanjima može doći do gubitka eubiotičkog balansa te prevage parazitarnih odnosa koji potom imaju ulogu u nastanku bolesti domaćina (39 – 41). Poremećaj strukture složenih komenzalnih zajednica nazivamo disbiozom. Karakteriziraju je gubitak

korisnih te širenje patogenih mikroorganizama, kao i gubitak mikrobne raznolikosti (41). Ovi događaji međusobno se ne isključuju, već se mogu pojaviti istovremeno (41).

Na mikrobiološku ravnotežu mogu utjecati fiziološke promjene poput starenja te hormonalnih promjena u pubertetu i trudnoći (42). Zdrave osobe uglavnom uspijeva ju kompenzirati pomake u mikrobnoj ravnoteži (42). Suprotno tome, u određenim slučajevima može doći do disbiotičkog pomaka s kojim se povezuje povećan rizik od nastanka bolesti (43). Oralnu disbiozu mogu potaknuti disfunkcije žlijezda slinovnica (promjene u protoku/sastavu sline), loša oralna higijena, određene prehrambene navike i pušenje (40).

Smatra se da disbalans oralne mikrofluore može pridonijeti nastanku lokalnih bolesti, kao što su zubni karijes, parodontitis, oralna leukoplakija, oralni lihen planus i oralni karcinom (44). Osim toga, bakterije i njihovi toksini iz usne šupljine krvlju dopijevaju i do udaljenih organa te mogu doprinijeti nastanku bolesti gastrointestinalnog (upalne bolesti crijeva, ciroza jetre, karcinom gušterače), živčanog (Alzheimerova bolest), endokrinog (dijabetes, sindrom policističnih jajnika), imunološkog (reumatoidni artritis) i kardiovaskularnog (ateroskleroza) sustava (44).

### **2.3. Uloga mikrobioma u etiologiji karcinoma usne šupljine**

#### **2.3.1. Bakterije**

Bakterijska infekcija jedan je od glavnih uzroka kronične upale koja se smatra odgovornom za 25 % malignih bolesti u ljudi (45). Upalni medijatori mogu potaknuti staničnu proliferaciju, mutagenezu, aktivaciju onkogeni i angiogenezu što vodi gubitku normalne kontrole rasta i, u konačnici, nastanku karcinoma. S dužom prisutnošću upalnog procesa raste rizik karcinogeneze. Akutna upala ne smatra se rizičnim čimbenikom za razvoj neoplazme, iako je karakterizira oslobađanje mnogih molekula istovjetnih onima u kroničnoj (45, 46).

Najviše proučavana bakterija koja ima ulogu u nastanku malignih bolesti je *Helicobacter pylori* (*H. Pylori*). Epidemiološke studije pokazuju da 2 do 3 % ljudi s *H. Pylori* infekcijom razvije želučani adenokarcinom, dok 0,1 % inficiranih oboli od MALT limfoma (47).

Potencijalno onkogenim smatraju se i oralne bakterije (48). Smatra se da loša oralna higijena i parodontitis povećavaju rizik od nastanka planocelularnog karcinoma usne šupljine (49). Stimulacija kronične upale, antiapoptotička aktivnost i metabolizam karcinogeni neki su od

mehanizama kojima bakterije sudjeluju u nastanku karcinoma (20). Karcinogena svojstva osobito su proučavana u *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) i *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*).

*P. gingivalis* djeluje na pojačano stvaranje interleukina, faktora tumorske nekroze (TNF), matriksnih metaloproteinaza, a posjeduje i antiapoptotičko djelovanje (50). Epitelne stanice prva su linija obrane od mikrobnih patogena. Povišene razine bakterija, kao što je *P. gingivalis*, mogu modulirati apoptotičke puteve unutar epitelnih stanica (51). Nastaje tzv. antiapoptotički fenotip usko povezan s karcinogenezom (52). Nadalje, regulacijom ciklina, fosforilacijom kinaza ovisnih o ciklinu i smanjenjem razine tumor supresorskog gena p53, *P. gingivalis* ubrzava proliferaciju gingivalnih epitelnih stanica (53). Izraženoj proliferaciji može pridonijeti i aktivacijom  $\beta$ -katenina (53). Unutar gingivalnih epitelnih stanica *P. gingivalis* potiče ekspresiju B7-H1 i B7-DC receptora koji imaju ulogu u kroničnoj upali (53). Poticanjem upalnog mikrookruženja ima ulogu u progresiji tumora (53). Stvoreni proupalni medijatori, kao što su interleukini i faktori tumorske nekroze, postaju dio okoline tumora te potiču njegov rast. Primjerice, interleukin 8 može regulirati matriksne metaloproteinaze koje pojačano razgrađuju ekstracelularni matriks, što olakšava širenje malignih stanica (54). TNF- $\alpha$  povećava stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala te potiče oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (DNK) posredovano oksidativnim stresom. Može potaknuti i epitelno mezenhimalnu tranziciju (EMT) te angiogenezu (54). EMT je proces kojim epitelne stanice poprimaju karakteristike mezenhimalnih (pokretljivost, invazivnost) (55).

*F. nucleatum* gram je negativna anaerobna bakterija sa sposobnošću prijanjanja na druge bakterije te na stanice domaćina putem fimbrija i nefimbrijalnih adhezina. Česta je detekcija *F. nucleatum* unutar tkiva karcinoma usne šupljine. S tumorigenezom je povezana putem nekoliko mehanizama (55, 56). Kao i *P. gingivalis*, može potaknuti proliferaciju stanica. Unutar epitelnih stanica aktivira 12 kinaza od kojih je većina uključena u preživljenje i proliferaciju stanica te popravke DNK (53). Aktivacijom protein kinaze p38 u inficiranim stanicama dovodi do pojačanog oslobađanja matriksnih metaloproteinaza 9 i 13 koje imaju važnu ulogu u tkivnom metabolizmu i održanju homeostaze (55). Njihovo prekomjerno otpuštanje sudjeluje u invazivnosti novotvorine (55).

Prilikom oštećenja DNK-a dolazi do smanjenja razine Ku70, podjedinice Ku proteinskog kompleksa, a pojačana je ekspresija staničnog tumorskog antigena p53 (55). Ovi događaji važni su za uspješan popravak DNK-a. Međutim, ako je njeno oštećenje unutar tumorskih stanica inficiranim *F. nucleatum* jako izraženo, a razina Ku70 proteina preniska za adekvatan popravak,



može doći do prekomjerne proliferacije stanica karcinoma (55). Detaljni mehanizmi međudjelovanja *F. nucleatum* i Ku70 proteina još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni (55).

*Prevotella intermedia* također se dovodi u vezu s karcinomom usne šupljine. Faktorima virulencije (lipopolisaharidi, peptidoglikani, lipoteikolična kiselina) izaziva porast lokalne koncentracije različitih interleukina i TNF- $\alpha$  (55). Otpuštanje citokina dodatno stimulira proizvodnjom proteaza (55). Djelujući kao signalne molekule, bakterijske proteaze mogu se vezati za receptore čija aktivacija posljedično djeluje na staničnu proliferaciju, apoptozu ili upalu. Osim toga, pojavu tumora ili njegovu progresiju stvorene proteaze mogu potaknuti razgradnjom ekstracelularnog matriksa te izmjenom imunološkog odgovora domaćina (55).

Važnu ulogu u nastanku karcinoma ima i bakterijski metabolizam alkohola do acetaldehida. Iako ovaj kancerogeni spoj može nastati djelovanjem mukoznih alkoholnih dehidrogenaza (ADH) u gornjem dijelu gastrointestinalnog sustava, znatno veće količine nastaju bakterijskom oksidacijom alkohola (10). Visoku aktivnost ADH-e ima rod *Neisseria* koji lokalno može stvoriti velike količine acetaldehida (10). Stoga mikrobi koji pripadaju ovom rodu mogu potencijalno biti uključeni u karcinogenezu povezanu s konzumacijom alkohola. Različiti streptokoki – *S. salivarius*, *S. intermedius* i *S. mitis* također posjeduju ADH (57). Oralne bakterije mogu imati ulogu i u povećanoj aktivaciji nitrozamina iz duhanskog dima (10).

Bakterije iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus* proizvode mliječnu kiselinu čime dolazi do lokalnog smanjenja pH vrijednosti (57). Neke bakterijske vrste, kao što je *Peptostreptococcus stomatis*, mogu proizvoditi više različitih kiselina. Kiselo i hipoksično okruženje tumora doprinose njegovu širenju (57).

### 2.3.2. Virusi

Ljudski onkogeni virusi inficiraju stanice domaćina koje, usprkos infekciji, preživljavaju (58). U usporedbi s drugim virusima odgovornim za nastanak mnogih bolesti, onkogeni virusi teže uspostavljanju perzistirajućih infekcija prilikom kojih mijenjaju imunološki odgovor domaćina (58). Proteklih je godina uloga virusa u nastanku karcinoma usne šupljine bila fokus mnogih istraživanja. Najviše su proučavana kancerogena svojstva HPV-a, potom EBV-a, HSV-a te CMV-a (55). HPV je DNK virus koji obuhvaća više od 200 različitih genotipova (58). Prema mogućnosti transformacije epitelnih stanica, dijele se na tipove visokog i niskog rizika. Niskorizični tipovi dovode do razvoja benignih promjena, kao što su papilomi, dok

visokorizični tipovi mogu biti uključeni u malignu transformaciju (58). Opće je poznata etiološka funkcija HPV-a u karcinomima anogenitalne regije (58).

Za karcinogenezu izazvanu HPV-om najviše su odgovorni viralni proteini E6 i E7 čija sinteza započinje nakon ugradnje viralnog DNK-a u genom keratinocita (59). Oba proteina imaju sposobnost inaktivacije tumor supresorskih proteina; E6 inhibira p53, a E6 onkoprotein inaktivira pRb protein (59). Ovaj slijed događaja rezultira porastom mitotičke aktivnosti zahvaćene stanice. Dolazi do genomske nestabilnosti, manjkavog popravka DNK-a, te do poremećaja u apoptozi i regulaciji staničnog ciklusa (59).

Prevalencija HPV-a u usnoj šupljini iznosi od 2 do 8 %, s najčešće zastupljenim tipom 16 (60). Rizični čimbenici, kao što su pušenje i imunodeficijencija povećavaju rizik oralne HPV infekcije te čine vjerojatnijim njenu perzistenciju (60). Važno je spomenuti da većina oralnih HPV infekcija spontano prolazi unutar godine dana (60).

Uloga HPV-a ističe se u nastanku orofaringealnih planocelu larnih karcinoma, dok je njegova uključenost u razvoj drugih karcinoma glave i vrata, pa i planocelularnog karcinoma usne šupljine, još uvijek dvojben (60). Postavljena dijagnoza anogenitalnog karcinoma, u E6 i E7 pozitivnih pacijenata, predstavlja povećan rizik za nastanak sekundarnog karcinoma anogenitalne regije, ali i glave i vrata, što se prvenstveno odnosi na orofaringealni karcinom (58). Nekoliko provedenih istraživanja utvrdilo je prisustvo virusne DNK u značajnom broju oralnih karcinoma. U 10 – 25 % tumora usne šupljine prisutan je virusni genom te je udio veći nego u zdravih kontrolnih skupina (60). Najčešći tip detektiran u karcinomima usne šupljine je HPV-16, slijedi HPV-18, dok je detekcija drugih visokorizičnih tipova rijetkost (60). Međutim, nedostaju dokazi koji bi potvrdili da virus potiče nastanak karcinoma, obzirom da prisutnost virusne DNK ne podrazumijeva i biološku aktivnost virusa (60).

### 2.3.3. Gljive

Manja raznolikost oralnog mikrobioma karakteristika je osoba oboljelih od karcinoma usne šupljine. Kao primjer, može se istaknuti manja zastupljenost gljiva iz roda *Malassezia* (55). Udio gljiva iz roda *Shizophyllum*, koje imaju sposobnost stvaranja antikancerogenog polisaharida šizofilana, također je smanjen u oboljelih od oralnog karcinoma (55).

Većina oralnih kandida jesu oportunistički patogeni. Naime, u usnoj šupljini prisutne su kao komenzalne vrste koje, u slučaju izmjene mikrokolišnih uvjeta i obrambenih mehanizama domaćina, mogu dovesti do infekcije sluznice (61). Oralna kandidijaza česta je u pacijenata oboljelih od karcinoma usne šupljine. Međutim, još uvijek nije razjašnjeno ima li infekcija ulogu u razvoju neoplazme ili nastaje zbog poticaja gljivičnog rasta djelovanjem tumora (62).

Usporedbom salivarnih uzoraka oboljelih od karcinoma usne šupljine, pacijenata s PMOP -om te zdravih kontrolnih skupina detektirane su znatne razlike u prisustvu gljiva iz roda *Candida* među skupinama. Gljive su bile najzastupljenije u osoba s karcinomom te su *non-albicans* vrste dominirale nad *Candidom albicans* (*C. albicans*) (63).

Prema *in vitro* istraživanjima, prisutnost *C. albicans* potiče progresiju karcinoma usne šupljine stimulacijom proizvodnje matriksnih metaloproteinaza, onkometabolita i indukcijom protumorskih signalnih puteva. Uočen je i njen utjecaj na prekomjernu ekspresiju gena uključenih u metastatsko širenje novotvorine. Slični učinci zabilježeni su i *in vivo* istraživanjima provedenim na životinjama (62).

Opisano je i međudjelovanje *C. albicans* i *P. gingivalis*; *C. albicans* potiče bakterijsku infekciju sprečavajući prepoznavanje *P. gingivalis* od strane imunološkog sustava (55). Nadalje, *C. albicans* ima veliki kapacitet proizvodnje kancerogenog acetaldehida te aktivira imunološki odgovor domaćina. Zabilježena je njena potencijalna uloga u malignoj transformaciji epitelnih lezija usne šupljine (64). Naime, leukoplakija zahvaćena kandidijazom ima veći rizik maligne transformacije nego neinficirana lezija (61).

### **3. SLINA KAO DIJAGNOSTIČKI MEDIJ**

### 3.1. Lučenje i funkcije sline

Slina je jedinstvena biološka tekućina koja ima važnu ulogu u očuvanju oralnog zdravlja. Čini je sekret velikih i malih žlijezda slinovnica pomiješan s gingivalnom krevikularnom tekućinom (65). Skupini velikih žlijezda slinovnica pripadaju po dvije parotidne, submandibularne i sublingvalne žlijezde. Njihovom aktivnošću nastaje 92 – 95 % sline, dok ostatak luče male žlijezde slinovnice (66). Parotidna žlijezda građena je pretežno od seroznih acinusa koji proizvode slinu bogatu  $\alpha$ -amilazom. Sublingvalna žlijezda luči mukoznu, viskoznu tekućinu bogatu mucinima, a submandibularna žlijezda luči i mukoznu i seroznu slinu (67). Sve žlijezde slinovnice pod kontrolom su autonomnog živčanog sustava.

Protok sline ovisi o mnogim faktorima, uključujući tip i veličinu stimulirane žlijezde, dob, hidrataciju, nutritivni status te period dana. U zdrave osobe koja miruje, ukupno se izluči 0,3 – 0,4 mL/min nestimulirane sline (68). Patološko niskom smatra se salivacija manja od 0,1 mL/min; takvo stanje označava se kao hiposalivacija. Količina izlučene sline u zdravih ljudi varira između 0,5 i 1,5 l dnevno s uključenom stimulacijom izazvanom konzumacijom hrane i pića (68).

99 % sastava sline čini voda, a preostalih 1 % različite anorganske i organske molekule; elektroliti, produkti metabolizma dušikovih tvari te proteini, kao što su imunoglobulini i mucini (69, 70). Različite komponente sline u međusobnoj su interakciji što je važno za ostvarenje njenih osnovnih funkcija. Bikarbonati, fosfati i drugi ioni moduliraju pH i puferski kapacitet sline (70). Uklanjanje patogena, kao što su bakterije, moguće je djelovanjem proteina s antimikrobnom aktivnošću. Takvi proteini su primjerice lizozimi, laktoferini i peroksidaze (71). Na primjer, laktoperoksidaza katalizira proizvodnju hipotiocijanata iz vodikovog peroksida i tiocijanata. Vodikov peroksid je produkt metabolizma bakterija, a tiocijanat se luči slinom. Hipotiocijanat ispoljava antimikrobne učinke inhibiranjem bakterijske glikolize (72). Nadalje, slina formira pelikulu, zaštitnu ovojnici koja obavija površinu zuba. Osim zaštite, salivama pelikula je i mjesto vezivanja bakterija, što je prvi korak u nastanku zubnog plaka. U slini se nalaze i biološki aktivni proteini te faktori rasta koji potiču cijeljenje rana i regeneraciju tkiva (71). Slina sudjeluje u osjetu okusa, žvakanju, oblikovanju bolusa, početnoj probavi uz pomoć enzima amilaze i gutanju (73).

### 3.2. Salivarna dijagnostika

Rana dijagnoza bolesti od izuzetne je važnosti za uspjeh dostupnih terapijskih postupaka. Liječenje bolesti u ranoj fazi može znatno umanjiti njen utjecaj na kvalitetu pacijentova života te prevenirati ili odgoditi naknadne komplikacije (74). Analiza sastava sline potencijalna je dijagnostička metoda te se očekuje da će u budućnosti postati zamjena za druge biološke tekućine korištene u dijagnostici bolesti, kao što su urin i serum (75).

Slina odražava fiziološko ili patološko stanje organizma (74). Njenom analizom moguće je detektirati različite biomarkere koji su objektivno mjerljivi pokazatelji normalnih bioloških, ali i patoloških procesa, te farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju (76). Biomarkeri dopijevaju u slinu iz krvi prolazeći transcelularnim ili paracelularnim putevima (74). Postoje u različitim oblicima, uključujući antitijela, mikrobe, DNA, RNA, lipide, metabolite i proteine (75).

Otkriće biomarkera u slini nudi mogućnost zaobilaznja invazivnog uzorkovanja krvi za procjenu zdravstvenog stanja pacijenta (77). Mnoge su prednosti korištenja sline u dijagnostičke svrhe. Prikupljanje uzoraka sline brzo je, jednostavno, jeftino, neinvazivno te dobro prihvaćeno od strane pacijenata. S obzirom na jednostavnost postupka, nije nužno da ga provodi medicinsko osoblje. Uzimanje, slanje i pohrana uzoraka ekonomičniji su u usporedbi sa serumom. Osim toga, salivarni uzorci ne zahtijevaju toliko manipulacije tijekom dijagnostičkih postupaka (78).

Uzorke sline moguće je klasificirati u dvije skupine:

1. s obzirom na izvor sline – razlikujemo ukupnu slinu te slinu koju je izlučila specifična žlijezda;
2. s obzirom na stimulaciju salivacije – razlikujemo stimuliranu i nestimuliranu slinu (79).

Vrlo je važna standardizacija metoda prikupljanja salivarnih uzoraka jer različiti čimbenici mogu utjecati na sastav i količinu izlučene sline. Nestimulirana slina prikuplja se pasivnim slinjenjem ili pljuvanjem te je važno izbjeći kontaminaciju uzorka krvlju ili sputumom (79). Prikupljeni metodom pljuvanja, salivarni uzorci sadržavaju znatno veće količine bakterija što može utjecati na njihovo skladištenje i daljnju analizu (79). Stimulacija salivacije također utječe na sastav, količinu te na pH sline. Potiče se masažom žlijezda ili žvakanjem parafinskog voska, gume ili pamučnih rolica (79). Uzorci bi trebali biti obrađeni što prije nakon njihova uzimanja.

Čuvaju se na različitim temperaturama, ovisno o vremenu koje će proteći do analize. Ako su uzorci zaleđeni, važno je izbjeći ponavljajuće cikluse odleđivanja/zaleđivanja jer utječu na degradaciju nukleinskih kiselina i proteina (79).

Prikupljanje uzorka sline prosječno traje 5 minuta po osobi, što je relativno puno vremena kada se primjenjuje u velikog broja ljudi, primjerice, u istraživanjima. Kao moguća alternativa, navodi se ispiranje usne šupljine vodom (engl. *mouth-rinsed water*, MW) koja se potom koristi za analizu (80). Velika prednost ove tehnike vrijeme je prikupljanja od svega 10 sekundi po uzorku (80). Usporedbom metaboličkog profila stimulirane i nestimulirane sline te MW-a, utvrđen je gotovo jednak kvalitativni sastav svih uzoraka (80). Kvantitativnom analizom više su se isticale individualne razlike među ispitanicima nego među različitim tehnikama uzorkovanja (80).

Nadalje, utvrđena je i korelacija mikrobiološkog sastava među uzorcima nestimulirane, stimulirane sline i MW-a (81).

### **3.2.1. Salivarna metabolomika**

Metabolomika je novo istraživačko polje koje se definira kao sveobuhvatna analiza metabolita; konačnih proizvoda staničnih biokemijskih procesa, u biološkom uzorku. Slina sadrži različite metabolite od kojih neki mogu biti povezani s oralnim ili sistemskim bolestima (82). Cilj je metabolomike, proučavanjem bolesti izmijenjenih metaboličkih puteva, pronaći specifične biomarkere za ranu dijagnozu što bi uvelike poboljšalo prognozu pacijenata oboljelih od karcinoma usne šupljine (83). Nadalje, salivarni metaboliti mogu biti korisni za evaluaciju odgovora na primijenjeno liječenje te za razvoj personalizirane medicine (84). Osim salivarnih, proučavaju se i uzorci seruma, tkiva te urina (83).

U metabolomičkim istraživanjima koriste se različite analitičke tehnike; infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, nuklearna magnetna rezonancija (NMR), plinska kromatografija – masena spektroskopija (GC-MS) i tekućinska kromatografija masene spektroskopije (LC-MS), od kojih je NMR najzastupljenija (83). Prednosti NMR-a jesu dobivanje precizno kvantificiranih ponovljivih rezultata te minimalna priprema uzoraka, međutim, osjetljivost ove tehnike je niska (85). Analize temeljene na masenoj spektroskopiji imaju najveću osjetljivost te je njima moguće izvesti opsežne procjene metaboloma (85). LC-MS prikladna je za analizu širokogspektra spojeva, dok je GC-MS ograničena na one hlapljive.

S obzirom na raznolikost metaboloma, nijedna platforma ne može odjednom pružiti uvid u sve metabolite (85).

Postoji mnoštvo različitih biomarkera koji koreliraju s prisutnošću karcinoma usne šupljine. Prema istraživanju iz 2011. godine, valin, mliječna kiselina i fenilalanin jasno su diferencirali pacijente s karcinomom usne šupljine od zdrave kontrolne skupine te oboljelih od oralne leukoplakije (86). Uzorci nestimulirane sline prikupljeni su u jutarnjim satima, između 9 i 10 sati, a 1, 5 sat prije uzorkovanja pacijenti nisu smjeli jesti, piti, pušiti, niti provoditi mjere oralne higijene. Nakon centrifugiranja, odvojeni su supernatanti te pohranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize. Visoke koncentracije mliječne kiseline dokaz su povišenih količina laktata što je moguće objasniti tzv. Warburg učinkom. Karakterizira ga pojačano iskorištavanje glukoze i stvaranje laktata u malignim tumorima unatoč prisutnosti dovoljnih količina kisika. Zbog toga manje količine piruvata ulaze u Krebsov ciklus. Nastaje poremećaj u proizvodnji energije te se drugi metabolički proizvodi, primjerice međuprodukti aminokiselina razgranatog lanca, uključuju u Krebsov ciklus. Ovaj događaj objašnjava snižene koncentracije valina u slini pacijenata s karcinomom usne šupljine (86). Premda je ovaj nalaz obećavajuć, osjetljivost i specifičnost biomarkera nisu zadovoljili kriterije da bi se koristili za ranu dijagnostiku bolesti (86).

Međutim, iste biomarkere pronašli su Lohavanichbutr i suradnici među 80 metabolita koji su razlikovali pacijente s karcinomom i bez karcinoma (87). Preoperativnim prikupljanjem uzoraka nestimulirane sline te njihovom analizom, u slini pacijenata s karcinomom usne šupljine pronađene su i značajno niže razine glicina i prolina (87). Ovi metaboliti, uz ornitin i citrulin, upućivali su na rani stadij karcinoma (87). Prije uzimanja uzoraka, pacijenti su također bili suzdržani od jedenja i pijenja, iznimka je bila mogućnost pijenja vode. Duže vrijeme gladovanja može olakšati otkrivanje biomarkera s dijagnostičkom vrijednošću. Salivarni uzorci centrifugirani su da bi se skupila sva slina s dna epruvete. Osim toga, proučavane su i koncentracije salivarnih metabolita u pacijenata s metastazama u limfnim čvorovima i bez metastaza, ali nisu pronađene razlike (87).

U diferencijaciji oralnog karcinoma i lihen planusa prikupljanjem uzoraka nestimulirane sline provedenim 3 sata nakon čišćenja dentalnog plaka i kamenca, dijagnostički su se istaknuli indol-3-acetat i etanolamin fosfat (88). Indol-3-acetat proizvodi tumorsko tkivo tijekom rasta malignih stanica, dok etanolamin fosfat nastaje metabolizmom fosfolipida za vrijeme progresije tumora (88).



Wang i suradnici utvrdili su 4 potencijalna salivarna biomarkera za dijagnozu ranog stadija karcinoma: kolin, betain, pipekoličnu kiselinu i L-karnitin (89). Prikupljeni su uzorci od 2 mL nestimulirane sline 30 zdravih i 30 oboljelih osoba koji su potom ispitani tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti. Pronađene su veće razine kolina, betaina i pipekolične kiseline, dok je salivami L-karnitin snižen u oboljelih (89). Proliferacija tumorskih stanica zahtijeva povećanu razinu metabolizma kolina. Promjene u koncentraciji betaina i L-karnitina povezane su sa smanjenim metabolizmom masnih kiselina, a pipekolične kiseline s povećanim metabolizmom lizina (89). Isti autori u drugom su istraživanju pronašli još jednu moguću kombinaciju biomarkera za ranu dijagnostiku karcinoma usne šupljine: propionil-kolin, N-acetil-L-fenilalanin, sfinganin, fitosfingozin i S-karboksimetil-L-cistein (90). Uzorci od 3 mL nestimulirane sline uzimani su između 9 i 11 sati. Sfinganin i fitosfingozin sudjeluju u sintezi i metabolizmu ceramida koji imaju ulogu u staničnoj signalizaciji i poticanju apoptoze (90).

U istraživanju Sugimota i suradnika, uspoređivala se slina 69 pacijenata s karcinomom usne šupljine sa 87 zdravih ispitanika te je detektirano 57 metabolita, od kojih je 28 pokazivalo različite koncentracije među uzorcima zdravih i bolesnih (91). Više razine poliamina, piperidina i taurina pronađene su u pacijenata s karcinomom usne šupljine (91). Pacijenti su se također suzdržavali od jela, pića i pušenja 1 sat prije uzorkovanja. Nakon ispiranja usne šupljine vodom, prikupljena je nestimulirana slina pljuvanjem u epruvetu. Pacijente se podsjetilo da ne iskašljavaju sluz. Epruvete su se pohranile u posude s ledom do centrifugiranja (91).

Česta je detekcija povećanih razina kadaverina, jednog od poliamina, u slini oboljelih (85). Usprkos nastojanjima premošćenja razlika u oralnoj higijeni prilikom analize mnoštva pacijenata, postoji mogućnost da je kadaverin povezan upravo s nedostatnom oralnom higijenom, koja je čest nalaz u pacijenata s oralnim karcinomom (85).

Potencijalnim biomarkerima pokazali su se i jabučna kiselina, maltoza, metionin, inozin i protokatekuijska kiselina čije su vrijednosti povišene u slini pacijenata s karcinomom (92). Suprotno tome, laktoza, katekol, ketoadipinska kiselina, urea i leucin pronađeni su u sniženim koncentracijama (92).

Nekoliko je biomarkera detektiranih u uzorcima sline pronađeno i metaboličkim analizama drugih bioloških tekućina. Izmijenjen metabolizam kolina uočen je, osim u slini, i u tkivu, plazmi te serumu oboljelih od karcinoma usne šupljine (85). Pretpostavka je da se povišene razine kolina pojavljuju zbog pojačanog fosfolipidnog metabolizma stanične membrane visokoproliferativnih stanica (85). Drugačiji nalaz pronašli su Bag i suradnici serumskom

metabolomikom; snižene vrijednosti kolina uz povišene vrijednosti njegovog nusprodukta trimetilamin N-oksida (93). Više razine aminokiselina valina i alanina također su utvrđene u uzorcima različitog podrijetla (slina, tkivo, urin) (85).

Osim dijagnostičkog značaja salivarnih metabolita, postoji mogućnost njihove korelacije s prognozom bolesti. Premda je većina saznanja o prognostičkim biomarkerima temeljena na proučavanjima genoma, transkriptoma i proteoma, Ishikawa i suradnici nedavnim su istraživanjem povezali različite vrijednosti salivarnog 3-metilhistidina s prognozom oralnog karcinoma (94). Pacijenti s višim koncentracijama 3-metilhistidina imali su značajno nižu stopu preživljenja u odnosu na pacijente s nižom razinom ovog metabolita (94).

Činjenica je da na metabolički profil sline mogu utjecati različiti čimbenici, što predstavlja izazov u standardizaciji uzoraka kako bi se istraživanjima dobili što vjerodostojniji podatci. Takvi su čimbenici, primjerice, vrijeme i metoda prikupljanja uzorka, uzimanje hrane prije uzorkovanja, zdravstveni status usne šupljine i oralni mikrobiom (87, 92). Zabilježene su i dnevne varijacije salivarnog metaboloma; različit sastav s obzirom na period dana u kojem je uzet uzorak (95). Primjer ovog odnosa jesu poliamini, kao što su putrescin i kadaverin, čija je koncentracija najveća ujutro neposredno nakon buđenja te opada nakon doručka i pranja zubi (95). Optimalnim se smatra izbjegavanje obroka 12 sati nakon večere te uzorkovanje u jutarnjim satima (95). Na dobivene rezultate mogu utjecati i razlike u analitičkim platformama koje mogu pokazivati različitu osjetljivost i specifičnost, a utjecaj imaju i korištene statističke metode, mjesto tumora te veličina uzorka (87). Nadalje, nestimulirana slina, u usporedbi sa stimuliranom, sadrži više koncentracije gotovo svih metabolita. Pušenje također djeluje na metabolički sastav sline. Pušači imaju veće koncentracije citrata, laktata, piruvata i saharoze te niže koncentracije formijata unutar sline (95). Osim toga, metaboličke razlike uzrokuje i spol pacijenata (95). Primjerice, u salivarnim uzorcima muškaraca nalaze se veće količine acetata, formijata, glicina i laktata (95). Različite etničke skupine pokazuju određene razlike u salivarnim metabolitima. U većini provedenih studija proučavani su oboljeli Azijati te se nameće potreba za više istraživanja u koja će biti uključene i druge etničke skupine (92).

### **3.2.2. Dijagnostička vrijednost oralnog mikrobioma**

Detaljna analiza salivarnih bakterija smatra se mogućim indikatorom karcinoma usne šupljine. Razlog tomu jest izmijenjen mikrobiološki profil koji se pojavljuje s razvojem karcinoma (96).

Oralni mikrobiom relativno je stabilan i sličan među različitim pojedincima, što povećava njegov dijagnostički značaj (97).

U procjeni oralnog mikrobioma, koriste se različite tehnike među kojima je, najčešće, uzimanje briseva oralne sluznice. Pouzdanost ove metode manjkava je, s obzirom na to da mikroorganizmi nisu konstantno fiksirani uz površinu, već slinom i kretnjama jezika putuju po usnoj šupljini. Uzorkovanje sline dodatna je metoda koja također pokazuje određene nedostatke. Dnevne varijacije u salivarnom sastavu dugo su smatrane preprekom objektivnoj analizi (97). Belstrom i suradnici izvijestili su o konstantnom mikrobiološkom sastavu sline tijekom 24 sata što nalaže da vrijeme uzorkovanja nije od kritične vrijednosti (98). Međutim, različite metode uzorkovanja sline mogu utjecati na sastav salivarnog mikrobioma. Primjerice, stimulacija salivacije pokretima mišića može rezultirati obilnijim mikrobim zajednicama u usporedbi s pasivnim slinjenjem (98).

Brojnim provedenim istraživanjima uočene su razlike u sastavu bakterijske mikroflore na površini i unutar zdravog te maligno oboljelog tkiva usne šupljine. Nagy i suradnici metodom su kulture utvrdili da je u biofilmu s površine planocelularnog karcinoma usne šupljine znatno veći broj aerobnih i anaerobnih bakterija u usporedbi sa zdravom sluznicom istih pacijenata (99). S područja karcinoma izoliran je velik broj anaerobnih bakterijskih vrsta – *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Actinomyces* i *Clostridium*. Najčešći izolirani aerobi bili su *Haemophilus*, *Enterobacteriaceae* i *Streptococcus* (99). Nadalje, Katz i suradnici metodom su imunohistokemijskog bojenja detektirali višu razinu *P. gingivalis* u gingivalnom karcinomu nego u tkivu zdrave gingive (100). Uspoređujući karcinomom zahvaćenu i kontralateralnu zdravu bukalnu sluznicu u 50 pacijenata, Zhang i suradnici su 16S rDNA sekvencioniranjem također uočili razlike u bakterijskom profilu (101). Zabilježili su značajno povećanje 10 bakterijskih vrsta u području karcinoma, među kojima su bile *F. nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter segnis*, *Peptostreptococcus stomatis* i *Catonella morbi* (101).

Mager i suradnici izvijestili su o razlikama u sastavu salivarne mikrofluore nakon analize nestimulirane sline oboljelih i zdravih skupina (102). Zabilježen je povećan broj bakterijskih vrsta *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* i *Streptococcus mitis* u slini pacijenata s karcinomom usne šupljine (102).

Usporedbom salivarnog mikrobioma 19 pacijenata s karcinomom glave i vrata s 25 zdravih ispitanika, kao potencijalni biomarkeri, istaknuli su se povećan broj laktobacila te gubitak

bakterija koje pripadaju rodovima *Haemophilus*, *Neisseria*, *Gemellaceae* i *Aggregatibacter* (97).

Promjenu stadija karcinoma prati dinamična izmjena oralne mikrobne zajednice. Prema istraživanju Yanga i suradnika, udio fuzobakterija u zdravih osoba iznosio je 2,98 % (103). U početnom stadiju karcinoma usne šupljine, njihov udio je dosegao 4,35 % te se postupno povećavao do četvrtog stadija u kojem su fuzobakterije činile 7,92 % mikrofluore (103). S druge strane, napredovanjem bolesti smanjivala se bakterijska zastupljenost na razini rodova *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Porphyromonas* i *Actinomyces* (103). Nekoliko bakterija u kombinaciji uspješno je razlikovalo drugi i treći stadij karcinoma od zdravih skupina: povećane razine *Fusobacterium periodonticum* i *Parvimonas micra*, te smanjenje *Streptococcus mitis*, *Veillonella parvulla*, *Porphyromonas pasteri* i *Actinomyces odontolyticus*. Povećan broj *Fusobacterium periodonticum* te smanjena prisutnost *Streptococcus mitis* i *Porphyromonas pasteri* pokazali su zadovoljavajuću sposobnost diferencijacije kasnog stadija karcinoma (103). Ovi nalazi dobiveni su na temelju ispiraka usne šupljine fiziološkom otopinom tijekom 30 sekundi i pljuvanjem u sterilnu epruvetu od 50 mL, nakon čega je provedeno 16S rRNA sekvencioniranje (103).

Sličnom metodom uzorkovanja uočen je različit mikrobiološki profil sline u pacijenata s oralnim i orofaringealnim karcinomom (104). Značajkom oralnog i orofaringealnog karcinoma pokazala se manja mikrobiološka raznolikost što bi se moglo objasniti ranije spomenutim Warburg učinkom koji pogoduje rastu određene skupine mikroba. Premda je uočeno smanjenje brojnosti bakterija iz većine bakterijskih rodova (*Haemophilus*, *Rothia*, *Corynebacterium*, *Paludibacter*, *Porphyromonas* i *Capnocytophaga*), značajno veća prisutnost bakterija iz roda *Oribacterium* karakterizirala je obje skupine te ih diferencirala od zdravih kontrola te onih s visokim rizikom od obolijevanja (104). Određeni rodovi, kao što su *Actinomyces* i *Prevotella* bili su brojniji u ispircima pacijenata s karcinomom usne šupljine te su ga razlikovali od orofaringealnog karcinoma (104).

Analizom mikrobioma tkivnih i salivarnih uzoraka te MW-a istaknule su se određene razlike. Na razini bakterijskih rodova, unutar tkivnih uzoraka, izdvojili su se *Acinetobacter* i *Fusobacterium* dok su rodovi *Streptococcus* i *Prevotella* predominirali u slini te MW-u (96). Nadalje, u nestimuliranoj slini detektirani su bakterijski rodovi sa sposobnošću razlikovanja oralnog karcinoma i leukoplakije. Zamijećen je osobit bakterijski pomak rodova *Megasphaera*, *Enterobacteriae*, *Salmonella* i *Prevotella*, što naglašava mogući dijagnostički značaj bakterioma prilikom praćenja eventualne maligne transformacije leukoplakije (105).



Planocelularni karcinom najčešća je maligna bolest usne šupljine s dobro poznatim rizičnim čimbenicima kao što su pušenje, konzumacija alkohola i žvakanje betelova oraha (5). Oralni mikrobiom, uz druge rizične čimbenike, mogao bi sudjelovati u nastanku ove bolesti. Glavnim problemom mikrobnog djelovanja smatra se poticanje kronične upale koja zauzima važno mjesto kao etiološki čimbenik u nastanku karcinoma (45).

Disbiozu oralnog mikrobioma moguće je preusmjeriti prema eubiotičnom stanju važnom za zdravlje organizma, a u literaturi se spominju različita djelovanja; dobro poznata mjera provođenja oralne higijene četkicom i pastom za zube, ali i korištenje sredstava kao što su antimikrobni peptidi, prebiotici, probiotici i modifikatori upalnog odgovora (106). Primjerice, oralno primijenjeni probiotici mogu ograničiti prodor patogenih mikroba te djelovati kao lokalni imunomodulatori, štiteći tako oralnu sluznicu (106). Primjena ovakvih sredstava mogla bi predstavljati svojevrsno preventivno djelovanje, barem na razini disbioze kao potencijalnog rizičnog čimbenika karcinoma usne šupljine.

Važno je usredotočiti se na prevenciju kako bi se rizik od nastanka karcinoma usne šupljine sveo na najmanji mogući, međutim, ako se neoplazma ipak razvije, težnja je postaviti dijagnozu u što ranijem stadiju bolesti. Salivarna dijagnostika podrazumijeva suvremeni pristup ranoj detekciji različitih bolesti. Slina ima mnoge prednosti koje je čine vrijednom dijagnostičkom tekućinom; lako je dostupna, njeno je uzorkovanje bezbolno, neinvazivno i jeftino (78). Prikupljanjem uzoraka sline i analizom njena sastava, mogu se uočiti odmaci od normalnog nalaza. Napretkom metabolomike postalo je moguće izmjeriti razine različitih metabolita u malim uzorcima (72). S obzirom na to da slina oblaže cjelokupnu usnu šupljinu, neizbježan je njen kontakt s tkivom karcinoma. Zbog toga se unutar sline mogu pronaći i metaboliti stanica karcinoma koji bi mogli postati biomarkerima bolesti. Do sada su promatrani različiti metaboliti i njihove razlike među slinom oboljelih i zdravih pojedinaca; valin, mliječna kiselina, fenilalanin, glicin, prolin, kolin, betain, pipekolična kiselina i drugi (86, 87, 89).

Osim što sadrži različite metabolite, slina odražava i prisutnost različitih mikroorganizama što bi također moglo poslužiti u dijagnozi karcinoma usne šupljine, ali i ovaj dijagnostički pristup zahtijeva dodatna istraživanja. Uočeno je da progresiju karcinoma prati povećanje zastupljenosti fuzobakterija u uzorcima sline (103). Osim povećanja udjela određenih bakterija u oboljelih od karcinoma, zabilježeno je i smanjenje broja drugih bakterija. Promatrane su i razlike među oboljelima od oralnog karcinoma i zdravih osoba, ali i oboljelih od leukoplakije i orofaringealnog karcinoma (102, 104, 105). Ako se pronađe biomarker, odnosno kombinacija

biomarkera zadovoljavajuće osjetljivosti i specifičnosti, salivarna dijagnostika mogla bi postati adekvatna zamjena uobičajenim dijagnostičkim metodama.





Bakterijski mikrobiom može doprinijeti nastanku oralnog karcinoma na mnogo načina, a njegovo potpuno razumijevanje pružit će nove pravce u dijagnostici, prevenciji i terapiji karcinoma. Premda je proteklih godina zabilježen napredak u liječenju karcinoma usne šupljine, petogodišnje preživljenje pacijenata još je uvijek na niskoj razini. Veći problem predstavlja često otkrivanje karcinoma u uznapredovanom stadiju zbog kasne pojave simptoma koji izazivaju prvu sumnju na postojanje patologije. Salivarni biomarkeri imaju veliki potencijal u ranoj dijagnostici karcinoma usne šupljine koja će omogućiti rani početak liječenja. Koristeći slinu, kao lako dostupnu biološku tekućinu s jednostavnošću uzorkovanja, pacijentima bi dijagnostički proces bio znatno ugodniji. Imajući u vidu da slina oblaže oralnu sluznicu, razumljivo je da se u njoj mogu pronaći i metaboliti svojstveni izmijenjenom metabolizmu karcinoma. Dostupna literatura, osim promjene metaboličkog sastava sline, opisuje i razlike bakterijskog sastava koje bi također mogle ukazivati na prisutnost karcinoma usne šupljine. Pri provedbi salivarne dijagnostike važna je standardizacija uzoraka sline kako bi se njihovom analizom dobili što pouzdaniji nalazi. Premda je ovakav pristup još uvijek u fazi istraživanja, u budućnosti bi moglo doći do njegove implementacije u svakodnevnu kliničku praksu. Budući da je oralni karcinom složena bolest koja proizlazi iz niza međusobno ovisnih biokemijskih promjena, skupina nekoliko različitih biomarkera poboljšat će osjetljivost i specifičnost u njegovu otkriću. Nažalost, do danas ne postoji zadovoljavajući biomarker ili skupina biomarkera za rano otkrivanje karcinoma usne šupljine, ali analize mikrobioma i metaboloma sline osoba s karcinomom usne šupljine mogle bi otkriti nove potencijalne biljege te dati još mnogo informacija o samom karcinomu usne šupljine.



1. Vitório JG, Duarte-Andrade FF, Dos Santos Fontes Pereira T, Fonseca FP, Amorim LSD, Martins-Chaves RR, et al. Metabolic landscape of oral squamous cell carcinoma. *Metabolomics*. 2020;16(10):105.
2. Irani S. New Insights into Oral Cancer-Risk Factors and Prevention: A Review of Literature. *Int J Prev Med*. 2020;11:202.
3. Chinn SB, Myers JN. Oral Cavity Carcinoma: Current Management, Controversies, and Future Directions. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3269-76.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
5. 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.
6. Kietthubthew S, Sriplung H, Au WW, Ishida T. Polymorphism in DNA repair genes and oral squamous cell carcinoma in Thailand. *Int J Hyg Environ Health*. 2006;209(1):21-9.
7. Hatagima A, Costa EC, Marques CF, Koifman RJ, Boffetta P, Koifman S. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol*. 2008;44(2):200-7.
8. Bau DT, Tsai MH, Huang CY, Lee CC, Tseng HC, Lo YL, Tsai Y, Tsai FJ. Relationship between polymorphisms of nucleotide excision repair genes and oral cancer risk in Taiwan: evidence for modification of smoking habit. *Chin J Physiol*. 2007;50(6):294-300.
9. Sampaio-Maia B, Caldas IM, Pereira ML, Pérez-Mongiovi D, Araujo R. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Adv Appl Microbiol*. 2016;97:171-210.
10. Zhang Y, Niu Q, Fan W, Huang F, He H. Oral microbiota and gastrointestinal cancer. *Oncotargets Ther*. 2019;12:4721-28.
11. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oro-pharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol*. 2012 Jul;6 Suppl 1(Suppl 1):S104-20.

12. Mehrotra R, Gupta DK. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. *Head Neck Oncol.* 2011;3:33.
13. Giovannacci I, Vescovi P, Manfredi M, Meleti M. Non-invasive visual tools for diagnosis of oral cancer and dysplasia: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(3):e305-15.
14. Farnaud SJ, Kosti O, Getting SJ, Renshaw D. Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:434-56.
15. Kreth J, Merritt J, Qi F. Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA Cell Biol.* 2009;28(8):397-403.
16. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010 Oct;192(19):5002-17.
17. Nieboer P, Roodenburg JL, van der Laan BF, de Vries EG, Mulder NH, van der Graaf WT. Screening for infectious foci in breast cancer patients prior to high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. *Anticancer Res.* 2003;23(2C):1779-83.
18. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* 2017;44 Suppl 18:S12-S22.
19. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis.* 2012;18:109–20.
20. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother.* 2018;99:883-93.
21. Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract. *mSystems.* 2018;3(6):e00187-18.
22. Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, Nelson KE, Gill SR, Fraser-Liggett CM, Relman DA. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* 2010;4(8):962-74.
23. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.

24. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881 -90.
25. Eren AM, Borisy GG, Huse SM, Mark Welch JL. Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(28):E2875-84.
26. Mark Welch JL, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of the Oral Microbiome: The Site - Specialist Hypothesis. *Annu Rev Microbiol.* 2019;73:335-58.
27. Li YH, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel).* 2012;12(3):2519-38.
28. Pride DT, Salzman J, Haynes M, Rohwer F, Davis-Long C, White RA 3rd, et al. Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *ISME J.* 2012;6(5):915-26.
29. Ly M, Abeles SR, Boehm TK, Robles-Sikisaka R, Naidu M, Santiago-Rodriguez T, et al. Altered oral viral ecology in association with periodontal disease. *mBio.* 2014;5(3):e01133-14.
30. Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol.* 2017;25(5):362-74.
31. Hong BY, Hoare A, Cardenas A, Dupuy AK, Choquette L, Salner AL, et al. The Salivary Mycobiome Contains 2 Ecologically Distinct Mycotypes. *J Dent Res.* 2020;99(6):730-8.
32. Naglik, J.R., Tang, S.X., Moyes, D.L. Oral Colonization of Fungi. *Curr Fungal Infect Rep.* 2013;(7):152–9.
33. Hamad I, Raoult D, Bittar F. Repertory of eukaryotes (eukaryome) in the human gastrointestinal tract: taxonomy and detection methods. *Parasite Immunol.* 2016;38(1):12 -36.
34. Yaseen A, Mahafzah A, Dababseh D, Taim D, Hamdan AA, Al-Fraihat E, et al. Oral Colonization by *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax*: A PCR-Based Study in Health, Gingivitis, and Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:782805.
35. Eme L, Spang A, Lombard J, Stairs CW, Ettema TJG. Archaea and the origin of eukaryotes. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(12):711-23.
36. Matarazzo F, Ribeiro AC, Faveri M, Taddei C, Martinez MB, Mayer MP. The domain Archaea in human mucosal surfaces. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(9):834-40.
37. Nguyen-Hieu T, Khelaifia S, Aboudharam G, Drancourt M. Methanogenic archaea in subgingival sites: a review. *APMIS.* 2013;121(6):467-77.

38. Rosier BT, Marsh PD, Mira A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J Dent Res.* 2018;97(4):371-80.
39. Méthot PO, Alizon S. What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence.* 2014;5(8):775-85.
40. Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 2016;221(10):657-66.
41. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol.* 2014;16(7):1024-33.
42. Zaura E, ten Cate JM. Towards understanding oral health. *Caries Res.* 2015;49(1):55-61.
43. Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA, et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol.* 2010;48(11):4121-8.
44. Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell.* 2018 May;9(5):488-500.
45. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol.* 2012;2:98.
46. Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park).* 2002;16(2):217-26, 229; discussion 230-2.
47. Alipour M. Molecular Mechanism of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer. *J Gastrointest Cancer.* 2021;52(1):23-30.
48. Szkaradkiewicz A.K., Karpiński T.M. Microbiology of chronic periodontitis. *J. Biol. Earth Sci.* 2013;3:14–20.
49. Petersen PE. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):454-60.
50. Tuominen H, Rautava J. Oral Microbiota and Cancer Development. *Pathobiology.* 2021;88(2):116-26.
51. Yilmaz O, Jungas T, Verbeke P, Ojcius DM. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun.* 2004;72(7):3743-51.

52. Nakhjiri SF, Park Y, Yilmaz O, Chung WO, Watanabe K, El-Sabaeny A, Park K, Lamont RJ. Inhibition of epithelial cell apoptosis by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;200(2):145-9.
53. Perera M, Al-Hebshi NN, Speicher DJ, Perera I, Johnson NW. Emerging role of bacteria in oral carcinogenesis: a review with special reference to perio-pathogenic bacteria. *J Oral Microbiol.* 2016;8:32762.
54. Fitzsimonds ZR, Rodriguez-Hernandez CJ, Bagaitkar J, Lamont RJ. From Beyond the Pale to the Pale Riders: The Emerging Association of Bacteria with Oral Cancer. *J Dent Res.* 2020;99(6):604-12.
55. Vyhnalova T, Danek Z, Gachova D, Linhartova PB. The Role of the Oral Microbiota in the Etiopathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Microorganisms.* 2021;9(8):1549.
56. Fujiwara N, Kitamura N, Yoshida K, Yamamoto T, Ozaki K, Kudo Y. Involvement of *Fusobacterium* Species in Oral Cancer Progression: A Literature Review Including Other Types of Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6207.
57. Karpiński TM. Role of Oral Microbiota in Cancer Development. *Microorganisms.* 2019;7(1):20.
58. Gupta K, Metgud R. Evidences suggesting involvement of viruses in oral squamous cell carcinoma. *Patholog Res Int.* 2013;2013:642496.
59. Martín-Hernán F, Sánchez-Hernández JG, Cano J, Campo J, del Romero J. Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(3):439-44.
60. Hübbers CU, Akgül B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence.* 2015;6(3):244-8.
61. Mohd Bakri M, Mohd Hussaini H, Rachel Holmes A, David Cannon R, Mary Rich A. Revisiting the association between candidal infection and carcinoma, particularly oral squamous cell carcinoma. *J Oral Microbiol.* 2010;2.
62. Vadovics M, Ho J, Igaz N, Alföldi R, Rakk D, Veres É, et al. *Candida albicans* Enhances the Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma *In Vitro* and *In Vivo*. *mBio.* 2022;13(1):e0314421.

63. Sankari SL, Mahalakshmi K, Kumar VN. A comparative study of *Candida* species diversity among patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *BMC Res Notes*. 2020;13(1):488.
64. Vesty A, Gear K, Biswas K, Radcliff FJ, Taylor MW, Douglas RG. Microbial and inflammatory-based salivary biomarkers of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Exp Dent Res*. 2018;4(6):255-62.
65. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J*. 1992 Apr 25;172(8):305-12.
66. Ghannam MG, Singh P. Anatomy, Head and Neck, Salivary Glands. 2021 Jun 11. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022
67. Porcheri C, Mitsiadis TA. Physiology, Pathology and Regeneration of Salivary Glands. *Cells*. 2019 Aug 26;8(9):976.
68. Bescos R., Brookes Z.L.S., Belfield L.A., Fernandez-Sanjurjo M., Casas-Agustench P. Modulation of oral microbiota: A new frontier in exercise supplementation. *PharmaNutrition*. 2020;14:100230.
69. Llana-Puy C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(5):449-55.
70. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001 Feb;85(2):162-9.
71. Alhaji M, Babos M. Physiology, Salivation. 2021 Jul 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022
72. Takahashi N. Oral Microbiome Metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing?". *J Dent Res*. 2015 Dec;94(12):1628-37.
73. Maddu, N. Functions of Saliva. In: Gokul, S. , editor. *Saliva and Salivary Diagnostics* [Internet]. London: IntechOpen; 2019 [cited 2022 Mar 12]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/66233> doi: 10.5772/intechopen.84709
74. Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*. 2009;22(4):241-8.



75. Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, Zhou XD. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci.* 2016;8(3):133-7.
76. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):781-91.
77. Agatonovic-Kustrin S, Morton DW, Smirnov V, Petukhov A, Gegechkori V, Kuzina V, et al. Analytical Strategies in Lipidomics for Discovery of Functional Biomarkers from Human Saliva. *Dis Markers.* 2019 Dec 4;2019:6741518.
78. Javaid MA, Ahmed AS, Durand R, Tran SD. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2016;6(1):66-75.
79. Pathiyil, V., Udayasankar, R. Salivary Diagnostics. In: Gokul, S., editor. *Saliva and Salivary Diagnostics* [Internet]. London: IntechOpen; 2019 [cited 2022 May 23]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/66416>
80. Maruyama Y, Nishimoto Y, Umezawa K, Kawamata R, Ichiba Y, Tsutsumi K, et al. Comparison of oral metabolome profiles of stimulated saliva, unstimulated saliva, and mouth-rinsed water. *Sci Rep.* 2022;12(1):689.
81. Jo, R. et al. Comparison of oral microbiome profiles in stimulated and unstimulated saliva, tongue, and mouth-rinsed water. *Sci. Rep.* 2019;9(1), 16124.
82. Washio J, Takahashi N. Metabolomic Studies of Oral Biofilm, Oral Cancer, and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6):870.
83. Rai V, Mukherjee R, Ghosh AK, Routray A, Chakraborty C. "Omics" in oral cancer: New approaches for biomarker discovery. *Arch Oral Biol.* 2018 Mar;87:15-34.
84. Nijakowski K, Gruszczyński D, Kopała D, Surdacka A. Salivary Metabolomics for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis: A Systematic Review. *Metabolites.* 2022;26;12(4):294.
85. Vitorio JG, Duarte-Andrade FF, Dos Santos Fontes Pereira T, Fonseca FP, Amorim LSD, Martins-Chaves RR, et al. Metabolic landscape of oral squamous cell carcinoma. *Metabolomics.* 2020;16(10):105.
86. Wei J, Xie G, Zhou Z, Shi P, Qiu Y, Zheng X, Chen T, Su M, Zhao A, Jia W. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *Int J Cancer.* 2011;129(9):2207-17.

87. Lohavanichbutr P, Zhang Y, Wang P, Gu H, Nagana Gowda GA, Djukovic D, et al. Salivary metabolite profiling distinguishes patients with oral cavity squamous cell carcinoma from normal controls. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204249.
88. Ishikawa S, Sugimoto M, Edamatsu K, Sugano A, Kitabatake K, Iino M. Discrimination of oral squamous cell carcinoma from oral lichen planus by salivary metabolomics. *Oral Dis*. 2020;26(1):35-42.
89. Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2014;427:79-85.
90. Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. *Sci Rep*. 2014;4:6802.
91. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*. 2010;6(1):78-95.
92. de Sá Alves M, de Sá Rodrigues N, Bandeira CM, Chagas JFS, Pascoal MBN, Nepomuceno GLJT, et al. Identification of Possible Salivary Metabolic Biomarkers and Altered Metabolic Pathways in South American Patients Diagnosed with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Metabolites*. 2021;11(10):650.
93. Bag S, Banerjee DR, Basak A, Das AK, Pal M, Banerjee R, et al. NMR (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) based signatures of abnormal choline metabolism in oral squamous cell carcinoma with no prominent Warburg effect. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;459(4):574-8.
94. Ishikawa S, Sugimoto M, Konta T, Kitabatake K, Ueda S, Edamatsu K, et al. Salivary Metabolomics for Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol*. 2022;11:789248.
95. Chen X, Yu D. Metabolomics study of oral cancers. *Metabolomics*. 2019 ;8;15(2):22.
96. Zhang Z, Yang J, Feng Q, Chen B, Li M, Liang C, et al. Compositional and Functional Analysis of the Microbiome in Tissue and Saliva of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front Microbiol*. 2019;10:1439.
97. Lim Y, Totsika M, Morrison M, Punyadeera C. Oral Microbiome: A New Biomarker Reservoir for Oral and Oropharyngeal Cancers. *Theranostics*. 2017;7(17):4313-21.

98. Belstrøm D, Holmstrup P, Bardow A, Kokaras A, Fiehn NE, Paster BJ. Temporal Stability of the Salivary Microbiota in Oral Health. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147472.
99. Nagy KN, Sonkodi I, Szöke I, Nagy E, Newman HN. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncol*. 1998;34(4):304-8.
100. Katz J, Onate MD, Pauley KM, Bhattacharyya I, Cha S. Presence of *Porphyromonas gingivalis* in gingival squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci*. 2011;3(4):209-15.
101. Zhang L, Liu Y, Zheng HJ, Zhang CP. The Oral Microbiota May Have Influence on Oral Cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;9:476.
102. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, et al. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med*. 2005;3:27.
103. Yang CY, Yeh YM, Yu HY, Chin CY, Hsu CW, Liu H, et al. Oral Microbiota Community Dynamics Associated With Oral Squamous Cell Carcinoma Staging. *Front Microbiol*. 2018;9:862.
104. Lim Y, Fukuma N, Totsika M, Kenny L, Morrison M, Punyadeera C. The Performance of an Oral Microbiome Biomarker Panel in Predicting Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:267.
105. Gopinath D, Kunnath Menon R, Chun Wie C, Banerjee M, Panda S, Mandal D, et al. Salivary bacterial shifts in oral leukoplakia resemble the dysbiotic oral cancer bacteriome. *J Oral Microbiol*. 2020;13(1):1857998.
106. Radaic A, Kapila YL. The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;19:1335-60.



Andrea Komšo rođena je 30. prosinca 1996. u Münchenu. Nakon završene osnovne škole upisuje Opću gimnaziju u Daruvaru koju završava 2015. godine. Iste godine upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.