



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Poslijediplomski sveučilišni studij

Smjer: Analitička kemija

Ana Tolić

PRIMJENA RAMANOVE SPEKTROSKOPIJE U FORENZICI ZA ANALIZU SLINE

Prema radu: Buchan E. i sur., Spectroscopic molecular-fingerprint profiling of saliva, *Analytica Chimica Acta*, **1185** (2021) 339704

Kemijski seminar I

Zagreb, 2022 godina.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. SLINA- MEDIJ VELIKOG BROJA MOLEKULA	2
3. RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA- PRIMJENA ZA ANALIZU SLINE	3
4. SPEKTROSKOPSKO PROFILIRANJE SLINE.....	5
4.1.1. Prikupljanje uzoraka i priprema uzoraka	5
4.1.2. Obrada rezultata	7
4.2. Klasifikacija sline prema spolu	8
4.3. Klasifikacija sline prema dobi.....	9
4.4. Vremenski utjecaj na sastav sline	11
5. ZAKLJUČAK.....	13
6. LITERATURA	14

1. UVOD

Proteklih desetljeća, slina se koristi kao medij za medicinsku dijagnostiku i forenziku. Slina je tjelesna tekućina kompleksnog sastava od proteina, polipeptida, nukleinskih kiselina, elektrolita i hormona te kao takva obiluje biokemijskim informacijama. Uspoređujući s krvi, prednosti upotrebe sline u dijagnostičke svrhe su jednostavnije metode uzorkovanja koje ne pridonose nelagodnosti i bolovima osobi od koje se uzorak uzima. Metode prikupljanja sline ne zahtijevaju visoku stručnost osoblja niti opremu, a sam pristup se smatra neinvazivnim i sigurnim za pacijenta i za operatera. Osim toga, prednost analize sline jest i ekonomičnost same metode uzorkovanja. Nadalje, slina se jednostavno skladišti i prenosi, a s vremenom ne dolazi do zgrušavanja tekućine kao što je slučaj s krvlju.

Slina je medij za istraživanje velikog broja čestih sustavnih bolesti, određivanjem potencijalnih biljega ili određivanjem serumskih dijagnostičkih analoga.¹ Slina se koristi za detekciju akutnog infarkta miokarda i amiotrofične lateralne skleroze (ALS), a slina se uspješno koristila u istraživanju raka kao npr. raka usne šupljine, dojke, pluća, jajnika, prostate itd.² U radu Li et al., s 80 % točnosti se dijagnosticirao rak pluća primjenom SERS metode.³

U forenzici, slina kao dokaz nije toliko česta kao krv ili sperma, ali može imati jako važnu ulogu za slučajeve u kojima se istražuju seksualni napadi, tragovi ugriza na hrani, i sl., a velika prednost očuvanja sline kao dokaza je mogućnost ekstrakcije DNK iz uzorka sline.⁴

Do sada, DNK je najčešći izvor dokaza, ali mana uporabe DNK kao dokaza da je identifikacija jedino uspješna ako je poznat potpuni genetski profil osobe odnosno DNK profil prikupljen kao dokaz ne može identificirati osobu jedino ako u bazi podataka nema već prikupljeni DNK te osobe.⁵ Stoga, upotrebe sline kao izvora dokaza može komplementirati analizu DNK, ali analiza sline u forenzici tek mora postati uobičajena.²

U forenzici, potrebno je što je više moguće izbjeći uništavanje dokaza prilikom analize stoga se sve više okreće prema spektroskopskim tehnikama analize. NMR spektroskopijom se mogu razlikovati periferna krv, sperma, slina i vaginalna tekućina. IR, Ramanova i NMR spektroskopija

se mogu koristiti za detekciju ilegalnih droga u oralnoj tekućini. Ramanova spektroskopija je atraktivna analitička tehnika u forenzici jer je selektivna, ne zahtijeva kompleksnu pripremu uzorka, a ne dolazi do uništenja analita prilikom analize.⁵ Tjelesne tekućine se mogu identificirati i razlikovati prema dobivenim Ramanovim spektrima.⁶ Ramanova spektroskopija omogućuje dobivanje velikog broja rezultata iz male količine uzorka krvi pa je tako zabilježeno da granica detekcije metode analize krvi manja od pojedinačnog eritrocita.⁷ Ramanova analiza krvi omogućuje identifikaciju traga krvi, razlikovati perifernu krv od menstrualne, odrediti rasu i spol osobe.⁵

2. SLINA- MEDIJ VELIKOG BROJA MOLEKULA

Slina je prozirna, muko-serozna tekućina koja nastaje u žlijezdama slinovnicama, a omogućuje vlaženje usne šupljine što olakšava govor, probavljanje i gutanje hrane. Osim toga, služi za regulaciju pH vrijednosti i održavanje oralne higijene.⁸ Još uvijek nisu poznate sve molekule prisutne u slini niti sve uloge sline u organizmu. Slina kao medij je poželjna jer je lako dostupna, pristupačnija od uzorkovanja seruma ili urina, a dodatno, uzorkovanje je jednostavnije i ekonomičnije. Osim toga, slina sadrži većinu molekula koje se nalaze u krvi ili urinu.

Odrasli čovjek dnevno proizvede između 0,5 i 1,5 L sline, a pH vrijednost fiziološki varira od 6,1 do 7,8.¹ Lučenje sline kontrolira autonomni živčani sustav. Sastav sline se može mijenjati ovisno o hormonalnim i psihološkim učincima (tjelovježba, oralna higijena), a sastav se razlikuje i prema načinu nastajanja sline odnosno radi li se o nestimuliranoj i stimuliranoj slini. Nestimulirana slina ovisi o hidriranosti organizma. Stimulirana slina nastaje pod utjecajem različitih stimulacija poput npr. mirisnih, okusnih ili farmakoloških podražaja.¹ Štoviše, sastav sline može uvelike varirati i ovisno o metodama prikupljanja i doba dana, pa čak i godišnjim dobima. Osim po sastavu, stimulirana slina se razlikuje od nestimulirane po tome što ona ovisi i o veličini žlijezde koja je luči. U literaturi, razlika u veličini žlijezde kod muškaraca i žena se navodi kao jedini razlog različitosti sline ovisno o spolu.⁹ Slina sadrži 95-98 % vode, a ostatak čine elektroliti, enzimi, čimbenici rasta, hormoni, antimikrobne tvari i antitijela. Slina također sadrži i različite proteine poput albumina, glikoproteina, imunoglobulina i enzime, ali i dušikove spojeve kao npr. ureu, mokraćnu kiselinu, aminokiseline i kreatinin, lipide i hormone.¹ Glavni proteini u slini su peptidi

bogati prolinom (PRP), glikoprotein α -amilaza i mnogo veći mucini, od kojih tri kumulativno čine gotovo 80% proteina sline.

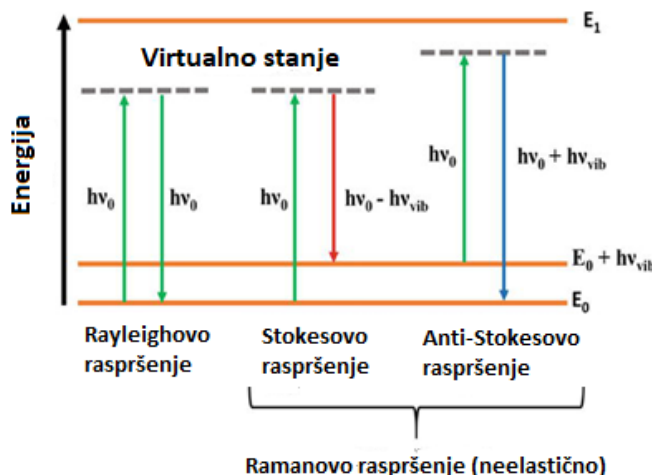


Slika 1. Sastav sline i uloge pojedinih spojeva u slini⁸

3. RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA- PRIMJENA ZA ANALIZU SLINE

Ramanova spektroskopija predstavlja atraktivnu metodu za analizu sline jer ne zahtijeva velike količine uzorka, nije potrebna komplicirana priprema uzorka, a tijekom analize ne dolazi do uništavanja analita što je za forenzičke svrhe izuzetno bitno. Ramanova spektroskopija je osjetljiva vibracijska spektroskopija koja pobudom veza unutar molekula identificira jedinstveni otisak prsta (eng. *fingerprint*) molekule. Fenomen Ramanovog raspršenja se temelji na neelastičnoj interakciji svjetlosti s molekularnim vibracijama, pri čemu dolazi do promjene polarizabilnosti veze kao funkcija nuklearnog gibanja što rezultira promjenom emitirane frekvencije svjetlosti što se prepoznaje kao Ramanov pomak. Različite molekule imaju različite veze stoga svaka molekula ima jedinstveni spektar na temelju kojeg se jednostavno može identificirati molekula. Ramanovi spektri sastoje se od brojnih signala različitih intenziteta i energije koji odgovaraju različitim vibracijskim modelima unutar molekule. Ti modeli vibracija pružaju informacije o atomima i

vezivanju unutar materijala koji se proučava. Ramanova spektroskopija je prikladna analitička metoda za analizu heterogenih i neuređenih uzoraka, kao što je slina zbog čega je izuzetno veliki potencijal te tehnike u forenzičke svrhe.



Slika 2. Prikaz razlike elastičnog i neelastičnog raspršenja svjetlosti

Kako je slina u osnovi voda (>95 %), bitna prednost Ramanove spektroskopije je što Ramanovo raspršenje ne trpi smetnje zbog prisutnosti molekula vode, kao IR spektroskopija. Nadalje, prednost Ramanove analize je i prenosivost instrumenta, za analizu i praćenje tjelesne tekućine na licu mjesta.

Veliki broj istraživanja koristilo je slinu kao medij za analizu primjenom Ramanove spektroskopije. Poznato je da kako ljudi stare da se protok, volumen i sastav sline mijenjaju. Autori su uspješno identificirali različite fenotipove uključujući spol i razlikovali ljudski i životinjski izvor uzorka. Zabilježeno je da se slina spektroskopski razlikuje od krvi i sperme, a dobiveni su i najbitniji signali za različite tjelesne tekućine poput krvi, znoja, sline, sperme i vaginalne tekućine.¹⁰

Međutim, nijedno istraživanje do sada nije uzimalo u obzir sadržaj proteina u slini i značajnost proteina za razlikovanje abnormalnih stanica, vibracije okosnice proteina i regija amid III grupe do rada Buchan E. i suradnika.² Trenutno, u forenzici još nisu u upotrebi potvrdni testovi, specifični za slinu.

U istraživanju Virkler i Lednev, NIR Ramanovom spektroskopijom su odredili heterogenost sasušene sline i razlike između uzoraka sline uzete od različitih donora. Na temelju heterogenog sastava, slina ima jedinstveni spektroskopski potpis po kojem se razlikuje od drugih tjelesnih tekućina poput krvi i sperme. Takvi rezultati doprinose razvoju forenzičke znanosti jer se ovakvom tehnikom, na mjestu zločina se mogu otkriti tragovi sline i razlikovati od ostalih tjelesnih tekućina i drugih umjetnih supstanci.⁴

Istu tezu, da se tjelesne tekućine mogu razlikovati prema Ramanovom spektru su dokazali i Muro i suradnici.⁶ Korak dalje su otišli s radom u kojem su uspješno odredili spol 60 donora sline, primjenom Ramanove spektroskopije i multivarijantne analize podataka. To je do tada, prvo istraživanje u kojem se razlikuje spol osobe primjenom spektroskopskih tehnika.⁵

4. SPEKTROSKOPSKO PROFILIRANJE SLINE

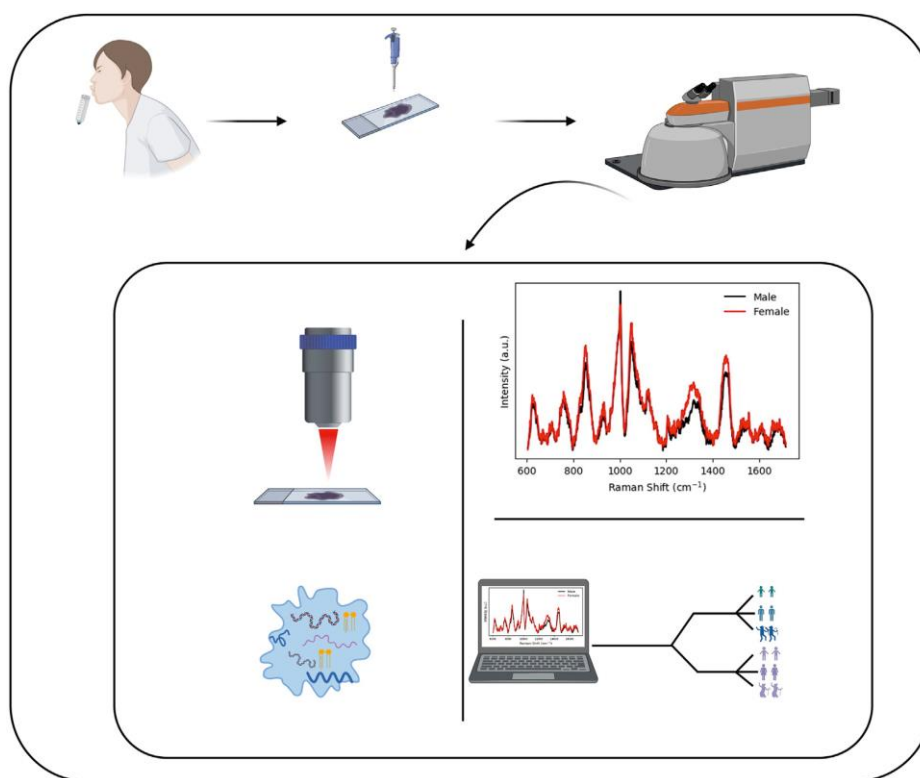
Istraživanje Buchan i suradnika je za cilj imalo profiliranje sline zdravih donora kao funkciju dobi i spoli te prema dobivenim Ramanovim spektrima odrediti kako vrijeme stajanja uzorka utječe na dobivene spektre. Žele se ustanoviti varijabilnosti u uzorcima sline osoba, podijeljene u dvije spolne skupine i tri dobne skupine kako je opisano u tablici 1.²

Tablica 1. Popis donora podijeljenih prema spolu i dobi te broj donora po određenoj dobnoj skupini

Dobne skupine za muške donore:			
DOBNA SKUPINA	20-30	31-55	56+
BROJ DONORA	22	6	4
Dobne skupine za ženske donore:			
DOBNA SKUPINA	20-30	31-55	56+
BROJ DONORA	16	11	11

4.1.1. Prikupljanje uzoraka i priprema uzoraka

Od ukupno 70 donora (32 muških i 38 ženskih osoba) prikupljen je uzorak sline. Početni preduvjet je da je osoba zdrava, da nema nikakvu povijest bolesnih stanja i kroničnih bolesti. Prije uzorkovanja sline, osoba nije smjela konzumirati hranu i piće minimalno 45 minuta prije prikupljanja sline. Kako je poznato da stimulirana slina ima drugačiji sastav sline (manji sadržaj proteina) i manje je viskozna od nestimulirane, slina svakog donora se prikupila metodom pasivnog slinjenja. Približni volumen prikupljene sline je 2 mL koja je sakupljena u roku od 5 minuta. 1 mL sline se centrifugira na mikro-centrifugi 30 minuta, brzinom okretaja od 10 000 g. Odmah nakon centrifugiranja, 5 μ L supernatanta se pipetira na mikroskopsko stakalce prevučeno aluminijskom folijom te se odmah provodi Ramanova analiza. Shema cijelog postupka analize je prikazana na slici 3.²



Slika 3. Prikupljanje uzorka i analiza uzorka sline Ramanovom spektroskopijom²

Parametri Ramanove analize su se optimizirali kako bi se dobio dobar omjer signala i šuma, s minimalnim utjecajem fluorescencije i dobrim odzivom (intenzivni signal u eng. *fingerprint* području). Ramanova analiza se provodila s laserom 785 nm ekscitacijske valne duljine, x50 objektivom, a mapiranje se provodilo na području od 100 μ m x 100 μ m s korakom 1,5 μ m.²

Multivarijantna analiza podataka je odrađena uz pomoć SKiNET, *open source* alata popratnim web sučeljem Raman Toolkit-a za izgradnju SOM modela koristeći set za treniranje. Optimizirani model je naknadno korišten za klasifikaciju prethodno neiskorištenih testnih podataka. Klasifikacija pomoću testnih podataka je ponovljena 10 puta iz zasebnih inicijalizacija SOM-a.²

4.1.2. Obrada rezultata

Uzorci sline zdravih donora, podijeljenih u dvije spolne grupe i tri dobne grupe se analiziraju u nedavno razvijenoj neuronskoj mreži. Svakoj klasi je dodijeljen težinski vektor (eng. *weight vector*) prema slici 4. Što je veći intenzitet svakog signala, to je bitniji za klasni spektralni otisak prsta.

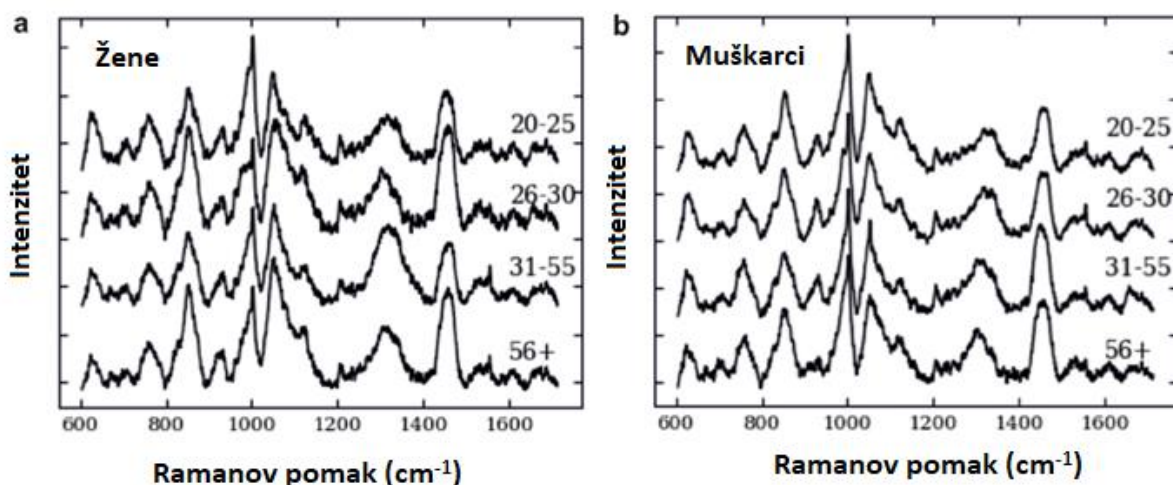
Najznačajniji signali u Ramanovom spektru sline zdravih donora je prikazan u tablici 2.

Tablica 2. Karakteristični signali prepoznati u Ramanovom spektru²

VALNI BROJ (cm ⁻¹)	VIBRACIJA
628	C-C istežanje i C-C uvijanje proteina; tirozin
760	Disajni mod triptofana; proteini
855	C-C; Disajni mod prstena tirozina
930	C-C istežanje aminokiselina (prolin, hidroksiprolin i valin)
960	Vrpca istežanja kalcijevog fosfata, α -zavojnica prolina, valina
1003	Simetrični disajni mod prstena (fenilalanin, triptofan)
1051	C-O i C-N istežanje
1070	HCO ₃
1076	C-C (lipidi) simetrično istežanje fosfata u hidroksiapatitu
1087	vibracija DNK okosnice
1125	C-C istežanje (lipidi); C-N istežanje (proteini)
1205	Amid III; CH ₂ klaćenje i vibracije (glicin, prolin, tirozin i fenilalanin)
1300	Amid III; CH ₂ uvijanje i klaćenje (lipidi i/ili proteini)
1337/1339	CH ₂ /CH ₃ klaćenje i uvijanje (proteini, nukleinske kiseline, lipidi)
1456	CH ₂ i CH ₃ deformacija (proteini i lipidi)
1655	Amid I: C-C istežanje (lipidi); C=O istežanje (proteini)

4.2. Klasifikacija sline prema spolu

Promatrajući spektre, najznačajnije razlike između dva spola je u intenzitetu signala, a ne u pomaku signala po valnom broju. Slina muškog donora ima intenzivnije signale 630, 760 i 1003 cm^{-1} , dok su za ženski spol dobiveni signali na 855 i 1300-1400 cm^{-1} jačeg intenziteta. Manje su razlike uočljive kod signala na 1051 i 1455 cm^{-1} .²



Slika 4. Ramanovi spektri kategoriziran po dobnim skupinama za: a) žene i b) muškarce²

Buchan E. i sur. su uspješno razvili model klasifikacije prema spolu, neovisno o dobi s točnošću od $93 \pm 0,5 \%$.² Uzorci muške i ženske osobe se najviše razlikuju prema signalima dodijeljenim proteinima, lipidima i aminokiselinama.

Fenilalanin je esencijalna aminokiselina koja se nalazi u sekvenci amilaze i lipaze, kojoj je dodijeljen signal na 630 cm^{-1} i povezan je s koncentracijom metabolita. Signal na 1003 cm^{-1} isto pripada fenilalaninu, ali se može pripisati i lizinu, jednom od najzastupljenijih aminokiselina u slini. Taj signal je manjeg intenziteta kod ženskog spola, gdje su identificirani metaboliti sline poput taurina i laktata. Manji pomak signala je vidljiv u amid III regiji (1205-1300 cm^{-1}) što ukazuje na to da se sastav muške i ženske sline razlikuje. Neki od razloga različitosti u sastavu sline su brzina protoka i utjecaj estrogena.

Brzina protoka sline kod žena je značajno sporiji zbog veličine submandibularne žlijezde. Najveći izvor nestimulirane sline jest submandibularna žlijezda, koja je kod žena značajno manja nego kod muškaraca.^{11,12}

Estrogen ima utjecaj na žlijezde slinovnice te je jedan od faktora po kojem se izvor sline može razlikovati prema spolu. Osim protoka sline, zabilježeno da je pH sline manji kod žena nego kod muškaraca. Protok sline je manji kod žena u menopauzi, kada se uspoređuje s ženama koje i dalje dobivaju menstruaciju. Osim toga, razlikuje se i pH vrijednost koja je značajno niža kod žena u menopauzi,¹³ a sama pH vrijednost sline utječe na spektralni izgled sline. Normalni pH je 6-7, ali može varirati između 5,3 (sporiji protok) i 7,8 (brži protok). Jedan od sastojaka sline, odgovoran za održavanje konstantne pH vrijednosti su hidrogenkarbonati, čija koncentracija ovisi o brzini protoka sline. Kada je brži protok i koncentracija bikarbonata je veća pa s time i pH vrijednost sline raste. Hidrogenkarbonati imaju signal u Ramanovom spektru na 1070 cm^{-1} te je intenzitet tog signala jači kod muškaraca nego kod žena, kao posljedica bržeg protoka i više pH vrijednosti.²

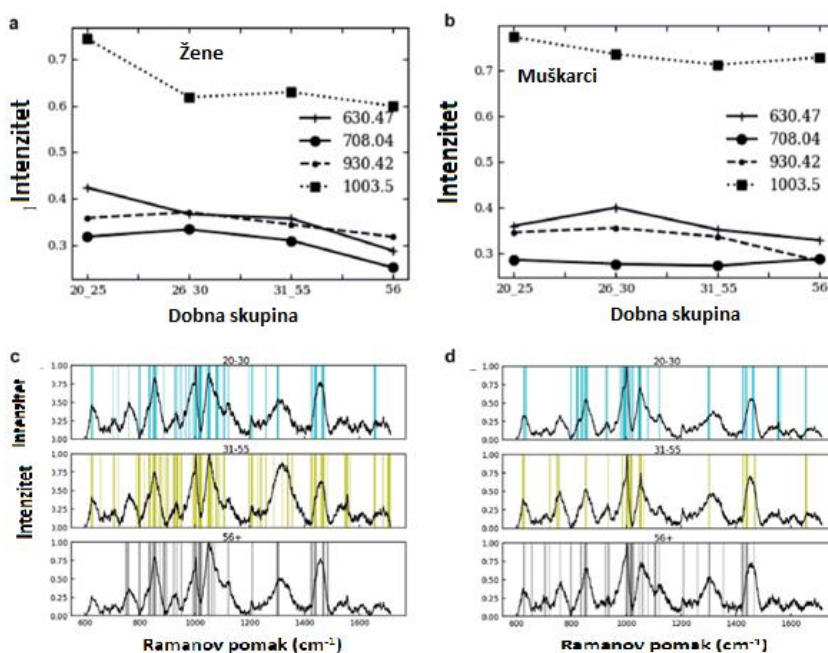
U radu Muro i sur., koji su jednakom analitičkom tehnikom, Ramanovom spektroskopijom profilirali slinu prema spolu, dodatno je zabilježeno da promjena koncentracije hormona estrogen, progesteron i testosteron u spektrima nije zabilježena. Stoga, razlikovanje spolova preko sline se uočava jedino prema sadržaju gore spomenutih proteina i amino kiselina.⁵

4.3. Klasifikacija sline prema dobi

Rad na kojem je temeljen ovaj seminar pokazao je da je moguće identificirati dob osobe koristeći Ramanovu spektroskopiju analizirajući slinu muškaraca i žena.²

Kako je vidljivo na slici 5., koja prikazuje varijacije intenziteta 4 najdominantnija signala kao funkciju dobi, najveće promjene su za 56+ kategoriju, posebice za ženske osobe. Za slinu ženskih donora, jasna je razlika prema dobnim skupinama (tablica 1.), određena s točnošću od $70\pm 1,2\%$. Iz slike je vidljivo da je najrazličitija dobna skupina, po tome i najprepoznatljivija od 56+ godina po intenzivnijim signalima na 1076 , 1455 i 855 cm^{-1} . Mlađe dobne skupine za ženske spektre se raspoznaju po smanjenom intenzitetu na 1300 - 1400 cm^{-1} i jačem intenzitetu signala na 1003 , 630 , 760 cm^{-1} . Slično tome, najveće razlike kod muških donora, za dobnu skupinu +56 se vidi prema

intenzivnijim signalima na 1455, 1051 i 855 cm^{-1} . Za mlađe dobne skupine, vidljiv je pomak signala u području 1200-1300 cm^{-1} do 1300-1375 cm^{-1} .²



Slika 5. Varijacije u spektrima sline za a) žene i b) muškarce²

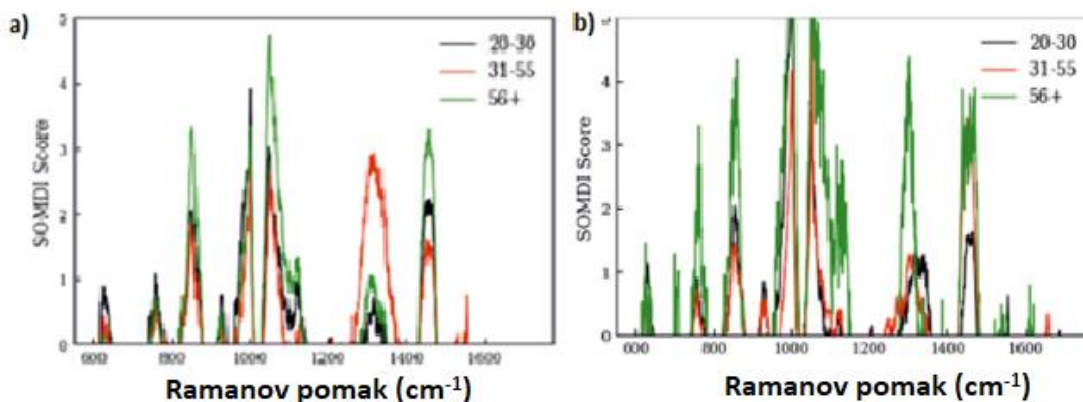
Najzastupljenije aminokiseline u slini su lizin (1003 cm^{-1}) i glicin (1327 cm^{-1}), a njihova se koncentracija povećava s godinama.

Kako se vidi na slici 5., smanjuje se intenzitet signala na 630 cm^{-1} i 1003 cm^{-1} sa starenjem osobe što je povezano s opadanjem brzine proizvodnje sline kod starije populacije čime i opada koncentracija aminokiselina u slini.¹⁴ S godinama dolazi do opadanja protoka sline (nestimulirane i stimulirane) iz sublingvinalne i submandibularne žlijezde.¹⁵

Signal 1003 cm^{-1} se može pripisati aminokiselini fenilalaninu. Jedna od najzastupljenijih vrsta u slini jest amilaza. Signal na 1003 cm^{-1} većeg je intenziteta kod mlađe populacije, do 30 godina nego kod starije od 56 godina.²

Također je pokazano da se i koncentracija proteina mijenja s godinama. Prosječna koncentracija proteina se smanjuje za otprilike 0,5 mg/mL kada se promatraju dobne skupine od 20-30 godina i

56+ godina. Čak se vidi i razlika među spolovima; žene proizvode veće koncentracije proteina od muškaraca, a razlika može biti i do 0,46 mg/mL. Proteini manje molekulske mase (staterin, histatin i cistin) su pronađeni u slini populacije mlađe dobne skupine, ali ne i kod starijih osoba.²



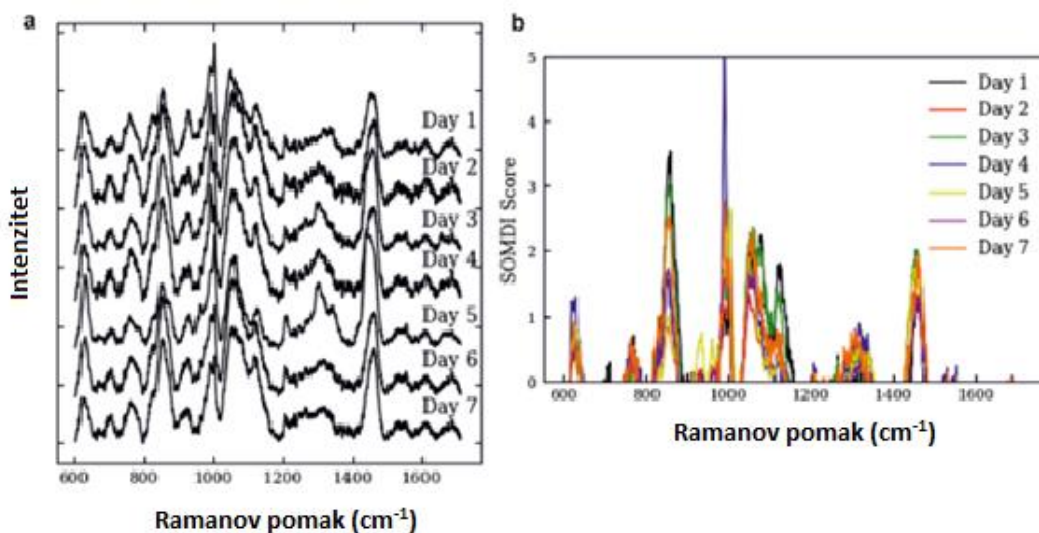
Slika 6. Varijacije u spektrima sline a) ženski donori i b) muški donori²

Slika 6. prikazuje Ramanove spektre u različitim bojama koje označavaju različite dobne skupine na kojima se jasno vide razlike u intenzitetima pojedinih vrpca u ovisnosti o dobi. Razlike u intenzitetu vrpca na 930 i 1200 cm^{-1} , autori ovog rada su pripisali u smanjenju izlučivanja sline.

U radu Xu F., Laguna L. i Sarkar A., opisane su fiziološke promjene žlijezda slinovnica koje se potencijalno očituju opisanim promjenama u gore navedenim Ramanovim spektrima. Slinu izlučuju tri žlijezde slinovnice; parotidna, sublingvinalna i submandibularna žlijezda, a žlijezde su sastavljene od triju vrsta stanica; duktalne, acinarne i mioepitelne stanice. Kod starijih osoba, razlog sporijeg izlučivanja sline jest i gubitak acinarnih stanica koji je glavni uzročnik suhoće usne šupljine. Iako je broj kanala u žlijezdama ostao jednak, dolazi do gubitka acinarnih stanica, povećanja masnog tkiva i neurofiziološkog propadanja što uzrokuje hipofunkciju žlijezda slinovnica.¹⁰ S godinama dolazi i do smanjenja broja okusnih receptora i smanjena neurološka stimulacija sline (manje je transmitera koji djeluju na receptore).¹⁶

4.4. Vremenski utjecaj na sastav sline

Kako bi se vidjelo utječe li stajanje uzorka sline na sastav sline i posljedično tome na spektre sline, slina muške osobe, dobne skupine 20-30 godina se skladištila 7 dana u nepropusni kutijama za pohranu satnih stakalaca. Slika 7. prikazuje Ramanove spektre sline snimljenog nakon svakog dana skladištenja.



Slika 7. Dobiveni Ramanovi spektri snimljeni tijekom 7 dana skladištenja, označeni različitim bojama²

Kako je vidljivo, promjene nisu velike, ali su detektirane, ponajviše u amid III regiji. Najveće promjene su vidljive na vpci na 855 cm^{-1} i 1458 cm^{-1} , koje pripadaju tirozinu. Međutim, rezultati ove istraživačke grupe su pokazali da su uzorci sline stabilni nakon 7 dana od uzorkovanja što je dodatna prednost sline kao medija za analize.²

5. ZAKLJUČAK

Ramanova spektroskopija je vrlo atraktivna metoda za upotrebu u forenzici jer ne zahtijeva veliku količinu uzorka niti komplicirane metode pripreme uzorka, a razvojem današnjih instrumenata omogućena je i prenosivost instrumenta na teren, pa i na samo mjesto zločina. Iako slina nije često upotrebljavana tjelesna tekućina za identifikaciju kao krv, ona ima mnoge prednosti u odnosu na krv. Lako uzorkovanje koje ne zahtijeva invazivne metode uzorkovanja niti stručnost osoblja, sadržaj većine molekule kao krv, a ne dolazi do narušavanja kvalitete uzorka s vremenom kao što je slučaj s krv. Rad na kojem je temeljen ovaj seminar je dokazao da se na temelju 1 mL uzorka sline može raspoznati osoba po spolu, ali i po dobnoj skupini u kojoj se nalazi. Vrpce u Ramanovom spektru se razlikuju po pomicanju vrpce po valnim brojevima ili promjeni širine vrpce. Veći je broj istraživanja povezalo promjene u proteinskom sastavu sline s dobnim skupinama, nego što su se istražile spolne razlike prema uzorku sline. U radu Buchan E. i sur., uspješno je napravljen model s točnošću od $93 \pm 0,5$ % prema kojem se može klasificirati slina prema spolu donora. Kao glavne razlike se spominju protok, koji je manji u žena i pH vrijednost koji je također manji u žena. Iako se spolne razlike najviše očituju prema spolnim hormonima, varijacija u njihovoj koncentraciji nije zabilježena u slini pa se spolne razlike najviše očituju u varijaciji proteina, aminokiselina i lipida.

Model raspoznavanja sline prema dobnoj skupini razvijen je s točnošću od $70 \pm 1,2$ %. S godinama dolazi do smanjenja lučenja sline, ali i do gubitka acinarnih stanica, koje grade žlijezde slinovnice, a posljedično mogu uzrokovati suhoću usne šupljine.

Međutim, različita istraživanja su dala različite rezultate poveznice dobi i koncentracije amilaze u slini. Stoga se tijekom pregleda literature može naići na oprečna mišljenja o ovisnosti o godinama osobe, ali i različite interpretacije kako starost osobe utječe na koncentraciju amilaze u slini.

Slina je stabilan medij analita te je pokazano da se može skladištiti do 7 dana bez gubitka, ali uz neke manje promjene u amid III regiji proteina.

6. LITERATURA

1. Salarić I. (2019) Određivanje koncentracije melatonina u slini oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet
2. Buchan E. i sur., Spectroscopic molecular-fingerprint profiling of saliva, *Analytica Chimica Acta*, **1185** (2021) 339704
3. Li X., Yang T., Lin J., Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surfac enhanced Raman spectroscopy, *J. Biomed. Opt.* **3** (2012) 1-5
4. Virkler K., Lednev I. K., Forensic body fluid identification: The Raman spectroscopic signature of saliva, *Analyst*, **135** (2010) 512–517
5. Muro C. K., Fernandes L., Lednev I. K., Sex Determination Based on Raman Spectroscopy of Saliva Traces for Forensic Purposes, *Analytical Chemistry*, **88** (2016) 12489–12493
6. Muro C.K., Doty K.C., De L., Fernandes S., Lednev I.K., Forensic body fluid identification and differentiation by Raman spectroscopy, *Forensic Chem.* **1** (2016) 31-38
7. Muro C.K., Lednev I. K., Identification of individual red blood cells by Raman microspectroscopy for forensic purposes: in search of a limit of detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* volume **409** (2017) 287–293
8. 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) 35-44
9. Percival, P.; Challacombe, S.; Marsh P., Flow Rates of Resting Whole and Stimulated Parotid Saliva in Relation to Age and Gender. *J. Dent. Res.*, **73** (1994), 1416–1420
10. Xu F., Laguna L., Sarkar A., Aging-related changes in quantity and quality of saliva: where do we stand in our understanding? , *Journal of Texture Studies* **50** (2019) 27-35
11. Inoue H. i sur., Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes, *Archives of Oral Biology* **51** (2006) 1055-1060
12. Cydejko A. i sur., Selected physicochemical properties of saliva in menopausal women-a pilot study, *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17** (2020) 1-8

13. Rukmini J.N. i sur., Effect of menopause on saliva and dental health, *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* **8** (2018) 529-533
14. Yeh C.K., Johnson D.A., Dodds M.W.J., Impact of aging on human salivary gland function: a community-based study, *Aging Clin. Exp. Res.* **10** (1998) 421-428
15. Affoo, R.H. i sur., Meta-analysis of salivary flow rates in young and older adults. *Journal of the American Geriatrics Society* **63** (2015) 2142-2151
16. Ekström, J., Khosravani, N., Castagnola, M., Messina, I. (2017) Saliva and the control of its secretion, u knjizi: *Dysphagia Medical Radiology*, Springer Berlin Heidelberg, Editors: Olle Ekberg, 1-37 (dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/263657111_Saliva_and_the_Control_of_Its_Secretion, 15.5.2022.)