

Određivanje koncentracije melatonina u slini oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine

Salarić, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:579962>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Ivan Salarić

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE
MELATONINA U SLINI OBOLJELIH OD
PLANOCELULARNOG KARCINOMA
USNE ŠUPLJINE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Ivan Salarić

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE
MELATONINA U SLINI OBOLJELIH OD
PLANOCELULARNOG KARCINOMA
USNE ŠUPLJINE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof.dr.sc. Darko Macan

Prof.dr.sc. Jasna Lovrić

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

School of Dental Medicine

Ivan Salarić

**SALIVARY MELATONIN
CONCENTRATION ASSESSMENT IN
PATIENTS WITH ORAL SQUAMOUS
CELL CARCINOMA**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:
Professor Darko Macan, PhD
Professor Jasna Lovrić, PhD

Zagreb, 2019.

Zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Darku Macanu i prof. dr. sc. Jasni Lovrić na ideji, neiscrpnim savjetima i nesebičnoj pomoći bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

Doc. dr. sc. Ivana Karmelić sudjelovala je u svakom dijelu istraživanja te bez njezine pomoći, savjeta i doprinosa ovaj doktorat ne bi bio na razini na kojoj je sada. Zahvaljujem i Rei Rösler koja je tijekom laboratorijskog dijela istraživanja bila moja desna ruka.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Kseniji Baždarić na statističkoj obradi podataka, brojnim savjetima i korisnim kritikama.

Zahvaljujem roditeljima, Majdi i Draganu te sestri Petri koji su me uvijek poticali na izvrsnost i bili moj oslonac.

Zahvaljujem svim sudionicima istraživanja, kolegama i suradnicima a posebno medicinskim sestrama s Klinike za kirurgiju lica, čeljusti i usta Kliničke bolnice Dubrava koji su uvijek s osmijehom i puno dobre volje u ranim jutarnjim satima pomagali prilikom uzorkovanja sline i krvi te u komunikaciji s pacijentima.

Ovaj rad posvećujem svojoj supruzi Dini koja je kroz ovo dinamično razdoblje imala neizmjereno strpljenje i razumijevanje.

Rad također posvećujem pokojnom djedu Pašku i baki Mariji te mojemu malom anđelu Noi koji je tijekom pisanja disertacije imao značajan doprinos u tipfelerima i brisanju brojnih dijelova ovoga rada.

Uzorkovanje slin i seruma izvedeno je u Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta KB Dubrava, Zagreb. Obrada i analiza uzoraka provedena je na Katedri za kemiju i biokemiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavoda za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je djelomično financirano sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (IP-09-2014-9376) i sredstvima potpore Sveučilišta u Zagrebu.

Lektorica hrvatskog jezika: Danica Crnobrnja, prof. i mag. knjižnič.

Lektorica engleskog jezika: Majda Bikić, prof. engleskog i talijanskog jezika

Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:

1. Doc.dr.sc. Davor Brajdić, Zavod za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
2. Prof.dr.sc. Jadranka Sertić, Katedra za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
3. Prof.dr.sc. Marinka Mravak Stipetić, Zavod za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
4. Prof.dr.sc. Mirjana Kujundžić-Tiljak, Katedra za statistiku i informatiku Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
5. Prof.dr.sc. Predrag Knežević, Katedra za maksilofacijalnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Datum obrane rada: _____

Rad sadrži: 164 stranice
 42 slike
 57 tablica
 1 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 su izvorni doprinos autora poslijediplomskog doktorskog 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 njihovog podrijetla.

Sažetak

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MELATONINA U SLINI OBOLJELIH OD PLANOCELULARNOG KARCINOMA USNE ŠUPLJINE

Melatonin (MLT) je lipofilna molekula koja se periodično tijekom dana sintetizira u epifizi. Dokazana je niska koncentracija serumskog MLT-a u pacijenata s karcinomom dojke, prostate, pluća, želuca i debelog crijeva. Jedno od objašnjenja je da navedeni bolesnici imaju dokazano smanjenu kvalitetu sna, povećani osjećaj malaksalosti i umora. Posljedično, manjak sna uzrokuje poremećaj u sintezi noćnog serumskog MLT-a a time i samog cirkadijalnog ritma MLT-a. U zadnjih nekoliko godina, liječenje karcinoma usne šupljine (KUŠ) daje sve bolje rezultate što se pripisuje razvoju kirurgije, radioterapije i kemoterapije. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), KUŠ je 8. najčešći karcinom u svijetu te unatoč napretku u liječenju, dugogodišnje preživljenje samo se neznatno poboljšalo s petogodišnjom stopom preživljavanja od 60 %.

Cilj ovoga istraživanja je izmjeriti koncentraciju salivarnog MLT-a i to u nestimuliranoj (NS) i stimuliranoj slini (SS), procijeniti kvalitetu sna (PSQI) i utjecaj kvalitete sna na koncentraciju MLT-a u pacijenata s KUŠ-em. Očekivano niže koncentracije MLT-a u pacijenata s KUŠ-em mogle bi opravdati eventualnu terapijsku primjenu egzogenog MLT-a.

Koncentracija MLT-a u NS-u značajno je viša ($P < 0,001$) u eksperimentalnoj skupini [medijan: 3,1 (95 % CI: 2,3 - 4,5)] u odnosu na kontrolnu skupinu [medijan: 0,7 (95 % CI: 0,44 - 1,52)]. Koncentracija MLT-a u SS-u značajno je viša ($P < 0,001$) u eksperimentalnoj skupini [medijan: 1,7 (95 % CI: 0,9 - 2,6)] u odnosu na kontrolnu skupinu [medijan: 0,6 (95 % CI: 0,1 - 1,0)]. Serumski MLT u pacijenata s KUŠ-em značajno je viši od referentnih vrijednosti zdravih osoba [median 13,01 (95 % CI: 10,08 - 15,14)].

Kvaliteta sna značajno je lošija u ispitanika s KUŠ-em ($P = 0,0001$, $U = 249,50$). Međutim, nije utvrđena veza između koncentracije MLT-a u slini i serumu te kvalitete sna.

Zaključno, MLT je mjerljiv u slini i serumu osoba s planocelularnim KUŠ-em. Koncentracija MLT u NS, SS i serumu je statistički značajno viša u pacijenata s KUŠ-em nego u kontrolnoj skupini. ROC analiza pokazala je osjetljivost MLT u NS kao biljega za KUŠ od 97,1 % te specifičnost od 57,6 % ($P < 0,0001$, $AUC = 0,841$). Prema dostupnoj literaturi, ovo je prvo istraživanje s MLT-om u ispitanika s KUŠ-em.

Ključne riječi: melatonin, karcinom usne šupljine, slina, žlijezde slinovnice, tumorski biljeg

SUMMARY

SALIVARY MELATONIN CONCENTRATION ASSESSMENT IN PATIENTS WITH ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Introduction:

Melatonin (MLT) is a lipophilic molecule, synthesized in the pineal gland in cyclic periods. It easily enters through the cell membrane by passive diffusion and it is possible to detect it in almost any body fluid. It is believed that MLT enters the saliva by passive diffusion from serum to the salivary glands.

Low levels of MLT have been registered in patients with breast cancer, prostate cancer, lung cancer, stomach and colon cancer. One of the possible explanations for this was decreased sleep quality and increased fatigue in cancer patients. Thereby, decreased sleep quality would result in the aberrant MLT synthesis during night-time and the overall MLT circadian rhythm.

In the last few years, there is a significant improvement in oral cancer (OC) treatment. This is due to the improvement of surgery, radiotherapy and chemotherapy. Nevertheless, a 5 year survival rate has just slightly improved and amounts to 60%. By the information provided by the World Health Organization (WHO), OC is the 8th most common cancer in the world.

Aim:

The aim of this research is to measure MLT in unstimulated whole saliva (UWS), stimulated whole saliva (SWS) and serum. Furthermore, the aim is to assess the sleep quality using the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), oral health and inflammation status using the Papillary Bleeding Index (PBI) and the correlation of the two with the levels of MLT in saliva and serum. The expected lower levels of MLT in serum and saliva could justify the therapeutic implications of MLT in OC patients.

Patients and methods:

Only patients with histologically identified oral squamous cell carcinoma were included in this study. Furthermore, only patients with T1N0M0 and T2N0M0 cancers, according to the TNM staging, were included in this study. Altogether, 34 patients with OC and 33 sex

and age matched patients were included in this study. Saliva and serum was sampled between 7 and 9 a.m. Saliva was sampled using a specially designed saliva collecting apparatus. Saliva stimulation was performed by chewing paraffin blocks. All participants had to meet certain criteria to be included in this study. Detailed medical history was taken before sampling that included the existence of systemic diseases, drug consumption and sleep quality measured by Pittsburgh Sleep Quality Index questionnaire. After sampling, PBI index was used to assess the oral health inflammation status. All samples were tested using ELISA commercially available kits.

Results:

The respondents were correctly matched for variables sex and age. Melatonin levels in UWS were significantly higher ($P<0.001$) in the OC group [median: 3.1 (95% CI: 2.3-4.5)] compared to the control group [median: 0.7 (95% CI: 0.44-1.52)]. Melatonin levels in the SWS were significantly higher ($P<0.001$) in the experimental group [median: 1.7 (95% CI: 0.9-2.6)] compared to the control group [median: 0.6 (95% CI: 0.1-1.0)].

Serum MLT levels were significantly higher in patients with OC compared to the reference values for serum MLT [median 13,01 (95% CI: 10,08 - 15,14)].

Sleep quality was significantly lower in patients with OC ($P = 0.0001$, $U=249.50$), however, due to the higher levels of MLT in serum and saliva, correlation between the PSQI and MLT levels was not established.

Using the ROC analysis, MLT showed a sensitivity of 97.1% and specificity of 57.6% as a marker for OC ($P<0.0001$, $AUC = 0.841$). A OC predictive model was introduced.

Conclusion:

Melatonin can be measured in saliva and serum in OC patients. Salivary and serum MLT could present a potential tumour marker for OC. Elevated levels of MLT in serum and saliva could indicate a expression disorder of MLT receptors in OC. To our knowledge, this is the first study measuring MLT in OC patients.

Keywords: melatonin, oral cancer, saliva, salivary glands, tumour marker

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA USNE ŠUPLJINE	1
1.2. ANATOMSKE LOKALIZACIJE KARCINOMA USNE ŠUPLJINE.....	2
1.3. ŠTETNE NAVIKE I RIZIČNI ČIMBENICI ZA NASTANAK KARCINOMA USNE ŠUPLJINE.....	5
1.3.1. Konzumacija alkohola	5
1.3.2. Duhan.....	6
1.3.3. Sinergističko djelovanje alkohola i duhana	7
1.4. KANCEROGENEZA I EPIGENETIKA KARCINOMA USNE ŠUPLJINE	8
1.5. POTENCIJALNO MALIGNI ORALNI POREMEĆAJI.....	11
1.5.1. Leukoplakija.....	11
1.5.2. Eritroplakija.....	13
1.5.3. Oralna submukozna fibroza	14
1.5.4. Oralni lihen.....	14
1.6. MELATONIN	15
1.7. SASTAV SLINE I SALIVARNA DIJAGNOSTIKA.....	21
1.7.1. Sastav sline.....	21
1.7.2. Salivarna dijagnostika	24
1.7.3. Metode uzorkovanja sline	27
1.8. MELATONIN I KARCINOM USNE ŠUPLJINE	28
2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	31
3. ISPITANICI I METODE	32
3.1. ISPITANICI	32
3.1.1. Veličina uzorka	33
3.1.2. Indeksi i anamneza.....	33
3.2. MATERIJALI.....	34
3.3. METODE	35
3.3.1. Uzorkovanje sline i seruma.....	35
3.3.2. ELISA analiza	36

3. 4. ETIČNOST ISTRAŽIVANJA I SUKOB INTERESA	44
3. 5. STATISTIČKA ANALIZA.....	44
4. REZULTATI.....	46
4.1. DIZAJN ELISA TESTOVA, DOBIVENE APSORBANCIJE I KONCENTRACIJE MELATONINA U SLINI	46
4.2. DIZAJN ELISA TESTOVA, DOBIVENE APSORBANCIJE I KONCENTRACIJE MELATONINA U SERUMU	70
4.3. OPIS SUDIONIKA ISTRAŽIVANJA	75
4.4. RAZLIKA U KONCENTRACIJAMA MELATONINA U STIMULIRANOJ I NESTIMULIRANOJ SLINI	78
4.4.1. Melatonin u nestimuliranoj slini	78
4.4.2. Melatonin u stimuliranoj slini	82
4.5. MELATONIN U SERUMU	85
4.5.1. Ukupni proteini u serumu ispitanika s karcinomom usne šupljine	86
4.5.2. Albumini u serumu ispitanika s karcinomom usne šupljine	88
4.6. ŠTETNE NAVIKE	91
4.6.1. Konzumacija alkohola	91
4.6.2. Konzumacija duhana.....	92
4.7. KVALITETA SPAVANJA	93
4.8. PAPILLARY BLEEDING INDEX.....	94
4.9. RAZLOG DOLASKA ISPITANIKA	95
4.10. SUSTAVNE BOLESTI I UZIMANJE LIJEKOVA	96
4.11. RAZLIKE U KONCENTRACIJAMA MELATONINA S OBZIROM NA UZIMANJE LIJEKOVA.....	99
4.11.1. Nestimulirana slina	99
4.11.1. Stimulirana slina	104
4.12. USPOREDBA KONCENTRACIJA MELATONINA U SLINI I SERUMU	108
4.13. ROC ANALIZA	110
4.14. PREDIKTIVNI MODEL ZA KARCINOM USNE ŠUPLJINE	111
5. RASPRAVA.....	117

6.	ZAKLJUČCI	138
7.	LITERATURA	139
8.	PRILOZI	156
9.	ŽIVOTOPIS	160

POPIS KRATICA:

5-HT	serotonin (5-hidroksitriptamin)
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ATC	engl. <i>Anatomical Therapeutic Chemical Classification System</i>
AUC	engl. <i>Area under ROC curve</i>
BP	engl. <i>Bullous pemphigoid antigen</i>
Ca	kalcij
CA125	engl. <i>cancer antigen 125</i>
CA15-3	engl. <i>cancer antigen 15-3</i>
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
CEA	engl. <i>carcinoembryonic antigen</i>
c-erbB2	engl. <i>Humanized epidermal growth factor receptor 2</i>
CI	engl. <i>Confidence interval</i>
COX	enzim ciklooksigenaza
DAPK	engl. <i>death-associated protein kinase</i>
DMBT1	engl. <i>Deleted in malignant brain tumors 1 protein</i>
DNA	deoksiribonukleinska kiselina

EBV	Epstein Barr virus
EGF	engl. <i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	engl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ER α	estrogen receptor α
FGF	engl. <i>Fibroblast growth factor</i>
GABA	γ -aminomaslačna kiseline
GPCR	receptor na koji su vezani G-proteini; (engl. <i>G-protein coupled receptors</i>)
HIF-1 α	engl. <i>Hypoxiainducible factor-1α</i>
HIV	virus humane imunodeficijencije
HPV	humani papilloma virus
HR	engl. <i>Hazard Ratio</i>
IAP	engl. <i>immunosuppressive acidic protein</i>
ICD-10	engl. <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IGF-1	engl. <i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL	interleukin
IQR	interkvartilni raspon
K	kalij

KNG1	kininogen 1
KUŠ	karcinom usne šupljine
LC-MS	engl. <i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>
MGMT	O6-metilguanin-DNA-metiltransferaza
MLT	melatonin
MMP1	engl. matrix metalloproteinase 1
NNN	N-nitrosornikotin
NS	nestimulirana slina
NSAR	nesteroidni antireumatici
OR	engl. <i>odds ratio</i>
P	statistička značajnost
PABA	para-aminobenzojeva kiselina
PBI	engl. <i>Papillary Bleeding Index</i>
PCC	planocelularni karcinom
PDGF	engl. <i>Platelet-derived growth factor</i>
PG	prostaglandin
pH – vrijednost	broj koji služi kao mjera kiselosti odnosno bazičnosti tvari/otopina

PMOP	potencijalno maligni oralni poremećaji
PSA	engl. <i>prostate-specific antigen</i>
PSQI	engl. <i>Pittsburgh Sleep Quality Index</i>
PVN	paraventrikularni nukleus
QR2	kvinon reduktaza 2
RNA	ribonukleinska kiselina
SCCA	engl. <i>squamous cell carcinoma antigen</i>
SCN	suprahijazmatski nukleus
SIL	engl. <i>Ljubljana classification of Squamous Intraepithelial Lesions</i> indeks
SIN	engl. <i>Squamous Intraepithelial Neoplasia</i> indeks
SS	stimulirana slina
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TCGA	engl. <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEM	transmisijski elektronski mikroskop
TMB	3,3',5,5'-tetrametil-benzidin
TNF- α	čimbenik tumorske nekroze α
VEGF	engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor-α</i>

1. UVOD

Godišnje se otkrije više od pola milijuna karcinoma glave i vrata, dok preko 325 000 osoba od istih umre (1). Većinu karcinoma glave i vrata čine planocelularni karcinomi (PCC). Najčešći karcinom glave i vrata je planocelularni karcinom usne šupljine (KUŠ) koji čini gotovo 55 % svih karcinoma glave i vrata (1,2). KUŠ se u tekstu odnosi na planocelularni KUŠ.

1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA USNE ŠUPLJINE

U zadnjih nekoliko godina, liječenje KUŠ-a daje sve bolje rezultate što se pripisuje razvoju kirurgije, radioterapije i kemoterapije. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), KUŠ je 8. najčešći karcinom u svijetu te unatoč napretku u liječenju, dugogodišnje preživljavanje samo se neznatno poboljšalo s petogodišnjom stopom preživljavanja od 60 % (3,4). Prema SZO-u, u zapadnim zemljama KUŠ u muškoj populaciji 6. najčešći karcinom nakon karcinoma pluća, prostate, koluma i rektuma, želuca i mokraćnog mjehura, dok je u ženskoj populaciji na 10. mjestu, nakon karcinoma dojke, pluća, želuca, maternice, vrata maternice, jajnika, mokraćnog mjehura, jetre i kolorektalnog karcinoma, (5). U svijetu se godišnje dijagnosticira više od 300 000 novih slučajeva KUŠ-a (4), dok se u Europskoj uniji otkrije otprilike 40 000 novih slučajeva (6). KUŠ se uglavnom javlja u srednjoj i starijoj dobi a sveukupna incidencija i mortalitet su u porastu. Bonifazi i suradnici (sur.) pokazali su u svojoj analizi kohorti kako se KUŠ u 98 % slučajeva javlja u osoba starijih od 40 godina (7).

Incidencija i mortalitet iznose 6,6/100000 i 3,1/100000 za muškarce te 2,9/100000 i 1,4/100000 za žene (5). Na početku 20. stoljeća omjer incidencije između muškaraca i žena iznosio je 9:1 (8). Danas se taj omjer kreće oko 2:1, a objašnjava se promjenom načina života žena (8). Autori epidemioloških istraživanja smatraju da će ova razlika kroz nekoliko godina nestati što dodatno govori u prilog poveznici između određenih štetnih navika i KUŠ-a (9–11).

Oko 70 % bolesnika javlja se liječniku tek kada se pojave jaki bolovi, otežano gutanje, oteklina vrata i estetski defekt koji su znakovi već uznapredovale bolesti (12). Naravno, liječenje je uspješnije i morbiditet najmanji mogući kada se KUŠ otkrije u ranoj fazi. Također, KUŠ u uznapredovaloj fazi financijski značajno opterećuje zdravstveni sustav. Brojne organizacije u svijetu su u prošlom stoljeću, s ciljem uspješnijeg liječenja, veće stope preživljavanja i manjeg

morbiditeta, provodile „screening“ KUŠ-a (10,13). Nažalost, „screeninzi“ se nisu pokazali efikasnim i isplativim iz više razloga: nisu bili ciljani, tj. nisu se ciljale rizične skupine (u većini zemalja pacijenti s KUŠ-em su nižeg socio-ekonomskog statusa), incidencija KUŠ-a geografski fluktuirala jer se na pregledu javljao veliki broj zdravih osoba (14).

Rutinski „screening“ za karcinom usne šupljine ne preporučuju US Preventive Services Task Force, The American Academy of Family Physicians i Canadian Task Force on Preventive Health Care i naglašavaju kako dosadašnja literatura nije uspjela dokazati efikasnost „screeninga“ za KUŠ, ali opravdavaju potencijalnu efikasnost ciljanog „screeninga“ (10,13,14). U vlastitom istraživanju smo na malom broju ispitanika pokazali potencijalnu dobrobit ciljanog „screeninga“ rizičnih skupina za nastanak KUŠ-a pacijenata s alkoholnom cirozom jetre i karcinomom pluća (12).

Dijagnostika KUŠ-a danas se još uvijek oslanja na inspekciju i palpaciju, a nakon toga na patohistološku dijagnostiku. Nažalost, karcinom se često otkrije kada već postoji metastatska bolest. U literaturi su se opisivali razni potencijalni biljezi za svaki stadij KUŠ-a s većim naglaskom na ranu fazu kancerogeneze. To se najčešće izvodi proučavanjem promjena DNA kod potencijalno zloćudnih oralnih poremećaja (15).

Provedena su brojna istraživanja o povezanosti onkogeni (npr. C-myc, C-Fos i dr.), protoonkogeni (npr. p53, p16 i dr.), citokini (npr. TGF-1 β , IL-8 i dr.), čimbenici rasta (EGF, VEGF i dr.), metaloproteinaze (npr. MMP1, MMP2 i dr.), citokeratina (CK 13,14 i dr.), biljega hipoksije (CA-9 i dr.), CYFRA 21-1, mikro RNA, hipermetilacije p16 i DAP-K, epitelnih mezenhimalnih biljega (E-kadherin i N-kadherin i dr.) i KUŠ-a u fazama inicijacije, invazije, recidiviranja i metastaziranja te nakon kirurškog liječenja (16).

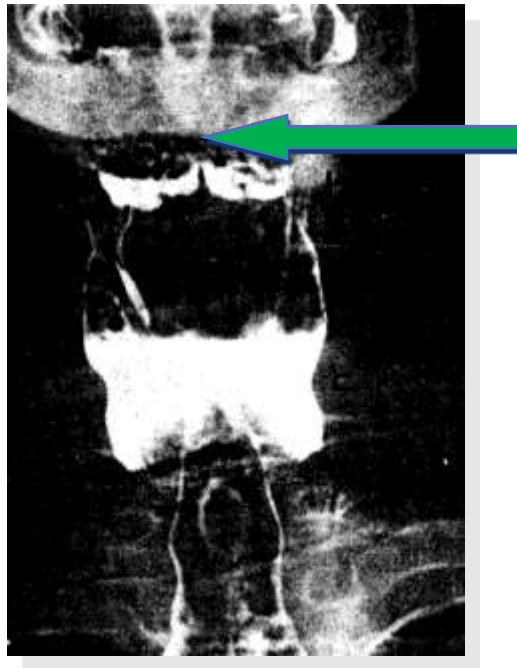
Nažalost, do danas ne postoji biljeg za KUŠ zadovoljavajuće osjetljivosti i specifičnosti.

1.2. ANATOMSKE LOKALIZACIJE KARCINOMA USNE ŠUPLJINE

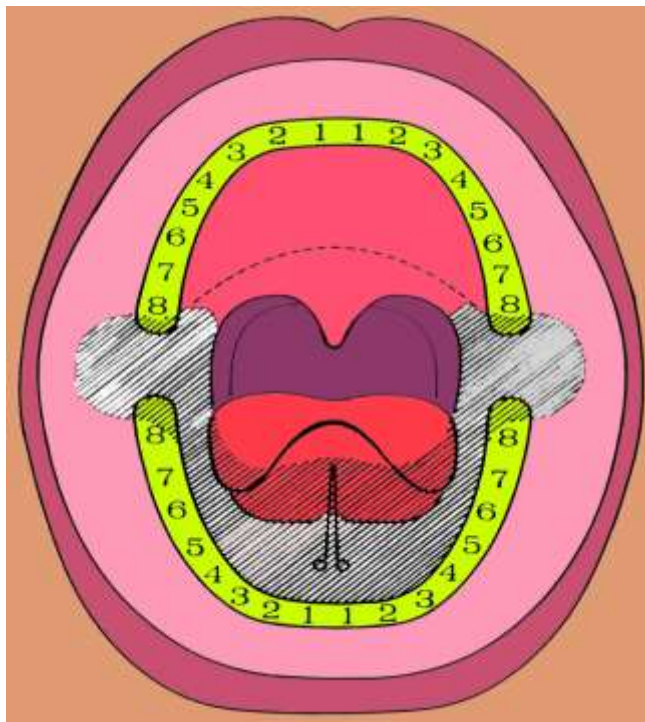
KUŠ se može pojaviti na bilo kojoj lokalizaciji u usnoj šupljini. U 70-im godinama prošlog stoljeća, Lederman je primijetio kako većina karcinoma gornjeg aerodigestivnog trakta najčešće nastaje na specifičnim lokalizacijama u tzv. rezervoar-sustavima, piriformnim udubinama, valekulama i na dnu usne šupljine (Slika (Sl.) 1) (17,18).

Moore i Catlin 1967. godine razvijaju teoriju o zoni povećanog rizika na temelju epidemioloških istraživanja KUŠ-a. Primjećuju kako se 75 % KUŠ-a u zapadnim zemljama

javlja na 20 % površine usne šupljine oblika potkove koju čine dno usne šupljine, ventralna i lateralne površine jezika te retromolarna regija (Sl. 2) (19). Smatra se da su najčešće zahvaćene anatomske lokalizacije usne šupljine KUŠ-em slabije keratinizirane i stoga sklonije displaziji (20). Nasuprot tome, lokalizacije s nešto manjim rizikom za nastanak KUŠ-a su tvrdo nepce i dorzum jezika.



Slika 1. Prikaz Ledermanovih rezervoar sustava: piriformne udubine, valekule i dno usne šupljine (obilježeno strelicom). Preuzeto iz (17).



Slika 2. Prikaz „potkove“ Moore i Catlina. Preuzeto iz (19).

Macan i sur. potvrdili su zapažanja Ledermana i pokazali kako ove lokalizacije predstavljaju rezervoar u kojemu se zadržavaju kancerogeni otopljeni u slini. Pokazali su kako su kod alkoholičara ove regije izložene kancerogenima i do 24 sata nakon konzumacije alkohola. Naime, alkohol se prilikom konzumacije prvo zadržava u usnoj šupljini a naknadno se nusprodukti izlučuju kroz slinu i zadržavaju u rezervoaru (21).

Kao što je već spomenuto, postoje zemljopisne varijacije vezane uz incidenciju KUŠ-a ali i zahvaćenost određenih lokalizacija u usnoj šupljini. Tako je spomenuto područje „potkove“ češće u zapadnim zemljama gdje dominira konzumacija alkohola i pušenje duhana, dok su na istoku zbog veće uloge betelovog oraha i obrnutog pušenja (engl. *reverse-smoking*), češće zahvaćeni jezik i obraz (20,22,23).

Konzumacija alkohola i pušenje duhana već su dugo poznate rizične navike za razvoj KUŠ-a. Zanimljivo je da, bez obzira što postoje brojne studije o povezanosti rizičnih čimbenika i navika s KUŠ-em te prikaza frekvencije KUŠ-a po lokalizacijama, prema dostupnoj literaturi, ne postoje istraživanja na zadovoljavajućem uzorku o utjecaju određene štetne navike ili više njih na pojavnost na određenoj lokalizaciji usne šupljine. Najbliži su bili Jovanović i sur. koji su utvrdili veću povezanost pušenja duhana s KUŠ-em retromolarnog područja i dna usne šupljine nego s KUŠ-em obraza i jezika (24).

Pored spomenutih, rizične navike za KUŠ su žvakanje betelovog oraha, snifanje burmuta i obrnuto pušenje. Navika žvakanja betelovog oraha je u porastu te se pored Azije, sve češće uživa i u Europi. Multicentrično istraživanje koje su u Kini proveli Lee i sur. pokazalo je kako žvakanje betelovog oraha predstavlja četiri puta veći rizik za nastanak KUŠ-a nego konzumacija alkohola (2). Treba napomenuti da u usporedbi sa stanovnicima Europe ili SAD-a, Kinezi konzumiraju manje alkohola.

Utjecaj svakako imaju prehrana i stres. Međutim, isti se ne smatraju nezavisnim rizičnim čimbenicima već doprinosećim čimbenicima. Poznat je protektivni učinak voća i povrća ali i štetni učinak hrane koja sadrži nitrite i nitrozamine, kao što su dimljena riba, meso i ukiseljeno povrće te njihov povoljni utjecaj na nastanak karcinoma (9,25–30). Čest slučaj kod alkoholičara je prehrana manjkava voćem i povrćem, a pretjerana konzumacija alkohola usporava apsorpciju hranjivih tvari iz probave (11).

Smatra se da infekcija humanim papilloma virusom (HPV), najčešće preko oralnog ili genitalnog kontakta, može imati ulogu u nastanku KUŠ-a. Međutim, taj utjecaj značajno je manji od onoga u nastanku orofaringealnog karcinoma. Koliko je važan utjecaj HPV infekcije u orofaringealnom karcinomu govori i najnovija TNM-ova klasifikacija orofaringealnog karcinoma American Joint Committee on Cancer (AJCC) u kojoj postoji podjela na p16 pozitivni i p16 negativni orofaringealni karcinom (31).

Schimansky i sur., u velikoj kohortnoj studiji o osobama s karcinomom glave i vrata (N=2272) na području Ujedinjenog Kraljevstva, navode komorbiditet kao nezavisni prognostički čimbenik kod karcinoma glave i vrata (32). Komorbiditet je određivan pomoću Adult Comorbidity Evaluation 27 (ACE 27) instrumenta te su autori uspjeli statistički ograditi „confoundere“, tj. zbunjujuće čimbenike kao što su konzumacija alkohola, pušenje duhana i socio-ekonomski status.

1.3. ŠTETNE NAVIKE I RIZIČNI ČIMBENICI ZA NASTANAK KARCINOMA USNE ŠUPLJINE

1. 3. 1. Konzumacija alkohola

Rizik za nastanak KUŠ-a, povezan s konzumacijom alkohola, sličan je u većini istraživanja bez obzira na geografsko područje i način konzumiranja (11,33,34). Alkohol djeluje lokalno na sluznicu usne šupljine i sustavno kancerogeno. Alkohol sam po sebi nije kancerogen, međutim,

acetaldehid, nitrozamini, superoksid i njegovi ostali metabolički nusproizvodi, jesu. Alkohol također može djelovati kao vehikulum ili otapalo za druge kancerogene tvari. Alkohol-dehidrogenaza, manjim dijelom i citokrom P450, metaboliziraju alkohol u acetaldehid, a acetaldehid-dehidrogenaza metabolizira acetaldehid u octenu kiselinu. Učinak acetaldehid-dehidrogenaze je sporiji od alkohol-dehidrogenaze, stoga se u alkoholičara acetaldehid sporije razgrađuje i dulje zadržava u organizmu. Acetaldehid dokazano uzrokuje točkaste mutacije stanica, hipermetilaciju DNA i aberacije kromosoma (20,33,35).

Opće je poznato da alkoholičari imaju viskoznu slinu kako zbog dehidracije, tako i zbog oštećenja parenhima žlijezda slinovnica acetaldehidom. Kod alkoholičara dolazi i do masne transformacije žlijezda slinovnica što dodatno pridonosi viskoznosti sline. Osim slabijeg ovlaživanja, promijenjenog sastava sline i slabijeg čišćenja, kod alkoholičara dolazi i do duljeg zadržavanja kancerogena u samoj slini.

Malnutricija i oslabljen imunološki odgovor često su povezani s alkoholizmom. S manjkom folne kiseline, određenih vitamina i minerala te oslabljenim nutritivnim statusom omogućen je još izraženiji kancerogeni učinak acetaldhida (36). Alkoholizam oslabljuje specifični i nespecifični imunosni odgovor organizma te usporava jetrenu funkciju uklanjanja/metaboliziranja drugih kancerogena (5,37).

Lokalno, alkohol povećava permeabilnost sluznice što omogućuje drugim štetnim tvarima i kancerogenima prolazak kroz sluznicu usne šupljine (38). Prema različitim istraživanjima, alkoholičari imaju 3 – 6 puta veći rizik za nastanak KUŠ-a (36–38).

1. 3. 2. Duhan

Duhan je već godinama poznat kao rizični čimbenik kako za brojne bolesti, tako i za KUŠ. Konzumacija duhana, kao i alkohola, predstavlja nezavisni čimbenik za razvoj KUŠ-a. U dimu cigareta nađeno je više od 300 karcinogena: nitrozamini, aromatski amini, policiklički aromatski ugljikovodici. U literaturi se najčešće spominju N-nitrosonornikotin (NNN), nitrosopirolidin, nitrosodimetilamin i 4-(metilnitrozamino)-1-(-3-piridil)-1-butanon (39). Glavni mehanizam učinka navedenih molekula je ometanje replikacije DNA.

Ovisno o načinu konzumacije, duhan ima različit utjecaj u kancerogenezi KUŠ-a. Na zapadu se duhan najčešće puši, međutim, sve češća je incidencija submukozne fibroze i KUŠ-a nastalih žvakanjem betela u Ujedinjenom Kraljevstvu (UK) i Grčkoj (40,41). Razlog ovome jest najvjerojatnije sve veća imigracija stanovništva s drukčijim navikama konzumiranja štetnih

tvari.

U Indiji je često uživanje bezdimnog duhana, bilo žvakanjem ili zadržavanjem istoga u usnoj šupljini. Postoji mnogo načina pripreme bezdimnog duhana, a osnovni sastojci su betelov list, areca orah i gašeno vapno. Mogu se dodati mentol, pepeo, natrijev bikarbonat (toombak), popularan u Sudanu (42) i eterična ulja. Gašeno vapno spušta vrijednost pH i poboljšava resorpciju alkaloida iz duhana i betela (39).

U nekim zemljama na istoku duhan se i šmrče, a nerijetka je navika obrnutog pušenja gdje je žar cigarete unutar usne šupljine (39). Osim navedenih načina konzumiranja duhana, iste osobe najčešće i puše duhan.

Pušenje cigareta najčešći je način konzumacije duhana te su brojna istraživanja pokazala zastupljenost pušača veću od 80 % među bolesnicima s KUŠ-em (6,9,24,43). Osobe koje puše i ne konzumiraju alkohol, ovisno o količini popušanih cigareta dnevno, imaju do pet puta veći rizik za nastanak KUŠ-a od zdravih osoba.

Rizik od KUŠ-a postupno opada s prestankom pušenja. Međutim, zanimljiv je rezultat Winna i sur. koji govori da je potrebno više od 10 godina kako bi se rizik za nastanak KUŠ-a spustio na onaj od zdravih osoba (44).

1. 3. 3. Sinergističko djelovanje alkohola i duhana

Alkohol i pušenje duhana smatraju se odgovornima za otprilike 51 % karcinoma glave i vrata u SAD-u, 84 % u Europi te 83 % u Južnoj Americi. U Indiji se korištenje bezdimnog duhana smatra odgovornim za 52,5 % KUŠ-a u muškaraca i 52,6 % KUŠ-a u žena (2). Sinergistički utjecaj alkohola i pušenja smatra se značajnijim nego zbroj individualnog utjecaja ovih pojedinačnih rizičnih čimbenika (45).

Pušenje povećava opterećenje acetaldehidom nakon konzumacije alkohola dok alkohol povećava aktivnost pro-kancerogena prisutnih u duhanu i lokalnu permeabilnost sluznice usne šupljine omogućavajući time lakše direktno stanično oštećenje (33).

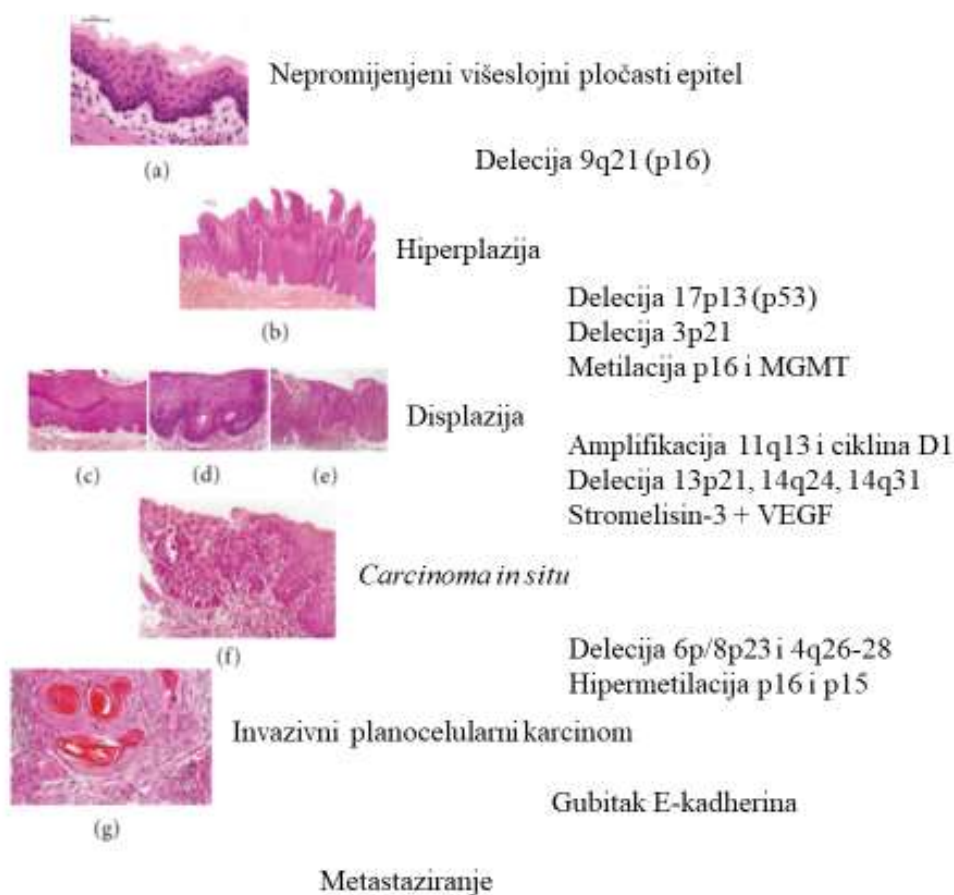
Kremer i sur. istraživali su penetraciju NNN otopljenog u različitim koncentracijama alkohola (5 - 50 %) kao vehikulumu, kroz sluznicu usne šupljine na raznim lokalizacijama u usnoj šupljini (dno usne šupljine, gingiva i obraz). Primijetili su da je najveća permeabilnost bila na dnu usne šupljine pod učinkom 15 % alkohola (38).

Alkohol smanjuje sposobnost jetre za detoksifikaciju i time izlaže organizam kancerogenima iz duhana. Kao što je već spomenuto, pretjerana konzumacija alkohola uzrokuje malapsorpciju iz

crijeva potencijalno uzrokujući malnutriciju, a u kasnijoj fazi i imunokompromitiranost (46).

1.4. KANCEROGENEZA I EPIGENETIKA KARCINOMA USNE ŠUPLJINE

Kancerogeneza svakog zloćudnog tumora izuzetno je složeni proces pa tako i kancerogeneza KUŠ-a. Progresija tumora u epitelu klasificira se kao normalna, hiperplastična (bez displazije), s displazijom – *carcinoma in situ* te kao invazivni karcinom (Sl. 3). Biologija inicijacije i progresije KUŠ-a do današnjeg dana nije posve jasna.



Slika 3. Prikaz pojedinih genetskih alteracija u kancerogenezi KUŠ-a. Preuzeto iz (47).

* MGMT - O6-metilguanin-DNA-metiltransferaza, VEGF – engl. *Vascular endothelial growth factor*

Obzirom na složenost procesa koji se odvijaju u KUŠ-u, proučavanje i znanstvene spoznaje o

biologiji ovoga karcinoma dobivene su na životinjskim modelima analiziranim patohistološki te biokemijskim i genetskim tehnikama. Veliki broj molekula ima mogućnost genetski oštetiti kromosome i inducirati malignu transformaciju. To se odnosi na kemijske i fizičke kancerogene, onkogene viruse i neke mikroorganizme (4,48,49).

Prve promjene na molekularnoj razini u procesu kancerogeneze su genetske alteracije koje se ne mogu patohistološki otkriti. S vremenom dolazi do akumulacije ovih molekularnih promjena uzrokujući stanične promjene koje su tada patohistološki „vidljive“. Tek kada dođe do izrazitog staničnog oštećenja, promjena je makroskopski vidljiva.

Kemijski kancerogeni, kao što su nusproizvodi konzumacije alkohola i duhana, sudjeluju u kancerogenezi u inicijaciji, promociji i progresiji KUŠ-a. Inicijacija je faza u kojoj dolazi do izlaganja inicirane stanice s kancerogenom (inicijatorom) u dovoljno jakoj dozi. U ovoj fazi dolazi do trajnog oštećenja DNA, tj. pojave mutacija (50,51).

U fazi promocije, djelovanjem promotora, dolazi do induciranja tumora u iniciranim stanicama. Promotori nisu sami po sebi kancerogeni i mogu imati učinak na iniciranu stanicu mjesecima nakon inicijacije. U ranoj su fazi promjene reverzibilne, za razliku od inicijatora (kancerogena). Promotori mogu uzrokovati proliferaciju stanica ili pridonijeti razvoju mutacija i staničnog oštećenja (4). Ukoliko proliferacija stanica potraje, dolazi do novih genetskih alteracija i nastanka onkogeni koji tada omogućuju stanici autonomni rast. Krajnji rezultat progresije je nastanak invazivnog karcinoma (4).

Epigenetika je termin koji opisuje sve potencijalne modifikacije u genskoj ekspresiji koje nisu kodirane u DNA. Najčešći primjeri epigenetičke kontrole ekspresije gena su DNA metilacija, modifikacija histona i regulacija s nekodirajućim RNA (52). Navedene promjene predstavljaju nasljedne modifikacije DNA ekspresije koje se manifestiraju bez direktnog fizičkog utjecaja na DNA.

Najviše istraživana epigenetska promjena je promjena DNA metilacije (53). Hipermetilacija DNA se, u podlozi nastanka zloćudnih tumora, najčešće odvija na mjestima tumor supresorskih gena, što rezultira nepravilnom genskom ekspresijom i malignom transformacijom. Navedeno je čest događaj u kancerogenezi KUŠ-a te potencijalni biljeg za KUŠ. Shaw i sur. (54) te Worsham i sur. (55) proučavali su metilaciju često uključenih gena u kancerogenezi i dobili sljedeću frekvenciju: MGMT-a (O6-metilguanin-DNA-metiltransferaza) 7 – 68 %, DAPK (engl. death-associated protein kinase) 18 – 75,3 %, p16: 17 – 76 % i ECAD (sinonimi CDH1; E-cadherin) 27 – 91 %.

Dvojakovska i sur. također su identificirali ECAD, MGMT, DAPK i p16 kao najčešće gene

zahvaćene metilacijom u KUŠ-u (53). Kod zdravih ispitanika nije bilo metilacije gena dok se ECAD gen pokazao najosjetljivijim za dijagnostiku KUŠ-a (90 %, sa 100 %-tnom specifičnošću). MGMT je imao nešto slabiju osjetljivost (75 %) ali riječ je o specifičnom genu za KUŠ. Isti su autori predložili ECAD i MGMT kao potencijalne neinvazivne biljege za KUŠ. Delecije sekvenci DNA, amplifikacije i mutacije predstavljaju ireverzibilne genetske promjene. Kancerizacija polja za KUŠ prvi put je predstavljena od strane Slaughtera i sur. 1953. godine (56). Navedeni efekt opisali su kao prekondicioniranje epitela kancerogenom/ima što omogućava proliferaciju KUŠ-a iz epitela. Mehanizmi kancerizacije polja do danas su nejasni. Poznato je da nusproizvodi alkohola i pušenja duhana uzrokuju anaplastičnu transformaciju koja uključuje „polje“, tj. veća područja usne šupljine, a ne ciljano stanicu (57). Ovime se objašnjava pojavnost novog primarnog KUŠ-a u drugoj regiji usne šupljine nakon odstranjivanja KUŠ-a sa zdravim rubovima. Multifokalna ekspresija tumora, mutacije ekspresije tumor supresorskih gena, promjene u popravku i procesu apoptoze DNA (npr. p53) vjerojatno su posljedica dugotrajne i ponavljane izloženosti egzogenim štetnim čimbenicima (47). Mutacijske adaptacije koje modificiraju postojanost određenog klona transformirane stanice mogu dodatno povećati otpornost na liječenje KUŠ-a (47). Genetske analize KUŠ-a pokazale su postojanje istog inicijalnog klona u podlozi novog primarnog KUŠ-a na drugoj lokalizaciji usne šupljine (58).

Kancerizacija polja opisana je i za druge karcinome: jednjaka, debelog crijeva, mokraćovoda, kože, dojke, cerviksa maternice i dišnih puteva (52).

Kod KUŠ-a su najčešće mutacije gena na kromosomima 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 17 i 19 (47). U veoma malom broju slučajeva, dokumentirana je i nasljedna komponenta KUŠ-a objašnjena polimorfnom varijacijom gena CYP1A1 te gena koji kodiraju glutation-S-transferazu-M1 i N-acetiltransferazu-2 (47,59,60). Smatra se da su osobe koje nose brzo-metabolizirajući alkohol-dehidrogenazu tip 3 (ADH3) alel dodatno osjetljive na štetni učinak alkohola te se smatraju osobama većeg rizika za nastanak KUŠ-a (47,61,62).

Analiza mikronukleusa eksfoliranih stanica bukalne sluznice zamišljena je kao metoda za rano detektiranje kromosomskih aberacija. Mikronukleusi su se koristili za evaluaciju displazije u leukoplakijama ali i rezultata terapije retinoidima i vitaminom E (63,64). Od ostalih metoda za ranu dijagnostiku KUŠ-a vrijedi spomenuti detektiranje aneuploidije te procjenu promjena somatskih i spolnih kromosoma.

1.5. POTENCIJALNO MALIGNI ORALNI POREMEĆAJI

Svjetska zdravstvena organizacija 2005. godine predlaže napuštanje tradicionalne distinkcije (SZO 1978.) između potencijalno malignih lezija i stanja te predlaže objedinjujući termin potencijalno maligni oralni poremećaji (PMOP) (40,65). Napuštaju se termini „*precancer*, *premalignant*, *preneoplastic*, *carcinoma prone*, *epithelial precursor*, *intra-epithelial neoplasia*, *intra-epithelial carcinoma*” i preporuča naziv PMOP. Obzirom na relativno veliki broj PMOP-ova, opisat će se oni najčešći i najozbiljniji, leukoplakija, eritroplakija, oralna submukozna fibroza i oralni lihen planus. Pored navedenih, najčešćih, ovdje se ubrajaju i aktinički heilitis, xeroderma pigmentosum, Fanconijeva anemija, diskoidni eritematozni lupus, ataxia teleangiectasia, Bloom sindrom, Li Fraumeni sindrom, Plummer Vinsonov sindrom, imunodeficijencije, sideropenična disfagija i dr.

1.5.1. Leukoplakija

Definicija leukoplakije je klinička: „Bijeli plak kod kojega postoji rizik za nastanak KUŠ-a“. Dijagnostika leukoplakije temelji se na eliminaciji sličnih entiteta. Greenberg je definira kao „bijela lezija koja zahvaća sluznicu usne šupljine te se ne može ukloniti struganjem ni, temeljem histopatološke slike, svrstati u bilo koju drugu vrstu lezija” (66).

Diferencijalno dijagnostički prije postavljanja konačne dijagnoze treba razmotriti pseudomembranoznu kandidijazu, frikcijske lezije, leukoedem, aspirinsku opeklinu, zagriznu ranu, bijeli spužvasti nevus i stomatitis nicotinicus.

Leukoplakija se ugrubo dijeli na homogenu i nehomogenu. Homogena leukoplakija je ravna tanka, uniformno bijela lezija, dok se u nehomogenu leukoplakiju svrstava vlasasta ili Epstein Barr virusom (EBV) ili Virusom humane imunodeficijencije (HIV) posredovana leukoplakija. Eritroleukoplakiju mnogi više ne smatraju nehomogenom leukoplakijom već *carcinomom in situ*. Poneki autori eritroleukoplakiju smatraju eritroplakijom (40,67).

Klinička klasifikacija leukoplakije SZO-a iz 1992. godine prikazana je u Tablici (Tbl.) 1.

Tablica 1. Klinička klasifikacija leukoplakije. Preuzeto iz (40).

L (veličina leukoplakije)	
L1	Veličina jedne ili više leukoplakija zajedno < 2 cm
L2	Veličina jedne ili više leukoplakija zajedno 2 - 4 cm
L3	Veličina jedne ili više leukoplakija zajedno > 4 cm
Lx	Veličina nije specificirana
P (patologija)	
P0	Bez epitelne displazije
P1	Blaga ili umjerena epitelna displazija
P2	Teška epitelna displazija
Px	Patologija nije specificirana
OL stadiji	
Stadij I	L1P0
Stadij II	L2P0
Stadij III	L3P0 ili L1L2P1
Stadij IV	L3P1, bilo koji L P2

Pravila:

1. Ukoliko postoji nedoumica vezana uz odabir L kategorije, odabire se niža kategorija
2. U slučaju ponavljanih biopsija iste ili više leukoplakija, odabire se najviši dobiveni patološki skor

Prevalencija oralne leukoplakije u svijetu iznosi otprilike 0,5 % dok maligna transformacija ovih lezija iznosi 1 % (40). Leukoplakija je šest puta češća kod pušača nego nepušača, a neovisni rizični čimbenik predstavlja alkohol (40).

Brouns i sur. pokazali su da je jedini prediktivni čimbenik za malignu transformaciju leukoplakije veličina lezije (> 4 cm) (68). Sarode i sur. predlažu klasifikaciju u kojoj je leukoplakiji, zbog štetnih navika, morfološki promijenjeno tkivo, a oralni lihen morfološki promijenjeno tkivo u kojoj upala ima glavnu ulogu u malignoj transformaciji (69). Patohistološka klasifikacija PMOP-a SZO-a iz 2005. god. razlikuje 5 patohistoloških stadija epitelnih prekursornih lezija: skvamozna hiperplazija, blaga displazija, umjerena displazija, teška displazija i *carcinoma in situ*. Treba spomenuti još dvije klasifikacije: „Squamous Intraepithelial Neoplasia (SIN)“ sustav i „Ljubljana classification of Squamous Intraepithelial Lesions (SIL)“. Sheme sve tri navedene klasifikacije prikazane su u Tbl. 2.

Tablica 2. Sheme patohistoloških klasifikacija prekursorskih i sličnih lezija. Preuzeto iz (40).

WHO klasifikacija	Višeslojno pločasta intraepitelijalna neoplazija (SIN)*	Ljubljanska klasifikacija višeslojno pločastih intraepitelijalnih lezija
Višeslojno pločasta hiperplazija		Jednostavna višeslojno pločasta hiperplazija
Blaga displazija	SIN 1	Hiperplazija bazalnih/parabazalnih stanica
Umjerena displazija	SIN 2	Atipična hiperplazija ^a
Teška displazija	SIN 3 ^b	Atipična hiperplazija ^a
<i>Carcinoma in situ</i>	SIN 3 ^b	<i>Carcinoma in situ</i>

* SIN – engl. *Squamous intraepithelial neoplasia*

^a „Rizični epitel“ koji je analogan umjerenoj i teškoj displaziji

^b SIN 3 označava i tešku displaziju i *carcinoma in situ*

Statistički značajno povećani rizik za malignu transformaciju leukoplakije imaju žene, osobe s idiopatskom leukoplakijom (nepušači), leukoplakija jezika i dna usne šupljine, leukoplakija veća od 200 mm² te nehomogeni tip leukoplakije (40).

1.5.2. Eritroplakija

Kao i leukoplakija, eritroplakija ima kliničku, isključujuću definiciju: „Crvena lezija koja se klinički i patohistološki ne može svrstati u neku drugu poznatu leziju“. Klinički ona može biti u razini sluznice ili čak ispod nje te imati glatku ili granuliranu površinu. Kao što je spomenuto, eritroleukoplakiju mnogi smatraju eritroplakijom (40,69). Kao i kod KUŠ-a, rizične navike povezane s eritroplakijom su konzumacija alkohola i duhana. Nije jasna potencijalna uloga *Candida albicans* u etiologiji eritroplakije.

Prevalencija eritroplakije varira od istraživanja do istraživanja (0,02 – 0,83 %) te ima geografsku komponentu (70). Uglavnom se javlja u osoba srednje i starije dobi.

Često je solitarna što kliničaru može olakšati razlikovanje iste od erozivnog lihen, eritematoznog lupusa i eritematozne kandidijaze. Navedeni entiteti češće su bilateralno smješteni u usnoj šupljini.

Patohistološki, eritroplakija uvijek pokazuje znakove displazije te je iz toga razloga neki svrstavaju u *carcinoma in situ* (70,71). Ne postoje istraživanja koja su dokumentirala postotak

maligne transformacije eritroplakije. Međutim, većina eritroplakija, ako već nisu *carcinoma in situ*, s vremenom prijeđu u KUŠ te se na taj način i pristupa njegovom liječenju.

1.5.3. Oralna submukozna fibroza

Incidencija oralne submukozne fibroze uglavnom je bila ograničena na jugoistočnu Aziju. Međutim, sve se više prijavljuju njezini slučajevi u Grčkoj, UK-u i zemljama na jugu Afrike. Bolest je uzrokovana štetnom navikom žvakanja areke i betelovog oraha ili njihovih prerađevina (40). Zanimljiva je informacija da je KUŠ 3. najčešći karcinom u Indiji što se upravo pripisuje žvakanju betelovog oraha (2,34). Žvakanje betelovog oraha 4. je najčešća ovisnost u svijetu te se godišnji prihodi od prodaje betelovog oraha u svijetu broje u milijardama dolara.

Klinički se oralna submukozna fibroza manifestira pečenjem, žarenjem, trizmusom, stezanjem i zadebljanjem sluznice kao posljedicom atrofije epitela te fibroze i hijalinizacije submukoze. S vremenom dolazi do formiranja fibroznih tračaka u obraznoj sluznici te sluznici oko usnica što može rezultirati mikrostomijom.

Atrofični epitel predstavlja *locus minoris resistentiae* za nastanak KUŠ-a jer je znatno podložniji utjecaju egzogenih kancerogena. Murti i sur. u istraživanju s dugoročnim praćenjem dokumentirali su godišnju stopu maligne transformacije oralne submukozne fibroze od 0,5 % (72). Otprilike trećina svih oralnih submukoznih fibroza alterira maligno (40,73).

1.5.4. Oralni lihen

Oralni lihen je mukokutana autoimuna bolest s raznim kliničkim i morfološkim manifestacijama. Najčešći je retikularni tip, dok su nešto rjeđi erozivni, atrofični, plakozni tip i dr.

U znanstvenoj literaturi navodi se debata na temu postoji li rizik od maligne transformacije kod oboljelih od oralnog lihena. Svakako je tendencija u znanstvenim istraživanjima lihen svrstavati u PMOP skupinu. Ovo se osobito odnosi na atrofični i erozivni oralni lihen.

U retrospektivnoj studiji Brzaka i sur. koja je uključivala 12 508 pacijenata s oralnim lihenom i leukoplakijom, u 10 godina nije registrirana maligna transformacija navedenih promjena (74). S druge strane, Tovar i sur. također su u retrospektivnoj studiji koja je uključivala 633 pacijenta s oralnim lihenom u praćenju do 20 godina otkrili šest slučajeva KUŠ-a, proizašlih iz

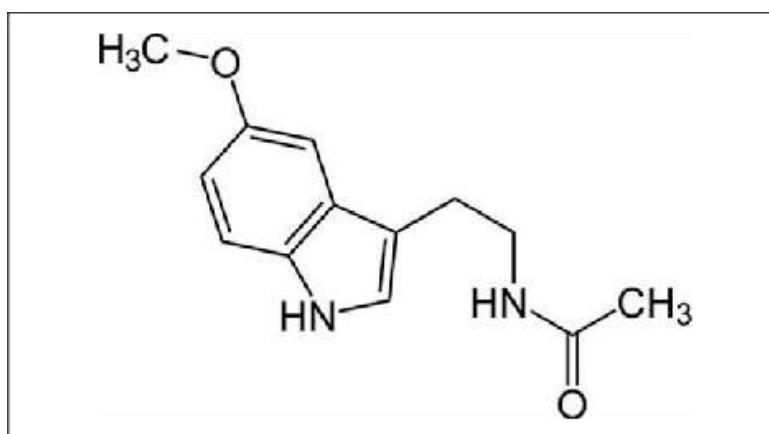
tih lezija (75). Ovaj postotak (0,95 %) nije veliki ali se ne može ni zanemariti. Manojlović i sur. opisali su pet slučajeva KUŠ-a proizašlih iz oralnog lihen (76).

Postoji još nekoliko preglednih radova koji opisuju stopu maligne transformacije oralnog lihen koja se kreće od 0 – 3,5 % (77–79). Međutim, kao i kod prethodno navedenih retrospektivnih studija, postoje određene limitacije. *Selection bias* i *recall bias* slabo su kontrolirani u navedenim istraživanjima te bi isti mogli zamaskirati neke podatke bitne za određivanje stope maligne transformacije lihen (80). Štetne navike i rizični čimbenici nisu adekvatno opisani niti registrirani, a svakako bi se trebali uzeti u obzir.

Dugoročne multicentrične kohortne studije s dobrim kliničkim i patohistološkim praćenjem mogle bi dati točniju i realniju sliku malignog potencijala oralnog lihen.

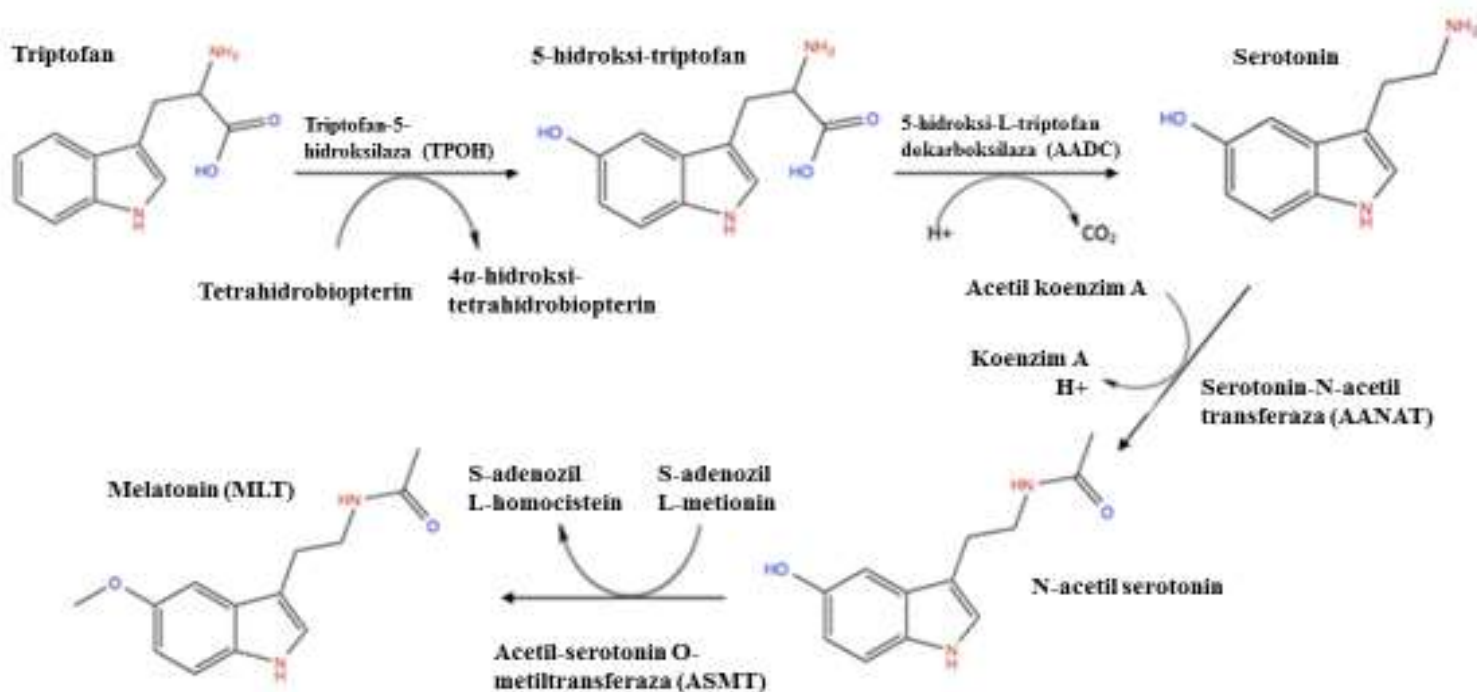
1.6. MELATONIN

Melatonin (N-acetil-5-metoksitriptamin) (MLT) je molekula koja se sintetizira u epifizi (corpus pineale) (Sl. 4), ali i u drugim tkivima i stanicama, kao što su mrežnica, koštana srž, testisi, jajnici, sluznica gastrointestinalnog sustava, limfociti, trombociti i drugi, u kojima se pretpostavlja da imaju lokalnu, specifičnu i još u potpunosti nepoznatu ulogu. MLT je klasificiran kao hormon. Međutim, riječ je o molekuli s autokrinim, parakrinim i antioksidacijskim učinkom. Stoga mnogi smatraju da je hormonska klasifikacija nedostatna. (81). Zbog svoje uloge u fotoperiodizmu, nazvan je i neuroendokrinim transduktorom.



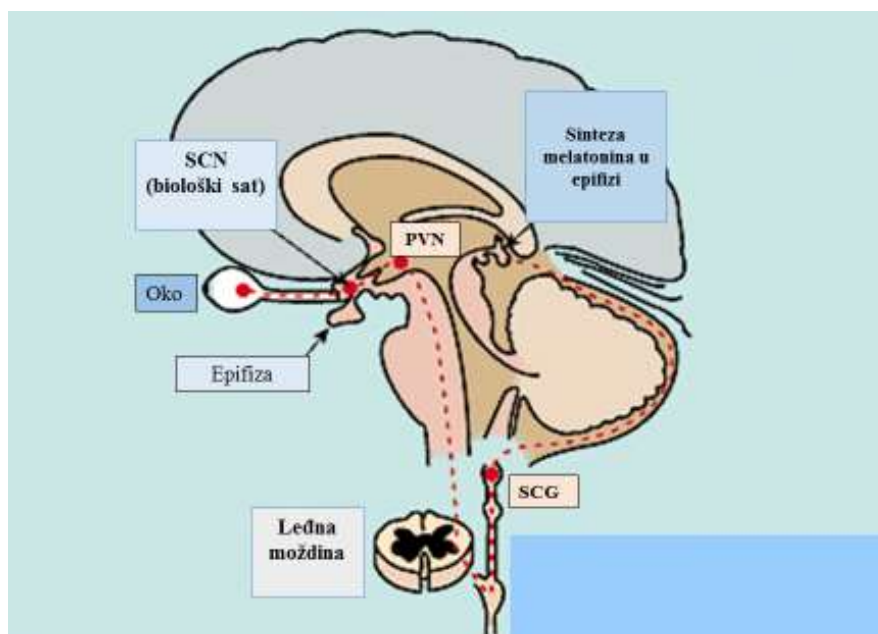
Slika 4. Kemijska struktura melatonina

MLT se sintetizira u organizmu iz aminokiseline triptofana. Sinteza MLT-a prikazana je na sl. 5.



Slika 5. Prikaz sinteze MLT-a iz triptofana. Preuzeto iz (82).

Najveći udio serumskog MLT-a sintetizira se u epifizi. Sinteza i lučenje MLT-a u pinealocitima najizraženije je tijekom noćnih sati kada dolazi do otpuštanja noradrenalina na simpatičkim završecima pinealocita (81,83). Sinkronizacija cirkadijalnog MLT-a pod kontrolom je suprahijazmatskog nukleusa koji preko retino-hipotalamičkog trakta dobiva informaciju o dnevnom svjetlu. Navedeni nukleusi predstavljaju biološki sat te šalju informaciju pinealocitima i na taj način sinkroniziraju sintezu i lučenje MLT-a u serum. Enzim koji sudjeluje u kontroli sinteze MLT-a je *N*-acetiltransferaza koju svjetlost tijekom dana inaktivira preko navedenog mehanizama (83). Jednom sintetiziran, MLT se otpušta u kapilarnu mrežu epifize i prema nekim navodima, u cerebrospinalnu tekućinu u trećem ventrikulu (83) (Sl. 6).

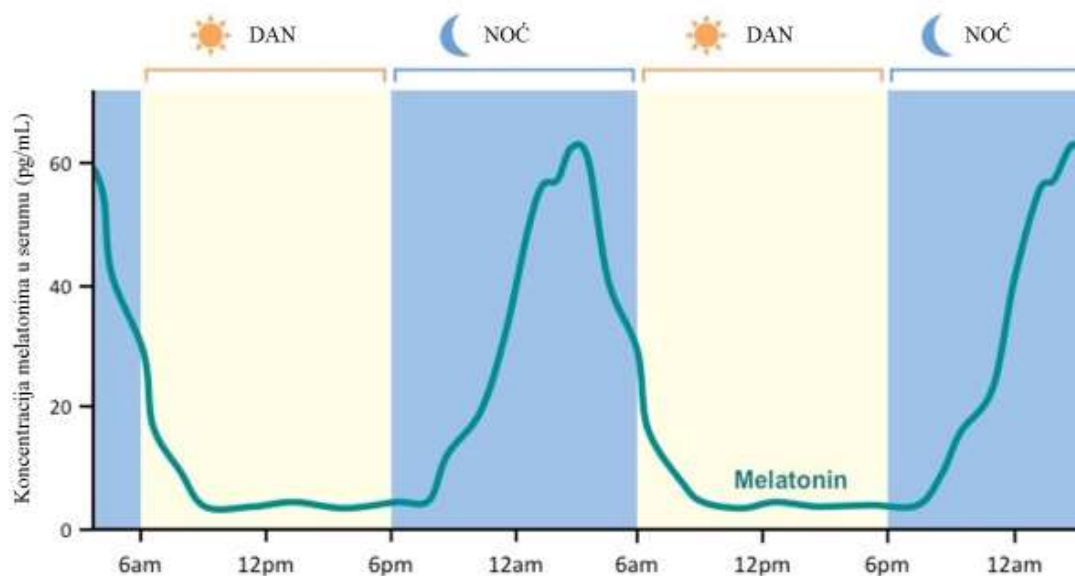


Slika 6. Prikaz kontrole sinteze MLT-a u epifizii: svjetlo se pretvara u elektrokemijski signal koji putuje retino-hipotalamičkim traktom do suprahijazmatskog nukleusa (SCN) hipotalamusa. Signal iz SCN-a zatim putuje do paraventrikularnog nukleusa (PVN) hipotalamusa. Iz PVN-a signal putuje do leđne moždine do sinapse u gornjem cervikalnom gangliju (SCG). SCG smanjuje aktivnost simpatičkih živčanih vlakana koji inerviraju epifiziu. Ovo dovodi do smanjenog oslobađanja noradrenalina na simpatičkim završecima i posljedičnog smanjenja proizvodnje cikličnog adenzin monofosfata (cAMP) u epifizii. Smanjenje koncentracije cAMP smanjuje funkciju *N*-acetiltransferaze, a time i inhibira/smanjuje lučenje MLT-a. Preuzeto iz (84).

MLT je lipofilna molekula i lako prolazi staničnu membranu. Smatra se da je približno 70 % serumskog MLT-a vezano na albumin (83). Samo nevezani, slobodni MLT iz seruma pasivnom difuzijom preko žlijezda slinovnica dolazi u slinu. Donedavno se smatralo kako je udio serumskog MLT-a koji dolazi u slinu konstantan te da iznosi od 24 – 33 % serumske koncentracije (85). Međutim, istraživanje koje su proveli van Faassen i sur. pokazalo je kako odstupanje između salivarnog i serumskog MLT-a iznosi i do 36 % (95 % CI = 4 - 60) te da se veća koncentracija slobodnog MLT-a nalazi u slini (85). Isti istraživači predložili su hipotezu o sintezi MLT-a unutar žlijezda slinovnica. S druge strane, istraživanje koje su proveli Isola i Lilliu, predlaže mogućnost skladištenja MLT-a unutar acinusnih stanica žlijezda slinovnica putem nepoznatog unutarstaničnog mehanizma (86). Također, isti autori tvrde kako su žlijezde slinovnice glavni distributer salivarnog MLT-a.

Koncentracija salivarnog MLT-a varira od 1 - 5 pg/mL tijekom dana te od 10 - 50 pg/mL u noćnim satima (87). Koncentracija serumskog MLT-a u zdravih ispitanika počinje se povećavati između 18 i 20 sati te dostiže najviše vrijednosti između ponoći i 5 sati ujutro, nakon

čega se počinje značajno snižavati (88) (Sl. 7).

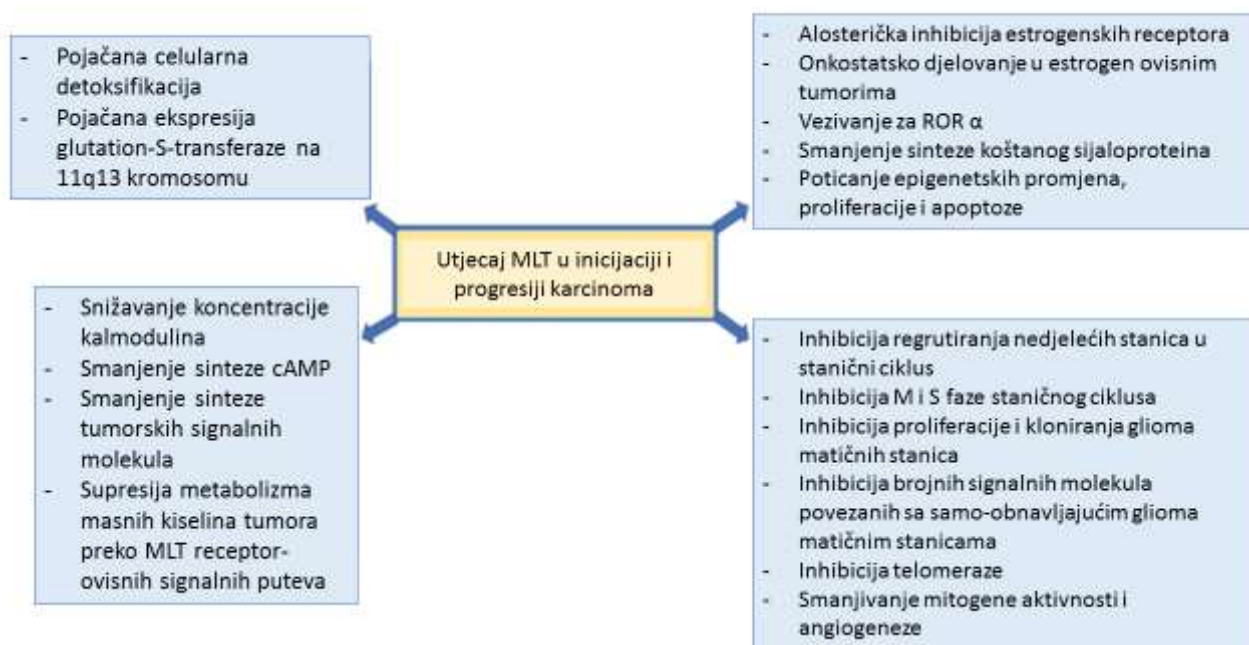


Slika 7. Cirkadijani ritam serumskog MLT-a. Preuzeto iz (89).

Odstupanja od normalnih serumskih koncentracija MLT-a povezuju se s poremećajima spavanja, desinkronizacijom u organizmu nastaloj kao posljedica letenja zrakoplovom kroz vremenske zone (engl. *jet-lag*), depresijom, stresom, shizofrenijom, hipotalamičnom amenorejom, trudnoćom, anoreksijom, nekim oblicima karcinoma, imunološkim poremećajima i seksualnim sazrijevanjem u pubertetu (88).

Većina cirkulirajućeg serumskog MLT-a metabolizira se u jetri u 6-hidroksi-melatonin i 6-sulfatoksimelatonin koji se u tom obliku izlučuju mokraćom. Koncentracija 6-hidroksimelatonina korelira sa sveukupnom koncentracijom serumskog MLT-a u vremenu skupljanja (90).

Do sada opisani mehanizmi učinka MLT-a su antioksidacijski, protuupalni (inhibicija ciklooksigenaze 2) i imunomodulirajući (poticanje stvaranja interleukin 1-beta, interleukina 2 i interferona alfa) te induciranje apoptoze. Uz navedeno, MLT potiče proliferaciju i sintezu kolagena tipa I, diferencijaciju osteoblasta te posljedično stvaranje koštanog tkiva (81,83). Antikancerogeni učinak MLT-a opisan je na sl. 8.



Slika 8. Uloga karcinoma u inicijaciji i progresiji karcinoma. Preuzeto iz (91).

* MLT – melatonin; ROR α - engl. *RAR-related orphan receptor alpha*

Većina navedenih mehanizama učinka MLT-a ostvarena je vezanjem na specifične membranske receptore koji se nalaze na gotovo svakoj stanici u ljudskom organizmu (Tbl. 3). Osim učinka posredovanog receptorima, MLT ima i direktni, receptorski neovisni učinak.

Tablica 3. Vrste MLT-ovih receptora, njihova anatomska distribucija i uloga. Preuzeto iz (91).

MLT-ov receptor	MT1		MT2	MT3
Podtip	Mel 1a	Mel 2a		
Distribucija	- SCN hipotalamusa - pars tuberalis epifize - anteriorni dio hipotalamusa - dorzomedijalni/ventromedijalni nukleusi hipotalamusa - pars distalis prednjih epifizinih, paraventrikularnih i talamičkih nukleusa - hipokampus - cerebralni i cerebelarni korteks	- area postrema u cerebelumu, srednjem mozgu, pons, cerebralni korteks - medijalno preoptičko područje, retina - krvne žile - vaskularni endotel	- periferna tkiva/organi - unutarnji pleksiformni sloj retine - krvne žile/vaskularni endotel	Mitohondriji
Sustav glasnika	Pertussis toksin – G ₁ protein ovisna adenilat-ciklaza		G ₀ ovisna inhibicija signalnog puta adenilat-ciklaze i guanilil-ciklaza	Kvinon reduktaza
Učinak	Kontrola cirkadijanog ritma	Aktivacija fosfolipaze C, vazokonstrikcija	Hidroliza fosfoinozitida, antiproliferacijski učinak, vazodilatacija	Antioksidacijski učinak, protutumorski učinak
Parcijalni agonist	Remelteon	Remelteon	Remelteon	Nepoznato
Parcijalni antagonist	Luzindol			Luzindol, prazosin, <i>N</i> -acetil-triptamin

* MLT – melatonin, SCN - suprahijazmatski nukleus

Do danas je nepoznato posjeduju li tumori koštanog tkiva MLT receptore. Obzirom da MLT sprječava rast mnogih tipova tumora *in vitro*, eventualna prisutnost MLT receptora mogla bi ukazati na opravdanost terapijske primjene MLT-a kod pacijenata s tumorima koštanog tkiva

(81).

MLT se metabolizira preko jetrenih citokroma, ponajprije CYP1A1 i CYP1A2 u 6-hidroksimelatonin. Izvan jetre, značajanu ulogu u metaboliziranju MLT-a ima CYP1B1 koji pokazuje značajnu ekspresiju u tkivima poput debelog crijeva i cerebralnog korteksa (92). MLT se izlučuje iz organizma preko urina u nepromijenjenom obliku te kao 6-hidroksimelatonin-sulfat (93).

1.7. SASTAV SLINE I SALIVARNA DIJAGNOSTIKA

Slina se sve više uključuje u dijagnostiku raznih bolesti i stanja. Privlačna je kao medij jer je lako dostupna, neinvazivna, njezino uzorkovanje je jednostavnije, ekonomičnije i pristupačnije od uzorkovanja seruma ili urina. Važno je napomenuti kako je većinu molekula koje se nalaze u krvi ili urinu moguće pronaći i u slini.

Slinu proizvode parne parotidne, submandibularne i sublingvalne žlijezde slinovnice te male žlijezde slinovnice smještene po cijeloj sluznici usne šupljine. Odrasli čovjek dnevno proizvede između 0,5 i 1,5 l sline, a pH vrijednost fiziološki varira od 6,1 do 7,8 (94).

1.7.1. Sastav sline

Slina je u zdravih osoba prozirna, muko-serozna tekućina koja nastaje u egzokrinim žlijezdama slinovnicama i omogućuje vlaženje usne šupljine što olakšava artikulaciju, probavljanje i gutanje hrane. Slina sudjeluje i u prijenosu temperature na okolnu sluznicu te u osjetu okusa i dodira (16). Još nam uvijek nisu poznate sve molekule prisutne u slini niti sve uloge sline u organizmu.

Slina ili sveukupna slina (engl. *Whole saliva*) mješavina je slina svih žlijezda slinovnica, gingivalne krevikularne tekućine, sekreta gornjeg dišnog puta te epitelnih stanica, bakterija, virusa, gljivica i njihovih produkata. Kao što je već spomenuto, sastav NS i SS je različit. Nestimulirana slina ovisna je o hidriranosti organizma. Stimulirana slina nastaje mirisnim, okusnim, mehaničkim, psihičkim ili farmakološkim podražajima. Sastav sline žlijezda slinovnica razlikuje se u sastavu i udjelu određenih molekula. Također, razlikuje se udio sline žlijezda slinovnica u NS i SS. Tako je u NS najveći udio sline iz submandibularnih žlijezda slinovnica, dok je u SS najveći udio sline iz parotidnih žlijezda slinovnica.

Gingivalna krevikularna tekućina je tekućina koja iz gingivnog sulkusa dolazi u sveukupnu slinu. Riječ je o intersticijskoj tekućini ili upalnom transudatu koji sadrži bakterije, epitelne stanice, upalne stanice, elektrolite, globuline, ureu i razne enzime (16). Smatra se da ima zaštitnu funkciju i štiti zub od infekcije parodontnog ligamenta.

Slina sadrži 95 – 98 % vode, a ostatak čine elektroliti, enzimi, čimbenici rasta, hormoni, antimikrobne tvari i antitijela (16). Lučenje sline kontrolira autonomni živčani sustav. Parotidne žlijezde slinovnice izlučuju seroznu slinu, dok sublingvalne žlijezde slinovnice mukoznu slinu. Slina iz submandibularnih žlijezda slinovnica je mješovita, serozna i mukozna. Serozna slina je rijetka, vodenasta i sadrži α -amilazu ili ptijalin, dok mukozna slina najvećim dijelom sadrži glikoprotein mucin (16,94). Unutar samih žlijezda slinovnica stvara se primarna slina koja je slična krvnoj plazmi, bogata elektrolitima i glikoproteinima. Obzirom da slina prolazi kroz kanaliće žlijezda slinovnica, postaje hipotonična i bogatija proteinima. Hipotoničnost sline je bitna za osjetljivost okusnih pupoljaka, ali i zaštitu sluznice usne šupljine. Naime, hipotoničnost sline omogućuje glikoproteinima u slini da hidriraju i štite sluznicu usne šupljine (16,94).

Slina sadrži razne proteine, kao što su: albumini, glikoproteini, imunoglobulini i enzimi, dušikove spojeve, kao što su urea, mokraćna kiselina, aminokiseline i kreatinin, lipide i hormone.

Sažeti prikaz određenih molekula u slini prikazan je na sl. 9.



Slika 9. Prikaz sastava sline i uloge pojedinih spojeva u slini. Preuzeto iz (16).

Pored vode, najveći udio u NS imaju mucini, glikoproteini od 20 – 30 %. Mucini mehanički štite sluznice usne šupljine, čine slinu gustom i ljepljivom, sudjeluju u probavi, sprječavaju kolonizaciju bakterija i samim time imaju i ulogu u prevenciji karijesa (94).

Fosfoproteini imaju ulogu u održavanju elektrolitne homeostaze sline i prevenciji zubnog karijesa, ugrađujući kalcij u hidroksiapatit cakline (16,94).

Histatini imaju baktericidni i fungicidni učinak dok staterini štite caklinu od fizičkih čimbenika. Cistatini imaju protuupalna i antibakterijska svojstva te se uglavnom izlučuju iz submandibularnih žlijezda slinovnica. Laktoferin je glikoprotein koji ima sposobnost vezivanja Fe^{3+} iona koji je potreban određenim bakterijama za rast. Na taj način laktoferin regulira razmnožavanje i rast određenih vrsta bakterija (16).

U slini se nalaze i imunoglobulini, i to A, G i M. IgA se stvara u vezivnom tkivu žlijezda slinovnica te putem kanalića žlijezda slinovnica dolazi u slini. Salivarni IgA igra ulogu u

neutralizaciji virusa te djeluje kao antitijelo na bakterijske antigene. Za imunoglobuline IgM i IgG vjeruje se da dolaze u slinu preko gingivalne krevikularne tekućine.

Serozna slina sadrži α -amilazu. Salivarna α -amilaza je enzim koji razgrađuje škrob hidrolizom $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidnih veza u jednostavnije šećere dekstrine, maltozu, maltotriozu i glukozu (94). Urea je u slini produkt metabolizma žlijezda slinovnica. Pufersku ulogu sline u održavanju stalne pH-vrijednosti obavljaju urea, hidrogenkarbonatni i fosfatni ioni te još neki enzimi. Mokraćna kiselina dolazi u slinu iz seruma, snažan je antioksidans koji nastaje razgradnjom purinskih nukleotida (94). Koncentracija salivarne i serumske mokraćne kiseline u slini je proporcionalna. Različite aminokiseline i kreatinin također dolaze iz seruma u slinu (16).

Ugljikohidrati u slini uglavnom tvore komplekse s proteinima (npr. glikoproteini).

U slini je moguće pronaći razne elektrolite čija koncentracija ponajviše ovisi o unosu hrane. Koncentracije elektrolita u serumu i slini značajno se razlikuju kao i koncentracije elektrolita u NS i SS. Nazastupljeniji kationi sline su ioni kalcija, magnezija, natrija i kalija, a nazastupljeniji anioni hidrogenkarbonatni, fosfatni, tiocijanatni i kloridni ioni (16,94).

1.7.2. Salivarna dijagnostika

Slina se već godinama koristi u forenzici (salivarni testovi za izolaciju DNA) kao dijagnostički medij. Koristi se i za određivanje koncentracije kortizola, estriola, dehidroepiandrosterona (DHEA), estrogena i testosterona u svrhu doping kontrola na sportskim natjecanjima ali i u medicinske svrhe. Slina se koristi i za određivanje koncentracije alkohola u organizmu (Q.E.D. test) (37).

Slina je dobar medij za dokazivanje zlorporabe određenih vrsta droga. Prometna policija u pojedinim zemljama Europske Unije koristi salivarne testove za zlorporabu droga. Na tržištu su dostupni brojni salivarni testovi za određivanje koncentracije heroína, morfija, kodeina, metadona, amfetamina, metamfetamina, delta-9-tetrahidrokanabiola (THC), THC-COOH, tramadola, hipnotika, sedativa i anksiolitika (npr. Dräger DrugTest®, DrugWipe® i dr.) (16). Zanimljiva je činjenica da su steroidni hormoni u niskim dozama najčešće zlorabljene supstance na sportskim natjecanjima.

Na tržištu postoje brojni dostupni preparati za skupljanje i skladištenje uzoraka sline, kao što su: „BBL Culture swab collection and transport system“ (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), „UpLink saliva collector“ (OraSure Technologies Inc. Bethlehem, PA, USA), „Intercept Oral Specimen Collection Device“ (OraSure Technologies Inc. Bethlehem,

PA, USA), „Aware Messenger Device for the Collection, Stabilization and Transport of Oral Fluid Specimens“ (Calypste Biomedical Corporation, Portland, Oregon, USA), „Saliva Collection device for collection of DNA samples from children“ (DNA Genotek Inc., Ottawa, Ontario, Canada), „Salivette“ (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Njemačka) „Oragene saliva kit for collection of saliva samples for DNA analysis“ (DNA Genotek Inc., Ottawa, Ontario, Kanada) i drugi (16)(95).

U zadnjih dvadesetak godina značajno je porastao broj istraživanja u kojima se koristila slina kao dijagnostički medij. Razlozi tome već su navedeni, ekonomičnost i lako uzorkovanje. Gotovo svaka češća sustavna bolest je na neki način istraživana preko sline, bilo određivanjem potencijalnih biljega, bilo određivanjem serumskih dijagnostičkih analoga.

U cilju pojednostavljivanja određivanja koncentracije glukoze kod dijabetičara, određivala se koncentracija salivarne glukoze i uspoređivala s koncentracijom u serumu. Nažalost, radi postojanja većeg broja izvora glukoze u slini, ove koncentracije nisu bile usporedive. Međutim, Strauss i sur. mjerili su koncentraciju glukoze u gingivalnoj krevikularnoj tekućini i dobili usporedive rezultate s koncentracijama glukoze dobivenima lancetom iz prsta (96). U slini su se određivali brojni drugi potencijalni biljezi za dijabetes tipa II, kao što su salivarni leptin, salivarna superoksid-dismutaza, glikirani hemoglobin HbA1c i ostali (16).

Mirzaii-Dizgah i Riahi određivali su koncentraciju salivarnog troponina u pacijenata s akutnim infarktom miokarda i dobili povišene vrijednosti troponina u NS (97). Floriano i sur. predložili su salivarni CRP, mijeloperoksidazu i mioglobin kao nadopunu EKG-u u postavljanju dijagnoze akutnog infarkta miokarda (98).

Salivarni lizozim predstavljen je kao potencijalni biljeg za hiperglikemiju, hipertenziju i rani stadij koronarne bolesti (99), a omjer salivarnog kortizola i testosterona, pored dokazanog reprezentativnog alata za procjenu stresa, boljim prediktorom koronarne bolesti srca od samog kortizola (100).

Salivarni kortizol, nitriti, mokraćna kiselina, natrij, kalij, promjena pH-vrijednosti sline, α -amilaza i laktoferin predstavljeni su kao potencijalni biljezi uznapredovale bubrežne insuficijencije (101–103). U dijagnostici hiperfosfatemije salivarni fosfatni ion pokazao se jednako reprezentativnim kao i serumski (104). Također, koncentracija salivarnog fosfatnog iona korelira s koncentracijom serumskog kreatinina i stupnjem glomerularne filtracije (105).

Osjet boli godinama se pokušava objektivizirati. Samo uzorkovanje krvi nekim pacijentima predstavlja bolno i stresno iskustvo. Iz navedenog razloga slina bi mogla predstavljati bolji medij za određivanje biljega za bol.

U vlastitom istraživanju određivali smo koncentraciju prirodnog analgetika, opiorfina u slini u pacijenata sa sindromom pekućih usta (106). Objasnili smo povišene koncentracije opiorfina u slini ovih pacijenata kao reakciju na kroničnu bol.

Oksidacijski stres poznati je medijator u zloćudnim bolestima, aterosklerozi, infarktu miokarda, Alzheimerovoj bolesti, Parkinsonovoj bolesti i drugima. U literaturi je moguće pronaći brojna istraživanja o parametrima oksidacijskog stresa u slini. Dostupni su i komercijalni testovi za procjenu oksidacijskog statusa sline (16,107,108)

Hu i sur. identificirali su 24 antigena u slini koji se razlikuju prema prisutnosti ili prema koncentraciji u bolesnika sa Syögrenovim sindromom i bolesnika sa sistemskim lupusom u odnosu na zdrave ispitanike (109). Otkrili su i 4 potencijalna antitijela prisutna u slini pacijenata sa Syögrenovim sindromom: antitransglutaminaza, antihiston, anti-Syögren povezani antigeni A i B (anti-SSA i anti-SSB). Salivarni Bullous pemphigoid antigen (BP) 180 i BP 230 opisani su kao potencijalni biljezi za bulozni pemfigoid (110).

Većinu biljega za određene tumore koji se rutinski mjere u serumu moguće je mjeriti i u slini. Među prvim istraživanjima o tumor supresorskom genu p53 u slini bilo je ono Azuma-e i sur. (111). Nakon ovoga istraživanja, krenuo je niz istraživanja o povezanosti p53, CA15-3, c-erB2, DMBT1 i karcinoma dojke, CA125 i karcinoma jajnika i brojnih drugih (16). Uspoređivan je i serumski i salivarni PSA (engl. *prostate-specific antigen*) u oboljelih od adenokarcinoma prostate. Iako su Shiiki i sur. utvrdili statistički značajnu razliku između koncentracija serumskog i salivarnog PSA, naglasili su kako iste koreliraju te da su im vrijednosti usporedive (112).

Postoje brojna istraživanja vezana za serumski i salivarni karcinoembrionalni antigen (CEA) u oboljelih od karcinoma debelog crijeva, usne šupljine, jednjaka, rektuma, žlijezda slinovnica, pluća, mokraćnog mjehura, jajnika, vrata maternice i dojke (16). Salivarni CEA pokazao se reprezentativnim i osjetljivim biljegom. Međutim, kao i serumski, ne predstavlja specifični biljeg za određeni karcinom.

Serumski CA 19-9 rutinski se koristi u dijagnostici karcinoma gušterače. Zanimljivo je istraživanje Dyckhoffa i sur. koji su predstavili salivarni CA 19-9 kao biljeg za razlikovanje dobroćudnih od zloćudnih tumora žlijezda slinovnica (113).

Slina je medij koji se koristi u brojnim STD (engl. *Sexually Transmitted Disease*) klinikama u svijetu za dijagnostiku HIV-a. U slini je moguće odrediti i EBV, HPV, viruse hepatitisa, influenze te poliovirus. Preko antigena mogu se detektirati i gljiva *Candida albicans* te paraziti *Toxoplasma gondii* i *Schistosoma mansoni* (16).

Slina predstavlja obećavajući medij za dijagnostiku brojnih poremećaja i stanja, međutim postoje parametri koji se za svaku molekulu moraju uzeti u obzir prije same dijagnostike. Više o parametrima koji mogu utjecati na salivarnu dijagnostiku bit će riječi u daljnjem tekstu.

1.7.3. Metode uzorkovanja sline

Prije uzorkovanja sline bitno je provjeriti utjecaj i isključiti zbunjujuće čimbenike (engl. *confounders*). Zbunjujući čimbenici mogu biti vrijeme uzorkovanja sline, konzumacija hrane i pića koje su prethodovale uzorkovanju, žvakanje guma za žvakanje, pranje zuba, uzimanje određenih lijekova, ali i dob i spol. Većina istraživanja sa salivarnom dijagnostikom uključuje ispitanike koji su se suzdržavali od jela, pića i pušenja te nisu prali zube najmanje sat vremena prije uzorkovanja.

Svaku molekulu koja se određuje salivarnom dijagnostikom valja zasebno promatrati te u što većoj mjeri pokušati isključiti zbunjujuće čimbenike.

Primjeri zbunjujućih čimbenika u mjerenju MLT-a su alkohol, s posebnim naglaskom na crno vino, nesteroidni antireumatici (NSAR) i vrijeme uzorkovanja. Više o ovome bit će riječi u poglavlju Ispitanici i metode.

Spomenuto je da se sastav sline razlikuje u NS i SS. Nestimulirana slina koja se skuplja s dna usne šupljine, najvećim udjelom je podrijetlom iz submandibularnih žlijezda slinovnica (65%), dok udio iz parotidnih žlijezda slinovnica iznosi otprilike 20 %, sublingvalnih do 8 % i malih žlijezda slinovnica uglavnom manje od 10 %. Stimulacijom se povećava udio parotidne sline s udjelom > 50 % (16).

Metode skupljanja sline su: istjecanje ili cijedenje, pljuvanje, usisavanje i upijanje. Najjednostavnija metoda skupljanja sline je pljuvanje sline u posudu. Ovaj postupak često se koristi u procjenjivanju volumena izlučene sline (16).

Protok NS zdrave osobe iznosi 0,3 - 0,5 mL/min. Fiziološki, protok pada tijekom sna i do 0,05 mL/min. Hiposalivaciju obilježava protok NS manji od 0,1 mL/min i protok SS manji od 0,5 mL/min. Kserostomiju označava potpuni nedostatak sline (16).

Stimulacija protoka sline može se postići vanjskom stimulacijom, lijekovima ili djelovanjem autonomnog živčanog sustava te može iznositi i do 3 mL/min. Najčešće se stimulacija sline u istraživanjima provodi pomoću askorbinske kiseline (npr. 0,1 - 0,2 mol/L) ili žvakanjem parafinskih kockica. Važno je da metoda stimulacije ne utječe na molekulu koja se istražuje

salivarnom dijagnostikom, tj. da ne predstavlja zbunjujući čimbenik. Stimulacija parafinom ne mijenja sastav sline dok kemijski stimulansi mijenjaju (16)

Slinu je moguće ciljano uzorkovati iz određene žlijezde slinovnice. Tako postoje brojne modifikacije aparata Carlsona i Crittendena iz 1910. godine za uzorkovanje sline iz parotidnih žlijezda slinovnica, segregatori i mikropipete za skupljanje sline iz sublingvalnih ili submandibularnih žlijezda slinovnica. U potpoglavlju 1. 8. 2. navedene su brojne komercijalne metode i aparati za prikupljanje sline koji se temelje na filter papiru, vati i drugim materijalima.

1.8. MELATONIN I KARCINOM USNE ŠUPLJINE

Dosadašnja su istraživanja pokazala nisku koncentraciju serumskog MLT-a u pacijenata s karcinomom dojke, prostate, pluća, želuca i debelog crijeva (90,114,115).

Niska koncentracija MLT-a u nekim patološkim stanjima u usnoj šupljini mogla bi ukazivati na terapijske mogućnosti istoga. Jedna od teorija snižene koncentracije MLT-a je da pretjerana ekspresija MLT-ovih receptora uzrokuje smanjenu koncentraciju MLT-a (83,85). Međutim, regulacija negativnom povratnom spregom koja bi bila temelj ove teorije do sada nije dokazana. Drugo objašnjenje za smanjenu koncentraciju MLT-a u onkoloških bolesnika je da je u istih dokazana smanjena kvaliteta sna, povećani osjećaj malaksalosti i umora (5). Posljedično, manjak sna uzrokuje poremećaj u sintezi noćnog serumskog MLT-a, a time i samog cirkadijanog ritma MLT-a.

Utvrđivanje ekspresije MT1 MLT-ovog receptora (pripada skupini membranskih receptora iz obitelji receptora povezanih s G-proteinom (engl. *G-protein coupled receptors*) u pacijenata s malignim tumorima usne šupljine može biti i od prognostičke važnosti obzirom da je ekspresija povezana s visokim stupnjem proliferacije stanica. Ekspresija MT1 receptora u fibroblastima lamine proprije sluznice usne šupljine otkrivena je i u osoba s melanomom i planocelularnim karcinomom usne šupljine (81). Nedavna su istraživanja pokazala ekspresiju MT1 receptora u zdravim stanicama sluznice usne šupljine, ali ne i u kultiviranim stanicama planocelularnog karcinoma (81,83). U istraživanjima, koja su provedena *in vivo* i *in vitro*, dokazan je inhibitorni učinak MLT-a na rast stanica planocelularnog karcinoma (81,83).

Lissoni i sur. uspoređivali su efikasnost liječenja pacijenata s KUŠ-em koji su uz kemoterapiju primali i MLT u odnosu na one koji su primali samo kemoterapiju (116). U pacijenata koji su naknadno dobivali MLT zabilježeno je značajno smanjenje pojavnosti trombocitopenije,

neurotoksičnosti, kardiotoksičnosti, stomatitisa i astenije. Također, zabilježena je bolja jednogodišnja stopa preživljenja, značajnija stopa regresije tumora i bolja kvaliteta života nakon liječenja.

Pregledom nama dostupne literature nije pronađena informacija o koncentraciji MLT-a u pacijenata s KUŠ-em.

Obzirom da je opisan *in vitro* antiangiogeni, antioksidacijski, antiproliferacijski, onkomodulirajući i citostatski učinak MLT-a, uvidom u koncentraciju MLT-a u serumu i slini imali bismo jednu od ključnih informacija za eventualnu terapijsku primjenu MLT-a u pacijenata s KUŠ-em. Na onkološkim skupovima sve se češće raspravlja o imunoterapiji KUŠ-a. Lissoni i sur. pokazali su dobrobiti suportivne terapije MLT-a uz kemoterapiju (116). Prije planiranja suportivne terapije MLT-om u osoba s KUŠ-em, uz kemoterapiju ili imunoterapiju, bit će nužan uvid u salivarnu i serumsku koncentraciju MLT-a.

Niža koncentracija MLT-a u serumu i slini osoba s KUŠ-em u odnosu na zdrave ispitanike mogla bi ukazivati na potencijalnu ulogu MLT-a u etiologiji KUŠ-a. Također, već su spomenuti pretjerana ekspresija melatoninskih receptora te umor i lošija kvaliteta sna kao mogući razlozi nižoj koncentraciji MLT-a u bolesnika s malignim bolestima.

Odstupanje veće od 40 % između serumskog i salivarnog MLT-a moglo bi govoriti u prilog skladištenja ili sinteze MLT-a u žlijezdama slinovnicama. Bitno je zasebno promatrati stimuliranu (SS) i nestimuliranu slinu (NS) iz razloga što se sastav jedne i druge značajno razlikuje. Razlog ovome je različita zastupljenost sline žlijezda slinovnica u NS i SS. Više o ovome bit će rečeno u poglavlju Ispitanici i metode.

Viša koncentracija u slini i/ili serumu osoba s KUŠ-em u odnosu na zdrave ispitanike mogla bi ukazivati na poremećaj ekspresije MT1 receptora u KUŠ-u. Naime, egzogenom restauracijom MT1 receptora *in vitro* postignut je prekid rasta karcinoma (81). Ova pretpostavka podrazumijeva protektivni učinak MLT-a na sluznicu usne šupljine, prekomjerno lučenje MLT-a, neosjetljivost ili slabu ekspresiju MLT-ovih receptora, ali i postojanje negativne povratne sprege.

U slučaju povišene ili snižene koncentracije MLT-a u osoba s KUŠ-em u odnosu na zdrave ispitanike, prije razmatranja terapijske primjene MLT-a, biti će potrebno dobiti uvid u *in vivo* ekspresiju MLT-ovih receptora zdrave sluznice usne šupljine, tkiva KUŠ-a te klinički nepromijenjenog tkiva sluznice usne šupljine u osoba s KUŠ-em. Odnos ekspresije MLT-ovih receptora i koncentracije salivarnog i/ili serumskog MLT-a mogao bi predstavljati značajan dijagnostički biljeg za KUŠ.

U dostupnoj literaturi postoje brojna istraživanja s određivanjem koncentracije MLT-a u slini. Originalnost i izvornost ovoga istraživanja proizlaze iz činjenice da do sada, prema nama dostupnoj literaturi, nije određivana koncentracija MLT-a u slini i serumu pacijenata s KUŠ-em.

2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteze predloženog istraživanja su:

- koncentracije salivarnog i serumskog MLT-a su niže u pacijenata s KUŠ-em nego u zdravih ispitanika,
- koncentracije salivarnog i serumskog MLT-a su usporedive,

Opći cilj istraživanja je izmjeriti koncentraciju salivarnog MLT-a u pacijenata s KUŠ-em.

Specifični ciljevi su:

- utvrditi razliku u koncentraciji MLT-a u NS i SS između dvije ispitivane skupine,
- utvrditi i objasniti razliku u koncentracijama MLT-a u NS i SS u odnosu na serumsku koncentraciju MLT-a kod skupine ispitanika s KUŠ-em,
- procijeniti kvalitetu sna pacijenata s KUŠ-em kao i ispitanika kontrolne skupine,
- istražiti povezanost između kvalitete sna i koncentracija MLT-a u NS i SS zdravih ispitanika te između kvalitete sna i serumskog MLT-a, MLT-a u NS i SS pacijenata s KUŠ-em,
- istražiti povezanost određenih serumskih parametara (albumini, ukupni proteini) i koncentracije serumskog MLT-a i MLT-a u NS i SS pacijenata s KUŠ-em,
- istražiti utjecaj Papillary Bleeding Index-a (PBI) na koncentraciju salivarnog MLT-a.

3. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je provedeno tijekom 2016., 2017. i 2018. godine na Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta Kliničke bolnice Dubrava, Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Katedri za kemiju i biokemiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Istraživanje je unicentrično, opservacijsko, a prema specifičnom ustroju radi se o presječnom istraživanju (engl. *cross-sectional study*).

Istraživanje je djelomično financirano sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (IP-09-2014-9376) i sredstvima potpore Sveučilišta u Zagrebu.

3. 1. ISPITANICI

Sudionici istraživanja podijeljeni su u ispitnu (eksperimentalnu) i kontrolnu skupinu.

Glavni uključni kriterij za ispitnu skupinu bila je patohistološka verifikacija planocelularnog karcinoma usne šupljine (što nije uključivalo pacijente s karcinomom usnice i orofarinksa). Uključeni su samo T1 i T2 N0M0 karcinomi (nepostojanje udaljenih metastaza, negativni limfni čvorovi i tumori veličine do 4 cm) liječeni na Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta Kliničke bolnice Dubrava.

Kontrolnu skupinu činili su zdravi ispitanici upareni s ispitnom skupinom prema dobi i spolu. Ispitanici kontrolne skupine regrutirani su u Zavodu za oralnu kirurgiju Klinike za kirurgiju lica, čeljusti i usta Kliničke bolnice Dubrava koji su dolazili na rutinski pregled ili zahvat. Slina se uzorkovala prije oralno-kirurškog zahvata na ispitanicima kontrolne skupine.

Kriteriji za uključivanje ispitanika obje skupine bili su:

- apstinencija od jela i pića najmanje 8 sati prije uzorkovanja
- neuzimanje NSAR-a najmanje 72 sata prije uzorkovanja (117)
- apstinencija od alkohola najmanje 24 sata prije uzorkovanja (118)
- usna šupljina nije četkana niti ispirana vodicama za usta na dan uzorkovanja.

Uzimanje medicinske i stomatološke anamneze te uzorkovanje i ispunjavanje anketnog upitnika provedeno je na Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta Kliničke bolnice Dubrava.

3.1.1. Veličina uzorka

Veličina uzorka izračunata je za potrebe provjere hipoteze na temelju rezultata istraživanja o cirkadijanim vrijednostima MLT-a (85,87). Potrebna veličina uzorka izračunata je koristeći G Power 3.1.9.2. (119). Obzirom da koncentracija salivarnog MLT-a u zdravih ispitanika iznosi između 1- 5 pg/mL tijekom jutra (6 – 9 sati) (85,87), očekivali smo koncentracije salivarnog MLT-a u ispitanika s KUŠ-em niže od 0,5 pg/mL. S vrijednostima $\alpha = 0,05$ i snagom od 0,80 predložena veličina uzorka iznosi 18 ispitanika. Koncentracija serumskog MLT-a u zdravih ispitanika tijekom jutra (6 – 9 sati) iznosi između 30 - 40 pg/mL (85,120) te smo očekivali koncentracije serumskog MLT-a niže od 20 pg/mL u ispitanika s KUŠ-em. S vrijednostima $\alpha = 0,05$ i snagom od 0,80 predložena veličina uzorka iznosi 9 ispitanika.

Stoga je veličina uzorka od 30 ispitanika po skupini za usporedbu salivarne koncentracije MLT-a bila prikladna za provođenje predloženog istraživanja. Uspoređivat će se koncentracije serumskog i salivarnog MLT-a u pojedinim pacijenata s KUŠ-em ($N = 11$).

3.1.2. Indeksi i anamneza

Ispitanici su anketirani upitnikom o kvaliteti sna, hrvatskom verzijom Pittsburg Sleep Quality Index Questionnaire (PSQI) (Privitak 1) (121,122). Anketom su dobivene informacije o kvaliteti sna ispitanika unazad mjesec dana. Anketa se sastoji od 9 cjelina u kojima se ocjenjuje subjektivna kvaliteta sna, trajanje uspavljivanja, trajanje sna, efikasnost sna, poremećaji i smetnje u snu, korištenje lijekova za san i utjecaj sna na dnevne aktivnosti. Svaka se cjelina ocjenjuje rasponom od 0 - 3 (viša vrijednost označava lošiju kvalitetu sna). Autori PSQI predlažu vrijednost indeksa koja je jednaka ili viša od 5, a povezana je s lošom kvalitetom ili poremećajem spavanja.

Za procjenu oralnog zdravlja koristio se Papillary Bleeding Index (PBI) na Ramfjordovim indeksiranim zubima: 16, 21, 24, 36, 41 i 44 (123). Ramfjordovi zubi se godinama koriste i smatraju reprezentativnim za procjenu gingivitisa i parodontitisa cijele usne šupljine (123,124). U slučajevima kada je nedostajao zub uključen u indeks, registrirao se sljedeći najbliži zub. Pacijenti s upalnim stanjima čeljusti i mekih tkiva usne šupljine nisu bili uključeni u istraživanje (ovo se ne odnosi na gingivitis i parodontitis).

PBI se određivao nakon nježnog sondiranja interdentalne papile. Upala gingive se ocjenjivala od 0 - 3 (124):

- 0: nema krvarenja nakon sondiranja
- 1: prisutno je ograničeno točkasto krvarenje
- 2: interdentalna papila ispunjena krvlju (izgled trokuta)
- 3: profuzno krvarenje u smjeru marginalne gingive u donjoj čeljusti ili kapanje krvi preko incizivnog brida u gornjoj čeljusti

Nakon sondiranja Ramfjordovih indeksiranih zuba, uzimala se srednja vrijednost svih PBI skorova dobivenih sondiranjem zuba istog ispitanika.

Uzimanje lijekova indeksiralo se pomoću ATC-a (engl. *Anatomical Therapeutical Chemical Classification System* (125), hrv. anatomsko-terapijska klasifikacija lijekova), dok su se sustavne bolesti indeksirale preko ICD-11 (engl. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*, hrv. Međunarodna klasifikacija bolesti - MKB-11) (126).

Postojanje štetne navike klasificiralo se kao konzumacija alkohola, konzumacija duhana, konzumacija alkohola i duhana te nepostojanje štetne navike. Konzumacija alkohola na dan se registrirala pomoću alkoholnih jedinica. Jedna alkoholna jedinica iznosila je 100 mL vina, 330 mL piva ili 0,05 mL žestokog alkoholnog pića.

Konzumacija duhana registrirala se pomoću dnevnog broja popušanih cigareta.

3. 2. MATERIJALI

Kao uzorak za biokemijske analize korišteni su slina (NS i SS) i svježi serum dobiven centrifugiranjem (1000 x g, 10 minuta) uzoraka krvi ispitanika koji su bili natašte. Uzorak krvi uzet je prilikom rutinskog uzorkovanja krvi pojedinim pacijentima s KUŠ-em. Uzorkovana slina i dobiveni serum su do ELISA analize bili pohranjeni u zamrzivaču na -80°C.

Proizvođači i izvori korištenih reagensa i komercijalnih setova kemikalija navedeni su u daljnjem tekstu.

3. 3. METODE

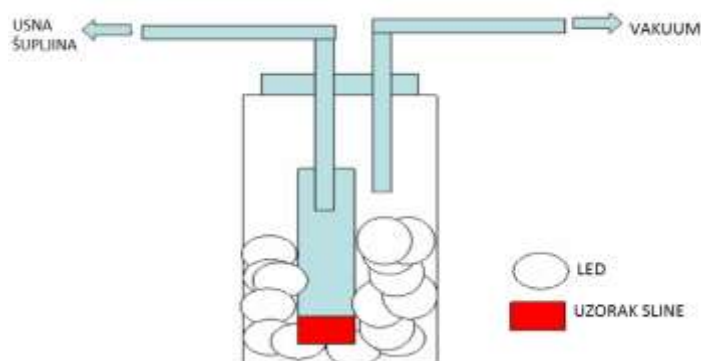
Aparatura za skupljanje sline izrađena je za potrebe ovoga istraživanja po principu onoga korištenog u našem istraživanju (106). ELISA testovi nabavljeni su iz sredstava potpora Sveučilišta u Zagrebu:

- 2017. godine: „Usporedba koncentracija salivarnog i serumskog melatonina oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine“, voditelj prof. dr. sc. Darko Macan,
- 2016. godine: „Kvantifikacija salivarnog melatonina kod pacijenata s karcinomom usne šupljine“, voditelj doc. dr. sc. Brajdić.

Potrošni laboratorijski materijal i multikanalne pipete korištene u ovome istraživanju nabavljene su sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu istraživačkog projekta IP-09-2014-9376, voditelja prof. dr. sc. Darka Macana.

3. 3. 1. Uzorkovanje sline i seruma

Slina svih ispitanika prikupljala se natašte u vremenskom razdoblju od 7 - 9 sati ujutro pomoću posebno izrađene aparature za skupljanje sline (Sl. 10).



Slika 10. Shema aparata za skupljanje sline

Uzorkovanje sline odvijalo se u zamračenoj prostoriji (< 30 lux). Jedan uzorak iznosio je 2 mL sline te je svaki uzorak bio skladišten u semimikro-epruvetama s UV zaštitom (*Eppendorf Tube light protection, Eppendorf Austria GmbH, Wien, Austria*). Svakom ispitaniku uzimao se uzorak NS i SS. Slina se stimulirala žvakanjem parafinskih kocki. Nakon uzorkovanja, uzorak sline se zamrznuo na - 80°C sve do ELISA analize. Obrada zamrznutog uzorka sline i daljnje rukovanje slijedilo je naputke proizvođača MLT ELISA testova.

Uzorak krvi uzet je prilikom rutinskog uzorkovanja krvi pojedinim pacijentima s KUŠ-em u istom vremenskom razdoblju kada i uzorak sline. Uzimanje uzorka krvi također se odvijalo u zamračenoj prostoriji (< 30 lux). Uzorak krvi odmah je nakon uzorkovanja centrifugiran u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava. Nakon centrifugiranja, odvojio se serum i pohranio na - 80°C sve do ELISA analize.

3. 3. 2. ELISA analiza

Analiza uzoraka ELISA metodom (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) provedena je u Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ELISA analiza redovito se koristi u laboratorijskim i kliničkim ispitivanjima od 80-ih godina prošlog stoljeća. Osnovni princip testa je imuno-analitička detekcija u prisutnosti liganda u tekućem uzorku koristeći antitijelo na istraživani antigen.

ELISA ima primjenu u medicini, patologiji biljaka, biotehnologiji i kontroli kvalitete u raznim industrijama (127). ELISA test se najčešće sastoji od više standarda različitih koncentracija, antitijela na određeni antigen, mikrotitarske pločice s jažicama, enzimskog supstrata i deterdženta za ispiranje. Ovisno o molekuli koja se određuje, u testu je moguće pronaći i druge otopine.

Kao i svaka analitička metoda, ELISA uključuje analit, specifičnu supstancu čija se prisutnost u uzorku mjeri kvantitativno ili kvalitativno, tekući uzorak i tekuće reagense. Kao heterogeni test, ELISA testom se odvaja određena komponenta analitičkom reakcijom i adsorpcijom u čvrstoj fazi koja je fizički imobilizirana. Tekući uzorak se dodaje u stacionarnu čvrstu fazu sa specifičnom mogućnošću vezivanja.

U najjednostavnijem tipu ELISA testa, antigeni se iz uzorka koji se analizira vežu za površinu jažice u ELISA mikrotitarskoj pločici. Zatim se dodaje odgovarajuće antitijelo koje se veže za antigen. Antitijelo je najčešće vezano uz enzim te se u zadnjem koraku dodaje enzimski supstrat. Dolazi do kemijske reakcije koja najčešće rezultira promjenom boje.

Svaka ELISA analiza uključuje bar jedno antitijelo specifično za određeni antigen. Uzorak s nepoznatom koncentracijom antigena se nespecifično (adsorpcija na površinu) ili specifično (vezivanje za antitijelo) imobilizira u ELISA mikrotitarskoj pločici (polistirenska pločica). Specifična imobilizacija karakteristična je za „Sandwich“ ELISA-u.

Nakon imobilizacije antigena, dodaje se antitijelo te nastaje kompleks antigen – antitijelo. Antitijelo je uobičajeno kovalentno vezano za enzim. Sam enzim ili sekundarno naknadno

dodano antitijelo (biokonjugacija) „otkrivaju“ ciljani antigen.

Između ovih postupaka mikrotitarska pločica se ispiri otopinom deterdženta (engl. *Wash Buffer*). Deterdžent služi za ispiranje nespecifično vezanih proteina i antitijela.

Na kraju se dodaje enzimski supstrat koji stvara vidljivi signal koji je proporcionalan količini antigena u uzorku.

Kao što je već spomenuto, reagensi ostvaruju signal koji omogućuje kvantifikaciju analita. U konačnoj fazi, prije i tijekom kvantifikacije u spektrofotometru, unutar ELISA jažica, uzorci i reagensi su i dalje prisutni u tekućoj fazi.

Kvantifikacija se uglavnom temelji na detekciji intenziteta odašiljanog svjetla određene valne duljine spektrofotometrom. Važno je napomenuti da su jažice ELISA mikrotitarskih pločica radi navedenog transparentna. Osjetljivost detekcije ovisi o amplifikaciji signala tijekom analitičkih reakcija. Obzirom da su enzimске reakcije dobro poznati amplifikacijski procesi, signal koji stvara određeni enzim vezan na detekcijski reagens, omogućuje ispravnu i točnu kvantifikaciju. Zbog navedenog, ELISA nosi dio imena - enzimski povezan (engl. *enzyme – linked*).

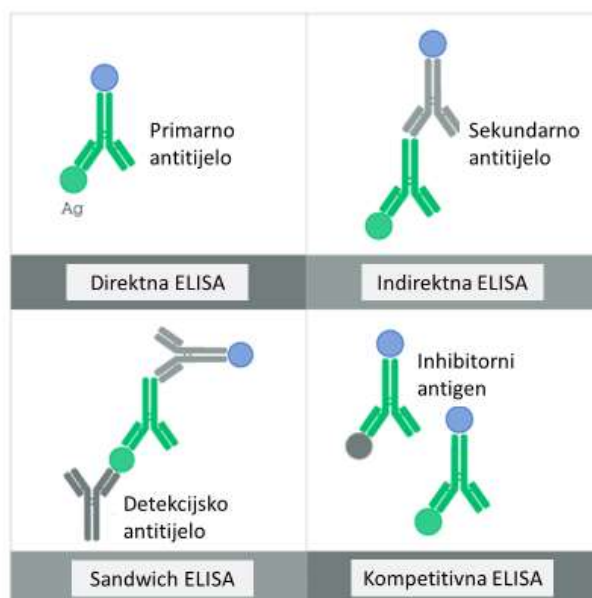
Analit se još naziva ligandom iz razloga što se specifično veže ili ligira za detekcijski reagens. Stoga se ELISA svrstava u kategoriju *ligand binding assays*. Nakon imobilizacije specifično vezujućeg reagensa, koristi se specifična reakcija antigen – antitijelo. Alternativno, ukoliko je analit sam po sebi antitijelo, može se koristiti njegov antigen za vezujući reagens (128).

Koncentracija MLT-a u uzorku slin i seruma određivala se pomoću komercijalno dostupnih Melatonin direct saliva ELISA testa i Melatonin ELISA testa za serum i plazmu (*IBL International GmbH, Hamburg, Germany*) u Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Sl. 11a i 11b).



Slika 11a i 11b. Melatonin direct Saliva ELISA test i Melatonin ELISA test za serum i plazmu

Oba ELISA testa slijede protokol kompetitivne ELISA-e. Postoje brojni komercijalno dostupni ELISA testovi za određene molekule koji koriste odgovarajuća antitijela. ELISA se dijeli na nekoliko tipova prema načinu vezivanja analita i antitijela. Shematski prikaz tipova ELISA analize prikazan je na Sl. 12.



Slika 12. Različiti tipovi ELISA-e analize. Prikaz ponašanja antitijela i antigena u direktnoj, indirektnoj, „Sandwich“ i kompetitivnoj ELISA-i. Preuzeto s (129).

3. 3. 2. 1. Kompetitivna ELISA

Osnovni princip kompetitivnog ELISA testa je da se antitijelo inkubira u prisutnosti antigena. Kompleks antitijelo – antigen zatim se dodaje u ELISA jačice koje su tretirane antigenom (engl. *antigen-coated wells*). Nevezana antitijela uklanjaju se ispiranjem s deterdžentom. Što je više antigena u uzorku, stvara se više kompleksa antigen – antitijelo, a što je više ovih kompleksa, manje je nevezanih antitijela. Stoga se ovaj tip ELISA-e naziva kompetitivnom.

Nakon ispiranja, dodaje se sekundarno antitijelo koje je vezano uz enzim. Nakon dodavanja supstrata, enzimska reakcija dovodi do kromogenog ili fluorescentnog signala. Nakon određenog vremena enzimске reakcije ona se određenom otopinom zaustavlja kako ne bi došlo do saturacije signala.

Pojedini kompetitivni ELISA testovi sadrže antigen vezan s enzimom umjesto antitijela

vezanog na enzim. Tada se označeni antigeni „natječu“ za mjesta u ELISA jažicama s antigenima (nepoznate koncentracije) u uzorku. Što je manje antigena u uzorku, to je više označenih antigena vezano za jažice. Posljedično je jači signal u takvoj jažici ELISA mikrotitarske pločice.

„Nadmetanje“ se u kompetitivnom ELISA testu za određivanje koncentracije serumskog i salivarnog MLT-a odvija između biotiniliranog i nebiotiniliranog antigena za vezivanje na određeni broj mjesta s antitijelom. Količina biotiniliranog antigena vezanog za antitijelo je obrnuto proporcionalna koncentraciji analita u uzorku. Kada je sustav u ravnoteži, slobodni biotinilirani antigen uklanja se ispiranjem (Wash Buffer-om), a spoj antitijelo – biotinilirani antigen određuje se streptavidin-peroksidazom kao biljegom i 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin (TMB) supstratom u ELISA saliva testu i streptavidin alkalnoj fosfatazi kao biljegom i *p*-nitrofenil-fosfatom kao supstratom u ELISA testu za serum i plazmu. Određivanje nepoznate koncentracije MLT-a u uzorku omogućeno je usporedbom enzimske aktivnosti nepoznatih uzoraka s baždarnom krivuljom pripremljenih standarda (*IBL International GmbH, Hamburg, Njemačka*).

3. 3. 2. 2. ELISA protokol za određivanje koncentracije melatonina u slini

Prije svake analize zaleđeni uzorci sline su se odmrznuli i napravljeni su dizajn i shema ELISA mikrotitarske pločice (Tbl. 4). Nakon odmrzavanja, uzorci su centrifugirani na 1000 x g 10 minuta na 4 °C. Supernatant se odvojio od taloga i pripremio u zasebne semimikro epruvete za analizu.

Tablica 4. Slika 12. Primjer dizajna ELISA mikrotitarske pločice za analizu sline.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B (St1)	B (St1)	7D	7D	23D	23D	32D	32D	37D	37D	22D	22D
B	St2	St2	7SD	7SD	23SD	23SD	32SD	32SD	37SD	37SD	22SD	22SD
C	St3	St3	8D	8D	28D	28D	33D	33D	38D	38D	25D	25D
D	St4	St4	8SD	8SD	28SD	28SD	33SD	33SD	38SD	38SD	25SD	25SD
E	St5	St5	11D	11D	29D	29D	34D	34D	40D	40D	44D	44D
F	St6	St6	11SD	11SD	29SD	29SD	34SD	34SD	40SD	40SD	44SD	44SD
G	Con1	Con1	12D	12D	31D	31D	36D	36D	41D	41D	1D	1D
H	Con2	Con2	12SD	12SD	31SD	31SD	36SD	36SD	41SD	41SD	1SD	1SD

*B - blank, St - standard, Con - kontrola, 7D - uzorak NS, 7SD - uzorak SS, plavo - blank, standardi i kontrole, crno - uzorci kontrolne skupine, crveno - uzorci ispitanika s KUŠ-em

Nakon navedenog, pripremljeni su standardi u koncentracijama 0 – 50 pg/mL te je dodano 100 μ L svakog standarda (6 standarda), kontrole (kontrola 1 i kontrola 2) i uzorka u duplikatu u odgovarajuće jažice u ELISA mikrotitarskoj pločici. Nakon toga je u svaku jažicu dodano 50 μ L otopine antiseruma. ELISA mikrotitarska pločica prekrivena je adhezivnom folijom i pažljivo protresena 1 minutu. Nakon toga je slijedila inkubacija uzoraka u trajanju od 18 h. ELISA mikrotitarska pločica je prilikom inkubacije zaštićena od svjetlosti bila pohranjena u hladnjaku na temperaturi od 4 °C. Nakon 18 h uklonjena je adhezivna folija i uklonjena otopina u jažicama. Pločica je isprana 4 puta s 250 μ L razrijeđenog Wash Buffera. Nakon ispiranja, u svaku jažicu dodano je po 100 μ L Biotin otopine. Pločica je ponovno prekrivena adhezivnom folijom i stavljena na inkubaciju 2 h u orbitalni shaker (500rpm, 25 °C). Na sl. 13 prikazan je orbitalni thermoshaker.



Slika 13. Orbitalni thermoshaker Grant Instruments, Cambridge, UK

Nakon inkubacije uklonjena je adhezivna folija i tekućina u jažicama te su jažice isprane 4 puta s 250 μ L razrijeđenog Wash Buffera. Zatim je dodano po 100 μ L enzimskog konjugata u svaku jažicu i pločica stavljena u orbitalni thermoshaker na inkubaciju 1 h na 500 rpm i 25 °C. Uklonjena je adhezivna folija te je pločica ponovno isprana 4 puta s Wash Bufferom. Zatim je dodano po 100 μ L otopine TMB supstrata u svaku jažicu. Slijedila je inkubacija 15 minuta na 500 rpm na 25 °C na orbitalnom thermoshakeru. Nakon inkubacije, uklonjena je adhezivna folija i dodano je 100 μ L TMB Stop otopine. Boja u jažicama se zatim promijenila u žutu. Nakon ove faze, pločica je stavljena u fotometar čitač i optička gustoća mjerena na valnoj duljini od 450 nm unutar 15 minuta od stavljanja TMB Stop otopine. Na sl. 14. prikazan je fotometar čitač.



Slika 14. Fotometar čitač (*Awareness Technologies Stat Fax 4200 Microplate Reader, GMI, Ramsey, USA*).

3. 3. 2. 3. ELISA protokol za određivanje koncentracije melatonina u serumu

ELISA analiza za serum zahtijeva korištenje kolona za ekstrakciju i njihovo prethodno kondicioniranje (Sl. 15). Ekstrakcija iz standarda i kontrola uzoraka provedene su pomoću kolona za ekstrakciju (C18 reversed phase, *IBL International GmbH, Hamburg, Njemačka*) na SPE vakuum Manifold instrumentu (*Restek™ Resprep 12-Port Tube Manifold, Restek, Bellefonte, USA*).

Postupak je obuhvaćao:

1. kondicioniranje kolone,
2. ispiranje,
3. eluiranje.

Kondicioniranje kolona za ekstrakciju provelo se metanolom HPLC čistoće (J.T. Baker, *Avantor Performance Materials B.V., Arnhem, Netherlands*) i bidestilirane vode. Uzorci za analizu su odležani i ponovno centrifugirani na 1000 x g 10 minuta na 4 °C. Supernatant se odvojio od taloga i pripremio u zasebne semimikro epruvete za analizu.

Nakon kondicioniranja kolone, aplicirani su uzorci na kolonu i provelo se ispiranje s 10% metanolom HPLC čistoće u bidestiliranoj vodi. Eluiranje je provedeno metanolom (1 mL) i uzorci su upareni na vakuum uparivaču IKA RV 10 basic V (*IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka*).



Slika 15. Kondicioniranje kolonica za ekstrakciju na SPE vakuum Manifold instrumentu (*Restek™ Resprep 12-Port Tube Manifold, Restek, Bellefonte, USA*)

Nakon evaporacije, svi su se uzorci rekonstruirali u bidestiliranoj vodi (0,150 mL) i po 50 μ L ekstrahiranih standarda, kontrola i uzoraka dodano je u jažice ELISA mikrotitarske pločice (Sl. 16).

Nakon što su se svi uzorci dodali u jažice u ELISA mikrotitarskoj pločici, dodalo se po 50 μ L Melatonin Biotina i antiseruma u svaku jažicu. Pločica se prekrila adhezivnom folijom i ostavila na inkubaciju 18 h na 4 °C. Nakon inkubacije, pločica se isprala 3 puta s 250 μ L razrijeđenog Wash Buffera. Nakon ispiranja, dodano je 150 μ L priređenog enzimskog konjugata u svaku jažicu. Pločica je ponovno prekrivena adhezivnom folijom i stavljena na inkubaciju 120 minuta na 25 °C uz 500 rpm u orbitalni shaker. Nakon inkubacije, uklonjena je otopina i pločica isprana 3 puta s 250 μ L razrijeđenog Wash Buffera. Dodano je po 200 μ L otopine PNPP supstrata u svaku jažicu te je pločica stavljena na inkubaciju 40 minuta na 25 °C i 500 rpm u orbitalnom shakeru. Nakon inkubacije, dodano je u svaku jažicu po 50 μ L PNPP Stop otopine te se pločica stavila u fotometar čitač. Optička gustoća mjerena je na valnoj duljini od 405 nm odmah nakon dodavanja PNPP Stop otopine.



Slika 16. Prikaz pipetiranja uzoraka pomoću multikanalne pipete u ELISA pločicu

Shema ELISA mikrotitarske pločice za analizu MLT-a u serumu prikazana je u Tbl. 5. Analiza apsorbancija dobivenih u fotometar čitaču i izračun koncentracija ELISA testova rađena je u GraphPad Prism 8 programu (*GraphPad Software, San Diego, USA*).

Tablica 5. Shema dizajna ELISA mikrotitarske pločice za analizu seruma.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B (StA)	B (StA)	50	50	58	58	51 ½	51 ½	59 ½	59 ½	B (StA)	B (StA)
B	StB	StB	51	51	59	59	52 ½	52 ½	76 ½	76 ½	StB	StB
C	StC	StC	52	52	76	76	53 ½	53 ½	246 ½	246 ½	StC	StC
D	StD	StD	53	53	246	246	54 ½	54 ½	248 ½	248 ½	StD	StD
E	StE	StE	54	54	248	248	55 ½	55 ½	249 ½	249 ½	StE	StE
F	StF	StF	55	55	249	249	56 ½	56 ½	266 ½	266 ½	StF	StF
G	Con1	Con1	56	56	266	266	57 ½	57 ½	50 ½	50 ½	Con1	Con1
H	Con2	Con2	57	57	50 ½	50 ½	58 ½	58 ½	76 ½	76 ½	Con2	Con2

*Crno - uzorak seruma ispitanika s KUŠ-em, crveno - uzorak kontrola, 51 ½ - 50% razrijeđeni uzorak 51, zeleno - standardi i kontrole, St - standard, B - blank, Con – kontrola

3. 4. ETIČNOST ISTRAŽIVANJA I SUKOB INTERESA

Procjena etičnosti zatražena je prije početka istraživanja. Istraživanje je pozitivno ocijenilo Etičko povjerenstvo Stomatološkog fakulteta i Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Dubrava. Svaki sudionik istraživanja dragovoljno se uključio u istraživanje, a sudjelovanje u istraživanju potvrdio je potpisivanjem informiranog pristanka. Autori istraživanja izjavljuju da prilikom izrade ovoga rada nisu bili u sukobu interesa.

3. 5. STATISTIČKA ANALIZA

Kategorijski podaci prikazani su frekvencijom i relativnom frekvencijom te uspoređeni hi-kvadrat testom. Post-hoc analiza za hi-kvadrat test učinjena je t-testom proporcija.

Kvantitativni podaci prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom obzirom da varijable značajno odstupaju od normalnih vrijednosti (Kolmogorov-Smirnov test). Dvije skupine kvantitativnih podataka uspoređene su Mann Whitneyevim U testom. U izradi prediktivnog

modela KUŠ-a korištena je logistička regresija.

Za usporedbu metoda mjerenja MLT-a korištena je Passing Bablock regresija.

Za procjenu graničnih vrijednosti MLT-a te za izračun osjetljivosti i specifičnosti korištena je ROC analiza. Povezanost je izračunata Spearmanovim neparametrijskim koeficijentom korelacije.

Podaci su prikupljeni i pohranjeni u bazi podataka u programu MS Excel. Statistička obrada podataka napravljena je u programu MedCalc ver. 16. 2. 1. (*MedCalc Software, Ostend, Belgium*).

Razina statističke značajnosti određena je na 5 % ($p < 0,05$) i svi intervali pouzdanosti dani na 95 %-tnoj razini.

4. REZULTATI

4.1. DIZAJN ELISA TESTOVA, DOBIVENE APSORBANCIJE I KONCENTRACIJE MELATONINA U SLINI

U tbl. 6. prikazana je shema jažica prvo korištenog ELISA testa, ELISA 1 (Pre-test). Analizirana su 2 uzorka pacijenata s KUŠ-em te dva uzorka zdravih ispitanika. Analiza je provedena u duplikatu pri čemu je analiziran uzorak NS i SS svakog ispitanika te su se isti uzorci razrijedili prema naputcima proizvođača ELISA testa za vrijednosti veće od 50 pg/mL: u jažice predviđene za razrijeđene uzorke dodano je, umjesto 100 µL čistog uzorka, 50 µL uzorka sline i 50 µL standarda A (0 pg/mL MLT).

Tablica 6. Dizajn jažica prvo korištene ELISA mikrotitarske pločice, ELISA 1.

	1	2	3	4	5	6
A	StA /B	StA /B	1D	1D	1D ½	1D ½
B	StB	StB	1SD	1SD	1SD ½	1SD ½
C	StC	StC	2D	2D	2D ½	2D ½
D	StD	StD	2SD	2SD	2SD ½	2SD ½
E	StE	StE	20D	20D	20D ½	20D ½
F	StF	StF	20SD	20SD	20SD ½	20SD ½
G	Con1	Con1	21D	21D	21D ½	21D ½
H	Con2	Con2	21SD	21SD	21SD ½	21SD ½

*Crno = uzorak sline zdravog ispitanika; Crveno = uzorak sline osobe s KUŠ; 1D ½ = 50% razrijeđeni uzorak; 1D= uzorak nestimulirane sline; 1SD= uzorak stimulirane sline; StA = standard A; B= blank; Con = kontrola

U tbl. 7. prikazana je GraphPad analiza ELISA testa iz tbl. 6.

Tablica 7. Prikaz GraphPad analize 1. U prvoj tablici su prikazane vrijednosti standarda s lijeve strane i vrijednosti apsorbancija standarda i uzoraka (paralele) s desne strane. U drugoj tablici prikazane su vrijednosti analize. U trećoj tablici prikazane su izračunate koncentracije MLT-a u uzorcima i srednje vrijednosti apsorbancija svakog pojedinog uzorka.

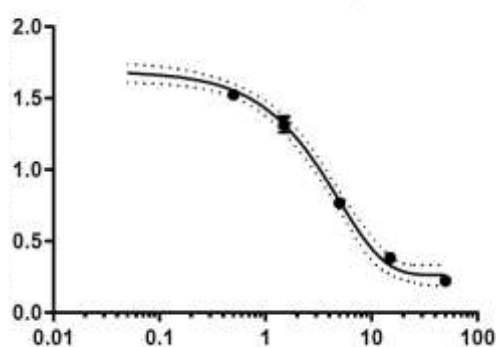
Table format: XY		X	Group A	
		Koncentracija MLT standardi (pg/mL)	Absorbancije	
		X	A:Y1	A:Y2
1	Title	0.0	1.741	1.695
2	Title	0.5	1.541	1.507
3	Title	1.5	1.354	1.277
4	Title	5.0	0.750	0.783
5	Title	15.0	0.407	0.358
6	Title	50.0	0.221	0.225
7	Title		1.198	1.157
8	Title		0.300	0.337
9	Title		1.614	1.529
10	Title		1.641	1.687
11	Title		1.540	1.556
12	Title		1.797	1.677
13	Title		0.621	0.614
14	Title		1.150	1.012
15	Title		1.251	1.042
16	Title		1.504	1.387
17	Title		3.050	2.997
18	Title		3.233	3.006
19	Title		2.989	2.881
20	Title		3.550	3.651
21	Title		1.112	1.223
22	Title		2.067	1.998
23	Title		2.221	2.119
24	Title		2.587	2.552
25	Title		2.887	2.979

1	Sigmoidal, 4PL, X is log(concentration)	
2	Best-fit values	
3	Top	3086
4	Bottom	0.2616
5	LogIC50	-37.88
6	HillSlope	-0.08803
7	IC50	1.332e-038
8	Span	3085
9	95% CI (asymptotic)	
10	Top	-6478347 to 6484519
11	Bottom	0.1879 to 0.3353
12	LogIC50	-10431 to 10355
13	HillSlope	-0.1477 to -0.02839
14	IC50	0.000 to +infinity
15	Span	-6478348 to +infinity
16	Goodness of Fit	
17	Degrees of Freedom	8
18	R squared	0.9952
19	Adjusted R squared	0.9934
20	Sum of Squares	0.01842
21	Replicates test for lack of fit	
22	SD replicates	0.03254
23	SD lack of fit	0.07769
24	Discrepancy (F)	5.700
25	P value	0.0410
26	Evidence of inadequate model?	Yes
27	Test for homoscedasticity	
28	Rs of predicted Y vs. residual	-0.07068
29	P value (one tailed)	0.4204
30	Passed (P > 0.05)?	Yes
31		
32	Number of points	
33	# of X values	12
34	# Y values analyzed	12

		Koncentracija MLT (pg/mL)	Apsorbancije (Entered)
		X	
1		2.193	1.178
2		15.901	0.319
3		0.427	1.572
4		0.090	1.664
5		0.517	1.548
6			1.737
7		6.857	0.618
8		2.742	1.081
9		2.363	1.147
10		0.926	1.446
11			3.024
12			3.120
13			2.935
14			3.601
15		2.247	1.168
16			2.033
17			2.170
18			2.570
19			2.933

*Kada vrijednost nije upisana tj. kada ista nedostaje, koncentracija u uzorku je ispod limita detekcije

Na sl. 17. prikazana je standardna krivulja prve ELISA analize s vrlo visokim koeficijentom multiple korelacije $R^2 = 0.995$.



Slika 17. Standardna krivulja ELISA analize 1, $R^2 = 0,995$. Na y osi prikazana je vrijednost apsorbancije, a na x osi koncentracije MLT-a (pg/mL).

Dobiveni rezultati ukazuju da su vrijednosti nerazrijeđenih uzoraka unutar detekcijskog raspona ELISA testa te su doveli do zaključka da uzorke nije potrebno razrjeđivati.

U tbl. 8. prikazan je dizajn mikrotitarske pločice sljedećeg ELISA testiranja, ELISA 2 (korišten isti ELISA test kao i u prvom testiranju), a u tbl. 9. GraphPad analiza istoga.

Tablica 8. Dizajn jažica ELISA 2 analize

	1	2	3	4	5	6
A	B (St1)	B (St1)	9D	9D	5D	5D
B	St2	St2	9SD	9SD	5SD	5SD
C	St3	St3	10D	10D	6D	6D
D	St4	St4	10SD	10SD	6SD	6SD
E	St5	St5	22SD	22SD	30D	30D
F	St6	St6	22D	22D	30SD	30SD
G	Con1	Con1	25D	25D	35D	35D
H	Con2	Con2	25SD	25SD	35SD	35SD

*Crno = uzorak sline zdravog ispitanika; Crveno = uzorak sline osobe s KUŠ; 9D= uzorak nestimulirane sline; 9SD= uzorak stimulirane sline; StA = standard A; B= blank; Con = kontrola

Tablica 9. Prikaz GraphPad analize 2. U prvoj tablici su prikazane vrijednosti standarda s lijeve strane i vrijednosti apsorbancija standarda i uzoraka (paralele) s desne strane. U drugoj tablici prikazane su vrijednosti analize. U trećoj tablici prikazane su izračunate koncentracije MLT-a u uzorcima i srednje vrijednosti apsorbancija svakog pojedinog uzorka.

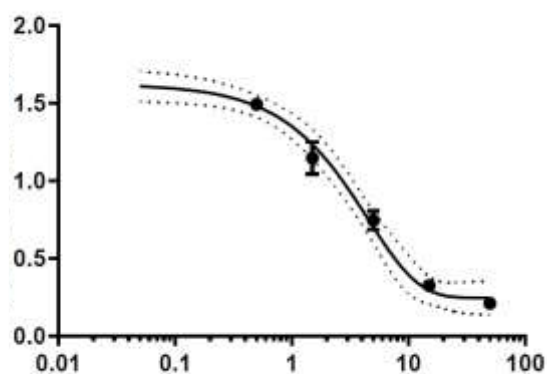
Table format: XY		X	Group A	
		Koncentracija standarda (pg/mL) (Interpolated)	Absorbancije	
		X	A:Y1	A:Y2
1	Title	0.0	1.651000	1.6720
2	Title	0.5	1.482000	1.5030
3	Title	1.5	1.074000	1.2210
4	Title	5.0	0.789000	0.7030
5	Title	15.0	0.336000	0.3140
6	Title	50.0	0.223000	0.2000
7	Title		1.232000	1.0670
8	Title		0.268000	0.2530
9	Title		1.463000	1.5570
10	Title		1.370000	1.4820
11	Title		1.064000	0.9770
12	Title		1.424000	1.3190
13	Title		1.442000	1.3270
14	Title		1.234000	1.1450
15	Title		1.181000	1.0480
16	Title		1.064000	1.0520
17	Title		0.591484	0.5830
18	Title		0.903300	0.8870
19	Title		1.398500	1.3860
20	Title		1.310000	1.3448
21	Title		1.120000	1.1168
22	Title		1.386300	1.3900
23	Title		0.905000	0.2030
24	Title		0.568000	1.0610

1	Sigmoidal, 4PL, X is log(concentration)	
2	Best-fit values	
3	Top	3636
4	Bottom	0.2459
5	LogIC50	-35.56
6	HillSlope	-0.09619
7	IC50	2.728e-036
8	Span	3636
9	95% CI (asymptotic)	
10	Top	-14774089 to 14781362
11	Bottom	0.1388 to 0.3530
12	LogIC50	-18428 to 18357
13	HillSlope	-0.1986 to 0.006187
14	IC50	0.000 to +infinity
15	Span	-14774089 to +infinity
16	Goodness of Fit	
17	Degrees of Freedom	8
18	R squared	0.9885
19	Adjusted R squared	0.9842
20	Sum of Squares	0.04183
21	Replicates test for lack of fit	
22	SD replicates	0.05074
23	SD lack of fit	0.1148
24	Discrepancy (F)	5.122
25	P value	0.0504
26	Evidence of inadequate model?	No
27	Test for homoscedasticity	
28	Rs of predicted Y vs. residual	-0.01414
29	P value (one tailed)	0.4909
30	Passed (P > 0.05)?	Yes
31		
32	Number of points	
33	# of X values	12
34	# Y values analyzed	12

		X	A
		Koncentracija MLT (pg/mL) (Interpolated)	Apsorbancije (Entered)
		X	
1		1.909	1.150
2		20.534	0.261
3		0.393	1.510
4		0.704	1.426
5		2.605	1.021
6		0.917	1.372
7		0.865	1.385
8		1.714	1.190
9		2.068	1.115
10		2.392	1.058
11		6.306	0.587
12		3.402	0.895
13		0.835	1.392
14		1.098	1.327
15		2.068	1.118
16		0.851	1.388
17		6.768	0.554
18		4.001	0.815

*Kada vrijednost nije upisana tj. kada ista nedostaje, koncentracija u uzorku je ispod limita detekcije

Na sl. 18. prikazana je standardna krivulja druge ELISA analize s vrlo visokim koeficijentom multiple korelacije $R^2 = 0.989$.



Slika 18. Standardna krivulja ELISA analize 2, $R^2 = 0.989$. Na y osi prikazana je vrijednost apsorbancije, a na x osi koncentracije MLT-a (pg/mL).

Analizom apsorbancija uočena je pogreška, vjerojatno nastala prilikom pipetiranja uzoraka i/ili reagensa i to za uzorke 22, 25 i 35. Isti uzorci ponovno su analizirani u sljedećim testiranjima.

U tbl. 10. prikazan je dizajn mikrotitarske pločice sljedećeg ELISA testiranja, ELISA 3, a u tbl. 11. GraphPad analiza istog.

Tablica 10. Dizajn jažica ELISA 3 analize

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	StA /B	StA /B	3D	3D	16D	16D	26D	26D	37D	37D	44D	44D
B	StB	StB	3SD	3SD	16SD	16SD	26SD	26SD	37SD	37SD	44SD	44SD
C	StC	StC	4D	4D	17D	17D	27D	27D	39D	39D	45D	45D
D	StD	StD	4SD	4SD	17SD	17SD	27SD	27SD	39SD	39SD	45SD	45SD
E	StE	StE	13D	13D	18D	18D	15D	15D	42D	42D	46D	46D
F	StF	StF	13SD	13SD	18SD	18SD	15SD	15SD	42SD	42SD	46SD	46SD
G	Con1	Con1	14D	14D	19D	19D	24D	24D	43D	43D	47D	47D
H	Con2	Con2	14SD	14SD	19SD	19SD	24SD	24SD	43SD	43SD	47SD	47SD

*Crno = uzorak sline zdravog ispitanika; Crveno = uzorak sline osobe s KUŠ; 3D= uzorak nestimulirane sline; 3SD= uzorak stimulirane sline; StA = standard A; B= blank; Con = kontrola

Tablica 11. Prikaz GraphPad analize 3. U prvoj tablici su prikazane vrijednosti standarda s lijeve strane i vrijednosti apsorbancija standarda i uzoraka (paralele) s desne strane. U drugoj tablici prikazane su vrijednosti analize. U trećoj tablici prikazane su izračunate koncentracije MLT-a u uzorcima i srednje vrijednosti apsorbancija svakog pojedinog uzorka.

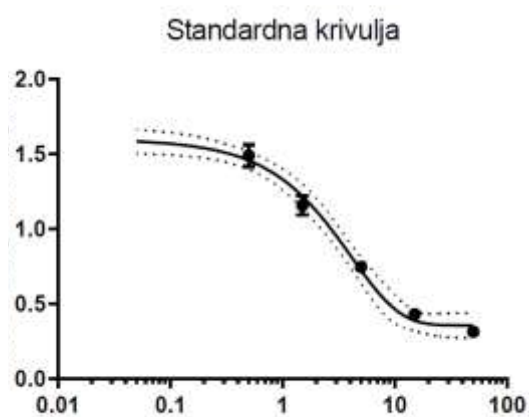
Table format: XY		X	Group A	
		Koncentracija standarda (pg/mL)	Apsorbancije	
		X	A:Y1	A:Y2
1	Title	0.0	1.609	1.600
2	Title	0.5	1.542	1.438
3	Title	1.5	1.204	1.112
4	Title	5.0	0.751	0.742
5	Title	15.0	0.424	0.438
6	Title	50.0	0.310	0.319
7	Title		1.306	1.371
8	Title		0.365	0.367
9	Title		1.510	1.371
10	Title		2.150	2.078
11	Title		1.809	1.454
12	Title		1.943	1.572
13	Title		1.463	1.569
14	Title		1.827	1.700
15	Title		2.185	1.926
16	Title		2.199	1.988
17	Title		1.173	1.658
18	Title		1.773	1.939
19	Title		1.352	1.060
20	Title		1.241	1.298
21	Title		2.203	2.101
22	Title		2.312	2.399
23	Title		2.001	1.807
24	Title		2.135	1.933
25	Title		1.376	1.347
26	Title		1.435	1.472
27	Title		1.626	1.440
28	Title		1.728	1.639
29	Title		1.054	0.896
30	Title		1.488	1.277
31	Title		1.677	1.645
32	Title		1.594	1.467
33	Title		0.910	0.976
34	Title		1.238	1.151
35	Title		1.572	1.598
36	Title		1.734	1.727
37	Title		1.279	1.325
38	Title		1.644	1.498
39	Title		1.159	1.176
40	Title		1.396	1.309
41	Title		1.219	1.172
42	Title		2.067	2.305
43	Title		1.032	1.069
44	Title		1.019	1.018
45	Title		1.563	1.317
46	Title		1.618	2.053
47	Title		0.899	0.748
48	Title		1.506	1.272

1	Sigmoidal, 4PL, X is log(concentration)	
2	Best-fit values	
3	Top	2780
4	Bottom	0.3563
5	LogIC50	-31.70
6	HillSlope	-0.1057
7	IC50	2.011e-032
8	Span	2779
9	95% CI (asymptotic)	
10	Top	-8563856 to 8569416
11	Bottom	0.2730 to 0.4396
12	LogIC50	-12733 to 12670
13	HillSlope	-0.2052 to -0.006178
14	IC50	0.000 to +infinity
15	Span	-8563857 to +infinity
16	Goodness of Fit	
17	Degrees of Freedom	8
18	R squared	0.9907
19	Adjusted R squared	0.9872
20	Sum of Squares	0.02766
21	Replicates test for lack of fit	
22	SD replicates	0.04054
23	SD lack of fit	0.09434
24	Discrepancy (F)	5.416
25	P value	0.0453
26	Evidence of inadequate model?	Yes
27	Test for homoscedasticity	
28	Rs of predicted Y vs. residual	-0.4806
29	P value (one tailed)	0.0601
30	Passed (P > 0.05)?	Yes
31		
32	Number of points	
33	# of X values	12
34	# Y values analyzed	12

		X	A
		Koncentracija MLT (pg/mL) (Interpolated)	Absorbancije (Entered)
		X	
1		0.967	1.339
2		19.948	0.366
3		0.561	1.441
4			2.114
5			1.632
6			1.758
7		0.284	1.516
8			1.764
9			2.056
10			2.094
11		0.657	1.416
12			1.856
13		1.563	1.206
14		1.267	1.270
15			2.152
16			2.356
17			1.904
18			2.034
19		0.872	1.362
20		0.512	1.454
21		0.225	1.533
22			1.684
23		2.867	0.975
24		0.787	1.383
25			1.661
26		0.233	1.531
27		3.086	0.943
28		1.619	1.195
29		0.047	1.585
30			1.731
31		1.123	1.302
32		0.094	1.571
33		1.754	1.168
34		0.909	1.353
35		1.614	1.196
36			2.186
37		2.394	1.051
38		2.588	1.019
39		0.563	1.440
40			1.836
41		4.022	0.824
42		0.761	1.389

*Kada vrijednost nije upisana tj. kada ista nedostaje, koncentracija u uzorku je ispod limita detekcije

Na sl. 19. prikazana je standardna krivulja ELISA analize 3.



Slika 19. Standardna krivulja ELISA analize 4, $R^2 = 0,9907$. Na y osi prikazana je vrijednost apsorbancije, a na x osi koncentracije MLT-a (pg/mL).

Prilikom ELISA 3 testiranja postavila se sumnja na pogreške prilikom pipetiranja. Kod nekih je ta pogreška i uočljiva usporedbom apsorbancija. Radi navedenog, uzorci 4, 14, 17, 37, 39, 44, 46, 47 su naknadno analizirani u sljedećim ELISA analizama.

U tbl. 12. prikazan je dizajn mikrotitarske pločice sljedećeg ELISA testiranja, ELISA 4, a u tbl. 13. GraphPad analiza istog.

Tablica 12. Dizajn jažica ELISA 4 analize

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	StA /B	StA /B	7D	7D	23D	23D	32D	32D	37D	37D	22D	22D
B	StB	StB	7SD	7SD	23SD	23SD	32SD	32SD	37SD	37SD	22SD	22SD
C	StC	StC	8D	8D	28D	28D	33D	33D	38D	38D	25D	25D
D	StD	StD	8SD	8SD	28SD	28SD	33SD	33SD	38SD	38SD	25SD	25SD
E	StE	StE	11D	11D	29D	29D	34D	34D	40D	40D	44D	44D
F	StF	StF	11SD	11SD	29SD	29SD	34SD	34SD	40SD	40SD	44SD	44SD
G	Con1	Con1	12D	12D	31D	31D	36D	36D	41D	41D	60D	60D
H	Con2	Con2	12SD	12SD	31SD	31SD	36SD	36SD	41SD	41SD	60SD	60SD

*Crno = uzorak sline zdravog ispitanika; Crveno = uzorak sline osobe s KUŠ; 7D= uzorak nestimulirane sline; 7SD= uzorak stimulirane sline; StA = standard A; B= blank; Con = kontrola

Tablica 13. Prikaz GraphPad analize 4. U prvoj tablici su prikazane vrijednosti standarda s lijeve strane i vrijednosti apsorbancija standarda i uzoraka (paralele) s desne strane. U drugoj tablici prikazane su vrijednosti analize. U trećoj tablici prikazane su izračunate koncentracije MLT-a u uzorcima i srednje vrijednosti apsorbancija svakog pojedinog uzorka.

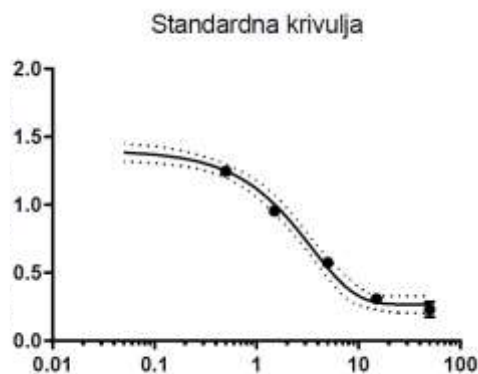
Table format: XY		X	Group A	
		Koncentracija standarda (pg/mL) (Interpolated)	Absorbancije	
		X	A:Y1	A:Y2
1	Title	0.000	1.400	1.452
2	Title	0.500	1.231	1.262
3	Title	1.500	0.965	0.942
4	Title	5.000	0.556	0.591
5	Title	15.000	0.303	0.311
6	Title	50.000	0.192	0.270
7	Title		0.728	1.347
8	Title		0.160	0.424
9	Title		0.874	0.757
10	Title		0.789	0.833
11	Title		0.687	0.793
12	Title		0.812	0.853
13	Title		1.025	0.862
14	Title		1.214	1.188
15	Title		0.992	0.937
16	Title		1.072	1.027
17	Title		1.169	1.164
18	Title		1.260	1.201
19	Title		1.026	1.010
20	Title		1.105	0.982
21	Title		1.017	1.005
22	Title		1.143	1.031
23	Title		1.028	0.851
24	Title		0.947	0.777
25	Title		1.324	1.441
26	Title		1.302	1.391
27	Title		0.946	0.816
28	Title		0.812	0.722
29	Title		1.439	1.035
30	Title		1.272	1.064
31	Title		1.143	0.885
32	Title		1.123	1.001
33	Title		1.070	0.783
34	Title		0.942	0.840
35	Title		1.084	1.062
36	Title		1.448	1.304
37	Title		1.672	1.346
38	Title		1.787	1.573
39	Title		0.717	0.644
40	Title		0.922	0.962
41	Title		1.006	1.136
42	Title		1.334	1.401
43	Title		0.835	0.775
44	Title		0.760	0.989
45	Title		1.056	1.172
46	Title		1.151	1.133
47	Title		1.113	1.425
48	Title		1.367	1.293

1	Sigmoidal, 4PL, X is log(concentration)	
2	Best-fit values	
3	Top	3585
4	Bottom	0.2667
5	LogIC50	-28.01
6	HillSlope	-0.1249
7	IC50	9.717e-029
8	Span	3584
9	95% CI (asymptotic)	
10	Top	-13121094 to 13128263
11	Bottom	0.2034 to 0.3300
12	LogIC50	-12782 to 12726
13	HillSlope	-0.2223 to -0.02759
14	IC50	0.000 to +infinity
15	Span	-13121095 to +infinity
16	Goodness of Fit	
17	Degrees of Freedom	8
18	R squared	0.9924
19	Adjusted R squared	0.9896
20	Sum of Squares	0.01869
21	Replicates test for lack of fit	
22	SD replicates	0.03105
23	SD lack of fit	0.08032
24	Discrepancy (F)	6.693
25	P value	0.0296
26	Evidence of inadequate model?	Yes
27	Test for homoscedasticity	
28	Rs of predicted Y vs. residual	-0.2403
29	P value (one tailed)	0.2292
30	Passed (P > 0.05)?	Yes
31		
32	Number of points	
33	# of X values	12
34	# Y values analyzed	12

		X	A
		Koncentracija MLT (pg/mL) (Interpolated)	Absorbancije (Entered)
		X	
1		1.343	1.038
2		13.218	0.292
3		2.524	0.816
4		2.552	0.811
5		3.038	0.740
6		2.418	0.833
7		1.795	0.944
8		0.674	1.201
9		1.689	0.965
10		1.289	1.050
11		0.805	1.167
12		0.566	1.231
13		1.432	1.018
14		1.316	1.044
15		1.464	1.011
16		1.126	1.087
17		1.815	0.940
18		2.241	0.862
19		0.056	1.383
20		0.171	1.347
21		2.749	0.781
22		2.845	0.767
23		0.542	1.237
24		0.799	1.168
25		1.450	1.014
26		1.234	1.062
27		1.883	0.927
28		2.076	0.891
29		1.186	1.073
30		0.077	1.376
31			1.509
32			1.680
33		3.505	0.681
34		1.803	0.942
35		1.195	1.071
36		0.104	1.368
37		2.591	0.805
38		2.169	0.875
39		1.014	1.114
40		0.901	1.142
41		0.430	1.269
42		0.224	1.330

*Kada vrijednost nije upisana tj. kada ista nedostaje, koncentracija u uzorku je ispod limita detekcije

Na sl. 20. prikazana je standardna krivulja ELISA 4 analize.



Slika 20. Standardna krivulja ELISA 4 analize, $R^2 = 0,992$. Na y osi prikazana je vrijednost apsorbancije, a na x osi koncentracije MLT-a (pg/mL).

Uočena je potencijalna pogreška prilikom pipetiranja uzoraka 38 i 40. Analiza istih uzoraka je kasnije ponovljena. U tbl. 14. prikazan je dizajn mikrotitarske pločice sljedećeg ELISA testiranja, ELISA 5, a u tbl. 15. GraphPad analiza istog.

Tablica 14. Dizajn jažica ELISA 5 analize

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	StA /B	StA /B	48D	48D	49D	49D	53D	53D	47D	47D	57D	57D
B	StB	StB	48SD	48SD	49SD	49SD	53SD	53SD	47SD	47SD	57SD	57SD
C	StC	StC	58D	58D	50D	50D	54SD	54SD	61D	61D	14D	14D
D	StD	StD	58SD	58SD	50SD	50SD	54SD	54SD	61SD	61SD	14SD	14SD
E	StE	StE	59D	59D	51D	51D	65D	65D	62D	62D	63D	63D
F	StF	StF	59SD	59SD	51SD	51SD	65SD	65SD	62SD	62SD	63SD	63SD
G	Con1	Con1	76D	76D	52D	52D	X1	X1	17D	17D	64D	64D
H	Con2	Con2	76SD	76SD	52SD	52SD	X1S	X1S	17SD	17SD	64SD	64SD

*Crno = uzorak sline zdravog ispitanika; Crveno = uzorak sline osobe s KUŠ; 48D= uzorak nestimulirane sline; 48SD= uzorak stimulirane sline; StA = standard A; B= blank; Con = kontrola

Tablica 15. Prikaz GraphPad analize 5. U prvoj tablici su prikazane vrijednosti standarda s lijeve strane i vrijednosti apsorbancija standarda i uzoraka (paralele) s desne strane. U drugoj tablici prikazane su vrijednosti analize. U trećoj tablici prikazane su izračunate koncentracije MLT-a u uzorcima i srednje vrijednosti apsorbancija svakog pojedinog uzorka.

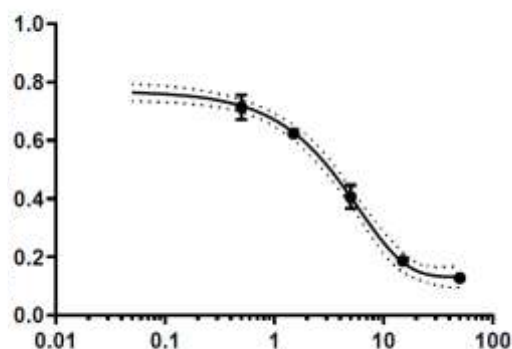
Table format: XY		X	Group A	
		Koncentracija standarda(pg/mL) (Interpolated)	Absorbancije	
		X	A:Y1	A:Y2
1	Title	0.0	0.788	0.765
2	Title	0.5	0.743	0.684
3	Title	1.5	0.627	0.620
4	Title	5.0	0.435	0.378
5	Title	15.0	0.191	0.184
6	Title	50.0	0.137	0.118
7	Title		0.541	0.566
8	Title		0.159	0.153
9	Title		1.155	1.111
10	Title		0.913	0.833
11	Title		0.812	0.876
12	Title		1.103	1.181
13	Title		0.840	0.739
14	Title		1.194	0.720
15	Title		0.685	1.087
16	Title		0.823	0.911
17	Title		0.438	0.484
18	Title		0.731	0.677
19	Title		0.497	0.621
20	Title		0.506	0.512
21	Title		0.872	0.889
22	Title		0.787	0.670
23	Title		0.898	0.787
24	Title		1.047	0.849
25	Title		0.676	0.659
26	Title		0.871	0.788
27	Title		0.820	0.648
28	Title		0.667	0.610
29	Title		1.016	0.903
30	Title		1.300	1.225
31	Title		0.570	0.398
32	Title		0.498	0.508
33	Title		0.404	0.638
34	Title		0.857	0.746
35	Title		0.781	0.645
36	Title		0.945	0.690
37	Title		0.684	0.607
38	Title		1.403	0.679
39	Title		0.662	0.583
40	Title		0.779	0.763
41	Title		1.017	1.134
42	Title		1.024	0.752
43	Title		0.728	0.718
44	Title		1.158	0.763
45	Title		0.738	0.856
46	Title		0.961	0.777
47	Title		0.912	0.733
48	Title		0.823	0.768

1	Sigmoidal, 4PL, X is log(concentration)	
2	Best-fit values	
3	Top	514.1
4	Bottom	0.1311
5	LogIC50	-39.72
6	HillSlope	-0.07315
7	IC50	1.924e-040
8	Span	514.0
9	95% CI (asymptotic)	
10	Top	-393765 to 394793
11	Bottom	0.09446 to 0.1677
12	LogIC50	-4625 to 4545
13	HillSlope	-0.1222 to -0.02413
14	IC50	0.000 to +infinity
15	Span	-393765 to +infinity
16	Goodness of Fit	
17	Degrees of Freedom	8
18	R squared	0.9946
19	Adjusted R squared	0.9926
20	Sum of Squares	0.004108
21	Replicates test for lack of fit	
22	SD replicates	0.02536
23	SD lack of fit	0.01115
24	Discrepancy (F)	0.1933
25	P value	0.8292
26	Evidence of inadequate model?	No
27	Test for homoscedasticity	
28	Rs of predicted Y vs. residual	0.1696
29	P value (one tailed)	0.3038
30	Passed (P > 0.05)?	Yes
31		
32	Number of points	
33	# of X values	12
34	# Y values analyzed	12

		X	A
		Koncentracija MLT (pg/mL) (Interpolated)	Absorbancije (Entered)
		X	
1		2.457	0.554
2		19.266	0.156
3			1.133
4			0.873
5			0.844
6			1.142
7			0.790
8			0.957
9			0.886
10			0.867
11		3.925	0.461
12		0.645	0.704
13		2.380	0.559
14		3.118	0.509
15			0.881
16		0.397	0.729
17			0.843
18			0.948
19		1.037	0.668
20			0.830
21		0.342	0.734
22		1.367	0.639
23			0.960
24			1.263
25		3.525	0.484
26		3.213	0.503
27		2.932	0.521
28			0.802
29		0.553	0.713
30			0.818
31		1.286	0.646
32			1.041
33		1.557	0.623
34			0.771
35			1.076
36			0.888
37		0.452	0.723
38			0.961
39			0.797
40			0.869
41			0.823
42			0.796

*Kada vrijednost nije upisana tj. kada ista nedostaje, koncentracija u uzorku je ispod limita detekcije

Na sl. 21. prikazana je standardna krivulja ELISA 5 analize.



Slika 21. Standardna krivulja ELISA 5 analize, $R^2 = 0,995$. Na y osi prikazana je vrijednost apsorbancije, a na x osi koncentracije MLT-a (pg/mL).

Prilikom ELISA 5 analize posumnjalo se na pogreške prilikom pipetiranja. Kod nekih je ta pogreška uočljiva usporedbom apsorbancija. Analiza uzoraka 48, 58, 59, 76, 50, 51, 52, 53 i 54 je ponovljena u ELISA 6 analizi. U tbl. 16. prikazan je dizajn mikrotitarske pločice sljedećeg ELISA testiranja, ELISA 6, a u tbl. 17. GraphPad analiza istog.

Tablica 16. Dizajn jažica ELISA 6 analize

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B (StA)	B (StA)	50D	50D	54D	54D	58D	58D	40D	40D	24D	24D
B	StB	StB	50SD	50SD	54SD	54SD	58SD	58SD	40SD	40SD	24SD	24SD
C	StC	StC	51D	51D	55D	55D	59D	59D	46D	46D	26D	26D
D	StD	StD	51SD	51SD	55SD	55SD	59SD	59SD	46SD	46SD	26SD	26SD
E	StE	StE	52D	52D	56D	56D	76SD	76SD	48D	48D	19D	19D
F	StF	StF	52SD	52SD	56SD	56SD	76SD	76SD	48SD	48SD	19SD	19SD
G	Con1	Con1	53D	53D	57D	57D	39D	39D	4D	4D	35D	35D
H	Con2	Con2	53SD	53SD	57SD	57SD	39SD	39SD	4SD	4SD	35SD	35SD

*Crno = uzorak sline zdravog ispitanika; Crveno = uzorak sline osobe s KUS; 50D= uzorak nestimulirane sline; 50SD= uzorak stimulirane sline; StA = standard A; B= blank; Con = kontrola

Tablica 17. Prikaz GraphPad analize 6. U prvoj tablici su prikazane vrijednosti standarda s lijeve strane i vrijednosti apsorbancija standarda i uzoraka (paralele) s desne strane. U drugoj tablici prikazane su vrijednosti analize. U trećoj tablici prikazane su izračunate koncentracije MLT-a u uzorcima i srednje vrijednosti apsorbancija svakog pojedinog uzorka.

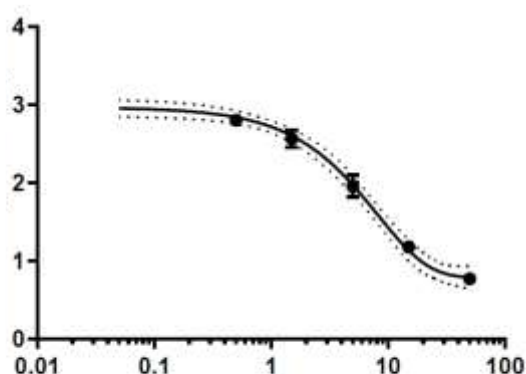
Table format: XY		X	Group A	
		Koncentracija standarda (pg/mL)	Absorbacije	
		X	A:Y1	A:Y2
1	Title	0.0	3.079	2.994
2	Title	0.5	2.827	2.774
3	Title	1.5	2.644	2.483
4	Title	5.0	2.057	1.860
5	Title	15.0	1.213	1.143
6	Title	50.0	0.777	0.763
7	Title		2.522	2.352
8	Title		0.968	0.884
9	Title		2.615	2.600
10	Title		1.954	1.792
11	Title		2.644	2.652
12	Title		2.667	2.853
13	Title		1.776	1.645
14	Title		1.271	1.136
15	Title		1.577	1.615
16	Title		2.004	1.917
17	Title		1.995	2.009
18	Title		2.237	2.197
19	Title		1.799	1.874
20	Title		2.666	2.653
21	Title		1.412	1.339
22	Title		1.840	1.818
23	Title		2.091	2.001
24	Title		1.457	1.503
25	Title		1.006	0.996
26	Title		2.508	2.549
27	Title		2.324	2.250
28	Title		1.638	1.628
29	Title		1.466	1.307
30	Title		1.262	1.108
31	Title		2.040	2.408
32	Title		2.522	2.693
33	Title		2.988	2.682
34	Title		2.977	2.937
35	Title		2.110	1.990
36	Title		2.094	1.988
37	Title		1.831	1.792
38	Title		1.673	1.503
39	Title		1.402	1.165
40	Title		1.657	1.612
41	Title		2.096	1.858
42	Title		2.517	2.372
43	Title		2.017	2.372
44	Title		2.629	2.610
45	Title		2.154	2.016
46	Title		2.406	2.285
47	Title		2.269	2.302
48	Title		2.448	2.537

Interpolation Table of results		A
		Absorbacije
1	Sigmoldal, 4PL, X is log(concentration)	
2	Best-fit values	
3	Top	3683
4	Bottom	0.7867
5	LogIC50	-60.77
6	HillSlope	-0.05310
7	IC50	1.702e-061
8	Span	3682
9	95% CI (asymptotic)	
10	Top	-6388090 to 6395455
11	Bottom	0.6361 to 0.9373
12	LogIC50	-14308 to 14187
13	HillSlope	-0.09117 to -0.01504
14	IC50	0.000 to +infinity
15	Span	-6388090 to +infinity
16	Goodness of Fit	
17	Degrees of Freedom	8
18	R squared	0.9929
19	Adjusted R squared	0.9902
20	Sum of Squares	0.06016
21	Replicates test for lack of fit	
22	SD replicates	0.08158
23	SD lack of fit	0.1006
24	Discrepancy (F)	1.520
25	P value	0.2924
26	Evidence of inadequate model?	No
27	Test for homoscedasticity	
28	Rs of predicted Y vs. residual	0.2403
29	P value (one tailed)	0.2292
30	Passed (P > 0.05)?	Yes
31		
32	Number of points	
33	# of X values	12
34	# Y values analyzed	12

		X	A
		Koncentracija MLT (pg/mL)	Absorbancije
		X	
1		2.283	2.437
2		22.503	0.926
3		1.478	2.608
4		5.704	1.873
5		1.298	2.648
6		0.416	2.860
7		7.030	1.711
8		13.539	1.204
9		8.112	1.596
10		5.070	1.961
11		4.786	2.002
12		3.453	2.217
13		5.984	1.837
14		1.248	2.660
15		10.714	1.376
16		6.042	1.829
17		4.495	2.046
18		9.377	1.480
19		18.980	1.001
20		1.841	2.529
21		3.062	2.287
22		7.746	1.633
23		10.562	1.387
24		13.911	1.185
25		3.413	2.224
26		1.478	2.608
27		0.515	2.835
28		0.042	2.957
29		4.469	2.050
30		4.528	2.041
31		6.181	1.812
32		8.193	1.588
33		12.103	1.284
34		7.732	1.635
35		4.956	1.977
36		2.246	2.445
37		3.583	2.195
38		1.425	2.620
39		4.246	2.085
40		2.749	2.346
41		3.071	2.286
42		2.012	2.493

*Kada vrijednost nije upisana tj. kada ista nedostaje, koncentracija u uzorku je ispod limita detekcije

Na sl. 22. prikazana je standardna krivulja ELISA 6 analize.



Slika 22. Standardna krivulja ELISA 6 analize, $R^2 = 0,993$. Na y osi prikazana je vrijednost apsorbancije, a na x osi koncentracije MLT-a (pg/mL).

4.2. DIZAJN ELISA TESTOVA, DOBIVENE APSORBANCIJE I KONCENTRACIJE MELATONINA U SERUMU

Kao i kod ELISA analize sline, radi nepoznatih koncentracija, razrjeđivali su se uzorci seruma prema naputcima proizvođača za ELISA analizu seruma. U jažice predviđene za razrijeđene uzorke dodano je, umjesto 100 μL čistog uzorka, 50 μL uzorka seruma i 50 μL standarda A (0 pg/mL MLT). Radi slobodnih mjesta u jažicama, napravljena je dvostruka kontrola svih standarda.

U tbl. 18. prikazana je shema jažica ELISA serum analize. Analizirano je 11 uzoraka seruma pacijenata s KUŠ-em te 4 uzorka zdravih ispitanika. Analiza je rađena u duplikatu. Uzorci zdravih ispitanika dobiveni su ljubaznošću doc. dr. sc. Ivane Karmelić. Isti su služili kao dodatna kontrola ELISA analize te rezultati s ovim uzrocima nisu statistički obrađivani radi nepoznatog vremena skladištenja.

Tablica 18. Dizajn jažica ELISA mikrotitarske pločice za serum

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B (StA)	B (StA)	50	50	58	58	51 ½	51 ½	59 ½	59 ½	B (StA)	B (StA)
B	StB	StB	51	51	59	59	52 ½	52 ½	76 ½	76 ½	StB	StB
C	StC	StC	52	52	76	76	53 ½	53 ½	246 ½	246 ½	StC	StC
D	StD	StD	53	53	246	246	54 ½	54 ½	248 ½	248 ½	StD	StD
E	StE	StE	54	54	248	248	55 ½	55 ½	249 ½	249 ½	StE	StE
F	StF	StF	55	55	249	249	56 ½	56 ½	266 ½	266 ½	StF	StF
G	Con1	Con1	56	56	266	266	57 ½	57 ½	50 ½	50 ½	Con1	Con1
H	Con2	Con2	57	57	50 ½	50 ½	58 ½	58 ½	76 ½	76 ½	Con2	Con2

*Crno = uzorak seruma ispitanika s KUS; Crveno = uzorak seruma zdravog ispitanika; Zeleno = standardi; 50 ½ = 50% razrijeđeni uzorak; StA = standard A; B= blank; Con = kontrola

U tbl. 19. prikazana je GraphPad analiza ELISA serum testa.

Tablica 19. Prikaz GraphPad analize ELISA serum. U prvoj tablici su prikazane vrijednosti standarda s lijeve strane i vrijednosti apsorbancija standarda i uzoraka (paralele) s desne strane. U drugoj tablici prikazane su vrijednosti analize. U trećoj tablici prikazane su izračunate koncentracije MLT-a u uzorcima i srednje vrijednosti apsorbancija svakog pojedinog uzorka.

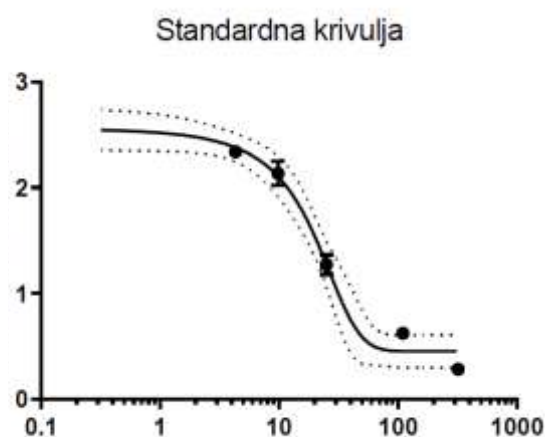
Table format: XY		X	Group A	
		Koncentracija standarda (pg/mL) (Interpolated)	Apsorbancije	
		X	A:Y1	A:Y2
1	Title	0.0	2.576	2.579
2	Title	4.3	2.317	2.364
3	Title	9.8	2.056	2.215
4	Title	25.0	1.208	1.339
5	Title	110.0	0.642	0.607
6	Title	320.0	0.266	0.302
7	Title		1.985	2.109
8	Title		0.605	0.652
9	Title		1.833	2.031
10	Title		1.565	1.821
11	Title		1.237	1.121
12	Title		2.059	1.934
13	Title		2.020	1.920
14	Title		1.905	1.771
15	Title		2.029	2.088
16	Title		1.849	1.827
17	Title		1.880	1.829
18	Title		2.362	2.226
19	Title		2.220	2.269
20	Title		2.048	2.100
21	Title		2.594	1.723
22	Title		2.248	2.209
23	Title		2.210	2.123
24	Title		2.098	1.785
25	Title		2.119	2.138
26	Title		1.679	1.599
27	Title		2.375	2.237
28	Title		2.330	2.314
29	Title		2.372	2.152
30	Title		2.197	2.394
31	Title		2.281	2.096
32	Title		2.181	2.240
33	Title		2.424	2.425
34	Title		2.408	2.355
35	Title		2.274	2.489
36	Title		2.619	2.040
37	Title		2.439	2.501
38	Title		2.316	2.354
39	Title		2.044	2.096
40	Title		2.247	2.377
41	Title		2.252	2.357
42	Title		2.172	2.285
43	Title		1.915	1.857
44	Title		1.168	1.204
45	Title		0.558	0.516
46	Title		0.230	0.252
47	Title		1.689	1.556
48	Title		0.609	0.540

1	Sigmoidal, 4PL, X is log(concentration)	
2	Best-fit values	
3	Top	3.117
4	Bottom	0.4530
5	LogIC50	15.62
6	HillSlope	-0.03696
7	IC50	4.153e+015
8	Span	2.664
9	95% CI (asymptotic)	
10	Top	1.571 to 4.663
11	Bottom	0.2977 to 0.6084
12	LogIC50	-0.6382 to 31.87
13	HillSlope	-0.06838 to -0.005536
14	IC50	0.2300 to 7.497e+031
15	Span	1.100 to 4.228
16	Goodness of Fit	
17	Degrees of Freedom	8
18	R squared	0.9842
19	Adjusted R squared	0.9783
20	Sum of Squares	0.1445
21	Replicates test for lack of fit	
22	SD replicates	0.06270
23	SD lack of fit	0.2458
24	Discrepancy (F)	15.37
25	P value	0.0044
26	Evidence of inadequate model?	Yes
27	Test for homoscedasticity	
28	Rs of predicted Y vs. residual	-0.8622
29	P value (one tailed)	0.0003
30	Passed (P > 0.05)?	No
31		
32	Number of points	
33	# of X values	12
34	# Y values analyzed	12

		X	A
		Koncentracija MLT (pg/mL) (Interpolated)	Absorbancije (Entered)
		X	
1		10.935	2.047
2		46.784	0.629
3		13.014	1.932
4		17.245	1.693
5		27.158	1.179
6		11.855	1.997
7		12.333	1.970
8		14.683	1.838
9		10.723	2.059
10		14.683	1.838
11		14.391	1.855
12		6.157	2.294
13		7.164	2.245
14		10.437	2.074
15		8.847	2.159
16		7.483	2.229
17		8.693	2.167
18		12.844	1.942
19		9.418	2.129
20		18.205	1.639
21		5.908	2.306
22		5.573	2.322
23		6.812	2.262
24		6.126	2.296
25		8.268	2.189
26		7.838	2.211
27		3.324	2.425
28		4.291	2.382
29		4.291	2.382
30		5.415	2.330
31		2.257	2.470
32		5.298	2.335
33		10.511	2.070
34		5.783	2.312
35		5.940	2.305
36		7.483	2.229
37		13.833	1.886
38		27.002	1.186
39		55.871	0.537
40			0.241
41		18.500	1.623
42		51.359	0.575

*Kada vrijednost nije upisana tj. kada ista nedostaje, koncentracija u uzorku je ispod limita detekcije

Na sl. 23. prikazana je standardna krivulja ELISA serum testa.



Slika 23. Standardna krivulja ELISA serum testa $R^2 = 0,984$. Na y osi prikazana je vrijednost apsorbancije, a na x osi koncentracije MLT-a (pg/mL).

4.3. OPIS SUDIONIKA ISTRAŽIVANJA

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 67 pacijenata, 34 (50,7%) ispitanika eksperimentalne skupine (KUŠ) i 33 (49,3%) ispitanika kontrolne skupine (zdravi ispitanici) (Tbl. 20). Raspodjela frekvencija po skupinama se ne razlikuje ($\chi^2 = 0,15$, $P = 0,903$).

Tablica 20. Raspodjela ispitanika s obzirom na skupinu

Skupina	N (%)
KUŠ	34 (50,7)
kontrolna	33 (49,3)
statistika	$\chi^2=0,15$, $P=0,903$

* KUŠ= skupina s karcinomom usne šupljine

U istraživanju je sudjelovalo 48 (71,6%) muškaraca i 19 (28,4%) žena. Broj muškaraca i žena ne razlikuje se značajno po skupinama ($\chi^2 = 0,12$, $P = 0,730$) (Tbl. 21).

Tablica 21. Raspodjela sudionika istraživanja po spolu i skupini

	Skupina		ukupno (N (%))
	kontrolna skupina (N (%))	KUŠ (N(%))	
muškarci	23	25	48 (71,6%)
žene	10	9	19 (28,4%)
ukupno (N (%))	33 (49,3%)	34 (50,7%)	67

* KUŠ= skupina s karcinomom usne šupljine

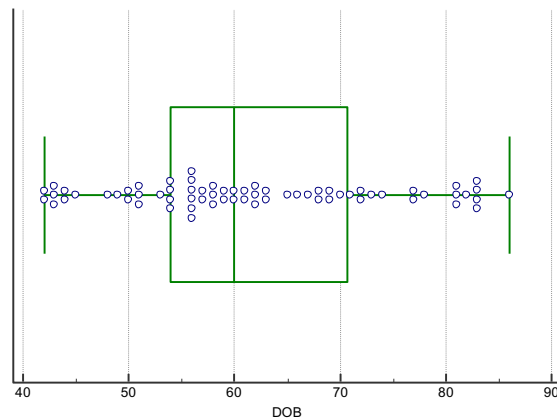
T-testom proporcija nema značajne razlike u raspodjeli po spolu između skupina, za muškarce $P = 0,784$, za žene $P = 0,799$.

Raspodjela prema dobi ne odstupa značajno od normalne raspodjele ($P > 0,10$) (Tbl. 22).

Tablica 22. Deskriptivna statistika za varijablu dob

Varijabla	DOB
veličina uzorka	67
minimalna vrijednost	42
maksimalna vrijednost	86
aritmetička sredina	61,7910
95% interval pouzdanosti (CI) za aritmetičku sredinu	58,8077 - 64,7744
Medijan	60,0000
95% CI za medijan	56,0069 - 63,0000
Varijanca	149,5920
standardna devijacija	12,2308
relativna standardna devijacija	0,1979 (19,79%)
standardna pogreška aritmetičke sredine	1,4942
koeficijent skewness	0,2901 ($P=0,3084$)
koeficijent kurtosis	-0,8297 ($P=0,0361$)
Kolmogorov-Smirnov test za normalnu distribuciju	D=0,0902 ($P>0,10$)

Na sl. 24. prikazan je grafikon okvira s ručicama (engl. Whisker box-plot) raspodjele prema dobi ispitanika istraživanja.



Slika 24. Raspodjela svih ispitanika s obzirom na dob

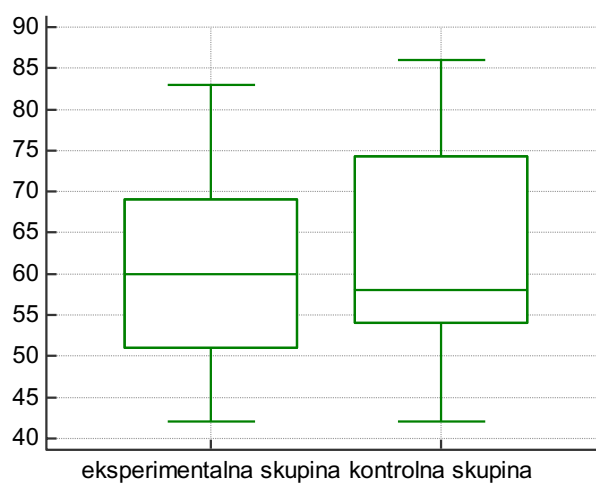
Prosječna dob pacijenata u eksperimentalnoj skupini je 60 ± 11 godina i ne razlikuje se značajno ($P = 0,431$) od pacijenata kontrolne skupine čija je prosječna dob 63 ± 13 (Tbl. 23).

Tablica 23. Usporedba dobi eksperimentalne i kontrolne skupine (Student t-test)

DOB	KUŠ (N=34)	kontrolna skupina (N=33)
srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija	$60,6 \pm 11,1$	$63,0 \pm 13,3$
statistika		
t		0,793
P		0,431

* KUŠ= skupina s karcinomom usne šupljine

U tbl. 23. uočljiva je dobra kontrola ispitanika obje skupine obzirom na varijablu dob. Na sl. 25. prikazana je raspodjela ispitanika po skupinama prema dobi.



Slika 25. Dob ispitanika s obzirom na skupinu ($P=0,431$).

4.4. RAZLIKA U KONCENTRACIJAMA MELATONINA U STIMULIRANOJ I NESTIMULIRANOJ SLINI

4.4.1. Melatonin u nestimuliranoj slini

Raspodjela MLT-a u NS značajno odstupa od normalne raspodjele ($P < 0,001$), stoga su se primjenjivali neparametrijski testovi (Tbl. 24).

Tablica 24. Deskriptivna statistika za koncentraciju melatonina u nestimuliranoj slini

varijabla	MLT NS
veličina uzorka	67
minimalna vrijednost (pg/ml)	0,10
maksimalna vrijednost (pg/ml)	18,98
aritmetička sredina (pg/ml)	2,7770
95% CI za aritmetičku sredinu	2,0129 - 3,5410
medijan	1,7540
95% CI za medijan	1,4501 - 2,6049
varijanca	9,8116
standardna devijacija	3,1323
relativna standardna devijacija	1,1280 (112,80%)
standardna pogreška aritmetičke sredine	0,3827
koeficijent Skewness	2,7210 ($P<0,0001$)
koeficijent Kurtosis	10,5085 ($P<0,0001$)
Kolmogorov-Smirnov test ^a za normalnu distribuciju	D=0,1964 ($P<0,0001$)

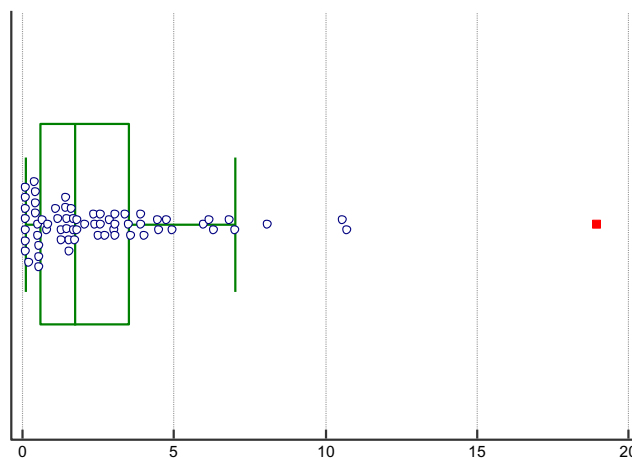
^a Lilliefors ispravak značajnosti

U tbl. 25. prikazana je koncentracija MLT-a u NS po percentilima.

Tablica 25. Raspodjela koncentracija melatonina u nestimuliranoj slini po percentilima

Percentil		95% CI
2,5	0,1000	
5	0,1000	
10	0,1250	0,1000 - 0,4735
25	0,5850	0,4287 - 1,3517
75	3,5635	2,8197 - 4,8576
90	6,2810	4,4861 - 10,5871
95	8,4795	
97,5	10,6874	

Na sl. 26 prikazan je grafikon okvira s ručicama za koncentraciju MLT-a u NS.



Slika 26. Raspodjela koncentracije melatonina u nestimuliranoj slini svih ispitanika

4.4.1.1. Usporedba koncentracija melatonina među skupinama u nestimuliranoj slini

Koncentracija MLT u NS značajno je viša ($P < 0,001$) u eksperimentalnoj skupini [medijan: 3,1 (95% CI: 2,3-4,5)] u odnosu na kontrolnu skupinu [medijan: 0,7 (95% CI: 0,44-1,52)] (Tbl. 26).

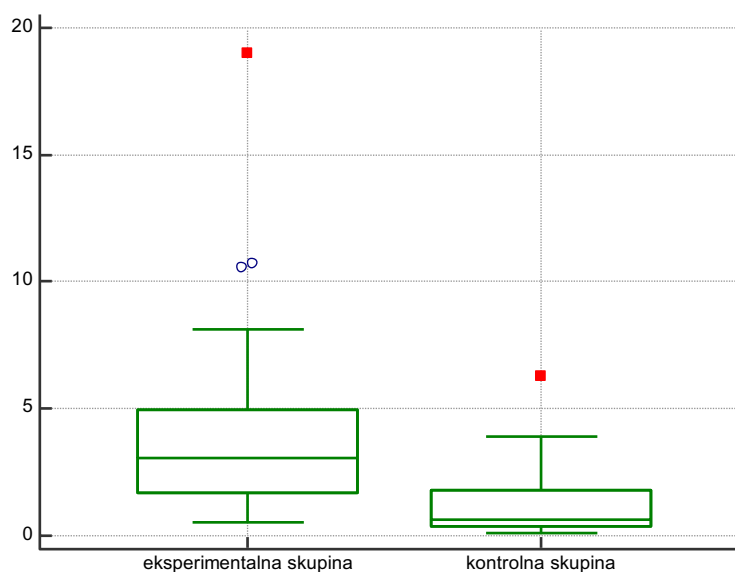
Tablica 26. Usporedba koncentracije melatonina u nestimuliranoj slini među skupinama
(Mann-Whitney U test)

	eksperimentalna skupina	kontrolna skupina
veličina uzorka	34	33
minimalna vrijednost	0,5150	0,1000
maksimalna vrijednost	18,9800	6,3060
Medijan	3,0785	0,6570
95% CI for za medijan	2,3116 - 4,4735	0,4390 - 1,5223
interkvartilni raspon	1,7140 - 4,9560	0,3510 - 1,8000

Mann-Whitney test (nezavisni uzorci)

prosječan rang prve skupine	45,2500
prosječan rang druge skupine	22,4091
Mann-Whitney U	178,50
test statistic Z	4,799
<i>P</i>	< 0,0001

Na sl. 27. prikazana je raspodjela koncentracija MLT-a u NS među skupinama.



Slika 27. Vrijednosti melatonina u nestimuliranoj slini eksperimentalne i kontrolne skupine
($P < 0,001$)

4.4.2. Melatonin u stimuliranoj slini

Raspodjela MLT-a u SS značajno odstupa od normalne raspodjele ($P < 0,001$), stoga su se primjenjivali neparametrijski testovi (Tbl. 27).

Tablica 27. Deskriptivna statistika za koncentraciju melatonina u stimuliranoj slini

varijabla	MLT SS
veličina uzroka	67
donja vrijednost (pg/ml)	0,10
gornja vrijednost (pg/ml)	13,91
aritmetička sredina (pg/ml)	1,9969
95% CI za aritmetičku sredinu	1,2923 - 2,7016
medijan	0,9170
95% CI za medijan	0,7612 - 1,3158
varijanca	8,3453
standardna devijacija	2,8888
relativna standardna devijacija	1,4466 (144,66%)
standardna pogreška aritmetičke sredine	0,3529
koeficijent Skewness	2,6338 ($P < 0,0001$)
koeficijent Kurtosis	7,4161 ($P < 0,0001$)
Kolmogorov-Smirnov test ^a za normalnu distribuciju	D=0,2557 ($P < 0,0001$)

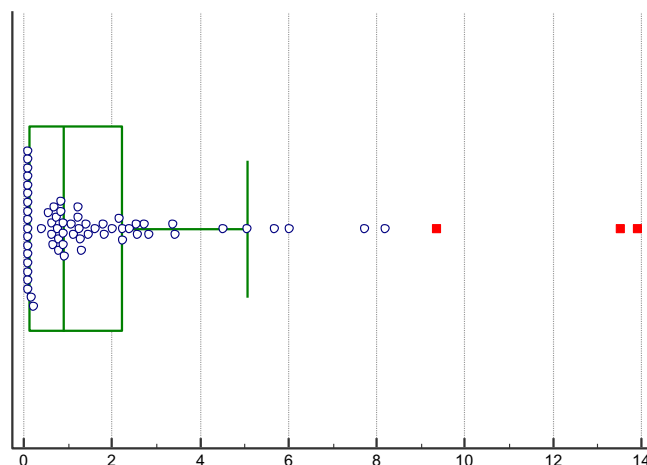
^a Lilliefors ispravak značajnosti

U tbl. 28. prikazana je koncentracija MLT-a u SS po percentilima.

Tablica 28. Raspodjela koncentracija melatonina u stimuliranoj slini po percentilima

Percentil	vrijednost MLT u SS	95% CI
2,5	0,1000	
5	0,1000	
10	0,1000	0,1000 to 0,1000
25	0,1178	0,1000 to 0,6860
75	2,2447	1,4568 to 3,4235
90	5,5772	2,8098 to 10,0639
95	8,3706	
97,5	12,8107	

Na sl. 27. prikazana je raspodjela koncentracije MLT-a u SS.



Slika 27. Raspodjela koncentracije melatonina u stimuliranoj slini svih ispitanika

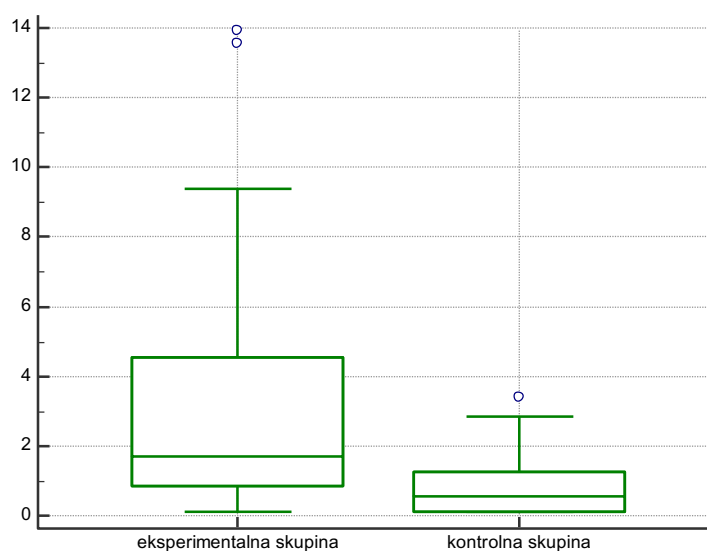
4.4.2.1. Usporedba koncentracija melatonina među skupinama u stimuliranoj slini

Koncentracija MLT-a u SS značajno je viša ($P < 0,001$) u eksperimentalnoj skupini [medijan: 1,7 (95 % CI: 0,9 - 2,6)] u odnosu na kontrolnu skupinu [medijan: 0,6 (95 % CI: 0,1 - 1,0)] (Tbl. 29).

Tablica 29. Usporedba koncentracije melatonina u stimuliranoj slini s obzirom na skupine

	eksperimentalna skupina	kontrolna skupina
veličina uzorka	34	33
minimalna vrijednost	0,1000	0,1000
maksimalna vrijednost	13,9110	3,4020
medijan	1,7110	0,5660
95% CI za medijan	0,9076 - 2,6148	0,1000 - 1,0236
interkvartilni raspon	0,8510 - 4,5280	0,1000 - 1,2725
prosječan rang prve skupine		42,7500
prosječan rang druge skupine		24,9848
Mann-Whitney U		263,50
test statistic Z		3,757
<i>P</i>		0,0002

Na sl. 28. prikazane su vrijednosti MLT-a u SS po skupinama.



Slika 28. Vrijednosti melatonina u stimuliranoj slini eksperimentalne i kontrolne skupine
($P < 0,001$)

4.5. MELATONIN U SERUMU

U tbl. 30. prikazana je deskriptivna statistika za koncentraciju MLT-a u serumu, a u tbl. 31. prikaz raspodjele koncentracija po percentilima.

Tablica 30. Deskriptivna statistika za koncentraciju melatonina u serumu

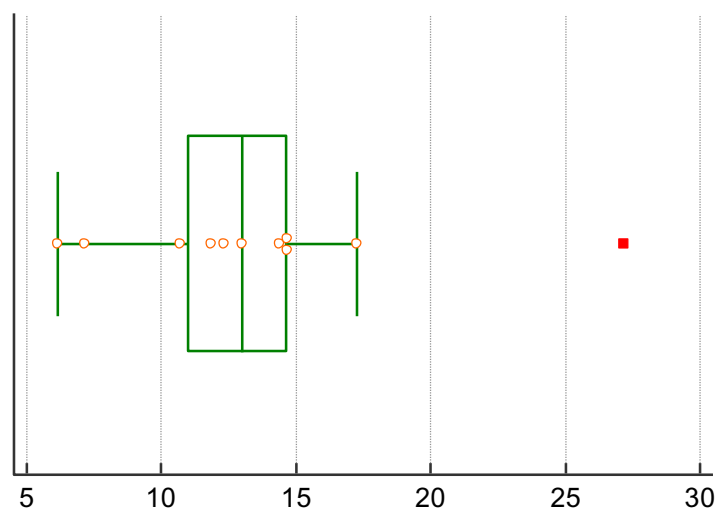
varijabla	MLT SERUM
veličina uzroka	11
donja vrijednost (pg/ml)	6,1570
gornja vrijednost (pg/ml)	27,1580
aritmetička sredina (pg/ml)	13,5824
95% CI za aritmetičku sredinu	9,8409 - 17,3238
medijan	13,0140
95% CI za medijan	10,0835 - 15,1434
varijanca	31,0165
standardna devijacija	5,5692
relativna standardna devijacija	0,4100 (41,00%)
standardna pogreška aritmetičke sredine	1,6792
koeficijent Skewness	1,3088 ($P=0,0500$)
koeficijent Kurtosis	3,2588 ($P=0,0457$)
Kolmogorov-Smirnov test ^a za normalnu distribuciju	D=0,2399 ($P=0,0767$)

^a Lilliefors ispravak značajnosti

Tablica 31. Raspodjela koncentracija melatonina u serumu po percentilama

Percentil	vrijednost MLT-a u serumu	95% CI
2,5		
5	6,2073	
10	6,7612	
25	11,0060	
75	14,6830	
90	21,2102	
95	26,6623	
97,5		

Na sl. 29 prikazana je raspodjela koncentracije MLT-a u serumu.



Slika 29. Raspodjela koncentracija melatonina u serumu

4.5.1. Ukupni proteini u serumu ispitanika s karcinomom usne šupljine

U tbl. 32. prikazana je deskriptivna statistika za koncentraciju ukupnih proteina u serumu ispitanika s karcinomom usne šupljine, a u tbl. 33. raspodjela koncentracija po percentilama.

Tablica 32. Deskriptivna statistika za varijablu ukupni proteini

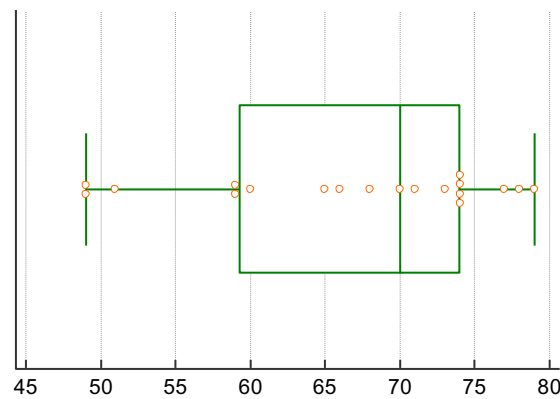
Varijabla	UKUPNI PROTEINI
veličina uzroka	19
donja vrijednost (g/l)	49
gornja vrijednost (g/l)	79
aritmetička sredina (g/l)	66,8421
95% CI za aritmetičku sredinu	62,1463 - 71,5379
medijan	70,0000
95% CI za medijan	59,7820 - 74,0000
varijanca	94,9181
standardna devijacija	9,7426
relativna standardna devijacija	0,1458 (14,58%)
standardna pogreška aritmetičke sredine	2,2351
koeficijent Skewness	-0,7109 ($P=0,1650$)
koeficijent Kurtosis	-0,6809 ($P=0,5160$)
Kolmogorov-Smirnov test ^a za normalnu distribuciju	D=0,1574 ($P>0,10$)

^a Lilliefors ispravak značajnosti

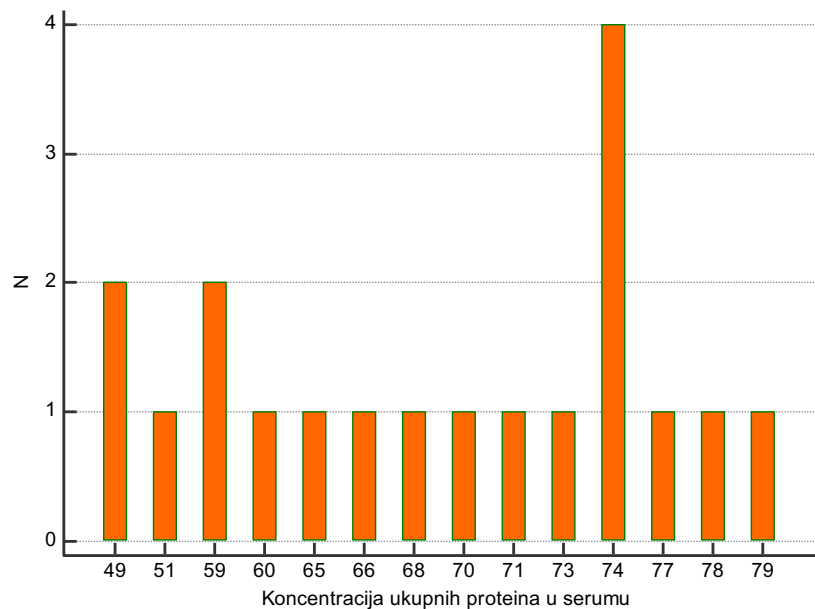
Tablica 33. Prikaz raspodjele ukupnih proteina po percentilama

Percentil	vrijednost ukupni proteini	95% CI
2,5		
5	49,0000	
10	49,8000	
25	59,2500	49,0000 - 68,2557
75	74,0000	70,8721 - 78,1342
90	77,6000	
95	78,5500	
97,5		

Na sl. 30. prikazana je raspodjela koncentracija ukupnih proteina u serumu pacijenata s KUŠ-em, a na sl. 31. prikazana je raspodjela koncentracija ukupnih proteina prema broju ispitanika.



Slika 30. Raspodjela koncentracija ukupnih proteina osoba s karcinomom usne šupljine



Slika 31. Raspodjela koncentracija ukupnih proteina u serumu osoba s karcinomom usne šupljine

4.5.2. Albumini u serumu ispitanika s karcinomom usne šupljine

U tbl. 34. prikazana je deskriptivna statistika za albumine u serumu ispitanika s karcinomom usne šupljine, a u tbl. 35. raspodjela koncentracija albumina po percentilama.

Tablica 34. Deskriptivna statistika za albumine u serumu ispitanika s karcinomom usne šupljine.

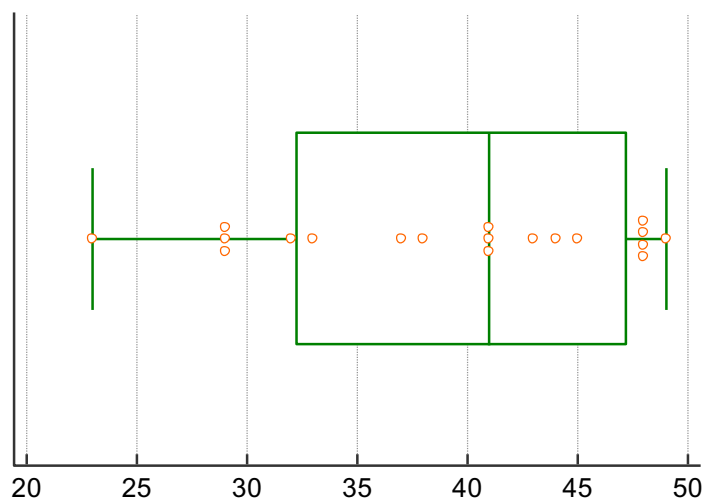
varijabla	ALBUMINI
veličina uzroka	19
donja vrijednost (g/l)	23
gornja vrijednost (g/l)	49
aritmetička sredina (g/l)	39,2632
95% CI za aritmetičku sredinu	35,3978 - 43,1285
medijan	41,0000
95% CI za medijan	32,7820 - 45,6541
varijanca	64,3158
standardna devijacija	8,0197
relativna standardna devijacija	0,2043 (20,43%)
standardna pogreška aritmetičke sredine	1,8398
koeficijent Skewness	-0,5096 ($P=0,3110$)
koeficijent Kurtosis	-0,9149 ($P=0,2943$)
Kolmogorov-Smirnov test ^a za normalnu distribuciju	D=0,1647 $P>0,10$

^a Lilliefors ispravak značajnosti

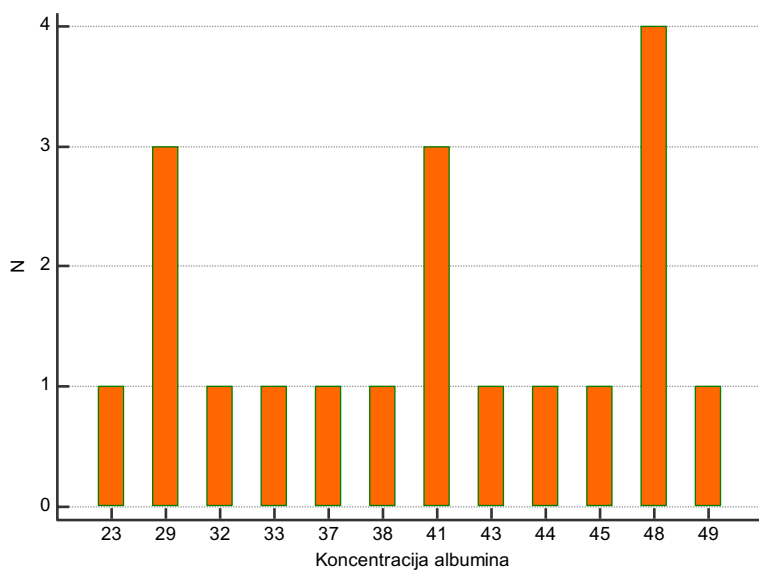
Tablica 35. Prikaz raspodjele koncentracija albumina po percentilama

Percentil	vrijednost albumini	95% CI
2,5		
5	25,7000	
10	29,0000	
25	32,2500	28,1945 - 41,0000
75	47,2500	41,0000 - 48,1342
90	48,0000	
95	48,5500	
97,5		

Na sl. 32. prikazana je raspodjela koncentracija albumina u serumu ispitanika s KUŠ-em, a na sl. 33. raspodjela koncentracija albumina obzirom na broj ispitanika.



Slika 32. Raspodjela koncentracija albumina u serumu ispitanika s karcinomom usne šupljine



Slika 33. Prikaz raspodjele koncentracija ukupnih proteina u serumu osoba s karcinomom usne šupljine

4.6. ŠTETNE NAVIKE

Raspodjela ispitanika po skupinama obzirom na štetnu naviku značajno se razlikuje ($\chi^2 = 15,48$; $P = 0,002$). U eksperimentalnoj je skupini 14 bolesnika s kombiniranim štetnim navikama (alkohol i pušenje) dok je u kontrolnoj skupini 1 ispitanik (t-test proporcija $P = 0,016$). U ostalim skupinama nema razlika u udjelima bolesnika (svi $P > 0,05$). U tbl. 36. prikazana je raspodjela frekvencija štetnih navika po skupinama.

Tablica 36. Prikaz frekvencije štetnih navika po skupinama

	Navika				
skupina	alkohol	pušenje	alkohol i pušenje	bez štetne navike	ukupno (N, %)
kontrolna	5	13	1	14	33 (49,3%)
KUŠ	5	5	14	10	34 (50,7%)
ukupno (N, %)	10 (14,9%)	18 (26,9%)	15 (22,4%)	24 (35,8%)	67 (100%)

4.6.1. Konzumacija alkohola

Raspodjela ispitanika po skupinama obzirom na konzumaciju alkohola značajno se razlikuje ($\chi^2 = 13,10$; $P = 0,004$). Više bolesnika u eksperimentalnoj skupini konzumira > 5 alkoholnih jedinica od onih u kontrolnoj skupini (t-test proporcija $P = 0,455$).

U tbl. 37. prikazana je frekvencija ispitanika po kategoriji uživanja alkohola izraženih u alkoholnim jedinicama.

Tablica 37. Raspodjela ispitanika obzirom na dnevnu količinu konzumiranog alkohola

Skupina	Konzumacija alkohola				ukupno (N, %)
	ne pije	1 AJ/dan	2-4 AJ/dan	>5 AJ/dan	
kontrolna skupina	14	12	5	2	33 (49,3%)
KUŠ	4	10	9	11	34 (50,7%)
ukupno (N, %)	18 (26,9%)	22 (32,8%)	14 (20,9%)	13 (19,4%)	67 (100%)
statistika					
χ^2	13,10				
P	0,004				

* AJ = alkoholna jedinica

4.6.2. Konzumacija duhana

Raspodjela ispitanika po skupinama obzirom na konzumaciju duhana ne razlikuje se značajno ($\chi^2 = 0,12$; $P = 0,73$). Međutim, značajno veći broj cigareta konzumira eksperimentalna skupina (KUŠ) ($\chi^2 = 19,61$; $P = 0,0015$).

U tbl. 38. prikazana je frekvencija ispitanika obzirom na broj dnevno konzumiranih cigareta.

Tablica 38. Frekvencija ispitanika kategorizirana prema dnevnoj količini konzumacije cigareta

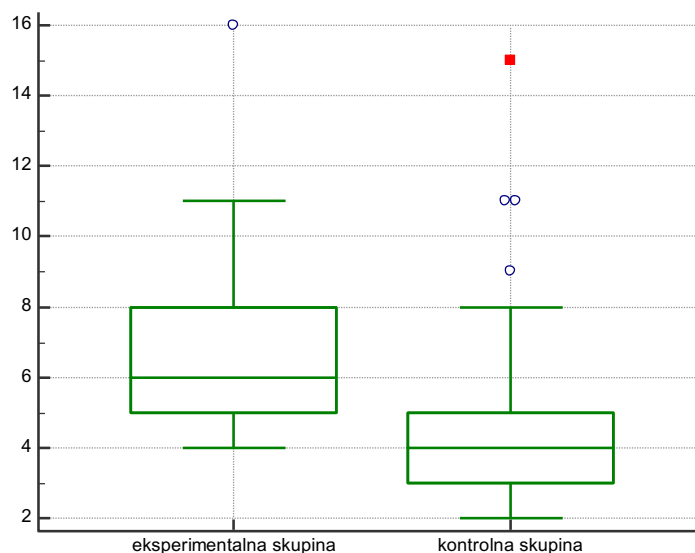
	Konzumacija duhana (cigareta/dan)						
skupina	ne puši	0-5	6-10	11-20	21-35	>36	ukupno (N, %)
kontrolna skupina	15	4	8	6	0	0	33 (49,3%)
KUŠ	14	3	1	3	9	4	34 (50,7%)
ukupno (N, %)	29 (43,3%)	7 (10,4%)	9 (13,4%)	9 (13,4%)	9 (13,4%)	4 (6,0%)	67 (100%)
statistika							
χ^2	19,61						
P	0,0015						

4.7. KVALITETA SPAVANJA

Indeks kvalitete spavanja (PSQI) značajno se razlikuje između skupina ($P < 0,001$) te je u eksperimentalnoj skupini [6 (5-8)] niži u odnosu na kontrolnu skupinu [4 (3-5)] (Tbl. 39). Na sl. 34. prikazane su prosječne vrijednosti PSQI između skupina.

Tablica 39. Usporedba skupina prema PSQI

	KUŠ	kontrolna skupina
veličina uzorka	34	33
minimalna vrijednost	4	2
maksimalna vrijednost	16	15
medijan	6	4
95% CI za medijan	5 - 8	3 – 5
interkvartilni raspon	5 - 8	3 - 5
prosječan rang prve skupine	43,1618	
prosječan rang druge skupine	24,5606	
Mann-Whitney U	249,50	
test statistic Z	3,935	
P	0,0001	



Slika 34. Vrijednosti PSQI između skupina

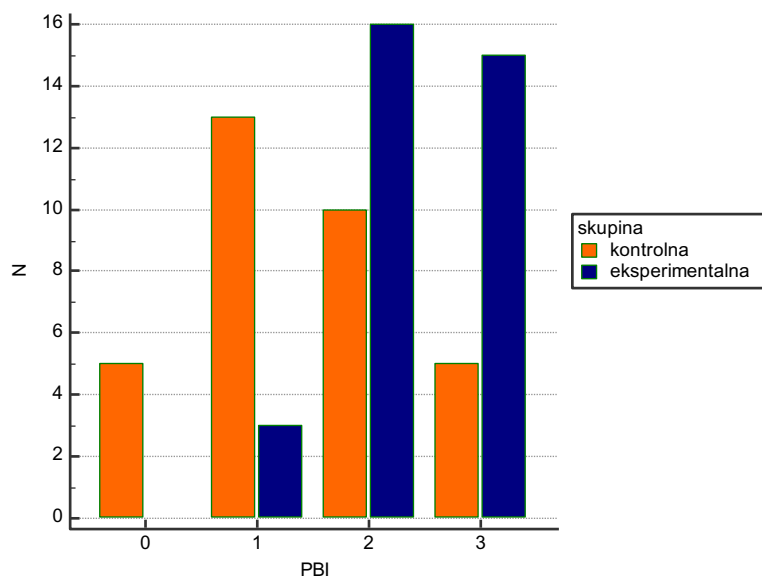
4.8. PAPILLARY BLEEDING INDEX

Papillary bleeding index (PBI) značajno se razlikuje između skupina ($P < 0,001$) te je u eksperimentalnoj skupini viši u odnosu na kontrolnu skupinu (Tbl. 40). Na sl. 35. prikazani su odnosi prosječnih vrijednosti PSQI između skupina.

Tablica 40. Usporedba skupina prema PBI

	KUŠ	Kontrolna skupina
veličina uzorka	34	33
minimalna vrijednost	1	0
maksimalna vrijednost	3	3
medijan	2	1
95% CI za medijan	2 - 3	1 - 2
interkvartilni raspon	2 - 3	1 - 2
prosječan rang prve skupine	42,7941	
prosječan rang druge skupine	24,9394	
Mann-Whitney U	262,00	
test statistic Z	3,922	
P	0,0001	

* KUŠ= skupina s karcinomom usne šupljine



Slika 35. Dijagram raspodjele PBI

U tbl. 41. prikazana je frekvencija ispitanika s obzirom na PBI.

Tablica 41. Frekvencija ispitanika s obzirom na PBI

	PBI				ukupno (N,%)
Skupina	0	1	2	3	
kontrolna skupina	5	13	10	5	33 (49,3%)
KUŠ	0	3	16	15	34 (50,7%)
ukupno (N,%)	5 (7,5%)	16 (23,9%)	26 (38,8%)	20 (29,9%)	67 (100%)

4.9. RAZLOG DOLASKA ISPITANIKA

U tbl. 42. prikazana je frekvencija određene skupine ispitanika prema razlogu dolaska u KB Dubrava ($\chi^2 = 0,123$; $P = 0,73$).

Tablica 42. Frekvencija određene skupine prema razlogu dolaska

razlog dolaska	Skupina		ukupno (N, %)
	kontrolna	KUŠ	
vađenje zuba	33	0	33 (49,3%)
karcinom* jezika	0	13	16 (23,9%)
karcinom dna usne šupljine	0	5	5 (7,5%)
karcinom retromolarno u donjoj čeljusti	0	3	3 (4,5%)
karcinom gingive donje čeljusti	0	5	5 (7,5%)
karcinom gingive gornje čeljusti	0	3	3 (4,5%)
karcinom obraza	0	1	1 (1,5%)
karcinom nepca	0	1	1 (1,5%)
ukupno (n, %)	33 (49,3%)	34 (50,7%)	67 (100%)

* Svi karcinomi su planocelularni karcinomi

4.10. SUSTAVNE BOLESTI I UZIMANJE LIJEKOVA

U tbl. 43. prikazane su sustavne bolesti ispitanika indeksirane preko ICD-11 klasifikacije WHO, a u tbl. 44. konzumacija lijekova ispitanika indeksiranih preko ATC klasifikacije WHO.

Tablica 43. Sustavne bolesti i stanja indeksirani pomoću ICD-11 klasifikacije

bolesti i stanja (ICD-11 oznaka)	KUŠ skupina (N)	kontrolna skupina (N)	ukupno (N)
zdravi *	/	26	26
hipertenzija (i10)	10	6	16
ateroskleroza (i70)	6	2	8
hiperlipidemija (5c80z)	7	3	10
flebitis i tromboflebitis (i80)	2	0	0
angina pectoris (i20)	2	1	3
varikozne vene donjih ekstremiteta (i-83)	0	2	0
gastroezofagealna refluksna bolest (gerb) (da22)	9	0	9
anksioznost (mb24.3)	7	0	7
hipertireoidizam	0	1	1
psihotični poremećaj prouzrokovan alkoholom (6c40.6)	3	0	3
psihoza (6a2y)	0	1	0
kronična bubrežna insuficijencija (gb61.z)	1	0	1
duboka venska tromboza (bd71)	1	0	1
kamenac bubrega ili uretera (n20)	2	0	2
hipokalijemija (5c77)	3	0	3
osteoporoza (m81)	1	0	1
depresija (f32)	3	1	4
hipertrofija prostate (ga90)	4	2	6
tip 2 diabetes mellitus (E11)	2	0	0
astma (J45)	3	0	3

* Bez sistemskih bolesti; KUŠ – karcinom usne šupljine

Tablica 44. Konzumacija lijekova (lijekovi indeksirani pomoću ATC 2019 klasifikacije)

lijek (ATC oznaka)	KUŠ skupina (N)	kontrolna skupina (N)	ukupno (N)
ne uzima lijekove	10	26	36
inhibitori kalcija (c08)	0	2	2
inhibitori protonske pumpe (a02bc)	6	0	6
acetilsalina kiselina (b01ac30)	3	1	4
benzodiazepinski derivativi (n05cd)	7	2	9
tireostatici (h03b)	0	1	1
blokatori alfa-adrenergičnih receptora (c02ca)	1	1	2
antagonisti angiotenzina ii (c09c)	2	0	2
sulfonamidi, čisti (c03ca)	6	1	7
blokatori beta receptora (c07ab)	10	1	11
selektivni agonisti beta-2 adrenergičkih receptora (r03ac)	3	0	3
lijekovi za liječenje benigne hipertrofije prostate (g04c)	4	2	6
klindamicin (g01a10)	1	1	2
vitamin d i analozi (a11cc)	1	0	1
amoksicilin + klavulanska kiselina (j01cr02)	2	0	2
antipsihotici (n05a)	3	1	4
ace inhibitori (c09a)	8	4	12
inhibitori hmg coa reductaze (c10aa)	7	3	10
heparini (b01ab)	6	0	6
opioidi (n02a)	2	0	2
lijekovi koji snižavaju serumsku glukozu, isključujući inzulin (a10b)	2	0	2
nesteroidni antireumatici - derivati octene kiseline (m01a)**	7	4	11
kalij (a12ba30)	3	0	3
antagonisti h2 receptora (a02ba)	5	0	5

lijekovi za liječenje gihta (m04a)	1	0	1
kalijev acetat i magnezijev karbonat (v03ae04)	1	0	1
varfarin (b01aa03)	1	0	1
vazodilatatori – lijekovi za liječenje angine pectoris (c01d)	2	1	0
trimetadizin (c01eb15)	1	0	1
antidepresivi (n06a)	3	1	4

* KUŠ - karcinom usne šupljine; N – broj

** Ispitanici nisu uzimali NSAR 72h prije uzorkovanja sline i seruma

4.11. RAZLIKE U KONCENTRACIJAMA MELATONINA S OBZIROM NA UZIMANJE LIJEKOVA

4.11.1. Nestimulirana slina

Kako bi se pokušao isključiti utjecaj lijekova na koncentraciju MLT-a u NS, uspoređivale su se razlike između osoba s KUŠ-em (Tbl. 45). Nije pronađena značajna razlika u koncentraciji MLT-ovih bolesnika s KUŠ-em obzirom na uzimanje lijekova ($P = 0,4274$) (Tbl. 45).

Tablica 45. Usporedba koncentracije melatonina u nestimuliranoj slini osoba s karcinomom obzirom na uzimanje lijekova

	ne uzimaju lijekove	uzimaju lijekove
veličina uzorka	10	24
minimalna vrijednost	1,2980	0,5150
maksimalna vrijednost	18,9800	10,7140
medijan	2,7290	3,6690
95% CI za medijan	1,6091 - 4,0111	2,1986 - 5,2164
interkvartilni raspon	1,7540 - 3,5050	1,6640 - 6,0825
Hodges-Lehmann razlika medijana		0,5775
95% CI		-0,9630 - 2,7240
prosječan rang prve skupine		15,4000
prosječan rang druge skupine		18,3750
Mann-Whitney U		99,00
test statistic Z		0,794
P		0,4274

Uspoređene su i koncentracije MLT-a u NS kontrolne skupine obzirom na uzimanje lijekova (Tbl. 46). Nije pronađena značajna razlika u koncentraciji MLT-ove kontrolne skupine obzirom na uzimanje lijekova ($P = 0,8946$).

Tablica 46. Usporedba koncentracije melatonina u nestimuliranoj slini kontrolne skupine obzirom na uzimanje lijekova

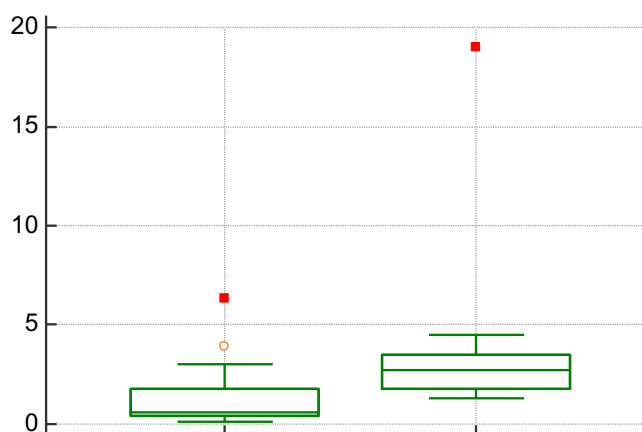
	ne uzima lijekove	uzima lijekove
veličina uzorka	26	7
minimalna vrijednost	0,1000	0,1000
maksimalna vrijednost	6,3060	3,5830
medijan	0,6090	0,8050
95% CI za medijan	0,4286 - 1,6199	0,1619 - 2,7074
interkvartilni raspon	0,3930 - 1,7950	0,3043 - 1,7193
Hodges-Lehmann razlika medijana	0,01000	
95% CI	-1,0210 - 0,9780	
prosječan rang prve skupine	16,8846	
prosječan rang druge skupine	17,4286	
Mann-Whitney U	88,00	
test statistic Z	0,132	
<i>P</i>	0,8946	

Usporedbom koncentracija MLT-a u NS ispitanika obje skupine koji ne uzimaju lijekove dobivena je statistički značajna razlika ($P = 0,0026$), s medijanom 0,61 kod zdravih ispitanika te 2,73 u ispitanika s KUŠ-em (Tbl. 47).

Tablica 47. Usporedba ispitanika koji ne uzimaju lijekove kontrolne (zdravih) i eksperimentalne (KUŠ) skupine u nestimuliranoj slini

	kontrolna skupina	KUŠ
veličina uzorka	26	10
minimalna vrijednost	0,1000	1,2980
maksimalna vrijednost	6,3060	18,9800
medijan	0,6090	2,7290
95% CI za medijan	0,4286 - 1,6199	1,6091 - 4,0111
interkvartilni raspon	0,3930 - 1,7950	1,7540 - 3,5050
Hodges-Lehmann razlika medijana	1,6270	
95% CI	0,7960 - 2,6440	
prosječan rang prve skupine	15,2308	
prosječan rang druge skupine	27,0000	
Mann-Whitney U	45,00	
test statistic Z	3,006	
P	0,0026	

Na sl. 36 prikazane su vrijednosti koncentracija MLT-a u NS u ispitanika koji ne uzimaju lijekove iz obje skupine.

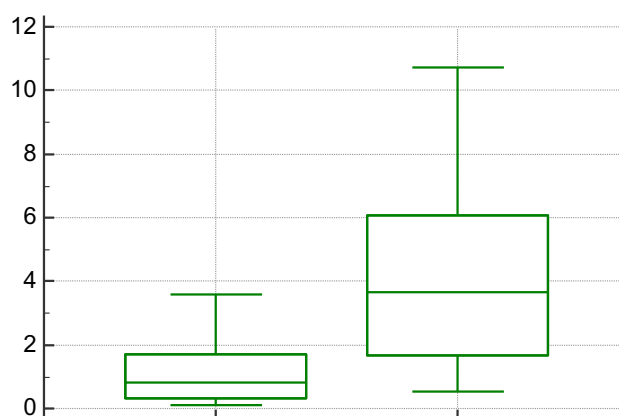


Slika 36. Prikaz koncentracija melatonina u nestimuliranoj slini (y os) ispitanika koji ne uzimaju lijekove (x os: lijevo – zdravi ispitanici; desno – osobe s karcinomom usne šupljine)

Uspoređujući ispitanike obje skupine koji uzimaju lijekove i njihovu koncentraciju MLT-a u NS dobije se statistički značajna razlika ($P = 0,0046$), s medijanima 0,81 kod kontrolne skupine i 3,67 kod ispitanika s KUŠ-em (Tbl. 48) (Sl. 37).

Tablica 48. Usporedba ispitanika koji uzimaju lijekove kontrolne (zdravih) i eksperimentalne (KUŠ) skupine u nestimuliranoj slini

	kontrolna skupina	KUŠ
veličina uzorka	7	24
minimalna vrijednost	0,1000	0,5150
maksimalna vrijednost	3,5830	10,7140
medijan	0,8050	3,6690
95% CI za medijan	0,1619 - 2,7074	2,1986 - 5,2164
interkvartilni raspon	0,3043 - 1,7193	1,6640 - 6,0825
Hodges-Lehmann razlika za medijan	2,5320	
95% CI	0,9080 - 4,7310	
prosječan rang prve skupine	7,4286	
prosječan rang druge skupine	18,5000	
Mann-Whitney U	24,00	
test statistic Z	2,835	
P	0,0046	



Slika 37. Prikaz koncentracija melatonina (y os) u nestimuliranoj slini ispitanika koji uzimaju lijekove (x os: lijevo – zdravi ispitanici; desno – osobe s karcinomom usne šupljine)

4.11.1. Stimulirana slina

Kako bi se pokušao isključiti utjecaj lijekova na koncentraciju MLT-a u SS, uspoređivalo se postojanje korelacije između osoba s KUŠ-em koji uzimaju lijekove i koji ne uzimaju lijekove (Tbl. 49).

Tablica 49. Usporedba koncentracije melatonina u stimuliranoj slini ispitanika s karcinomom usne šupljine obzirom na uzimanje lijekova

	ne uzima lijekove	uzima lijekove
veličina uzorka	10	24
minimalna vrijednost	0,4160	0,1000
maksimalna vrijednost	5,7040	13,9110
medijan	1,8220	1,5485
95% CI za medijan	0,8174 - 3,4075	0,8919 - 3,8625
interkvartilni raspon	0,8510 - 2,1690	0,8380 - 5,5560
Hodges-Lehmann razlika medijana		0,2795
95% CI		-0,9350 - 2,5440
prosječan rang prve skupine		16,4000
prosječan rang druge skupine		17,9583
Mann-Whitney U		109,00
test statistic Z		0,416
P		0,6776

Uspoređene su i koncentracije MLT-a u SS kontrolne skupine obzirom na uzimanje lijekova (Tbl. 50). Nije pronađena značajna razlika u koncentraciji MLT-a kontrolne skupine obzirom na uzimanje lijekova ($P = 0,8946$).

Tablica 50. Usporedba koncentracija melatonina u stimuliranoj slini osoba kontrolne skupine obzirom na uzimanje lijekova

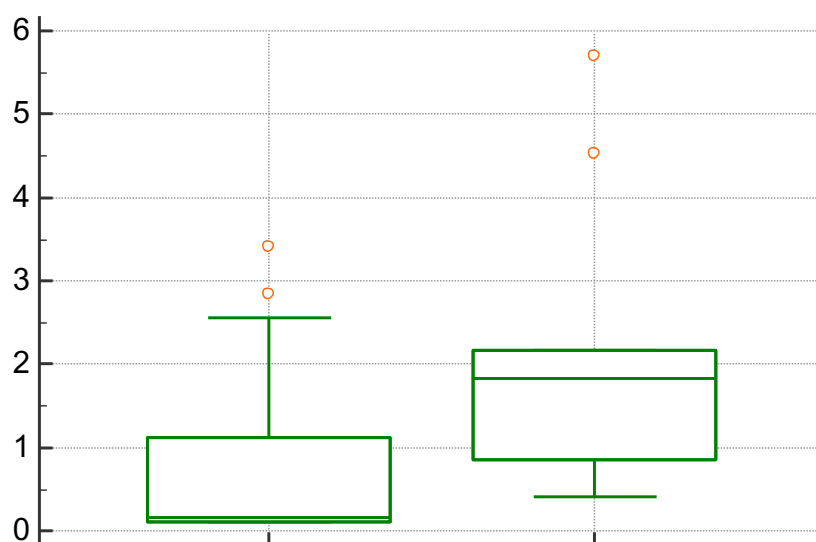
	Ne uzima lijekove	Uzima lijekove
veličina uzorka	26	7
minimalna vrijednost	0,1000	0,1000
maksimalna vrijednost	3,4020	2,2410
medijan	0,1620	0,7990
95% CI za medijan	0,1000 - 0,9987	0,1352 - 1,8369
interkvartilni raspon	0,1000 - 1,1260	0,2698 - 1,3977
Hodges-Lehmann razlika medijana	0,1560	
95% CI	-0,4740 - 1,1150	
prosječan rang prve skupine	16,0192	
prosječan rang druge skupine	20,6429	
Mann-Whitney U	65,50	
test statistic Z	1,159	
<i>Two-tailed</i> vjerojatnost	$P = 0,2466$	

Usporedbom koncentracija MLT-a u SS ispitanika obje skupine obzirom na uzimanje lijekova dobivena je statistički značajna razlika ($P = 0,0070$), s medijanom kod zdravih ispitanika od 0,16 i 1,82 kod ispitanika s KUŠ-em (Tbl. 51).

Tablica 51. Usporedba koncentracija melatonina u stimuliranoj slini osoba koje ne uzimaju lijekove obzirom na skupinu

	kontrolna skupina	KUŠ
veličina uzorka	26	10
minimalna vrijednost	0,1000	0,4160
maksimalna vrijednost	3,4020	5,7040
medijan	0,1620	1,8220
95% CI za medijan	0,1000 - 0,9987	0,8174 - 3,4075
interkvartilni raspon	0,1000 - 1,1260	0,8510 - 2,1690
Hodges-Lehmann razlika medijana		0,8445
95% CI		0,3160 - 1,9120
prosječan rang prve skupine		15,6154
prosječan rang druge skupine		26,0000
Mann-Whitney U		55,00
test statistic Z		2,699
P		0,0070

Na sl. 38 prikazane su vrijednosti koncentracija MLT-a u SS u ispitanika obje skupine koji ne uzimaju lijekove.

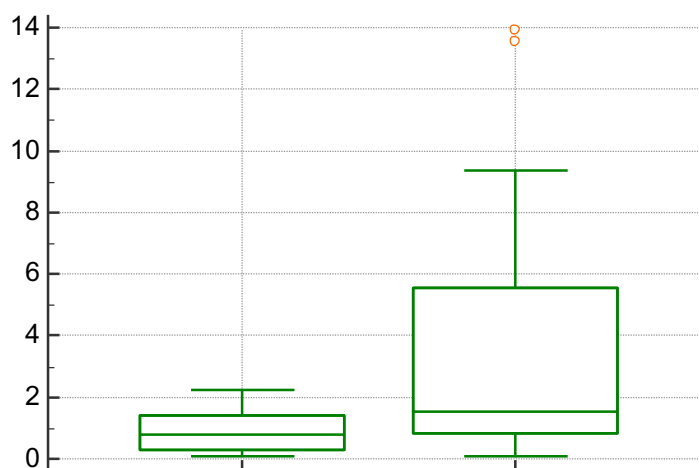


Slika 38. Prikaz koncentracija melatonina u stimuliranoj slini (y os) ispitanika koji ne uzimaju lijekove (x os: lijevo – zdravi ispitanici; desno – osobe s karcinomom usne šupljine)

Uspoređujući ispitanike obje skupine koji uzimaju lijekove i koncentraciju MLT u SS nije pronađena statistički značajna razlika ($P = 0,0845$) (Tbl. 52) (Sl. 39).

Tablica 52. Usporedba koncentracije melatonina ispitanika koji uzimaju lijekove obzirom na skupinu

	kontrolna skupina	KUŠ
veličina uzorka	7	24
minimalna vrijednost	0,1000	0,1000
maksimalna vrijednost	2,2410	13,9110
medijan	0,7990	1,5485
95% CI za medijan	0,1352 - 1,8369	0,8919 – 3,8625
interkvartilni raspon	0,2698 - 1,3977	0,8380 – 5,5560
Hodges-Lehmann razlika medijana		0,8235
95% CI		-0,07100 - 4,6170
prosječan rang prve skupine		10,7857
prosječan rang druge skupine		17,5208
Mann-Whitney U		47,50
test statistic Z		1,725
P		0,0845



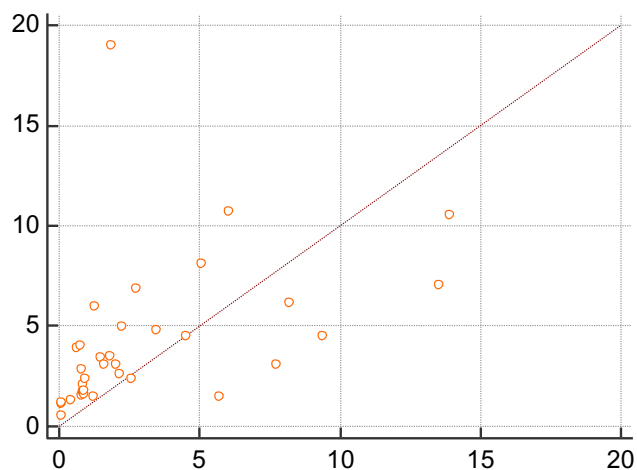
Slika 39. Prikaz koncentracija melatonina (y os) u stimuliranoj slini ispitanika koji uzimaju lijekove (x os: lijevo – zdravi ispitanici; desno – osobe s karcinomom usne šupljine)

4.12. USPOREDBA KONCENTRACIJA MELATONINA U SLINI I SERUMU

Radi usporedbe medija za uzorkovanje uspoređivala se koncentracija MLT-a u serumu i NS ispitanika s KUŠ-em (Tbl. 53) (Sl. 40).

Tablica 53. Usporedba koncentracije melatonina u nestimuliranoj slini i serumu ispitanika s karcinomom usne šupljine

veličina uzorka	34
Spearmanov koeficijent korelacije (ρ)	0,684
P	0,0001
95% CI	0,450 - 0,830



Slika 40. Usporedba koncentracija melatonina u nestimuliranoj slini (y os) i serumu (x os) ispitanika s karcinomom usne šupljine.

Uspoređivala se i slina kao medij. Uspoređivala se koncentracija melatonina u NS i SS kod osoba s KUŠ-em (Tbl. 54).

Tablica 54. Usporedba koncetracije melatonina u nestimuliranoj i stimuliranoj slini ispitanika s karcinomom usne šupljine (MLT NS – melatonin u nestimuliranoj slini; MLT SS – melatonin u stimuliranoj slini)

Varijabla X	MLT SS	
Varijabla Y	MLT NS	
Veličina uzorka	67	
	varijabla X	varijabla Y
minimalna vrijednost	0,1000	0,1000
maksimalna vrijednost	13,9110	18,9800
aritmetička sredina	1,9969	2,7770
medijan	0,9170	1,7540
standardna devijacija	2,8888	3,1323
standardna pogreška aritmetičke sredine	0,3529	0,3827

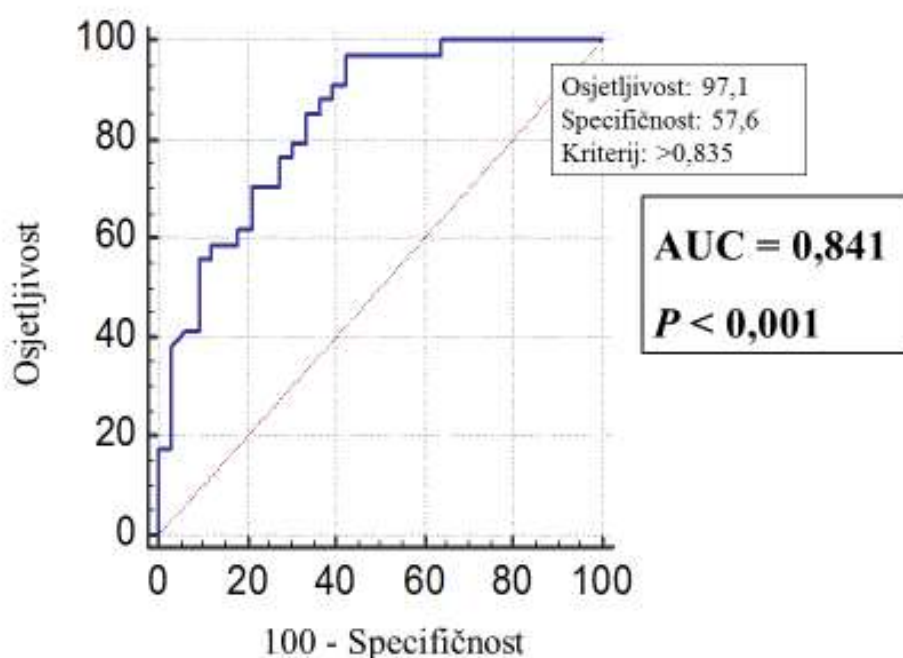
Regresijska jednadžba

$y = 0,247309 + 1,516860 x$	
Sistematske razlike	
intercept A	0,2473
95% CI	-0,09039 - 0,4010
Proporcionalne razlike	
nagib B	1,5169
95% CI	1,1397 - 1,9039
Nasumične razlike	
rezidualna standardna devijacija (RSD)	2,0695
± 1.96 RSD interval	-4,0562 - 4,0562
Vrijednost linearnog modela	
Cusum test za linearnost	Ne postoji značajna devijacija od linearnosti ($P=0,27$)

Iako je test linearnosti zadovoljen kao uvjet za provođenje analize ($P = 0,27$) rezultati upućuju na to da se ove dvije metode ne mogu naizmjenično koristiti za mjerenje koncentracije melatonina obzirom da odsječak pravca (B) ne obuhvaća vrijednost 1 (130).

4.13. ROC ANALIZA

Za procjenu granične vrijednosti koncentracije MLT-a u dijagnostici KUŠ-a korištena je ROC analiza koja se pokazala značajnom ($P < 0,001$). Površina ispod krivulje iznosila je 0,84 što se smatra vrlo dobrim. Uz osjetljivost od 97,1 % i specifičnost od 57,6 % granična je vrijednost koncentracije MLT-a u NS od 0,835 (Sl. 41) (Tbl. 55).



Slika 41. Prikaz osjetljivosti i specifičnosti melatonina u nestimuliranoj slini kao biljega za karcinom usne šupljine (AUC – engl. *area under ROC curve*)

Tablica 55. Deskriptivna statistika za specifičnost i osjetljivost melatonina u nestimuliranoj slini kao biljega za karcinom usne šupljine

varijabla	MLT NS
klasifikacijska varijabla	Između skupina
veličina uzorka	67
eksperimentalna skupina	34 (50,75%)
kontrolna skupina	33 (49,25%)
<i>Area under the ROC curve (AUC)</i>	0,841
standardna pogreška ^a	0,0475
95% CI	0,731 - 0,919
z	7,170
<i>P (Area=0,5)</i>	<0,001

^a DeLong et al., 1988

Youden index

Youden indeks J	0,5463
vezani kriterij	>0,835
osjetljivost	97,06 (95% C,I, 84,7-99,9)
specifičnost	57,58 (95% C,I, 39,2-74,5)

4.14. PREDIKTIVNI MODEL ZA KARCINOM USNE ŠUPLJINE

Prediktivno modeliranje je statistička tehnika koja se temelji na obradi velikog broja varijabli u svrhu predviđanja vjerojatnosti određenog ishoda. Rezultat prediktivnog modeliranja je prediktivni model koji se sastoji od niza prediktora (varijabli), koje će vjerojatno utjecati na buduće rezultate. U izradi prediktivnog modela KUŠ-a korištena je logistička regresija.

U prvom prediktivnom modelu promatrane su sve mjerene i određivane varijable u istraživanju.

Prediktivni model KUŠ-a uz prediktore konzumacija alkohola, dob, MLT u NS, MLT u SS, MLT u serumu, konzumacija duhana, PSQI, PBI i uzimanje lijekova (Logistička regresija 1) pokazao se značajnim ($P < 0,0001$) (Tbl. 56.)

Tablica 56. Logistička regresija I

nulti model -2 log vjerojatnost	92,867
potpuni model -2 log vjerojatnost	34,229
χ^2	58,637
DF (stupnjevi slobode)	10
P	< 0,001
Cox & Snell R^2	0,5832
Nagelkerke R^2	0,7777

Koeficijenti i standardne pogreške

Varijabla	koeficijent	standardna pogreška	Wald	P
konzumacija alkohola	1,01729	0,65901	2,3829	0,1227
Dob	0,0084379	0,053192	0,02516	0,8740
MLT NS	1,28845	0,52572	6,0066	0,0143
MLT SS	0,50959	0,55290	0,8495	0,3567
navika (pušenje, alkohol, pušenje + alkohol, bez štetnih navika)	0,36397	1,16157	0,09818	0,7540
PBI	1,90316	0,85462	4,9591	0,0260
PSQI	0,19620	0,17604	1,2421	0,2651
konzumacija duhana	-0,12156	0,77041	0,02490	0,8746
uzimanje lijekova	0,95903	1,08178	0,7859	0,3753

spol	1,19701	1,43755	0,6933	0,4050
konstanta	-11,22635	5,27946	4,5217	0,0335

Omjeri rizika (OR: engl. *Odds Ratios*) i 95% CI

varijabla	OR	95% CI
konzumacija alkohola	2,7657	0,7601 - 10,0638
dob	1,0085	0,9086 - 1,1193
MLT NS	3,6272	1,2944 - 10,1642
MLT SS	1,6646	0,5632 - 4,9198
navika (pušenje, alkohol, pušenje + alkohol, bez štetnih navika)	1,4390	0,1477 - 14,0224
PBI	6,7071	1,2562 - 35,8098
PSQI	1,2168	0,8617 - 1,7181
konzumacija duhana	0,8855	0,1956 - 4,0086
uzimanje lijekova	2,6092	0,3131 - 21,7438
spol	3,3102	0,1978 - 55,4021

Hosmer & Lemeshow test

χ^2	4,7209
DF	8
<i>P</i>	0,7869

ROC curve analiza

AUC	0,958
standardna pogreška	0,0217
95% CI	0,879 - 0,992

Iz rezultata je vidljivo da bi se trebao primijeniti drugi model koji ne uključuje konzumaciju duhana, uzimanje lijekova, koncentraciju MLT-a u SS, štetne navike promatrane zajedno, dob i spol. Stoga je analizirano još nekoliko modela logističkih regresija (rezultati nisu prikazani, moguće dostaviti na zahtjev) s manjim brojem prediktora, u različitim kombinacijama, dok nije pronađena ona s najboljima vrijednostima (Konačna logistička regresija) koja je uključivala MLT u NS, PSQI i konzumaciju alkohola (Tbl. 57).

Tablica 57. Konačna logistička regresijska analiza

nulti model -2 log vjerojatnost	92,867
potpuni model -2 log vjerojatnost	46,166
χ^2	46,701
DF (stupnjevi slobode)	3
<i>P</i>	$P < 0,0001$
Cox & Snell R^2	0,5019
Nagelkerke R^2	0,6693

Koeficijenti i standardne pogreške

varijabla	koeficijent	standardna pogreška	Wald	<i>P</i>
konzumacija alkohola	1,38828	0,41262	11,3201	0,0008
MLT NS	1,01939	0,31043	10,7833	0,0010
PSQI	0,29035	0,13639	4,5318	0,0333
konstanta	-5,87966	1,54405	14,5005	0,0001

OR i 95% CI

varijabla	OR	95% CI
konzumacija alkohola	4,0079	1,7852 - 8,9981
MLT NS	2,7715	1,5082 - 5,0928
PSQI	1,3369	1,0233 - 1,7466

Hosmer & Lemeshow test

χ^2	4,7426
DF	8
P	$P = 0,7847$

Tablica kontigencije Hosmer & Lemeshow test

Grupa	Y=0		Y=1		Ukupno
	Izmjereno	Očekivano	Izmjereno	Očekivano	
1	7	6,899	0	0,101	7
2	7	6,741	0	0,259	7
3	6	6,229	1	0,771	7
4	5	5,095	2	1,905	7
5	4	3,714	3	3,286	7
6	1	2,231	6	4,769	7
7	3	1,362	4	5,638	7
8	0	0,666	7	6,334	7
9	0	0,0603	7	6,940	7
10	0	0,00113	4	3,999	4

Klasifikacijska tablica (cut-off vrijednost $P=0.5$)

Aktualna grupa	Prediktivna grupa		Postotak ispravnih
	0	1	
Y = 0	28	5	84,85 %
Y = 1	6	28	82,35 %
Postotak ispravno klasificiranih			83,58 %

ROC curve analiza

AUC	0,923
Standardna pogreška	0,0306

95% CI	0,832 - 0,974
--------	---------------

* NS= nestimulirana slini, SS= stimulirana slina, PBI = Papillary Bleeding Index, PSQI= Pittsburgh Sleep Quality Index

Konačni prediktivni model identificirao je konzumaciju alkohola (OR=4,01; 95% CI: 1,79 – 9,00), koncentraciju MLT-a u NS (OR= 2,77 ; 95% CI: 1,51 - 5,09) te PSQI (OR=1,3369; 95%CI = 1,02 - 1,75) kao glavne prediktore KUŠ-a ovog istraživanja.

Važno je napomenuti kako je konačni prediktivni model isključivo deskriptivne naravi te da nema kliničku značajnost. Prediktivni modeli zahtjevaju velik broj uzoraka te su češće rezultati velikih epidemioloških istraživanja (131).

Kada bi se ovakvim istraživanjem obuhvatilo oko 1000 ispitanika s KUŠ-em (132) i dobili slični ili jednaki rezultati prediktivne analize, zaključili bismo kako su MLT u NS, konzumacija alkohola i PSQI značajne varijable u razvoju bolesti. Time bi se izdvojili alkohol i loša kvaliteta sna kao najznačajniji rizični čimbenici za nastanak ili progresiju KUŠ-a. Prediktivni model ne bi donio veći značaj MLT u NS od onog dobivenog ovim istraživanjem.

5. RASPRAVA

Jedan od doprinosa ovoga istraživanja, ali i preduvjet za provođenje istoga, je informacija da je MLT mjerljiv u serumu i slini. Kao što je navedeno, prema dostupnoj literaturi, MLT do sada nije mjeran u slini i serumu ispitanika s KUŠ-em. Bez obzira na dostupnost ELISA testova napravljenih specifično za slinu i serum, istraživanje nepoznate koncentracije u određenoj populaciji predstavlja izazov. Radi nepoznavanja raspona koncentracija te očekivano nižih koncentracija MLT-a u slini ispitanika s KUŠ-em, testirana su različita razrjeđenja uzoraka, ali i standarda, što je vidljivo i iz rezultata s prvim ELISA testom (Tbl. 6 i 7).

U istraživanjima su najčešće korištene metode za određivanje određenog analita u uzorku vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. *Liquid chromatography–mass spectrometry* (LC-MS)) i ELISA.

Kada se uspoređuju LC-MS analiza i ELISA, neupitne su prednosti LC-MS analize jer ima bolju analitičku reproducibilnost, specifičnost i standardizaciju te manju vjerojatnost varijacija (133). Bitno je napomenuti da rezultati dobiveni ELISA analizama mogu varirati od proizvođača do proizvođača (85). Uz navedeno LC-MS ima mogućnost određivanja više analita u jednom testiranju, dok se ELISA analizom može promatrati samo ciljani molekula. Također, LC-MS metodom moguće je izolirati molekule mnogo manjih molekularnih masa te sama metoda ima mnogo niži limit detekcije od bilo kojega ELISA testa.

Kada se koristi ELISA test, uobičajeno je da se uzorci analiziraju u duplikatu. Najčešći razlog je mogućnost uočavanja pogreške prilikom pipetiranja. Korištenje multikanalnih pipeta svakako smanjuje mogućnost pogreške, ali vjerojatnost iste uvijek postoji. Analizom apsorbancija ustanovljene su pogreške i u ovome istraživanju, i to u četiri ELISA analize od ukupno 7, sveukupno u analizi gotovo 24 uzorka. Pozitivno je da su pogreške u ELISA testiranju lako uočljive. Pogreške su se uočavale iz velikih razlika u apsorbancijama ili se tijekom samog rada s testovima postavila sumnja na pogrešku. Zbog toga je sveukupno ponovljeno testiranje 24 uzorka naknadnim ELISA analizama (Tbl. 12-17).

Bez obzira na navedene prednosti LC-MS analize, ELISA ima svoje mjesto u kliničkoj i dijagnostičkoj medicini. Brza je i usporediva, ali zahtijeva kalibraciju, tj. procjenu stabilnosti spoja, određivanje koncentracijskog raspona i ponovljivost. Obzirom da su koncentracijski rasponi MLT-a poznati, ELISA predstavlja jednostavniju i ekonomičniju metodu od LC-MS/MS metode za određivanje koncentracije MLT-a.

Prilikom obrade podataka kod pojedinih ispitanika kontrolne skupine pojavio se problem a to su vrijednosti koje su bile ispod limita detekcije ELISA testa koje su bile 0,3 pg/mL. Stoga su prilikom statističke obrade podataka sve vrijednosti salivarnog MLT-a blizu (0,3 - 0,45 pg/mL) ili ispod limita detekcije ELISA testa za slinu mjerene kao 0,1 pg/mL.

Razlog ovome je mogućnost da se svi rezultati statistički mjere, ali i da svi rezultati koji su manji, ali potencijalno blizu vrijednosti limita, budu jednako tretirani kao i oni neposredno blizu limita detekcije, tj. vrijednosti do 0,45 pg/mL.

Ne treba posebno naglašavati važnost vremenski uniformnog uzorkovanja MLT-a jer svako odstupanje od vremenskog intervala može značajno utjecati na rezultate, tj. na izmjerenu koncentraciju MLT-a. Zbog toga je svim sudionicima istraživanja slina bila uzorkovana između 7 i 9 sati ujutro. Potencijalna limitacija ovoga istraživanja je da je svim osobama s karcinomom uzorkovana slina i serum između 7 i 7:45 sati ujutro, dok je svim zdravim ispitanicima slina uzorkovana između 8 i 9 sati ujutro. Međutim, većina istraživanja o cirkadijanom ritmu MLT-a promatrala je ovo vremensko razdoblje zajedno te je stoga i ovdje prihvaćen takav model (85,88,134,135).

Slina kao dijagnostički medij ima svoje prednosti navedene u uvodu, materijalima i metodama. Međutim, tijekom uzorkovanja sline, pojavila su se određena metodološki bitna pitanja/limitacije.

Viskoznost sline i njezina reološka svojstva mogu predstavljati problem prilikom analize uzoraka. Naime, samo uzorkovanje viskozne sline ne predstavlja problem. Međutim, nakon centrifugiranja, kada je potrebno odvojiti supernatant od taloga, mogu se pojaviti tehnički problemi. Svi su uzorci sline nakon odležavanja centrifugirani 10 minuta na 1000 x g na 4 °C. Ovaj tehnički problem istraživanja kod većine uzoraka riješen je ponavljanim centrifugiranjem u istim uvjetima, a neke uzorke bilo je potrebno centrifugirati i na 4000 x g.

Kod pojedinih ponavljanih uzoraka uzeo se i dio taloga. Usporedbom uzoraka istih ispitanika s i bez taloga nismo našli značajnu razliku u apsorbancijama. Ovo govori u prilog očekivanju da se u proteinskom talogu ne nalazi MLT.

Postavlja se pitanje je li potrebno uzorke sline centrifugirati. Mišljenja smo da mali dio proteinskog taloga ne utječe na ELISA analizu. Međutim, necentrifugirani uzorak svakako bi mogao utjecati na kompetitivnu ELISA analizu i omesti natjecanje MLT-a i antigena za mjesta

vezivanja u jažicama ELISA mikrotitarske pločice.

Drugi potencijalni problem na koji smo naišli je prisutnost krvi u slini pojedinih pacijenata koji su imali PBI 3. Kontaktirani su proizvođači korištenog ELISA testa koji nisu imali odgovor na pitanje utječe li zagađenost sline krvlju na rezultate ELISA analize. Stoga ovo može predstavljati još jednu limitaciju u istraživanju. Prema dostupnim istraživanjima u literaturi sa slinom i ELISA analizom, nisu pronađeni komentari, rješenja ili objašnjenja u svezi ovoga potencijalnog problema.

Utjecaj ponovnog zaleđivanja i odleđivanja uzoraka sline mogao bi utjecati na stabilnost MLT-a. Uzorci koji su ponavljani relativno su sličnih apsorbancija s onom višom u prvom mjerenju, što može ukazivati na relativnu stabilnost MLT-a i do godinu dana čuvanog na -80 °C (N = 24). Valja naglasiti da su potrebna dodatna istraživanja o kratkoročnoj, ali i dugoročnoj stabilnosti MLT-a u slini.

Ne postoji posebni razlog zašto su u ovo istraživanje uključeni samo T1 i T2 planocelularni karcinomi. Obzirom da su koncentracije MLT-a nepoznate kod svih stadija prema TNM klasifikaciji, ne bi bilo pogrešno uključiti i ispitanike s metastatskom bolešću. Međutim, stratifikacija svakako pridonosi uniformnosti istraživanja i postavlja potencijalni značaj za buduća istraživanja na ovu temu. Metastatska bolest kod KUŠ-a svakako ima utjecaj na brojne molekule koje potencijalno predstavljaju biljege. Međutim, ovo se odnosi samo na molekule koje su direktno uključene u kancerogenezu, a ne nužno i one koje su indirektno uključene ili reaktivne prirode kao što je to najvjerojatnije slučaj s MLT-om.

Za razliku od očekivane snižene koncentracije MLT-a u osoba s KUŠ-em, dobivene su statistički značajno više koncentracije MLT-a. Upravo ovo predstavlja najzanimljiviji i najznačajniji rezultat ovoga istraživanja. Razlog bi mogao biti reaktivno zaštitno lučenje MLT-a u bolesnika s KUŠ-em.

Do danas nisu poznati svi izvori MLT-a u slini. U imunohistokemijskoj studiji Shimosumae i sur. na štakorima, identificirani su MLT specifična *N*-acetiltransferaza i hidroksiindol-O-metiltransferaza u svim velikim žlijezdama slinovnicama (136). Također su potvrdili ekspresiju MT1 receptora u stanicama bukalne sluznice štakora. Zanimljivo je da su tada, 2011. godine,

isti istraživači postavili hipotezu o produkciji MLT-a unutar žlijezda slinovnica.

Radi svoje lipofilne prirode, u literaturi je prihvaćena tvrdnja da MLT pasivnom difuzijom dolazi u slinu te da korelira s koncentracijom slobodnog MLT-a u serumu (88). Smatra se da je koncentracija MLT-a u slini odraz one serumske, i to koncentracije MLT-a nevezanog za albumine te da iznosi između 30 – 40 % vrijednosti serumske koncentracije MLT-a (87,137). Nedavna istraživanja pokazuju da uz pasivnu difuziju postoji mehanizam skladištenja MLT-a unutar žlijezda slinovnica u sekretornim zrnima (86). U seroznim acinusnim stanicama parotidne žlijezde slinovnice, MLT je identificiran u bliskom kontaktu sa sekretornim granulama, ali i u matriksu samih granula (86). Uz navedeno, MLT-ovi receptori, MT1 i MT2 receptori pronađeni su u žlijezdama slinovnicama čovjeka i štakora ne samo na mebranama plazma stanica, već i u svezi sa sekretornim granulama (138).

U eksperimentalnom modelu, na parotidnom tkivu štakora, Isola i sur. (2016) utvrdili su da visoke koncentracije serumskog cirkulirajućeg MLT-a povećavaju broj sekretornih granula s izraženim MT1 receptorom u parotidnom tkivu, ali i da povećavaju gustoću MT1 receptora po granulama (86). Isola i sur. su ovime opisali receptorski ovisni transport te skladištenje MLT-a unutar parotidne žlijezde slinovnice.

U drugom istraživanju Isola i sur. (2018) su štakorima davali visoke doze izoprenalina, β -adrenergičkog agonista (139). Nakon 60 minuta, ekstrahirali su parotidne žlijezde slinovnice štakora i promatrali MLT označen zlatom pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM). Uočili su degranulaciju unutar parotidnih žlijezda slinovnica te MLT lokaliziran unutar i izvan sekretornih granula. Ovime je dokazana egzocitoza MLT-a iz sekretornih granula u slinu pod utjecajem autonomnog živčanog sustava, tj. alternativni put dolaska MLT-a u slinu. Tijekom boravka u granulama, potencijalna uloga MLT-a mogla bi biti zaštita proteina/peptida od oksidacijskog oštećenja (139).

Isola i sur. nisu isključili mogućnost sinteze MLT-a unutar parotidnih žlijezda slinovnica. Esktrapinealno, poznato je da se MLT sintetizira u retini, koži, gastrointestinalnom traktu, limfocitima, koštanoj srži, trombocitima i jajnicima (140–143).

Rezultati ovoga istraživanja ne govore u prilog, ali niti protiv teorije o sintezi MLT-a u žlijezdama slinovnicama. U slučaju da je postojala diskrepancija između serumskog i

salivarnog MLT-a manjeg od 30 – 40 %, ista bi tada mogla ukazivati na postojanje dodatnog izvora MLT-a u slini.

Svejedno, rezultati ovoga istraživanja otkrivaju diskrepanciju između salivarnog i serumskog MLT-a u odnosu na očekivano odstupanje od 30 - 40 %.

Koncentracija MLT-a u serumu zdravih ispitanika u razdoblju između 7 - 9 sati ujutro iznosi od 5 - 8 pg/mL (87,135). Koncentracije MLT-a su zimi, zbog kraćeg trajanja dana, prosječno nešto više od onih u ljetnom razdoblju, ali unutar navedenog raspona (89, 132, 133). U ovome istraživanju, uzorkovanje nije bilo kontrolirano prema godišnjem dobu.

Medijan MLT-a u NS zdravih ispitanika iznosio je 0,66 pg/mL, a u SS 0,57 pg/mL.

Referentna koncentracija serumskog MLT-a u zdravih ispitanika je stoga 7,58 – 12,12 puta viša nego u NS i 8,77 – 14,04 puta viša nego u SS. Gledano u postotcima, koncentracija MLT-a u NS iznosi 8,25 – 13,2 % vrijednosti slobodnog serumskog MLT-a, a MLT u SS 7,13 – 8,77 % vrijednosti serumskog nevezanog MLT-a. Limitacija ovih rezultata je relativno mali broj ispitanika kojima je uzorkovan i serumski i salivarni MLT te informacija da je serum uzorkovan samo ispitanicima s KUŠ-em.

Usporedbom rezultata dobivenih u serumu te NS i SS ispitanika pronađena je statistički značajna korelacija, što je i bilo očekivano obzirom na značajno više vrijednosti MLT-a u serumu (Spearmanov koeficijent $\rho = 0,684$; $P < 0,0001$).

Iz prikaza raspodjela MLT-a u NS (Sl. 26) i SS (Sl. 27) moguće je uočiti četiri uzorka čije vrijednosti odstupaju od ostalih. Analizom PSQI, uzimanja lijekova i sustavnih bolesti ovih ispitanika nije otkrivena niti jedna karakteristika koja bi objasnila ove vrijednosti. Sva četiri uzorka su iz skupine ispitanika s KUŠ-em. Iz toga razloga iste se ne mogu isključiti iz analize.

Zanimljivo je da su van Faasen i sur. usporedbom slobodnog MLT-a u plazmi i MLT-a u slini, dobili 36 % više vrijednosti MLT-a u slini (95 % CI = 4 – 60) od onih u serumu (85). To bi moglo govoriti u prilog sinteze MLT-a u žlijezdama slinovnicama.

Suprotno ovome, pojedina su istraživanja pokazala upravo suprotno, 70 % nižu koncentraciju MLT-a u slini od one u serumu (133, 142, 143). Autori navedenih istraživanja ovu su razliku u koncentracijama objasnili hipotezom da koncentracija MLT-a u slini reflektira serumsku koncentraciju MLT-a nevezanog za albumine. Zanimljivo je da su pojedini autori uglavnom starijih istraživanja smatrali da slina ne sadrži albumine (135). Međutim, to se pokazalo netočnim (146).

Razlog ovim oprečnim rezultatima nije posve jasan. Proučavanjem metodologije pojedinih gore navedenih istraživanja nije jasno je li slina vremenski uzorkovana isto kao i serum. Također, sama metoda uzorkovanja sline nije dovoljno detaljno opisana u gotovo svim navedenim istraživanjima o usporedbi salivarnog i serumskog MLT-a, niti je razlikovana NS od SS.

Treba također napomenuti da u velikom broju istraživanja u kojima su opisane cirkadijane koncentracije MLT-a u serumu, ispitanici nisu bili ispravno kontrolirani prema dobi. Dodatno, zbunjujući čimbenici nisu adekvatno kontrolirani. Ovo se odnosi na sve moguće varijable koje mogu značajno utjecati na rezultate, kao što su štetne navike ispitanika, uzimanje NSAR-a ili postojanje upalnih stanja u usnoj šupljini.

Moguće objašnjenje za odstupanje rezultata istraživanja od opisanih 30 – 40 % između serumskog i salivarnog MLT-a je dob ispitanika. Naime, sa starenjem padaju vrijednosti MLT-a (147), a prosječna dob ispitanika s KUŠ-em iznosila je $60,6 \pm 11,1$ godina. Iz rezultata je vidljivo da je kontrolna skupina bila dobro kontrolirana i prema dobi ($t = 0,793$ $P = 0,431$) i spolu ($\chi^2 = 0,12$, $P = 0,730$).

Potrebna su dodatna istraživanja vezana za koncentraciju MLT-a u serumu i slini zdravih ispitanika, s dobro kontroliranim zbunjujućim čimbenicima kao što su dob, spol, postojanje štetnih navika, uzimanje određenih lijekova i dr.

U našem istraživanju pronađena je viša koncentracija MLT-a u NS (medijan 1,75; 95 % CI: 1,45 - 2,60) u odnosu na SS (medijan 0,92; 95 % CI: 0,76 – 1,32). U uvodu je navedeno kako NS većinom čini slina iz submandibularnih žlijezda slinovnica.

U trećem istraživanju Isola i sur. (2018) istraživali su prisutnost MLT-a u žlijezdama slinovnicama pacijenata s dijabetesom tipa 2 (148). Promatrani su bioptirani uzorci parotidne i submandibularne žlijezde slinovnice. Rezultate i gustoću zlatom obojenih čestica uspoređivali su sa svojim prijašnjim istraživanjima. Uočili su veći broj MLT pozitivnih granula u parotidnim nego u submandibularnim žlijezdama slinovnicama osoba s dijabetesom tipa II. Također, uočili su značajno manje vrijednosti MLT-a u osoba s dijabetesom nego u zdravih ispitanika iz svojih prijašnjih istraživanja.

Isti su istraživači uočili da se i u seroznim acinusnim stanicama submandibularnih žlijezda slinovnica, kao i u parotidnim žlijezdama slinovnicama, odvija egzocitoza MLT-a u slinu. Zanimljivo bi bilo promatrati sekretorna zrnca MLT-a u acinusnim seroznim stanicama submandibularnih žlijezda slinovnica zdravih ispitanika i usporediti rezultate s onima

dobivenim u istraživanjima Isole i suradnika. Obzirom da smo u ovome istraživanju dobili višu koncentraciju MLT-a u NS nego u SS, postoji mogućnost da u osoba koje nemaju dijabetes tipa II, postoji i izraženija egzocitoza MLT-a iz seroznih acinusnih stanica u slinu.

Također, ne smije se isključiti niti potencijalna mogućnost sinteze MLT-a u žlijezdama slinovnicama. Kako bi se potvrdila ova hipoteza potrebna su istraživanja slična onima Isole i suradnika.

U još jednom istraživanju Isole i sur. (2016) promatran je utjecaj unosa egzogenog MLT-a na MLT-ove receptore. Uočili su da egzogeni unos MLT-a povećava broj MT1 receptora u tkivu parotidne žlijezde slinovnice, ali ne i MT2 receptora (149).

Stoga je moguće da pojačana sinteza nije primarno uzrok pojačane ekspresije receptora, već da je pojačana ekspresija MLT-ovih receptora posljedica pojačane sinteze MLT. Naravno, ova tvrdnja je hipotetske naravi.

Pojačana ekspresija MLT-ovih receptora u tkivu karcinoma usne šupljine mogla bi imati i terapijski značaj. Naime, onkostatski učinak MLT-a je već poznat te je dokazana *in vitro* supresija rasta planocelularnog karcinoma (81).

No pretjerana ekspresija MLT-ovih receptora ujedno je predložena kao objašnjenje za smanjenu koncentraciju MLT-a u osoba s karcinomom (81). Međutim, takva regulacija negativnom povratnom spregom koja bi bila temelj ove teorije nije dokazana. Ista, naravno, ne bi niti bila važeća u ispitanika s KUŠ-em, obzirom na povišene vrijednosti MLT-a u serumu i slini u ovome istraživanju.

Preostaje pitanje zašto je koncentracija MLT-a viša u osoba s KUŠ-em. Postoji mogućnost postojanja nepoznatog obrambenog mehanizma u organizmu koji nastoji smanjiti oksidacijsko oštećenje sluznice usne šupljine. Razlog zašto je u bolesnika s KUŠ-em pojačana sinteza MLT-a teško je objasniti bez informacije o ekspresiji MLT-ovih receptora u tkivu KUŠ-a i u okolnom, nepromijenjenom tkivu usne šupljine.

U uvodu je opisan mehanizam kontrole sinteze MLT-a u epifizi, mehanizam njegovog otpuštanja u krvotok te cirkadijani ritam MLT-a. Dobro su poznate koncentracije MLT-a u serumu zdravih pojedinaca, ali i osoba s raznim zloćudnim tumorima. Poznato je da poremećaj cirkadijanog ritma ima ulogu u etiologiji depresije i određenih karcinoma (85).

Istraživanja na temu povezanosti MLT-a i karcinoma počela su se provoditi u 60-im godinama prošlog stoljeća. Cohen i sur. su još 1978. godine predložili potencijalnu ulogu epifize u etiologiji karcinoma dojke (150). MT3 receptor, spomenut u uvodu, zaslužan je za ekspresiju

kvinon-reduktaze 2 (QR2), poznatog antioksidansa. Tijekom inicijacije i progresije karcinoma, MLT inducira QR2 koji usporava inicijaciju i progresiju karcinoma (91,151).

In vitro, MLT povećava ekspresiju glutation-S-transferaza gena u brojnim staničnim linijama karcinoma što za posljedicu ima direktni onkostatski i antioksidacijski učinak (152). Preko MT1 i MT2 receptora MLT inhibira stvaranje cAMP što rezultira smanjenom apsorpcijom linolne kiseline preko specifičnih transportera za masne kiseline. Ovo rezultira smanjenom oksidacijom linolne kiseline u 13-hidroksi-okta-deka-dienoičnu kiselinu preko 15-lipoksioksigenaze koja uobičajeno pojačava tumorski rast (153). Upravo se ova inhibicija apsorpcije linolne kiseline smatra jednim od snažnijih antionkogenih mehanizama MLT-a.

Dokazano je i da se MLT veže za RAR-srodne orfan receptore (ROR), članove obitelji nuklearnih receptora intracelularnih transkripcijskih čimbenika. Ovim vezivanjem dolazi do poremećaja u transkripciji pojedinih gena koji su uključeni u proliferaciju, diferencijaciju i translaciju određenih proteina, kao što su 5-lipoksigenaza i koštani sijaloprotein (154–156).

MLT inducira apoptozu u staničnim linijama hepatokarcinoma HepG2. Ovaj učinak se temelji na oslobađanju citokroma c citoplazmatskog matriksa i aktivaciji kaspaze-9 (157). Dolazi i do povećanja aktivnosti kaspaze-8, iako ne dolazi do značajne promjene u Fas-L ekspresiji (157). Antionkogeni učinak MLT-a temelji se na antioksidacijskom učinku te uklanjanju slobodnih radikala (154,157).

Inaktivacija kalmodulina je mehanizam kojim MLT uzajamno djeluje s estrogenskim signalnim putem. U estrogen-ovisnim tumorima MLT ima povoljni učinak jer inhibira estrogen receptor α (ER α) (91). MLT ima i inhibitorski učinak na aktivnost telomeraze i direktni antionkogeni efekt preko inhibicije Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF) i insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (158). Navedeni čimbenici imaju značajnu ulogu u angiogenezi karcinoma.

Mehanizam kojim MLT inhibira angiogenezu, pored već spomenutog direktnog utjecaja na čimbenike rasta, osobito VEGF, je smanjenje sinteze Hypoxiainducible Factor-1 α (HIF-1 α). Za ovaj transkripcijski čimbenik poznato je da inducira sintezu VEGF-a.

In vitro istraživanje Colomba i sur. potvrdilo je značajno smanjenje ekspresije HIF-1 α i VEGF-a u HepG2 staničnim linijama hepatokarcinoma nakon aplikacije MLT-a (159).

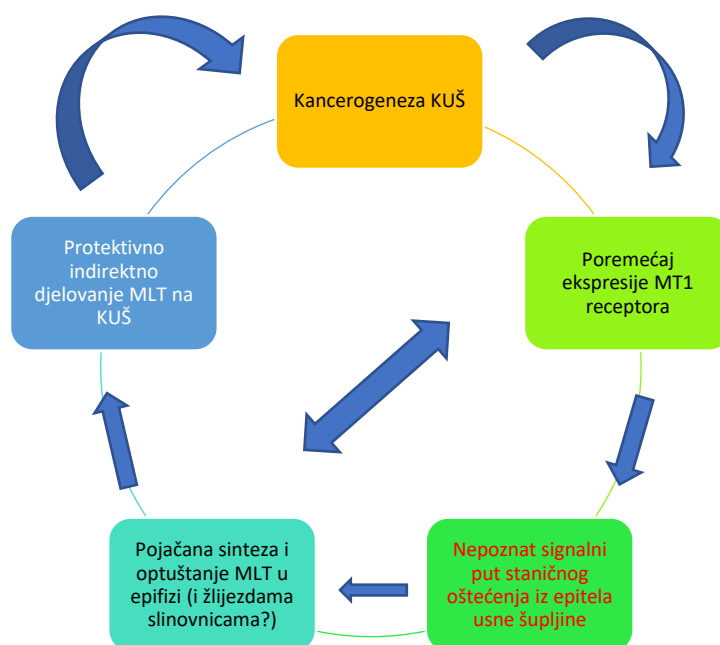
Antionkogeni i antiproliferacijski učinak MLT-a dokazan je u staničnim linijama karcinoma jajnika, prostate, želuca, debelog crijeva, pankreasa, jetre, pluća, dojke, leukemije i glioblastoma (160,161).

In vitro studije korisne su za proučavanje utjecaja MLT-a na rast karcinoma. Međutim, složena tumorska mikro-okolina koju čine i MLT i njegovi receptori, krvne žile, fibroblasti, stanice imunološkog sustava, ekstracelularni matriks i razne signalne molekule i čimbenici rasta, imaju sposobnost modulacije zaštitnog učinka MLT-a. Stoga su potrebna in vivo istraživanja kako bi se opravdala, ali i učinila efikasnijom terapijska primjena MLT-a.

Zheng i sur. proveli su genomsku analizu tumorske melatonergične mikro-okoline raznih solidnih tumora koristeći podatke RNA sekvencioniranja iz baze The Cancer Genome Atlas (TCGA) (92). Promatrali su sposobnost melatonergične mikro-okoline da sintetizira MLT, njezino postojanje u raznim tumorima, procjenjivali prognostičku vrijednost sinteze MLT-a i njegovog metabolizma u raznim tumorima te procjenjivali odnos sinteze i metabolizma MLT-a i određenih imunogenih karakteristika, kao što su mutacijsko opterećenje i stvaranje novih antigena. Isti su autori otkrili da je sposobnost tumorske mikro-okoline da sintetizira i akumulira MLT negativno povezana s tumorskim opterećenjem. Zheng i sur. uspjeli su razviti prognostički model za karcinom dojke, planocelularni karcinom pluća, melanom i adenokarcinom želuca proučavajući njihove melatonergične mikro-okoline (92). Predloženi prognostički modeli koji se temelje na individualnom genskom potpisu određenog tumora mogli bi posjedovati i prediktivnu vrijednost za uspješnost imunoterapije ovih tumora.

Ukoliko uzmemo za pretpostavku da MLT nema direktni učinak na KUŠ radi nepostojanja ili poremećene ekspresije MT1 receptora u tkivu KUŠ-a, očito je snažan sustavni ili indirektni povoljni učinak MLT-a na KUŠ. Stoga pored svih opisanih antionkogenih učinaka MLT-a, mora postojati još jedan ili više zaštitnih mehanizama MLT-a na sluznicu usne šupljine. Također, postoji mogućnost da se MLT više sintetizira i otpušta u krvotok zbog neosjetljivosti stanica KUŠ-a. Obzirom na do sada proučavane zloćudne tumore, ovo reaktivno stvaranje MLT-a bilo bi za sada specifično za KUŠ. Ukoliko poremećaj ekspresije MT1 ima takvu značajnu ulogu u kancerogenezi KUŠ-a, mogao bi definirati i pravac za istraživanje novih terapijskih rješenja za KUŠ, kao što je npr. restauracija MT1 receptora u tkivu KUŠ-a.

Pored navedenoga, ove hipoteze zahtijevale bi postojanje još nepoznatog signalnog puta koji bi poticao sintezu MLT-a s ishodištem u stanicama sluznice usne šupljine i s ciljem u epifizi i potencijalno u žlijezdama slinovnicama. Shema predloženog modela prikazana je na sl. 42.



Slika 42. Shema modela s nepoznatim signalnim putem iz usne šupljine koji bi objasnio povišene koncentracije melatonina u slini i serumu kod karcinoma usne šupljine

* KUŠ= karcinom usne šupljine; MLT= melatonin

Unatoč svim prednostima kemoterapije i radioterapije, štetne nuspojave značajno smanjuju kvalitetu života pacijenata te su često razlog prekidanja terapije. U cilju smanjenja štetnih nuspojava obje terapije, u nekoliko istraživanja predložen je MLT koji, pored svih već opisanih mehanizama učinka, posjeduje i radioprotektivni učinak. Za razliku od amifosfatina, citoprotektivnog lijeka koji se često propisuje ovim pacijentima, MLT ne uzrokuje toksične reakcije u stanicama (162). Wang i sur. napravili su meta-analizu koja je uključivala osam randomiziranih kontroliranih studija i pokazala netoksičnost uzimanja visokih doza MLT-a (> 20 mg/dan) (163). U meta-analizi obuhvaćeni su pacijenti s raznim solidnim tumorima te su učinci bili konzistentni bez obzira na vrstu tumora. Dokazano je da uzimanje MLT-a kao dodatka liječenju pacijenata na kemoterapiji i radioterapiji značajno poboljšava stopu preživljavanja već u prvoj godini, veću remisiju tumora te smanjuje nuspojave obiju terapija, posebno neurotoksičnost, trombocitopeniju i osjećaj malaksalosti (116,163). Također, MLT smanjuje učestalost kemoterapijom uzrokovanog stomatitisa, astenije i kardiotoksičnosti (164). Jedina nuspojava uporabe MLT-a je povećani osjećaj pospanosti i sedacija u nekih pacijenata. Obzirom da je njegov antioksidacijski i protektivni učinak karakterističan za noćno razdoblje, savjetuje ga se uzimati navečer (165).

Lissoni i sur. primijetili su bolju jednogodišnju stopu preživljavanja osoba s KUŠ-em, značajniju stopu regresije tumora i bolju kvalitetu života nakon liječenja uz suportivnu terapiju MLT-om (116).

U uvodu je napomenuto da se odstupanja od normalnih serumskih koncentracija MLT-a povezuju s poremećajima spavanja, desinkronizacijom u organizmu nastaloj kao posljedica letenja zrakoplovom kroz vremenske zone (engl. *jet-lag*), depresijom, stresom, shizofrenijom, hipotalamičnom amenorejom, trudnoćom, dijabetesom, anoreksijom, nekim oblicima karcinoma, imunološkim poremećajima i seksualnim sazrijevanjem u pubertetu. Uz navedeno, konzumacija pića, pogotovo crvenog vina (166,167), razina dnevnog svjetla prilikom uzorkovanja (168), sustavne bolesti i uzimanje lijekova u istraživanjima o cirkadijanom ritmu nisu adekvatno statistički kontrolirani. Prehrana može predstavljati značajan čimbenik u sintezi i homeostazi MLT-a. Pojedine supstance, kao što su banane, zobene pahuljice, ananas, kukuruz, bijela riža, jasmin, rajčica, đumbir, ječam, crveno vino, lješnjaci, bademi, kamilica i med sadrže MLT te na taj način značajno utječu na koncentraciju serumskog MLT-a u tijelu (169). Namirnice koje sadrže triptofan također mogu pridonijeti povećanju sinteze serotonina te posljedično i serumske koncentracije MLT-a (151). Pojedini minerali i vitamini važni su za sintezu MLT-a, kao što su vitamin B6, magnezij, cink i folna kiselina. Oni mogu utjecati na sintezu MLT-a na više načina, npr. folna kiselina direktno je povezana s dostupnošću pteridina (151). Hidroksilacija triptofana u 5-hidroksitriptofan zahtijeva prisutnost pteridina kao kofaktora, tj. isti je potreban mitohondrijskom enzimu triptofan-5-hidroksilazi. Vitamin B6 igra važnu ulogu u dekarboksilaciji triptofana i stimulira oslobađanje MLT-a u epifizi djece (91). Obzirom na značajan utjecaj prehrambenih namirnica na koncentraciju MLT-a, nije jednostavno provesti istraživanje s MLT-om u kojemu će se zadovoljavajuće kontrolirati sve zbunjujuće čimbenike. Prednost ovoga istraživanja je da su svi ispitanici bili natašte prilikom uzorkovanja sline i seruma.

U uvodu je objašnjena povezanost spavanja i MLT-a. Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) razvili su Buysee i sur. 1989. godine i jedan je od najčešće korištenih instrumenata (anketni obrazac) za klinička i znanstvena istraživanja koji je preveden na 48 jezika (121) (Privitak 1). Služi za procjenu kvalitete sna unatrag mjesec dana. Brojna istraživanja s procjenom kvalitete sna koristila su PSQI (170–174). Sastoji se od 9 cjelina, ocjenjuje se subjektivna kvaliteta sna, trajanje uspavljanja, trajanje sna, efikasnost sna, poremećaji i smetnje u snu, korištenje

lijekova za san i utjecaj sna na dnevne aktivnosti. Svaka cjelina se ocjenjuje rasponom od 0 - 3 (viša vrijednost označava lošiju kvalitetu sna). Autori PSQI prepoznali su vrijednost indeksa jednakog ili višeg od 5 indikativnim za prepoznavanje ispitanika s lošom kvalitetom ili s poremećajem u spavanju (121).

Međutim, Backhaus i sur. su, zbog utjecaja spoznaje i posljedičnog psihičkog stresa, od dijagnoze preporučili graničnu vrijednost indeksa za kvalitetu sna osoba sa zloćudnim tumorima od 8 (175). Ovaj prijedlog pozdravili su i autori drugih istraživanja na temu karcinoma i kvalitete sna (176–178).

Očekivano, PSQI indeks bio je značajno viši u ispitanika s KUŠ-em ($U = 249,50$, $P = 0,0001$). Gledajući preporučenu vrijednost Backhaus i sur., zanimljiva je informacija da je 13 ispitanika s KUŠ-em imalo vrijednost $PSQI \geq 8$, dok je u kontrolnoj skupini ispitanika s ovakvim vrijednostima bilo 6.

Neočekivano, visoki PSQI nije značajno povezan s vrijednostima MLT-a u serumu i slini, tj. očekivali smo posljedično niske vrijednosti MLT-a kod osoba koje imaju slabiju kvalitetu sna, kao što je to slučaj kod nekih drugih karcinoma (169, 172, 174, 175). Razlog ovome nije jasan. Predložili smo objašnjenje s nepoznatim obrambenim mehanizmom organizma specifičnim za usnu šupljinu koji nastoji smanjiti oksidacijsko oštećenje sluznice usne šupljine (Sl. 42). Naravno, ovo objašnjenje je samo hipotetske naravi.

Istraživanja o nazofaringealnim karcinomima i karcinomima štitnjače te kvaliteti života ovih pacijenata, razlog lošijoj kvaliteti spavanja kod istih pacijenata pripisivali su opstruktivnoj apneji u snu. Simptomi apneje u snu su hrkanje, buđenje iz sna s osjećajem gušenja, suhoća usne šupljine, mamurluk i jutarnja glavobolja na koje se posebno obraća pozornost u PSQI upitniku (176). U pacijenata s KUŠ-em, apneja u snu se može javiti kao nuspojava radioterapije (179).

Faiz i sur. istraživali su kvalitetu sna pacijenata s karcinomima glave i vrata te su primijetili da 89 % ovih pacijenata ima neki oblik poremećaja spavanja (179). Istraživanje Qin i sur. s uznapredovalim nazofaringelnim karcinomima pripisalo je poremećaje sa spavanjem radioterapiji i kemoterapiji (180). Scarpa i sur. povezali su poremećaje spavanja s dopaminom kojega pacijenti poslijeoperacijski primaju u jedinicama intenzivne skrbi te sa svakodnevnom uporabom benzodiazepina (181).

Obzirom na povišene koncentracije MLT-a, upitna je učinkovitost i opravdanost egzogenog unosa MLT-a kao lijeka za poremećaje spavanja u ispitanika s KUŠ-em. Razlog zašto ispitanici s KUŠ-em imaju lošiji PSQI indeks, a povišene koncentracije MLT-a u serumu i slini ostaje

nepoznat.

Svaki anketni upitnik, kao instrument za procjenu određene kvalitete, ima svoje nedostatke. To su nemogućnost stvaranja potpuno vjerodostojne kliničke slike, vjerodostojnost iskaza ispitanika te tzv. „recall bias“. Recall bias se odnosi na sustavnu pogrešku koja nastaje kada se ispitanici ne mogu prisjetiti određenog događaja ili doživljaja iz prošlosti.

Za procjenu higijene usne šupljine koristio se PBI indeks koji numerički omogućuje procjenu opsežnosti upale parodontnog ligamenta, tj. služio je kao kvantitativni indeks za parodontitis i gingivitis. U brojnim istraživanjima smatra se glavnim pokazateljem higijene i upalnog statusa usne šupljine (182–186).

Iako slabo istraživano, oralni mikrobiom mogao bi igrati ulogu u kroničnim bolestima usne šupljine, ali i u nekim fazama kancerogeneze KUŠ-a. Primjera radi, poznat je utjecaj *H. pylori* i karcinoma želuca, ali i povezanost drugih karcinoma sa specifičnim infekcijama, kao što su karcinom debelog crijeva, mokraćnog mjehura, prostate i pluća (187,188). U usnoj šupljini moguće je pronaći preko 700 poznatih mikroorganizama koji žive u međusobnoj simbiozi, ali i u simbiozi s imunonološkim sustavom organizma.

Istraživanja koja su povezivala povećani rizik od koronarne bolesti s parodontitisom motivirale su znanstvenike na istraživanja u svezi s potencijalnom povezanošću parodontne bolesti i karcinoma. Opservacijske studije su najčešće proučavale postojanost veze između KUŠ-a i parodontitisa. U zadnje vrijeme sve se više promatra utjecaj parodontitisa i udaljenih karcinoma, kao što su karcinomi probavnog trakta, pluća, dojke, prostate i jajnika. Cilj ovih istraživanja bio je dokazati sustavni utjecaj parodontitisa i određenog patogena ili više njih koji preko imunološkog odgovora sudjeluju u kancerogenezi karcinoma na udaljenoj lokaciji (189). Prema dostupnoj literaturi, postoji samo jedna kohortna studija koja je kontrolirala pušenje i pokušala pronaći vezu između KUŠ-a i parodontne bolesti. U navedenoj studiji nije pronađen statistički značajni rizik osoba s parodontitisom za razvoj KUŠ-a (Hazard Ratio (HR) = 1,15, 95 % CI: 0,73 – 1,81). U istom istraživanju, pronađena je povezanost parodontitisa i orofaringealnog karcinoma i karcinoma jednjaka (HR = 2,25, 95 % CI: 1,30 – 3,90) (190), ali nakon što se eliminirala varijabla „pušenje“, tj. nakon što su se ograničili rezultati na nepušače. U drugoj kohortnoj studiji, dokazana je veza između karcinoma glave i vrata i parodontitisa (HR = 1,20, 95 % CI: 1,09 – 1,33). Međutim, štetne navike nisu kontrolirane (191). U drugim istraživanjima, uglavnom *case-control* tipa, rezultati su nedosljedni sa slabim korelacijama, s

odds ratio (OR) vrijednostima od 0,8 (192) ili vrijednostima s OR preko 10 (193). Navedena istraživanja su utvrdila vezu između izgubljenog broja zuba i rizika za karcinome glave i vrata te zaključili kako rizik od KUŠ-a raste s brojem izgubljenih zuba te da isto ne vrijedi za faringealni i laringealni karcinom. Kada bi ovo bilo točno, KUŠ bi vrlo vjerojatno bio najčešći karcinom u svijetu.

Dva istraživanja povezala su stupanj radiološkog gubitka parodontne kosti i rizik za nastanak KUŠ-a i dobili priželjkivane rezultate, s $OR = 4,52$, 95 % CI: 3,03 – 6,75 za svaki milimetar gubitka parodontne kosti (194) i $OR = 2,4$, 95 % CI: 3,04 - 11,7 (193).

Kada se provode ovakva istraživanja, bitno je znati prepoznati zbunjujuće čimbenike, pokušati ih što točnije i u većem opsegu kontrolirati, jer se u protivnom statistika može usmjeriti u željenom smjeru istraživača, što predstavlja sustavni bias. Primjer za ovo je poznato, a sada povučeno, istraživanje o povezanosti autizma i Mo-Pa-Ru cjepiva iz 1998. godine objavljenog u The Lancetu.

Michaud i sur. napravili su meta-regresijsku analizu 6 *case-control* istraživanja o povezanosti između gubitka zuba i KUŠ-a (189). Nisu pronašli značajni linearni niti nelinearni odnos ili vezu između ovih varijabli. Isti autori imali su namjeru napraviti kvalitetnu meta-analizu o povezanosti parodontitisa i KUŠ-a. Međutim, obzirom na nedosljednost rezultata, nedovoljno dobro kontrolirane štetne navike i mali broj uzoraka, navedeno nisu uspjeli.

Prije pokušaja postavljanja uzročno-posljedične veze između KUŠ-a i parodontitisa, za preporučiti je otkrivanje točnog mehanizma ili mehanizama kojima bi parodontitis mogao uzrokovati KUŠ.

Lodhi i sur. promatrali su koncentraciju MLT-a u slini osoba s parodontitisom i dobili povišene vrijednosti MLT-a u odnosu na osobe bez parodontitisa (195). Sukladno ovim rezultatima za očekivati je da će ispitanici s većim PBI imati i višu salivarnu koncentraciju MLT-a. Lodhi i sur. su na relativnom malom broju ispitanika, ali više nego dovoljnom za pilot studiju, predstavili uzročno-posljedičnu vezu između koncentracije MLT-a i stupnja upale od blagog gingivitisa do agresivnog parodontitisa (195).

Parodontna bolest pogoršava se oslobađanjem slobodnih radikala i promijenjenim odgovorom organizma na mikroorganizme u zubnom plaku. U parodontitisu čest su nalaz polimorfonuklearni neutrofili i visoke koncentracije radikala oksidacijskog stresa (196–198). Uz navedeno, dolazi i do značajne migracije neutrofila u tkivo gingive i gingivalnu krevikularnu tekućinu i prekomjerne proizvodnje radikala oksidacijskog stresa. Upravo zbog porasta koncentracije slobodnih radikala u parodontnom ligamentu, Lodhi i sur. smatraju da dolazi do

porasta koncentracije MLT-a. Melatonin ima sposobnost modifikacije parodontne bolesti jer svojim učinkom na prostaglandin E_2 (PGE_2) može inhibirati diferencijaciju osteoklasta induciranih međustaničnim signalnim putevima između osteoklasta i osteoblasta posredovanih citokinima (83). Također, MLT može modulirati proteine koji reguliraju resorpciju kosti u parodontnoj bolesti i utjecati na sintezu i učinak kalcitonina, parathormona, $1\alpha 25(OH)_2D_3$, IL-2, IL-1 β , IL-6 i osteoprotegerina. Ovim mehanizmima MLT usporava resorpciju kosti i potiče diferencijaciju stanica u koštanoj srži (195). U uvodu je opisan i direktni antibakterijski učinak MLT-a na pojedine bakterijske vrste. Eksperimentalno istraživanje na štakorima Kose i sur. pokazalo je snažan inhibitorni utjecaj MLT-a na hiperglikemijom inducirani oksidacijski stres i gubitak alveolarne kosti kod štakora s dijabetesom i parodontitisom (199).

Zanimljiv je podatak da su Almughrabi i sur. (200) dobili potpuno oprečne rezultate onima Lodhija i suradnika. U oba istraživanja koristila se ELISA analiza dok su Almughrabi i sur. određivali zasebno koncentraciju MLT-a u slini i gingivalnoj krevikularnoj tekućini.

Balaji i sur. u pilot studiji određivali su MLT u tkivu gingive, serumu i slini 15 pacijenata s parodontitisom (201). Nisu pronašli statistički značajnu razliku u koncentracijama MLT-a u slini ($P = 0,266$) niti u plazmi ($P = 0,933$) između zdravih ispitanika i osoba s parodontitisom, ali su pronašli statistički značajno nižu koncentraciju MLT-a u tkivu gingive osoba s kroničnim parodontitisom ($P = 0,015$).

Iz rezultata našega istraživanja uočljivo je kako je PBI bio značajno viši u osoba s KUŠ-em ($U = 262$, $P = 0,0001$).

Potencijalna limitacija našeg istraživanja mogla bi biti ta da ispitanici nisu bili kontrolirani prema PBI. Međutim, dok u literaturi postoje oprečni rezultati o koncentraciji MLT-a u parodontnoj bolesti, sa sigurnošću ne možemo govoriti o PBI-u kao zbunjujućem čimbeniku. Neupitan je samo povoljni učinak MLT-a na parodontnu bolest i druga upalna stanja u usnoj šupljini.

Provedena je logistička regresijska analiza kako bi se vidjelo utječe li određena sustavna bolest i konzumacija određenog lijeka na koncentraciju MLT-a. Nije pronađena statistički značajna povezanost između konzumacije lijekova, sustavnih bolesti i koncentracije MLT-a.

Kako bi se točno procijenio utjecaj određene bolesti ili lijeka na vrijednosti MLT-a u slini i serumu, bit će potrebno istraživanje s većim uzorkom. Bez obzira na dobivenu vrijednost snage testa i statistički zadovoljavajući broj uključenih ispitanika po skupini, veličina uzorka bi zbog potencijalno nepoznatog utjecaja lijekova i/ili sustavnih bolesti, mogla predstavljati limitaciju

istraživanja. Ispitanici nisu bili kontrolirani prema sustavnim bolestima i konzumaciji lijekova, što je i pokazala naknadna analiza podataka. Većina ispitanika kontrolne skupine nije uzimala nikakve lijekove (24/33; 72,7 %).

Lijekove i sustavne bolesti pokušali smo naknadno statistički kontrolirati na način da smo promatrali koncentracije MLT-a u NS, SS, serumu i uspoređivali ih unutar skupina i između skupina obzirom na uzimanje lijekova (Podpoglavlje 4.11). Ovim analizama nije pronađena razlika u koncentracijama unutar pojedinačne skupine obzirom na uzimanje lijekova, ali je pronađena razlika između istraživanih skupina što je i očekivano obzirom na glavni rezultat istraživanja, razliku između zdravih i osoba s KUŠ-em u koncentraciji MLT-a u NS, SS i serumu. Ovime je statistički obrazloženo nepostojanje utjecaja konzumacije lijekova i sustavnih bolesti navedenih u tbl. 41 i 42 na koncentraciju MLT-a u slini i serumu.

Nedostatak ove analize je što je svaki lijek dobio jednak značaj, što svakako može predstavljati limitaciju. Također, broj ispitanika koji ne uzimaju lijekove u skupini s KUŠ-em iznosio je 7.

U uvodu su detaljno opisane najčešće štetne navike u osoba s KUŠ-em i rizik koji one nose. Očekivano, u ovome istraživanju ispitanici s KUŠ-em značajno su više konzumirali duhan i alkohol ($\chi^2 = 15,48$; $P = 0,002$). Sinergistički učinak štetnih navika, konzumacija alkohola i pušenja, predstavlja najznačajniji rizik za nastanak KUŠ-a. Stoga nije iznenađujući rezultat da je 14 ispitanika s kombiniranim štetnim navikama bilo iz skupine s KUŠ-em, a samo 1 u kontrolnoj skupini.

Raspodjela ispitanika po skupinama obzirom na broj konzumiranih alkoholnih jedinica značajno se razlikuje ($\chi^2 = 13,10$; $P = 0,004$). Više ispitanika s KUŠ-em konzumira > 5 alkoholnih jedinica dnevno od onih u kontrolnoj skupini (t-test proporcija $P = 0,05$). Očekivana je velika razlika između dvije skupine u kategoriji „ne piju alkohol“. Naime, 4 ispitanika s KUŠ-em odgovorila su da ne konzumiraju alkohol, dok je takvih u kontrolnoj skupini bilo 14.

Raspodjela ispitanika po skupinama obzirom na broj konzumiranih cigareta također se značajno razlikuje ($\chi^2 = 19,61$; $P = 0,0015$) i najuočljivija je u gornjim kategorijama varijable pušenje (> 20 cigareta/dan), gdje je 9 ispitanika iz skupine s KUŠ-em konzumiralo 21 - 35 cigareta dnevno i 4 ispitanika više od 36 cigareta. U kontrolnoj skupini u ovim kategorijama nema ispitanika. Gledajući niže kategorije varijable pušenje (< 6 cigareta/dan), kategoriju „ne puši“ te „0 - 5 cigareta dnevno“ ne uočavamo značajnu razliku u broju ispitanika.

Vjerodostojnost iskaza svakako predstavlja potencijalni opservacijski bias za varijable pušenje i alkohol.

Zbog raspodjele varijabli i broja uzoraka nije bilo moguće uspoređivati utjecaj određene štetne navike na pojavnost karcinoma na određenoj lokalizaciji. Zato je razlog dolaska opisan frekvencijom. Svi ispitanici kontrolne skupine dolazili su zbog ekstrakcije zuba. Bitno je napomenuti da se uzorkovanje sline kontrolne skupine izvodilo prije oralno-kirurškog zahvata. Najviše ispitanika iz skupine s KUŠ-em imalo je planocelularni karcinom jezika ($N = 13$; 19,4 %). Slijedili su planocelularni karcinomi sublingvalne regije i gingive donje čeljusti s $N = 5$ (7,5 %), retromolarne regije donje čeljusti i gingive gornje čeljusti s $N = 3$ (4,5 %) te obraza i nepca s $N = 1$ (1,5 %).

Koncentracija ukupnih proteina i albumina osoba s KUŠ-em bila je niža od referentnih. Kaheksija i loš nutritivni status dokazano su u svezi s alkoholizmom (29,202). U ovome istraživanju nije pronađena povezanost između konzumacije alkohola ispitanika s KUŠ-em i koncentracije ukupnih proteina (Spearmanov koeficijent korelacije: $-0,091$, $P = 0,71$) i albumina (Spearmanov koeficijent korelacije: $0,015$, $P = 0,95$). Promatrajući referentne vrijednosti koncentracija ukupnih proteina i albumina za zdrave osobe uočljivo je da su iste niže ili na donjoj granici referentnih vrijednosti u ispitanika s KUŠ-em, s medijanom od 70 (95 % CI: 59,78 - 74,00) za ukupne proteine te s medijanom od 41 za albumine (95 % CI: 32,78 - 45,65). Referentne vrijednosti za koncentraciju ukupnih proteina u serumu su 66 - 81 g/L, a albumina 41 - 51 g/L.

Spomenuto je da se uzorkovanje krvi obavljalo dan prije operacije. Rutinski se uzima krv i nakon operativnog zahvata kada su zbog gubitka krvi snižene koncentracije ukupnih proteina i albumina u krvi. Promatrala su se i uključile u statističku obradu samo vrijednosti dobivene prije operativnog zahvata.

Teorija o pasivnoj difuziji MLT-a iz seruma u slinu te teorija o omjeru nevezanog MLT-a u serumu i MLT-a u slini od 30 - 40 % mogla bi objasniti povišenu koncentraciju MLT-a u slini ispitanika s hipoalbuminemijom. Poznato je da hipoalbuminemija može biti povezana s alkoholizmom te da je konzumacija alkohola glavni rizični čimbenik za KUŠ.

Naime, ukoliko je koncentracija albumina snižena, očekivano je više slobodnog MLT-a u serumu jer isti nije vezan za albumine što bi zbog pasivne difuzije moglo rezultirati povišenom koncentracijom MLT-a u slini.

Međutim, obzirom da smo u ovom istraživanju dobili više vrijednosti MLT-a i u serumu (ELISA određivanjem koncentracije MLT-a u serumu mjeri se koncentracija ukupnog MLT-a,

nevezanog i vezanog za albumine), nismo potvrdili ovu hipotezu.

Postavilo se pitanje je li potrebno uzorkovati samo NS u budućim istraživanjima sa salivarnim MLT-om. Odgovor na ovo pitanje dala je Passing bablock regresijska analiza.

Iako je test linearnosti zadovoljen kao uvjet za provođenje analize ($P = 0,27$), rezultati upućuju na to da se NS i SS ne mogu naizmjenično koristiti za mjerenje koncentracije MLT-a obzirom da odsječak pravca (B) ne obuhvaća vrijednost 1 (130). Stoga je statistički prepoznata neovisnost vrijednosti koncentracija MLT-a u NS i SS. Ovo je potvrđeno i izradom prediktivnog modela za KUŠ koji će detaljnije biti opisan u daljnjem tekstu gdje se utjecaj koncentracije MLT-a u SS nije pokazao jednako značajnim kao i koncentracija MLT-a u NS.

Rivera i sur. u preglednom su radu prikupili rezultate raznih istraživanja o potencijalnim biljezima za KUŠ i istakli 41 biljeg za koje smatraju da imaju potencijalni dijagnostički značaj, ali zahtijevaju daljnja dugotrajna istraživanja (203).

Većina istraživanja s biljezima za KUŠ još je u ranoj fazi, tj. u fazi „otkrivanja“ te zahtijeva validaciju za kliničku praksu. Nažalost, TCGA s velikom proteomskom i genomskom bazom još uvijek nije pridonio poboljšanju dijagnostike, ne samo KUŠ-a, već i ostalih zloćudnih bolesti (204). Novija istraživanja idu u pravcu specifične i individualizirane dijagnostike i liječenja karcinoma što govori da su znanstvenici svjesni male vjerojatnosti postojanja jednog specifičnog markera za pojedini karcinom.

Rivera i sur. izdvojili su 38 istraživanja koja opisuju multivarijantnu analizu preživljavanja za 41 biljeg. Iz ovih članaka, najveću pozornost znanstvene zajednice izazvali su MMP-2, MMP-1, kadherin-1, mucin-1, GLUT-1 (SLC2A1), mucin-4, interleukin-8, HPV-16, EGFR i p53 (203). HPV-16 je sada već poznati biljeg za orofaringealni karcinom, ali ne i KUŠ (205).

Maligna progresija KUŠ-a okarakterizirana je progresivnim i nekontroliranim rastom tumorskih stanica. Procjena hoće li PMOP prijeći u KUŠ od neupitnog je kliničkog značaja. Kao potencijalni biljezi za ranu fazu kancerogeneze, tj. za PMOP, predstavljeni su Rho GTPaza aktivirajući protein 7, retinalna dehidrogenaza 1/prominin-1 (kombinirani biljezi), podoplanin, kortaktin/fokalna adhezijska kinaza 1 (kombinirani biljezi) i catenin delta-1. Ovi proteini predloženi su i kao biljezi za procjenu rizika za nastanak KUŠ-a (206–212).

Veliki je broj istraživanja s rezultatima koji nagovještavaju i predlažu nove biljege, ali je značajno mali broj tih istraživanja od kliničke koristi. Biljeg za kliničku praksu mora biti jednostavno mjerljiv, validiran na zadovoljavajućem broju ispitanika, ekonomičan i specifičan.

Rivera i sur. otkrili su još jednu zanimljivu informaciju, a to je da sva istraživanja vezana uz biljege i KUŠ nisu navela snagu testa, tj, opravdali veličinu uzorka uključenog u određeno istraživanje (203). Također, u pregledanim istraživanjima predstavljeni su prediktivni modeli za KUŠ bez interne ili eksterne validacije te su nedovoljno kontrolirane sustavne bolesti i konzumacija lijekova (203). Radi potpunijeg, razlike u koncentracijama potencijalnog biljega mogu biti uzrokovane individualnim utjecajem, prije nego karcinomom posredovanim utjecajem. Rivera i sur. stoga upozoravaju da se rezultati u ovim istraživanjima trebaju uzeti s oprezom. Upravo radi heterogenosti među istraživanjima o biljezima za KUŠ, Rivera i sur. nisu uspjeli kreirati meta-analizu koja bi obuhvaćala rezultate većeg broja istraživanja (203).

Ovim istraživanjem za procjenu granične vrijednosti koncentracije MLT-a u dijagnostici KUŠ-a korištena je ROC analiza koja se pokazala značajnom ($P < 0,001$). Površina ispod krivulje iznosila je 0,84 što se može smatrati vrlo dobrim. Dobivena je osjetljivost od 97,1 % i specifičnost od 57,6 % s graničnom vrijednošću MLT-a u NS od 0,83 (Youdenov indeks: 0,55). Stoga je uvidom u koncentraciju MLT-a u NS oboljelih od KUŠ-a moguća identifikacija 97,1 % (95 % CI: 84,7-99,9) pozitivnih kao stvarno bolesnih. Ovo znači da bi se 97,1 % ispitanika s KUŠ-om, u razdoblju između 7 i 9 h ujutro, koji imaju vrijednosti MLT-a u NS višu od 0,835 pg/mL, ocijenili ispravno kao bolesni.

Očekivano, dobivene su niže vrijednosti specifičnosti koje govore da će se samo 57,6 % (95 % CI: 39,2 - 74,5) negativnih ocijeniti kao zdravi. Ovo znači da bi se 57,6 % zdravih ispitanika, koji imaju vrijednost MLT-a u NS u razdoblju između 7 i 9 h ujutro nižu od 0,835 pg/mL, ispravno ocijenilo kao zdravi.

Rezultati dobiveni ROC analizom reprezentativniji su čak i od ponekih predstavljenih kumulativnih biomarkera za KUŠ, kao što su CEA (engl. *carcinoembryonic antigen*), SCCA (engl. *squamous cell carcinoma antigen*) (istraživanje nije razlikovalo SCCA1 i SCCA2) i IAP (engl. *immunosuppressive acidic protein*) (15). Prema dostupnoj literaturi, samo su dva potencijalna biljega za KUŠ imala više vrijednosti Youdenovog indeksa od MLT-a u NS, serumski MMP1 (engl. *matrix metalloproteinase 1*) s 0,64 i serumski KNG1 (kininogen 1) s 0,59 (213).

Bilo bi zanimljivo mjeriti sva 3 potencijalna biljega zajedno i promatrati njihovu kumulativnu osjetljivost i specifičnost.

Nedostatak strategija validacije biomarkera i standardnih operativnih postupaka za odabir

uzoraka u istraživanjima predstavlja značajnu limitaciju, što najčešće rezultira terminima kao što su „potencijalni biljeg“. Nažalost, ovo je također jedno od takvih istraživanja koje zadovoljava uvjete da se naziva presječno istraživanje, dok je sam značaj na razini pilot studije. Bez obzira na to, ovo ne umanjuje značaj rezultata koji zahtijevaju analizu na većem broju uzoraka.

Za potrebe ovog istraživanja izrađen je prediktivni model za KUŠ, model kojim se pokušalo izdvojiti varijable koje bi mogle biti značajne u ishodu bolesti. Spomenuto je da je prediktivni model u ovom istraživanju deskriptivne naravi te da nema kliničku značajnost. Prediktivni modeli zahtijevaju velik broj uzoraka te su češće rezultati velikih epidemioloških istraživanja nego presječnih istraživanja i istraživanja parova (131).

Izradom modela, promatrale su se sve varijable zajedno i postupno uklanjale one koje nisu pokazivale statistički značajnu razliku (nisu prikazani svi rezultati ove analize, iste je moguće dostaviti na zahtjev). Na kraju je dobiven prediktivni model koji objašnjava gotovo 50 – 67 % varijanci bolesti (Cox & Snell $R^2 = 0,50$ Nagelkerke $R^2 = 67$; $P < 0,0001$) (Tbl. 57).

Zanimljivo je da su u prediktivnom modelu značajne varijable koncentracija MLT-a u NS, konzumacija alkohola i PSQI. Vidljivo je da najviši OR (engl. *odds ratio*) ima MLT u NS od 4,01, konzumacija alkohola od 2,77 i PSQI od 1,34. Važno je napomenuti da navedeni OR dobiveni prediktivnim modelom nisu međusobno usporedivi jer se prediktivnim modelom promatra njihov kumulativni utjecaj.

Kada bi se ovakvim istraživanjem obuhvatilo oko 1000 ispitanika s KUŠ-em (132) i dobili slični ili jednaki rezultati prediktivne analize, zaključili bismo kako su MLT u NS, konzumacija alkohola i PSQI značajne varijable u razvoju bolesti. Time bi se izdvojili alkohol i loša kvaliteta sna kao najznačajniji rizični čimbenici za nastanak ili progresiju KUŠ-a. Prediktivni model ne bi donio veći značaj MLT u NS od onog dobivenog ovim istraživanjem.

Vidljivo je da su varijable koje su se direktnim statističkim testiranjem pokazale neznačajnim (PSQI), svoj značajni utjecaj pokazale u prediktivnom modelu, dok su one koje su se pokazale značajnim (pušenje, koncentracije MLT-a u SS i serumu), nisu pokazale takvima u prediktivnom modelu za KUŠ.

Zaključno, istraživanjem je dobivena povišena koncentracija MLT-a u slini i serumu osoba s KUŠ-em u odnosu na zdrave ispitanike. To bi moglo ukazivati na poremećaj ekspresije MT1

receptora u osoba s KUŠ-em. Poznato je da je egzogenom restauracijom MT1 receptora *in vitro* postignut prekid rasta karcinoma (81). Ova hipoteza podrazumijeva protektivni učinak MLT-a na sluznicu usne šupljine, prekomjerno lučenje MLT-a, neosjetljivost ili slabu ekspresiju MLT-ovih receptora, ali i postojanje negativne povratne sprege.

Prije razmatranja terapijske primjene MLT-a, bit će potrebno dobiti uvid u *in vivo* ekspresiju MLT-ovih receptora zdrave sluznice usne šupljine, tkiva KUŠ-a te klinički nepromijenjenog tkiva sluznice usne šupljine osoba s KUŠ-em. Odnos ekspresije MLT-ovih receptora i koncentracije salivarnog i/ili serumskog MLT-a mogao bi predstavljati značajan dijagnostički biljeg za KUŠ.

Zanimljiva je činjenica da je koncentracija MLT-a u serumu pacijenata s KUŠ-em povišena u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, dok je to kod ostalih do sada istraživanih karcinoma suprotno.

Melatonin se pokazao potencijalnim biljekom za KUŠ s osjetljivošću od 97 % i specifičnošću od 58 %.

6. ZAKLJUČCI

1. Melatonin je mjerljiv u slini i serumu osoba s planocelularnim karcinomom usne šupljine.
2. Koncentracija melatonina je u nestimuliranoj slini i stimuliranoj slini statistički značajno viša u ispitanika s karcinomom usne šupljine nego u zdravih osoba.
3. Koncentracija melatonina je u serumu statistički značajno viša u ispitanika s planocelularnim karcinomom usne šupljine nego u zdravih osoba.
4. Koncentracija melatonina u nestimuliranoj slini iznosi 8,25 – 13,2% vrijednosti slobodnog serumskog melatonina, a melatonin u stimuliranoj slini 7,13 – 8,77% vrijednosti serumskog nevezanog melatonina u ispitanika s karcinomom usne šupljine.
5. Pittsburgh Sleep Quality Index bio je značajno viši u ispitanika s karcinomom usne šupljine, međutim nije pronađena očekivana povezanost s koncentracijom melatonina u slini i serumu.
6. Papillary Bleeding Index bio je značajno viši u ispitanika s karcinomom usne šupljine.
7. Ispitanici s karcinomom usne šupljine značajno su više konzumirali alkohol i duhan pojedinačno te alkohol i duhan zajedno.
8. Predstavljen je prediktivni model za karcinom usne šupljine (Cox & Snell $R^2=0,50$ Nagelkerke $R^2 = 67$; $P < 0,0001$). Kao glavni prediktori karcinoma usne šupljine u istraživanju identificirane su varijable konzumacija alkohola (OR=4,01; 95% CI: 1,79 – 9,00), koncentracija melatonina u nestimuliranoj slini (OR= 2,77; 95% CI: 1,51 - 5,09) i PSQI (OR=1,3369; 95% CI = 1,02 - 1,75).
9. Salivarni melatonin mogao bi predstavljati potencijalni biljeg za karcinom usne šupljine. ROC analizom je dobivena osjetljivost od 97,1% i specifičnost od 57,6% s graničnom vrijednosti melatonina u nestimuliranoj slini od 0,83 (Youdenov indeks: 0.55).

7. LITERATURA

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Lee YA, Li S, Chen Y, et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, betel quid chewing, and the risk of head and neck cancer in an East Asian population. *Head Neck*. 2019;41(1):92-102.
3. Miloro M, Larsen P, Ghali GE, Waite P. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. 2nd ed. Connecticut: PMPH USA; 2011.
4. Rivera MCA. 4NQO Carcinogenesis: A Model of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Morphol.* 2012;30(1):309-14.
5. Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer*. 2006;43(2):60-6.
6. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2007;43(6):523-34.
7. Bonifazi M, Malvezzi M, Bertuccio P, et al. Age-period-cohort analysis of oral cancer mortality in Europe: The end of an epidemic? *Oral Oncol.* 2011;47(5):400-7.
8. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16.
9. Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):340-50.
10. Sankaranarayanan R. Screening for cancer in low- and middle-income countries. *Ann Glob Health*. 2014;80(5):412-7.
11. Seitz HK, Mueller S. Alcohol and cancer. In: Verster J, Brady K., Galanter M, Conrod P, editors. *Drug Abuse and Addiction in Medical Illness: Causes, Consequences and Treatment*. New York: Springer; 2012. p. 431-41.
12. Salarić I, Povrzanović I, Brajdić D, Lukšić I, Macan D. Potentially malignant oral disorders and high-risk habits in liver cirrhosis and lung cancer patients. *Oral Dis*. 2015;21(3):373-7.
13. Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thara S, et al. Long term effect of visual screening on oral cancer incidence and mortality in a randomized trial in Kerala, India. *Oral Oncol.* 2013;49(4):314-21.
14. Linkov F, Lisovich A, Yurkovetsky Z, et al. Early detection of head and neck cancer:

- Development of a novel screening tool using multiplexed immunobead-based biomarker profiling. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16(1):102-7.
15. Kurokawa H, Tsuru S, Okada M, Nakamura T, Kajiyama M. Evaluation of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma in the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 22(1):35-8.
 16. Salarić I, Lovrić J, Karmelić I, Macan D. Slina kao dijagnostičko sredstvo. U: Mravak-Stipetić M, Sertić J, Jurišić-Kvesić A, urednici. *Opće zdravlje kroz oralno zdravlje. Multidisciplinarni pristup.* Zagreb: Hrvatska komora dentalne medicine; 2019. p. 35-44.
 17. Lederman M. Cancer Of The Pharyngo-Laryngeal Groove with Special Reference to the Sinus Pyriformis. *J Laryngol Otol.* 1953;67(11):641-54.
 18. Lederman M. The Anatomy of Cancer. *J Laryngol Otol.* 1964;78(2):181-208.
 19. Moore C, Catlin D. Anatomic origins and locations of oral cancer. *Am J Surg.* 1967;114(4):510-3.
 20. Shenoi R, Chaudhuri, Sapre SB, Devrukhkar V, Sharma BK, Chikhale A. Demographic and clinical profile of oral squamous cell carcinoma patients: A retrospective study. *Indian J Cancer.* 2012;49(1):21-6.
 21. Macan D, Virag M, Božikov J. Alcohol in saliva related to the anatomical site of oral carcinoma. In: Abstracts of the First World Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO); 2007 May 17–20; Amsterdam, Netherlands. *Oral Oncol (Suppl 2)*128:1.
 22. Bhurgri Y, Bhurgri A, Hussainy AS, et al. Cancer of the Oral Cavity and Pharynx in Karachi - Identification of Potential Risk Factors. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2003;4(2):125-30.
 23. Bektas-Kayhan K, Karagoz G, Kesimli MC, et al. Carcinoma of the Tongue: A Case-control Study on Etiologic Factors and Dental Trauma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(5):2225-9.
 24. Jovanovic A, Schulten EAJM, Kostense PJ, Snow GB, Waal I. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(10):459-62.
 25. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2018;16(11):1362-89.
 26. Miller AB. Cancer Prevention. In: Quah SR, editor. *International Encyclopedia of*

- Public Health. Cambridge, USA: Academic Press; 2016. p. 381-8.
27. Goodman B, Gardner H. The microbiome and cancer. *J Pathol.* 2018;244(5):667-76.
 28. Kravchenko JS. Diet and Cancer. In: Quah SR, editor. *International Encyclopedia of Public Health.* Cambridge, USA: Academic Press; 2016. p. 295-300.
 29. Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr.* 2004;7(1A):187-200.
 30. Baena R, Salinas P. Diet and colorectal cancer. *Maturitas.* 2015;80(3):258-64.
 31. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):122-137.
 32. Schimansky S, Lang S, Beynon R, et al. Association between comorbidity and survival in head and neck cancer: Results from Head and Neck 5000. *Head Neck.* 2019;41(4):1053-1062.
 33. Scully C, Petti S. Overview of cancer for the healthcare team: Aetiopathogenesis and early diagnosis. *Oral Oncol.* 2010;46(6):402-6.
 34. Rao SVK, Mejia G, Roberts-Thomson K, Logan R. Epidemiology of Oral Cancer in Asia in the Past Decade- An Update (2000-2012). *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(10):5567-77.
 35. Carrard VC, Pires AS, Mendez M, et al. Exploring the mechanisms of alcohol-related damage in oral mucosa – is oxidative stress associated with the increase in cell proliferation in rat tongue epithelium? *Pharm Biol.* 2013;51(2):160-9.
 36. Rehm J, Baliunas D, Borges GLG, et al. The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease: An overview. *Addiction.* 2010;105(5):817-43.
 37. Macan D. Uloga alkohola u nastanku karcinoma usne šupljine [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu Stomatološki fakultet; 1999.
 38. Kremer M, Lesch CA Squier CA. Effect of Alcohol on Mucosal Penetration of Tobacco Carcinogens (Abstract). *J Dent Res.* 1991;70:595.
 39. Povrzanović I. Promjene na sluznici usne šupljine kod skupina rizičnih za pojavu karcinoma [magistarski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu Stomatološki fakultet; 2006.
 40. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.*

- 2009;45(4-5):317-23.
41. Mortazavi H, Baharvand M, Mehdipour M. Oral Potentially Malignant Disorders: An Overview of More than 20 Entities. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2014;8(1):6-14.
 42. Idris AM, Prokopczyk B, Hoffmann D. Toombak: A major risk factor for cancer of the oral cavity in Sudan. *Prev Med*. 1994;23(6):832-9.
 43. Boffetta P, Mashberg A, Winkelmann R, Garfinkel L. Carcinogenic effect of tobacco smoking and alcohol drinking on anatomic sites of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer*. 1992;52(4):530-3.
 44. Winn DM. Tobacco Use and Oral Disease. *J Dent Educ*. 2001;65(4):306-12.
 45. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer Epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(2):541-50.
 46. Nabukenya J, Hadlock TA, Arubaku W. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Western Uganda: Disease of Uncertainty and Poor Prognosis. *OTO Open*. 2018;2(1):2473974X1876186.
 47. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol*. 2011;2011:603740.
 48. Jiang C, Ye D, Qiu W, et al. Response of lymphocyte subsets and cytokines to Shenyang prescription in Sprague-Dawley rats with tongue squamous cell carcinomas induced by 4NQO. *BMC Cancer*. 2007;7:40.
 49. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: Implications for therapy. *J Dent Res*. 2008;87(1):14-32.
 50. Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi G, Santinelli A. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002;60(5):532-40.
 51. Raudenska M, Gumulec J, Fribley AM, Masarik M. HNSCC Biomarkers Derived from Key Processes of Cancerogenesis. In: M. Fribley A, editor. *Targeting Oral Cancer*. New York: Springer; 2016. p.115-60.
 52. Russo D, Merolla F, Varricchio S, et al. Epigenetics of oral and oropharyngeal cancers. *Biomed Reports*. *Biomed Rep*. 2018;9(4):275-83.

53. Dvojakovska S, Popovic-Monevska D, Grcev A, et al. Promotor hypermethylated genes: Prospective diagnostic biomarkers in oral cancerogenesis. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2018;46(10):1737-40.
54. Shaw RJ, Hall GL, Lowe D, et al. The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: Correlation of quantitative methylation data with gene expression. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;134(3):251-6.
55. Worsham MJ, Chen KM, Stephen JK, Havard S, Benninger MS. Novel approaches to global mining of aberrantly methylated promoter sites in squamous head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;143(1):116-21.
56. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953;6(5):963-8.
57. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Kummer JA, Leemans CR, Braakhuis BJM. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: A retrospective study. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3607-13.
58. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of slaughter's concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63(8):1727-30.
59. Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis.* 1999;20(10):1927-31.
60. Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR, Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol.* 2001;37(7):593-8.
61. Harty LC, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(12):937-9.
62. Brennan P, Lewis S, Hashibe M, et al. Pooled Analysis of Alcohol Dehydrogenase Genotypes and Head and Neck Cancer: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2004;159(1):1-16.
63. Benner SE, Wargovich MJ, Lippman SM, et al. Reduction in Oral Mucosa Micronuclei Frequency Following Alpha-Tocopherol Treatment of Oral Leukoplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994;3(1):73-6.
64. Stich HF, Rosin MP, Hornby AP, Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair MK. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated

- with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *Int J Cancer*. 1988;42(2):195-9.
65. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van Der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10):575-80.
66. Greenberg MS, Glick M. *Burket's Oral Medicine: Diagnosis & Treatment*. Hamilton: BC Decker; 2003.
67. Sarode GS, Sarode SC. Determination of bioimpedance in oral potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013;27(S9):370.
68. Brouns E, Baart JA, Karagozoglu KH, Aartman IHA, Bloemena E, Van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia in a well-defined cohort of 144 patients. *Oral Dis*. 2014;20(3):19-24.
69. Sarode SC, Sarode GS, Tupkari J V. Oral potentially malignant disorders: Precising the definition. *Oral Oncol*. 2012;48(9):759-60.
70. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia - A review. *Oral Oncol*. 2005;41(6):551-61.
71. Shafer WG, Waldron CA. Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer*. 1975;36(3):1021-8.
72. Murti PR, Bhonsle RB, Pindborg JJ, Daftary DK, Gupta PC, Mehta FS. Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1985;13(6):340-1.
73. Su WWY, Yen AMF, Chiu SYH, Chen THH. A community-based RCT for oral cancer screening with toluidine blue. *J Dent Res*. 2010;89(9):933-7.
74. Brzak BL, Mravak-Stipetić M, Canjuga I, et al. The frequency and malignant transformation rate of oral lichen planus and leukoplakia--a retrospective study. *Coll Antropol*. 2012;36(3):773-7.
75. Tovu S, Parlatescu I, Gheorghe C, Tovu M, Costache M, Sardella A. Oral lichen planus: A retrospective study of 633 patients from Bucharest, Romania. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(2):201-6.
76. Manojlovic S, Mravak Stipetic M, Luksic I, Macan D, Manojlovic Z. Malignant transformation of oral lichen planus. Abstracts of the 21st European Congress of Pathology; 2007 Sep 8-13; *Virchows Archiv*. New York: Springer; 2007. p. 544-545.
77. Aghbari SMH, Abushouk AI, Attia A, et al. Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A meta-analysis of 20095 patient data. *Oral Oncol*.

- 2017;68:92-102.
78. Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions A systematic review. *J Am Dent Assoc.* 2014;145(1):45-56.
 79. McCartan BE, Healy CM. The reported prevalence of oral lichen planus: A review and critique. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(8):447-53.
 80. Richards D. Malignant transformation rates in Oral Lichen Planus. *Evid Based Dent.* 2018;19(4):122.
 81. Cutando A, Aneiros-Fernández J, López-Valverde A, Arias-Santiago S, Aneiros-Cachaza J, Reiter RJ. A new perspective in Oral health: Potential importance and actions of melatonin receptors MT1, MT2, MT3, and RZR/ROR in the oral cavity. *Arch Oral Biol.* 2011;56(10):944-50.
 82. Srinivasan R, Gechtman Guy, Bayer A. What is the Molecular Basis of Sleep Regulation [Internet]. c2018. Available from: <https://sites.tufts.edu/sleep/biochemical-pathway/>.
 83. Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ. Melatonin in diseases of the oral cavity. *Oral Dis.* 2010;16(3):242-7.
 84. Skene DJ, Arendt J. Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann Clin Biochem.* 2006;43(5):344-53.
 85. Van Faassen M, Bischoff R, Kema IP. Relationship between plasma and salivary melatonin and cortisol investigated by LC-MS/MS. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(9):1340-8.
 86. Isola M, Lilliu MA. Melatonin localization in human salivary glands. *J Oral Pathol Med.* 2016;45(7):510-5.
 87. Laakso M-L, A J A Porkka-Heiskanen T, Alila A, Stenberg D, Johansson G. Correlation Between Salivary and Serum Melatonin: Dependence on Serum Melatonin Levels. *J Pineal Res.* 1990;9(1):39-50.
 88. De Almeida EA, Di Mascio P, Harumi T, et al. Measurement of melatonin in body fluids: Standards, protocols and procedures. *Childs Nerv Syst.* 2011;27(6):879-91.
 89. Cornell B. BioNinja: Melatonin [Internet]. c2016. Available from: <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-6-human-physiology/66-hormones-homeostasis-and/melatonin.html>.
 90. Kim TW, Jeong JH, Hong SC. The impact of sleep and circadian disturbance on

- hormones and metabolism. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:591729.
91. Maitra S, Bhattacharya D, Das S, Bhattacharya S. Melatonin and its anti-glioma functions: a comprehensive review. *Rev Neurosci*. 2019 [Epub ahead of print].
 92. Lv J-W, Zheng Z-Q, Wang Z-X, et al. Pan-cancer Genomic Analyses Reveal Prognostic and Immunogenic Features of the Tumor Melatonergic Microenvironment Across 14 Solid Cancer Types. *J Pineal Res*. 2019;66(3):e12557.
 93. Kovács J, Brodner W, Kirchlechner V, Arif T, Waldhauser F. Measurement of urinary melatonin: A useful tool for monitoring serum melatonin after its oral administration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(2):666-70.
 94. Sánchez A, Calpena AC, Clares B. Evaluating the oxidative stress in inflammation: Role of melatonin. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):16981-7004.
 95. Bush SH, Lacaze-Masmonteil N, McNamara-Kilian MT, et al. The preventative role of exogenous melatonin administration to patients with advanced cancer who are at risk of delirium: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2016;17:399.
 96. Lissoni P, Barni S, Mandalà M, et al. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer*. 1999;35(12):1688-92.
 97. Lovrić J i sur. Priručnik za vježbe iz biokemije za studente stomatologije. Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
 98. Malamud D. Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent Clin North Am*. 2011;55(1):159-78.
 99. Strauss SM, Wheeler AJ, Russell SL, et al. The Potential Use of Gingival Crevicular Blood for Measuring Glucose to Screen for Diabetes: An Examination Based on Characteristics of the Blood Collection Site. *J Periodontol*. 2009;80(6):907-14.
 100. Mirzaii-Dizgah I, Riahi E. Salivary troponin I as an indicator of myocardial infarction. *Indian J Med Res*. 2013;138(6):861-5.
 101. Floriano PN, Christodoulides N, Miller CS, et al. Use of saliva-based nano-biochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: A feasibility study. *Clin Chem*. 2009;55(8):1530-8.
 102. Qvarnstrom M, Janket S, Jones JA, et al. Salivary lysozyme and prevalent hypertension. *J Dent Res*. 2008;87(5):480-4.
 103. Lee JM, Colangelo LA, Schwartz JE, et al. Associations of cortisol/testosterone and cortisol/sex hormone-binding globulin ratios with atherosclerosis in middle-age

- women. *Atherosclerosis*. 2016;248:203-9.
104. Nagler RM. Saliva analysis for monitoring dialysis and renal function. *Clin Chem*. 2008;54(9):1415-7.
105. Walt DR, Blicharz TM, Hayman RB, et al. Microsensor arrays for saliva diagnostics. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1098:389-400.
106. Arregger AL, Cardoso EML, Tumilasci O, Contreras LN. Diagnostic value of salivary cortisol in end stage renal disease. *Steroids*. 2008;73(1):77-82.
107. Lovrić J. Oksidacijski stres. U: Bulić-Jakuš F, Sertić J, urednici. *Metode molekularne biologije u medicini*. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. p. 85-94.
108. Lovrić J. Metode za određivanje oksidacijskog stresa. U: Lovrić J, Rogić D, urednici. *Biokemijske metode u biomedicinskim istraživanjima*. Zagreb: Medicinska naklada; 2015. p. 33-40.
109. Savica V, Calo LA, Monardo P, et al. Salivary Phosphate-Binding Chewing Gum Reduces Hyperphosphatemia in Dialysis Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(3):639-44.
110. Savica V, Calo LA, Granata A, et al. A new approach to the evaluation of hyperphosphatemia in chronic kidney disease. *Clin Nephrol*. 2007;68(4):216-21.
111. Salarić I, Sabalić M, Alajbeg I. Opiorphin in burning mouth syndrome patients: a case-control study. *Clin Oral Investig*. 2017;21(7):2363-2370.
112. Hu S, Vissink A, Arellano M, et al. Identification of autoantibody biomarkers for primary Sjogren's syndrome using protein microarrays. *Proteomics*. 2011;11(8):1499-507.
113. Esmaili N, Mortazavi H, Kamyab-Hesari K, et al. Diagnostic accuracy of BP180 NC16a and BP230-C3 ELISA in serum and saliva of patients with bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol*. 2015;40(3):324-30.
114. Azuma M, Kasai Y, Tamatani T, Sato M. Involvement of p53 mutation in the development of human salivary gland pleomorphic adenomas. *Cancer Lett*. 1992;65(1):61-71.
115. Shiiki N, Tokuyama S, Sato C, et al. Association between saliva PSA and serum PSA in conditions with prostate adenocarcinoma. *Biomarkers*. 2011;16(6):498-503.
116. Dyckhoff G, Warta R, Gonnermann A, Plinkert PK, Flechtenmacher C, Volkmann M. Carbohydrate antigen 19-9 in saliva: Possible preoperative marker of malignancy in parotid tumors. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;145(5):772-7.

117. Murphy PJ, Myers BL, Badia P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs alter body temperature and suppress melatonin in humans. *Physiol Behav.* 1996;59(1):133-9.
118. Maldonado MD, Moreno H, Calvo JR. Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clin Nutr.* 2009;28(2):188-91.
119. Erdfelder E, Faul F, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods.* 2009;41(4):1149-60.
120. Premkumar M, Sable T, Dhanwal D, Dewan R. Circadian Levels of Serum Melatonin and Cortisol in relation to Changes in Mood, Sleep, and Neurocognitive Performance, Spanning a Year of Residence in Antarctica. *Neurosci J.* 2013;2013:254090.
121. Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh sleep quality index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* 1989;28(2):193-213.
122. Lušić L, Pecotić R, Valić M, Pavlinac Dodig I, Đogaš Z. Sleep quality and other psychological variables in obstructive sleep apnea patients. *The Oxford Sleep and Circadian Neuroscience Summer Schools; 2014 June 24-29; John Radcliffe Hospital, Oxford, UK.* 2014. p. 1.
123. Ramfjord SP. Indices for Prevalence and Incidence of Periodontal Disease. *J Periodontol.* 1959;30(1):51-9.
124. Poulsen S. Epidemiology and indices of gingival and periodontal disease. *Pediatr Dent.* 1981;3:82-8.
125. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. WHOCC - ATC/DDD Index [Internet]. c2015. Available from: https://www.whocc.no/atc_ddd_index/.
126. WHO. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-11) [Internet]. c2018. Available from: <https://www.who.int/classifications/icd/en/>.
127. Konstantinou GN. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2017;1592:79-94.
128. Thermo Fisher Scientific. Overview of ELISA [Internet]. c2013. Available from: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>

129. Abcam. Types of ELISA [Internet]. c2016. Available from: <https://www.abcam.com/kits/types-of-elisa>.
130. Bilic - Zulle L. Lessons in biostatistics Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Medica*. 2011;21(3):49-52.
131. Kim YM, Heyman HM. Mass spectrometry-based metabolomics. *Methods Mol Biol*. 2018;1775:107-18.
132. Nogueira LM, Sampson JN, Chu LW, et al. Individual variations in serum melatonin levels through time: Implications for epidemiologic studies. *PLoS One*. 2013;8(12):e83208.
133. Geisser S. Predictive Inference: An Introduction. 1st ed. New York: Routledge; 2017.
134. Ogundimu EO, Altman DG, Collins GS. Adequate sample size for developing prediction models is not simply related to events per variable. *J Clin Epidemiol*. 2016;76:175-82.
135. Kennaway DJ, Voultzios A. Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(3):1013-5.
136. Shimozuma M, Tokuyama R, Tatehara S, et al. Expression and cellular localization of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivary glands. *Histochem Cell Biol*. 2011;135(4):389-96.
137. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, et al. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(16):2997-3025.
138. Isola M, Ekström J, Diana M, et al. Subcellular distribution of melatonin receptors in human parotid glands. *J Anat*. 2013;223(5):519-24.
139. Isola M, Ekström J, Isola R, Loy F. Melatonin release by exocytosis in the rat parotid gland. *J Anat*. 2019;234(3):338-45.
140. Reiter RJ, Tan DX, Lorena FB. Melatonin: A multitasking molecule. *Prog Brain Res*. 2010;181:127-51.
141. Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*. 1991;12(2):151-80.
142. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: Localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci*. 2002;47(10):2336-48.
143. Hardeland R, Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond)*. 2005;2:22.

144. Vakkuri O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. *Acta Physiol Scand*. 1985;124(3):409-12.
145. Voultsios A, Kennaway DJ, Dawson D. Salivary Melatonin as a Circadian Phase Marker: Validation and Comparison to Plasma Melatonin. *J Biol Rhythms*. 1997;12(5):457-66.
146. Meurman JH, Rantonen P, Pajukoski H, Sulkava R. Salivary albumin and other constituents and their relation to oral and general health in the elderly. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94(4):432-8.
147. Vural EMS, Van Munster BC, De Rooij SE. Optimal dosages for melatonin supplementation therapy in older adults: A systematic review of current literature. *Drugs Aging*. 2014;31(6):441-51.
148. Isola M, Lilliu MA, Loy F, Isola R. Diabetic Status Influences the Storage of Melatonin in Human Salivary Glands. *Anat Rec (Hoboken)*. 2018;301(4):711-6.
149. Isola M, Ekstrom J, Lilliu MA, Isola R, Loy F. Dynamics of the melatonin MT1 receptor in the rat parotidgland upon melatonin administration. *J Physiol Pharmacol*. 2016;67(1):111-9.
150. Cohen M, Lippman M, Chabner B. Role of pineal gland in ætiology and treatment of breast cancer. *Lancet*. 1978;2(8094):814-6.
151. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, et al. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J Exp Bot*. 2012;63(2):577-97.
152. El-Missiry MA, Abd El-Aziz AF. Influence of melatonin on proliferation and antioxidant system in Ehrlich ascites carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2000;151(2):119-25.
153. Blask D, Sauer L, Dauchy R. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem*. 2002;2(2):113-32.
154. Jung B, Ahmad N. Melatonin in cancer management: Progress and promise. *Cancer Res*. 2006;66(20):9789-93.
155. Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:387-96.
156. Carlberg C, Wiesenberger I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res*. 1995;18(4):171-8.
157. Martín-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andrés O, González P, González-Gallego J. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res*. 2008;45(4):532-40.

158. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Clinical Uses of Melatonin: Evaluation of Human Trials. *Curr Med Chem*. 2010;17(19):2070-95.
159. Colombo J, Maciel JMW, Ferreira LC, da Silva RF, Zuccari DAP de C. Effects of melatonin on HIF-1 α and VEGF expression and on the invasive properties of hepatocarcinoma cells. *Oncol Lett*. 2016;12(1):231-7.
160. Vijayalaxmi, Thomas CR, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol*. 2002;20(10):2575-601.
161. Cutando A, López-Valverde A, Arias-Santiago S, De Vicente J, De Diego RG. Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res*. 2012;32(7):2747-54.
162. Ushakov IB, Vasin MV. Radiation protective agents in the radiation safety system for long-term exploration missions. *Hum Physiol*. 2014;40:695-703.
163. Wang YM, Jin BZ, Ai F, et al. The efficacy and safety of melatonin in concurrent chemotherapy or radiotherapy for solid tumors: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69(5):1213-20.
164. Kim C, Kim N, Joo H, et al. Modulation by melatonin of the cardiotoxic and antitumor activities of adriamycin. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46(2):200-10.
165. Pourhanifeh MH, Mahdavinia M, Reiter RJ, Asemi Z. Potential use of melatonin in skin cancer treatment: A review of current biological evidence. *J Cell Physiol*. 2019 [Epub ahead of print].
166. Varoni EM, Paroni R, Antognetti J, et al. Effects of red wine drinking on salivary and serum melatonin contents. *Molecules*. 2018; 23(10): 2474.
167. Varoni EM, Gardana C, Cammarota S, et al. Effects of red wine drinking on salivary and serum melatonin contents. *Oral Dis*. 2014;20:7.
168. Gooley JJ, Chamberlain K, Smith KA, et al. Exposure to room light before bedtime suppresses melatonin onset and shortens melatonin duration in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(3):E463-72.
169. Meng X, Li Y, Li S, et al. Dietary sources and bioactivities of melatonin. *Nutrients*. 2017;9(4):E367.
170. Lund HG, Reider BD, Whiting AB, Prichard JR. Sleep Patterns and Predictors of Disturbed Sleep in a Large Population of College Students. *J Adolesc Health*. 2010;46(2):124-32.
171. Bush AL, Armento MEA, Weiss BJ, et al. The Pittsburgh Sleep Quality Index in older primary care patients with generalized anxiety disorder: Psychometrics and outcomes

- following cognitive behavioral therapy. *Psychiatry Res.* 2012;199(1):24-30.
172. Casement MD, Harrington KM, Miller MW, Resick PA. Associations between Pittsburgh Sleep Quality Index factors and health outcomes in women with posttraumatic stress disorder. *Sleep Med.* 2012;13(6):752-8.
173. Sano A, Phillips AJ, Yu AZ, et al. Recognizing academic performance, sleep quality, stress level, and mental health using personality traits, wearable sensors and mobile phones. In: 2015 IEEE 12th International Conference on Wearable and Implantable Body Sensor Networks; 2015 June 9-12; Cambridge, USA: IEEE; 2015. p.1-6.
174. Benitez A, Gunstad J. Poor sleep quality diminishes cognitive functioning independent of depression and anxiety in healthy young adults. *Clin Neuropsychol.* 2012;26(2):214-23.
175. Backhaus J, Junghanns K, Broocks A, Riemann D, Hohagen F. Test-retest reliability and validity of the Pittsburgh Sleep Quality Index in primary insomnia. *J Psychosom Res.* 2002;53(3):737-40.
176. Chen D, Yin Z, Fang B. Measurements and status of sleep quality in patients with cancers. *Support Care Cancer.* 2018;26(2):405-14.
177. Otte JL, Rand KL, Carpenter JS, Russell KM, Champion VL. Factor analysis of the pittsburgh sleep quality index in breast cancer survivors. *J Pain Symptom Manage.* 2013;45(3):620-7.
178. Carpenter JS, Andrykowski MA. Psychometric evaluation of the Pittsburgh Sleep Quality Index. *J Psychosom Res.* 1998;45(1):5-13.
179. Faiz SA, Balachandran D, Hessel AC, et al. Sleep-Related Breathing Disorders in Patients With Tumors in the Head and Neck Region. *Oncologist.* 2014;19(11):1200-6.
180. Qin L, Mo YL, Li L, et al. Sleep characteristics and psychological symptoms in patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma before and after intensity-modulated radiotherapy and concurrent chemotherapy. *Psychol Health Med.* 2015;20(6):662-9.
181. Scarpa M, Pinto E, Saadeh LM, et al. Sleep disturbances and quality of life in postoperative management after esophagectomy for esophageal cancer. *World J Surg Oncol.* 2014;12:156.
182. Kim EK, Lee SG, Choi YH, et al. Association between diabetes-related factors and clinical periodontal parameters in type-2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health.* 2013;13:64.

183. Van Strydonck DAC, Slot DE, Van Der Velden U, Van Der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2012;39(11):1042-55.
184. Nightingale KJ, Chinta SK, Agarwal P, et al. Toothbrush efficacy for plaque removal. *Int J Dent Hyg*. 2014;12(4):251-6.
185. Sunitha R V, Sapthagiri E. Flapless implant surgery: A 2-year follow-up study of 40 implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;116(4):e237-43.
186. Schmickler J, Rupprecht A, Patschan S, et al. Cross-Sectional Evaluation of Periodontal Status and Microbiologic and Rheumatoid Parameters in a Large Cohort of Patients With Rheumatoid Arthritis. *J Periodontol*. 2017;88(4):368-79.
187. Lax AJ, Thomas W. How bacteria could cause cancer: One step at a time. *Trends Microbiol*. 2002;10(6):293-9.
188. Gholizadeh P, Eslami H, Yousefi M, Asgharzadeh M, Aghazadeh M, Kafil HS. Role of oral microbiome on oral cancers, a review. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:552-8.
189. Michaud DS, Fu Z, Shi J, Chung M. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk. *Epidemiol Rev*. 2017;39(1):49-58.
190. Michaud DS, Liu Y, Meyer M, Giovannucci E, Joshipura K. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2008;9(6):550-8.
191. Chung SD, Tsai MC, Huang CC, Kao LT, Chen CH. A population-based study on the associations between chronic periodontitis and the risk of cancer. *Int J Clin Oncol*. 2016;21(2):219-223.
192. Blot WJ, Blot WJ, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Winn DM. Mouthwash Use and Oral Conditions in the Risk of Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Res*. 1991;51(11):3044-7.
193. Moergel M, Kämmerer P, Kasaj A, et al. Chronic periodontitis and its possible association with oral squamous cell carcinoma - a retrospective case control study. *Head Face Med*. 2013;9:39.
194. Tezal M, Sullivan MA, Hyland A, et al. Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(9):2406-12.
195. Lodhi K, Saimbi C, Khan M, Nath C, Shukla R. Evaluation of melatonin levels in saliva in gingivitis and periodontitis cases: A pilot study. *Contemp Clin Dent*.

- 2016;7(4):519-23.
196. Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, et al. Periodontal disease: The influence of metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9(1):88.
 197. Horton AL, Boggess KA, Moss KL, Beck J, Offenbacher S. Periodontal Disease, Oxidative Stress, and Risk for Preeclampsia. *J Periodontol*. 2010;81(2):199-204.
 198. Almerich-Silla JM, Montiel-Company JM, Pastor S, Serrano F, Puig-Silla M, Dasí F. Oxidative Stress Parameters in Saliva and Its Association with Periodontal Disease and Types of Bacteria. *Dis Markers*. 2015;2015:653537.
 199. Kose O, Arabaci T, Kara A, et al. Effects of Melatonin on Oxidative Stress Index and Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats With Periodontitis. *J Periodontol*. 2016;87(5):e82-90.
 200. Almughrabi OM, Marzouk KM, Hasanato RM, Shafik SS. Melatonin levels in periodontal health and disease. *J Periodontal Res*. 2013;48(3):315-21.
 201. Balaji TM, Vasanthi HR, Rao SR. Gingival, plasma and salivary levels of melatonin in periodontally healthy individuals and chronic periodontitis patients: A pilot study. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(3):23-5.
 202. Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health*. 2003;27(3):220-31.
 203. Rivera C, Oliveira AK, Costa RAP, De Rossi T, Paes Leme AF. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncol*. 2017;72:38-47.
 204. Yuan Y, Van Allen EM, Omberg L, et al. Assessing the clinical utility of cancer genomic and proteomic data across tumor types. *Nat Biotechnol*. 2014;32(7):644-52.
 205. Dok R, Nuyts S. HPV positive head and neck cancers: Molecular pathogenesis and evolving treatment strategies. *Cancers (Basel)*. 2016;8(4):41.
 206. Tripathi SC, Kaur J, Matta A, et al. Loss of DLC1 is an independent prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2012;25(1):14-25.
 207. De Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM. Podoplanin expression in oral leukoplakia: Tumorigenic role. *Oral Oncol*. 2013;49(6):598-603.
 208. Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, et al. Podoplanin: A novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J Clin Oncol*. 2008;26(3):354-60.
 209. Ma LW, Zhou ZT, He QB, Jiang WW. Phosphorylated p120-catenin expression has

- predictive value for oral cancer progression. *J Clin Pathol*. 2012;65(4):315-9.
210. Liu W, Wu L, Shen XM, et al. Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and CD133 correlate with a high risk of malignant transformation of oral leukoplakia. *Int J Cancer*. 2013;132(4):868-74.
211. Feng JQ, Xu ZY, Shi LJ, Wu L, Liu W, Zhou ZT. Expression of cancer stem cell markers ALDH1 and Bmi1 in oral erythroplakia and the risk of oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 2013;42(2):148-53.
212. De Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM. Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with premalignant oral epithelial lesions. *Oral Oncol*. 2012;48(7):641-6.
213. Yu J-S, Chen Y-T, Chiang W-F, et al. Saliva protein biomarkers to detect oral squamous cell carcinoma in a high-risk population in Taiwan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(41):11549-54.

8. PRILOZI

Istraživački obrazac za procjenu kvalitete sna korišten u kliničkom ispitivanju: Pittsburgh Sleep Quality Index

Sljedeća se pitanja odnose na Vaše uobičajene navike spavanja u zadnjih mjesec dana. Vaši odgovori trebaju se odnositi na ono što je točno za većinu dana i noći u proteklom mjesecu. Molim Vas da odgovorite na sva pitanja.

U zadnjih mjesec dana...

#1 ... u koliko ste sati obično odlazili u krevet? _____

#2 ... koliko vremena (u minutama) Vam je obično trebalo da zaspate? _____

#3 ...u koliko ste sati obično ujutro ustajali iz kreveta? _____

#4 ... Koliko ste sati zaista spavali po noći? _____

(ovo trajanje može se razlikovati od broja sati koje ste proveli u krevetu) _____

#5 Na sljedeća pitanja odgovorite tako da označite jedan odgovor.

Molim Vas da odgovorite na sva pitanja.

#5a U zadnjih mjesec dana, koliko ste često imali problema sa spavanjem zbog toga što...

... niste uspjeli zaspati unutar 30 minuta

a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)

b) Manje od jednom tjedno (1)

c) Jednom ili dvaput tjedno (2)

d) Tri ili više puta tjedno (3)

#5b ...probudili ste se usred noći ili rano ujutro

a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)

b) Manje od jednom tjedno (1)

c) Jednom ili dvaput tjedno (2)

d) Tri ili više puta tjedno (3)

#5c...morali ste se ustati kako biste otišli na wc

- a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)
- b) Manje od jednom tjedno (1)
- c) Jednom ili dvaput tjedno (2)
- d) Tri ili više puta tjedno (3)

#5d... U zadnjih mjesec dana, koliko ste često imali problema sa spavanjem zbog toga što ste otežano disali

- a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)
- b) Manje od jednom tjedno (1)
- c) Jednom ili dvaput tjedno (2)
- d) Tri ili više puta tjedno (3)

#5e ...kašljali ste ili glasno hrkali

- a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)
- b) Manje od jednom tjedno (1)
- c) Jednom ili dvaput tjedno (2)
- d) Tri ili više puta tjedno (3)

#5f...bilo Vam je prehladno

- a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)
- b) Manje od jednom tjedno (1)
- c) Jednom ili dvaput tjedno (2)
- d) Tri ili više puta tjedno (3)

#5g...bilo Vam je prevruće

- a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)
- b) Manje od jednom tjedno (1)
- c) Jednom ili dvaput tjedno (2)
- d) Tri ili više puta tjedno (3)

#5h...loše ste sanjali

- a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)

- b) Manje od jednom tjedno (1)
- c) Jednom ili dvaput tjedno (2)
- d) Tri ili više puta tjedno (3)

#5i...imali ste bolove

- a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)
- b) Manje od jednom tjedno (1)
- c) Jednom ili dvaput tjedno (2)
- d) Tri ili više puta tjedno (3)

...drugi razlog/razlozi, molim Vas opišite ih _____

#5j Drugi razlog(zi); koliko ste često u zadnjih mjesec dana imali problema sa spavanjem zbog toga?

- a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)
- b) Manje od jednom tjedno (1)
- c) Jednom ili dvaput tjedno (2)
- d) Tri ili više puta tjedno (3)

#6 U zadnjih mjesec dana, koliko ste često uzimali lijekove za spavanje (na recept ili one za koje ne treba recept)?

- a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)
- b) Manje od jednom tjedno (1)
- c) Jednom ili dvaput tjedno (2)
- d) Tri ili više puta tjedno (3)

#7 U zadnjih mjesec dana, koliko ste često imali problema s održavanjem budnosti za vrijeme vožnje, obroka ili dok ste sudjelovali u društvenim aktivnostima?

- a) Nijednom u zadnjih mjesec dana (0)
- b) Manje od jednom tjedno (1)
- c) Jednom ili dvaput tjedno (2)
- d) Tri ili više puta tjedno (3)

#8 U zadnjih mjesec dana, koliki Vam je problem bio da s voljom obavljate sve ono što ste

trebali?

- a) To mi uopće nije bio problem (0)
- b) To mi je bio vrlo mali problem (1)
- c) To mi je prilično bio problem (2)
- d) To mi je bio vrlo veliki problem (3)

#9 Kako biste ocijenili kvalitetu svog spavanja u zadnjih mjesec dana?

- a) Vrlo dobra (0)
- b) Prilično dobra (1)
- c) Prilično loša (2)
- d) Vrlo loša (3)

Komponenta 1 #9 Skor C1 _____

Komponenta 2 #2 Skor (<15min (0), 16-30min (1), 31-60 min (2), >60min (3))

+ #5a Score (ukoliko je zbroj jednak 0=0; 1-2=1; 3-4=2; 5-6=3) C2 _____

Komponenta 3 #4 Skor (>7(0), 6-7 (1), 5-6 (2), <5 (3) C3 _____

Komponenta 4 (ukupno # sati u snu) / (ukupno # sati u krevetu) x 100

>85%=0, 75%-84%=1, 65%-74%=2, <65%=3 C4 _____

Komponenta 5 # zbroj skorova 5b do 5j (0=0; 1-9=1; 10-18=2; 19-27=3) C5 _____

Komponenta 6 #6 Skor C6 _____

Komponenta 7 #7 Skor + #8 skor (0=0; 1-2=1; 3-4=2; 5-6=3) C7 _____

Zbroj svih 7 skorova _____

9. ŽIVOTOPIS

Ivan Salarić je rođen 14. siječnja 1988. godine u Zagrebu. Završio je Klasičnu gimnaziju, Križanićeva 4a, u Zagrebu 2006. s odličnim uspjehom. Nakon toga upisuje Stomatološki fakultet koji završava 2012., također s odličnim uspjehom.

Tijekom studija bio je demonstrator na predmetima Fiziologija, Histologija s embriologijom, Kemija i biokemija, Pretklinička fiksna protetika, Pretklinička restaurativna stomatologija.

Završio je Harvard School of Public Health; HarvardX program: „Quantitative Methods in Clinical & Public Health Research“ te Massachusetts Institute of Technology; „Introduction to Biology: The Secret of Life“.

Upisuje doktorski studij u rujnu 2014. godine, a trenutno je zaposlen kao asistent na Zavodu za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta u Zagrebu, Kliničke bolnice Dubrava.

Suradnik je na projektu Hrvatske zaklade za znanost, voditelja prof.dr.sc. Darka Macana, pod nazivom „IP-09—2014-9376: Izolacija, kvantifikacija i kinetika salivarnih Ap4A, SCCA i TROP2 kod pacijenta s oralnim karcinomom i potencijalno malignim poremećajima“ i potpori Sveučilišta u Zagrebu, voditelja prof.dr.sc. Darka Macana, pod nazivom „Kvantifikacija salivarnog Ap3A u pacijenata s karcinomom usne šupljine“.

Dobitnik je National Cancer Research Institute Company of Biologists Award 2018., Robert Frank nagrade (International Association of Dental Research) 2014., Rektorove nagrade 2012., bio je stipendist grada Zagreba 2011., stipendist Sveučilišta u Zagrebu 2010. te stipendist Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta 2009. godine.

Član je Hrvatskoga društva za dentalnu implantologiju te Hrvatskoga društva za oralnu kirurgiju Hrvatskoga liječničkog zbora. Član je radne skupina za provođenje aktivnosti ranog otkrivanja oralnog karcinoma Ministarstva zdravstva.

U slobodno vrijeme bavi se biciklizmom, svira gitaru u bendu „Do 3 minute“ i „Das Endüro“ te proizvodi pivu u vlastitom domaćinstvu.

Publikacije:

1. **Salarić I**, Sabalić M, Alajbeg I. Opiorphin in burning mouth syndrome patients: a case-control study. Clin Oral Investig. 2017;21(7):2363-70.
2. Sutton P, **Salarić I**, Granić M, Mueller D, Lukšić I. Prognostic significance of extracapsular

spread of lymph node metastasis from oral squamous cell carcinoma in the clinically negative neck. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017;46(6):669-75.

3. **Salarić I**, Miloš M, Brajdić D, Manojlović S, Trutin Ostović K, Macan D. Bronchogenic adenocarcinoma metastatic tumour mimicking a dentoalveolar abscess in maxilla. *Quintessence Int.* 2016;47(9):785-90.

4. **Salarić I**, Povrzanović I, Brajdić D, Lukšić I, Macan D. Potentially malignant oral disorders and high risk habits in liver cirrhosis and lung cancer patients. *Oral Dis.* 2015;21(3):373-7.

5. Brkljačić L, Sabalić M, **Salarić I**, Jerić I, Alajbeg I, Nemet I. Development and validation of a liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the quantification of opiorphin in human saliva. *J Chromatogr B.* 2011;879(32):3920-6.

6. Đanić P, **Salarić I**, Macan D. Nove spoznaje o lokalnoj primjeni tramadola u oralnoj kirurgiji. *Acta Stomatol Croat.* 2017;51(4):336-44.

7. Biočić J, Brajdić D, Perić B, Đanić P, **Salarić I**, Macan D. Veliki hematom obraza kao komplikacija lokalne anestezije: prikaz slučaja. *Acta Stomatol Croat.* 2018;52(2):156-9.

8. Milardović Ortolan S, Bergman L, Viskić J, Mehulić K, **Salarić I**. Određivanje boje u okviru fiksoprotetske terapije. Sonda: list studenata Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2012;13:84-7.

9. **Salarić I**, Macan D, Alajbeg I. Epulis - podjela, patologija i diferencijalna dijagnostika. Sonda: list studenata Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2011;12:54-8.

10. **Salarić I**, Gabrić Pandurić D. Alveolitis sicca dolorosa. Sonda: list studenata Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2009;19:47-50.

11. **Salarić I**, Karmelić I, Lovrić J, Rožman M, Brajdić D, Zajc I, Čvrljević I, Baždarić K, Macan D. Salivary melatonin and squamous cell carcinoma antigen 1 levels in patients with oral squamous cell carcinoma. Selected Abstracts from the 2018 NCRI Cancer Conference of National Cancer Research Institute, Glasgow, UK, 4.-6-11-2018. *Br J Cancer.* 2018;119 (S8): 27.

12. Biočić J, Brajdić D, Žabarović D, Perić B, Đanić P, **Salarić I**, Macan D. Reconstruction of the alveolar ridge and implantoprosthodontic rehabilitation in maxilla after a recurrent central giant cell granuloma resection. Abstract Book: 26th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration. Madrid, 5.-7.10.2017. *Clin Oral Implants Res.* 2017; 28(S14):514.

13. Đanić P, Brajdić D, Biočić J, Bajan T, **Salarić I**, Perić B, Macan D. Dental implants in a patient with a large idiopathic osteosclerosis of maxilla. Abstract Book: 26th Annual Scientific

Meeting of the European Association for Osseointegration. Madrid, Spain, 5.-07.10.2017. Clin Oral Implants Res. 2017;28(S14):520.

14. Đanić P, **Salarić I**, Brajdić D, Jokić D, Bajan T, Macan D. Hybrid abutment-crown implanto-prosthetic solution in the aesthetic zone. Abstracts of the EAO Congress. Paris, France, 29.9. – 1.10. 2016; Clin Oral Implants Res. 2016;27(S13):352.

15. Brajdić D, Macan D, Žabarović D, **Salarić I**, Dediol E, Zajc I, Uglešić V. Dental implants in maxillary and mandibular reconstructions using osteocutaneous free fibula flap. Abstracts of the EAO Congress. Stockholm, Sweden, 24–26.9. 2015. Clin Oral Implants Res. 2015;26(S12):189.

16. **Salarić I**, Sabalić M, Alajbeg I. Increased opiorphin in burning mouth syndrome: possible disbalanced androgen regulation. Abstracts of the 7th Meeting of the Pan European Region. Dubrovnik, Croatia, 10-13.9.2014. J Dent Res. 2014;93(C):15.

17. Sabalić M, Brkljačić L, **Salarić I**, Alajbeg I, Jerić I, Nemet I. Salivary opiorphin as a potential marker of oral disease. Abstracts of the 11th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine. Athens, Greece, 13-15.9.2012. Oral Dis. 2012: 21.

18. Karmelić I, **Salarić I**, Baždarić K, Lovrić J, Macan, D. Salivary squamous cell carcinoma antigen 1 and 2 in oral cancer patients: a pilot study. Abstracts of the 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever. Prague, Czech Republic, 7-12.7.2018. FEBS Open Bio. 2018;8(S1):320-1.

19. Đanić P, Brajdić D, Biočić J, **Salarić I**, Macan D, Bajan T, Perić B. Je li idiopatska osteoskleroza čeljusti kontraindikacija za ugradnju dentalnih implantata? Sažetci 7. Međunarodnog kongresa Hrvatskoga društva za dentalnu implantologiju Hrvatskoga liječničkog zbora. Osijek, Hrvatska, 12.–14.10.2017. Acta Stomatol Croat. 2017;51(4):353-4.

20. Grgić N, Brajdić D, Jerković D, **Salarić I**, Kopic V, Macan D. Imedijatno postavljanje dentalnih implantata u molarnoj regiji donje čeljusti. Sažetci 7. Međunarodnog kongresa Hrvatskoga društva za dentalnu implantologiju Hrvatskoga liječničkog zbora. Osijek, Hrvatska, 12.–14.10.2017. Acta Stomatol Croat. 2017;51(4):361.

21. **Salarić I**, Brajdić D, Đanić P, Biočić J, Zajc I, Macan D. Upotreba mucografa kod imedijatne implantacije. Sažetci 7. Međunarodnog kongresa Hrvatskoga društva za dentalnu implantologiju Hrvatskoga liječničkog zbora. Osijek, Hrvatska, 12.–14.10.2017. Acta Stomatol Croat. 2017;51(4):361.

22. Brajdić D, **Salarić I**, Zajc I, Đanić P, Granić M, Biočić J, Knežević D, Macan D. Smjernice za postupak s pacijentima rizičnim za nastanak medikamentozne osteonekroze čeljusti. Sažeci

1. Međunarodnog kongresa Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Croatia 20.-21.3.2015. Acta Stomatol Croat. 2015;49(2):183.
23. Brajdić D, **Salarić I**, Zajc I, Đanić P, Macan D. Imedijatno postavljanje dentalnih implantata. Sažeci 6. Međunarodnog kongresa Hrvatskoga društva za dentalnu implantologiju. Vodice, Hrvatska. 8. – 10. 10. 2015. Acta Stomatol Croat. 2015;49(4):356.
24. **Salarić I**, Đanić P, Brajdić D, Jokić D, Macan D. Suvremena hibridna implantoprotetska rješenja u estetskoj zoni – prikaz dva slučaja. Sažeci 6. Međunarodnog kongresa Hrvatskoga društva za dentalnu implantologiju. Vodice, Hrvatska. 8. – 10. 10. 2015. Acta Stomatol Croat. 2015;49(4):360.
25. **Salarić I**, Povrzanović I, Brajdić D, Macan D. Ciljne skupine za "screening" potencijalno malignih oralnih poremećaja i karcinoma usne šupljine. Sažeci 1. Međunarodnog kongresa Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska, 20.-21.3.2015. Acta Stomatol Croat. 2015;49(2):183.
26. **Salarić I**, Galić I, Šlaus M, Vodanović M. Oval bone cavity in a 4th century mandible. Abstracts of the 16th International Symposium on Dental Morphology (ISDM) and the 1st Congress of the International Association for Paleodontology (IAPO). Zagreb, Croatia, 26.-30.8.2014. Bull Int Assoc Paleodont. 2014; 8(1):127.
27. **Salarić I**, Sabalić M, Alajbeg I. Povišene razina opiorfina u pacijenata sa sindromom pekućih usta. Sažeci 2. Kongresa Hrvatskog društva za oralnu medicinu i patologiju HLZ-a "Partnerstvo stomatologije i medicine - multimodalni pristup integracije znanja i iskustva". Zagreb, Hrvatska, 5. - 7. 12. 2013. Acta Stomatol Croat. 2014;48(1):86.
28. **Salarić I**, Povrzanović I, Brajdić D, Lukšić I, Macan D. Rizične skupine za nastanak potencijalno malignih oralnih poremećaja. Zbornik sažetaka. 75 godina Klinike za kirurgiju lica, čeljusti i usta KB Dubrava; XI. kongresa Hrvatskoga društva za maksilofacijalnu, plastičnu i rekonstrukcijsku kirurgiju glave i vrata, V. kongresa Hrvatskoga društva za oralnu kirurgiju. Zagreb, Hrvatska, 27.-29.11.2014. 2014:22.
29. Brkljačić L, Sabalić M, **Salarić I**, Jerić I, Alajbeg I, Nemet I. Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of opiorphin in human saliva. Book of abstracts of the 13th International Chromatography School. Zagreb, Croatia, 18.-19.6.2012. 2012: 48.
30. **Salarić I**. Vestibulokohlearna oštećenja. Završni rad - diplomski/integralni studij. Zagreb : Stomatološki fakultet, 11.07. 2012., 32 str. Voditelj: Robert Trotić.
31. **Salarić I**. Oralna i maksilofacijalna kirurgija; prijevod poglavlja. Dental Mammoth (Dentalni Mamut). Autti, Heikki (ur.) Zagreb : Hansa Book, EU, 2015. Str. 698-814.

32. **Salarić I.** Traumatologija; prijevod poglavlja. Dental Mammoth (Dentalni Mamut). Autti, Heikki (ur.). Zagreb : Hansa Book, EU, 2015. Str. 815-40.
33. **Salarić I.** Implantologija; prijevod poglavlja. Dental Mammoth (Dentalni Mamut). Autti, Heikki (ur.). Zagreb : Hansa Book, EU, 2015. Str. 841-66.
34. **Salarić I.**, Lovrić J, Karmelić I, Macan D. Slina kao dijagnostičko sredstvo. Poglavlje u knjizi. Iz: Mravak-Stipetić M, Sertić J, Jurišić-Kvesić A, urednici. Opće zdravlje kroz oralno zdravlje. Multidisciplinarni pristup. Zagreb: Hrvatska komora dentalne medicine; 2019. p. 35-44.