

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Bogdan R. Lisul

PRIMENA OPTOMAGNETNE IMIDŽING
SPEKTROSKOPIJE U BIOFIZIČKOJ
KARAKTERIZACIJI MARGINALNOG I
KARCINOMOM IZMENJENOG TKIVA U USNOJ
DUPLJI

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Bogdan R. Lisul

APPLICATION OF OPTO-MAGNETIC IMAGING
SPECTROSCOPY IN BIOPHYSICAL
CHARACTERIZATION OF MARGINAL AND
CARCINOMA TISSUE IN THE ORAL
CAVITY

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Mentori doktorske disertacije

dr sci Đurica Grga, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

dr sci Milan Petrović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

dr sci Vitomir Konstantinović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

dr sci Lidiya Matija, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet

dr sci Nada Tomanović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr sci Sanja Milutinović-Smiljanić, docent

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

dr sci Aleksandar Kartelj, docent

Univerzitet u Beogradu, Matematički fakultet

Datum odbrane:

Zahvalnica

Posebno se zahvaljujem svom mentoru profesoru Đurici Grgi i tvorcu OMIS metode profesoru Djuri Korugi na pruženoj prilici da svoj naučni rad usavršavam u jednoj tehnološki revolucionarnoj i dinamičnoj oblasti kakva je biomedicinska optika. Na ovom zanimljivom putu naročito me je inspirisala saradnja sa brojnim timovima i ljudima koji su svojim nemezljivim doprinosom učinili da ova disertacija dodirne svaki aspekt, svaki delić neverovatno intrigantnog odnosa koji kao ljudska bića imamo sa fenomenom svetlosti. Timu sa Klinike za maksilofacijalnu hirurgiju na čelu sa svojim mentorom, profesorom Milanom Petrovićem zahvaljujem se na svesrdnoj podršci i pomoći na realizaciji ovog istraživanja, a naročito doktoru Dragu Jelovcu koji mi je svojim znanjem i neprocenjivim savetima pomogao da shvatim kompleksnost i izazove koji se savremenoj medicini nameću u borbi sa oboljenjem kakvo je oralni karcinom. Profesorki Zvezdani Tepavčević i timu sa Odeljenja za opštu i oralnu patologiju dugujem neizmernu zahvalnost na ukazanom vremenu i saznanjima koja su ovom istraživanju dala izuzetno značajnu notu u pogledu histopatologije oralnog karcinoma, a meni, kao mladom istraživaču, otvorila jedan potpuno novi svet interesovanja. Posebno zadovoljstvo pružila mi je saradnja sa izvanrednim ljudima sa Katedre za biomedicinsko inženjerstvo Mašinskog fakulteta u Beogradu, bez čijeg predanog rada i upornosti ne bi ni bilo metode koja čini srž ove disertacije. Profesorki Lidiji Matiji, docentkinji Branislavi Jeftić i kolegincima Aleksandri Dragičević zahvaljujem se na brojnim savetima, bezrezervnoj podršci, a iznad svega na inženjerskom duhu koji me je kroz ovu avanturu uspešno vodio.

Najveću zahvalnost na svom životnom putu, čiji je ova disertacija samo mali deo, a veliki korak, dugujem članovima svoje porodice koji svojom ljubavlju i podrškom svemu daju smisao.

"To boldly go where no one has gone before!"

Star Trek: The Next Generation

Mariji

PRIMENA OPTOMAGNETNE IMIDŽING SPEKTROSKOPIJE U BIOFIZIČKOJ KARAKTERIZACIJI MARGINALNOG I KARCINOMOM IZMENJENOG TKIVA U USNOJ DUPLJI

Sažetak

Jedan od najznačajnijih faktora u hirurškom lečenju obolelih od oralnog karcinoma predstavlja status hirurške margine. Nalaz pozitivne hirurške margine u direktnoj je vezi sa lošom prognozom, učestalijom pojavom lokalnih recidiva i smanjenom stopom petogodišnjeg preživljavanja. Cilj ovog istraživanja bio je da ispita efikasnost primene nove optičke metode - optomagnetne imidžing spektroskopije (OMIS) u razlikovanju marginalnog i karcinomom izmenjenog tkiva u usnoj duplji. Istraživanje je obuhvatilo analizu razlika kod 60 nativnih (karcinom - 31, normalno tkivo - 29) i 857 bojanih uzoraka (karcinom - 514, normalno - 343). Prilikom digitalnog fotografisanja uzoraka tkiva, tj. izlaganja uzoraka vidljivoj beloj svetlosti pod pravim i pod Brusterovim uglom, OMIS metodom je registrovano magnetno ponašanje analiziranih uzoraka. Obradom digitalnog zapisa specijalizovanim konvolucionim algoritmom dobijen je optomagnetni spektar u kojem su opisane vrednosti intenziteta magnetne aktivnosti na 256 pozicija (razlika talasnih dužina). Vrednosti veće od nule podrazumavaju paramagnetno, a vrednosti manje od nule dijamagnetno ponašanje tkiva. Klasifikaciona efikasnost OMIS metode procenjena je primenom šest algoritama zasnovanih na metodama mašinskog učenja. Kod nativnih uzoraka uočeno je da tkivo oralnog planocelularnog karcinoma pokazuje izraženiju paramagnetnu i dijamagnetnu aktivnost u odnosu na normalno marginalno tkivo, dok je kod bojanih uzoraka različitih tipova normalnog tkiva bila izraženija paramagnetna, a kod uzoraka karcinoma dijamagnetna aktivnost. U slučaju nativnih uzoraka OMIS metoda je razlikovala tkivo karcinoma od normalnog tkiva u hirurškim marginama sa tačnosti do 88,89%, senzitivnosti do 88,89%, specifičnosti do 88,89% i vrednosti AUC do 0,988. U slučaju bojanih uzoraka OMIS metoda je razlikovala preparate karcinoma od preparata normalnog marginalnog tkiva sa tačnosti do 91,07%, senzitivnosti do 100%, specifičnosti do 87,5% i vrednosti AUC do 0,973. Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da je optomagnetnom imidžing spektroskopijom moguće razlikovati marginalno i karcinomom izmenjeno tkivo u usnoj duplji. Na taj način ona poseduje evidentan potencijal za evaluaciju hirurških margina kod oralnog planocelularnog karcinoma u kliničkom i laboratorijskom okruženju.

Ključne reči: oralni planocelularni karcinom, hirurška margina, optomagnetna spektroskopija, analiza, algoritmi, mašinsko učenje, klasifikaciona efikasnost, automatizacija donošenja odluke

Naučna oblast: stomatološke nauke

Uža naučna oblast: biomedicinski inženjering u stomatologiji

APPLICATION OF OPTO-MAGNETIC IMAGING SPECTROSCOPY IN BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION OF MARGINAL AND CARCINOMA TISSUE IN THE ORAL CAVITY

Abstract

The surgical margin status represents one of the most significant factors in patients undergoing surgical treatment for oral squamous cell carcinoma (OSCC). The finding of a positive surgical margin indicates the infiltration of marginal tissue with neoplastic cells and relates to poor prognosis, higher recurrence, and lower overall survival rate. The main goal of this study was to explore the efficiency of a new optical method - the Opto-magnetic imaging spectroscopy (OMIS) in discriminating between the histologically normal tissue in surgical margins and OSCC tissue in the oral cavity. The study encompassed the analysis of 60 native tissue samples (OSCC - 31, normal tissue - 29) and 857 H&E stained tissue samples (OSCC - 514, normal tissue - 343). The OMIS procedure is based on digital imaging of tissue samples or more specifically their illumination with the white light perpendicular to the sample and the white light under a characteristic Brewster angle. Such an operation enables the OMIS device to register the magnetic behaviour of structures within the analyzed tissue. With the use of a specially designed convolution algorithm, these digital images were then transformed into Opto-magnetic spectra represented with the intensity values of magnetic activity on 256 positions (wavelength differences). Values above zero signify paramagnetic and values below zero diamagnetic tissue behaviour. The classification efficiency of the OMIS method was determined with six machine learning algorithms. In native samples, the OSCC tissue has shown extensive paramagnetic and diamagnetic activity as compared to normal tissue. In stained samples, different types of normal tissue were more paramagnetic, and the OSCC tissue more diamagnetic in comparison between the two groups. The OMIS method distinguished the native OSCC tissue from native normal tissue with an accuracy of up to 88.89%, the sensitivity of up to 88.89%, a specificity of up to 88.89%, and the AUC value of up to 0.988. In stained samples, the accuracy was up to 91.07%, sensitivity up to 100%, specificity up to 87.5%, and the AUC value up to 0.973. Based on the results of this study, it could be concluded that the OMIS method successfully discriminates the OSCC tissue from normal tissue in surgical margins. This way, it possesses an evident potential for the evaluation of surgical margins in patients treated for oral squamous cell carcinoma both in clinical and laboratory settings.

Key words: oral squamous cell carcinoma, surgical margin, opto-magnetic spectroscopy, analysis, algorithms, machine learning, classification efficacy, automation of decision-making processes

Scientific field: dental medicine

Scientific subfield: biomedical engineering in dentistry

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kancer u 21. veku	1
1.2. Usna duplja	3
1.2.1. Anatomija i histologija usne duplje	3
1.2.2. Limfni čvorovi vrata	8
1.3. Kancer usne duplje	10
1.3.1. Oralni planocelularni karcinom (OPK) - definicija	10
1.3.2. Epidemiologija karcinoma usne duplje	10
1.3.3. Etiologija i faktori rizika za nastanak karcinoma usne duplje	13
1.3.3.1. Duvan i oralni karcinom	14
1.3.3.2. Alkohol i oralni karcinom	14
1.3.3.3. Potencijalno maligna oboljenja u usnoj duplji	15
1.3.4. Oralni planocelularni karcinom - karcinogeneza	17
1.3.5. Histopatološki aspekt oralnog planocelularnog karcinoma	18
1.3.6. Biohemijski aspekt oralnog planocelularnog karcinoma	19
1.3.7. Klinička slika oralnog planocelularnog karcinoma	22
1.3.8. Lečenje oralnog planocelularnog karcinoma	27
1.3.9. Petogodišnje preživljavanje	29
1.3.10. Prevencija oralnog planocelularnog karcinoma	29
1.4. Hirurška i histološka margina kod oralnog planocelularnog karcinoma	31
1.4.1. Evaluacija hirurških margina kod oralnog planocelularnog karcinoma	34
1.5. Optičke metode evaluacije hirurških margina kod oralnog planocelularnog karcinoma	37
1.5.1. Interakcija svetlosti i materije - optičke karakteristike humanih tkiva	37
1.5.1.1. Apsorpcija	38
1.5.1.2. Rasejanje	42
1.5.1.3. Generički model interakcije svetlost - tkivo	45
1.5.1.4. Fluorescencija	46
1.5.1.5. Vrste svetlosti u biomedicinskoj optici	47
1.5.1.6. Polarizacija svetlosti	48
1.5.1.7. Dubina prodiranja svetlosti	49
1.5.2. Analiza širokog polja lezije	51
1.5.2.1. Primena metoda zasnovanih na autofluorescenciji tkiva u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a	51
1.5.2.2. Primena fluorescentnih boja u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a	54
1.5.2.3. Primena endoskopije uskog snopa (eng. <i>Narrow Band Imaging</i> - NBI) u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a	56

1.5.3. Analiza uskog polja lezije	58
1.5.3.1. Primena spektroskopskih metoda u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a	59
1.5.3.1.a. Primena spektroskopije zasnovane na elastičnom rasejanju svetlosti (eng. <i>Elastic Scattering Spectroscopy</i> - ESS)	59
1.5.3.1.b. Ramanova spektroskopija (eng. <i>Raman Spectroscopy</i> - RS)	61
1.5.3.2. Primena optičke koherentne tomografije (eng. <i>Optical Coherence Tomography</i> - OCT) u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a	65
1.5.3.3. Primena mikroendoskopije visoke rezolucije (eng. <i>High-Resolution Microendoscopy</i> - HRME) u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a	67
1.6. Postoperativna evaluacija hirurških margina kod OPK-a - histopatološk analiza ekscidiranog tkiva	70
2. CILJ	73
3. MATERIJAL I METODE	74
3.1. Materijal - uzorak	74
3.2. Metode	76
3.2.1. Optomagnetna imidžing spektroskopija (OMIS)	76
3.2.2. Protokol primene OMIS metode u analizi uzoraka marginalnog i karcinomom izmenjenog tkiva u usnoj duplji	81
3.2.3. Algoritmi za automatizovano razvrstavanje i klasifikaciju uzoraka različitih tipova tkiva	83
3.2.3.1. Naivni Bajesov klasifikacioni metod (NB)	83
3.2.3.2. Stablo odlučivanja (DT)	83
3.2.3.3. Metod "slučajne šume" (RF)	84
3.2.3.4. Metod potpornih vektora (SVM)	85
3.2.3.5. Neuralna mreža (NN)	87
3.2.3.6. Dubinsko učenje (DL)	88
3.2.4. Analiza klasifikacione efikasnosti različitih algoritama primenjenih na baze podataka dobijene opto-magnetnom imidžing spektroskopijom	89
3.2.4.1. Priprema podataka	89
3.2.4.2. Primena automatizovanih algoritama	90
3.2.4.3. Validacija automatizovanih algoritama	96
3.2.4.4. Izbor optimalnog algoritma za automatizovanu interpretaciju podataka dobijenih primenom OMIS metode	97
3.2.4.5. Testiranje nulte hipoteze	98
4. REZULTATI	99
4.1. Rezultati kvalitativne analize primene optomagnetne imidžing spektroskopije u razlikovanju karcinomom izmenjenog tkiva i normalnog tkiva u hirurškim marginama - optomagnetni spektri	99

4.1.1. Optomagnetni spektri nativnih uzoraka tkiva OPK-a i normalnog tkiva u hirurškim marginama	99
4.1.2. Optomagnetni spektri bojjenih uzoraka tkiva OPK-a i normalnog tkiva u hirurškim marginama	102
4.2. Rezultati kvantitativne analize primene optomagnetne imidžing spektroskopije u razlikovanju karcinomom izmenjenog tkiva i normalnog tkiva u hirurškim marginama	108
4.2.1. Razvoj algoritama za automatizovano klasifikovanje nativnih uzoraka tkiva OPK-a i normalnog tkiva u hirurškim marginama	108
4.2.2. Razvoj algoritama za automatizovano klasifikovanje bojjenih uzoraka tkiva OPK-a i normalnog tkiva u hirurškim marginama	111
4.2.2.1. Klasifikacija uzoraka tkiva OPK-a (kategorije 1,2,3,4 i 5) i svih preparata različitih tipova normalnog tkiva	111
4.2.2.2. Klasifikacija uzoraka tkiva OPK-a. Razvrstavanja preparata kategorije 1 (OPK) i kategorije 5 (OPK i normalno - prelazno)	114
4.2.2.3. Klasifikacija uzoraka tkiva OPK-a (kategorija 5 - prelazno) i svih preparata različitih tipova normalnog tkiva	117
4.2.2.4. Klasifikacija uzoraka tkiva OPK-a (kategorija 1) i preparata normalnog epitelnog i vezivnog tkiva	120
4.2.2.5. Klasifikacija uzoraka tkiva OPK - a (kategorija 1) i preparata normalnog mišićnog tkiva	123
4.2.2.6. Klasifikacija uzoraka tkiva OPK - a (kategorija 1) i preparata normalnog masnog tkiva	126
4.2.2.7. Klasifikacija uzoraka tkiva OPK - a (kategorija 1) i preparata normalnog koštanog tkiva	129
4.2.2.8. Klasifikacija uzoraka tkiva OPK - a (kategorija 4 - infiltrisano koštano tkivo) i preparata normalnog koštanog tkiva	132
4.2.2.9. Klasifikacija uzoraka tkiva OPK - a (kategorija 1) i preparata normalnog tkiva pljuvačnih žlezda	135
4.2.3. Rangiranje automatizovanih algoritama i testiranje nulte hipoteze prema definisanim parametrima klasifikacione efikasnosti	138
4.2.3.1. Rangiranje po tačnosti	138
4.2.3.2. Rangiranje po vrednosti AUC	138
4.2.3.3. Rangiranje po odnosu verovatnoće za pozitivan rezultat testa (vrednost OV+)	139
4.2.3.4. Rangiranje po odnosu verovatnoće za negativan rezultat testa (vrednost OV-)	140
4.2.3.5. Rangiranje po dijagnostičkom odnosu šansi (vrednost DOŠ)	140
4.2.3.6. Testiranje nulte hipoteze	143
5. DISKUSIJA	144
6. ZAKLJUČAK	158

7. LITERATURA	160
8. BIOGRAFIJA AUTORA	188
9. IZJAVE	189

1. UVOD

1.1. | Kancer u 21. veku

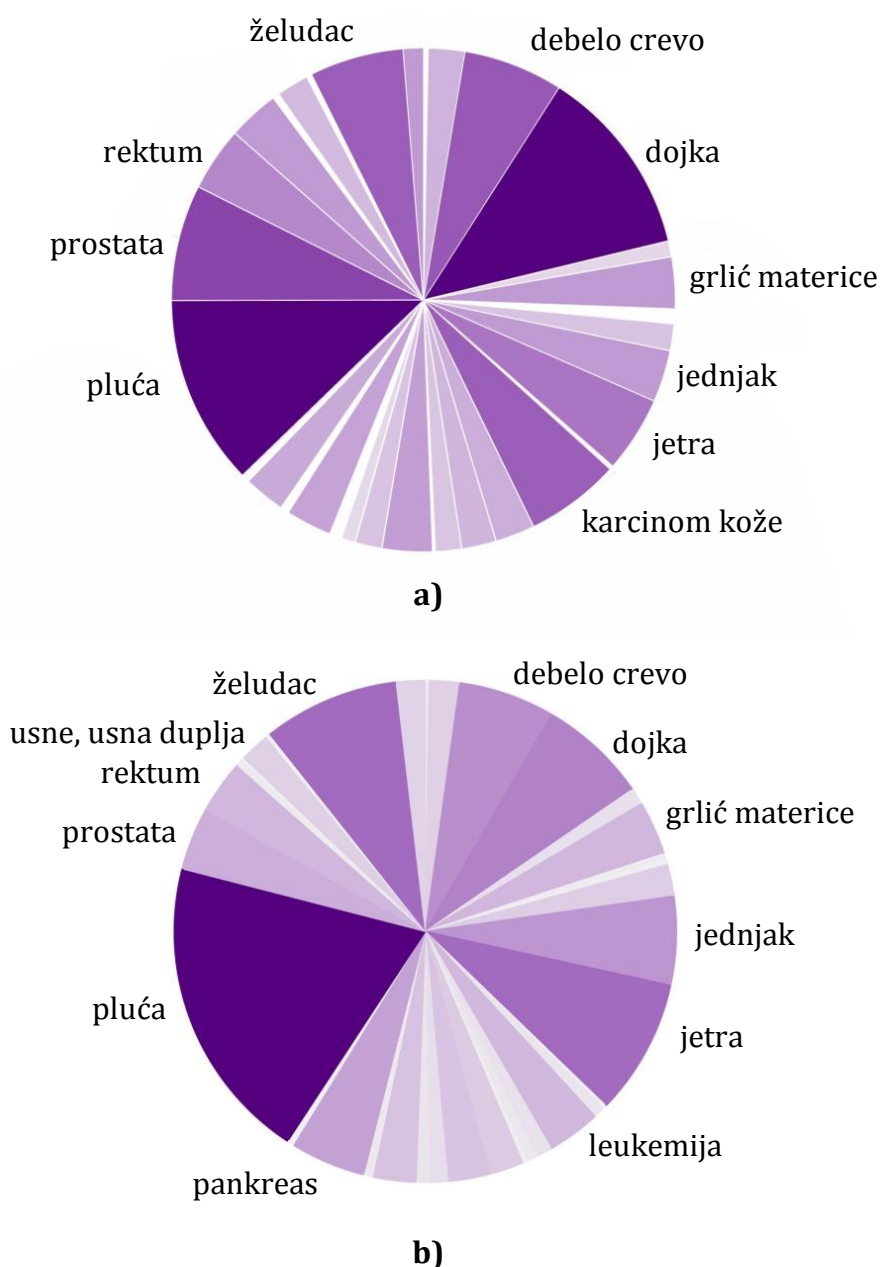
Na početku 21. veka nezarazne bolesti predstavljaju najveći izazov savremene medicine. Procene su da će kancer, uz kardiovaskularna oboljenja, u narednim decenijama postati glavni uzrok smrti u svim zemljama sveta (Bray i sar., 2018).

Podaci Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO, eng. *WHO*) iz 2015. rangiraju kancer među prva dva uzročnika smrtnosti kod osoba starosti do 70 godina u gotovo polovini država sveta (91/192). U periodu od 2006. do 2016. godine na godišnjem nivou primećen je porast od 28% u broju obolelih (Fitzmaurice i sar., 2018). Procene su da je u svetu samo u 2018. godini registrovano 18,1 milion novih pacijenata obolelih od kancera, a da je broj smrtnih slučajeva kao direktna posledica istog oko 9,6 miliona (Bray i sar., 2018). Posebno su alarmantne projekcije da će se do 2040 ovaj trend nastaviti i da će broj umrlih na godišnjem nivou u najboljem slučaju iznositi nešto više od 13 miliona, a da može dostići i cifru od preko 17, što bi predstavljalo porast od gotovo 80% u odnosu na 2018. godinu (Foreman i sar., 2018).

U pogledu geografske rasprostranjenosti kancera, najveći broj slučajeva dijagnostikovani su u Aziji (60%), što se može smatrati očekivanim s obzirom na broj ljudi koji na tom kontinentu žive (Bray i sar., 2018). Zanimljivo je da je u Evropi, iako u njoj živi svega 9% ukupne svetske populacije, registrovana četvrtina od broja obolelih na globalnom nivou, sa najvišom incidencom prisutnom u zemljama Zapadne Evrope (Bray i sar., 2018; Ferlay i sar., 2013; United Nations, Population Division, 2017). U odnosu na indeks humanog razvoja (IHR), incidenca malignih neoplazmi i stopa smrtnosti u 2018. godini značajno je viša u zemljama sa visokom vrednosti IHR-a, odnosno ekonomski razvijenim zemljama u poređenju sa zemljama u razvoju koje se uglavnom nalaze na afričkom kontinentu i Južnoj Aziji (Bray i sar., 2018; United Nations Development Programme, 2016). Ipak, ove razlike iz godine u godinu sve su manje usled tzv. „vesternizacije“ stila života ljudi u manje razvijenim zemljama, kao i smanjenja broja obolelih od kancera povezanih sa infekcijama, lošim uslovima života i siromaštvom (Gersten i Wilmoth, 2002; Maule i Merletti, 2012; Bray, 2014).

Kanceri pluća, ženske dojke i kolorektalne regije tri su najzastupljenija tipa kancera na globalnom nivou (slika 1) (Bray i sar., 2018). Ipak, specifičnosti poput seksualne opredeljenosti obolelih, različitih socio-ekonomskih i kulturoloških faktora, kao i stila života na regionalnom i lokalnom nivou, mogu uticati na učestaliju pojavu i drugih tipova malignih neoplazmi. Takav je recimo slučaj Indije i Pakistana, dve zemlje srednjeg IHR – a, sa visokom prevalencijom upotrebe duvana i najvišom incidencom i stopom smrtnosti registrovanih za kancer usana i usne duplje kod muškaraca (Bray i sar., 2018; United Nations Development Programme, 2016).

Srbija pripada grupi zemalja sa visokim IHR-a te su i podaci o broju obolelih i umrlih kao posledica malignih neoplazmi u skladu sa podacima u zemljama sa sličnim ili višim IHR-a. Sa 20,7% od ukupnog broja umrlih u 2017, kancer predstavlja drugi najčešći uzrok smrti u Srbiji, odmah iza kardiovaskularnih oboljenja. Od 2008. do 2017. godine stopa mortaliteta uvećala se za 8%, uz oko 20% više smrtnih slučajeva kod muškaraca nego kod žena. Po podacima iz 2015. godine na teritoriji Centralne Srbije najučestaliji bili su kanceri pluća, kolona i rektuma te prostate kod muškaraca i dojke, kolona i rektuma te pluća kod žena. Incidenca obolelih u Republici Srbiji za 2018. godinu projektovana je na 460.5/100.000 kod muškaraca, odnosno 377.2/100.000 kod žena (Ferlay i sar., 2018; Institut za javno zdravlje Srbije, 2018).



Slika 1. Najzastupljeniji tipovi kancera prema broju novih slučajeva (a) i broju umrlih (b) na globalnom nivou u 2018. godini (Bray i sar., 2018).

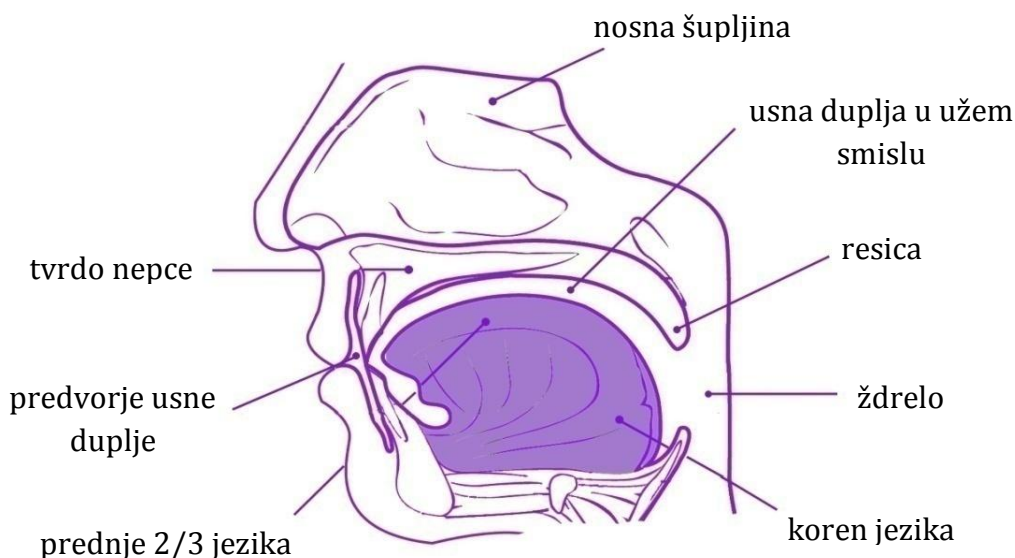
Glavni razlozi dosta nepovoljnih pokazatelja za kancer u Srbiji i na globalnom nivou, nalaze se pre svega u faktorima rizika na koje je moguće uticati i delovati preventivno. Konzumiranje duvana i alkohola, prekomerna telesna težina, fizička neaktivnost i loša ishrana su faktori koji značajno doprinose pojavi većine malignih neoplazmi, naročito onih vezanih za disajni i digestivni sistem (Secretan i sar., 2009; Bouvard i sar., 2015; Lauby-Secretan i sar., 2016; Islami i sar., 2018). Ipak, konzumiranje duvana u vidu pušenja, pa čak i indirektnog udisanja duvanskog dima posebno se izdvaja. Ovo je, pojedinačno, bio najzastupljeniji faktor rizika u 2014. godini u Sjedinjenim Američkim Državama, povezan sa blizu 20% svih slučajeva dijagnostikovanog kancera, odnosno sa 30% smrtnih ishoda kao posledica istih. Podaci takođe ukazuju i da su konzumacija duvana i alkohola kao udruženi faktor rizika najprisutniji kod kancera usne duplje i ždrela (Islami i sar., 2018).

1.2. | Usna duplja

Usna duplja predstavlja početni deo digestivnog trakta koji u čovekovom organizmu obavlja funkciju žvakanja, govora, mimike, čula ukusa, lučenja pjuvačke i početne faze varenja hrane (Meyer i sar., 1984; Shah i sar., 2001).

1.2.1. | Anatomija i histologija usne duplje

U anatomskom smislu, usna duplja se prema napred prostire od mukokutane linije rumenog dela usana do prelaza tvrdog u meko nepce prema nazad i gore, odnosno opšančenih papila jezika prema nazad i dole.¹



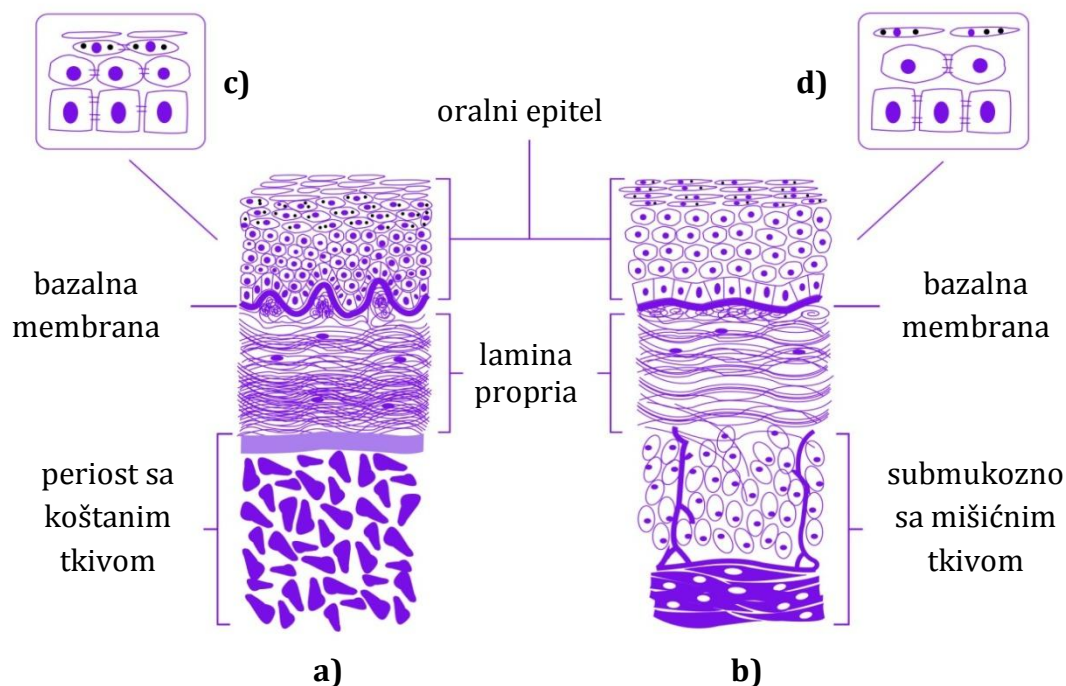
Slika 2. Anatomske granice usne duplje (Preuzeto i prilagođeno sa interneta - OpenStax College, 2013)

Veći deo usne duplje pokriva oralna sluzokoža koja se sastoji od oralnog epitela i vezivnog tkiva koje se nejasnom granicom nastavlja u submukozno tkivo ili periost kosti. Oralni epitel je pločasto-slojevitog tipa i to sa orožavanjem (keratinizirajući) (slika 3a) ili bez orožavanja (nekeratinizirajući) (slika 3b).

Osnovnu komponentu oralnog epitela čine keratinociti - ćelije čiji stepen maturacije definiše njegove biofizičke karakteristike. Keratinociti su u različitom obliku prisutni u svim slojevima oralnog epitela. U najdubljem - bazalnom sloju (lat. *stratum basale*) oni su kuboidalnog oblika sa velikim jedrom. U sloju iznad - spinoznom (*stratum spinosum*), ove

¹Preko usnog otvora (lat. *rima oris*) otvorena je ka spoljašnjoj sredini. Zubnim nastavcima gornje i donje vilice sa gornjim i donjim zubnim lukom podeljena je na predvorje usne duplje (lat. *vestibulum oris*) i usnu duplju u užem smislu (lat. *cavitas oris proprium*). Predvorje usne duplje ograničeno je obrazima i usnama ka spolja i zubnim nastavcima sa zubnim lukovima ka unutra. Zubni nastavci gornje i donje vilice sa zubnim lukovima formiraju usnu duplju u užem smislu koja je prema gore ograničena tvrdim nepcem a prema dole podom usne duplje i jezikom (prednje 2/3). Usna duplja se preko ždrelnog suženja (lat. *isthmus faucium*) nastavlja u orofarinks (Shah i sar., 2001; Greene i sar., 2002b; Barnes i sar., 2005).

ćelije su ovoidne i u njihovoj citoplazmi nalaze se snopovi tonofilamenata, odnosno granule kod ćelija gornjeg dela ovog sloja.



Slika 3. Oralna sluzokoža. **a)** oralna sluzokoža sa keratinizirajućim epitelom **b)** oralna sluzokoža sa nekeratinizirajućim epitelom **c)** slojevi keratinizirajućeg epitela **d)** slojevi nekeratinizirajućeg epitela

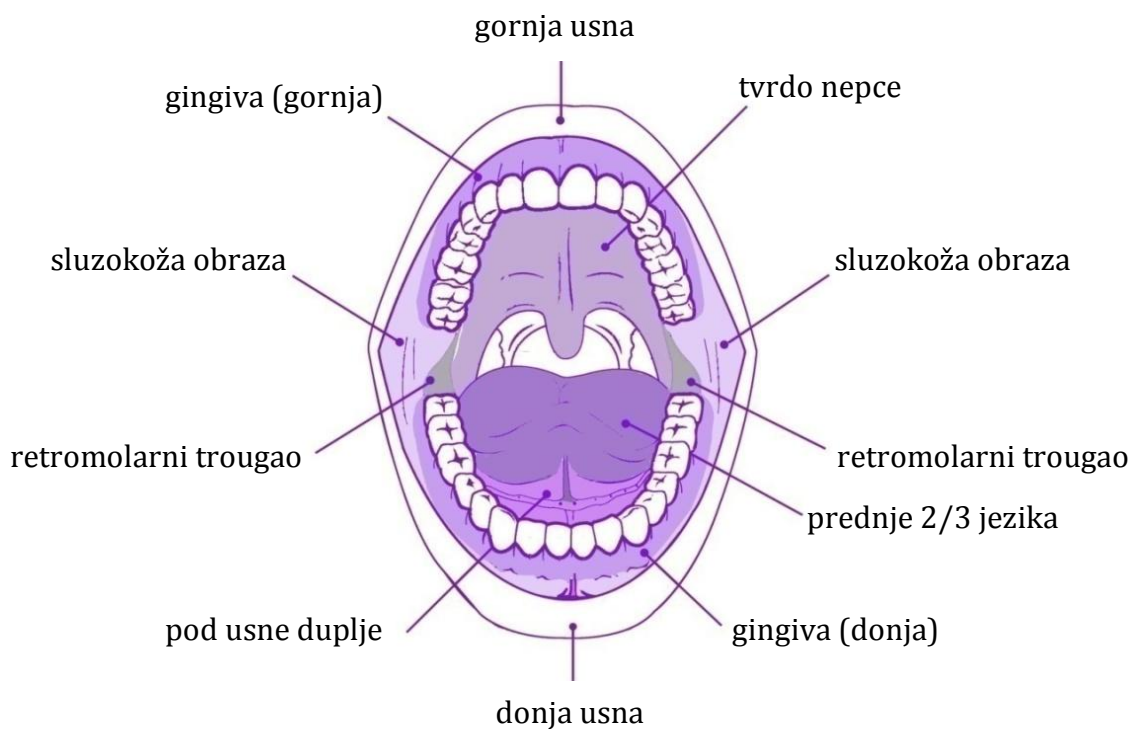
Iznad spinoznog smešten je granulozni sloj (lat. *stratum granulosum*) u kome su keratinociti spljošteni i u čijoj se citoplazmi nalaze keratohijalinske granule. U poslednjem - površinskom sloju (lat. *stratum corneum*) nalaze se izdužene, dehidrirane ćelije bez jedra i ćelijskih organela i citoplazmom bogatom fibrilarnim proteinima. Ovakav raspored i osobine keratinocita karakteristični su za keratinizirajući epitel (slika 3c). Ponekad je u ćelijama površinskog sloja moguće uočiti tamno piknotično jedro - fenomen parakeratinizacije. Kod drugog tipa oralnog epitela - nekeratinizirajućeg, dva dublja sloja (bazalni i spinozni) su gotovo iste građe i karakteristika, dok nedostaje granulozni sloj, a površinski (lat. *stratum superficiale*) čine izdužene ćelije sa jedrom, organelama i citoplazmom u kojoj se nalaze tonofilamenti (slika 3d). Pored keratinocita, u oralnom epitelu nalaze se i druge ćelije - melanociti, Langerhansove i Merkelove ćelije. Melanociti se nalaze u bazalnom sloju i odgovorni su za pigmentaciju oralne sluzokože; Langerhansove ćelije imaju imunološku ulogu dok se Merkelove ponašaju kao mehanoreceptori. Ispod oralnog epitela nalazi se vezivno tkivo bogato mrežom kolagenih vlakana, krvnih sudova i nerava (lat. *lamina propria*). Kontakt epitelnog i vezivnog tkiva ostvaruje se duž talasaste linije koja nastaje evaginacijama gornjeg (papilarnog) dela lamine proprie u epitel. Donji (retikularni) deo čine snopovi kolagenih vlakana postavljeni paralelno sa površinom sluzokože. Ka dubini, vezivno tkivo lamine proprie prelazi u submukozno, periost kosti ili mišićno tkivo (slika 3a,b) (Meyer i sar., 1984; Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Nanci, 2013). U zavisnosti od funkcije koju obavlja u usnoj duplji, zastupljena su tri tipa oralne sluzokože: mastikatorna, zastorna i specijalizovana (Danilović i Kuburović-Radujković, 2012). Procene su da je oko 60% usne duplje prekriveno zastornom, 25% mastikatornom i 15% specijalizovanom sluzokožom (Collins i Dawes, 1987).

Epitel mastikatorne sluzokože je po histološkoj organizaciji keratinizirajući (u nekim delovima parakeratinizirajući) pločasto-slojevit epitel koji je najviše izložen delovanju mastikatornih sila. Od papilarnog dela lamine propriae deli ga talasasta bazalna membrana nastala brojnim evaginacijama vezivnog tkiva u epitel. Papilarni deo lamine propriae čini umereno vaskularizovano vezivno tkivo, dok se u retikularnom nalaze gusto raspoređeni snopovi kolagenih vlakana (slika 3a) (Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016).

Epitel zastorne sluzokože uglavnom je nekeratinizirajućeg tipa i generalno je tanji od epitela mastikatorne mukozne. Kontaktna linija epitela i lamine propriae je relativno ravna sa plitkim evaginacijama u epitel. Lamina propria je dobro vaskularizovana i čini je rastresito vezivno tkivo koje sadrži kolagena i elastična vlakna. U odnosu na mastikatornu, lamina propria zastorne sluzokože nešto je deblja. Sastav i dubina submukoznog sloja variraju u odnosu na anatomske predele (slika 3b) (Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016).

Epitel specijalizovane sluzokože je u odnosu na svoju ulogu (mehanička ili senzorna) keratinizirajućeg ili nekeratinizirajućeg tipa. U lamini propriae nalazi se umereno vaskularizovano vezivno tkivo sa izraženim evaginacijama u epitel. Mogu biti prisutne i male pljuvačne žlezde. Submukozno tkivo nije prisutno (Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016).

Usna duplja podeljena je u nekoliko anatomske predela: usne (gornja i donja), sluzokoža obraza, gingiva (gornja i donja), prednje 2/3 jezika, pod usne duplje, retromolarni trougao i tvrdo nepce (slika 4) (Shah i sar., 2001; Miloro i sar., 2004).



Slika 4. Anatomske predelne usne duplje (Preuzeto i prilagođeno sa interneta - OpenStax College, 2013)

Usne (donja i gornja) se nalaze na ulazu u digestivni trakt. Sastoje se iz spoljašnjeg - kožnog, prelaznog (rumenog) i unutrašnjeg (mukoznog) dela. Predeo koji pripada usnoj duplji obuhvata rumeni deo koji predstavlja i kontaktnu površinu gornje i donje usne, kao i mukozni koji je okrenut ka zubnim nastavcima. Histološki, sluzokoža usana je većinom zastornog tipa - tanak nekeratinizovani pločasto-slojevit epitel sa dobro vaskularizovanom laminom propriom i submukozom u kome su smeštene male pljuvačne žlezde. U predelu rumenog dela epitel je keratinizirajući dok se u lamini proprii gube dlake, lojne i znojne žlezde karakteristične za kožni deo usana. U lamini proprii dobro je razvijena kapilarna mreža koja ovom delu daje tamno crvenu boju. Mukoza je direktno vezana za vlakna kružnog mišića usana (Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016).

Sluzokoža obraza oblaže unutrašnju površinu usne duplje i prostire se od komisure usana do palatoglosalnog luka. Čini je zastorni nekeratinizirajući pločasto slojevit epitel debljine oko 500µm i dobro vaskularizovano vezivno tkivo lamine proprie bogato kolagenim i elastičnim vlaknima kojim je mukoza vezana za mišiće obraza. U vezivnom tkivu submukoze prisutni su adipociti i male pljuvačne žlezde (Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016).

Gingiva (gornja i donja) predstavlja deo usne duplje koji pokriva alveolarni greben, interdentalni septum i koronarni deo zubnih nastavaka. Deli se na tri dela - slobodnu, pripojnu i interdentalnu gingivu. Slobodna obavija krunicu zuba od kojeg je odvojena sulkusom. Apikalno se nastavlja u pripojnu koja je čvrsto vezana za zub i alveolarnu kost. Interdentalna je smeštena u interdentalnom prostoru i delom je slobodna. Pripojna gingiva sa vestibularne i oralne strane prelazi u alveolarnu sluzokožu od koje je demarkirana mukogingivalnom linijom, dok palatinalno prelazi u sluzokožu tvrdog nepca. Generalno, gingivalna sluzokoža je mastikatornog tipa. Epitel je debljine oko 250µm, keratinizirajući i sa elementima parakeratinizacije. Laminu propriu ispunjava gusto vezivno tkivo sa izraženim evaginacijama papilarnog sloja u epitel. Submukoznog sloja nema, jer je gingivalna sluzokoža direktno vezana za periost kosti. Kao što je napomenuto, gingiva se sa vestibularne i oralne strane nastavlja u sluzokožu zubnih nastavaka - alveolarnu sluzokožu. Za razliku od gingivalne, alveolarna sluzokoža je zastornog tipa sa tankim nekeratinizirajućim pločasto-slojevitim epitelom i dobro vaskularizovanom laminom propriom sa mnoštvom elastičnih vlakana. U submukozi se nalazi rastresito vezivno tkivo koje je elastičnim vlaknima vezano za periost kosti, a prisutne su i male pljuvačne žlezde (Shah i sar., 2001; Greene i sar., 2002b; Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016).

Prednje dve trećine jezika pripadaju usnoj duplji, dok zadnja trećina pripada orofarinksu. Prednji deo je pokretan i prema napred vezan za pod usne duplje jezičnim frenulumom, dok se pozadi prostire do terminalnog sulkusa (lat. *sulcus terminalis*) oblika slova V, otvorenim prema vrhu jezika. Može se podeliti u pet anatomskih polja: vrh, bočne strane, dorzalna i ventralna strana. Jezik je pretežno mišićna struktura koja je na dorzalnoj strani prekrivena specijalizovanim sluzokožom. Zbog svoje mehaničko-senzorne uloge sadrži zone i keratinizirajućeg nekeratinizirajućeg pločasto-slojevitog epitela organizovanog u jezične papile. Postoje četiri vrste jezičnih papila - opšančene, pečurkaste, listaste i končaste. Opšančene papile nalaze se u predelu terminalnog žleba u koji se izlivaju i von Ebnerove male pljuvačne žlezde. Sa gornje strane prekrivene su keratinizirajućim a na bočnim nekeratinizirajućim epitelom. Pečurkaste papile nalaze se na prednjem delu dorzalne strane jezika, pečurkastog su oblika, a njihov vrh je jasno crvene boje i prekriven nekeratinizovanim epitelom ispod kojeg se nalazi dobro vaskularizovano vezivno tkivo. Od papila koje sadrže gustativne korpuskule prisutne su još i listaste papile. Najbrojnije papile - končaste, obavljaju

mehaničku ulogu i prekrivene su keratinizirajućim epitelom (Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016). Papilarni deo lamine proprie dobro je razvijen, sa brojnim evaginacijama u epitel i sadrži mrežu kapilara i male pljuvačne žlezde. Lamina propria direktno je vezana za mišiće jezika. Ventralna strana jezika prekrivena je zastornom sluzokožom koju čine tanak nekeratinizirajući pločasto slojevit epitel i tanka lamina propria u kojoj se nalaze elastična vlakna, malo pljuvačnih žlezda, kapilarna mreža u papilarnom sloju i relativno slabo vaskularizovan retikularni sloj. Submukoza, ukoliko je prisutna, nekada sadrži masno tkivo i dobro je vaskularizovana. Na mestima gde izostaje, sluzokoža je direktno vezana za mišiće (Shah i sar., 2001; Greene i sar., 2002b; Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016).

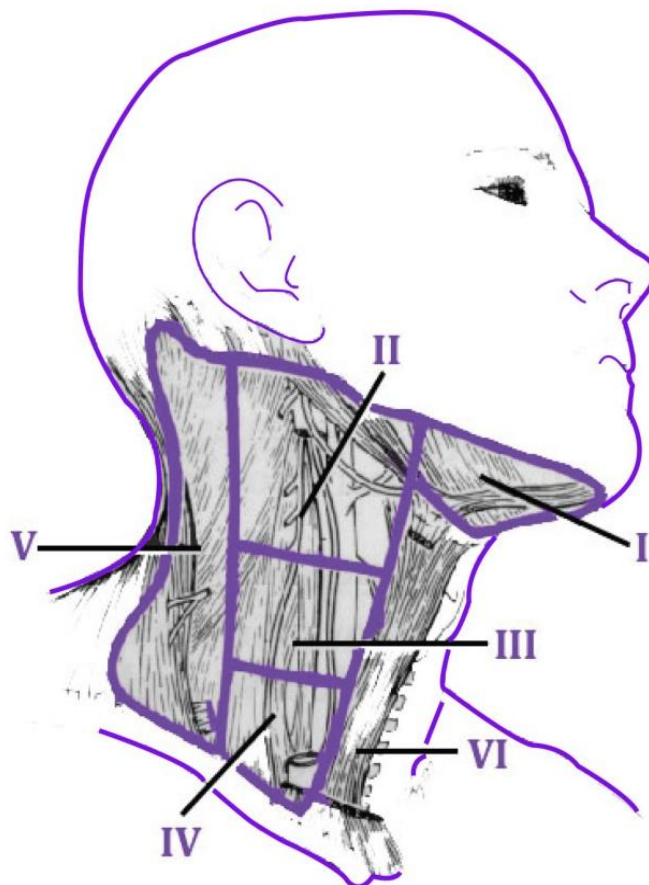
Pod usne duplje prema napred i sa bočnih strana ograničen je unutrašnjom površinom donjeg alveolarnog grebena, u središnjem delu ventralnom stranom jezika a pozadi palatoglosalnim lukovima. Potkovičastog je oblika i u kontinuitetu je sa predelom retromolarnog trougla, dok se ispod nalaze milohioidni i hioglosni mišići. U ovom prostoru nalaze se i otvori sublingvalnih i submandibularnih žlezda. Sluzokoža poda usne duplje je zastornog tipa i čine je tanak nekeratinizirajući pločasto slojevit epitel debljine oko 100µm i dobro vaskularizovana lamina propria bogata elastičnim vlaknima. U submukoznom tkivu nalaze se male pljuvačne žlezde i vezivno tkivo (Shah i sar., 2001; Greene i sar., 2002b; Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016).

Retromolarni predeo (lat. *trigonum retromolare*) je trouglasti prostor smešten iza distalnih površina donjih trećih molara čija sluzokoža pokriva ushodni deo unutrašnje strane ramusa donje vilice. Bočno je u kontinuitetu sa bukalnom sluzokožom, ka sredini sa sluzokožom mekog nepca dok se prema dole nastavlja u pod usne duplje. Epitel retromolarnog predela je nekeratinizirajući i prekriva žlezdano i mišićno tkivo (Shah i sar., 2001; Greene i sar., 2002b; Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016).

Tvrdo nepce ograničeno je prema napred zubnim nastavkom gornje vilice dok se prema nazad nastavlja u meko nepce koje pripada orofarinksu. Od spoja tvrdog i mekog nepca do incizalne jame prostire se medijalna linija (lat. *raphe palati*). Sluzokoža tvrdog nepca je mastikatornog tipa. Čini je keratinizirajući (ponekad parakeratinizirajući) pločasto-slojevit epitel na koji se nastavlja lamina propria izraženih evaginacija u epitel i koju čine gusto i umereno vaskularizovano vezivno tkivo. U predelu medijalne linije submukoza nije prisutna i sluzokoža je direktno vezana za periost kosti. U anterolateralnoj i posterolateralnoj zoni submukozni sloj je prisutan i bogat je masnim, odnosno mukoznim žlezdanim tkivom (Shah i sar., 2001; Greene i sar., 2002b; Danilović i Kuburović-Radujković, 2012; Pawlina i Ross, 2016).

1.2.2. | Limfni čvorovi vrata

Drenaža limfe svakog anatomskog predela usne duplje vrši se određenim putem u preko 300 limfnih čvorova vrata (Rouviere, 1938). Na osnovu anatomskih struktura i iz kliničke (hirurške) perspektive svi limfni čvorovi vrata mogu se svrstati u šest nivoa (slika 5).



Slika 5. Nivoi limfnih čvorova vrata (Preuzeto i prilagođeno sa interneta - Nick's Radiology Wiki, 2017)

Nivo I obuhvata submentalnu i submandibularnu grupu limfnih čvorova. Submentalnu grupu (I-A) čine limfni čvorovi smešteni između prednjih trbuha digastričnih mišića, hoidne kosti i simfize donje vilice. Submandibularna grupa (I-B) obuhvata limfne čvorove u prostoru ograničenom prednjim i zadnjim trbuhom digastričnih mišića, telom donje vilice i stilohoidnim mišićem (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002a).

Nivo II obuhvata gornje jugularne limfne čvorove smeštene duž gornjeg dela unutrašnje jugularne vene i gornjeg dela akcesornog živca. Nivo II-A predstavlja grupu limfnih čvorova koja je prema dole ograničena horizontalnom linijom u nivou hoidne kosti, bazom lobanje prema gore, stilohoidnim mišićem prema napred i vertikalnom linijom definisanom akcesornim živcem prema pozadi (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002a).

Nivo II-B grupa je prema dole ograničena horizontalnom linijom u nivou hoidne kosti, prema gore bazom lobanje, prema napred vertikalnom linijom akcesornog živca i prema

pozadi zadnjom ivicom sternokleidomastoidnog mišića (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002a).

Nivo III obuhvata limfne čvorove duž srednje trećine unutrašnje jugularne vene. Prema dole je ograničen horizontalnom linijom u nivou donje ivice krikoidne hrskavice, prema gore horizontalnom linijom u nivou hioidne kosti, prema napred zadnjom ivicom sternohioidnog mišića i prema nazad zadnjom ivicom sternokleidomastoidnog mišića ili senzitivnim granama vratnog plexusa (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002a).

Nivo IV obuhvata limfne čvorove duž donjeg dela unutrašnje jugularne vene. Ograničen je klavikulom, donjom ivicom krikoidne hrskavice, zadnjom ivicom sternohioidnog mišića i zadnjom ivicom sternokleidomastoidnog mišića ili senzitivnim granama vratnog plexusa (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002a).

Nivo V obuhvata sve limfne čvorove zadnjeg trougla vrata, limfne čvorove duž akcesornog živca, limfne čvorove duž poprečne arterije vrata kao i sve limfne čvorove duž unutrašnje jugularne vene u projekciji zadnje ivice sternokleidomastoidnog mišića. Nivo V-A ograničen je donjom ivicom krikoidne hrskavice, vrhom na kome se susreću sternokleidomastoidni i trapezoidni mišić, zadnjim trbuhom sternokleidomastoidnog mišića ili senzitivnim granama vratnog plexusa i prednjim trbuhom trapezoidnog mišića. Nivo V-B ograničen je klavikulom, donjom ivicom hioidne kosti, zadnjim trbuhom sternokleidomastoidnog mišića ili senzitivnim granama vratnog plexusa i prednjim trbuhom trapezoidnog mišića (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002a).

Nivo VI obuhvata pretrahealne, paratrahealne, i prelaringealne limfne čvorove. Ovaj prostor je prema dole ograničen suprasternalnom incizurou, prema gore hioidnom kosti, a pozadi zajedničkom karotidnom arterijom. Ovaj nivo je poznat i kao "prednji kompartment" (Robbins i sar., 2002; Greene i sar., 2002a).

1.3. | Kancer usne duplje

Oralni kancer predstavlja svaku malignu neoplazmu koja se može razviti na tkivima usana i usne duplje (Rivera, 2015; Barnes i sar., 2005). Maligni tumori usne duplje mogu biti epitelnog, mezenhimalnog ili hematolimfoidnog porekla (Barnes i sar., 2005). U 85 do 95% slučajeva oralni kancer nastaje malignom transformacijom epitelnog tkiva - oralni planocelularni karcinom (Strong i Spiro, 1987; Funk i sar., 2002). U ustima je moguće dijagnostikovati i prisustvo drugih tipova malignih neoplazmi poput sarkoma, melanoma, tumora malih pljuvačnih žlezda kao i udaljenih metastaza kancera sa bilo koje lokacije u ljudskom organizmu (Milorio i sar., 2004).

1.3.1. | Oralni planocelularni karcinom (OPK) - definicija

"Oralni planocelularni karcinom predstavlja invazivnu neoplazmu različitog stepena skvamozne diferencijacije uz tendenciju ranog i izraženog metastaziranja u regionalne limfne čvorove." OPK se najčešće javlja kod osoba u petoj i šestoj deceniji života (Barnes i sar., 2005).

1.3.2. | Epidemiologija karcinoma usne duplje

Većina epidemioloških studija incidencu i stopu smrtnosti za oralne karcinome prikazuje u sklopu registra za kancer usne i usne duplje (ICD-10; COO-14) ili usne, usne duplje i farinksa (COO-C06) (Warnakulasuriya, 2009).

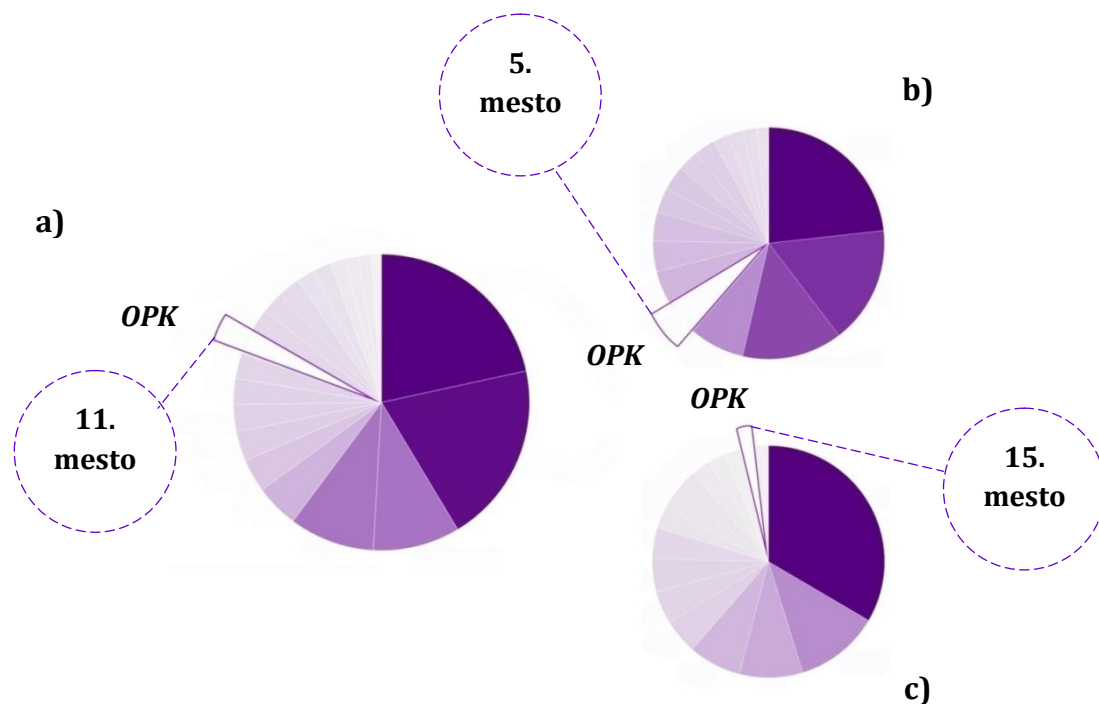
Najnovije procene SZO ukazuju da je u 2018. godini dijagnostikovano 354.864 novih slučajeva kancera usana i usne duplje na globalnom nivou, kao i da broj umrlih kao posledica istih dostiže cifru od oko 180.000. U zemljama sa srednjim i niskim IHR-a, maligne neoplazme usana i usne duplje nalaze se na četvrtom mestu po broju smrtnih slučajeva kod pripadnika muške populacije. Najvišu incidencu kancera usana i usne duplje pokazuju zemlje Melanezijske regije (Papua Nova Gvineja), praćene zemljama Južne i Srednje Azije (Indija, Pakistan, Bangladeš, Avganistan). Slede Australija i Novi Zeland, Istočna i Zapadna Evropa te države Severne Amerike (Sjedinjene Američke Države i Kanada). Ipak, kancer usana i usne duplje najveće posledice ostavlja u Indiji, koja se sa oko 120.000 dijagnostikovanih slučajeva u 2018. godini nalazi na 2. mestu, odmah iza kancera dojke. Shodno navedenom, kod muške populacije ova grupa kancera zauzima 1. mesto sa udelom od oko 16% u odnosu na sve slučajeve novoobolelih od malignih neoplazmi u 2018 (Bray i sar., 2018).

Incidencija kancera usana, usne duplje i farinksa na evropskom kontinentu projektovana je na 19,9/100.000 kod muškaraca i 5,9/100.000 kod žena. U slučaju prvih navedena incidencija predstavlja 4,3% od ukupnog broja dijagnostikovanih malignih neoplazmi. U Evropi, pomenuti pokazatelji pozicioniraju ovu grupu kancera na 5. mesto po učestalosti kod muškaraca, 10. mesto u odnosu na ukupan broj dijagnostikovanih kancera kod oba pola, te 11. mesto po broju slučajeva sa smrtnim ishodom za 2018. godinu (slika 6a,b,c) (Ferlay i sar., 2018).

U odnosu na broj novoobolelih, broj umrlih u 2018. iznosi oko 45% - nešto niže od globalnog proseka koji se poslednjih decenija nije mnogo menjao (preko 50% umrlih) (Jemal i sar., 2008; Bray i sar., 2018).

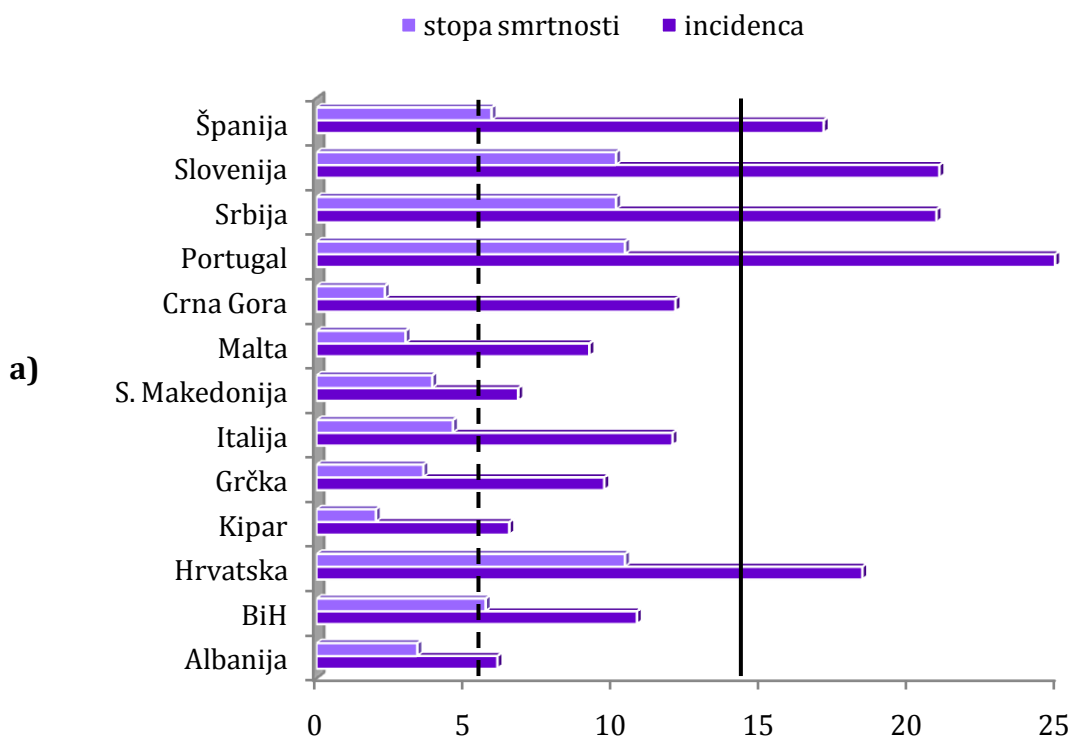
Najveći zdravstveno-ekonomski teret prouzrokovan karcinomom orofarijealne regije podnose zemlje Srednje i Istočne Evrope (Mađarska, Belorusija, Rumunija, Slovačka), praćene

Zapadnom i Severnom (Letonija, Francuska, Danska), dok su najniža incidenca i stopa smrtnosti prisutne u zemljama Mediterana (Južna Evropa) (Ferlay i sar., 2018).

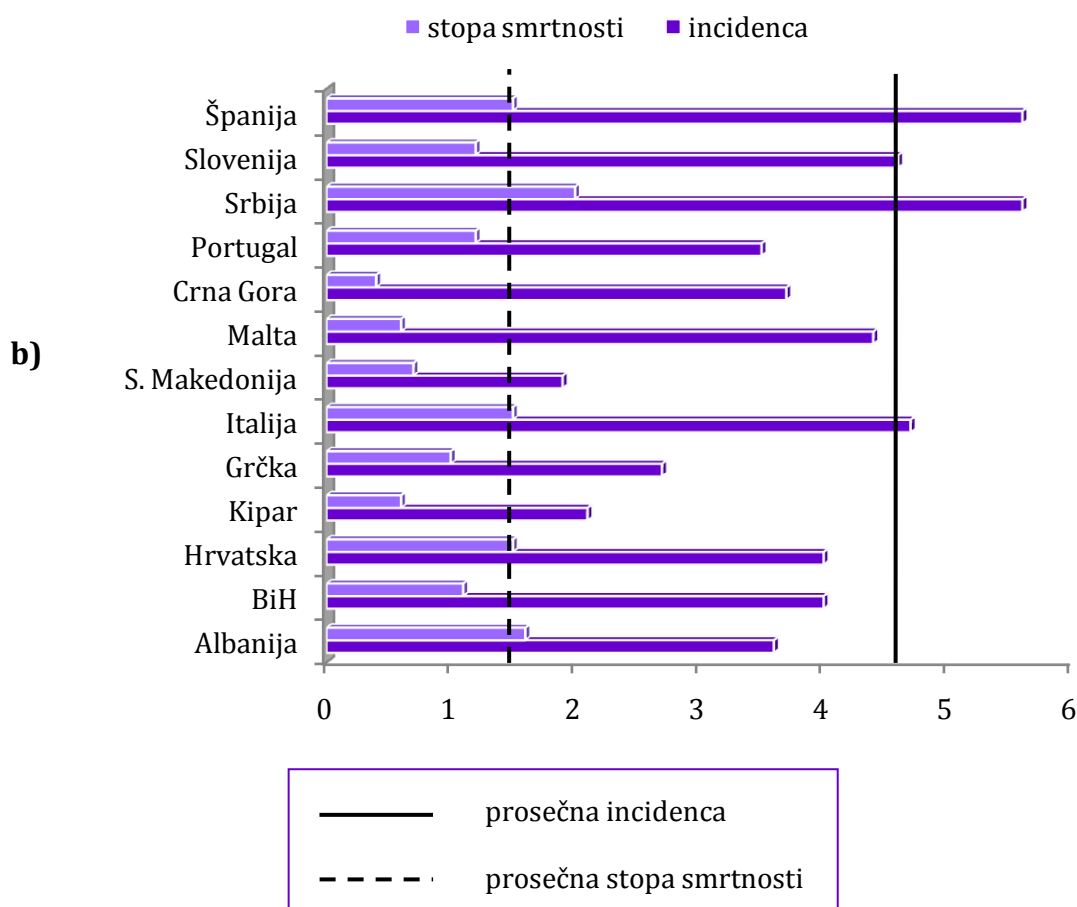


Slika 6. Pokazatelji za oralni planocelularni karcinom u Evropi. **a)** pozicija OPK – a u odnosu na broj umrlih od kancera **b)** pozicija OPK –a u odnosu na učestalost kancera kod muškaraca i **c)** kod žena

U grupi zemalja Južne Evrope, za mušku populaciju Srbija zauzima 3. mesto po učestalosti (20,9/100.000) i stopi smrtnosti (10,1/100.000).



Kod ženske populacije, Srbija se i po učestalosti (5,6/100.000) i po stopi smrtnosti (2,0/100.000) nalazi na 1. mestu.



Slika 7. Incidenca i stopa smrtnosti za OPK u Južnoj Evropi. **a)** incidenca i stopa smrtnosti kod muškaraca **b)** incidenca i stopa smrtnosti kod žena (Ferlay i sar., 2018)

Navedeni podaci nalaze se unutar prosečnih vrednosti za Evropu u celini, a iznad prosečnih vrednosti za države Južne Evrope (incidenca: 14,7/100.000, 4,6/100.000; stopa smrtnosti: 5,7/100.000, 1,5/100.000) (slika 7a,b). U odnosu na zemlje Centralne i Istočne Evrope (Belorusija, Mađarska, Poljska, Rumunija, Slovačka, Ukrajina) Srbija ima niže vrednosti incidence i stope smrtnosti, dok su vrednosti slične pojedinim zemljama Severne i Zapadne Evrope (Danska, Litvanija, Belgija) (Ferlay i sar., 2018).

Prema podacima za 2015. godinu, kod muške populacije je dijagnostikovano 288 novih slučajeva kancera usne duplje i farinksa. U odnosu na ukupan broj novoobolelih od malignih neoplazmi u istom periodu, kancer usne duplje i farinksa zauzima 12. mesto (Institut za javno zdravlje Srbije, 2018).

Karcinom orofarinksa najčešće se javlja kod muškaraca starosti između 40 i 60 godina i povezan je sa uobičajenim faktorima rizika (konzumacija duvana i alkohola). Odnos obolelih muškaraca i obolelih žena varira od 2:1 do 4:1 (La Vecchia i sar., 1997; Scully i Bagan, 2009; Grégoire i sar., 2010). Istraživanja sprovedena na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu kod pacijenata sa dijagnostikovanim karcinomom usana utvrdila su da ovaj odnos iznosi 5:1 u korist muške populacije (Vukadinović i sar., 2007;

Petrović i Jelovac, 2008). Ipak, poslednjih godina se broj obolelih žena uvećava, naročito u kategoriji onih mlađih - starosti 20 do 35 godina. Posebno je zanimljiva činjenica da se u pomenutoj populaciji ovaj tip kancera sve češće javlja u odsustvu tradicionalnih faktora rizika (Dahlstrom i sar., 2008; Koo i sar., 2013). Poslednja istraživanja u Sjedinjenim Američkim Državama ukazuju da je generalno broj pacijenata mlađih od 45 godina sa dijagnostikovanim karcinomom jezika sve veći (Müller i sar., 2008; Patel i sar., 2011; Saba i sar., 2011; Brown i sar., 2012; Ng i sar., 2017). U periodu od 1975. do 2007. godine, broj novoobolelih muškaraca starosti do 45 godina uvećao se za 44%, dok se broj novoobolelih žena u istom periodu uvećao za čak 111% (Patel i sar., 2011).

1.3.3. | Etiologija i faktori rizika za nastanak karcinoma usne duplje

U osnovi nastanka oralnog karcinoma nalaze se mutacije DNK na ćelijskom nivou -nivo oralnog keratinocita. One se mogu javiti kao posledica različitog uticaja - hemijskog, fizičkog ili mikrobiološkog (Scully i Bagan, 2009). Nabrojani faktori mogu ispoljavati svoje dejstvo pojedinačno ili u sinergiji sa drugim faktorima. Proces transformacije normalne u malignu ćeliju, tj. zdravog tkiva usne duplje u oralni karcinom je postepen i vrlo kompleksan. Različiti su nivoi patološke alteracije tkiva koji sa većom ili manjom verovatnoćom mogu progredirati u kancer - hiperplazija i displazija niskog, srednjeg ili visokog stepena (Scully i Bagan, 2009; Rivera, 2015). Osim navedenih tipova agensa i drugi faktori poput genetskih (porodični), higijensko - dijetetskih, prisustva sistemskih bolesti ili stanja imunosupresije organizma mogu podstaći razvoj oralnog karcinoma (Dahlstrom i sar., 2008; Scully i Bagan, 2009; Petti, 2009).

Konsumacija duvana i alkohola svakako su najzastupljeniji u etiologiji OPK-a. Ovi faktori direktno su povezani sa 65-70% (duvan), odnosno 20-35% (alkohol) slučajeva karcinoma usne duplje (La Vecchia i sar., 1997; Parkin, 2011a; Parkin, 2011b). Bitno je napomenuti da se rizik za nastanak oralnog karcinoma uvećava 8 do 15 puta ukoliko se duvan i alkohol konzumiraju zajedno (Blot i sar., 1988; Andre i sar., 1995; Castellsagué i sar., 2004; Hashibe i sar., 2009; Lubin i sar., 2011; Maasland i sar., 2014).

Na povećan rizik od pojave karcinoma usne duplje mogu uticati i određene geografske specifičnosti. Tako se žvakanje lista biljke betel (vrsta bibera) povezuje sa preko 50% dijagnostikovanih slučajeva oralnog karcinoma u regionima južne i jugoistočne Azije (Petti, 2009). Ishrana koja obiluje hranom bogatom šećerima i mastima, a u nedostatku voća i povrća takođe je prisutna kao faktor u 10-15% slučajeva karcinoma usne duplje (Petti, 2009).

Humani papiloma virus (HPV) najznačajniji je mikrobiološki agens koji se vezuje za nastanak karcinoma orofaringealne regije, ukazujući na činjenicu da osobe koje često menjaju seksualne partnere, naročito u mlađem dobu, imaju povećan rizik za nastanak oboljenja (Scully, 2002; D'Souza i sar., 2007). Loša oralna higijena i posledične infekcije u usnoj duplji doprinose razvoju patoloških promena koje mogu dovesti do pojave oralnog karcinoma (Zheng i sar., 1990). Značajan broj studija ukazuje na potencijalnu ulogu prisustva pojedinih gljivičnih i bakterijskih infekcija- kandidijaza i sifilis (Trieger i sar., 1958; Cawson i Binnie, 1980; Parkin i sar., 2005). Ustanovljeno je da je rizik za nastanak oralnog karcinoma kod pacijenata koji su redovno posećivali stomatologa bio niži za 62% (Holmes i sar., 2009). Sa druge strane, periodontalna bolest, gubitak zuba i neadekvatni stomatološki radovi (proteze) mogu takođe biti povezani sa razvojem neoplastičnih promena u usnoj duplji (Meyer i sar., 2008; Oji i Chukwuneke, 2012; Rajesh i sar., 2013; Goyal i sar., 2014).

Pored svega navedenog, treba istaći i da svako stanje imunosupresije organizma i prisustva sistemskih bolesti (diabetes mellitus, eritematozni lupus, skleroderma i dr.) povećava i rizik za pojavu malignih neoplazmi, u čemu oralna sredina ne predstavlja izuzetak (Derk i sar., 2005; Dikshit i sar., 2006).

1.3.3.1. | Duvan i oralni karcinom

Danas je poznato da jekonzumacija duvana, tj. pušenje, žvakanje, žvakanje u kombinaciji sa betelom ("betel quid"), nedobrovoljno pušenje, najodgovornija za nastanak oralnog karcinoma (La Vecchia i sar., 1997; Scully i Bagan, 2009; Parkin, 2011a). Rizik za pojavu oboljenja je 2 do 12 puta veći kod osoba koje konzumiraju duvan u poređenju sa nepušačima, dok je rizik kod nepušača koji su izloženi duvanskom dimu (nedobrovoljno pušenje) takođe uvećan, i to za 87% (Blot i sar., 1988; Jovanovic i sar., 1993; Mashberg i sar., 1993; Lee i sar., 2009). Neke studije ukazuju da se prestankom pušenja, potencijal za razvoj karcinoma usne duplje umanjuje za 35% kod osoba koje su to učinile pre 4 godine, dok se rizik kod onih koji ne puše preko 20 godina ne razlikuje u odnosu na nepušače (Marron i sar., 2010). Kada je reč o konzumiranju "bezdimnog" duvana relativni rizik za nastanak oralnog karcinoma zavisi od odnosa kancer promovišućih i kancer inhibišućih sastojaka. Tako proizvodi na bazi vlažnog duvana imaju nizak potencijal za razvoj karcinoma usne duplje (Janbaz i sar., 2014).

Mehanizam delovanja duvana na oralna tkiva izuzetno je složen i obuhvata niz hemijskih procesa na molekularnom nivou. Duvanski dim u kombinaciji sa toplotom dovodi do oslobađanja elemenata koji mogu promovisati razvoj kancera (Miloro i sar., 2004; Lee i sar., 2012). Ovi elementi (benzopireni, nitrozamini, aromatični amini) se inicijalno ponašaju kao pre-kancerogeni, da bi se u interakciji sa oksidativnim enzimima tkiva transformisali u agens koji uspostavljanjem kovalentne veze sa DNK tkiva dovodi do mutacije (Parise, 2000). Kao dodatni produkt metabolizma, dolazi do oslobađanja slobodnih radikala sa velikim brojem nesparenih elektrona. Sa visokim nivoom reaktivnosti koji poseduju, oni takođe podstiču mutacije koje idu u prilog patološkoj transformaciji zdravog tkiva (Parise, 2000).

U slučaju "bezdimnog" duvana, najznačajniju grupu potencijalno kancerogenih sastojaka čine N-nitrozamini (Janbaz i sar., 2014). Oslobađanjem slobodnih radikala mogu dovesti do narušavanja anti-oksidativne odbrane u ćelijama oralnog tkiva, što se manifestuje njihovim povećanim brojem u tkivima oralnih prekanceroza i oralnog karcinoma (Choudhari i sar., 2014).

1.3.3.2. | Alkohol i oralni karcinom

Konzumacija alkohola nesumnjivo doprinosi patološkoj alteraciji tkiva auto-digestivnog trakta, a naročito je to izraženo u pogledu usne duplje. Kao faktor, alkohol je prisutan u oko 30% pacijenata sa dijagnostikovanim oralnim karcinomom (Parkin, 2011b). U kombinaciji sa konzumacijom duvana značajno uvećava rizik za pojavu oboljenja (Blot i sar., 1988; Andre i sar., 1995; Castellsagué i sar., 2004; Hashibe i sar., 2009; Lubin i sar., 2011; Maasland i sar., 2014). Iako nije poznato koja količina i koncentracija alkohola u piću na dnevnom nivou najnepovoljnije utiče na tkiva usne duplje, utvrđeno je da je uticaj bio deset puta izraženiji kod osoba koje su konzumirale 170g viskija dnevno u poređenju sa onima koji retko konzumiraju alkoholna pića (Wynder i sar., 1957).

Hemijski efekat alkohola ogleda se u podsticanju dejstva drugih kancerogenih agensa na tkiva usne duplje (McCoy, 1978). Alkohol povećava permeabilnost tkiva razlaganjem lipidnih komponenata epitela dovodeći do njegove atrofije i modifikacija u sintezi DNK (Reidy i sar., 2011). Uz negativan uticaj na normalno odvijanje metaboličkih procesa u ćelijama oralnog epitela, može ispoljavati i mutageno dejstvo (McCoy, 1978; Reidy i sar., 2011). Sve ovo dovodi do pada odbrambenih sposobnosti oralnog tkiva, koja tako postaju sklona infekcijama i patološkim promenama (Reidy i sar., 2011).

1.3.3.3. | Potencijalno maligna oboljenja u usnoj duplji

Prema preporukama radne grupe Svetske Zdravstvene Organizacije iz 2005., sve oralne lezije sa predispozicijom maligne transformacije klasifikuju se kao "potencijalno maligna oboljenja". Jedinstvenom terminologijom obuhvaćene su sve prekancerozne lezije izolovanog tj. lokalnog porekla, kao i prekancerozna stanja povezana sa sistemskim stanjem organizma (Warnakulasuriya i sar., 2007). Prekancerozne lezije definišu se kao "morfološki izmenjeno tkivo u kojem je verovatnoća razvoja oralnog kancera značajno veća u odnosu na normalno tkivo istog sastava". Prekancerozno stanje predstavlja "sistemsko stanje organizma udruženo sa značajno većim rizikom za pojavu kancera" (World Health Organization, 1973).

U prekanceroznim lezijama, tkivo usne duplje može u histopatološkom smislu pokazivati različit stepen transformacije. Novija kategorizacija ovih promena primenjuje binarni sistem klasifikovanja navedenih promena u displaziju niskog i displaziju visokog stepena (tabela 1) (El-Naggar i sar., 2017).

Tabela 1. Kategorizacija patološke transformacije tkiva u usnoj duplji (Preuzeto i prilagođeno iz El - Naggar i sar., 2017)

histopatološki stadijum (2017)	histopatološki stadijum (2005)	karakteristike
displazija niskog stepena	hiperplazija	akantoza u spinoznom sloju, hiperplazija u bazalnom; nije prisutna ćelijska atipija; očuvana arhitektura tkiva
	displazija niskog stepena	poremećaj arhitekture u donjoj 1/3 epitela; pojava ćelijske atipije
displazija visokog stepena	displazija srednjeg stepena	poremećaj arhitekture proširen na srednju 1/3 epitela; izraženija ćelijska atipija
	displazija visokog stepena	više od 2/3 epitela poremećene arhitekture; izraženija ćelijska atipija
	carcinoma <i>in situ</i>	arhitektura poremećena celom ili gotovo celom debljinom epitela; veoma izražena ćelijska atipija

U tom pogledu, razlikujemo hiperplaziju - povećan broj ćelija spinoznog (akantoza) ili bazalnog sloja epitela usne duplje (hiperplazija bazalnih ćelija) bez prisustva ćelijske atipije, i displaziju tkiva - poremećaj tkivne arhitekture praćen ćelijskom atipijom. U odnosu na opseg zahvaćenosti epitelnog sloja i stepena prisutne ćelijske atipije moguće je identifikovati displaziju niskog, srednjeg i visokog stepena. U trenutku kada je epitelni sloj zahvaćen celom ili gotovo celom debljinom sa izraženom atipijom ćelija koja je istih karakteristika kao i kod malignog tumora (hiperhromatična jedra i iregularan raspored), promena se definiše kao karcinom *in situ* (van der Waal, 2009; Barnes i sar., 2005). U najznačajnije i najčešće prekancerozne lezije ubrajaju se leukoplakija i eritroplakija (Scully i Bagan, 2009).

Leukoplakija se definiše kao "bela naslaga upitnog rizika u trenutku kada je isključeno prisustvo oboljenja i poremećaja za koje je poznato da ne poseduju rizik za nastanak kancera" (Warnakulasuriya i sar., 2007). Klinički, moguće je dijagnostikovati dva tipa leukoplakije koja mogu zahvatiti bilo koji lokalitet usne duplje - homogena i nehomogena leukoplakija. Prva se karakteriše kao ravna, uniformna i tanka bela naslaga, dok se druga definiše kao belo-crvena lezija koja može biti iregularno ravna (eng. *speckled*) ili nodularne građe (van der Waal, 2009). U nehomogene leukoplakije ubraja se i verukozna leukoplakija, čiji proliferativni tip poseduje visok potencijal maligne transformacije (Hansen i sar., 1985; Cabay i sar., 2007; van der Waal i Reichart, 2008). Histopatološki, razlikuju se leukoplakija sa i bez prisustva displazije, u odsustvu ili prisustvu ćelijske atipije (van der Waal, 2009). Leukoplakija se najčešće pojavljuje na vermilionu donje usne, obrazima i gingivi, dok su displastični oblici leukoplakije sa većim stepenom rizika za nastanak oralnog karcinoma prisutniji na jeziku i u predelu poda usne duplje (Waldron i Shafer, 1975; Silverman i sar., 1976; Banoczy, 1977; Silverman i sar., 1984). Najznačajniji faktori koji utiču na potencijalnu malignu transformaciju leukoplakije obuhvataju: ne-homogenu tipizaciju, veličinu preko 200mm², prisustvo Candide Albicans, njeno dugotrajno prisustvo, pojavu kod žena, idiopatsku leukoplakiju, pojavu na jeziku i podu usne duplje i prisustvo epitelne displazije (van der Waal, 2009).

Eritroplakija se definiše kao "vatreno crvena mrlja koja se klinički i patološki ne može karakterisati kao niti jedno drugo poznato oboljenje" (Pindborg i sar., 1997). Eritroplakija može biti ravna ili blago udubljena, glatke ili granularne površine (van der Waal, 2009). Uglavnom se pojavljuje kao izolovana lezija i može zahvatiti bilo koji lokalitet orofaringealne regije. Eritroplakija uvek pokazuje izvestan stepen displazije, a često se može dijagnostikovati i kao karcinom *in situ*, a ponekad i kao invazivni karcinom (Shafer i Waldron, 1975). U većini identifikovanih slučajeva dolazi do maligne transformacije (van der Waal, 2009).

Od prekanceroznih stanja koja se manifestuju u usnoj duplji i poseduju izvestan rizik za nastanak oralnog karcinoma izdvajaju se lihen planus i oralna submukozna fibroza.

Oralni lihen planus (OLP) zahvata sluzokožu usne duplje, najčešće obraza, jezika i gingive (Scully i Carrozzo, 2008; van der Waal, 2009). Ovo oboljenje je autoimunog karaktera i klinički se ispoljava kao beličaste strije koje podsećaju na paukovu mrežu sa mogućim izraženim crvenilom usled ulceracija i plikova (Thorn i sar., 1988; Epstein i sar., 2003). U odnosu na eritroplakiju koja je izolovanog karaktera, lezije u okviru OLP-a raspoređene su simetrično i bilateralno (van der Waal, 2009). Postoji nekoliko formi OLP-a: retikularna, papularna, pločasta, erozivna, atrofična i bulozna (van der Waal, 2009). Prve tri su obično bezbolne, dok su ostale praćene bolnim simptomom pečenja u ustima (van der Waal, 2009). Iako postoje oprečna mišljenja o riziku koji prisustvo OLP-a predstavlja za nastanak oralnog karcinoma, u manje od 1% dijagnostikovanih slučajeva OLP-a na godišnjem nivou dolazi do maligne transformacije (Gandolfo i sar., 2004; van der Waal, 2009).

Oralna submukozna fibroza je hronično oboljenje koje karakteriše fibroza zastornog epitela usne duplje i manifestuje se atrofijom epitela i povećanim gubitkom mobilnosti tkiva uz prisustvo simptoma pečenja, stezanja i sijanja oralne mukoze (Warnakulasuriya i sar., 2007; van der Waal, 2009). U prisustvu kancerogena, atrofični epitel pokazuje povećan nivo rizika za nastanak oralnog karcinoma (van der Waal, 2009). Dosadašnja istraživanja pokazuju da stepen maligne transformacije na godišnjem nivou u proseku iznosi oko 0,5% (Murti i sar., 1985).

1.3.4. | Oralni planocelularni karcinom - karcinogeneza

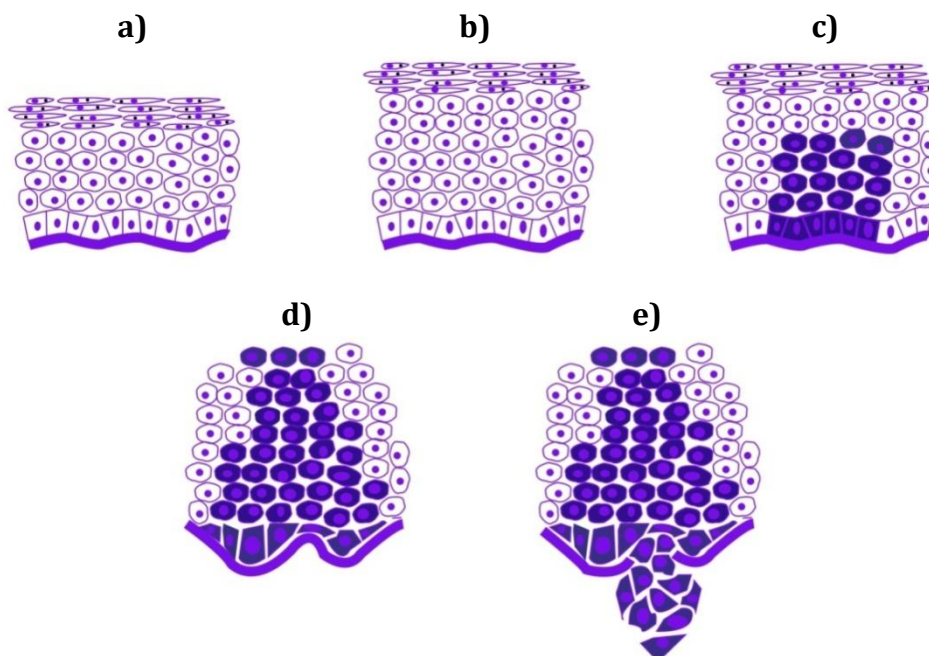
Oralni karcinom rezultat je hroničnog delovanja različitih faktora koji podstiču procese genetskih alteracija u ćelijama oralnog epitela (Tanaka i Ishigamori, 2011; Fukuda i sar., 2012). Smatra se da su u nastanku oralnog karcinoma uključene promene na hromozomima u preko 100 gena (Roepman i sar., 2005). Najznačajnije su svakako one na TP53 genu, receptoru epidermalnog faktora rasta (EGFR), inhibitoru ciklin-zavisne kinaze 2A (CDKN2A), protein prenosiocu signala i aktivatoru transkripcije STAT3 i ciklinu D1 (Curry i sar., 2014). Povećano nakupljanje hipoksijom indukovano faktora (HIF)-1alfa koje se vezuje za mutacije u mitohondrijskoj DNK kod OPK-a takođe igra bitnu ulogu u njegovom razvoju (Ha Pk i sar., 2009).

Navedene alteracije dovode do poremećaja normalnog ćelijskog ciklusa, njene diferencijacije i "programirane" smrti kao i do poremećaja u reparaciji DNK. Na ovaj način, ćelije oralnog epitela postaju nestabilne i poprimaju osobine koje vremenom dovode do potpune transformacije u malignu neoplastičnu ćeliju (Feller i sar., 2013). Kao posledica dolazi do razvoja neoplastičnog tkiva koga karakterišu neograničeni replikativni potencijal, sopstveni faktori rasta, neoskupljivost na inhibiciju rasta, izbegavanje "programirane" ćelijske smrti, proliferacija krvnih sudova (angiogeneza) i sposobnost invazije i metastaziranja (Hanahan i Weinberg, 2000; Pickup i sar., 2014). U njegovom daljem razvoju značajnu ulogu ima i sadržaj mikrosredine samog tumora (Rivera i Venegas, 2014). U njoj mogu biti prisutni kancer-karakteristični fibroblasti (CAFs), citokini, elementi epitelijalno mezenhimalne tranzicije (EMT) kao i povećana koncentracija slobodnih radikala (eng. *reactive oxygen species* - ROS) (Cavallo i sar., 2011). Kancer-karakteristični fibroblasti (eng. *cancer-associated fibroblasts* - CAFs) posebno su značajni elementi tumorskog tkiva koji podstiču njegovu proliferaciju i invazivnu prirodu dok povećana akumulacija citokina doprinosi imunosupresiji i epitelijalno mezenhimalnoj tranziciji (Hanahan i Weinberg, 2011; Cavallo i sar., 2011). Uz navedene faktore, u tkivima oralnog planocelularnog karcinoma prisutna je i više ili manje izražena inflamacija kao i hipoksija koje pospešuju procese proliferacije krvnih sudova i metabolizma u njima (Hanahan i Weinberg, 2011).

Iako za oralne karcinome ne postoji specifičan biomarker, određeni markeri poput E-kadherina, N-kadherina, citokeratina, vimentina i dr. mogu se nalaziti u mikrosredini samog tumora (Curry i sar., 2014). Novija istraživanja kao potencijalne biomarkere za oralni karcinom nameću interleukin 8 (IL-8) i interleukin 1beta (IL-1 β) (Elashoff i sar. 2012; Gleber-Netto i sar., 2016).

1.3.5. | Histopatološki aspekt oralnog planocelularnog karcinoma

Kao i u slučaju promena na molekularnom nivou, tako se i patološka transformacija normalnih ćelija oralnog epitela odvija postepeno i u više faza (slika 8).



Slika 8. Patološka transformacija oralnog epitela u oralni planocelularni karcinom. **a)** normalan epitel **b)** hiperplazija **c)** displazija **d)** carcinoma *in situ* **e)** invazivni karcinom

U procesima displazije koji mogu dovesti do nastanka oralnog karcinoma dolazi do ugrožavanja tkivne strukture i promena na ćelijskom nivou, kao što je prikazano u tabeli 1 (van der Wall, 2009; El-Naggar i sar., 2017). U trenutku kada se displastično tkivo proteže skoro čitavom širinom oralnog epitela i uz prisutnu atipičnost ćelija, lezija se definiše kao karcinom *in situ* (Barnes i sar., 2005). Narušavanjem integriteta bazalne membrane karcinom poprima invazivni karakter, dolazi do njegovog širenja u dublje slojeve lamine proprie i submukoznog tkiva i posledične stromalne reakcije (Barnes i sar., 2005; Kumar i sar., 2009). Upravo invazivna priroda i različit stepen skvamozne diferencijacije označavaju maligni potencijal OPK-a (Pindborg i sar., 1997; Barnes i sar., 2005; Rivera i sar., 2011).

Uzimajući u obzir stepen diferencijacije neoplastičnih ćelija oralni planocelularni karcinomi klasifikuju se u dobro, srednje i slabo diferentovane. Dobro diferentovani OPK čine ćelije slične ćelijama normalnog oralnog epitela. Srednje diferentovani čine ćelije koje pokazuju različit stepen jedarnog pleomorfizma i mitotskih aktivnosti uz prisustvo patoloških mitoza i smanjenom keratinizacijom u poređenju sa normalnim ćelijama. Slabo diferentovani sastoji se od ćelija koje su pretežno nediferentovane, sa velikim brojem tipičnih i atipičnih mitoza i slabo izraženom keratinizacijom (Pindborg i sar., 1997; Barnes i sar., 2005).

Invazivna priroda, odnosno invazivni front tumora, predstavlja deo tumora sa najvećom dubinom invazije i najizraženijem potencijalom za širenje u okolne strukture

(Barnes i sar., 2005; Wang i sar., 2009). Karakterišu ga određen stepen keratinizacije, jedarni pleomorfizam, limfocitna infiltracija i način širenja - ekspanzivni, infiltrativni, oba (Kurokawa i sar., 2005; Bryne i sar., 2005; Barnes i sar., 2005). Ekspanzivni tip širenja obuhvata velike "plaže" tumora sa jasno definisanim granicama prema okolnom tkivu, dok se infiltrativni odlikuje snopovima tumorskih ćelija nepravilnog izgleda ili invazijom pojedinačnih tumorskih ćelija nejasnih granica prema okolini (Bryne i sar., 2005; Dissanayaka i sar., 2012). Invazivni front tumora smatra se najreprezentativnijim delom tumorskog tkiva, što potvrđuju i jasne razlike u njegovoj molekularnoj strukturi u poređenju sa površinskim slojevima tumora (Kurokawa i sar., 2005; Bänkfalvi i Piffkò, 2000).

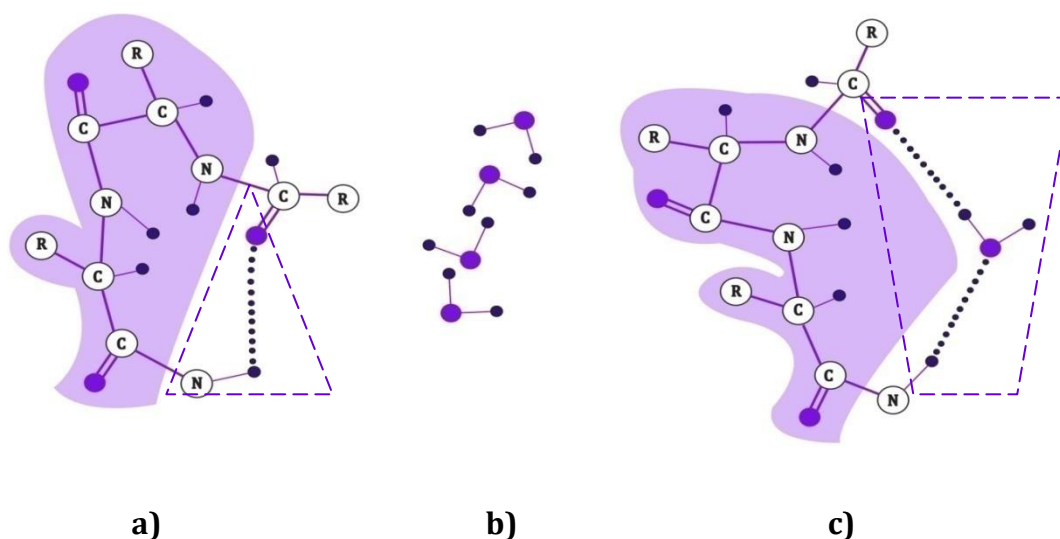
Kao posledica širenja OPK-a javlja se reakcija okolnog tkiva sa kojim ćelije karcinoma stupaju u interakciju. Kao rezultat dolazi do formiranja ranije pomenute mikrosredine tumora u kojoj dominantnu ulogu igraju kancer-karakteristični fibroblasti (Barnes i sar., 2005; Koontongkaew, 2013). Pored njih, mogu biti prisutni i miofibroblasti, endotelijalne ćelije, periciti, neutrofilni, eozinofili, bazofili, T i B limfociti, mast ćelije, NK (eng. *natural killer*) ćelije, makrofagi i dr. (Rivera i Venegas, 2014). Smatra se da kancer-karakteristični fibroblasti u potpunosti menjaju strukturu normalnog ekstracelularnog matriksa doprinoseći invazivnom potencijalu tumorskih ćelija na molekularnom nivou (Koontongkaew, 2013). Pojedina istraživanja ukazuju i na ulogu koju proces već pomenute epitelijalno mezenhimalne tranzicije potencijalno ima u invazivnosti i metastaziranju OPK-a (Thiery, 2002). Ovaj proces podrazumeva potpunu transformaciju epitelinih ćelija u mezenhimalne fibroblastima slične ćelije. Epitelne ćelije gube svoj polaritet, dolazi do raskidanja međućelijskih veza, reorganizacije organela, povećane mobilnosti, lokalne invazije i metastaziranja (Thiery i Sleeman, 2006). Još jedna bitna karakteristika tumorskog tkiva, kao i preduslov dalje progresije oralnog karcinoma jeste endotelijalna proliferacija i stvaranje novih krvnih sudova, tj. angiogeneza. Ona predstavlja neophodnu osnovu ishrane i razvoja kancera (Choi i Myers, 2008).

1.3.6. | Biohemijski aspekt oralnog planocelularnog karcinoma

Voda

Kod ljudi, voda čini oko 50, 60% ukupne telesne mase (Strauss, 1957; Edelman i Leibman, 1959). Kao takva predstavlja osnovnu komponentu normalnog odvijanja biohemijskih i fizioloških procesa u ljudskom organizmu (Pollard i sar., 2008). Posebno je značajna njena uloga u povezivanju makromolekula - proteina i lipida (izgradnja fosfolipidnog sloja) kao i sintezi i degradaciji proteina i nukleinskih kiselina (Chaplin, 2001; Albiser i sar., 2001; Pollard i sar., 2008). Svoju funkciju ostvaruje uspostavljanjem nekovalentnih vodoničnih veza između pozitivno naelektrisanog vodonika i negativno naelektrisanih elemenata, najčešće kiseonika i azota, što je od važnosti za stabilizaciju strukture proteina (α -heliks) i DNK (Pollard i sar., 2008). Pored vodoničnih veza, za normalno funkcionisanje ćelija i tkiva značajni su i hidrofobni efekat vode (kreiranje glicerofosfolipidnog dvosloja), kao i Van der Valsove (eng. *Van der Waals*) interakcije koje se dešavaju na nivou atoma komplementarnih molekula koji se nalaze na maloj međusobnoj udaljenosti (Pollard i sar., 2008).

Efekat vode na stabilnost proteina najbolje se ogleda u stanju vodonične veze kod proteina u osnovnom ("stabilnom") i proteina u ekscitiranom stanju (slika 9) (Nossal i Lecar, 1991).



Slika 9. Uticaj molekula vode na strukturu i funkcionalnost proteina. **a)** osnovno stanje proteina **b)** višak molekula vode u medijumu **c)** promena konformacione strukture proteina usled vezivanja jednog od prisutnih molekula vode – prelazak u ekscitirano stanje

U čovekovom telu voda se nalazi intracelularno (65%) i ekstracelularno (35%) (Chumlea i sar., 1999). Istraživanja ukazuju da se unutar ćelije molekuli vode organizuju u vodene lance i klastere - kristalasto ("gelasto") stanje (Pollack, 2001; Ho i sar., 2006; Koruga, 2017). Ovakva sredina mesto je izuzetne ćelijske aktivnosti gde dolazi kako do vezivanja tako i do otpuštanja vode i faza u kojima su molekuli vode međusobno vezani većim (niska gustina), odnosno manjim (visoka gustina) brojem vodoničnih veza (Wiggins, 1996; Fullerton i sar., 2006). S tim u vezi, različite faze podrazumevaju i različitu hidrataciju i metabolizam unutar ćelija (Chaplin, 2006). Upravo se povećana hidratacija ćelije smatra jednim od okidača karcinogeneze, kao i faktorom u procesima rasta i metastaziranja tumora (McIntyre, 2006; McIntyre, 2007). Potencijalno objašnjenje leži u povećanoj potrebi ćelije kancera za nutritivnim faktorima koji joj omogućavaju dalji razvoj. Veća količina slobodne vode ubrzava njenu aktivnost, a posebno respiraciju, i obezbeđuje joj primat u ishrani u odnosu na zdrave ćelije (Chaplin, 2006). U prilog navedenom govore i istraživanja sprovedena primenom magnetne rezonantne tomografije (MRT) i teraherc spektroskopije u kojima je potvrđen veći sadržaj vode u ćelijama kancera pluća, grlića materice i kože (Boyd i sar., 2010; Wang i sar., 2010; Yu i sar., 2012). Veća količina slobodne vode takođe je prisutna i u tkivima oralnog karcinoma. Primenom Ramanove spektroskopije utvrđena je jasna razlika u koncentraciji vode između tkiva oralnog planocelularnog karcinoma i zdravog tkiva sa senzitivnosti od 99% i specifičnosti od 92% (Barroso i sar., 2015). Istom metodom došlo se i do rezultata koji ukazuju da se sadržaj vode smanjuje pomeranjem polja interesovanja od tumorskog ka zdravom tkivu (Barroso i sar., 2016).

Proteini

Kao najvažnije komponente u ćelijama ljudskog organizma, proteini predstavljaju kombinaciju 20 aminokiselina povezanih peptidnim vezama u jedan ili više polipeptida. U zavisnosti od naelektrisanja aminokiselina u njima, proteini lakše ili teže formiraju vodonične veze sa molekulima vode. Kao što je navedeno, interakcija sa vodom je posebno bitna u procesu stabilizacije sekundarne strukture proteina (Pollard i sar., 2008). Na ovaj način proteini koji ulaze u sastav ćelijskih sistema ostvaruju svoju punu funkcionalnost. U karcinogenezi, a shodno tome i u vezi sa razvojem oralnog planocelularnog karcinoma, proteini su izloženi patološkim procesima koji menjaju njihovu strukturu, a samim tim i ulogu koju imaju (Chaplin, 2006; Nossal i Lecar, 1991). Najvažniji među njima su kolagen (tip IV), e-kadherin i integrini (Choi i Myers, 2008; Rivera i Venegas, 2014).

Kolagen tipa IV po strukturi je α -heliks, što govori o značaju koji za njegovu stabilnost imaju molekuli vode i vodonične veze koje se ostvaruju unutar polipeptidnog lanca. Ovaj protein najznačajniji je gradivni element bazalne membrane i obezbeđuje njen integritet i strukturu (Yurchenco i O'Rear, 1994; Ninomiya i sar., 1995; Kadler i sar., 2008; Pollard i sar., 2008). Razgradnjom kolagena tipa IV u kojoj učestvuju proteolitički enzimi matriks-metaloproteinaze (MMP-2, MMP-9), u bazalnoj membrani stvaraju se kanali za prodor tumorskih ćelija (Duffy i sar., 2008; Kessenbrock i sar., 2010). Kao posledica dolazi do njene degradacije i infiltracije dubljih tkivnih struktura kancerom, kao i posledičnog metastaziranja (Duffy i sar., 2008). Do sada, više studija potvrdilo je ulogu koju razgradnja kolagena tipa IV ima u progresiji oralnog karcinoma (de Vicente i sar., 2005; Fan i sar., 2012; Tamamura i sar., 2013).

E-kadherin je najznačajniji transmembranski glikoprotein koji obezbeđuje blizak kontakt ("priljubljenost") ćelija u tkivu (Halbleib i Nelson, 2006; Choi i Myers, 2008). Smanjeno prisustvo e-kadherina tokom karcinogeneze dovodi do povećane pokretljivosti tumorskih ćelija i podiže njihov invazivni kapacitet (Takeichi, 1991; Gumbiner, 1996). Nizak nivo e-kadherina povezan je sa lošijom prognozom i lokalnim metastazama kod oralnog karcinoma (Diniz-Freitas i sar., 2006; Lim i sar., 2004).

Integrini su još jedan tip transmembranskih glikoproteina čiji sadržaj opada u tkivima OPK-a u poređenju sa normalnim tkivom (Jones i sar., 1993; Cortesina i sar., 1995). Ova grupa proteina učestvuje u procesima proliferacije, diferencijacije i migracije ćelija (Thomas i Speight, 2001).

Lipidi

Lipidi su molekuli koji čine osnovu svih bioloških membrana, odgovorni su za održavanje proteina na površinama membrana, skladištenje energije i prenos informacija unutar i van ćelije. Najzastupljeniji tip lipida su fosfogliceridi koji ulaze u sastav ćelijske membrane. Sami fosfogliceridi su delom hidrofobni, a delom hidrofilni. Shodno navedenom, sastavljeni su od komponenata koje variraju od pozicija pozitivnog do pozicija negativnog naelektrisanja. Osim fosfoglicerida u membranama su još prisutni sfingolipidi, steroli, glikolipidi i trigliceridi (Pollard i sar., 2008).

Odnos sadržaja proteina i lipida u zdravom i tkivu oralnog planocelularnog karcinoma jedan je od glavnih biohemijskih pokazatelja razlika dva tkiva. Primenom Ramanove spektroskopije došlo se do zaključka da se u tkivima oralnog planocelularnog karcinoma nalazi značajno viši nivo proteina, dok u zdravom tkivu preovlađuju lipidi (Malini i sar., 2006;

Deshmukh i sar., 2011; Singh i sar., 2012; Guze i sar., 2015). Smatra se da ćelije oralnog karcinoma sadrže više površinskih proteina - receptora, enzima, antigena i antitela (Malini i sar., 2006). U Ramanovom spektru ovako izmenjene membranske građe tumorske ćelije preovlađuju pre svega amidni regioni (amid I i III) što i ukazuje na dodatni sadržaj proteina. U Ramanovom spektru normalnog ("zdravog") tkiva na istim mestima preovlađuju fosfogliceridi, ukazujući na normalnu strukturu ćelijske membrane (Malini i sar., 2006; Deshmukh i sar., 2011; Singh i sar., 2012; Guze i sar., 2015).

1.3.7. | Klinička slika oralnog planocelularnog karcinoma

U kombinaciji različitih simptoma, kao i samog izgleda promene na površini oralne sluzokože, klinička slika oralnog planocelularnog karcinoma se u najboljem slučaju može opisati kompleksnom i varijabilnom (Shah i sar., 2012). Prvi korak u identifikaciji promena suspektih na OPK jeste adekvatna inspekcija usne duplje i vrata. U mnogim slučajevima, dok se nalazi u početnom, lokalizovanom stadijumu, OPK nije praćen znacima i simptomima koji bi se vizuelno mogli uočiti (Lehew i sar., 2010). Pojavu pojedinačnih izraslina, crvenih mrlja, nepravilnih beličastih i crveno-beličastih naslaga prisutnih duže od tri nedelje, ekstrakcionih rana koje ne zarastaju, bola ili utrnulosti, kao i ulceracija izdignutih ivica trebalo bi smatrati manifestacijama OPK-a, dok se ne dokaže suprotno. Takođe, prisustvo uvećanih limfnih čvorova vrata u ranim stadijumima bolesti može ukazati na već prisutne metastaze primarnog OPK-a. U kasnijim fazama, na OPK je moguće posumnjati usled klaćenja zuba koji se ranije nisu klatili, protetskih radova koji su bez jasnog razloga neadekvatno pozicionirani, bola u ušima i ograničenog ili onemogućenog otvaranja usta (*trismus*). U razgovoru sa pacijentima kod kojih postoji sumnja na OPK takođe se dobijaju i informacije o teškoćama i bolu prilikom govora i gutanja, poremećaju čula ukusa kao i neprijatnom zadahu iz usta (*foetor ex ore*) (Mashberg i Samit, 1995; Miloro i sar., 2004; Brandizzi i sar., 2008; Scully i Bagan, 2009).

U odnosu na rast tumora, moguće je razlikovati tri kliničke forme - ulceroznu, egzofitičnu i endofitičnu (Greene i sar., 2002a). Ulcerozna forma odlikuje se ulceracijom čvrstog induriranog dna i izdignutih i nepravilnih ivica na koju se često nadovezuje infekcija. Može biti udružena sa endofitičnim rastom tumora, koji infiltriše veću količinu mekog tkiva ispod same površine suspektne regije. Sa druge strane, egzofitični oblik lezije manifestuje se "karfiolastim izraštajem" (papilomatozni tip) često prekrivenim beličastim naslagama ili ravnim ružičasto-belim proliferativnim mrljama. Papilomatozni tip promene može pokazivati različit stepen keratinizacije, tj. biti prekriven većom ili manjom količinom beličastog keratina koji potencijalno može maskirati obim, granice i invazivni potencijal OPK-a. Prisustvo krvarenja u ovim lezijama posebno je indikativno i može ukazati na prisustvo maligne neoplazije (Gavrić i sar., 2001; Shah i sar., 2012).

Lokalizacija OPK-a je još jedan značajan faktor u kliničkoj evaluaciji same promene, jer zahvaćenost različitih anatomskih regiona u usnoj duplji povlači za sobom i specifičnosti zahvaćenog tkiva (Greene i sar., 2002b). Ove specifičnosti obuhvataju izgled, veličinu, debljinu, oblik, granice, teksturu, tvrdoću, pokretljivost, kao i odnose same lezije sa okolnim mišićnim, žlezdanim, masnim i koštanim tkivnim strukturama (Shah i sar., 2012). S obzirom da OPK prvenstveno metastazira limfnim putem u regionalne limfne čvorove vrata, na osnovu lokalizacije primarnog OPK-a može se utvrditi i potencijalni put metastaziranja oralnog karcinoma (Miloro i sar., 2004; Shah i sar., 2009). Najčešće su oralnim planocelularnim karcinomom zahvaćeni jezik i pod usne duplje (slika 10) (de Camargo Cancela i sar., 2010).



Slika 10. Zahvaćenost tkiva oralnim karcinomom u odnosu na anatomske regione usne duplje (de Camargo Cancela i sar., 2010)

Zatim slede usne, gingiva, obrazna mukoza, retromolarni trougao i tvrdo nepce (slika 10). Ovakav raspored uglavnom se odnosi na zemlje Severne Amerike i Evrope. U azijskom regionu zastupljeniji su OPK obrazne sluzokože i retromolarnog trougla (Shah i sar., 2001; de Camargo Cancela i sar., 2010).

OPK jezika obuhvata oko 40% od ukupnog broja dijagnostikovanih slučajeva oralnog karcinoma (Chen i sar., 1991; Worrall, 1995; Antunes i sar., 2001; Shah i sar., 2001; de Camargo Cancela i sar., 2010). Limfna drenaža jezika prvenstveno je usmerena ka nivou II, a zatim nivou III i I limfnih čvorova vrata. OPK jezika može dati metastaze ipsilateralno (bočne strane jezika) i bilateralno (vrh i telo jezika) (Shah i sar., 1990). Metastaze u limfnim čvorovima vrata prisutne su kod 40% pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze (Spiro, 1985).

OPK poda usne duplje javlja se u 8 do 25% slučajeva (Chen i sar., 1991; Worrall, 1995; Antunes i sar., 2001; Shah i sar., 2001; de Camargo Cancela i sar., 2010). Limfna drenaža vrši se bilateralno (prednji deo poda usta) u submandibularne limfne čvorove (Nivo I) i ipsilateralno u duboke limfne čvorove vrata (Nivo I, II i III). Metastaze u limfnim čvorovima vrata prisutne su kod 50 do 60% pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze (Shaha i sar., 1984).

OPK sluzokožnog dela usana javlja se u 2 do 25% slučajeva (Chen i sar., 1991; Shah i sar., 2001; Cooper i sar., 2009; de Camargo Cancela i sar., 2010). Metastaze u limfnim čvorovima vrata prisutne su kod 10% do 20% pacijenata češće kod onih sa OPK gornje usne (Jorgensen i sar., 1973; Bucur i Stefanescu, 2004; Ozturk i sar., 2015). Kod donje usne metastaze su zastupljenije u limfnim čvorovima nivoa I u poređenju sa limfnim čvorovima nivoa II, dok je kod gornje usne obratno (Zitsch i sar., 1993).

OPK gingive nastaje u 2 do 18% pacijenata, i pretežno se javlja u donjoj vilici (Soo i sar., 1988; Chen i sar., 1991; Worrall, 1995; Gomez i sar., 2000; Shah i sar., 2001; Yoon i sar., 2007; de Camargo Cancela i sar., 2010). Ono što je posebno karakteristično za OPK gingive jeste podatak da je u trećini slučajeva prisutna infiltracija kosti, dok su metastaze u limfnim čvorovima vrata prisutne kod oko 25% pacijenata u trenutku dijagnostikovanja. Limfna drenaža gingivalne mukoze, kako donje tako i gornje vilice, vrši se u limfne čvorove vrata nivoa I i II (Soo i sar., 1988; Overholt i sar., 1996; Shah i sar., 1990; Gomez i sar., 2000).

OPK obrazne mukoze prisutan je u 2 do 10% slučajeva (Chen i sar., 1991; Diaz i sar., 2003; de Camargo Cancela i sar., 2010). Metastaze su prisutne prvenstveno u limfnim čvorovima vrata I, pa zatim II nivoa kod 10 do 27% pacijenata u trenutku dijagnostikovanja (Urist i sar., 1987; Shah i sar., 1990; Chhetri i sar., 2000; Diaz i sar., 2003).

OPK retromolarnog trougla obuhvata 2 do 12% od ukupnog broja obolelih (Chen i sar., 1991; Antunes i sar., 2001; Shah i sar., 2001; Mazziotti i sar., 2013; de Camargo Cancela i sar., 2010). Uglavnom su karcinomi na ovoj lokaciji povezani sa karcinomima prisutnim i u drugim regijama u usnoj duplji (Milorio i sar., 2004). Kod 27 do 56% pacijenata dolazi do metastaziranja u limfne čvorove vrata (Byers i sar., 1984; Kowalski i sar., 1993). Limfna drenaža je predominantno u nivo I-B i nivo II (Shah i sar., 1990).

OPK tvrdog nepca javlja se u 3 do 6% slučajeva (Chen i sar., 1991; Antunes i sar., 2001; Shah i sar., 2001; de Camargo Cancela i sar., 2010). Limfna drenaža vrši se u limfne čvorove vrata I i II nivoa. Sa metastazama se na prvom pregledu pojavi 10 do 25% obolelih (Chung i sar., 1980).

Kada je reč o udaljenim metastazama OPK-a, treba reći da su one izuzetno retke, ali da ukoliko do istih dođe, uglavnom se javljaju na plućima i u skeletnom sistemu. Kod prvog pregleda prisutne su kod 1% pacijenata (Gavrić i sar., 2001).

Osim detaljnog kliničkog pregleda, u postavljanju konačne dijagnoze OPK-a koriste se i dodatna sredstva, tehnike i metode.

Kada je reč o sredstvima, najčešće se u kliničkoj praksi koristi toluidin plavo. Ono je sa relativno visokom senzitivnosti i specifičnosti naročito primenjivo u dijagnostikovanju OPK-a u početnom stadijumu (Junaid i sar., 2012; Junaid i sar., 2013). Pod istim okolnostima, poslednjih godina koriste se i pojedine optičke metode poput VEL-Scope-a, koje sa visokom tačnošću razlikuju zdravo od patološki izmenjenog tkiva OPK-a (Poh i sar., 2006; Messadi, 2013). "Zlatni" standard u potvrđivanju prisustva OPK-a u usnoj duplji i dalje predstavlja histopatološka evaluacija hirurški uzetog uzorka suspektnog tkiva sa njegove primarne lokacije - biopsija. Procedura se obavlja u bolničkim uslovima i obično u lokalnoj anesteziji. U svakodnevnoj praksi najčešće se sprovode inciziona biopsija - uzima se uzorak najreprezentativnijeg dela lezije i uzorak okolne zdrave sluzokože i "punch" biopsija u kojoj se cilindričnim nožem uzima deo reprezentativnog tkiva (Milorio i sar., 2004; Shah i sar., 2012). Od izuzetnog je značaja da uzorak ne obuhvata nekrotično tkivo, jer se na taj način mogu kompromitovati rezultati histopatološke analize (Shah i sar., 2012). U praksi se još primenjuju eksciziona (lezije manje od 1cm u promeru), aspiraciona i sentinel biopsija (Milorio i sar., 2004; Kalmar, 2006). Kada je OPK zahvatio dublje strukture, npr. kost donje vilice ili u slučaju endofitičnog karcinoma jezika kada je potrebno utvrditi obim zahvaćenosti mekih tkiva, koriste se dopunske radiološke metode - kompjuterizovana tomografija (CT), magnetna rezonanca (MR) kao i sofisticiranije metode poput 3D kompjuterizovane tomografije

("Dentascan") i pozitron emisione tomografije - "PET scan" (Miloro i sar., 2004; Aulino i sar., 2006; Shah i sar., 2012; Arya i sar., 2014).

Kada su prikupljene sve neophodne informacije pristupa se TNM klasifikaciji primarnog OPK-a po kriterijumima Američkog udruženja za borbu protiv kancera (eng. *American Joint Committee on Cancer - AJCC*) (Greene i sar., 2002). Prema standardima osmog izdanja vodiča za određivanje stadijuma kancera (eng. *AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition, 2017*) klasifikacija kancera u usnoj duplji se vrši po sledećoj nomenklaturi: slovom "T" obeležava se tumor, slovom "N" regionalni limfni čvor, a slovom "M" udaljene metastaze (Amin i sar., 2017).

Tx - primarni tumor se ne može ustanoviti; Tis - Carcinoma *in situ*; T1 - tumor veličine do 2cm, dubina invazije (eng. *depth of invasion - DOI*) do 5mm; T2 - tumor veličine do 2cm, dubina invazije veća od 5, a manja od 10mm ili tumor veličine od 2 do 4cm i dubina invazije do 10mm; T3 - tumor veličine veće od 4cm ili bilo koji tumor sa dubinom invazije većom od 10mm; T4 - srednje razvijena ili veoma razvijena lokalna bolest - T4a - srednje razvijena lokalna bolest: usne - tumor kroz kortikalni deo kosti infiltriše donji alveolarni živac, pod usne duplje i kožu lica (brade ili nosa); ostali delovi usne duplje - tumor infiltriše okolne strukture - kroz kortikalni deo donje ili gornje vilice, ili infiltriše maksilarni sinus ili kožu lica (erozija kosti kao posledica primarnog tumora gingive nije dovoljna da bi se ovakav tumor klasifikovao kao T4); T4b - veoma razvijena lokalna bolest - tumor infiltriše prostore koji ograničavaju mastikatorni mišići, pterigoidni nastavci ili baza lobanje i infiltriše unutrašnju karotidnu arteriju.

Nx - regionalne metastaze se ne mogu ustanoviti; N0 - nisu nađene regionalne metastaze; N1 - metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru veličine do 3cm; N2(a,b,c), N3(a,b) - palpatorno izmenjeni limfni čvorovi vrata, metastaze u jednom ili više limfnih čvorova vrata, ipsilateralno, kontralateralno i/ili bilateralno, veličine do i preko 6cm; N3b - metastaza u bilo kom limfnom čvoru koja je probila kapsulu limfnog čvora. M0 - nema udaljenih metastaza; M1 - prisutne udaljene metastaze (Amin i sar., 2017).

Na osnovu navedenih podataka određuje se stadijum bolesti - stadijumi I, II, III, IVA, IVB, IVC (tabela 2).

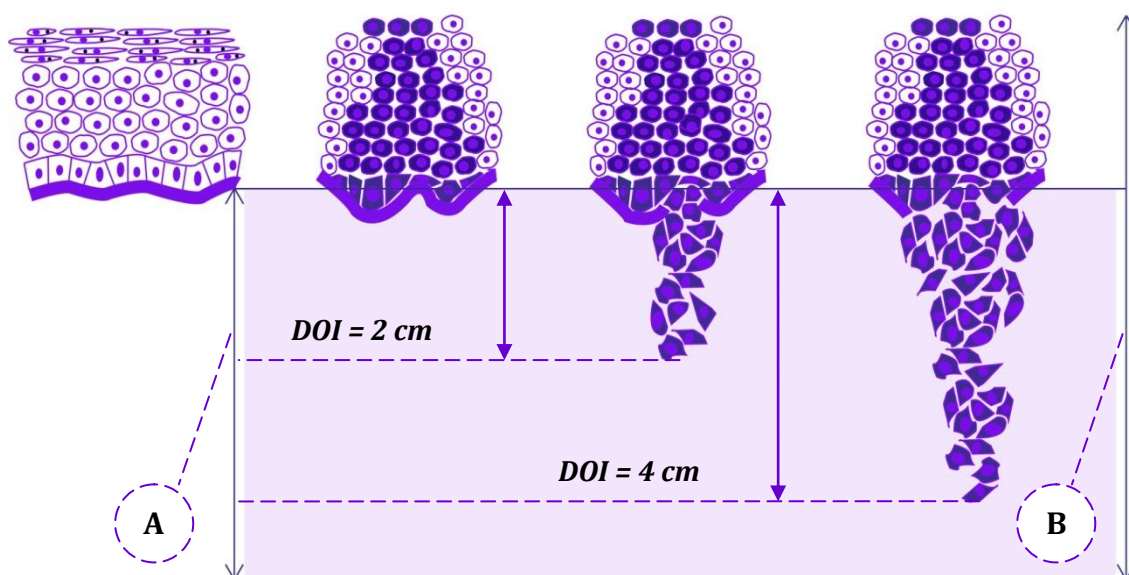
Tabela 2. TNM klasifikacija (Preuzeto i prilagođeno iz Amin i sar., 2017)

T kategorija	N kategorija			
	N0	N1	N2a,b,c	N3a,b
T1	I	III	IVA	IVB
T2	II	III	IVA	IVB
T3	III	III	IVA	IVB
T4a	IVA	IVA	IVA	IVB
T4b	IVB	IVB	IVB	IVB

sve kategorije u kombinaciji sa M1 statusom - IVC stadijum

Uz TNM klasifikaciju, procenjuje se i histopatološki stadijum bolesti. Kao što je već napomenuto, histopatološki, OPK se klasifikuje kao dobro diferentovan (gradus I), srednje diferentovan (gradus II) ili slabo diferentovan (gradus III) tumor (Barnes i sar., 2005).

Posebno značajan parametar u novijem shvatanju sveukupne prognoze kod OPK-a ima dubina invazije (DOI). "Histopatološki DOI se meri od nivoa bazalne membrane okolne zdrave sluzokože do najdublje tačke invazije tumora" (slika 11) (Lydiatt i sar., 2017).



Slika 11. Dubina invazije OPK – a. **A** – dubina invazije (DOI); **B** – debljina tumora

Na ovaj način se, u odnosu na ustaljenu praksu merenja najveće debljine tumora, uvodi parametar koji preciznije definiše dalji tok bolesti (Shim i sar., 2010). Do zvaničnog prihvatanja DOI-a došlo se pre svega na osnovu istraživanja koje su sproveli Ebrahimi i saradnici, a koje je obuhvatilo preko 3000 obolelih od OPK-a. Uključivanjem graničnih vrednosti DOI-a na svakih 5 mm, autori su došli do tačnije prognoze petogodišnjeg preživljavanja nego u slučaju kada je korišćen samo klasični TNM sistem klasifikacije (Ebrahimi i sar., 2014). Infiltracija kosti karcinomom takođe predstavlja loš prognostički znak, kako u kliničkom tako i u histopatološkom smislu (Shah i sar., 2012). Nekoliko istraživanja govori u prilog ovakvom stanovištu. Li i saradnici ističu značaj infiltracije spongiozne kosti, dok druge studije ukazuju da je navedena infiltracija kosti povezana sa lošom prognozom, bez obzira na veličinu primarnog tumora (Kuk i sar., 2016; Li i sar., 2017; Fives i sar., 2017). Svakako, jedan od najbitnijih faktora u pogledu toka bolesti i procene uspešnosti hirurške terapije jeste i histološki status hirurške margine, o čemu će posebno biti reči (Shah i sar., 2012).

1.3.8. | Lečenje oralnog planocelularnog karcinoma

"Lečenje OPK-a usmereno je pre svega na potpuno izlečenje, očuvanje i povraćaj funkcionalnosti usne duplje (govor, gutanje, žvakanje, spoljašnji izgled), minimalizaciju posledica lečenja (pojava zubnog karijesa, osteonekroza vilice, trizmus) i podizanje svesti pacijenta na rizik od pojave novih tumora" (Shah i sar., 2012). Kao izuzetno složena bolest, oralni planocelularni karcinom u pogledu terapije zahteva multidisciplinarni pristup (Shah i sar., 2009). U izboru metode lečenja učestvuje konzilijum za maksilofacijalnu regiju koji prilikom predlaganja terapije uzima u obzir anatomske regije, veličinu (T stadijum), lokalizaciju tumora (anteriorno-posteriorno), histološke aspekte (tip, gradus i dubina invazije), status limfnih čvorova vrata, odnos tumora i koštanih struktura, kao i prethodne terapije ukoliko ih je bilo (Shah i sar., 2003). Uz navedene, analiziraju se i faktori poput potencijalnih komplikacija lečenja, godišta, kooperativnosti, životnih navika (konzumacija duvana i alkohola) i socio-ekonomskog statusa pacijenta te troškova samog lečenja i kompetencija članova tima koji lečenje sprovodi (Jun i sar., 1983; Friedlander i sar. 1998; Shah i sar., 2009). Definitivna odluka donosi se uz pisani pristanak pacijenta, nakon što je informisan/a o svim aspektima predloženog lečenja.

U lečenju OPK-a primenjuju se tri tipa terapije - hirurška, zračna i polihemioterapija. U zavisnosti od stadijuma bolesti ove procedure se sprovode pojedinačno ili u kombinaciji. Kod površinskih i tumora male veličine koji se nalaze u početnom stadijumu (T1 i T2) najčešće se primenjuje samo hirurška terapija (Huang i sar., 2010; Shah i sar., 2012). Kod uznapredovale bolesti (T3 i T4) primena pojedinačnih procedura - hirurške ili zračne terapije, pruža lošije rezultate u pogledu lokalne kontrole tumora i stope petogodišnjeg preživljavanja. Kombinovanom terapijom - hirurško lečenje praćeno postoperativnim zračenjem, postiže se bolja lokalna kontrola tumora, ali se u slučaju preživljavanja prognoza značajno ne menja (Mishra i sar., 1996; Shah i sar., 2012). Određene kliničke studije ukazuju da se uključivanjem hemioterapije, uz postoperativno zračenje obezbeđuje bolja kontrola bolesti i povoljnija prognoza u pogledu preživljavanja, a naročito kod pacijenata sa lošijim prognostičkim pokazateljima (pozitivne hirurške margine, metastaze u limfnim čvorovima vrata, ektranodalno širenje tumora, perineuralna i perivaskularna infiltracija) (Bernier i sar., 2005).

Hirurško lečenje predstavlja terapiju izbora kod pacijenata sa dijagnostikovanim OPK. Ono obuhvata potpunu eksciziju primarnog tumora do u klinički - makroskopski zdravo tkivo, uz maksimalno očuvanje integriteta nezahvaćenog tkiva i rekonstrukciju resektiranog dela tkiva ili organa ukoliko to uslovi dozvoljavaju. Zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova metastazama takođe zahteva njihovo hirurško uklanjanje (Gavrić i sar., 2001; Miloro i sar., 2004).

Način na koji će se u okviru hirurške procedure pristupiti primarnom tumoru zavisi od više faktora, a to su (Shah i sar., 2009):

- veličina tumora
- dubina invazije
- lokalizacija tumora (prema napred, prema nazad)
- odnos tumora sa kosti donje ili gornje vilice

Malim i površinskim tumorima (T1 i T2), pozicioniranim u prednjem delu usne duplje uglavnom se pristupa intraoralno. Ovakav pristup je moguć kod svih tumora smeštenih u

prednjem delu usne duplje, kao i kod uznapredovalih lezija (T3 i T4) u slučaju bezubosti donje vilice. Ipak, u okolnostima gde je tumor, bez obzira na veličinu, infiltrisao dublje strukture, ili se svojim rastom približio kosti donje ili gornje vilice, pristup je ekstraoralni. Ovo je ujedno karakteristično za tumore većih dimenzija (T3 i T4), a pozicioniranih na srednjoj i zadnjoj trećini jezika, podu usne duplje i u retromolarnom predelu (Shah i sar., 1987; Miloro i sar., 2004; Shah i sar., 2012, Omura, 2014).

Pored radikalne ekscizije primarnog tumora, kod velikog broja pacijenata sa dijagnozom OPK-a potrebno je sprovesti i hirurški postupak uklanjanja metastatski izmenjenih limfnih čvorova vrata - disekcija vrata. Najveći rizik za metastaziranje pokazuju tumori jezika, poda usne duplje i retromolarnog predela. Takođe, pojava regionalnih metastaza je češća kod primarnih lezija lokalizovanih prema nazad - posteriorno, u poređenju sa lezijama lokalizovanim prema napred - anteriorno u usnoj duplji. Disekcija vrata se uobičajeno sprovodi pre uklanjanja primarnog OPK-a i može biti radikalna, proširena radikalna, modifikovana i selektivna (Shah i sar., 1987; Miloro i sar., 2004; Shah i sar., 2012, Omura, 2014).

Kao što je već napomenuto, u situacijama kada su prisutni određeni faktori rizika za uspešan ishod lečenja OPK-a, uz hiruršku sprovode se i postoperativna zračna i polihemioterapija. Faktore koji utiču na primenu dodatne terapije možemo svrstati u one srednjeg i one visokog rizika.

U faktore srednjeg rizika spadaju (Langendijk i sar., 2003):

- patološki stadijum T3 ili T4
- ivice resekcije u blizini tumora
- limfo-vaskularna infiltracija
- perineuralna infiltracija
- prisustvo metastaza u limfnim čvorovima vrata

U faktore visokog rizika spadaju (Bernier i sar., 2005):

- prisustvo tumorskih ćelija u hirurškim marginama
- ekстранodalno širenje tumora

Kada su prisutni faktori srednjeg rizika primenjuje se postoperativna zračna terapija (radioterapija) koja podrazumeva primenu jonizujućeg zračenja od 60 Gy (*greja*), s tim da određena istraživanja ukazuju da je dovoljno i zračenje od 54 Gy. Kada su prisutni faktori visokog rizika zračenje se može povećati na 57.6 Gy i dodatno sprovesti hemioterapija (Tupchong i sar., 1991; Peters i sar., 1993). Od svih preparata, Cis platina se u ovim slučajevima pokazala kao najefikasnija u kombinaciji sa postoperativnim zračenjem, dok je efekat primene preparata poput Cetuximab-a i dalje pod istraživanjem (Hartner, 2018).

I pored primene različitih modaliteta lečenja, kod izvesnog broja pacijenata (20%) doći će do pojave recidiva na mestu primarnog tumora, dok će se u 10% slučajeva javiti i recidivi u limfnim čvorovima vrata. Uz navedeno, rizik za razvoj sekundarnog primarnog karcinoma iznosi 4 do 7% na godišnjem nivou i glavni je uzrok smrti kod pacijenata kod kojih je sprovedeno lečenje karcinoma u ranom stadijumu (Vikram i sar., 1984a; Vikram i sar., 1984b; Vikram i sar., 1984c; Vikram i sar., 1984d).

1.3.9. | Petogodišnje preživljavanje

Prema najnovijem istraživanju, petogodišnja stopa preživljavanja kod pacijenata sa dijagnostikovanim primarnim OPK-om iznosi 64%. Kao nezavisni prognostički faktori petogodišnjeg preživljavanja označeni su godište pacijenta, prisustvo komorbiditeta, perivaskularna i perineuralna invazija, dubina invazije, patološki T stadijum, patološki N stadijum, histološki gradus, ekстранodalno širenje tumora i status hirurških margina. U odnosu na T stadijum stopa petogodišnjeg preživljavanja opada idući od T1 ka T4 stadijumu (81%; 64%; 51%; 39%). Povećanje dubine invazije takođe se nepovoljno odražava na sveukupnu prognozu bolesti. Sa dubinom invazije većom od 10mm, stopa petogodišnjeg preživljavanja smanjuje se na 44%. Kod hirurških margina u kojima je potvrđeno prisustvo ćelija karcinoma (pozitivna margina) stopa iznosi 38%, i značajno je niža u poređenju sa histološki "čistim" (negativnim) marginama (73%) (Zanoni i sar., 2019). Kod pacijenata obolelih od OPK-a u ranom stadijumu bolesti (T1 i T2) i kod kojih je u 90% slučajeva status hirurške margine negativan, stopa petogodišnjeg preživljavanja je 70% (Luryi i sar., 2015). Alonso i saradnici utvrdili su da je stopa petogodišnjeg preživljavanja u slučajevima obolelih od OPK-a tvrdog nepca 33%, dok u Rizvijevoj studiji koja je obuhvatila veliki broj pacijenata sa OPK-om retromolarnog predela (4022), ona iznosi 38% (Alonso i sar., 2018; Rizvi i sar., 2018). Takođe, na uzorku od preko 14000 obolelih od karcinoma poda usne duplje utvrđena je petogodišnja stopa preživljavanja od 39% (Saggi i sar., 2018).

U pogledu modaliteta terapije, kod pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna zračna terapija, petogodišnja stopa preživljavanja iznosi 57% (Quinlan- Davidson i sar., 2017). U studiji u kojoj je preko 60% obolelih od karcinoma obrazne mukoze i gingivobukalnog sulkusa tretirano postoperativnom zračnom terapijom zabeleženo je petogodišnje preživljavanje od 60% (Shukla i sar., 2018). Sa druge strane, Ling i saradnici u svom istraživanju u kome je u oko 60% pacijenata sa OPK-om jezika lečeno i postoperativnim zračenjem beleže nižu stopu preživljavanja - 44% (Ling i sar., 2013). U analizama pojedinih studija obuhvaćen je veliki broj pacijenata tretiran samo zračnom terapijom (14-23%), što svakako utiče na smanjenu stopu preživljavanja (Alonso i sar., 2018; Rizvi i sar., 2018; Saggi i sar., 2018; Zanoni i sar., 2019).

Prisustvo regionalnih metastaza u limfnim čvorovima vrata je značajan faktor u ishodu lečenja kod obolelih od OPK-a. Petogodišnja stopa preživljavanja smanjuje se idući od stadijuma N0/Nx ka stadijumu N3 (74%; 63%; 48%; 23%). Ekстранodalno širenje tumora takođe je izuzetno loš prognostički znak, sa stopom petogodišnjeg preživljavanja od svega 28% u poređenju sa slučajevima u kojima nije prisutno - 55% (Zanoni i sar., 2019). Sličan trend zabeležen je i u drugim studijama (Wreesmann i sar., 2016; Garzino-Demo i sar., 2016; Ong i sar., 2017).

1.3.10. | Prevencija oralnog planocelularnog karcinoma

U javno - zdravstvenom smislu, oralni karcinom se ne nalazi na listi prioriteta kada je reč o aktivnom praćenju i evaluaciji osoba sa visokim rizikom za razvoj ove bolesti (Thomson, 2015). Kompleksnost, kao i relativno kasna klinička prezentacija OPK-a stvaraju dodatne probleme u profilisanju osobe sa "visokim rizikom" za nastanak oralnog karcinoma (Thomson, 2015; Williams i Bethea, 2011). Međutim, kao i kod drugih oboljenja u kojima je manje više poznata etiološka pozadina, tako se i kod OPK-a može preventivno delovati upravo

na faktore koji mu doprinose i koji pospešuju njegov dalji razvoj. U svojoj studiji, Thomson predlaže tri "stuba" prevencije OPK-a:

- primarnu, koja je usmerena na uklanjanje primarnih faktora rizika kao što su konzumacija duvana i alkohola te loša ishrana, a kroz javno - zdravstvene programe na nivou zajednice
- sekundarnu, u kojoj će na efikasan način biti moguće identifikovati promene dok se one nalaze na nivou potencijalno malignih oboljenja ili OPK-a u ranom stadijumu i
- tercijarnu, koja za zadatak ima da smanji rizik od pojave recidivantne bolesti i ublaži posledice nastale usled lečenja OPK-a, obezbeđujući ciljanu kliničku uslugu u adekvatnim uslovima i sledeći jasne postterapijske protokole (Thomson, 2018).

Ono što svakako predstavlja imperativ svakodnevne stomatološke prakse u prevenciji oralnog karcinoma jesu redovni pregledi, naročito kod osoba koje konzumiraju duvan i velike količine alkohola. Modifikacijom stila života i kontinuiranim praćenjem već prisutnih potencijalno malignih oboljenja može se sprečiti većina negativnih posledica koje sa sobom nosi pojava oralnog karcinoma (Rethman i sar., 2010; Thomson, 2015).

1.4. | Hirurška i histološka margina kod oralnog planocelularnog karcinoma

U svrhu ostvarivanja povoljnog ishoda hirurškog lečenja i definisanja eventualne postoperativne terapije, maksilofacijalni hirurzi zajedno sa oralnim karcinomom ekscidiraju i određeni deo klinički tj. makroskopski zdravog tkiva koji se naziva hirurška margina (Ward i van As-Brooks, 2007; Brown i sar., 2012; Hinni i sar., 2013; Zanoni i sar., 2017). Ona obično obuhvata pojas makroskopski zdravog tkiva unutar 1 cm od vidljive ivice samog tumora, sa ciljem uklanjanja svih potencijalnih rezidua OPK-a na mikroskopskom nivou (Kurita i sar., 2010; Wong i sar., 2012). Osim površinske mukoze, ekscizijom su obuhvaćene i dublje strukture - submukozno, vezivno, mišićno i po potrebi koštano tkivo koje okružuju tumor (Woolgar, 2006).

Ovako dobijeni uzorak tkiva podleže histološkoj evaluaciji ne bi li se utvrdila adekvatnost sprovedene ekscizije i definisao status histološke tj. mikroskopske margine. Status histološke margine jedan je od najznačajnijih faktora sveukupne prognoze bolesti i modaliteta dalje terapije (Brown i sar., 2012; Priya i sar., 2012).

Brojna istraživanja ukazuju da je prisustvo malignih ćelija u histološkim marginama (pozitivna margina) povezano sa povećanim rizikom za pojavu recidiva, kao i sa smanjenom stopom petogodišnjeg preživljavanja (Looser i sar., 1978; Chen i sar., 1987; Loree i Strong, 1990; Sutton i sar., 2003; Binahmed i sar., 2007; Ganly i sar., 2012; Zanoni i sar., 2019). U svojoj studiji Looser i saradnici predlažu klasifikaciju histološki pozitivne margine na osnovu sledećih kriterijuma:

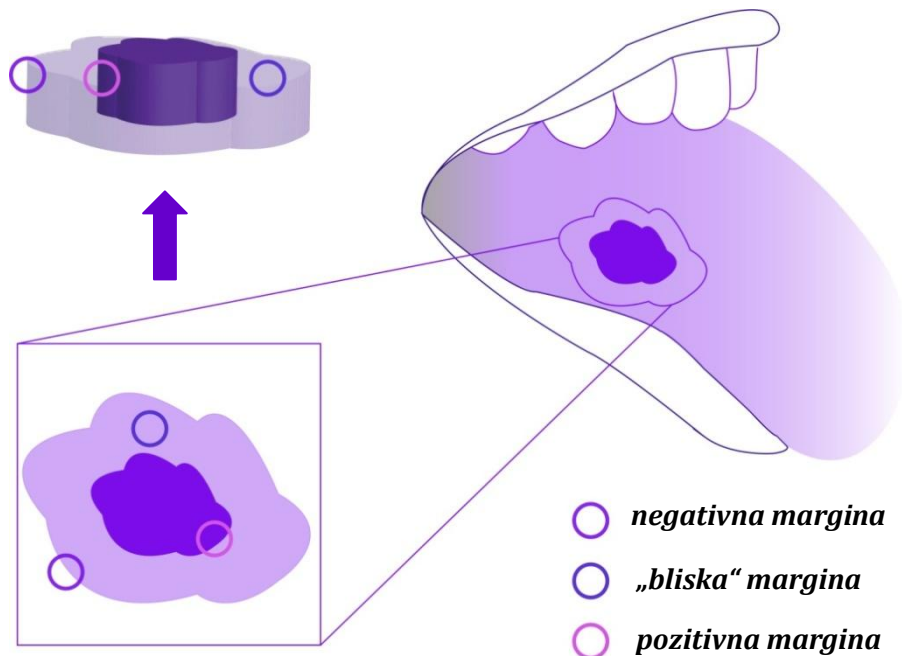
- margina unutar 0,5 mm od tumora,
- prisustvo premalignih promena u margini,
- *carcinoma in situ* u margini
- invazivni karcinom u margini (Looser i sar., 1978).

Posebnu pažnju zahteva prisustvo displazije u histološkim marginama. Smatra se da marginalno tkivo koje u sebi sadrži elemente displazije predstavlja loš prognostički znak, a naročito u sklopu povećanog rizika za pojavu lokalnih recidiva (Loree i Strong, 1990; Batsakis, 1999; Slootweg i sar., 2002; Bradley i sar., 2007). Ipak, istraživanje Američkog udruženja za glavu i vrat koje je obuhvatilo oko 500 svojih članova - hirurga za ovu regiju, govori da većina njih (oko 80%) ne klasifikuje displaziju u marginama kao pozitivnu marginu, dok je obratno u slučaju prisustva *carcinoma in situ* (Meier i sar., 2005). Iako ne opovrgavaju značaj prisustva displazije ili *carcinoma in situ* u marginama, McMahon i saradnici smatraju da se pojava jednog ili drugog ne može posmatrati u istom svetlu kao pojava invazivnog karcinoma u margini (McMahon i sar., 2003).

Kontroverze oko definisanja statusa hirurških, a shodno tome i histoloških margina najizraženije su u pogledu udaljenosti linije resekcije tj. "hirurškog noža" (skalpel, elektrokauter ili laser) od ivice karcinomom izmenjenog tkiva (Hinni i sar., 2013).

Prema preporukama Kraljevskog koledža patologa Ujedinjenog Kraljevstva (eng. *Guidance on pathological margins for OSCC*) sve margine se histološki mogu podeliti u tri kategorije (slika 12) (Helliwell i Woolgar, 2011):

- "involverane" tj. pozitivne margine - <1 mm od ivice tumora
- "bliske" (*close margins*) margine - 1-5 mm od ivice tumora i
- "čiste" tj. negativne margine - > 5 mm od ivice tumora.



Slika 12. Uzimanje uzoraka marginalnog tkiva kod oralnog planocelularnog karcinoma

I pored toga što je malo nedoumica u vezi sa lošom sveukupnom prognozom kada je margina na manje od 1 mm od ivice tumora, problemi i oprečna mišljenja nastaju u definisanju negativnih ("čistih"), a posebno "bliskih" margina (Dixit i sar., 1998; Sutton i sar., 2003; Bessell i sar., 2011; Wong i sar., 2012; Hinni i sar., 2013; Anderson i sar., 2015).

U velikom broju studija vrednost od 5 mm koristi se kao referentna u definisanju adekvatne, tj. "čiste" (>5 mm) i neadekvatne margine (<5 mm). Ovakva podela povezana je sa većom pojavom recidiva i smanjenim preživljavanjem kod margina na manje od 5 mm od ivice tumora (Chen i sar., 1987; Loree i Strong, 1990; Sutton i sar., 2003; Amaral i sar., 2004; Weijers i sar., 2004; Brandwein-Gensler i sar., 2005; Garzino-Demo i sar., 2006). Liao i saradnici su u svom ispitivanju došli do zaključka da su margine na manje od 7 mm od ivice tumora povezane sa lošijom prognozom (Liao i sar., 2008).

Sa druge strane, postoje i dokazi da u pogledu pojave lokalnih recidiva nema značajnih razlika između "bliskih" i "čistih" margina, a da se u slučaju preživljavanja za referentnu vrednost može postaviti i margina na 1,6 mm od ivice tumora (Wong i sar., 2012). Alicandri-Ciuffelli i saradnici predlažu da se "bliskim" marginama mogu smatrati one do 4mm, dok Zanoni i saradnici u svojoj studiji definišu "čistim" one na više od 2,2 mm od ivice tumora (Alicandri-Ciuffelli i sar., 2013; Zanoni i sar., 2017). U istraživanju koje je obuhvatilo preko 300 pacijenata obolelih od OPK-a u ranom stadijumu (T1 i T2) i koji su podvrgnuti hirurškoj terapiji uočeno je da margine zapravo i nemaju uticaj na pojavu recidiva i preživljavanje

(Barry i sar., 2015). Brojni su razlozi nekonzistentnosti u rezultatima navedenih studija, od toga da su oralni karcinomi statistički posmatrani u sklopu karcinoma glave i vrata zajedno sa karcinomima orofarinksa i larinksa, do toga da nisu uzeti u obzir i drugi značajni faktori poput dubine invazije, prisustva ili odsustva perineuralne i limfovaskularne infiltracije veličine tumora (Weijers i sar., 2004; Binahmed i sar., 2007; Nason i sar., 2009; Wong i sar., 2012; Hinni i sar., 2013; Alicandri-Ciufelli i sar., 2013; Anderson i sar., 2015). Tako na primer agresivniji tumori, tj. oni sa infiltrativnom prirodom širenja, zahtevaju širu marginu od onih sa ekspanzivnim invazivnim frontom (Nason i sar., 2009).

Adekvatnost same ekscizije u direktnoj je vezi sa lokalizacijom tumora, anatomskim ograničenjima, biološkim karakteristikama i obimom hirurške procedure (Nason i sar., 2009; Hinni i sar., 2013; Alicandri-Ciufelli i sar., 2013). Tako je verovatnoća nalaza pozitivne margine veća kod OPK-a poda usne duplje i obrazne mukoze nego što je to slučaj sa OPK-om jezika (Kamat i sar., 2019). Pozitivne margine takođe su učestalije u slučajevima kada obuhvataju dublje mekotkivne strukture u poređenju sa površinskim mukoznim marginama (Woolgar i Triantafyllou, 2005). Potencijalna objašnjenja ovakvog nalaza mogu se naći u anatomskim ograničenjima samog hirurškog zahvata i činjenici da su površinske margine vidljive, dok se kod dubokih hirurg orijentiše palpacijom (Hinni i sar., 2013).

Na poziciju resekcione linije utiče još jedan značajan faktor, a to je tzv. "skupljanje" tkiva (eng. *tissue shrinkage*) (Hinni i sar., 2013; Anderson i sar., 2015; Kamat i sar., 2019). Ovaj fenomen se javlja nakon ekscizije i tokom histološke obrade uzorka tkiva (Sarode i Sarode, 2012; Gonzalez- Ballester, 2016). U nekoliko studija, najizraženije "skupljanje" zabeleženo je kod obrazne mukoze, dok se u odnosu na sve regione u usnoj duplji "skupljanje" tkiva kreće od 9 do 70% (Johnson i sar., 1997; Mistry i sar., 2005; Cheng i sar., 2008; El-Fol i sar., 2015). Umanjenje dimenzija margine može nastati i kao posledica elasticiteta mukoze, što posebno može imati implikacije po intraoralnu eksciziju OPK-a obrazne mukoze (Tsai i sar., 2016). Navedeni rezultati ukazuju na potrebu zahvatanja veće količine marginalnog tkiva u toku hirurške procedure, ne bi li se efekti "skupljanja" tkiva umanjili (Johnson i sar., 1997; Hinni i sar., 2013).

Uzevši u obzir gotovo sve faktore izložene u velikom broju studija, Anderson i saradnici u svojoj meta-analizi ipak dolaze do zaključka da je 5 mm minimalno prihvatljiva vrednost histološke margine kod oralnog karcinoma (Anderson i sar., 2015).

Razvojem novih tehnologija i metoda, uz one koje u oblasti evaluacije margina predstavljaju "zlatni" standard, otvaraju se brojne mogućnosti efikasnijeg i preciznijeg definisanja toka i modaliteta lečenja, kao i sveukupne prognoze kod obolelih od OPK-a.

1.4.1. | Evaluacija hirurških margina kod oralnog planocelularnog karcinoma

Inicijalnu procenu površine tkiva zahvaćenog karcinomom, a samim tim i pozicije buduće resekcijske linije sprovodi hirurg vizuelnom inspekcijom i palpacijom. U ovoj fazi evaluacije, često se kao pomoćne metode u definisanju granica tumora, ali i prisustva potencijalnih "satelita" OPK-a, koriste vitalno bojenje tkiva i određene optičke metode o kojima će posebno biti reči.

U okviru vitalnog bojenja tkiva, odnosno upotrebe nefluorescentnih boja najčešće se primenjuje već pomenuto toluidin plavo (Niebel i Chomet, 1964; Strong i sar., 1968; Warnakulasuriya i Johnson, 1996; Kerawala i sar., 2000). Radi se o metahromatskoj boji za koju se smatra da poseduje afinitet prema nukleinskim kiselinama (DNK i RNK) (Herlin i sar., 1983). U praksi se ovaj efekat oslikava kroz bojenje patološki izmenjenog tkiva - invazivnog karcinoma, *carcinoma in situ* i displazije tamno plavom bojom, što hirurgu omogućava bolju preglednost patološke promene (Mashberg, 1980; Mashberg, 1981; Silverman i sar., 1984). Osim toluidin plavog, pojedina istraživanja ističu i pozitivne rezultate bojenja izmenjenog tkiva rastvorima joda i definisanja margine u nebojenom tkivu na minimum 5 mm od ivice obojene površine (Kurita i Kurashina, 1996; Umeda i sar., 2011; Xiao i sar., 2013).

Kao glavni nedostaci primene nefluorescentnih boja ističu se nemogućnost detekcije promena po dubini, kao i odsustvo efekta bojenja na keratinizovani epitel (Mashberg, 1981; Kerawala i sar., 2000; Kurita i Kurashina, 1996; Umeda i sar., 2011; Xiao i sar., 2013).

U procesu evaluacije hirurških margina najviše se teži brzom dobijanju informacija o adekvatnosti ekscizije u toku operacije - intraoperativno. Poslednjih decenija se u te svrhe intenzivno traga za optimalnom metodom koja bi mogla poslužiti kao zamena za postoperativnu histopatološku analizu prethodno fiksiranih uzoraka tkiva. Kain i saradnici u svojoj studiji klasifikuju pomenute metode u one koje podrazumevaju patološku analizu uzoraka, analizu širokog polja lezije i analizu uskog polja lezije (Kain i sar., 2020). Poslednje dve grupe pretežno se zasnivaju na interakciji svetlosti i tkiva - optičke metode, sa izuzetkom upotrebe već pomenutih nefluorescentnih boja.

U metode patološke analize uzoraka tkiva hirurških margina spadaju:

- *ex tempore* dijagnostika (eng. *frozen section procedure*)
- Mohs mikrografska hirurgija (eng. *Mohs Micrographic Surgery*)
- molekularne analize (Kain i sar., 2020).

Ex tempore dijagnostika predstavlja intraoperativnu metodu namenjenu brzom histopatološkoj analizi tkiva hirurških margina. Tkivo se zamrzava u kriostat mašini, seče u slojevima od 5 do 7 μm , postavlja na mikroskopsku pločicu, fiksira, boji (hematoksilin eozin bojenje) i analizira pod mikroskopom (Winship i Rosvoll, 1959; Ackerman i Ramierez, 1959; Black i sar., 2006). Ono što ovu metodu čini izuzetno praktičnom je relativno kratko vreme procesuiranja uzorka i njegove evaluacije - oko 20 minuta (Novis i Zarbo, 1997). Celokupna procedura se odvija u bliskoj komunikaciji hirurga i patologa, te se prvom omogućava prostor za uklanjanje dodatne količine tkiva u toku operacije, ukoliko je margina ocenjena kao pozitivna (Black i sar., 2006).

Veliki broj studija govori u prilog preciznosti ove metode (Sawady i sar., 1988; Oneson i sar., 1989; Howanitz i sar., 1990; Zarbo i sar., 1991). Zarbo i saradnici zaključuju da se učešćem iskusnog patologa rezultati *ex tempore* metode poklapaju sa konačnim histopatološkim nalazom u preko 90% slučajeva (Zarbo i sar., 1991). Pojedina istraživanja dolaze i do preciznosti od 98%, uz veoma visoku senzitivnost (88%) i specifičnost (99%) (DiNardo i sar., 2000). Drugi pak ukazuju da se u 2 do 10% margina označenih kao negativne, nalaz menja u pozitivan status nakon definitivne histopatološke evaluacije (Spiro i sar., 1999; Cooley i sar., 2002).

Sa druge strane, neki autori smatraju da primena ove metode ne poboljšava lokalnu kontrolu bolesti i stopu preživljavanja (Pathak i sar., 2009; Varvares i sar., 2015; Buchakjian i sar., 2016; Mair i sar., 2017). Dodatno uklanjanje tkiva kod margina sa pozitivnim nalazom nakon *ex tempore* procedure takođe nema uticaja na preživljavanje (Buchakjian i sar., 2016). Kao glavni nedostatak ističe se način uzimanja tkiva, jer se u 76% slučajeva uzorak uzima iz predela postekscizionog defekta (eng. *tumor bed margins*) (slika 13) (Meier i sar., 2005; Kain i sar., 2020).



Slika 13. Uzimanje uzoraka tkiva postekscizionog defekta

Tako se u kontekstu prethodno navedene visoke preciznosti, ona posmatra iz perspektive konačnog histopatološkog nalaza tkiva sa iste lokacije (Kain i sar., 2020). U odnosu na nalaz kod glavnog uzorka- ekscidirano tumorsko tkivo sa marginama, pozitivan ili negativan status dobijen *ex tempore* metodom nije u statistički značajnoj korelaciji (Gerber i sar., 2011). Abbas i saradnici beleže preciznost ovakvog pristupa od svega 36% u odnosu na glavni "en bloc" uzorak (Abbas i sar., 2017). Jedan od problema je i isplativost same procedure. Odnos troškova i koristi (eng. *cost-benefit*) je 20:1, dok prosečni troškovi primene *ex tempore* metode iznose oko 3123 američkih dolara (\$) po pacijentu (DiNardo i sar., 2000).

Iz navedenih razloga veliki broj studija ističe potrebu intraoperativne evaluacije hirurških margina kod OPK-a analizom tkiva glavnog uzorka (eng. *specimen driven approach*), za razliku od ustaljene prakse analize uzoraka tkiva postekscizionog defekta. Autori smatraju da se na taj način omogućava bolja lokalna kontrola i poboljšava sveukupna prognoza bolesti (Hinni i sar., 2013; Chang i sar., 2013; Maxwell i sar., 2015; Moran i sar., 2016).

Mohs mikrografska hirurgija predstavlja potencijalno alternativnu metodu *ex tempore* evaluaciji hirurških margina. U ovoj tehnici celokupna površina resektovanog uzorka analizira se pod mikroskopom u toku trajanja hirurškog postupka (Gauthier i sar., 2010; Bergeron i sar., 2016; Kain i sar., 2020). Do sada su samo pojedina istraživanja ukazala na povoljne rezultate ovakvog pristupa (Gauthier i sar., 2010; Bergeron i sar., 2016). Glavnim nedostacima

smatraju se otežana izvodljivost ove metode usled anatomskih ograničenja u usnoj duplji, kao i produženo trajanje hirurške procedure (Kain i sar., 2020).

Razvojem inovativnih tehnologija i metoda za molekularnu analizu humanog tkiva, u poslednje vreme se i u evaluaciji hirurških margina ovaj pristup sve više primenjuje. Zasniva se na premisi da histološki negativna margina može sadržati genetske alteracije, što utiče na povećan rizik za pojavu lokalnog recidiva (Braakhuis i sar., 2010; Reis i sar., 2011). Koncept sam po sebi nije nov, i povezan je sa fenomenom polja kancerizacije, koje je prvi put opisao Slaughter sa saradnicima davne 1953. godine (Slaughter i sar., 1953). Ovaj fenomen objašnjava se pojavom lokalnih recidiva na istom mestu gde je prethodno sprovedena potpuna ekscizija tumora (Gandor i Meyer, 1988; Reibel, 2003). U usnoj duplji, to podrazumeva oralnu mukozu koja makroskopski izgleda normalno, dok je na molekularnom nivou pod uticajem različitih agensa već podlegla alteraciji (Braakhuis i sar., 2002). Veliki broj studija bavi se prisustvom različitih genetskih mutacija i epigenetskih markera u tkivima hirurških margina koje su prethodno označene kao histološki "čiste" (Kamat i sar., 2019; Kain i sar., 2020). Neke od njih usmerene su na povećanu ekspresiju p53 i TP53 gena, onkogeno poput receptora epidermalnog faktora rasta kao i pojedinih protoonkogeno kao što je slučaj sa Her-2 (Bilde i sar., 2009; Vosoughhosseini i sar., 2012; Singh i sar., 2016; Wang i sar., 2016; Jelovac i sar., 2016; Milosevic i sar., 2018). I pored obećavajućih rezultata, primena molekularnih analiza i dalje je ograničena u pogledu brzog dobijanja informacija u toku trajanja hirurškog postupka (Kain i sar., 2020).

Uzevši u obzir preciznost, efikasnost i isplativost pojedinih procedura, poslednjih godina sve je veći akcenat na potencijalnoj primeni različitih optičkih metoda i njihovoj upotrebnoj vrednosti u analizi tkiva hirurških margina kod oralnog karcinoma.

1.5. | Optičke metode evaluacije hirurških margina kod oralnog planocelularnog karcinoma

Optičke metode u savremenoj medicini zasnivaju se na interakciji svetlosti i humanog tkiva. Kada je reč o primeni ovih tehnologija u oralnoj onkologiji, one se mogu podeliti na one koje se koriste u analizi širokog polja lezije i one koje se koriste u analizi uskog polja lezije (Kain i sar., 2020).

U prvu grupu ubrajaju se:

- metode zasnovane na primeni fluorescentnih boja - egzogene fluorofore
- metode zasnovane na principu autofluorescencije (*autofluorescent imaging* - AFI) i
- endoskopija uskog snopa (*narrow band imaging* - NBI)

U drugu grupu ubrajaju se:

- spektroskopske metode:
 - Spektroskopija na bazi elastičnog rasejanja (*Elastic Scattering Spectroscopy*)
 - Ramanova spektroskopija (*Raman Spectroscopy*)
- optička koherentna tomografija (*Optical Coherence Tomography* - OCT) i
- mikroendoskopija visoke rezolucije (*High-Resolution Microendoscopy* - HRME)

1.5.1. | Interakcija svetlosti i materije - optičke karakteristike humanih tkiva

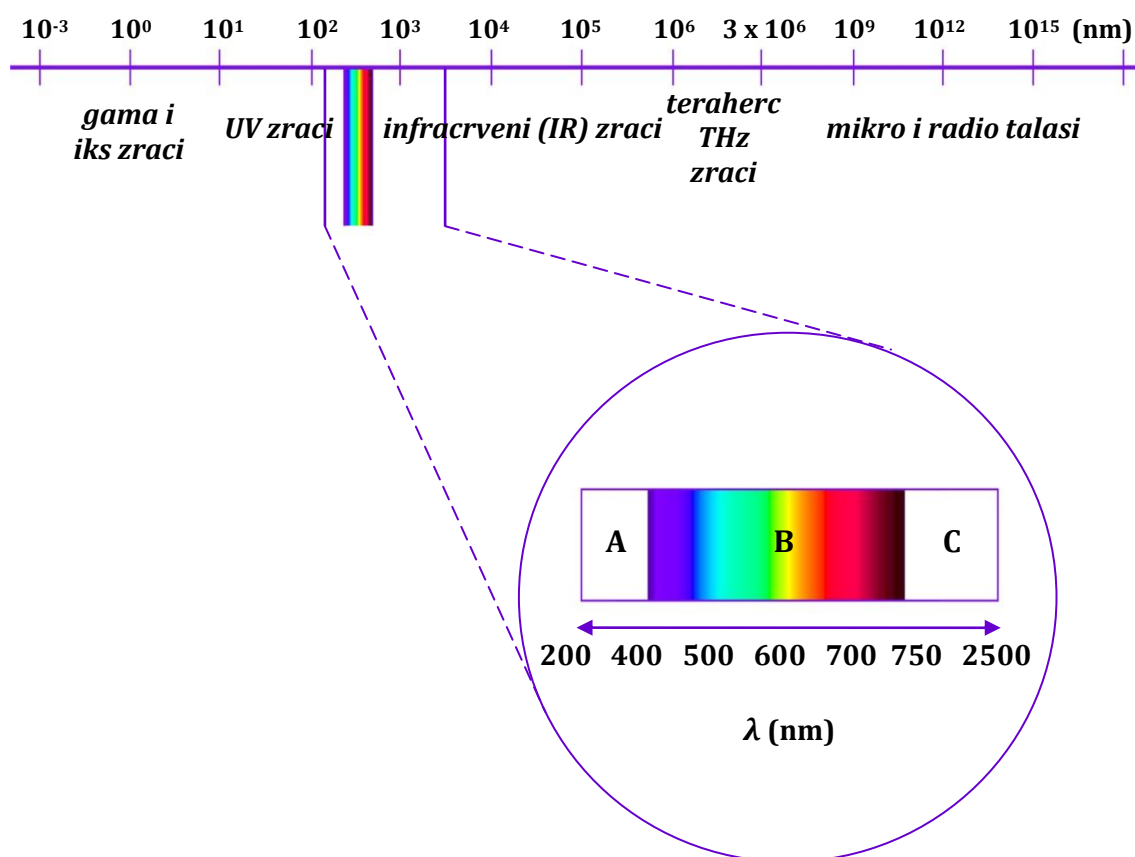
Svetlost predstavlja grupu fotona elektromagnetne prirode koji se kroz datu sredinu prostiru kao spreg električnog i magnetnog polja. Obe komponente elektromagnetnog talasa su vektorske veličine (imaju intenzitet, pravac, smer i napadnu tačku) i u svim uslovima normalne su jedna u odnosu na drugu (Pain, 2005; Koruga, 2017). Svaki foton ima svoju talasnu dužinu koja odgovara određenoj frekvenciji, odnosno energiji koju sa sobom nosi. Talasna dužina, frekvencija i energija fotona nalaze su u takvom odnosu da što je veća frekvencija (*broj ponavljanja u sekundi*) i energija fotona je veća, što je stanje koje odgovara manjoj talasnoj dužini:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

E - energija fotona; h - Plankova konstanta; c - brzina svetlosti u vakumu; λ - talasna dužina fotona; $\frac{c}{\lambda}$ - frekvencija fotona.

Redom su date veličine izražene u metrima (m), hercima (Hz) i elektronvoltima (eV). Shodno navedenom, svetlost čine elektromagnetni talasi fotona različite talasne dužine, frekvencije i energije i kao takvi deo su elektromagnetnog spektra. U odnosu na talasnu dužinu, elektromagnetni talasi klasifikuju se kao gama zraci, iks zraci, ultraljubičasti zraci,

zruci vidljive svetlosti, infracrveni zruci, teraherc zruci, mikro talasi i radio talasi (slika 14) (Tuchin, 2010; Tuchin 2015a).



Slika 14. Elektromagnetni (EM) spektar sa izdvojenim regionom od interesa za interakciju svetlosti i tkiva u usnoj duplji. **A** – blisko podruće UV zraka; **B** – vidljiva svetlost (**VIS**); **C** – blisko podruće IR zraka (eng. *near infrared spectrum* - **NIR**)

U biomedicinskoj optici, od najvećeg značaja za interpretaciju interakcije svetlosti i humanih tkiva jesu regioni ultraljubičastog, vidljivog i infracrvenog dela elektromagnetnog spektra - 100nm (*nm* - *nanometar*) do 1000 μ m (μ m - *mikrometar*) (Tuchin, 2015a). Osnovne pojave koje definišu ovu interakciju, a samim tim i optičke karakteristike tkiva kroz koju svetlost prolazi, jesu apsorpcija i rasejanje. Sa njima u vezi opisuju se i koeficijent apsorpcije, koeficijent rasejanja, anizotropija i realni indeks prelamanja svetlosti u tkivu (Jacques i Pogue, 2008; Welch i van Gemert, 2011; Jacques, 2013).

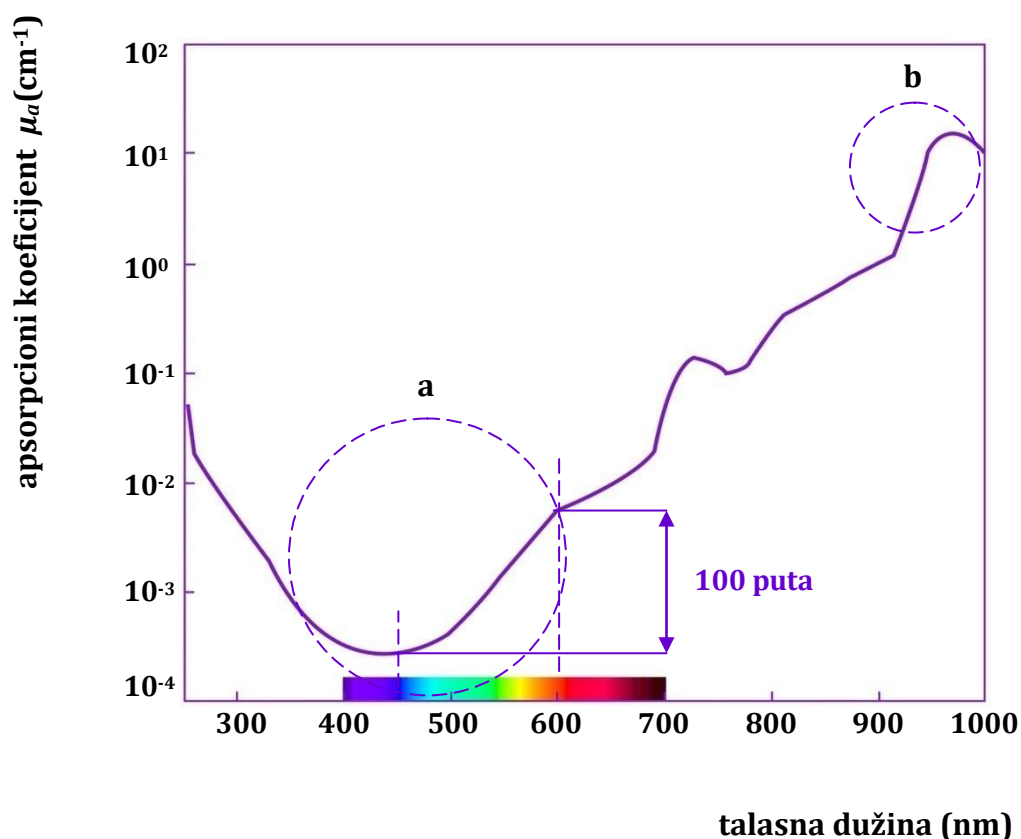
1.5.1.1. | Apsorpcija

Apsorpcija je proces gubitka jednog dela energije svetlosti, koja se može transformisati u toplotu, zvuk, te fluorescenciju prilikom prolaska (*penetracije*) svetlosti kroz određenu sredinu, tj. tkivo (Lister i sar., 2012; Tuchin, 2015b). Nastaje kada atom iz stanja najniže dozvoljene energije pređe u pobuđeno stanje pod uticajem fotona odgovarajuće energije (Bohren i Huffman, 1983).

Nivo apsorpcije svetlosti opisuje se kroz koeficijent apsorpcije μ_a (cm^{-1}) koji predstavlja recipročnu vrednost pređenog puta svetlosti kroz tkivo, u okviru kog je došlo do umanjjenja intenziteta upadne svetlosti. Uglavnom se ovaj parametar posmatra u odnosu na talasnu dužinu upadne svetlosti (Jacques, 2013; Tuchin 2015b).

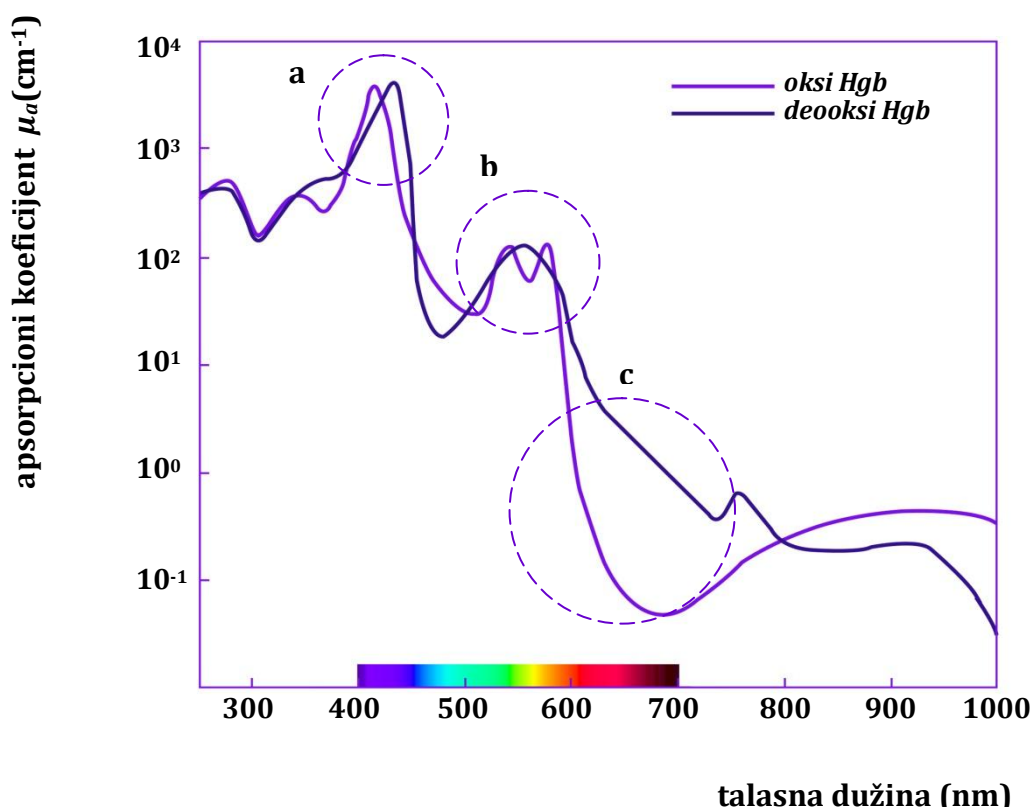
Apsorpcija u humanim tkivima pre svega zavisi od prisustva molekula sposobnih da apsorbuju fotone određenih talasnih dužina - hromofora. Među najznačajnije hromofore, koje definišu apsorpcioni potencijal tkiva ubrajaju se voda i cela krv, u kojoj presudnu ulogu ima hemoglobin - oksihemoglobin (sadrži kiseonik) i deoksihemoglobin (ne sadrži kiseonik). Pored njih, značajan doprinos apsorpciji upadne svetlosti mogu dati i prisustvo masti (*lipida*), melanina, bilirubina, karotenoida i porfirina. Od značaja za spektroskopske analize bitne su i hromofore sa nižim stepenom apsorpcije svetlosti - aminokiseline (triptofan, tirozin), nukleinske kiseline, citohrom c oksidaza, mioglobin, vitamin B12 (sadrži kobalt) i dr. (Sandell i Zhu, 2011; Lister i sar., 2012; Jacques, 2013; Tuchin, 2015b; Wu i sar., 2018).

Sve navedene hromofore apsorbuju fotone upadne svetlosti nejednakim intenzitetom i na različitim talasnim dužinama elektromagnetnog spektra. Tako voda u regionu vidljive svetlosti (400-750nm) apsorbuje 100 puta više svetlosti u crvenom (600-750nm) u poređenju sa plavim delom spektra (400-500nm) (slika 15a). To je opet značajno manje od intenziteta apsorpcije u bliskom području infracrvenih zraka, gde voda pokazuje specifične apsorpcione krive između 900 i 1100nm (slika 15b) (Sandell i Zhu, 2011; Jacques, 2013; Tuchin, 2015b).



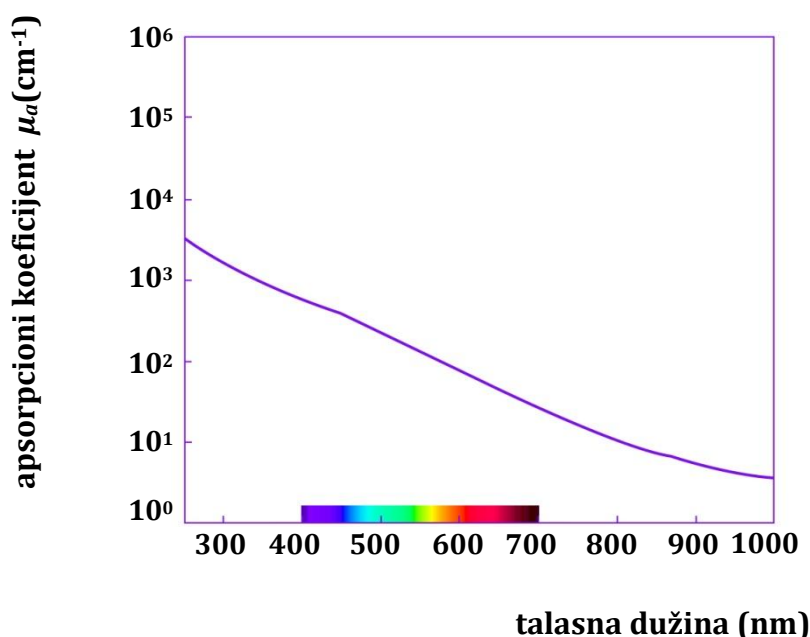
Slika 15. Apsorpcioni spektar vode sa posebnim osvrtom na područje vidljive svetlosti (Preuzeto i modifikovano sa interneta - zhun310, 2009)

Hemoglobin (Hgb), sa druge strane, jeste najznačajniji absorbent svetlosti u vidljivom delu spektra, i to na određenim talasnim dužinama koje se razlikuju kada je u pitanju oksihemoglobin, odnosno deoksihemoglobin (Sandell i Zhu, 2011; Jacques, 2013; Tuchin, 2015b). Oksihemoglobin pokazuje specifičan apsorpcioni pik u plavom delu spektra na 415nm - tzv. *Soretov* pik (slika 16a). Ovo je ujedno i pozicija najvećeg intenziteta apsorpcije, koja je prisutna još u zeleno - žutom području vidljivog spektra na 542 i 577nm - tzv. *Q* krivina (slika 16b). Intenziteti ova dva pika su 1 - 2% intenziteta *Soretovog* pika (Hsu i Woody, 1971). U poređenju sa oksihemoglobinom, primarni apsorpcioni pik deoksihemoglobina nešto je pomeren na 430nm (slika 16a), dok se kod istog nalazi još samo jedan pik i to na 555nm (slika 16b). U slučaju oba tipa hemoglobina nivo apsorpcije značajno se smanjuje posle 620nm, tj. ulaskom u crveni deo spektra (slika 16c) (Tuchin, 2015b).



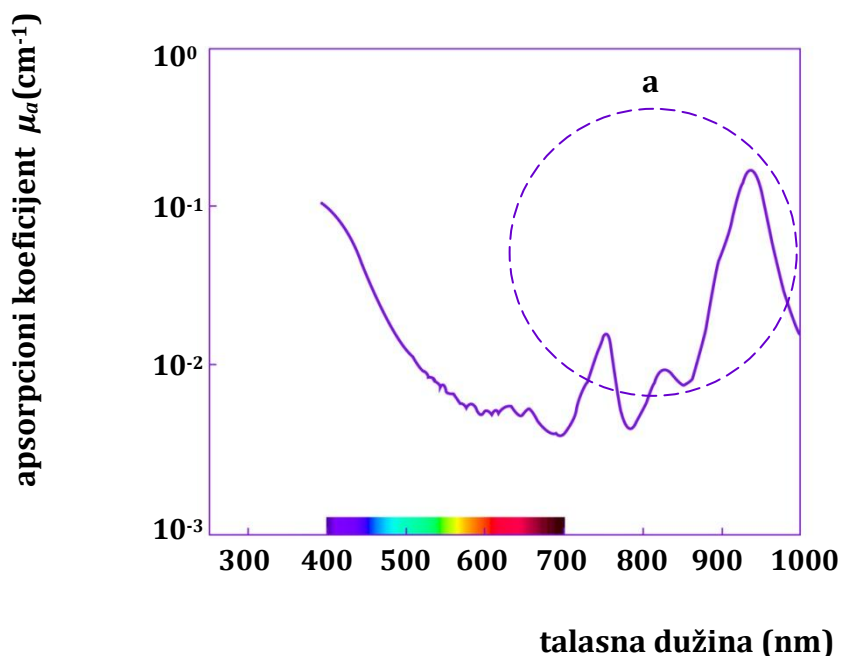
Slika 16. Apsorpcioni spektar hemoglobina sa posebnim osvrtom na područje vidljive svetlosti (Preuzeto i modifikovano sa interneta - zhun310, 2009)

Melanin je biološki pigment koji takođe može imati značajnog uticaja na apsorpciju svetlosti, a naročito u pogledu epidermisa kože. Opseg apsorpcije melanina je između 300 i 1000nm, s tim da je apsorpcija najizraženija u bliskom području ultraljubičastih zraka, dok se krećući se ka zonama infracrvenog dela spektra ona smanjuje (slika 17) (Jacques i McAuliffe, 1991; Meredith i sar., 2006; Zonios i sar., 2008; Tuchin, 2015b). Apsorpcija melanina se često opisuje kao model hemijskog nerada, u kome različite komponente melanina pokazuju različite apsorpcione intenzitete koji su u elektromagnetnom spektru predstavljeni jednom apsorpcionom krivom (Riesz, 2007; Zonios i sar., 2008; Lister i sar., 2012).



Slika 17. Apsorpcioni spektar melanina sa posebnim osvrtom na područje vidljive svetlosti (Preuzeto i modificovano sa interneta - zhun310, 2009)

Kada su u pitanju masti tj. lipidi, njihov uticaj na apsorpciju u tkivima naročito je izražen u područjima na talasnim dužinama većim od 700nm, sa najznačajnijim pikovima na 930nm (slika 18a) (Simpson i sar., 1998; van Veen i sar., 2004; Anderson i sar., 2006).



Slika 18. Apsorpcioni spektar lipida sa posebnim osvrtom na područje vidljive svetlosti (Preuzeto i modificovano sa interneta - zhun310, 2009)

Ostale hromofore uglavnom apsorbuju svetlost u području ultraljubičastih zraka i plavog spektra vidljive svetlosti - tabela 3. (Dawson, 1985; Du i sar., 1998; Jacques, 2013; Tuchin, 2015b). Treba istaći i da su pojedini autori mišljenja da u ultraljubičastom delu spektra preovlađuje apsorpcija kolagena (Wang i sar., 2008).

Tabela 3. Apsorpcija svetlosti - ostale spektroskopski važne hromofore u tkivima

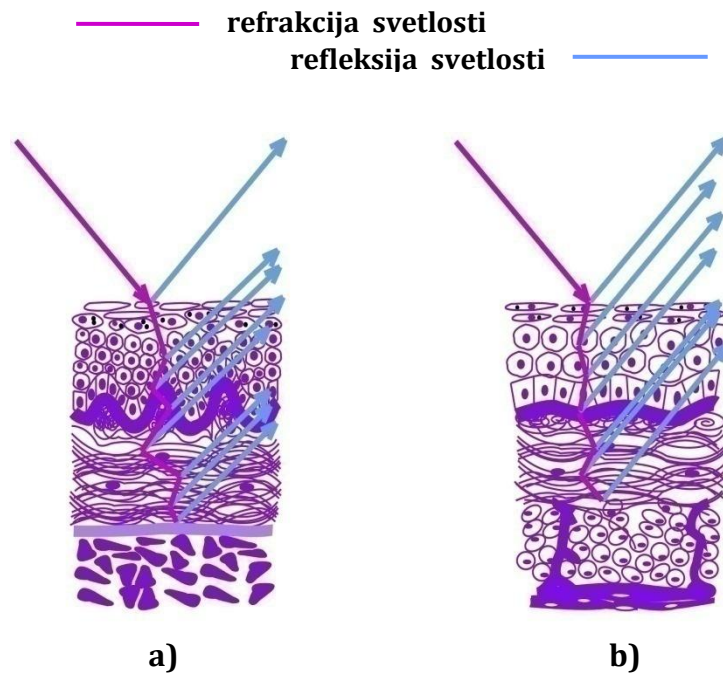
Hromofora	Apsorpcioni pik/opseg talasna dužina (nm)	Područje elektromagnetnog spektra
β - karoten	400 - 500	plava VIS
nukleinske kiseline	260 - 270	UV
tirozin	275	UV
triptofan	280	UV
bilirubin	330, 460	UV, plava VIS
NADH	339	UV
NAD	259	UV
citohrom c oksidaza	500 - 600; 820 - 830	VIS, NIF

1.5.1.2. | Rasejanje

Kada upadna svetlost u interakciji sa tkivom promeni pravac prostiranja, polarizaciju i fazu tada govorimo o rasejanju svetlosti (Lister i sar., 2012). Do njega dolazi kada elektroni u atomima tkiva pod uticajem električnog polja upadne svetlosti počnu oscilirati napred i nazad oko svog centra ravnoteže. To dovodi do promene brzine naelektrisanja i kao posledica emituje se svetlost u svim pravcima u ravni upravnoj na oscilaciju (Bohren i Huffman, 1983). Emitovana svetlost može biti iste frekvencije kao i upadna ili može promeniti frekvenciju, a samim tim i energiju. U prvom slučaju tada govorimo o elastičnom, a u drugom o neelastičnom rasejanju (Bohren i Huffman, 1983; Wang i Wu, 2007).

Do inicijalnog rasejanja dolazi prilikom prelaska svetlosnih zraka iz vazdušne u tkivnu sredinu na tzv. granici vazduh - tkivo. Kod oralne sluzokože to su površinski slojevi - *stratum corneum* ili *stratum superficiale* u zavisnosti od tipa epitela. U interakciji sa navedenim strukturama 4 - 7% upadne svetlosti biva rasejano u suprotnom smeru od smera upadne svetlosti tj. biva reflektovano (tzv. Fresnelova refleksija), dok ostatak svetlosti zadržava smer ka napred i prodire u tkivo, tj. biva refraktovano (Anderson i Parrish, 1982; Takiwaki, 1998; Lister i sar., 2012; Cruchley i Bergmeier, 2018). Na dalje rasejanje svetlosti utiče nehomogenost humanog tkiva kroz koje svetlost prodire i čini je skup brojnih procesa refleksije i refrakcije. Efekti refleksije i refrakcije svetlosti karakteristični su za svaki sloj tkiva

i uslovljeni su prisustvom različitih komponenti na strukturalnom, celularnom i intracelularnom nivou (slika 19).



Slika 19. Refrakcija i refleksija svetlosti u interakciji sa sluzokožom usne duplje. **a)** epitel mastikatorne sluzokože **b)** epitel zastorne sluzokože

Do rasejanja dolazi usled različitih vrednosti indeksa prelamanja svetlosti (eng. *refractive index*) ovih komponenti i okolne sredine čiju okosnicu u tkivima čini voda.

U datim interakcijama prevlađuju dva tipa elastičnog rasejanja - Rejljevo (eng. *Rayleigh scattering*) i Mia (eng. *Mie scattering*). Rejljevo se suštinski smatra tipom Mia rasejanja, jer se i jedno i drugo zasnivaju na teoriji rasejanja svetlosti od objekata sferičnog oblika (Jacques, 2013; Tuchin 2015b).

Rejljevo rasejanje karakteristično je za strukture koje su manjih dimenzija od vrednosti talasne dužine upadne svetlosti - promera do 100nm (Saidi i sar., 1995; Jacques, 1996; Tuchin, 2015b). U oralnoj sluzokoži to su strukturalni elementi poput keratinskih vlakana u keratinocitima ili kolagenih vlakana u bazalnoj membrani i lamini proprii (Saidi i sar., 1995; Jacques, 1996; Lister i sar., 2012; Cruchley i Bergmeier, 2018). Na celularnom i intracelularnom nivou glavni izvori Rejljevog rasejanja jesu lipidne membrane (6-10nm debljine), što je naročito karakteristično za ćelije sa velikim brojem mitohondrija i lizozoma (Beauvoit i sar., 1995; Wilson i sar., 2007; Tuchin 2015b). Od ostalih značajnijih komponenti tu su još ribozomi (promera 20nm) te miofilamenti i miofibrili u mišićnom tkivu (Tuchin, 2015b). Poseban značaj po ovaj tip rasejanja svetlosti ima i sadržaj DNK u ćelijama, jer je dokazano da je ono veće kada se ćelije nalaze u S i G2 fazi u poređenju sa G1 fazom ćelijskog ciklusa. Pored zaključka da je nivo rasejanja direktno proporcionalan količini DNK u ćelijama, treba reći i da je ovako rasejana svetlost mahom reflektovana, jer je ugao rasejanja vrednosti od 110 do 140° (Mourant i sar., 2000). Osim komponenti koje rasejavaju svetlost, još jednu bitnu razliku Rejljevog i Mia rasejanja predstavlja činjenica da Rejljevo rasejanje zavisi od talasne dužine upadne svetlosti (Jacques, 2013; Tuchin 2015b). Naime, ugao rasejanja

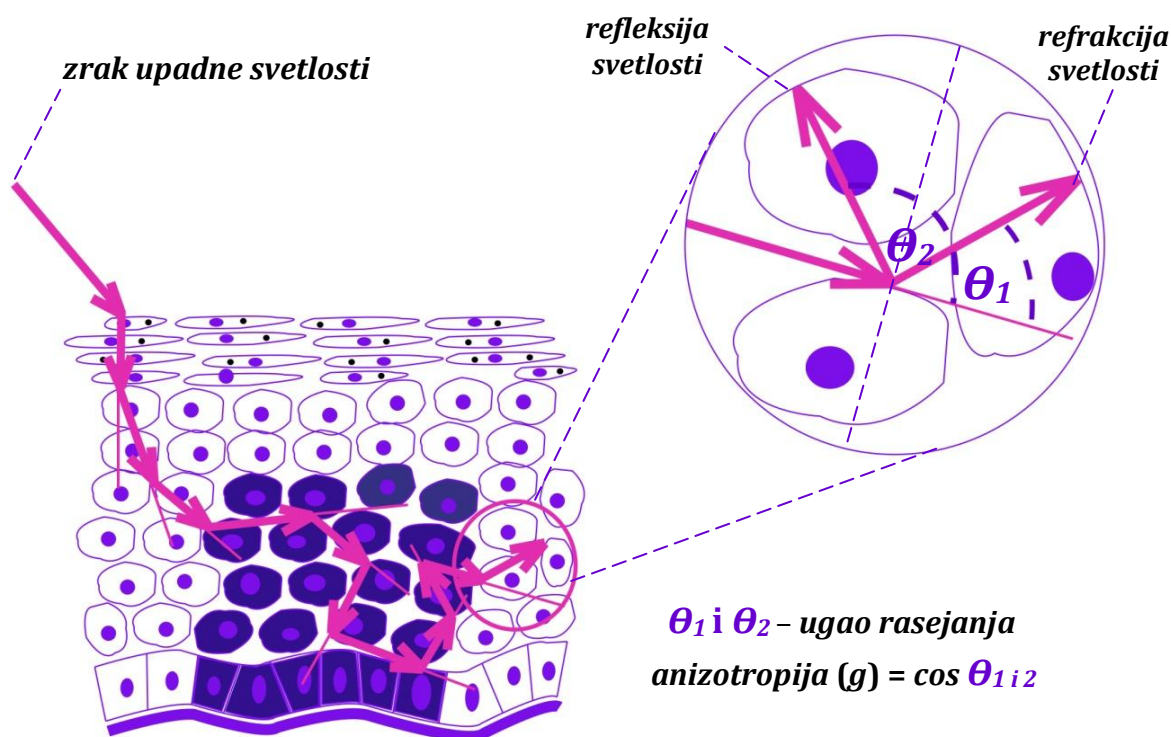
obrnuto je proporcionalan četvrtom stepenu talasne dužine, što znači da fotoni manjih talasnih dužina više skreću (Bohren i Huffman, 1983; Mishchenko i sar., 2002).

Mia rasejanje karakteristično je pre svega za veće celularne i intracelularne strukture - ćeliju kao celinu i jedro, kao i mitohondrije, lizosome i peroksizome većih dimenzija (Mourant i sar., 2000; Jacques, 2013; Tuchin, 2015b). Veliki broj studija ukazuje da je Mia rasejana svetlost gotovo uvek usmerena prema napred (refrakcija), tj. prema dubljim tkivnim strukturama (Anderson i Parrish, 1982; Jacques i sar., 1987; Mourant i sar., 2002; Hall i sar., 2012).

Kao parametri intenziteta i pravca rasejanja prilikom interakcije svetlosti i nehomogene sredine kao što je humano tkivo, najčešće se koriste koeficijent rasejanja μ_s (cm^{-1}), anizotropija g ($\cos \theta$, gde je θ ugao rasejanja) i realni indeks prelamanja n' (Jacques, 2013).

Kao i koeficijent apsorpcije, koeficijent rasejanja predstavlja umanjeње intenziteta upadne svetlosti u funkciji vrednosti pređenog puta svetlosti kroz tkivo. Prikazuje se najčešće u odnosu na talasnu dužinu upadne svetlosti (Jacques, 2013; Tuchin, 2015b).

Kako tkiva predstavljaju izuzetno složene sisteme, ukupno rasejanje nije vezano samo za pojedinačnu komponentu tkiva. Iz tog razloga se za opisivanje relativnog pravca rasejane svetlosti koristi anizotropija $g = \cos \theta$. Anizotropija nam daje informaciju o tome da li je svetlost pretežno usmerena prema napred (refrakcija) ili prema nazad (refleksija). Njene vrednosti kreću se od -1 do 1, gde -1 predstavlja direktnu refleksiju, a 1 direktnu propagaciju svetlosti (slika 20) (Wang i Wu, 2007; Jacques, 2013; Tuchin 2015b).



Slika 20. Rasejanje svetlosti u interakciji sa oralnim epitelom definisano uglom rasejanja i anizotropijom

Indeks prelamanja svetlosti predstavlja odnos brzine svetlosti kroz vakuum i brzine svetlosti kroz supstancu. Relativni indeks prelamanja podrazumeva odnos brzine svetlosti u dva optička entiteta - tkivna sredina i tkivne komponente. Za aproksimaciju kod humanih tkiva koristi se realni indeks prelamanja svetlosti n' i izražava se kao:

$$n' = n'_{dry} - (n'_{dry} - n'_{water})W$$

gde je n'_{dry} indeks prelamanja svetlosti suve mase tkiva, n'_{water} indeks prelamanja svetlosti vode, a W sadržaj vode,

čime se realni indeks prelamanja svetlosti tkiva stavlja u funkciju količine vode u tkivima (Jacques, 2013). Indeks prelamanja svetlosti je od izuzetnog značaja za rasejanje svetlosti. Što su veće razlike u vrednosti indeksa prelamanja različitih komponenata tkiva (ćelija, jedra, organela i dr.) i indeksa prelamanja sredine u kojoj se one nalaze, to je rasejanje svetlosti veće (Tuchin, 2015b).

Koji je tip elastičnog rasejanja svetlosti dominantniji? Anizotropija tkiva u mnogim studijama pokazuje izuzetno visoke vrednosti, što ukazuje da se manji deo svetlosti reflektuje, a da je veći deo svetlosti usmeren ka napred (Anderson i Parrish, 1982; Jacques i sar., 1987; Mourant i sar., 2002; Hall i sar., 2012). Takvi nalazi idu u prilog dominantnoj ulozi ćelije kao celine i jedra u ukupnom rasejanju, ali potencijalno i drugih struktura visoke gustine i promera (Jacques, 2013). Sa druge strane, rezultati nekih istraživanja ukazuju da Mie rasejanje preovlađuje kada je ugao rasejanja manji od 10° , dok je kod većih uglova značajniji doprinos manjih struktura, tj. organela i membrana (Xu i sar., 2008). Mourant i saradnici takođe ističu da su za 55% ukupno rasejane svetlosti, pri uglu rasejanja većem od 40° , odgovorne intracelularne strukture, i to sa ulogom jedra u samo 40% navedenog rasejanja (Mourant i sar., 2000). U odnosu na talasnu dužinu upadne svetlosti, treba očekivati da se uticaj manjih komponenti u tkivima na ukupno rasejanje svetlosti smanjuje sa porastom talasne dužine (Jacques, 2013).

Za oblast biomedicinske optike najznačajniji vid neelastičnog rasejanja predstavlja Ramanovo rasejanje. Ono nastaje kada foton upadne svetlosti u interakciji sa molekulima sredine kroz koju prolazi preda ili primi malu količinu energije. Kada upadni foton tkivu predaje energiju, izlazni foton nosi manju količinu energije i tada govorimo o stoksovom Ramanovom rasejanju. U suprotnom, kada upadni foton primi energiju od molekula tkiva, izlazni nosi veću količinu energije i tada se radi o antistoksovom Ramanovom rasejanju. U oba slučaja emituje se svetlost novih talasnih dužina (frekvencija), koja predstavlja kombinaciju frekvencija upadne svetlosti i frekvencija vibracionih i rotacionih kretanja molekula. Na taj način ona nosi informacije o karakteristikama određenog dela tkiva na molekularnom nivou. Treba reći da najinformativniji spektralni region ovog tipa rasejanja predstavljaju intenziteti stoksovih Ramanovih linija, ali da je to ujedno i intenzitet koji je tek 10^{-15} do 10^{-7} deo intenziteta Rejljevog rasejanja (Tu, 1982; Mahadevan-Jansen i Richards-Kortum, 1996; Lucassen i sar., 2016).

1.5.1.3. | Generički model interakcije svetlost - tkivo

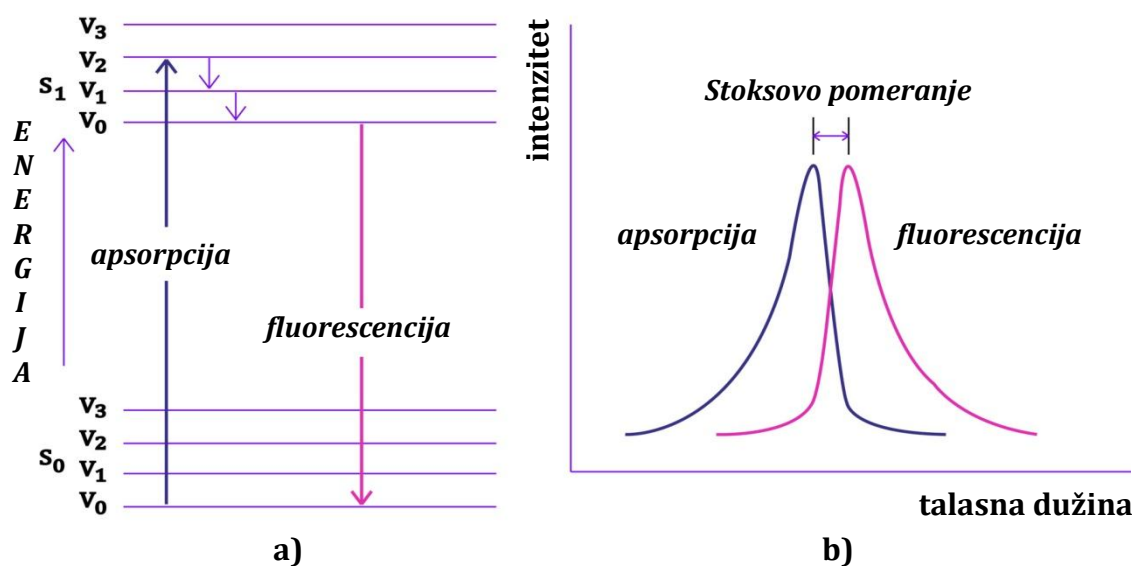
Koristeći najznačajnije karakteristike apsorpcije i rasejanja svetlosti prilikom njenog prolaska kroz tkivo, Jacques je definisao generički model tkiva čije optičke karakteristike zavise od:

- saturacije Hemoglobina u krvnim sudovima tkiva kiseonikom
- prosečnog volumena krvi u tkivu
- sadržaja (količine) vode u tkivu
- koncentracije bilirubina
- koncentracije β - karotena
- sadržaja (količine) masti (lipida) u tkivu
- udeo volumena melanozoma u tkivu (količina melanina)

Simulacijom različitih stanja u tkivima koja se zasnivaju na različitim vrednostima navedenih faktora, mogu se modelovati brojni scenariji interakcije svetlosti i tkiva. Na ovaj način moguće je prikazati brojne aspekte apsorpcije, kao i odnose Rejljevog i Mia rasejanja svetlosti u tkivu (Jacques, 2013).

1.5.1.4. | Fluorescencija

Fluorescencija je fenomen interakcije svetlosti i tkiva koji se nadovezuje na proces apsorpcije. Naime, ona predstavlja emisiju fotona koja je atomu hromofore neophodna da bi se iz pobuđenog stanja, nastalog kao posledica apsorpcije fotona upadne svetlosti, vratio u svoje osnovno stanje (slika 21a)(Rosenthal i sar., 2015a; Schneckenburger i sar., 2016; Wu i sar., 2018).



Slika 21. Fenomen fluorescencije (Preuzeto i prilagođeno sa interneta –Jacopo Werther, 2010; Chem461S16Group1, 2016)

U toku ovog procesa dolazi do gubitka energije, te u odnosu na apsorpcioni, spektar emitovane svetlosti biva pomeren ka stanjima niže energije, a stoga i većim talasnim dužinama. Ovo pomeranje spektra fluorescencije u odnosu na spektar apsorpcije naziva se Stoksovo pomeranje (eng. *Stokes shift*) (slika 21b) (Schneckenburger i sar., 2016; Wu i sar., 2018). Svaka hromofora poseduje karakterističan fluorescentni životni vek, čije se trajanje, uz sve specifičnosti, meri nano i piko sekundama (Tuchin, 2016; Schneckenburger i sar., 2016; Wu i sar., 2018).

U tabeli 4 prikazana su poređenja pikova/opsega apsorpcije i fluorescencije pojedinih hromofora, na osnovu kojih se može utvrditi i vrednost Stoksovog pomeranja (Jérôme i sar., 2007; Zheng i sar., 2011; Schneckenburger i sar., 2016).

Tabela 4. Spektar apsorpcije i fluorescencije hromofora u humanim tkivima

hromofora	spektar apsorpcije talasna dužina (λ (nm))	spektar fluorescencije talasna dužina (λ (nm))
proteini fenilalanin - tirozin - triptofan	257 - 280	280 - 350
kolagen, elastin	300 - 400	400 - 600 (pikovi - 400, 430, 460)
oksihemoglobin	<i>Soretov</i> pik 415	438
NADH	335 - 350	440 - 470
FAD	450	505 - 550

Zahvaljujući metodama koje se zasnivaju na ovom fenomenu u mogućnosti smo da dobijemo informacije o fluorescenciji određenih molekula (povećana ili snižena koncentracija), njihovim konformacionim stanjima, interakcijama i vezama sa drugim molekulima unutar ćelije i tkiva (Sinichkin i sar., 2016).

U praksi se primenjuju dva pristupa fluorescencije - prvi koji koristi fluorescenciju prirodnih hromofora kao onih prikazanih u tabeli 4 i koje se još nazivaju endogenim fluoroforama i drugi koji podrazumeva upotrebu egzogenih fluorescentnih boja sposobnih za identifikaciju građe i fiziologije ćelija u tkivu - egzogene fluorofore (Sinichkin i sar., 2016; Wu i sar., 2018).

1.5.1.5. | Vrste svetlosti u biomedicinskoj optici

Za potrebe medicinske dijagnostike, kao i terapije najčešće se koriste tri vrste svetlosti:

- difuzna svetlost (različite vrste lampi, prirodna Sunčeva svetlost)
- laserska svetlost - laseri koji koriste područja X zraka, ultraljubičastih i infracrvenih zraka (laseri sa X zracima, UV laseri, IR laseri) i
- linearno polarizovana svetlost.

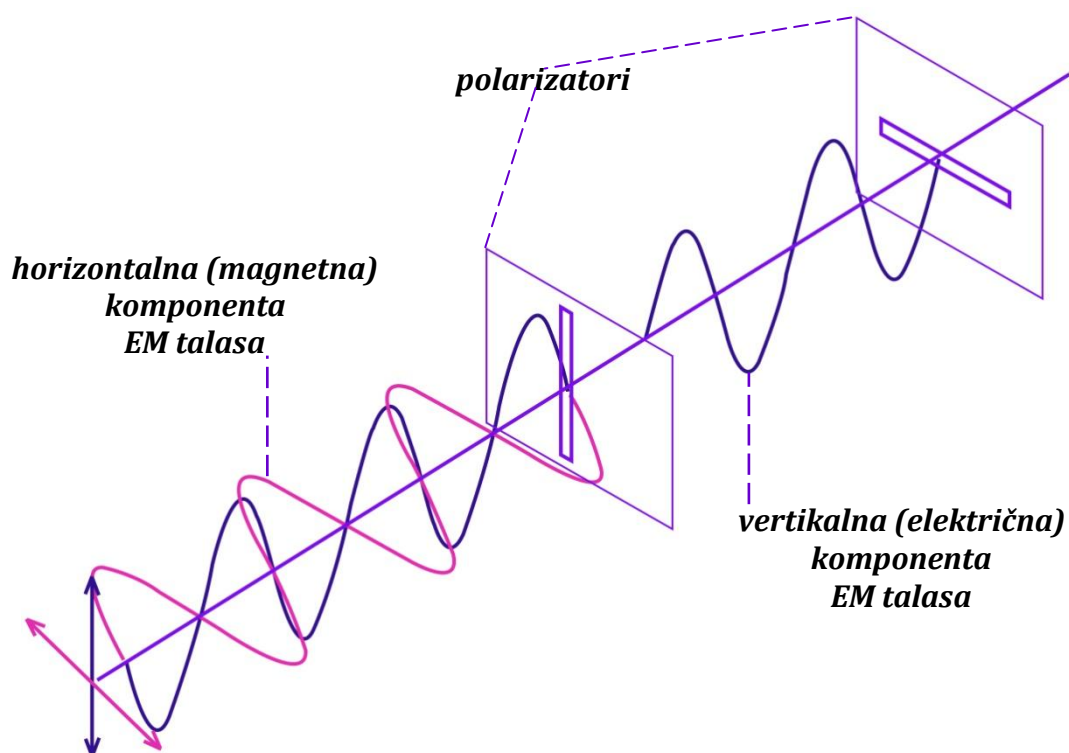
Razlike u karakteristikama navedenih tipova svetlosti ogledaju se pre svega u fotonima koji mogu biti različitih ili istih talasnih dužina - polihromatska ili monohromatska svetlost. Fotoni difuzne i linearno polarizovane svetlosti su polihromatski, dok lasersku svetlost čine fotoni monohromatske svetlosti. Kod difuzne svetlosti prisutno je nasumična orijentacija električne i magnetne komponente fotona (u svim pravcima), kod laserske visoka energija usmerena je ka tačno određenoj površini, dok se kod linearno polarizovane fotoni istih

frekvencija nalaze u istoj ravni. Laserska svetlost je u poređenju sa druge dve koherentna, tj. talasi koji je čine nalaze se u istoj fazi i vremenski i prostorno su isti. Kod difuzne svetlosti električno i magnetno polje uvek su upravni jedno u odnosu na drugo u svim pravcima prostiranja svetlosti. Kod laserske i linearno polarizovane moguća je vertikalna ili horizontalna polarizacija (Koruga, 2017).

1.5.1.6. | Polarizacija svetlosti

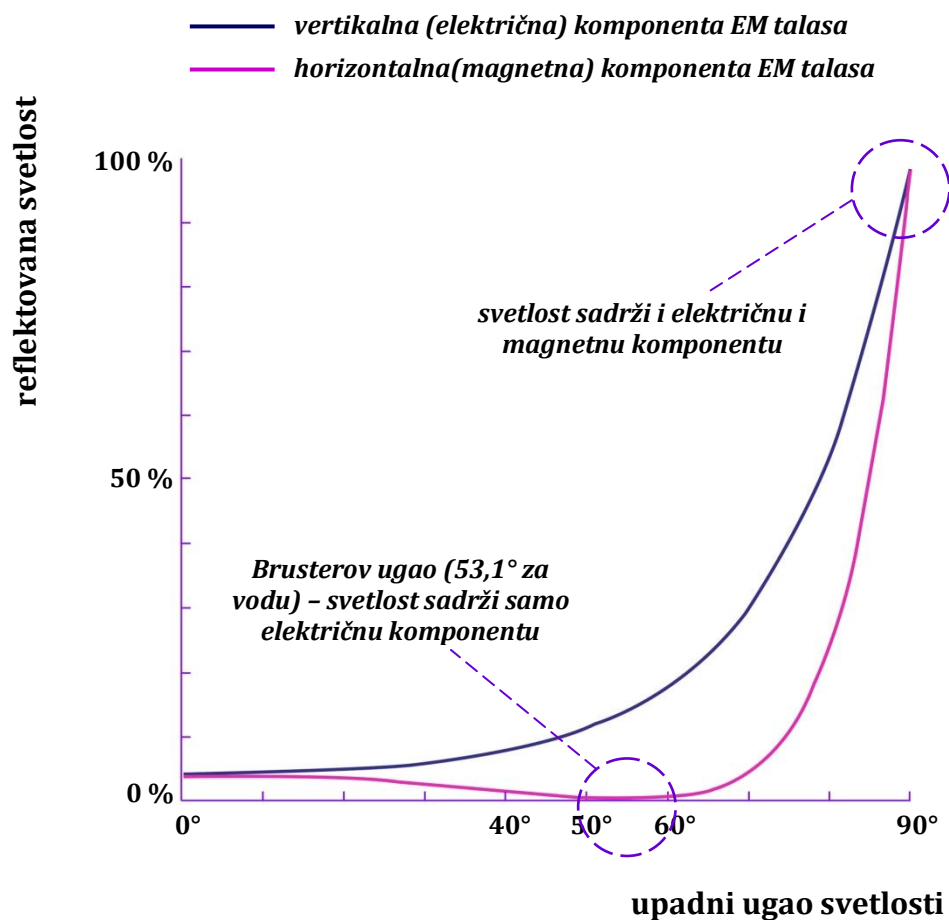
"Polarizacija svetlosti opisuje geometrijsku orijentaciju oscilacija elektromagnetnog talasa" (Baumann, 2017). Postoje tri tipa polarizovane svetlosti - linearno polarizovana, cirkularno polarizovana i eliptično polarizovana svetlost. Kod linearno polarizovane svetlosti vektori električnog i magnetnog polja osciliraju u jednoj ravni - ili duž x ose kada govorimo o horizontalnoj, ili duž y ose kada je reč o vertikalnoj linearnoj polarizaciji. Kada se vektor elektromagnetnog zraka rotira oko pravca zraka u ravni koja je upravna na zrak reč je o eliptičnoj polarizaciji. Ako je rotacija kružna i ukoliko ne dođe do periodične promene intenziteta, ona postaje cirkularna. Često se u interpretaciji polarizacije svetlosti koristi Poenkareova sfera koja na osnovu faznog pomeranja elektromagnetnog talasa prikazuje raspored linearnih i cirkularnih polarizacija (Tuchin, 2016; Baumann, 2017; Koruga, 2017).

Linearna polarizacija u biomedicinskoj optici je fenomen u kome se tehničkim rešenjima (postavljanjem polarizatora) ili prirodnim putem (od strane tkiva) propušta ili reflektuje određeni deo difuzne svetlosti (njena električna komponenta) u kome su fotoni iste talasne dužine uređeni u ravni (Tuchin, 2016; Koruga 2017). Tako će recimo difuzna svetlost propuštena kroz vertikalni polarizator sadržati samo fotone kod kojih je električna komponenta vertikalna, dok će kroz horizontalni polarizator prolaziti fotoni kod kojih je električna komponenta horizontalna (slika 22) (Koruga, 2017).



Slika 22. Polarizacija svetlosti

Da li će linearna polarizacija biti vertikalna ili horizontalna zavisi i od ugla upadne svetlosti. U slučaju humanih tkiva kada difuzna svetlost padne na površinu tkiva pod tačno određenim uglom, to tkivo će polarizovati svetlost. U takvim okolnostima horizontalna komponenta linearne polarizacije je jednaka nuli. Samim tim reflektovana svetlost biće vertikalno polarizovana, tj. sadržaće samo fotone električne komponente svetlosti. Ovaj ugao naziva se Brusterov ugao (eng. *Brewster angle*) i karakterističan je za različita tkiva i materijale (slika 23). Tako je recimo vrednost Brusterovog ugla za vodu $53,1^\circ$ (Baumann, 2017; Koruga 2017).



Slika 23. Refleksija difuzne svetlosti u odnosu na njen upadni ugao (Preuzeto i prilagođeno sa interneta – Ulflund, 2011)

U slučaju da je prilikom polarizacije površine nekog materijala došlo do reflektovanja svetlosti pod uglom koji je upravan na Brusterov ugao tada govorimo o spekularnoj refleksiji koja je karakteristična za linearnu polarizaciju materijala sa ravnom površinom (npr. ogledalo). Kod tkiva, čija je površina neravna a organizacija nehomogena preovlađuje difuzna refleksija (Fox, 2010; Koruga, 2017).

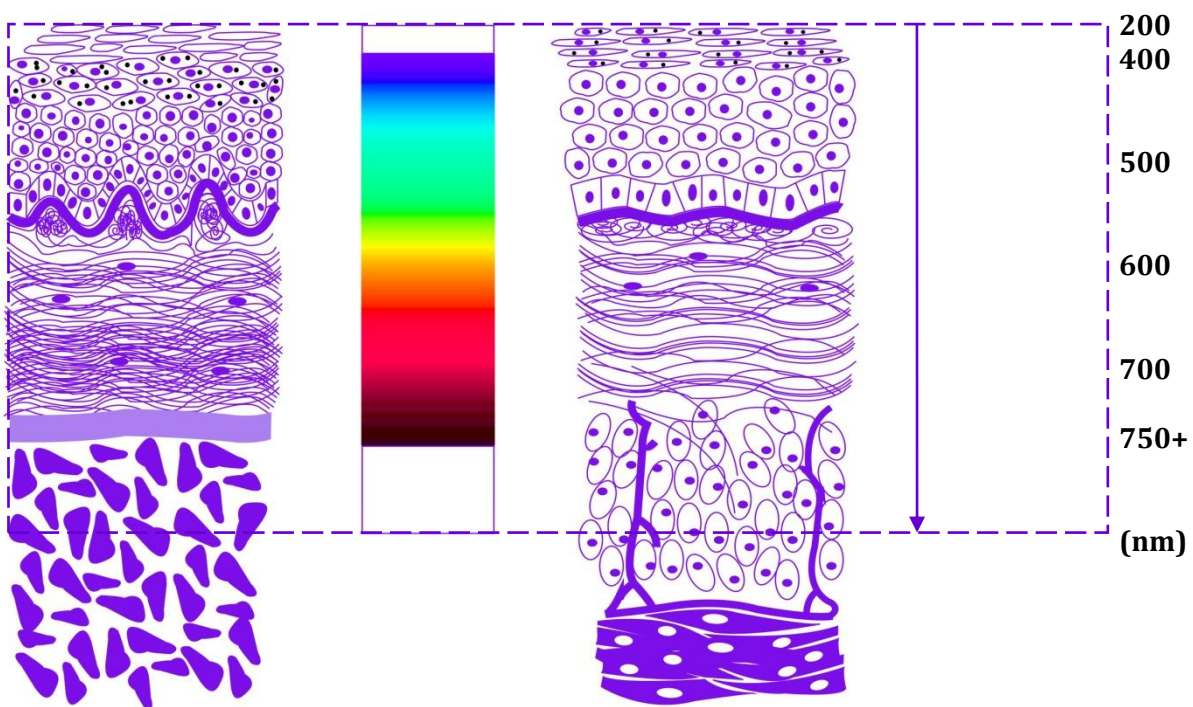
1.5.1.7. | Dubina prodiranja svetlosti

Kao što je već napomenuto, sveukupan prodor difuzne svetlosti kroz tkiva nalazi se u funkciji procesa apsorpcije i rasejanja svetlosti.

Prodor fotona različitih talasnih dužina stoga je uslovljen njihovom interakcijom sa komponentama u različitim slojevima tkiva. Veliki deo apsorpcije ispoljava se interakcijom fotona na talasnim dužinama koje odgovaraju području ultraljubičastih zraka i području vidljive svetlosti (plavi, zeleni i žuti deo spektra), dok efekti rasejanja slabe sa porastom talasne dužine (Clement i sar., 2005; Jacques, 2013; Tuchin, 2015b; Sturm i Wang, 2015; Yang i sar., 2017).

Shodno navedenom, može se zaključiti da će fotoni sa talasnim dužinama koje odgovaraju području crvenog dela vidljivog spektra i području infracrvenih zraka prodirati dublje u tkiva (Zhao i Fairchild, 1998; Kwon i sar., 2009). Ipak, neka istraživanja ukazuju i na određena ograničenja u tom pogledu, smatrajući da nije jasna dubina prodiranja fotona na talasnim dužinama većim od 1000 nm (Thayson-Peterson i sar., 2012).

U biomedicinskoj optici, vrednosti prodora svetlosti u tkivima procenjene su na 4 do 6 mm. (Fitzpatrick, 1988; Clement i sar., 2005) Ash i saradnici u svojoj studiji procenjuju dubinu prodiranja na 5,4 mm za svetlost talasne dužine od 750 nm (Ash i sar., 2017). U slučaju oralne sluzokože, zbog različite organizacije oralnog epitela, sastava lamine proprie i prisustva submukoznog ili koštanog tkiva, prisutne su značajne varijacije u dubini prodiranja svetlosti kroz tkivo (slika 24).



Slika 24. Prodor svetlosti kroz dva različita tipa sluzokože usne duplje za opseg talasnih dužina od 200 do 750+ nm

U tabeli 5 prikazane su vrednosti dubine prodiranja svetlosti u zavisnosti od talasne dužine i u odnosu na slojeve oralne sluzokože (Clement i sar., 2005; Jacques, 2013; Koruga, 2017).

Tabela 5. Dubina prodiranja svetlosti u odnosu na sloj oralne sluzokože

područje EM spektra	talasna dužina (λ (nm))	dubina prodiranja (mm)	sloj oralne sluzokože
UV	200 - 400	< 0,5	stratum corneum / stratum superficiale
plavi deo VIS	400 - 500	0,5 - 1	stratum corneum / stratum superficiale / stratum granulosum
zeleni deo VIS	500 - 560	\approx 2,5	stratum basale / lamina propria
žuti deo VIS	560 - 600	< 4	lamina propria
crveni deo VIS	600 - 740	\leq 5	lamina propria / submukoza / periost / kost
NIR	750+	\approx 5,5	submukoza / periost / kost

1.5.2. | Analiza širokog polja lezije

U grupu metoda koje imaju mogućnost analize širokog polja lezije ubrajaju se (Kain i sar., 2020):

1. metode zasnovane na principu autofluorescencije (eng. *autofluorescent imaging* - AFI)
2. metode zasnovane na primeni fluorescentnih boja
3. endoskopija uskog snopa (*narrow band imaging* - NBI)

1.5.2.1. | Primena metoda zasnovanih na autofluorescenciji tkiva u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a

Princip rada

Ove metode koriste sposobnost različitih tkivnih hromofora (endogene fluorofore) da emituju svetlost - autofluorescencija, o čijem mehanizmu je već bilo reči (Sinichkin i sar., 2016). Uređaji na bazi autofluorescencije (AFI uređaji) uglavnom proizvode ekscitacionu svetlost u područjima ultraljubičastih zraka (200-400 nm) i vidljivog dela spektra (400-600 nm) (Lane i sar., 2006). U zdravom tkivu, nakon što hromofore apsorbuju deo upadnih fotona, dolazi do emisije fluorescentne svetlosti. Kod neoplastičnog tkiva usled morfoloških i metaboličkih alteracija, menjaju se i optička svojstva tkiva te je ovaj fenomen umanjen ili

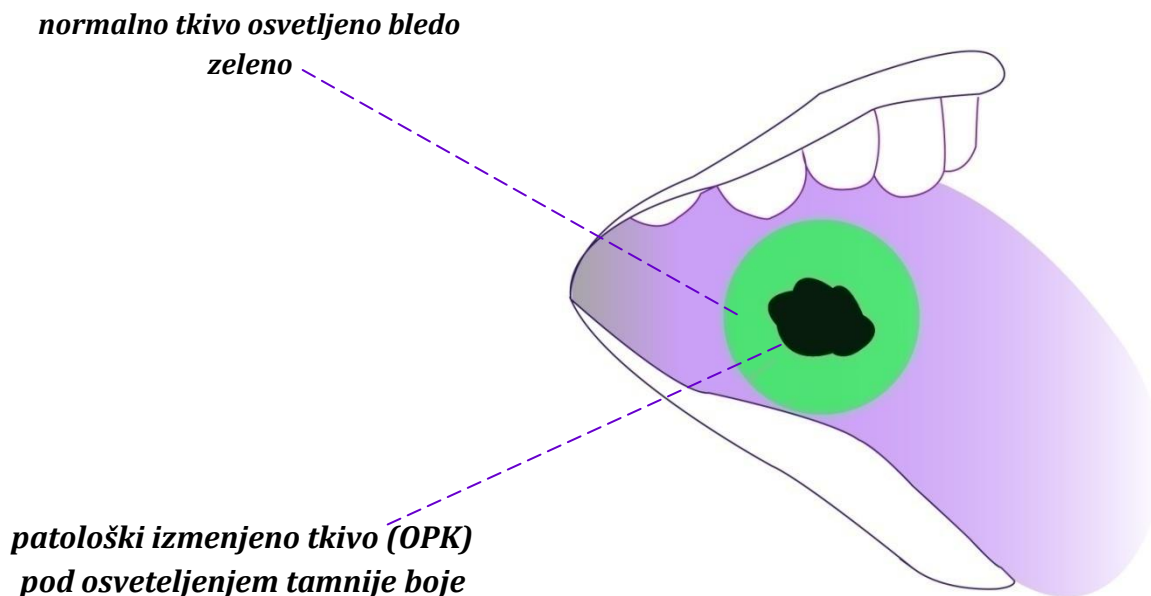
izostaje (Sweeny i sar., 2011; Mercadante i sar., 2012; Messadi, 2013). Iz tog razloga, makroskopski posmatrano, tumorsko tkivo izgleda tamnije od okolnog zdravog (Lane i sar., 2006). Najčešće se kod metoda zasnovanih na principu autofluorescencije koriste apsorpciono - emisione karakteristike redukovanog nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) i flavin adenin dinukleotida (FAD) (de Veld i sar., 2005).

Instrumentacija

U analizi suspektnih promena u usnoj duplji danas se koriste dva uređaja koja se zasnivaju na autofluorescenciji posmatranog tkiva - ranije pomenuti VELscope (LED Medical Diagnostics, Vankuver, Kanada) i Identafi (DentalEZ, Lankaster, SAD) (Messadi, 2013). Prvi predstavlja ručnu kameru koja ekscitira tkivne hromofore plavom (400-460 nm), dok drugi, čija sonda podseća na stomatološko ogledalce, ekscitaciju, shodno nameni, sprovodi belom, ljubičastom (405 nm) ili zeleno žutom (545 nm) svetlosti (Roblyer i sar., 2009; Farah i sar., 2012; Bhatia i sar., 2013). VELscope se zbog lakog rukovanja i interpretacije osvetljenog područja češće koristi u svakodnevnoj praksi. Identafi, i pored šireg okvira performansi od VELscope-a, zahteva dužu obuku u adekvatnom korišćenju, te se stoga ređe primenjuje. Oba uređaja zamišljena su pre svega kao pomoćne tehnike u skriningu, dijagnostici i hirurškom lečenju patoloških promena u usnoj duplji (Wu i sar., 2018).

Klinička primena

Makroskopski, zdrava tkiva osvetljena plavom svetlosti VELscope - a su bledo zelene boje. Patološki izmenjena, zbog umanjene ili izgubljene autofluorescencije, izgledaju tamnije u odnosu na okolna tkiva (slika 25).



Slika 25. Polje vizuelizacije uspostavljeno primenom VELscope uređaja

Kod Identafi - a, bela svetlost koristi se pri standardnom stomatološkom pregledu a ljubičasta kao i u slučaju VELscope-a u razlikovanju zdravog od neoplastičnog tkiva. Posebnu namenu ima zeleno žuta svetlost. Njena talasna dužina odgovara jednom od apsorpcionih

pikova oksihemoglobina, što potencira vizuelizaciju novostvorenog vaskularnog tkiva kod tumora - identifikacija angiogeneze (Farah i sar., 2012; Bhatia i sar., 2013; Wu i sar., 2018).

Kao što je već navedeno, VELscope se češće koristi u svakodnevnoj kliničkoj praksi (Wu i sar., 2018). U pogledu skrininga (stomatološka ordinacija), pokazao se kao pouzdano pomoćno sredstvo standardnom stomatološkom pregledu usne duplje - veći broj primećenih patoloških promena u kombinaciji sa pregledom u odnosu na pregled zasebno (Huff i sar., 2009). Bhatia i saradnici beleže da primenjen samostalno (bez pregleda), VELscope pokazuje specifičnost od samo 54,3%, dok upotrebljen sa pregledom, ovaj parametar raste na skoro 98% (Bathia i sar., 2014). U dijagnozi OPK-a i displazije, najnovije sprovedena meta analiza ukazuje na srednje vrednosti senzitivnosti i specifičnosti od 72,4 i 63,8%, čime se po autorima u ovom trenutku primena VELscope-a u ove svrhe može smatrati nedovoljno pouzdanom metodom (Giovannacci i sar., 2016).

Kada je reč o intraoperativnoj evaluaciji hirurških margina, VELscope-om je u studiji koju su sproveli Poh i saradnici, identifikovan gubitak autofluorescencije u regionima na 4 do 25 mm (srednja vrednost 10,3 mm) od granice klinički vidljivog tumora. Od margina koje su pokazale gubitak autofluorescencije, za 89% njih je histopatološkom analizom utvrđeno prisustvo nekog oblika displazije ili karcinoma. Kod margina koje su zadržale svoju autofluorescenciju, samo je jedna od 66 histopatološki ocenjena kao displastična (Poh i sar., 2006).

U novijim istraživanjima utvrđeno je da primena VELscope-a tokom procene adekvatnosti hirurških margina značajno umanjuje stopu lokalnog recidiviranja u periodu od tri godine nakon hirurške terapije. Naime, u slučajevima gde je pored standardne procedure korišćen i VELscope, trogodišnja stopa iznosila je 6,5% za OPK, odnosno 8,1% za displaziju visokog stepena, dok je u slučajevima gde je primenjena samo standardna procedura, ova stopa iznosila 40,6 (OPK) i 39,3% (displazija) (Poh i sar., 2016). Ohnishi i saradnici utvrdili su, koristeći VELscope, veoma visoku senzitivnost i specifičnost (91%; 100%) u diskriminaciji normalnog od patološki izmenjenog (karcinom, displazija) tkiva u usnoj duplji (Ohnishi i sar., 2016).

Sa druge strane, mali je broj studija koje se bave procenom efikasnosti Identafi uređaja. Tako je u jednom istraživanju utvrđena niža specifičnost ljubičaste i zeleno žute svetlosti korišćene u ovom uređaju u poređenju sa standardnim belim svetlom (Sweeny i sar., 2011; Lalla i sar., 2015).

Prednosti i nedostaci

Prednosti primene metoda zasnovanih na autofluorescenciji u hirurgiji glave i vrata (Poh i sar., 2006; Sweeny i sar., 2011; Mercadante i sar., 2012; Ohnishi i sar., 2016; Wu i sar., 2018):

- ✓ neinvazivnost
- ✓ praktična primena
- ✓ isplativost
- ✓ povoljni rezultati u slučajevima prekanceroznih lezija i početnih stadijuma oralnih karcinoma

Nedostaci primene metoda zasnovanih na autofluorescenciji u hirurgiji glave i vrata (Sweeny i sar., 2011; Poh i sar., 2011; Mercadante i sar., 2012; McNamara i sar., 2012; Bathia i sar., 2013; Wu i sar., 2018):

- ✓ relativno niska specifičnost
 - preklapanje efekta gubitka autofluorescencije sa istim kod granulacionog tkiva, edema ili inflamacije
 - fluorescencija patološki izmenjenog tkiva usled prisustva izraženo fluorescentnih bakterija i keratina kod hiperkeratoze
- ✓ mali broj pacijenata uključenih u studiju (trenutno u toku najveća studija - očekuje se da 400 pacijenata obolelih od oralnog karcinoma budu podvrgnuti analizama koje uključuju primenu uređaja na bazi autofluorescencije - COOLS studija)
- ✓ ograničenost na površinsku analizu (niska dubina prodiranja primenjene svetlosti)

1.5.2.2. | Primena fluorescentnih boja u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a

Princip rada

Ova metoda podrazumeva lokalnu ili sistemsku (intravenoznu) aplikaciju različitih egzogenih fluorofora praćenu ekscitacijom svetlosti čije se talasne dužine najčešće nalaze u području bliskih infracrvenih zraka (700-900 nm) (Zhang i sar., 2017; Kain i sar., 2020). Kako su u ovom regionu apsorpcioni potencijal tkivnih hromofora i ukupno rasejanje svetlosti minimalni, u njemu je moguće postići optimalan efekat - adekvatnu dubinu prodiranja i trajanje fluorescencije (Cheong i sar., 1990; Frangioni, 2003; Rosenthal i sar., 2015a). Svaka egzogena fluorofora sastoji se iz dve komponente - one koja se vezuje za tumorske strukture (tumorska komponenta) i fluorescentne boje koja pod uticajem svetlosti proizvodi fluorescenciju (fluorescentna komponenta) (de Boer i sar., 2015).

Egzogene fluorofore vrše markiranje neoplastičnih ćelija na nekoliko načina (Keereweer i sar., 2012):

- vezivanjem tumorske komponente za receptore tumora (receptor epidermalnog faktora rasta) ili migriranjem u unutrašnjost tumorske ćelije, da bi nakon toga fluorescentna komponenta proizvela fluorescenciju i označila ćeliju tumora
- specifični enzimi tumora (npr. matriks metaloproteinaza) reaguju sa molekulima umanjene fluorescencije prethodno akumuliranim u tumorskom tkivu, dovodeći ih u stanje povišene fluorescencije
- tumorska komponenta vezuje se za elemente neoplastične angiogeneze, a zatim ekcitrana fluorescentna komponenta emituje svetlost (fluorescenciju) i obeležava vaskularne strukture tumora

U sva tri slučaja prvo dolazi do akumulacije tumorske komponente u neoplastičnom tkivu, a zatim izvor svetlosti (posebno filtrirane lampe ili laseri) ekcitrira fluorescentnu komponentu koja emituje fotone čiji se signal, koristeći CCD (eng. *charge coupled device*) kameru, pretvara u sliku. Na kraju, meri se odnos signala koji potiče od tumorskih ćelija i signala koji je porekla okolnih struktura na slici - TBR (eng. *tumor-to-background ratio*). Kada je vrednost TBR-a najmanje 2, može se reći da je dato tkivo u potpunosti identifikovano kao tumor (Wu i sar., 2018).

Instrumentacija

Shodno regulatornim ograničenjima, uređaji za ekscitaciju prethodno aplikovanih fluorescentnih boja prilagođeni su proizvodnji svetlosti koja odgovara njihovom apsorpciono-emisionom spektru. Danas se iz tih razloga koristi samo svetlost talasnih dužina u području bliskih infracrvenih zraka (NIR). Uređaji na principu NIR svetlosti se u intraoperativnim uslovima primenjuju inkorporirani u postojeći operativni ili kao što je to slučaj sa fluorescentnim bojama, zaseban sistem (Rosenthal i sar., 2015; Wu i sar., 2018).

Klinička primena

Kao tumorska komponenta u hirurgiji glave i vrata najčešće se koriste antitela koja se vezuju za receptor epidermalnog faktora rasta - cetuksimab i panitumumab. Navedena antitela su ujedno i jedine tumorske komponente odobrene za kliničku upotrebu od strane Američke uprave za hranu i lekove (eng. *U.S. Food and Drug Administration*) (Warram i sar., 2014; Wu i sar., 2018). Brojna klinička istraživanja takođe ispituju mogućnosti primene nano antitela (eng. *nanobodies, affibodies*) koja poseduju lakšu molekularnu masu u odnosu na antitela, čime bi se omogućila bolja distribucija, dublje prodiranje i efikasnije izlučivanje (Bai i Bornhop, 2012; van Driel i sar., 2014).

Veliki broj studija usmeren je na pronalaženje optimalne fluorescentne boje koja bi zauzela mesto fluorescentne komponente (Wu i sar., 2018). Najčešće se koristi, i jedina je odobrena, indocijanin zelena - ICZ (eng. *indocyanine Greene - ICG*) (Schaafsma i sar., 2011; Wu i sar., 2018). Uloga ICZ-e se u hirurgiji oralnog karcinoma pre svega ispituje u mapiranju i biopsiji sentinel limfnih čvorova. Dok neke studije ističu pouzdanost ICZ-e, druge je i pored specifičnosti od 100% smatraju nedovoljnom dijagnostičkom metodom (Peng i sar., 2015; Al-Dam i sar., 2018). U pogledu evaluacije hirurških margina, Scott-Wittenborn i Jackson u svom istraživanju dolaze do zaključka da primenom ICZ-e nije moguće napraviti jasnu razliku između tumorskog i zdravog tkiva (Scott-Wittenborn i Jackson, 2018). Trenutno se sprovode kliničke studije koje ispituju pouzdanost primene još jedne boje - IRDye800CW (LICOR Biotechnology, Linkoln, SAD) (Wu i sar., 2018; Kain i sar., 2020). U kombinaciji sa cetuksimabom i panitumumabom, primena ove boje pokazuje specifičnost od 85, 78,6 i 81%, kao i senzitivnost od 91, 90,5 i 92,9% prilikom diskriminacije uzoraka normalnog te tkiva planocelularnog karcinoma i postekscizionog defekta u regiji glave i vrata (Rosenthal i sar., 2015b; Warram i sar., 2015). Primena ove dve boje je posebno značajna zbog njihove ekscitacije i fluorescencije u području bliskih infracrvenih zraka. Vrednosti njihovih apsorpcionih i fluorescentnih pikova prikazani su u tabeli 6 (Wu i sar., 2018).

Tabela 6. Apsorpcioni i emisioni spektri fluorescentnih boja

fluorescentna boja	spektar apsorpcije talasna dužina (λ (nm))	spektar fluorescencije talasna dužina (λ (nm))
indocijanin zelena - ICZ	807	820
IRDye800CW	785	810

Na uzorcima oralnog karcinoma rađena su i istraživanja u primeni γ -glutamil hidrosimetil rodamin zelene (eng. *γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine Greene - HMRG*) sa senzitivnosti od 100%, specifičnosti od 63% i tačnosti od 78%. (Slooter i sar., 2018) Od ostalih fluorescentnih boja, i u kombinaciji sa različitim tumorskim komponentama ispitivani su još i PARPi-FL i Cy5 (Kossatz i sar., 2016; Nguyen i sar., 2010).

Prednosti i nedostaci

Prednosti primene fluorescentnih boja u hirurgiji glave i vrata (Zhang i sar., 2017):

- ✓ netoksične po pacijenta
- ✓ nema zračenja
- ✓ rezultati dostupni u toku hirurške procedure
- ✓ adekvatno polje vizuelizacije
- ✓ niska cena

Nedostaci primene fluorescentnih boja u hirurgiji glave i vrata (Keereweer i sar., 2014; Zhang i sar., 2017; Wu i sar., 2018; Kain i sar., 2020):

- ✓ različiti fenotipi tumorskih ćelija - smanjenje senzitivnosti
- ✓ optička svojstva okolnih tkiva - smanjenje TBR - a
- ✓ nekompatibilnost izvora svetlosti uređaja i LED svetla u operativnoj sali
- ✓ niska specifičnost ICZ - e u razlikovanju tumorskog od zdravog tkiva
- ✓ mali broj pacijenata uključenih u istraživanja
- ✓ regulatorna ograničenja - potrebno je da talasne dužine svetlosti proizvedene u uređajima odgovaraju apsorpciono - emisionom spektru fluorofore

1.5.2.3. | Primena endoskopije uskog snopa (eng. *Narrow Band Imaging - NBI*) u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a

Princip rada

NBI tehnika zasniva se na razvoju posebne vaskularne mreže u okviru neoplastičnog tkiva - angiogeneza. Kako novostvoreni krvni sudovi podrazumevaju i povećan protok krvi u tkivu, tako se u njemu može očekivati i veća količina hemoglobina (Choi i Myers 2008; Messadi i sar., 2013). Iz tog razloga, 2003. godine prišlo se razvoju metode koja će suziti snop upadne svetlosti, tako da on odgovara apsorpcionom opsegu karakterističnim za oksihemoglobin (400-600 nm, sa pikovima na 415, 542 i 577 nm). Glavni cilj bio je da se ovakvim pristupom navedeni krvni sudovi vizuelizuju i povratna informacija predstavi kao faktor u razlikovanju neoplastičnog i zdravog tkiva (Hsu i Woody, 1971; Gono i sar., 2003; Tuchin, 2015b).

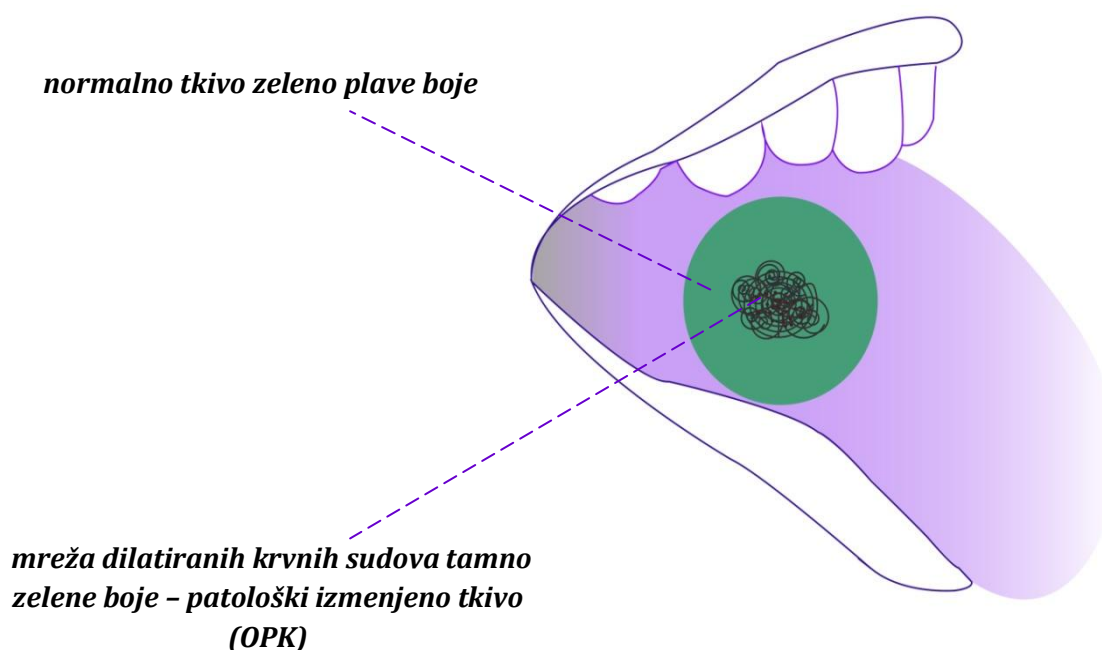
Instrumentacija

Ova tehnologija dostupna je u okviru većine fleksibilnih endoskopskih uređaja. Tako je korisniku omogućeno da jednostavnim pritiskom na dugme menja oblik upadne svetlosti, iz bele u NBI generisanu, i obratno. Kada korisnik izabere NBI opciju, emituje se upadna svetlost koja istovremeno sadrži suženi snop plave svetlosti (400-430 nm, centriranim na 415 nm - *Soretov pik*) i suženi snop zelene svetlosti (525-555 nm, centriranim na 540 nm - drugi apsorpcioni pik oksihemoglobina). Prvi snop namenjen je vizuelizaciji površinske vaskularne mreže u epitelnom sloju oralne sluzokože, dok drugi, shodno dubini prodiranja, ekscitira oksihemoglobin prisutan u krvnim sudovima lamine proprie. Poslednjih godina, u svrhu

dobijanja jasnije i preciznije slike, koriste se endoskopska uveličanja i kamere visoke rezolucije (Piazza i sar., 2012; Bhatia i sar., 2013).

Klinička primena

Makroskopski, primenom NBI metode neoplastični oblici tkiva vide se u pozadini zeleno plave zone na izgled normalnog tkiva kao polja ili tačke tamnije boje (tamno zeleno do braon). Ova mesta braonkaste boje pre svega predstavljaju polja izražene vaskularne gustine i patoloških intraepitelijalnih kapilarnih petlji (eng. *intraepithelial papillary capillary loops - IPCL*), koje su u odnosu na normalnu sluzokožu dilatirane i krivudave (slika 26) (Piazza i sar., 2012; Ni i Wang, 2016).



Slika 26. Polje vizuelizacije uspostavljeno primenom NBI tehnike

Upravo je na osnovu karakteristika navednih petlji Takano sa saradnicima razvio sistem klasifikacije neoplastične transformacije tkiva u okviru primene NBI tehnike. Na taj način definisane su četiri grupe: 1) IPCL tip I ili normalno - kapilarne petlje su upravne na površinu sluzokože; 2) IPCL tip II ili dilatirano - kapilarne petlje većeg promera, a sličnog oblika kao IPCL tip I; 3) IPCL tip III ili elongacija - petlje su većeg promera, čine se dužim i često su zamršene; 4) IPCL tip IV ili narušena struktura - petlje podsećaju na velike krvne sudove. Tipovi III i IV smatraju se potencijalno neoplastičnim tkivom - pozitivne lezije (Takano i sar., 2010).

U dijagnostici planocelularnog karcinoma glave i vrata NBI metoda je često korišćena. U svojoj meta analizi Li i saradnici utvrdili su da je sa senzitivnosti od 90%, specifičnosti od 97% i tačnosti od 98% NBI pouzdanija tehnika u dijagnostikovanju površinskih sluzokožnih maligniteta od standardne evaluacije pod belom svetlosti (bela svetlost), što je potvrđeno i u drugim istraživanjima (Li i sar., 2013; Nguyen i sar., 2013; Zabrodsky i sar., 2014).

U oblasti intraoperativne hirurgije, tj. evaluacije hirurških margina u terapiji OPK-a, NBI se pokazao superiornijim od bele svetlosti (Wu i sar., 2018). Tako je u jednom istraživanju, na uzorku od 58 pacijenata, *ex tempore* dijagnostikom zabeležen značajno manji broj pozitivnih margina kod hirurških postupaka u kojima je primenjena NBI metoda - 12,1% (NBI), 42,1% (bela svetlost) (Vicini i sar., 2015). U sličnoj studiji, Tirelli i saradnici *ex tempore* dijagnostikom nisu utvrdili značajne razlike između NBI tehnike i bele svetlosti, ali su one došle do izražaja nakon definitivnog histopatološkog nalaza - 11,5% (NBI), 36,4% (bela svetlost). Autori su takođe ukazali na mogućnost reevaluacije stanovišta da se prilikom ekscizije oralnog karcinoma resekciona linija postavlja na 1 do 1,5 cm od granice vidljivog tumora. Oni su kod 19 pacijenata, primenom NBI metode, registrovali patološku alteraciju i u tkivu koje se nalazilo i do 2,5 cm od granice tumora (Tirelli i sar., 2015). U svoje dve studije, Farah sa saradnicima takođe ističe prednosti NBI u odnosu na konvencionalnu primenu bele svetlosti. Osim što su margine primenom NBI bile manje involvirane tumorskim ćelijama od onih prosvetljenih belom svetlosti, stopa lokalnog petogodišnjeg recidiviranja bila je svega 5,26%, dok je stopa petogodišnjeg odsustva bolesti iznosila 84,21% (Farah i sar., 2015; Farah i sar., 2018).

Prednosti i nedostaci

Prednosti primene NBI metode u hirurgiji glave i vrata (Tirelli i sar., 2015; Farah i sar., 2018; Wu i sar., 2018):

- ✓ bolja lokalna kontrola bolesti
- ✓ jednostavna primena
- ✓ deo već postojećih endoskopskih sistema

Nedostaci primene NBI metode u hirurgiji glave i vrata (Piazza i sar., 2011; Lin i sar., 2012; Chu i sar., 2012):

- ✓ subjektivno ocenjivanje NBI rezultata na osnovu IPCL statusa
- ✓ nejasno definisan termin "pozitivne lezije" usled anatomskih razlika u usnoj duplji
- ✓ slaba vidljivost neoplastične angiogeneze u situacijama kada su prisutni hiperkeratinizacija, debeo epitel ili limfatično tkivo
- ✓ lažno pozitivni rezultati u slučajevima kada se radi o vaskularnim malformacijama benigne prirode, modifikacijama usled zračenja ili hirurškog zahvata i prisustva inflamacije

1.5.3. | Analiza uskog polja lezija

U grupu metoda koje imaju mogućnost analize uskog polja lezije ubrajaju se (Kain i sar., 2020):

1. spektroskopske metode:

- a) Spektroskopija zasnovana na elastičnom rasejanju (eng. *Elastic Scattering Spectroscopy* - ESS)
- b) Ramanova spektroskopija (eng. *Raman Spectroscopy* - RS)

2. optička koherentna tomografija (eng. *Optical Coherence Tomography* - OCT)i

3. mikroendoskopija visoke rezolucije (eng. *High-Resolution Microendoscopy* - HRME)

1.5.3.1. | **Primena spektroskopskih metoda u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a**

a) | **Spektroskopija zasnovana na elastičnom rasejanju svetlosti (eng. *Elastic Scattering Spectroscopy* - ESS)**

Princip rada

Kod ESS metode, kao što je to istaknuto i u samom nazivu, ključnu ulogu u razlikovanju različitih tipova tkiva (normalno, displastično, neoplastično) imaju osobine elastičnog rasejanja svetlosti u njima. Ova tehnika, koja je osmišljena devedesetih godina prošlog veka, pre svega se zasniva na rasejanju svetlosti koje potiče od ćelije kao celine i određenih subcelularnih struktura - jedra i ćelijskih organela (Bigio i Mourant, 1997; Mourant i sar., 1997; Hielscher i sar., 1997; Mourant i sar., 2000). Posebno se u histopatološkom smislu ističu uticaj veličine jedra, tj. odnosa jedro - citoplazma u ćeliji, jedarnog sastava u pogledu hromatina i njegove granularnosti, kondenzacije DNK materijala, broja i gustine mitohondrija, kao i prisustva strukturalnih proteina u tkivu (Mourant i sar., 1997; Perelman i sar., 1997; Wallace i Van Dam, 2000; Mourant i sar., 2000; Drezek i sar., 2003). Osnovna hipoteza je da će zdravo i patološki izmenjeno tkivo u interakciji sa svetlosti proizvesti različit efekat i obim Rejljevog i Mia rasejanja. Ovaj efekat (različit koeficijent rasejanja, različita anizotropija, izmenjeni indeksi prelamanja svetlosti) na kvantitativan način (ESS spektri) oponaša odnose i status navedenih komponenti u ispitivanim tkivima (Mourant i sar., 1997; Fang i sar., 2003).

Instrumentacija

Kao izvor svetlosti, u ESS sistemu uglavnom se koristi ksenon lampa, koja je fiber optičkim kablovima povezana sa spektrometrom u okviru kog se nalazi i CCD kamera, dok je ceo sistem povezan sa laptop ili PC računom. Prvi fiber optički kabl direktno je povezan sa ksenon lampom i služi prenosu svetlosti u ispitivano tkivo sa kojim se nalazi u direktnom kontaktu. Drugi fiber optički kabl takođe se nalazi priljubljen uz tkivo i služi prikupljanju rasejane svetlosti koju prenosi do spektrometra gde se vrši dalje procesuiranje signala. Osnovni dijametar kablova je 200 do 400 μm , dok njihovi završeci mogu biti dijametra i do 2mm. Dva kabla se nalaze na rastojanju od 250 do 300 μm i na osnovu datih dimenzija moguće je dobiti informacije o statusu tkiva zapremine od oko jednog kubnog milimetra (1 mm^3). Često se navedeni kablovi nalaze unutar jednog većeg, koji je jedini i vidljiv. Opseg svetlosti koji je moguće koristiti u okviru ESS tehnologije pokriva područja ultraljubičastih zraka, vidljive svetlosti i bliskih infracrvenih zraka (300-900 nm). Da bi se izbegli efekti ambijetalne svetlosti u okruženju ispitivanog polja, sistem je automatizovan da obavi prvo merenje bez uključivanja ksenon lampe. Nakon 100 milisekundi (ms), meri se signal dobijen paljenjem lampe i dobija ESS spektar. Konačni rezultat analize podrazumeva oduzimanje spektra ambijetalne svetlosti od ESS spektra. Kontrola celokupnog procesa vrši se pomoću laptop ili PC računara, dok se rezultat za ispitivani deo tkiva dobija kroz jednu sekundu (1s) (Bigio i Mourant, 1997; Jerjes i sar., 2004; Jerjes i sar., 2005; Sharwani i sar., 2006; Grillone i sar., 2017).

Algoritam

Kako kod ESS metode nije moguća makroskopska vizuelizacija kao u analizi širokog polja lezije, neophodno je razvijati algoritme koji će adekvatno predstaviti razlike ispitivanih tipova tkiva (Mourant i sar., 1997; Fang i sar., 2003).

Algoritmi se kreiraju tako da prate interakciju svetlosti i tkiva u određenom opsegu talasnih dužina u kome se beleže jasni signali određenih apsorpcionih ili emisionih pikova (Sharwani i sar., 2006; Grillone i sar., 2017). Zatim se, radi lakše i preciznije interpretacije rezultata, vrši normalizacija spektra. Normalizacija predstavlja odnos vrednosti intenziteta na svim posmatranim talasnim dužinama i neke referentne vrednosti - maksimalni intenzitet, vrednost intenziteta na određenoj talasnoj dužini, ukupan broj piksela kod digitalne slike i dr. Na ovaj način spektre različitih uzoraka moguće je porediti pod istim okolnostima (Randolph, 2006; Malacara, 2011). Nakon normalizacije, a u slučaju velikog broja atributa (talasnih dužina) koje nose neku vrednost (hiperdimensionalnost), pristupa se njegovom smanjenju kako bi se izdvojile one koje najbolje reprezentuju osobine spektra (Roweis i Saul, 2000). Na tako pripremljenom skupu podataka uglavnom se primenjuje neka od metoda mašinskog učenja, s ciljem da se uzorku tkiva, tj. vrednostima njegove interakcije sa svetlosti, odredi kategorija kojoj pripada - npr. zdravo ili tumorsko tkivo (Grillone i sar., 2017).

Tako su u slučaju primene ESS metode, Grillone i saradnici prvo za analizu izdvojili 216 vrednosti intenziteta u određenom opsegu talasnih dužina (330-760 nm). Zatim su normalizovali spektar u odnosu na vrednost intenziteta na jednoj talasnoj dužini - 650 nm. Zbog velikog broja varijabli (216) primenili su neku od metoda smanjenja njihovog broja, a nakon toga novoformirani skup podataka izložili obradi jednom od procedura mašinskog učenja - u njihovom slučaju radilo se o metodi potpornih vektora (eng. *Support Vector Machine* - SVM). Algoritam je dalje bio razvijen tako da svakom uzorku dodeli neku vrednost od 0 do 1. Što je vrednost bliža jedinici, veća je šansa da se radi o malignoj promeni, dok se obratno uzorci sa vrednostima bližim nuli smatraju benignijim. (Grillone i sar., 2017) Sličnu proceduru sproveo je i Sharwani sa saradnicima, s tim da se u tom istraživanju kao metoda za razlikovanje benignog i patološki izmenjenog tkiva koristila linearna diskriminantna analiza (eng. *Linear Discriminant Analysis* - LDA) (Sharwani i sar., 2006).

Klinička primena

ESS metoda do sada je korišćena u dosta malom broju studija kada je reč o tkivima usne duplje. U polju dijagnostike, poredeći uzorke normalnog i displastičnog tkiva sa njihovim histopatološkim nalazima, Sharwani i saradnici došli su do senzitivnosti od 72 i specifičnosti od 75% (Sharwani i sar., 2006). U evaluaciji hirurških margina kod OPK-a, prvo istraživanje bilo je usmereno ka potencijalnoj upotrebi ESS sistema u identifikaciji karcinomom infiltrisane kosti. Za ove potrebe korišćeni su arhivirani formalinom fiksirani uzorci koji su sadržali kost donje vilice. U korelaciji sa zvaničnim histopatološkim izveštajima, ostvarena je senzitivnost od 87 i specifičnost od 80%. (Jerjes i sar., 2005). Ipak, do danas, samo je jedna studija sprovedena ovom metodom intraoperativno i obuhvatila je *in vivo* analizu neoplastičnog i graničnog tkiva kod OPK-a. Grillone i saradnici došli su, primenjujući već pomenuti algoritam i princip klasifikacije uzoraka, do senzitivnosti od 84 i specifičnosti od 71% u poređenju kategorija normalno/blago displastično i izraženo displastično/*carcinoma in situ*/invazivni karcinom tkiva. Kada su iz analize isključili grupu uzoraka sa invazivnim karcinomom, došlo se do novih vrednosti navedenih parametara -

100 i 89%. ESS metodom bilo je takođe moguće razlikovati normalno od svih tipova displastičnog tkiva sa senzitivnosti od 85 i specifičnosti od 78%. Isti autori procenjuju da bi u slučaju veće proizvodnje i kliničke primene, cena pojedinačnog ESS sistema mogla iznositi oko 10000\$ (Grillone i sar., 2017).

Prednosti i nedostaci

Prednosti primene ESS metode u hirurgiji glave i vrata (Jerjes i sar., 2005; Sharwani i sar., 2006; Grillone i sar., 2017):

- ✓ mala težina i lak prenos u hirurškoj sali
- ✓ dostupnost svih regija usne duplje - posebno dizajnirani fiber optički kablovi
- ✓ kratko vreme dobijanja rezultata
- ✓ povoljna senzitivnost u evaluaciji hirurških margina (84 - 100%)
- ✓ slab uticaj prisustva inflamacije na rezultate

Nedostaci primene ESS metode u hirurgiji glave i vrata (Sharwani i sar., 2006; Grillone i sar., 2017):

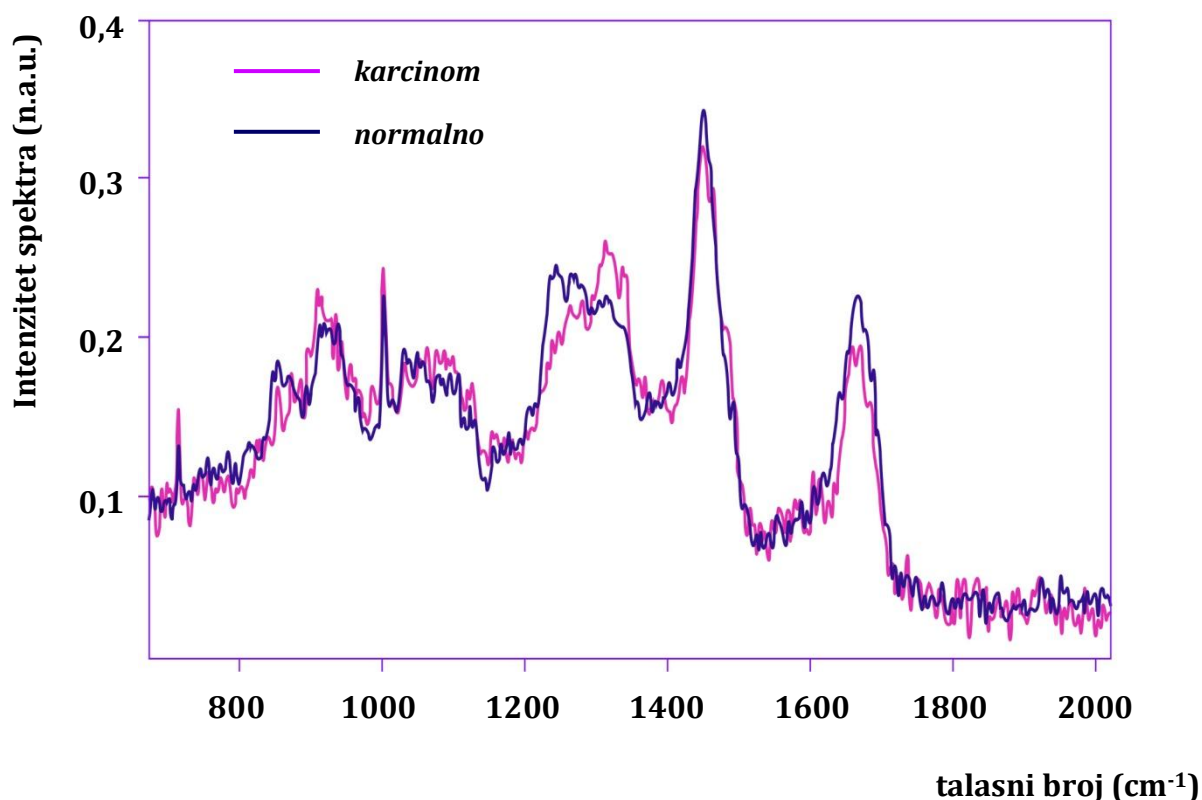
- ✓ mali broj ispitivanih uzoraka
- ✓ prisustvo krvi u polju analize
- ✓ ograničena dubina prodiranja u većem delu spektra - nemogućnost analize dubokih margina
- ✓ nemogućnost analize celokupne mukozne margine - polje analize ograničeno na površinu prečnika 2 mm
- ✓ niža specifičnost

b) | Ramanova spektroskopija (eng. *Raman Spectroscopy* - RS)

Princip rada

Ramanova spektroskopija (RS) zasniva se na Ramanovom rasejanju svetlosti. Kao što je već navedeno, ovaj tip rasejanja vrlo je specifičan iz razloga što sa sobom nosi informacije o vibracionim, rotacionim i drugim niskofrekventnim fenomenima na molekularnom nivou (Tu, 1982; Mahadevan-Jansen i Richards-Kortum, 1996; Lucassen i sar., 2016). Kod RS metode, ovi fenomeni oslikavaju status određenih biohemijskih komponenti u tkivu, prvenstveno proteina i lipida, ali i vode (Malini i sar., 2006; Su i sar., 2012; Singh i sar., 2012; Barroso i sar., 2015). Za svaku od tih komponenti i molekularnih struktura karakteristični su intenziteti određene vrednosti (pikovi) i u određenim delovima Ramanovog spektra (Lloyd i sar., 2013). Oni se za razliku od drugih optičkih metoda najčešće prikazuju u odnosu na talasnu dužinu izraženu talasnim brojem (broj talasa u jednom dužnom centimetru - cm^{-1}) - tzv. Ramanov pomak (eng. *Raman shift*) (slika 27) (Tu i Chang, 2012).

Ramanovom spektroskopijom moguće je prikupiti veliki broj informacija. Takva saznanja mogu se u slučaju navedene metode iskoristiti za razlikovanje šireg opsega različitih tipova tkiva (Wu i sar., 2018).



Slika 27. Primer Ramanovog spektra (Preuzeto i prilagođeno sa interneta – Naurecka i sar., 2017)

Instrumentacija

U većini slučajeva sistem za primenu Ramanove spektroskopije sastoji se od izvora svetlosti, mikroskopskog objektiva, različitih vrsta filtera svetlosti, spektrometra i CCD kamere. Kao izvor koriste se laseri koji emituju svetlost u područjima vidljivog dela spektra i NIR - a. U istraživanjima u regiji glave i vrata uglavnom se koriste diodni laseri sa ekscitacionom svetlosti na 785 nm i snagom od 30 do 300 milivati (mW) (Malini i sar., 2006; Singh i sar., 2012; Cals i sar., 2013; Cals i sar., 2015; Barroso i sar., 2015; Guze i sar., 2015; Cals i sar., 2016). Samo je Su sa saradnicima u svojoj studiji koristio helijum neonski (He-Ne) laser sa ekscitacionom svetlosti na 632,8 nmsnage 13,5 mW (Su i sar., 2012). Sama ekscitacija tkiva sprovodi se kroz posebno dizajnirani mikroskopski objektiv, sa fokusom na određeno tkivno polje prečnika od 2 μm do 3,5 mm (Cals i sar., 2013; Cals i sar., 2015; Barroso i sar., 2015; Guze i sar., 2015; Cals i sar., 2016). Trajanje ekscitacije u jednom fokusu i njeno pomeranje na drugi traje oko dve sekunde (Cals i sar., 2013). Rasejana svetlost prikuplja se kroz isti objektiv, sprovodi ka optimizovanom spektrometru, da bi se uz primenu filtera (npr. holografski filteri) eliminisao doprinos Rejljevog rasejanja i ovako "pročišćen" spektar detektovao CCD kamerom (Malini i sar., 2006; Cals i sar., 2013). Kao što je već napomenuto, Ramanovi spektri posmatraju se u odnosu na talasne brojeve. U dosadašnjim studijama analizirani su Ramanovi spektri u opsegu 300 do 2530 cm^{-1} (800-1800; 700-1800; 310-2530; 300-2500; 0-1800; 400-1800), što odgovara talasnim dužinama u području NIR - a (Malini i sar., 2006; Singh i sar., 2012; Cals i sar., 2013; Cals i sar., 2015; Guze i sar., 2015; Cals i sar., 2016). Izuzetak predstavlja istraživanje koje je sa saradnicima sproveo Barroso gde je korišćen opseg Ramanovog spektra od 2500 do 4000 cm^{-1} (Barroso i sar., 2015).

Algoritam

U gotovo svim studijama se na početku analize podataka prikupljenih Ramanovom spektroskopijom pristupa definisanju dela spektra koji najbolje oslikava osobine tkiva (tabela 7).

Tabela 7. Ramanov spektar u analizi tkiva u usnoj duplji

studija	analizirani deo Ramanovog spektra (cm ⁻¹)
Malini i sar., 2006	800 - 1800
Oliveira i sar., 2006	800 - 1800
Su i sar., 2011	700 - 1800
Singh i sar., 2012	1200 - 1800
Singh i sar., 2012	1200 - 1800
Guze i sar., 2015	800 - 1700
Cals i sar., 2013	400 - 1800
Cals i sar., 2015	400 - 1800
Barroso i sar., 2015	2500 - 4000
Barroso i sar., 2016	2500 - 4000
Cals i sar., 2016	400 - 1800

Zatim se sprovodi već pomenuti proces normalizacije (npr. u odnosu na ukupnu površinu spektra), a potom pristupa izboru metoda koje će na najbolji način klasifikovati različite vrste tkiva (zdravo, displastično, tumorsko i dr.). U svim istraživanjima koje obuhvataju interpretaciju Ramanovog spektra primenjuje se metod nenadgledane (eng. *unsupervised*) analize glavnih komponentata (eng. *Principal Component Analysis* - PCA) kako bi se umanjila njegova dimenzionalnost i istakli parametri od najvećeg značaja za proceduru daljeg klasifikovanja uzoraktkiva (Jolliffe, 2002). Pojedini autori na osnovu PCA rezultata sprovode i diskriminaciju tkiva na normalno i maligno (OPK) (Oliveira i sar., 2006; Su i sar., 2012). U drugim studijama se za potrebe daljeg razlikovanja različitih tipova tkiva primenjuju linearna diskriminantna analiza (LDA) i klasterizacija metodom K - srednjih vrednosti (eng. K - means clustering) (Malini i sar., 2006; Singh i sar., 2012; Cals i sar., 2013; Cals i sar., 2015; Guze i sar., 2015; Cals i sar., 2016). Kod prve se na osnovu linearne kombinacije obeležja određuje grupa kojoj uzorak pripada, a kod druge se uzorci svrstavaju u klustere u kojima poseduju najsličnije osobine jedni drugima (Jain, 1988; Tabachnick, 1996).

Klinička primena

Odnos proteina i lipida u tkivima predstavlja okosnicu razumevanja Ramanove spektroskopije. Biohemijska kompozicija u korist lipida karakteristika je zdravog tkiva, dok se ona koja obiluju proteinima smatraju patološki izmenjenim. Ovakvo načelo potvrđuju i rezultati brojnih istraživanja, a naročito onih kod kojih se na mestima lipidnih pikova nalaze

amidne grupe u Ramanovim spektrima tumorskog tkiva (Malini i sar., 2006; Su i sar., 2012; Singh i sar., 2012; Guze i sar., 2015). U nekoliko studija kao faktor razlikovanja korišćena je i količina vode u tkivima (Barroso i sar., 2015; Barroso i sar., 2016).

U pogledu razlikovanja prekanceroznih lezija, OPK-a, benignog i normalnog tkiva, Guze i saradnici došli su do obećavajućih rezultata sa senzitivnosti od 100 i specifičnosti od 77% (Guze i sar., 2015). Singh i saradnici takođe ukazuju na mogućnosti efikasne primene Ramanove spektroskopije u razlikovanju zdravog, prekanceroznog i malignog tkiva (Singh i sar., 2012). Primenom Ramanovih eksperimenata mapiranja, Cals sa saradnicima definiše spektre suprabazalnih slojeva epitela, bazalnog sloja epitela, kolagenog tkiva različite gustine, masnog i glatkog mišićnog tkiva (Cals i sar., 2013).

Kada je reč o evaluaciji hirurških margina kod OPK-a Cals i saradnici su u nekoliko svojih studija, koristeći različite algoritme došli do sličnih rezultata. U svojoj studiji iz 2015. godine sa visokom preciznosti razlikuju uzorke OPK-a i različitih tipova zdravog tkiva u hirurškim marginama. Tako se OPK primenom Ramanove spektroskopije diskriminiše od masnog i nervnog tkiva sa tačnosti od 100%, od vezivnog sa 93%, od mišićnog sa 97%, od žlezdanog sa 94%, dok najmanju preciznost (75%) pokazuje u odnosu na epitelno tkivo (Cals i sar., 2015). U svojoj drugoj studiji, analizirajući razlike u spektrima tumorskog i normalnog tkiva, dolazi do tačnosti od 86% (senzitivnost 100%, specifičnost 66%) i tačnosti od 91% (senzitivnost 100%, specifičnost 78%) primenjujući dva pristupa u analizi spektra (Cals i sar., 2016). Koristeći graničnu vrednost od 69% sadržaja vode u tkivima, Barroso sa saradnicima sa senzitivnosti od 99 i specifičnosti od 92% identifikuje tumorsko tkivo (Barroso i sar., 2015). Nadovezujući se na navedene rezultate, isti autor sa saradnicima definiše sadržaj vode od $76\pm 8\%$ u tumorskom tkivu, od $59\pm 24\%$ u neadekvatnim (0 - 5 mm) i od $54\pm 24\%$ u adekvatno postavljenim marginama ($>5\text{mm}$). Shodno navedenom, autori smatraju da se Ramanova spektroskopija može primeniti u evaluaciji hirurških margina i na osnovu sadržaja vode u tkivu (Barroso i sar., 2016).

Prednosti i nedostaci

Prednosti primene RS metode u hirurgiji glave i vrata (Harris i sar., 2010; Li i sar., 2010):

- ✓ apsorpcija vode ne utiče na merenja
- ✓ korišćenjem eksitacione svetlosti veće talasne dužine značajno se umanjuje uticaj fluorescencije na dobijene rezultate
- ✓ zbog velikog broja informacija koje u sebi sadrži Ramanov spektar, moguće je sprovesti različite hemometrijske analize i obrade podataka
- ✓ primenom laserske svetlosti, potreban je manji volumen tkiva za spektroskopska merenja

Nedostaci primene RS metode u hirurgiji glave i vrata (Smith i Dent, 2005; Tu i Chang, 2012; Cals i sar., 2013; Guze i sar., 2015):

- ✓ neefikasnost Ramanove spektroskopije - merenje individualnog eksperimenta može potrajati i do 67 sati
- ✓ mala površina analiziranog tkiva
- ✓ mali udeo rasejane svetlosti pripada Ramanovom rasejanju
- ✓ iako se umanjuje uticaj fluorescencije, povećanjem talasne dužine eksitacione svetlosti umanjuje se efikasnost same metode

✓ mali broj pacijenata uključen u pojedine studije

1.5.3.2. | Primena optičke koherentne tomografije (eng. *Optical Coherence Tomography* - OCT) u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a

Princip rada

U osnovi OCT metode nalazi se fenomen interferencije. Ekscitaciona svetlost deli se na dva jednaka svetlosna zraka - referentni, koji je usmeren ka sistemu referentnog ogledala i onaj koji je usmeren ka uzorku tkiva. Do interferencije dolazi kada se na mestu prvobitne podele susretnu zraci reflektovane svetlosti ogledala i svetlosti reflektovane od tkiva. U interakciji sa tkivom dolazi do već pomenutih procesa apsorpcije i rasejanja. Svetlost rasejana prema nazad (reflektovana svetlost) je iz tog razloga manjeg intenziteta od upadne svetlosti. Kombinovanjem reflektovane svetlosti ogledala i reflektovane svetlosti tkiva dobija se signal interferencije koji se detektuje i prikazuje kao dvodimenzionalna slika poprečnog preseka arhitekture tkiva (Wilder-Smith i sar., 2004; Jerjes i sar., 2010; Hsieh i sar., 2013). Na ovaj način, određene zone i slojevi tkiva koji reflektuju više svetlosti daju jači signal i biće prikazani u višoj rezoluciji. Najznačajnije informacije koje se primenom OCT metode mogu dobiti jesu one o debljini epitela i stanju bazalne membrane (Jerjes i sar., 2010). Dubina prodiranja svetlosti od 2 do 3 mm u mekim tkivima omogućava detekciju i epitelijalnih i subepitelijalnih struktura (Bouma i Tearney, 2002).

Instrumentacija

Osnovni OCT sistem zasniva se na merenju optičkog kašnjenja svetlosnog zraka i zahvaljujući mobilnosti referentnog ogledala poseduje sposobnost detekcije svetlosti reflektovane na različitim dubinama u tkivu (Drexler i Fujimoto, 2008; Gabriele i sar., 2011). Novija rešenja, poput Furijerove OCT metode dizajnirana su tako da u odnosu na osnovni OCT sistem obezbede brzinu snimanja i do 500 puta veću, uz poboljšanu senzitivnost. Ove visoke performanse ostvaruju se ili spektrometrima ili brzim skenirajućim laserima (Leitgeb i sar., 2003; Wojtkowski i sar., 2004; Bouma i sar., 2009). Oni sistemi koji se zasnivaju na spektrometrima najefektniji su na radnim talasnim dužinama od 800 nm i upotrebom CCD detektora ostvaruju najbolju aksijalnu rezoluciju, dok se laserski preporučuju na talasnim dužinama od 1310 nm. Kao takvi, pogodni su za vizuelizaciju krvnih sudova i nerava (Yun i sar., 2003; Cense i sar., 2004; Bouma i sar., 2009). U praksi se još koriste i verzije OCT sistema koje su sposobne prikazati i funkcionalne karakteristike tkiva. U njih spadaju Doplerov, polarizaciono - senzitivni i molekularni OCT sistem (Pircher i sar., 2011; Leitgeb i sar., 2014; Kim i sar., 2015). U dosadašnjim istraživanjima u regiji glave i vrata uglavnom su korišćeni laserski sa maksimalnom širinom dobijene slike od 6 i dubinom penetracije od 1,5 mm (Tsai i sar., 2008; Tsai i sar., 2009; Jerjes i sar., 2010; Hamdoon i sar., 2013; Hamdoon i sar., 2016).

Klinička primena

Klinička interpretacija slika različitih tipova tkiva dobijenih OCT metodom uglavnom se svodi na status debljine epitelnog sloja i bazalne membrane (Wilder-Smith i sar., 2004). Tsai i saradnici u svom istraživanju ističu da povećana debljina epitelnog sloja i slabo vidljiva granica između epitela i lamine proprie (bazalna membrana) predstavljaju parametre abnormalnosti u arhitekturi tkiva (Tsai i sar., 2008). U svojoj drugoj studiji, analizirajući uzorke zdravog i tkiva na različitim stadijumima karcinogeneze (normalno, displastično, karcinom), uočavaju bitne razlike. Kod normalnog tkiva bazalna membrana je na OCT snimku

jasno izražena, dok se u papilarnom sloju lamine proprie mogu uočiti tamnija polja koja odgovaraju krvnim sudovima. Kod displastičnog tkiva bazalna membrana je i dalje vidljiva, ali je epitelni sloj deblji, dok je u slučaju karcinoma ova granica praktično neprimetna (Tsai i sar., 2009). Pored navedenih parametara, Jerjes i saradnici primenom OCT metode bliže analiziraju i stanje keratinskog sloja kao i prisustvo određenih komponenti u lamini proprii u 26 uzoraka leukoplakije i 8 uzoraka eritroplakije. Korelacijom sa oblikom lezije (papule, ulceracije, makule, plak, vezikule) i krajnjim histopatološkim nalazom uspevaju da identifikuju bazalnu membranu u samo 15 slučajeva, ali ističu i nepouzdanost OCT metode u tačnoj diferencijaciji promena (Jerjes i sar., 2010). U sličnoj, ali opsežnijoj studiji (125 uzoraka), Hamdoon sa saradnicima analizira efikasnost OCT metode u prepoznavanju različitih promena u usnoj duplji. Koristeći kapa statistiku u korelaciji sa histopatološkim nalazom dolazi do tačnosti od 82, senzitivnosti od 85 i specifičnosti od 78% (Hamdoon i sar., 2013).

U evaluaciji hirurških margina kod OPK-a, primenom iste metodologije identifikovano je 90 negativnih i 22 pozitivne margine. Srednja vrednost debljine epitela negativne margine iznosila je 360, a pozitivne 567 μm . Tačnost je u zavisnosti od evaluatora iznosila 84, odnosno 88%, dok su ukupna senzitivnost i specifičnost bile 81,5 i 87% (Hamdoon i sar., 2016).

Prednosti i nedostaci

Prednosti primene OCT metode u hirurgiji glave i vrata (Wilder-Smith i sar., 2009; DeCoro i Wilder-Smith, 2010):

- ✓ mogućnost *in vivo* analize tkivne arhitekture u realnom vremenu
- ✓ visoka rezolucija
- ✓ niska cena i visoka efikasnost
- ✓ pacijenti lakše prihvataju sprovođenje biopsije kada su im prvo dostupni OCT snimci

Nedostaci primene OCT metode u hirurgiji glave i vrata (Fujimoto i sar., 2000; Jerjes i sar., 2008; Hamdoon i sar., 2012; Hamdoon i sar., 2013; Hamdoon i sar., 2016):

- ✓ *ex vivo* priroda pojedinih istraživanja
- ✓ prisustvo krvarenja u tkivima može uticati na pogrešnu interpretaciju OCT snimaka
- ✓ dubina prodiranja svetlosti ograničena na maksimalnih 2 mm
- ✓ uticaj hiperkeratoze na kvalitet dobijene slike
- ✓ upitna analogija sa kontrastom u histopatološkim nalazima
- ✓ prisustvo efekta "skupljanja" tkiva u analizama hirurških margina može uticati na korelaciju OCT i histopatološkog nalaza

1.5.3.3. | Primena mikroendoskopije visoke rezolucije (eng. *High-Resolution Microendoscopy* - HRME) u evaluaciji hirurških margina kod OPK-a

Princip rada

U primeni ove tehnike centralno mesto zauzima proces fluorescencije. Za te potrebe koriste se karakteristike endogenih fluorofora ili se na površinu ispitivanog tkiva aplikuje fluorescentno kontrastno sredstvo. Ekscitacija se vrši difuznom svetlosti (Wu i sar., 2018). Kod HRME metode emitovana svetlost sadrži informacije o stanju i promenama na subcelularnom nivou - veličina jedra, odnos jedra i citoplazme i pleomorfizam ćelije (Vila i sar., 2012). Zbog mogućnosti prikaza navedenih komponenata tkiva u visokoj rezoluciji i u realnom vremenu, ova metoda se smatra i tzv. "optičkom biopsijom" (Louie i sar., 2015; Protano i sar., 2015).

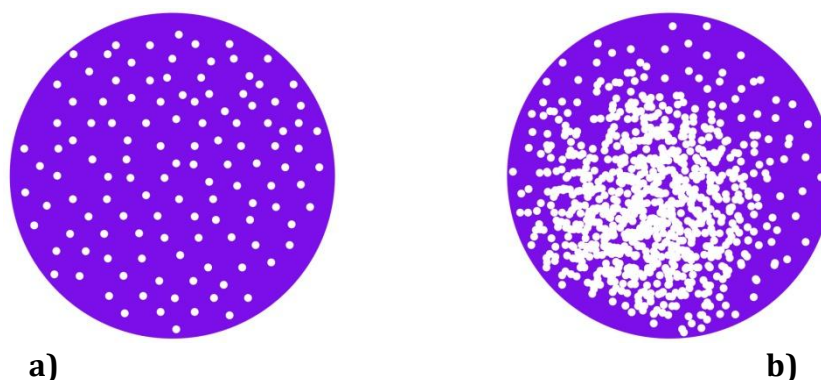
Instrumentacija

HRME sistem sastoji se od izvora bele svetlosti, fiber-optičkih kablova organizovanih u jedinstven snop, optičkog sočiva, filtera i ogledala, CCD detektora i PC ili laptop računara. Kao izvor svetlosti koriste se obične LED lampe (Pierce i sar., 2011). Fiber-optički snop u celom sistemu ima dvojak u ulogu. Prva je sprovođenje ekscitacione svetlosti do tkiva, a druga prikupljanje emitovane svetlosti i njeno usmeravanje ka CCD kameri i računaru. Kako se fiber-optički snop nalazi u direktnom kontaktu sa površinom ispitivanog tkiva, ovi se procesi praktičnu odvijaju istovremeno. Svaki fiber-optički kabl u okviru snopa predstavlja jedan piksel buduće slike (Louie i sar., 2015; Wu i sar., 2018). Sama rezolucija uslovljena je razmakom između pojedinačnih kablova. U standardnim uslovima (razmak od oko 4 μm) moguće je postići uveličanje do 1000 puta na subcelularnom nivou. I površina analiziranog tkiva uslovljena je ovim razmakom. Veći razmak povlači i širi opseg analiziranog tkiva, ali i slabiju rezoluciju. Uglavnom je polje vizuelizacije dijametra 720 μm (Pierce i sar., 2011). Kao fluorescentni kontrast najčešće se koristi proflavin (Vila i sar., 2012). Njegova uloga ostvaruje se vezivanjem za DNK materijal u jedru. Proflavin emituje svetlost na talasnoj dužini od 515 nm, dok se njegova ekscitacija ostvaruje na 445 nm (Pierce i sar., 2011). HRME sistem trenutno se ne nalazi u komercijalnoj upotrebi, dok proflavin još uvek nije odobren za *in vivo* upotrebu od strane Američke uprave za hranu i lekove (Louie i sar., 2015).

Klinička primena

Na tipičnoj HRME slici nalazi se svetlucavo jedro sa tamnom pozadinom (Louie i sar., 2015). Upravo se jedro i njegov odnos sa citoplazmom koriste kao ključni parametri u diferencijaciji normalnog od neoplastičnog tkiva. Kod prvog, jedra se vide kao svetlucave tačke ravnomerno raspoređene u vizuelnom polju, dok su kod drugog prisutne neuređenost, nagomilavanje i povećanje njihovog volumena (slika 28) (Vila i sar., 2012; Wu i sar., 2018).

U te svrhe prišlo se i razvoju algoritama kod kojih je na osnovu navedenih promena moguće kvantifikovati odnos jedro - citoplazma (Pierce i sar., 2012; Muldoon i sar., 2012; Ishijima i sar., 2015). Najjednostavniji takav algoritam podrazumeva vrstu normalizacije same slike - broj piksela koji odgovara svetlucavim jedrima podeljen je sa ukupnim brojem piksela na slici i tako je dobijena vrednost odnosa jedro - citoplazma za određenu zonu tkiva (Pierce i sar., 2012; Muldoon i sar., 2012). U nekoliko studija koje su ispitivale preciznost ovakvog sistema u poređenju sa histopatološkim nalazom došlo se do senzitivnosti od 84, 71 i 69%, dok je specifičnost bila 71, 80 i 76% (Pierce i sar., 2012; Ishijima i sar., 2015).



Slika 28. Ilustracija HRME nalaza. **a)** normalno tkivo **b)** neoplastično tkivo

Veliki broj *ex vivo* istraživanja u regiji glave i vrata obuhvatio je primenu HRME metode. Poredeći HRME slike uzoraka tumorskog, prelaznog i normalnog okolnog tkiva sa konačnim histopatološkim nalazom, Vila i saradnici došli su do obećavajućih rezultata - tačnost 97%, senzitivnost 98%, specifičnost 91% i vrednost Flajsove (eng. *Fleiss*) kape statistike od 0,84 (Vila i sar., 2012). Flajsova kapa statistika se koristi u slučajevima kada je potrebno proceniti slaganje tri i više evaluatora oko klasifikacije nekih obeležja (vrednost kape od 0,81 do 1 ukazuje na gotovo savršeno slaganje) (Fleiss, 1971; Landis i Koch, 1977). U rezultatima koji se nadovezuju na ovu studiju, Levy i saradnici došli su do sličnih vrednosti senzitivnosti i specifičnosti za HRME slike (98% i 92%). Ipak, mereći iste parametre za HRME video snimke došlo je do njihovog pada - senzitivnost 84%, specifičnost 68%. Flajsova kapa statistika iznosila je u slučaju slika 0,84, a kod prikaza HRME nalaza u vidu video snimka 0,47 (Levy i sar., 2013). U još jednom istraživanju koje je obuhvatilo 141 uzorak normalnog epitela, displazije različitog stepena i neoplastičnog tkiva ostvarena je senzitivnost od 81 do 90%, dok je specifičnost iznosila 77 do 85% (Muldoon i sar., 2012).

Na osnovu rezultata navedenih *ex vivo* istraživanja, Miles i saradnici analizirali su *in vivo* potencijal HRME metode u razlikovanju neoplastične od benigne sluzokože usne duplje, oro i hipofarinksa. U evaluaciji HRME snimaka učestvovalo je 11 specijalista za regiju glave i vrata, koji su prethodno obučeni u njihovoj adekvatnoj interpretaciji. U korelaciji sa definitivnim histopatološkim nalazima ostvarene su srednje vrednosti tačnosti od 95,1, senzitivnosti od 96 i specifičnosti od 95%. Flajsova kapa iznosila je 0,81 (Miles i sar., 2015).

Prednosti i nedostaci

Prednosti primene HRME metode u hirurgiji glave i vrata (Vila i sar., 2012; Louie i sar., 2015):

- ✓ veoma visoke vrednosti tačnosti, senzitivnosti i specifičnosti
- ✓ tehnički jednostavna instrumentacija - bolja mobilnost u kliničkim uslovima i niža cena
- ✓ gotovo analogna standardnoj histopatološkoj evaluaciji

Nedostaci primene HRME metode u hirurgiji glave i vrata (Pierce i sar., 2011; Vila i sar., 2012; Louie i sar., 2015; Ishijima i sar., 2015; Wu i sar., 2018):

- ✓ analizirana površina tkiva dijametra do 1400 μm

-
- ✓ niska vrednost dubine prodiranja svetlosti (do 50 μm) - analiza ograničena na površinske slojeve sluzokože
 - ✓ hiperkeratinizacija - zbog dubine prodiranja i visokog afiniteta fluorescentnog kontrasta (proflavin) prema keratinu
 - ✓ niža efikasnost automatizovanih algoritama za interpretaciju HRME slika

1.6 | Postoperativna evaluacija hirurških margina kod OPK-a - histopatološka analiza ekscidiranog tkiva

Metoda histopatološke evaluacije predstavlja "zlatni standard" analize ekscidiranog tkiva kod OPK-a. Ona se zasniva na bojenju prethodno fiksiranog uzorka tkiva kako bi se u njemu identifikovale određene strukture od značaja za postavljanje definitivne dijagnoze (Chan, 2014). U te svrhe najčešće se primenjuje hematoksilin eozin bojenje (eng. *hematoxylin and eosin stain* - HE stain). Hematoksilin u svom oksidisanom stanju predstavlja baznu boju. Strukture koje poseduju afinitet prema hematoksilinu su bazofilne, tj. hematoksifilne i boje se plavo. Eozin je kisela boja. Strukture sa afinitetom prema eozinu boje se roze do crvene boje i smatraju se acidofilnim, tj. eozinofilnim (Fischer i sar., 2008; Kumar i Kiernan, 2010; Avwioro, 2011).

U bazofilne strukture spadaju: jedro sa jedarnom membranom i heterohromatinom, granulirani endoplazmatični retikulum, ribozomi, kiseli mucini i dr. (Luna 1991; Chan, 2014)

U acidofilne strukture spadaju: ćelijska membrana, cilije, mitohondrije, lizozomi, glatki endoplazmatični retikulum, intermedijarni filamenti, miofilamenti, mikrotubule, proteini (npr. hemoglobin, imunoglobulini), jedarce, neutralni mucini i dr. Kod hematoksilin eozin bojenja lipidne vakuole ostaju nebojene (Luna, 1991; Chan, 2014).

Afinitet pojedinih tkivnih struktura prema bojama, kao i selektivnost određenih boja prema različitim komponentama u tkivu uslovljena je fizičko hemijskim interakcijama među njima. Osnovna premisa je da se boja kreće sa mesta više (rastvori boje) ka mestu niže koncentracije (tkiva, ćelije) (Prento, 2009; Kumar i Kiernan, 2010). Ipak, samo kretanje boje na ovakav način nije dovoljno za njeno selektivno vezivanje sa određenim elementima u tkivu. U ovom procesu ključnu ulogu imaju međumolekulska privlačenja i hemijske veze. Na malim udaljenostima najčešće dolazi do Van der Valsvog privlačenja (Horobin i Bennion, 1973; Prento, 2009; Kumar i Kiernan, 2010). Ono je posebno prisutno u vezama kiselih boja, poput eozina, i molekula proteina u tkivu. Drugi načini podrazumevaju interakcije jona, formiranje kovalentnih i vodoničnih veza te hidrofobno vezivanje. Poslednje se smatra i potencijalnim mehanizmom kojim hematoksilin boji jedro (Kumar i Kiernan, 2010). Najveći značaj u bojenju hematoksilinom ima bojenje hromatina, tj. identifikacija DNK materijala u ćeliji. Ipak, hematoksilin u svom osnovnom stanju ne poseduje sposobnost formiranja hemijske veze sa navedenim komponentama u tkivu. Oksidacijom, on se transformiše u negativno naelektrisan hematein koji takođe ne može stupiti u reakciju sa negativno naelektrisanim grupama fosforne kiseline u DNK molekulu. Iz tih razloga, njemu se pridodaju joni metala, najčešće aluminijuma. Na taj način formira se hemalum koji strukturu od interesa boji plavo (Bettinger i Zimmermann, 1991; Kumar i Kiernan, 2010).

Postoji nekoliko principa koje je neophodno zadovoljiti kako bi se HE bojenje moglo smatrati adekvatnim. Oni podrazumevaju (Luna, 1991):

- da se hromatin u jedru boji plavo do plavo ljubičasto i jasno uočava,
- da se jedarce boji ružičasto,
- da se i kod kolagenog i mišićnog tkiva jasno uočava fibrilarnost dok se mišić boji nešto izraženijom nijansom crvene od kolagena koji je rozikast i
- da se eozinofilne granule boje narandžasto crveno i da ih je moguće jasno identifikovati.

Ono što svakako treba pomenuti jeste činjenica da tkiva i tkivne komponente nisu obojene isključivo jednom nijansom plave, roze, crvene ili ljubičaste, već su predstavljene različitim kombinacijama u okviru RGB (eng. *R - red; G - Greene; B - blue*) sistema boja (Ruifrok i Johnston, 2001). I pored navedenih univerzalnih pravila, svako tkivo poseduje i specifičnosti koje mogu uticati na intenzitet i tip bojenja. Takav je slučaj i sa tkivom oralnog planocelularnog karcinoma i onim koje se nalazi u hirurškim marginama.

U zavisnosti od histopatološkog stadijuma OPK-a, HE bojenjem moguće je identifikovati različite strukture specifične za dati stadijum. Tako se kod dobro i srednje diferentovanog OPK-a mogu uočiti ćelije karcinoma koje podsećaju na "bodljikave" ćelije spinoznog sloja epitela sa bledo izraženom citoplazmom. Često ove ćelije učestvuju u formiranju koncentričnih struktura roze do ružičaste boje - tzv. keratinskih petlji. Jedra takođe pokazuju atipiju i veći broj mitozna i boje se tamno plavo. Kod slabije diferentovanog oblika OPK-a ćelije su praktično bez vidljive citoplazme, nepravilnog oblika sa izraženim hiperhromatizmom i gotovo bez prisustva keratina. Time se značajno uvećava površina preparata koja se boji tamno plavom bojom. Često se u fiziološkim, a naročito u okolnostima prisutnog OPK-a mogu videti i plazma ćelije bobičastog izgleda, tj. limfocitni infiltrat koji se boji tamno plavo. Na invazivnost OPK-a ukazuju narušavanje bazalne membrane (linija rozikaste boje koje se teže uočava HE bojenjem), plaže ili difuzno raspoređene ćelije karcinoma u lamini proprii kao i infiltracija submukoznog, vaskularnog, nervnog i koštanog tkiva (Barnes i sar., 2005; Mills, 2013; Odell, 2017).

U skladu sa lokalizacijom OPK-a, u uzorcima graničnog tkiva (hirurška margina) mogu biti prisutni različiti tipovi tkiva: oralni epitel, vezivno, mišićno, masno, tkivo pljuvačnih žlezda, krvni sudovi, nervi i kost.

Kada je reč o oralnom epitelu, bilo da se radi o keratinizirajućem, bilo o nekeratinizirajućem, ćelije bazalnog sloja su kuboidalnog oblika, jedra se boje tamno plavo i bazofilne (plavičaste) su citoplazme. Ćelije spinoznog sloja poseduju karakteristične "bodlje", plavo obojeno jedro i eozinofilniju citoplazmu. U spljoštenim ćelijama granuloznog sloja keratinizirajućeg epitela nalaze se tamne, bazofilne keratohijalinske granule smeštene u roze obojenoj citoplazmi. Poslednji površinski sloj čine ćelije bez jedra i organela sa eozinofilnom citoplazmom usled nakupljanja keratina. Kod nekeratinizirajućeg epitela, umesto poslednja dva, nalazi se samo površinski sloj sa plavo obojenim jedrom i citoplazmom koja je iste boje kao i kod granuloznog sloja (Mills, 2013; Chan, 2014).

Vezivno tkivo lamine proprije se uglavnom boji nijansama roze do crvene boje kao posledica prisustva kolagenih vlakana veće ili manje gustine. U lamini proprii, a naročito u njenom papilarnom delu može biti prisutan i limfocitni infiltrat. Krvni sudovi i nervi takođe se boje nijansama crvene i roze boje (Mills, 2013; Chan, 2014).

Mišićne ćelije sadrže ružičastu do crvenu citoplazmu te je istim bojama i celokupno tkivo obojeno. Izuzetak je jedro u ćelijama, koje je obojeno tamno plavo (Mills, 2013; Chan, 2014).

Masno tkivo, se kao što je već navedeno ne boji kod primene HE bojenja, tj. prisutne su providne lipidne vakuole. Često se na preparatima masnog tkiva mogu uočiti i roze obojena kolagena vlakna, kao i crveno bojeni krvni sudovi (Mills, 2013; Chan, 2014).

Tkivo pljuvačnih žlezda može sadržati ćelije seroznih acinusa koje sadrže bazofilnu citoplazmu i boje se intenzivno plavo, dok je u ćelijama mukoznih acinusa citoplazma gotovo providna pri HE bojenju (Mills, 2013; Chan, 2014).

Nakon dekalifikacije, tkivo kompaktne kosti boji se nijansama roze, ružičaste i crvene boje. Ista bojenja karakteristična su i za trabekularnu kost. Između trabekula nalazi se gotovo providna, rozikasta koštana srž (Mills, 2013; Chan, 2014).

Potrebno je naglasiti da se u pojedinačnim uzorcima hirurških margina može nalaziti više različitih tipova tkiva.

2. CILJ

Naučni cilj doktorske disertacije bila je analiza tkiva oralnog planocelularnog karcinoma i tkiva u hirurškim marginama kroz primenu inovativne i neinvazivne optičke metode - optomagnetne imidžing spektroskopije (OMIS) i razvoj automatizovanih algoritama za njihovu biofizičku karakterizaciju i razvrstavanje.

Na osnovu navedenog cilja postavljena je nulta hipoteza (H0) koja glasi: "*Optomagnetnom imidžing spektroskopijom nije moguće razlikovati karcinomom izmenjeno i normalno tkivo u usnoj duplji*".

U svrhu realizacije definisanog cilja i testiranja nulte hipoteze istraživanja postavljeni su sledeći zadaci:

a) Kvalitativnom analizom optomagnetnog spektra

1. Registrovati i analizirati razlike između nativnih uzoraka tkiva oralnog planocelularnog karcinoma i normalnog tkiva u histopatološki negativnim marginama primenom optomagnetne imidžing spektroskopije
2. Registrovati i analizirati razlike između bojenih uzoraka tkiva oralnog planocelularnog karcinoma i različitih tipova tkiva u histopatološki negativnim marginama primenom optomagnetne imidžing spektroskopije

b) Kvantitativnom analizom optomagnetnog spektra

1. Razviti automatizovane algoritme za biofizičku karakterizaciju i razvrstavanje nativnih uzoraka po grupama
2. Razviti automatizovane algoritme za biofizičku karakterizaciju i razvrstavanje bojenih uzoraka po grupama
3. Poređenjem rezultata predložiti automatizovani algoritam koji sa najvišim stepenom efikasnosti klasifikuje nalaze, tj. podatke dobijene primenom OMIS metode na tkivo oralnog karcinoma i normalno tkivo u hirurškim marginama

3. MATERIJAL I METODE

3.1 | Materijal - uzorak

Prospektivni deo istraživanja obuhvatio je slučajni uzorak 25 pacijenata koji su podvrgnuti hirurškom lečenju oralnog planocelularnog karcinoma na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu u periodu od 2016 do 2018 godine. Ukupno je prikupljeno 60 uzoraka nativnog tkiva - 31 uzorak tumorskog (histopatološki potvrđen OPK) i 29 uzoraka tkiva hirurške margine. Svi nativni uzorci karcinomom izmenjenog i marginalnog tkiva uzeti su sa glavnog disektata neposredno po sprovođenju radikalne ekscizije primarnog OPK-a. Uzorci tkiva karcinoma uzeti su sa područja makroskopski vidljivog tumora, dok su uzorci marginalnog tkiva uzeti na rastojanju od najmanje 5 mm od njegove klinički vidljive ivice. Uzorak marginalnog tkiva uzet je sa najmanje jedne lokacije oko tumora. Veličina uzorka varirala je od 3 do 8 mm u dijametri i 2 do 5 mm u debljini shodno ukupnoj količini resektovanog tkiva dostupnog za analizu. Uzorci su potom postavljeni na standardne mikroskopske pločice (76 x 26 mm; 1 - 1,2 mm debljine) i svaki ponaosob (uzorak karcinoma; uzorak marginalnog tkiva) podvrgnut OMIS analizi.

Histopatološkom evaluacijom hirurških margina uključenih u studiju nije zabeleženo prisustvo ćelija karcinoma u marginama, tj. ocenjene su kao negativne. Kada je reč o OPK-u histopatološki je evidentiran:

- dobro diferentovani oblik karcinoma (n = 6)
- srednje diferentovani oblik karcinoma (n = 23)
- slabo diferentovani oblik karcinoma (n = 2)

U pogledu lokalizacije (anatomska regija) sa koje su uzorci prikupljeni raspodela je sledeća:

- jezik (n=11)
- pod usne duplje (n=7)
- donja usna (n = 4)
- gingiva i sluzokoža alveolarnog nastavka (n = 4)
- obrazna sluzokoža (n = 2)
- retromolarni trougao (n = 2)
- tvrdo nepce (n = 1)

U retrospektivnom delu istraživanja analizirano je 857 bojenih preparata (HE bojenje). Prisustvo ćelija karcinoma verifikovano je u 514 uzoraka. Oni su razvrstani u nekoliko kategorija:

- kategorija 1 - uzorci koji pretežno sadrže tkivo OPK-a (n = 114)
- kategorija 2 - uzorci koji pored OPK-a sadrže i tragove drugog tkiva (n=129)
- kategorija 3 - uzorci različitih tipova tkiva infiltrisanih ćelijama karcinoma - pozitivne margine (n = 48)
- kategorija 4 - uzorci sa verifikovanom infiltracijom koštanog tkiva (n = 90)
- kategorija 5 - uzorci koji sadrže prelaz tkiva OPK-a uneki od tipova normalnog tkiva (sadrže i OPK i normalno tkivo) označeni kao prelazni uzorci (n = 133)

Na osnovu histopatološkog nalaza (kategorije 1, 2 i 5):

- uzorci dobro diferentovanog OPK-a (n = 64)
- uzorci srednje diferentovanog OPK-a (n = 292)
- uzorci slabo diferentovanog OPK-a (n = 20)

U pogledu lokalizacije (kategorije 1, 2 i 5):

- jezik (n= 130)
- pod usne duplje (n= 79)
- donja usna (n = 27)
- gingiva i sluzokoža alveolarnog nastavka (n = 88)
- obrazna sluzokoža (n = 24)
- retromolarni trougao (n = 17)
- tvrdo nepce (n = 11)

Preparati normalnog tkiva, prisutni u histopatološki negativnim marginama i kojih je bilo 343, razvrstani su na sledeći način:

- uzorci epitelnog i vezivnog tkiva (n = 45)
- uzorci mišićnog tkiva (n = 160)
- uzorci masnog tkiva (n = 40)
- uzorci tkiva pljuvačnih žlezda (n = 24)
- uzorci koštanog tkiva (n = 74)

Sve analize i prikupljanja podataka u okviru ove disertacije sprovedeni su uz informisani pristanak pacijenata uključenih u istraživanje, saglasnost Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (br. 36/29) i poštujući principe Helsinške Deklaracije o etičkim načelima medicinskih istraživanja na ljudima.

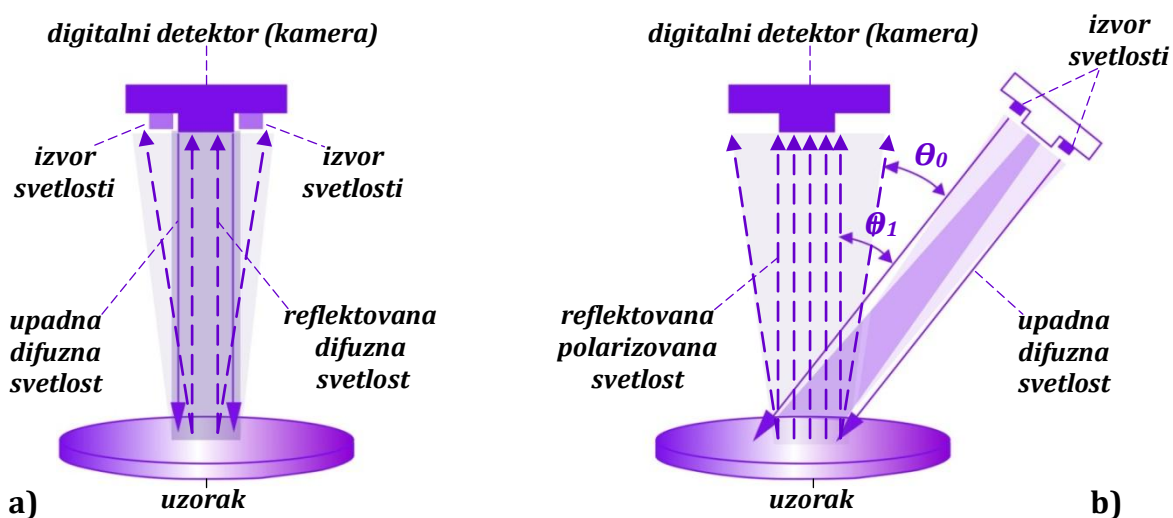
3.2 | Metode

3.2.1. | Optomagnetna imidžing spektroskopija (OMIS)

Princip rada

OMIS predstavlja novu optičku metodu koja se zasniva na magnetnim osobinama analiziranog materijala. One su posebno zanimljive jer se smatra da je njihovom interpretacijom moguće doći do podataka koji ukazuju na potencijalne konformacione promene koje se odvijaju na kvantnom, odnosno molekularnom nivou (Matija i sar., 2014). U fizičko - hemijskom smislu osnovu za analizu ovih promena čine prosečna energetska stanja valentnih elektrona u datom materijalu, tj. njihov status u okviru vodoničnih i kovalentnih veza te jon-elektron i Van der Valsovih privlačenjima prilikom interakcije materijala i svetlosti (Koruga i Tomić, 2009; Koruga i sar., 2010; Coey, 2015). Uzevši u obzir da je njihova magnetna sila 10^4 deo njihove električne sile ($F_M / F_E \approx 10^{-4}$), a da je sila F direktno proporcionalna kvantnoj akciji (Plankova akcija) $h = F \times d \times t = 6.266 \times 10^{-34}$ Js (d - pomeraj; t - vreme akcije), može se izvesti zaključak da se akcija magnetne sile odvija 10000 puta bliže kvantnom stanju materijala od električne (Koruga i sar., 2010; Matija i sar., 2014). Shodno tome i na osnovu dobijenih informacija o magnetnom ponašanju datog materijala, kod OMIS metode svaki se uzorak može posmatrati kao dija ili paramagnetik. Dijamagnetici su sve one strukture koje se odbijaju u prisustvu magnetnog polja i čije atome čine sparni elektroni. Sa druge strane, paramagnetici se u prisustvu magnetnog polja blago privlače, dok su sačinjeni od atoma čiji su elektroni nesparni (Coey i sar., 2015). U odnosu na interakciju materijala sa svetlosti, njegov dijamagnetizam promovira apsorpciju (atrakciju), a paramagnetizam njenu emisiju - repulziju (Koruga i Tomić, 2009).

Kako bi se u okviru navedenog došlo do željenih informacija koristi se već pomenuta elektromagnetna priroda svetlosti u kojoj se električna komponenta svetlosnog talasa u svim pravcima nalazi upravna na magnetnu. Kod OMIS metode svaki uzorak, tj. materijal prvo je izložen difuznoj beloju svetlosti, koja na njegovu površinu pada pod pravim uglom (slika 29a) (Koruga i Tomić, 2009; Matija i sar., 2014).



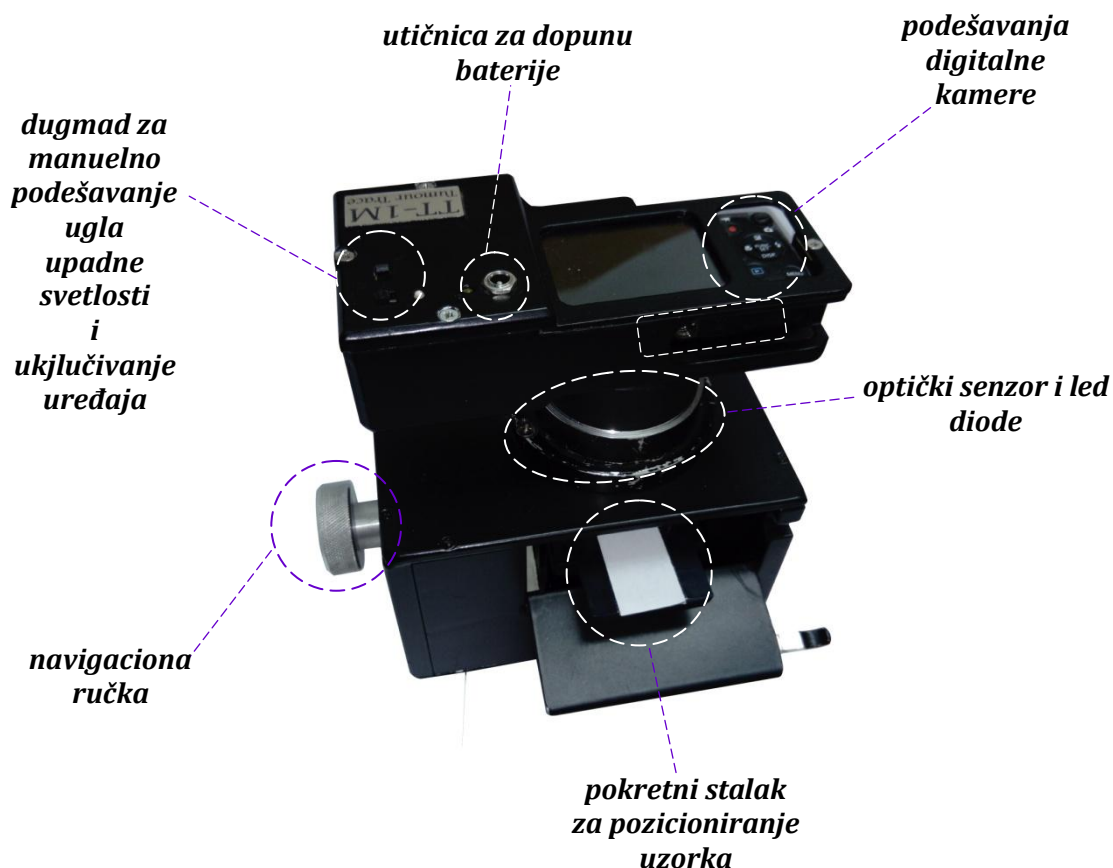
Slika 29. Interakcija svetlosti i materije u OMIS-u. **a)** reflektovana svetlost je difuzna **b)** reflektovana svetlost je polarizovana (Preuzeto i prilagođeno iz Koruga i Tomić, 2009)

Rezultat ovakve interakcije jeste reflektovana difuzna svetlost koja sa sobom nosi informacije o elektromagnetnim osobinama materijala. Sa druge strane, ako se izvor svetlosti postavi tako da svetlost na površinu istog uzorka pada pod tačno utvrđenim uglom - Brusterov ugao, sam uzorak izvršiće linearnu polarizaciju svetlosti (slika 29b). Kao rezultat, reflektovana polarizovana svetlost sadržiće samo vertikalnu, tj. električnu komponentu svetlosti, dok će horizontalna, tj. magnetna biti jednaka nuli. Na ovaj način reflektovana svetlost nosi informacije o električnim osobinama materijala (Koruga i Tomić, 2009;Matija i sar., 2014).

Kada se od reflektovane difuzne svetlosti (elektromagnetne osobine) oduzme reflektovana polarizovana svetlost (električne osobine) dobija se rezultat koji nosi informacije o magnetnim osobinama analiziranog uzorka (Koruga i Tomić, 2009;Matija i sar., 2014).

Instrumentacija

Kompletan sistem za semiautomatizovanu primenu OMIS metode čini adaptabilno kućište u kojem su smešteni: digitalna kamera, optički senzor, izvor svetlosti i pokretni stalak za pozicioniranje uzorka (slika 30).

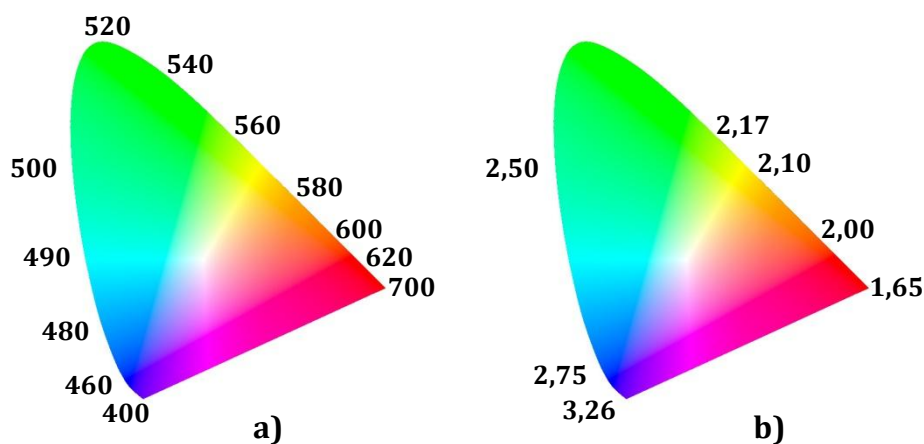


Slika 30. NL - B53 uređaj za primenu optomagnetne imidžing spektroskopije

Digitalna kamera koja se koristi u okviru OMIS metode za ova istraživanja je model IXUS 105, efektivne senzorne rezolucije 12,1 megapiksela i senzora veličine 1/2,3 inča proizvođača optičkih uređaja Canon (Canon Inc., Japan). Optički senzor za registrovanje reflektovane svetlosti je tipa CCD (eng. *charge - coupled device*), dok se kao izvor bele difuzne svetlosti koristi sistem šest emisionih LED dioda (tip LL-304WC4B-W2-3PD) kružno postavljenih pod odgovarajućim uglom ispred kamere. Bela difuzna svetlost koja se koristi kod OMIS metode nalazi se u opsegu talasnih dužina koje odgovaraju vidljivom delu elektromagnetnog spektra (400-700 nm). Podešavanja svetlosti normalne na uzorak i pod Brusterovim uglom sprovode se manuelno. Navedeni opseg svetlosti OMIS metodi omogućava analizu različitih slojeva datog materijala na dubini do 5 mm. Pokretni stalak za pozicioniranje uzorka dizajniran je tako da odgovara dimenzijama standardnih mikroskopskih pločica i povezan je sa navigacionom ručkom. Ovako postavljenim sistemom moguće je sprovesti digitalno slikanje kružnog područja datog uzorka dijametra do 25 mm. Dobijene slike obrađuju se na laptop ili PC računaru primenom odgovarajućih softverskih programa.

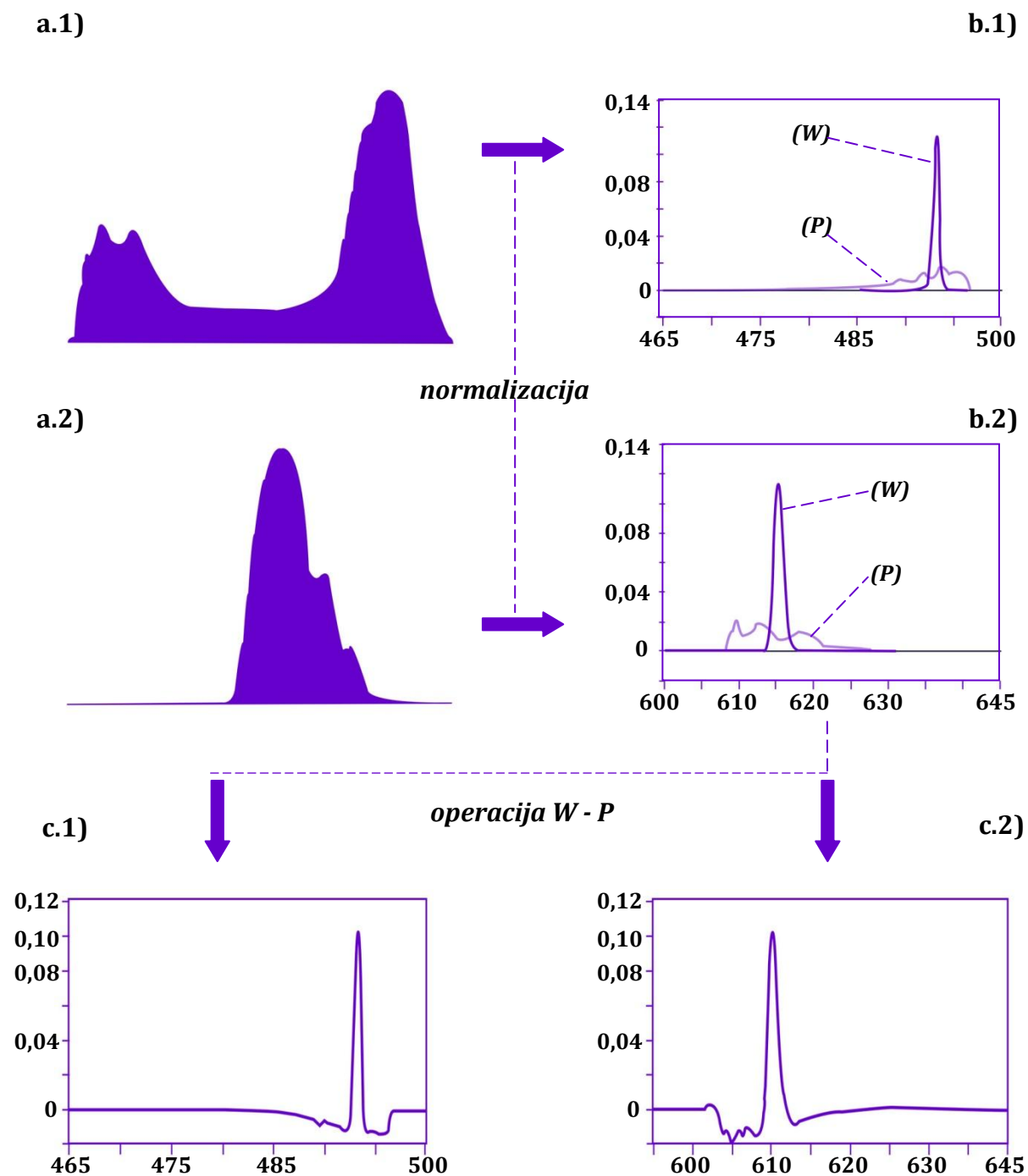
Obrada digitalne slike - Konvolucionni algoritam

Obrada digitalne slike dobijene OMIS metodom obuhvata primenu posebno dizajniranog konvolucionog algoritma razvijenog u softverskom paketu MATLAB® R2013a (MathWorks, MA, SAD). Algoritam podrazumeva transformaciju RGB (eng. *R - red; G - Greene; B - blue*) slika u optomagnetne spektre i zasniva se na tzv. Maksvelovoj potkovici boja (slika 31). Ona predstavlja dvodimenzionalni dijagram različitih sekvenci plave, zelene i crvene boje u vidljivom delu elektromagnetnog spektra (400-700 nm) i sa vrednostima energije valentnih elektrona u opsegu od 2,75 eV (eV - elektronVolt) za plavu do 1,65 eV za crvenu boju (Koruga i Tomić, 2009; Malacara, 2011).



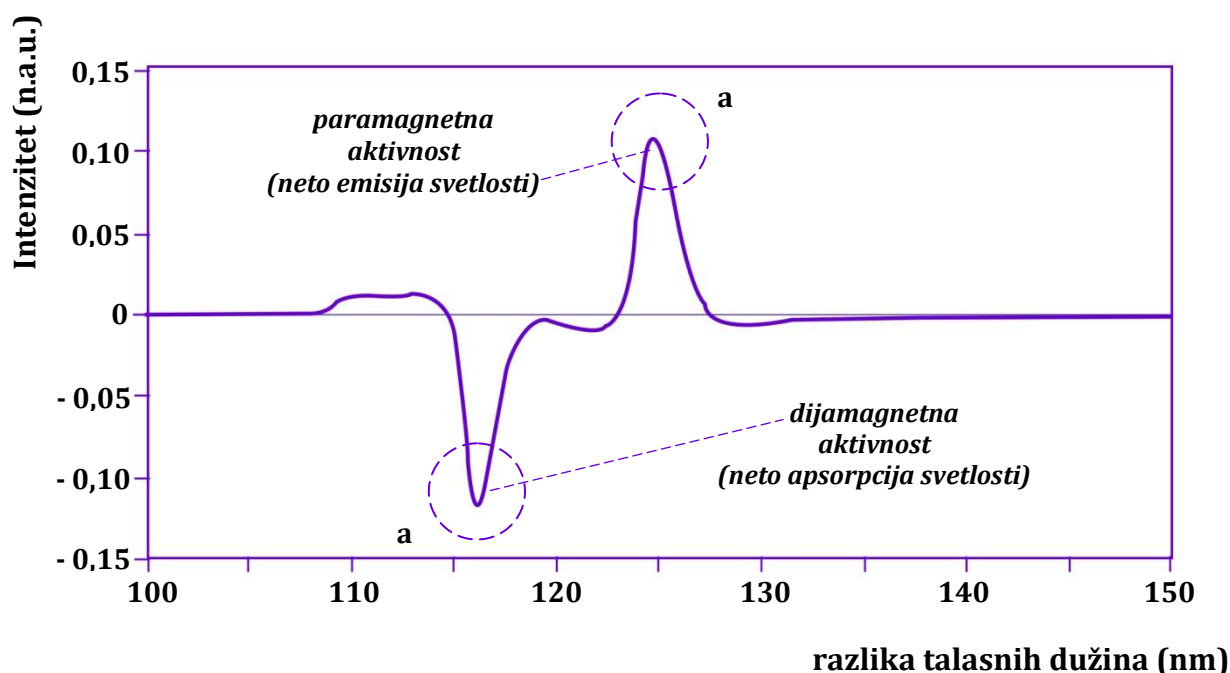
Slika 31. Maksvelova potkovica boja. **a)** RGB sistem boja u odnosu na talasnu dužinu λ (nm) **b)** RGB sistem boja u odnosu na energiju valentnih elektrona (eV)

Celokupan proces sprovodi se u nekoliko faza. Prvo se za svaku digitalnu sliku uzorka (svetlost normalna na uzorak - reflektovana difuzna svetlost (W); svetlost pod Brusterovim uglom - reflektovana polarizovana svetlost (P)) generišu RGB histogrami - histogram plavog (B), zelenog (G) i crvenog (R) dela spektra (slika 32a 1, 2). Zatim se dobijeni histogrami normalizuju tako što se njihova vrednost za svaku boju deli sa ukupnim brojem piksela date digitalne slike. Na ovaj način dobijaju se standardizovani intenziteti spektra za svaku pojedinačnu boju u vrednosti od 0 do 1, a koji su u vezi sa vrednostima talasne dužine upadne svetlosti u opsegu od 400 do 700 nm (slika 32b 1, 2) (Koruga i Tomić, 2009).



Slika 32. Dobijanje kompozitnog spektra. **a.1)** histogram plavog spektra **a.2)** histogram crvenog spektra **b.1)** normalizovani plavi deo spektra za difuznu (W) i polarizovanu (P) svetlost **b.2)** normalizovani crveni deo spektra za difuznu (W) i polarizovanu (P) svetlost **c.1)** kompozitni plavi deo spektra B ($W - P$) **c.2)** kompozitni crveni deo spektra R ($W - P$) (Preuzeto i prilagođeno iz Koruga i Tomić, 2009)

Sledeća faza podrazumeva proces oduzimanja navedenih vrednosti za digitalnu sliku dobijenu sa svetlosti pod Brusterovim uglom za istu površinu, od istih vrednosti za digitalnu sliku dobijenu sa difuznom svetlosti normalnom na uzorak. Rezultat ove matematičke operacije jesu kompozitni spektri za plavi - B (W - P), zeleni - G (W - P) i crveni - R (W - P) deo spektra (slika 32c 1,2). U poslednjoj fazi ovi se spektri kombinuju kako bi se dobio jedinstveni konvolucioni optomagnetni spektar ispitivanog uzorka predstavljen u koordinatnom sistemu u kojem se na y osi prikazuje intenzitet izražen u normalizovanim arbitrarnim jedinicama (n.a.u.) a na x osi razlika talasnih dužina (eng. *wavelength difference* - WD) izražena u nanometrima (nm) (slika 33) (Koruga i Tomić, 2009).



Slika 33. Konvolucioni optomagnetni spektar (R - B) i (W - P) (Preuzeto i prilagođeno iz Koruga i Tomić, 2009)

U koordinatnom sistemu optomagnetnog spektra analiziraju se intenziteti, pozicije, oblici i učestalost pojave karakterističnih pikova koji opisuju magnetne osobine nekog uzorka (slika 33, pozicija a) (Koruga i Tomić, 2009). Kada su u pitanju meka humana tkiva, najčešće se u primeni OMIS metode kombinuju kompozitni spektri plave i crvene boje kako bi se dobio optomagnetni spektar specifikacije (R - B) i (W - P). Uzevši u obzir ranije pomenute aspekte dubine prodiranja svetlosti kroz tkiva, ovom se specifikacijom identifikuju karakteristike i potencijalne konformacione promene u prostoru od površinskih do dubljih slojeva određenog uzorka tkiva (Jacques, 2013; Matija i sar., 2014). U ovako generisanom optomagnetnom spektru pikovi sa negativnim vrednostima intenziteta indiciraju su diamagnetnog ponašanja tkiva i reprezentuju neto apsorpciju, tj. "atrakciju" svetlosti u njemu. Pikovi sa pozitivnim vrednostima asociraju na paramagnetnu prirodu tkiva i predstavljaju neto emisiju, tj. "repulzivnost" (refleksiju) svetlosti u interakciji sa tkivom (slika 33) (Koruga i Tomić, 2009).

3.2.2. | Protokol primene OMIS metode u analizi uzoraka marginalnog i karcinomom izmenjenog tkiva u usnoj duplji

OMIS analiza sastoji se iz digitalnog slikanja uzoraka uređajem za optomagnetnu imidžing spektroskopiju i procesa obrade dobijenih slika primenom konvolucionog algoritma (slika 34).

Digitalno slikanje uzoraka sprovodi se u nekoliko koraka:

1. Mikroskopska pločica sa uzorkom tkiva postavlja se na pokretni stalak koji se navigacionom ručkom maksimalno približi objektivu digitalne kamere. Prvo se uzorak izlaže difuznoj svetlosti čiji je pravac normalan na površinu uzorka i dobija se prva digitalna slika - reflektovana difuzna svetlost (W) (slika 34A).
2. Zatim se izvor svetlosti manuelno uključuje tako da ona na površinu uzorka pada pod Brusterovim uglom od 53° . Uzorak se izlaže navedenoj svetlosti i dobija se druga digitalna slika - reflektovana polarizovana svetlost (P) (slika 34A).
3. Procedura se simultano ponavlja 10 puta za oba tipa uzorka - za slikanje jednog uzorka potrebno je između 5 i 10 sekundi.

Na ovaj način je na grupi od 60 uzoraka dobijeno ukupno 1200 digitalnih slika (620 slika OPK-a i 580 slika marginalnog tkiva). Nativni uzorci se nakon slikanja fiksiraju i šalju na histopatološku evaluaciju.

U slučaju bojenih preparata kompletna procedura digitalnog slikanja je ista kao i kod nativnih uzoraka, s tim što se procedura ponavlja 5 puta za sve tipove uzoraka. Ukupno je na taj način dobijeno 8570 digitalnih slika.

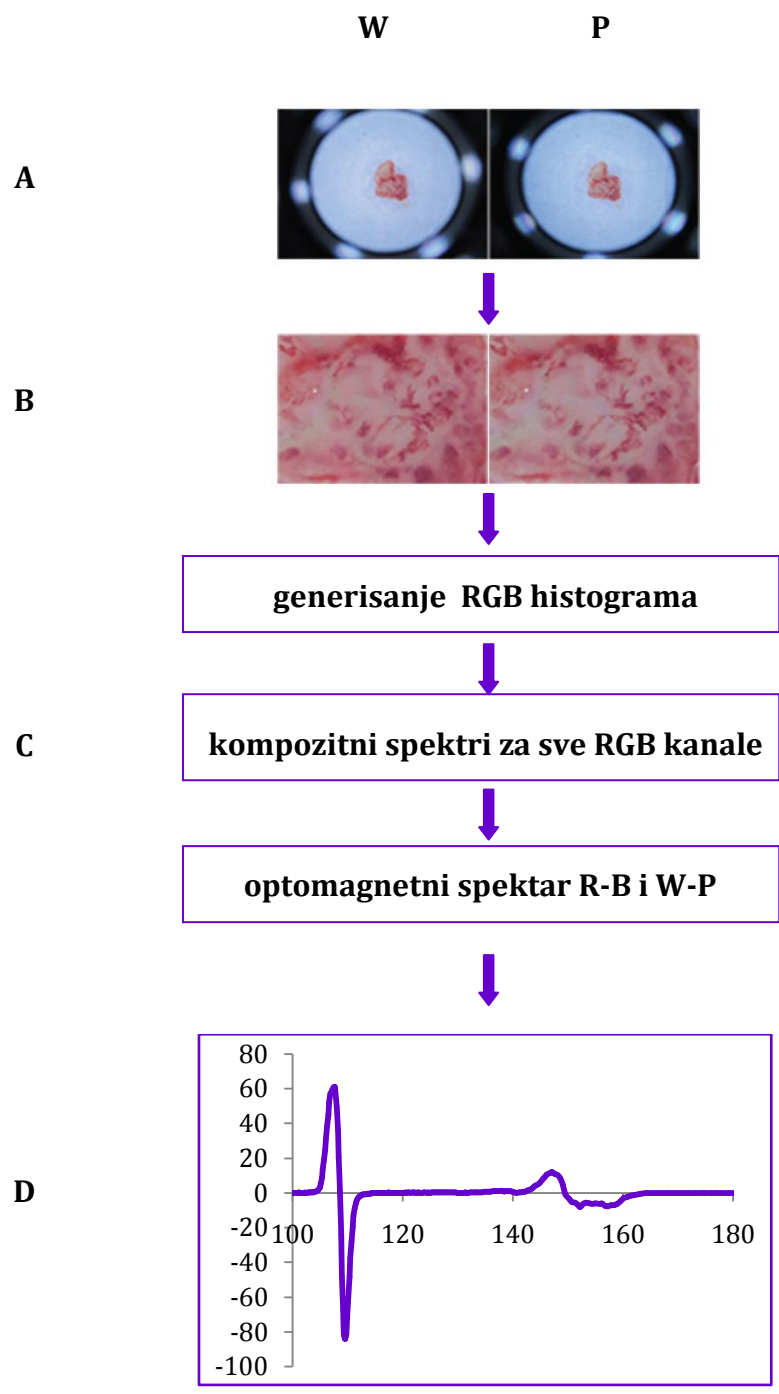
Slike se zatim prebacuju na računar sa instaliranim softverima (Adobe Photoshop®, MATLAB®) za njihovu dalju obradu.

Obrada dobijenih digitalnih slika takođe se sprovodi u nekoliko faza:

1. Slike se prvo kropuju (iseku) tako da novoformirana površina sadrži minimalnu količinu bele pozadine, čime se maksimalno umanjuje prisustvo šuma u okviru OMIS signala (slika 34B).
2. Kropovane slike se dalje obrađuju ranije pomenutim algoritmom za konvoluciju spektra u regiji plave, zelene i crvene boje (slika 34C).
3. Kao rezultat navedenih matematičkih operacija dobijaju se optomagnetni spektri prikazani u obliku dijagrama i u okviru već opisanog koordinacionog sistema. Ovi dijagrami sadrže informaciju o vrednosti intenziteta na 256 tačaka koje predstavljaju razliku talasnih dužina u opsegu od 100 do 300 nm (slika 34D).

Dobijeni dijagrami i podaci o karakterističnim pikovima u okviru optomagnetnog spektra omogućavaju njegovu kvalitativnu evaluaciju.

Za potrebe razvrstavanja i klasifikacije uzoraka različitih tipova tkiva dalje se pristupa razvoju automatizovanih algoritama (klasifikatora) zasnovanih na metodama mašinskog učenja. Klasifikacija podrazumeva da se na osnovu određenih atributa datom uzorku odredi klasa kojoj pripada, a na osnovu obučavajućeg skupa opservacija unapred poznatih kategorija (Tan i sar., 2006). Kod primene OMIS-a ona je binarna - mogućnost razvrstavanja u dve klase.



Slika 34. Protokol primene OMIS metode na uzorcima tkiva u usnoj duplji

3.2.3. | Algoritmi za automatizovano razvrstavanje i klasifikaciju uzoraka različitih tipova tkiva

Metode mašinskog učenja predstavljaju okosnicu razvoja algoritama za automatizovanu klasifikaciju različitih tipova tkiva na osnovu rezultata dobijenih primenom OMIS metode. Statistički, radi se o metodama nadgledanog (eng. *supervised*) učenja u kojima se teži pronalasku funkcije f koja ulazna obeležja X (256 atributa) mapira u ishod Y (klasa tumorskog ili normalnog tkiva) (Tan i sar., 2006).

$$Y = f(X)$$

U okviru istraživanja koje obuhvata analizu uzoraka tkiva u usnoj duplji prišlo se identifikaciji najoptimalnijeg modela za zadati skup vrednosti u okviru optomagnnog spektra. U te svrhe ispitivana je efikasnost nekoliko metoda mašinskog učenja:

- Naivni Bajesov klasifikacioni metod (eng. *Naive Bayes Classifier*-NB)
- Stablo odlučivanja (eng. *Decision Tree* - DT)
- Metod "slučajne šume" (eng. *Random Forest* - RF)
- Metod potpornih vektora (eng. *Support Vector Machine* - SVM)
- Neuralna mreža (eng. *Neural Net* - NN)
- Dubinsko učenje (eng. *Deep Learning* - DL)

3.2.3.1. | Naivni Bajesov klasifikacioni metod (NB)

Primenom NB metode podrazumeva se da je za potrebe klasifikacije uzoraka uticaj vrednosti svakog atributa na datu klasu nezavisan od vrednosti drugih atributa, a u skladu sa pravilima Bajesove teoreme. Tako se na "naivan" način svakom atributu pridaje jednaka važnost u definisanju klase kojoj uzorak pripada (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011).

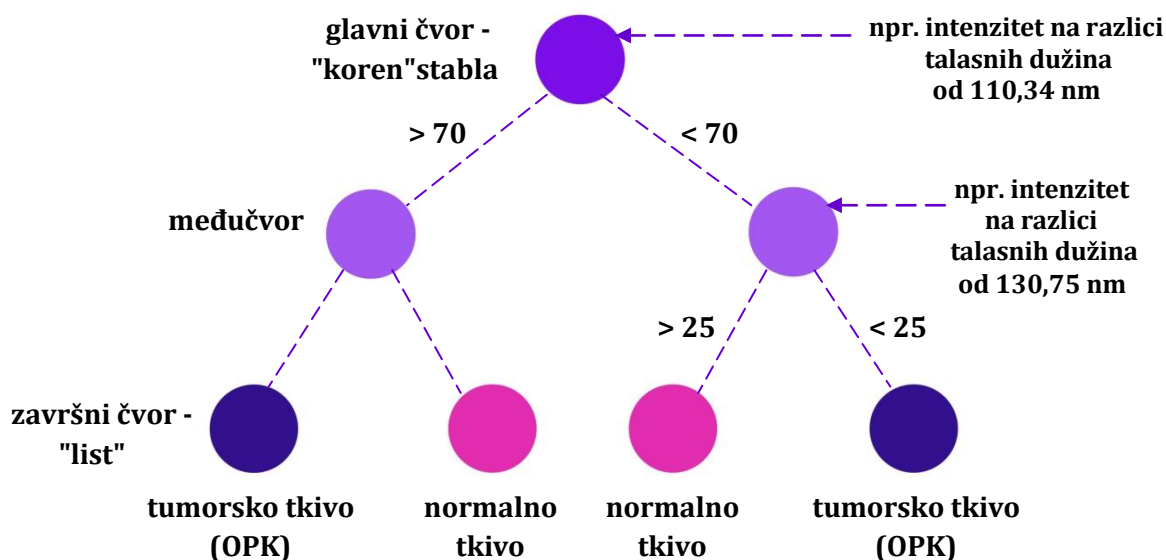
Prednosti NB metode u klasifikaciji uzoraka se pre svega odnose na njenu jednostavnost i programsku efikasnost, kao i nisku varijansu. Iako se u praksi retko potvrđuje pretpostavljena nezavisnost atributa, NB algoritam je po svojoj preciznosti kompatibilan rezultatima kompleksnijih metoda mašinskog učenja (Sammut i Webb, 2011; Murty i Devi, 2011).

3.2.3.2. | Stablo odlučivanja (DT)

Kao jedna od najčešće primenjivanih metoda, stabla odlučivanja predstavljaju algoritam koji je u svojoj građi sličan stablu drveta. Sastoji se iz određenog broja čvorova u kojem je svaki od njih povezan sa donošenjem odluke o pripadnosti uzorka nekoj od klasa (Quinlan, 1986; Murthy, 1998; Sammut i Webb, 2011).

Svako stablo odlučivanja počinje glavnim čvorom - "korenom", odnosno izborom atributa koji je najbolji za tu ulogu. Selekcija najreprezentativnijeg atributa sprovodi se merenjem stepena "nečistoće" (eng. *impurity*) nekog čvora, odnosno broja predstavnika iste klase u njemu (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011). Ova mera određuje se na dva načina - primenom informaciono teoretske entropije ili gini indeksa (Breiman i sar. 1984; Quinlan, 1986). Ovim putem teži se izboru atributa koji će određeni skup podataka podeliti na dve grupe u kojima se u idealnim uslovima nalaze samo predstavnici iste klase. U takvom sistemu, algoritam bira atribut sa najviše umanjenom prosečnom "nečistoćom". Iz glavnog čvora stablo se u odnosu na vrednosti navedenog atributa grana do narednog čvora koji odgovara

vrednosti novog atributa. Proces se ponavlja sve dok se ne dođe do završnog čvora, tzv. lista koji odgovara vrednosti date klase, tj. uzorak se npr. identifikuje kao tumor ili kao zdravo tkivo. Za sve uzorke koji se na osnovu vrednosti svojih atributa završe na isti način, tj. na istom listu, DT algoritam određuje pripadnost istoj klasi (slika 35) (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011).



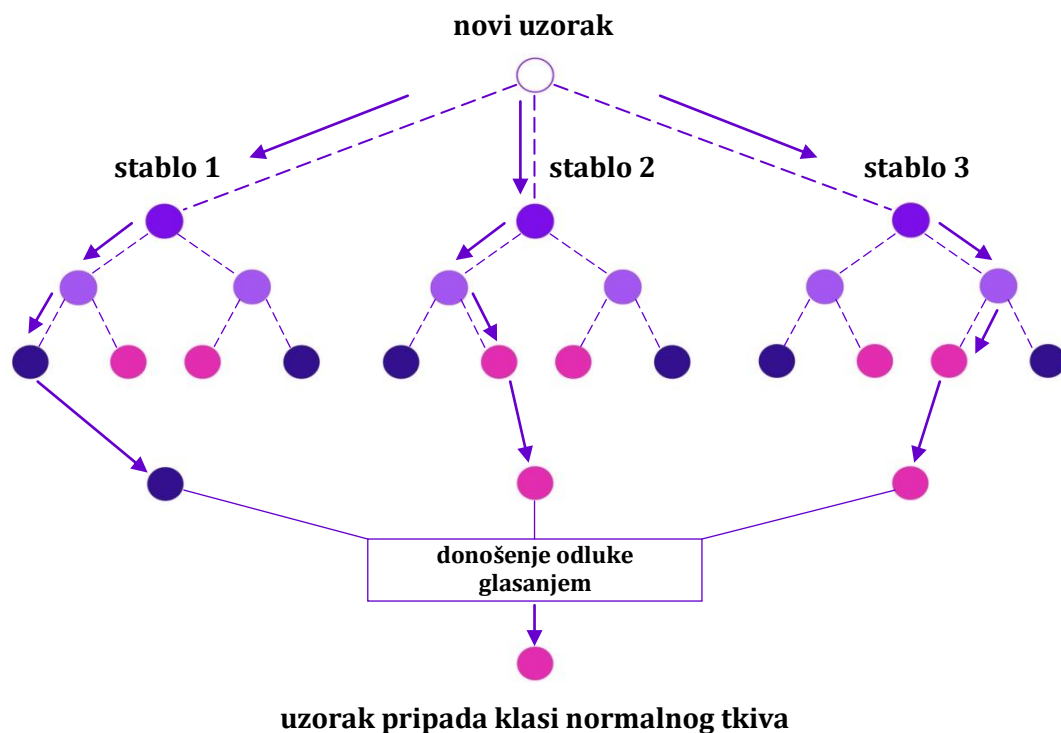
Slika 35. Ilustracija razvrstavanja po klasama primenom DT algoritma

Glavna prednost korišćenja DT algoritma jeste njegova lako razumljiva i transparentna interpretacija. Svaki čvor u okviru stabla predstavlja kriterijum za donošenje neke odluke, što ovaj algoritam čini jednostavnim i efikasnim. Primarnim nedostatkom može se smatrati povećan rizik od preteranog prilagođavanja (eng. *overfitting*) podataka (Sammut i Webb, 2011; Murty i Devi, 2011).

3.2.3.3. | Metod "slučajne šume" (RF)

U svrhu još preciznijeg donošenja odluka u odnosu na DT algoritam, često se u praksi primenjuje metod "slučajne šume". "Slučajnu šumu" sačinjava određeni broj nasumično odabranih stabala odlučivanja formiranih na različitim podgrupama glavnog skupa podataka - tzv. obučavajućih (eng. *bootstrap*) podskupova. Za sve nove uzorke, svako stablo donosi odluku o pripadnosti uzorka određenoj klasi na osnovu sopstvenih pravila klasifikacije (Breiman i sar., 1984; Breiman, 2001).

U realnoj primeni navedeni pristup podrazumeva izlaganje svakog uzorka analizi nezavisnih stabala odlučivanja treniranih na različitim podskupovima podataka. Kako bi se dodatno uvećao broj faktora koji klasifikuju uzorak, algoritam sprovodi i nasumični odabir atributa. Na svakom čvoru se u okviru stabla vrši izbor atributa iz različitih podskupova veličine n , a koji proističu iz celokupne baze atributa. Proces se sprovodi na isti način kao i u selekciji najreprezentativnije vrednosti atributa kod DT metode - primenom entropije ili gini indeksa. Pripadnost uzorka nekoj klasi definiše se metodom glasanja, odnosno identifikacijom one odluke koja se najčešće ponavlja kao rezultat primene nezavisnih stabala u okviru "slučajne šume" (Breiman i sar., 1984; Breiman, 2001; Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011).



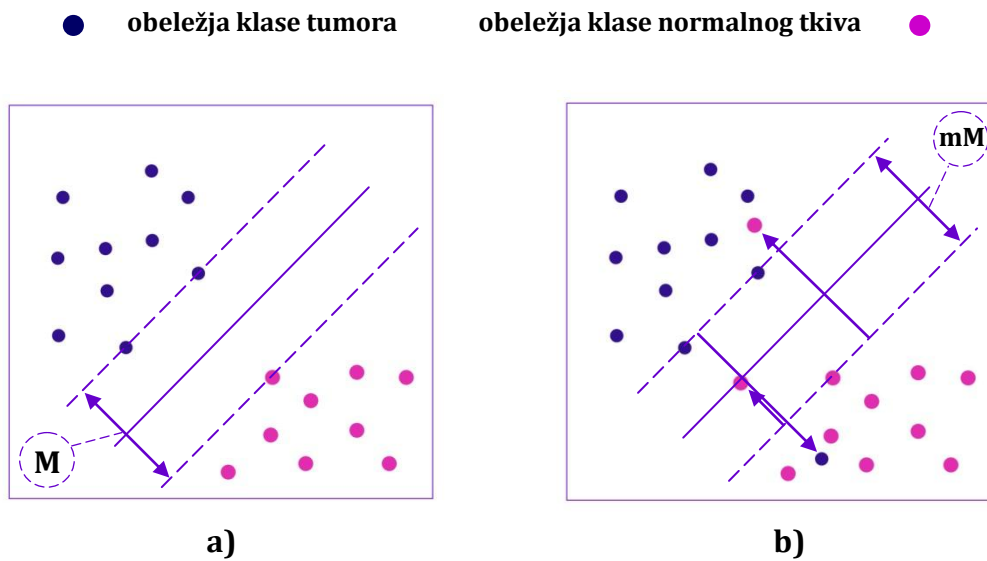
Slika 36. Određivanje pripadnosti uzorka jednoj od klasa primenom RF algoritma (Preuzeto i prilagođeno sa interneta - Jagannath, 2017)

Shodno samoj strukturi algoritma i načinu donošenja odluka, primenom metode "slučajne šume" postiže se umanjeње varijanse, izbegava "zamka" preteranog prilagođavanja podataka i postiže veća preciznost (Breiman, 2001; Touw i sar., 2013).

3.2.3.4. | Metod potpornih vektora (SVM)

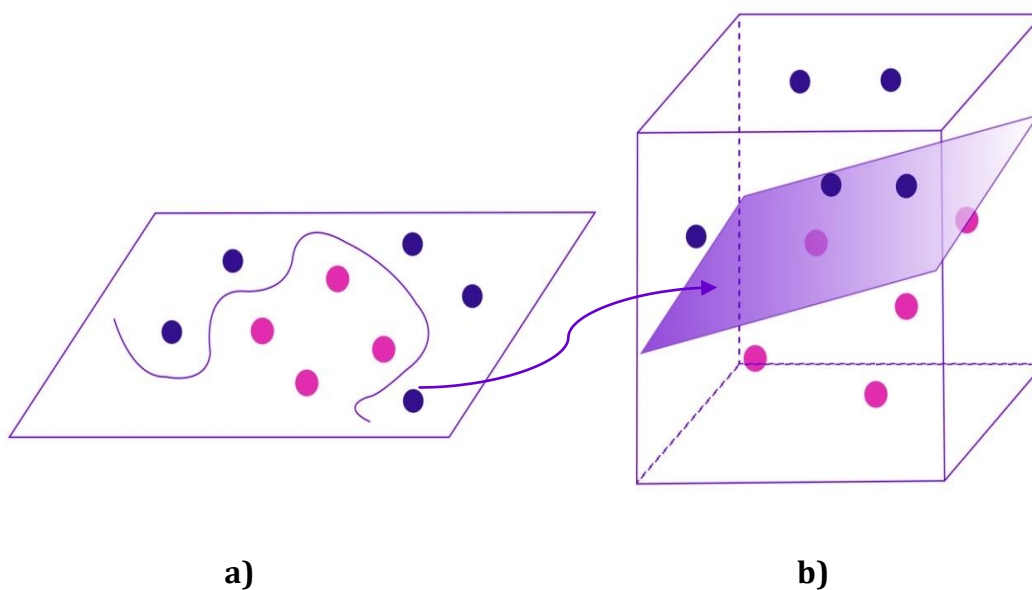
"SVM primarno predstavlja vrstu linearnog algoritma koji se može koristiti za potrebe klasifikacije, regresije i dr." (Sammut i Webb, 2011). Kada je reč o njenoj praktičnoj primeni, ona se najčešće odnosi na binarnu klasifikaciju koja predviđa formiranje jedne ili više hiper-ravni koje jasno definišu pripadnost uzorka nekoj od dvaju klasa na osnovu skupa obeležja obučavajućih uzoraka (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011; Murty i Devi, 2011).

U izboru optimalne hiper-ravni ključnu ulogu imaju obeležja koja naležu na samu ravan ili se nalaze u njenoj neposrednoj blizini - tačke koje predstavljaju potporne vektore. Pronalaženje ovih tačaka obezbeđuje kreiranje najvećeg mogućeg prostora, tj. maksimalne margine između analiziranih klasa. U scenariju linearno deljivog skupa obeležja, ovako kreiran SVM model, obučavan na skupu navedenih vektora, nove uzorke svrstava sa jedne ili druge strane hiper-ravni, tj. opredeljuje ih prostorima koji odgovaraju dostupnim klasama (slika 37a). U slučaju kada neki skup podataka nije moguće u potpunosti linearno razvrstati uvodi se pojam tzv. meke margine. U ovako definisanoj margini toleriše se pozicioniranje nekih obeležja u prostoru same margine ili sa pogrešne strane hiper-ravni. Ovaj pristup zahteva korekciju modela uz "kažnjavanje" prisustva navedenih tačaka, a koje je proporcionalno njihovom geometrijskom odstupanju od marginalne ivice prostora koji odgovara klasi kojoj nominalno pripadaju (slika 37b) (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011; Murty i Devi, 2011).



Slika 37. Razdvajanje obeležja dve klase metodom potpornih vektora. **a)** maksimalna margina (**M**) **b)** meka margina (**mM**). U oba slučaja potporni vektori predstavljaju obeležja koja se nalaze na isprekidanoj liniji. U slučaju meke margine pogrešno pozicionirana obeležja označena su strelicama (Preuzeto i prilagođeno sa interneta - Larhmam, 2018)

Kada je reč o podacima dobijenih OMIS metodom, oni, kao i u većini slučajeva, pripadaju skupu nelinearno deljivih obeležja datih klasa. U takvim okolnostima neophodna je njegova transformacija u sistem u kojem je omogućeno njihovo linearno razvrstavanje. Originalni prostor u kome su navedena obeležja nelinearno deljiva (slika 38a) mapira se u prostor većih dimenzija u kojem je moguće realizovati koncept linearnog SVM modela (slika 38b). Kako bi takva procedura proizvela značajno operativno i memorijsko opterećenje pristupa se primeni različitih tipova kernel funkcija, matematičkog algoritma u praksi poznatog i kao kernelski trik (eng. *kernel trick*) (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011).



Slika 38. Mapiranje nelinearne podele obeležja dve klase (**a**) u višedimenzionalni linearni prostor (**b**) (Preuzeto i prilagođeno sa interneta - Shehzadex, 2016)

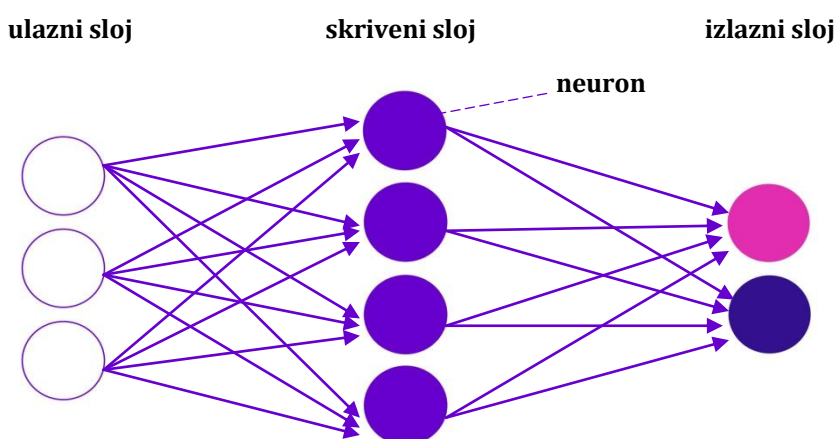
Uzevši u obzir da skalarni proizvod vektora predstavlja osnovu linearnog SVM klasifikacionog modela, za nelinearno deljiv skup obeležja neophodno ga je izračunati u prostoru veće dimenzionalnosti. Kernel funkcija to implicitno i izvršava, obezbeđujući tim putem SVM algoritmu resurse za učenje nelinearnih principa razdvajanja dve klase. U tipove kernel funkcija (kernela) koje se najčešće primenjuju spadaju linearni, polinomijalni te radijalni kerneli (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011).

Glavne prednosti SVM klasifikacionog algoritma odnose se na svestranu primenu ovog algoritma u rešavanju različitih problema. Veoma dobre performanse ove metode posebno su vidljive na opsežnijim bazama podataka, gde obukom na širokom opsegu informacija podiže preciznost klasifikacije kada je izložena novim opservacijama - osobina generalizacije. Izbor potpornih vektora je nezavisan dok aplikacija kernelove funkcije omogućava rad sa nelinearno deljivim obeležjima (Sammut i Webb, 2011).

3.2.3.5. | Neuralna mreža (NN)

Kao posebno dizajniran algoritam, neuralna mreža je konceptualno slična strukturi i funkcionisanju nervnog sistema bioloških jedinki. Kao takva sastavljena je od brojnih veštačkih neurona - čvorova (eng. *nodes*), međusobno povezanih radi prenosa i obrade neke informacije. Iz tih razloga ova metoda često nosi naziv veštačka neuralna mreža (eng. *Artificial Neural Network* - ANN). Najčešće korišćen koncept ovog tipa jeste višeslojna perceptron (eng. *multi-layer perceptron* - MLP) neuralna mreža čiji se rad zasniva na algoritmu povratne propagacije (eng. *backpropagation*) i u kojoj se informacija prenosi i procesira samo u jednom smeru - prema napred (eng. *feedforward*) (slika 39) (Tan i sar., 2006; Murty i Devi, 2011).

MLP mrežu grade najmanje tri sloja neurona - ulazni (eng. *input*), skriveni (eng. *hidden*) i izlazni (eng. *output*) (slika 39).



Slika 39. Koncept klasične neuralne mreže sa jednim skrivenim slojem neurona

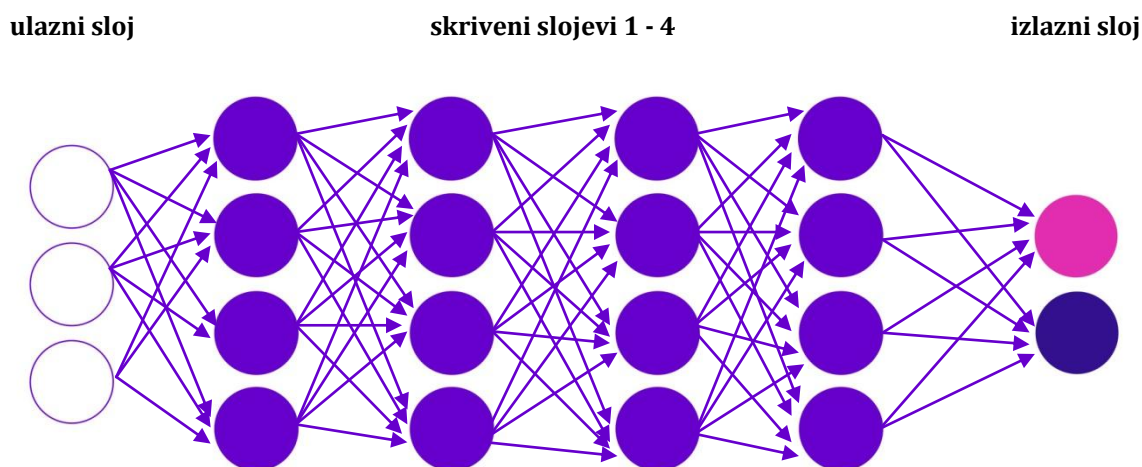
U okviru ovako struktuiranog sistema svaki neuron prvog u nizu sloja komunicira sa svim neuronima narednog, dok je za ovaj tip neuronske mreže isključen prenos informacije unutar istog sloja. Svaki neuron u okviru mreže poseduje aktivacionu funkciju, dok se svaka interneuronska veza meri težinom određene vrednosti. Informaciju (ulazni skup podataka) prvo prihvataju neuroni ulaznog sloja, prenose je na neurone skrivenog da bi se u poslednjem koraku na izlazu generisao odziv, odnosno rezultat rada MLP mreže. Osim onih koji se nalaze

u ulaznom sloju, svi ostali neuroni najčešće poseduju sigmoidnu aktivacionu funkciju. Prilikom prve propagacije informacija kroz sistem, koriste se nasumično izabrane vrednosti praga aktivacione funkcije i težine interneuronske veze, da bi se svakim ponavljanjem procesa mreža adaptirala i korigovala ih. Na taj način ona proučava sve zavisnosti na relaciji ulazne informacije i izlaznog rezultata. Osnovu navedenog pristupa čini algoritam povratne propagacije. Sa svakim ponavljanjem izlazni rezultat algoritma poredi se sa očekivanom odlukom o pripadnosti uzorka datoj klasi. Na osnovu vrednosti grešaka generisanih prilikom svakog ciklusa, mreža koriguje težine svake veze kako bi se efikasnost (preciznost klasifikacije) modela podigla na odgovarajući nivo, a greška svela na minimum (Tan i sar., 2006; Murty i Devi, 2011).

Efikasnost neuralne mreže uvećava se sa povećanjem broja uzoraka koji se analiziraju. To je čini posebno pogodnom u analizi velikih baza podataka. Jednu od njenih bitnih karakteristika predstavlja i veća brzina procesuiranja informacija u odnosu na standardne metode mašinskog učenja. Ipak, glavnu prednost oslikava osobina generalizacije - obezbeđuje precizne rezultate i na osnovu parametara kojima prilikom obuke nije izložena (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011; Murty i Devi, 2011).

3.2.3.6. | Dubinsko učenje (DL)

U kontekstu jednostavnosti osnovne strukture neuralne mreže, dubinsko učenje prvenstveno se zasniva na njenoj nadogradnji. Ono obuhvata upotrebu široke grupe algoritama - duboke, rekurentne, konvolucione neuralne mreže i dr., a koji su u skladu sa svojom praktičnom primenom. U interpretaciji OMIS rezultata korišćen je koncept "duboke neuralne mreže" (eng. *deep neural network*) u okviru programske dokumentacije H2O 3 platforme za mašinsko učenje. Ona se od osnovne strukture MLP mreže razlikuje po većem broju skrivenih slojeva i aktivacionim funkcijama neurona u njima (funkcije: *rectifier*, *tanh* i *maxout*) (slika 40). Zasniva se na istim algoritmima i principu rada - algoritam povratne propagacije i procesuiranje informacija prema napred. Uz adaptabilnu stopu učenja (eng. *learning rate*) i druga napredna rešenja smatra se superiornijim klasifikacionim modelom od bazičnih neuralnih mreža, s posebnim akcentom na veću tačnost (Schmidhuber, 2015, H2O.ai, 2020).



Slika 40. Dubinska neuralna mreža sa većim brojem skrivenih slojeva neurona

3.2.4. | Analiza klasifikacione efikasnosti različitih algoritama primenjenih na baze podataka dobijene opto-magnetnom imidžing spektroskopijom

Magnetne osobine svakog uzorka (opservacije) opisane su, kao što je ranije navedeno, intenzitetima spektralnih pikova (vrednosti uvećane 1000 puta i izražene u arbitrarnim jedinicama) i pozicijama na kojima se isti javljaju - razlike talasnih dužina (256 tačaka u opsegu od 100 do 300 nm). Pripadnost nekog uzorka odgovarajućoj klasi je na taj način definisana vrednostima 256 obeležja (atributa) (Koruga i Tomić, 2009). U binarnoj klasifikaciji uzoraka na osnovu atributa dobijenih OMIS metodom, klasa opservacija označena kao tumorsko tkivo (OPK) uparena je sa jednom od navedenih klasa:

- zaativne uzorke tkiva
 - klasa opservacija označena kao normalno tkivo
- za bojene preparate tkiva
 - klasa opservacija označena kao normalno tkivo
 - klasa opservacija označena kao epitelno i vezivno tkivo
 - klasa opservacija označena kao mišićno tkivo
 - klasa opservacija označena kao masno tkivo
 - klasa opservacija označena kao tkivo pljuvačnih žlezda
 - klasa opservacija označena kao koštano tkivo

Uz navedena poređenja, sprovedeno je i razvrstavanje uzoraka koji pripadaju klasama koštanog tkiva infiltrisanog ćelijama karcinoma i koštanog tkiva normalne histopatološke građe.

Kompletna analiza podataka dobijenih OMIS metodom obuhvata tri faze:

1. Priprema podataka
 - smanjenje dimenzionalnosti (veličine slike - piksela) i normalizacija
2. Primena automatizovanih algoritama
 - mere efikasnosti klasifikacionih modela
3. Validacija automatizovanih algoritama
 - unakrsna validacija (eng. *cross validation*)

3.2.4.1. | Priprema podataka

U slučaju podataka dobijenih primenom OMIS metode, "svaki objekat analize (klasa pripadnosti uzorka) moguće je predstaviti kao multidimenzionalnu tačku u n - dimenzionalnom matematičkom prostoru, u kome n odgovara ukupnom broju dostupnih atributa" - 256 (Sammut i Webb, 2011). Smanjenje dimenzionalnosti takvog skupa podataka podrazumeva prezentovanje n - dimenzionalne tačke u smanjenom p - dimenzionalnom prostoru ($p < n$). U pogledu klasifikacije ovaj postupak nudi nekoliko pogodnosti, među kojima se naročito ističu niža varijansa novoformiranog skupa i uklanjanje eventualno prisutnih iregularnosti (statistički šum), a u svrhe poboljšanja tačnosti. Najčešće korišćenu metodu smanjenja dimenzionalnosti predstavlja analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis* - PCA) (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011).

PCA algoritam traga za atributima koji se nalaze u potencijalnoj korelaciji, te ih je ortogonalnom transformacijom moguće prezentovati u manjem broju dimenzija, a njihove vrednosti projektovati u skup tzv. glavnih komponenti (veštački formirana obeležja). Na taj

način se veći deo varijanse originalnog skupa atributa preslikava u određeni broj međusobno nepovezanih, nezavisnih obeležja. Prva u nizu PCA komponenti je ona koja sadrži maksimalnu vrednost varijanse originalnog skupa, dok se svaka sledeća određuje po istom principu i tako da se ne nalazi u korelaciji sa onom koja joj prethodi (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011).

U zavisnosti od OMIS datoteka korišćenih u sklopu željenih razvrstavanja, PCA metodom se originalnih 256 atributa mapira u skupove podataka koji u proseku sadrže 9 do 10 glavnih komponenti. Na ovaj način zadržava se 95% primarne varijanse.

Uz analizu glavnih komponenti sprovodi se i normalizacija vrednosti intenziteta spektralnih pikova kako bi se iste nalazile u istom opsegu.

3.2.4.2. | Primena automatizovanih algoritama

Druga faza analize podrazumeva aplikaciju metoda mašinskog učenja na novoformirani PCA skup podataka. Na početku, pomenuti skup podataka deli se na obučavajući i test skup u odnosu 70% prema 30%. Algoritmi prvo proučavaju pravila predviđanja pripadnosti uzoraka odgovarajućim klasama na skupu obučavajućih opservacija (obučavajući skup), a zatim ih primenjuju u kategorizaciji novih, do tada neviđenih uzoraka (test skup). Njihova klasifikaciona efikasnost meri se brojem tačnih i netačnih predviđanja ostvarenih na test skupu. U praktičnom smislu dobijaju se informacije o stepenu podudaranja unapred poznatih klasa sa rezultatima klasifikacije. Na taj način formira se matrica konfuzije (eng. *confusion matrix*) (Sammut i Webb, 2011). U binarnom sistemu čine je dve vrste opservacija – one koje pripadaju pozitivnoj (tumorsko tkivo) i one koje pripadaju negativnoj klasi (normalno tkivo). Prikazuje se u obliku tabele u kojoj su definisana četiri interesna polja (tabela 8) (Sammut i Webb, 2011):

- “tačno pozitivni (TP)” (eng. *true positive*) uzorci – broj opservacija koje je algoritam identifikovao kao tumorsko tkivo, a koje zaista i pripadaju toj klasi
- “lažno pozitivni (LP)” (eng. *false positive*) uzorci – broj opservacija koje je algoritam identifikovao kao tumorsko, a koje pripadaju klasi normalnog tkiva
- “tačno negativni (TN)” (eng. *true negative*) uzorci – broj opservacija koje je algoritam identifikovao kao normalno tkivo, a koje zaista i pripadaju toj klasi
- “lažno negativni (LN)” (eng. *false negative*) uzorci – broj opservacija koje je algoritam identifikovao kao normalno, a koje pripadaju klasi tumorskog tkiva

Tabela 8. Matrica konfuzije

MATRICA KONFUZIJE		
predviđena klasa	stvarna klasa	
	POZITIVNA	NEGATIVNA
POZITIVNA (OPK)	TP	LP
NEGATIVNA (normalno tkivo)	LN	TN

Na osnovu navedenih vrednosti moguće je evaluirati performanse različitih algoritama putem brojnih statističkih parametara. Kada je reč o većini dijagnostičkih metoda poput OMIS-a najčešće se koriste sledeći (Šimundić, 2009):

-
- Senzitivnost (eng. *Sensitivity*)
 - Specifičnost (eng. *Specificity*)
 - Tačnost (eng. *Accuracy*)
 - Površina ispod ROC krive (eng. *Area Under the Curve* - AUC)
 - Odnos verovatnoće (eng. *Likelihood Ratio* - LR)
 - Dijagnostički odnos šansi (eng. *Diagnostic Odds Ratio* - DOR)

Senzitivnost

Senzitivnost predstavlja meru efikasnosti određenog algoritma u identifikaciji uzoraka koji stvarno pripadaju klasi tumorskog tkiva (Altman i Bland, 1994). Prikazuje se kao odnos broja tačno predviđenih i ukupnog broja uzoraka tumorskog tkiva.

$$\text{SENZITIVNOST} = TP / (TP + LN)$$

Specifičnost

Specifičnost predstavlja meru sposobnosti određenog algoritma u ispravnoj identifikaciji uzoraka normalnog tkiva (Altman i Bland, 1994). Prikazuje se kao odnos broja tačno predviđenih i ukupnog broja uzoraka normalnog tkiva.

$$\text{SPECIFIČNOST} = TN / (TN + LP)$$

Tačnost

Tačnost je parametar koji meri sposobnost algoritma u tačnom predviđanju pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa (Altman i Bland, 1994). Prikazuje se kao odnos broja ispravnih predviđanja i ukupnog broja uzoraka.

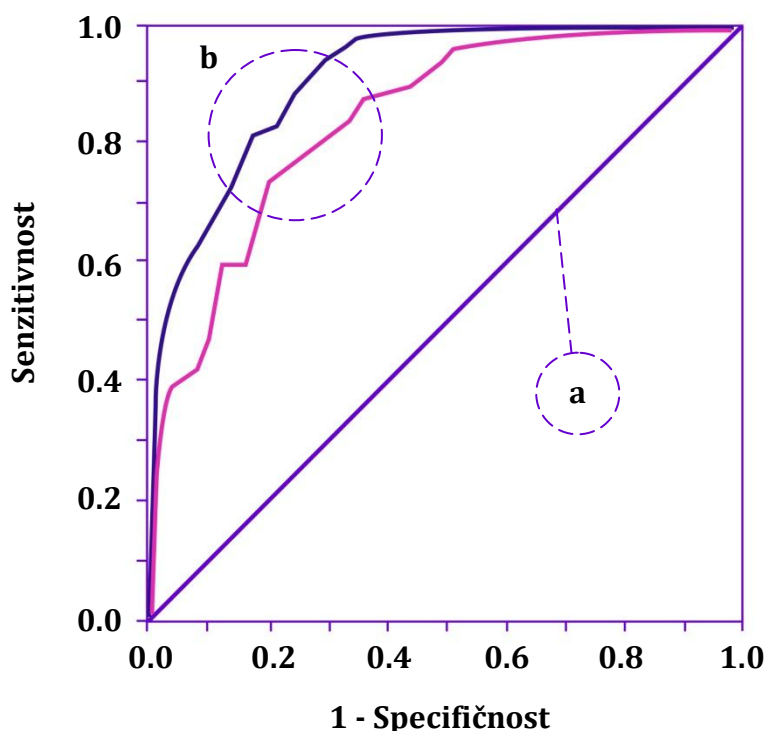
$$\text{TAČNOST} = TP + TN / (TP + LP + TN + LN)$$

Površina ispod ROC krive²

Primarna svrha analize ROC krive jeste da utvrdi u kojoj meri je određeni klasifikator (algoritam) efikasan u razlikovanju dve klase opservacija. Što su razlike izraženije, to je

²ROC kriva (eng. *Receiver Operating Characteristic curve*) predstavlja grafički prikaz odnosa senzitivnosti (stopa "tačno pozitivnih" predviđanja) i specifičnosti (stopa "tačno negativnih" predviđanja). Definisana je vrednostima tih parametara u koordinatnom sistemu u kome se na y osi nalaze vrednosti senzitivnosti, a na x osi vrednosti "lažno pozitivnih" predviđanja (jedan minus specifičnost)

mogućnost greške i preklapanja njihovih distribucija manja (Swets, 1979; Hanley i McNeil, 1982; Hanley, 1989). U praksi se ROC kriva nalazi između dva ekstremne pozicije (slika 41).



Slika 41. Efikasnost klasifikatora iz perspektive ROC krive. ROC kriva tamno plave boje pokazuje veću efikasnost u razlikovanju dve klase opservacija od ROC krive roze boje

Prva je ona u kojoj postoji jednaka verovatnoća da će npr. uzorak tkiva pripasti klasi tumora i kada joj stvarno i pripada, ali i u slučaju njegove pripadnosti klasi normalnog tkiva. Kada uzmemo u obzir rezultate dobijene OMIS metodom ova pozicija upućuje na istu raspodelu spektra i kod tumorskog i kod normalnog tkiva. U koordinatnom sistemu takva kriva predstavljena je pravom linijom koja povezuje tačke (0, 0) i (1, 1) i naziva se dijagonala slučajnog ishoda (eng. *chance diagonal*) (slika 41a). U drugom scenariju, u kome postoji najmanje jedna granična vrednost na kojoj će svi uzorci biti raspoređeni klasi kojoj i pripadaju, obezbeđeno je potpuno, tj. idealno razlikovanje dve klase. Tada sa aspekta senzitivnosti i specifičnosti klasifikator sve uzorke tumorskog i normalnog tkiva deklariše prema njihovoj stvarnoj pripadnosti. ROC kriva je u tom slučaju prikazana kao kombinacija pravih linija, prve koja povezuje tačke (0, 0) i (0, 1) i druge koja se na nju nadovezuje u tački (0, 1) i prostire do tačke (1, 1). Kvalitativno, algoritam je uspešan u razlikovanju opservacija dve klase onoliko koliko je vrh ROC krive bliži gornjem levom uglu grafika (slika 41b). Kvantitativno, navedeni grafički prikaz najčešće se interpretira vrednostima površine ispod ROC krive – AUC (Swets, 1979; Zou i sar., 2007; Sammut i Webb, 2011; Hajian-Tilaki, 2013).

Vrednost AUC - a koristi se u praksi kao parametar od značaja za procenu diskriminatorne moći neke dijagnostičke, odnosno optičke metode. U takvim testiranjima teži se dobijanju informacije o odbacivanju ($AUC \neq 0,5$) ili potvrdi ($AUC = 0,5$) nulte hipoteze da metoda primenom odgovarajućeg algoritma ne razlikuje opservacije dve nominalno različite klase (Hajian-Tilaki, 2013).

Vrednost AUC = 1,0 karakteristična je za situaciju u kojoj i senzitivnost i specifičnost iznose 100% i ukazuje na maksimalnu diskriminatornu moć klasifikatora. Vrednost AUC = 0,5 (senzitivnost 50%; specifičnost 50%) ukazuje da klasifikator nema moć razlikovanja tumorskog od normalnog tkiva (Zou i sar., 2007; Hajian-Tilaki, 2013). Obično se AUC vrednosti kreću između navedenih ekstrema i u različitim opsezima koji definišu kvalitet diskriminatorne moći primenjenih algoritama (tabela 9).

Tabela 9. Diskriminatorsna moć automatizovanih algoritama zasnovana na vrednostima AUC indeksa (Swets, 1979; Šimundić, 2009)

AUC vrednost	diskriminatorsna moć algoritma
0.5 – 0.7	slaba do prihvatljiva
0.7 – 0.8	dobra
0.8 – 0.9	veoma dobra
0.9 – 1.0	odlična

Odnos verovatnoće (OV)

U pogledu evaluacije dijagnostičke opravdanosti primene nekog testa ili metode (OMIS-a) odnos verovatnoće pruža nam informacije o odnosu očekivanog rezultata testa u uzorcima označenim kao tkivo karcinoma prema uzorcima označenim kao normalno tkivo. U praksi se koriste dve varijante ovog parametra - odnos verovatnoće za pozitivan rezultat testa (karcinom, bolest) i odnos verovatnoće za negativan rezultat testa (normalno tkivo, odsustvo bolesti) (Deeks i Altman, 2004; Šimundić, 2009).

Odnos verovatnoće za pozitivan rezultat testa (OV+) nam govori koliko je verovatnije da će OMIS pokazati da uzorak karcinoma pripada klasi karcinoma nego klasi normalnog tkiva. Izračunava se kao odnos stope stvarno pozitivnih (senzitivnost) i stope lažno pozitivnih rezultata (1 - specifičnost) (Šimundić, 2009).

$$OV+ = \text{Senzitivnost} / 1 - \text{Specifičnost}$$

Vrednost OV+ parametra veća od 1 ukazuje da OMIS prepoznaje uzorak kao tkivo karcinoma. Što je ona veća to je primena OMIS-a u datim okolnostima opravdanija.

Odnos verovatnoće za negativan rezultat testa (OV-) pruža informaciju o tome koliko je manje verovatno da OMIS tkivo karcinoma označi kao normalno u odnosu na verovatnoću da normalno tkivo i registruje kao normalno. Izračunava se kao odnos stope lažno negativnih (1 - senzitivnost) i stope stvarno negativnih rezultata (specifičnost) (Šimundić, 2009).

$$OV- = 1 - \text{Senzitivnost} / \text{Specifičnost}$$

Vrednost OV- parametra manja od 1,0 povezana je sa nalazom OMIS-a da uzorak pripada klasi normalnog tkiva. Što je njegova vrednost manja OMIS sa većom sigurnošću isključuje prisustvo karcinoma u uzorku i prepoznaje ga kao normalno tkivo.

Kako bi se neka dijagnostička metoda ili test smatrali prihvatljivijim za kliničku primenu teži se vrednostima većim od 10 za OV+ ($OV+ > 10$), odnosno manjim od 0,1 za OV- parametar ($OV- < 0,1$). Kada je vrednost oba parametra jednaka 1,0 metoda ili test smatraju se neupotrebljivim (Deeks i Altman, 2004). Navedeni parametri nalaze se u uskoj vezi i sa vrednostima verovatnoće da je neki uzorak dijagnostikovao kao karcinom ili normalno tkivo pre i nakon primene OMIS metode. Ova veza ostvaruje se matematičkim operacijama zasnovanim na Bajesovoj teoremi ili grafički, analizom Faganovog nomograma. U oba slučaja dobijeni rezultat nam daje uvid u doprinos OMIS metode donošenju odluke o statusu hirurške margine kod oralnog karcinoma (Fagan, 1975; Sackett i sar., 2000).

Verovatnoća pre testa - VpreT (eng. *pre - test probability* - preTP) predstavlja neku referentnu vrednost u odnosu na koju se meri učinak OMIS metode (Deeks i Altman, 2004). U te svrhe može se koristiti vrednost prevalencije za OPK, klinička procena maksilofacijalnog hirurga, histopatološki status kao "zlatni standard" i dr. U ovom istraživanju upotrebljeni su sledeći parametri:

- histopatološki status kao "zlatni standard" (za merenje učinka svih klasifikacionih razvrstavanja) - npr. ako je u grupi nativnih uzoraka histopatološki potvrđen 31 uzorak karcinoma i 29 uzoraka normalnog tkiva, za vrednost verovatnoće pre testa uzima se udeo karcinoma koji u ovom slučaju iznosi 51,67% (0,5167)
- udeo pacijenata kod kojih je u tri referentne studije histopatološki potvrđeno prisustvo ćelija karcinoma u hirurškoj margini (pozitivna margina - za merenje učinka klasifikacionog razvrstavanja kod nativnih uzoraka) - vrednost verovatnoće pre testa od 20,56% (0,2056; 233/1133) (Loree i Strong, 1990; Zanoni i sar., 2017; Tasche i sar., 2017)

Formula za izračunavanje verovatnoće nakon primene testa - VposleT (eng. *post - test probability* - postTP) glasi (Deeks i Altman, 2004):

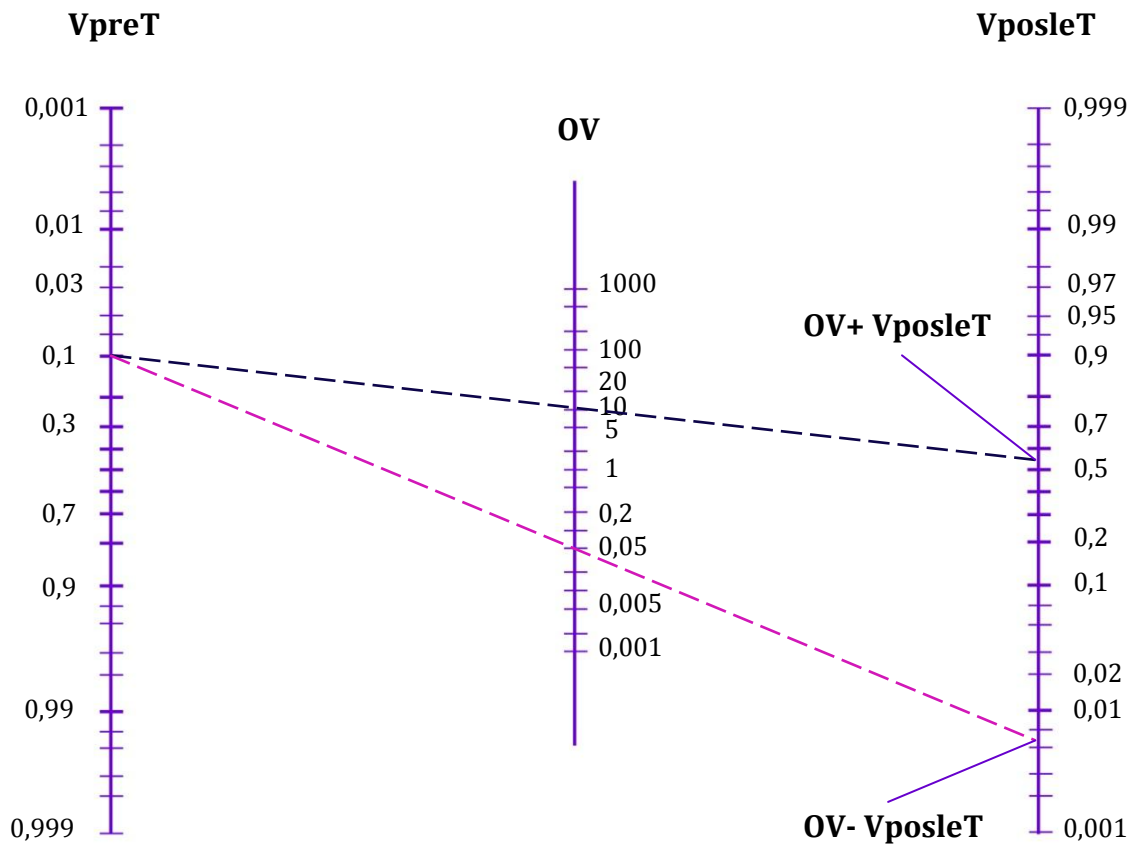
$$VposleT = (VpreT / 1 - VpreT) \times OV (+;-) / 1 + (VpreT / 1 - VpreT) \times OV (+;-)$$
$$VposleT(\%) = VposleT \times 100$$

Kada se želi utvrditi za koji procenat pozitivan rezultat (karcinom) primene OMIS metode povećava verovatnoću da uzorak tkiva pripada klasi karcinoma u formuli se koristi vrednost parametra OV+ (Akobeng, 2007).

Kada se želi utvrditi za koji procenat negativan rezultat (normalno tkivo) primene OMIS metode umanjuje verovatnoću da se u normalnom tkivu hirurških margina nalaze ćelije karcinoma u formuli se koristi vrednost parametra OV- (Akobeng, 2007).

Faganov nomogram sa druge strane predstavlja jednostavno grafičko rešenje za procenu doprinosa nekog dijagnostičkog testa donošenju kliničke odluke. Sa leve strane nomograma nalazi se skala vrednosti verovatnoće pre testa (VpreT), u sredini skala vrednosti odnosa verovatnoće (OV) i sa desne strane skala vrednosti verovatnoće nakon primene testa (VposleT). Kroz tačku sa leve strane (VpreT) i dobijene vrednosti parametra OV povlači se

prava linija koja seče desnu skalu nomograma. Tačke preseka odgovaraju vrednostima verovatnoće nakon primene testa (OMIS metode) (slika 42).



Slika 42. Ilustracija Faganovog nomograma (Fagan, 1975)

Dijagnostički odnos šansi (DOŠ)

Upotreba DOŠ parametra u klasifikacionim razvrstavanjima takođe je svrsishodna kada se želi odrediti diskriminatorsna moć nekog dijagnostičkog testa ili metode poput OMIS-a. Njegova vrednost je poput odnosa verovatnoće usko vezana za vrednosti senzitivnosti i specifičnosti. U skladu sa opštom definicijom, dijagnostički odnos šansi primene OMIS metode predstavlja odnos šanse pozitivnosti testa kod klase uzoraka OPK-a i šanse pozitivnosti testa u klasi uzoraka normalnog tkiva (Glas i sar., 2003; Šimundić, 2009).

$$\text{DOŠ} = (\text{TP} / \text{LN}) / (\text{LP} / \text{TN})$$

Vrednost DOŠ - a takođe se može iskazati odnosima verovatnoće:

$$\text{DOŠ} = \text{OV}+ / \text{OV}-$$

Kako bi se diskriminatorsna moć neke metode i primenjenog algoritma smatrala zadovoljavajućom potrebno je da vrednost DOŠ parametra bude veća od 1,0. Što su vrednosti senzitivnosti i specifičnosti više to je i kvalitet razvrstavanja dve klase bolji. Kada vrednost DOŠ - a iznosi 1,0, test ili metoda su neupotrebljivi, dok vrednost manja od 1,0 ukazuje na povećan broj negativnih rezultata testa u kategoriji tkiva OPK-a (Glas i sar., 2003; Šimundić, 2009).

Zajednička karakteristika većine parametara klasifikacione efikasnosti OMIS metode jeste nezavisnost od prevalencije oralnog karcinoma. Ova osobina rezultate senzitivnosti, specifičnosti, odnosa verovatnoće i dijagnostičkog odnosa šansi čini visoko transferabilnim i primenjivim u okolnostima njene promenjene vrednosti u nekoj drugoj populaciji. Za razliku od navedenih, parametar tačnosti zavisi od prevalencije OPK-a u određenoj populaciji i sa njenim smanjenjem u uslovima nepromenjenih senzitivnosti i specifičnosti, dolazi do njegovog uvećanja. I u pogledu senzitivnosti i specifičnosti, kao i svih parametara direktno povezanih sa ova dva, postoje određena ograničenja. Ona se pre svega ogledaju u definisanju stanja bolesnog - karcinoma u slučaju OMIS-a. Ukoliko se u analizu dodatno uključe različiti stadijumi karcinoma, histopatološka tipizacija ili prisustvo komorbiditeta, tada su ovi parametri podložni promenama (Šimundić, 2009).

3.2.4.3. | Validacija automatizovanih algoritama

Kao najčešći problem koji se može javiti prilikom primene nekog od algoritama zasnovanog na nadgledanom mašinskom učenju ističe se preterano prilagođavanje podataka (Tan i sar., 2006).

U pozadini svakog klasifikacionog modela krije se ideja o prepoznavanju onih karakteristika koje se ponavljaju kod svih ili većine uzoraka koji pripadaju istoj klasi. Na taj način otvara se mogućnost ranije pomenute generalizacije – pravilne klasifikacije novih uzoraka sa čijim obeležjima model prethodno nije imao dodira. Onog trenutka kada neki algoritam uključi i ona obeležja karakteristična samo za pojedinačne uzorke i primeni ih tokom klasifikacije kao attribute od značaja za celu klasu, model se može smatrati preterano prilagođenim. U takvim okolnostima velika je verovatnoća da će prilikom klasifikacije novih uzoraka doći do greške i posledičnog smanjenja tačnosti algoritma. Kako bi se navedene okolnosti preduhitrile i efikasno izbegle, sprovodi se neka od tehnika validacije modela. Na prvom mestu koristi se metod unakrsne validacije (Tan i sar., 2006).

Unakrsna validacija

Kod ove metode celokupna baza podataka deli se u k podskupova (eng. *folds*) iste veličine $-P_1, P_2, \dots, P_k$. Od tog broja (k) bira se jedan u kojem će se nalaziti opservacije koje će poslužiti kao test skup algoritmu koji će se obučavati na preostalim k minus 1 podskupova. Srž evaluacije nalazi se u činjenici da se celokupan proces ponavlja k puta, tako da se svaki formirani podskup jednom koristi i kao test skup. Konačna vrednost klasifikacione moći algoritma dobija se pronalaženjem srednje vrednosti senzitivnosti, specifičnosti, tačnosti i vrednosti AUC za sve primenjene iteracije. Na ovaj način se performanse klasifikatora dovode u stanje u kome se mogu očekivati slični rezultati i na skupovima novih opservacija, izbegavajući pritom preterano prilagođavanje podataka. Najčešće se sprovodi pet ili deset iteracija – $k = 5$ ili $k = 10$. Algoritmi u okviru primene OMIS metode evaluirani su primenom vrednosti $k = 10$ (eng. *10-fold cross validation*) na obučavajućem skupu podataka. U okviru ovog istraživanja takođe je korišćen stratifikovani tip unakrsne validacije (eng. *stratified cross*

validation) u kojem je svaki od deset podskupova formiran tako da sadrži istu ili približnu distribuciju klasa kao i originalna OMIS datoteka (Tan i sar., 2006; Sammut i Webb, 2011; Purushotham i Tripathy, 2011).

Za razvoj algoritama za automatizovanu klasifikaciju uzoraka tkiva u usnoj duplji na osnovu podataka dobijenih OMIS metodom korišćen je softverski paket otvorenog koda (eng. *open source*) za mašinsko učenje i analizu podataka RapidMiner Studio Educational, verzija 9.5.0® (RapidMiner, Boston, MA, SAD).

3.2.4.4. | Izbor optimalnog algoritma za automatizovanu interpretaciju podataka dobijenih primenom OMIS metode

Kako bi se identifikovao algoritam koji na osnovu različitih parametara klasifikacione efikasnosti najviše odgovara tipu podataka i informacija dobijenih primenom OMIS metode, prišlo se njihovom rangiranju i proceni razlika među njima. U te svrhe korišćeni su Fridmanov (eng. *Friedman*) i Nemenji (eng. *Nemenyi*) testovi (Demšar, 2006).

Fridmanov test rangira korišćene algoritme prema parametrima klasifikacione efikasnosti koji obuhvataju tačnost, vrednost AUC, odnos verovatnoće za pozitivan rezultat testa (OV+), odnos verovatnoće za negativan rezultat testa (OV-) i vrednost dijagnostičkog odnosa šansi (DOŠ). Rangiranje se sprovodi za svako od 10 klasifikacionih razvrstavanja za svaki od navedenih parametara. Tako se npr. za vrednost tačnosti, 6 algoritama rangira za svako od 10 poređenja. Klasifikatoru sa najboljom tačnosti za dato razvrstavanje dodeljuje se 6 bodova, sledećem u nizu 5, itd. Po završetku rangiranja ukupno dobijeni rezultat za svaki od algoritama, a po pitanju tačnosti deli se brojem 10 (broj razvrstavanja tj. poređenja u ovom istraživanju) i dobija prosečna vrednost ranga.

U sledećem koraku Fridmanov test poredi dobijene prosečne vrednosti ranga i utvrđuje da li po pitanju svakog od navedenih parametara klasifikacione efikasnosti postoje statistički značajne razlike među algoritmima sa intervalom poverenja od 95% (95% CI; $p < 0,05$). Analizama Fridmanovog testa potencijalno se dobija informacija da među klasifikatorima postoji razlika u interpretaciji rezultata dobijenih OMIS metodom. Međutim, na ovaj način nije moguće definisati između kojih algoritama i u kom broju slučajeva (u ovom istraživanju taj broj iznosi 36 po parametru) postoje statistički značajne razlike. Iz navedenih razloga, ova markiranja zahtevaju dodatnu analizu. U te svrhe sprovodi se Nemenji test (Demšar, 2006).

Ovim testom se statistički značajnom razlikom ($p < 0,05$) u vrednosti prosečnog ranga dva algoritma smatra ona koja je jednaka najmanje kritičnoj razlici (eng. *critical difference - CD*), a koja se izračunava formulom (Demšar, 2006):

$$CD = q_{\alpha} \sqrt{K \frac{(K+1)}{6N}}$$

u kojoj q_{α} predstavlja kritičnu vrednost Nemenji testa za $\alpha = 0,05$ i koja za broj algoritama K u ovom istraživanju ($K=6$) iznosi 2,850; N označava broj merenja, tj. razvrstavanja ($N=10$). Kritična razlika u prosečnom rangju algoritama za sve analizirane parametre i prema navedenoj formuli u ovoj studiji iznosi 2,4036.

Za sprovođenje navedenih testova i analiza korišćen je statistički softver XLSTAT, verzija 2019.4.1® (Addinsoft, New York, NY, USA).

3.2.4.5. | Testiranje nulte hipoteze

U okviru ovog istraživanja nulta hipoteza testirana je u odnosu na vrednosti 4 parametra klasifikacione efikasnosti primene OMIS metode na tkivima u usnoj duplji (tabela 10).

Tabela 10. Testiranje nulte hipoteze

parametar klasifikacione efikasnosti	prihvatanje nulte hipoteze	odbacivanje nulte hipoteze
vrednost AUC	= 0,5	> 0,5
odnos verovatnoće OV+	= 1,0	> 1,0
odnos verovatnoće OV-	= 1,0	< 1,0 i > 0,0
dijagnostički odnos šansi - DOS	= 1,0	> 1,0

Na ovaj način nulta hipoteza testirana je za 6 klasifikacionih algoritama u 10 različitih okolnosti u kojima se primenom OMIS metode teži razlikovanju tkiva oralnog karcinoma od normalnog tkiva u hirurškim marginama. Ukupan broj testiranih vrednosti iznosi 240.

4. REZULTATI

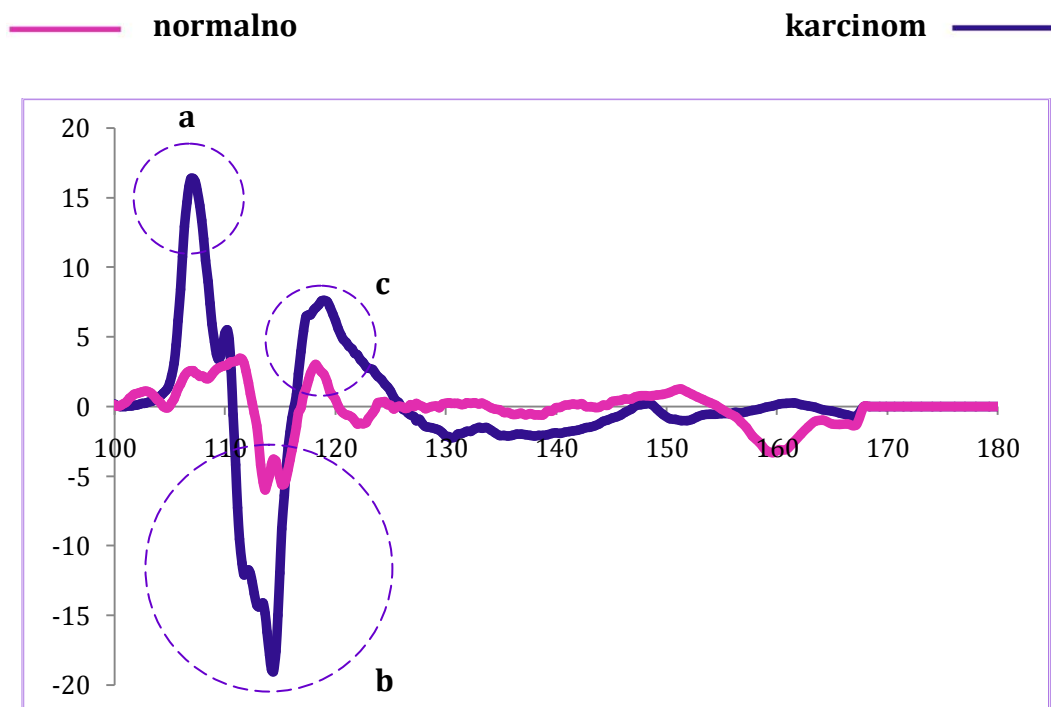
4.1. | Rezultati kvalitativne analize primene optomagnetne imidžing spektroskopije u razlikovanju karcinomom izmenjenog tkiva i normalnog tkiva u hirurškim marginama - optomagnetni spektri

Optomagnetni spektri dobijeni primenom OMIS metode, kao što je ranije navedeno, predstavljaju odnos intenziteta spektralnih pikova izraženog u normalizovanim arbitrarnim jedinicama (n.a.j.) uvećanih 1000 puta (y osa) i razlike talasnih dužina na kojima se isti javljaju izražene u nanometrima (x osa). U okviru ovog istraživanja korišćene su srednje vrednosti spektralnog intenziteta karakterističnog za određenu klasu uzoraka tkiva, a u opsegu razlika talasnih dužina od 100 do 300 nm (256 talasnih dužina od interesa). Kvalitativna analiza optomagnetnog spektra podrazumeva sledeće opisne parametre:

- region opsega razlike talasnih dužina na kojima se karakteristični pikovi javljaju i
- vrednost intenziteta karakterističnih spektralnih pikova (pozitivna/negativna; viša/niša).

4.1.1. | Optomagnetni spektri nativnih uzoraka tkiva OPK-a i normalnog tkiva u hirurškim marginama

U okviru evaluacije spektra dobijenog primenom OMIS metode na nebojenim, tj. nativnim uzorcima tkiva OPK-a ($n = 31$) i normalnog tkiva u hirurškim marginama ($n = 29$) sprovedena su kvalitativna poređenja njegovih srednjih vrednosti. Na slici 43 prikazana je spektralna distribucija karakteristična za tkivo karcinoma i normalno tkivo u hirurškim marginama.

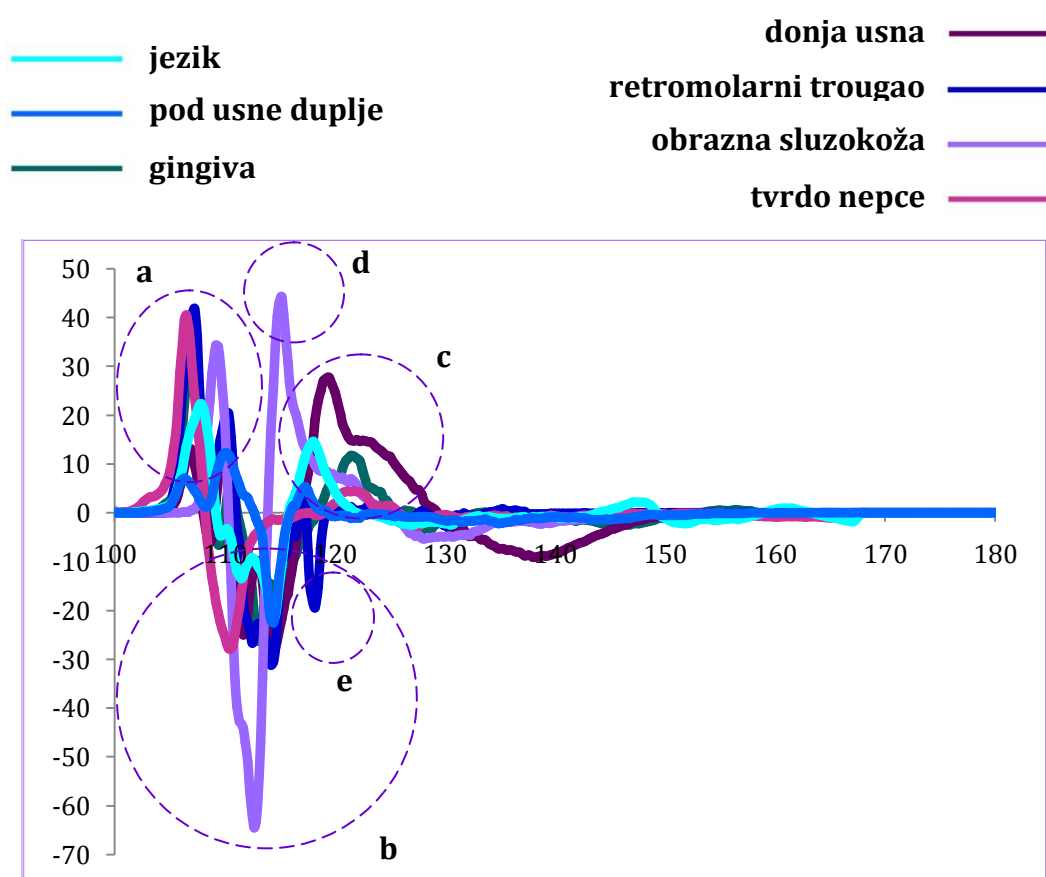


Slika 43. Optomagnetni spektri nativnog tkiva OPK-a i normalnog tkiva u hirurškim marginama

Posmatranjem dve spektralne distribucije može se uočiti pojava karakterističnih pikova za obe klase uzoraka u regionu razlika talasnih dužina od 110 do 125 nm (slika 43b,c), dok je za klasu uzoraka koji pripadaju tkivu OPK-a ona izražena i u regionu od 100 do 110 nm (slika 43a). Kada su u pitanju intenziteti spektralnih pikova tkiva OPK-a, oni pokazuju više vrednosti u odnosu na pikove normalnog tkiva. Prvi se nalaze u opsezima od +5 do +17 n.a.j. (pikovi pozitivnih vrednosti) i do -20 n.a.j. (pikovi negativnih vrednosti), dok se pikovi normalnog tkiva nalaze u opsegu od +3 do -6 n.a.j.

Za 31 uzorak tkiva oralnog karcinoma sprovedena su još dva poređenja dobijenog optomagnetonog spektra:

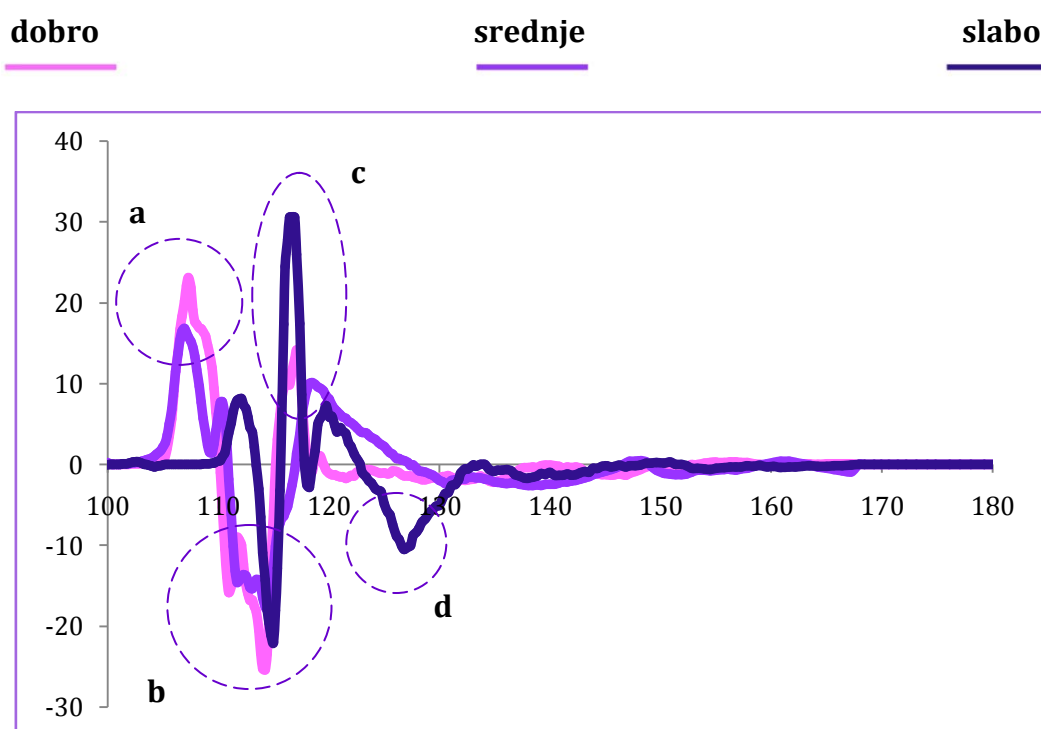
- spektralna distribucija u odnosu na primarnu lokalizaciju OPK-a (slika 44).
- spektralna distribucija u odnosu na histopatološki stadijum OPK-a (slika 45).



Slika 44. Optomagnetonni spektri nativnog tkiva OPK-a. Distribucija spektra u odnosu na primarnu lokalizaciju karcinoma

U optomagnetonom spektru uzoraka oralnog karcinoma vide se, nezavisno od lokalizacije, tri interesna regiona pojačane spektralne aktivnosti (slika 44a,b,c). Prvi pikovi karakteristični za karcinome svih anatomskih regiona u usnoj duplji javljaju se u opsegu od 105 do 110 nm razlike talasnih dužina (slika 44a), drugi u opsegu 110 do 120 nm (slika 44b) i treći u opsegu od 120 do 130 nm (slika 44c). Pikovi u prvom i trećem opsegu nalaze se u području pozitivnog, dok se oni u drugom nalaze u području negativnog intenziteta. Prisutno je i nekoliko odstupanja od navedenog trenda. Treći karakterističan pik uzoraka OPK-a

obrazne sluzokože nalazi se u regionu od 115 do 120 nm (slika 44d) dok se isti kod uzoraka OPK-a retromolarnog trougla nalazi u području negativnog intenziteta (slika 44e). U odnosu na parametar vrednosti intenziteta, one se generalno kreću od +10 do +40 za prvi, od -10 do -65 za drugi i, izuzimajući klasu uzoraka tkiva retromolarnog trougla, od +5 do +45 n.a.j. za treći karakteristični pik. Najviše intenzitete prvog pika pokazuju uzorci OPK-a nepca, retromolarnog trougla i obrazne sluzokože (+20 do +40 n.a.j.), a one su nešto niže kod uzoraka ostalih klasa (+10 do +25 n.a.j.). Drugi i treći pik pokazuju najviše vrednosti (-65 i +45 n.a.j.) u slučaju karcinoma obrazne sluzokože. Takođe se može izdvojiti i intenzitet trećeg pika kod uzoraka OPK-a donje usne. Specifičnog je oblika i vrednosti koja se nalazi izolovana u opsegu intenziteta od +15 do +35 n.a.j (+30 n.a.j.) (slika 44c).



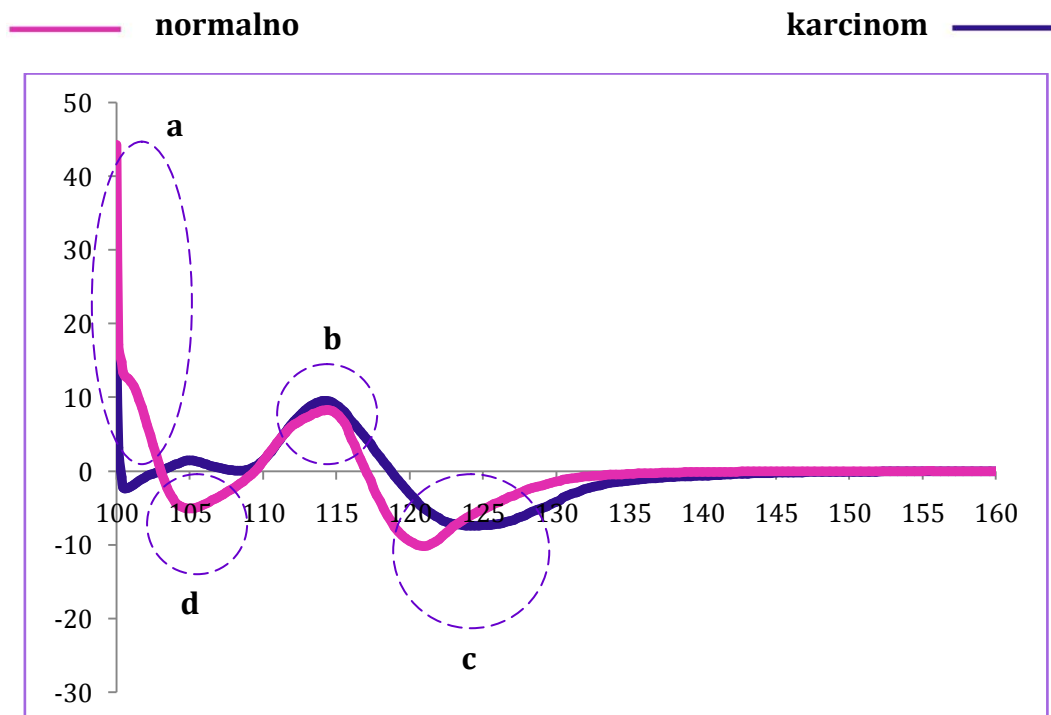
Slika 45. Optomagnetični spektri nativnog tkiva OPK-a. Distribucija spektra u odnosu na stepen diferencijancije oralnog karcinoma

U odnosu na histopatološki stadijum OPK-a, primetan je prvi pik u području pozitivnog intenziteta za dobro i srednje diferentovane karcinome za opseg razlike talasnih dužina od 100 do 110 nm (slika 45a). Niža spektralna aktivnost registruje se za slabo diferentovane karcinome na oko 112 nm razlike talasnih dužina. Drugi karakterističan pik javlja se u regionu od 110 do 115 nm i u području negativnog intenziteta za sve tri klase uzoraka (slika 45b), dok se treći u sva tri slučaja javlja u području pozitivnog intenziteta i opsegu od 115 do 120 nm (slika 45c). Posebno se izdvaja i četvrti pik klase slabo diferentovanog OPK-a na oko 125 nm razlike talasnih dužina i u području negativnog intenziteta (intenzitet -10 n.a.j.) (slika 45d). Kada je reč o vrednostima intenziteta, najvišu poseduje treći spektralni pik slabo diferentovanih karcinoma (+30 n.a.j.) dok se ostali nalaze u sledećim rasponima - prvi od +8 do +25, drugi od -15 do -30 i treći od +10 do +30 n.a.j. Spektar dobro i srednje diferentovanih uzoraka OPK-a pokazuje sličnu distribuciju.

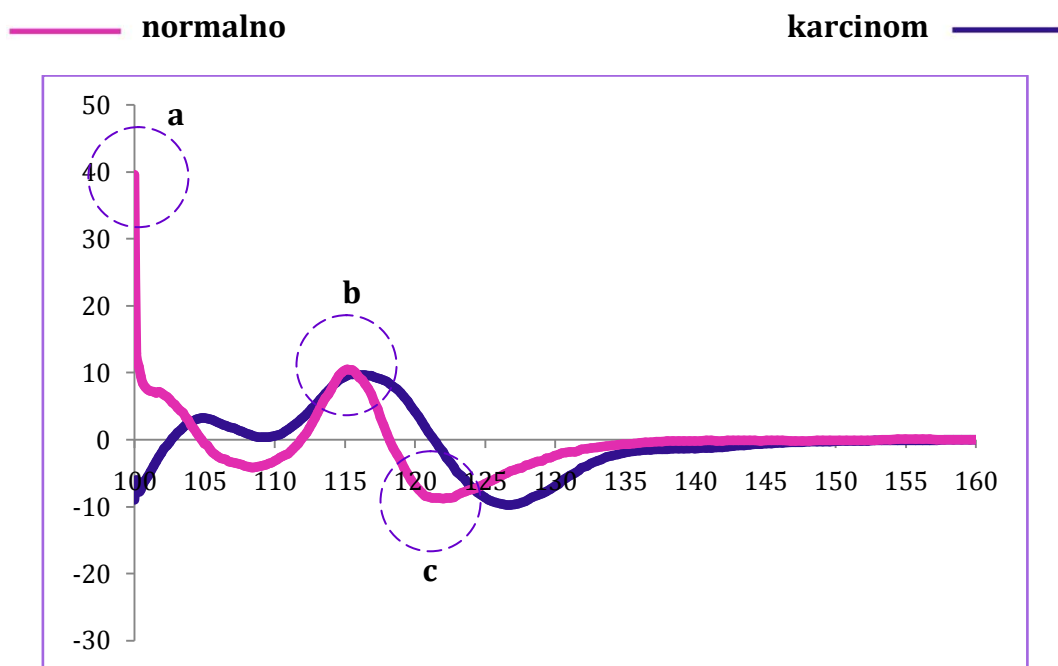
4.1.2. | Optomagnetni spektri bojnih uzoraka tkiva OPK-a i normalnog tkiva u hirurškim marginama

Optomagnetni spektri dobijeni primenom OMIS metode na bojnim uzorcima tkiva OPK-a i različitim tipovima normalnog tkiva u hirurškim marginama analizirani su kroz sledeća poređenja:

- spektralnu distribuciju svih uzoraka OPK-a (n=514) i različitih tipova normalnog tkiva (n=343) (slika 46)
- spektralnu distribuciju kategorije 1 uzoraka OPK-a (n=114), kategorije 5 uzoraka OPK-a (prelazno tkivo; n= 133) i različitih tipova normalnog tkiva (n=343) (slika 47)
- spektralnu distribuciju uzoraka OPK-a u odnosu na njihov histopatološki status (slika 48)
- spektralnu distribuciju kategorije 1 uzoraka OPK-a (n=114) i klase uzoraka normalnog epitelnog i vezivnog tkiva (n=45) (slika 49)
- spektralnu distribuciju kategorije 1 uzoraka OPK-a (n=114) i klase uzoraka normalnog mišićnog tkiva (n=160) (slika 50)
- spektralnu distribuciju kategorije 1 uzoraka OPK-a (n=114) i klase uzoraka normalnog masnog tkiva (n=40) (slika 51)
- spektralnu distribuciju kategorije 1 uzoraka OPK-a (n=114) i klase uzoraka normalnog koštanog tkiva (n=74) (slika 52)
- spektralnu distribuciju kategorije 4 uzoraka OPK-a (infiltrisana kost; n=90) i klase uzoraka normalnog koštanog tkiva (n=74) (slika 53)
- spektralnu distribuciju kategorije 1 uzoraka OPK-a (n=114) i klase uzoraka normalnog tkiva pljuvačnih žlezda (n=24) (slika 54)

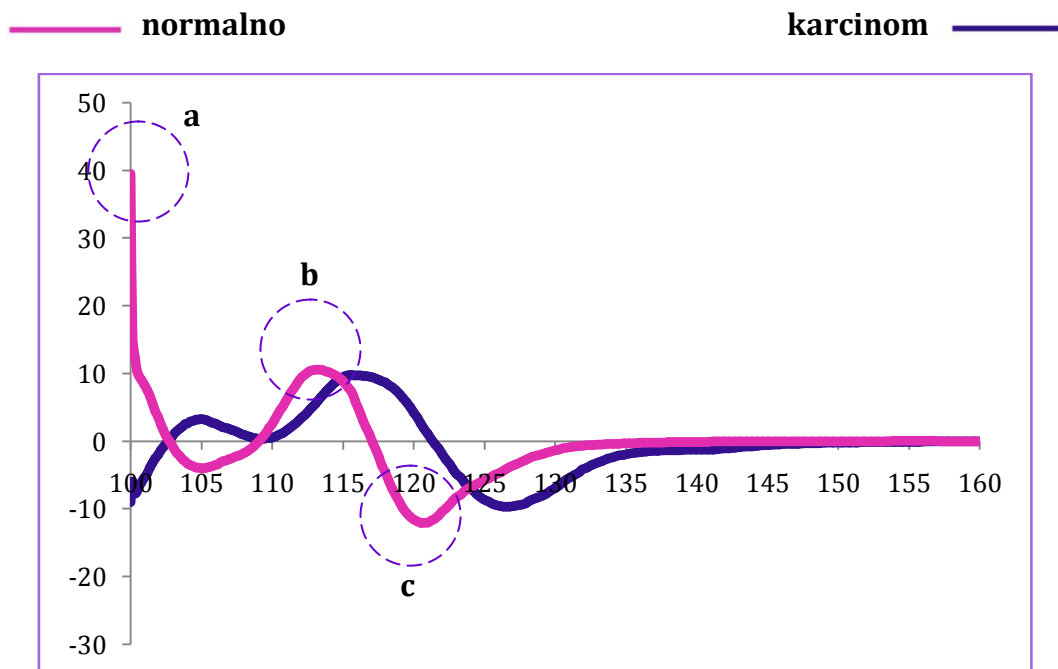


Slika 46. Optomagnetni spektri svih bojnih uzoraka tkiva OPK-a i različitih tipova normalnog tkiva



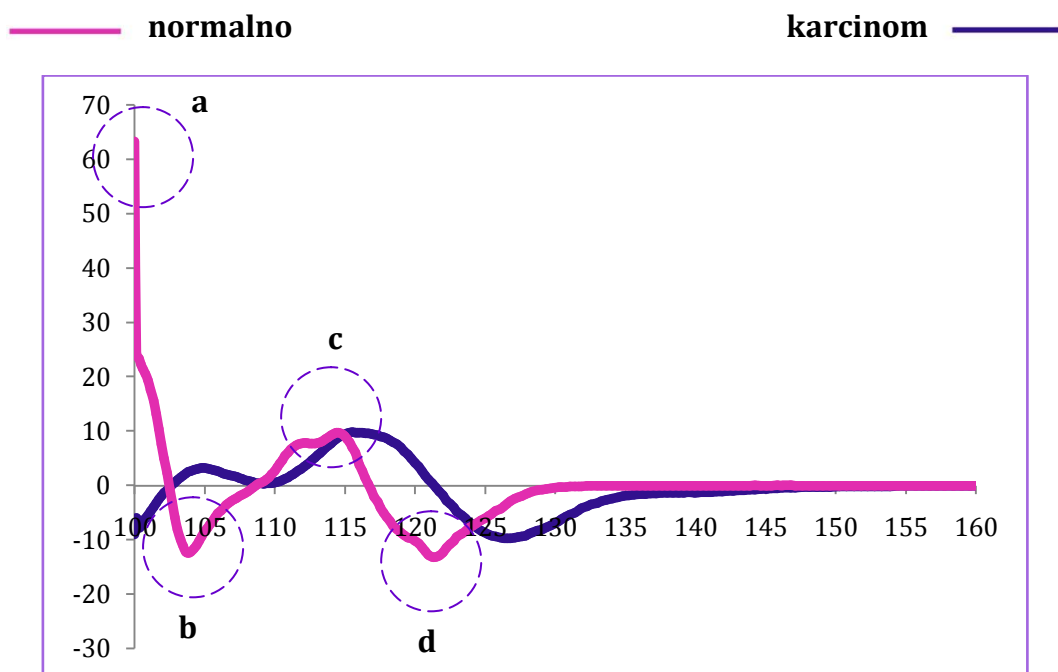
Slika 49. Spektralna distribucija klase normalnog epitelnog i vezivnog tkiva i klase oralnog karcinoma (kategorija 1)

Karakteristični pikovi klase uzoraka epitelnog i vezivnog tkiva javljaju se na sledećim pozicijama: prvi na 100 nm (+40 n.a.j.) (slika 49a), drugi na 115 nm (+10 n.a.j.) (slika 49b) i treći na 121 nm (-9 n.a.j.) (slika 49c).



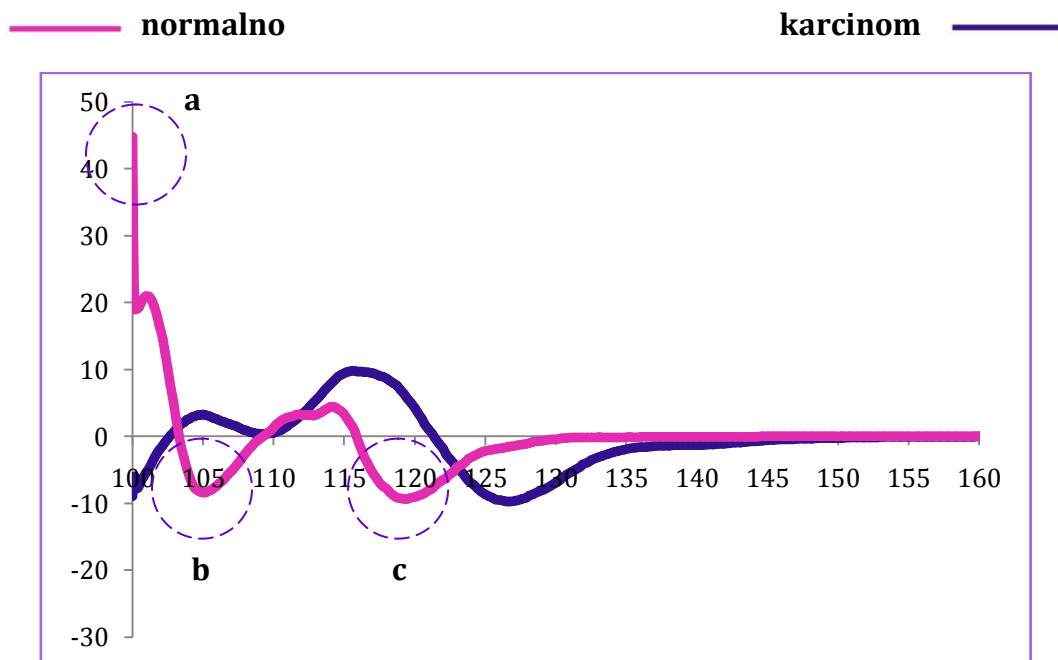
Slika 50. Spektralna distribucija klase normalnog mišićnog tkiva i klase oralnog karcinoma (kategorija 1)

Karakteristični pikovi klase uzoraka mišićnog tkiva javljaju se na sledećim pozicijama: prvi na 100 nm (+40 n.a.j.) (slika 50a), drugi na 113 nm (+10 n.a.j.) (slika 50b) i treći na 121 nm (-12 n.a.j.) (slika 50c).



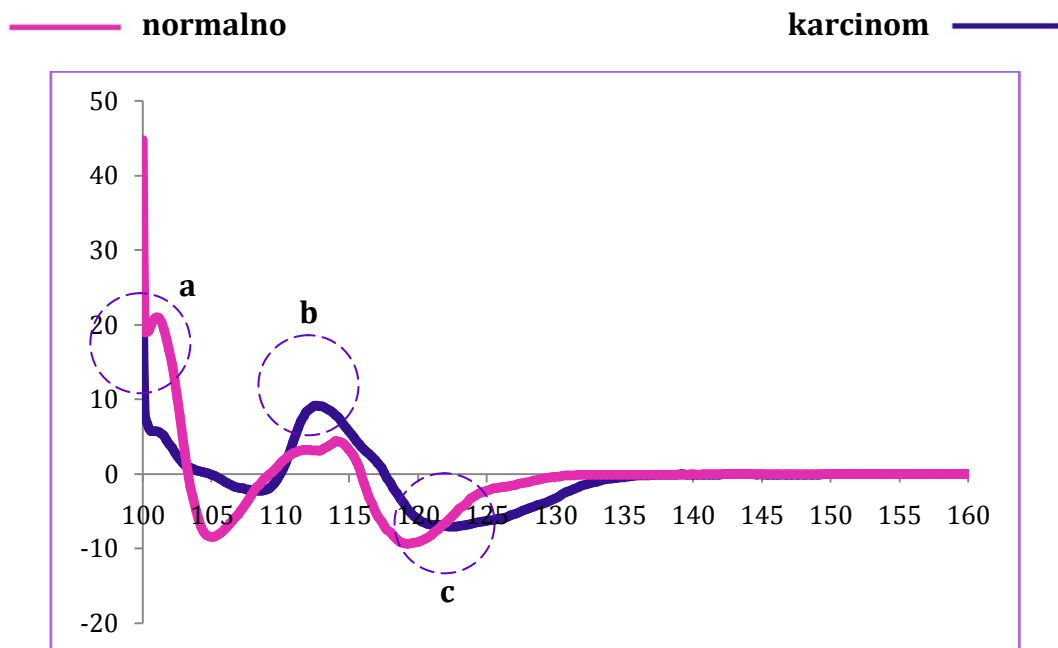
Slika 51. Spektralna distribucija klase normalnog masnog tkiva i klase oralnog karcinoma (kategorija 1)

Karakteristični pikovi klase uzoraka masnog tkiva javljaju se na sledećim pozicijama: prvi na 100 nm (+63 n.a.j.) (Slika 51a), drugi na 104 nm (-12 n.a.j.) (slika 51b), treći na 115 nm (+10 n.a.j.) (slika 51c) i četvrti na 121 nm (-12 n.a.j.) (slika 51d).



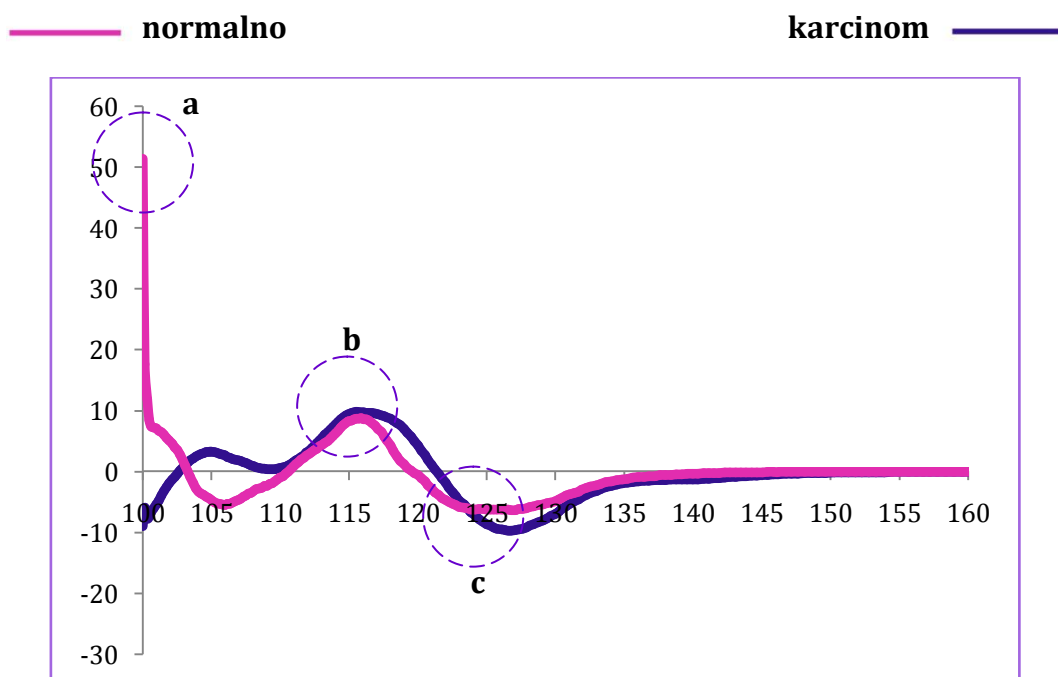
Slika 52. Spektralna distribucija klase normalnog koštanog tkiva i klase oralnog karcinoma (kategorija 1)

Karakteristični pikovi klase uzoraka koštanog tkiva javljaju se na sledećim pozicijama: prvi na 100 nm (+45 n.a.j.) (Slika 52a), drugi na 105 nm (-10 n.a.j.) (slika 52b) i treći na 120 nm (-10 n.a.j.) (slika 52c).



Slika 53. Spektralna distribucija klase normalnog koštanog tkiva i klase karcinomom infiltrisanog koštanog tkiva (kategorija 4)

Karakteristični pikovi klase uzoraka karcinomom infiltrisanog koštanog tkiva javljaju se na sledećim pozicijama: prvi na 100 nm (+23 n.a.j.) (slika 53a), drugi na 113 nm (+10 n.a.j.) (slika 53b) i treći na 122 nm (-8 n.a.j.) (slika 53c).



Slika 54. Spektralna distribucija klase normalnog tkiva pljuvačne žlezde i klase oralnog karcinoma (kategorija 1)

Karakteristični pikovi klase uzoraka tkiva pljuvačne žlezde javljaju se na sledećim pozicijama: prvi na 100 nm (+52 n.a.j.) (slika 54a), drugi na 115 nm (+9 n.a.j.) (slika 54b) i treći na 125 nm (-6 n.a.j.) (slika 54c).

4.2. | Rezultati kvantitativne analize primene optomagnetne imidžing spektroskopije u razlikovanju karcinomom izmenjenog tkiva i normalnog tkiva u hirurškim marginama

4.2.1. | Razvoj algoritama za automatizovano klasifikovanje nativnih uzoraka tkiva OPK-a i normalnog tkiva u hirurškim marginama

U okviru analize obuhvaćeno je ukupno 60 uzoraka tkiva (karcinom - 31, normalno - 29) čija je karakterizacija definisana podacima prikupljenim OMIS metodom. Sa inicijalnih 256 atributa, odgovornih za određivanje pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa, PCA tehnikom za smanjenje dimenzionalnosti došlo se do konačnih 11 PCA obeležja. Novoformirani skup podataka podeljen je na obučavajući (karcinom - 22, normalno - 20) i test (karcinom - 9 (50%), normalno - 9 (50%)) skup.

Na test skup podataka primenjeni su algoritmi za mašinsko učenje kreirani na obučavajućem skupu podataka i dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 11.1. U tabeli 11.2 prikazane su vrednosti parametara dijagnostičkog značaja primene OMIS metode.

Tabela 11.1. Parametri primene OMIS metode na nativnim uzorcima tkiva

parametar	algoritam					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
tačnost	88,89%	72,22%	83,33%	83,33%	66,67%	72,22%
senzitivnost	88,89%	66,67%	88,89%	77,78%	77,78%	88,89%
specifičnost	88,89%	77,78%	77,78%	88,89%	55,56%	55,56%
vrednost AUC	0,988	0,691	0,840	0,901	0,605	0,765
TP*	8	6	8	7	7	8
LP**	1	2	2	1	4	4
TN***	8	7	7	8	5	5
LN****	1	3	1	2	2	1

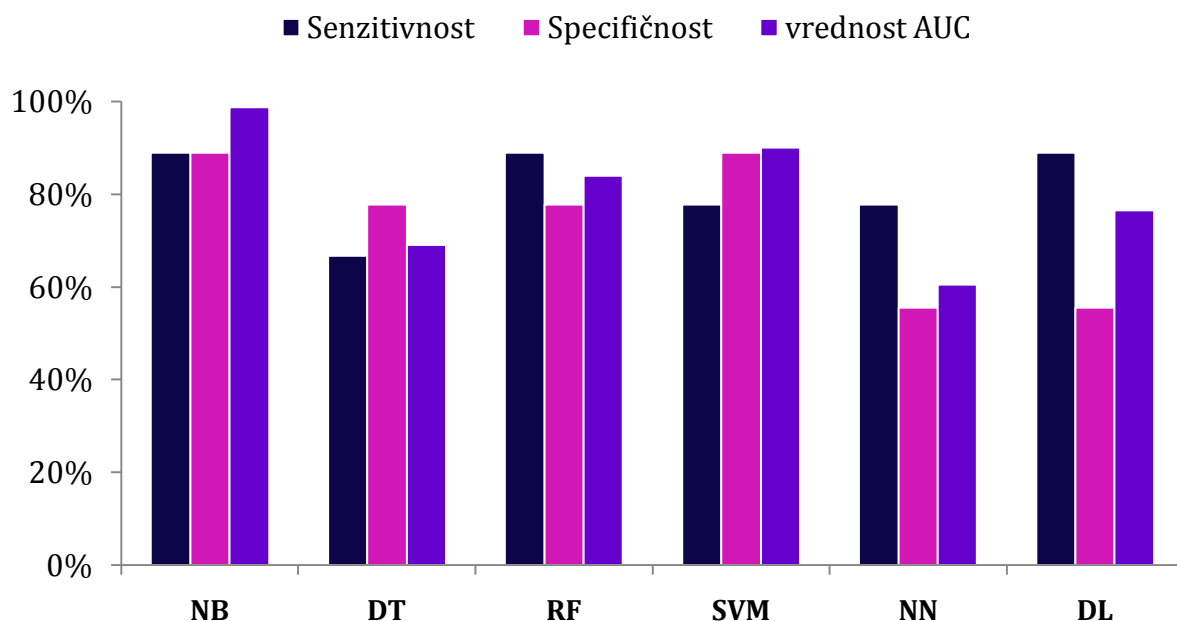
*TP - tačno pozitivni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao OPK

**LP - lažno pozitivni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao OPK

***TN - tačno negativni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao normalno

****LN - lažno negativni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao normalno

Na slici 55 prikazano je poređenje parametara klasifikacione efikasnosti (senzitivnost, specifičnost, vrednost AUC indeksa) primenjenih algoritama.



Slika 55. Klasifikaciona efikasnost automatizovanih algoritama primenjenih na OMIS nalaze kod nativnih uzoraka (4.2.1.)

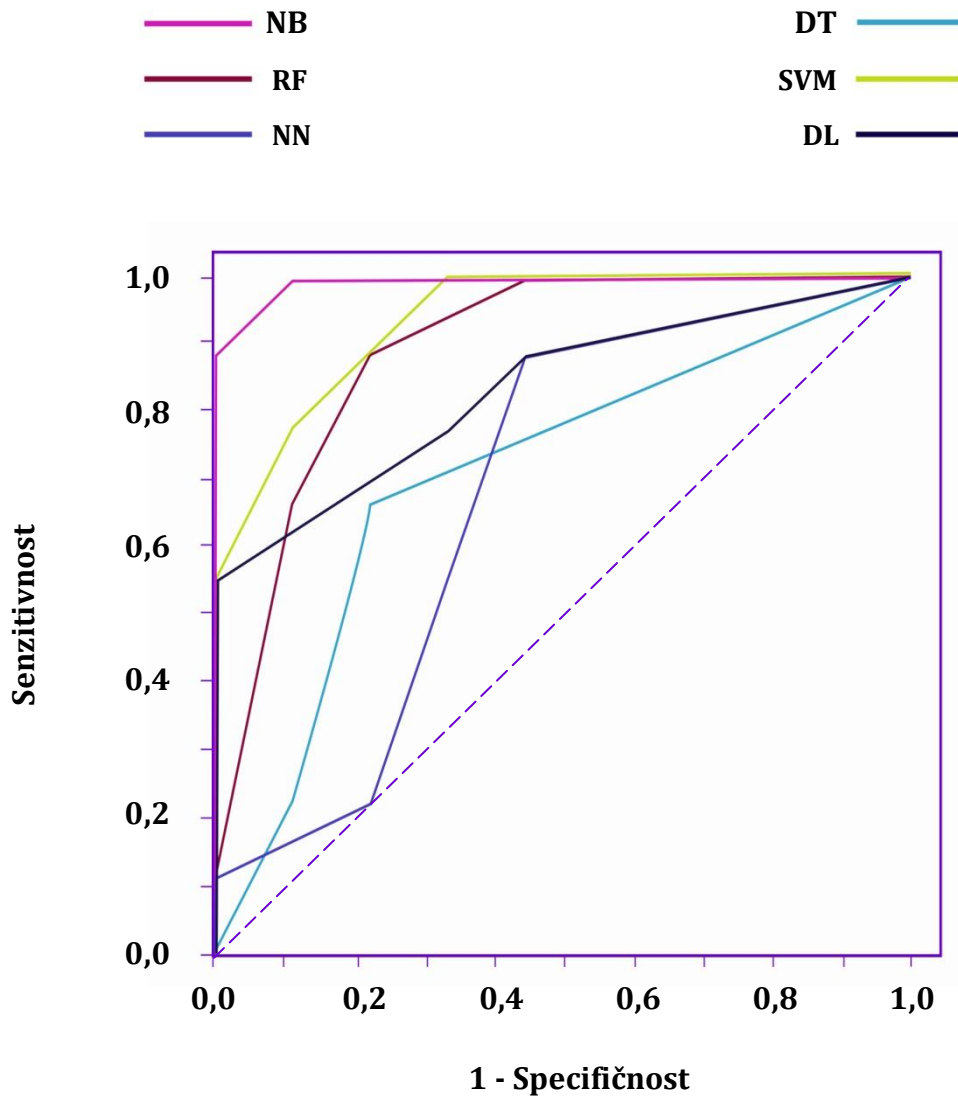
Tabela 11.2. Dijagnostički značaj primene OMIS metode na nativnim uzorcima tkiva

parametri	algoritmi					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
OV+	8,00	3,00	4,00	7,00	1,75	2,00
OV-	0,12	0,42	0,14	0,25	0,40	0,25
DOŠ	66,66	7,14	28,57	28,00	4,75	8,00



algoritam	verovatnoća pre testa (primene OMIS-a) - VpreT			
	50,00%	20,56%	50,00%	20,56%
	VposleT (za OV+)		VposleT (za OV-)	
NB	88,88%	67,43%	10,71%	3,01%
DT	75,00%	43,70%	29,57%	9,80%
RF	80,00%	49,21%	12,28%	3,49%
SVM	87,50%	64,43%	20,00%	6,07%
NN	63,63%	31,17%	28,57%	9,38%
DL	66,66%	34,10%	20,00%	6,07%

Na slici 56 prikazano je poređenje ROC kriva za sve algoritme primenjene na dati skup podataka.



Slika 56. Poređenje ROC kriva za native uzorke tkiva (4.2.1.)

4.2.2. | Razvoj algoritama za automatizovano klasifikovanje bojnih uzoraka tkiva OPK-a i normalnog tkiva u hirurškim marginama

4.2.2.1. | Klasifikacija uzoraka tkiva OPK-a (kategorije 1,2,3,4 i 5) i svih preparata različitih tipova normalnog tkiva

U okviru analize obuhvaćeno je ukupno 857 uzoraka tkiva (karcinom - 514, normalno - 343) čija je karakterizacija definisana podacima prikupljenim OMIS metodom. Sa inicijalnih 256 atributa, odgovornih za određivanje pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa, PCA tehnikom za smanjenje dimenzionalnosti došlo se do konačnih 10 PCA obeležja. Novoformirani skup podataka podeljen je na obučavajući (karcinom - 360, normalno - 240) i test (karcinom - 154 (59,92%), normalno - 103 (40,08%)) skup.

Na test skup podataka primenjeni su algoritmi za mašinsko učenje kreirani na obučavajućem skupu podataka i dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 12.1. U tabeli 12.2 prikazane su vrednosti parametara dijagnostičkog značaja primene OMIS metode.

Tabela 12.1. Parametri primene OMIS metode na bojnim uzorcima tkiva (4.2.2.1.)

parametar	algoritam					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
tačnost	66,54%	71,21%	74,71%	70,43%	73,54%	72,37%
senzitivnost	82,47%	80,52%	81,17%	82,47%	80,52%	66,23%
specifičnost	42,72%	57,28%	65,05%	52,43%	63,11%	81,55%
vrednost AUC	0,728	0,686	0,808	0,785	0,793	0,796
TP*	127	124	125	127	124	102
LP**	59	44	36	49	38	19
TN***	44	59	67	54	65	84
LN****	27	30	29	27	30	52

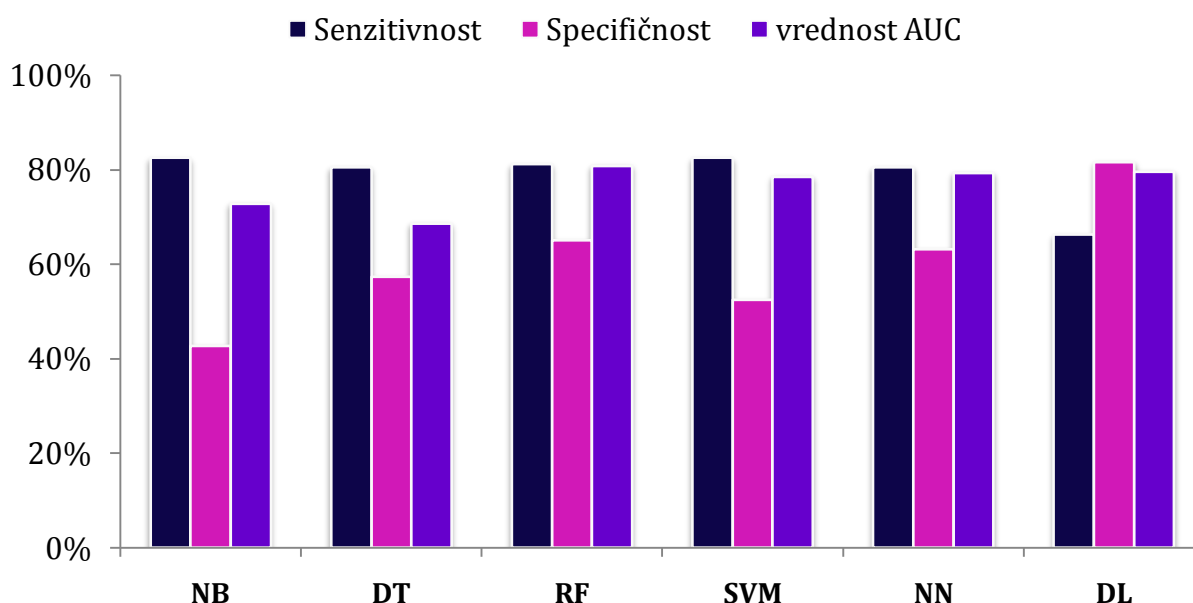
*TP - tačno pozitivni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao OPK

**LP - lažno pozitivni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao OPK

***TN - tačno negativni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao normalno

****LN - lažno negativni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao normalno

Na sliki 57 prikazano je poređenje parametara klasifikacione efikasnosti (senzitivnost, specifičnost, vrednost AUC indeksa) primenjenih algoritama.



Slika 57. Klasifikaciona efikasnost automatizovanih algoritama primenjenih na podatke OMIS-a kod bojenih uzoraka (4.2.2.1.)

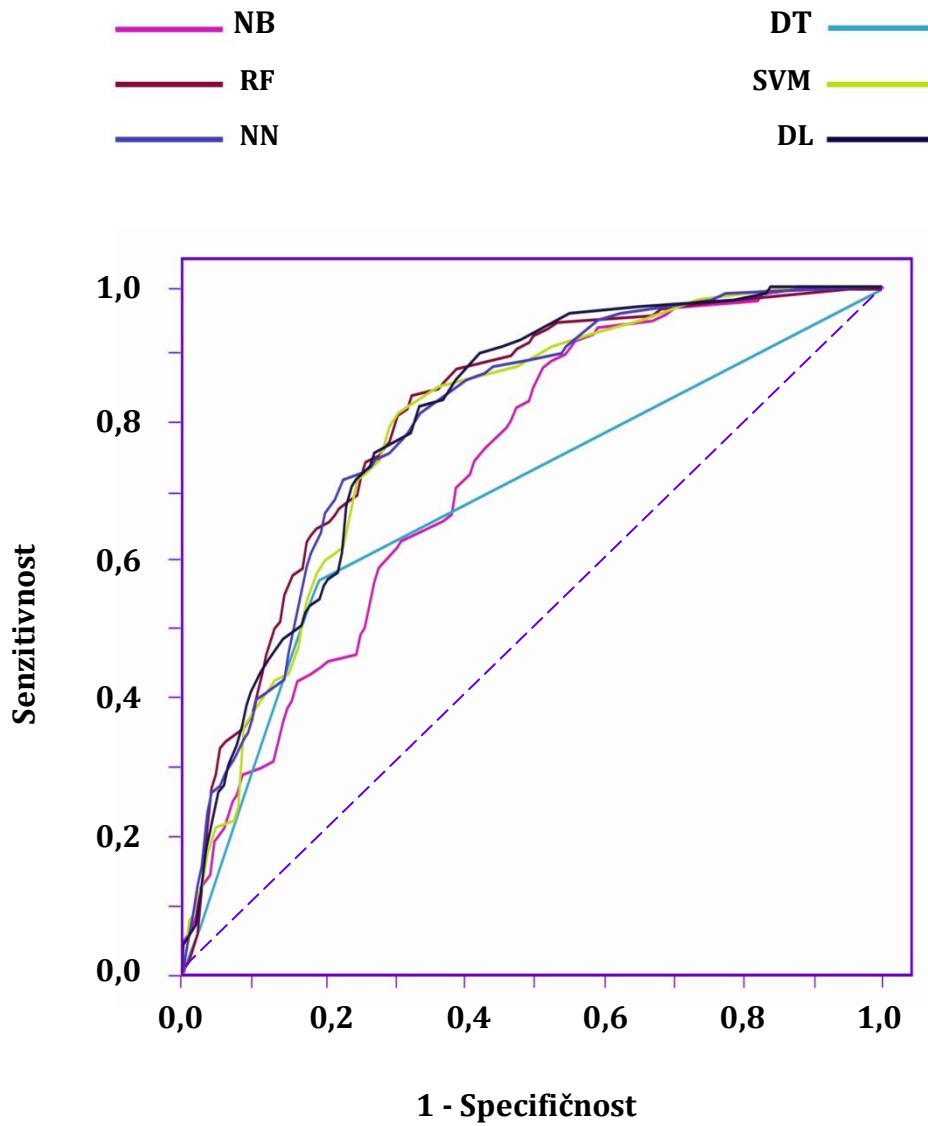
Tabela 12.2. Dijagnostička efikasnost primene OMIS metode (4.2.2.1.)

parametri	algoritmi					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
OV+	1,44	1,88	2,32	1,73	2,18	3,59
OV-	0,41	0,34	0,29	0,33	0,31	0,41
DOŠ	3,51	5,53	8,00	5,24	7,03	8,75



algoritam	verovatnoća pre testa (primene OMIS-a) - VpreT			
	VposleT (za OV+)		VposleT (za OV-)	
	59,92%	20,56%	59,92%	20,56%
NB	68,28%	27,15%	38,00%	9,60%
DT	73,75%	32,72%	33,70%	8,08%
RF	77,62%	37,51%	30,24%	6,98%
SVM	72,11%	30,92%	33,03%	7,86%
NN	76,52%	36,06%	31,66%	7,42%
DL	84,29%	48,16%	38,00%	9,60%

Na slici 58 prikazano je poređenje ROC kriva za sve algoritme primenjene na dati skup podataka.



Slika 58. Poređenje ROC kriva za bojene uzorke tkiva (4.2.2.1.)

4.2.2.2. | Klasifikacija uzoraka tkiva OPK-a. Razvrstavanja preparata kategorije 1 (OPK) i kategorije 5 (OPK i normalno - prelazno)

U okviru analize obuhvaćeno je ukupno 247 uzoraka tkiva (OPK - 114, prelazno - 133) čija je karakterizacija definisana podacima prikupljenim OMIS metodom. Sa inicijalnih 256 atributa, odgovornih za određivanje pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa, PCA tehnikom za smanjenje dimenzionalnosti došlo se do konačnih 9 PCA obeležja. Novoformirani skup podataka podeljen je na obučavajući (OPK - 80, prelazno - 93) i test (OPK- 34(45,94%), prelazno - 40 (54,06%)) skup.

Na test skup podataka primenjeni su algoritmi za mašinsko učenje kreirani na obučavajućem skupu podataka i dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 13.1. U tabeli 13.2 prikazane su vrednosti parametara dijagnostičkog značaja primene OMIS metode.

Tabela 13.1. Parametri primene OMIS metode na bojenim uzorcima tkiva (4.2.2.2.)

parametar	algoritam					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
tačnost	71,62%	68,92%	78,38%	82,43%	77,03%	77,03%
senzitivnost	61,76%	73,53%	79,14%	82,35%	79,41%	82,35%
specifičnost	80,00%	65,00%	77,50%	82,50%	75,00%	72,50%
vrednost AUC	0,793	0,671	0,859	0,870	0,842	0,809
TP*	21	25	27	28	27	28
LP**	8	14	9	7	10	11
TN***	32	26	31	33	30	29
LN****	13	9	7	6	7	6

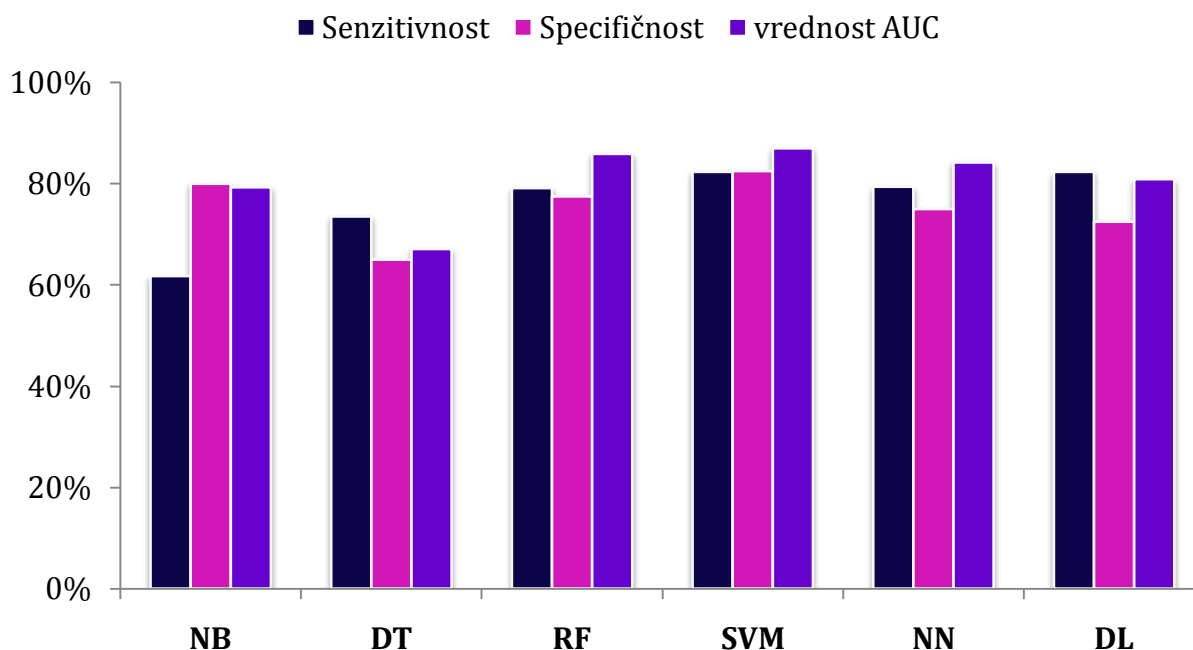
*TP - tačno pozitivni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao OPK

**LP - lažno pozitivni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao OPK

***TN - tačno negativni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao normalno

****LN - lažno negativni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao normalno

Na sliki 59 prikazano je poređenje parametara klasifikacione efikasnosti (senzitivnost, specifičnost, vrednost AUC indeksa) primenjenih algoritama.



Slika 59. Klasifikaciona efikasnost automatizovanih algoritama primenjenih na podatke OMIS-a kod bojnih uzoraka (4.2.2.2.)

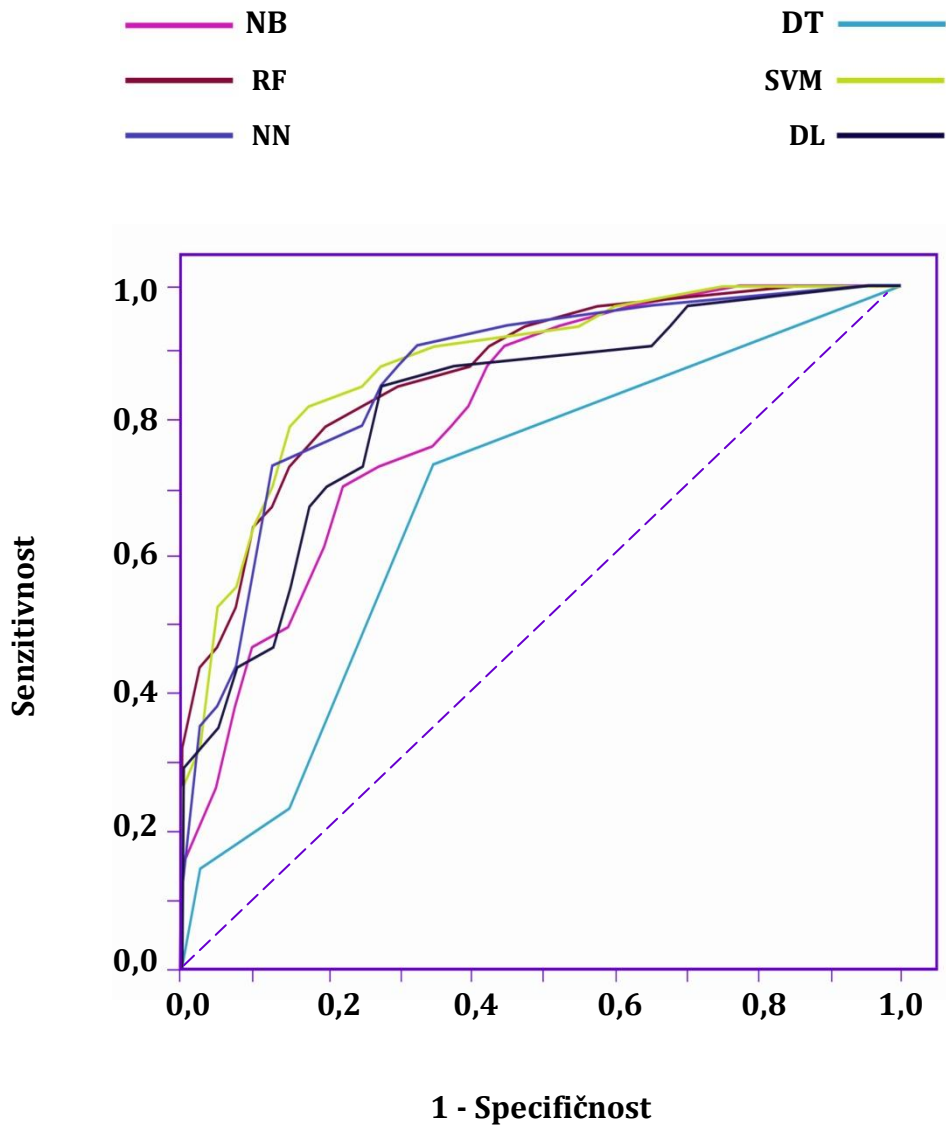
Tabela 13.2. Dijagnostički značaj primene OMIS metode (4.2.2.2.)

parametri	algoritmi					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
OV+	3,09	2,10	3,52	4,70	3,18	2,99
OV-	0,48	0,40	0,27	0,21	0,27	0,24
DOŠ	6,44	5,25	13,04	22,38	11,77	12,45



algoritam	verovatnoća pre testa (primene OMIS-a) - VpreT			
	45,94%		20,56%	
	VposleT (za OV+)		VposleT (za OV-)	
NB	72,42%	44,43%	28,97%	11,04%
DT	64,09%	75,27%	25,37%	15,70%
RF	74,94%	47,67%	18,66%	6,53%
SVM	79,97%	54,88%	15,14%	5,15%
NN	72,99%	45,14%	18,66%	6,53%
DL	71,76%	43,62%	16,94%	5,85%

Na slici 60 prikazano je poređenje ROC kriva za sve algoritme primenjene na dati skup podataka.



Slika 60. Poređenje ROC kriva za bojene uzorke tkiva (4.2.2.2.)

4.2.2.3. | Klasifikacija uzoraka tkiva OPK-a (kategorija 5 - prelazno) i svih preparata različitih tipova normalnog tkiva

U okviru analize obuhvaćeno je ukupno 476 uzoraka tkiva (prelazno - 133, normalno - 343) čija je karakterizacija definisana podacima prikupljenim OMIS metodom. Sa inicijalnih 256 atributa, odgovornih za određivanje pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa, PCA tehnikom za smanjenje dimenzionalnosti došlo se do konačnih 9 PCA obeležja. Novoformirani skup podataka podeljen je na obučavajući (prelazno - 93, normalno - 240) i test (prelazno - 40 (27,97%), normalno - 103 (72,03%)) skup.

Na test skup podataka primenjeni su algoritmi za mašinsko učenje kreirani na obučavajućem skupu podataka i dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 14.1. U tabeli 14.2 prikazane su vrednosti parametara dijagnostičkog značaja primene OMIS metode.

Tabela 14.1. Parametri primene OMIS metode na bojenim uzorcima tkiva (4.2.2.3.)

parametar	algoritam					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
tačnost	73,43%	72,73%	79,02%	82,52%	78,32%	81,82%
senzitivnost	62,50%	62,50%	57,50%	60,00%	65,00%	72,50%
specifičnost	77,67%	76,70%	87,38%	91,26%	83,50%	85,44%
vrednost AUC	0,796	0,671	0,814	0,855	0,836	0,830
TP*	25	25	23	24	26	29
LP**	23	24	13	9	17	15
TN***	80	79	90	94	86	88
LN****	15	15	17	16	14	11

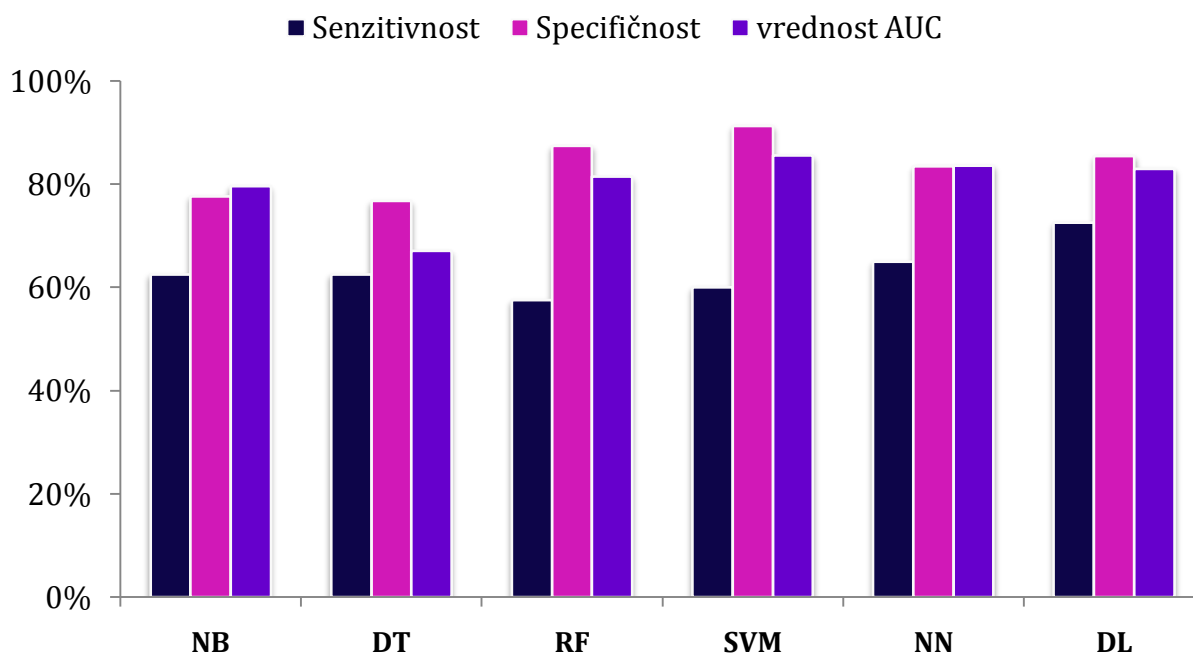
*TP - tačno pozitivni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao OPK

**LP - lažno pozitivni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao OPK

***TN - tačno negativni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao normalno

****LN - lažno negativni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao normalno

Na slici 61 prikazano je poređenje parametara klasifikacione efikasnosti (senzitivnost, specifičnost, vrednost AUC indeksa) primenjenih algoritama.



Slika 61. Klasifikaciona efikasnost automatizovanih algoritama primenjenih na podatke OMIS-a kod bojnih uzoraka (4.2.2.3.)

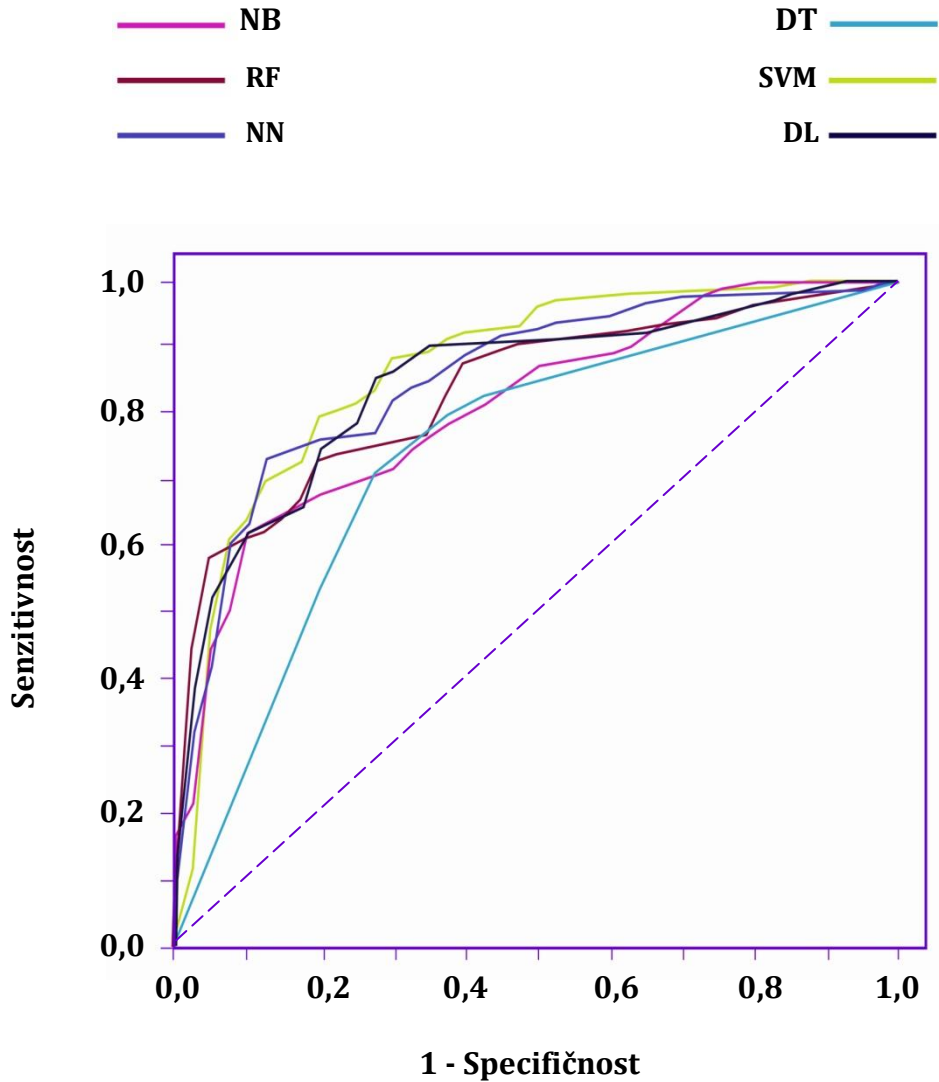
Tabela 14.2 Dijagnostički značaj primene OMIS metode (4.2.2.3.)

parametri	algoritmi					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
OV+	2,80	2,68	4,56	6,16	3,94	4,97
OV-	0,48	0,49	0,49	0,44	0,42	0,32
DOŠ	5,83	5,47	9,30	14,00	9,38	15,53



algoritam	verovatnoća pre testa (primene OMIS-a) - VpreT			
	27,97%		20,56%	
	VposleT (za OV+)		VposleT (za OV-)	
NB	52,07%	42,01%	15,70%	11,04%
DT	50,97%	40,95%	28,55%	11,25%
RF	63,88%	54,13%	28,55%	11,25%
SVM	70,50%	61,45%	14,58%	10,22%
NN	60,45%	50,48%	14,01%	9,80%
DL	65,85%	56,25%	11,04%	7,64%

Na slici 62 prikazano je poređenje ROC kriva za sve algoritme primenjene na dati skup podataka.



Slika 62. Poređenje ROC kriva za bojene uzorke tkiva (4.2.2.3.)

4.2.2.4. | Klasifikacija uzoraka tkiva OPK-a (kategorija 1) i preparata normalnog epitelnog i vezivnog tkiva

U okviru analize obuhvaćeno je ukupno 159 uzoraka tkiva (karcinom - 114, normalno epitelno i vezivno tkivo - 45) čija je karakterizacija definisana podacima prikupljenim OMIS metodom. Sa inicijalnih 256 atributa, odgovornih za određivanje pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa, PCA tehnikom za smanjenje dimenzionalnosti došlo se do konačnih 9 PCA obeležja. Novoformirani skup podataka podeljen je na obučavajući (karcinom - 80, normalno - 31) i test (karcinom - 34 (70,83%), normalno - 14 (29,17%)) skup.

Na test skup podataka primenjeni su algoritmi za mašinsko učenje kreirani na obučavajućem skupu podataka i dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 15.1. U tabeli 15.2 prikazane su vrednosti parametara dijagnostičkog značaja primene OMIS metode.

Tabela 15.1. Parametri primene OMIS metode na bojenim uzorcima tkiva (4.2.2.4.)

parametar	algoritam					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
tačnost	75,00%	77,08%	87,50%	77,08%	70,83%	77,08%
senzitivnost	88,24%	79,41%	97,06%	97,06%	97,06%	94,12%
specifičnost	42,86%	71,43%	64,29%	28,57%	7,14%	35,71%
vrednost AUC	0,842	0,711	0,891	0,853	0,716	0,826
TP*	30	27	33	33	33	32
LP**	8	4	5	10	13	9
TN***	6	10	9	4	1	5
LN****	4	7	1	1	1	2

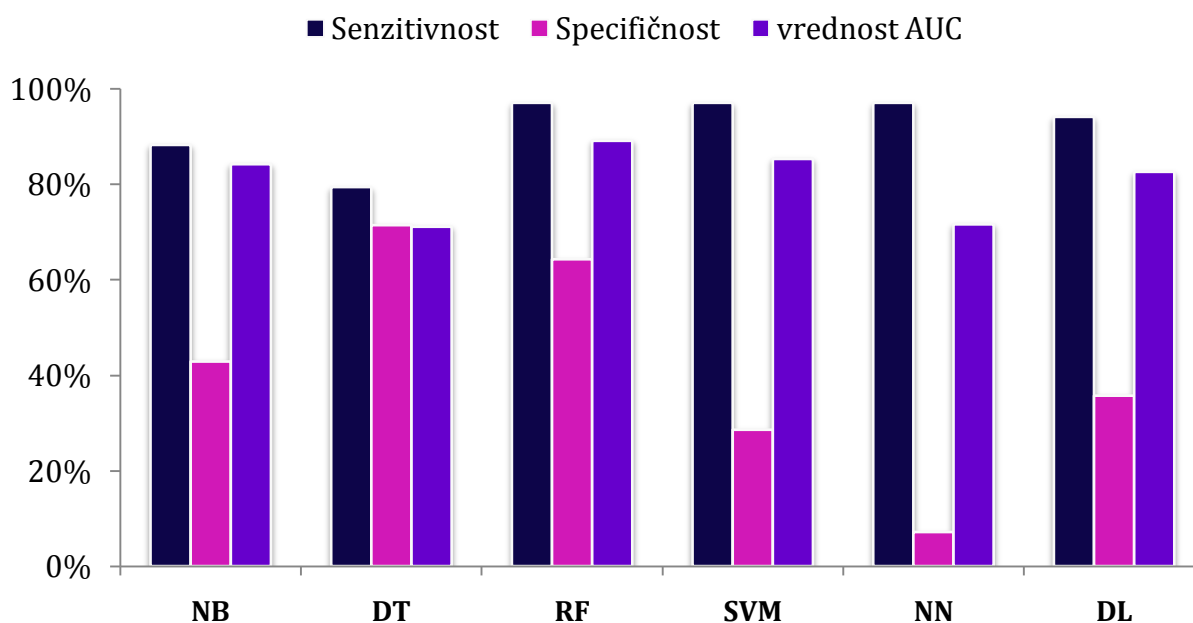
*TP - tačno pozitivni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao OPK

**LP - lažno pozitivni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao OPK

***TN - tačno negativni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao normalno

****LN - lažno negativni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao normalno

Na sliki 63 prikazano je poređenje parametara klasifikacione efikasnosti (senzitivnost, specifičnost, vrednost AUC indeksa) primenjenih algoritama.



Slika 63. Klasifikaciona efikasnost automatizovanih algoritama primenjenih na podatke OMIS-a kod bojnih uzoraka (4.2.2.4.)

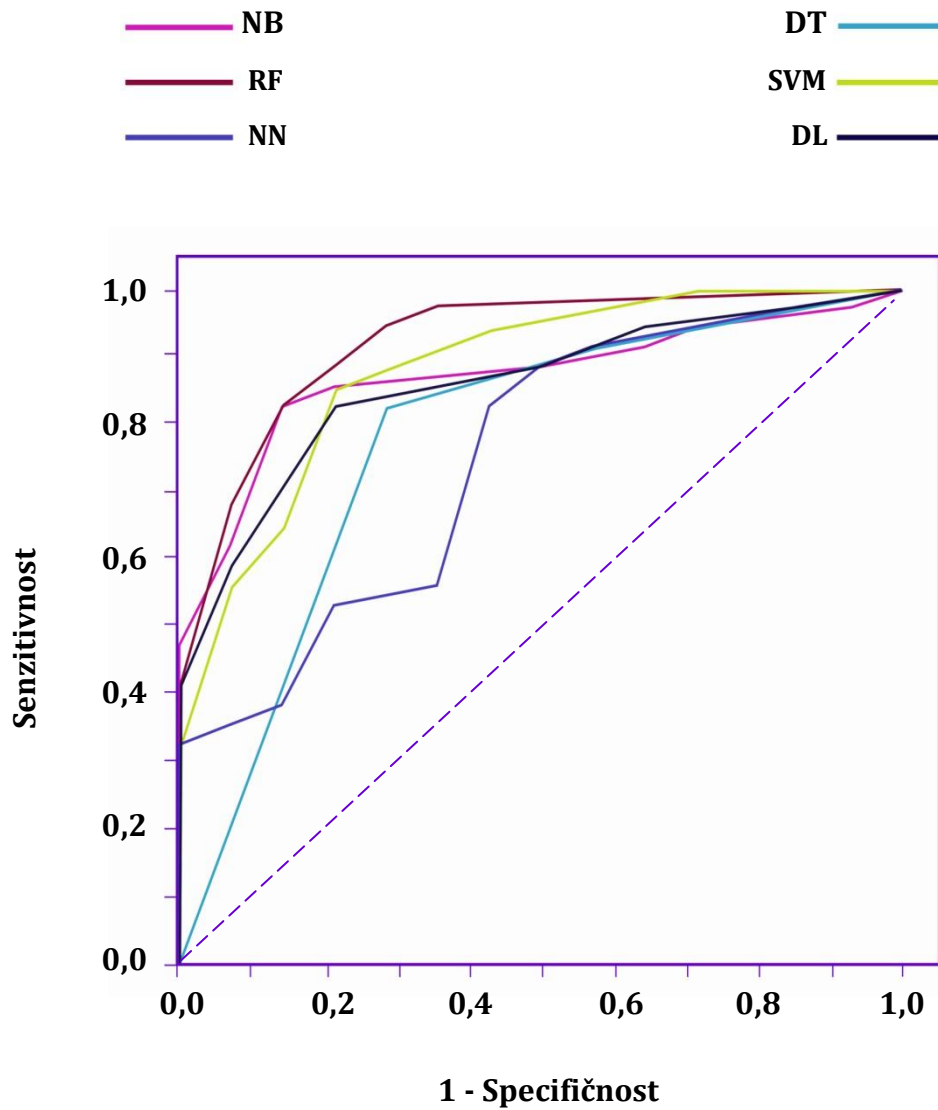
Tabela 15.2. Dijagnostički značaj primene OMIS metode (4.2.2.4.)

parametri	algoritmi					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
OV+	1,54	2,78	2,71	1,36	1,04	1,46
OV-	0,27	0,29	0,04	0,10	0,41	0,16
DOŠ	5,70	9,58	67,75	13,6	2,53	9,12



algoritam	verovatnoća pre testa (primene OMIS-a) - VpreT			
	70,83%		20,56%	
	VposleT (za OV+)		VposleT (za OV-)	
NB	78,89%	28,49%	39,59%	6,53%
DT	87,08%	41,83%	41,31%	6,98%
RF	86,80%	41,22%	8,85%	1,02%
SVM	76,75%	26,03%	19,53%	2,52%
NN	71,63%	21,20%	49,88%	9,59%
DL	78,00%	27,42%	27,97%	3,97%

Na slici 64 prikazano je poređenje ROC kriva za sve algoritme primenjene na dati skup podataka.



Slika 64. Poređenje ROC kriva za bojene uzorke tkiva (4.2.2.4.)

4.2.2.5. | Klasifikacija uzoraka tkiva OPK - a (kategorija 1) i preparata normalnog mišićnog tkiva

U okviru analize obuhvaćeno je ukupno 274 uzoraka tkiva (karcinom - 114, normalno mišićno tkivo - 160) čija je karakterizacija definisana podacima prikupljenim OMIS metodom. Sa inicijalnih 256 atributa, odgovornih za određivanje pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa, PCA tehnikom za smanjenje dimenzionalnosti došlo se do konačnih 9 PCA obeležja. Novoformirani skup podataka podeljen je na obučavajući (karcinom - 80, normalno - 112) i test (karcinom - 34 (41,46%), normalno - 48 (58,54%)) skup.

Na test skup podataka primenjeni su algoritmi za mašinsko učenje kreirani na obučavajućem skupu podataka i dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 16.1. U tabeli 16.2 prikazane su vrednosti parametara dijagnostičkog značaja primene OMIS metode.

Tabela 16.1. Parametri primene OMIS metode na bojenim uzorcima tkiva (4.2.2.5.)

parametar	algoritam					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
tačnost	79,23%	73,17%	86,59%	82,93%	82,93%	79,27%
senzitivnost	67,65%	97,06%	85,29%	76,47%	79,41%	82,35%
specifičnost	87,50%	56,25%	87,50%	87,50%	85,42%	77,08%
vrednost AUC	0,869	0,775	0,916	0,889	0,900	0,873
TP*	23	33	29	26	27	28
LP**	6	21	6	6	7	11
TN***	42	27	42	42	41	37
LN****	11	1	5	8	7	6

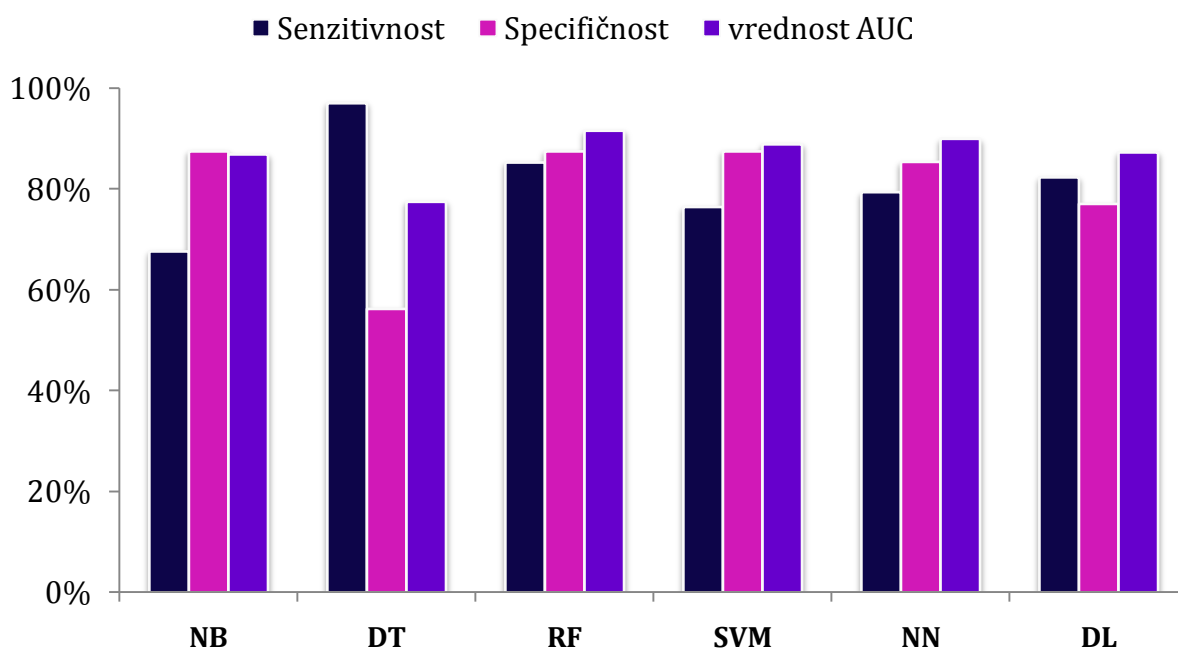
*TP - tačno pozitivni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao OPK

**LP - lažno pozitivni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao OPK

***TN - tačno negativni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao normalno

****LN - lažno negativni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao normalno

Na slici 65 prikazano je poređenje parametara klasifikacione efikasnosti (senzitivnost, specifičnost, vrednost AUC indeksa) primenjenih algoritama.



Slika 65. Klasifikaciona efikasnost automatizovanih algoritama primenjenih na podatke OMIS-a kod bojanih uzoraka (4.2.2.5.)

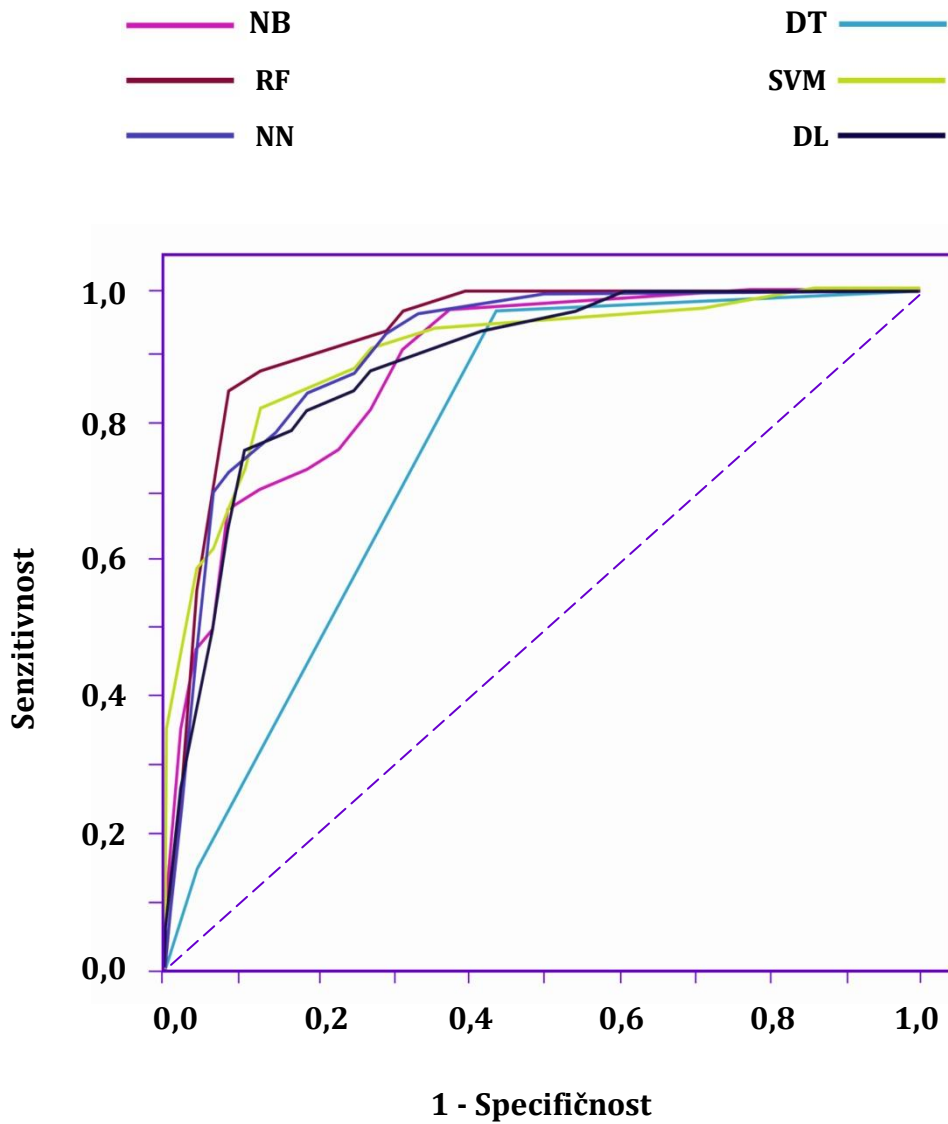
Tabela 16.2. Dijagnostički značaj primene OMIS metode (4.2.2.5.)

parametri	algoritmi					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
OV+	5,41	2,22	6,82	6,12	5,44	3,59
OV-	0,37	0,05	0,16	0,27	0,24	0,23
DOŠ	14,62	44,40	42,62	22,66	22,66	15,60



algoritam	verovatnoća pre testa (primene OMIS-a) - VpreT			
	41,46%		20,56%	
	VposleT (za OV+)		VposleT (za OV-)	
NB	79,29%	58,33%	20,75%	8,73%
DT	61,11%	36,48%	3,41%	1,27%
RF	82,84%	63,83%	10,17%	3,97%
SVM	81,24%	61,29%	16,04%	6,53%
NN	79,38%	58,47%	14,52%	5,84%
DL	71,76%	48,16%	14,00%	5,61%

Na slici 66 prikazano je poređenje ROC kriva za sve algoritme primenjene na dati skup podataka.



Slika 66. Poređenje ROC kriva za bojene uzorke tkiva (4.2.2.5.)

4.2.2.6. | Klasifikacija uzoraka tkiva OPK – a (kategorija 1) i preparata normalnog masnog tkiva

U okviru analize obuhvaćeno je ukupno 154 uzoraka tkiva (karcinom - 114, normalno masno tkivo - 40) čija je karakterizacija definisana podacima prikupljenim OMIS metodom. Sa inicijalnih 256 atributa, odgovornih za određivanje pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa, PCA tehnikom za smanjenje dimenzionalnosti došlo se do konačnih 9 PCA obeležja. Novoformirani skup podataka podeljen je na obučavajući (karcinom - 80, normalno - 28) i test (karcinom - 34 (73,91%), normalno - 12 (26,09%)) skup.

Na test skup podataka primenjeni su algoritmi za mašinsko učenje kreirani na obučavajućem skupu podataka i dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 17.1. U tabeli 17.2 prikazane su vrednosti parametara dijagnostičkog značaja primene OMIS metode.

Tabela 17.1. Parametri primene OMIS metode na bojenim uzorcima tkiva (4.2.2.6.)

parametar	algoritam					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
tačnost	82,61%	84,78%	80,43%	76,09%	84,78%	84,78%
senzitivnost	97,06%	100%	97,06%	100%	97,06%	97,06%
specifičnost	41,67%	41,67%	33,33%	8,33%	50,00%	50,00%
vrednost AUC	0,909	0,681	0,879	0,929	0,885	0,873
TP*	33	34	33	34	33	33
LP**	7	7	8	11	6	6
TN***	5	5	4	1	6	6
LN****	1	0	1	0	1	1

*TP - tačno pozitivni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao OPK

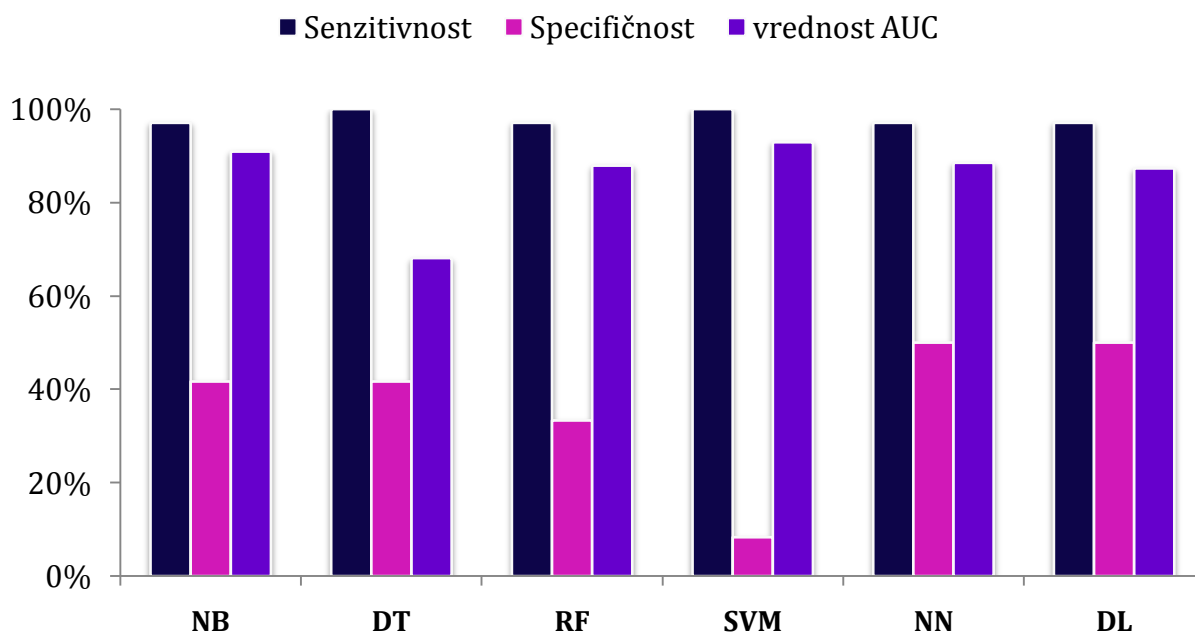
**LP - lažno pozitivni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao OPK

***TN - tačno negativni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao normalno

****LN - lažno negativni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao normalno

*****Za vrednosti senzitivnosti i specifičnosti od 100 i 0%, radi izračunavanja odnosa verovatnoće i dijagnostičkog odnosa šansi korišćene su vrednosti 99 i 1%.

Na sliki 67 prikazano je poređenje parametara klasifikacione efikasnosti (senzitivnost, specifičnost, vrednost AUC indeksa) primenjenih algoritama.



Slika 67. Klasifikaciona efikasnost automatizovanih algoritama primenjenih na podatke OMIS-a kod bojnih uzoraka (4.2.2.6.)

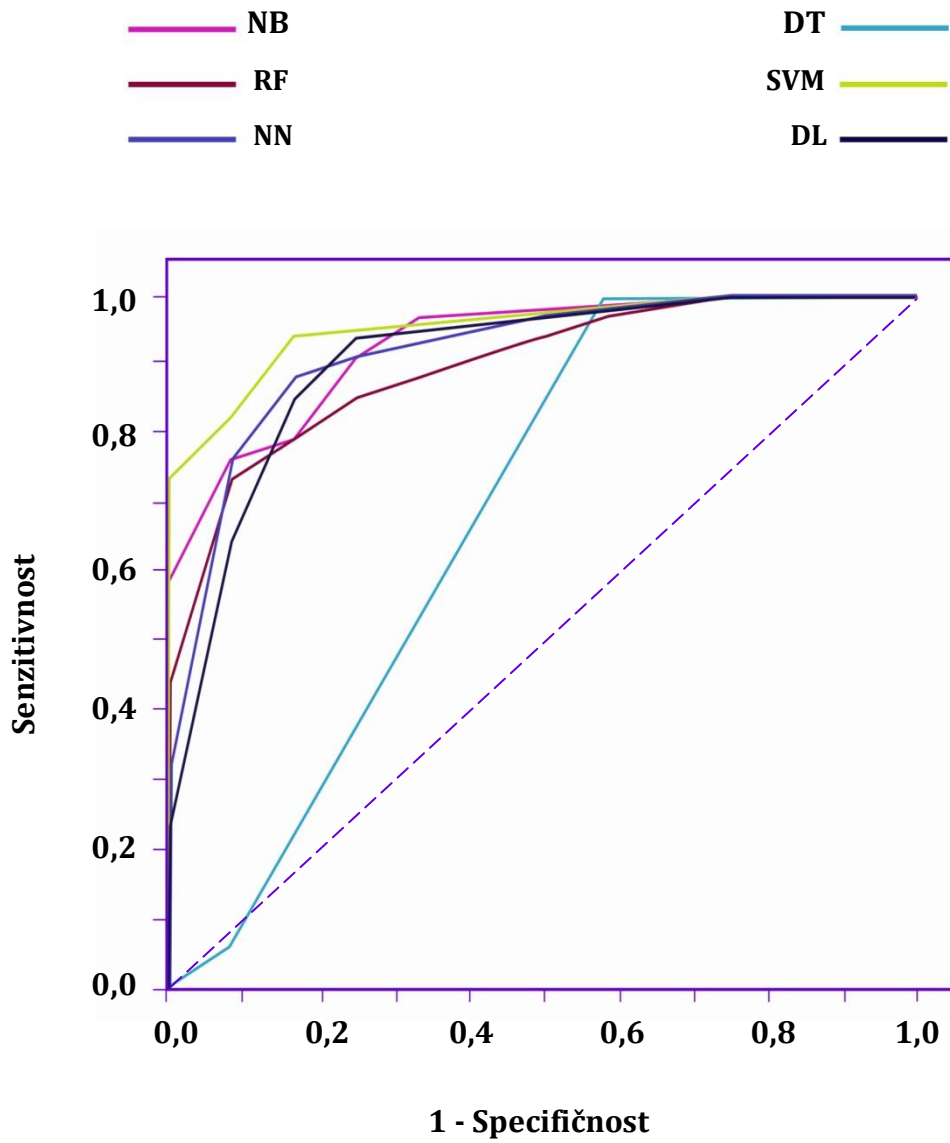
Tabela 17.2. Dijagnostički značaj primene OMIS metode (4.2.2.6.)

parametri	algoritmi					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
OV+	1,66	1,69	1,46	1,08	1,94	1,94
OV-	0,07	0,02	0,09	0,12	0,06	0,06
DOŠ	23,71	84,5	16,22	9,00	32,33	32,33



algoritam	verovatnoća pre testa (primene OMIS-a) - VpreT			
	73,91%	20,56%	73,91%	20,56%
	VposleT (za OV+)		VposleT (za OV-)	
NB	82,45%	30,05%	16,54%	1,77%
DT	82,71%	30,42%	5,36%	0,51%
RF	80,52%	27,42%	20,31%	2,27%
SVM	75,36%	21,84%	25,36%	3,01%
NN	84,60%	33,42%	14,52%	1,52%
DL	84,60%	33,42%	14,52%	1,52%

Na slici 68 prikazano je poređenje ROC kriva za sve algoritme primenjene na dati skup podataka.



Slika 68. Poređenje ROC kriva za bojene uzorke tkiva (4.2.2.6.)

4.2.2.7. | Klasifikacija uzoraka tkiva OPK – a (kategorija 1) i preparata normalnog koštanog tkiva

U okviru analize obuhvaćeno je ukupno 188 uzoraka tkiva (karcinom - 114, normalno koštano tkivo - 74) čija je karakterizacija definisana podacima prikupljenim OMIS metodom. Sa inicijalnih 256 atributa, odgovornih za određivanje pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa, PCA tehnikom za smanjenje dimenzionalnosti došlo se do konačnih 10 PCA obeležja. Novoformirani skup podataka podeljen je na obučavajući (karcinom - 80, normalno - 52) i test (karcinom - 34 (60,71%), normalno - 22 (39,29%)) skup.

Na test skup podataka primenjeni su algoritmi za mašinsko učenje kreirani na obučavajućem skupu podataka i dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 18.1. U tabeli 18.2 prikazane su vrednosti parametara dijagnostičkog značaja primene OMIS metode.

Tabela 18.1. Parametri primene OMIS metode na bojenim uzorcima tkiva (4.2.2.7.)

parametar	algoritam					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
tačnost	82,14%	83,93%	91,07%	87,50%	85,71%	89,29%
senzitivnost	91,18%	85,29%	94,12%	91,18%	94,12%	91,18%
specifičnost	68,18%	81,82%	86,36%	81,82%	72,73%	86,36%
vrednost AUC	0,936	0,921	0,973	0,936	0,959	0,971
TP*	31	29	32	31	32	31
LP**	7	4	3	4	6	3
TN***	15	18	19	18	16	19
LN****	3	5	2	3	2	3

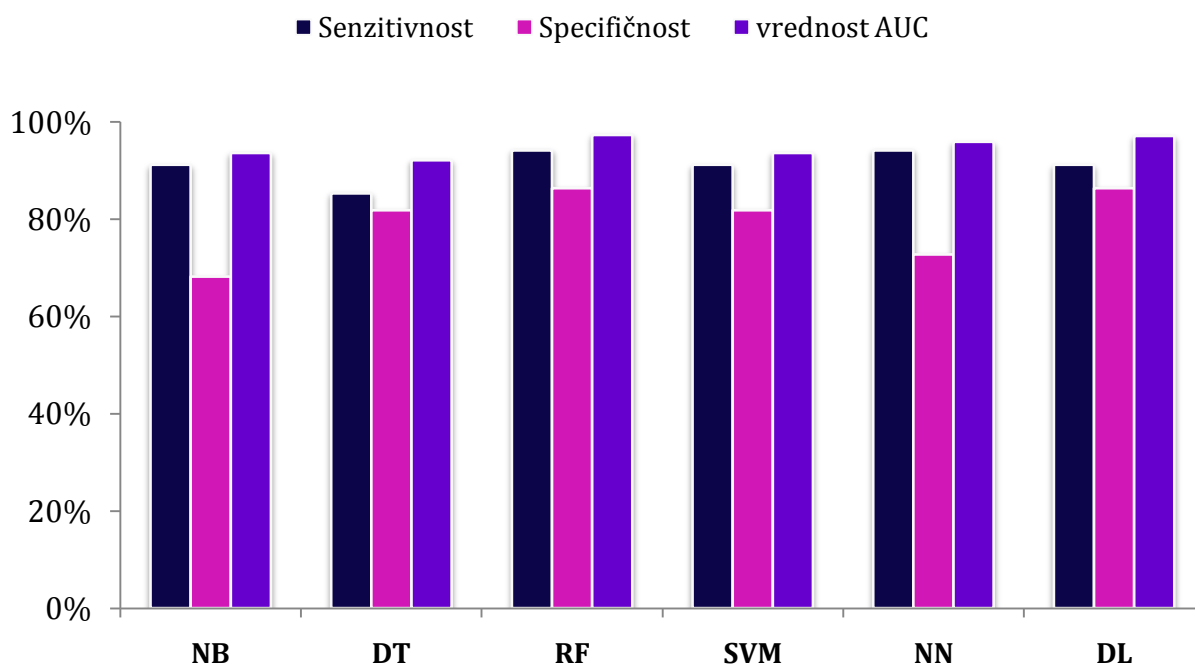
*TP - tačno pozitivni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao OPK

**LP - lažno pozitivni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao OPK

***TN - tačno negativni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao normalno

****LN - lažno negativni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao normalno

Na slici 69 prikazano je poređenje parametara klasifikacione efikasnosti (senzitivnost, specifičnost, vrednost AUC indeksa) primenjenih algoritama.



Slika 69. Klasifikaciona efikasnost automatizovanih algoritama primenjenih na podatke OMIS-a kod bojenih uzoraka (4.2.2.7.)

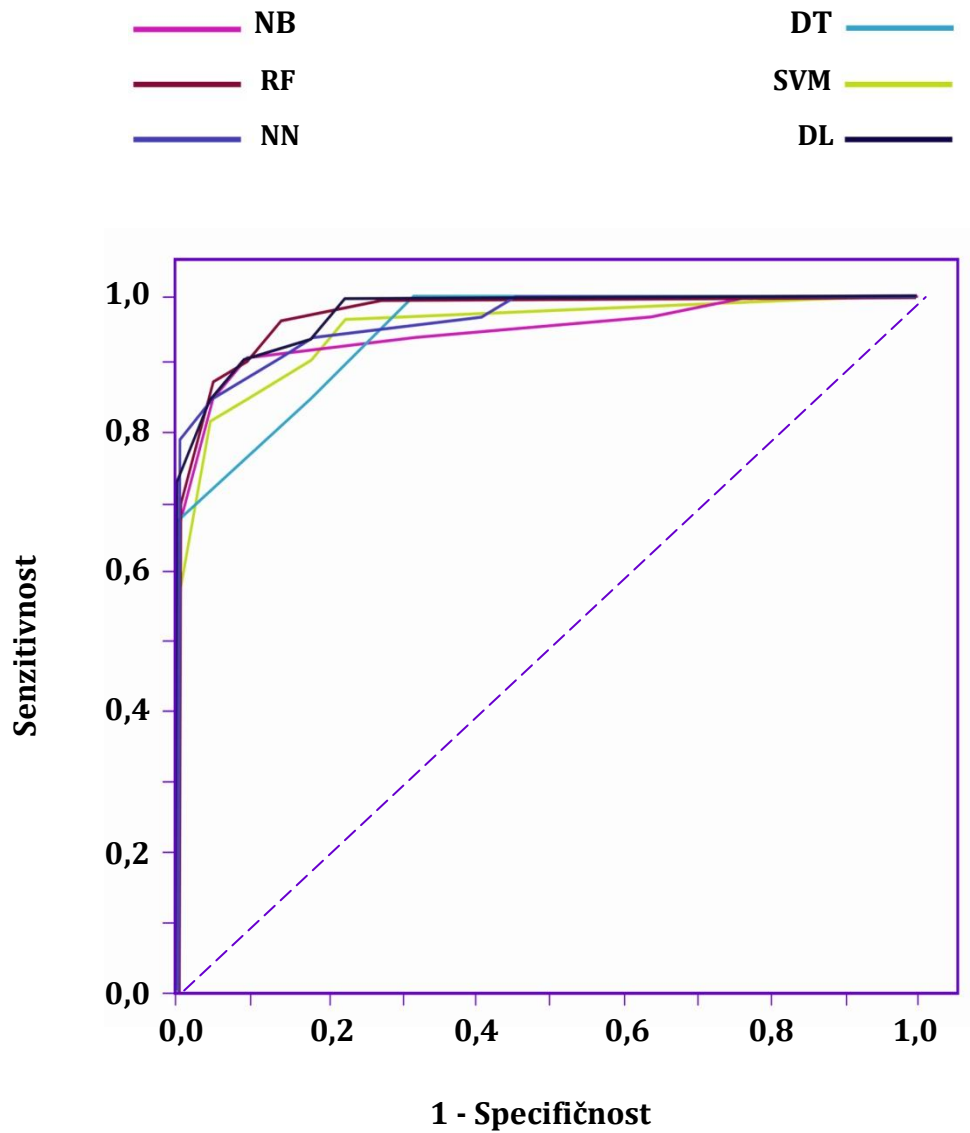
Tabela 18.2. Dijagnostički značaj primene OMIS metode (4.2.2.7.)

parametri	algoritmi					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
OV+	2,18	4,69	6,90	5,01	3,45	6,68
OV-	0,13	0,18	0,07	0,11	0,08	0,10
DOŠ	16,76	26,05	98,57	45,54	43,12	66,80



algoritam	verovatnoća pre testa (primene OMIS-a) - VpreT			
	60,71%		20,56%	
	VposleT (za OV+)		VposleT (za OV-)	
NB	77,10%	36,06%	16,72%	3,25%
DT	87,87%	54,82%	21,75%	4,45%
RF	91,42%	64,10%	9,75%	1,78%
SVM	88,55%	56,45%	14,52%	2,76%
NN	84,20%	47,16%	11,00%	2,02%
DL	91,16%	63,35%	10,00%	2,52%

Na slici 70 prikazano je poređenje ROC kriva za sve algoritme primenjene na dati skup podataka.



Slika 70. Poređenje ROC kriva za bojene uzorke tkiva (4.2.2.7.)

4.2.2.8. | Klasifikacija uzoraka tkiva OPK - a (kategorija 4 - infiltrirano koštano tkivo) i preparata normalnog koštanog tkiva

U okviru analize obuhvaćeno je ukupno 164 uzoraka tkiva (infiltracija kosti - 90, normalno koštano tkivo - 74) čija je karakterizacija definisana podacima prikupljenim OMIS metodom. Sa inicijalnih 256 atributa, odgovornih za određivanje pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa, PCA tehnikom za smanjenje dimenzionalnosti došlo se do konačnih 10 PCA obeležja. Novoformirani skup podataka podeljen je na obučavajući (infiltracija kosti - 63, normalno - 52) i test (infiltracija kosti - 27 (55,10%), normalno - 22 (44,90%)) skup.

Na test skup podataka primenjeni su algoritmi za mašinsko učenje kreirani na obučavajućem skupu podataka i dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 19.1. U tabeli 19.2 prikazane su vrednosti parametara dijagnostičkog značaja primene OMIS metode.

Tabela 19.1. Parametri primene OMIS metode na bojenim uzorcima tkiva (4.2.2.8.)

parametar	algoritam					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
tačnost	55,10%	61,22%	57,14%	65,31%	65,31%	67,35%
senzitivnost	51,85%	92,59%	62,96%	74,07%	70,37%	70,37%
specifičnost	59,09%	22,73%	50,00%	54,55%	59,09%	63,64%
vrednost AUC	0,601	0,620	0,650	0,682	0,721	0,734
TP*	14	25	17	20	19	19
LP**	9	17	11	10	9	8
TN***	13	5	11	12	13	14
LN****	13	2	10	7	8	8

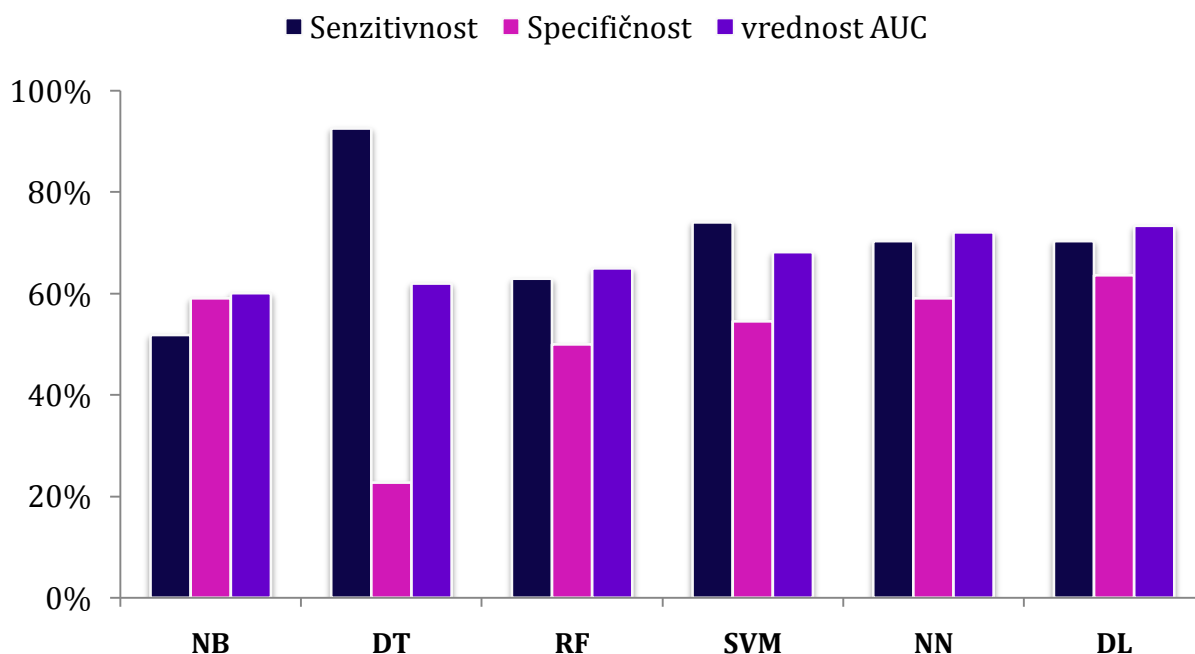
*TP - tačno pozitivni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao OPK

**LP - lažno pozitivni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao OPK

***TN - tačno negativni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao normalno

****LN - lažno negativni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao normalno

Na slici 71 prikazano je poređenje parametara klasifikacione efikasnosti (senzitivnost, specifičnost, vrednost AUC indeksa) primenjenih algoritama.



Slika 71. Klasifikaciona efikasnost automatizovanih algoritama primenjenih na podatke OMIS-a kod bojnih uzoraka (4.2.2.8.)

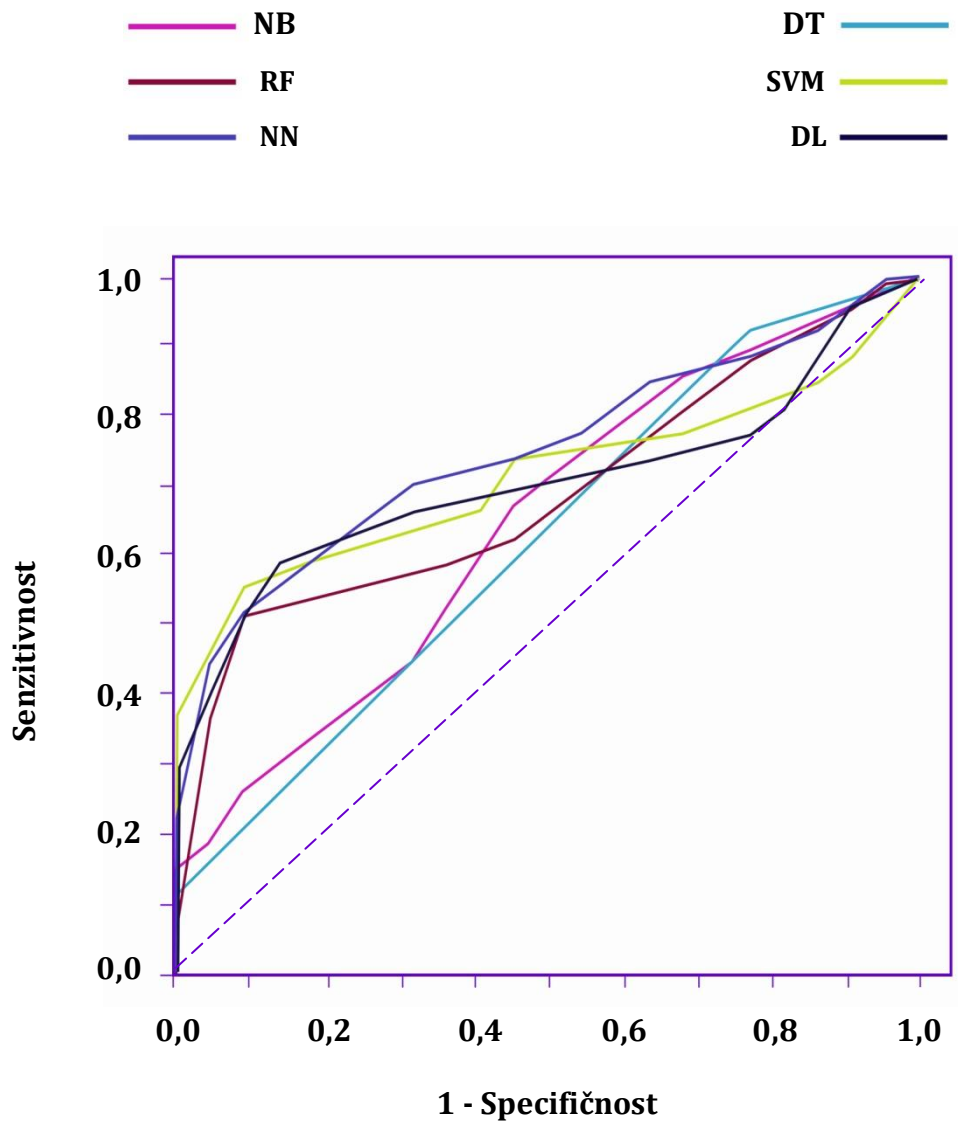
Tabela 19.2. Dijagnostički značaj primene OMIS metode (4.2.2.8.)

parametri	algoritmi					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
OV+	1,27	1,20	1,26	1,63	1,72	1,94
OV-	0,81	0,32	0,74	0,47	0,50	0,46
DOŠ	1,57	3,75	1,70	3,46	3,44	4,22



algoritam	verovatnoća pre testa (primene OMIS-a) - VpreT			
	55,10%		20,56%	
	VposleT (za OV+)		VposleT (za OV-)	
NB	60,29%	24,73%	49,85%	17,32%
DT	59,55%	23,69%	28,19%	7,64%
RF	60,72%	24,59%	47,58%	16,07%
SVM	66,67%	29,66%	36,57%	10,84%
NN	67,85%	30,80%	38,02%	11,46%
DL	70,41%	33,42%	36,07%	10,63%

Na slici 72 prikazano je poređenje ROC kriva za sve algoritme primenjene na dati skup podataka.



Slika 72. Poređenje ROC kriva za bojene uzorke tkiva (4.2.2.8.)

4.2.2.9. | Klasifikacija uzoraka tkiva OPK – a (kategorija 1) i preparata normalnog tkiva pljuvačnih žlezda

U okviru analize obuhvaćeno je ukupno 138 uzoraka tkiva (karcinom - 114, normalno tkivo pljuvačne žlezde - 24) čija je karakterizacija definisana podacima prikupljenim OMIS metodom. Sa inicijalnih 256 atributa, odgovornih za određivanje pripadnosti uzoraka nekoj od dostupnih klasa, PCA tehnikom za smanjenje dimenzionalnosti došlo se do konačnih 9 PCA obeležja. Novoformirani skup podataka podeljen je na obučavajući (karcinom - 80, normalno - 17) i test (karcinom - 34 (82,92%), normalno - 7 (17,08%)) skup.

Na test skup podataka primenjeni su algoritmi za mašinsko učenje kreirani na obučavajućem skupu podataka i dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 20.1. U tabeli 20.2 prikazane su vrednosti parametara dijagnostičkog značaja primene OMIS metode.

Tabela 20.1. Parametri primene OMIS metode na bojnim uzorcima tkiva (4.2.2.9.)

parametar	algoritam					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
tačnost	82,93%	80,49%	82,93%	82,93%	82,93%	80,49%
senzitivnost	97,06%	97,06%	100%	100%	97,06%	91,18%
specifičnost	14,29%	0,00%	0,00%	0,00%	14,29%	28,57%
vrednost AUC	0,769	0,378	0,889	0,782	0,870	0,752
TP*	33	33	34	34	33	31
LP**	6	7	7	7	6	5
TN***	1	0	0	0	1	2
LN****	1	1	0	0	1	3

*TP - tačno pozitivni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao OPK

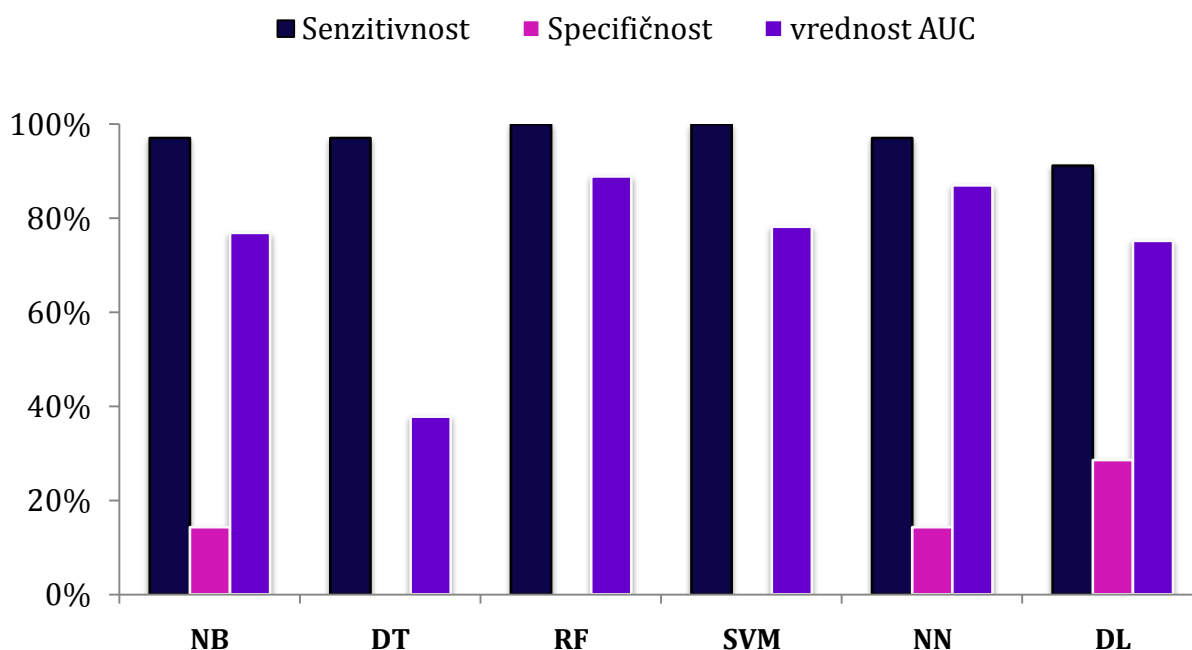
**LP - lažno pozitivni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao OPK

***TN - tačno negativni - br. uzoraka normalnog tkiva koje je algoritam predvideo kao normalno

****LN - lažno negativni - br. uzoraka tkiva OPK-a koje je algoritam predvideo kao normalno

*****Za vrednosti senzitivnosti i specifičnosti od 100 i 0%, radi izračunavanja odnosa verovatnoće i dijagnostičkog odnosa šansi korišćene su vrednosti 99 i 1%.

Na slici 73 prikazano je poređenje parametara klasifikacione efikasnosti (senzitivnost, specifičnost, vrednost AUC indeksa) primenjenih algoritama.



Slika 73. Klasifikaciona efikasnost automatizovanih algoritama primenjenih na podatke OMIS-a kod bojanih uzoraka (4.2.2.9.)

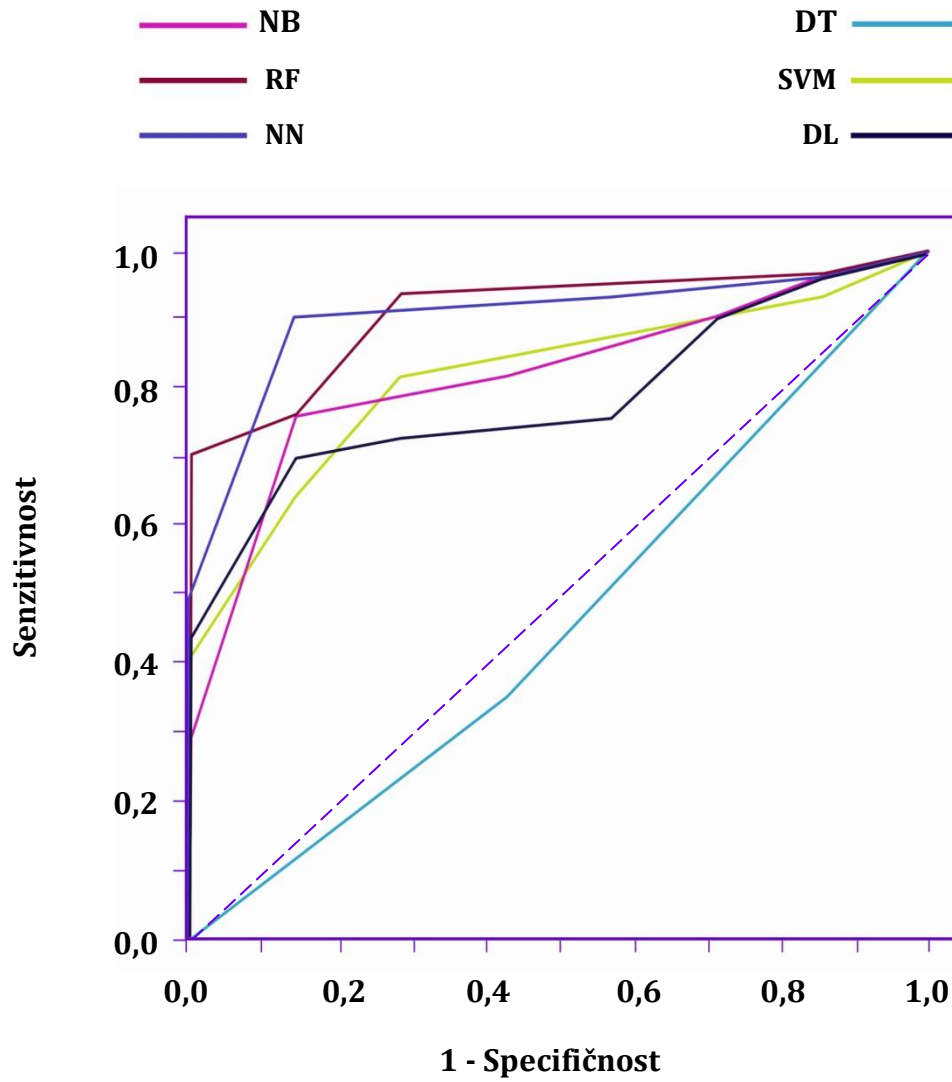
Tabela 20.2. Dijagnostički značaj primene OMIS metode (4.2.2.9.)

parametri	algoritmi					
	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
OV+	1,13	0,98	1,00	1,00	1,13	1,28
OV-	0,20	2,94	1,00	1,00	0,20	0,34
DOŠ	5,65	0,33	1,00	1,00	5,65	3,76



algoritam	verovatnoća pre testa (primene OMIS-a) - VpreT			
	82,92%		20,56%	
	VposleT (za OV+)		VposleT (za OV-)	
NB	84,57%	22,62%	49,25%	4,92%
DT	82,62%	20,23%	93,45%	43,20%
RF	82,92%	20,56%	82,92%	20,56%
SVM	82,92%	20,56%	82,92%	20,56%
NN	84,57%	22,62%	49,25%	4,92%
DL	86,13%	24,88%	62,27%	8,08%

Na slici 74 prikazano je poređenje ROC kriva za sve algoritme primenjene na dati skup podataka.



Slika 74. Poređenje ROC kriva za bojene uzorke tkiva (4.2.2.9.)

4.2.3. | Rangiranje automatizovanih algoritama i testiranje nulte hipoteze prema definisanim parametrima klasifikacione efikasnosti

4.2.3.1. | Rangiranje po tačnosti

Rezultat Fridmanovog testa: $p=0,028$ (referentna vrednost $p<0,05$)

Tabela 21.1 Rangiranje algoritama prema vrednosti tačnosti

algoritmi	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
VPR*	2,450	2,400	4,600	4,100	3,500	3,950

*VPR -vrednost prosečnog ranga

Rezultati Nemenji testa za vrednost kritične razlike prosečnog ranga od 2,4036 u odnosu na vrednost p (referentna vrednost $p<0,05$)

Tabela 21.2 Prisustvo statistički značajnih razlika između primenjenih algoritama po vrednostima za parametar tačnosti

algoritmi	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
NB	1	1.000	0.109	0.361	0.809	0.472
DT	1.000	1	0.094	0.327	0.777	0.434
RF	0.109	0.094	1	0.991	0.777	0.971
SVM	0.361	0.327	0.991	1	0.980	1.000
NN	0.809	0.777	0.777	0.980	1	0.995
DL	0.472	0.434	0.971	1.000	0.995	1

*bojom su obeležena polja sa vrednosti $p<0,05$

4.2.3.2. | Rangiranje po vrednosti AUC

Rezultat Fridmanovog testa: $p\approx 0,0002$ (referentna vrednost $p<0,05$)

Tabela 22.1 Rangiranje algoritama prema vrednosti AUC

algoritmi	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
VPR*	2,950	1,200	4,800	4,550	3,900	3,600

*VPR -vrednost prosečnog ranga

Rezultati Nemenji testa za vrednost kritične razlike prosečnog ranga od 2,4036 u odnosu na vrednost p (referentna vrednost $p<0,05$)

Tabela 22.2 Prisustvo statistički značajnih razlika između primenjenih algoritama po vrednostima parametra AUC

algoritmi	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
NB	1	0.295	0.236	0.397	0.866	0.971
DT	0.295	1	0.0003	0.001	0.018	0.051
RF	0.236	0.0003	1	1.000	0.891	0.706
SVM	0.397	0.001	1.000	1	0.971	0.866
NN	0.866	0.018	0.891	0.971	1	0.999
DL	0.971	0.051	0.706	0.866	0.999	1

*bojom su obeležena polja sa vrednosti $p < 0,05$

4.2.3.3. | Rangiranje po odnosu verovatnoće za pozitivan rezultat testa (vrednost OV+)

Rezultat Fridmanovog testa: $p = 0,212$ (referentna vrednost $p < 0,05$)

Tabela 23.1 Rangiranje algoritama prema vrednosti OV+

algoritmi	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
VPR*	3,050	2,400	4,150	3,750	3,400	4,250

*VPR -vrednost prosečnog ranga

Rezultati Nemenji testa za vrednost kritične razlike prosečnog ranga od 2,4036 u odnosu na vrednost p (referentna vrednost $p < 0,05$)

Tabela 23.2 Prisustvo statistički značajnih razlika između primenjenih algoritama po vrednostima za parametar odnosa verovatnoće za pozitivan rezultat testa

algoritmi	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
NB	1	0.971	0.777	0.960	0.998	0.706
DT	0.971	1	0.295	0.590	0.839	0.236
RF	0.777	0.295	1	0.997	0.947	1.000
SVM	0.960	0.590	0.997	1	0.998	0.991
NN	0.998	0.839	0.947	0.998	1	0.912
DL	0.706	0.236	1.000	0.991	0.912	1

*bojom su obeležena polja sa vrednosti $p < 0,05$

4.2.3.4. | Rangiranje po odnosu verovatnoće za negativan rezultat testa (vrednost OV-)

Rezultat Fridmanovog testa: $p=0,447$ (referentna vrednost $p<0,05$)

Tabela 24.1 Rangiranje algoritama prema vrednosti OV-

algoritmi	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
VPR*	2,850	3,050	4,050	3,250	3,500	4,300

*VPR -vrednost prosečnog ranga

Rezultati Nemenji testa za vrednost kritične razlike prosečnog ranga od 2,4036 u odnosu na vrednost p (referentna vrednost $p<0,05$)

Tabela 24.2 Prisustvo statistički značajnih razlika između primenjenih algoritama po vrednostima za parametar odnosa verovatnoće za negativan rezultat testa

algoritmi	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
NB	1	1.000	0.668	0.931	0.809	0.511
DT	1.000	1	0.839	0.986	0.931	0.706
RF	0.668	0.839	1	0.995	1.000	1.000
SVM	0.931	0.986	0.995	1	1.000	0.971
NN	0.809	0.931	1.000	1.000	1	0.997
DL	0.511	0.706	1.000	0.971	0.997	1

*bojom su obeležena polja sa vrednosti $p<0,05$

4.2.3.5. | Rangiranje po dijagnostičkom odnosu šansi (vrednost DOŠ)

Rezultat Fridmanovog testa: $p=0,202$ (referentna vrednost $p<0,05$)

Tabela 25.1 Rangiranje algoritama prema vrednosti OV+

algoritmi	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
VPR*	2,450	3,100	4,150	3,700	3,250	4,350

*VPR -vrednost prosečnog ranga

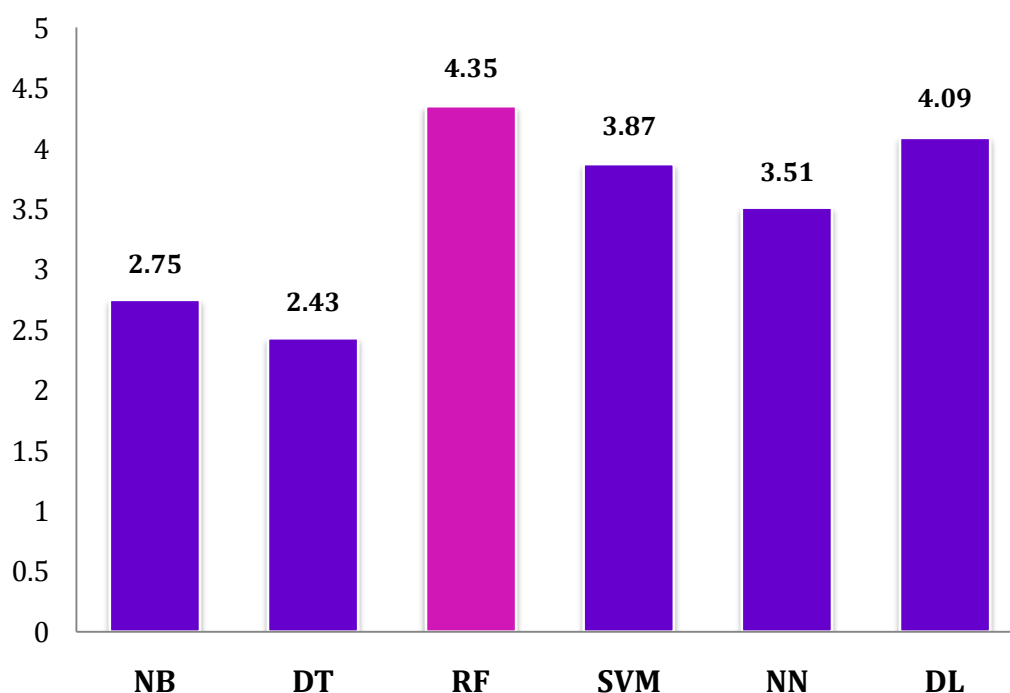
Rezultati Nemenji testa za vrednost kritične razlike prosečnog ranga od 2,4036 u odnosu na vrednost p (referentna vrednost $p<0,05$)

Tabela 25.2 Prisustvo statistički značajnih razlika između primenjenih algoritama po vrednostima za parametar dijagnostičkog odnosa šansi

algoritmi	NB	DT	RF	SVM	NN	DL
NB	1	0.971	0.327	0.668	0.931	0.210
DT	0.971	1	0.809	0.980	1.000	0.668
RF	0.327	0.809	1	0.995	0.891	1.000
SVM	0.668	0.980	0.995	1	0.995	0.971
NN	0.931	1.000	0.891	0.995	1	0.777
DL	0.210	0.668	1.000	0.971	0.777	1

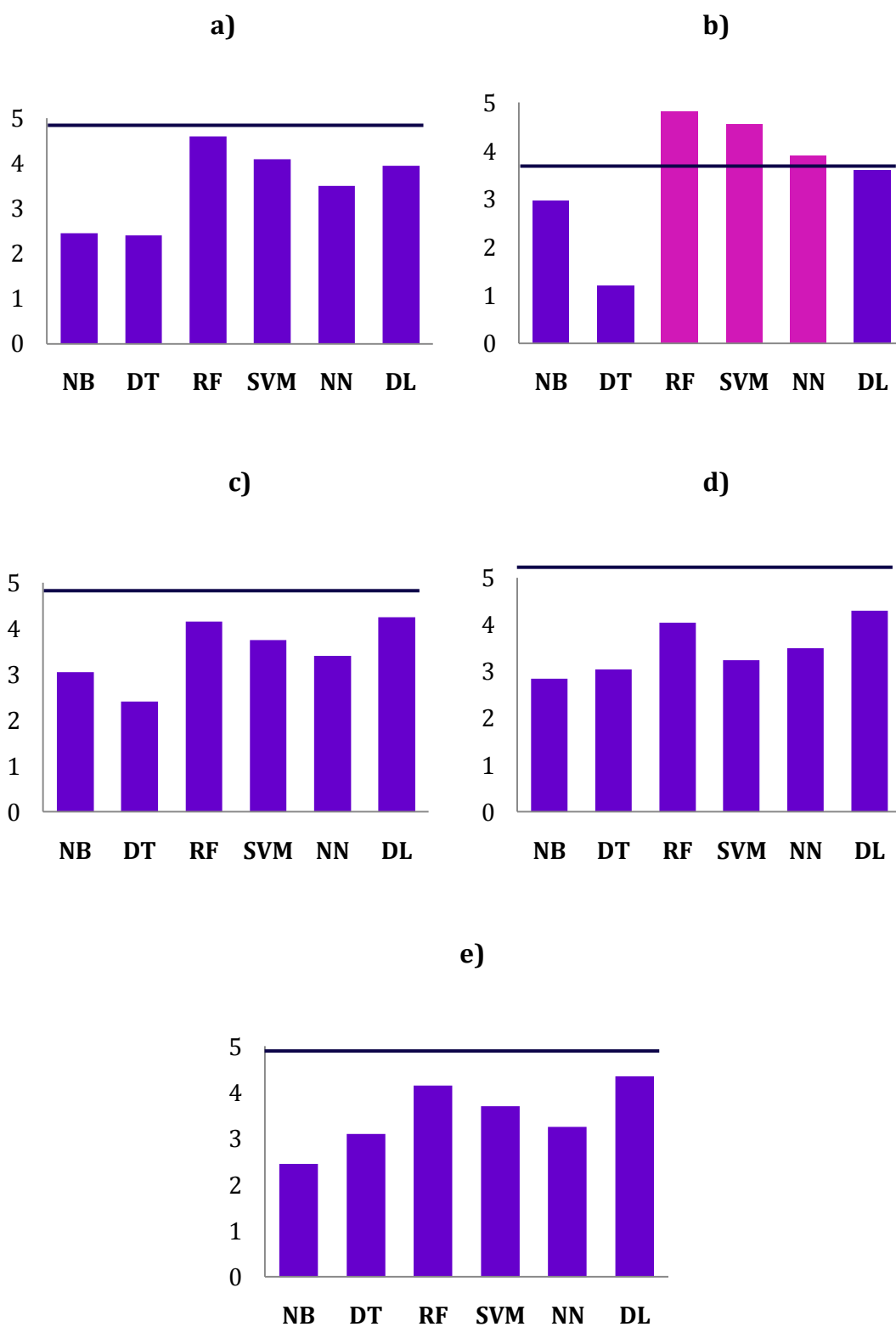
*bojom su obeležena polja sa vrednosti $p < 0,05$

Prosečna vrednost ranga algoritama po svih pet analiziranih parametara prikazana je na slici 75.



Slika 75. Prosečna vrednost ranga efikasnosti primenjenih algoritama u odnosu na pet analiziranih parametara

Na slici 76 predstavljen je grafički prikaz prisustva ili odsustva statistički značajnih razlika u performansama primenjenih algoritama po svakom parametru pojedinačno. Statistički značajnim smatraju se sve vrednosti ranga koje se nalaze iznad granične vrednosti (granična vrednost = najniži rang + kritična razlika prosečnog ranga - 2,4036).



Slika 76. Statistički značajne razlike u efikasnosti primenjenih algoritmima u odnosu na zadatak graničnu vrednost za parametre (a) tačnosti (b) vrednosti AUC (c) OV+ (d) OV- i (e) DOŠ

4.2.3.6. | Testiranje nulte hipoteze

U okviru testiranja nulte hipoteze sprovedeno je ukupno 240 testova po četiri parametra koji ujedno opisuju i dijagnostički značaj primene OMIS metode na tkiva u usnoj duplji: vrednost AUC, odnos verovatnoće za pozitivan rezultat testa (OV+), odnos verovatnoće za negativan rezultat testa (OV-) i dijagnostički odnos šansi (DOŠ).

Rezultati testiranja nulte hipoteze (slika 77):

Broj testova kod kojih se vrednosti parametara nalaze ispod (AUC, OV+ i DOŠ) ili iznad graničnih vrednosti (OV-): 10 ($\approx 4\%$)

Broj testova kod kojih se vrednosti parametara nalaze iznad (AUC, OV+ i DOŠ) ili ispod graničnih vrednosti (OV-): 230 ($\approx 96\%$)



Slika 77. Primena OMIS-a u odnosu na testiranje nulte hipoteze

5. DISKUSIJA

Poslednjih decenija poseban akcenat stavljen je na razvoj novih tehnologija za pravovremenu i tačnu detekciju ćelija karcinoma u humanom tkivu. Upravo sa radom na unapređenju rane dijagnostike, skrining programa, molekularnih analiza, inovativnih tehnika i pametnih uređaja, težnja stručne i šire javnosti konstantno je usmerena na pronalaženje rešenja koja bi na efikasan, neinvazivan, brz i isplativ način mogla zameniti neke od ustaljenih metoda analize prekanceroznih i kanceroznih stanja. Veoma dinamična sfera novih istraživanja po tom pitanju jeste i oblast onkologije usne duplje, sa naročitim interesovanjem za dijagnostiku i lečenje oralnog planocelularnog karcinoma.

Osim rastućeg broja studija koje govore o potencijalnom značaju neoplastičnih promena koje se odvijaju na molekularnom nivou, dobar deo novijih ispitivanja fokusiran je na podatke koji se o malignoj transformaciji tkiva u usnoj duplji mogu dobiti njihovom neposrednom interakcijom sa svetlosti, tj. primenom optičkih metoda. Potreba za novim pristupom javila se iz nekoliko razloga. Prvi je rano i precizno uočavanje inicijalnih promena koje mogu ukazivati na oralni karcinom, drugi je poboljšanje prognoze lečenja i stope petogodišnjeg preživljavanja kod pacijenata obolelih od OPK-a, a treći je invazivna priroda i svrsishodnost primene nekih od tradicionalno korišćenih dijagnostičkih metoda.

Dok su neke od optičkih metoda poput onih zasnovanih na fluorescenciji i autofluorescenciji svoje mesto mahom našle kao pomoćne tehnike u ranoj dijagnostici oralnog karcinoma, druge su aktuelizovale jedan od najznačajnijih problema koji se javlja u sklopu hirurške terapije OPK-a, a to je pozitivan status hirurške margine, tj. histopatološki potvrđeno prisustvo ćelija karcinoma u graničnom uzorku tkiva (Shah i sar., 2012; Kain i sar., 2020). Osnovne premise njihove eventualne kliničke primene leže u neinvazivnoj prirodi procedure i tačnoj proceni stanja u kome se ispitivani uzorak tkiva (*ex vivo*) ili područje margine u usnoj duplji (*in vivo*) nalaze u realnom vremenu i u toku samog sprovođenja hirurškog postupka. Na ovaj način teži se pronalaženju optičke metode koja bi mogla predstavljati alternativu standardnom postupku histopatološke evaluacije koji se izvodi postoperativno. Takođe, njihovom upotrebom i automatizacijom procesa donošenja odluke želi se premostiti negativan uticaj netačnih nalaza, tj. grešaka do kojih dolazi primenom *ex tempore* dijagnostičke metode i grešaka nastalih kao posledica subjektivne procene hirurga i patologa. One se u slučaju *ex tempore* dijagnostike, inače najčešće primenjivane u toku trajanja hirurškog zahvata, najbolje oslikavaju kroz tačnost od svega 38% (Gerber i sar., 2011; Abbas i sar., 2017). Njena neisplativost (oko \$3000/pacijent) daje dodatni impuls potencijalnoj primeni jeftinijih, a opet efikasnijih optičkih metoda (DiNardo i sar., 2000).

Dosadašnja istraživanja u oblasti procene statusa hirurške margine kod oralnog karcinoma pored ostalih obuhvatila su primenu optičkih metoda zasnovanih na elastičnom i Ramanovom rasejanju, na apsorpcionim karakteristikama određenih hromofora, fenomenu interferencije i efektima fluorescencije. I pored obećavajuće efikasnosti u prepoznavanju tkiva karcinoma i normalnog tkiva (tipova tkiva) u usnoj duplji, kod svih pomenutih metoda uočeni su određeni nedostaci koji i dalje ograničavaju njihovu standardnu kliničku primenu. U neke od najznačajnijih spadaju mali opseg analiziranog tkiva, mala dubina prodiranja svetlosti, dugo procesuiranje podataka, izostanak automatizacije procesa donošenja odluke, uticaj izražene keratinizacije, varijabilnost parametara, niska senzitivnost i neisplativost (Smith i Dent, 2005; Sharwani i sar., 2006; Vila i sar., 2012; Muldoon i sar., 2012; Tu i Chang, 2012; Cals i sar., 2013; Hamdoon i sar., 2013).

Trenutni domet postojećih optičkih metoda nametnuo je potrebu pronalaska nove metode kojom je moguće otkloniti navedene nedostatke i ponuditi efikasniji pristup automatizaciji procesa donošenja odluka u kliničkom i laboratorijskom okruženju.

Kao potencijalno rešenje pomenutog problema, u okviru ovog istraživanja primenjena je inovativna optička metoda - optomagnetna imidžing spektroskopija (OMIS). Ovo je ujedno i prva studija u kojoj je OMIS metoda implementirana na tkivima u usnoj duplji. Do sada je, kada je reč o humanim tkivima, ona korišćena u analizi tkiva kože, grlića materice i debelog creva (Koruga i sar., 2012; Jeftić i sar., 2017; Jeftić, 2017; Dragicević i sar., 2019).

Broj ispitanika (n=25) uključenih u ovu studiju odgovara podacima sličnih istraživanja u oblasti primene optičkih metoda u analizi mekotkivnih struktura u usnoj duplji. On je u prvom slučaju nešto niži u odnosu na studije sa primenom mikroendoskopije visoke rezolucije (HRME) (n=38), optičke koherentne tomografije (OCT) (n=28), a veći u poređenju sa ispitivanjima efikasnosti spektroskopija zasnovanih na Ramanovom (RS) (n=10-21) i elastičnom rasejanju (ESS) (n=20) (Sharwani i sar., 2006; Vila i sar., 2012; Barroso i sar., 2015; Cals i sar., 2015; Cals i sar., 2016; Hamdoon i sar., 2016). U odnosu na broj uzoraka nativnog tkiva (n'=60), svakako treba istaći dosta veći broj u studiji koju su Hamdoon i saradnici sprovedi koristeći OCT metodu (n'=112), dok je broj uzoraka kod primene OMIS-a značajno veći od onog u studijama u kojima je primenjena Ramanova spektroskopija (n'=25-44) (Cals i sar., 2015; Cals i sar., 2016; Hamdoon i sar., 2016; Barroso i sar., 2016). Ako uporedimo njen broj sa ispitivanjima primene OMIS-a na tkivima grlića materice (n'=320-454) i debelog creva (n'=316), onda je on značajno manji, što je opet u skladu i sa značajno većom prevalencijom karcinoma u pomenutim anatomskim regijama (Jeftić i sar., 2017; Jeftić, 2017; Bray i sar., 2018; Dragicević i sar., 2019).

Sa aspekta bojjenih preparata, broj (n=857) korišćen u ovom istraživanju manji je od broja preparata korišćenim u primeni OMIS-a na tkiva grlića materice (n=1672), kao i u poređenju sa drugim studijama čiji je jedan od ciljeva i automatizacija procesa histopatološke evaluacije. Takav je recimo primer dijagnostike karcinoma pluća na osnovu baze bojjenih preparata čiji je broj iznosio preko 2000 (Yu i sar., 2016; Jeftić i sar., 2017; Jeftić, 2017).

U odnosu na princip rada i biofizičke osnove na kojima se zasniva, primena OMIS metode na tkivima u usnoj duplji povlači sa sobom brojne inovativnosti. Prva je da se u poređenju sa svim drugim metodama, osim delimično optičkom koherentnom tomografijom, za opis stanja tkiva koriste efekti neto apsorpcije i neto emisije svetlosti. U praktičnom smislu, njihovi nalazi nisu uslovljeni doprinosom samo jednog fenomena interakcije svetlosti i tkiva. Tako se npr. u odnosu na RS metodu koja koristi efekte isključivo Ramanovog rasejanja, kod OMIS-a u obzir uzimaju celokupni efekti rasejanja na putu svetlosti kroz tkivo, koji mahom pripadaju nekom od tipova elastičnog rasejanja svetlosti - Rejljevom ili Mia. U pogledu apsorpcije se za razliku od endoskopije uskog snopa i drugih fluorescencija, koje se oslanjaju na karakteristike apsorpcije određene hromom ili fluorofore, kod OMIS-a posmatraju doprinosi različitih komponenata i struktura u tkivu.

Optička aktivnost kod svih metoda ovog tipa diktirana je određenom biofizičkom osnovom. Tako je kod Ramanove spektroskopije, ramanovo rasejanje u tkivima usne duplje definisano odnosom sadržaja proteina i lipida u tkivu, kao i manjim ili većim sadržajem vode u njemu. Kod endoskopije uskog snopa (NBI) uslovljeno je većim ili manjim prisustvom hemoglobina, a recimo kod OCT metode debljinom epitela i stanjem bazalne membrane (Wu i sar., 2018; Kain i sar., 2020). U poređenju sa njima, OMIS je jedinstven po tome što su efekti

apsorpcije i rasejanja (emisije) svetlosti analogni obliku magnetizma koji preovlađuje u uzorku - dija ili paramagnetizmu. Iako se radi o fizičkim fenomenima kvantne prirode, oni su ipak uslovljeni prisustvom ili odsustvom sličnih faktora kao i u pomenutim optičkim metodama. Najznačajniji od njih svakako je sadržaj vode, a ne mali značaj imaju i hemoglobin, melanin, status bazalne membrane, prisustvo slobodnih radikala kao i promene koje na ćelijskom nivou nastaju kao posledica patološke transformacije tkiva. Kada je reč o analizi bojениh uzoraka OMIS metodom, optička aktivnost i oblik magnetizma prisutan u preparatu u zavisnosti su od odnosa hematoksilin i eozin vezanih struktura, slično kao i u slučaju primene OMIS-a na bojene uzorke tkiva grlića materice (Jeftić i sar., 2017; Jeftić, 2017).

Tehnička rešenja prilagođena principu rada u okviru OMIS metode najviše se razlikuju od drugih metoda ovog tipa u pogledu dubine penetracije svetlosti i maksimalnog opsega analize, tj. površine tkiva dostupne digitalnom slikanju. U odnosu na Ramanovu spektroskopiju kod koje je u pojedinačnoj analizi moguće obuhvatiti područje tkiva dijametra od svega 2 μm do 3,5 mm, kod OMIS-a ono je prečnika do 25 mm (Koruga i Tomić, 2009; Cals i sar., 2013; Cals i sar., 2015; Barroso i sar., 2015; Guze i sar., 2015; Cals i sar., 2016). I u poređenju sa HRME (dijametar do 1,4 mm) i ESS metodama (dijametar do 2 mm), OMIS po ovom pitanju poseduje veće mogućnosti (Sharwani i sar., 2006; Pierce i sar., 2011; Grillone i sar., 2017). Dubina penetracije upadne svetlosti od 3 do 5 mm kod OMIS metode je takođe veća od one prisutne kod OCT (do 1,5 mm), HRME (50 μm), ESS (oko 1 mm) i svih drugih metoda ograničenih na površinske slojeve tkiva (metode zasnovane na florescenciji i autofluorescenciji, endoskopija uskog snopa) (Sharwani i sar., 2006; Tsai i sar., 2008; Jerjes i sar., 2010; Pierce i sar., 2011; Hamdoon i sar., 2013). OMIS se od pojedinih metoda, kao što je Ramanova spektroskopija razlikuje i u vremenu procesuiranja podataka i dobijanja rezultata. Kod Ramanove spektroskopije je u određenim istraživanjima bilo potrebno 67 sati kako bi se dobili rezultati pojedinačnog eksperimenta, dok se primenom OMIS metode oni mogu dobiti u roku od 5 minuta (Cals i sar., 2013).

U pogledu informacija prikupljenih primenom optičkih metoda, podaci dobijeni OMIS metodom kvalitativno su najbliži onima kod primene Ramanove spektroskopije i ESS metode, tj. spektroskopskim metodama. Kako bi se izbegla mogućnost grešaka, tj. subjektivnog tumačenja rezultata, kao što je to npr. slučaj sa NBI metodom, pribegava se automatizaciji samog procesa donošenja odluke. U te svrhe u ovoj studiji korišćeni su algoritmi koji se zasnivaju na metodama mašinskog učenja. Ovi algoritmi ponašaju se slično ljudima - učenjem različitih ulaznih principa (spektri) razvijaju sposobnost samostalnog donošenja odluke. Uz ovu, oni u odnosu na standardne statističke metode poseduju još jednu prednost - princip generalizacije. On podrazumeva da procesom učenja, tj. treniranja na dovoljnoj količini informacija mogu donositi tačne odluke i kada se izlože podacima sa kojima pre toga nisu imali kontakt.

Algoritmi korišćeni u ovom istraživanju odgovaraju algoritmima primenjenim i u drugim OMIS studijama na uzorcima humanog tkiva. U poređenju sa studijom na tkivu grlića materice primenjeno je nekoliko istih algoritma - metod naivnog bajesa (NB), stablo odlučivanja (DT), metod "slučajne šume" (RF) i metod potpornih vektora (SVM) (Jeftić, 2017). U odnosu na OMIS analize uzoraka sluzokože debelog creva ovde su takođe korišćeni metod naivnog bajesa i metod višeslojne neuralne mreže (Dragicevic i sar., 2019). U tom pogledu, novitet u ovom istraživanju predstavlja primena algoritma "duboke neuralne mreže" iz programske dokumentacije H2O 3 platforme za mašinsko učenje (DL). U odnosu na druge optičke metode, poput ESS-a, a po ugledu na studiju koju su sproveli Grillone i saradnici i u ovom istraživanju primenjena je metoda potpornih vektora (Grillone i sar., 2017).

Kada je reč o RS metodi, u istraživanjima je uglavnom korišćena linearna diskriminantna analiza (LDA) u kombinaciji sa metodom K-srednjih vrednosti koje su se za takav skup podataka pokazale najoptimalnijim (Cals i sar., 2015; Cals i sar., 2016). U odnosu na mere kvaliteta klasifikacione efikasnosti algoritama, u ovom istraživanju upotrebljeni su isti parametri kao i u drugim pomenutim studijama koje su obuhvatile primenu OMIS-a i u skladu su i sa svim prethodno korišćenim optičkim metodama na uzorcima tkiva u usnoj duplji - tačnost, senzitivnost, specifičnost i vrednost AUC. Za razliku od drugih, u okviru ove studije korišćeni su i neki od parametara dijagnostičkog značaja - odnos verovatnoće i dijagnostički odnos šansi, kako bi se ocenio trenutni status potencijalne primene OMIS-a u kliničkom okruženju. Po ugledu na studiju koju su sprovedeli Yu i saradnici, sprovedeno je rangiranje algoritama kako bi se utvrdilo da li se efikasnost algoritama po određenim parametrima razlikuje i da li su te razlike statistički značajne (Yu i sar., 2016). Kako u ovom istraživanju podaci nisu normalno distribuirani, za potrebe rangiranja korišćeni su neparametarski Fridmanov test u kombinaciji sa Nemenji testom (Demšar, 2006).

Koliko je OMIS efikasan u razlikovanju tkiva karcinoma (OPK) i normalnog tkiva u usnoj duplji procenjeno je oblikom magnetizma koji u nativnim i bojenim uzorcima tkiva preovlađuju, faktorima koji na magnetnu aktivnost utiču i kvantifikacijom tih razlika kroz primenu automatizovanih algoritama.

Optomagnetni spektri kod nativnih uzoraka

Kada je reč o nativnim uzorcima, na slici 43 mogu se uočiti jasne razlike u magnetnom ponašanju uzoraka tkiva oralnog karcinoma i normalnog tkiva u hirurškim marginama, što potvrđuju i rezultati primene automatizovanih algoritama - tačnost do 89% i vrednost AUC do 0,988.

Uzorci karcinoma pokazuju izražene paramagnetne osobine u područjima od 100 do 110 nm razlike talasnih dužina, a zatim i nešto manju paramagnetnu aktivnost u području oko 120 nm razlike talasnih dužina. U istim delovima optomagnetnog spektra uzorci normalnog tkiva pokazuju neznatan paramagnetizam. Treba istaći da pomenuto ponašanje uzoraka tkiva OPK-a nije iznenađujuće i da verovatno, kada je reč o OMIS-u, odgovara uticaju prisustva povećanog sadržaja vode koji promenom indeksa prelamanja svetlosti sredine povećava efekat rasejanja prilikom njenog prolaska kroz tkivo. Povećan sadržaj vode, koji je generalno karakterističan za karcinome, takođe je registrovan i u studiji koju su primenom Ramanove spektroskopije na hirurškim marginama kod OPK-a sprovedeli Barroso i saradnici. Osim pomenutog, višak vode dovodi i do ekscitacije proteinskih struktura. Veći broj novoformiranih vodoničnih veza dovodi se u vezu sa većim brojem nesporenih elektrona, koji sa druge strane predstavljaju osnovu paramagnetnog ponašanja. Drugi mogući razlog je aktivan proces neoplastične transformacije u tkivu, koji je sličan tumačenju rezultata kod primene ESS metode. U slučaju porasta vrednosti DNK materijala u ćelijama, veći je i stepen refleksije svetlosti, što direktno utiče na pojavu pozitivnih spektralnih pikova koji su analogni paramagnetizmu u uzorku. Od ostalih faktora koji doprinose paramagnetnoj aktivnosti vredni spomenuti povećan sadržaj slobodnih radikala u tkivu OPK-a, što opet za posledicu ima i povećan broj nesporenih elektrona. U odnosu na lokalizaciju karcinoma, izgled optomagnetnog spektra na slici 44 ukazuje da najveći doprinos izraženom paramagnetizmu u okviru ove klase daju uzorci OPK-a obrazne sluzokože, a da je u odnosu na stepen diferencijacije OPK-a ovaj efekat najdominantniji kod slabo diferenciranih karcinoma (slika 45).

Osim jasne razlike u paramagnetnom ponašanju karcinomom izmenjenog i normalnog tkiva u usnoj duplji, evidentne su i one po pitanju njihovog dijamagnetizma. Naime, u regionu od 110 do 115 nm razlike talasnih dužina pojavljuje se zona dijamagnetne aktivnosti kod oba tipa uzoraka analiziranih u okviru ovog istraživanja (slika 43). Primetno je da uzorci tkiva OPK-a pokazuju izraženiju dijamagnetnu aktivnost od one registrovane kod uzoraka normalnog tkiva. Glavni razlog jeste povećano prisustvo hemoglobina, koji iako po prirodi paramagnetik, vezivanjem kiseonika postaje dijamagnetik. Ova pojava gotovo sigurno posledica je aktivnog procesa angiogeneze, tj. stvaranja novih krvnih sudova, karakterističnih za tkivo karcinoma i tekući proces karcinogeneze. Povećano prisustvo hemoglobina u tkivima OPK-a dokazano je i primenom endoskopije uskog snopa. Kao i u pogledu paramagnetnog ponašanja, karcinomi obrazne sluzokože najviše doprinose dijamagnetizmu na nivou klase uzoraka tkiva OPK-a (slika 44), dok je izolovana dijamagnetna aktivnost primetna i kod uzoraka karcinoma retromolarnog trougla. U odnosu na stepen diferencijacije svi tipovi uzoraka pokazuju sličnu dijamagnetnu aktivnost, sa izuzetkom izolovanog dijamagnetizma kod slabo diferenciranih karcinoma (slika 45).

Razlike u optomagnentim spektrima u odnosu na lokalizaciju karcinoma diktirane su i histološkom građom neizmenjenog tkiva u uzorku. Za očekivati je da rasejanje svetlosti bude izraženije kod mastikatorne i delom specijalizovane sluzokože u odnosu na zastornu, čija je bazalna membrana gotovo ravna. Drugačija građa epitela, kao i različit stepen prokrvljenosti i prisustva kolagenih i elastičnih vlakana u lamini proprii takođe govore u prilog njihovom doprinosu magnetnoj aktivnosti tkiva. Ipak, dosta ograničen magnetizam kod klase normalnog tkiva ukazuje da ipak predominantnu ulogu u spektru uzoraka karcinoma poseduju ćelije karcinoma i celokupna patološka i biohemijska transformacija koja se u tkivu odvija (slika 43). Ne treba zaboraviti ni uticaj koji na spektar ima i prisustvo drugih tipova tkiva - mišićnog, masnog, koštanog i žlezdanog, što je i predstavljalo motivaciju da se u okviru ovog istraživanja ispituju razlike koje u njihovom spektru eventualno postoje u odnosu na onaj kod karcinoma. Pomenuti faktori naročito dolaze do izražaja kada uporedimo optomagnente spektre kod OPK-a i karcinoma grlica materice i debelog creva, gde uzorci OPK-a pokazuju izraženije paramagnetne i dijamagnetne karakteristike.

Automatizacija procesa donošenja odluke kom tipu (karcinom ili normalno) pripadaju analizirani nativni uzorci

Kada su navedene kvalitativne osobine i razlike optomagnetnog spektra uzoraka OPK-a i uzoraka normalnog tkiva pretočene u njihovu kvantitativnu, tj. klasifikacionu verziju dobijen je pravi uvid u njihovu realnu vrednost. Svih šest primenjenih algoritama na osnovu vrednosti AUC govori u prilog činjenici da OMIS poseduje odgovarajuću diskriminatornu moć prilikom poređenja nativnih uzoraka tkiva OPK-a i normalnog tkiva u usnoj duplji. Kod dva algoritma (NB, SVM) ona je odlična, kod RF metode veoma dobra, u slučaju DL algoritma dobra, a u pogledu DT i NN metoda prihvatljiva (tabela 11.1). Od svih metoda mašinskog učenja primenjenih na test skup OMIS podataka dobijenih na nativnim uzorcima u usnoj duplji, metod naivnog bajesa predstavlja algoritam izbora po gotovo svim analiziranim parametrima klasifikacione efikasnosti (slika 55). U pogledu tačnosti od 88,89%, specifičnosti od 88,89% i vrednosti AUC od 0,988 NB metoda najbolje razlikuje tkivo karcinoma od normalnog tkiva u hirurškim marginama. Sa aspekta senzitivnosti, tri metode - naivni bajes, metod "slučajne šume" i metod potpunih vektora pokazuju istu efikasnost (88,89%) u prepoznavanju uzoraka tkiva OPK-a. Po navedenom parametru DT metoda pokazala se manje efikasnom od ostalih, dok su po vrednosti specifičnosti najslabiji NN i DL algoritmi (tabela

11.1). Izgled ROC kriva odgovara vrednostima AUC. Tamo gde su one najniže, kao što je slučaj sa NN algoritmom (0,605), ROC kriva je bliže dijagonali slučajnog ishoda, dok je kod NB metode njen vrh najbliži gornjem levom uglu grafika, ukazujući na najbolju diskriminatornu moć (slika 56). U poređenju sa drugim optičkim metodama korišćenim na istim klasama tkiva u usnoj duplji navedeni rezultati su sličnih vrednosti. Bolji su u odnosu na rezultate studija koje su primenjujući ESS metodu sprovedi Sharwani (senzitivnost 72%; specifičnost 75%) i Grillone (senzitivnost 84%; specifičnost 71%) sa saradnicima, a delimično bolji u odnosu na rezultate studije koju su primenom Ramanove spektroskopije sprovedi Cals i saradnici (tačnost 86%; senzitivnost 100%; specifičnost 66%) (Sharwani i sar., 2006; Cals i sar., 2016; Grillone i sar., 2017). Ako ih uporedimo sa rezultatima dobijenih primenom OCT i HRME metode, može se reći da su u prvom slučaju slični (tačnost 88%; senzitivnost 81,5%; specifičnost 87%), a u drugom nešto lošiji (tačnost 95,1%; senzitivnost 96%; specifičnost 95%) (Miles i sar., 2015; Hamdoon i sar., 2016). Kada rezultate dobijene u ovom istraživanju stavimo u kontekst rezultata primene OMIS-a u studiji sa tkivom sluzokože grlića materice, oni su po većini parametara slični (tačnost do 96%; senzitivnost do 82%; specifičnost do 97%; vrednost AUC do 0,931) (Jeftic i sar., 2017). U odnosu na studiju sa tkivom sluzokože debelog creva oni su gotovo istih vrednosti kod NB algoritma (tačnost 89,87%; senzitivnost 92,11%; specifičnost 87,8%; vrednost AUC 0,917), a lošiji ako uporedimo primenu neuralne mreže i duboke neuralne mreže u ovoj studiji, sa upotrebom višeslojne perceptron neuralne mreže kod tkiva debelog creva (tačnost 92,59%; senzitivnost 96,3%; specifičnost 88,89%) (Dragicevic i sar., 2019).

Zahvaljujući visokim vrednostima senzitivnosti i specifičnosti, NB algoritam u ovom istraživanju poseduje i najviše vrednosti OV+ (8,0) i DOŠ parametara (66,66), kao i najniže vrednosti OV- parametra (0,12) (tabela 11.2). Njihov praktični smisao dolazi do izražaja kada OMIS metoda registruje neki uzorak tkiva kao karcinom (pozitivan rezultat primene OMIS-a), odnosno kada pokaže da se u nekom uzorku tkiva karcinom ne nalazi (negativan rezultat primene OMIS-a). Za pozitivan rezultat primene OMIS-a kod NB i SVM algoritama, vrednosti OV+ od 8,0 i 7,0 podižu verovatnoću da je u uzorku prisutan karcinom sa bazičnih 50% (udeo uzoraka OPK-a u test skupu korišćenom u ovom istraživanju) na 88,88 i 87,5%, dok se u slučaju referentne vrednosti od 20,56% (% pozitivnih margina na osnovu referentnih studija) ona podiže na 67,43 i 64,43%. Kada je rezultat primene OMIS-a negativan, tada se na osnovu vrednosti OV- parametra od 0,12, kod NB algoritma može reći da je verovatnoća da se u uzorku tkivu nalazi karcinom opala sa 50 na 10,71%, odnosno sa 20,56 na 3,01% (tabela 11.2).

Optomagnetni spektri kod bojjenih uzoraka - karcinom/prelaz/normalno

Kada je u pitanju interpretacija magnetnog ponašanja kod bojjenih preparata OPK-a i normalnog tkiva u hirurškim marginama treba istaći da su razlike među njima mahom definisane odnosom struktura u tkivu vezanih za hematoksin, odnosno eozin.

Zajednička karakteristika svih bojjenih preparata normalnog tkiva jeste inicijalno izraženi paramagnetizam. Na ovakvo ponašanje ukazuje veće prisustvo eozin bojjenih komponenti u odnosu na preparate OPK-a, što i nije iznenađujuće ukoliko se zna da se i mišićno i vezivno, kao i koštano tkivo boje nijansama roze i crvene. Ono je pre svega posledica prirode hemijske veze (Van der Valsova privlačenja) eozina i odgovarajućih struktura u tkivu, ali i činjenice da je u svom ekscitiranom stanju i sam eozin paramagnetik (Harryvan i sar., 1996). Pomenuti trend prisutan je i kada se optomagnetni spektri za različite tipove normalnog tkiva posmatraju kao jedinstvena grupa u poređenju sa tkivom koje sadrži ćelije

karcinoma (slike 46 i 47), kao i kada se svaki tip normalnog tkiva analizira zasebno u poređenju sa uzorcima koji sadrže pretežno tkivo OPK-a (slike 49, 50, 51, 52 i 54). Doprinos eozin bojenih struktura posebno je uočljiv prilikom poređenja tri kategorije analiziranih preparata - različitih tipova normalnog tkiva, uzoraka koji sadrže i normalno i tkivo OPK-a (kategorija prelaznih uzoraka) i uzoraka koji pretežno sadrže tkivo OPK-a. Na slici 47 vidi se da optomagnetni spektar uzoraka koji sadrže pretežno tkivo OPK-a pokazuje na početnim pozicijama izraženu dijamagnetnu aktivnost, za razliku od kategorije prelaznih i uzoraka normalnog tkiva kod kojih je ona inicijalno paramagnetne prirode. Pomenuti dijamagnetizam kod uzoraka sa naglašenim sadržajem tkiva karcinoma najverovatnije je uzrokovan povećanim prisustvom kovalentnih veza ostvarenih između kompleksa hemaluma i DNK molekula u ćelijama karcinoma (Bettinger i Zimmermann, 1991). Pozitivno naelektrisani aluminijum stupa u reakciju sa negativno naelektrisanim fosforinim grupama što dovodi do sparivanja elektrona i inicira dijamagnetnu aktivnost. Sa druge strane, stepen paramagnetnog ponašanja prelaznih uzoraka dosta je niži od onog koji je karakterističan za grupu uzoraka koji sadrže različite tipove normalnog tkiva. Navedeni opis optomagnetnog spektra ukazuje na mogućnost da se kod bojenih preparata nivo paramagnetizma, tj. emisije svetlosti uvećava sa doprinosom eozin bojenih struktura, dok se nivo dijamagnetizma, tj. apsorpcije svetlosti uvećava sa doprinosom hematoksilin bojenih struktura.

U daljem toku optomagnetnog spektra, bojeni preparati normalnog i karcinomom izmenjenog tkiva ne pokazuju izraženije razlike (slika 46). Ipak, kada se dalji tok spektra posmatra u odnosu na tri kategorije uzoraka (slika 47) prisutna je slična paramagnetna aktivnost kod preparata normalnog i prelaznog tkiva između 110 i 115 nm razlike talasnih dužina, dok je isto ponašanje uzoraka koji sadrže pretežno tkivo OPK-a prisutno između 115 i 120 nm. Pomenuto pomeranje pozicije paramagnetne aktivnosti kod tkiva OPK-a analogno je i dijamagnetnom ponašanju tri grupe uzoraka u regiji od 120 do 130 nm. Tako je dijamagnetizam normalnog i prelaznog tkiva prisutan na 120 nm, dok preparati koji pretežno sadrže tkivo OPK-a apsorbuju svetlost u području od 125 do 130 nm. Kada se optomagnetni spektar posmatra iz perspektive stepena diferencijacije oralnog planocelularnog karcinoma, kao što je to slučaj sa prikazom tri spektra na slici 48, može se primetiti da osim izraženijeg paramagnetizma zastupljenog kod grupe uzoraka slabo diferentovanog OPK-a, nema većih razlika u magnetnom ponašanju i distribuciji spektra kod dobro, srednje i slabo diferentovanih karcinoma.

Automatizacija procesa donošenja odluke kom tipu (karcinom/prelaz/normalno) pripadaju analizirani bojeni uzorci

Kada razlike u optomagnetnim spektrima preslikamo na klasifikacionu efikasnost primenjenih algoritama rezultati ukazuju da je u gotovo svim slučajevima moguće ostvariti dobru diskriminatornu moć ($AUC > 0,8$) između analiziranih klasa uzoraka.

U odnosu na poređenje svih dostupnih preparata tkiva OPK-a i svih tipova normalnog tkiva u usnoj duplji, metod "slučajne šume" se u pogledu ukupne tačnosti od 74,71% pokazao neznatno efikasnijim među primenjenim algoritmima (tabela 12.1). NB i SVM metode najbolje prepoznaju uzorke koji sadrže tkivo karcinoma. Njihova senzitivnost iznosi 82,47%. Sa druge strane, samo je kod DL metode registrovana specifičnost veća od 80% (81,55%). Kada je reč o vrednosti AUC, četiri metode imaju slične vrednosti u opsegu od $\pm 0,23$ - RF, DL, NN i SVM algoritam (slika 57). Među pomenutim, samo je vrednost AUC kod RF metode iznad 0,8 (0,808), što potvrđuje i vrh ROC krive koji je najbliži gornjem levom uglu grafika, obezbeđujući mu na taj način veoma dobru diskriminatornu moć (slika 58). U poređenju sa

rezultatima OMIS-a na bojenim uzorcima dve klase tkiva grlića materice (karcinom i normalno) sa tačnosti od 57,98%, senzitivnosti od 79,17%, specifičnosti od 27,61 i vrednosti AUC od 0,6775 za RF algoritam rezultati su nešto bolji (Jeftić, 2017). Kada algoritme primenimo na klase preparata koje sadrže tkivo karcinoma, jednu u kojoj je pretežno tkivo OPK-a i drugu u kojoj su podjednako zastupljeni tkivo OPK-a i različiti tipovi normalnog tkiva (kategorija prelaznog tkiva), najbolje rezultate po svim parametrima ostvaruje SVM algoritam - tačnost od 82,43%, senzitivnost od 82,35%, specifičnost od 82,5% i vrednost AUC od 0,870 (tabela 13.1, slika 59). Veoma dobru diskriminatornu moć pored ovog pokazuju još i RF, NN i DL algoritmi, dok se oni zasnovani na NB i DT metodama mogu smatrati klasifikatorima dobre, odnosno prihvatljive diskriminatorne moći. Trend visoke klasifikacione efikasnosti SVM metode prisutan je i prilikom poređenja podataka prikupljenih primenom OMIS metode na klase "prelaznih" i uzoraka različitih tipova normalnog tkiva. Ovom metodom ostvarene su najviše vrednosti tačnosti (82,52%), specifičnosti (91,26%) i AUC-a (0,855). Ono što je karakteristika svih algoritama u ovom slučaju jeste i niža senzitivnost, koja samo u slučaju DL algoritma prelazi 70% (72,5%) (tabela 14.1, slika 61). U oba poređenja vrh ROC krive najbliži je levom gornjem uglu grafika u slučaju SVM algoritma, a najbliži dijagonali slučajnog ishoda kod primene DT algoritma (slike 60 i 62).

Kao i kod procene praktičnog značaja automatizacije procesa odlučivanja (primene algoritama) kod nativnih uzoraka, tako je i kod bojenih preparata moguće na ovaj način interpretirati dobijene rezultate. U tom kontekstu vrednost OV- parametara od 0,29 govori da se primenom RF algoritma u slučaju negativnog rezultata primene OMIS-a najviše smanjuje verovatnoća da se u preparatu nalazi karcinom - sa 59,92% (bazična vrednost) na 30,24% i sa 20,56% (referentna vrednost) na 6,98%. Sa druge strane, vrednost OV+ od 3,59 kod DL algoritma ukazuju, da se u slučaju pozitivnog rezultata primene OMIS-a, verovatnoća da je karcinom prisutan u uzorku povećava sa 59,92 na 84,29% i sa 20,56 na 48,16% (tabela 12.2). Ako analiziramo scenarije pozitivnog i negativnog rezultata primene OMIS-a prilikom poređenja klase prelaznog i klase normalnog tkiva, tada se u slučaju prvog verovatnoća povećava sa 27,97 na 70,5% i sa 20,56 na 61,45% za vrednost OV+ od 6,16 kod SVM algoritma, dok se u slučaju drugog ona smanjuje sa 27,97 na 11,04% i 20,56 na 7,64% za vrednost OV- od 0,32 kod DL algoritma (tabela 14.2). U oba primera najvišu vrednost DOŠ-a ima algoritam zasnovan na metodi dubokih neuralnih mreža (DL) - 8,75 i 15,53, što nam iz ugla automatizacije govori da pomenuti algoritam kod ovih poređenja potencijalno ima najveći praktični značaj.

Optomagnetni spektri kod bojenih uzoraka - karcinom/različiti tipovi normalnog tkiva

Poređenja optomagnetnog spektra bojenih uzoraka koji sadrže pretežno tkivo OPK-a sa pojedinačnim spektrima bojenih uzoraka različitih tipova normalnog tkiva otvaraju mogućnost novih zapažanja kada je reč o njihovom magnetnom ponašanju.

Tako se na slikama 49 i 50 može uočiti gotovo analogna distribucija spektra preparata klase normalnog epitelnog i vezivnog tkiva (slika 49) i normalnog mišićnog tkiva (slika 50). Obe klase uzoraka pokazuju isto početno paramagnetno ponašanje i sličan dalji tok optomagnetnog spektra u poređenju sa spektrom uzoraka karcinoma. Neznatne razlike javljaju se u nešto ranijoj paramagnetnoj aktivnosti mišićnog tkiva u odnosu na uzorke epitelnog i vezivnog tkiva (mišićno na oko 112 nm, a epitelno i vezivno tkivo na oko 115 nm razlike talasnih dužina) i izraženijem dijamagnetizmu mišićnog tkiva na 120 nm. Kada na pomenute nalaze nadovežemo i one na slikama 51, 52 i 54, a koji prikazuju spektre masnog, koštanog i tkiva pljuvačne žlezde, primetno je da najizraženiji inicijalni paramagnetizam

pokazuju preparati masnog tkiva, praćeni uzorcima tkiva pljuvačnih žlezda i uzorcima koštanog tkiva. Treba istaći da sve tri navedene grupe u daljem toku spektra pokazuju smanjenu paramagnetnu aktivnost u odnosu na preparate epitelnog i vezivnog, kao i mišićnog tkiva, ali i primetnije dijamagnetno ponašanje na 105 i 120 nm razlike talasnih dužina u slučaju bojenih uzoraka masnog i koštanog tkiva. Posebno je interesantno ponašanje preparata masnog tkiva. Dok se za ostale grupe uzoraka može reći da je paramagnetizam posledica različitog afiniteta tkivnih komponenti prema eozinu, tj. njihovom eozinofilnom potencijalu, čini se da je u slučaju uzoraka masnog tkiva on najizraženiji usled izostanka vezivanja pomenutog tkiva i sa eozinom i sa hematoksilinom. Sa druge strane, dijamagnetizam je naročito prisutan na dve pozicije kod masnog i koštanog, kao i na jednoj kod preparata mišićnog tkiva. Kod uzoraka masnog tkiva on je moguća posledica prisustva tragova drugih tipova normalnog tkiva, ali i prisustva krvnih sudova, dok je kod koštanog verovatno reč o različitom odnosu zastupljenosti trabekularne kosti i koštane srži u analiziranim preparatima. U slučaju bojenih uzoraka tkiva pljuvačnih žlezda može se reći da optomagnetni spektar zavisi od zastupljenosti seroznih, odnosno mukoznih ćelija (mukociti) u njima. U okviru ovog istraživanja čini se da izraženi paramagnetizam govori u prilog većeg udela mukocita u korišćenim uzorcima koji poput ćelija masnog tkiva pokazuju slab afinitet prema hematoksilin eozin bojenju.

Poređenje optomagnetnog spektra bojenih uzoraka normalnog koštanog tkiva i spektra bojenih uzoraka koštanog tkiva sa potvrđenim prisustvom ćelija karcinoma u njima takođe govori u prilog stanovišta da je magnetno ponašanje bojenih preparata uslovljeno odnosom eozina i hematoksilina (slika 53). Intenzivnija početna paramagnetna aktivnost kod uzoraka normalnog koštanog tkiva ukazuje na smanjenu distribuciju eozina u preparatima infiltrisanog koštanog tkiva što pretpostavlja prisustvo hematoksilin bojenih jedara u ćelijama karcinoma prisutnih u preparatu. Dalji tok optomagnetnog spektra infiltrisanih uzoraka veoma je sličan i odgovara spektralnoj distribuciji u okviru klase bojenih uzoraka koji sadrže pretežno tkivo OPK-a. To se naročito ogleda kroz dijamagnetnu aktivnost u području od 120 do 130 nm razlike talasnih dužina (slika 53c).

Automatizacija procesa donošenja odluke kom tipu (karcinom/različiti tipovi normalnog tkiva) pripadaju analizirani bojeni uzorci

U kvantifikaciji optomagnetnog spektra različitih tipova normalnog tkiva i njihovih razlika sa spektrom uzoraka koji sadrže pretežno tkivo OPK-a, samo je u slučaju normalnog koštanog tkiva zabeležena odlična diskriminatorna moć kod svih primenjenih algoritama ($AUC > 0,9$) (slika 70). I pored malih razlika među njima, kod pomenutog poređenja najbolji rezultati ostvareni su primenom RF algoritma - tačnost od 91,07%, senzitivnost od 94,12%, specifičnost od 86,36% i vrednost AUC od 0,973 (tabela 18.1, slika 69). Koristeći ESS metodu, Jerjes i saradnici analizirali su prisustvo karcinoma u uzorcima formalinom fiksiranog koštanog tkiva i ostvarili nešto lošije rezultate - senzitivnost od 87 i specifičnost od 80% (Jerjes i sar., 2005). Ipak, ako iste rezultate uporedimo sa vrednostima senzitivnosti i specifičnosti kod razlikovanja preparata normalnog i karcinomom infiltrisanog koštanog tkiva za DL algoritam u ovom istraživanju (senzitivnost 70,37%; specifičnost 63,64%), onda su oni dosta lošiji (tabela 19.1, slika 71). Potrebno je takođe istaći da je u istom poređenju DT algoritam postigao senzitivnost od 92,59%, ali u kombinaciji sa veoma niskom specifičnosti (22,73%) i vrednosti AUC od 0,620. Samo dva algoritma su u ovom slučaju posedovala vrednosti AUC veće od 0,7 - NN i DL (slika 72).

Metod "slučajne šume" (RF) najbolje se pokazao i kada su za klasu normalnog tkiva korišćeni uzorci normalnog epitelnog i vezivnog, kao i preparati mišićnog tkiva. Kod prvih ostvarena je tačnost od 87,5%, senzitivnost od 97,06% (kao i za SVM i NN algoritme), specifičnost od 64,29% (veća je samo kod DT algoritma) i vrednost AUC od 0,891 (tabela 15.1, slika 63). Položaj vrha ROC krive potvrđuje veoma dobru diskriminatornu moć ovog algoritma (slika 64). U poređenju sa rezultatima primene Ramanove spektroskopije (za vezivno tkivo - tačnost od 93%, senzitivnost od 86%, specifičnost od 95%; za epitelno tkivo - tačnost od 75%, senzitivnost od 81%, specifičnost od 72%) oni su u ovoj studiji nešto bolji po pitanju senzitivnosti, a nešto lošiji po pitanju specifičnosti (Cals i sar., 2015). Kod mišićnog tkiva tačnost je iznosila 86,59%, senzitivnost 85,29%, specifičnost 87,5% a vrednost AUC 0,916, ukazujući na odličnu diskriminatornu moć RF algoritma u ovom poređenju (tabela 16.1, slika 65). Samo je još kod NN algoritma vrednost AUC najmanje 0,9, dok je jedino u slučaju DT metode ispod 0,8, što potvrđuje i izgled ROC kriva (slika 66). Navedeni rezultati su neznatno lošiji u odnosu na klasifikacionu efikasnost Ramanove spektroskopije koja uzorke karcinoma od uzoraka mišićnog tkiva razlikuje sa tačnosti od 97% (senzitivnost 97%; specifičnost 98%) (Cals i sar., 2015). U kvantifikaciji razlika spektra masnog i karcinomom izmenjenog tkiva kod tri algoritma postignuta je ista tačnost od 84,78% (DT, NN i DL). Senzitivnost je kod svih algoritama izuzetno visoka (97-100%), dok je specifičnost samo kod dva najmanje 50% (NN i DL) (tabela 17.1). Odličnu diskriminatornu moć poseduju SVM i NB algoritmi, što se vidi u vrednostima njihovog AUCa (0,929; 0,909) i položaju njihovih ROC kriva (slike 67 i 68). Pomenuti rezultati lošiji su od onih ostvarenih primenom Ramanove spektroskopije (tačnost, senzitivnost, specifičnost - 100%), s tim da su u pogledu senzitivnosti kod upotrebe pojedinih algoritama identični (Cals i sar., 2015). Kada se za klasu normalnog tkiva postave uzorci tkiva pljuvačnih žlezda četiri algoritma pokazuju istu tačnost od 82,93% (NB, RF, SVM, NN), visoke vrednosti senzitivnosti do 100% (RF i SVM), i izuzetno nisku specifičnost, koja je u tri slučaja 0% (DT, RF i SVM algoritmi) (tabela 20.1). Kod dva algoritma zabeležena je veoma dobra diskriminatorna moć (RF i NN), dok se na osnovu vrednosti AUC od 0,378 i položaja ROC krive ispod dijagonale slučajnog ishoda, DT algoritam može smatrati neupotrebljivim za ovaj skup podataka (slike 73 i 74). Sličan trend prisutan je i ako u obzir uzmemo rezultate Ramanove spektroskopije - senzitivnost od 100% i niža specifičnost od 65%, koja je opet značajno bolja od one postignute u ovom istraživanju (Cals i sar., 2015).

Efekti praktične primene OMIS-a na pomenutim grupama uzoraka normalnog tkiva najuočljiviji su u slučajevima registrovanja karcinoma u odnosu na normalno mišićno i koštano tkivo. Visoke vrednosti OV+ parametra od 6,82 i 6,9 za metod "slučajne šume" u slučaju pozitivnog rezultata primene OMIS-a dovode do povećanja verovatnoće da se analizirano tkivo može smatrati karcinomom, sa osnovnih 41,46% na 82,84% i sa referentnih 20,56 na 63,83% u slučaju mišićnog, odnosno do povećanja verovatnoće sa osnovnih 60,71 na 91,42% i sa 20,56 na 64,1% u slučaju koštanog tkiva (tabele 16.2 i 18.2). Po pitanju negativnog rezultata primene OMIS-a, upotrebom RF algoritma se kod preparata koštanog tkiva (OV-=0,07), smanjuje verovatnoća da je u njemu prisutno tkivo OPK-a sa 60,71 na 9,75% i sa 20,56 na 1,78 (tabela 18.2). Isti algoritam optimalan je za korišćenje i kod normalnog epitelnog i vezivnog tkiva, gde se u slučaju negativnog rezultata primene OMIS-a verovatnoća da se u tkivu nalazi karcinom smanjuje sa početnih 70,83 na 8,85% i sa 20,56 na 1,02% (tabela 15.2). Zanimljiva je i veoma niska vrednost OV- parametra u dva slučaja primene DT algoritma - kod mišićnog (OV-=0,05) i masnog tkiva (OV-=0,02) (tabele 16.2 i 17.2). Ona je pre svega definisana visokom senzitivnosti pomenutog algoritma prisutnom u oba poređenja. Iako su vrednosti AUC kod DT metode generalno niže u odnosu na ostale algoritme, to čini se ne utiče na njenu praktičnu primenu u pogledu verovatnoće da se u tkivu nalazi karcinom u

slučaju negativnog rezultata primene OMIS-a. Tako se npr. kod negativnog rezultata prilikom analize preparata masnog tkiva ona smanjuje sa početnih 73,91 na 5,36% i sa 20,56 na 0,51% (tabela 17.2). I pored nižih vrednosti OV+ parametra ovaj algoritam se u praktičnom smislu pokazao najboljim u datim okolnostima, što potvrđuju i vrednosti DOŠ-a od 44,4 kod mišićnog, odnosno 84,5 kod masnog tkiva (tabele 16.2 i 17.2). Sa druge strane, može se reći da je u praktičnom smislu OMIS u ovom trenutku najmanje upotrebljiv kod registrovanja ili isključivanja infiltracije kosti, kao i isključivanja prisustva karcinoma u tkivu pljuvačnih žlezda. U prvom slučaju, po svim parametrima on se nalazi iznad granice upotrebljivosti, ali sa nižim vrednostima OV+ i DOŠ parametara (OV+=1,94, DOŠ=4,22 za DL algoritam) i višim vrednostima OV- parametra (najniži OV- od 0,32 zabeležen je kod DT algoritma) (tabela 19.2). Treba istaći da je vrednost OV+ od 1,94 identična maksimalnoj vrednosti ovog parametra kod masnog tkiva te da je u pogledu verovatnoće da se u tkivu nalazi karcinom usled pozitivnog rezultata primene OMIS-a, efekat isti kod ovih grupa, ali u smislu ukupne praktične primenljivosti izraženiji kod masnog tkiva usled nižih vrednosti OV- parametra (tabele 17.2 i 19.2). Kod tkiva pljuvačnih žlezda OMIS se i pored registrovane visoke senzitivnosti i visokih vrednosti AUCa (RF i SVM algoritmi), u tri situacije može smatrati u potpunosti neupotrebljivim - kod primene DT, RF i SVM algoritama, dok u pogledu NB i NN algoritma pokazuje relativno dobre rezultate, a naročito u pogledu isključivanja prisustva karcinoma u uzorku (OV- od 0,2 i DOŠ od 5,65). Na ovaj način se u slučaju negativnog rezultata primene OMIS-a verovatnoća da je u tkivu pljuvačnih žlezda prisutan karcinom smanjuje sa bazičnih 82,92 na 49,25% i sa referentnih 20,56 na 4,92% (tabela 20.2).

Rangiranje algoritama - izbor algoritma koji OMIS metodi pruža najveći stepen klasifikacione efikasnosti

Kao što se vidi u analizama njihove klasifikacione efikasnosti i praktičnog značaja automatizacije procesa donošenja odluka, primenjeni algoritmi sa sobom nose širok opseg raznolikosti i značaja prilikom poređenja različitih skupova podataka dobijenih OMIS metodom. Iz pomenutih razloga prišlo se njihovom rangiranju ne bi li se utvrdilo da li su performanse nekog od njih superiornije ili inferiornije u odnosu na one karakteristične za druge.

Po pitanju parametara tačnosti i vrednosti AUC, za 10 sprovedenih poređenja u okviru ovog istraživanja, najbolje performanse vidljive su kod metode "slučajne šume" (RF) (tabele 21.1 i 22.1). U pogledu odnosa verovatnoće za pozitivan i negativan rezultat primene OMIS-a, kao i dijagnostičkog odnosa šansi, najbolje se pokazao algoritam zasnovan na "dubokoj neuralnoj mreži" (DL) (tabele 23.1, 24.1 i 25.1). Ako posmatramo prosečnu vrednost ranga svakog algoritma za svih pet parametara, tada metod "slučajne šume" sa vrednosti od 4,35 OMIS metodi obezbeđuje najviši stepen klasifikacione efikasnosti. Prate ga DL i SVM algoritmi, dok se najslabije pokazao DT algoritam (2,43) (slika 75).

Sa druge strane, ako se pomenuti rezultati stave u kontekst prisustva statistički značajnih razlika u performansama jednog ili više algoritama u odnosu na performanse ostalih, onda se samo u slučaju vrednosti AUC, superiornost ili inferiornost algoritma/ama može smatrati validnim. Naime, po vrednosti AUC registrovane su statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između RF, SVM i NN algoritama sa jedne i DT algoritma sa druge strane (tabela 22.2). Ovo ukazuje da je diskriminatorna moć DT algoritma statistički značajno manja u odnosu na onu kod tri pomenuta algoritma. To je primetno i na slici 76b na kojoj rang tri algoritma prelazi graničnu vrednost dobijenu sabiranjem vrednosti ranga najslabijeg algoritma po pitanju vrednosti AUC (DT) i kritične razlike prosečnog ranga od 2,4036. Iako se

NB i DL algoritmi nalaze ispod linije graničnog ranga, oni, niti su statistički značajno inferiorniji od RF, SVM i NN algoritama, niti su statistički značajno superiorniji od DT algoritma. Po drugim parametrima, iako su razlike vidljive, one statistički nisu značajne i ne preporučuju korišćenje jednog na uštrb drugog algoritma, što se može i videti na slici 76a, 76c, 76d i 76e, gde rang svih algoritama ne prelazi graničnu vrednost.

Naučni doprinos primene OMIS metode na uzorcima tkiva u usnoj duplji

Ovim istraživanjem, magnetne osobine nativnih i bojenih uzoraka tkiva u usnoj duplji prvi put su poslužile kao osnova za detekciju ćelija karcinoma u njima.

Karakteristike tkiva posmatrane su iz perspektive aktivnosti koje se u njemu odvijaju na kvantnom nivou - nivou hemijskih veza i prisustva ili odsustva elektronskih parova u njima. Ovakvo paramagnetno ili dijamagnetno ponašanje tkiva dovedeno je u direktnu vezu sa neto efektima njegove interakcije sa difuznom svetlosti korišćenom u okviru OMIS metode. Zahvaljujući dostupnoj literaturi i dosadašnjim istraživanjima definisana je jasna povezanost histološki normalne strukture ili faktora karcinogeneze sa pomenutim optičkim efektima - apsorpcijom i emisijom svetlosti. Prisustvo ili odsustvo karcinoma u normalnom tkivu hirurških margina na taj način stavljeno je u funkciju preovlađujućeg oblika magnetizma zastupljenog u njima. Kod bojenih uzoraka uspostavljena je jasna korelacija između sadržaja boja u preparatu i magnetizma registrovanog putem OMIS-a. Definisana je međuzavisnost dijamagnetne i paramagnetne aktivnosti i odnosa eozin i hematokislin vezanih struktura u tkivu. Na osnovu poznate hemijske osnove bojenja određenih komponenti u tkivu kada je ono normalno i kada je patološki izmenjeno definisano je koja od boja (hematoksilin ili eozin) u preparatima karcinoma i različitih tipova normalnog tkiva preovlađuje. Na taj način prisustvo karcinoma u tkivu dovedeno je u vezu sa magnetnim osobinama samih boja i kompleksa koje one formiraju sa različitim tkivnim elementima.

Primenom algoritama zasnovanih na metodama mašinskog učenja kvalitativno vidljive razlike u spektrima tkiva OPK-a i normalnog tkiva u usnoj duplji dobile su svoju kvantitativnu interpretaciju. Na taj način, validnost korišćenja magnetne aktivnosti u tkivu kao faktora za njihovo razlikovanje jasno je povezana sa stepenom klasifikacione efikasnosti algoritama. Definisanjem vrednosti klasifikacione efikasnosti postavljene su osnove automatizaciji procesa donošenja odluke da li je tkivo karcinom ili normalno na osnovu njegovih magnetnih osobina. Za skupove podataka dobijene OMIS metodom po prvi put je primenom odgovarajućeg testa rangiranja algoritama određen onaj sa najboljim performansama i u pogledu klasifikacione efikasnosti ali i u kontekstu potencijalnog značaja za praksu. Testiranjem statističke značajnosti dobijenih rezultata došlo se i do realne procene da li nekom algoritmu ili algoritmima treba dati prednost u procesu automatizacije donošenja odluka.

Uvođenjem parametara odnosa verovatnoće i dijagnostičkog odnosa šansi po prvi put je primena neke optičke metode na tkivima u usnoj duplji dobila i svoj realan uticaj koji u datom trenutku ima na donošenje odluke u kliničkom i laboratorijskom okruženju. Uspostavljena je direktna veza rezultata primene OMIS-a i verovatnoće da se u uzorku tkiva hirurške margine nalaze ili ne nalaze ćelije karcinoma pre i posle primene OMIS-a. Na taj način, data je procena trenutnog doprinosa koji bi OMIS kao neinvazivna metoda mogao imati na donošenje odluke u realnom vremenu i u toku sprovođenja hirurške ekscizije tkiva izmenjenog oralnim planocelularnim karcinomom. Korišćenjem pomenutih vrednosti dobija se objektivan osvrt na pravac kojim je potrebno usmeriti dalja istraživanja koja obuhvataju primenu OMIS metode, kako bi se omogućili njen dalji razvoj i klinička primena.

Pravac budućih istraživanja primene OMIS metode na uzorcima tkiva u usnoj duplji

Razvoj novih tehnologija i metoda u onkologiji nije jednostavan proces i zahteva dugogodišnju posvećenost otklanjanju svih ograničenja koja se na tom putu nameću. Ovo je posebno slučaj sa neoplastičnom transformacijom tkiva u usnoj duplji, koja svojom kompleksnom građom i funkcijom predstavlja svojevrsni izazov.

U pogledu vrednosti određenih parametara, a naročito specifičnosti i odnosa verovatnoće za pozitivan rezultat primene OMIS-a ostvarenih u ovom istraživanju, potrebno je sa *ex vivo* prirode istraživanja preći na *in vivo* analizu promena koje se potencijalno odvijaju u graničnom području oko prisutnog oralnog karcinoma. Pomenuti pristup biće omogućen unapređenjem postojećeg sistema OMIS instrumentacije i to u vidu fiber-optičkog kabla kojim će biti obezbeđeni direktan kontakt i digitalno slikanje željene regije u ustima pacijenta. Ovim putem rešiće se i problem efekta "skupljanja" tkiva koji nastaje prilikom njegove ekscizije, a umanjiti uticaj spoljašnje sredine na dobijene OMIS podatke. Na ovaj način, takođe se eliminiše i prisustvo tzv. šuma, prisutnog u vidu bele pozadine digitalnih snimaka, a koja ne predstavlja deo analiziranog uzorka tkiva.

Sa histopatološkog aspekta, buduće studije potrebno je usmeriti i na utvrđivanje značaja različitog stepena keratinizacije, koja ukoliko je izraženija može proizvesti neželjene efekte na dobijene rezultate. Keratinizacija generalno predstavlja problem kod svih optičkih metoda primenjenih na tkivima u usnoj duplji. Pored nje, trebalo bi ispitati i nivo uticaja koji na OMIS nalaze može imati limfocitna infiltracija i prisustvo zapaljenskog procesa u analiziranom tkivu. Kod analize tkiva OPK-a, neophodno je uključiti veći broj uzroka koji su histopatološki ocenjeni kao dobro i slabo diferentovani karcinomi, kako bi se dobila relevantnija slika o razlikama među njima i srednje diferentovanih karcinoma. Kada je reč o nativnim uzorcima normalnog tkiva, bilo bi poželjno utvrditi pojedinačni značaj koji po optomagneti spektr u datim okolnostima imaju vezivno, mišićno, masno i tkivo pljuvačnih žlezda. Unapređenje klasifikacione efikasnosti naročito je značajno kod analize bojjenih preparata. Tačno definisanje površina koje u datom preparatu pripadaju nekom od tipova normalnog ili patološki izmenjenog tkiva, uz nalaze iz ovog istraživanja, daće potpuniju sliku o specifičnom uticaju koji na OMIS rezultate imaju boje poput eozina i hematoksilina.

U svetlu velikog broja studija koje ispituju značaj alteracija različitih gena na nastanak i razvoj oralnog karcinoma, bilo bi zanimljivo ustanoviti da li je moguće uspostaviti jasnu vezu prisustva neke od ovih alteracija i magnetnog ponašanja u analiziranim uzorcima tkiva. Ovo je posebno interesantno, ako se uzme u obzir kvantna priroda optomagneti imidžing spektroskopije.

U odnosu na značaj koji potencijalno ima na donošenje odluka u kliničkom okruženju, neophodno je ispitati i praktičnu vrednost primene OMIS-a u ranoj dijagnostici oralnog karcinoma. Poput studije sa uzorcima tkiva grlića materice, uzimanjem i analizom brisa sa različitih područja normalne i patološki izmenjene sluzokože u usnoj duplji, bilo bi moguće detektovati promene koje ukazuju na displaziju niskog, odnosno visokog stepena. Na ovaj način mogao bi se definisati i optomagneti spektr određenih prekanceroznih lezija i stanja poput leukoplakije, eritroplakije oralnog lihen planusa i dr., i utvrdio značaj OMIS-a u prevenciji nastanka oralnog karcinoma. U tom pogledu, ispitala bi se i potencijalna korelacija određenih etioloških faktora, poput konzumacije duvana i alkohola, sa dobijenim OMIS nalazom, što bi naročito bilo značajno ako se uzme u obzir dejstvo koje pomenuti faktori ispoljavaju na molekularnom nivou.

Svi navedeni pravci budućih istraživanja, uz istovremeni razvoj automatizovanih algoritama, imaju za cilj da OMIS metodu postave kao efikasnu, neinvazivnu i jeftinu tehnologiju koja stručnim licima omogućava tačno i pravovremeno donošenje odluka na svakom koraku, od prevencije i rane dijagnostike do lečenja oralnog planocelularnog karcinoma.

6. ZAKLJUČAK

1. Primenom OMIS metode na nativnim uzorcima tkiva oralnog planocelularnog karcinoma i normalnog tkiva u histopatološki negativnim marginama utvrđeno je da tkivo OPK-a pokazuje vidljivo različitu distribuciju optomagnetnog spektra u odnosu na normalno tkivo. U pogledu magnetne aktivnosti, tkivo OPK-a pokazuje izraženije i paramagnetne i dijamagnetne osobine od normalnog tkiva ukazujući na izmenjene efekte apsorpcije i emisije svetlosti nastale kao posledica patološke transformacije u tkivu.
2. Primenom OMIS metode na bojenim uzorcima tkiva oralnog planocelularnog karcinoma i različitih tipova normalnog tkiva u histopatološki negativnim marginama i uvidom u njihove optomagnetne spektre utvrđeno je da tkivo OPK-a pokazuje različite magnetne karakteristike od normalnog tkiva - nižu paramagnetnu i višu dijamagnetnu aktivnost.
 - Preparati kod kojih preovlađuje bojenje eozinom pokazuju izraženiji paramagnetizam i odnose se uglavnom na klase uzoraka normalnog tkiva
 - Preparati kod kojih preovlađuje bojenje hematoksilinom pokazuju izraženiji dijamagnetizam i odnose se na klasu uzoraka koji pretežno sadrže tkivo OPK-a
 - Preparati koji pokazuju najviše vrednosti paramagnetizma, a koje su veće od 50 arbitrarnih jedinica pripadaju klasama masnog tkiva i tkiva pljuvačnih žlezda koje imaju slab afinitet prema hematoksilin eozin bojenju
 - Registrovanje karcinomom izmenjenog tkiva u različitim preparatima dovodi do pada paramagnetne aktivnosti u njima
3. Algoritmima zasnovanim na metodama mašinskog učenja moguće je razlikovati optomagnetne spektre nativnih uzoraka tkiva OPK-a i uzoraka normalnog tkiva u histopatološki negativnim marginama sa tačnosti do 88,89%, senzitivnosti do 88,89%, specifičnosti do 88,89% i vrednosti AUC do 0,988.
 - Najbolju klasifikacionu efikasnost pokazuje metod naivnog bajesa
 - Odličnu diskriminatornu moć poseduju algoritmi zasnovani na metodi naivnog bajesa i metodi potpornih vektora
 - Za pozitivan rezultat primene OMIS metode u kombinaciji sa automatizovanim algoritmima verovatnoća da je u tkivu prisutan karcinom raste sa bazičnih 50 na najviših 88,88%
 - Za negativan rezultat primene OMIS metode u kombinaciji sa automatizovanim algoritmima verovatnoća da je u tkivu prisutan karcinom opada sa bazičnih 50 na najnižih 10,71%
4. Algoritmima zasnovanim na metodama mašinskog učenja moguće je razlikovati optomagnetne spektre bojenih uzoraka tkiva OPK-a, prelaznih uzoraka i uzoraka normalnog tkiva u histopatološki negativnim marginama sa tačnosti do 82,52%, senzitivnosti do 82,47%, specifičnosti do 91,26% i vrednosti AUC do 0,870.
 - OMIS metodom najbolje se razlikuju klase prelaznog i normalnog tkiva, te klase prelaznog i tkiva koje pretežno sadrži OPK
 - Najlošiji rezultati ostvaruju se kada se porede svi uzorci koji sadrže tkivo OPK-a i svi uzorci normalnog tkiva, što ukazuje na drugačiji doprinos eozin i

hematoksilin bojenih struktura kod različitih klasa normalnog i karcinomom izmenjenog tkiva

5. Algoritmima zasnovanim na metodama mašinskog učenja moguće je razlikovati optomagnetne spektre bojenih uzoraka koji sadrže pretežno tkivo OPK-a i uzoraka različitih tipova normalnog tkiva u histopatološki negativnim marginama sa tačnosti do 91,07%, senzitivnosti do 100%, specifičnosti do 87,5% i vrednosti AUC do 0,973.
 - Najveću klasifikacionu efikasnost algoritmi imaju prilikom poređenja tkiva OPK-a i klase normalnog koštanog tkiva
 - Najveći potencijal za tačno razvrstavanje uzoraka karcinoma, a ujedno i najniži potencijal za tačno razvrstavanje uzoraka normalnog tkiva prisutan je prilikom poređenja klase OPK-a i klase normalnog masnog i tkiva pljuvačnih žlezda
 - Najveći doprinos automatizaciji procesa donošenja odluke za pozitivan rezultat primene OMIS-a prisutan je za porast verovatnoće da se u tkivu nalazi karcinom u odnosu na preparate normalnog koštanog i mišićnog tkiva
 - Najveći doprinos automatizaciji procesa donošenja odluke za negativan rezultat primene OMIS-a prisutan je za pad verovatnoće da se u tkivu nalazi karcinom u odnosu na preparate normalnog masnog, normalnog epitelnog i vezivnog tkiva, kao i u odnosu na preparate normalnog mišićnog tkiva
 - Najniži doprinos automatizaciji procesa donošenja odluke da li se u tkivu nalazi karcinom ili ne, OMIS ima u slučaju poređenja klase OPK-a i klase normalnog tkiva pljuvačne žlezde
6. U izboru algoritma sa najvišim stepenom klasifikacione efikasnosti prednjači metod "slučajne šume" sa prosečnom vrednosti ranga od 4,35, dok statistički najlošije performanse u pogledu diskriminatorne moći ima algoritam zasnovan na stablu odlučivanja. Po ostalim parametrima nijedan algoritam nije statistički gledano superioran ili inferioran u odnosu na druge.
7. Nulta hipoteza u ovom istraživanju odbačena je u 96% testova (230/240). S obzirom na navedenu činjenicu, može se reći da je optomagnetnom imidžing spektroskopijom moguće razlikovati karcinomom izmenjeno i normalno tkivo u usnoj duplji. Na taj način ona poseduje evidentan potencijal za evaluaciju hirurških margina kod oralnog karcinoma u kliničkom i laboratorijskom okruženju.

7. LITERATURA

- Abbas, S.A.,** Ikram, M., Tariq, M.U., Raheem, A. & Saeed, J. (2017). Accuracy of frozen sections in oral cancer resections, an experience of a tertiary care hospital. *J Pak Med Assoc*, 67, 806–809.
- Ackerman, L.V., Ramierez, G.A.** (1959). The indications for and limitation of frozen section diagnosis. *Br J Surg.*, 46, 336–350.
- Akobeng, A.K.** (2007). Understanding diagnostic tests 2: likelihood ratios, pre- and post-test probabilities and their use in clinical practice. *Acta Paediatr.*, 96, 487–491.
- Albiser, G.,** Lamiri, A. & Premilat, S. (2001). The A–B transition: temperature and base composition effects on hydration of DNA. *Int. J. Biol. Macromol.*, 28, 199–203.
- Al-Dam, A.,** Precht, C., Barbe, A. et al (2018). Sensitivity and specificity of sentinel lymph node biopsy in patients with oral squamous cell carcinomas using indocyanine Greene fluorescence imaging. *J Craniomaxillofac Surg*, 46, 1379–1384.
- Alicandri-Ciufelli, M.,** Bonali, M., Piccinini, A., Marra, L., Ghidini, A., Cunsolo, E.M., et al(2013).Surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma: What is ‘close’? *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, 270, 2603-9.
- Alonso, J.E.,** Han, A.Y., Kuan, E.C., Strohl, M., St.Clair, J.M., St.John, M.A., et al (2018). The survival impact of surgical therapy in squamous cell carcinoma of the hard palate. *Laryngoscope*, 128, 2050.
- Altman, D.G., Bland, J.M.** (1994). Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *BMJ*, 308, 1552.
- Amaral, T.M.P.,** Freire, A.R.S., Carvalho, A.L., Pinto, C.A., Kowalski, L.P. (2004). Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth. *Oral Oncol*, 40, 780–786.
- Amin, M.B.,** Edge, S.B., Greene, F.L. et al eds. (2017). *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York: Springer.
- Anderson, C.R.,** Sisson, K. and Moncrieff, M. (2015).A meta-analysis of margin size and local recurrence in oral squamous cell carcinoma.*Oral Oncol.*, 51(5), 464-469.
- Anderson, R.R., Parrish, J.A.**(1982). Optical properties of human skin in *The Science of Photomedicine* ed J D Regan and J A Parrish (New York: Plenum Press) chapter 6, pp 147–94.
- Anderson, R.R.,** Farinelli, W., Laubach, H., Manstein, D., Yaroslavsky, A.N.,Gubeli, J. 3rd, et al(2006). Selective photothermolysis of lipid-rich tissues: A free electron laser study *Laser Surg.Med.*, 38, 913–19.
- Andre, K.,** Schraub, S., Mercier, M. and Bontemps, P. (1995). Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 31, 301–9.
- Antunes, J.L.F.,** Biazzevic, M.G.H., de Araujo, M.E., Tomita, N.E., Chinellato, L.E., Narvai, P.C. (2001) Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in Sao Paulo, Brazil, 1980-1998. *Oral Oncol*, 37, 345–50.
- Arya, S.,** Rane, P. and Deshmukh, A. (2014). Oral cavity squamous cell carcinoma: Role of pretreatment imaging and its influence on management. *Clin Radiol.*, 69, 916–930.
- Ash, C.,** Dubec, M., Donne, K. and Bashford, T. (2017). Effect of wavelength and beam width on penetration in light tissue interaction using computational methods *Lasers Med. Sci.*, 32(8), pp.1909-1918.
- Aulino, J.M.,** Strother, M.K. and Shipman, J.L. (2006). Imaging of oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.*, 18, 445-63.
- Avwioro, G.** (2011). Histochemical uses of haematoxylin—a review. *JPCS.*, 1, 24-34.
- Bai, M., Bornhop, D.J.** (2012). Recent advances in receptor-targeted fluorescent probes for in vivo cancer imaging.*Curr. Med. Chem.*, 19, 4742–4758.

-
- Bànkfalvi, A., Piffkò, J.** (2000). Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med*, 29, 291-298.
- Banoczy, J.** (1977). Follow-up studies in oral leukoplakia. *J Maxillofac Surg*, 5, 69–75.
- Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P.A., Sidransky, D.** (2005). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Head and neck tumours. World Health Organization.
- Barroso, E.M., Smits, R.W., van Lanschot, C.G., Caspers, P.J., Ten Hove, I., Mast, H. et al** (2016). "Water concentration analysis by Raman spectroscopy to determine the location of the tumor border in oral cancer surgery," *Cancer Res.*, 76(20), 5945–5953.
- Barroso, E.M., Smits, R.W.H., Bakker Schut, T.C., ten Hove, I., Hardillo, J.A., Wolvius, E.B. et al** (2015). Discrimination between oral cancer and healthy tissue based on water content determined by raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 87(4), 2419–2426.
- Barry, C.P., Ahmed, F., Rogers, S.N., Lowe, D., Bekiroglu, F., Brown, J.S. et al** (2015). Influence of surgical margins on local recurrence in T1/T2 oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 37(8), 1176-1180.
- Batsakis, J.G.** (1999). Surgical excision margins: a pathologist's perspective. *Adv Anat Pathol*, 6, 140–148.
- Baumann, B.** (2017). Polarization sensitive optical coherence tomography: a review of technology and applications. *Appl. Sci.*, 7(5), 474.
- Beauvoit, B., Evans, S.M., Jenkins, T.W., Miller, E.E., Chance, B.** (1995). Correlation between the light scattering and the mitochondrial content of normal tissues and transplantable rodent tumors. *Anal. Biochem.*, 226(1), 67–74.
- Bergeron, M., Gauthier, P, Audet N** (2016). Decreasing loco-regional recurrence for oral cavity cancer with total Mohs margins technique. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 45, 63.
- Bernier, J., Cooper, J.S., Pajak, T.F., van Glabbeke, M., Bourhis, J., Forastiere, A. et al** (2005). Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck*. Oct, 27(10), 843–850.
- Bessell, A., Glenny, A., Furness, S., Clarkson, J.E., Oliver, R., Conway, D.I. et al** (2011). Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: surgical treatment. *Cochrane Database Syst Rev.*, 7(9), CD006205.
- Bettinger, C., Zimmermann, H.W.** (1991). New investigations on hematoxylin, hematein, and hematein-aluminium complexes: II. Hematein-aluminium complexes and hemalum staining. *Histochemistry*, 96, 215–228.
- Bhatia, N., Lalla, Y., Vu, A.N., Farah, C.S.** (2013). Advances in optical adjunctive AIDS for visualisation and detection of oral malignant and potentially malignant lesions. *Int. J. Dent.*, 194029.
- Bhatia, N., Matias, M.A., Farah, C.S.** (2014). Assessment of a decision making protocol to improve the efficacy of VELscope in general dental practice: a prospective evaluation. *Oral Oncol.*, 50, 1012–1019.
- Bigio, I.J., Mourant, J.R.** (1997). Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. *Phys Med Biol*, 42(5), 803–14.
- Bilde, A., von Buchwald, C., Dabelsteen, E., Therkildsen, M.H. et al** (2009). Molecular markers in the surgical margin of oral carcinomas. *J Oral Pathol Med* 38, 72-8.
- Binahmed, A., Nason, R.W., Abdoh, A.A.** (2007). The clinical significance of the positive surgical margin in oral cancer. *Oral Oncol*, 43(8), 780–4.
- Black, C., Marotti, J., Zarovnaya, E., Paydarfar, J.** (2006). Critical evaluation of frozen section margins in head and neck cancer resections. *Cancer*, 107, 2792–2800.
-

-
- Blot, W.J.,** McLaughlin, J.K., Winn, D.M., Austin, D.F., Greeneberg, R.S., Preston-Martin, S. et al (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, 48, 3282-7.
- Bohren Craig, F., Donald R Huffman** (1983). *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. Wiley. ISBN 978-0-471-29340-8.
- Bouma, B.E., Tearney, G.J.** (2002). *Handbook of Optical Coherence Tomography*. Marcel Dekker; NY, USA.
- Bouma, B.E.,** Yun, S.H., Vakoc, B.J., Suter, M.J., Tearney, G.J. (2009). Fourier-domain optical coherence tomography: Recent advances toward clinical utility. *Curr Opin Biotechnol*, 20, 111-8.
- Bouvard, V.,** Loomis, D., Guyton, K.Z., Grosse, Y., Ghissassi, F.E., Benbrahim-Tallaa, L. et al (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.*, 16, 1599-1600.
- Boyd, N.F.,** Martin, L.J., Bronskill, M., Yaffe, M.J., Duric, N., Minkin, S. (2010) *Cancer Inst.*, 102, 1224-1237.
- Braakhuis, B.J.,** Bloemena, E., Leemans, C.R., Brakenhoff, R.H. (2010). Molecular analysis of surgical margins in head and neck cancer: More than a marginal issue. *Oral Oncol*, 46, 485-91.
- Braakhuis, B.J.M.,** Tabor, M.P., Lemans, C.R., van der Waal, I., Snow, G.B., Brakenhoff, R.H. (2002). Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck*, 24, 198-206.
- Bradley, P.J.,** MacLennan, K., Brakenhoff, R.H., Leemans, C.R. (2007). Status of primary tumour surgical margins in squamous head and neck cancer: prognostic implications. *Curr Opin OtolaryngolHead Neck Surg*, 15, 74-81.
- Brandizzi, D.,** Gandolfo, M., Velazco, M.L., Cabrini, R.L., Lanfranchi, H.E. (2008). Clinical features and evolution of oral cancer: a study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal*, 13(9), E544-8.
- Brandwein-Gensler, M.,** Teixeira, M.S., Lewis, C.M., Lee, B., Rolnitzky, L., Hille, J.J. et al (2005). Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol*, 29, 167-178.
- Bray, F.** (2014). Transitions in human development and the global cancer burden In: Stewart BW, Wild CP, eds. *World Cancer Report 2014*. Lyon: IARC Press, 42-55.
- Bray, F.,** Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*, 68, 394-424.
- Breiman, L.** (2001). Random forests. *Machine learning*, 45(1), 5-32. Pacific Grove: Wadsworth & Brooks.
- Breiman, L.,** Friedman, J.H., Olshen, R. and Stone, C. (1984). Classification and regression trees.
- Brown, J.S.,** Shaw, R.J., Bekiroglu, F., Rogers, S.N. (2012). Systematic review of the current evidence in the use of postoperative radiotherapy for oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofacial Surg*, 50, 481-9.
- Brown, L.M.,** Check, D.P., Devesa, S.S. (2012). Oral cavity and pharynx cancer incidence trends by subsite in the United States: Changing gender patterns. *J Oncol*, 2012, 1-10.
- Bryne, M.,** Koppang, H.S., Lilleng, R., Kjaerheim, A. (2005). Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*, 166, 375-381.

-
- Buchakjian, M.R.**, Tasche, K.K., Robinson, R.A., Pagedar, N.A., Sperry, S.M. (2016). Association of main specimen and tumor bed margin status with local recurrence and survival in oral cancer surgery. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 142, 1191–1198.
- Bucur, A., Stefanescu, L.** (2004). Management of patients with squamous cell carcinoma of the lower lip and N0-neck. *J Cranio-maxillofac Surg*, 32, 16–8.
- Byers, R.M.**, Anderson, B., Schwartz, E.A. (1984). Treatment of squamous carcinoma of the retromolar trigone. *Am J Clin Oncol*, 7, 647–52.
- Cabay, R.J.**, Morton, T.H. et al (2007). Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med*, 36, 255–61.
- Cals, F.L.**, Koljenović, S., Hardillo, J.A., Baatenburg de Jong, R.J., Bakker Schut, T.C., Puppels, G.J. (2016). Development and validation of Raman spectroscopic classification models to discriminate tongue squamous cell carcinoma from non-tumorous tissue. *Oral Oncol.*, 60, 41–47.
- Cals, F.L.**, Bakker Schut, T.C., Hardillo, J.A., Baatenburg de Jong, R.J., Koljenović, S., Puppels, G.J. (2015). Investigation of the potential of Raman spectroscopy for oral cancer detection in surgical margins. *Lab. Invest.*, 95, 1186–1196.
- Cals, F.L.**, Bakker Schut, T.C., Koljenović, S., Puppels, G.J., Baatenburg de Jong, R.J. (2013). Method development: Raman spectroscopy-based histopathology of oral mucosa. *J Raman Spectrosc*, 44, 963–972.
- Castellsagué, X.**, Quintana, M.J., Martínez, M.C., Nieto, A., Sanchez, M.J., Juan, A. et al (2004). The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*, 108, 741–9.
- Cavallo, F.**, De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G., Lollini, P.L. (2011). 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother*; 60, 319-326.
- Cawson, R.A., Binnie, W.H.** (1980). Candida, leukoplakia and carcinoma: a possible relationship. In: Mackenzie IC, Dabelsteen E, Squier CA (eds) *Oral premalignancy*, 1st edn. University of Iowa Press, Iowa city, pp 59–66.
- Cense, B.**, Nassif, N., Chen, T., Pierce, M., Yun, S.H., Park, B. et al (2004). Ultrahigh-resolution high-speed retinal imaging using spectraldomain optical coherence tomography. *Opt. Express.*, 12, 2435–2447.
- Chan, J.K.** (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol.*, 22(1), 12–32.
- Chang, A.M.**, Kim, S.W., Duvvuri, U., Johnson, J.T., Myers, E.N., Ferris, R.L. et al (2013). Early squamous cell carcinoma of the oral tongue: comparing margins obtained from the glossectomy specimen to margins from the tumor bed. *Oral Oncol*, 49, 1077–1082.
- Chaplin, M.** (2006). Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 861–866.
- Chaplin, M.** (2001). Water: its importance to life. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 29, 54–59.
- Chem461S16Group1**
(2016).https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jablonski_Diagram.png
- Chen, J.**, Eisenberg, E., Krutchkoff, D.J. et al (1991). Changing trends in oral cancer in the United States, 1935 to 1985: a Connecticut Study. *J Oral Maxillofac Surg*, 49, 1152–8.
- Chen, T.Y.**, Emrich, L.J., Driscoll, D.L. (1987). The clinical significance of pathological findings in surgically resected margins of the primary tumor in head and neck carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 13, 833–837.
- Cheng, A.**, Cox, D. et al (2008). Oral squamous cell carcinoma margin discrepancy after resection and pathologic processing. *J Oral Maxillofacial Surg*, 66(3), 523–9.
- Cheong, W.F.**, Prahl, S.A., Welch, A.J. (1990). A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J Quantum Electron.*, 26, 2166–2185.
-

-
- Chhetri, D.K.**, Rawnsley, J.D., Calcaterra, T.C. (2000). Carcinoma of the buccal mucosa. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 123, 566–71.
- Choi, S., Myers, J.N.** (2008). Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of Dental Research*, 87, 14–32.
- Choudhari, S.K.**, Chaudhary, M., Gadbail, A.R. et al (2014). Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncol*, 50, 10-18.
- Chu, P.Y.**, Tsai, T.L., Tai, S.K., Chang, S.Y. (2012). Effectiveness of narrow band imaging in patients with oral squamous cell carcinoma after treatment. *Head Neck*, 34, 155–161.
- Chumlea, W.C.**, Guo, S.S., Zeller, C.M., Reo, N.V., Siervogel, R.M. (1999). Total body water data for white adults 18 to 64 years of age: the Fels Longitudinal Study. *Kidney Int*. 56, 244–252.
- Chung, C.K.**, Johns, M.E., Cantrell, R.W., Constable, W.C. (1980). Radiotherapy in the management of primary of the hard palate. *Laryngoscope*, 90, 576–84.
- Clement, M.**, Daniel, G., Trelles, M. (2005). Optimising the design of a broad band light source for the treatment of skin. *J Cosmetic Laser Ther*, 7, 177–189.
- Coey, J.M.D.** (2015). Magnetism and magnetic materials. Cambridge: Cambridge University Press.
- Collins, L.M., Dawes, C.** (1987). The surface area of the adult human mouth and the thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res*, 66, 1300–2
- Cooley, M.L.**, Hoffman, H.T., Robinson, R.A. (2002). Discrepancies in frozen section mucosal margin tissue in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 24, 262–267.
- Cooper, J.S.**, Porter, K., Mallin, K., Hoffman, H.T., Weber, R.S., Ang, K.K. et al (2009). National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck*, 31, 748–58.
- Cortesina, G.**, Sacchi, M., Bussi, M., Panizzut, B., Ferro, S., Carlevato, M.T. et al (1995). Integrin expression in head and neck cancers. *Acta Otolaryngol*, 115, 328-330.
- Cruchley, A.T., Bergmeier, L.A.** (2018). Structure and functions of the oral mucosa. In: *Oral Mucosa in Health and Disease*. Springer, pp, 1-18.
- Curry, J.M.**, Sprandio, J., Cognetti, D., Luginbuhl, A., Bar-ad, V., Pribitkin, E., Tuluc, M. (2014). Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol*, 41, 217-234.
- D'Souza, G.**, Kreimer, A.R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W.M. et al (2007). Case control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 356(19), 1944–56.
- Dahlstrom, K.R.**, Little, J.A., Zafereo, M.E., Lung, M., Wei, Q., Sturgis, E.M. (2008). Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker–never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck*, 30, 75–84.
- Danilović, V., Kuburović-Radujković, G.** (2012). *Oralna histologija i embriologija*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd
- Dawson, R.B.** (1985). *Data for biochemical research* (3rd ed.). Oxford: Clarendon Press. p.122.
- de Boer, E.**, Harlaar, N.J., Taruttis, A., Nagengast, W.B., Rosenthal, E.L., Ntziachristos, V. et al (2015). Optical innovations in surgery. *Br. J. Surg.*, 102, e56–72.
- de Camargo Cancela, M.**, Voti, L., Guerra-Yi, M., Chapuis, F., Mazuir, M. and Curado, M.P. (2010). Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck*, 32, 357–367.
- de Veld, D.C.**, Bakker Schut, T.C., Skurichina, M., Witjes, M.J., van der Wall, J.E., Roodenburg, J.L. et al (2005). Autofluorescence and Raman microspectroscopy of tissue sections of oral lesions. *Lasers Med. Sci.*, 19, 203–209.
-

-
- de Vicente, J.C.,** Fresno, M.F., Villalain, L., Vega, J.A. and Hernández Vallejo, G. (2005). Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 41, 283-293.
- DeCoro, M., Wilder-Smith, P.** (2010). Potential of optical coherence tomography for early diagnosis of oral malignancies. *Expert review of anticancer therapy*, 10 (3), 321-329.
- Deeks, J.J., Altman, D.G.** (2004). Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ*, 17, 329(7458), 168-9.
- Demšar, J.** (2006). Statistical comparisons of classifiers over multiple data sets. *Journal of Machine Learning Research*, 7(1), 1-30.
- Derk, C.T.,** Rasheed, M., Spiegel, J.R. et al (2005). Increased incidence of carcinoma of the tongue in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*, 32(4), 637-41.
- Deshmukh, A.,** Singh, S.P., Chaturvedi, P., Krishna, C.M. (2011). Raman spectroscopy of normal oral buccal mucosa tissues: study on intact and incised biopsies. *J Biomed Opt*, 16, 127004.
- Diaz, E.M.,** Holsinger, P.C., Zuniga, E.R., Roberts, D.B., Sorensen, D.M. (2003). Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: one institution's experience with 119 previously untreated patients. *Head Neck*, 25, 267-73.
- Dikshit, R.P.,** Ramadas, K., Hashibe, M., Thomas, G., Somanathan, T., Sankaranarayanan, R. (2006). Association between diabetes mellitus and premalignant oral diseases: a cross-sectional study in Kerala, India. *Int J Cancer*, 118(2), 453-7.
- DiNardo, L.J.,** Lin, J., Karageorge, L.S., Powers, C.N. (2000). Accuracy, Utility, and cost of frozen section margins in head and neck cancer surgery. *Laryngoscope*, 110, 1773-1776.
- Diniz-Freitas, M.,** Garcia-Caballero, T., Antunez-Lopez, J., Gandara-Rey, J.M., Garcia-Garcia, A. (2006). Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 42, 190-200.
- Dissanayaka, W.L.,** Pitiyage, G., Kumarasiri, P.V., Liyanage, R.L., Dias, K.D. and Tilakaratne, W.M. (2012). Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 113, 518-525.
- Dixit, S.,** Vyas, R.K., Toparani, R.B., Baboo, H.A., Patel, D.D. (1998). Surgery versus surgery and postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: a comparative study. *Ann Surg Oncol*, 5(6), 502-10.
- Dragicevic, A.,** Matija, L., Krivokapic, Z., Dimitrijevic, I., Baros, M., Koruga, Dj. (2018). Classification of Healthy and Cancer States of Colon Epithelial Tissues Using Opto-magnetic Imaging Spectroscopy. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 39, 367-380.
- Drexler, W.M., Fujimoto, J.G.** (2008). *Optical Coherence Tomography Technology and Applications*. Springer; NY, USA.
- Drezek, R.A.,** Richards-Kortum, R., Brewer, M.A., Feld, M.S, Pitris, C., Ferenczy, A. et al (2003). Optical imaging of the cervix. *Cancer*, 98(Suppl. 9), 2015-27.
- Du, H.,** Fuh, R.A., Li, J., Corkan, A., Lindsey, J.S. (1998). PhotochemCAD: a computer-aided design and research tool in photochemistry. *Photochem. Photobiol.*, 68, 141-2.
- Duffy, M.J.,** McGowan, P.M., Gallagher, W.M. (2008). Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol*, 214, 283-293.
- Ebrahimi, A.,** Gil, Z., Amit, M., Yen, T.C., Liao, C.T., Chaturvedi, P. et al (2014). Primary tumor staging for oral cancer and a proposed modification incorporating depth of invasion: an international multicenter retrospective study. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.*, 140, 1138-1148.
- Edelman, I.S., Leibman, J.** (1959). Anatomy of body water and electrolytes. *Am J Med*, 27, 256-277.
-

-
- Elashoff, D.**, Zhou, H., Reiss, J., Wang, J., Xiao, H., Henson, B. et al (2012). Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21, 664-672.
- El-Fol, H.A.**, Noman, S.A., Beheiri, M.G., Khalil, A.M., Kamel, M.M. (2015). Significance of post-resection tissue shrinkage on surgical margins of oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg*, 43, 475-82.
- El-Naggar, A.K.**, Chan, J.K.C., Grandis, J.R., Takata, T., Slootweg, P.J. (2017). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Head and neck tumours. World Health Organization.
- Epstein, J.B.**, Wan, L.S., Gorsky, M., Zhang, L. (2003). Oral lichen planus: progress in understanding its malignant potential and implications for clinical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 96, 32-7.
- Fagan, T.J.** (1975). Letter: Nomogram for Bayes theorem. *N Engl J Med*, 293, 257.
- Fan, H.X.**, Li, H.X., Chen, D., Gao, Z.X., Zheng, J.H. (2012). Changes in the expression of MMP2, MMP9, and ColIV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications. *J Exp Clin Cancer Res*, 31, 90.
- Fang, H.**, Ollero, M., Vitkin, E., Kimerer, L.M., Cipolloni, P.B., Zaman, M. et al (2003). Noninvasive sizing of subcellular organelles with light scattering spectroscopy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 9, 267-276.
- Farah, C.S.** (2015). Improved surgical margin definition by narrow band imaging for resection of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 44:e5.
- Farah, C.S.** (2018). Narrow band imaging-guided resection of oral cavity cancer decreases local recurrence and increases survival. *Oral Dis*, 24, 89-97.
- Farah, C.S.**, McIntosh, L., Georgiou, A., McCullough, M.J. (2012). Efficacy of tissue autofluorescence imaging (VELScope) in the visualization of oral mucosal lesions. *Head Neck*, 34, 856-862.
- Feller, L.L.**, Khammissa, R.R., Kramer, B.B., Lemmer, J.J. (2013). Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer Cell Int*, 13, 31.
- Ferlay, J.**, Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C. et al (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; <http://globocan.iarc.fr> [Accessed 12 July 2016].
- Ferlay, J.**, Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M. et al (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*, 103, 356-87.
- Fischer, A.H.**, Jacobson, K.A., Rose, J., Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc.*, 2008:pdb prot4986.
- Fitzmaurice, C.**, Akinyemiju, T.F., Al Lami, F.H., Alam, T. et al (2018). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*.
- Fitzpatrick, T.B.** (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*, 124(6), 869-871.
- Fives, C.**, Nae, A. et al (2017). Impact of mandibular invasion on prognosis in oral squamous cell carcinoma four centimeters or less in size. *Laryngoscope*; 127(4): 849-854.
- Fleiss, J.L.** (1971). "Measuring nominal scale agreement among many raters." *Psychological Bulletin*, Vol. 76, No. 5 pp., 378-382.
-

-
- Foreman, K.J.**, Marquez, N., Dolgert, A., Fukutaki, K., Fullman, N., McGaughey, M. et al (2018). Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet*, 392(10159), 2052- 2090.
- Fox, M.** (2010). *Optical properties of solids*(2nd ed.). Oxford: Oxford University Press. p.1.ISBN 978-0-19-957336-3.
- Frangioni, J.V.** (2003). In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol.*, 7, 626–634.
- Friedlander, P.L.**, Schantz, S.P., Shaha, A.R., Yu, G., Shah, J.P. (1998). Squamous cell carcinoma of the tongue in young patients: a matched-pair analysis. *Head Neck*. Aug, 20(5), 363–368.
- Fujimoto, J.G.**, Pitris, C., Boppart, S.A., Brezinski, M.E. (2000). Optical coherence tomography: An emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy. *Neoplasia*, 2, 9-25.
- Fukuda, M.**, Ohmori, Y. and Sakashita, H. (2012). The Role of Tumor Microenvironment in Oral Cancer. In: Biswas S, editors. *Tumor Microenvironment and Myelomonocytic Cells*. InTech.
- Fullerton, G.D.**, Kanal, K.M., Cameron, I.L. (2006). Osmotically unresponsive water fraction on proteins: non-ideal osmotic pressure of bovine serum albumin as a function of pH and salt concentration. *Cell Biol. Int.*, 30, 86–92.
- Funk, G.F.**, Karnell, L.H., Robinson, R.A., Zhen, W.K., Trask, D.K., Hoffman, H.T. (2002). Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a national cancer data base report. *Head Neck*, 24, 165–80.
- Gabriele, M.L.**, Wollstein, G., Ishikawa, H., Kagemann, L., Xu, J., Folio, L.S. et al (2011). Optical coherence tomography: History, current status, and laboratory work. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 2425-36.
- Gandolfo, S.**, Richiardi, L., Carrozzo, M., Broccoletti, R., Carbone, M., Pagano, M. et al (2004). Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol*, 40, 77–83.
- Gandor, D.W., Meyer, J.** (1988). A simple two-dye basic stain facilitating recognition of mitosis in plastic embedded tissue sections. *Stain Technol*; 63, 75-81.
- Ganly, I.**, Patel, S., Shah, J. (2012). Early stage squamous cell cancer of the oral tongue—clinicopathologic features affecting outcome. *Cancer*, 118(1), 101-111.
- Garzino-Demo, P.**, Dell’Acqua, A., Dalmaso, P., Fasolis, M., La Terra Maggiore, G.M., Ramieri, G. et al (2006). Clinicopathologic parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg*, 34, 344–350.
- Garzino-Demo, P.**, Zavattero, E., Franco, P., Fasolis, M., Tanteri, G., Mettus, A. et al (2016). Parameters and outcomes in 525 patients operated on for oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg*, 44(9), 1414–21.
- Gauthier, P.**, Audet, N., Guertin, L. et al (2010). Complete frozen section margins (with measurable 1 or 5 mm thick free margin) for cancer of the tongue: part 2: clinical experience. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 39, 20–27.
- Gavrić, M.**, Pišćević, A., Sjerobabin, I. (2001). *Maksilofacijalna hirurgija*. Beograd, Draganić.
- Gerber, S.**, Gengler, C., Gratz, K.W., Kruse, A.L. (2011). The impact of frozen sections on final surgical margins in squamous cell carcinoma of the oral cavity and lips: a retrospective analysis over an 11 years period. *Head Neck Oncol*, 3, 56.
- Gersten, O., Wilmoth, J.R.** (2002). The cancer transition in Japan since 1951. *Demogr Res.*, 7, 271-306.
- Giovannacci, I.**, Vescovi, P., Manfredi, M., Meleti, M. (2016). Non-invasive visual tools for diagnosis of oral cancer and dysplasia: a systematic review. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, 21, e305–315.
-

-
- Glas, A.S.**, Lijmer, J.G., Prins, M.H., Bonsel, G.J., Bossuyt, P.M. (2003). The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol*, 56, 1129-1135.
- Gleber-Netto, F.O.**, Yakob, M., Li, F., Feng, Z., Dai, J., Kao, H.K. et al (2016). Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma in a Taiwanese population. *Clin Cancer Res*, 22(13), 3340-7.
- Gomez, D.**, Faucher, A., Picot, V., Siberchicot, F., Renaud-Salis, J.L., Bussi eres, E. et al (2000). Outcome of squamous cell carcinoma of the gingiva: a follow-up study of 83 cases. *J Craniomaxillofac Surg*, 28, 331-5.
- Gono, K.**, Yamazaki, K., Doguchi, N., Nonami, T., Obi, T., Yamaguchi, M. et al (2003). Endoscopic observation of tissue by narrowband illumination. *Opt. Rev.*, 10, 211-215.
- Gonzalez-Ballester, D.** (2016). The tissue shrinkage phenomenon on surgical margins in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Plast Aesthet Res*, 3, 150-7.
- Goyal, S.**, Tiwari, V.K., Nair, K.S., Raj, S. (2014). Risk factors and costs of oral cancer in a tertiary care hospital in Delhi. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(4), 1659-65.
- Greene, F.L.**, Page, D.L., Fleming, I.D. et al, editors (2002). Head and neck sites. In: *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag, p. 17-22.
- Greene, F.L.**, Page, D.L., Fleming, I.D. et al, editors (2002). Lip and oral cavity. In: *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag, p. 23-32.
- Gr egoire, V.**, Lefebvre, J.L., Licitra, L., Felip, E. (2010). EHNS-ESMO-ESTRO Guidelines Working Group. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 21(Suppl. 5), v184-6.
- Grillone, G.A.**, Wang, Z., Krisciunas, G.P., Tsai, A.C., Kannabiran, V.R., Pistey, R.W. et al (2017). The color of cancer: margin guidance for oral cancer resection using elastic scattering spectroscopy," *Laryngoscope*, 127(Suppl. 4), S1-S9.
- Gumbiner, B.M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84, 345-357.
- Guze, K.**, Pawluk, H.C., Short, M., Zeng, H., Lorch, J., Norris, C. et al (2014). Pilot study: Raman spectroscopy in differentiating premalignant and malignant oral lesions from normal mucosa and benign lesions in humans. *Head Neck*, 37, 511-517.
- Ha, P.K.**, Chang, S.S., Glazer, C.A., Califano, J.A., Sidransky, D. (2009). Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. *Oral Oncol*, 45(4-5), 335-9.
- Hajian-Tilaki, K.** (2013). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Casp. J. Internal Med.*, 4(2), pp.627-635.
- Halbleib, J.M., Nelson, W.J.** (2006) Cadherins in development: Cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.*, 20, 3199-3214.
- Hall, G.**, Jacques, S.L., Eliceiri, K.W., Campagnola, P.J. (2012). Goniometric measurements of thick tissue using Monte Carlo simulations to obtain the single scattering anisotropy coefficient *Biomed. Opt. Express*, 3, 2707-19.
- Hamdoon, Z.**, Jerjes, W., Al-Delayme, R., McKenzie, G., Jay, A., Hopper, C. (2012). Structural validation of oral mucosal tissue using optical coherence tomography. *Head Neck Oncol*, 4, 29.
- Hamdoon, Z.**, Jerjes, W., McKenzie, G., Jay, A., Hopper, C. (2016). Optical coherence tomography in the assessment of oral squamous cell carcinoma resection margins. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 13, 211-217.
- Hamdoon, Z.**, Jerjes, W., Upile, T., McKenzie, G., Jay, A., Hopper, C. (2013). Optical coherence tomography in the assessment of suspicious oral lesions: An immediate ex vivo study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 10, 17-27.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*; 100: 57-70.

-
- Hanahan, D., Weinberg, R.A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; 144: 646-674.
- Hanley, J.A.** (1989). Receiver operating characteristic (ROC) methodology: the state of the art. *Crit Rev Diagn Imaging*, 29, 307-35.
- Hanley, J.A., McNeil, B.J.** (1982). The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, 143, 29-36.
- Hansen, L.S., Olson, J.A., Silverman, Jr. S.** (1985). Proliferative verrucous leukoplakia. A longterm study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 60, 285-98.
- Harris, A.T., Rennie, A., Waqar-Uddin, H., Wheatley, S.R., Ghosh, K.S., Martin-Hirsch, D.P., et al** (2010). Raman spectroscopy in head and neck cancer. *Head Neck Oncol.*, 2, 26.
- Harryvan, D.H., Lubberhuizen, W.H., Faassen, Ev, Levine, Y.K., Kothe, G.** (1996). Characterization of the magneto-optical properties of eosin Y and erythrosin. *Chem. Phys. Lett.*, 257(1-2), 190-196.
- Hartner, L.** (2018). Chemotherapy for oral cancer. *Dent Clin North Am*, 62, 87-97.
- Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S.C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C. et al** (2009). Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 18, 541-50.
- Helliwell, T., Woolgar, J.** (2011). Dataset for histopathology reporting of mucosal malignancies of the oral cavity. London: Royal College of Pathologists.
- Herlin, P., Marnay, J., Jacob, J.H., Ollivier, J.M., Manard, A.M.** (1983). A study of the mechanism of staining of the toluidine blue dye test. *Endoscopy*, 15, 4-7.
- Hielscher, A.H., Mourant, J.R., Bigio, I.J.** (1997). Influence of particle size and concentration on the diffuse backscattering of polarized light from tissue phantoms and biological cell suspensions. *Appl Opt.*, 36(1), 125-135.
- Hinni, M.L., Ferlito, A., Brandwein-Gensler, M.S., Takes, R.P., Silver, C.E., Westra, W.H. et al** (2013). Surgical margins in head and neck cancer: A contemporary review. *Head Neck*, 35, 1362-70.
- Ho, M-W., Ming, Z.Y., Haffegge, J., Watton, A., Musumeci, F., Privitera, G. et al** (2006) in *Water and The Cell*, (eds Pollack GH, Cameron IL and Wheatley DN) 219-234, Springer, Dordrecht
- Holmes, L., des Vignes-Kendrik, M., Slomka, J., Mahabir, S., Beeravolu, S., Emani, S.R.** (2009). Is dental care utilization associated with oral cavity cancer in a large sample of community-based United States residents?. *Community Dent Oral Epidemiol.*, 37, 134-42.
- Horobin, R.W., Bennion, P.J.** (1973). The interrelation of the size and substantivity of dyes: the role of van der Waals attractions and hydrophobic bonding in biological staining. *Histochemie*, 33, 191-204.
- Howanitz, P.J., Hoffman, G.G., Zarbo, R.J.** (1990). The accuracy of frozen section diagnosis in 34 hospitals. *Arch Pathol Lab Med.*, 114, 355-359.
- Hsieh, Y.S., Ho, Y.C., Lee, S.Y., Chunag, C.C., Tsai, J.C., Lin, K.F. et al** (2013). Dental optical coherence tomography. *Sensors*, 13, 8928-49.
- Hsu, M.C., Woody, R.W.** (1971). Origin of the heme cotton effects in myoglobin and hemoglobin. *J. Am Chem. Soc.*, 93(14), 3515-3525.
- Huang, T.Y., Hsu, L.P., Wen, Y.H., Huang, T.T., Chou, Y.F., Lee, C.F. et al** (2010). Predictors of locoregional recurrence in early stage oral cavity cancer with free surgical margins. *Oral Oncol.*, 46, 49-55.
- Huff, K., Stark, P.C., Solomon, L.W.** (2009). Sensitivity of direct tissue fluorescence visualization in screening for oral premalignant lesions in general practice. *Gen. Dent.*, 57, 34-38.
-

-
- H2O.ai** 3.28.0.4 (2020). Deep Learning (Neural Networks). <http://docs.h2o.ai/h2o/latest-stable/h2o-docs/data-science/deep-learning.html>
- Institut za javno zdravlje Srbije** (2018). ZDRAVSTVENO-STATISTIČKI GODIŠNJAK REPUBLIKE SRBIJE 2017. Odeljak 6: NEZARAZNI POREMEĆAJI ZDRAVLJA (str. 427-445). Beograd.
- Ishijima, A.**, Schwarz, R.A., Shin, D., Mondrik, S., Vigneswaran, N., Gillenwater, A.M. et al (2015). Automated frame selection process for high-resolution microendoscopy. *J. Biomed. Opt.*, 20, 46014.
- Islami, F.**, Goding Sauer, A., Miller, K.D., Siegel, R.L., Fedewa, S.A., Jacobs, E.J. et al (2018). Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA: a cancer Journal for Clinicians*, 68, 31–54.
- Jacopo Werther** (2010). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Stokes_shift.png
- Jacques, S.L.** (2013). Optical properties of biological tissues: a review *Phys. Med. Biol.*, 58, R37–61.
- Jacques, S.L.** (1996). Origins of tissue optical properties in the UVA, visible and NIR regions *OSA TOPS on Advances in Optical Imaging and Photon Migration* vol 2 ed R R Alfano and J G Fujimoto (Washington DC: Optical Society of America) pp 364–71.
- Jacques, S.L., McAuliffe, D.J.** (1991). The melanosome: threshold temperature for explosive vaporization and internal absorption coefficient during pulsed laser irradiation *Photochem. Photobiol.*, 53, 769–76.
- Jacques, S.L., Pogue, B.W.** (2008). Tutorial on diffuse light transport *J. Biomed. Opt.* 13, 041302.
- Jacques, S.L.**, Alter, C.A., Prahl, S.A. (1987). Angular dependence of HeNe laser light scattering by human dermis *Lasers Life Sci.*, 1, 309–34.
- Jain, D.** (1988). *Dubes Red Algorithms for Clustering Data*. Prentice Hall, pp 334.
- Janbaz, K.H.**, Qadir, M.I., Bassar, H.T., Bokhari, T.H., Ahmad, B. (2014). Risk for oral cancer from smokeless tobacco. *Contemp Oncol (Pozn.)*, 18(3), 160-4.
- Jeftić, B.**, Papic-Obradovic, M., Muncan, J., Matija, L., Koruga, Dj. (2017). Optomagnetic Imaging spectroscopy application in cervical dysplasia and cancer detection: comparison of stained and unstained papanicolaou smears. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 37, 936–943.
- Jeftić, B.** (2017). Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi spektroskopije. *Doktorska disertacija*.
- Jelovac, D.B.**, Tepavčević, Z., Nikolić, N., Ilić, B., Eljabo, N., Popović, B. et al (2016). The amplification of c-erb-B2 in cancer-free surgical margins is a predictor of poor outcome in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 45, 700-5.
- Jemal, A.**, Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. et al (2008). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, 58(2), 71-96.
- Jerjes, W.**, Swinson, B., Johnson, K.S., Thomas, G.J., Hopper, C. (2005). Assessment of bony resection margins in oral cancer using elastic scattering spectroscopy: a study on archival material. *Arch Oral Biol*, 50(3), 361–6.
- Jerjes, W.**, Swinson, B., Pickard, D., Thomas, G.J., Hopper, C. (2004). Detection of cervical intranodal metastasis in oral cancer using elastic scattering spectroscopy. *Oral Oncol*, 40(7), 673–8.
- Jerjes, W.**, Upile, T., Betz, C.S., Abbas, S., Sandison, A., Hopper, C. (2008). Detection of oral pathologies using optical coherence tomography. *Eur Oncol.*, 4, 57–9.
- Jerjes, W.**, Upile, T., Conn, B., Betz, C.S., McKenzie, G., Radhi, H. et al. (2010). In vitro examination of suspicious oral lesions using optical coherence tomography. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 48, 18-25.
-

-
- Jérôme, D.R.**, Maureen, F., Johan, W., Perpèteb, A., Julien, P., Denis, J. (2007). Towards the understanding of the absorption spectra of NAD(P)H/NAD(P)⁺ as a common indicator of dehydrogenase enzymatic activity. *Chem. Phys. Lett.*, 450(1-3), 119-122.
- Johnson, R.E.**, Sigman, J.D., Funk, G.F., Robinson, R.A, Hoffman, H.T. (1997). Quantification of surgical margin shrinkage in the oral cavity. *Head Neck*;19(4):281-6.
- Jolliffe, I.T.** (2002) *Principal Component Analysis*; 2nd (edn). Springer: New York, NY, USA, pp 487.
- Jones. J.**, Sugiyama, M., Watt, F.M., Speight, P.M. (1993). Integrin expression in normal, hyperplastic, dysplastic, and malignant oral epithelium. *J Pathol*, 169, 235-243.
- Jorgensen, K.**, Elbroud, O., Anderson, A.P. (1973). Carcinoma of the lip: a series of 869 cases. *Acta Radiol Ther Phys Biol*, 12, 177-90.
- Jovanovic, A.**, Schulten, E.A., Kostense, P.J., Snow, G.B., van der Waal, I. (1993). Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 22, 459-62.
- Jun, M.Y.**, Strong, E.W., Saltzman, E.I., Gerold, F.P. (1983). Head and neck cancer in the elderly. *Head Neck Surg*. May-Jun, 5(5), 376-382.
- Junaid, M.**, Choudhary, M.M., Sobani, Z.A., Murtaza, G., Qadeer, S., Ali, N.S. et al (2012). A comparative analysis of toluidine blue with frozen section in oral squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol*, 10, 57.
- Junaid, M.**, Suhail, A., Umer, B., Nawaz, A., Ikram, M., Sobani, Z.U. et al (2013). Toluidine blue: yet another low cost method for screening oral cavity tumour margins in third world countries. *J Pak Med Assoc*, 63, 835-837.
- Kadler, K.E.**, Hill, A., Canty-Laird, E.G. (2008). Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Current Opin Cell Biol*, 20, 495-501.
- Kain, J.J.**, Birkeland, A.C., Udayakumar, N., Morlandt, A.B., Stevens, T.M., Carroll, W.R., Rosenthal, E.L., Warram, J.M. (2020). Surgical margins in oral cavity squamous cell carcinoma: Current practices and future directions. *Laryngoscope*, 130(1), 128-138.
- Kalmar, J.R.** (2006). Advances in the detection and diagnosis of oral precancerous and cancerous lesions. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am*, 18, 465-82.
- Kamat, M.**, Rai, B.D., Puranik, R.S., Datar, U.V. (2019). A comprehensive review of surgical margin in oral squamous cell carcinoma highlighting the significance of tumor-free surgical margins. *J Cancer Res Ther*. 15(3), 449-454.
- Keereweer, S.**, Sterenborg, H.J., Kerrebijn, J.D., Van Driel, P.B., Baatenburg de Jong, R.J., Löwik, C.W. (2012). Image-guided surgery in head and neck cancer: current practice and future directions of optical imaging. *Head Neck*, 34, 120-126.
- Keereweer, S.**, Van Driel, P.B., Robinson, D.J., Lowik, C.W. (2014). Shifting focus in optical image-guided cancer therapy. *Mol. Imaging Biol.*, 16, 1-9.
- Kerawala, C.J.**, Beale, V., Reed, M., Martin, I.C. (2000). The role of vital tissue staining in the marginal control of oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 29, 32-35.
- Kessenbrock, K.**, Plaks, V., Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumour microenvironment. *Cell*, 141, 52-67.
- Kim, J.**, Brown, W., Maher, J.R., Levinson, H., Wax, A. (2015). Functional optical coherence tomography: Principles and progress. *Phys Med Biol*, 60, R211-37.
- Koo, K.**, Barrowman, R., McCullough, M., Iseli, T., Wiesenfeld, D. (2013). Non-smoking nondrinking elderly females: a clinically distinct subgroup of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 42, 929-33.
- Koontongkaew, S.** (2013). The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*; 4, 66-83.
-

-
- Koruga, Dj.**, Miljković, S., Ribar, S., Matija, L., Kojić, D. (2010). Water hydrogen bonds study by opto-magnetic fingerprint. *Acta Physics Polonica A*, 117(5), 777–781.
- Koruga, Dj.** (2017). *Hyperpolarized light: Fundamentals of nanobiomedical photonics*. Belgrade: Zepter World Book.
- Koruga, Dj., Tomić, A.** (2009). System and Method for Analysis of Light matter Interaction Based on Spectral Convolution. US Patent Pub. No: 2009/0245603.
- Kossatz, S.**, Brand, C., Gutiontov, S., Liu, J.T., Lee, N.Y., Gönen, M. et al (2016). Detection and delineation of oral cancer with a PARP1 targeted optical imaging agent. *Sci Rep*, 6, 21371.
- Kowalski, L.P.**, Hashimoto, I., Magrin, J. (1993). End results of 114 extended “commando” operations for retromolar trigone carcinoma. *Am J Surg*, 166, 374–9.
- Kuk, S.K.**, Yoon, H.J., Hong, S.D., Hong, S.P., Lee, J.I. (2016). Staging significance of bone invasion in small-sized (4cm or less) oral squamous cell carcinoma as defined by the American Joint Committee on Cancer. *Oral Oncol*, 55, 31–36.
- Kumar, G.L., Kiernan, J.A.** (2010). *Educational guide: Special stains and H & E*. 2nd ed. CA: Dako North America.
- Kumar, V.**, Abbas, A.K., Aster, J.C. (2009). *Robbins Basic Pathology*. Chapter 7: Neoplasia. 8th ed. Saunders, Philadelphia, PA, pp-298-299.
- Kurita, H., Kurashina, K.** (1996). Vital staining with iodine solution in delineating the border of oral dysplastic lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 81, 275–280.
- Kurita, H.**, Nakanishi, Y., Nishizawa, R., Xiao, T., Kamata, T., Koike, T. et al (2010). Impact of different surgical margin conditions on local recurrence of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 46, 814–7.
- Kurokawa, H.**, Zhang, M., Matsumoto, S., Yamashita, Y., Tomoyose, T., Tanaka, T. et al (2005). The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 34, 329-333.
- Kwon, K.**, Son, T., Lee, K., Jung, B. (2009). Enhancement of light prop depth in skin: cross-validation of mathematical modelling methods. *Lasers Med Sci*, 24(4), 605–615.
- La Vecchia, C.**, Tavani, A., Franceschi, S., Levi, F., Corrao, G., Negri, E. (1997). Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol*, 33, 302–12.
- Lalla, Y.**, Matias, M., Farah, C.S. (2015). Oral mucosal disease in an Australian urban Indigenous community using autofluorescence imaging and reflectance spectroscopy. *Aust. Dent. J.*, 60, 216–224.
- Landis, J.R., Koch, G.G.** (1977) "The measurement of observer agreement for categorical data" in *Biometrics.*, 33, 159–174.
- Lane, P.M.**, Gilhuly, T., Whitehead, P.D. et al (2006). Simple device for the direct visualization of oral-cavity tissue fluorescence. *J. Biomed. Opt.*, 11, 024006.
- Langendijk, J.A.**, de Jong, M.A., Leemans, C.R., de Bree, R., Smeele, L.E., Doornaert, P. et al (2003). Postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oral cavity: the importance of the overall treatment time. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 57, 693-700.
- Larhman** (2018). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SVM_margin.png
- Lauby-Secretan, B.**, Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., Straif, K. et al (2016). Body fatness and cancer—viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med.*, 375, 794-798.
- Lee, J.**, Taneja, V., Vassallo, R. (2012). Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res*, 91, 142-149.
- Lee, Y.C.**, Marron, M., Benhamou, S. et al (2009). Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 3353-3361.
-

-
- Lehew, C.W.**, Epstein, J.B., Kaste, L.M., Choi, Y.K. (2010). Assessing oral cancer early detection: clarifying dentists' practices. *J Public Health Dent*, Spring, 70(2), 93-100.
- Leitgeb, R.A.**, Hitzenberger, C.K., Fercher, A.F. (2003). Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography. *Opt. Express*, 11, 889-894.
- Leitgeb, R.A.**, Werkmeister, R.M., Blatter, C., Schmetterer, L. (2014). Doppler optical coherence tomography. *Prog Retin Eye Res*, 41, 26-43.
- Levy, L.L.**, Schwarz, R., Polydorides, A.D., Gillenwater, A.M., Richards-Kortum, R., Sikora, A.G. et al (2013). OP078: High resolution microendoscopy of intraoperative resection margins in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol*, 49(Suppl 1), S35.
- Li, C.**, Lin, J., Men, Y., Yang, W., Mi, F., Li, L. (2017). Does medullary versus cortical invasion of the mandible affect prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma? *J Oral Maxillofac Surg*, 75(2), 403-415.
- Li, Y.**, Wen, Z., Li, L., Li, M., Gao, N., Guo, Y. et al (2010). Research on the Raman spectral character and diagnostic value of squamous cell carcinoma of oral mucosa. *J. Raman Spectrosc.*, 41, 142-147.
- Li, Z.H.**, Gao, W., Lei, W.B., Ho, W.K., Chan, Y.W., Wong, T.S. (2013). The clinical utility of narrow band imaging in the surveillance of mucosa and sub-mucosa lesions in head and neck regions. *Head Neck Oncol*, 5, 29.
- Liao, C.T.**, Chang, J.T., Wang, H.M., Ng, S.H., Hsueh, C., Lee, L.Y. et al (2008). Analysis of risk factors of predictive local tumor control in oral cavity cancer. *Ann Surg Oncol*, 15, 915-922.
- Lim, S.C.**, Zhang, S., Ishii, G., Endoh, Y., Kodama, K., Miyamoto, S. et al (2004). Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res*, 10, 166-172.
- Lin, Y.C.**, Wang, W., Lee, H.K.F., Tsai, W.C., Weng, H.H. (2012). Value of narrow band imaging endoscopy in early mucosal head and neck cancer. *Head Neck*, 34, 1574-1579.
- Ling, W.**, Mijiti, A., Moming, A. (2013). Survival pattern and prognostic factors of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: a retrospective analysis of 210 cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 71(4), 775-85.
- Lister, T.**, Wright, P.A., Chappell, P.H. (2012). Optical properties of human skin. *J Biomed Opt*, 17(9), 090901.
- Lloyd, G.R.**, Orr, L.E., Christie-Brown, J., McCarthy, K., Rose, S., Thomas, M. et al (2013). Discrimination between benign, primary and secondary malignancies in lymph nodes from the head and neck utilising Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Analyst*, 138, 3900-3908.
- Looser, K.G.S.J.**, Shah, J.P., Strong, E.W. (1978). The significance of "positive" margins in surgically resected epidermoid carcinomas. *Head Neck Surg.*, 1(2), 107-111.
- Loree, T.R.**, Strong, E.W. (1990). Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg.*, 160(4), 410-4.
- Louie, J.S.**, Shukla, R., Richards-Kortum, R., Anandasabapathy, S. (2015). High-resolution microendoscopy in differentiating neoplastic from non-neoplastic colorectal polyps. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 29, 663-673.
- Lubin, J.H.**, Muscat, J., Gaudet, M.M., Olshan, A.F., Curado, M.P., Dal Maso, L. et al (2011). An examination of male and female odds ratios by BMI, cigarette smoking, and alcohol consumption for cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx in pooled data from 15 case-control studies. *Cancer Causes Control*, 22(9), 1217-31.
- Lucassen, G.W.**, Caspers, P.J., Puppels, G.J., Darvin, M.E., Lademann, J. (2016). "Infrared and Raman spectroscopy of human skin in vivo" in *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. Vol. 2: Methods, V. V. Tuchin (ed.), 2nd ed., PM263, SPIE Press, Bellingham, WA, 191-210.
-

-
- Luna, L.G.** (1991). "The quality control dilemma in Histotechnology: A possible answer" *Histologic*, 21(3), 245-250.
- Luryi, A.L.**, Chen, M.M., Mehra, S., Roman, S.A., Sosa, J.A., Judson, B.L. et al (2015). Treatment factors associated with survival in early-stage oral cavity cancer: analysis of 6830 cases from the national cancer data base. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 141(7), 593–8.
- Lydiatt, W.M.**, Patel, S.G., O'Sullivan, B., Brandwein, M.S., Ridge, J.A., Migliacci, J.C. et al. (2017). Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*, 67(2), 122–37.
- Maasland, D.H.**, van den Brandt, P.A., Kremer, B., Goldbohm, R.A., Schouten, L.J. (2014). Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*, 14, 187.
- Mahadevan-Jansen, A., Richards-Kortum, R.** (1996). Raman spectroscopy for detection of cancers and precancers. *J. Biomed. Opt.*, 1(1), 31–70.
- Mair, M.**, Nair, D., Nair, S., Dutta, S., Garg, A., Malik, A. et al (2017). Intraoperative gross examination vs frozen section for achievement of adequate margin in oral cancer surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 123, 544–549.
- Malacara, D.** (2011). *Color vision and colorimetry: Theory and applications*(2nd ed.). Washington, DC: SPIE.
- Malini, R.**, Venkatakrishna, K., Kurien, J., Pai, K.M., Rao, L., Kartha, V.B. et al (2006). Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. *Biopolymers*, 81, 179–193.
- Marron, M.**, Boffetta, P., Zhang, Z.F. et al (2010). Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol*, 39, 182-196.
- Mashberg, A.** (1980). Re-evaluation of toluidine blue application as a diagnostic adjunct in the detection of asymptomatic oral squamous cell carcinoma: a continuing prospective study of oral cancer. *Cancer*, 46, 758–63.
- Mashberg, A.** (1981). Tolonium (toluidine blue) rinse – a screening method for the recognition of squamous carcinoma: continuing study of oral cancer. *JAMA*, 245, 2408–10.
- Mashberg, A.**, Boffetta, P., Winkelman, R., Garfinkel, L. (1993). Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer*, 72, 1369–75.
- Mashberg, A., Samit, A.** (1995) Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA Cancer J Clin*, 45(6), 328–51.
- Matija, L.**, Jeftic, B., Nikolic, G., Dragicevic, A., Mileusnic, I., Muncan, J. et al (2014). Nanophysical approach to diagnosis of epithelial tissue using opto-magnetic imaging spectroscopy. In A. Seifalian, A. Mel, & D. M. Kalaskar (Eds.), *Nanomedicine* (pp. 156–186). London: One Central Press.
- Maule, M., Merletti, F.** (2012). Cancer transition and priorities for cancer control. *Lancet Oncol.*, 13, 745-746.
- Maxwell, J.H.**, Thompson, L.R., Brandwein-Gensler, M.S., Weiss, B.G., Canis, M., Purgina, B. et al (2015). Early oral tongue squamous cell carcinoma: sampling of margins from tumor bed and worse local control. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 141, 1104–1110.
- Mazziotti, S.**, Ascenti, G., Scribano, E., Mileto, A., Racchiusa, S., Visalli, C. et al (2013). CT-MR integrated diagnostic imaging of the oral cavity: neoplastic disease. *La radiologia Med*, 118, 123-139.
- McCoy, G.D.** (1978). A biochemical approach to the aetiology of alcohol related cancers of the head and neck. *Laryngoscope*, 88, 59–62.
- McIntyre, G.I.** (2006). Cell hydration as the primary factor in carcinogenesis: a unifying concept. *Med. Hypotheses*, 66, 518–526.
-

-
- McIntyre, G.I.** (2007). Increased cell hydration promotes both tumor growth and metastasis: A biochemical mechanism consistent with genetic signatures *Med. Hypotheses*, 69, 1127–1130.
- McMahon, J.**, O'Brien, C.J., Pathak, I., Hamill, R., McNeil, E., Hammersley, N. et al (2003). Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 41, 224–231.
- McNamara, K.K.**, Martin, B.D., Evans, E.W., Kalmar, J.R. (2012). The role of direct visual fluorescent examination (VELscope) in routine screening for potentially malignant oral mucosal lesions. *Oral Surg. Oral Med Oral Pathol. Oral Radiol.*, 114, 636–643.
- Meier, J.D.**, Oliver, D.A., Varvares, M.A. (2005). Surgical margin determination in head and neck oncology: current clinical practice. The results of an International American Head and Neck Society Member Survey. *Head Neck*, 27, 952–958.
- Mercadante, V.**, Paderni, C., Campisi, G. (2012). Novel non-invasive adjunctive techniques for early oral cancer diagnosis and oral lesions examination. *Curr. Pharm. Des.*, 18, 5442–5451.
- Meredith, P.**, Powell, B.J., Riesz, J., Nighswander-Rempel, S.P., Pederson, M., Moore, E.G. (2006). Towards structure-property-function relationships for eumelanin. *Soft. Matter.*, 2(1), 37–44.
- Messadi, D.V.** (2013). Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. *Int J Oral Sci*, 5, 59–65.
- Meyer, J.**, Squier, C.A., Gerson, S.J. (1984). The structure and function of oral mucosa. Pergamon Press, New York.
- Meyer, M.S.**, Joshipura, K., Giovanucci, E., Michaud, D.S. (2008). A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer. *Cancer Causes Control*, 19(9), 895–907.
- Miles, B.A.**, Patsias, A., Quang, T., Polydorides, A.D., Richards-Kortum, R., Sikora, A.G. (2015). Operative margin control with high-resolution optical microendoscopy for head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, 125, 2308–2316.
- Mills, S.E.** (2013). "Histology for Pathologists", Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.
- Miloro, M.**, Ghali, G.E., Larsen, P., Waite, P. (2004). Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery 2nd ed. Chapter 32: Oral Cancer: Classification, Staging, and Diagnosis (pp 617-630). BC Decker Inc. Ontario, Canada.
- Milosevic, M.**, Lazarevic, M., Toljic, B., Simonovic, J., Trisic, D., Nikolic, N., Petrovic, M., Milasin, J. (2018). Characterization of stem-like cancer cells in basal cell carcinoma and its surgical margins. *Experimental Dermatology*, 27(10), 1160-1165.
- Mishchenko, M.I.**, Travis, L.D., Lalis, A.A. (2002). Scattering, Absorption, and Emission of Light by Small Particles, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Mishra, R.C.**, Singh, D.N., Mishra, T.K. (1996). Post-operative radiotherapy in carcinoma of buccal mucosa, a prospective randomized trial. *Eur J Surg Oncol.*, 22, 502-4.
- Mistry, R.C.**, Qureshi, S.S., Kumaran, C. (2005). Post-resection mucosal margin shrinkage in oral cancer: quantification and significance. *J Surg Oncol*, 91(2), 131–3.
- Moran, A.**, Shorook, N.A., Leonor, L.T. et al (2016). Improving the rate of negative margins after surgery for oral cavity squamous cell carcinoma: A prospective randomized controlled study. *Head Neck*, 38(suppl 1), E1803–E1809.
- Mourant, J.R.**, Canpolat, M., Brocker, C., Esponda-Ramos, O., Johnson, T.M., Matanock, A. et al (2000). Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status. *J. Biomed. Opt.*, 5, 131–137.
- Mourant, J.R.**, Fuselier, T., Boyer, J., Johnson, T., Bigio, I.J. (1997). Predictions and measurements of scattering and absorption over broad wavelength ranges in tissue phantoms. *Appl Opt.*, 36(4), 949–957.
-

-
- Mourant, J.R.**, Johnson, T.M., Carpenter, S., Guerra, A., Aida, T., Freyer, J.P. (2002). Polarized angular dependent spectroscopy of epithelial cells and epithelial cell nuclei to determine the size scale of scattering structures *J. Biomed. Opt.*, 7, 378–87.
- Muldoon, T.J.**, Roblyer, D., Williams, M.D., Stepanek, V.M., Richards-Kortum, R., Gillenwater, A.M. (2012). Noninvasive imaging of oral neoplasia with a high-resolution fiber-optic microendoscope. *Head Neck*, 34, 305–312.
- Müller, S.**, Pan, Y., Li, R., Chi, A.C. (2008). Changing trends in oral squamous cell carcinoma with particular reference to young patients: 1971-2006. The Emory university experience. *Head Neck Pathol*, 2, 60–6.
- Murthy, S.K.** (1998). Automatic construction of decision trees from data: A multi-disciplinary survey. *Data Mining and Knowledge Discovery*, 2(4), 345–389.
- Murti, P.R.**, Bhonsle, R.B., Pindborg, J.J., Daftary, D.K., Gupta, P.C., Mehta, F.S. (1985). Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *Community Dent Oral Epidemiol*, 13, 340–1.
- Murty, M.N., Devi, V.S.** (2011). *Pattern Recognition - An Algorithmic Approach*. (p.93), Springer. ISBN: 978-0-85729-495-1.
- Nanci, A.** (2013). *Ten Cate's Oral Histology, Development, Structure and Function*. 8th ed. Mosby Inc., St.Louis
- Nason, R.W.**, Binahmed, A., Pathak, K.A., Abdoh, A.A., Sándor, G.K. (2009). What is the adequate margin of surgical resection in oral cancer? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107, 625-9.
- Naurecka, M.L.**, Sierakowski, B.M., Kasprzycka, W., Dojs, A., Dojs, M., Suszyński, Z. et al (2017). FTIR-ATR and FT-Raman Spectroscopy for Biochemical Changes in Oral Tissue. *American Journal of Analytical Chemistry*, 8(3), 180.
- Ng, J.H.**, Iyer, N.G., Tan, M-H., Edgren, G. (2017). Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck*, 39, 297–304.
- Nguyen, P.**, Bashirzadeh, F., Hodge, R., Agnew, J., Farah, C.S., Duhig, E. et al (2013). High specificity of combined narrow band imaging and autofluorescence mucosal assessment of patients with head and neck cancer. *Head Neck*, 35, 619–625.
- Nguyen, Q.T.**, Olson, E.S., Aguilera, T.A., Jiang, T., Scadeng, M., Ellies, L.G. et al (2010). Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4317–4322.
- Ni, X.G., Wang, G.Q.** (2016). The role of narrow band imaging in head and neck cancers. *Curr. Oncol. Rep.*, 18, 10.
- Nick's Radiology Wiki** (2017). <http://fasanonet.com/rad/lib/exe/detail.php?id=neuro&media=lymphzones.gif>
- Niebel, H.H., Chomet, B.** (1964). *In vivo* staining for the delineation of oral intraepithelial neoplastic change. *J AmDent Assoc*: 68: 801–6.
- Ninomiya, Y.**, Kagawa, M., Iyama, K., Naito, I., Kishiro, Y., Seyer, J.M. et al (1995) Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. *J Cell Biol*, 1, 1219–29.
- Nossal, R., Lecar, H.** (1991). *Molecular and Cell Biophysic*. Addison-Wesley, Reedwood City.
- Novis, D.A., Zarbo, R.J.** (1997). Interinstitutional comparison of frozen section turnaround time: a College of American Pathologists Q-Probes study of 32868 frozen sections in 700 hospitals. *Arch Pathol Lab Med.*, 121, 559–567.
- Odell, E.W.** (2017). *Cawson's essentials of oral pathology and oral medicine*. London: Elsevier Ltd.
-

-
- Ohnishi, Y.,** Fujii, T., Ugaki, Y., Yasui, H., Watanabe, M., Dateoka, S. et al (2016). Usefulness of a fluorescence visualization system for the detection of oral precancerous and early cancerous lesions. *Oncol Rep*, 36, 514–520.
- Oji, C., Chukwuneke, F.** (2012). Poor oral hygiene may be the sole cause of oral cancer. *J Maxillofac Oral Surg*, 11(4), 379-83.
- Oliveira, A.P.,** Bitar, R.A., Silveira, L., Zangaro, R.A. and Martin, A.A. (2006). Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis. *Photomed. Laser Surg.*, 24, 348–353.
- Omura, K.** (2014). Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol.*;19:423–430.
- Oneson, R.H.,** Minke, J.A., Silverberg, S.G. (1989). Intraoperative pathologic consultation: an audit of 1000 recent consecutive cases. *Am J Surg Pathol.*,13, 237–243.
- Ong, T.K.,** Murphy, C., Smith, A.B., Kanatas, A.N., Mitchell, D.A. (2017). Survival after surgery for oral cancer: a 30-year experience. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 55(9), 911–6.
- OpenStax College** (2013). Anatomy & Physiology, Connexions Web site. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>; https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2305_Divisions_of_the_Pharynx.jpg
- OpenStax College** (2013). Anatomy & Physiology, Connexions Web site. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>; https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0c/2406_Structures_of_the_Mouth.jpg
- Overholt, S.M.,** Eicher, S.A., Wolf, P., Weber, R.S. (1996). Prognostic factors affecting outcome in lower gingival carcinoma. *Laryngoscope*, 106, 1335–9.
- Ozturk, K.,** Gode, S., Erdogan, U., Akyildiz, S. et al (2015). Squamous cell carcinoma of the lip: survival analysis with long-term follow-up. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, 272, 3545–50.
- Pain, H.J.** (2005). *The Physics of Vibrations and Waves*, 6th Edition. John Wiley, West Sussex
- Parise, O.** (2000). *Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos*. Sarvier.
- Parkin, D.M.** (2011). Cancers attributable to consumption of alcohol in the UK in 2010. *Br J Cancer*, 105, S14–8.
- Parkin, D.M.** (2011). Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. *Br J Cancer*, 105, S6–13.
- Parkin, D.M.,** Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005). Global cancer statistics-2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2), 74–10.
- Patel, S.C.,** Carpenter, W.R., Tyree, S., Couch, M.E., Weissler, M., Hackman, T. et al (2011). Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol*, 29, 1488–94.
- Pathak, K.A.,** Nason, R.W., Penner, C., Viallet, N.R., Sutherland, D., Kerr, P.D. (2009). Impact of use of frozen section assessment of operative margins on survival in oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107, 235–239.
- Pawlina, W., Ross Michael, H.** (2016). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Seventh edition. Wolters Kluwer Health
- Peng, H.,** Wang, S.J., Niu, X., Yang, X., Chi, C., Zhang, G. (2015). Sentinel node biopsy using indocyanine Greene in oral/oropharyngeal cancer. *World J Surg Oncol*, 13, 278.
- Perelman, L.T.,** Winn, J., Wu, J., Dasari, R.R., Feld, M.S. (1997). Photon migration of near-diffusive photons in turbid media: a Lagrangian-based approach. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 14(1), 224–9.
- Peters, L.J.,** Goepfert, H., Ang, K.K., Byers, R.M., Maor, M.H., Guillaumondegui, O. et al (1993). Evaluation of the dose for post-operative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 26, 3–11.
- Petrović, M., Jelovac, D.** (2008). The Frequency and Outcome of Lip Cancer in Serbian Population. *Balkan Journal of Stomatology*, 12, 34-7.
-

-
- Petti, S.** (2009). Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol*, 45(4–5), 340–50.
- Piazza, C., Cocco, D., Del Bon, F., Mangili, S., Nicolai, P., Peretti, G.** (2011). Narrow band imaging and high definition television in the endoscopic evaluation of upper aero-digestive tract cancer. *Acta Otorhinolaryngol.*, 31, 70–75.
- Piazza, C., Del Bon, F., Peretti, G., Nicolai, P.** (2012). Narrow band imaging in endoscopic evaluation of the larynx. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 20, 472–476.
- Pickup, M.W., Mouw, J.K., Weaver, V.M.** (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*, 15, 1243–1253.
- Pierce, M., Yu, D., Richards-Kortum, R.** (2011). High-resolution fiber-optic microendoscopy for in situ cellular imaging. *J. Vis. Exp.*, 47, 2306.
- Pierce, M.C., Schwarz, R.A., Bhattar, V.S., Mondrik, S., Williams, M.D., Lee, J.J. et al** (2012). Accuracy of in vivo multimodal optical imaging for detection of oral neoplasia. *Cancer Prev. Res.*, 5, 801–809.
- Pindborg, J.J., Reichart, P.A., Smith, C.J., van der Waal, I.** (1997). Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. International histological classification of tumours. World Health Organization.
- Pircher, M., Hitzemberger, C.K., Schmidt-Erfurth, U.** (2011). Polarization sensitive optical coherence tomography in the human eye. *Prog Retin Eye Res*, 30, 431–51.
- Poh, C.F., Durham, J.S., Brasher, P.M., Anderson, D.W., Berean, K.W., MacAulay, C.E. et al** (2011). Canadian Optically-guided approach for Oral Lesions Surgical (COOLS) trial: study protocol for a randomized controlled trial. *BMC Cancer*, 11, 462.
- Poh, C.F., Anderson, D.W., Durham, J.S., Chen, J., Berean, K.W., MacAulay, C.E. et al** (2016). Fluorescence visualization-guided surgery for early-stage oral cancer. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 142, 209–216.
- Poh, C.F., Zhang, L., Anderson, D.W., Durham, J.S., Williams, P.M., Priddy, R.W. et al** (2006). Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. *Clin Cancer Res*, 12, 6716–6722.
- Pollack, G.H.** (2001). *Cells, Gels and the Engines of Life; a New Unifying Approach to Cell Function.* Ebner and Sons Publishers, Washington
- Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., Lippincott-Schwartz, J.** (2008). *Cell biology*, 2nd edition. Saunders, Philadelphia.
- Prento, P.** (2009). Staining of macromolecules: possible mechanisms and examples. *Biotech Histochem*, 84, 139–158.
- Priya, S.R., D’Cruz, A.K., Pai, P.S.** (2012). Cut margins and disease control in oral cancers. *J Cancer Res Ther*, 8, 74–9.
- Protano, M.A., Xu, H., Wang, G., Polydorides, A.D., Dawsey, S.M., Cui, J. et al** (2015). Low-cost high-resolution microendoscopy for the detection of esophageal squamous cell neoplasia: an international trial. *Gastroenterology*, 149, 321–329.
- Purushotham, S., Tripathy, B.K.** (2012). Evaluation of classifier models using stratified tenfold cross validation techniques. In: Krishna, P. V., Babu, M. R., and Ariwa, E. (Eds.), *Global Trends in Information Systems and Software Applications, Pt 2.* Springer-Verlag Berlin, Berlin, pp. 680–690.
- Quinlan, J.R.** (1986). Induction of decision trees. *Machine Learning*, 1, 81–106.
- Quinlan-Davidson, S.R., Mohamed, A.S.R., Myers, J.N., Gunn, G.B., Johnson, F.M., Skinner, H. et al** (2017). Outcomes of oral cavity cancer patients treated with surgery followed by postoperative intensity modulated radiation therapy. *Oral Oncol*, 72, 90–7.
- Rajesh, K.S., Thomas, D., Hegde, S., Kumar, M.S.** (2013). Poor periodontal health: A cancer risk? *J Indian Soc Periodontol*, 17(6), 706–10.
-

-
- Randolph, T.W.** (2006). Scale-based normalization of spectral data. *Cancer Biomark.*, 2, 135–44.
- Reibel, J.** (2003). Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14, 47-62.
- Reidy, J.,** McHugh, E. and Stassen, L.F. (2011). A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon*, 9, 278-283.
- Reis, P.P.,** Waldron, L., Perez-Ordóñez, B., Pintilie, M., Galloni, N.N., Xuan, Y. et al (2011). A gene signature in histologically normal surgical margins is predictive of oral carcinoma recurrence. *BMC Cancer*, 11, 437.
- Rethman, M.P.,** Carpenter, W., Cohen, E.E., Epstein, J., Evans, C.A., Flaitz, C.M. et al (2010). Evidence-based clinical recommendations regarding screening for oral squamous cell carcinomas. *J Am Dent Assoc*, 141, 509–20.
- Riesz J.** (2007). The spectroscopic properties of melanin. Ph.D. Thesis, University of Queensland.
- Rivera, C.** (2015). Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(9), 11884–94.
- Rivera, C., Venegas, B.** (2014). Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett*; 8, 7-11.
- Rivera, C.A.,** Droguett, D.A., Kemmerling, U., Venegas, B.A. (2011). Chronic restraint stress in oral squamous cell carcinoma. *J Dent Res*, 90, 799-803.
- Rizvi, Z.H.,** Alonso J.E. et al. (2018). Treatment outcomes of patients with primary squamous cell carcinoma of the retromolar trigone. *Laryngoscope*, 128, 2740-2744.
- Robbins, K.T.,** Clayman, G., Levine, P.A., Medina, J., Sessions, R., Shaha, A. et al (2002). Neck dissection classification update: Revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 128, 751–8.
- Roblyer, D.,** Kurachi, C., Stepanek, V., Williams, M.D., El-Naggar, A.K., Lee, J.J. et al (2009). Objective detection and delineation of oral neoplasia using autofluorescence imaging. *Cancer Prev. Res.*, 2, 423–431.
- Roepman, P.,** Wessels, L.F., Kettelarij, N., Kemmeren, P., Miles, A.J., Lijnzaad, P. et al (2005). An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet*, 37(2), 182–6.
- Rosenthal, E.L.,** Warram, J.M., Bland, K.I., Zinn, K.R. (2015). The status of contemporary image-guided modalities in oncologic surgery. *Ann. Surg.*, 261, 46–55.
- Rosenthal, E.L.,** Warram, J.M., de Boer, E., Chung, T.K., Korb, M.L., Brandwein-Gensler, M. et al (2015). Safety and tumor specificity of cetuximab-IRDye800 for surgical navigation in head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.*, 21, 3658–3666.
- Rouviere, H.** (1938). Anatomy of the human lymphatic system. Tobies MJ, translator. Ann Arbor (MI): Edwards Brother.
- Roweis, S.T., Saul, L.K.** (2000). Nonlinear dimensionality reduction by Locally Linear Embedding. *Science*, 290(5500), 2323–2326.
- Ruifrok, A.C., Johnston, D.A.** (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol.*, 23, 291-299.
- Saba, N.F.,** Goodman, M., Ward, K., Flowers, C., Ramalingam, S., Owonikoko, T. et al (2011). Gender and ethnic disparities in incidence and survival of squamous cell carcinoma of the oral tongue, base of tongue, and tonsils: A surveillance, epidemiology and end results program-based analysis. *Oncology*, 81, 12–20.
- Sackett, D.L.,** Straus, S., Richardson, W.S., Rosenberg, W., Haynes, R.B. (2000). Evidence based medicine. How to practise and teach EBM. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 67-93.
-

-
- Saggi, S.,** Badran, K.W., Han, A.Y., Kuan, E.C., St John, M.A. (2018). Clinicopathologic characteristics and survival outcomes in floor of mouth squamous cell carcinoma: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 159(1), 51–58.
- Saidi, I.S.,** Jacques, S.L., Tittel, F.K. (1995). Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin. *Appl. Opt.*, 34, 7410–8.
- Sammut, C., Webb, G.I.** (2011). Encyclopedia of machine learning (C. Sammut & G. I. Webb, Eds.). New York, NY: Springer.
- Sandell, J.L., Zhu, T.C.** (2011). A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on pdt. *J. Biophotonics.*, 4(11–12), 773–787.
- Sarode, S.C., Sarode, G.S.** (2012). A novel ‘microscopic method’ of shrinkage calculation in the pursuance of shrinkage based histopathological guidelines for interpretation of surgical margins. *Oral Oncol*, 48, e15-6.
- Sawady, J.,** Berner, J.J., Siegler, E.E. (1988). Accuracy of and reasons for frozen sections: a correlative retrospective study. *Hum Pathol.*, 19, 1019–1023.
- Schaafsma, B.E.,** Mieog, J.S., Hutteman, M., van der Vorst, J.R., Kuppen, P.J., Löwik, C.W. et al (2011). The clinical use of indocyanine Green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J. Surg. Oncol.*, 104, 323–332.
- Schmidhuber, J.** (2015). Deep learning in neural networks: An overview. *Neural Networks*, 61, 85–117.
- Schneckenburger, H.,** Strauss, W.S.L., Stock, K., Steiner, R. (2016). “Fluorescence technologies in biomedical diagnostics” in *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. Vol. 2: Methods, V. V. Tuchin (ed.), 2nd ed., PM263, SPIE Press, Bellingham, WA, 241–304.
- Scott-Wittenborn, N., Jackson, R.S.** (2018). Intraoperative imaging during minimally invasive transoral robotic surgery using near-infrared light. *Am J Otolaryngol*, 39, 220–222.
- Scully, C.** (2002). Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol*, 38(3), 227–34.
- Scully, C., Bagan, J.** (2009). Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*, 45, 301–8.
- Scully, C., Carrozzo, M.** (2008). Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg.*, 46, 15–21.
- Secretan, B.,** Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V. et al (2009). A review of human carcinogens—Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol.*, 10, 1033-1034.
- Shafer, W.G., Waldron, C.A.** (1975). Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer*, 36, 1021–8.
- Shah, J.P.** et al (2001). Atlas of Clinical Oncology, Cancer of Head and Neck: 102. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York.
- Shah, J.P.,** Candela, F.C., Poddar, A.K. (1990). The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, 66, 109–13.
- Shah, J.P.** and Gil, Z. (2009). Current concepts in management of oral cancer--surgery. *Oral Oncol.*, 45 (4-5), 394-401.
- Shah, J.P., Patel, S.G.** (2003). *Head and Neck Surgery and Oncology*. 3rd Edition. Edinburgh, London, New York: Mosby.
- Shah, J.P., Patel, S.G., Singh, B., eds.** (2012). *Jatin Shah’s Head and Neck Surgery and Oncology*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier.
- Shah, J.P.,** Shemen, L.J., Strong, E.W. (1987). Buccal mucosa, alveolus, retromolar trigone, floor of the mouth, hard palate, and tongue tumors. U: Thawley S.E, i Panje W.R. (urednici) *Comprehensive Management of Head and Neck Tumors*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Mexico Sity, Rio de Janeiro, Sydney, Tokio, Hong Kong, str., 551-563.
-

-
- Shaha, A.R.**, Spiro, R.H., Shah, J.P., Strong, E.W. (1984) Squamous carcinoma of the floor of the mouth. *Am J Surg*, 148, 100–4.
- Sharwani, A.**, Jerjes, W., Salih, V., Swinson, B. et al (2006). Assessment of oral premalignancy using elastic scattering spectroscopy. *OralOncology*, 42, 343–349.
- Shehzadex** (2016). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kernel_yontemi_ile_veriyi_daha_fazla_dimensiyonlu_uzaya_tasima_islemi.png
- Shim, S.J.**, Cha, J., Koom, W., Kim, G.E., Lee, C.G., Choi, E.C. et al (2010). Clinical outcomes for T1-2N0-1 oral tongue cancer patients underwent surgery with and without postoperative radiotherapy. *Radiat Oncol.*, 5, 1-7.
- Shukla, N.K.**, Deo, S.V.S., Jakhetiya, A. et al (2018). Clinical spectrum, treatment and relapse patterns in 353 patients with squamous cell carcinoma of the alveobuccal complex treated with a curative intent: a retrospective study. *J Maxillofac Oral Surg*;17(1):24–31.
- Silverman, S.**, Bhargava, K., Mani, N.J. et al(1976). Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57,518 industrial workers of Gujarat, India. *Cancer*, 38, 1790–5.
- Silverman, S.**, Gorsky, M., Lozada, F. (1984). Oral leukoplakia and malignant transformation: A follow up study of 257 patients. *Cancer*, 53, 563–8.
- Silverman, S.**, Migliorati, C., Barbosa, J. (1984).Toluidine blue staining in the detection of oral precancerous and malignant lesions. *Oral Surg*, 57, 379–82.
- Simpson, C.R.**, Kohl, M., Essenpreis, M., Cope, M. (1998). Near infrared optical properties of *ex-vivo* human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique. *Phys. Med. Biol.*, 43, 2465–78.
- Šimundić, A-M.** (2009). Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. *Med Biol Sci*, 19, 203-211.
- Singh, J.**, Jayaraj, R., Baxi, S., Mileva, M., Skinner, J., Dhand, N.K. et al (2016). Immunohistochemical expression levels of p53 and eIF4E markers in histologically negative surgical margins, and their association with the clinical outcome of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol*, 4, 166-72.
- Singh, S.P.**, Deshmukh, A., Chaturvedi, P., Murali Krishna, C. (2012). In vivo Raman spectroscopic identification of premalignant lesions in oral buccal mucosa. *J Biomed Opt*, 17, 105002.
- Sinichkin, Y.P.**, Kollias, N., Zonios, G.I., Utz, S.R., Tuchin, V.V. (2016). “Reflectance and fluorescence spectroscopy of human skin in vivo” in *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. Vol. 2: Methods, V. V. Tuchin (ed.), 2nd ed., PM263, SPIE Press, Bellingham, WA, 99–190.
- Slaughter, D.P.**, Southwick, H.W., Smejkal, W. (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6, 963–968.
- Slooter, M.D.**, Handgraaf, H.J.M., Boonstra, M.C. et al (2018). Detecting tumour-positive resection margins after oral cancer surgery by spraying a fluorescent tracer activated by gamma-glutamyltranspeptidase. *Oral Oncol*, 78, 1–7.
- Slootweg, P.J.**, Hordijk, G.J., Schade, Y., van Es, R.J., Koole, R. (2002). Treatment failure and margin status in head and neck cancer. A critical view on the potential value of molecular pathology. *Oral Oncol*, 38, 500–503.
- Smith, E., Dent, G.**(2005). *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. Hoboken, NJ: Wiley;p 1-5, 71-3.
- Soo, K.C.**, Spiro, R.H., King, W., Harvey, W., Strong, E.W. (1988). Squamous carcinoma of the gums. *Am J Surg*, 156, 105–9.
- Spiro, R.H.** (1985). Squamous cancer of the tongue. *CA Cancer J Clin*, 35, 252–6.
- Spiro, R.H.**, Guillaumondegui, O., Paulino, A.F., Huvos, A.G. (1999). Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck*, 21, 408–413.
-

-
- Strauss, M.B.** (1957). *Body Water in Man*. Boston, Little, Brown & Company
- Strong, E.W., Spiro, R.H.** (1987). Cancer of the oral cavity. In: Myers EN, Suen JY, editors. *Cancer of the head and neck*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; p. 417–64.
- Strong, M.S.,** Vaughan, C.W., Incze, J.S. (1968). Toluidine blue in the management of carcinoma of the oral cavity. *Arch Otolaryngol*, 87, 101–5.
- Sturm, M.B., Wang, T.D.** (2015). Emerging optical methods for surveillance of Barrett's oesophagus. [Review]. *Gut*, 64, 1816–1823.
- Su, L.,** Sun, Y.F., Chen, Y., Chen, P. et al (2012). Raman spectral properties of squamous cell carcinoma of oral tissues and cells. *Laser Phys*, 22, 311–316.
- Sutton, D.N.,** Brown, J.S., Rogers, S.N. et al (2003). The prognostic implications of the surgical margin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, 32, 30-34.
- Sweeny, L.,** Dean, N.R., Magnuson, J.S., Carroll, W.R., Clemons, L., Rosenthal, E.L. et al (2011). Assessment of tissue autofluorescence and reflectance for oral cavity cancer screening. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 145, 956–960.
- Swets, J.A.** (1979). ROC analysis applied to the evaluation of medical imaging techniques. *Invest Radiol*; 14:109-21.
- Tabachnick, B.G.** (1996). *Using Multivariate Statistics*; 3rd (edn). Harper Colins College Publishers.
- Takano, J.H.,** Yakushiji, T., Kamiyama, I., Nomura, T., Katakura, A., Takano, N. et al (2010). Detecting early oral cancer: narrowband imaging system observation of the oral mucosa microvasculature. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg*, 39, 208–213.
- Takeichi, M.** (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251, 1451-1455.
- Takiwaki, H.** (1998). Measurement of skin color: practical application and theoretical considerations. *J. Med. Invest.*, 44(3–4), 103–108.
- Tamamura, R.,** Nagatsuka, H., Siar, C.H., Katase, N., Naito, I., Sado, Y. et al (2013). Comparative analysis of basal lamina type IV collagen alpha chains, matrix metalloproteinases-2 and -9 expressions in oral dysplasia and invasive carcinoma. *Acta Histochem*, 115, 113-119.
- Tan, P.N., Steinbach, M., Kumar, V.** (2006). *Introduction to Data Mining* (p. 231 - 238; . New York, USA: Addison Wesley, 1 edition.
- Tanaka, T., Ishigamori, R.** (2011). Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol*; 2011, 603740.
- Tasche, K.K.,** Buchakjian, M.R., Pagedar, N.A., Sperry, S.M. (2017). Definition of “Close Margin” in oral cancer surgery and association of margin distance with local recurrence rate. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.*, 143, 1166–72.
- Thayson-Peterson, D.,** Bjerring, P., Dierickx, C., Nash, J., Town, G., Haedershal, M. (2012). A systematic review of light based home use devices for hair removal and considerations on human safety. *Eur Acad Dermatol Venereol*, 26(5), 545–553.
- Thiery, J.P.** (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 442-454.
- Thiery, J.P. and Sleeman, J.P.** (2006). Complex networks orchestrate epithelialmesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 131-142.
- Thomas, G.J., Speight, P.M.** (2001). Cell adhesion molecules and oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12, 479-498.
- Thomson, P.J.** (2015). Managing oral potentially malignant disorders: A question of risk. *Faculty Dental Journal*, 6, 186-191.
- Thomson, P.J.** (2018). Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention – proliferation, position, progression and prediction. *J Oral Pathol Med*, 47, 803–7.
-

- Thorn, J.J.**, Holmstrup, P., Rindum, J., Pindborg, J.J. (1988). Course of various clinical forms of oral lichen planus. A prospective follow-up study of 611 patients. *J Oral Pathol*, 17, 213-218.
- Tirelli, G.**, Piovesana, M., Gatto, A., Tofanelli, M., Biasotto, M., Boscolo Nata, F. (2015). Narrow band imaging in the intra-operative definition of resection margins in oral cavity and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*, 51, 908-913.
- Touw, W.G.**, Bayjanov, J.R., Overmars, L., Backus, L., Boekhorst, J., Wels, M. et al (2013). Data mining in the Life Sciences with Random Forest: a walk in the park or lost in the jungle? *Brief. Bioinform.*, vol.14, (pg.315-326).
- Trieger, N.**, Ship, I.I., Taylor, G.W., Weisberger, D. (1958). Cirrhosis and other predisposing factors in carcinoma of the tongue. *Cancer*, 11(2), 357-362.
- Tsai, M.T.**, Lee, C.K., Lee, H.C., Chen, H.M., Chiang, C.P., Wang, Y.M., Yang, C.C. (2009). Differentiating oral lesions in different carcinogenesis stages with optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.*, Jul-Aug, 14(4), 044028.
- Tsai, M.T.**, Lee, H.C., Lu, C.W., Wang, Y.N., Lee, C.K., Yang, C.C., Chiang, C.P. (2008). Delineation of an oral cancer lesion with swept-source optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.*, 13(4), 044012.
- Tsai, P.T.**, Shieh, Y.S., Wu, C.T., Lee, S.P., Chen, Y.W. (2016). Buccal mucosa elasticity influences surgical margin determination in buccal carcinoma resection. *J Oral Maxillofac Surg*, 74(9), 1900.e1-7.
- Tu, A.T.** (1982). *Raman Spectroscopy in Biology*, John Wiley & Sons Ltd., New York
- Tu, Q., Chang, C.** (2012). Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomed Nanotechnol Biol Med.*, 8, 545-558.
- Tuchin, V.V.** (2010). *Lasers and Fibre Optics in Biomedical Science*, 2nd ed., Fizmatlit, Moscow
- Tuchin, V.V.** (2015). Tissue Optics and Photonics: Biological Tissue Structures. *J. of Biomedical Photonics & Eng.*, 1(1), 3-21.
- Tuchin, V.V.** (2015). Tissue optics and photonics: Light-tissue interaction. *J. of Biomedical Photonics & Eng.*, 1(2), 98-135.
- Tuchin, V.V.** (2016). Polarized light interaction with tissues. *J. Biomed. Opt.*, 21, 071114
- Tupchong, L.**, Scott, C.B., Blitzer, P.H., Marcial, V.A., Lowry, L.D., Jacobs, J.R. et al (1991). Randomized study of preoperative versus postoperative radiation therapy in advanced head and neck carcinoma: long-term followup of RTOG 73-03. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 20, 21-8.
- Ulflund** (2011). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fresnel_reflection.svg
- Umeda, M.**, Shigeta, T., Takahashi, H., Minamikawa, T. et al (2011). Clinical evaluation of Lugol's iodine staining in the treatment of stage I-II squamous cell carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 40, 593-6.
- United Nations Development Programme** (2016). *Human Development Report 2016: Human Development for Everyone*. New York, NY: United Nations Development Programme.
- United Nations, Population division** (2017). *World Population Prospects, the 2017 revision*. <https://esa.un.org/unpd/wpp/>.
- Urist, M.M.**, O'Brien, C.J., Soong, S.J., Visscher, D.W., Maddox, W.A. (1987). Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: analysis of prognostic factors. *Am J Surg*, 154, 411-4.
- van der Waal, I., Reichart, P.A.** (2008). Oral proliferative verrucous leukoplakia revisited. *Oral Oncol*, 44, 719-721.
- van der Waal, I.** (2009). Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal.*, 14, 310-4.

-
- van Driel, P.B.**, van der Vorst, J.R., Verbeek, F.P. et al (2014). Intraoperative fluorescence delineation of head and neck cancer with a fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Int. J. Cancer*, 134, 2663–2673.
- van Veen, R.L.P.**, Sterenborg, H.J.C.M., Pifferi, A. et al (2004). Determination of VIS–NIR absorption coefficients of mammalian fat, with time- and spatially resolved diffuse reflectance and transmission spectroscopy. *OSA Annual BIOMED Topical Meeting*.
- Varvares, M.A.**, Shannon, P., Bianca, K., Kara, C., Walker, R.J. (2015). Surgical margins and primary site resection in achieving local control in oral cancer resections. *Laryngoscope*, 125, 2298–2307.
- Venkata Jagannath** (2017).
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Random_forest_diagram_complete.png
- Vicini, C.**, Montevecchi, F., D’Agostino, G., De Vito, A., Meccariello, G.A. (2015). A novel approach emphasising intra-operative superficial margin enhancement of head-neck tumours with narrow-band imaging in transoral robotic surgery. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.*, 35, 157–161.
- Vikram, B.**, Strong, E.W., Shah, J.P., Spiro, R. (1984). Failure at distant sites following multi-modality treatment in advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg*, 6, 730–3.
- Vikram, B.**, Strong, E.W., Shah, J.P., Spiro, R. (1984). Failure in the neck following multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg*, 6, 724–9.
- Vikram, B.**, Strong, E.W., Shah, J.P., Spiro, R. (1984). Second primary neoplasms in patients successfully treated with multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg*, 6, 734–7.
- Vikram, B.**, Strong, E.W., Shah, J.P., Spiro, R. (1984) Failure at the primary site following multi-modality treatment in advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg*, 6, 720–3.
- Vila, P.M.**, Park, C.W., Pierce, M.C., Goldstein, G.H., Levy, L., Gurudutt, V.V. et al (2012). Discrimination of benign and neoplastic mucosa with a high-resolution microendoscope (HRME) in head and neck cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 19, 3534–3539.
- Vosoughhosseini, S.**, Lotfi, M., Fakhrjou, A., Aghbali, A., Moradzadeh, M., Sina, M. et al (2012). Analysis of epidermal growth factor receptor in histopathologically tumor-free surgical margins in patients with oral squamous cell carcinoma. *Afr J Biotechnol*, 11, 516–20.
- Vukadinovic, M.**, Jezdic, Z., Petrovic, M., Medenica, L.M., Lens, M. (2007). Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. *J Oral Maxillofac Surg*, 65(4), 675–679.
- Waldron, C.A., Shafer, W.G.** (1975). Leukoplakia revisited. *Cancer*, 36, 1386–92.
- Wallace, M., Van Dam, J.** (2000). Enhanced gastrointestinal diagnosis: light-scattering spectroscopy and optical coherence tomography. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 10(1), 71–80.
- Wang, L.V., Wu, H.I.** (2007). *Biomedical Optics: Principles and Imaging*, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ
- Wang, Q.Z.**, Yang, H.Z., Agrawal, A., Wang, N.S., Pfefer, T.J. (2008). Measurement of internal tissue optical properties at ultraviolet and visible wavelengths: Development and implementation of a fiberoptic-based system. *Opt. Express*, 16(12), 8685–8703.
- Wang, X.**, Chen, S., Chen, X., Zhang, C., Liang, X. (2016). Tumor-related markers in histologically normal margins correlate with locally recurrent oral squamous cell carcinoma: A retrospective study. *J Oral Pathol Med*, 45, 83–8.
- Wang, X.**, Zhang, J., Fan, M., Zhou, Q., Deng, H., Aisharif, M.J. et al (2009). The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107, 547–554.
-

-
- Wang, Y.,** Minamide, H., Tang, M., Notake, T., Ito, H. (2010). Study of water concentration measurement in thin tissues with terahertz-wave parametric source. *Optics Express*, 18, 15504-15512.
- Ward, E., van As-Brooks, C.** (2007). Head and neck cancer treatment, rehabilitation and outcomes. Plural Publishing; Chapter 4. ISBN10: 1-59756-061-8.
- Warnakulasuriya, K.A.A.S., Johnson. N.W.** (1996). Sensitivity and specificity of Orascan® toluidine blue mouth rinse in the detection of oral cancer and precancer. *J Oral Pathol Med*, 25, 97-103.
- Warnakulasuriya, S.** (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.*, 45(4-5), 309-316.
- Warnakulasuriya. S/, Johnson. N.W., van der Waal, I.** (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*, 36, 575-80.
- Warram, J.M., de Boer, E., Sorace, A.G., Chung, T.K., Kim, H., Pleijhuis, R.G. et al** (2014). Antibody-based imaging strategies for cancer. *Cancer Metastasis- Rev.*, 33, 809-822.
- Warram, J.M., de Boer, E., Moore, L.S., Schmalbach, C.E., Withrow, K.P., Carroll, W.R. et al** (2015). A ratiometric threshold for determining presence of cancer during fluorescence-guided surgery. *J. Surg. Oncol.*, 112, 2-8.
- Weijers, M., Snow, G.B., Bezemer, D.P., van der Wal, J.E., van der Waal, I.** (2004). The status of the deep surgical margins in tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma and risk of local recurrence: an analysis of 68 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33, 146-149.
- Welch, A.J., van Gemert, M.J.C.** (2011). Overview of optical and thermal laser-tissue interaction and nomenclature. *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue* 2nd edn ed A J Welch and M J C van Gemert (Berlin: Springer) chapter 1 (DOI:10.1007/978-90-481-8831-4)
- Wiggins, P.M.** (1996). High and low density water and resting, active and transformed cells. *Cell Biol. Int.* 20:429-435.
- Wilder-Smith, P., Jung, W.G., Brenner, M., Osann, K., Beydoun, H., Messadi, D. et al** (2004). *In vivo* optical coherence tomography for the diagnosis of oral malignancy. *Lasers Surg Med*, 35, 269-275.
- Wilder-Smith, P., Lee, K., Guo, S., Zhang, J., Osann, K., Chen, Z. et al** (2009). *In vivo* diagnosis of oral dysplasia and malignancy using optical coherence tomography: preliminary studies in 50 patients. *Lasers Surg. Med.*, 41, 353-357.
- Williams, M., Bethea, J.** (2011). Patient awareness of oral cancer health advice in a dental access centre: a mixed methods study. *British Dental Journal*, 210(6), E9.
- Wilson, J.D., Cottrell, W.J., Foster, T.H.** (2007). Index-of-refraction-dependent subcellular light scattering observed with organelle-specific dyes *J. Biomed. Opt.*, 12, 014010.
- Winship, T., Rosvoll, R.** (1959). Frozen sections. *Surgery.*, 45, 462-466.
- Wojtkowski, M., Srinivasan, V., Ko, T., Fujimoto, J., Kowalczyk, A., Duker, J.** (2004). Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation. *Opt. Express.*, 12, 2404-2422.
- Wong, L.S., McMahon, J., Devine, J., McLellan, D., Thompson, E., Farrow, A. et al** (2012). Influence of close resection margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal carcinoma. *Br J Oral Maxillofacial Surg*, 50, 102-8.
- Woolgar, J.A.** (2006). Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 42, 229-39.
- Woolgar, J.A., Triantafyllou, A.** (2005). A histopathological appraisal of surgical margins in oral and oropharyngeal cancer resection specimens. *Oral Oncol*, 41, 1034-43.
-

-
- World Health Organization** (1973). Report of a meeting of investigators on the histological definition of precancerous lesions. Geneva: World Health Organization, Can /731.
- Worrall, S.F.** (1995) Oral cancer incidence between 1971 and 1989. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995;33:195–6. Crosher R, Mitchell R. Incidence of oral cancer in Scotland 1971-1989. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 33, 333–4.
- Wreesmann, V.B.**, Katabi, N., Palmer, F.L., Montero, P.H., Migliacci, J.C., Gönen, M. et al (2016). Influence of extracapsular nodal spread extent on prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 38, 1192-1199.
- Wu, C.**, Gleysteen, J., Teraphongphom, N.T., Li, Y., Rosenthal, E. (2018). In-vivo optical imaging in head and neck oncology: basic principles, clinical applications and future directions. *Int J Oral Sci*, 10, 10.
- Wynder, E.L.**, Bross, I.J., Feldman, R.M. (1957). A study of the aetiological factors in cancer of the mouth. *Cancer*, 10(6), 1300–1323.
- Xiao, T.**, Kurita, H., Shimane, T., Nakanishi, Y., Koike, T. (2013). Vital staining with iodine solution in oral cancer: Iodine infiltration, cell proliferation, and glucose transporter 1. *Int J Clin Oncol*, 18, 792-800.
- Xu, M.**, Wu, T.T., Qu, J.Y. (2008). Unified Mie and fractal scattering by cells and experimental study on application in optical characterization of cellular and subcellular structures *J. Biomed. Opt.*, 13, 024015.
- Yang, Q.**, Ma, Z., Wang, H. et al (2017). Rational design of molecular fluorophores for biological imaging in the NIR-II Window. *Adv. Mater.*, 29, 1605497.
- Yoon, T.Y.**, Bhattacharyya, I., Katz, J., Towle, H.J., Islam, M.N. (2007) Squamous cell carcinoma of the gingiva presenting as localized periodontal disease. *Quintessence Int.*, 38, 97–102.
- Yu, C.**, Fan, S., Sun, Y., Pickwell-MacPherson, E. (2012). The potential of terahertz imaging for cancer diagnosis: A review of investigations to date. *Quant. Imaging Med. Surg.*, 2, 33-45.
- Yu, K.H.**, Zhang, C., Berry, G.J., Altman, R.B., Ré, C., Rubin, D.L. et al (2016). Predicting non-small cell lung cancer prognosis by fully automated microscopic pathology image features. *Nat. Commun.*, 7, 12474.
- Yun, S.**, Tearney, G., de Boer, J., Iftimia, N., Bouma, B. (2003). High-speed optical frequency-domain imaging. *Opt. Express.*, 11, 2953–2963.
- Yurchenco, P.D., O’Rear, J.J.** (1994). Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 6, 674–81.
- Zabrodsky, M.**, Lukes, P., Lukesova, E., Boucek, J., Plzak, J. (2014). The role of narrow band imaging in the detection of recurrent laryngeal and hypopharyngeal cancer after curative radiotherapy. *Biomed. Res. Int.* 2014, 175398.
- Zanoni, D.K.**, Migliacci, J.C., Xu, B., Katabi, N., Montero, P.H., Ganly, I. et al (2017). A proposal to redefine close surgical margins in squamous cell carcinoma of the oral tongue. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 143(6), 555–60.
- Zanoni, D.K.**, Montero, P.H., Migliacci, J.C., Shah, J.P., Wong, R.J., Ganly, I., Patel, S.G. (2019). Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015). *Oral Oncol.* Mar, 90, 115-121.
- Zarbo, R.J.**, Hoffman, G.G., Howanitz, P.J. (1991). Interinstitutional comparison of frozen section consultation. *Arch Pathol Lab Med.*, 115, 1187–1194.
- Zhang, R.R.**, Schroeder, A.B., Grudzinski, J.J., Rosenthal, E.L., Warram, J.M., Pinchuk, A.N., et al (2017). Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 14, 347–364.
- Zhao, Z., Fairchild, P.** (1998). Dependence of light transmission through human skin on incident beam diameter at different wavelengths. *SPIE Proceedings of Laser-Tissue Interaction IX*, 3254, 354–360.
-

-
- Zheng, T.Z.**, Boyle, P., Hu, H.F., Duan, J., Jian, P.J., Ma, D.Q. et al (1990). Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Causes Control*, 1(3), 235–41.
- Zheng, W.**, Li, D., Zeng, Y., Luo, Y., Qu, J.Y. (2011). Two-photon excited hemoglobin fluorescence. *Biomed. Opt. Express*, 2, 71–79.
- Zhun310** (2009). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fat_absorption.png
- Zhun310** (2009). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fig_1_-_The_molar_extinction_coefficient_of_HbO2_and_Hb.png
- Zhun310** (2009). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Melanin_extinction.PNG
- Zhun310** (2009). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Water_absorption.png
- Zitsch, R.P.** (1993). Carcinoma of the lip. *Otolaryngol Clin North Am*, 26, 265–77.
- Zonios, G.**, Dimou, A., Bassukas, I., Galaris, D., Tsolakidis, A., Kaxiras, E. (2008). Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection. *J. Biomed. Opt.* 13(1), 014017.
- Zou, K.H.**, O'Malley, A.J., Mauri, L. (2007). Receiver operating characteristic analysis for evaluation diagnostic tests and predictive models. *Circulation.*, 115, 654–57.

8. BIOGRAFIJA

Dr Bogdan Lisul rođen je 24.06.1985. u Kikindi. Osnovnu i srednju školu završio je u Kikindi sa odličnim uspehom. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2004. godine, a diplomirao je 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,36. Pripravnički staž obavio je tokom 2014. godine. Dobitnik je nagrade za najboljeg studenta prve godine osnovnih studija za 2005. godinu sa prosečnom ocenom 9,88. U akademskoj 2008/2009. godini bio je stipendista Fonda za mlade talente - "1000 najboljih studenata završne godine osnovnih studija". 2011. godine upisao je doktorske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i položio sve ispite sa prosečnom ocenom 9,35. U periodu od 2011 do 2013. godine obavljao je ulogu koordinatora na projektu "Zagrizi Znanje Zdravim Zubima" pod pokroviteljstvom Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U okviru projekta realizovanog na Univerzitetima u Beogradu i Nišu sprovedeno je preko 2000 besplatnih stomatoloških pregleda i preko 1000 stomatoloških intervencija. Od 2013 do 2015. godine radio je kao trener za pripremu i pisanje projekata u okviru EU fondova. U ovom periodu realizovao je preko 50 treninga za fondove poput IPA, ERASMUS+ i delom HORIZON 2020. Od 2015. godine angažovan je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (redni br. III 41006) pod nazivom „Razvoj novih metoda i tehnika za ranu dijagnostiku kancera grlića materice, debelog creva, usne duplje i melanoma na bazi digitalne slike i eksitaciono emisionih spektara u vidljivom i infracrvenom domenu“. Objavio je tri rada, od kojih jedan u časopisu sa SCI liste i prezentovao na nekoliko kongresa i konferencija sa međunarodnim učešćem.

U toku osnovnih i posle diplomskih studija na Stomatološkom fakultetu u Beogradu obavljao je nekoliko funkcija. U akademskoj 2008/2009. godini bio je student prodekan Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Od 2009 do 2014. godine nalazio se na funkciji predsednika neprofitne organizacije Saveza studenata Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Bio je predsednik i koordinator organizacionih timova nekoliko naučnih i sportsko-edukativnih manifestacija studenata biomedicinskih nauka koje su okupile preko 10000 učesnika. 2013. godine učestvovao je u organizaciji 51. sastanka i srebrnog jubileja Evropske dentalne studentske asocijacije održanom u Beogradu, na kojem je učešće uzelo preko 100 studenata stomatologije iz 30 evropskih zemalja. Kao student, bio je autor ili koautor na četiri naučno-istraživačka rada prezentovana na domaćim i međunarodnim naučnim kongresima.

Dr Bogdan Lisul tečno govori engleski jezik i poseduje osnovno znanje u radu sa Swift i Python programskim jezicima.

9. IZJAVE

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Богдан Лисул

Број индекса 4017/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Примена оптомагнетне имиџинг спектроскопије у биофизичкој карактеризацији
маргиналног и карциномом измењеног ткива у усној дупљи“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских
- установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, _____

Потпис аутора

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Богдан Лисул

Број индекса 4017/2011

Студијски програм Докторске студије

Наслов рада „Примена оптомагнетне имицинг спектроскопије у биофизичкој карактеризацији маргиналног и карциномом измењеног ткива у усној дупљи“

Ментор Проф. др Ђурица Грга, Проф. др Милан Петровић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, _____

Потпис аутора

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Примена оптомагнетне имицинг спектроскопије у биофизичкој карактеризацији маргиналног и карциномом измењеног ткива у усној дупљи“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове

изјаве).

У Београду, _____

Потпис аутора

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.