УДК 616:31-02-001/-009-003
DOI https://doi.org/10.32782/2786-7684/2025-2-12

Лешко Мирослав Михайлович,
аспірант кафедри стоматології післядипломної освіти,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0009-0005-5441-6292
м. Ужгород, Україна

Китастий Олексій Ігорович,
аспірант кафедри стоматології післядипломної освіти,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
ORCID ID: 0009-0009-2041-3359
м. Ужгород, Україна

Обґрунтування використання методів метаболоміки в стоматології

Вступ. Оміксні технології (*omics*) – комплекс сучасних технологій в молекулярній біології та біоінформатиці. Метаболоміка – наука, котра спеціалізується на всебічному вивченні метаболічних реакцій для систематичної характеристики метаболітів людського тіла**.** Omix наступного покоління реалізує підхід до клінічних робочих процесів, таким чином надаючи підказки для розробки та перепрофілювання фармацевтичних продуктів

Мета дослідження. Провести аналіз літературних джерел щодо використання методів метаболоміки для діагностики стану норми та захворюваності основними стоматологічними захворюваннями.

Результати. Проведений пошук наукових досліджень, котрі містяться в базах даних PubMed, Scopus, Web of Science та Google Scholar та стосується ідентифікації метаболітів та білків слини, котрі пов'язані з ризиком утворення та прогресування основних стоматологічних захворювань. Метаболоміка дає можливості не лише для визначення метаболому людини, а й визначає інформація про взаємодію метаболітів та вплив фармакологічних препаратів на рівні метаболітів (фармакометаболоміка), що можуть застосовуватися в харчуванні, біохімії, клінічній хімії, клінічній генетиці та медицині.

Висновки. Досягнення останніх років, котрі присвячені результатів використання методів метаболоміки для діагностики стану норми та захворюваності основними стоматологічними захворюваннями є досить поширеними. Розширення діапазону їх затосування дозволить уніфікувати алгоритми доклінічної діагностики таких поширени захворювань як карієсна хвороба та захворювання тканин пародонта серед населення

Ключові слова: стоматологія, оральний мікробіом, кислотостійкість, карієсогенний ризик, карієс зубів, метаболоміка (OMICS).

Leshko Myroslav Mykhaylovych, Postgraduate Student at the Department of Dentistry of Postgraduate Education, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0009-0005-5441-6292, Uzhhorod, Ukraine

Kytastyi Oleksii Ihorovych, Postgraduate Student at the Department of Dentistry of Postgraduate Education, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0009-0009-2041-3359, Uzhhorod, Ukraine

Justification of the use of metabolomics methods in dentistry

Introduction. Omics technologies (omics) are a complex of modern technologies in molecular biology and bioinformatics. Metabolomics is a science that specializes in the comprehensive study of metabolic reactions for the systematic characterization of metabolites in the human body. Next-generation Omix implements an approach to clinical workflows, thus providing insights for the development and repurposing of pharmaceutical products.

The aim of the study. To conduct an analysis of literary sources regarding the use of metabolomics methods for the diagnosis of the normal state and incidence of major dental diseases.

The results. A search was conducted for scientific studies contained in PubMed, Scopus, Web of Science and Google Scholar databases and related to the identification of salivary metabolites and proteins associated with the risk of development and progression of major dental diseases. Metabolomics provides opportunities not only to determine the human metabolome, but also determines information about the interaction of metabolites and the effect of pharmacological drugs on the level of metabolites (pharmacometabolomics), which can be used in nutrition, biochemistry, clinical chemistry, clinical genetics and medicine.

Conclusion. The achievements of recent years, which are devoted to the results of the use of metabolomics methods for the diagnosis of the normal state and incidence of major dental diseases, are quite common. Expanding the range of their application will allow unifying algorithms for preclinical diagnosis of such common diseases as caries and periodontal tissue diseases among the population

Key words: dentistry, oral microbiome, acid resistance, cariogenic risk, dental caries, metabolomics (OMICS).

Вступ. Оміксні технології (*omics*) – комплекс сучасних технологій в молекулярній біології та біоінформатиці, наприклад: геноміка, транскриптоміка, епігеноміка, епітранскриптоміка, протеоміка, метаболоміка, метагеноміка та інші. Завдяки застосуванню оміксних технологій можливо вивчення організм в цілому та його частин на різних рівнях, починаючи з найглибшого – рівня ДНК. Серед оміксних технологій протеоміка та метаболоміка, котрі більш поглиблено описують потреби персоналізованої медицини, зважаючи на біологічну мінливість під дією факторів навколишнього середовища та відіграють важливу роль у здоров'ї та хворобах. Omix наступного покоління реалізує підхід до клінічних робочих проце-

сів, таким чином надаючи підказки для розробки та перепрофілювання фармацевтичних продуктів [1].

Метаболоміка – наука, котра спеціалізується на всебічному вивченні метаболічних реакцій для систематичної характеристики метаболітів людського тіла. Метаболом є найкращим показником фенотипу організму. Вішарт зазначає, що в геномі людини є 3 мільярди пар основ, проте в людському організмі міститься від 3000 до 100 000 маломолекулярних метаболітів, що є проблематичним для метаболомічних досліджень. Зважаючи на перспективність галузі «омічних» дисциплін, таких як метаболоміка, їх інтеграція в системну біологію наділить клініцистів новими потужними аналітичними технологіями, котрі забезпечать розвиток чотирьох новітніх напрямків: нанотехнологій, прогностичної медицини, нутрицевтики та регенеративної медицини [2].

Мета дослідження. Провести аналіз літературних джерел щодо використання методів метаболоміки для діагностики стану норми та захворюваності основними стоматологічними захворюваннями.

Проведений пошук наукових досліджень, котрі містяться в базах даних PubMed, Scopus, Web of Science та Google Scholar та стосується ідентифікації метаболітів та білків слини, котрі пов'язані з ризиком утворення та прогресування основних стоматологічних захворювань

Науковці Farooq SU, Kishor K, зі співав. зазначають, що метаболоміка – це нова перспективна галузь, котра направлена на відкриття ліків та біомаркерів, забезпечуючи новий підхід до взаємозв'язку між фізіологічними процесами та параметрами, що на них впливають; базується на досягненнях органічної хімії та біохімічному контексті та розумінні клітинних процесів. В метаболоміці використовують аналітичні та обчислювальні технології, що дозволяє характеризувати та ідентифікувати молекули. Проте, з урахуванням складності метаболома та різноманітності властивостей метаболітів неможливо застосувати уніфіковану аналітичну платформу для виявлення всіх метаболітів у біологічному зразку, що створює потребу у використанні комбінованих сучасних інструментальних аналітичних підходів, зокрема, газова хроматографія, МС- та ЯМР-спектроскопія, що дає змогу отримати ідеальні результати в розділенні, виявленні, характеристиці та кількісному визначенні метаболітів і метаболічних шляхів [3].

Основні стоматологічні захворювання, такі як карієс зубів та захворювання пародонту безпосередньо пов'язані з трансформацією симбіотичної мікробіоти порожнини рота в дисбіотичну, що призводить до незворотніх змін фізико-хімічних параметрів ротової рідини. Метою досліджень Lochman J, Zapletalova M, та співав. слугувала розробка чутливого, швидкого та разом з тим економічно доступного методу ідентифікації та кількісного визначення карієсогенних бактерій та пародонтопатогенів порожнини рота. Використовували мультиплексний ПЛР-метод у реальному часі для виявлення та кількісного визначення співвідношення 10 видів бактерій, карієсогенного комплексу; червоного та оранжевого комплексу пародонтопатогенів та окремо *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Загалом дослідували 60 зразків від 30 дітей віком 2–6 років з діагностованим клінічно раннім дитячим карієсом та гінгівітом. Також визначали кількісне визначення загального вмісту бактерій. Дослідники виявили вірогідну різницю між мікробними композиціями, отриманими з контрольної ділянки та уражених зубів ($p < 0,05$). Тест рекомендовано застосовувати для визначення ризику виникнення та прогресування карієсу або запалення тканин пародонту, а також використовувати як інструмент поведінкового втручання і, таким чином, профілактики основних стоматологічних захворювань [4].

Біоплівка – це спільнота мікробів, вбудовані в позаклітинний матрикс, котра зафіксована на твердій поверхні на межі двох середовищ, утворюючи при цьому високоорганізовану структуру, яка викликає в стоматології карієс зубів. Порушення дієти при вживанні цукрів, котрі підживлюють появу патогенів, складання матриці та підкислення мікрооточення біоплівки, сприяючи екологічним змінам і узгодженим зусиллям багатьох видів, які сприяють кислотному пошкодженню мінералізованої тканини зуба. Bowen WH, Burne RA, та співав. досліджували матрикс оральних біоплівок та взаємодії між умовно-патогенними мікроорганізмами та коменсалами в патогенезі карієсу зубів. Автори дослідили важливість організмів, що виробляють матрицю, у створенні патогенного середовища існування, де відбувається міжвидова конкуренція та синергія, щоб стимулювати процес захворювання, що може мати наслідки для інших інфекцій, пов'язаних з полімікробними біоплівками [5].

Для дослідження бактеріального складу та метаболоміки зубного нальоту у 40 шведських підлітків, у 20 із карієсом та 20 без карієсу були взяті зразки над'ясенних зубних відкладень, котрі тестували *ex-vivo* на кислотостійкість, частку бактерій, стійких до дії кислот оцінювали за допомогою конфокальної мікроскопії та фарбування, з подальшим кількісним вивченням утворених метаболітів за допомогою ядерного магнітного резонансу, проте вірогідних відмінностей не виявили. З метою характеристики бактеріального складу зразків виділяли ДНК та секвеновали ген 16S рРНК за допомогою секвенування Illumina. Бактеріальний склад, зокрема, *Abiotrophia*, *Prevotella* та *Veillonella* були виявлені у значно вищих рівнях у осіб з карієсом (p=0,0085, 0,026 та 0,04 відповідно), а *Rothia* та *Corynebacterium* у значно вищих рівнях у осіб без карієсу (p=0,026 та 0,003). *Streptococcus mutans* був виявлений на низьких частотах і був відсутній у 60% осіб з карієсом. Автори визначили, що для при створенні прогностичної моделі карієсу у підлітків. необхідні принаймні 4 види або 9 родів бактерій. Метаболомічний профіль, отриманий за допомогою ЯМР, показав значне скупчення органічних кислот зі специфічними бактеріями осіб з карієсом, та виявлено значну кількість етанолу та ізопропанолу з бактеріями, пов'язаними з *Rothia* або *Corynebacterium*. Також виявлені взаємозв'язки сполук, зокрема, співвідношення етанол-лактат або сукцинат-лактат, котрі безпосередньо пов'язані з толерантністю до кислоти та мають прогностичну цінність щодо ризику утворення карієсу. Автори стверджують, що

майбутні дослідження ризику карієсу повинні базуватися не лише на наявності потенційних мікробних біомаркерів, а й їх функціональної адаптації та метаболічного результату [6, 7].

В дослідженнях Dieterle F, Ross A, та співав. показано, що інтегральна нормалізація є оптимальним методом нормалізації спектрів метабономічних досліджень як методу попередньої обробки у сфері метабономії, з урахуванням розведення зразків шляхом масштабування спектрів до запрограмованої загальної концентрації. Автори представили результати нормалізації ймовірнісного коефіцієнта, метод базується на обчисленні найбільш ймовірного коефіцієнта розведення шляхом розгляду частки амплітуд досліджуваного спектру на частки еталонного спектру. Змодельовані спектри при метабономічному дослідженні 4000 зразків контрольних тварин демонструють, що нормалізація ймовірнісного коефіцієнта є набагато надійнішою та точнішою, ніж широко поширена інтегральна нормалізація та нормалізація довжини вектора [8].

У 2007 році вперше була створена метаболомна база даних, яка містить вичерпну інформацію про метаболіти людини разом із їх біологічними ролями, фізіологічними концентраціями, асоціаціями захворювань, хімічними реакціями, метаболічними шляхами та еталонними спектрами. Наступне оприлюднення метаболомної бази відбулося у 2018 році, в якому кількість повністю анотованих метаболітів зросла майже втричі, кількість експериментальних спектрів зросла майже в чотири рази, а кількість проілюстрованих метаболічних шляхів зросла майже в 60 разів. База включає велику кількість прогнозованих MS/MS і GC-MS еталонних спектральних даних, а також прогнозованих (фізіологічно можливих) структур метаболітів для полегшення ідентифікації нових метаболітів. Цікавою є додана інформація про взаємодію метаболітів та вплив фармакологічних препаратів на рівні метаболітів (фармакометаболоміка), дані бази даних можуть застосовуватися в харчуванні, біохімії, клінічній хімії, клінічній генетиці, медицині та метаболомії [9].

Дослідження Rosier BT, Buetas E, та співав. присвячені впливу нітратів слини на мікробіом порожнини рота. Зібрану слину 12 здорових донорів використали для вирощування біоплівок in vitro з 6,5 мМ нітрату та без нього, оцінювали рівень амонію, лактату та pH, та проводили секвенування гена 16S рРНК Illumina. Нітрат не вплинув суттєво на ріст біоплівки, проте зменшив виробництво лактату, підвищив виробництво амонію та pH. Спостерігалися вищі рівні нітрат-відновлювальних родів Neisseria та Rothia, та зниження наступних родів, пов'язаних із карієсом, таких як Streptococcus, Veillonella та Oribacterium та асоційовані з пародонтитом родів Porphyromonas, Fusobacterium, Leptotrichia, Prevotella та Alloprevotella. Отже, нітрати до оральних середниках призводять до швидкої модуляції складу та активності мікробіому, що посилює еубіоз та зменшує дисбіоз. Таким чином, нітрат слід досліджувати як потенційний пребіотик для здоров'я порожнини рота [10].

Nascimento MM, Zaura E та співав в проведеному аналітичному дослідженні обґрунтували застосування нових підходів до використання методів OMICS, що дозволить колективно оцінювати кілька пов'язаних біологічних одиниць, включаючи гени, експресію генів, білки та метаболіти, що забезпечило більшу глибину існуючих гіпотез, а також нове розуміння етіології карієсу зубів. Зокрема, визначення повних бактеріальних мікробіомів порожнини рота при порівнянні з аналізом орального метатранскриптому та метаболома підтверджує точку зору про дисбактеріоз над'ясенних біоплівок. Також дослідження метаболомів відіграли важливу роль у розкритті внеску основних шляхів центрального метаболізму вуглецю та амінокислот у гомеостаз pH біоплівки. Було ідентифіковано нові, часто некультивовані, пероральні стрептококи, їх фенотипова характеристика виявила кандидатів для пробіотичної терапії. Хоча чітких алгоритмів проведення такого роду досліджень дотепер не створено. В майбутньому очікується, що дослідження OMICS сприятиме відкриттю нових біомаркерів карієсу та розробці діагностики та терапії нового покоління для контролю карієсу та вивчення інших захворювань порожнини рота [11].

Іншим предиктором ризику розвитку карієс науковці Nascimento MM, Alvarez AJ, та співав. вважають аргінін. Було проведене когортне дослідження 79 дітей від 2 до 7 років щодо вивчення взаємозв'язок між активністю ADS та змінами бактеріального профілю над'ясенних біоплівок із карієсом у дітей з часом. Виділені групи без карієсу, з карієсом емалі та дентину окремо. Активність ADS бляшок вимірювали шляхом моніторингу виробництва цитруліну з аргініну та порівнювали з таксономічними профілями рибосомальних 16S рРНК для тих самих зразків. Встановлено, що існує позитивна кореляція між активністю карієсу та низькою аргінолітичною здатністю над'ясенних оральних біоплівок дітей та поверхонь зубів з часом. Вимірювання метаболізму аргініну за допомогою ADS може бути корисним для диференціації ризику карієсу в окремих осіб і поверхонь зубів.Результати цього дослідження підтверджують розробку нових стратегій оцінки ризику карієсу та профілактики на основі модуляції вірулентності мікробіому ротової порожнини через метаболізм аргініну в над'ясенних біоплівках [12].

Зважаючи на те, що дисбіотичний стан є ключовим фактором у виникненні захворювань порожнини рота, розуміння здоров'я порожнини рота, меж здорової екосистеми порожнини рота та екологічного зсуву в бік дисбактеріозу все ще обмежене. Zaura E, Brandt BW. Та співав. описали екобіологічну гетерогенність екосистеми слини та зв'язки між мікробіомом слини, метаболомом слини та пов'язаними з хазяїном біохімічними параметрами слини у 268 здорових дорослих після нічного голодування. Спостерігалися гендерні відмінності в мікробіомі та метаболомі, які були пов'язані з pH слини та споживанням білка в їжі. При аналізі індивідуумів згрупували в п'ять кластерів на основі мікробіомів та чотирьох метаболомів, які прямо пов'язані з біохімічними параметрами слини. Результати свідчать про те, що низький pH слини та висока активність лізоциму пов'язані з високою часткою стрептококових філотипів та збільшенням продуктів розпаду мембранних ліпідів. Зразки з високим pH слини показали підвищену активність хітинази, більшу кількість видів Veillonella

та Prevotella та вищі рівні продуктів бродіння амінокислот, що свідчить про протеолітичну адаптацію. Надмірна спеціалізація в бік протеолітичного або сахаролітичного екотипу може вказувати на зрушення в бік дисбіотичного стану. Їхнє прогностичне значення та ступінь зв'язку цих екотипів із підвищеним ризиком захворювання ще належить визначити [13].

В дослідженнях Ferrer MD, Pérez S. та співав. проведено оцінку клінічних, біохімічних та мікробіологічних маркерів карієсу зубів у 75 добровольців дорослого віку, в котрих вивчали наявність карієсу, нальоту та визначені індекси гінгівіту. Нестимульоване виділення слини, pH, лактат, *Streptococcus mutans* і *Streptococcus dentisani* вимірювалися в зубних слини та нальоту до та після промивання розчином цукру. Було виявлено, що лактат у зубному нальоті суттєво пов'язаний з віком, статтю, частотою чищення зубів, наявністю каріозних порожнин та індексом нальоту. Рівні *S. dentisani* в зубному нальоті значно збільшувалися з частотою чищення зубів. Після промивання цукристим розчином відсоток рівнів *S. mutans* у зубному нальоті був вищим у пацієнтів із рівнем молочної кислоти > 350 мг/л. Частота чищення зубів була фактором, який найбільше асоціювався зі здоров'ям порожнини рота. У жінок клінічні та біохімічні показники відображені краще, ніж у чоловіків. Низький pH та високий рівень молочної кислоти асоціюються з високим рівнем карієсу. Цікавим є факт відсутності зв'язку між рівнем бактерій та індексом карієсу [14].

Дослідження Dawes C. стосуються оцінці швидкості та складу слини, що вироблена привушною залозою та загальна нестимульована та стимульована. Оцінювали середній рівень, амплітуду, акрофазу та період. Нестимульована цільна слина показала значні циркадні ритми швидкості потоку та концентрації натрію та хлориду, але не білка, калію, кальцію, фосфату чи сечовини. Стимульована привушна слина показала значні циркадні ритми в концентраціях білка, натрію, калію, кальцію та хлориду, але не у фосфаті чи сечовині. Температура в ротовій порожнині показала циркадний ритм, який, як і ритми виділення слини, мав періодичність 24 години [15, 16].

Окрім того, науковці Gomar-Vercher S, Simón-Soro A, та співав порівняли склад мікробіоти порожнини рота між двома різними зразками слини, зібраними одночасно: нестимульованою слиною з паперовими точками та стимульованою слиною, зібраною після жування парафінової гумки. Виділено ДНК зі зразків слини десяти осіб, з їх подальшим аналізом за допомогою піросеквенування 16S рРНК для опису різноманітності бактерій. Отримано значні відмінності між мікробіотою цих двох видів слини. Було виявлено, що стимульована слина містить приблизно в три рази більше видів, ніж нестимульована слина, бактеріальний склад на рівні класу та роду радикально відрізнявся між обома типами зразків. У порівнянні з іншими нішами ротової порожнини обидва типи слини показали певну схожість зі слизовою оболонкою язика та щік, але вони зовсім не корелюють із бактеріальним складом, описаним у над- чи під-ясеневому зубному нальоті, що ставить під сумнів їх використання в етіологічних та епідеміологічних дослідженнях. захворювання ротової порожнини мікробного походження [17].

Mutahar M, Carpenter G, та співав. дослідили вплив набутої плівки емалі на утворення кислотної ерозії та на процес розм'якшення емалі. В нормі тонкий білковий шар, що утворюється з природної слини на поверхні зубів, захищає від ерозивного зношування, проте дотепер не відомі компоненти слини, відповідальні за такий захист. Оцінювали три розчини, що містять різні компоненти: білки та іони – природна слина (NS), мінерали без білків -штучна слина (AS) та деіонізована вода (DW). Зразки емалі піддавали дії лимонної кислоти з подальшим зануренням у відповідний розчин на 24 години. Після п'яти циклів занурення вимірювали середню висоту сходинки за допомогою безконтактного профілометра, середню мікротвердість поверхні за допомогою приладу для вимірювання мікротвердості Кнупа та шорсткість і двовимірні профілі за допомогою атомно-силової мікроскопії. Значення порівнювали з вихідними. Результати: Група зразків з натуральної слиною мала вірогідно меншу втрату тканин, та більшу зміну мікротвердості, ніж решта груп. Зразки в натуральній слині були м'якшими та шорсткішими, але менш ерозивними [18].

Мікро- та макрохімічні елементи мають вирішальне значення для фізіологічного функціонування клітин, і їх зміни в біологічних рідинах можуть бути пов'язані з основним патологічним станом. Дослідження Alqahtani AA, Alhalabi F, та співав присвячені аналізу опубліковану літературу щодо застосування іономіки слини для діагностики карієсу в базах даних PubMed, EMBASE, Web of Science і Scopus. Було проведено аналіз хімічних елементів слини, які суттєво відрізнялися між суб'єктами з карієсної хворою та без неї. Було включено 34 дослідження за участю 2299 суб'єктів з карієсом та 1669 суб'єктів без карієсу, віком від 3 до 64 років у понад 16 країнах. Мета-аналіз виявив статистично значущу різницю у рівнях кальцію, фосфору, хлориду, магнію, калію, натрію та цинку в слині між суб'єктами з карієсом та без, лише іони цинку та хлориду виявилися значно вищими та сталими. Суперечливі результати спостерігалися для всіх інших хімічних елементів слини, включаючи іони алюмінію, брому, кальцію, міді, фтору, заліза, калію, магнію, марганцю, натрію, аміаку, нітриту, нітрату, фосфору, свинцю, селену та сульфату [19].

Висновки. Досягнення останніх років, котрі присвячені результатів використання методів метаболоміки для діагностики стану норми та захворюваності основними стоматологічними захворюваннями є досить поширеними. Розширення діапазону їх затосування дозволить уніфікувати алгоритми доклінічної діагностики таких поширених захворювань як карієсна хвороба та захворювання тканин пародонта серед населення.

REFERENCES

1. Ukrainian Wikipedia. Available from: https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9E%D0%BC%D1%96%D0%BA%D1%81%D0%BD%D1%96_%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%97

2. D'Alessandro A, Giardina B, Gevi F, Timperio AM, Zolla L. Clinical metabolomics: the next stage of clinical biochemistry. Blood Transfus. 2012 May;10 Suppl 2(Suppl 2):s19-24. doi: 10.2450/2012.005S. PMID: 22890264; PMCID: PMC3418628.

3. Farooq SU, Kishor K, Sharma A. Metabolomics: a radical approach to molecular study. Journal of Livestock Science. 2013;14:35-40 doi: 10.33259/JLivestSci.2023.35-40

4. Lochman J, Zapletalova M, Poskerova H, Izakovicova Holla L, Borilova Linhartova P. Rapid Multiplex Real-Time PCR Method for the Detection and Quantification of Selected Cariogenic and Periodontal Bacteria. Diagnostics (Basel). 2019 Dec 22;10(1):8. doi: 10.3390/diagnostics10010008. PMID: 31877891; PMCID: PMC7168300.

5. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. Trends Microbiol. 2018 Mar;26(3):229-242. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.008. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29097091; PMCID: PMC5834367.

6. Gronenborn AM, Polenova T. Introduction: Biomolecular NMR Spectroscopy. Chem Rev. 2022 May 25;122(10):9265-9266. doi: 10.1021/acs.chemrev.2c00142. PMID: 35611522.

7. Havsed K, Stensson M, Jansson H, Carda-Diéguez M, Pedersen A, Neilands J, Svensäter G, Mira A. Bacterial Composition and Metabolomics of Dental Plaque From Adolescents. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Jul 30;11:716493. doi: 10.3389/fcimb.2021.716493. PMID: 34395316; PMCID: PMC8362896.

8. Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. Anal Chem. 2006 Jul 1;78(13):4281-90. doi: 10.1021/ac051632c. PMID: 16808434.

9. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, Sajed T, Johnson D, Li C, Karu N, Sayeeda Z, Lo E, Assempour N, Berjanskii M, Singhal S, Arndt D, Liang Y, Badran H, Grant J, Serra-Cayuela A, Liu Y, Mandal R, Neveu V, Pon A, Knox C, Wilson M, Manach C, Scalbert A. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. Nucleic Acids Res. 2018 Jan 4;46(D1):D608-D617. doi: 10.1093/nar/gkx1089. PMID: 29140435; PMCID: PMC5753273.HMDB 4.0.

10. Rosier BT, Buetas E, Moya-Gonzalvez EM, Artacho A, Mira A. Nitrate as a potential prebiotic for the oral microbiome. Sci Rep. 2020 Jul 30;10(1):12895. doi: 10.1038/s41598-020-69931-x. PMID: 32732931; PMCID: PMC7393384.

11. Nascimento MM, Zaura E, Mira A, Takahashi N, Ten Cate JM. Second Era of OMICS in Caries Research: Moving Past the Phase of Disillusionment. J Dent Res. 2017 Jul;96(7):733-740. doi: 10.1177/0022034517701902. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28384412; PMCID: PMC5480809.

12. Nascimento MM, Alvarez AJ, Huang X, Hanway S, Perry S, Luce A, Richards VP, Burne RA. Arginine Metabolism in Supragingival Oral Biofilms as a Potential Predictor of Caries Risk. JDR Clin Trans Res. 2019 Jul;4(3):262-270. doi: 10.1177/2380084419834234. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31039043; PMCID: PMC6572888.

13. Zaura E, Brandt BW, Prodan A, Teixeira de Mattos MJ, Imangaliyev S, Kool J, Buijs MJ, Jagers FL, Hennequin-Hoenderdos NL, Slot DE, Nicu EA, Lagerweij MD, Janus MM, Fernandez-Gutierrez MM, Levin E, Krom BP, Brand HS, Veerman EC, Kleerebezem M, Loos BG, van der Weijden GA, Crielaard W, Keijser BJ. On the ecosystemic network of saliva in healthy young adults. ISME J. 2017 May;11(5):1218-1231. doi: 10.1038/ismej.2016.199. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28072421; PMCID: PMC5475835.

14. Ferrer MD, Pérez S, Lopez AL, Sanz JL, Melo M, Llena C, Mira A. Evaluation of Clinical, Biochemical and Microbiological Markers Related to Dental Caries. Int J Environ Res Public Health. 2021 Jun 4;18(11):6049. doi: 10.3390/ijerph18116049. PMID: 34199794; PMCID: PMC8200118.

15. Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. J Physiol. 1972 Feb;220(3):529-45. doi: 10.1113/jphysiol.1972.sp009721. PMID: 5016036; PMCID: PMC1331668.

16. Keirns BH, Sciarrillo CM, Koemel NA, Emerson SR. Fasting, non-fasting and postprandial triglycerides for screening cardiometabolic risk. J Nutr Sci. 2021 Sep 14;10:e75. doi: 10.1017/jns.2021.73. PMID: 34589207; PMCID: PMC8453457.

17. Gomar-Vercher S, Simón-Soro A, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM, Mira A. Stimulated and unstimulated saliva samples have significantly different bacterial profiles. PLoS One. 2018 Jun 1;13(6):e0198021. doi: 10.1371/journal.pone.0198021. PMID: 29856779; PMCID: PMC5983451.

18. Mutahar M, Carpenter G, Bartlett D, German M, Moazzez R. The presence of acquired enamel pellicle changes acid-induced erosion from dissolution to a softening process. Sci Rep. 2017 Sep 7;7(1):10920. doi: 10.1038/s41598-017-11498-1. PMID: 28883656; PMCID: PMC5589892.

19. Alqahtani AA, Alhalabi F, Alam MK. Salivary elemental signature of dental caries: a systematic review and meta-analysis of ionomics studies. Odontology. 2024 Jan;112(1):27-50. doi: 10.1007/s10266-023-00839-4. Epub 2023 Aug 1. PMID: 37526792