

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Šárka Šimáčková

Mikrobiom dutiny ústní a karcinogeneze

Oral microbiome and carcinogenesis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jana Šmahelová

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 1. 2023

Šárka Šimáčková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především mé školitelce paní RNDr. Janě Šmahelové za její trpělivost, cenné rady a pomoc při vypracování této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu.

Abstrakt

Mikroorganismy, které osidlují lidské tělo, přispívají ke správnému fungování lidského organismu a mají důležitou roli ve zdraví jedince. Složení těchto společenstev, mikrobiomů, je pro každého jedince specifické a změny v tomto složení mohou přispívat ke vzniku a vývoji onemocnění. Mezi taková patří například také indukce karcinogeneze a vznik nádorů. Tato práce se zabývá konkrétně nádory v oblasti hlavy a krku, jejichž známými rizikovými faktory jsou kouření, konzumace alkoholu a infekce lidskými papilomaviry. V závislosti na těchto faktorech je ovlivňováno i složení mikrobiomu dutiny ústní. Četné studie ukazují rozdíly mezi orálními mikrobiomy pacientů s nádory hlavy a krku a zdravými kontrolami.

Klíčová slova: mikrobiom, dutina ústní, nádory hlavy a krku, papilomavirus

Abstract

Microorganisms that colonize human body participate to well functioning of human organism and they are very important for human health. The composition of these communities (microbiomes) is specific for everyone and changes in the composition may participate to induce and progression of disease. These diseases also include carcinogenesis and tumors. Main goal of this work are specially tumors in head and neck area which risk factors are smoking, alcohol consumption and human papillomaviruses infection. Depending on these factors is influenced the composition of microbiome of oral cavity. Many studies show differences between oral microbiomes of patients with head and neck cancer and healthy people as controls.

Keywords: microbiome, oral cavity, head and neck cancer, papillomavirus

Seznam použitých zkratek

AMPs	antimikrobiální peptidy
CPR	candidate phyla radiation
EBV	virus Epstein-Barrové
HNSCC	dlaždicobuněčný nádor hlavy a krku
HOMD	databáze lidského orálního mikrobiomu
HPV	lidský papilomavirus
HSP	proteiny tepelného šoku
IgA	imunoglobulin A
ITS	interní transkribovaný spacer
miRNA	microRNA
NLN	negativní lymfatické uzliny
NPR	primární nádor bez metastáze na uzlinách
OCSCC	dlaždicobuněčný nádor dutiny ústní
OPSCC	dlaždicobuněčný nádor orofaryngu
OTU	operační taxonomické jednotky
PML	pre maligní léze
PLN	pozitivní lymfatické uzliny
PPR	primární nádor s metastázemi na uzlinách
pRb	retinoblastomový protein
TERT	telomerázová reverzní transkriptáza
TLR	toll-like receptor

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Mikrobiom	8
2.1	Zkoumání mikrobiomu.....	8
2.2	Obecná definice mikrobiomu	9
2.3	Funkce mikrobiomu	10
2.4	Diverzita ve složení mikrobiomu	11
3	Mikrobiom dutiny ústní	14
3.1	Složení mikrobiomu	14
3.1.1	Bakteriom.....	14
3.1.2	Mykobiom.....	19
3.1.3	Virom	19
4	Mikrobiom a nádory.....	20
4.1	Nádory hlavy a krku.....	22
4.2	Hlavní rizikové faktory HNSCC	22
4.2.1	Kouření a konzumace alkoholu.....	22
4.2.2	Infekce lidským papilomavirem.....	23
4.3	Mikrobiom pacientů s HNSCC	25
4.3.1	Nádory asociované s infekcí HPV	26
4.3.2	Nádory asociované s kouřením a konzumací alkoholu.....	30
4.3.3	Nádory asociované s parodontálními patogeny	31
5	Závěr	33
6	Seznam použité literatury.....	35

1 Úvod

Vývoj a správné fungování lidského organismu je ovlivňováno mnoha faktory. Jedním z nich jsou mikrobiální organismy, které kolonizují lidské tělo, čímž vytváří specifická uskupení, nazývána jako mikrobiomy. Přestože mají mikroorganismy převážně pozitivní vliv na organismus, mohou také přispívat ke vzniku a rozvoji onemocnění či dokonce nádorů. To je způsobeno především změnou ve složení mikrobiomu, poklesem četnosti prospěšných mikrobů či rozvojem patogenních mikroorganismů. Konkrétně mikrobiom dutiny ústní je velmi otevřeným a dynamickým systémem, na jehož složení má vliv mnoho exogenních faktorů (jídlo, pití, dýchání, kouření a konzumace alkoholu). Kouření a konzumace alkoholu představují hlavní rizikové faktory pro vznik nádorů hlavy a krku. Dalším rizikovým faktorem je infekce lidskými papilomaviry (HPV), konkrétně vysoce rizikovými HPV, které prostřednictvím virových onkoproteinů ovlivňují funkce buněčných nádorových supresorových proteinů a tím zamezují regulaci buněčného cyklu a apoptóze. Buňka tak podléhá neustálému a nekontrolovatelnému dělení, jehož důsledkem je hromadění mutací a transformace infikovaných buněk. Nádory hlavy a krku jsou také nepřímo asociovány s parodontálními patogeny a špatnou či nedostatečnou hygienou dutiny ústní.

Nádory hlavy a krku jsou rozmanitou skupinou nádorů, jejichž charakteristika a prognóza je odlišná v závislosti na infekci HPV či asociaci s jinými rizikovými faktory. U pacientů s těmito nádory jsou prováděny studie, které se zaměřují na studium mikrobiálního složení v souvislosti s určitým rizikovým faktorem.

Cílem této bakalářské práce je popsání změn ve složení mikrobiomu u pacientů s nádory hlavy a krku v závislosti na infekci HPV a dalších rizikových faktorů. Dále také vyhledání možných mikrobiálních interakcí, které mohou přispívat ke vzniku a vývoji nádoru. K dosažení těchto cílů je práce rozdělena do tří hlavních kapitol, z nichž první kapitola vysvětluje pojem mikrobiom a zabývá se jeho významem pro lidský organismus. Druhá kapitola je zaměřena na mikrobiom dutiny ústní a pojednává o jeho složení. Třetí, nejrozsáhlejší kapitola, se věnuje asociaci mikrobiomu s nádory.

2 Mikrobiom

2.1 Zkoumání mikrobiomu

Zkoumání mikrobů započalo již v 17. století. Důležitou událostí byl objev mikroskopu, kdy bylo možno rozpoznat mikroorganismy, které byly do té doby okem neviditelné. Pomocí mikroskopu zkoumal Antonie van Leeuwenhoek bakterie a další mikroby, které nazval jako „animalcules“. Následně Robert Koch pozoroval, že mikroby způsobují infekce a jsou původci lidských a zvířecích nemocí. Pozdější zkoumání však prokázala, že pouze malé procento mikroorganismů je patogenní, a naopak jsou velmi důležité pro správné fungování ekosystému (Berg et al., 2020). Mikroorganismy přestaly být vnímány jakožto samostatné jednotky, ale jako součást mikrobiálního společenstva, které se vzájemně ovlivňují a komunikují spolu (Bassler, 2002). Následný rozvoj a pokrok molekulárních biologických metod – sekvenačních technologií, PCR a klonovacích technik stále zdokonalovaly zkoumání mikroorganismů a poskytovaly další možnosti ve výzkumu (Berg et al., 2020).

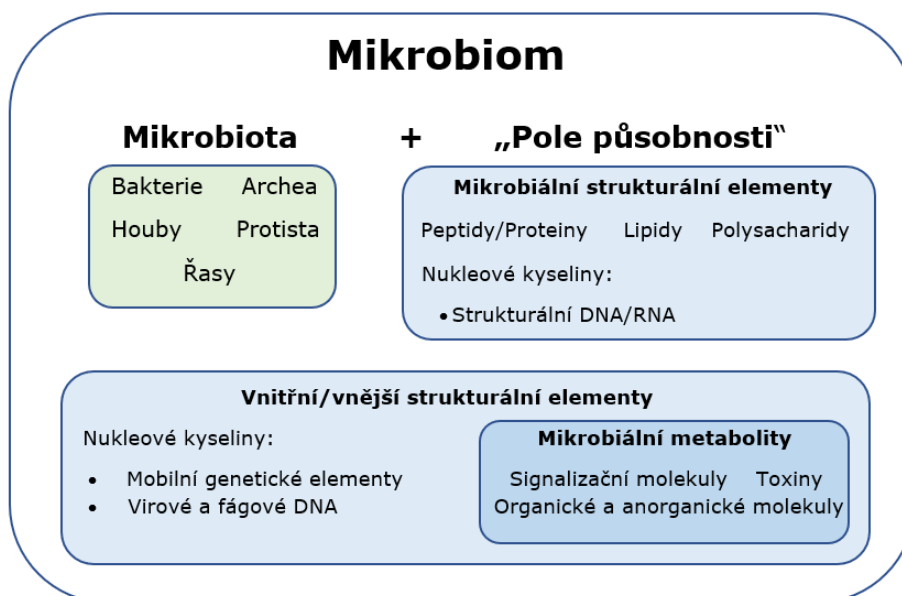
V dnešní době jsou používány metody založené na analýze genomu. Prostřednictvím sekvenování markerových genů (konzervované geny, nejčastěji 16S rRNA, ITS neboli interní transkribovaný spacer či 18S rRNA), metagenomiky, metatranskriptomiky, metabolomiky, metaproteomiky a dalších lze studovat složení a funkce mikrobiálních společenstev (Knight et al., 2018).

Rozsáhlé zkoumání mikrobiálních společenstev podpořil Národní institut zdraví Spojených států amerických, který v roce 2007 zahájil „Human Microbiome Project“, který se zabýval lidským mikrobiomem a vlivem mikroorganismů na zdraví a nemoci lidí (Creasy et al., 2021). Následně byla spuštěna ještě druhá část projektu „Integrative Human Microbiome Project“ (iHMP), zaměřená na studium mikrobiomu a jeho změny u vybraných skupin lidí. První skupinou byly těhotné ženy a ženy, které porodily předčasně, a dále lidé se zánětlivým onemocněním střev a lidé s nemocí diabetes mellitus 2. typu (Integrative HMP Research Network Consortium, 2019). Evropská komise zahájila v roce 2007 rámcový program „7th Framework Programme“ a v roce 2013 program „Horizon 2020“. V rámci jejich činnosti bylo založeno 216 projektů, mezi nimiž se nacházely takové, které také zkoumaly mikrobiom (Hadrich, 2018).

2.2 Obecná definice mikrobiomu

Dosud neexistuje jednotná definice mikrobiomu pro různé vědní obory a je to stále předmětem diskuzí. Definice mikrobiomu může být různá v závislosti na tom, z jakého hlediska je určena (Berg et al., 2020). Může být ekologického směru, závislá na interakci mikroorganismu s hostitelem nebo založená na výsledcích nějaké metody, nejčastěji metoda DNA sekvenování.

Mnoho vědců, kteří se zabývají studiem mikrobiomu se odkazují na definici podle Whippe a kol. (1988), kteří popsali mikrobiom z ekologického hlediska. Jejich definice je založena na popsání mikroorganismů jakožto mikrobiálních společenstev, která se vyskytují v určitém prostředí, jenž se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a zároveň definují mikrobiom jako „pole působnosti“ (Obrázek 1). První částí mikrobiomu jsou mikrobiální společenstva neboli mikrobiota (Berg et al., 2020; cit. dle Whipps et al., 1988), definována jako žijící mikroorganismy utvářející mikrobiom (Lederberg & McCray, 2001). Tvoří ji bakterie, archea, houby, protista a řasy. Druhou část mikrobiomu, která je podle Whippsovy definice nazvána „pole působnosti“, tvoří strukturální elementy. Mikrobiálními strukturálními elementy jsou peptidy, proteiny, lipidy, polysacharidy a nukleové kyseliny – strukturální DNA/RNA. Mezi vnitřní a vnější strukturální elementy patří nukleové kyseliny – mobilní genetické elementy a virové a fágové DNA a mikrobiální metabolity – signalizační molekuly, toxiny a organické a anorganické molekuly (Berg et al., 2020; cit dle Whipps et al., 1988).



Obrázek 1- Složení mikrobiomu (Převzato a upraveno podle Berg et al., 2020)

Další definicí mikrobiomu z ekologického hlediska je popis mikrobiomu jako uskupení symbiotických, komenzálních a patogenních mikrobů v určitém prostředí (Lederberg & McCray, 2001). Tato definice je citována mnoha autory vědeckých článků a je hojně používaná dodnes (Berg et al., 2020).

Podle Marchesiho a Ravela zahrnuje pojem mikrobiom biotop, kde se vyskytují mikroorganismy – bakterie, archea, nižší a vyšší eukaryota – a viry, jejich genomy a podmínky prostředí (Marchesi & Ravel, 2015).

V rámci evropského projektu MicrobiomeSupport byl v roce 2019 uspořádán workshop předních odborníků ve výzkumu mikrobiomu. Cílem setkání byla diskuze na toto téma a mezinárodní standardizace výzkumných dat při neustálém vývoji nových technik studia mikrobiomu. Na základě výsledků diskuze se současní odborníci přiklánějí k definici mikrobiomu podle Whippe, která podle nich doposud nejlépe vystihuje komplexnost pojmu mikrobiom. Nedá se ale ovšem považovat za univerzální konečnou definici mikrobiomu, jež zůstává tedy stále předmětem diskuzí (Berg et al., 2020).

2.3 Funkce mikrobiomu

Mikrobiom hraje důležitou roli ve zdraví jedince. Má vliv na metabolismus (i), imunitní a nervový systém (ii) a taktéž vytváří ochrannou bariéru proti osídlení patogenními mikroorganismy (iii) (Kho & Lal, 2018). Z hlediska popisu funkcí se budu převážně věnovat střevní mikrobiotě, protože je zde největší zastoupení mikroorganismů lidského těla a je také nejdéle zkoumána.

(i) Mikroorganismy se podílejí na udržování energetické homeostázy. Střevní mikrobiota se podílí na fermentaci vlákniny a produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem, z nichž významnou sloučeninou je butyrát, který slouží jako primární zdroj energie pro kolonocyty (Donohoe et al., 2011). Dalšími důležitými produkty mikroorganismů, které přispívají ke zdraví jedince jsou vitamíny, například vitamín K (Cooke et al., 2006). Taktéž se střevní mikrobiota podílí na metabolismu a regulaci syntézy žlučových kyselin (Sayin et al., 2013).

(ii) Vliv mikrobioty na vývoj imunitního systému byl experimentálně testován na zvířatech bez choroboplodných zárodků, u nichž je vývoj střevní lymfoidní tkáně defektní. Střevní mikrobiota ovlivňuje nejen vývoj imunitního systému, ale také produkci T-lymfocytů, regulačních T-buněk (Treg) a pomocných T-buněk (Th17). Při porušení rovnovážné aktivity mezi těmito buňkami dochází ke vzniku autoimunity např. experimentální autoimunitní encefalomyelitidy či revmatoidní artritidy (Lee & Mazmanian, 2010). Mikroorganismy také

mají schopnost aktivovat Toll-like receptory (TLR), které rozpoznávají patogenní mikroorganismy od komenzálních mikroorganismů. Důležitá je rovnováha mezi TLR a komenzálními mikroorganismy, protože TLR indukované genové produkty – zánětlivé cytokiny a chemokiny mohou zabráňovat poškození střeva a podílet se na opravě již poškozené tkáně. V opačném případě dochází ke vzniku idiopatických střevních zánětů (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

(iii) Ochrana před kolonizací patogenními organismy může spočívat v přímé interakci mezi střevní mikrobiotou a patogeny a to tak, že dochází ke kompetici o místo či živiny. Taktéž může spočívat v posílení obranných mechanismů hostitele (viz výše), a tím dojde k zabránění kolonizace patogenními mikroorganismy (Kho & Lal, 2018).

Mikroorganismy však mohou mít i negativní účinky na zdraví organismu. Pokud se dostanou do míst, kde jejich výskyt není běžný, mohou být vnímány jako patogeny a vyvolat onemocnění (Iebba et al., 2016).

2.4 Diverzita ve složení mikrobiomu

Je zřejmé, že složení mikrobiomu je mezi jedinci rozdílné a z tohoto důvodu nelze definovat mikrobiom zdravých jedinců jakožto soubor určitých mikrobiálních komunit. Existují však bakteriální druhy, které jsou mezi jedinci shodné, jež jsou nazývány jako „core“ (základ) mikrobiomu. Pomocí metody metagenomického sekvenování bylo identifikováno 75 bakteriálních druhů ve vzorcích střevního mikrobiomu společných pro více než 50 % analyzovaných jedinců, 57 druhů bakterií společných pro více než 90 % analyzovaných jedinců a 18 druhů bakterií společných pro všechny (Qin et al., 2010).

Diverzita je také dána sledovaným kompartmentem lidského těla. Diverzitu mikrobiomu v rámci jednoho jedince popisuje alfa-diverzita, která je posuzována počtem a četností mikroorganismů různých rodů. Obdobně je posuzována beta-diverzita mezi jednotlivými jedinci. Bylo zjištěno, že variace ve složení mikrobiomů v rámci jedince byly v průběhu času nižší v porovnání s variací ve složení mikroorganismů mezi jedinci. To znamená, že ojedinělost mikrobiomu každého jedince, se zdá být stabilní v průběhu času (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Mezi jednotlivými skupinami mikroorganismů i v rámci jedné skupiny mikroorganismů dochází k četným vzájemným interakcím. Tyto interakce mohou být synergické (i) či antagonistické (ii)

(i) Mezi synergické interakce patří koadheze. Mikroorganismy agregují s jinými mikroby a dochází tak k uskupení fyziologicky vhodných partnerských druhů vedle sebe. Tím se usnadňují další synergické mikrobiální interakce, jako jsou nutriční spolupráce, horizontální přenos genů a signalizace buňka-buňka (Marsh & Zaura, 2017). Ve studii bakteriálních interakcí byla pozorována koagregace bakteriálních rodů *Treponema* a *Fusobacterium* v rámci dutiny ústní (Kolenbrander et al., 1995). U bakterií z rodu *Fusobacterium* byly zjištěny koagregace s dalšími orálními bakteriálními rody - *Streptococcus*, *Gemella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Rothia*, *Actinobacillus*, *Veillonella*, *Bacteroides*, *Capnocytophaga* a *Porphyromonas* (Kolenbrander et al., 1989) a koagregace v rámci zubního plaku byly pozorovány u bakterií z rodu *Parvimonas*, *Treponema* a *Prevotella*, u které byly také pozorovány pozitivní asociace s bakteriemi z rodu *Campylobacter* v rámci tvrdého patra. Další koagregace byly nalezeny v předních nozdrách u bakterií z rodů *Parabacteroides* a *Bacteroides* (Faust et al., 2012).

(ii) Antagonistické interakce zahrnují především kompetici o základní živiny, uvolňování lytických fágů a produkci látek, které jim poskytují konkurenční výhodu před ostatními mikroorganismy. Produkovanými sloučeninami jsou bakteriociny, peroxid vodíku, enzymy a organické kyseliny, kterými lze regulovat pH prostředí a vytvářet tak inhibiční podmínky pro růst některých mikrobů (Marsh & Zaura, 2017). Tyto interakce byly pozorovány u bakteriálních rodů *Neisseria* a *Prevotella* na mandlích a čeledi *Prevotellaceae* a rodu *Bacteroides* ve stolici (Faust et al., 2012).

Interakce probíhají také mezi mikroorganismy a hostitelem. Mikroorganismy stimulují imunitní odpověď tak, aby nedocházelo k tvorbě protilátek proti orálním komenzálním mikrobům, ale zároveň aby docházelo k potlačení patogenních mikroorganismů. U zdravého jedince jsou komenzální mikrobiální vztahy vyvážené a tento stav je nazýván jako mikrobiální homeostáza neboli eubióza. V opačném případě se jedná o dysbiózu, která je způsobena poklesem prospěšných mikrobů, ztrátou diverzity či rozvojem patogenních mikroorganismů (Radaic & Kapila, 2021).

Složení lidského mikrobiomu je ovlivňováno mnoha faktory (viz obrázek 2) (Hasan & Yang, 2019). Prvním faktorem je způsob narození. K mikrobiální kolonizaci dochází při porodu, kdy je novorozenec vystaven vaginální mikrobiotě matky. V pochvě se vyskytují převážně bakteriální rody *Lactobacillus* a *Prevotella*. U novorozenců narozených císařským řezem dochází k prvnímu kontaktu s mikrobiotou lidské kůže a novorozenec získává mikroby, které jsou zde přítomné (především *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Propionibacterium*). (Dominguez-Bello et al., 2010).

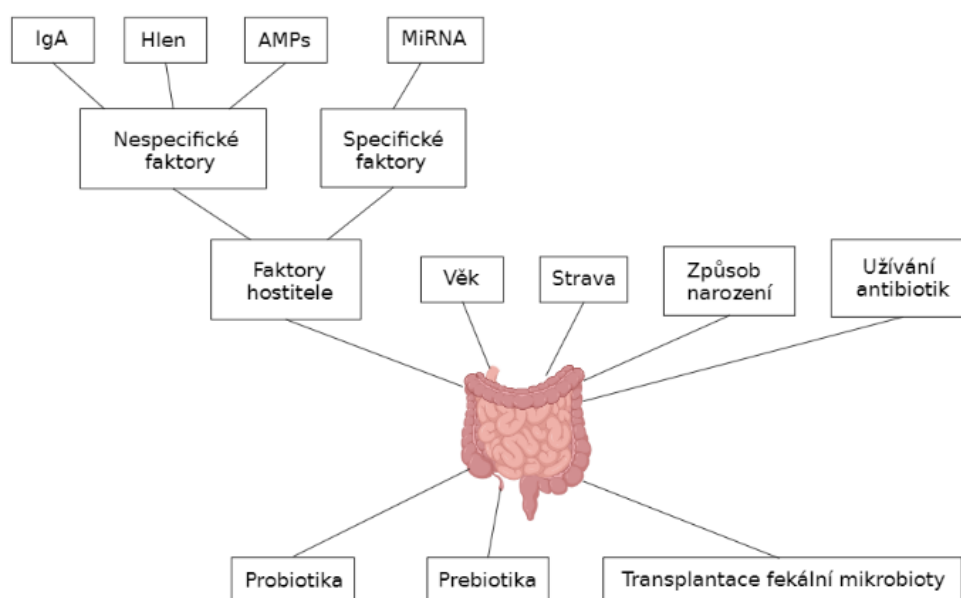
Dalším důležitým faktorem při utváření střevního mikrobiomu je strava novorozence. Byly pozorovány rozdíly při kolonizaci střevními bakteriemi u kojených dětí a dětí krmených umělou výživou (Stark & Lee, 1982). Strava je důležitým faktorem pro diverzitu mikrobiomu po celý život člověka (David et al., 2014)

Buňky střevního epitelu produkují nespecifické faktory jako jsou hlen, imunoglobulin A (IgA) a antimikrobiální peptidy (AMPs) ovlivňující strukturu povrchů kolonizovaných střevní mikrobiotou a tím ovlivňují složení této mikrobioty. Tyto faktory podporují či inhibují růst určitého mikrobiálního druhu (Hasan & Yang, 2019).

Specifickým faktorem, který ovlivňuje složení mikrobiomu, jsou fekální microRNA (miRNA), produkované epiteliálními, Panethovými a pohárkovými buňkami střeva a sekretované do střevního lumen. Mohou vstoupit do bakteriálních buněk a ovlivňovat tak jejich růst a genovou expresi (Liu et al., 2016).

Mezi další faktory, které ovlivňují složení lidského střevního mikrobiomu patří věk, geografické vlivy (Yatsunencko et al., 2012) či užívání antibiotik (Ge et al., 2017).

Při narušení střevní mikrobioty v důsledku onemocnění, může být střevní mikrobiom částečně modulován pomocí probiotik, prebiotik či transplantací fekální mikrobioty (Hasan & Yang, 2019).



Obrázek 2- Faktory ovlivňující složení střevního mikrobiomu, zkratky: **IgA** – imunoglobulin A, **AMPs** – antimikrobiální peptidy, **miRNA** – microRNA (Převzato a upraveno podle Hasan & Yang, 2019)

3 Mikrobiom dutiny ústní

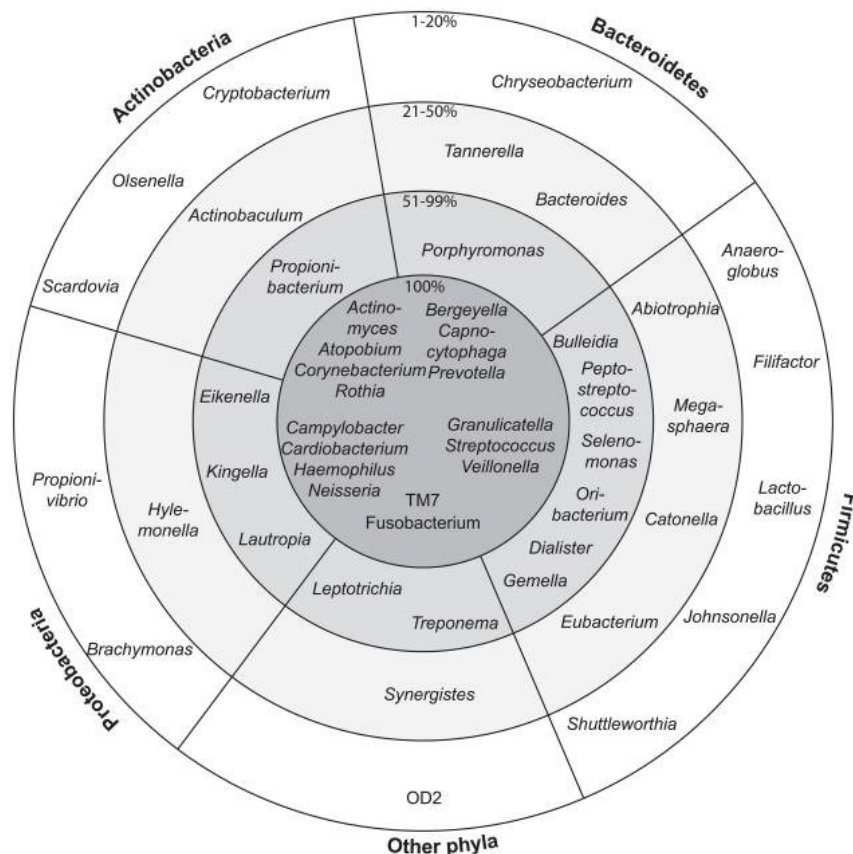
Mikrobiom dutiny ústní představuje po střevním druhý nejvíce rozmanitý mikrobiom lidského těla s více než 700 bakteriálními druhy (Gao et al., 2018). Je to velmi dynamický a otevřený systém. Prostřednictvím jídla, pití a dýchání prochází dutinou ústní mnoho exogenních mikroorganismů, a proto nelze přesně určit množství mikroorganismů v dutině ústní (Dewhirst et al., 2010).

3.1 Složení mikrobiomu

Dutina ústní je osídlena širokou škálou bakterií, hub, virů, fágů, archeí a skupinou velmi malých nekultivovatelných bakterií, která je nazývána jako „candidate phyla radiation“ (CPR) (Baker et al., 2017). CPR je skupina mikroorganismů s malým genomem, které často obsahují samo se sestřihující introny a proteiny kódované ve svých rRNA (Brown et al., 2015). Jejich buňky postrádají kompletní cykly kyseliny citrónové a dýchacího řetězce a u většiny z nich nedochází nebo pouze omezeně dochází k syntéze nukleotidů a aminokyselin (Baker et al., 2017).

3.1.1 Bakteriom

Nejvíce prozkoumanou oblastí mikrobiomu dutiny ústní je ta, která je tvořená bakteriemi neboli bakteriom. Jeho složení bylo zjišťováno analýzou sekvencí genů pro 16S rRNA, na jejíž výsledcích byla vytvořena databáze lidského orálního mikrobiomu (HOMD) (Voorhis Andrew, Fabiola Miranda-Sanchez, Floyd E. Dewhirst, Jessica Mark Welch, Kathryn Kauffman, Stéphane Viala, Susan Yost a William G. Chen. Expanded Human oral microbiome database. EHOMD [online]. [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://www.homd.org/>). Mikroorganismy byly rozřazeny do jednotlivých taxonů, z nichž 96 % taxonů obsahuje šest hlavních bakteriálních kmenů, kterými jsou *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* a *Fusobacteria*. Kmen archeí *Euryarchaeota*, bakteriální kmeny *Chlamydia*, *Chloroflexi*, *Synergistetes* a *Tenericutes* a kmeny CPR *Absconditabacteria* (*SR1*) a *Saccharibacteria* (také označovaného jako *TM7*) tvoří zbývající 4 % taxonů (Dewhirst et al., 2010). Na úrovni rodu je nejzastoupenější bakteriální rod *Streptococcus*. Dalšími hojně zastoupenými jsou rody *Haemophilus*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Veillonella* a *Rothia*. Další bakteriální rody vyskytující se v dutině ústní u 10 zdravých studovaných jedinců ve věku 27-61 let jsou vyobrazeny na obrázku 3 (Bik et al., 2010).



Obrázek 3- Zobrazení bakteriálních rodů v dutině ústní; od vnitřního kruhu k vnějšímu: bakteriální rody, které byly nalezeny u všech 10 analyzovaných jedinců, rody bakterií nalezené u 6-9 jedinců, bakteriální rody vyskytující se u 3-5 jedinců a nejméně zastoupené bakteriální rody u 1-2 analyzovaných jedinců (Převzato od Bik et al., 2010)

Pro zjištění výskytu bakterií v dutině ústní bylo metodou sekvenování genů pro 16S rRNA studováno 9 míst v dutině ústní - hřbet jazyka, laterální strany jazyka, bukalní sliznice, tvrdé patro, měkké patro, labiální dásně, mandle, supragingivální plak a subgingivální plak u 5 zdravých jedinců ve věku 23-55 let (Aas et al., 2005). Celkem bylo identifikováno 141 bakteriálních taxonů. Bakterie *Streptococcus mitis* a *Granulicatella adicens* byly přítomné na více místech dutiny ústní, avšak jiné bakteriální druhy byly místně specifické. Například *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces* spp., *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* a *Abiotrophia defectiva* pro kolonizaci zubů, kdežto *Streptococcus salivarius* byl nejvíce nalezen na hřbetu jazyka. Nejpočetnější bakteriální druhy nalezené na určitých místech v dutině ústní jsou uvedeny v tabulce 1. Největší mikrobiální diverzita byla pozorována na mandlích (n=59), naopak nejmenší množství bakterií bylo pozorováno u labiální dásně (n=15). Dále bylo zjištěno, že množství nalezených bakteriálních druhů bylo u analyzovaných jedinců odlišné (nejméně, n=34; nejvíce, n=72).

Tabulka 1- Přehled nejzastoupenějších bakteriálních druhů nalezených na 9 místech v dutině ústní (Vytvořeno podle Aas et al., 2005)

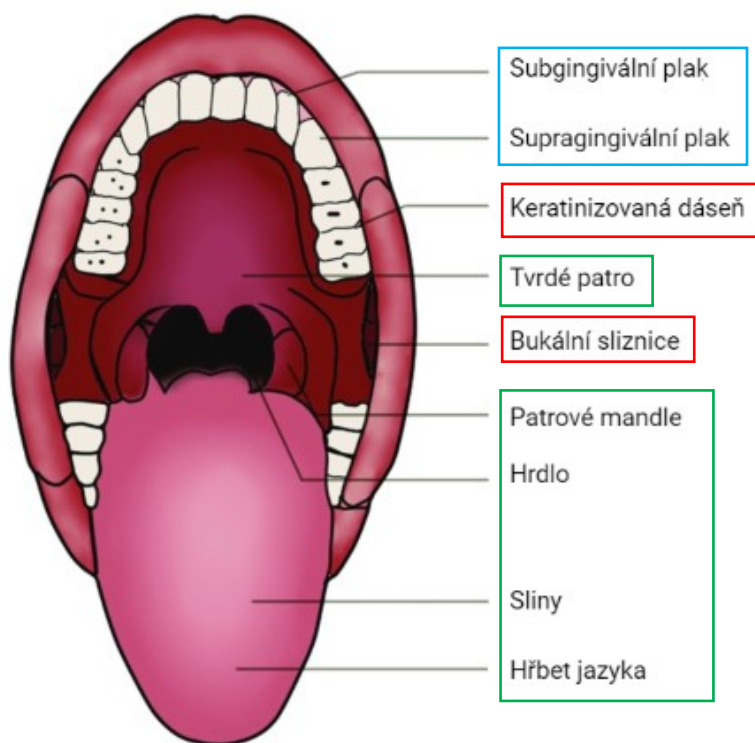
Místo v dutině ústní	Název nejzastoupenějších bakteriálních druhů
Hřbet jazyka	<i>S. mitis</i> , <i>S. australis</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>Granulicatella adiacens</i> , <i>Veillonella</i> spp.
Laterální strany jazyka	<i>S. mitis</i> , <i>S. mitis</i> bv. 2, <i>S. australis</i> , <i>G. adiacens</i> , <i>Veillonella</i> spp., <i>Gemella haemolysans</i>
Bukální sliznice	<i>S. mitis</i> , <i>G. adiacens</i> , <i>S. mitis</i> bv. 2, <i>G. haemolysans</i>
Tvrdé patro	<i>S. mitis</i> , <i>S. mitis</i> bv. 2, <i>S. infantis</i> , <i>Granulicatella elegans</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>Neisseria subflava</i>
Měkké patro	<i>S. mitis</i> , <i>G. adiacens</i> , <i>G. haemolysans</i>
Labiální dásěň	<i>S. mitis</i> , <i>Granulicatella</i> spp., <i>Gemella</i> spp.
Mandle	<i>S. mitis</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>G. adiacens</i>
Supragingivální plak	<i>S. mitis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>R. dentocariosa</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>G. adiacens</i> , <i>A. defectiva</i>
Subgingivální plak	<i>S. mitis</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>G. morbillorum</i>

Později byly v rámci „Human Microbiome Project“ získány a studovány vzorky od 225 zdravých jedinců ve věku 18-40 let a určeny sekvence genů pro 16S rRNA ve variabilních regionech V1-V3 a V3-V5 (Eren et al., 2014). Byla použita odlišná metoda než v předchozí studii, a to oligotypizace, která umožňuje vysoké taxonomické rozlišení podle shodných úseků primární struktury DNA. Pomocí ní byl analyzován celý mikrobiom dutiny ústní a hltanu a bylo nalezeno 493 oligotypů z regionu V1-V3 a 360 z regionu V3-V5. Následně byly oligotypy porovnány se známými sekvencemi uvedenými v HOMD pro přiřazení oligotypů ke konkrétním taxonům. V případě shodnosti ve 250 analyzovaných nukleotidů u více bakteriálních druhů uvedených v HOMD, byl oligotyp přiřazen k více bakteriálním druhům (označeny lomítkem, např.: *Neisseria flavescens*/ *N. subflava*). Byly charakterizovány jednotlivé mikrobiální komunity na devíti místech v dutině ústní – subgingivální plak, supragingivální plak, bukální sliznice, keratinizovaná dásěň, hřbet jazyka, tvrdé patro, sliny, patrové mandle a hrdlo. Analýza byla zaměřena na 7 nejčastěji se vyskytujících bakteriálních kmenů – Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes a TM7.

Výsledky ukázaly, že místem s největší biologickou rozmanitostí je zubní plak, kde bylo nalezeno 147 oligotypů v regionu V1-V3 a 140 oligotypů v regionu V3-V5, které byly hojnější v plaku než na jiných místech dutiny ústní. Keratinizovaná dásěň se odlišuje přítomností

specifických oligotypů, z nichž některé jsou sdílené s bukální sliznicí. Bakteriom na hřbetě jazyka má podobnosti s bakteriomem tvrdého patra, slin, patrových mandlí a hrdla. Z tohoto hlediska lze dutinu ústní rozdělit na 3 oblasti - 1. zubní plak, 2. keratinizovaná dásně a bukální sliznice, 3. hřbet jazyka, tvrdé patro, sliny, patrové mandle a hrdlo, které mají podobné složení mikrobiomu (viz obrázek 4). Avšak u většiny hlavních bakteriálních rodů vyskytujících se v dutině ústní, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Leptotrichia*, *Rothia*, *Selenomonas* a *Streptococcus*, byly velmi podobné oligotypy nalezeny na dvou či všech třech oblastech v dutině ústní.

Tabulka 2 dokazuje podobnost mikrobiálního složení ve 3 oblastech dutiny ústní. Byla vytvořena porovnáním 5 nejvíce zastoupených bakteriálních druhů na daném místě v dutině ústní podle analyzovaných variabilních regionů V1-V3 a V3-V5.



Obrázek 4- Barevně odlišené oblasti míst v dutině ústní, na kterých bylo charakterizováno podobné složení mikrobiální komunity (Převzato a upraveno podle Gao et al., 2018).

Tabulka 2- Nejzastoupenější druhy bakterií na 9 místech v dutině ústní, V1-V3 a V3-V5 – variabilní regiony
(Vytvořeno podle Eren et al., 2014)

	Název bakteriálního kmene	Místa v dutině ústní								
		Subgingivální plak	Supragingivální plak	Keratinizovaná dásně	Bukální sliznice	Tvrdé patro	Sliny	Hřbet jazyka	Hrdlo	Patrové mandle
V1-V3	<i>Streptococcus pneumoniae/ S. mitis/ S.mitis bv 2/ S. australis/ S. sp.</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Streptococcus peroris/ / S. mitis/ S. mitis bv 2/ S. sp./ S. oralis</i>					*				
	<i>Streptococcus salivarius/ S. vestibularis</i>			*	*	*		*	*	*
	<i>Veillonella parvula/ V. dispar</i>						*	*	*	*
	<i>Streptococcus oralis/ S. infantis/ S. mitis bv 2/ S. sp.</i>				*		*			
	<i>Rothia aerea</i>	*	*							
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	*	*							
	<i>Lautropia mirabilis</i>	*	*							
	<i>Actinomyces sp.</i>	*	*							
	<i>Gemella haemolysans</i>			*	*	*				
	<i>Granulicatella elegans</i>			*						
	<i>Veillonella sp.</i>			*						
	<i>Rothia mucilaginosa</i>				*					
	<i>Campylobacter concisus</i>						*		*	*
<i>Prevotella melaninogenica</i>						*	*	*	*	
<i>Neisseria flavescens</i>							*			
V3-V5	<i>Streptococcus peroris/ / S. mitis/ S. mitis bv 2/ S. sp./ S. oralis</i>	*	*	*	*	*			*	*
	<i>Fusobacterium nucleatum ss. Nucleatum/F. sp./ F. nucleatum ss polymorphum</i>	*	*							
	<i>Fusobacterium naviforme/ F. nucleatum ss vincenti</i>	*								
	<i>Veillonella atypica/ V. parvula/ / V. rogosae/ V. dispar</i>	*	*		*	*	*	*	*	*
	<i>Streptococcus salivarius/ S. vestibularis</i>					*		*	*	*
	<i>Streptococcus infantis/S. sp.</i>			*	*	*	*		*	*
	<i>Neisseria flavescens/ Neisseria subflava</i>					*	*	*	*	
	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	*	*							
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>						*	*		*
	<i>Haemophilus haemolyticus</i>			*	*					
	<i>Porphyromonas sp.</i>						*			
	<i>Streptococcus sinensis/ / S. cristatus/ S. australis S. parasanguinis I/ S. parasanguinis II/ S. sp.</i>							*		
	<i>Streptococcus sanguinis/S. agalactiae</i>		*							
<i>Terrahaemophilus aromaticivorans</i>			*							
<i>Gemella sanguinis/G. haemolysans/G. morbillorum</i>				*						

* Označení přítomnosti bakteriálního druhu

3.1.2 Mykobiom

Již méně prozkoumanou složkou mikrobiomu jsou houby, které utváří mykobiom dutiny ústní (Baker et al., 2017). Ve studii 20 zdravých jedinců ve věku 21- 60 let, nekuřáků byla metodou amplifikace ITS1 s následnou analýzou určena bazální distribuce rodů hub přítomné v dutině ústní. (Ghannoum et al., 2010). Nejvíce zastoupené byly rody *Candida* u 75 %, *Cladosporium* u 65 %, *Aureobasidium* a *Saccharomycetales* u 50 % testovaných jedinců. Méně časté byly rody *Dothioraceae* a *Teratosphaeria* u 45 %, rod *Alternaria* u 40 %, rod *Aspergillus* u 35 %, rody *Fusarium* a *Saccharomyces* u 30 %, rody *Eurotium* a *Glomus* u 25 % a rody *Cryptococcus* a *Gibberella* u 20 % testovaných jedinců.

Odlišné výsledky byly získány ve studii slin 6 zdravých jedinců (Dupuy et al., 2014). Metodika spočívala v amplifikaci úseku 18S ITS1, který je využíván pro identifikaci hub, protože vykazuje široký sekvenční polymorfismus a je schopen tolerovat více mutací v evolučním procesu (Principles and Workflow of 16S/18S/ITS Amplicon Sequencing. CD Genomics [online]. [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://www.cd-genomics.com/resource-Principels-and-Workflow-of-16S-18S-ITS-Amplicon-Sequencing.html>). Ve výsledcích jejich studie nebyly nalezeny rody *Glomus*, *Teratosphaeria*, *Saccharomycetales* a *Dothioraceae*, ale identifikovali pět rodů, které nebyly nalezeny v předchozí studii Ghannoum a kol. (2010). Jsou to rody *Malassezia*, *Irpex*, *Cytospora* (také nazýván *Valsa*), *Lenzites* (jiným označením *Trametes*) a *Sporobolomyces* (nebo také *Sporidiobolus*).

3.1.3 Virom

Dutina ústní je osídlena také obrovským množstvím virů (Baker et al., 2017). Lidský virom dutiny ústní je tvořen velkým množstvím eukaryotických virů a především bakteriofágů, jejichž role úzce souvisí s bakteriemi. Bakteriofágy jsou viry, které infikují bakteriální buňky. Mohou tak ovlivňovat složení bakteriálních společenstev a zároveň dochází k jejich vzájemné interakci (Pride et al., 2012). Bakteriofágy mohou mít odlišné životní strategie. Lyzogenní bakteriofágy (např. bakteriofágy z čeledi *Siphoviridae*) se integrují do genomu svého hostitele a přetrvávají tak velice dlouho (Ly et al., 2014). Tento proces se nazývá lyzogenní konverze a mohou tak poskytnout nové funkce svému bakteriálnímu hostiteli, např. se může stát rezistentní vůči některým účinkům antibiotik či získat vlastnost virulence (Brüssow et al., 2004). Naopak lytické fágy (např. bakteriofágy z čeledi *Myoviridae* a *Podoviridae*) výrazně ovlivňují zdatnost svého bakteriálního hostitele a tím i celkovou bakteriální diverzitu (Ly et al., 2014). Druhou složkou viromu jsou eukaryotické viry, které způsobují infekce, spouštějí reakce

imunitního systému, vyvolávají onemocnění či mohou přetrvávat v organismu dlouhou dobu bez projevu příznaků a navozují dlouhodobý latentní stav (Liang & Bushman, 2021).

Ve studii, kde byly analyzovány výplachy z dutiny ústní od 72 jedinců ve věku od 18 do 25 let, bylo zjištěno, že nejvíce zastoupené jsou čeledi bakteriofágů z řádu *Caudovirales*, konkrétně čeleď *Siphoviridae*, která byla nalezena u 71 jedinců a čeleď *Myoviridae*, nalezena u 68 analyzovaných jedinců (Pérez-Brocal & Moya, 2018). Zároveň bylo zjištěno, že čeleď *Herpesviridae* a konkrétně lidský herpesvirus 7 je nejčastěji se vyskytující eukaryotický virus v dutině ústní. Výsledky jiné metagenomické analýzy u 102 zdravých jedinců ukázaly, že nejčastějšími eukaryotickými viry, které se vyskytují v dutině ústní, byly z čeledi *Herpesviridae* a *Papillomaviridae* (Wylie et al., 2014). Další nalezené eukaryotické viry byly z čeledi *Anelloviridae*, *Circoviridae* a *Adenoviridae*.

4 Mikrobiom a nádory

Známé pozitivní vlivy mikrobiomu na zdraví člověka jsem již popisovala výše. Mikrobiom však hraje roli i v tumorigenezi. Odhaduje se, že mikroorganismy způsobují až 20 % nádorů, především virus hepatitidy B, virus hepatitidy C, HPV a bakterie *Helicobacter pylori*. Dalšími zkoumanými bakteriemi jsou *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli* a *Bacteroides fragilis* přispívající ke vzniku kolorektálního karcinomu a *Porphyromonas gingivalis* při vzniku rakoviny slinivky břišní a dutiny ústní. Tyto bakterie jsou schopné produkovat toxiny a metabolity, které mají vliv na buněčnou apoptózu, únik před reakcemi imunitního systému, zánětlivé procesy a tím také na vznik a vývoj nádorů (Doocey et al., 2022).

Dysbióza mikrobiomu je stav, který je asociován se vznikem a vývojem nádorů. Pokles diverzity byl pozorován ve studii 141 fekálních vzorků, kde byla hodnocena alfa – diverzita z hlediska rozmanitosti (tzn. podle počtu zastoupených taxonů) a rovnoměrnosti (tzn. podle rovnoměrné distribuce taxonů v rámci vzorku). U pacientů s kolorektálním karcinomem byla zjištěna snížená rozmanitost střevního mikrobiomu, avšak rovnoměrnost zastoupení taxonů nebyla rozdílná od kontrolních vzorků (Ahn et al., 2013). Ve studii pacientů s nádory prsu bylo pozorováno snížené množství mikroorganismů v nádorové tkáni oproti zdravé prsní tkáni a konkrétně množství bakterie *Sphingomonas yanoikuyae* bylo výrazně nižší v nádorové tkáni. Tato dysbióza mikrobiomu může přispívat k nedostatečné stimulaci imunitních buněk a tím vytvářet vhodné prostředí pro vznik a rozvoj nádoru (Xuan et al., 2014).

Mikrobiom různých typů nádorů má odlišné složení. Studie, zabývající se mikrobiomem nádorové tkáně u nádoru prsu, plic, vaječníků, slinivky břišní, kostí, mozku a kůže a kontrolních

vzorků zdravé tkáně, prokázala, že mikrobiom nádoru prsu je rozmanitější a bohatší (v průměru 16,4 nalezených bakteriálních druhů) než u ostatních typů nádorů (v průměru méně než 9 nalezených bakteriálních druhů) a zdravé prsní tkáně. Porovnáním beta-diverzity u různých typů nádorů bylo zjištěno, že bakteriální druhy z kmene *Proteobacteria* a *Firmicutes* tvořily téměř celý mikrobiom u všech typů nádorů, pouze s odlišným poměrem zastoupení. Bakterie z kmene *Proteobacteria* jsou nejhojnější v nádoru slinivky břišní, kdežto u kolorektálního karcinomu jsou nejhojnější bakterie z kmene *Firmicutes*. Také bylo pozorováno, že bakterie z kmene *Actinobacteria* byly hojnější u negastrointestinálních nádorů. Vyšší hojnost bakteriálních druhů z kmene *Proteobacteria* a *Actinobacteria* u plicních nádorů byla pozorována u 100 současných kuřáků. Tyto bakteriální druhy mají schopnost degradovat metabolity cigaretového kouře (nikotin, antranilát, toluen, fenol a další) (Nejman et al., 2020).

Rozdílné mikrobiální složení u nádorové a zdravé tkáně bylo také studováno u pacientů s nádorem hlavy a krku (HNSCC). Bylo prokázáno odlišné mikrobiální složení, ale nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v alfa – diverzitě mezi těmito tkáněmi. Odlišné mikrobiální zastoupení u daných vzorků tkáně bylo pozorováno v hojnosti nejzastoupenějších bakteriálních kmenů v dutině ústní – *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* a *Actinobacteria*. Ve studii 5 pacientů s HNSCC (Schmidt et al., 2014) bylo u nádorové tkáně pozorováno snížené relativní zastoupení bakterií z kmene *Firmicutes* a *Actinobacteria* a zvýšené relativní množství bakterií z kmene *Fusobacteria*. S tímto závěrem koreluje i rozsáhlejší studie 121 pacientů s HNSCC (Wang et al., 2017). Avšak odlišný závěr byl zjištěn ve studii 10 pacientů s HNSCC (Pushalkar et al., 2012), kde bylo nalezeno relativní zvýšené množství bakterií z kmene *Firmicutes* u nádorové tkáně a snížené relativní množství bakterií z ostatních kmenů.

Existují studie rakoviny vaječníků (Banerjee, Tian, Wei, Shih, et al., 2017), rakoviny prsu (Banerjee et al., 2018) a nádorů orofaryngu a dutiny ústní (Banerjee, Tian, Wei, Peck, et al., 2017), které prokázaly souvislost mezi určitým mikrobiálním složením vytvářející mikroprostředí, které je vhodné pro vznik a vývoj nádoru na určitém místě lidského těla. Naopak studie zabývající se asociací orálního mikrobiomu a rizikem vzniku HNSCC (Hayes et al., 2018), prokázala, že zvýšené množství komenzálních bakterií rodu *Corynebacterium* (kmen *Actinobacteria*) a *Kingella* (kmen *Proteobacteria*) snižuje riziko vzniku HNSCC.

4.1 Nádory hlavy a krku

Nádory hlavy a krku jsou heterogenní skupinou nádorů, z nichž více než 90 % tvoří dlaždicobuněčný karcinom, tedy zhoubný nádor vznikající z epitelové tkáně sliznice dutiny ústní, nosohltanu, orofaryngu, hypofaryngu a hrtanu a dalších (Pai & Westra, 2009). Mezi hlavní rizikové faktory patří kouření, konzumace alkoholu a infekce lidským papilomavirem. Studie pacientů nekuřáků s HNSCC dutiny ústní negativním na HPV naznačuje (Ganly et al., 2019), že dalším rizikovým faktorem jsou parodontální patogeny, zejména bakterie z rodu *Fusobacterium* a *Prevotella*. Ke stejnému závěru přispěla také další studie (Hsiao et al., 2018), zabývající se asociací orálního mikrobiomu a nádoru dutiny ústní. Rutinní prohlídky u zubaře výrazně snižují riziko vzniku nádoru orofaryngu, špatné zdraví dutiny ústní a taktéž i nedostatečná hygiena dutiny ústní jsou dalšími rizikovými faktory pro vznik HNSCC (Mazul et al., 2017).

4.2 Hlavní rizikové faktory HNSCC

4.2.1 Kouření a konzumace alkoholu

Kouření a konzumace alkoholu patří mezi nejvýznamnější rizikové faktory pro vznik HNSCC. Při retrospektivní analýze 9 950 pacientů s HNSCC bylo identifikováno, že 3 605 pacientů byli pouze kuřáci, 607 pacientů byly pouze alkoholici a 5 254 pacientů byli kuřáci a zároveň alkoholici (Dhull et al., 2018). Nejvíce se vyskytovaly nádory orofaryngu, konkrétně spodiny jazyka a krčních mandlí. Jako další časté nádory byly evidovány nádory hrtanu a dutiny ústní. Analýza prokázala souvislost výskytu HNSCC s kouřením a konzumací alkoholu u 89 % kuřáků a u 59 % alkoholiků. K obdobným výsledkům dospěly i studie na 1 393 pacientech s HNSCC z Velké Británie (Beynon et al., 2018) a rozsáhlá analýza výsledků 26 studií pacientů s HNSCC a kontrol provedená v rámci „International head and neck cancer epidemiology“ konsorcia (di Credico et al., 2020).

Tyto rizikové faktory mají podíl na změně složení mikrobiomu a tím mohou přispívat k rozvoji nádoru. Studie, která se zabývala asociací konzumace alkoholu s orálním mikrobiomem ve vzorcích výplachů z dutiny ústní od 1044 jedinců, z nichž 270 nekonzumovalo alkohol, 614 slabě konzumovalo alkohol a 160 bylo silných konzumentů alkoholu, prokázala odlišné složení mikrobiomu vlivem konzumace alkoholu (Fan et al., 2018). U jedinců, kteří konzumovali alkohol, byl zaznamenán snížený výskyt bakterií z třídy *Bacilli* a řádu *Lactobacillales* (kmen *Firmicutes*) a zvýšený výskyt bakterií z rodu *Streptococcus* a *Lachnoanaerobaculum* (kmen *Firmicutes*), *Actinomyces* (kmen *Actinobacteria*), *Leptotrichia*

(kmen *Fusobacteria*), *Cardiobacterium*, *Neisseria*, *Aggregatibacter* a *Kingella* (kmen *Proteobacteria*) a *Bacteroidales* a *Prevotella* z kmene *Bacteroidetes*. Pokles prospěšných bakterií, ale zvýšený výskyt potencionálně patogenních bakterií může přispívat ke vzniku zubních kazů či parodontitidy a dalších onemocnění. Například zvýšený výskyt bakteriálního rodu *Neisseria*, který má schopnost produkovat karcinogenní acetaldehyd z etanolu (Muto et al., 2000) a snížený výskyt bakterií z řádu *Lactobacillales* podílející se na degradaci acetaldehydu, přispívá ke vzniku a vývoji nádorů.

Toxické látky obsažené v cigaretovém kouři taktéž ovlivňují mikrobiální složení. Pro studii rozdílů ve složení orálního mikrobiomu, byly analyzovány vzorky z výplachů dutiny ústní od 1204 jedinců (nekuřáci, n=521; bývalí kuřáci, n=571; současní kuřáci, n=112). Významné rozdíly v mikrobiálním složení byly pozorovány u současných kuřáků (viz tabulka 3), avšak mikrobiomy nekuřáků a bývalých kuřáků měly podobné složení (Wu et al., 2016). Výsledky korelují s odlišnou studií, která studovala složení mikrobiomu v souvislosti s kouřením ze vzorků slin od 22 jedinců (Wirth et al., 2020).

Tabulka 3- Odlišné mikrobiální zastoupení u současných kuřáků (Vytvořeno podle Wu et al., 2016)

	Současní kuřáci
Snížené množství	kmen <i>Actinobacteria</i> (rod <i>Corynebacterium</i>) kmen <i>Firmicutes</i> (rody <i>Abiotrophia</i> , <i>Selenomonas</i> a <i>Peptostreptococcus</i>) kmen <i>Proteobacteria</i> (rody <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> a <i>Aggregatibacter</i>) kmen <i>Fusobacteria</i> (rod <i>Leptotrichia</i>) kmen <i>Bacteroidetes</i> (rody <i>Capnocytophaga</i> , <i>Porphyromonas</i> a <i>Prevotella</i>)
Zvýšené množství	kmen <i>Actinobacteria</i> (rody <i>Atopobium</i> a <i>Bifidobacterium</i>) kmen <i>Firmicutes</i> (rody <i>Streptococcus</i> a <i>Lactobacillus</i>)

4.2.2 Infekce lidským papilomavirem

Dalším významným rizikovým faktorem vzniku HNSCC je infekce HPV. Tyto viry jsou součástí přirozeného lidského mikrobiomu (Wylie et al., 2014), avšak vysoce rizikové HPV převážně typ HPV16, minoritně typy HPV33 a HPV35 (Mena et al., 2020) mohou vyvolat vznik HNSCC zejména v oblasti orofaryngu. Onkogenní potenciál vysoce rizikových HPV spočívá především v aktivitě virových onkoproteinů E6 a E7. Onkoprotein E7 váže retinoblastomový nádorový supresorový protein (pRb) a tím ho uvolňuje z komplexu s transkripčním faktorem E2F. Volný E2F způsobí aktivaci transkripce genů, které jsou spojeny se vstupem buňky do aktivní S fáze buněčného cyklu. Nadměrná mitotická aktivita indukuje odpověď nádorového

supresorového proteinu p53, která vede k zastavení buněčného cyklu nebo k apoptóze. Onkoprotein E6 však váže p53 a pomocí ubikvitin ligázy E6AP jej navádí k degradaci. Další důležitou aktivitou onkoproteinu E6 je aktivace transkripce telomerázové reverzní transkriptázy (TERT), jejíž aktivita zabraňuje zkracování konců chromozomů. Buňka podléhá neustálému dělení a v důsledku deregulace buněčného cyklu dochází ke vzniku četných mutací a nestability genomu a následně k imortalizaci a transformaci infikovaných buněk (Sabol & Gašperov, 2018).

Infekce HPV je nejčastěji příčinou vzniku nádoru v oblasti orofaryngu, hlavně krčních mandlí a kořene jazyka. Vyvolává ale také karcinomy hltanu, nosohltanu, hrtanu a hypofaryngu (Castellsagué et al., 2016). Rizikovým faktorem pro detekci nádoru pozitivního na HPV je sexuální chování jedince, zejména vysoký počet sexuálních partnerů při vaginálním či orálním styku, příležitostný pohlavní styk s různými sexuálními partnery, nižší věk při prvním pohlavním styku a nechráněný pohlavní styk (D'Souza et al., 2007).

HPV může interagovat s dalšími mikroorganismy, které mohou poskytovat určitou výhodu pro vznik a vývoj nádorů. Studie, která se zabývala interakcemi HPV s bakteriemi rodu *Streptococcus* nacházející se v dutině ústní a hrdle prokázala, že pomocí nich, respektive jejich endopeptidáz podobných furinu, může docházet k aktivaci HPV. Součástí životního cyklu HPV je totiž odštěpení části kapsidového proteinu L2 proteázou furin, čímž je umožněna vazba na receptor a následný vstup viru do buňky. Bylo identifikováno 8 druhů rodu *Streptococcus* (*S.gordonii*, *S.infantis*, *S.anginosus*, *S.mitis*, *S.parasanguinis*, *S.pyogenes*, *S.sanguinis*, *S.oralis*), které exprimují peptidázy podobné furinu a konkrétně 3 endopeptidázy PepO, PulO a SepM vykazovaly aktivity podobající se aktivitě furinu (Pavlova et al., 2019).

Další interakci HPV s jinými mikroorganismy prokázala studie, zabývající se přítomností HPV a viru Epstein-Barrové (EBV) ve vzorcích dlaždicobuněčných nádorů mandlí, kořene jazyka a měkkého patra a nenádorových vzorcích tkáně jako negativních kontrol. Koinfekce HPV a EBV byla zaznamenána pouze u nádorů mandlí a kořene jazyka a byla prokázána souvislost této koinfekce se zvýšenou tumorigenezí a invazivitou nádorů (Jiang et al., 2015).

Jak je již zmíněno výše, parodontální patogeny jsou jedním z rizikových faktorů pro vznik HNSCC. Byly také zkoumány z hlediska možné asociace s HPV. Parodontitida je chronické zánětlivé onemocnění, jejímž důsledkem je poškození sliznice a produkce zánětlivých cytokinů, které zprostředkovávají epiteliální proliferaci, s čímž může být asociována infekce HPV. Ve studii 124 pacientů s HNSCC z nichž 50 mělo nádor pozitivní na HPV (Tezal et al., 2012), byl u těchto pacientů prokázán úbytek alveolární kosti, zejména u pacientů s nádorem orofaryngu pozitivním na HPV. U dalších zkoumaných změn v dutině ústní – zubní kaz, zubní

výplně, chybějící zuby či úplná nepřítomnost zubů v dutině ústní – nebyla pozorována asociace s HPV infekcí. Stejný závěr byl učiněn i v předchozí studii autorů, kdy byl pozorován větší úbytek alveolární kosti u 21 z 30 studovaných pacientů s nádorem kořene jazyka v závislosti na HPV infekci a v 86 % případů byl zaznamenán výskyt parodontitidy (Tezal et al., 2009).

Ačkoliv obě předchozí studie prokazují souvislost HPV infekce s parodontitidou, nedávná rozsáhlá meta-analýza (Ali et al., 2021), která analyzovala dosavadní studie asociace HPV a parodontitidy, neprokázala tuto závislost za průkaznou.

4.3 Mikrobiom pacientů s HNSCC

HNSCC asociované s infekcí HPV a nádory vyvolané jinými rizikovými faktory mají odlišné charakteristiky a bylo prokázáno, že se jedná o rozdílné skupiny nádorů. Jedinci s nádorem pozitivním na HPV jsou obvykle nižšího věku, mají lepší prognózu a větší naději na přežití než jedinci s nádorem negativním na HPV i přes to, že je u této skupiny nádorů pravděpodobnější výskyt metastáz v lymfatických uzlinách (Gillison, 2000). Podobné výsledky zaznamenala i studie porovnávající nádory orofaryngu pozitivní na HPV a negativní na HPV (Cantrell et al., 2013). Z těchto důvodů jsou prováděny studie, které se zaměřují na studium mikrobiomu a jeho odlišnosti u různých skupin pacientů s nádory.

Studie zabývající se příčinami vzniku HNSCC zkoumala metodou sekvenace genů pro 16S rRNA vzorky nádorové a přilehlé zdravé tkáně od 106 pacientů s nádorem dutiny ústní (OCSCC), 24 s nádorem hrtanu, 15 s nádorem orofaryngu, 13 s nádorem hypofaryngu a 8 s nádorem dutiny a vedlejších dutin nosních (Chan et al., 2022). Z celkového počtu 166 pacientů ve věku 27-92 let mělo pouze 15,7 % nádor pozitivní na HPV (nejvíce nádor orofaryngu z 66,7 % a hrtanu z 16,7 %). Jelikož 45,8 % testovaných pacientů mělo nádor negativní na HPV a zároveň nekonzumovali alkohol a nekouřili, byly studovány další faktory, které mohou způsobovat tumorigenezi. Byly zjištěny odlišnosti ve složení mikrobiomu a nižší alfa-diverzita u nádorové tkáně v porovnání se zdravou tkání. Konkrétně bylo nalezeno 15 taxonů, jejichž relativní četnost byla zvýšená (nejvíce *Fusobacterium*, *Treponema* a *Peptostreptococcus*) a 36 taxonů (nejvíce *Streptococcus*, *Neisseria* a *Veillonella*) se sníženou relativní četností ve vzorcích nádorové tkáně. Dále bylo zjištěno, že určité rizikové faktory vyvolávající nádory jsou asociovány s některými bakteriálními druhy. Například u kuřáků s OCSCC byly hojnější bakterie rodu *Corynebacterium*, *Phocaeicola* a *Fretibacterium* a snížené množství bakterií z rodu *Fusobacterium* a *Catonella*. U pacientů s nádorem pozitivním na HPV byl hojnější bakteriální rod *Porphyromonas*.

4.3.1 Nádory asociované s infekcí HPV

Ve studii 17 pacientů s HNSCC (Guerrero-Preston et al., 2016) studovali bakteriom a jeho složení s ohledem na infekci HPV metodou masivního paralelního sekvenování genů pro 16S rRNA ve slinách. Jako kontroly byly hodnoceny vzorky 25 zdravých jedinců, kteří nekouří a nekonzumují alkohol. Informace o vzorcích slin odebraných od pacientů s HNSCC jsou pro lepší přehlednost uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4- Informace o vzorcích slin odebraných od pacientů s nádorem orofaryngu a pacientů s nádorem dutiny ústní. Zkratky: **HPV+** : pozitivní na HPV, **HPV-** : negativní na HPV (Vytvořeno podle Guerrero-Preston et al., 2016)

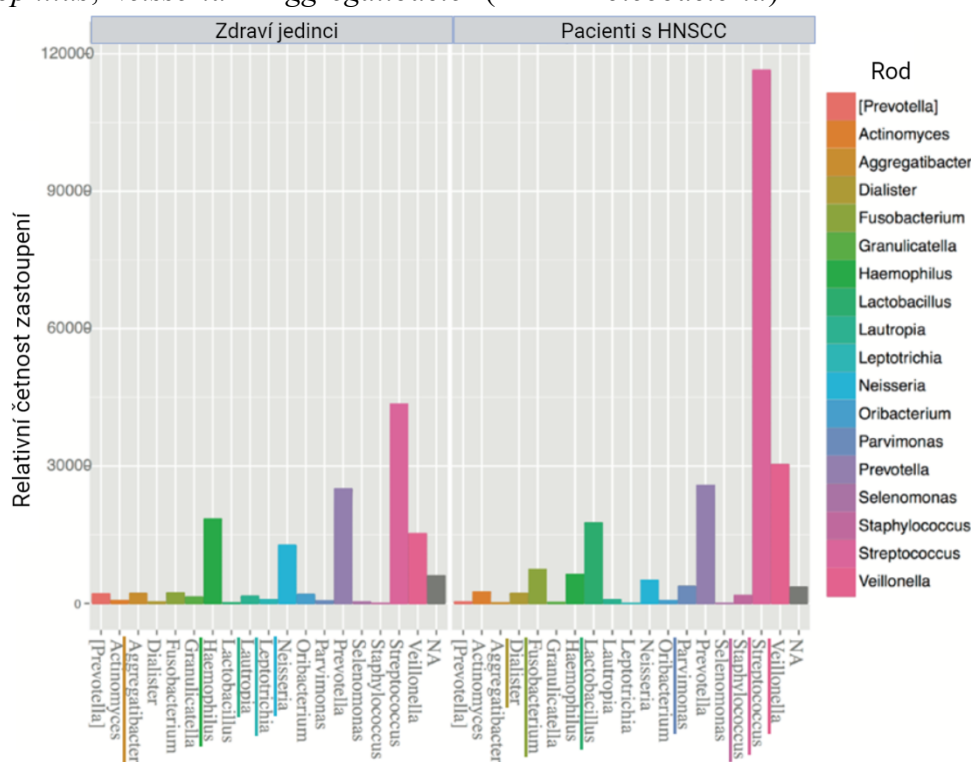
Druh nádoru	Počet pacientů	HPV+	HPV-	Věkový průměr pacientů	Zastoupení mužů a žen (v %)
Nádor orofaryngu (OPSCC)	11	7	4	62 let	77 % mužů 23 % žen
Nádor dutiny ústní (OCSCC)	6	0	6	66 let	67 % mužů 33 % žen

V této studii bylo nalezeno 13 nejčastějších kmenů bakterií, které byly přítomny ve všech vzorcích, přičemž z toho 8 kmenů bylo nalezeno v relativní četnosti menší než 1 %. Kmeny bakterií *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* a *Fusobacteria* byly nalezeny ve vyšších četnostech. V kontrolních vzorcích byly nejzastoupenější kmeny bakterií *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Proteobacteria*. V tabulce 5 jsou porovnány procentuální zastoupení těchto kmenů ve vzorcích slin od zdravých jedinců a od pacientů s HNSCC bez ohledu na HPV pozitivitu.

Tabulka 5- Procentuální zastoupení kmenů bakterií ve vzorcích slin. **OPSCC**- dlaždicobuněčný nádor orofaryngu, **OCSCC**- dlaždicobuněčný nádor dutiny ústní (Vytvořeno podle Guerrero-Preston et al., 2016)

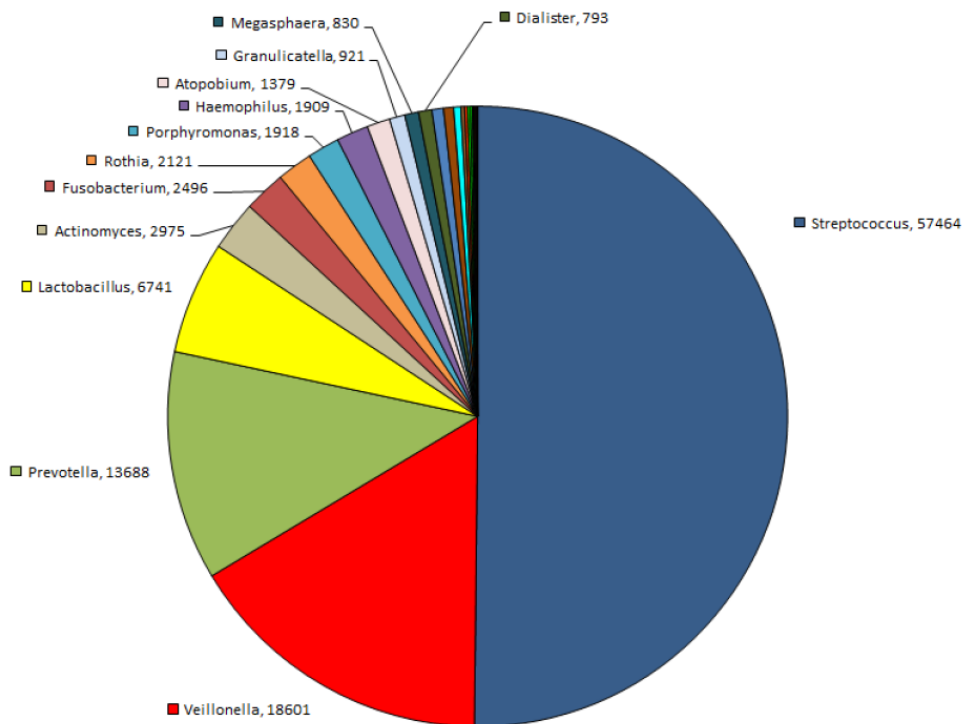
Název bakteriálního kmene	Zdraví jedinci (n=25)	Pacienti s OPSCC (n=11)	Pacienti s OCSCC (n=6)
<i>Firmicutes</i>	47,1 %	73,03 %	57,19 %
<i>Bacteroidetes</i>	21,2 %	10,23 %	20,54 %
<i>Proteobacteria</i>	22,7 %	9,04 %	10,21 %

Byla prokázána snížená rozmanitost a bohatost ve složení mikrobiomu u pacientů s HNSCC v porovnání s kontrolními vzorky. S ohledem na HPV infekci a místo výskytu nádoru, byla zaznamenána zvýšená rozmanitost a bohatost mikroorganismů u pacientů s OCSCC negativním na HPV oproti pacientům s OPSCC pozitivním a negativním na HPV. U zdravých jedinců byly v relativní četnosti zastoupenější rody *Haemophilus*, *Neisseria*, *Lautropia*, *Leptotrichia* a *Aggregatibacter*, kdežto u pacientů s HNSCC byly v relativní četnosti více přítomné rody *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Dialister*, *Staphylococcus*, *Fusobacterium* a *Parvimonas* (viz graf 1, Guerrero-Preston et al., 2016). Bylo prokázáno, že rody bakterií *Lactobacillus* a *Veillonella* (kmen *Firmicutes*) jsou asociovány s HNSCC, a tak jejich zvýšené množství ve slinách může být považováno za biomarker HNSCC. Stejně tak může být považováno za biomarker HNSCC snížené zastoupení *Haemophilus*, *Neisseria* či *Aggregatibacter* (kmen *Proteobacteria*).

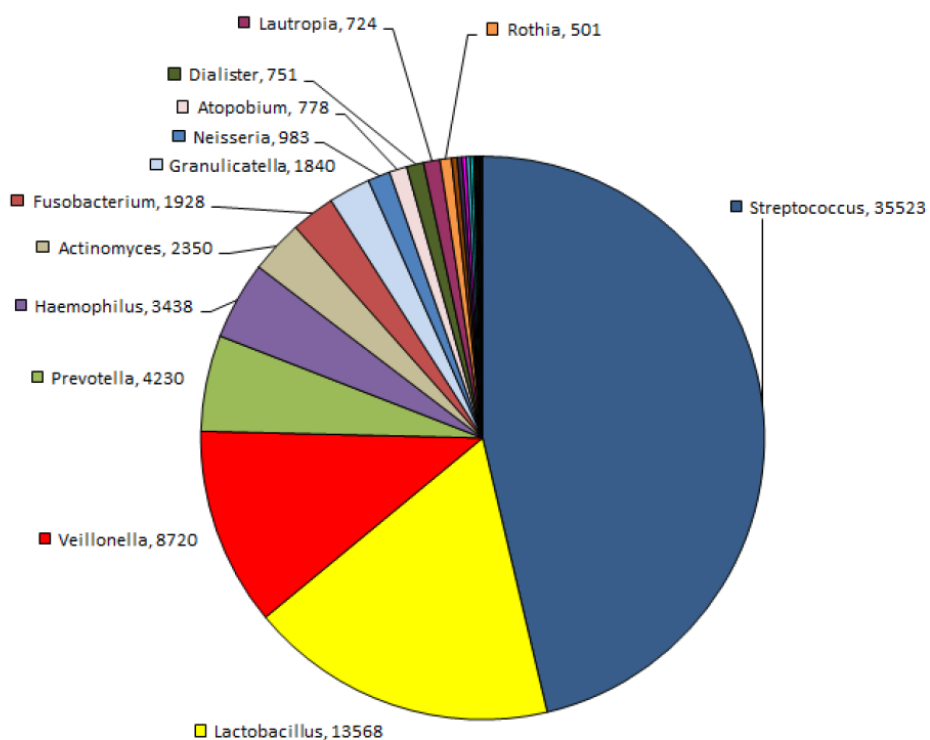


Graf 1- Porovnání relativní četnosti zastoupení bakteriálních rodů ve vzorcích slin od zdravých jedinců a pacientů s HNSCC. Více zastoupené rody bakterií u kontrolních vzorků či vzorků s HNSCC jsou označeny podtržením. (Převzato a upraveno podle Guerrero-Preston et al., 2016)

Při porovnání mikrobiomu pacientů s OPSCC pozitivním na HPV a negativním na HPV byly zjištěny značné rozdíly v jeho složení. Bakteriální rod *Streptococcus* měl dominantní zastoupení u obou typů nádorů, avšak u pacientů s OPSCC pozitivním na HPV byl druhý nejzastoupenější bakteriální rod *Veillonella*, kdežto u pacientů s OPSCC negativním na HPV to byl rod *Lactobacillus* (viz grafy 2A a 2B, Guerrero-Preston et al., 2016).



A-Nádory orofaryngu pozitívni na HPV



B-Nádory orofaryngu negatívni na HPV

Graf 2- Složení mikrobiomu pacientů s OPSCC. Čísla znázorňují četnost sekvencí daného bakteriálního rodu (Převzato od Guerrero-Preston et al., 2016)

Další studie (Zakrzewski et al., 2021), která zaznamenala odlišné mikrobiální složení v závislosti na HPV infekci, používala metodu sekvenace genů pro 16S rRNA. Pro tuto studii byly získány vzorky slin, nádorové tkáně a normální tkáně přilehlé k nádoru od 13 pacientů s OPSCC. Porovnáním alfa-diverzity byla zjištěna snížená bohatost zastoupení mikroorganismů u pacientů s OPSCC pozitivních na HPV, avšak nebyla pozorována odlišná rozmanitost mikrobiálního zastoupení v závislosti na HPV infekci. Rozdíly ve složení mikrobiomu v závislosti na HPV infekci byly v této studii zaznamenány u kmene bakterií *Spirochaetes* a bakteriálního rodu *Treponema*, jejichž výskyt byl zvýšený v normální tkáni u pacientů s OPSCC pozitivním na HPV a zároveň zjistili snížený výskyt bakteriálního rodu *Atopobium*. Ve vzorcích slin byl zaznamenán snížený výskyt bakterií z kmene *Fusobacteria*, bakteriálního rodu *Leptotrichia* a na úrovni operačních taxonomických jednotek (OTU) snížený výskyt čtyř OTU *Prevotella sp.* u OPSCC pozitivních na HPV. V nádorové tkáni byl snížený výskyt dvou OTU *Prevotella sp.* a *Rothia*. U bakteriálního rodu *Veillonella* byl zaznamenán snížený výskyt v normální tkáni u pacientů s OPSCC pozitivních na HPV, avšak stejné zastoupení ve slinách a nádorové tkáni u pacientů s OPSCC pozitivním a negativním na HPV.

Při porovnání zdravé a nádorové tkáně nebyly zjištěny signifikantní rozdíly ve složení mikrobiomu, pouze byla pozorována snížená bohatost u nádorové tkáně a taktéž zvýšené zastoupení bakteriálního rodu *Parvimonas* u zdravé tkáně. Toto pozorování je však odlišné od dřívějších studií (Wang et al., 2017) a (Pushalkar et al., 2012), které také porovnávaly mikrobiom zdravé a nádorové tkáně. Taktéž byl pozorován snížený výskyt bakteriálních kmenů *Firmicutes* a *Actinobacteria* u nádorové tkáně, s čímž se shodují závěry dalších studií mikrobiomu (Wang et al., 2017) a (Schmidt et al., 2014).

Odlišné složení mikrobiomu u pacientů s HNSCC pozitivním na HPV bylo zaznamenáno i ve studii (Carey et al., 2020), která se zaměřovala na studování viromu u 114 pacientů s nádorem mandlí pozitivním na HPV s případnými metastázemi na uzlinách a pacientů bez HNSCC. U těchto pacientů byly porovnávány mikrobiomy na dvou místech – mikrobiom primárního nádoru a mikrobiom lymfatických uzlin a u pacientů bez HNSCC pouze mikrobiom mandlí (viz tabulka 6). V této studii byla použita analýza pomocí softwaru rMAT, která analyzuje celý metagenom a detekuje pozitivní hybridizační signál neboli vysoce exprimované genové oblasti v genomu. Pro stanovení zkřížené hybridizace sond a následnou vizualizaci pomocí skeneru, byly připraveny referenční lidské DNA a RNA, které byly rozdílně označeny od studovaných vzorků a následně byly společně hybridizovány pomocí mikročipů PathoChip.

Tabulka 6 - Informace o studovaných pacientech, Zkratky: HNSCC- dlaždicobuněčný nádor hlavy a krku (Vytvořeno podle Carey et al., 2020)

Pacienti bez metastáz na uzlinách	Pacienti s metastázami na uzlinách	Pacienti bez HNSCC
Mikrobiom primárního nádoru (NPR) (n=23)	Mikrobiom primárního nádoru (PPR) (n=23)	Mikrobiom mandlí (n=24)
Mikrobiom lymfatických uzlin (NLN) (n=22)	Mikrobiom lymfatických uzlin (PLN) (n=22)	

Nejvyšší hybridizační signál u vzorků nádorů byl zaznamenán od virů z čeledi *Papillomaviridae* (nejvíce typ HPV16) s výjimkou NLN, kde byl zachycen nejvyšší hybridizační signál od virů z čeledi *Siphoviridae*. Další vysoké hybridizační signály virů z čeledí *Myoviridae*, *Reoviridae*, *Polydnviridae*, *Baculoviridae* a *Herpesviridae* byly zaznamenány u všech vzorků nádorů. Tyto čeledi virů jsou teda možným biomarkerem pro nádory pozitivní na HPV, především viry z čeledi *Reoviridae*. Bylo zjištěno, že složení viromu je u primárních nádorů podobné, a tedy neovlivňuje schopnost nádoru metastazovat či délku přežití pacienta.

4.3.2 Nádory asociované s kouřením a konzumací alkoholu

Kouření a konzumace alkoholu jsou jedním z hlavních rizikových faktorů pro vznik nádorů, jak je již popisováno výše. Avšak u všech kuřáků nedochází k rozvoji HNSCC. Porovnáním orálního mikrobiomu ve vzorcích bukalní sliznice 24 kuřáků bez HNSCC a 27 kuřáků s HNSCC (Sharma et al., 2020), byly zjištěny možné asociace se změnou mikrobiálního složení u těchto pacientů. Porovnáním alfa a beta-diverzity byla pozorována nižší bohatost bakteriálního zastoupení a vyšší variabilita běžných orálních bakterií u pacientů s HNSCC. Dále bylo objeveno 11 taxonů, jejichž relativní hojnost byla odlišná u daných skupin jedinců v souvislosti i s funkčními schopnostmi těchto bakterií. Bakteriální rody *Tannerella*, *Capnocytophaga*, *Selenomonas*, *Kingella*, druhy *Veillonella parvula* a *Haemophilus parainfluenzae* a čeledi *Lachnospiraceae* a *Weeksellaceae* byly nalezeny ve větší relativní hojnosti u zdravých jedinců. U některých z těchto bakterií byla prokázána pozitivní korelace s biosyntézou cukrů, aminokyselin a lipidů a degradací některých cukrů (xylóza, galakturonát a arabinóza). Rody bakterií *Stenotrophomonas*, *Ruminococcus* a čeleď *Comamonadaceae*

specifické pro pacienty s HNSCC se podílejí na degradaci xenobiotik, aminokyselin a aminů a podporují rezistenci na antibiotika.

4.3.3 Nádory asociované s parodontálními patogeny

Infekce parodontálními patogeny představuje riziko vzniku HNSCC. Studie (Ganly et al., 2019), zabývající se asociací parodontálních patogenů s orálním mikrobiomem u nekouřících jedinců, analyzovala vzorky výplachů z dutiny ústní od pacientů s OCSCC negativním na HPV, pacientů s premaligními lézemi (PML) a negativních kontrol. Porovnáním beta-diverzity u jednotlivých skupin jedinců bylo identifikováno 5 bakteriálních rodů, jejichž relativní množství bylo signifikantně odlišné (viz tabulka 7).

Tabulka 7- Relativní hojnost zastoupení 5 vybraných bakteriálních rodů u studovaných jedinců. Zkratky: **OCSCC**- dlaždicobuněčný nádor dutiny ústní, **PML** – premaligní léze (Vytvořeno podle Ganly et al., 2019)

Název bakteriálního rodu	Pacienti s OCSCC (n=18)	Pacienti s PML (n=8)	Negativní kontroly (n=12)
<i>Fusobacterium</i>	3,88 %	3,15 %	1,37 %
<i>Prevotella</i>	14,01 %	13,61 %	6,21 %
<i>Alloprevotella</i>	2,31 %	1,5 %	0,13 %
<i>Veillonella</i>	7,8 %	14,86 %	5,72 %
<i>Streptococcus</i>	18,09 %		34,63 %

U pacientů s OCSCC byly pozorovány změny ve složení orálního mikrobiomu se zvýšeným výskytem parodontálních patogenních bakterií z rodů *Fusobacterium*, *Prevotella* a *Alloprevotella* a sníženým výskytem komenzálního bakteriálního rodu *Streptococcus* v porovnání s negativními kontrolami. Taktéž u nich byly nalezeny geny kódující proteiny tepelného šoku (HSP90), ligandy pro TLR1 a enzymy pro syntézu ligandů pro TLR2 a TLR4. Výskyt těchto prozánětlivých genů je důsledkem schopnosti parodontálních patogenů způsobit zánět, především bakterií z rodů *Fusobacterium*, *Prevotella* a *Alloprevotella*. Pro pozorování vztahů mezi bakteriemi byly použity bioinformatické analýzy na základě korelací mezi jednotlivými rody. Pomocí síťové analýzy byla vytvořena síť ze čtyř primárních rodů, které souvisí s onemocněním - patogenní rody *Fusobacterium*, *Prevotella* a *Alloprevotella* a komenzálního rodu *Streptococcus*, které vytvořily shluk propojením s dalšími osmi parodontálními patogeny - *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Parvimonas*, *Enterococcus*, *Selenomonas* a *Dialister*, *Campylobacter*, *Peptostreptococcus* a deseti nepatogenními

bakteriemi - *Bifidobacterium*, *Atopobium*, *Catonella*, *Rothia*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Staphylococcus*, *Moryella*, *Veillonella* a *Scardovia*. Bylo zjištěno 19 kolaborativních (mezi dvěma patogeny či mezi dvěma nepatogeny) a 14 inhibičních (mezi patogeny a nepatogeny) spojení. Při porovnání vzorků od tří skupin jedinců byl zjištěn lineární nárůst relativního množství parodontálních patogenů od negativních kontrol k pacientům s nádory (u negativních kontrol – průměr 9,96 %, u pacientů s PML – průměr 20,9 % a u pacientů s OCSCC – průměr 27,84 %).

5 Závěr

Tato práce pojednává o lidském mikrobiomu dutiny ústní a jeho asociaci s nádory. Je zřejmé, že mikrobiom je nedílnou součástí lidského organismu již od narození a má zásadní vliv na jeho funkci. Složení mikrobiomu je pro každého člověka specifické a mikroorganismy se vyskytují v odlišných četnostech. Bylo ale pozorováno, že existuje bakteriální základ (nazývaný „core“) tvořený bakteriemi, které jsou mezi jedinci shodné. Složení mikrobiomu je předmětem mnoha studií, protože změny v jeho složení mohou přispívat ke vzniku a vývoji onemocnění. Významné rozdíly v mikrobiálním zastoupení byly zjištěny studiem složení mikrobiomu u zdravých jedinců a onkogenních pacientů. Například zvýšené množství bakteriálních rodů *Lactobacillus* a *Veillonella* či snížené množství rodů bakterií *Haemophilus*, *Neisseria* či *Aggregatibacter* může být považováno za nádorový biomarker a pomoci tak s diagnostikou nádoru.

U pacientů s HNSCC byla pozorovaná snížená alfa – diverzita orálního mikrobiomu oproti zdravým jedincům. Nádory hlavy a krku jsou skupinou nádorů, které jsou asociovány především s kouřením, konzumací alkoholu a infekcí HPV. Porovnáním nádorů vyvolaných infekcí HPV a nádorů vyvolaných jinými rizikovými faktory bylo prokázáno, že se jedná o rozdílné skupiny nádorů s odlišnými charakteristikami. Působením těchto rizikových faktorů, byly zjištěny změny v mikrobiálním složení dutiny ústní u studovaných jedinců, které mohou přispívat k tumorigenezi. Vlivem konzumace alkoholu byl zaznamenán snížený výskyt bakterií z třídy *Bacilli* a řádu *Lactobacillales* a zvýšený výskyt bakteriálních rodů *Streptococcus*, *Lachnoanaerobaculum*, *Actinomyces*, *Leptotrichia*, *Cardiobacterium*, *Neisseria*, *Aggregatibacter*, *Kingella*, *Bacteroidales* a *Prevotella*. Vlivem kouření byla pozorována zvýšená množství bakteriálních rodů *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* a *Lactobacillus* a snížená množství rodů bakterií *Corynebacterium*, *Abiotrophia*, *Selenomonas*, *Peptostreptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas* a *Prevotella*.

Složení orálních mikrobiomů pacientů s HNSCC je rozdílné a byly prokázány asociace v četnosti určitých mikrobiálních taxonů s daným rizikovým faktorem. V posledních letech jsou hojně studovány hlavně změny ve složení mikrobiomu u pacientů s HNSCC v závislosti na infekci HPV, u kterých byla pozorována zvýšená relativní četnost bakterií z rodů *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Dialister*, *Staphylococcus*, *Fusobacterium*, *Parvimonas* a virů především z čeledi *Papillomaviridae*, ale také *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Reoviridae*, *Polydnaviridae*, *Baculoviridae* a *Herpesviridae* v porovnání se zdravými jedinci.

Mikrobiom pacientů s OPSCC pozitivním na HPV byl převážně tvořen bakteriálním rodem *Streptococcus* a druhým nejzastoupenějším rodem *Veillonella*, v porovnání s mikrobiomem pacientů s OPSCC negativním na HPV, ve kterém byl taktéž nejvíce zastoupený rod *Streptococcus*, kdežto druhý nejčetnější rod byl *Lactobacillus*. U kouřících pacientů s HNSCC byly ve zvýšeném množství pozorovány rody bakterií *Stenotrophomonas*, *Ruminococcus* a čeleď bakterií *Comamonadaceae*, kdežto u zdravých jedinců byly pozorovány ve zvýšeném množství bakteriální rody *Tannerella*, *Capnocytophaga*, *Selenomonas*, *Kingella*, druhy *Veillonella parvula* a *Haemophilus parainfluenzae* a čeledi *Lachnospiraceae* a *Weeksellaceae*. U nádorů asociovaných s parodontálními patogeny byla u pacientů s HNSCC nalezena zvýšená množství patogenních bakteriálních rodů *Fusobacterium*, *Prevotella* a *Alloprevotella* a snížené množství komenzálních bakterií z rodu *Streptococcus* v porovnání s negativními kontrolami.

Mikrobiální interakce, které mohou přispívat k indukci a progresi nádorů byly pozorovány u HPV s bakteriemi rodu *Streptococcus* a EBV. Ačkoliv existují studie, které dokumentují asociaci HPV a parodontálních patogenů, není toto pozorování považováno za průkazné, protože existuje pouze málo důkazů, které toto zjištění potvrzují. Interakce mezi dalšími mikroorganismy jsou velmi málo prozkoumanou oblastí a je zapotřebí dalších studií.

6 Seznam použité literatury

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(11), 5721–5732. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>
- Ahn, J., Sinha, R., Pei, Z., Dominianni, C., Wu, J., Shi, J., Goedert, J. J., Hayes, R. B., & Yang, L. (2013). Human Gut Microbiome and Risk for Colorectal Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *105*(24), 1907–1911. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt300>
- Ali, A., Lassi, Z. S., Kapellas, K., Jamieson, L., & Rumbold, A. R. (2021). A systematic review and meta-analysis of the association between periodontitis and oral high-risk human papillomavirus infection. *Journal of Public Health*, *43*(4), e610–e619. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdaa156>
- Baker, J. L., Bor, B., Agnello, M., Shi, W., & He, X. (2017). Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends in Microbiology*, *25*(5), 362–374. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.012>
- Banerjee, S., Tian, T., Wei, Z., Peck, K. N., Shih, N., Chalian, A. A., O'Malley, B. W., Weinstein, G. S., Feldman, M. D., Alwine, J., & Robertson, E. S. (2017). Microbial Signatures Associated with Oropharyngeal and Oral Squamous Cell Carcinomas. *Scientific Reports*, *7*(1), 4036. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03466-6>
- Banerjee, S., Tian, T., Wei, Z., Shih, N., Feldman, M. D., Alwine, J. C., Coukos, G., & Robertson, E. S. (2017). The ovarian cancer oncobiome. *Oncotarget*, *8*(22), 36225–36245. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16717>
- Banerjee, S., Tian, T., Wei, Z., Shih, N., Feldman, M. D., Peck, K. N., DeMichele, A. M., Alwine, J. C., & Robertson, E. S. (2018). Distinct Microbial Signatures Associated With Different Breast Cancer Types. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00951>
- Bassler, B. L. (2002). Small Talk. *Cell*, *109*(4), 421–424. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00749-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00749-3)
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schlöter, M. (2020).

Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0> *

Beynon, R. A., Lang, S., Schimansky, S., Penfold, C. M., Waylen, A., Thomas, S. J., Pawlita, M., Waterboer, T., Martin, R. M., May, M., & Ness, A. R. (2018). Tobacco smoking and alcohol drinking at diagnosis of head and neck cancer and all-cause mortality: Results from head and neck 5000, a prospective observational cohort of people with head and neck cancer. *International Journal of Cancer*, 143(5), 1114–1127. <https://doi.org/10.1002/ijc.31416>

Bik, E. M., Long, C. D., Armitage, G. C., Loomer, P., Emerson, J., Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Gill, S. R., Fraser-Liggett, C. M., & Relman, D. A. (2010). Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *The ISME Journal*, 4(8), 962–974. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.30>

Brown, C. T., Hug, L. A., Thomas, B. C., Sharon, I., Castelle, C. J., Singh, A., Wilkins, M. J., Wrighton, K. C., Williams, K. H., & Banfield, J. F. (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature*, 523(7559), 208–211. <https://doi.org/10.1038/nature14486>

Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W.-D. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 560–602. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004>

Cantrell, S. C., Peck, B. W., Li, G., Wei, Q., Sturgis, E. M., & Ginsberg, L. E. (2013). Differences in Imaging Characteristics of HPV-Positive and HPV-Negative Oropharyngeal Cancers: A Blinded Matched-Pair Analysis. *American Journal of Neuroradiology*, 34(10), 2005–2009. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3524>

Carey, R. M., Rajasekaran, K., Seckar, T., Lin, X., Wei, Z., Tong, C. C. L., Ranasinghe, V. J., Newman, J. G., O'Malley, B. W., Weinstein, G. S., Feldman, M. D., & Robertson, E. S. (2020). The virome of HPV-positive tonsil squamous cell carcinoma and neck metastasis. *Oncotarget*, 11(3), 282–293. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27436>

Castellsagué, X., Alemany, L., Quer, M., Halc, G., Quirós, B., Tous, S., Clavero, O., Alòs, L., Biegner, T., Szafarowski, T., Alejo, M., Holzinger, D., Cadena, E., Claros, E., Hall, G., Laco, J., Poljak, M., Benevolo, M., Kasamatsu, E., ... Xavier Bosch, F. (2016). HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in

- 3680 Patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(6), djv403. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv403>
- Chan, J. Y. K., Cheung, M. K., Lan, L., Ng, C., Lau, E. H. L., Yeung, Z. W. C., Wong, E. W. Y., Leung, L., Qu, X., Cai, L., Zhu, H., Boon, S. S., Burk, R. D., Chan, P. K. S., & Chen, Z. (2022). Characterization of oral microbiota in HPV and non-HPV head and neck squamous cell carcinoma and its association with patient outcomes. *Oral Oncology*, 135, 106245. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2022.106245>
- Cooke, G., Behan, J., & Costello, M. (2006). Newly identified vitamin K-producing bacteria isolated from the neonatal faecal flora. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 18(3–4). <https://doi.org/10.3402/mehd.v18i3-4.7681>
- Creasy, H. H., Felix, V., Aluvathingal, J., Crabtree, J., Ifeonu, O., Matsumura, J., McCracken, C., Nickel, L., Orvis, J., Schor, M., Giglio, M., Mahurkar, A., & White, O. (2021). HMPDACC: a Human Microbiome Project Multi-omic data resource. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D734–D742. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa996>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. v., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W.-H., Lakshmanan, A., & Wade, W. G. (2010). The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5002–5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>
- Dhull, A. K., Atri, R., Dhankhar, R., Chauhan, A. K., & Kaushal, V. (2018). Major Risk Factors in Head and Neck Cancer: A Retrospective Analysis of 12-Year Experiences. *World Journal of Oncology*, 9(3), 80–84. <https://doi.org/10.14740/wjon1104w>
- di Credico, G., Polesel, J., Dal Maso, L., Pauli, F., Torelli, N., Luce, D., Radoï, L., Matsuo, K., Serraino, D., Brennan, P., Holcatova, I., Ahrens, W., Lagiou, P., Canova, C., Richiardi, L., Healy, C. M., Kjaerheim, K., Conway, D. I., Macfarlane, G. J., ... Edefonti, V. (2020). Alcohol drinking and head and neck cancer risk: the joint effect of intensity and duration. *British Journal of Cancer*, 123(9), 1456–1463. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01031-z>

- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(26), 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O’Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. (2011). The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metabolism*, *13*(5), 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>
- Doocey, C. M., Finn, K., Murphy, C., & Guinane, C. M. (2022). The impact of the human microbiome in tumorigenesis, cancer progression, and biotherapeutic development. *BMC Microbiology*, *22*(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02465-6>
- D’Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Westra, W. H., & Gillison, M. L. (2007). Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*, *356*(19), 1944–1956. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065497>
- Dupuy, A. K., David, M. S., Li, L., Heider, T. N., Peterson, J. D., Montano, E. A., Dongari-Bagtzoglou, A., Diaz, P. I., & Strausbaugh, L. D. (2014). Redefining the Human Oral Mycobiome with Improved Practices in Amplicon-based Taxonomy: Discovery of *Malassezia* as a Prominent Commensal. *PLoS ONE*, *9*(3), e90899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090899>
- Eren, A. M., Borisy, G. G., Huse, S. M., & Mark Welch, J. L. (2014). Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.1409644111>
- Fan, X., Peters, B. A., Jacobs, E. J., Gapstur, S. M., Purdue, M. P., Freedman, N. D., Alekseyenko, A. v., Wu, J., Yang, L., Pei, Z., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2018). Drinking alcohol is associated with variation in the human oral microbiome in a large study of American adults. *Microbiome*, *6*(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0448-x>
- Faust, K., Sathirapongsasuti, J. F., Izard, J., Segata, N., Gevers, D., Raes, J., & Huttenhower, C. (2012). Microbial Co-occurrence Relationships in the Human Microbiome. *PLoS Computational Biology*, *8*(7), e1002606. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002606>

- Ganly, I., Yang, L., Giese, R. A., Hao, Y., Nossa, C. W., Morris, L. G. T., Rosenthal, M., Migliacci, J., Kelly, D., Tseng, W., Hu, J., Li, H., Brown, S., & Pei, Z. (2019). Periodontal pathogens are a risk factor of oral cavity squamous cell carcinoma, independent of tobacco and alcohol and human papillomavirus. *International Journal of Cancer*, *145*(3), 775–784. <https://doi.org/10.1002/ijc.32152>
- Gao, L., Xu, T., Huang, G., Jiang, S., Gu, Y., & Chen, F. (2018). Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein & Cell*, *9*(5), 488–500. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0548-1>
- Ge, X., Ding, C., Zhao, W., Xu, L., Tian, H., Gong, J., Zhu, M., Li, J., & Li, N. (2017). Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility. *Journal of Translational Medicine*, *15*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1105-4>
- Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. *PLoS Pathogens*, *6*(1), e1000713. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713>
- Gillison, M. L. (2000). Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, *92*(9), 709–720. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.9.709>
- Guerrero-Preston, R., Godoy-Vitorino, F., Jedlicka, A., Rodríguez-Hilario, A., González, H., Bondy, J., Lawson, F., Folawiyo, O., Michailidi, C., Dziedzic, A., Thangavel, R., Hadar, T., Noordhuis, M. G., Westra, W., Koch, W., & Sidransky, D. (2016). 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, human papilloma virus infection and surgical treatment. *Oncotarget*, *7*(32), 51320–51334. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9710>
- Hadrich, D. (2018). Microbiome Research Is Becoming the Key to Better Understanding Health and Nutrition. *Frontiers in Genetics*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00212>
- Hasan, N., & Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*, *7*, e7502. <https://doi.org/10.7717/peerj.7502>
- Hayes, R. B., Ahn, J., Fan, X., Peters, B. A., Ma, Y., Yang, L., Agalliu, I., Burk, R. D., Ganly, I., Purdue, M. P., Freedman, N. D., Gapstur, S. M., & Pei, Z. (2018). Association of Oral

Microbiome With Risk for Incident Head and Neck Squamous Cell Cancer. *JAMA Oncology*, 4(3), 358. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.4777>

Hsiao, J.-R., Chang, C.-C., Lee, W.-T., Huang, C.-C., Ou, C.-Y., Tsai, S.-T., Chen, K.-C., Huang, J.-S., Wong, T.-Y., Lai, Y.-H., Wu, Y.-H., Hsueh, W.-T., Wu, S.-Y., Yen, C.-J., Chang, J.-Y., Lin, C.-L., Weng, Y.-L., Yang, H.-C., Chen, Y.-S., & Chang, J. S. (2018). The interplay between oral microbiome, lifestyle factors and genetic polymorphisms in the risk of oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 39(6), 778–787. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy053>

Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>

Iebba, V., Totino, V., Gagliardi, A., Santangelo, F., Cacciotti, F., Trancassini, M., Mancini, C., Cicerone, C., Corazziari, E., Pantanella, F., & Schippa, S. (2016). Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *The New Microbiologica*, 39(1), 1–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26922981>

Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. (2019). The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*, 569(7758), 641–648. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1238-8>

Jiang, R., Ekshyyan, O., Moore-Medlin, T., Rong, X., Nathan, S., Gu, X., Abreo, F., Rosenthal, E. L., Shi, M., Guidry, J. T., Scott, R. S., Hutt-Fletcher, L. M., & Nathan, C.-A. O. (2015). Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 44(1), 28–36. <https://doi.org/10.1111/jop.12221>

Kho, Z. Y., & Lal, S. K. (2018). The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01835>

Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolek, T., McCall, L.-I., McDonald, D., Melnik, A. v., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R. A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, A., Xu, Z. Z., ... Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 410–422. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9>

- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., & Moore, L. v. (1989). Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infection and Immunity*, *57*(10), 3194–3203. <https://doi.org/10.1128/iai.57.10.3194-3203.1989>
- Kolenbrander, P. E., Parrish, K. D., Andersen, R. N., & Greenberg, E. P. (1995). Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infection and Immunity*, *63*(12), 4584–4588. <https://doi.org/10.1128/iai.63.12.4584-4588.1995>
- LEDERBERG, J., & MCCRAY, A. T. (2001). `Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, *15*(7), 8. <https://link.gale.com/apps/doc/A73535513/AONE?u=anon~622ab2a3&sid=googleScholar&xid=eee77f51>
- Lee, Y. K., & Mazmanian, S. K. (2010). Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System? *Science*, *330*(6012), 1768–1773. <https://doi.org/10.1126/science.1195568>
- Liang, G., & Bushman, F. D. (2021). The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(8), 514–527. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00536-5>
- Liu, S., da Cunha, A. P., Rezende, R. M., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., Comstock, L. E., Gandhi, R., & Weiner, H. L. (2016). The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA. *Cell Host & Microbe*, *19*(1), 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.005>
- Ly, M., Abeles, S. R., Boehm, T. K., Robles-Sikisaka, R., Naidu, M., Santiago-Rodriguez, T., & Pride, D. T. (2014). Altered Oral Viral Ecology in Association with Periodontal Disease. *MBio*, *5*(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01133-14>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, *3*(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Marsh, P. D., & Zaura, E. (2017). Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*, *44*, S12–S22. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12679>
- Mazul, A. L., Taylor, J. M., Divaris, K., Weissler, M. C., Brennan, P., Anantharaman, D., Abedi-Ardekani, B., Olshan, A. F., & Zavallos, J. P. (2017). Oral health and human

papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 123(1), 71–80. <https://doi.org/10.1002/cncr.30312>

Mena, M., Frias-Gomez, J., Taberna, M., Quirós, B., Marquez, S., Clavero, O., Baena, A., Lloveras, B., Alejo, M., León, X., García, J., Mesía, R., Bermejo, O., Bonfill, T., Aguila, A., Guix, M., Hijano, R., Pavón, M. A., Torres, M., ... Alemany, L. (2020). Epidemiology of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer in a classically low-burden region of southern Europe. *Scientific Reports*, 10(1), 13219. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70118-7>

Muto, M., Hitomi, Y., Ohtsu, A., Shimada, H., Kashiwase, Y., Sasaki, H., Yoshida, S., & Esumi, H. (2000). Acetaldehyde production by non-pathogenic *Neisseria* in human oral microflora: Implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract. *International Journal of Cancer*, 88(3), 342–350. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20001101\)88:3<342::AID-IJC4>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20001101)88:3<342::AID-IJC4>3.0.CO;2-I)

Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L. T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltser, A., Douglas, G. M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., ... Straussman, R. (2020). The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science*, 368(6494), 973–980. <https://doi.org/10.1126/science.aay9189>

Pai, S. I., & Westra, W. H. (2009). Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), 49–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158>

Pavlova, S. I., Wilkening, R. v., Federle, M. J., Lu, Y., Schwartz, J., & Tao, L. (2019). *Streptococcus* endopeptidases promote HPV infection in vitro. *MicrobiologyOpen*, 8(1), e00628. <https://doi.org/10.1002/mbo3.628>

Pérez-Brocal, V., & Moya, A. (2018). The analysis of the oral DNA virome reveals which viruses are widespread and rare among healthy young adults in Valencia (Spain). *PLOS ONE*, 13(2), e0191867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191867>

Pride, D. T., Salzman, J., Haynes, M., Rohwer, F., Davis-Long, C., White, R. A., Loomer, P., Armitage, G. C., & Relman, D. A. (2012). Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *The ISME Journal*, 6(5), 915–926. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.169>

- Principles and Workflow of 16S/18S/ITS Amplicon Sequencing. CD Genomics [online]. [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://www.cd-genomics.com/resourse-Principels-and-Workflow-of-16S-18S-ITS-Amplicon-Sequencing.html>
- Pushalkar, S., Ji, X., Li, Y., Estilo, C., Yegnanarayana, R., Singh, B., Li, X., & Saxena, D. (2012). Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiology*, *12*(1), 144. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-144>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Radaic, A., & Kapila, Y. L. (2021). The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 1335–1360. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.010>
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell*, *118*(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>
- Sabol, I., & Gašperov, N. M. (2018). *The transforming properties of human papillomavirus oncoproteins*. <https://www.researchgate.net/publication/286217456>
- Sayin, S. I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., & Bäckhed, F. (2013). Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metabolism*, *17*(2), 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.003>
- Schmidt, B. L., Kuczynski, J., Bhattacharya, A., Huey, B., Corby, P. M., Queiroz, E. L. S., Nightingale, K., Kerr, A. R., DeLacure, M. D., Veeramachaneni, R., Olshen, A. B., & Albertson, D. G. (2014). Changes in Abundance of Oral Microbiota Associated with Oral Cancer. *PLoS ONE*, *9*(6), e98741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098741>
- Sharma, A. K., DeBusk, W. T., Stepanov, I., Gomez, A., & Khariwala, S. S. (2020). Oral Microbiome Profiling in Smokers with and without Head and Neck Cancer Reveals

- Variations Between Health and Disease. *Cancer Prevention Research*, 13(5), 463–474. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0459>
- Stark, P. L., & Lee, A. (1982). The Microbial Ecology of the Large Bowel of Breastfed and Formula-fed Infants During the First Year of Life. *Journal of Medical Microbiology*, 15(2), 189–203. <https://doi.org/10.1099/00222615-15-2-189>
- Tezal, M., Scannapieco, F. A., Wactawski-Wende, J., Hyland, A., Marshall, J. R., Rigual, N. R., & Stoler, D. L. (2012). Local Inflammation and Human Papillomavirus Status of Head and Neck Cancers. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 138(7), 669. <https://doi.org/10.1001/archoto.2012.873>
- Tezal, M., Sullivan Nasca, M., Stoler, D. L., Melendy, T., Hyland, A., Smaldino, P. J., Rigual, N. R., & Loree, T. R. (2009). Chronic Periodontitis–Human Papillomavirus Synergy in Base of Tongue Cancers. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 135(4), 391. <https://doi.org/10.1001/archoto.2009.6>
- Voorhis Andrew, Fabiola Miranda-Sanchez, Floyd E. Dewhirst, Jessica Mark Welch, Kathryn Kauffman, Stéphane Viala, Susan Yost a William G. Chen. Expanded human oral microbiome database. Ehomd [online]. [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://www.homd.org/>
- Wang, H., Funchain, P., Bebek, G., Altemus, J., Zhang, H., Niazi, F., Peterson, C., Lee, W. T., Burkey, B. B., & Eng, C. (2017). Microbiomic differences in tumor and paired-normal tissue in head and neck squamous cell carcinomas. *Genome Medicine*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0405-5>
- Whipps J, Lewis K, Cooke R. Mycoparasitism and plant disease control. In: Burge M, editor. *Fungi Biol Control Syst*. Manchester University Press; 1988. p. 161-187
- Wirth, R., Maróti, G., Mihók, R., Simon-Fiala, D., Antal, M., Pap, B., Demcsák, A., Minarovits, J., & Kovács, K. L. (2020). A case study of salivary microbiome in smokers and non-smokers in Hungary: analysis by shotgun metagenome sequencing. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1), 1773067. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1773067>
- Wu, J., Peters, B. A., Dominianni, C., Zhang, Y., Pei, Z., Yang, L., Ma, Y., Purdue, M. P., Jacobs, E. J., Gapstur, S. M., Li, H., Alekseyenko, A. v, Hayes, R. B., & Ahn, J. (2016). Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults. *The ISME Journal*, 10(10), 2435–2446. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.37>

- Wylie, K. M., Mihindukulasuriya, K. A., Zhou, Y., Sodergren, E., Storch, G. A., & Weinstock, G. M. (2014). Metagenomic analysis of double-stranded DNA viruses in healthy adults. *BMC Biology*, *12*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0071-7>
- Xuan, C., Shamonki, J. M., Chung, A., DiNome, M. L., Chung, M., Sieling, P. A., & Lee, D. J. (2014). Microbial Dysbiosis Is Associated with Human Breast Cancer. *PLoS ONE*, *9*(1), e83744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083744>
- Yatsunenکو, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, *486*(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Zakrzewski, M., Gannon, O. M., Panizza, B. J., Saunders, N. A., & Antonsson, A. (2021). Human papillomavirus infection and tumor microenvironment are associated with the microbiota in patients with oropharyngeal cancers—pilot study. *Head & Neck*, *43*(11), 3324–3330. <https://doi.org/10.1002/hed.26821>