

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Svetlana Z. Valjarević

**Primena savremenih računarskih metoda za
analizu međucelijske interakcije u cilju
unapređenja dijagnostike i hirurškog lečenja
planocelularnog karcinoma larinksa**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Svetlana Z. Valjarević

**Application of Modern Computer Methods for
the Analysis of Intercellular Interaction for
Improving the Diagnosis and Surgical
Treatment of Laryngeal Squamous Cell
Carcinoma**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentori:

Prof. dr Milan B. Jovanović, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Igor Pantić, vanredni profesor i naučni savetnik, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Vladimir Đorđević, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Danijela Vučević, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Marina Đelić, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Miloš Vujisić, vanredni profesor, Elektrotehnički fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Biserka Vukomanović Đurđević, vanredni profesor, Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvaljujem se:

Svojim mentorima, profesoru Milanu B. Jovanoviću i profesoru Igoru Pantiću na neizmernoj pomoći i podršci tokom izrade disertacije.

Članovima komisije:

Prof. dr Vladimiru Đorđeviću

Prof. dr Danijeli Vučević

Prof. dr Marini Đelić

Prof. dr Milošu Vujisiću

Prof. dr Biserki Vukomanović Đurđević,

na dragocenim savetima i pomoći u realizaciji disertacije.

Deki **Miladinu Babiću**

Nani **Slobodi (rođ. Radisavljević) Babić**

Porodici i prijateljima

Zahvaljujem se koautorima radova koji su publikovani kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske na doprinosu u:

1. Kreiranju koncepta istraživanja: prof. dr Milan B.Jovanović, prof. dr Igor Pantić
2. Prikupljanju podataka: dr Nenad Miladinović
3. Metodologiji: prof. dr Igor Pantić, prof. dr Peter R. Corridon
4. Formalnoj analizi: prof. dr Igor Pantić, dr Jelena Čumić, dr Stefan Dugalić
5. Istraživanju: prof. dr Milan B. Jovanović, prof. dr Igor Pantić
6. Superviziji: prof.dr Igor Pantić
7. Pisanju – originalni nacrt: prof. dr Igor Pantić
8. Pisanju- recenzija i uređivanje: prof. dr Milan B.Jovanović, prof. dr Peter R. Corridon

Primena savremenih računarskih metoda za analizu međućelijske interakcije u cilju unapređenja dijagnostike i hirurškog lečenja planocelularnog karcinoma larinksa

Sažetak

Histopatološka dijagnostika promena na sluznici larinksa može biti zahtevna kada je u pitanju razlikovanje displastičnih lezija od početnog stadijuma karcinoma, procena prisustva malignih ćelija u graničnim preparatima uzetim sa tkiva koje makroskopski izgleda zdravo, kao i analiza tkiva prilikom sumnje na recidiv bolesti. Teksturalna analiza predstavlja savremenu računarsku metodu koja može da evaluira početne promene u međućelijskoj interakciji, obliku ćelije i strukturi hromatina, a koje nisu uočljive konvencionalnim mikroskopskim metodama. Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi senzitivnost računarskih algoritama teksturalne analize u detekciji strukturnih promena karakterističnih za ćelije i tkivo planocelularnog karcinoma larinksa. Na preparatima sluznice larinksa kod 100 pacijenata (50 sa malignitetom, 50 sa hroničnim laringitisom) napravljeno je 2000 reprezentativnih digitalnih mikrografa tkiva korišćenjem optičkih instrumenata, a potom su mikrografi analizirani primenom metoda baziranih na primeni teksturalne analize. Rezultati našeg istraživanja ukazuju na to da postoji značajna razlika između tkivne citoarhitekture planocelularnog karcinoma larinksa i hroničnog laringitisa u pogledu teksturalnih karakteristika kvantifikovanih GLCM tehnikom, kao i u pogledu indikatora vejevlet matematičke analize. Morfološki slična jedra epitelnih ćelija u tkivu planocelularnog karcinoma larinksa i tkivu kod hroničnog laringitisa pokazuju značajne razlike u vrednostima teksturalnih i vejevlet indikatora. Moguće je razviti modele mašinskog učenja zasnovane na logističkoj regresiji, slučajnim šumama i višeslojnom perceptronu za razlikovanje malignog od benignog tkiva koristeći teksturalne i vejevlet indikatore kao ulazne podatke. Teksturalna i vejevlet matematička analiza ćelija i tkiva, kao i modeli mašinskog učenja bazirani na njima, imaju potencijal da u budućnosti, nakon dodatne evaluacije i razvoja, budu uključeni u standardne protokole u otorinolaringologiji za dijagnozu i hirurško lečenje planocelularnog karcinoma larinksa.

Ključne reči: planocelularni karcinom larinksa, teksturalna analiza, međućelijska interakcija, računarske metode, modeli mašinskog učenja

Naučna oblast: Medicinske nauke

Uža naučna oblast: Rekonstruktivna hirurgija

UDK broj:

Application of Modern Computer Methods for the Analysis of Intercellular Interaction for Improving the Diagnosis and Surgical Treatment of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma

Abstract

Histopathological diagnosis of changes in the laryngeal mucosa can be challenging when it comes to distinguishing dysplastic lesions from the initial stage of carcinoma, assessing the presence of malignant cells in borderline specimens taken from tissue that appears macroscopically healthy, and analyzing tissue in cases of suspected disease recurrence. Textural analysis represents a contemporary computer-based method that can evaluate initial changes in intercellular interaction, cell shape, and chromatin structure that may not be apparent with conventional microscopic methods. The aim of this research was to determine the sensitivity of computer algorithms in textural analysis for detecting structural changes characteristic of cells and tissue in squamous cell carcinoma of the larynx. Using optical instruments, 2000 representative digital micrographs of laryngeal mucosa specimens from 100 patients (50 with malignancy, 50 with chronic laryngitis) were obtained and then analyzed using methods based on the application of textural analysis. The results of our research indicate a significant difference in the tissue cytoarchitecture between squamous cell carcinoma of the larynx and chronic laryngitis in terms of textural characteristics quantified by the GLCM technique, as well as in terms of wavelet mathematical analysis indicators. Morphologically similar nuclei of epithelial cells in the tissue of squamous cell carcinoma of the larynx and tissue in chronic laryngitis show significant differences in the values of textural and wavelet indicators. It is possible to develop machine learning models based on logistic regression, random forests, and multilayer perceptron to differentiate between malignant and benign tissue using textural and wavelet indicators as input data. Textural and wavelet mathematical analysis of cells and tissues, as well as machine learning models based on them, have the potential, after additional evaluation and development, to be incorporated into standard protocols in otolaryngology for the diagnosis and surgical treatment of squamous cell carcinoma of the larynx in the future.

Key words: laryngeal squamous cell carcinoma, textural analysis, intercellular interaction, computer methods, machine learning models

Scientific field: Medical Sciences

Narrower Scientific field: Reconstructive Surgery

UDK number:

SADRŽAJ:

1.	UVOD.....	1
1.1.	PLANOCELULARNI KARCINOM LARINKSA	1
1.1.1.	Epidemiologija.....	2
1.1.2.	Etiologija.....	3
1.1.3.	Klinička slika	4
1.1.4.	Dijagnostika	6
1.1.5.	Histopatološka analiza	7
1.1.6.	TNM klasifikacija	9
1.1.7.	Modaliteti lečenja.....	11
1.2.	TEKSTURALNA ANALIZA UPOTREBOM METODE MATRICE SIMULTANE POJAVE SIVIH VREDNOSTI REZOLUCIONIH JEDINICA	18
1.3.	PRIMENA SAVREMENIH RAČUNARSKIH METODA U MEDICINI	20
1.3.1.	Veštačka inteligencija, mašinsko učenje, duboko učenje i neuronske mreže.....	21
1.3.2.	Primena mašinskog učenja i neuronskih mreža u dijagnostici i lečenju karcinoma	23
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
3.	MATERIJAL I METODE	26
3.1.	TEKSTURALNA ANALIZA UPOTREBOM GLCM ALGORITMA	27
3.2.	DISKRETNNA VEJVLET TRANSFORMACIJA.....	29
4.	REZULTATI.....	33
5.	DISKUSIJA	42
6.	ZAKLJUČCI.....	64
7.	LITERATURA.....	65

1. UVOD

Onkološka oboljenja predstavljaju jedan od vodećih uzroka oboljevanja i smrtnosti u svetu i predstavljaju izuzetno ozbiljan i zahtevan zdravstveni i društveni problem. Procenjuje se da u svetu oko 10 miliona ljudi godišnje umre zbog maligniteta, odnosno da je jedan od šest smrtnih ishoda uzrokovan karcinomom, dok se preko 19 miliona ljudi razboli od onkoloških oboljenja na godišnjem nivou (Sung et al. 2021). U Srbiji, maligne bolesti su, nakon kardiovaskularnih oboljenja, drugi uzrok smrtnosti. Oko 21 000 ljudi godišnje umre od maligniteta u Srbiji (Miljus et al. 2022). U poređenju sa drugim državama u Evropi, incidenca karcinoma u Srbiji bliska je evropskoj prosečnoj incidenci, ali je stopa smrtnosti druga u svetu, a najviša u Evropi i iznosi 150,6/100 (www.wcrf.org/cancer-trends/global-cancer-data-by-country).

Karcinom larinksa je oboljenje koje ima učestalost od oko 1% svih onkoloških oboljenja i najčešći je karcinom u regiji glave i vrata. Na globalnom nivou, karcinom larinksa je relativno redak, i zastupljen je u procentu od 2 do 3% u odnosu na sve karcinome (Nocini et al. 2020). Svetska zdravstvena organizacija procenjuje da se na godišnjem nivou javlja više od 180 000 novootkrivenih slučajeva širom sveta, a više od 100 000 slučajeva završava smrću (Bray et al. 2018). Podaci o incidenci, mortalitetu, toku bolesti i preživljavanju značajno se razlikuju po regionima sveta. Oni ne zavise samo od sociodemografskih karakteristika stanovništva, već u mnogome zavise i od faktora kao što su dostupnost zdravstvene nege, efikasnost primarne zdravstvene zaštite, mogućnost skrining pregleda, dijagnostičkih i terapijskih procedura (Sung et al. 2021). Globalna stopa incidencije raka larinksa opada, međutim, petogodišnje preživljavanje ovih pacijenata smanjuje se u poslednjih nekoliko godina sa 66% na 63% (Siegel et al. 2016; Molina-Fernández et al. 2023).

Larinks je organ koji ima funkciju u zaštiti donjih respiratornih puteva, fonaciji i gutanju, tako da onkološka oboljenja ovog organa, kao i lečenje maligniteta larinksa značajno utiču na kvalitet života, psihološko stanje pacijenta kao i radnu sposobnost, pogotovo kod osoba koji su vokalni profesionalci (Armstrong et al. 2015). Rehabilitacija glasa, govora, akta gutanja, socijalizacije i radne sposobnosti kod pacijenata kojima je zbog bolesti odstranjen larinks, predstavlja dugotrajan proces za koji je potrebno mnogo eksperata iz različitih oblasti i podrške okoline. Razvijanje savremenih dijagnostičkih, terapijskih i prognostičkih metoda i modela predstavlja preduslov za unapređenje lečenja i ishoda ovog onkološkog entiteta (Bergström et al. 2017).

1.1. Planocelularni karcinom larinksa

Laringealni karcinom je malignitet koji primarno zahvata jedan od tri anatomska subregiona-supraglotis, glotis ili subglotis. Supraglotis je deo larinksa kome anatomski pripadaju epiglotis, ariepiglотиčni nabori, aritenoidna regija, ventrikularni nabori i Morganijevi ventrikulusi. Glotičnu regiju predstavljaju glasnice sa prednjom komisurom i zadnjim zidom glotisa, dok je subglotis deo larinksa koji počinje 5 mm distalno od slobodne ivice glasnica, i čiju ventralnu granicu čine medijalni deo krikotiroidnog ligamenta, a dorzalnu deo krikoidne hrskavice. (Steuer et al. 2017; Nocini et al. 2020). Najveći procenat karcinoma larinksa (98%) prema histopatološkom tipu jesu planocelularni karcinomi. Ostali tipovi maligniteta su retki i uključuju hondrosarkome, lejomiosarkome, neuroendokrine karcinome, adenokarcinome, adenocistične karcinome i mukoepidermoidne karcinome u ukupnoj učestalosti od 2-5%. Limfomi i melanomi su retko primarni tumori larinksa, dok se češće nalaze kao metastaze. Među planocelularnim karcinomima larinksa dominiraju dobro i umereno diferentovani tip, sa zastupljenošću od 43,5% i 41,5% svih slučajeva. Slabo diferentovan tip planocelularnog karcinoma ima učestalost oko 15%. Dve trećine karcinoma larinksa ima primarnu

lokalizaciju u regiji glotisa, dok je oko 30% maligniteta primolokalizovano na sluznici struktura supraglotisa. Primarni karcinomi subglotisa izrazito su retki (Ciolofan et al. 2017; Nocini et al. 2020).

1.1.1. Epidemiologija

Na globalnom nivou, više od 200 000 novootkrivenih slučajeva karcinoma larinksa dijagnostikuje se svake godine, dok ukupni broj obolelih iznosi oko milion slučajeva na godišnjem nivou. Incidenca iznosi 2,76 novih slučajeva na 100 000 stanovnika, dok prevalenca iznosi 14,33 na 100 000 stanovnika (Nocini et al. 2020). Svetski podaci ukazuju da je oko 127 000 smrti godišnje prouzrokovano karcinomom larinksa (1,66 smrti na 100 000 stanovnika). Ovaj malignitet na svetskom nivou uzrokuje 3,28 miliona godina života korigovanih u odnosu na nesposobnost (engl. "disability adjusted life years", DALY). Broj pacijenata sa karcinomom larinksa kontinuirano raste, u najvećem procentu zbog napretka dijagnostičkih i terapijskih modaliteta i povećanja dužine očekivanog životnog veka. U poslednje 3 decenije, globalna incidenca porasla je za 12%, a prevalenca za 23,8%, dok je stopa mortaliteta opala za 5%. Predviđa se da će do 2035. godine stope incidence i prevalence biti u daljem porastu (Lin et al. 2022). Od svih lokalizacija karcinoma, maligniteti larinksa su na 22. mestu po vrednostima incidence (0,89% svih kancera), 18. mestu po vrednostima prevalencije (1,44% svih kancera), na 18. prema DALY parametrima (1,50% svih karcinoma) i mortalitetu (1,39% svih smrti uzrokovanih malignitetima) (Nocini et al. 2020). Ipak, incidenca karcinoma larinksa razlikuje se u odnosu na geografske i demografske faktore. Generalno, karcinom larinksa ima veću incidencu u razvijenim zemljama (Wang et al. 2021). Prema geografskoj distribuciji, incidenca karcinoma larinksa najviša je u Evropi (5,45 novoobolelih na 100 000 stanovnika). Incidenca ove maligne bolesti na američkim kontinentima iznosi 3,37 novoobolelih na 100 000 stanovnika. U zemljama Zapadnog Pacifika (Kina, Australija, Novi Zeland, Mongolija, Japan), incidenca je 2,73 na 100 000, dok u zemljama jugoistočne Azije iznosi 2,59 slučajeva na 100 000. Zemlje istočnog Mediterana imaju incidencu karcinoma larinksa od 1,93, dok je vrednost najniža u Africi (0,68 novoobolelih na 100 000). Mortalitet delimično prati obrazac geografske distribucije incidence, tako da se najveći broj smrti zbog karcinoma larinksa beleži u Evropi (2,57 na 100 000), potom u zemljama jugoistočne Azije (2,20 na 100 000), američkih zemalja (1,62 na 100 000), južnog Mediterana (1,53 na 100 000), zapadnog Pacifika (1,28 na 100 000) i Afrike (0,61 na 100 000). Ono što je značajno napomenuti je da je odnos između mortaliteta i incidence oboljevanja od karcinoma larinksa izrazito visok u Africi (0,90) i jugoistočnoj Aziji (0,85), umeren u zemljama istočnog Mediterana (0,79) i značajno niži u zemljama američkih kontinenta (0,48), zemalja zapadnog Pacifika i Evrope (0,47) (Nocini et al. 2020). Standardizovana stopa mortaliteta (engl. "age-standardized incidence rate", ASR) od karcinoma larinksa prema GloboCan 2020 bazi iznosi 7,3 slučajeva na 100 000 ljudi posmatrane populacije. Incidenca karcinoma je značajno viša kod muškaraca nego kod žena sa procenjenom ASR stopom od 10,8 slučajeva na 100 000 kod muškaraca, i 3,7 na 100 000 kod žena. Incidenca malignih oboljenja larinksa najviša je nakon 65 godina života kod oba pola. Prema podacima GloboCana, 86,5% pacijenata sa karcinomom larinksa imaju lokalizovanu i kontrolisanu bolest, 7,3% imaju metastatsku bolest, 1,0% pacijenata je u terminalnom stadijumu maligne bolesti, dok 5,1% pacijenata ima dobru kontrolu bolesti nakon totalne laringektomije (Sung et al. 2021).

U Srbiji, karcinom larinksa ne spada u prvih 10 vodećih lokalizacija u oboljevanju i umiranju od raka kod oba pola. Incidenca oboljevanja od ovog maligniteta iznosi 2,7% kod osoba muškog pola i na 8. je mestu incidence od svih maligniteta. Kod žena je ovaj procenat značajno niži i iznosi 0,5%. Godišnji broj novoobolelih od karcinoma larinksa na teritoriji Srbije kreće se u opsegu od 500 do 600 pacijenata, a 2020. iznosio je 591. Najveći broj pacijenata ima između 60 i 75 godina u trenutku dijagnostike ovog oboljenja. Stopa mortaliteta od karcinoma larinksa u odnosu na sve ostale malignitete iznosi 2,6% za muškarce i 0,4% za žene. Standardizovane stope incidencije od karcinoma larinksa na populaciju Srbije iznose 15,5 za muškarce i 2,4 za žene. Standardizovane stope mortaliteta

od raka na populaciju Srbije iznose 7,8 za muškarce i 1,0 za žene, dok stope standardizovane na populaciju sveta iznose 4,1 za muškarce i 0,4 za žene (Miljus et al. 2022).

1.1.2. Etiologija

Onkogeneza je dugotrajan proces u kome se zdrave ćelije transformišu u maligne, zbog gubitka mogućnosti da regulišu normalan rast i deobe. Na taj način dolazi do tumorogeneze, odnosno formiranja mase tumorski izmenjenog tkiva. Brojni faktori rizika uključeni su u patogenezu maligniteta larinksa.

Dokazano je da je konzumiranje cigareta linearno povezano sa razvojem karcinoma larinksa, te da pušači imaju 10 do 30 puta veći rizik da razviju ovu bolest od nepušača (Kuper et al. 2002). Takođe, konzumiranje cigareta ima i negativan efekat na lečenje, prognozu bolesti i preživljavanje (McCarter et al. 2022). Stopa mortaliteta kod pacijenata koji imaju dijagnostikovani karcinom glave i vrata za 36% je veća kod pušača nego kod nepušača (Sharp et al. 2014). Najčešće konzumirana forma duvana jesu cigarete, koje sadrže više od 9500 hemijskih supstanci. Ove supstance po svom biološkom dejstvu mogu da budu toksični agensi, iritansi, inhibitori enzima, kao i dokazani kancerogeni, kojih ima više od 80 (Li et al. 2022). Više štetnih supstanci nalazi se u takozvanom sekundarnom dimu (koji nastaje prilikom spontanog sagorevanja cigarete) i one nastaju nepotpunom oksidacijom organskih jedinjenja na nižim temperaturama sagorevanja. Primarni dim, koji pacijenti direktno uvlače u usnu šupljinu i potom, u disajne organe, nastaje na višoj temperaturi sagorevanja, te u sebi ima manje kancerogenih supstanci, ali je sama temperatura dima dodatni faktor oštećenja sluznice respiratornih organa. Najveći kancerogeni uticaj u nastanku maligniteta glave i vrata imaju *N*-nitrosomonokotinin i nitrozamini specifični za duvan (engl. "tobacco-specific nitrosamine", TSNA). Pored ovih hemijskih supstanci, na onkogenezu utiču i policiklični aromatični ugljovodonici, aromatični amini, formaldehid, benzen i brojni drugi organski derivati sagorevanja duvana (Jethwa et Khariwala 2017). Molekuli kancerogenih supstanci iz duvanskog dima direktno oštećuju ćelijsku DNK, a utiču i na brojne enzime kao što su citohrom p450, glutation-S-transferaza, uridin-5-difosfoglukuronosiltransferaza. Proizvodi duvanskog sagorevanja izazivaju specifične DNK mutacije, koje, ukoliko se ne poprave ćelijskim mehanizmima reparacije, aktiviraju onkogenezu ili inaktiviraju tumor-supresorske gene. Kod praktično svih karcinoma glave i vrata povezanih sa pušenjem, genetičke studije dokazale su gubitak funkcije tumor supresorskog gena p53 i inaktivaciju ciklin-zavisnog kinaza inhibitora 2A. Efekti duvanskog dima na sluznicu larinksa izuzetno su štetni i dugotrajni. Prestanak konzumiranja cigareta tek nakon 20 godina dovodi pacijente u podjednak rizik od oboljevanja od karcinoma larinksa kao i pacijente koji nikada nisu bili pušači. Takođe, pacijenti koji nastave sa konzumiranjem cigareta u toku lečenja karcinoma larinksa imaju veću stopu udaljenih metastaza od pacijenata koji su prestali da puše ili nikada nisu konzumirali cigarete- 31% naspram 4% (Miranda-Galvis et al. 2021). Kontinuirano konzumiranje cigareta povezano je sa smanjenom stopom preživljavanja i manjim uspehom svih primenjenih modaliteta lečenja. Pacijentima koji puše treba savetovati prestanak pušenja i kontrolisati ih češće tokom onkološkog lečenja (Obid et al. 2019).

Konzumiranje cigareta i alkohola u kombinaciji značajno povećava rizik od karcinoma larinksa (Altieri et al. 2005). Epidemiološke studije pokazale su da je incidenca laringealnog karcinoma najviša u zemljama Evrope upravo zbog konzumiranja alkohola koje je u tom regionu značajno veće od svetskog proseka (Gell et al. 2015; Wang et al. 2021). Alkohol izaziva atrofiju epitela, razlaže lipidne komponente ćelije i olakšava apsorpciju kancerogenih supstanci iz duvanskog dima i vazduha. Osnovni metabolit metabolizma alkohola, acetaldehid, dokazano je mutagen. Sinergistično dejstvo cigareta i alkohola značajno doprinosi riziku od oboljevanja od maligniteta larinksa. Ipak, studije nisu dokazale da je alkohol nezavisni faktor rizika za nastajanje karcinoma larinksa. Stoga, smatra se da je alkohol značajan promotor tumorske progresije, pre nego karcinogen (Hashibe et al. 2009). Kod pacijenta koji konzumiraju alkohol, u tumorskom tkivu nađena je veća ekspresija proteina HIF-1 α (hipoksijom izazvan faktor 1-alfa), koji je ključan u održavanju tumorskog makrookruženja

hipoksičnim. Ovaj protein vrši ushodnu regulaciju transkripcije vimentina, matriks-metaloproteinaza i drugih enzima koji omogućavaju invazivni rast tumora i angiogenezu. Alkohol takođe utiče na metastatski rast tumora tako što prekida integritet vaskularno-endotelnih veza (Xu M et al. 2012).

Za razliku od planocelularnog karcinoma orofarinksa, gde su maligniteti podeljeni u 2 grupe prema prisustvu, odnosno odustvu infekcije humanim papiloma virusom (HPV) u malignom tkivu, takve onkološke podele za sada nema u klasifikaciji tipa planocelularnog karcinoma larinksa. Ipak, prema dosadašnjim studijama, humani papiloma virus nalazi se u tkivu karcinoma larinksa u rasponu od 3 do 85% (Wang et al. 2020). Molekularni mehanizmi karcinoma larinksa povezanih sa humanim papiloma virusom podrazumevaju inserciju genoma HPV u DNK epitelnih ćelija, što dovodi do ekspresije virusnih onkoproteina E6 i E7. Posledično, ćelijski signalni putevi odgovorni za kontrolu ćelijskog ciklusa bivaju izmenjeni, uticajem onkoproteina E6 i E7 na tumor supresorski protein p53 i retinoblastom protein, pRb. Dodatno, HPV E6 protein vrši interakciju sa c-myc regulatornim genom formirajući kompleks c-myc/E6, koji aktivira transkripciju katalitičke subjediniice telomeraze hTERT (engl. "human telomerase reverse transcriptase", hTERT) čime doprinosi nekontrolisanom ćelijskom rastu i imortalizaciji ćelije (Munger et al. 2004). Podtipovi HPV sa visokim onkološkim potencijalom (HPV 16, 18, 33 i 52) predstavljaju etiološki faktor za nastanak maligniteta larinksa, pogotovo kod pacijenata mlađih od 45 godina. Pacijenti u čijem tkivu planocelularnog karcinoma larinksa postoji HPV pozitivnost imaju bolju prognozu, efikasniji odgovor na hemioterapiju i radioterapiju, kao i veće trogodišnje preživljavanje. To se može objasniti sa perspektive tumorskog mikrokruženja, gde se bolji odgovor na onkološku terapiju objašnjava već postojećim antitumorskim odgovorom organizma imunom reakcijom pacijenta na HPV. Ipak, pošto se HPV pozitivni tumori češće nalaze kod mlađih pacijenata, odsustvo komorbiditeta i opšte bolje fizičko stanje objašnjavaju veću uspešnost u lečenju ovih tumora, kao i bolju prognozu (Saulle et al. 2015; Wang et al. 2020).

Oko 20% pacijenata sa karcinomom larinksa kao komorbiditet ima i gastroezofagealni refluks (Anis et al. 2018). Laringofaringealni refluks predstavlja sličan, ali ipak različit entitet, koji za sada nije kodiran posebnom šifrom u međunarodnoj klasifikaciji bolesti, te se uvidom u medicinsku dokumentaciju i pretragom literature teško razdvaja od gastroezofagealne refluksne bolesti. Refluksat koji sadrži želudačnu kiselinu, pepsin i žučne kiseline oštećuje sluznicu direktno, hemijskim putem, ali i indirektno, praveći disbalans mikrobioma. Ova bolest ima uticaj na nastanak hronične inflamacije sluznice larinksa, odnosno hroničnog laringitisa, ali se ne može direktno povezati sa nastankom planocelularnog karcinoma larinksa. Sa druge strane, dokazani etiopatogenetski faktori za nastanak maligniteta larinksa kao što su konzumiranje cigareta i alkohola, takođe utiču i na nastanak gastroezofagealnog i laringofaringealnog refluksa. U faktore rizika spadaju i profesionalna izloženost štetnostima u vidu aerosola ili udisanja vreloug vazduha. Određene epidemiološke studije dokazale su veću učestalost maligniteta larinksa kod pacijenata koji su pothranjeni, kao i kod onih imaju dijabetes melitus tip 2 (Lee et al. 2022).

1.1.3. Klinička slika

Pacijenti sa karcinomom larinksa mogu se javiti lekaru dok je bolest lokalizovana, regionalno proširena ili već metastatski uznapredovala. Neretko, pacijenti se javljaju kada su tegobe u vidu disanja toliko izražene da je neophodno raditi hiruršku traheotomiju već u okviru prve posete otorinolaringologu. Kod takvih pacijenata prognoza je značajno lošija nego kod pacijenata koji ne zahtevaju urgentni hirurški tretman (Bollig et al. 2020). Karcinom larinksa praktično se nikada ne dijagnostikuje zbog opštih tegoba kao što su gubitak telesne mase ili anemija. Simptomi paraneoplastičnog sindroma kao što su periferna neuropatija, neoplastična temperatura, endokrini poremećaji ili promene na koži, mogući su, ali izuzetno retki (Rinaldo et al. 2020). U najvećem broju slučajeva pacijenti se javljaju lekaru zbog promena koje su specifične za anatomsku lokalizaciju tumora u larinksu (Chu et al. 2008).

Karcinomi sa primarnom lokalizacijom na strukturama supraglotisa mogu da daju osećaj stranog tela u grlu ili parestezije. Egzofitni rast tumorske mase može da dovede do hemoptizija. Veći rast tumora dovodi do tegoba u vidu otežanog gutanja, kao i izmenjene fonacije. Ukoliko se tumor proširi na glasnice, dolazi do promuklosti. Dalje širenje izaziva tegobe u vidu bolnog gutanja i refleksne otalgije. Ipak, u brojnim slučajevima tumorske lezije bivaju asimptomatične dugo vremena, sve dok ne daju lokalizovane metastaze, tako da je veoma česta situacija u kojoj se pacijent javlja lekaru upravo zbog pojave tumefakta na vratu (Sanabria et al. 2020).

Minimalne izrasline na glasnicama daće primetne promene u karakteristikama glasa, odnosno, dovešće do promuklosti. Iz tog razloga, i najraniji karcinomi glotisa mogu biti lako i brzo dijagnostikovani. Za optimalnu produkciju glasa potreban je očuvan epitel glasnica i kontinuitet mukoznog talasa, tako da tumorske lezije milimetarskih veličina dovode do promena u akustičkim karakteristikama glasa (Martins et al. 2016). Iz tog razloga, svaka promuklost koja traje duže od 3 nedelje, trebalo bi da bude evaluirana od strane otorinolaringologa (Stachler et al. 2018). Sa daljim rastom tumora dolazi do pojačane promuklosti i zamorljivosti glasa, nepokretnosti glasnice i mogućnosti aspiracije hrane ili tečnosti. Veliki tumori dovode do progresivne dispneje i stridora. Moguće se tegobe u vidu hemoptizija. Refleksne otalgije i odinofagije nisu česte kod lokalizovanog karcinoma glotisa. Glasnice imaju oskudnu limfnu drenažu, sa značajnom limfnom mrežom samo na njihovoj donjoj površini, tako da metastaze na vratu ukazuju na širenje tumora na strukture supraglotisa (Liu et al. 2006).

Subglotis je subregion larinksa u kojem se najređe javljaju karcinomi. Ipak, minimalne tumorske lezije retko daju rane simptome i znakove bolesti. Osećaj stranog tela ili stezanja u grlu javlja se kod određenog broja pacijenata. Promuklost se javlja tek kada se tumor proširi na strukture glotisa ili zahvati rekurentni laringealni nerv. Cirkumferentni rast tumora dovodi do progresivne dispneje, vokalnog zamora i na kraju, stridora. Širenje tumorskog tkiva ka tiroidnoj žlezdi može da imitira primarni tumor istmusa tiroidne žlezde (Coskun et al. 2019).

Prisustvo regionalne proširenosti bolesti važan je prognostički faktor kod pacijenata sa karcinomom larinksa. Petogodišnje preživljavanje kod pacijenata koje nemaju lokalne metastaze znatno je veće od pacijenata koji ih imaju i iznosi 65-95% kod pacijenata bez metastaza, odnosno 30-55% kod pacijenata koji imaju metastaze. Takođe, ekstrakapsularno širenje tumora u limfnom čvoru, nepovoljno je po ishod lečenja i prognozu bolesti (de Juan et al. 2013). Prisustvo metastaza povezano je i sa veličinom samog primarnog tumora, tako da se one nalaze u 15-40% kod T1 tumora, 35-40% kod tumora T2 stadijuma, 50-65% kod T3 tumora, i u oko 65% kod T4 tumora (Mutglu et al. 2014). Limfni sistem vrata veoma je razvijen i sadrži oko 300 limfnih čvorova od oko 800 koliko ih ukupno ima u ljudskom telu. Oni su, prema konsenzusu Komiteta američke akademije za otorinolaringologiju i hirurgiju glave i vrata (AAO-HNS) grupisani u 6 nivoa. Klasifikacija limfonodusa prema regionima olakšava njihovo opisivanje prilikom kliničkog pregleda, praćenje veličine limfonodusa u toku terapije i koristi se u planiranju hirurškog lečenja na vratu (disekcija). Prema ovoj podeli, I nivo vrata obuhvata submentalne (IA) i submandibularne (IB) limfonoduse. Nivou II pripadaju gornji jugularni limfni nodusi, uz gornju trećinu unutrašnje jugularne vene (IIA podnivo obuhvata limfonoduse lokalizovane medijalno od n. akcesorijusa, IIB noduse lokalizovane lateralno od spinalnog akcesornog nerva). Nivou III pripadaju srednji jugularni limfonodusi (uz srednju trećinu unutrašnje jugularne vene), a nivou IV donji jugularni limfonodusi (uz donju trećinu unutrašnje jugularne vene). Nivo V obuhvata limfonoduse zadnjeg trougla vrata (nivo VA noduse lokalizovane iznad ravni koja je ograničena donjom ivicom krikoidne hrskavice, VB noduse lokalizovane ispod opisane ravni, uključujući i transferzalne cervikalne i supraklavikularne limfonoduse). VI nivo vrata obuhvata noduse prednjeg odeljka vrata (Robins et al. 1991). Zbog dobro razvijene limfne drenaže, karcinomi sa primarnom supraglotičnom lokalizacijom najčešće daju regionalne metastaze u II, III i IV nivo vrata, veoma često i obostrano. Limfonodusi V nivoa vrata su retko zahvaćeni metastazama planocelularnog karcinoma supraglotisa, dok limfonodusi I nivoa (submandibularni i submentalni) praktično nikad nisu mesto regionalnog metastatskog širenja. Metastaze karcinoma glotisa su retke u

ranij fazi bolesti, zbog oskudne limfne drenaže glasnica, ali tokom rasta primarnog tumora, povećava se i mogućnost regionalnog metastaziranja u II, III, IV i VI nivo vrata. Ukoliko se karcinom glotisa dijagnostikuje kada je pacijent u odmaklom stadijumu bolesti, moguće je kliničkim pregledom utvrditi i prisustvo obostanih metastatskih promena na vratu. Primarni subglotični karcinomi larinksa mogu dati metastaze u VI nivo vrata, mada je, zbog odsustva ranih simptoma i kasnog javljanja pacijenta lekaru, često prisutno prisustvo izmenjenih limfonodusa i u II, III i IV nivou vrata (Kaur et al.2002; Mutlu et al. 2014).

1.1.4. Dijagnostika

U postavljanju dijagnoze maligniteta larinksa bitna su dva aspekta- prvi je otkrivanje karcinoma u početnom stadijumu, što omogućava pravovremeno lečenje sa očuvanjem svih funkcija larinksa i brzim oporavkom pacijenta. Drugi važan aspekt prilikom postavljanja dijagnoze maligniteta larinksa jeste tačno određivanje lokalne, regionalne i udaljene proširenosti tumora, radi određivanja optimalnog izbora modaliteta specifičnog onkološkog lečenja. U tom smislu, neophodna je primena najsavremenijih endoskopskih, radioloških i histopatoloških metoda.

Dijagnoza kod pacijenata sa suspektnim karcinomom larinksa počinje anamnezom. Osnovni simptomi maligniteta larinksa predstavljeni su promuklošću, vokalnom zamorljivošću, otežanim ili bolnim gutanjem, refleksnim bolom u jednom ili oba uva, kašljem, hemoptizijama i otežanim disanjem. Otorinolaringološki klinički pregled podrazumeva vizualizaciju struktura larinksa indirektnom laringoskopijom, direktnom laringoskopijom ili fiberoptičkom endonazalnom laringoskopijom. Ovim pregledima konstatuju se neravna polja na sluznici larinksa, hipertrofija sluznice ili jasno izražene tumorske mase u larinksu. Nepokretnost jedne polovine larinksa ukazuje na lokalno proširenu bolest. Endovideolaringostroboskopijom moguće je videti diskretne promene mukoznog talasa kod najranijih stadijuma karcinoma. Palpacijom vrata dodatno se procenjuje pokretljivost grkljana, osetljivost tiroidne hrskavice, direktni proboj tumora u meka tkiva vrata kao i eventualno prisustvo patološki izmenjenih i uvećanih limfonodusa (Chu et Kim 2008).

Ultrazvučnom dijagnostikom dobijaju se podaci o eventualnom prisustvu metastatski izmenjenih limfonodusa u vratu. Ultrasonografija vrata ne može precizno proceniti veličinu, oblik i proširenost primarnog tumora u samom larinksu. Prisustvo mekotkivnih struktura koje su ispunjene vazduhom, hiodne kosti, tiroidne i krikodne hrskavice onemogućava dobru vizuelizaciju sluznice larinksa ovom radiološkom metodom. Takođe, u smislu ehogenosti, hipoehogenost je karakteristična za benigne, kao i za maligne tumore larinksa, bez mogućnosti diferenciranja ovih promena (Ahn et al. 2022). Iz tog razloga, za radiološku procenu proširenosti lezija na larinksu neophodna je radiološka dijagnostika u vidu kompjuterizovane tomografije sa intravenskim kontrastom, nuklearne magnetne rezonance ili pozitron emisijne tomografije. Kompjuterizovana tomografija larinksa i vrata najčešće se koristi u radiološkoj dijagnostici tumora larinksa i u proceni njegove lokalne i lokoregionalne proširenosti. Prednosti kompjuterizovane tomografije u odnosu na nuklearnu magnetnu rezonancu su: veća dostupnost CT aparata, manja cena pregleda, lakše izvođenje snimanja, snimanje u više ravni, lakše proširenje polja snimanja sa vrata na grudni koš ili endokranijum ukoliko je potrebno, lakša interpretacija i dobijanje dobrih detalja koštanih struktura. Kompjuterizovana tomografija traje značajno kraće u odnosu na proceduru nuklearne magnetne rezonance. Kraće trajanje procedure u velikoj meri smanjuje artefakte nastale zbog kašljanja, gutanja i nemogućnosti pacijenta da u potpunosti miruje tokom celog trajanja snimanja. Neophodnost davanja kontrastnog sredstva, relativno niska kontrastna rezolucija mekih tkiva, degradacija slike u slučaju metalnih dentalnih punjenja i izlaganje zračenju predstavljaju nedostatke CT dijagnostike u odnosu na NMR. Ipak, u najvećem broju slučajeva CT snimanjem struktura larinksa i vrata dobijaju se podaci koji su kliničarima dovoljni za dalje medicinske odluke i postupke, tako da se NMR koristi samo sporadično, kao dopunska metoda. CT kriterijumi za postavljanje dijagnoze karcinoma intenzivno postkontrastno pojačanje, zadebljanje mekih tkiva, prisustvo velike tumorske mase, infiltracija masnog tkiva ili

kombinacija nabrojanog. Minimalne tumorske promene mukoze larinksa mogu biti radiološki nevidljive, ili imponovati kao otok ili promena sluznice u vidu inflamacije. Erozija hrskavica larinksa, invazija preepiglottičnog ili paraglottičnog prostora i ekstralaringealna propagacija karcinoma jasno se verifikuju CT snimanjem larinksa i pouzdan su znak uznapredovale bolesti. CT jasno verifikuje širenje tumora u meka tkiva vrata, štitnu žlezdu, strukture hipofarinksa i početni deo jednjaka, kao i patološki izmenjene limfonoduse u vratu (Zinreich 2002; Blitz et Aygun 2008; Agnello et al. 2017). Snimanje pozitronskom emisionom tomografijom (PET-CT) daje još preciznije rezultate (Paone et al. 2019).

Za definitivnu dijagnostičku potvrdu planocelularnog karcinoma larinksa neophodna je laringomikroskopija u opštoj endotrahealnoj anesteziji. Ovom procedurom postmatraju se strukture larinksa pod mikroskopskim uvećanjem i uzimaju uzorci tumorskog tkiva ili suspektno izmenjene sluznice larinksa za histopatološku analizu. Pod mikroskopskim uvećanjem pregledaju se strukture hipofarinksa, svih spratova glotisa i vidljivog dela traheje, tako da se mogu jasno uočiti male promene, kao i proširenost uznapredovalih tumora. U slučajevima proširene bolesti, uzima se više graničnih uzoraka za biopsiju (Stevanovic et al. 2023). Najpreciznije određivanja prisustva i proširenosti maligniteta dobija se kombinacijom laringomikroskopije i radiološke dijagnostike. Studija iz 2005. analizirala je tačnost klasifikacije T stadijuma tumora kod pacijenata sa glotičnim i supraglotičnim planocelularnim karcinomom larinksa. Svi pacijenti pregledani su endovideolaringostroboskopski, a potom je učinjena direktna laringoskopija u cilju procene lokalnog statusa i biopsije. Takođe, rađeni su helikoidni aksijalni, sagitalni i koronarni CT preseki od 1 mm. Nakon sprovedenog hirurškog lečenja i analize histopatološkog materijala, zaključeno je da je klasifikacija tumora postavljena endoskopskim metodama bila tačna u 40,38% slučajeva (40% za T1, 29,41% za T2, 46,43% za T3 i 50% za T4). Tačnost CT procene proširenosti bolesti bila je 75%, i to T2 (62,50% za T2), T3 (73,91% za T3), i T4 (88,24% za T4). Kada je radiološkim snimcima verifikovana zahvaćenost prednje komisure, tačnost stadijuma povećavana je i na 96%. Ova studija ukazala je na nedostatke i potencijalne rizike oslanjanja isključivo na endoskopske metode prilikom gradiranja karcinoma (Barbosa et al. 2005). Kasnija istraživanja ukazala su na činjenicu da videostroboskopija ne poboljšava dijagnostičku preciznost kada se radi o eventualnoj zahvaćenosti prednje komisure. Ona je korisna metoda u proceni pokretljivosti larinksa, kao i u postavljanju razlike između T1a i T2 karcinoma larinksa (Porras Alonso et al. 2020).

1.1.5. Histopatološka analiza

Makroskopski, planocelularni karcinom larinksa može da bude u vidu ravne lezije sluznice sa ivicama koje su uzdignute i neravne; u vidu egzofitne lezije koja najčešće ima centralnu ulceraciju ili u vidu endofitne ulcerozne lezije. Mikroskopski, planocelularni karcinom larinksa karakteriše invazivni rast uz varijabilan stepen skvamozne diferencijacije. Prisutan je prekid bazalne membrane, kao i prisustvo pojedinačnih tumorskih ćelija u subepitelnoj stromi. Atipija ćelija ogleda se u stepenu njihove keratinizacije hiperplazije i hiperhromatizacije jezgra, u varijacijama veličine i oblika ćelija, kao i u postojanju velikog broja atipičnih mitoz. Broj, odnosno procenat atipičnih spinoznih ćelija proporcionalan je stepenu maligniteta. Prema stepenu diferencijacije malignih ćelija planocelularni karcinom larinksa deli se na 3 histološka stepena (gradusa)- G1, dobro diferentovani tip, G2, umereno diferentovani tip i G3, slabo diferentovani tip. Kriterijume gradiranja predstavljaju: stepen diferencijacije ćelija, nuklearni pleomorfizam i mitotska aktivnost. Dobro diferentovani planocelularni karcinom najsličniji je planocelularnom epitelu urednog nalaza i karakteriše ga prisustvo velikih diferentovanih ćelija nalik keratinocitima kao i malih ćelija nalik bazaloidnim, koje su najčešće lokalizovane na periferiji tumorskih ostrvaca. Prisutni su intercelularni mostići i keratinizacija, dok su mitoze retke. Umereno diferentovani planocelularni karcinom karakteriše veći stepen nuklearnog polimorfizma i veći broj mitoz, uključujući i atipične mitoze, sa manjim stepenom keratinizacije ćelija. Kod slabo diferentovanog gradusa planocelularnog karcinoma dominiraju ćelije

nalik bazalnim, sa visokim mitotskim indeksom, atipičnim mitozama, jedva uočljivim inercelularnim mostićima i minimalnom ili odsutnom keratinizacijom. Invazivni tumorski rast može da bude u smislu ekspanzivnog, infiltrativnog ili kombinacije ova dva tipa širenja. Uznappedovali tumorski rast dovodi do zahvatanja mišićnog ili hrskavičavog tkiva a moguća je i perineuralna i perivaskularna invazija (Zidar et Gale, 2019).

U kliničkom smislu, od izuzetne važnosti je razlikovanje displastičnih lezija od početnog stadijuma karcinoma kao i procena prisustva malignih ćelija u graničnim preparatima uzetim sa tkiva koje makroskopski izgleda zdravo. Tačno i precizno određivanje prisustva maligniteta neophodno je da bi se planirao obim hirurške resekcije kada je moguća, odredile mogućnosti rekonstrukcije struktura u hipofarinksu i larinksu i dodatni modaliteti specifičnog onkološkog lečenja ukoliko je neophodno. Takođe, izuzetno je važna histopatološka analiza tkiva uzetog nakon specifičnog onkološkog lečenja, u slučajevima kada postoji sumnja na recidiv bolesti (Hrelec 2021).

Klinička praksa i studije ukazale su na to da se nekada najizraženije histološke promene na nalaze na onim delovima sluznice larinksa koje su najviše hiperemične ili imponuju kao izražena polja hiperkeratoze. S obzirom da se biopsijom sluznice glasnica uzima mala količina materijala, često se može uzeti neadekvatan uzorak, odnosno uzorak u kome se ne može proceniti intaktnost bazalne membrane. Takođe, postoje varijacije u normalnom histološkom izgledu glasnica, s obzirom na to da je debljina epitela varijabilna i može da iznosi od 5 do 20 redova ćelija na različitim mestima iste glasnice. Inflammatorne promene izazvane hroničnim inflamatornim procesima (laringofaringealnim refluksom, bakterijskim ili gljivičnim infekcijama) kao i ranijim zračenjem regije vrata dodatno komplikuju interpretaciju histopatološkog nalaza (Eckel et al. 2021).

Imunohistohemijske analize predstavljaju dopunu klasičnom histopatološkom pregledu tkiva i pružaju dodatne informacije o analiziranim preparatima. Na ćelijama planocelularnog karcinoma larinksa nalaze se brojni receptori - CD44, CK5,10,17,18, Ki-67, p63. Visok nivo ekspresije CD44, površinskog receptora za hijaluronsku kiselinu i matriks-metaloproteinaze nađen je u ćelijama planocelularnog karcinoma larinksa. Ovaj receptor povezan je sa većim rizikom za metastatsko širenje tumora i sa lošijom prognozom. Ipak, CD44 pozitivne epitelne ćelije mogu se naći i u normalnom pločasto-slojevitom epitelu sluznice larinksa, kao i u patološki neizmenjenim limfonodusima glave i vrata (Sharaf et al. 2021). Takođe, visoka ekspresija CD44 receptora nađena je i u sekretornim ćelijama mukoznih žlezda sluznice larinksa, tako da je nemoguće koristiti ovaj biomarker kao specifičan pokazatelj maligniteta (Arutyunyan et al. 2022). Prisustvo ekspresije citokeratina (CK) koristi se u imunohistohemijskoj identifikaciji tumora epitelnog porekla. CK5 i CK17 prisutni su u tkivu planocelularnog karcinoma, tako da se rutinski koriste u dijagnostičkim panelima za potvrdu ove bolesti (Yi et al. 2017). Najnovije studije ukazuju na prisustvo visokih nivoa CK5 i CK17 i u zdravom epitelu larinksa. Ekspresija CK10 i CK18 takođe je prisutna i u maligno izmenjenom i u zdravom tkivu. Više od 80% svih tumorskih ćelija planocelularnog karcinoma larinksa iskazuje pozitivnost na p63 tumorski protein, ali je ta pozitivnost nađena i kod ćelija zdravog epitela larinksa. Kod karcinoma larinksa koji su visoko diferentovani, specifične subpopulacije neizmenjenih i tumorskih ćelija relativno se lako razlikuju prema ekspresiji nuklearnih markera Ki-67 i p63, kao i citoplazmatskih markera CK10 i CK8. Sa druge strane, kod umereno diferentovanih karcinoma ekspresija ovih markera slična je i kod tumorskih ćelija, i kod neizmenjenih ćelija bazalnih slojeva pločastoslojevitog epitela larinksa (Arutyunyan et al. 2022).

Na kraju, evaluacija citoarhitekture tkiva podložna je određenom stepenu intra- i interispitivačke varijabilnosti. Ona u mnogome zavisi od subjektivne procene, znanja i iskustva patologa. Iz tog razloga, primena objektivnih i kvantitativnih računarskih metoda u savremenoj medicinskoj praksi ne samo da je poželjna, već je i neophodna.

1.1.6. TNM klasifikacija

Da bi se na jednostavan i medicinski informativan način klasifikovala maligna bolest, procenile mogućnosti lečenja, prognoza i olakšala razmena informacija između lekara različitih specijalnosti (hirurga, onkologa, radioterapeuta), još 1944. godine predložena je TNM klasifikacija (engl. "Tumor Node Metastasis"). Prva verzija ove klasifikacije usvojena od strane Međunarodnog udruženja za borbu protiv raka (engl. "Union for International Cancer Control", UICC), kao i od Udruženog američkog komiteta za rak (engl. "American Joint Committee on Cancer", AJCC) u upotrebi je od 1987. godine, a od 1. januara 2018. godine važeće je osmo izdanje TNM klasifikacije (Zanoni et al. 2019). Koristeći ovu metodu, označava se veličina primarnog tumora (T), širenje na regionalne limfonoduse (N) kao i prisustvo ili odsustvo udaljenih metastaza (M) (Tabela 1, 2 i 3). Prema podacima ove klasifikacije, bolest se svrstava u stadijume, od kojih početni imaju bolje ishode, a viši stadijumi ukazuju na teže onkološko oboljenje (Tabela 4). TNM klasifikacija određuje se na podacima koji se dobijaju nakon kliničkih, radioloških pregleda, biopsije i histopatološke verifikacije malignog oboljenja, odnosno, pre početka lečenja, i ne menja se naknadno. Patološka klasifikacija (pTNM) uključuje i dodatne podatke dobijene nakon hirurškog zahvata i histopatoloških pregleda preparata dostavljenih na analizu (Gershenwald et al. 2017; Huang et O'Sullivan 2017).

Tabela 1. TNM klasifikacija karcinoma larinksa, primarni tumor (T)

Supraglotis	
1	Tumor ograničen na jednu podregiju supraglotisa sa normalnom pokretljivošću glasnice
2	Tumor zahvata sluznicu više od jedne podregije supraglotisa ili glotisa, ili regije izvan supraglotisa (sluznica baze jezika, valekula, medijalni zid piriformnog sinusa) bez fiksacije larinksa
3	Tumor ograničen na larinks sa fiksacijom glasnice i/ili tumor koji zahvata i neku od sledećih struktura: postkrikoidna regija, preepiglotisni prostor, paraglotisni prostor i/ili unutrašnji korteks tiroidne hrskavice
4a	Umereno uznapredovala lokalna bolest. Tumor se širi kroz tiroidnu hrskavicu i/ili zahvata tkiva izvan larinksa (traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke spoljne mišiće jezika, infrahoidne mišiće, tiroidnu žlezdu ili ezofagus)
4b	Veoma uznapredovala lokalna bolest. Tumor zahvata prevertebralni prostor, obuhvata karotidnu arteriju ili medijastinalne strukture
Glottis	
1	Tumor ograničen na glasnicu/e (može zahvatiti prednju komisuru ili zadnji zid glotisa) koja je normalno pokretna T1a Tumor zahvata jednu glasnicu T1b Tumor zahvata obe glasnice
2	Tumor se širi na supraglotis i/ili subglottis i/ili je pokretljivost glasnice smanjena
3	Tumor ograničen na larinks sa fiksacijom glasnice i/ili zahvata paraglotisni prostor i/ili unutrašnji korteks tiroidne hrskavice
4a	Umereno uznapredovala lokalna bolest. Tumor prodire kroz spoljašnji korteks tiroidne hrskavice i/ili zahvata tkiva izvan larinksa (traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke spoljašnje mišiće jezika, infrahoidne mišiće, tiroidnu žlezdu ili jednjak)
4b	Veoma uznapredovala lokalna bolest. Tumor zahvata prevertebralni prostor, obuhvata karotidnu arteriju ili medijastinalne strukture
Subglottis	
1	Tumor ograničen na subglottis
2	Tumor se širi na glasnicu/e koja je normalno ili ograničeno pokretna
3	Tumor ograničen na larinks sa fiksacijom glasnice
4a	Umereno uznapredovala lokalna bolest. Tumor prodire kroz spoljašnji korteks tiroidne hrskavice i/ili zahvata tkiva izvan larinksa (traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke spoljašnje mišiće jezika, infrahoidne mišiće, tiroidnu žlezdu ili jednjak)
4b	Veoma uznapredovala lokalna bolest. Tumor zahvata prevertebralni prostor, obuhvata karotidnu arteriju ili medijastinalne strukture

Tabela 2. TNM klasifikacija karcinoma larinksa, regionalni limfni nodusi (N)

0	Nema metastaza u regionalnim limfnim nodusima
1	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom nodusu, 3cm ili manja u najvećoj dimenziji, ENE* (-)
2	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom nodusu, veća od 3 cm a manja od 6 cm u najvećoj dimenziji; ili metastaze u brojnim ipsilateralnim limfnim nodusima, nijedna veća od 6 cm u najvećoj dimenziji; ili metastaza u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim nodusima, manja od 6 cm u najvećem dijametri, ENE (-)
2a	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom nodusu, veća od 3 cm ali ne veća od 6 cm u najvećoj dimenziji, ENE (-)
2b	Metastaze u brojnim ipsilateralnim limfnim nodusima, nijedna veća od 6 cm u najvećoj dimenziji, ENE (-)
2c	Metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim nodusima, nijedna veća od 6 cm u najvećoj dimenziji, ENE (-)
3a	Metastaza u limfnom nodusu, veća od 6 cm u najvećoj dimenziji, ENE (-)
3b	Metastaza u bilo kom limfnom nodusu, bilo koje veličine, ENE (+)
	*ENE- ektranodalna ekstenzija

Tabela 3. TNM klasifikacija karcinoma larinksa, prisustvo udaljenih metastaza (M)

0	Nema udaljenih metastaza
1	Postoje udaljene metastaze

Tabela 4. Stadijumi planocelularnog karcinoma larinksa

Stadijum I	T1 N0 M0	
Stadijum II	T2 N0 M0	
Stadijum III	T3 N0 M0	T1-3 N1 M0
Stadijum IV A	T4a N0-1 M0	T1-4a N2 M0
Stadijum IV B	T4b N0-3 M0	T1-4b N3 M0
Stadijum IV C	T1-4b N0-3 M1	

1.1.7. Modaliteti lečenja

Savremeni modeli lečenja planocelularnog karcinoma larinksa usmereni su ishodu koji nude najviši kvalitet života, odnosno na izlečenje uz očuvanje funkcija larinksa, ukoliko je to moguće. Kod pacijenata sa ranim stadijumom karcinoma (T1 i T2) ovo se postiže endoskopskom (transoralnom) hirurzijom larinksa ili parcijalnom otvorenom (transcervikalnom) laringektomijom (Pfister et al. 2006; Obid et al. 2019).

Kod pacijenata koji imaju viši stadijum bolesti, u lečenje se uključuju i drugi modaliteti lečenja- hemioterapija u kombinaciji sa radioterapijom. Odabir hirurškog ili nehirurškog lečenja kao inicijalnog tretmana za planocelularni karcinom larinksa zavisi od individualnih karakteristika pacijenta, kao što su starost i pridružene bolesti, kao i od karakteristika onkološkog oboljenja-

podregion primarnog tumora, obim, veličina i širenje primarnog tumora, prisustvo regionalnih ili udaljenih metastaza. Karcinom larinksa se može lečiti različitim hirurškim procedurama. Funkcionalni ishodi parcijalnih laringektomija zavise u velikoj meri od toga da li će hirurška resekcija biti jedini modalitet lečenja, pošto primena postoperativne radioterapije može da ugrozi očuvanje funkcija preostalih struktura larinksa. Poštedna laringealna hirurgija trebalo bi da se primeni samo onda kada hirurg može da osigura otklanjanje tumora sa ivicama makroskopski zdravog izgleda. Odluka da se sprovede hirurško lečenje u vidu parcijalne laringektomije sa očekivanom potrebom za postoperativnom radioterapijom usled prisustva pozitivnih ivica nije prihvatljiv pristup (Gourin et al. 2009; Alicandri-Ciufelli et al.; Forastiere et al. 2018). Lošiji ishodi lečenja planocelularnog karcinoma larinksa češći su kod pacijenata sa uznapredovalim T ili N stadijumom, velikim volumenom tumorske mase, invazijom tumora u prednju komisuru, hrskavičave strukture larinksa, dubokom invazijom u preepiglottični ili paraglottični prostor, smanjenom pokretljivošću glasnica i otežanim disanjem koje zahteva traheotomiju (Pointreau et al. 2009; Mucha-Malecka et al. 2013; Cîrstea et al. 2023). U poslednjih nekoliko godina razmatranje manje agresivnih modaliteta lečenja odnosi se na primenu radioterapije za rani karcinom larinksa i kombinacije hemio i radioterapije za slučajeve uznapredovalog karcinoma larinksa. Međutim, tvrdnje da su ova dva tretmana manje agresivna u poređenju sa hirurškim lečenjem moraju se kritički razmatrati. Pacijenti su izloženi visokim dozama zračenja svakodnevno, a kada se hemioterapija koja povećava osetljivost na zračenje dodaje radioterapiji, toksičnost se više nego udvostručuje. Neki od neželjenih efekata radioterapije i citostatika jesu mukozitis, kserostomija, gubitak čula ukusa, neutropenija, oštećenje bubrega i jetre, gubitak sluha, postiradijaciona hipotireoza (Chone et al. 2015). Iz tog razloga, odluke o tipu lečenja, moraju da budu donete na što objektivniji način.

1.1.7.1. Hirurško lečenje

Najvažniji cilj tokom hirurškog odstranjivanja jeste dobijanje resekcionih ivica negativnih na malignitet. Iako većina maligniteta glave i vrata zahteva rub koji je najmanje 5 mm udaljen od maligno izmenjenog tkiva, konzervativna hirurgija larinksa toleriše bliže hirurške margine, zbog specifične i kompleksne anatomske strukture larinksa (Alicandri-Ciufelli et al. 2013; Barzan et al. 2022). Zbog toga je precizna histopatološka analiza resekcionih ivica ključna za donošenje daljih koraka o lečenju pacijenta. Uspeh bilo kog modaliteta za očuvanje larinksa zavisi od multidisciplinarnog pristupa lečenju na osnovu tačne procene obima tumora, mogućnosti očuvanja funkcija govora i gutanja, ali i postizanja najbolje lokalne kontrole sa što manjim rizikom od regionalnih ili udaljenih metastaza. Savremeni koncept onkološke terapije često se tumači kao izbor najmanje agresivnog lečenja. Studija Hofmana iz 2006. godine analizirala je podatke dveju američkih baza podataka o kanceru, SEER (engl. "Surveillance, Epidemiology, and End Results") i NCDB (engl. "National Cancer Data Base") u periodu od 1985-2001. godine. Gotovo svi karcinomi kod ljudi pokazali su povećanje petogodišnjeg preživljavanja bez bolesti, ali ne i karcinom larinksa. Kod ovog oboljenja, preživljavanje se smanjuje (Hofmann et al. 2006; Molina-Fernandez et al. 2023). Brojni autori stoga smatraju da postoji potreba da se hirurško lečenje karcinoma larinksa ponovo istakne kao standardni tretman odnosno tretman prvog izbora za ovo oboljenje (Hofmann et al. 2006; Chone et al. 2015; Tang et al. 2018).

Transoralna mikrohirurgija predstavlja minimalno invazivni endoskopski pristup koji kombinuje laringomikroskopiju sa laserskim uređajem za resekciju tumorskog tkiva. Laserski zraci ugljen-dioksida i Nd:YAG (neodijum-itrijum-aluminijum-granata) stvaraju talasnu dužinu svetlosti koja se apsorbuje u molekulima vode, minimizirajući oštećenje tkiva. Tumor se uklanja mikrohirurškim instrumentima u celosti ili u delovima, u zavisnosti od odluke hirurga. Kod resekcije u celosti, tumor se u potpunosti uklanja sa delom okolnog tkiva koje pod mikroskopskim uveličanjem izgleda zdravo. S druge strane, kod resekcije u delovima, tumor se prvo preseca u epicentru kako bi se utvrdila dubina invazije, a zatim se uklanja u kvadrantima koji se prostiru u okolno tkivo. Očuvanje bar jednog

pokretnog kompleksa aritenoida neophodno je za održavanje laringealne funkcije (Zeitels et al. 2014; Chiesa-Estomba et al. 2019). Kvalitet glasa nakon endoskopske operacije planocelularnog karcinoma larinksa varira u zavisnosti od lokalizacije i obima tumora. Optimalni rezultati postižu se kod T1 tumorskih lezija koje zahvataju samo membranozni deo glasnice i supraglotičnih tumora koji se ne šire na glasnice. Kod transoralne laserske mikrohirurgije, hrskavičavi skelet larinksa u potpunosti biva očuvan, za razliku od otvorene parcijalne laringektomije. Zbog toga se smanjuje potreba za traheostomijom, postoperativni oporavak gutanja je brži, a hospitalizacija kraća. Onkološki rezultati transoralne laserske mikrohirurgije, prema mnogim studijama, pokazuju podjednako dobre rezultate kao i lečenje putem otvorene parcijalne laringektomije (Suarez et al. 2013; Canis et al. 2013; Gökmen et al. 2020). Funkcionalne prednosti su najoptimalnije samo kada se transoralna laserska mikrohirurgija koristi kao jedina metoda terapije. Eventualna postoperativna radioterapija u slučaju da je neka od resekcionijskih margina pozitivna na malignitet, povećava komorbiditete daljeg onkološkog tretmana i produžava oporavak akta gutanja. Stoga je pri izboru tehnike transoralne laserske hirurgije kao primarnog tipa lečenja najvažnija procena verovatnoće da će se postići potpuna mikroskopska resekcija (Obid et al.2019).

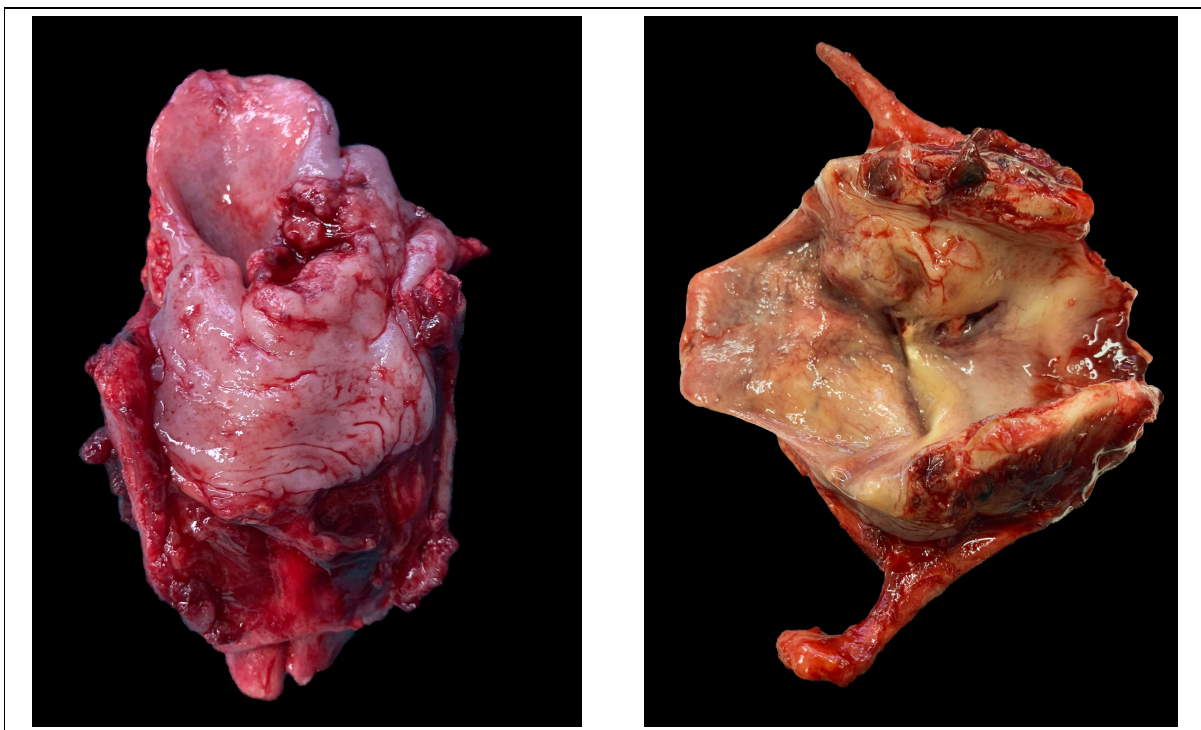
Hordektomija podrazumeva isecanje mukoznog, submukoznog i muskularnog sloga glasnice do tiroidne hrskavice koja je zahvaćena T1 ili T2 tumorom koji ne ograničava pokretljivost larinksa. Otvoreni pristup laringofisurum predstavlja otvaranje larinksa rezom kože, potkože i platizme u medijalnoj liniji vrata, a potom se rezom tiroidne hrskavice duž njenog ugla pristupa lumenu larinksa. Evropsko laringološko društvo (engl. "European Laryngological Society", ELS) objavilo je 2000. godine klasifikaciju, a 2007. dopunu klasifikacije različitih tipova endoskopskih laserskih hordektomija koje su podeljene u 6 tipova (Remakle et al. 2007). Po ELS klasifikaciji, tip I podrazumeva subepitelnu resekciju glasnice, tip II subligamentarnu, dok tip III podrazumeva transmuskularnu resekciju i može da obuhvati i resekciju ventrikularnog nabora. Tip IV laserske hordektomije podrazumeva totalnu resekciju glasnice uz resekciju dela ili celog ipsilateralnog ventrikularnog nastavka. Tip V podrazumeva proširenu hordektomiju gde se kod tipa Va uklanja i deo kontralateralne glasnice, kod tipa Vb ipsilateralni aritenoid, kod tipa Vc ipsilateralni ventrikulus i kod tipa Vd deo subglotične sluznice. Kod tipa VI ekscidira se tkivo prednje komisure. Godine 2007. učinjena je prva operacija supraglotisnog karcinoma primenom transoralne robotske hirurgije. 2009. godine procedura je zvanično odobrena od strane agencije FDA (engl. "Food and Drug Administration") za T1 i T2 laringealne karcinome, kao i benigne tumore (Genden et al, 2009). Ipak, do danas, samo 3% svih operacija učinjenih ovom tehnikom pripada regiji glave i vrata (Hans et al. 2022).

Otvorena parcijalna laringektomija podrazumeva širok spektar transcervikalnih hirurških tehnika kod kojih se uklanjaju strukture larinksa uz očuvanje funkcije preostalih struktura. Parcijalne laringektomije mogu da se postoperativno komplikuju supkutanim emfizemom, otežanim gutanjem, laringokutanom fistulom, edemom disajnih puteva koji zahteva traheotomiju, aspiracionom pneumonijom (Ganley et al. 2009; Gökmen et al. 2020). Vertikalna parcijalna laringektomija, odnosno hemilaringektomija, primenjuje se u hirurškom tretmanu određenih T1 i T2 glotičnih karcinoma sa zahvatanjem prednje komisure. Vertikalni rez pravi se kroz tiroidnu hrskavicu blizu prednje komisure, resekujući glasnicu, deo subglotisa, ventrikulus, ventrikularni nabor i ariepiglottični nabor. Zbog razvoja transoralne laserske hirurgije kojom se podjednako dobro vrši resekcija T1 i T2 karcinoma larinksa, smanjuje se stopa otvorenih vertikalnih parcijalnih laringektomija (Gigot et al. 2022). Horizontalna parcijalna laringektomija (supraglotična laringektomija) obuhvata resekciju supraglotičnih struktura larinksa, uključujući epiglotis i preepiglottičnu regiju, uz čuvanje glasnica i aritenoidnih hrskavica. U određenom broju slučajeva nakon operacije je potrebna privremena traheotomija i ishrana preko nazogastrične sonde u trajanju od 4 do 6 nedelja. Slično kao i kod vertikalne parcijalne laringektomije, uloga horizontalne parcijalne laringektomije u konzervativnoj hirurgiji smanjuje se zbog transoralne laserske mikrohirurgije. Ipak, horizontalna parcijalna laringektomija metoda je izbora za T3 i T4 supraglotične tumore koji zahvataju jednu glasnicu i jednu

aritenoidnu regiju, sa širenjem u piriformni sinus ili bazu jezika. Za masivne tumore sa invazijom hrskavice, širenjem u subglotis ili zahvatanjem lateralnog zida piriformnog sinusa hirurški modalitet lečenja je totalna laringektomija (Lee et al. 2023).

Suprakrikoidna parcijalna laringektomija podrazumeva resekciju štitne hrskavice, obeju glasnica i ventrikularnih nabora, kao i oba paraglotična prostora uz čuvanje epiglotisa. Opcionalno, resekcija obuhvata jednu aritenoidnu regiju, deo epiglotisa i preepiglotične regije. Prednost suprakrikoidne parcijalne laringektomije u odnosu na totalnu laringektomiju jeste očuvanje funkcije gutanja i govora uz korišćenje vazduha iz pluća. Glas je hrapav i slab, ali odsustvo trajne traheostome značajno poboljšava kvalitet života pacijenta. Rekonstrukcija laringofarinksa vrši se aproksimacijom krikoidne hrskavice i hioidne kosti i aritenoida koji formiraju neoglotis i epiglotisa (krikohioidoepiglotopeksija) illi baze jezika (krikohioidopeksija). Rehabilitacija je slična onoj nakon supraglotične laringektomije, sa postoperativnom privremenom traheotomijom i nazogastričnom sondom. Nakon 6 do 12 nedelja uklanja se nazogastrična sonda, kao i trahealna kanila i sprovodi rehabilitacija gutanja i govora. U lečenju pacijenata nakon suprakrikoidne parcijalne laringektomije ne bi trebalo planirati postoperativnu radioterapiju jer bi ista dovela do otežanog zarastanja rane, loše rehabilitacije glasa i govora i produžene potrebe za traheostomom (Nakayama et al. 2023; Stanisce et al. 2023). Ishodi suprakrikoidne parcijalne laringektomije kod T2 i određenih T3 karcinoma larinksa slični su ishodima nakon totalne laringektomije kombinovane sa hemoradioterapijom, uz kontrolu lokalne bolesti i do 90% (Dufour et al. 2004; Nakayama et al. 2023). Naravno, da bi se optimalni ishod omogućio, pre svega je neophodna dobra selekcija pacijenata (Mesoletta et al 2021).

Totalna laringektomija predstavlja standardnu hiruršku metodu za pacijente sa uznapredovalim stadijumom karcinoma. Ovom hirurškom procedurom uklanja se larinks u potpunosti (Slika 1), kao i infrahioidni mišići, paratrahealni limfatici, i u određenim slučajevima ipsilateralni režanj štitne žlezde. Ovaj obim hirurške resekcije daje najbolje šanse za izlečenje, ali pacijent ostaje sa doživotnom traheostomom i gubitkom prirodnog glasa. Najčešće komplikacije totalne laringektomije su infekcija rane i faringokutana fistula, koje se javljaju i do 50 % kod pacijenata koji su prethodno ozračeni (Obid et al. 2019).



Slika 1. Preparat larinksa sa karcinomom, uklonjen totalnom laringektomijom.

Disekcije vrata sprovode se zbog uklanjanja patološki izmenjenih limfonodusa ili limfonodusa za koje postoji visoka verovatnoća da imaju okultne metastaze. Zahvaćenost limfonodusa vrata tumorom izuzetno je važan prognostički faktor kod pacijenata sa laringealnim malignitetima. Zbog toga je određivanje regionalne proširenosti bolesti ključno za odabir adekvatnog izbora tretmana pacijenta. Limfonodusi na vratu mogu biti uklonjeni hirurškim putem, ili može biti sprovedena zračna terapija. Disekcije vrata mogu biti selektivne, modifikovane radikalne, radikalne i proširene radikalne. Selektivne disekcije vrata podrazumevaju uklanjanje limfonodusa iz pojedinih regiona vrata, pri čemu se ne uklanjaju druge nelimfatične strukture. Kod supraomohoidne (anterolateralne) disekcije vrata uklanjaju se limfonodusi iz I, II i III regiona vrata, kod lateralne disekcije limfonodusi iz II, III i IV regiona, kod posterolateralne disekcije limfonodusi iz II, III, IV i V regiona vrata, a kod anteriorne disekcije limfonodusi iz regiona VI. Modifikovana radikalna disekcija vrata obuhvata uklanjanje limfonodusa regiona I-V, uz čuvanje nekih od struktura koje se uklanjaju u okviru radikalne disekcije vrata. Radikalna disekcija vrata podrazumeva uklanjanje limfonodusa iz regiona I-V kao i nelimfatičnih struktura: sternokleidomastoidnog mišića, unutrašnje jugularne vene i akcesornog spinalnog nerva. Proširena radikalna disekcija vrata podrazumeva uklanjanje svih prethodno opisanih struktura u radikalnoj disekciji vrata uz dodatne regije i nelimfatične strukture (resekcija kože vrata, podvezivanje i uklanjanje karotidne arterije, digastričnog ili stilohoidnog mišića, parotidne žlezde, nerava brahijalnog plexusa) (Luna-Ortiz et al. 2022; Deganello et al. 2023). Elektivno lečenje vrata nije obično potrebno kod glotičnih lezija indeksa T1 i T2 sa klinički negativnim cervikalnim limfnim čvorovima, ali se preporučuje za supraglotične tumore, kao i za glotične ili subglotične tumore sa indeksom T3 ili višim (Ferlito et al. 2000; Djordjevic et al. 2009; Forastiere et al. 2018; Elicin et Giger 2020).

1.1.7.2. Hemioterapija, radioterapija i imunoterapija u lečenju planocelularnog karcinoma larinksa

Radioterapija je jedan od modaliteta lečenja planocelularnog karcinoma larinksa i može biti primarna, postoperativna, elektivna i palijativna. Primarna radioterapija primenjuje se kod uznapredovalog tumora kod kog nije moguće hirurško lečenje ili kod pacijenata koji ne žele, odnosno odbijaju hirurško lečenje. Faktori koji najpreciznije ukazuju na loš ishod radioterapije jesu velika zapremina tumora i nedostatak odgovora na višestruke cikluse radioterapije. Ukoliko postoji duboka invazija malignog tkiva u tiroidnu ili krikoidnu hrskavicu, očekivan je negativni ishod radioterapije, te bi takve pacijente trebalo lečiti hirurškim putem, odnosno totalnom laringektomijom. Postoperativna radioterapija se primenjuje nakon hirurškog lečenja ukoliko je histopatološki nalaz tumorskog resektata i disektata vrata ukazao na pozitivnost neke od resekcionih ivica ili lokalnu proširenost maligne bolesti na regionalne limfonoduse. Elektivna radioterapija predstavlja zračenje limfonodusa na vratu koji klinički ne imponuju izmenjeno, ali postoji visoka mogućnost da u njima postoje metastatski fokusi. Palijativna radioterapija predstavlja tretman koji se sprovodi kod pacijenata koji imaju izrazito proširen, inkurabilan tumor ili recidiv tumora. Cilj palijativne radioterapije nije izlečenje, već smanjenje tegoba izazvanih rastom tumora, poboljšanje kvaliteta života i produženje istog (Qian et al. 2021).

Hemioterapija podrazumeva primenu citostatika, i može da bude neoadjuvantna, konkomitantna i sistemska terapija. Neoadjuvantna terapija podrazumeva primenu citostatika kod uznapredovalih inoperabilnih tumora radi dovođenja u stanje hirurške operabilnosti ili radiokurabilnosti. Najčešće se radi o karcinomima larinksa sa propagacijom u hipofarinks i orofarinks, ekstralaringealnim probojem kroz tiroidnu i krikoidnu hrskavicu, zahvatanjem prevertebralne fascije i parafaringealnog prostora. Neoadjuvantna terapija ordinira se kao kombinacija 2 (cisplatin i docetaksel) ili 3 (cisplatin, docetaksel i 5-fluorouracil) hemioterapeutika (Joshi et al. 2017; Benson et al. 2018). Konkomitantna hemioterapija (konkurentna hemioterapija, hemioradiopotencijacija) podrazumeva hemioterapiju

udruženu sa radioterapijom i primenjuje se kod pacijenata koji odbijaju totalnu laringektomiju, kao i postoperativno kod bolesnika sa visokim rizikom od pojave lokoregionalnih recidiva. Sistemska hemioterapija ordinira se kod pacijenata kod kojih je dokazano prisustvo udaljenih metastaza. Redovno šestomesečno praćenje pacijenata od strane nadležnog lekara neophodno je zbog procene lokalnog statusa, komplikacija hirurškog lečenja ili terapije zračenjem ili citostaticima, kao i radi uvida u eventualni nastavak navika (konzumiranje cigareta i alkohola) koje značajno povećavaju stepen od recidiva bolesti ili pojave novog primarnog tumora. Kontrolni pregledi i radiološki snimci radi provere lokalnog statusa rade se prema dinamici koju određuje onkološki konzilijum ili na predlog ordinirajućeg lekara (Leblanc et al. 2023).

Postoji određen imunološki potencijal koji pruža osnovu za upotrebu bioloških lekova kod pacijenata sa karcinomom glave i vrata, ali dostupni klinički dokazi ukazuju da većina pacijenata trenutno ne pokazuje adekvatnu reakciju na monoterapiju imunolekovima. U lečenju karcinoma glave i vrata ispituju se anti-PD-1 antitela nivolumab i pembrolizumab, anti-PD-L1 antitela durvalumab, atezolizumab i avelumab, kao i anti-CTLA-4 antitela ipilimumab i tremelimumab (Qian et Schoenfeld 2021). Primena samo jednog modaliteta terapije smanjuje broj i težinu lokalnih komplikacija i povoljniji je po očuvanje funkcija larinksa. Naravno, bitno je da primena pojedinačnog modaliteta terapije ne smanjuje šansu za izlečenjem u odnosu na multimodalni vid lečenja (Obid et al. 2019).

1.1.7.3. Izbor modaliteta lečenja pacijenata sa planocelularnim karcinomom larinksa

Ciljevi u lečenju pacijenata sa ranim stadijumom karcinoma larinksa (T1 i T2) jesu izlečenje maligne bolesti uz očuvanje funkcija tumorom nezahvaćenih struktura larinksa. Rani glotični karcinomi larinksa mogu da se resekiraju hirurškim putem u vidu transoralne laserske mikrohirurgije ili otvorene parcijalne laringektomije, dok drugu terapijsku opciju predstavlja primena radioterapije. Zračenje može da bude prva opcija lečenja kod pacijenata kojih je hirurški zahvat rizičan zbog komorbiditeta ili kod pacijenata koji hirurško lečenje ne žele. Meta-analiza o ishodima lečenja T1a karcinoma pokazala je da se bolji funkcionalni rezultati postižu nakon transoralne laserske hirurgije u poređenju sa radioterapijom (Abdurehim et al. 2012). Prilikom donošenja odluke o tipu hirurškog lečenja, mora se voditi računa o tome kolika je verovatnoća postizanja potpune resekcije sa marginama negativnim na malignitet. Endoskopska resekcija može uspešno postići lokalnu kontrolu sa marginama od najmanje 2 mm, dok se za otvorenu parcijalnu laringektomiju savetuju margine od 4 do 5 mm (Lee et al. 2013; Yoo et al. 2014). Zbog oskudne limfne drenaže glotisne regije larinksa, regionalno širenje bolesti se kod T1 i T2 karcinome javlja retko. Stoga, radioterapija kao primarni vid lečenja može biti adekvatna, ali hirurško lečenje predstavlja metod izbora (Forastiere et al. 2018; Elicin et Giger 2020). Za lezije T1 i T2, stopa preživljavanja bez bolesti je veća nakon hirurškog zahvata (100% i 79%, redom) u poređenju sa radioterapijom (71% i 60%, redom), kako je pokazala sistematska revizija radova Cochrane biblioteke iz 2002. godine (Dey et al. 2002). Revizija iz 2014. godine pokazala je da je petogodišnje preživljavanje za T1 tumore 100% kod pacijenata lečenih hirurškim metodama u odnosu na 91,7% kod pacijenata lečenih radioterapijom, dok je kod T2 karcinoma preživljavanje bilo 97,4% nakon hirurškog lečenja, u odnosu na 88,8% kod pacijenata lečenih radioterapijom. Kod T1 tumora, petogodišnji period bez recidiva iznosio je 100% kod hirurški lečenih pacijenata, dok je iznosio 71,1% za pacijente lečene radioterapijom. Za T2 tumore procenti su iznosili 78,7% kod hirurški lečenih pacijenata, i 60,1% kod pacijenata lečenih radioterapijom (Warner et al. 2014).

Adekvatna histopatološka dijagnostika sluznice prednje komisure glotisa predstavlja izuzetno bitan onkološki aspekt, s obzirom na anatomske osobenosti ove regije. Prednja komisura larinksa je specifičan subregion glotisne regije sa morfološkim i kliničkim specifičnostima od posebnog onkološkog značaja. Prednja komisura glotisa predstavlja mesto insercije glasnice u unutrašnjem uglu tiroidne hrskavice. Minimalno rastojanje između sluznice prednje komisure i hrskavice štitne žlezde, odsustvo unutrašnjeg perihondrijuma na mestu pripoja tetive na hrskavicu štitaste žlezde, zamenjenog

Brojlovim ligamentom, mala površina regije i odsustvo efekta na pokretljivost glasnica čine ovu lokalizaciju posebno specifičnom (Prades et al. 2017). Rizik od uzimanja malog ili neadekvatnog uzroka za histopatološku analizu posebno je veliki u ovoj regiji. Zahvaćenost prednje komisure malignim procesom ne odražava se na T stadijum tumora glasnica. Ipak, određivanje prisustva maligniteta u ovoj regiji je od ključnog značaja za odluku o daljem lečenju (Hakeem et al. 2013). U smislu onkološke radikalnosti, prisutne su dileme i kontroverze, s obzirom na ograničenja hirurške resekcije tumora prednje komisure. Takođe, neuspesi radioterapije ove regije objašnjavaju se kašnjenjem u lečenju, slabom vaskularizacijom prednje komisure, konfiguracijom ugla štitne hrskavice u regionu prednje komisure, kao i čestoj ranoj nekrozi hrskavice zbog izloženosti unakrsnom zračenju (Hendriksma et Sjögren 2019). Posebna pažnja prilikom odlučivanja bitna je kod pacijenata koji imaju površinske T1 lezije glotisa koje se šire na ipsilateralnu polovinu prednje komisure, "potkovičaste" lezije koje zahvataju prednju komisuru i delove obeju glasnica, lezije koje su primarno na prednjoj komisuri, kao i lezije koje se šire na petiolus epiglotusa (Jamal et al. 2014). Dopunske metode analize bioptiranog materijala dale bi dodatnu sigurnost ordinirajućem otorinolaringologu, patologu i onkologu prilikom odlučivanja o lečenju kada se radi o karcinomima sa širenjem na prednju komisuru, pogotovo kada su u pitanju T1 karcinomi.

Za razliku od T1 i T2 karcinoma glotisa, okultne regionalne metastaze često se javljaju kod T1 i T2 tumora supraglotičnog regiona larinksa (Djordjevic et al. 2009; Obid et al. 2019; Elicin et Giger 2020). Iz tog razloga, i kod supraglotičnih karcinoma nižih T stadijuma, neophodno je uraditi disekcije vrata (Ferlito et al. 2000). Karcinomi supraglotisa koji su klasifikovani kao T1 i T2 mogu se tretirati hirurškim zahvatom- transoralna laserska mikrohirurgija ili otvorena parcijalna laringektomija sa elektivnom disekcijom vrata ili samo zračnom terapijom tumora sa elektivnim zračenjem regionalnih limfonodusa (Obid et al. 2019). Studija Lescinske i saradnika iz 2015. godine analizirala je histopatološke nalaze operativnih resektata T2a, T2b i T3 karcinoma glotisa koji su dobijeni različitim tehnikama parcijalnih horizontalnih laringektomija. Nepovoljni nalazi histopatološke analize u smislu infiltracije perihondrijuma hrskavice, perineuralnih vlakana i mikrovaskularnog širenja maligniteta identifikovani su kod 22 od 254 patohistoloških uzoraka. Ovakvi nalazi značajno češće su nađeni kod pacijenata sa stadijumom T2b i T3 u odnosu na T2a. Studija je pokazala da T2b karcinomi po ishodu sličniji T3 stadijumu, što podvlači značaj inicijalne TNM klasifikacije (Leszczyńska et al. 2015). U slučaju uznapredovalih T3 i T4 tumora, izuzetno je zahtevno sprovesti adekvatno lečenje bez izvođenja totalne laringektomije. Kod određenog broja pacijenata sa T3 tumorima, moguće su parcijalne laringektomije uz primenu adjuvantnih modaliteta lečenja ukoliko postoji ektranodalna ekstenzija tumora. Pacijenti sa T3 tumorima i povoljnim funkcionalnim statusom mogu biti lečeni kombinacijom hemioterapije i radioterapije, dok hirurški modalitet može da bude opcija lečenja ukoliko dođe do recidiva bolesti. Ipak, određeni broj studija ukazuje na lošije ishode i veći broj komplikacija hirurškog lečenja karcinoma larinksa nakon neuspeha inicijalne kombinovane hemioterapije i radioterapije (Forestiere et al. 2018; Obid et al. 2019). Studija Tanga poredila je rezultate hirurškog i nehirurškog lečenja kod ukupno 6288 pacijenata sa T3 i T4 stadijumom karcinoma larinksa. Rezultati studije su pokazali da se petogodišnje preživljavanje nije razlikovalo kod pacijenata sa T3 karcinomom larinksa bez obzira na to da li su lečeni kombinacijom hemio i radio terapije ili hirurškim putem, ali su pacijenti sa T4 stadijumom karcinoma larinksa imali lošije preživljavanje ukoliko nisu primarno lečeni hirurškim putem, odnosno totalnom laringektomijom (Tang et al. 2018). U studiji Patela hirurško lečenje T4 N0 N3 tumora bilo je povezano sa poboljšanim preživljavanjem (Patel et al. 2019). Kod pacijenata sa T4a tumorima totalna laringektomija dovodi do većeg procenta preživljavanja i povećanog kvaliteta života u poređenju sa pristupima očuvanja larinksa, te je kod ovih pacijenata potpuno uklanjanje larinksa prvi izbor lečenja (Grover et al. 2015). Takođe, stopa preživljavanja je manja kod pacijenata sa T4a karcinomom i zahvaćenim limfonodusima na vratu (N2 ili N3) ukoliko se pacijenti ne podvrgnu hirurškom lečenju, već samo hemioterapiji i radioterapiji (Megwalu et al. 2014). Iako pacijenti veoma često teško prihvataju hirurški tretman u smislu totalne laringektomije, određene

studije sugerišu da postoji značajan broj pacijenata sa disfunkcionalnim larinksom nakon radioterapije, čak i kada hirurško uklanjanje larinksa nije učinjeno, kao i da je kao i da je stopa recidiva u slučajevima nehirurškog lečenja viša (Chone et al. 2015). Još 2006. godine Hofman i saradnici ukazali su na opadajuće stope petogodišnjeg preživljavanja kod karcinoma larinksa tokom 1980-ih i 1990-ih, a Cosetti i saradnici 2008. zaključili da je isti posledica pogoršanog preživljavanja kod pacijenata sa lokalno-regionalno uznapredovalim planocelularnim karcinomom larinksa koji su lečeni nehirurškim pristupom (Hoffman et al. 2006; Cosetti et al. 2008).

Neophodno je naglasiti da je većina recidiva kod ranog karcinoma larinksa nakon radioterapije teže prepoznatljiva u ranim fazama ponovnog javljanja bolesti, kao i da većina recidiva zahteva kasnije potpuno odstranjivanje larinksa. Hirurški tretman u vidu totalne laringektomije učinjene nakon hemioradioterapije ima veći procenat komplikacija kao što su faringokutane fistule. Takođe, često su zahtevaju ponovne opsežne i dugotrajne operacije kao što je rekonstrukcija defekata na vratu lokalnim ili udaljenim režnjevima (Sievert et al. 2021).

1.2. Teksturalna analiza upotrebom metode matrice simultane pojave sivih vrednosti rezolucionih jedinica

Uobičajena analiza histopatoloških preparata u određenom broju slučajeva može dovesti do pogrešne dijagnoze. Iz tog razloga, jedan od najvažnijih zadataka u savremenoj patologiji predstavlja razvijanje objektivnih tehnika koje bi povećale tačnost pri postavljanju dijagnoze i imale visoku reproducibilnost. Obojeni histopatološki preparati mogu se konvertovati u digitalizovane dvodimenzionalne zapise sa kojih se daljom analizom dobijaju brojni kvantitativni podaci. Ovi parametri koriste se u cilju morfološke interpretacije tkiva koje se posmatra. Matrica ko-ponavljanja nijansi sive (engl. "Gray-level Co-occurrence Matrix", GLCM) jedna je od čestih metoda koja se koristi za dopunsku evaluaciju medicinske slike i pokazuje sve veći značaj u oblasti histopatološke dijagnostike, posebno kod analiziranja tumorskog tkiva (Dincic et al. 2020; Pantic et al. 2022).

Teksturalna GLCM analiza, odnosno analiza upotrebom metode matriksa simultane pojave sivih vrednosti, započela je razvoj 1973. godine kada je Robert M. Haralik sa saradnicima razvio i unapredio metod koji kvantifikuje prostorni odnos između nivoa sivih tonova (engl. "grey levels"), odnosno obrazaca distribucije rezolucionih jedinica (piksela) na slici. Ovaj metod procenjuje odnos između parova sivih vrednosti rezolucionih jedinica u kojima su one odvojene definisanim rastojanjem, odnosno koristi statistiku "drugog reda" za kvantifikovanje teksturalnih indikatora (Korda et al. 2021). Ovakva analiza razlikuje se od statističkih metoda "prvog reda", koje imaju značajno jednostavniji pristup i računaju samo odnos između pojedinačnih vrednosti, a ne između grupa, odnosno parova (Haralick et al. 1973).

GLCM predstavlja računarski metod koji se danas može koristiti u cilju analiziranja i kvantifikacije najdiskretnijih promena u strukturi ćelija i tkiva. Ovaj kompleksni softverski algoritam u mogućnosti je da kvantifikuje teksturu dvodimenzionalnog signala kao što je radiološka slika ili digitalni mikrograf. Mikrografi su zapisi koji se dobijaju svetlosnom ili elektronskom mikroskopijom (Yang et al. 2016; Tahir et al. 2016; Lian et al. 2019). Brojni svetlosni i elektronski mikroskopi svojim digitalnim instrumentima (kamerama) mogu da kreiraju mikrografe izuzetno velike rezolucije i dimenzija. GLCM analiza može da se primeni na nivou celog tkiva u cilju kvantifikacije promena u citoarhitekturi, ali i na nivou ćelije, citoplazme, jedra ili drugih organela (Bhattacharjee et al. 2019). Računarski programi za obradu slike mogu da modifikuju digitalni format mikrografa u smislu isticanja pojedinih bioloških struktura ili regiona od interesa, tako da njihovi detalji postanu jasno uočljivi tokom konvencionalne histopatološke evaluacije. U tim optimalnim uslovima, teksturalna analiza rezultovaće izuzetno preciznim i senzitivnim kvantifikacijama promena teksturalne

homogenosti koje nisu uočljive konvencionalnim metodama (Pantic et al. 2022). Postoje indicije da parametri dobijeni GLCM analizom mogu biti relativno uspešni u detekciji različitih fizioloških i patoloških fenomena u ćelijama i tkivima, poput ranih stadijuma programirane ćelijske smrti i celularne senescencije. Teksturalna analiza je potencijalno primenljiva i u evaluaciji strukturne dezorganizacije tkiva tokom procesa fiziološkog starenja. (Pantic et al. 2016). Teksturalni obrasci hromatinske organizacije i distribucije značajno se menjaju čak i tokom minimalnih fizioloških ili patoloških promena u okruženju ćelije, što se može manifestovati kroz drugačije vrednosti pojedinih GLCM parametara (Kanai et al. 2020). Redistribucija hromatina koja se odvija tokom apoptoze potencijalno se može na indirektan način kvantifikovati teksturalnom analizom. Ukoliko se na tkivo deluje proapoptotskim hemijskim agensima, GLCM parametri mogu veoma precizno da identifikuju rane morfološke promene u ćeliji (Losa et Casteli 2005). Maligna transformacija ćelije dovodi do promena u teksturalnoj homogenosti, tako da GLCM hromatinski indikatori predstavljaju potencijalne biomakere nekih maligniteta kao što je papilarni tiroidni karcinom (Dincic et al. 2020). S obzirom na učestalost nuklearnih i tkivnih abnormalnosti u kanceru, postoji veliki potencijal za razvoj novih dijagnostičkih strategija za uočavanje i kvantifikaciju promena na nivou citoarhitekture tumorskog tkiva, strukture ćelija i ćelijskog jedra (Kalinin et al. 2018; Pantic et al. 2022).

Teksturalna GLCM analiza takođe je u mogućnosti da na indirektan način evaluiira početne promene u međućelijskoj interakciji i komunikaciji koje se odražavaju na citoarhitekturu tkiva, a koje nisu uočljive konvencionalnim mikroskopskim metodama. Teksturalni indikatori poput inverznog momenta razlike i angularnog drugog momenta, mogu se koristiti za merenje strukturne homogenosti i uniformnosti kako normalnog, tako i patološki izmenjenog tkiva (Chen et al. 2021). Ovo je od posebnog značaja u onkologiji gde postoji potencijalna primena ove metode u razlikovanju malignih i benignih promena što može biti od velike pomoći profesionalnom patologu i drugim lekarima prilikom donošenja definitivne dijagnoze (Mishra et al. 2017; Xu et al. 2020). U naučnoistraživačkom radu, GLCM analiza teksture tkiva takođe se često koristi kao moguća dopunska analiza radioloških snimaka (kompjuterizovana tomografija, nuklearna magnetna rezonanca) tumora mozga. Postoje indicije da je analiza snimaka ovom metodom pokazala je dobre rezultate u praksi i sa velikom preciznošću predviđala tip tumora. Na primer, analiza histopatoloških preparata tumora mozga ukazala je da teksturalna analiza primenom GLCM algoritama sa preciznošću od 93% klasifikuje različite tumore mozga (astrocitome i gliome), dok sa 100% preciznošću razlikuje maligno neizmenjeno od maligno izmenjenog tkiva (Dutta et Bandyopadhyay 2021; Durgamahanthi et al. 2021). Studija primene GLCM na nalazima nuklearne magnetne rezonance mozga pokazala je da se ova računarska metoda može potencijalno koristiti i za dijagnostikovanje Alchajmerove bolesti, kao i blagih kognitivnih poremećaja (Feng et Ding 2020).

Kao softverski dodatak uobičajenoj analizi zapisa kompjuterizovane tomografije, nuklearne magnetne rezonance, ali i mamografije, GLCM analiza se pokazala relativno korisnom u diferencijaciji benignih od malignih promena dojke (da Silva et al. 2021). Studija Vujasinović i saradnika analizirala je tkivo invazivnog karcinoma dojke kod 78 pacijentkinja bez sistemskog tretmana bolesti, uz medijanu praćenja od 147 meseci. Na tkivu koje je obrađeno od strane patologa i obojeno hematoksilin-eozin bojenjem ili specifično pomoću koktela antitela za pancitokeratin, urađena je teksturalna analiza GLCM metodom. Univarijantna analiza utvrdila je da su kontrast i entropija kao parametri neuređenosti teksture povezani sa niskim rizikom od pojave metastaza. Rezultati studije ukazali su na jaču korelaciju između GLCM parametara i metastatskog širenja bolesti u poređenju sa kliničkim i patološkim parametrima bolesti (Vujasinovic et al. 2015).

U studiji koja je kombinovala tehniku laserskog skeniranja i GLCM analizu analizirane su teksturalne karakteristike 5 ćelijskih linija u parovima, od kojih su prvu linijsku ćeliju u paru činile ćelije sa niskim, a drugu linijsku ćeliju ćelije sa visokim metastatskim potencijalom. Pet parova korišćenih linija bile su: HeLa/HeLa-S3 (ćelijske linije karcinoma grlića materice), CL1-0/CL1-5 (ćelijske linije adenokarcinoma pluća), OVTW59-P0/OVTW59-P4 (ćelijske linije epitelnog karcinoma ovarijuma), 67NR/4T1 (ćelijske linije adenokarcinoma dojke miševa), i CE81T-

FNlow/CE81T-FNhigh (ćelije planocelularnog karcinoma jednjaka). Iz dvodimenzionalnog zapisa slika ćelijskih linija dobijenih laserskim skeniranjem, rađena je ekstrakcija i analiza tipičnih teksturalnih karakteristika (kontrast, korelacija, energija, entropija i homogenost). GLCM analiza je efikasno klasifikovala niskometastatske i visokometastatske ćelije na osnovu statistički značajno različitih karakteristika- niskometastatske ćelije imale su viši stepen uniformnosti, odnosno energije i homogenosti, dok su visokometastatske ćelije imale visok stepen teksturalne neuređenosti (kontrasta i entropije). Metoda za softversku diskriminaciju pokazala se vrlo pouzdanom i brzom dijagnostičkom procedurom za procenu metastatske sposobnosti karcinoma u *in vitro* ili *ex vivo* uslovima (Lian et Huang 2019).

GLCM modeli mašinskog učenja za određivanje duboke invazije miometrijuma na osnovu digitalnih zapisa dobijenih obradom NMR snimaka pokazali su preciznost od 77 do 88% u otkrivanju duboke invazije endometrijuma (Qin et al. 2022). Modeli mašinskog učenja bazirani na GLCM analizi teksturalnih parametara slika dobijenih dermoskopijom bili su precizni u dijagnostikovanju melanoma sa tačnošću od 97,50% do 98% (Alsaade et al. 2021). Teksturalne GLCM karakteristike 18F-FDG PET/CT snimaka pacijenata sa sarkomima ekstremiteta i trupa bile su nezavisni faktor u predviđanju dužine preživljavanja bez bolesti, kao i ukupnog preživljavanja. Zaključeno je da GLCM korelacija može da identifikuje pacijente sa visokim rizikom od recidiva sarkoma, i da na taj način pomaže optimizaciju perioperativnog tretmana pacijenata (Annovazzi et al. 2022). U studiji Santosa i saradnika, karakteristike teksture dobijene su sa periapikalnih, dentalnih panoramskih rendgenskih snimaka, CT i MRI snimaka vilica, a analizirane su pomoću GLCM modela uz primenu metoda podržavanja vektora i slučajnih šumskih klasifikatora. Rezultati su pokazali značajne razlike između zdravog i osteoporotičnog tkiva. Na taj način, ovi modeli su demonstrirali izvanredne sposobnosti u klasifikaciji cističnih promena i tumora odontogenog i neodontogenog porekla. (Santos et al. 2023). U oftalmologiji GLCM analiza pokazala je visoku sposobnost dijagnostikovanja melanoma oka na osnovu slika dobijenih oftalmoskopijom (92,31% do 94,70%), kao i visoku stopu tačnosti od 93% u predviđanju bolesti koronarnih arterija koristeći klasifikator baziran na modelu mašinskog učenja (Olaniyi et al. 2023; Özbilgin et al. 2023).

Kao dodatak GLCM analizi često se koristi još jedan računarski algoritam za kvantifikaciju teksture ćelija, odnosno "vejvlet" analiza, koja se zasniva na identifikaciji i analizi specifičnih talasa unutar nekog signala. Neretko se kreiraju programi koji istovremeno primenjuju vejvlet i GLCM kvantifikaciju digitalnog zapisa od interesa. Poslednjih godina, kao jedan od najčešćih oblika vejvlet analize, u cilju analize teksture ćelija i tkiva, koristi se Harova diskretna vejvlet transformacija. Ovaj alternativni kompjuterski algoritam u pojedinim okolnostima može imati značajnu primenu u patohistološkoj proceni različitih tkivnih uzoraka. Može se koristiti kao jedina tehnika za kvantifikaciju teksture, a postoji mogućnost da se može upotrebiti i u cilju dobijanja matematičkog objašnjenja detektovanih promena u GLCM parametrima. Diskretnom vejvlet transformacijom kvantifikuju se dodatni deskriptori strukture - vejvlet koeficijenti i njihove energije. Strukturalna heterogenost može značajno da utiče na vrednosti vejvlet koeficijenata u određenim eksperimentalnim uslovima (Yang et al. 2016; Xu et al. 2020; Paunovic et al. 2021). Upotreba ove metode sa kombinacijom GLCM analize značajna je i zbog činjenice da su obe tehnike relativno brze, pristupačne i ne zahtevaju značajna finansijska i materijalna sredstva. Na osnovu navedenog može se očekivati velika korisnost GLCM i alternativnih algoritama u diferencijaciji maligno izmenjenog tkiva sluznice larinksa od sluznice koja nije maligno transformisana.

1.3. Primena savremenih računarskih metoda u medicini

Razvoj informacionih tehnologija doveo je do procesa digitalizacije podataka o pacijentima i do mogućnosti analize tih podataka od strane računarskih programa u zdravstvenom sistemu. Početak 21. veka donosi ubrzani napredak u razvijanju računarskih alata i sve veću primenu istih u medicini.

Kreiranje savremenih programskih jezika kao što su Python, JavaScript, Java, Hashicorp Configuration Language, Rust, PHP, TypeScript, PHP, C#, CSS, C++, Ruby, C i Swift omogućilo je razvoj brojnih aplikacija za personalne računare, a samim tim i aplikacija koje se mogu koristiti i u medicinskim istraživanjima i kliničkoj praksi. Najveće prednosti primena računarskih algoritama jesu njihova apsolutna neinvazivnost sa jedne strane, i nepristrasnost i objektivnost sa druge. Stepen saglasnosti nalaza dva ili više kompjuterskih programa značajno je viši u odnosu na stepen saglasnosti zaključaka više nezavisnih stručnjaka iz istih medicinskih oblasti, što daje mogućnost za unapređenje dijagnostike i lečenja planocelularnog karcinoma larinksa (Perkel 2021; Shajii et al. 2021; Hammond et al. 2022).

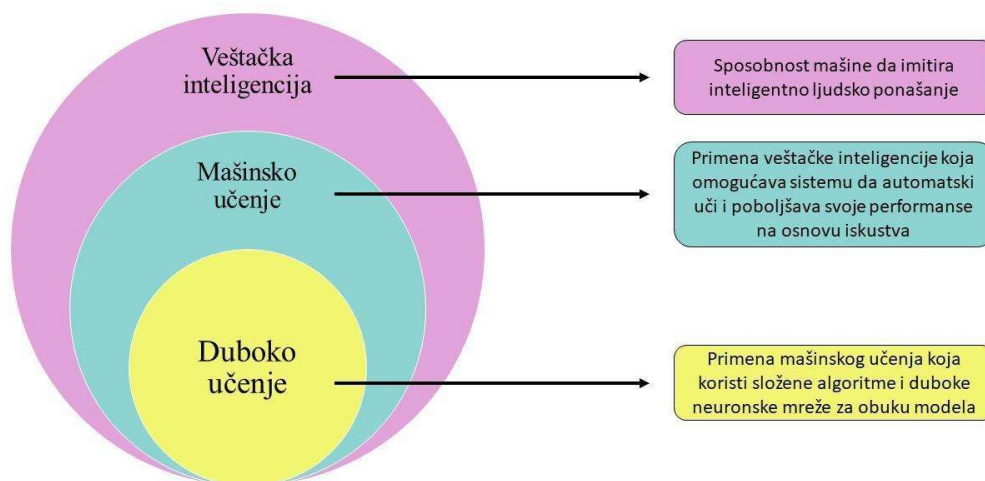
1.3.1. Veštačka inteligencija, mašinsko učenje, duboko učenje i neuronske mreže

Veštačka inteligencija (engl. "Artificial Intelligence", AI) predstavlja vrstu automatskog učenja i zaključivanja. Jedinствена, opšteprihvаćena definicija veštačke inteligencije ne postoji. Ipak, veštačka inteligencija može se definisati kao sposobnost sistema da tačno interpretira spoljne podatke, uči iz tih podataka i koristi ta saznanja da bi postigao određene ciljeve i zadatke putem fleksibilne adaptacije (Haenlein et al. 2019). Ustanovljena kao akademska disciplina 1950-ih godina, veštačka inteligencija je ostala oblast relativne naučne neizvesnosti i ograničenog praktičnog interesa više od pola veka. Sada je zbog pojave velikih količina podataka i unapređenja računarske snage u savremenom životu ušla u sve vrste profesionalnih okruženja (Cohen et al. 2021; Pantic et al. 2022; Rasteau et al. 2022).

Psiholog Donald Heb (Donald Hebb) 1949. godine napravio je model učenja zasnovan na mehanizmu neuralne plastičnosti. Ovaj model poznat je kao Hebovo učenje (engl. "Hebbian Learning"), a ukazuje na to da veze između neurona jačaju svaki put kada se koriste. Ako se dva neurona aktiviraju u istom vremenu, po Hebu, njihova veza jača. Hebovo učenje važi za jedno tipično nenadgledano učenje, a njegove kasnije varijante bili su rani modeli za ideju dugoročnog potenciranja i korišćene su u razvoju računarskih algoritama (Heb 1949). Godine 1950, engleski matematičar Alan Turing (Alan Turing) objavio je svoj ključni članak "Computing Machinery and Intelligence", u kojem je opisao kako stvoriti inteligentne mašine, a posebno kako testirati njihovu inteligenciju. Ovaj Turingov test se i danas smatra merilom za identifikovanje inteligencije veštačkog sistema: ako osoba komunicira s drugom osobom i mašinom i nije u stanju da razlikuje mašinu od čoveka, tada se smatra da je mašina inteligentna (Turing 1950). Termin "veštačka inteligencija" zvanično je stvoren šest godina kasnije, odnosno 1956. godine kada su Marvin Minski (Marvin Minsky) i Džon MekKarti (John McCarthy), naučnici iz oblasti računarstva sa Stanforda) organizovali skup na Dartmouth koledžu u Nju Hempširu (engl. "Dartmouth Summer Research Project on Artificial Intelligence", DSRPAI). Cilj DSRPAI-a bio je da okupi istraživače iz različitih oblasti kako bi se stvorila nova istraživačka oblast usmerena ka izgradnji mašina sposobnih da simuliraju ljudsku inteligenciju. Učesnici su uključivali računarskog naučnika Nathaniela Rochestera, koji je kasnije dizajnirao IBM 701, prvi komercijalni naučni računar, i matematičara Kloda Šenona (Claude Shannon), koji je osnovao teoriju informacija. Godine 2015. program AlphaGo, razvijen od strane Googla, uspeo da pobedi svetskog šampiona u igri Go. Go je značajno složenija igra od šaha (na primer, u početku šaha postoji 20 mogućih poteza, dok u Go postoji 361), a dugo se smatralo da računari neće nikada biti u stanju da pobede ljude u ovoj igri. Danas veštačke neuronske mreže i duboko učenje čine osnovu većine aplikacija koje poznajemo pod oznakom AI. One su osnova algoritama za prepoznavanje slika koje koriste društvene mreže, algoritama za prepoznavanje govora koji pokreću "pametni" zvučnici i sistema upravljanja autonomnih vozila (Haenlein et al. 2019).

Mašinsko učenje predstavlja podvrstu veštačke inteligencije koja omogućava softverskim aplikacijama da automatski uče iz podataka, poboljšavaju svoje performanse na osnovu iskustva i postaju tačnije u predviđanju ishoda bez ljudske intervencije (slika 2). Drugim rečima, mašinsko učenje omogućava softverskim aplikacijama da samostalno uče prateći određeni skup instrukcija,

odnosno da imitiraju način na koji funkcioniše naš mozak. Glavna ideja mašinskog učenja jeste korišćenje podataka da bi se računarski programi "obučili", odnosno, da bi se razvili algoritmi i modeli koji mogu da prepoznaju obrasce i veze u podacima i da primene ta znanja na slične, ali nove probleme. Kvalitet podataka i način na koji su prikupljeni i obrađeni mogu uticati na kvalitet modela i njegove sposobnosti da reši probleme. Podvrste mašinskog učenja su supervizirano učenje, nesupervizirano učenje, duboko učenje, učenje pojačavanjem i prenosno učenje (Madakam et al. 2022).



Slika 2. Veštačka inteligencija, mašinsko i duboko učenje.

U superviziranom (nadgledanom) učenju, program se obučava na osnovu ulaznih i izlaznih podataka, a zatim se primenjuje na nove podatke. U ovom tipu učenja, mašinama se, zajedno s ulaznim podacima, pružaju i izlazni podaci. Direktno povratne informacije pomažu mašinama da uče iz grešaka i poboljšaju preciznost modela. Ovaj mehanizam je sličan tradicionalnom procesu učenja u okruženju nastavnik-student. Na isti način u nadgledanom mašinskom učenju računarski pametni uređaji ili mašine u poslovnom okruženju uče putem vođenih instrukcija algoritama. Nadgledano učenje može biti pojedinačno ili višestruko, odnosno algoritmi mogu biti pojedinačni ili kombinacija algoritama kako bi se mašina naučila iz podataka kako bi se izgradio model. Konačni model ili izlaz nadgledanog učenja može se koristiti za validaciju podataka u stvarnom vremenu. U nadgledanom mašinskom učenju glavni izlazi su modeli. Ovi modeli mogu biti u obliku uputa, jednačina, algoritama, dijagrama i mnogih drugih oblika (Liu et al. 2023).

U nesuperviziranom (nenadgledanom) učenju, program se trenira na osnovu ulaznih podataka bez prethodno određenih izlaznih podataka. Ovaj koncept sličan je odnosno samostalnom učenju kod ljudi kroz iskustvo- putem grešaka. Nenadgledano učenje se koristi za istraživačku analizu podataka kako bi se pronašli grupisani podaci ili skriveni obrasci u podacima. Prednost ovih tehnika je smanjenje ljudskog nadzora na minimum (Madakam et al. 2022).

Duboko učenje predstavlja podskup mašinskog učenja, gde se velike količine podataka obrađuju kroz neuronske mreže, slično načinu na koji funkcioniše ljudski mozak. Duboko učenje se često koristi za prepoznavanje slika, govora i prirodnog jezika, ali se takođe može primeniti na druge probleme. Prenosno učenje predstavlja napredniji model dubokog učenja koji koristi prethodno stečeno znanje da bi se rešili novi, ali slični problemi mnogo brže i efikasnije. Može da obučuje duboke

neuronske mreže sa relativno malo podataka i u poslednje vreme privlači sve veću pažnju. Prenosno učenje ima za cilj da obezbedi okvir za korišćenje prethodno stečenog znanja kako bi se rešili srodni, ali različiti problemi u ciljnom domenu, čak i kada problemi obuke i testiranja imaju različite distribucije ili karakteristike. U pojačanom učenju, program uči putem interakcije sa okolinom uz nagrađivanje nakon pravilnih odluka (Ngiam et Khor 2019; Kim et al. 2020; Hammond et al. 2022).

Neuronske mreže su složeni matematički modeli čiji je razvoj inspirisan načinom na koji ljudski mozak procesira informacije, koristeći mrežu neurona koji međusobno komuniciraju putem sinapsi. Neuronske mreže se sastoje od slojeva neurona koji su povezani međusobno, a svaki neuron obrađuje informacije koje prima i prenosi ih dalje u mreži. Postoje različite vrste slojeva neurona, poput ulaznih, izlaznih i skrivenih slojeva, te svaki sloj ima različitu funkciju u procesu obrade informacija. Da bi neuronska mreža mogla da reši zadati problem, potrebno ju je prvo trenirati na velikom skupu podataka. U toku treniranja, mreža se prilagođava uzorcima podataka i uči se da prepozna obrasce u podacima. Nakon što je mreža utrenirana, može da se koristi za rešavanje novih problema sličnih onima na kojima je obučavana. Važna osobina neuronskih mreža jeste mogućnost da same uoče šta je u obrađivanom signalu relevantno za rešavanje problema. Neuronske mreže su posebno pogodne za rukovanje kompleksnim, visoko dimenzionalnim podacima (Kriegeskorte et Golan 2019; Celaya et al. 2023; Pantic et al. 2023). U oblasti medicine, neuronske mreže najčešće se koriste za analizu medicinskih slika. Na primer, neuronska mreža se može obučiti da prepozna različite vrste patoloških lezija na radiološkim slikama, ili da identifikuje prisustvo abnormalnosti u elektrokardiogramu (Ahsan et al. 2022). Takođe, neuronske mreže imaju veliki potencijal za korišćenje u oblasti farmakologije. Istraživanje lekova predstavlja složen i dugotrajan proces koji uključuje analizu velikog broja jedinjenja u smislu mogućeg terapijskog efekta, ali i neželjenih dejstava. Neuronske mreže se mogu koristiti za predviđanje potencijalne aktivnosti jedinjenja na osnovu njihove hemijske strukture, što može pomoći u smanjenju broja jedinjenja koja treba testirati u laboratoriji (Noor et al. 2023; Pantic et al. 2023).

Neuronske mreže predstavljaju sve neophodniji alat u medicini. Ovi algoritmi omogućavaju medicinskim stručnjacima da analiziraju velike skupove podataka i da dobijaju značajne i odlučujuće informacije koje se koriste za dijagnostiku i terapiju brojnih bolesti uključujući i malignitet. Sa povećanom dostupnošću velikih kliničkih i molekularnih podataka o karcinomu, savremene računarske metode sve se više istražuju u cilju pomoći u višedimenzionalnom procesu donošenja odluka o lečenju raka (Derbal et al. 2022).

1.3.2. Primena mašinskog učenja i neuronskih mreža u dijagnostici i lečenju karcinoma

Kancer je stohastički, nelinearni dinamički sistem čije lečenje zahteva kontinuirano praćenje bolesti i dobijanja povratnih informacija za prilagođavanje terapije odgovoru na tretman (Derbal et al 2022). Mašinski računarski algoritmi počeli su da se primenjuju u laringologiji prvenstveno za analizu fonijatrijskih zapisa i otkrivanje eventualnih patoloških promena u akustičkim karakteristikama glasa (Song et al. 2013). Noviji algoritmi, zasnovani na neuronskim mrežama, pokazuju izuzetnu preciznost u otkrivanju čak i najsuptilnijih promena u govoru, sa tačnošću koja doseže i do 99% (Fang et al. 2018). Savremene metode mašinskog učenja omogućavaju algoritmima da na osnovu analize mukoznog talasa glasnica dijagnostikuju malignitete sa primarnom lokalizacijom na glasicama. Karcinomi infiltracijom subepitelnih struktura prekidaju kontinuitet mukoznog talasa, što se može detektovati primenom računarskih algoritama. Kreirane su neuronske mreže koje su analizom podataka dobijenih sa slika videostroboskopije uspešno identifikovale T1a karcinome glotisa, sa senzitivnošću i specifičnošću od čak 100% (Crowson et al. 2020).

Uobičajena analiza radioloških snimaka pri kojoj lekar specijalista posmatra i tumači iste, već se dopunjuje ili zamenjuje softverskim nizom algoritama koji se temelje na kvantitativnoj kompjuterskoj analizi (Mayerhoefer et al. 2020). Računarski algoritmi iz radioloških snimaka,

ultrazvučnih nalaza, slika dobijenih kompjuterskom tomografijom, nuklearnom magnetnom rezonancom i pozitronskom emisionom tomografijom, izdvajaju specifične podatke, odnosno radiomike. Ovi podaci se zatim analiziraju od strane računara kako bi se procenilo da li se radi o maligno izmenjenom tkivu ili ne. Računarski algoritmi su u stanju da analiziraju slike dobijene tokom procedura kao što su spektroskopija, kontakt endoskopija, konfokalna laserska endomikroskopija i infracrveno termalno snimanje. Teksturalna analiza radioloških PET i CT slika predstavlja precizan vodič za ciljanu zračnu terapiju u regiji glave i vrata (engl. "Image-Guided Radiotherapy", IGRT), što postaje osnova savremene radioterapije (Mahmud et al. 2021; Mirestean et al. 2019). Primena mašinskog učenja omogućava precizno određivanje doze zračenja na osnovu analiza lokalizacije i volumena tumora, tumorskog mikrookruženja i anatomskih varijacija organa zahvaćenih tumorom (Iliadou et al. 2022) Takođe, razvijaju se računarski algoritmi koji na osnovu analize CT i PET slika predviđaju mogućnost radiorezistentnosti tumora, odnosno prognoziraju uspešnost radioterapije (Devakumar et al. 2021; Tanaka et al. 2022). Računarski obrađeni podaci sa radioloških slika kompjuterske tomografije i nuklearne magnetne rezonance koriste se i za analizu morfohistoloških karakteristika velikih i malih pljuvačnih žlezda. Softverski algoritmi ove podatke kombinuju sa podacima o neophodnim dozama zračenja, analiziraju ih, i predviđaju mogućnost i težinu komplikacija u vidu postiradijacione fibroze pljuvačnih žlezda, odnosno kserostomije (Sheikh et al. 2019). Drugi primeri primene mašinskog učenja u onkologiji uključuju procenu kratkoročnog rizika od smrtnosti kod pacijenata koji započinju hemoterapiju, preporuke za lečenje radi sprečavanja metastaza, selektovanje pacijenata koji mogu imati koristi od neoadjuvantne terapije, kao i predviđanje mogućnosti nastanka recidiva karcinoma (Boon et al. 2018; Martins et al. 2019; Wei et al. 2019; Gertych et al. 2019).

Na području patologije postignut je značajan napredak primenom koncepta digitalne patologije, odnosno digitalizacijom patohistoloških preparata i njihovom analizom uz pomoć računarskih algoritama (engl. "Whole Slide Imaging", WSI). Algoritmi koji se koriste u ovom procesu bazirani su na konceptu dubokog učenja i treniranju veštačkih neuralnih mreža. Unosom velikog broja slika u računar, učimo ga koji su parametri od značaja za klasifikaciju i dijagnostiku, odnosno za objektivizaciju i kvantifikaciju promena u tkivu. Što je veći broj slika, veće su i mogućnosti performansi računara. Mašinsko učenje se najčešće sprovodi pod supervizijom stručnjaka iz date oblasti, ali postoji i mogućnost nesuperviziranog učenja (Albahra et al. 2023).

Lečenje onkoloških bolesti predstavlja dugotrajan i kompleksan proces zbog dinamičnog odnosa između stadijuma bolesti, primenjenih terapijskih modaliteta, odgovora na terapiju i eventualnih komplikacija. Alati bazirani na mašinskom učenju i veštačkoj inteligenciji imaju potencijal da unaprede dijagnostičke procedure u medicini i predvide ishod bolesti i odgovor na terapiju (West et al. 2020; Derbal et al. 2022; Bassani et al. 2022).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi senzitivnost računarskih algoritama teksturalne analize u detekciji strukturnih promena karakterističnih za ćelije i tkivo planocelularnog karcinoma larinksa.
2. Predložiti inovativne modele mašinskog učenja, zasnovane na teksturalnim parametrima, koji bi mogli da se koriste za unapređenje savremene dijagnostike planocelularnog karcinoma larinksa.
3. Unaprediti smernice u procesu odlučivanja o tipu i obimu hirurške resekcije, kao i o daljem onkološkom tretmanu kod pacijenata sa planocelularnim karcinomom larinksa.

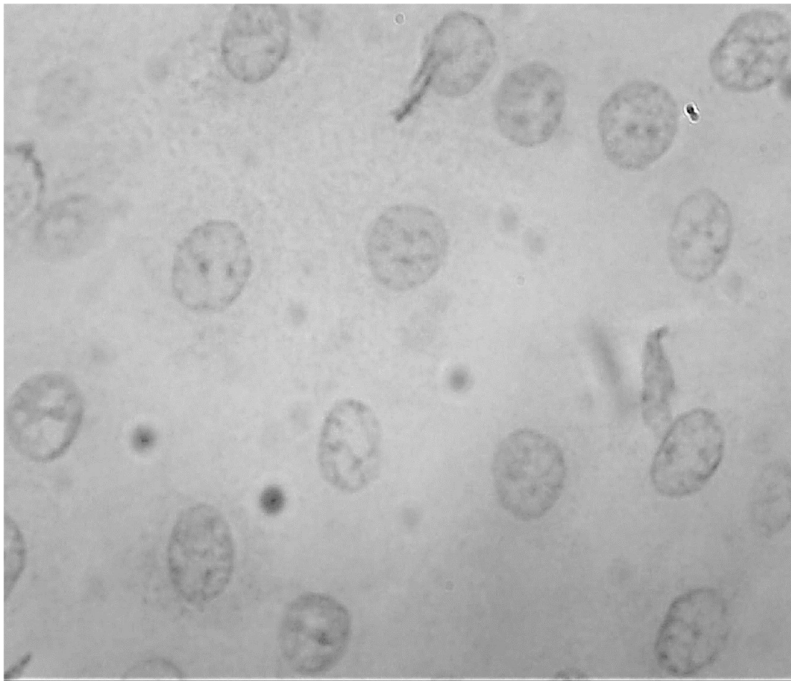
3. MATERIJAL I METODE

Retrospektivna studija rađena je na uzorcima tkiva sluznice larinksa uzetih mikrohirurškim instrumentima za biopsiju u toku laringomikroskopskog pregleda u opštoj endotrahealnoj anesteziji kod ukupno 100 pacijenata. Kod 50 pacijenata histopatološkom analizom dijagnostikovao je planocelularni karcinom larinksa, dok je kod 50 pacijenata dijagnostikovao hronični laringitis. Svi pacijenti bili su hospitalizovani na Odeljenju otorinolaringologije Službe otorinolaringologije sa maksilofacijalnom hirurgijom Kliničko-bolničkog centra Zemun u Beogradu, a histopatološka analiza bioptiranog materijala učinjena je od strane patologa Službe za kliničku patologiju iste ustanove. Patološka stanja kao što su drugi tipovi karcinoma, granulomatozna oboljenja, benigni tumori ili pseudotumori sluznice larinksa nisu uključeni u studiju. U studiju nisu uključeni preparati tkiva uzetih od pacijenata koji su prethodno dobijali radioterapiju ili hemioterapiju. Istraživanje je odobreno dozvolom Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj 17/I-17, 12. januar 2023. godine) i sprovedeno je u skladu sa principima Helsinške deklaracije.

Studijom su obuhvaćeni histopatološki preparati dobijeni biopsijom sluznice larinksa, fiksirani pufersanim desetoprocenatnim rastvorom formaldehida, obojeni hematoksilin – eozin bojom, koji su od strane patologa verifikovani kao planocelularni karcinom, odnosno hronični laringitis. Ekskluzivni kriterijumi su se odnosili na preparate sa malom količinom bioptiranog tkiva (manje od 1x4 mm), kao i preparate kod kojih postoje polja ekstenzivne nekroze, fibroze ili hemoragije (više od 50 procenata).

Za svaki preparat napravljeno je 20 reprezentativnih digitalnih mikrografa tkiva korišćenjem industrijskog Pro-MicroScan DEM 200 senzora (Oplenic Optronics, Hangzhou, CN), odnosno digitalnog instrumenta TCA1000-C, postavljenog na OPTIC900TH trinokularni biološki mikroskop (COLO LabExperts, Novo Mesto, Slovenija). Mikrografi su napravljeni u JPG formatu sa vrednošću bitne dubine od 24, a horizontalna i vertikalna rezolucija iznosile su po 96 dpi. Mikrografi su potom konvertovani u BMP format radi GLCM i DWT analize. Na ovaj način, u okviru ove disertacije, analizirano je ukupno 2000 mikrografa.

U preparatima planocelularnog karcinoma larinksa analizirani su mikrografi ćelija koje su izgledale morfološki intaktno, bez mikroskopskih znakova maligne transformacije kao što su segmentacija jedra, prisustvo multiplih jedara, vidljive inkluzione formacije, gigantska jedra ili atipične mitoze. Posebno su analizirani regioni interesa tkiva, odnosno tkivne citoarhitekture, a posebno regioni interesa jedara epitelnih ćelija. Na ovaj način su kvantifikovani indikatori teksture samog tkiva, kao i pojedinačnih ćelija, odnosno njihovih jedara (Slika 3).



Slika 3. Jedra epitelnih ćelija planocelularnog karcinoma larinksa. Slike su prethodno konvertovane u BMP format (8-bit) radi teksturalne analize GLCM i DWT tehnikom.

Teksturalna i vevjlet analiza mikrografa urađena je u okviru C++ i Delphi© - softverske platforme Mazda (Institut za elektroniku Tehničkog univerziteta Lođ, Poljska) koja je dizajnirana u okviru evropskih projekata COST B21 projekta “Physiological modelling of MR Image formation” i COST B11 projekta “Quantitative Analysis of Magnetic Resonance Image Texture” (Kociołek et al. 2001; Szczypinski et al. 2007; Szczypinski et al. 2009). Sličan pristup je već primenjen u studiji o efektima nanočestica na strukturalnu organizaciju hromatina u hepatocitima (Paunovic et al, 2021). U našoj studiji, dobijeni parametri korišćeni su u cilju evaluacije heterogenosti tkivne arhitekture maligno izmenjenog tkiva, kao i hromatinske organizacije u jedrima ćelija sluznice larinksa.

3.1. Teksturalna analiza upotrebom GLCM algoritma

Teksturalna analiza je izvršena korišćenjem tehnike matrice simultanog pojavljivanja sivih vrednosti rezolucioničkih jedinica (engl. "Gray level co-occurrence matrix, GLCM"). Termin „gray level co-occurrence matrix” uveden je od strane Haralika, Šanmugama i Dinstina u njihovom radu „Textural Features for Image Classification” objavljenom 1973. godine (Haralick et al. 1973). Autori su predložili upotrebu matrice ko-pojavljivanja nijansi sive u smislu alata za analizu tekstre slike. Od tada, GLCM je postala široko korišćena tehnika u digitalnoj obradi slika i prepoznavanju obrazaca. Metoda se u osnovi zasniva na analizi crno-belih (engl. “gray-scale”) slika ili delova slika u kojoj svaka rezoluciona jedinica može imati različite intenzitete sive boje. Na osnovu intenziteta sive boje, svakoj rezolucioničkoj jedinici se dodeljuje takozvana “siva vrednost”. Zatim se primenjuju metode takozvane statistike drugog reda gde se umesto pojedinačnih, analiziraju parovi vrednosti. Dobijeni GLCM indikatori na indirektni način kvantifikuju karakteristike tekstre slike poput uniformnosti, homogenosti ili neuređenosti.

U našoj studiji, na osnovu rezultata GLCM analize, na platformi Mazda, kvantifikovano je 5 parametara teksturalne analize: inverzni momenat razlike (engl. “inverse difference moment” - IDM), angularni drugi momenat (engl. “angular second moment” - ASM), teksturalna korelacija (engl.

“textural correlation” - COR), kontrast GLCM-a (engl. “textural contrast” - COR) i teksturalna varijansa (engl, sum variance- SVAR). Kao što je gore napomenuto, ove vrednosti su određene za regione interesa tkivne stukture, kao i za jedra pojedinačnih epitelnih ćelija.

Inverzni momenat razlike predstavlja parametar koji zavisi od takozvane lokalne homogenosti teksture (engl. „local homogeneity“) (Santos et al. 2015; Paunovic et al, 2021). Biološke strukture koje ispoljavaju veći stepen strukturne homogenosti ponekad ispoljavaju veće vrednosti ovog GLCM indikatora. Inverzni momenat razlike određen je na osnovu sledeće formule:

$$IDM = \sum_i \sum_j \frac{1}{1+(i-j)^2} p(i,j)$$

U formuli p(i,j) predstavlja (i,j)-ti unos normalizovane matrice zajedničkog pojavljivanja.

Angularni drugi momenat predstavlja indirektni parametar teksturalne uniformnosti. „Regularne“ teksture koje imaju uravnoteženu distribuciju strukturnih elemenata, imaju veće vrednosti ovog indikatora (Santos et al. 2015; Paunovic et al. 2021). Angularni drugi momenat izračunat je na osnovu normalizovane matrice simultanog pojavljivanja parova rezolucionih jedinica imajući u vidu (i,j)ti unos u matrici označen kao p(i,j) u formuli:

$$ASM = \sum_i \sum_j \{p(i, j)\}^2$$

gde su i i j koordinate u GLCM matrici. Angularni drugi momenat i inverzni momenat razlike su u osnovi vrlo slični indikatori pošto stepen stukturne homogenosti može da utiče na oba indikatora. Ipak treba imati u vidu da je njihova veza u pojedinim biološkim strukturama veoma kompleksna i ne može se objasniti prostom linearnom zavisnošću.

Teksturalna korelacija je parametar koji zavisi od linearne zavisnosti sivih vrednosti u matrici. Ukoliko je linearna povezanost velika, ovaj parametar imaće vrednost blizu -1 ili 1. Sa druge strane, odsustvo asocijacije kao rezultat imaće vrednost koja je bliža vrednosti 0.

Pri izračunavanju ovog parametra uzimaju se u obzir srednje vrednosti (μ) i standardne devijacije (σ) za odgovarajući red (x) ili kolonu (y) u matrici, prema jednačini:

$$COR = \frac{\sum_i \sum_j (ij)p(i, j) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y}$$

Teksturalni kontrast predstavlja jedan od indikator teksturalne heterogenosti, koji zavisi od stepena varijabilnosti teksture, odnosno od sporadične varijacije u sivim vrednostima rezolucionih jedinica (Santos et al. 2015, Paunovic et al. 2021). Izračunava se prema formuli:

$$\text{CON} = \sum_i \sum_j (i - j)^k P_d[i, j]^n$$

U GLCM postavci, varijansa se odnosi na nivo disperzije distribucije sivih vrednosti oko središnje vrednosti, i uz angularni drugi momenat i inverzni momenat razlike predstavlja jedan od najsenzitivnijih parametara GLCM analize kada je u pitanju promena u heterogenosti tkivne arhitekture i detektovanje strukturnih promena u ćelijskom jedru (Paunovic et al. 2021). Suma varijanse (SVAR) odnosi se na sumu distribucije u digitalnom mikrografu. Računa se na osnovu sledeće formule:

$$\text{SVAR} = \sum \left[i - \sum ip_{x-y}(i) \right]^2$$

3.2. Diskretna vejtlet transformacija

U teoriji obrade signala često se koriste različite transformacije. Transformacije su operacije nad signalom koje transformišu njegov oblik u drugi, često lakši za procesiranje i analizu. U osnovi, transformacije se koriste za manipulaciju signalom kako bi se naglasile njegove ključne karakteristike. Iako se ulazna i izlazna funkcija razlikuju, one nose istu informaciju i predstavljaju različite načine prikaza iste pojave, odnosno istog signala (Kociolek et al. 2001). U našem istraživanju, kao dodatak teksturalnoj GLMC analizi primenjena je i diskretna vejtlet transformacija (engl. „discrete wavelet transform“) (Szczybinski et al. 2007; Szczybinski et al. 2009).

Teorija malih talasa (vejtleta) značajna je sa stanovišta obrade signala. Reč vejtlet (engl. „wavelet“) potiče od kombinacije engleske reči “wave” koja znači talas i francuske reči “ondelette” koja u prevodu znači- mali talas. Francuski matematičar Žan Batist Žosef Furije (Jean-Baptiste Joseph Fourier) dao je polaznu osnovu za postavljanje teorije vejtleta. On je 1807. godine objavio rad u kom je predstavio kontinualne signale preko niza koeficijenata. Osnovna ideja Furijeove transformacije zasniva se na mogućnosti da se svaka periodična funkcija može aproksimirati sumom određenih trigonometrijskih funkcija, odnosno kao skup sinusnih i kosinusnih funkcija (Dym et McKean, 1972). Preteča njegove teorije predstavljena je pokušajima da se matematički opišu oscilacije violinske vibrirajuće žice. Brojni matematičari- francuski Dalember (Jean-Baptiste le Rond d'Alembert), kao i švajcarski matematičari Danijel Bernuli (Daniel Bernoulli) i Leonard Ojler (Leonhard Euler) istraživali su ovaj problem. 1822. godine Furije je objavio knjigu ”The Analytical Theory of Heat” u kojoj je obrazložio da se svaka na „delove glatka” (engl. „piecewise smooth“) funkcija f može predstaviti trigonometrijskom sumom (Fourier, 1822).

Teoriju o talasićima u svojoj doktorskoj disertaciji “On the theory of the orthogonal function systems” postavio je mađarski matematičar Alfred Har (Alfred Haar) početkom dvadesetog veka

(1909. godine). On je predstavio ortogonalne funkcije iz kojih su izvedene funkcije Harove familije vejlveta. Istraživanjima u ovoj oblasti bavio se i francuski geofizičar Žan Morle (Jean Morlet), koji je prvi i iskoristio termin vejlvet da bi opisao funkcije talasića (“vejlveti konstantnog nagiba, engl. wavelets of constant slope). Radeći na istraživanju prisustva nafte ispod Zemljine kore, odnosno na identifikaciji gustine nafte slanjem impulsa ka tlu i analizom njihovih odjeka, Morle je bezuspešno pokušao da iskoristi Furijeovu transformaciju. Haar je došao do ideje da oblik funkcije ne menja, ali da je postepeno širi i skuplja u vremenskom domenu. Uz pomoć i saradnju sa matematičerm Aleksom Grosmanom (Alex Grosman) dobijena je i definicija vejlveta 1981.godine (Grossmann et Morlet, 1984). Har vejlvet se smatra “prvim” (osnovnim) vejlvetom i ujedno predstavlja danas najjednostavniji talasić za analizu. Koncept analize signala sa talasićem može se objasniti kroz proces preslikavanja, odnosno pomeranja i upoređivanjem talasića duž njega. Ukoliko se talasić poklapa sa signalom u velikoj meri, rezultujuća funkcija će imati visoku vrednost, dok će u suprotnom imati nisku vrednost. Ovo poređenjem i pomeranje talasića (pri čemu se on modifikuje ne samo pomeranjem već i menjanjem skale) omogućava da se donese zaključak o frekvencijskom sadržaju signala.

Vejlvet predstavlja oscilaciju u obliku talasa kod koje se vrednost od nulte tačke povećava do maksimuma, nakon čega se vraća na nultu tačku. Mnoge matematičke funkcije mogu biti predstavljene kao kombinacije vejlveta, a taj proces se naziva vejlvet transformacija. Diskretna vejlvet transformacija podrazumeva diskretno uzorkovanje vejlveta. Ova tehnika se, između ostalog, može koristiti za obradu dvodimenzionalnih signala putem propuštanja signala kroz odgovarajuće visokopropusne i niskopropusne filtere (engl. „high-pass“ i „low-pass“). Filtriranje informacija u signalu može pomoći u detekciji lokalnih promena u osvetljenju, saturaciji i drugim detaljima, a rezultati se mogu koristiti za dobijanje dodatnih informacija, kao što su granice pojedinih objekata na slici (Kociołek et al. 2001; Szczyński et al. 2007; Szczyński et al. 2009).

U našoj studiji, izvedene karakteristike regiona interesa su takođe izračunate u prethodno pomenutom Mazda softveru. U ovoj studiji koristili smo konvencionalne Har talase za izračunavanje energija talasnih koeficijenata na različitim skalama i podskalama (podopsezima, engl. „subband“). Tokom ove analize, vektori podataka se transformišu u numerički različite vektore iste dužine, koji se zatim podvrgavaju poduzorkovanju faktorom 2 (Kociołek et al. 2001). Podaci prolaze kroz različite kombinacije visokopropusnih (H) i niskopropusnih (L) filtera. Na osnovu talasnih koeficijenata (d) u različitim podopsezima i lokacijama podopseka (x i y), uzimajući u obzir broj jedinica rezolucije ROI-a, dobija se vrednost energije koeficijenta. Energije se izračunavaju na osnovu sledeće formule:

$$En = \frac{\sum_{x,y \in ROI} (d_{x,y}^{subband})^2}{n}$$

gde n označava ukupa broj rezolucijskih jedinica na analiziranoj slici, dok x i y predstavljaju koordinate za odgovarajući "subband" (Kociołek et al., 2001; Paunovic et al. 2021).

Za svaki mikrogram kvantifikovane su tri energetske grupe vejlvet koeficijenata, nakon primene visoko- i nisko-propusnih filtera (engl, high (H) and low-pass (L) filters: EnLH, EnHL, EnHH). Ove vrednosti se često koriste kao dodatak konvencionalnim teksturalnim parametrima poput angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike, i njihove vrednosti indirektno zavise od stepena heterogenosti signala. U našoj studiji, ovi parametri korišćeni su u cilju evaluacije heterogenosti tkivne arhitekture maligno izmenjenog tkiva, kao i jedara pojedinačnih eptielnih ćelija unutar tkiva.

Statistička analiza GLCM i DWT rezultata obavljena je u SPSS Statistics (SPSS 21.0, Čikago, SAD) softverskom paketu. Pored primene odgovarajućih testova za ocenu značajnosti razlike,

urađena je i ROC (engl. „Receiver operating characteristic“) analiza u cilju određivanja diskriminatorne moći teksturalnih i vejevlet parametara u smislu mogućnosti razlikovanja maligno izmenjenog i neizmenjenog tkiva. Razlike između teksturalnih karakteristika regiona od interesa između dve grupe pacijenata su procenjene korišćenjem konvencionalnih analitičkih testova, u zavisnosti od normalnosti distribucije i parametričke prirode podataka. Nivo značajnosti p manji od 0.05 u dvosmernom testiranju smatran je statistički značajnim, dok je nivo značajnosti p manji od 0.01 smatran visoko statistički značajnim.

3.3. Modeli mašinskog učenja

Na osnovu dobijenih podataka GLCM-a i DWT-a za regione od interesa, u okviru ovog istraživanja razvili smo i testirali tri hipotetička modela mašinskog učenja. Prvi model je bio zasnovan na binomijalnoj logističkoj regresiji. Ovo je relativno jednostavan algoritam koji se koristi za predviđanje dihotomnih ishoda, odnosno ishoda koji mogu biti svrstani u jednu od dve kategorije (u našem slučaju maligno i benigno tkivo). Model se može izraziti kao:

$$\log \left(\frac{p}{1-p} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k$$

gde p predstavlja verovatnoću da će region interesa pripadati tumorskom tkivu, X su nezavisne varijable u modelu a β su koeficijenti koji se podešavaju tokom treniranja modela. Metoda takozvane „maksimalne verodostojnosti“ se primenjuje da bi se koeficijenti podesili tako da se verovatnoća tačnog ishoda poveća na maksimum. Prednosti ovakvog pristupa su interpretabilnost i reproducibilnost, jer poznavanje koeficijenata daje uvid u funkcionisanje modela. Model je takođe veoma fleksibilan imajući u vidu raznolikost ulaznih varijabli koje mogu poslužiti za njegovo treniranje.

U našoj studiji, drugi model je bio baziran na algoritmu slučajnih šuma (engl. „random forests“), još jednoj metodi mašinskog učenja pod supervizijom koji konstruiše različite stabla odlučivanja kako bi povezoao ulazne i ishodne (ciljne) podatke. Slučajne šume tokom ovog postupka ocenjuju stabla odlučivanja u smislu njihovih predikcionih rezultata. Kada se koristi za klasifikaciju, što je bio slučaj u našem istraživanju, odluka o ishodu se donosi na osnovu „glasanja većine“ (engl. „majority voting“). Drugim rečima, odluka o tome da li neki region interesa pripada malignom ili benignom tkivu donosi se na osnovu toga za koji ishod se većina drva odluke opredelila. Za treniranje drva odluke se koristi tehnika uzorkovanja sa zamenom, takozvani „bootstrapping“, tokom koje neki uzorci mogu biti korišćeni više puta, a neki u potpunosti zanemareni.

Treći model mašinskog učenja razvijen u okviru ove studije zasnivao se na algoritmu višeslojnog perceptrona. Višeslojni perceptron pripada kategoriji veštačkih neuronskih mreža i potencijalno je veoma koristan u analizi nelinearnih obrazaca u biomedicinskim signalima. Ovaj model se sastojao od barem četiri sloja neurona od kojih je ulazni sloj imao ukupno 8 neurona i primao podatke dobijene GLCM i vejevlet analizom. Dva skrivena sloja su imala 7 odnosno 5 neurona i ovi slojevi su bili odgovorni za nalaženje odgovarajućih težinskih kombinacija ulaznih signala, i primenu sigmoidne aktivacione funkcije. Izlazni sloj je imao 2 neurona koja su korespondirale statusu tkiva: maligno ili benigno. Proces treniranja se odvijao kroz propagaciju napred, odnosno podaci su prosleđivani od ulaznog ka izlaznom sloju, bez vraćanja unazad.

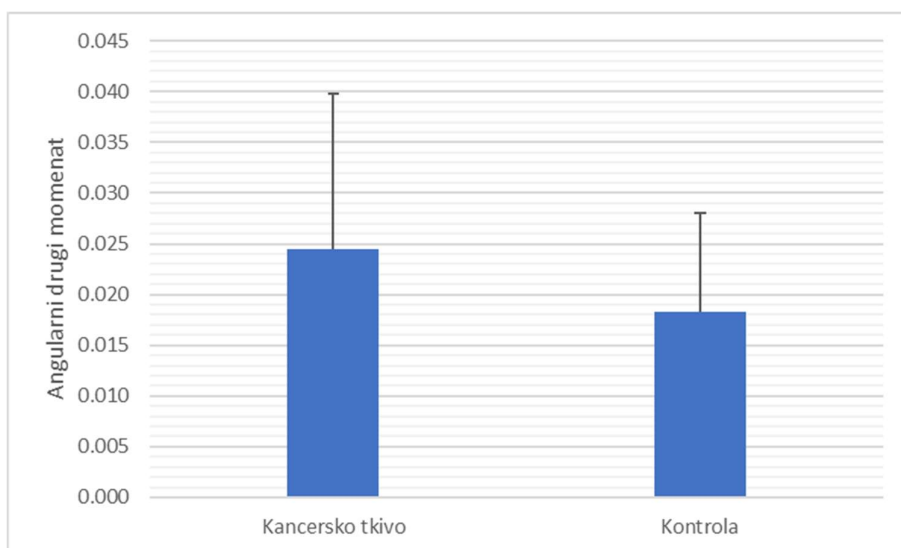
Svi modeli mašinskog učenja razvijeni su u Python SciKit-learn biblioteci za mašinsko učenje, dostupnoj putem Google Colaboratory-a i uslužne platforme pod nazivom Jupyter beležnica (Pedregosa et al, 2011). Inicijalni razvoj modela zasnovanog na višeslojnom perceptronu i logističkoj regresiji obavljen je u programu SPSS Modeler (v. 18. IBM koporacija, Čikago, SAD). Od ukupnih

izvornih podataka GLCM-a i DWT-a, 80% je korišćeno za treniranje modela, dok je ostatak korišćen za testiranje. Izračunali smo tačnost klasifikacije u "metrics" modulu SciKit-learn biblioteke, a ovaj modul je takođe korišćen za analizu karakteristika operativnog prijemnika (ROC). Za oba modela, površina ispod ROC krive je određena kako bi se procenila njihova diskriminativna moć u razdvajanju nuklearnih regiona od interesa epitelnih ćelija sluznica larinksa kao i regiona interesa samog tkiva. Deo Python koda za modele je prethodno razvijen kao deo projekta SensoFracTW naučnog fonda Republike Srbije (grant br. 7739645) u svrhu evaluacije promena u jedrima ćelija *Saccharomyces cerevisiae* nakon izlaganja subletalnim koncentracijama toksičnih hemijskih agenasa.

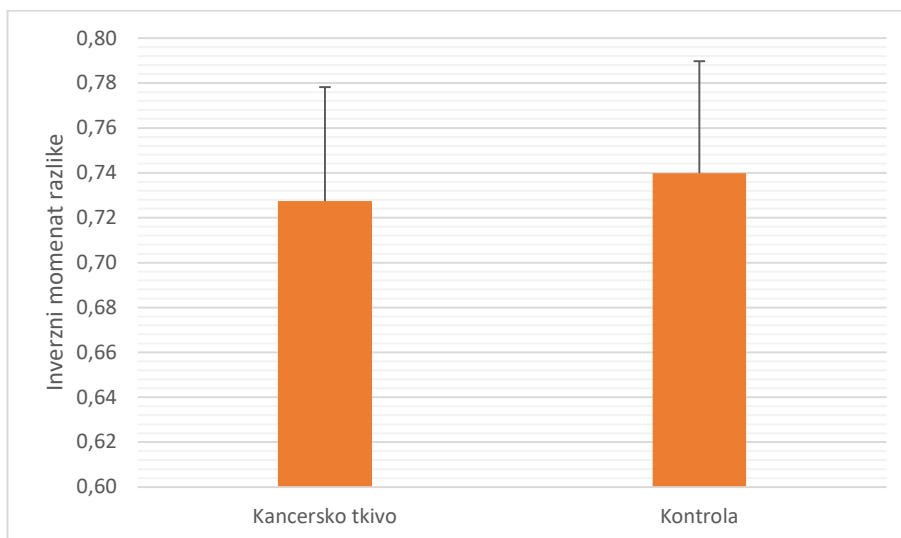
4. REZULTATI

4.1. Rezultati teksturalne analize citoarhitekture tkiva

Teksturalna analiza citoarhitekture tkiva, odnosno regiona interesa digitalnih mikrografa tkiva je pokazala da postoje značajne razlike između dve grupe u pogledu svih parametara, kako onih određenih GLCM metodom, tako i onih kvantifikovanih vejtlet matematičkom metodom. Vrednosti angularnog drugog momenta tkiva planocelularnog karcinoma larinksa iznosila je 0.024 ± 0.015 što je bilo značajno više u odnosu na kontrolnu grupu gde je ova vrednost bila 0.018 ± 0.010 ($p < 0.01$, Slika 4). Drugim rečima, kancersko tkivo je imalo značajno veću vrednost GLCM parametra koji je indirektni pokazatelj teksturalne uniformnosti. Sa druge strane, lokalna teksturalna homogenost, kvantifikovana kroz vrednosti inverznog momenta razlike je bila manja u kancerskom tkivu (0.727 ± 0.051) u odnosu na kontrolu (0.739 ± 0.049 , $p < 0.01$, Slika 5).

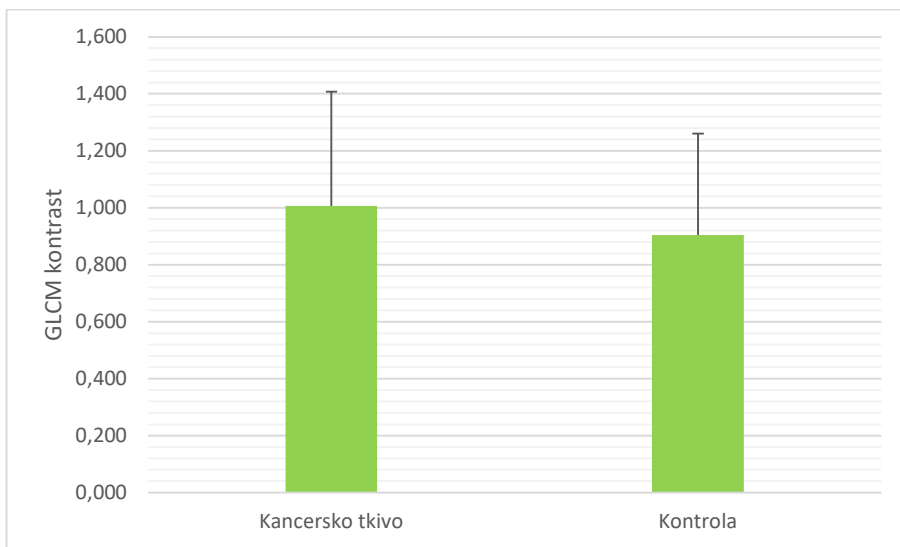


Slika 4. Vrednosti angularnog drugog momenta citoarhitekture tkiva.

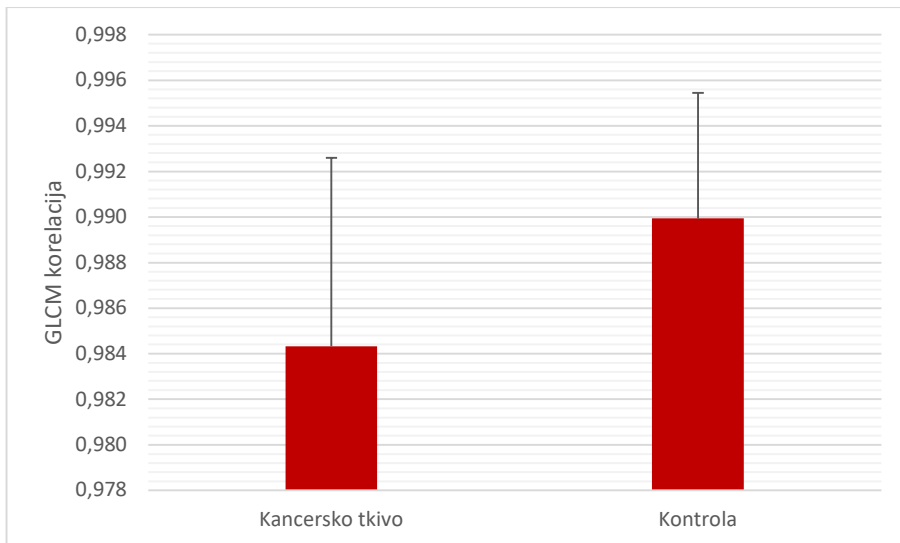


Slika 5. Vrednosti inverznog momenta razlike citoarhitekture tkiva.

Teksturalni kontrast citoarhitekture tkiva planocelularnog karcinoma larinksa je imao srednju vrednost od 1.006 ± 0.401 što je bilo značajno više u odnosu na kontrolnu grupu (0.904 ± 0.357 , Slika 6). I ovde je detektovana statistički visoko značajna razlika između dve grupe. Vrednost teksturalne korelacije u eksperimentalno grupi je iznosila 0.984 ± 0.008 , a u kontrolnoj 0.989 ± 0.006 ($p < 0.01$, Slika 7). Srednja vrednost GLCM sume varijanse je bila značajno manja kod tkiva karcinoma larinksa (180.78 ± 137.19) u odnosu na kontrolnu grupu (237.00 ± 162.57 , $p < 0.01$). Od svih GLCM indikatora, najveću senzitivnost u razlikovanju benignog od malignog tkiva su imali angularni drugi momenat (53.1%) i inverzni momenat razlike (52.8%).



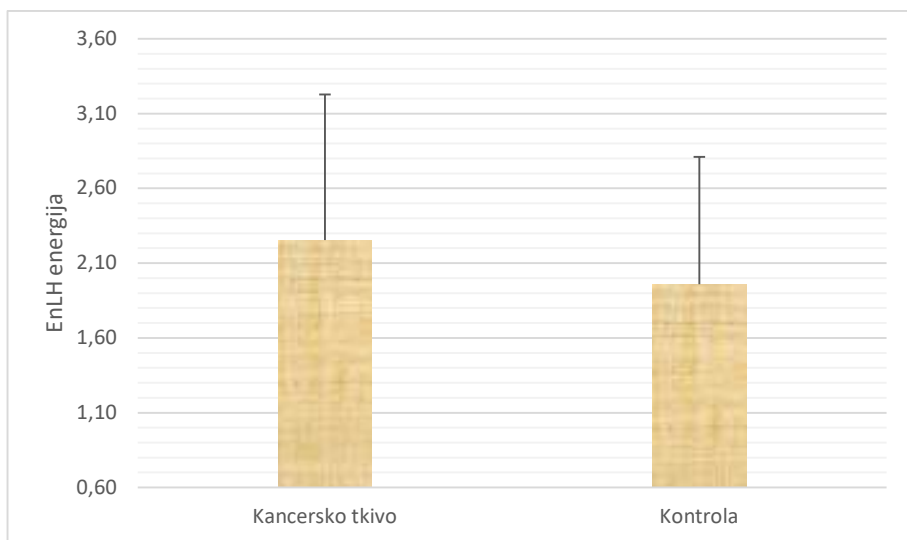
Slika 6. Vrednosti GLCM kontrasta citoarhitekture tkiva.



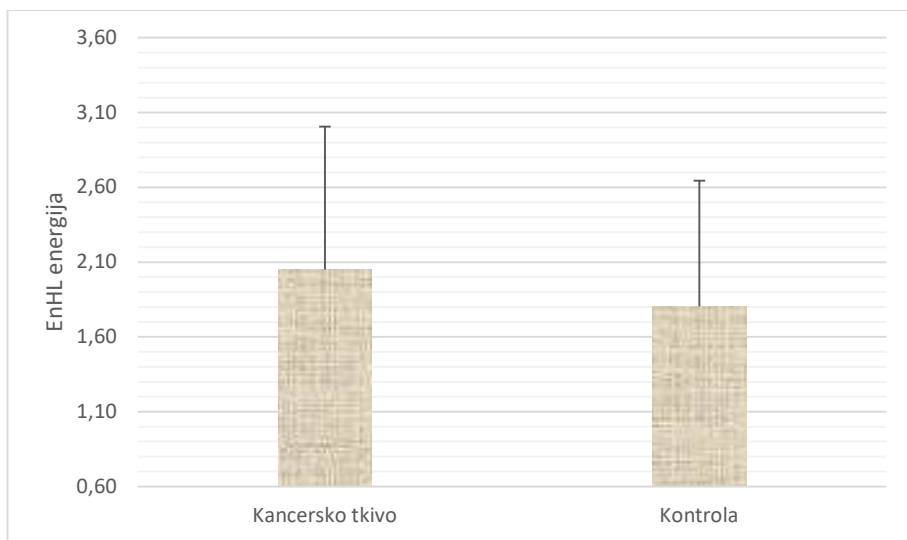
Slika 7. Vrednosti GLCM korelacije citoarhitekture tkiva.

Kada je u pitanju vejevlet matematička analiza, uočeno je da kancersko tkivo, odnosno regioni interesa na digitalnim mikrogramima imaju značajno veće vrednosti svih energija vejevlet koeficijenata

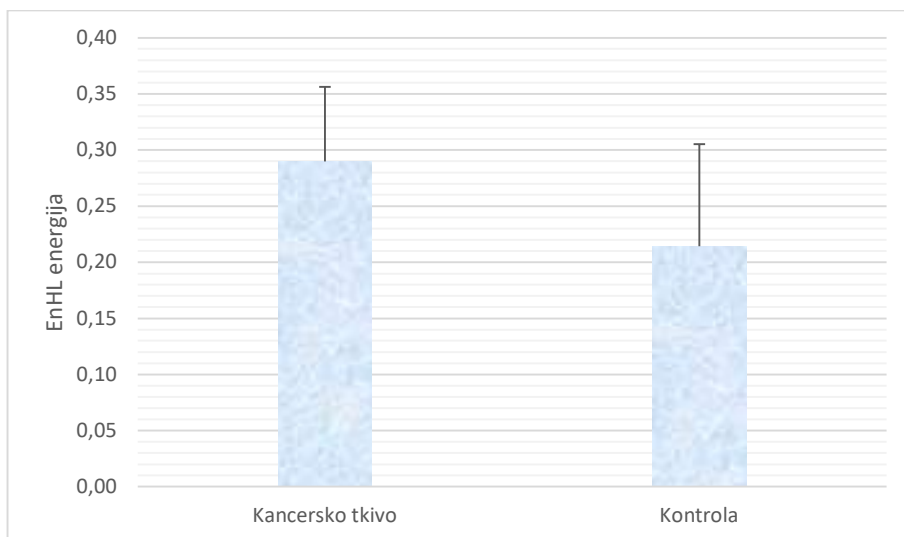
u odnosu na kontrolu. Srednja vrednost EnLH energije je iznosila 2.254 ± 0.972 kod kancerskog tkiva, a 1.958 ± 0.852 kod kontrole (Slika 8). Kada je u pitanju vrednost EnHL energije, u kancerskom tkivu ona je iznosila 2.050 ± 0.955 a u kontrolnom tkivu 1.803 ± 0.842 (Slika 9). Konačno EnHH energija u kancerskom tkivu je iznosila 0.290 ± 0.067 što je takođe bilo značajno više u poređenju sa kontrolom (0.214 ± 0.091 , Slika 10). Za sve parametre utvrđena je statistički visoko značajna razlika između dve grupe ($p < 0.01$). Od svih vejevlet indikatora, najveću senzitivnost u razlikovanju benignog od malignog tkiva je imala EnHH energija i ona je iznosila 62.8%.



Slika 8. Vrednosti vejevlet EnLH energije citoarhitekture tkiva.



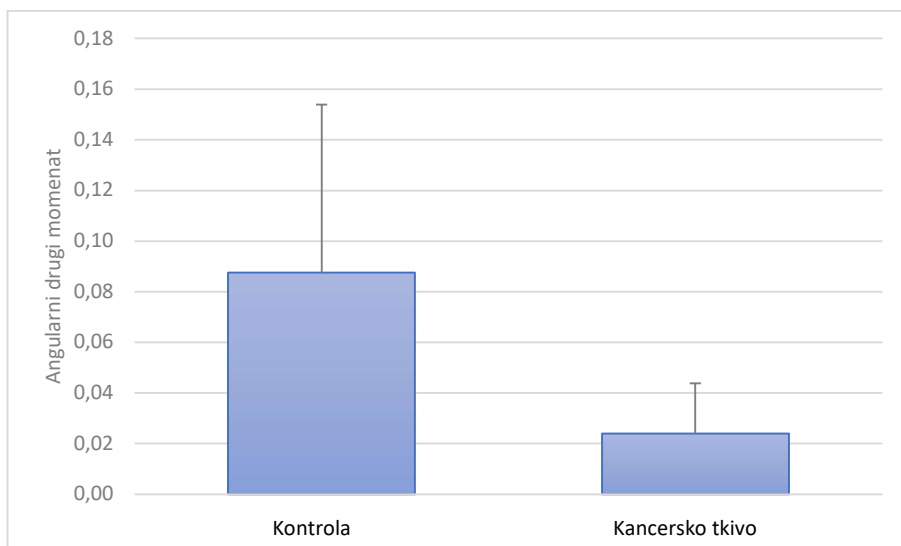
Slika 9. Vrednosti vejevlet EnHL energije citoarhitekture tkiva.



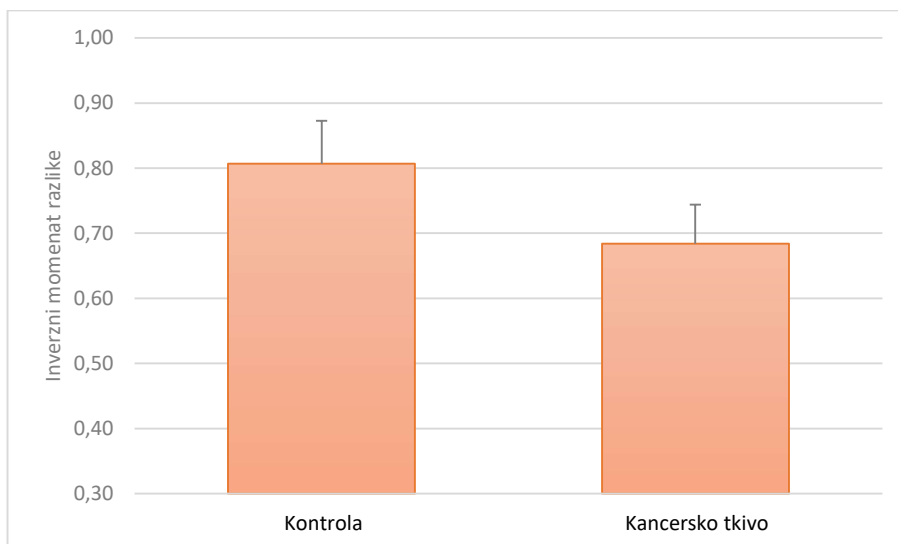
Slika 10. Vrednosti vejevlet EnHH energije citoarhitekture tkiva.

4.2. Rezultati teksturalne analize jedara epitelnih ćelija

U tkivu larinksa verifikovanog kao hronični laringitis, srednja vrednost angularnog drugog momenta iznosila je 0.088 ± 0.066 , dok je u ćelijama planocelularnog karcinoma larinksa iznosila 0.024 ± 0.020 ($p < 0.01$, Slika 11). Slični rezultati dobijeni su i za inverzni momenat razlike. Prosečna vrednost inverznog momenta razlike jedarnih regiona interesa ćelija pločastoslojevitog epitela u kontrolnoj grupi iznosila je 0.807 ± 0.066 dok je u maligno izmenjenom tkivu zapaženo statistički značajno smanjenje ovog pokazatelja na vrednost od 0.684 ± 0.060 ($p < 0.01$, Slika 12). Ovo ukazuje na to da je nuklearna strukturalna organizacija epitelnih ćelija planocelularnog karcinoma larinksa karakterisana smanjenim nivoima uniformnosti i lokalne teksturalne homogenosti u poređenju sa morfološki sličnim ćelijama sluznice u hroničnom laringitisu.

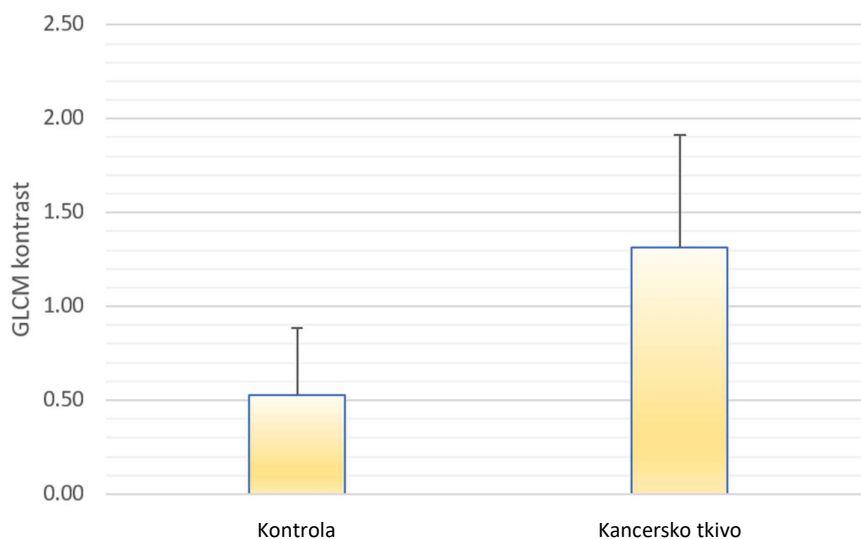


Slika 11. Vrednosti angularnog drugog momenta jedarne strukture epitelnih ćelija.

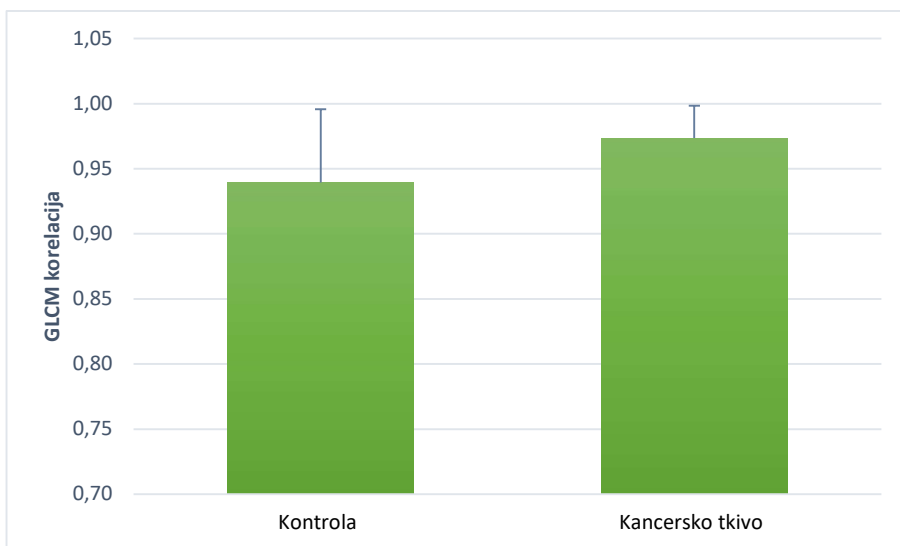


Slika 12. Vrednosti inverznog momenta razlike jedarne strukture epitelnih ćelija.

Srednje vrednosti teksturalnog kontrasta i korelacije GLCM-a kod ćelija iz uzoraka tkiva hroničnog laringitisa iznosile su 0.529 ± 0.355 , odnosno 0.940 ± 0.056 . Kod ćelija iz uzoraka tkiva karcinoma, oba parametra bila su značajno povećana ($p < 0.01$), kontrast na vrednost od 1.311 ± 0.599 (Slika 13), a korelacija na vrednost od 0.973 ± 0.025 (Slika 14). Drugim rečima, i stepen varijacije intenziteta sive boje u regionima od interesa, i linearna zavisnost sivih nivoa susednih jedinica rezolucije, bile su povećane u nuklearnim regionima interesa ćelija planocelularnog karcinoma larinksa. Srednja vrednost sume varijanse GLCM-a nuklearnih regiona interesa takođe je bila značajno povećana u grupi planocelularnog karcinoma larinksa, gde je iznosila 171.92 ± 144.71 , što je značajno veća vrednost u odnosu na 43.46 ± 71.63 ($p < 0.01$) uočena u grupi sa hroničnim laringitisom. Analiza diskretne vejljet transformacije pokazala je da su sve energetske vrednosti koeficijenata bile značajno veće u ispitivanim uzorcima maligno izmenjenog tkiva u poređenju sa uzorcima tkiva hroničnog laringitisa.

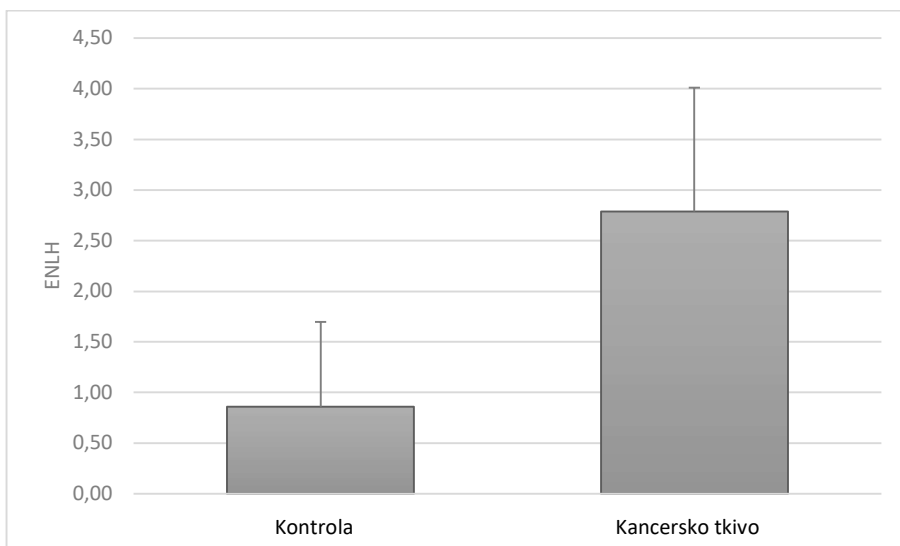


Slika 13. Vrednosti GLCM kontrasta jedarne strukture epitelnih ćelija.



Slika 14. Vrednosti GLCM korelacije jedarne strukture epitelnih ćelija.

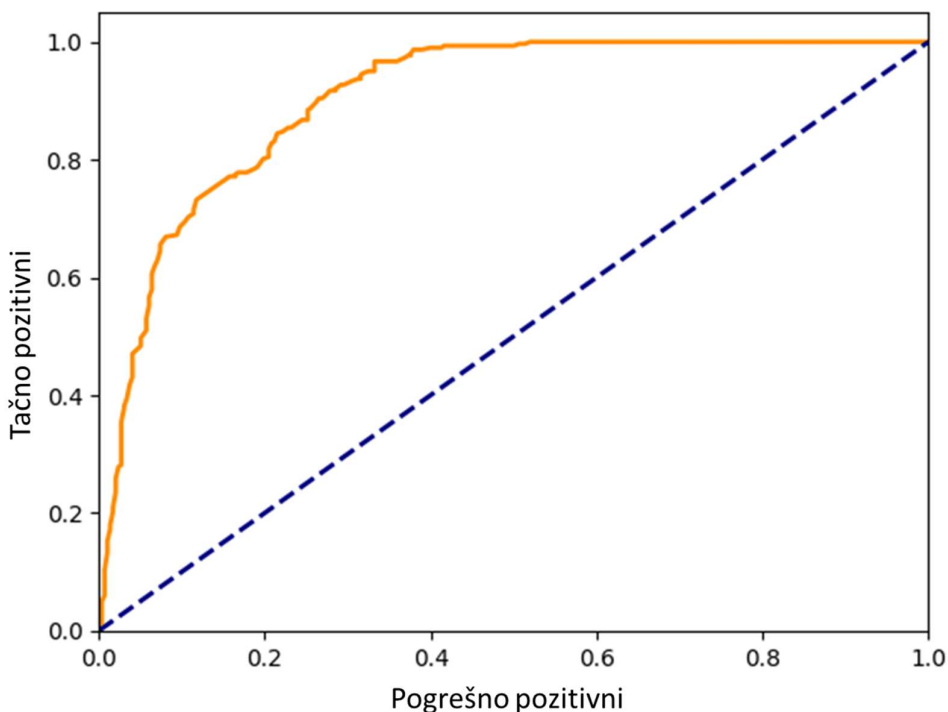
Srednja vrednost EnHH energije iznosila je 0.133 ± 0.087 u uzorcima hroničnog laringitisa i 0.342 ± 0.099 u uzorcima planocelularnog karcinoma. Prosečne vrednosti EnLH i EnHL kod hroničnog laringitisa bile su 0.859 ± 0.839 , odnosno 0.897 ± 0.840 , dok su kod karcinoma pločastih ćelija larinksa iznosile 2.789 ± 1.222 , odnosno 2.761 ± 1.423 ($p < 0.01$, Slika 15). Ako pretpostavimo da su koeficijenti energija indirektni pokazatelji teksturalne heterogenosti, možemo pretpostaviti da je nuklearna tekstura ćelija planocelularnog karcinoma, barem u matematičkom smislu, bila heterogena u većem stepenu.



Slika 15. Vrednosti vejevlet EnLH energije jedarne strukture epitelnih ćelija.

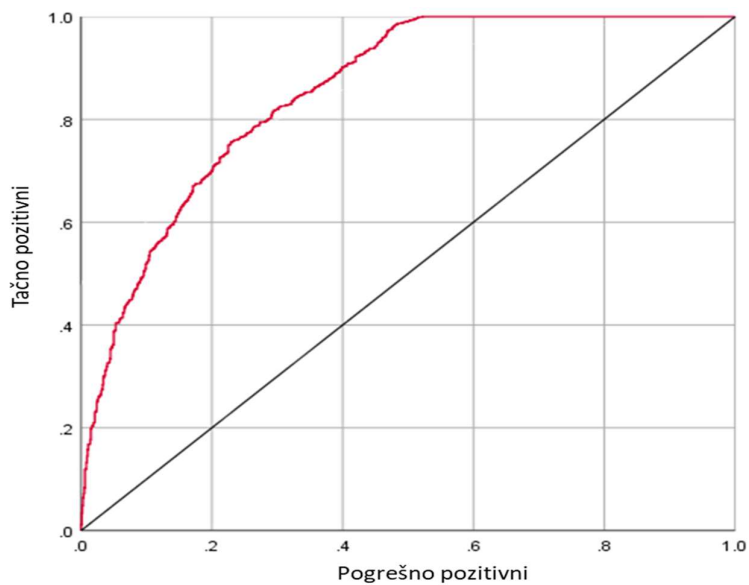
4.3. Modeli mašinskog učenja

U okviru ovog istraživanja uspešno smo razvili hipotetičke modele mašinskog učenja koristeći algoritme slučajnih šuma (engl. “random forests”, RF), binomialne logističke regresije, kao i višeslojnog perceptrona koristeći GLCM i DWT kvantifikatore kao ulazne podatke. Kada su u pitanju modeli razvijeni u cilju klasifikacije regiona tkivne strukture, sva tri modela su pokazala zadovoljavajuće performanse. Model zasnovan na algoritmu slučajnih šuma imao je najveću klasifikacionu preciznost od 81% i površinu ispod krive radnih karakteristika prijemnika od 0.9 (Slika 16).

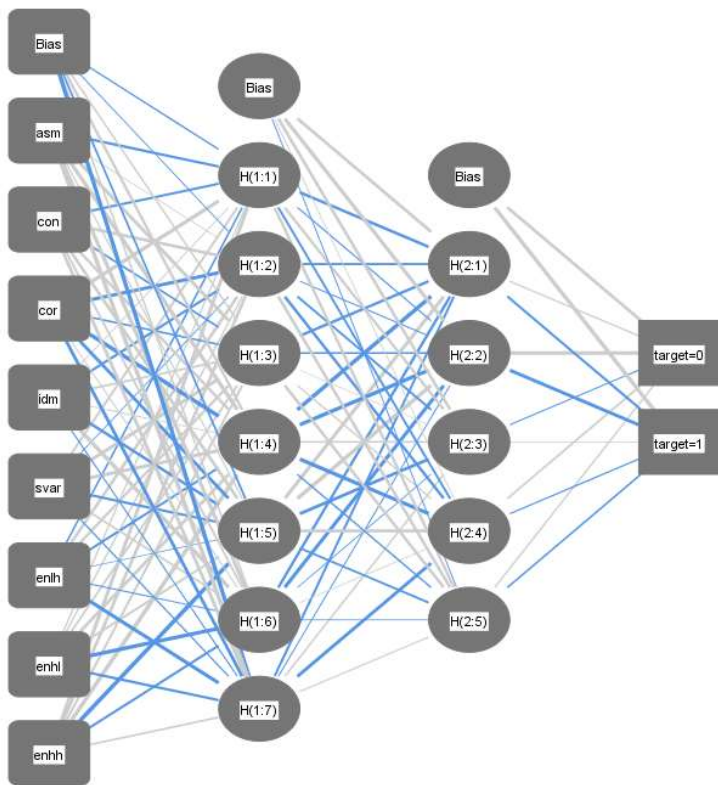


Slika 16. Kriva radnih karakteristika prijemnika za model mašinskog učenja zasnovanog na algoritmu slučajnih šuma.

Model zasnovan na algoritmu višeslojnog perceptrona je imao znatno manju klasifikacionu preciznost od 76.1% i površinu ispod krive radnih karakteristika prijemnika od 0.85 (Slika 17). Primer arhitekture modela mašinskog učenja zasnovanog na algoritmu višeslojnog perceptrona prikazan je šematski (Slika 18).



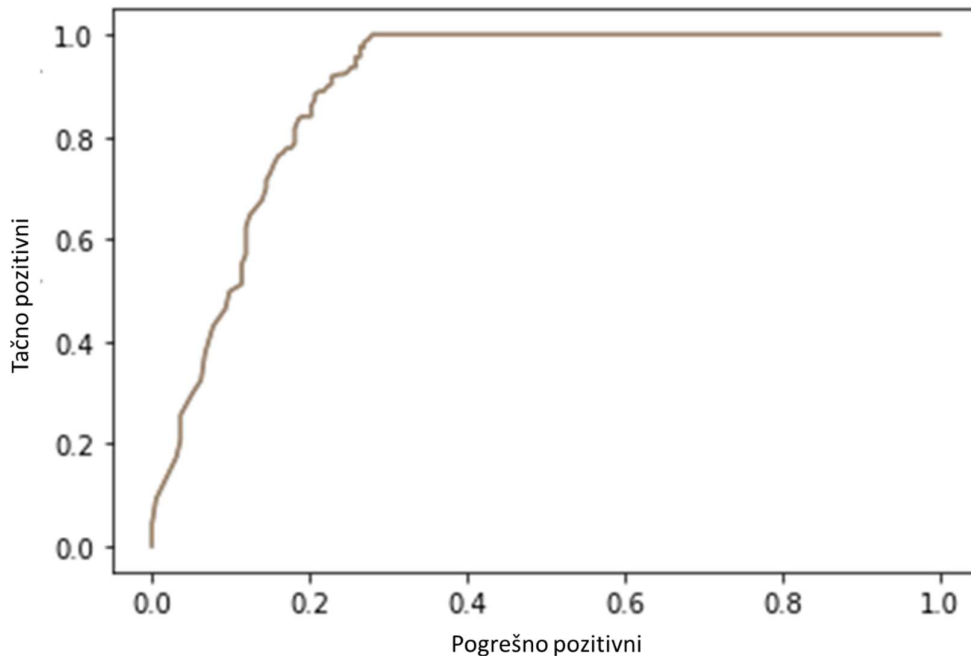
Slika 17. Kriva radnih karakteristika prijemnika za model mašinskog učenja zasnovanog na algoritmu višeslojnog perceptrona.



Slika 18. Primer arhitekture modela mašinskog učenja zasnovanog na algoritmu višeslojnog perceptrona.

Najmanju klasifikacionu preciznost imao je model zasnovan na binomialnoj logističkoj regresiji i ona je iznosila 75.1%. Površina ispod krive radnih karakteristika prijemnika iznosila je 0.84.

Kad su u pitanju modeli razvijeni u cilju klasifikacije regiona interesa jedara epitelnih ćelija, svi modeli su pokazali relativno dobre performanse, pri čemu su se slučajne šume odlikovale najvećom klasifikacionom preciznošću. Slučajne šume su imale tačnost klasifikacije od 84.5%, a površina ispod krive radnih karakteristika prijemnika takođe je bila 0.89 (Slika 19). Model zasnovan na binomialnoj logističkoj regresiji imao je klasifikacionu preciznost od 84.0% i površinu ispod krive radnih karakteristika prijemnika od 0.88. Model zasnovan na veštačkim neuralnim mrežama višeslojnog perceptrona imao je najnižu klasifikacionu preciznost od 79.7% i površinu ispod krive radnih karakteristika prijemnika od 0.84.



Slika 19. Kriva radnih karakteristika prijemnika za model mašinskog učenja zasnovanog na algoritmu slučajnih šuma.

5. DISKUSIJA

Proces postavljanja dijagnoze karcinoma larinksa veoma je kompleksan, jer se moraju proceniti tegobe pacijenta, medicinska anamneza, kao i podaci dobijeni tokom radioloških, endoskopskih i histoloških dijagnostičkih procedura. U kliničkoj praksi, kod više od 40% pacijenata sa planocelularnim karcinomom larinksa dijagnoza se postavlja u odmaklom stadijumu bolesti, sa petogodišnjim preživljavanjem koje je manje od 50% uprkos svim primenjenim modalitetima lečenja. Zbog toga je precizna i pravovremena dijagnostika od najvećeg značaja za ishod ove onkološke bolesti. Specifičan biomarker koji bi predvideo stepen agresivnosti karcinoma kao i evoluciju bolesti ne postoji, tako da je uvođenje novih dijagnostičkih metoda neophodno (Cossu et al. 2019; Sharaf et al. 2021).

Nastajanje planocelularnog karcinoma larinksa predstavlja kaskadni proces tokom kojeg zdrava sluznica prolazi kroz proces hronične inflamacije, hiperplazije, displazije i konačne transformacije u maligno izmenjeno tkivo. S obzirom na činjenicu da uzorci tkiva hronično izmenjene sluznice larinksa i laringealnog planocelularnog karcinoma u određenom broju slučajeva imaju iste morfološke karakteristike, imunohistohemijsko bojenje i molekularne osobine, diferencijalna dijagnoza između ove dve bolesti nije uvek jednostavna, čak ni za obučenog patologa. Znaci inflamacije i otoka tipični za hronični laringitis mogu biti prisutni kako u malignom tkivu, tako i u okolnim nemaligim regijama. Limfocitni infiltrati, kao i pojava plazma ćelija i histiocita, mogu biti primećeni tokom mikroskopske evaluacije u oba oboljenja. Takođe, hronični nespecifični laringitis često je povezan sa epitelnom hiperplazijom koja može imati vrlo raznolik izgled tokom histopatološke procene. Nadalje, planocelularni karcinom larinksa može nastati sa mesta hronične inflamacije, iritacije ili oštećenja tkiva hemijskim agensima koje takođe prati inflamacija. Ćelije planocelularnog karcinoma larinksa i displastično izmenjene sluznice larinksa imaju još brojnije morfološko-mikroskopske sličnosti (Zidar et Gale 2019; Cavaliere et al. 2021).

Prekanceroza lezija sluznice larinksa, odnosno displazija larinksa, unazad decenijama predstavlja problem u kliničkoj praksi otorinolaringologa, patologa i onkologa. Kliničke lezije koje su prepoznate kao prekancerozne u literaturi nazivale su se različitim imenima: leukoplakija, eritroplakija, eritrokeratoza, diskeratoza, keratoza, ali su, generalno, sve uzrokovane promenama koje izaziva dugotrajni inflamatorni proces sluznice larinksa. Svetska zdravstvena organizacija je 1978. godine klasifikovala prekancerozne lezije kao progresivne morfološke promene epitela usled iritantnog hroničnog lokalnog faktora ili povezane sa lokalnom manifestacijom opšte bolesti, koje pokazuju veću verovatnoću transformacije u karcinom u odnosu na okolnu sluznicu (Kramer 1978). Prekanceroza je po savremenoj definiciji specifično stanje epitela koji još nije pokazao histološke, biološke i kliničke karakteristike karcinoma, ali će ih razviti u većem procentu slučajeva nego normalni epitel (Gale et al. 2020). U histološkom smislu, prekancerozno stanje odgovara atipičnoj hiperplaziji. Ipak, neslaganja koja se odražavaju na nekonzistentnu terminologiju mogu da zbune kliničare, utiču na tretman pacijenata i prouzrokuju otežanu uporedivost rezultata različitih studija praćenja (Wenig 2017). Karcinom in situ teško je razlikovati od atipične hiperplazije. Određeni kliničari, ali i patolozi smatraju da se razlikovanje isključivo temelji na subjektivnim interpretacijama nalaza. Kod atipične hiperplazije, dva ili tri sloja ćelija na površini epitela su diferencirana. Normalna struktura epitela je kod in situ karcinoma u potpunosti uništena, gubi se ćelijska diferencijacija i javljaju se brojne patološke mitoze koje su prisutne u svim slojevima epitela. U konvencionalnoj tehnici histopatološke dijagnostike, ova dva stanja nije uvek lako razlikovati (Gale et al. 2020).

Prve dve morfološke klasifikacije patoloških promena sluznice larinksa predložili su Klajnsasser (Kleinsasser 1963) i Kambič i Lenart (Kambič et Lenart 1971). Klajnsaserov sistem gradiranja promena na sluznici larinksa bazirao se na ćelijskoj atipiji i podrazumevao je 3 stepena izmenjenosti epitela- jednostavna skvamozna hiperplazija epitela, epitelna hiperplazija sa ćelijskom atipijom i karcinom in situ. Kambič i Lenart predlagali su četvorostepenu klasifikaciju koja je podrazumevala:

jednostavnu, abnormalnu i atipičnu hiperplaziju i karcinom in situ. Nijedna od predloženih klasifikacija nije prihvaćena na svetskom nivou. Kasnije klasifikacije ugledale su se na terminologiju koja se koristila za skvamozne epitelne lezije cerviksa uterusa. Potencijalni maligni karakter displastičnih lezija sluznice grlića materice prepoznat je već 1953. godine, dok je koncept laringealne displazije usvojen tek 1974. godine (Friedman et al. 1974) na konferenciji u Torontu. Isti koncept prihvaćen je u prvom i dugom izdanju klasifikacije histoloških tipova tumora gornjeg respiratornog sistema Svetske zdravstvene organizacije 1978. godine. Klasifikacija Svetske zdravstvene organizacije razlikovala je blagu, umerenu i izraženu displaziju, dok je karcinom in situ bio poseban entitet (Shanmugaratnam et Sobin 1978). Friedmann i Osborn uveli su 1976. godine termin skvamozna intraepitelna neoplazija- SIN, (Friedmann et Osborn 1976), a Crissman i Fu koriste termin intraepitelna neoplazija larinksa (Crissman et Fu 1986). Friedmann i Ferlito predložili su LIN klasifikaciju (laringealna intraepitelna neoplazija) u kojoj je LIN I ekvivalent blagoj displaziji, LIN II umerenoj displaziji dok LIN III obuhvata tešku displaziju i karcinom in situ (Friedmann et Ferlito 1993). Skvamozna intraepitelna lezija (SIL) termin je koji obuhvata spektar intraepitelnih promena, od skvamozne hiperplazije do carcinoma in situ. U svojoj evoluciji, neki slučajevi SIL-a su samoograničavajući i reverzibilni, neki perzistirajući, a neki progrediraju u planocelularni karcinom larinksa uprkos redovnim kontrolama i odusustvu izlaganja faktorima rizika (Gale et al. 2014).

Zbog višestrukih sistema i nekonzistente terminologije, u trećem izdanju klasifikacije Svetske zdravstvene organizacije (engl. "World Health Organization", WHO) iz 2005. godine objavljena su tri najčešće korišćena sistema- 1) petostepeni sistem koji promene sluznice deli na skvamoznu hiperplaziju epitela, blagu, umerenu i tešku displaziju, kao i karcinom in situ; 2) trostepeni sistem skvamozne intraepitelne neoplazije (SIN); kao i 3) četvorostepena Ljubljanska klasifikacija koja uključuje skvamoznu hiperplaziju, bazalnu/parabazalnu hiperplaziju, atipičnu hiperplaziju i karcinom in situ (Gale et al. 2005). WHO klasifikacija iz 2017, bazirana na korigovanoj Ljubljanskoj klasifikaciji, podrazumeva dvostepeni sistem - low grade displaziju (koja uključuje skvamoznu hiperplaziju i laku displaziju) i high grade displaziju koja uključuje umerenu i tešku displaziju i karcinom in situ. Svetska zdravstvena organizacija 2017. godine uvela je novu podelu po kojoj se displazije dele na displazije niskog stepena (engl. "low grade") i displazije visokog stepena (engl. "high grade"). Displazija niskog stepena obuhvata prva dva stepena Ljubljanske klasifikacije, odnosno promene koje zahvataju donju trećinu epitela. Displazija visokog stepena odnosi se na promene koje zahvataju više od donje trećine epitela i tu pripadaju karcinom in situ i atipična hiperplazija. Određene studije pronašle su značajnu razliku u stopi preživljavanja između ta dva stepena displazije dok druge tvrde kako razlike nema (Gale et al. 2017; Gale et al. 2020). Veliki broj kliničara favorizuje trostepeni sistem u kome pored displazije niskog i visokog stepena postoji zasebno i karcinom in situ, iz razloga donošenja adekvatne odluke o primeni hirurškog lečenja ili radioterapije. Histopatološki, karcinom in situ karakteriše se izraženim promenama tkivne arhitekture sa potpunim gubitkom stratifikacije i polarizacije ćelija, sa ćelijskom atipijom i povećanim brojem atipičnih mitozama (Gale et al. 2017). Promene citoarhitekture i citomorfologije u ćelijama bazalnog sloja sluznice ključne su za gradiranje stepena displazije, dok stepen ćelijske keratinizacije, epitelne maturacije i debljina abnormalnog epitelnog sloja nisu značajni. Retrospektivne studije laringealnih prekanceroznih lezija klasifikovanih prema korigovanoj Ljubljanskoj klasifikaciji pokazale su značajnu razliku u progresiji u malignitet između displazija niskog (1.6%) i visokog stepena (12%) (Gale et al. 2014). Multicentrične studije i meta-analize ukazale su na stopu maligne transformacije od 14% kod svih laringealnih displazija, u sledećoj raspodeli- 10.6% kod pacijenata sa lakom i umerenom displazijom i 30.4% kod pacijenata sa teškom displazijom i karcinomom (Weller et al. 2010). Iz tog razloga, na kliničaru je odluka o tome da li će displaziju sluznice pratiti, endoskopski resekirati, upotrebiti neki dodatni metod dijagnostike kao što je uskopojasna tehnika endoskopskog snimanja ili dodatno analizirati histopatološki preparat.

Prekursorski markeri koji bi ukazali na to da li će lezija progredirati u karcinom bili bi korisni u donošenju odluka o lečenju pacijenata sa displazijama (Gale et al. 2020). Brojni molekularni markeri,

identifikovani imunohistohemijskim analizama, in situ hibridizacijom, protočnom citometrijom i PCR tehnikom, mogu biti korišćeni kao prognostički alat. Ipak, nijedan nije u potpunosti specifičan za postavljanje dijagnoze planocelularnog karcinoma larinksa niti za procenu malignog potencijala displastične lezije (Cavaliere et al. 2021). Najveći broj studija proučavao je biomarkere u tkivima invazivnog planocelularnog karcinoma, dok je manji broj studija istraživao biomarkere karakteristične za početne onkogene promene sluznice larinksa. Proučavani markeri uključeni su u širok spektar ćelijskih procesa u karcinogenezi glave i vrata, uključujući degradaciju ekstracelularnog matriksa, ćelijsku pokretljivost i invaziju, ćelijsku adheziju, transport rastvora, imortalizaciju, metabolizam, ciklus ćelije i apoptozu, transkripciju i signalne puteve. Molekularni biomarkeri visokorizičnih prekanceroznih lezija koji koreliraju sa transformacijom u pločasti ćelijski karcinom mogli bi da pruže prognostičku vrednost pri kliničkoj odlučivanju. Upotreba ovih molekularnih markera u kombinaciji sa drugim ranim kliničkim i histološkim pokazateljima mogla bi pouzdano predvideti progresiju bolesti, ali uprkos obećavajućim primenama u kliničkom radu, manje od 0.1% biomarkera se rutinski i potpuno uspešno koristi u praksi (Ranganath et al. 2022). Genetske studije ukazuju da su mutacije gena FGFR3 i PIK3CA prisutne u lezijama koje će progredirati u laringealni karcinom, dok u lezijama koje nisu maligno alterisale ove mutacije nisu nađene. Sa druge strane, mutacije gena JAK3, MET i FBXW7 nađene su u lezijama koje nisu progredirajuće, dok u progresivnim lezijama ili invazivnom planocelularnom karcinomu one nisu detektovane. Gen p53 je najčešće pogođen mutacijom i kod progredirajućih i kod neprogredirajućih lezija (Manterola et al. 2018). Uloga NANOG regulatornog gena u procesu karcinogeneze planocelularnog karcinoma larinksa nije definitivno uvrđena. Imunohistohemijskim bojenjima snažno citoplazmatsko bojenje na NANOG dokazano je u 27% displastičnih lezija i povezano sa većim rizikom od razvoja planocelularnog karcinoma (Rodrigo et al. 2017).

Saznanja u našem istraživanju impliciraju da teksturalni obrasci u kancerogenom tkivu, kao i u samim jedrima maligno izmenjenih ćelija ispoljavaju suptilne razlike koje se mogu detektovati primenom savremenih računarskih metoda. U kliničkom smislu, od izuzetne važnosti je odluka da li je displazija visokog stepena nalaz koji bi trebalo pratiti ili hirurški resekirati (pogotovo kada pacijent ne odustaje od faktora rizika kao što su konzumiranje duvana i/ili alkohola). Ovo se odnosi i na pacijente kod kojih nije potvrđena invazivna maligna bolest, ali i na pacijente kod kojih su granični preparati nakon hordektomija ili parcijalnih laringektomija nejasni u smislu izmenjenosti ćelije sluznice larinksa. U tim slučajevima GLCM analiza bi kao dopunska metoda bi u teoriji mogla dati jasnije podatke o eventualnoj malignoj izmenjenosti suspektnih nalaza i odrediti dalji tok lečenja.

Izmenjenost oblika i strukture patološki izmenjenih ćelija primećena je još od ranih dana citologije. U radu britanskog lekara Lionela S. Beala nalazimo rane opise strukturnih abnormalnosti malignih ćelija. On je opisao ćeliju kao zatvorenu strukturu koja sadrži nukleus i nukleolus. Klasifikovao je ćelije prema oblicima kao i prema tkivima i organima iz kojih su potekle, a razmatrao je i načine razlikovanja benignih promena u ćelijama od promena koje ukazuju na malignitet. Godine 1860. iz sputuma je izolovao i opisao maligno izmenjene ćelije sluznice farinksa (Beale 1860). U poslednjih nekoliko decenija, znanje o biologiji karcinoma izrazito se proširilo, kao i razumevanje strukture i funkcije malignih ćelija i njihovih osnovnih bioloških mehanizama. Kao jedan od kriterijuma za postavljanje histopatološke dijagnoze, u kontekstu strukture ćelije i tkiva, patolozi često koriste abnormalnosti u obliku i veličini jedra za klasifikaciju različitih vrsta karcinoma. Jedro ćelije predstavlja ćelijsku organelu koja štiti i organizuje najveći deo genetskog materijala, dok se manji deo istog nalazi u mitohondrijama. Na osnovu oblika jedra može se doći do informacija o funkcionalnom statusu ćelije. Iako većina ćelija ima sferično ili ovalno jedro, različite ćelije mogu imati različite oblike kao što je lobulirano ili vretenasto jedro. Nuklearna metrika koja se koristi u patologiji za klasifikaciju tkiva raka uključuje sledeće parametre: abnormalnu veličinu jedra, povećan nuklearno-citoplazmatični odnos, nepravilnosti membrane jedra, hiperhromaziju i aberantnu distribuciju hromatina (Singh et Lele 2022). Maligne ćelije iz različitih anatomskih lokacija često pokazuju kombinaciju, ali ne i sve ove morfološke abnormalnosti. Nepravilnosti jedarne membrane

uključuju zadebljanja, udubljenja, nabore, žlebove i lažne inkluzije. Hromatin je nepravilno raspoređen u malignim ćelijama i često je grube ili mehuričaste teksture, ali može biti gracilniji i ravnomernije raspoređen kao kod malih ćelija neuroendokrinog karcinoma. Ove citomorfološke karakteristike su takođe važne u proceni tkivnih biopsija, gde se procenjuju u skladu sa arhitektonskim karakteristikama kao što su rast neoplastičnih ćelija i prisustvo dezmozoplazmatičnog stromalnog odgovora (Fisher 2020).

Varijacije u oblicima jedra mogu da budu posledica i različite transkripcione ili funkcionalne aktivnosti ćelije. Jedro je dinamično organizovano te je moguće prilagođavanje oblika i veličine tako da se obezbedi homeostaza tokom različitih faza ćelijskog ciklusa kao i u zavisnosti od potreba same ćelije. Fenomen celularne funkcionalnosti podrazumeva promene u morfologiji koje se dešavaju kao odgovor na modifikovane uslove u samoj ćeliji kao i u ćelijskom okruženju. Te morfološke promene od vitalnog su značaja za održavanje optimalnog funkcionisanja jedra tokom ćelijskog rasta, deobe ili promena ćelijskih potreba kada su izložene faktorima stresa. Takođe, morfološke promene dešavaju se prilikom starenja, patoloških stanja- bolesti, i naročito kod razvoja karcinoma (Pantic et al. 2016; Manda et al. 2023). Istraživanja o biomehanici i morfologiji jedra pružila su uvide u osnovne biofizičke mehanizme koji leže u osnovi nuklearne arhitekture, a samim tim i načine na koje fizička svojstva hromatina utiču na nuklearnu funkciju u brojnim patološkim stanjima (Stephens et al. 2019). Nuklearni omotač sačinjavaju 2 dvoslojne lipidne membrane, od kojih je spoljna deo endoplazmatičnog retikuluma, sa kojim čini funkcionalnu celinu, dok je unutrašnja membrana u kontaktu sa kompleksom intermedijernih filamenata, a preko njih sa genetskim materijalom. Intermedijerni filamenti formiraju jedarnu laminu koja je odgovorna za oblik i strukturni identitet ćelijskog jedra (Chai et al. 2021). Za spoljašnji ili unutrašnji lipidni dvosloj vezani su brojni proteini i kompleksi proteina. Njihove funkcije su mnogobrojne- od održavanja integriteta strukture jedra, do regulacije transporta jedinjenja iz jedra u citoplazmu i obrnuto. Citoskelet je sa hromatinskom strukturom povezan LINC kompleksom (engl. "Linker of Nukleoskeleton and Cytoskeleton") koji ima značajnu ulogu tokom procesa mitoze i mejoze, formiranja centrozoma i migracije hromozoma. U jedru se nalazi genetski materijal - dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) u obliku dugih lanaca koji se nazivaju hromozomima (Chang et al. 2015).

Dispergovan hromozomski materijal interfaznog jedra prvi je uočio nemački biolog Valter Fleming 1882. godine tokom proučavanja ćelijske deobe, i dao mu je naziv hromatin (Flemming 1884). Gusto pakovanje hromatinskih vlakana omogućava da se lanac DNK dužine veće od 2 m u diploidnoj ćeliji upakuje u ćelijsko jedro promera 5 do 10 mikrometara. Ova organizacija hromatinske strukture ima veliki uticaj na procese transkripcije i replikacije DNK. Molekuli DNK moraju se razmotati i raspakovati da bi se geni iskopirali i preveli u proteine. Raspakovana DNK je aktivna i dostupna za transkripciju, dok je kompaktna DNK neaktivna i nedostupna (Manda et al. 2023). Organizacija genoma u ćelijskom jedru ne predstavlja nasumičan proces, tako da pri dijagnostikovanju maligno izmenjenih ćelija, patolozi, histolozi i citolozi ne traže samo nepravilnosti oblika jedra, već i abnormalnosti u teksturi hromatina (Fišer 2020; Singh et Lele 2022). Hromatin jedra sačinjen je od nekoliko desetina miliona nukleozoma, koji predstavljaju osnovni, odnosno prvi nivo hromatinske organizacije kod eukariota. Nukleozom sačinjava deo DNK lanca od oko 147 baza DNK koje su obmotane oko oktamera proteina koji se nazivaju histonima. Nukleozomi su međusobno povezani sačinjavajući niz koji ima perlastu strukturu. Drugi nivo organizacije predstavljen je vlaknom dijametra 30 nanometara, koje predstavlja kompaktni sloj nukleozoma međusobno povezanih histonom H1. Sledeći, odnosno treći nivo organizacije predstavljaju hromatinske petlje koje nastaju daljom spiralizacijom hromatinskih vlakana. Četvrti i poslednji nivo organizacije hromatina je kondenzovani hromozomski nivo- hromozom koji se može videti pod mikroskopom i koji se sastoji od 2 hromatide spojene centromerom. Postoje dve forme hromatina koje se mogu videti u jedru- heterohromatin, kondenzovana, gusto pakovana i manje transkripciono aktivna forma, kao i euhromatin, mikrofibrilarna forma, sa većom transkripcionom aktivnošću. U interfaznom jedru

hromatin ima različite strukture obrasce koji zavise od tipa ćelije, ali i od histološke tehnike bojenja (Yusufova et al. 2021).

Nuklearna organizacija hromatina povezana je sa morfologijom jedra. Hromatin doprinosi regulaciji nuklearne morfologije tako što interaguje sa nuklearnom omotačem. Brojni integralni proteini unutrašnje nuklearne membrane, poput laminina, LAP2 (polipeptid asociran sa laminom 2), emerina i receptora laminina B interaguju s DNA i/ili hromozomskim proteinima i pružaju složenu dinamičku vezu između periferne lamele, nukleoskeletnih struktura i hromatinskih vlakana. Takođe, biofizičko stanje heterohromatina u velikoj meri utiče na oblik, krutost i veličinu jedra (Antmen et al. 2019; Manda et al. 2023). Povećanje udela euhromatina ili smanjenje heterohromatina modifikacijom histona uzrokuje stvaranje nepravilnosti u konturama jedra. Mehanizam kojim stanje hromatina utiče na oblik jedra može se objasniti promenom mehaničkih svojstava jedra u izmenjenom odnosu euhromatina i heterohromatina, gde jedro dobija rastresitiju, "mekšu" strukturu. Disregulacija enzima koji modifikuje histone može da promeni oblik i veličinu jedara u tumorski izmenjenim ćelijama (Furosawa et al. 2015; Fišer 2020; Singh et Lele 2022). Povećanje količine euhromatina dovodi do razmekšavanja jedara i takozvanog nuklearnog talasanja. Euhromatin je mehanički slabiji od heterohromatina, te stoga promenjen odnos euhromatina i heterohromatina može da izazove gubitak povezanosti sa laminama i posledično smanji stabilnost jedarne strukture (Stephens et al. 2018). Histonska acetilacija povećava sadržaj euhromatina, dok histonska metilacija povećava količinu heterohromatina. Tretman ćelija inhibitorima histon-deacetilaza i histon-metiltransferaza povećava nivo euhromatina i smanjuje nivo heterohromatina. Ovakav eksperimentalni tretman kod mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF), kao i kod humanih ćelija karcinoma doveo je do razmekšavanja jedra i stvaranja ispupčenja na njima. Nasuprot tome, MEF ćelije tretirane inhibitorima histon-demetilaze imale su povećan heterohromatinski sadržaj i kompaktnija jedra sa manje izbočenja. Slično tome, inhibiranje histon-demetilaze je normalizovalo nepravilne oblike jedra fibroblasta pacijenata sa Hačinson-Gilford progerijom, povećavajući krutost jedra (Stephens et al. 2018).

Gruba tekstura hromatina primećena je kod papilarnog karcinoma štitne žlezde, cervikalnog karcinoma i karcinoma bešike, a prouzrokovana je varijacijama u distribuciji heterohromatina (Fišer 2020; Singh et Lele 2022). Prekomerna ekspresija histon acetil-transferaze p300 u prostati povezana je sa niskim stopama preživljavanja i agresivnim napredovanjem karcinoma. Transfekcija histon acetil-transferaze p300 u ćelije karcinoma prostate uzgajane in vitro, povećava veličinu jedra (Debes et al. 2005). Manje kondenzovanog euhromatina nađeno je i u ćelijama akutne limfoblastične leukemije (Wang et al. 2018). Poremećaji drugih neshistonskih proteina i enzima takođe mogu da imaju efekte koji menjaju kompaktnost hromatina i posledično oblik i veličinu jedra u brojnim tipovima karcinoma (Lee et al. 2015). Promene veličine jedra kod ćelija kancera uglavnom se pripisuju aneuploidiji. Aneuploidija, odnosno abnormalan broj hromozoma, izazvana je hromozomskom nestabilnošću i povećanom učestalošću grešaka u segregaciji hromozoma tokom mitoze. Veoma je učestala u tkivu karcinoma, i nalazi se kod oko 90% solidnih tumora (Taylor et al. 2018). U fiziološkim uslovima, povećanje broja hromozoma dovodi do povećanja veličine ćelijskog jedra. Ipak, aneuploidija kod ćelija karcinoma ne korelira nužno sa veličinom jedra (Ben-David et Amon 2020).

Abnormalnosti oblika nukleusa mogu biti uzrokovane izmenama u velikom broju pojedinačnih gena koji se tipično nalaze u ćelijama karcinoma. Nuklearne morfološke promene uključuju alteracije u veličini, obliku, marginama, promenama obrazaca hromatinskog pakovanja, uvećanje nukleusa ili perinukleusnog prostora. Povećani citoskeletni stres koji deluje na kancerogeni nukleus zbog kontraktilnih aktomiozin stresnih vlakana ili zbog procesa rasta ćelija može dodatno pojačati nuklearne abnormalnosti. Takođe, i izmene u osmotskoj razmeni sa citoplazmom i nukleocitoplazmatičnom transportu mogu doprineti promenama u veličini i izgledu jedra (Singh et Lele 2022). Nepravilnosti u veličini i obliku jedra, kao i u teksturi hromatina često su povezani sa izmenjenom organizacijom i ekspresijom gena kod ćelija tumora (Manda et al. 2023). Nuklearna morfometrija igra značajnu ulogu u histopatološkom i citološkom aspektu dijagnostike brojnih

maligniteta. Studija koja je 35 meseci pratila progresiju bolesti kod pacijenata sa osteosarkomom otkrila je povezanost između ishoda bolesti i veličine i oblika jedara maligno izmenjenih ćelija. Značajno bolji ishod bolesti zabeležen je u onim slučajevima gde je mikroskopski verifikovano da ćelije tumora imaju velika i okrugla jedra, dok je lošiji ishod bolesti konstantovan kod pacijenata gde su ćelije tumora imale mala i polimorfna jedra (de Andrea et al. 2011). Mutacije gena povezanih sa razvojem karcinoma kao što su TP53 i RET/PTC takođe su povezane sa promenama u nuklearnoj morfologiji. TP53 je kodirajući gen za transkripcioni faktor p53, koji ima funkciju supresora tumorskog rasta, štiteći na taj način ćelije od nekontrolisane proliferacije. Mutacije p53 uočene su u preko 90% karcinoma uterusa i seroznih cistadenoma jajnika, kao i u više od 30% karcinoma dojke. Pozitivnost p53 u tkivu karcinoma dojke korelira sa nepravilnom formom nukleusa (Tocco et al. 2018). Kod melanoma, p53 pozitivne ćelije imaju uvećano jedro koje je naglašeno kružnog oblika, što ukazuje na to da p53 pozitivnost može da ima mešoviti uticaj na oblik jedra u različitim tkivima (Mijovic et al. 2013). Povećana ekspresija p53 i smanjena ekspresija regulatora tumor supresorskog proteina Rb (retinoblastomski protein), takođe su bili povezani sa povećanjem jedra kod ćelija karcinoma pluća i adenokarcinoma. Redukcija ekspresije p53 gena in vitro uslovima, pokazala je takođe različite efekte na oblik ćelijskog jedra, u zavisnosti od ispitivanih ćelijskih linija. Kod epitelnih ćelija tkiva dojke smanjena ekspresija p53 dovela je do nepravilnosti oblika jedra, dok je kod humanih pigmentnih ćelija retine dovela do fragilnosti jedra i rupturiranja jedarnih ovojnica zbog povećanja zapremine jedra. Transfekcija p53 gena u p53-deficijentne ćelije karcinoma kolona dovela je do toga da ćelijska jedra postanu nepravilno oblikovana (Singh et Lele 2022). NOP53 protein koji ima tumor supresorno dejstvo, vezuje se za p53 i učestvuje u regulaciji oštećenja DNK. Nishodna regulacija NOP53 u humanim ćelijama karcinoma cerviksa dovodi do nestabilnosti hromozoma i brojnih tipova nepravilnosti ćelijskog jedra kao što su uvećanje jedra, mikronukleacija ili multinukleacija (Lee et al. 2020). Takođe, deplecija tumor proteina p63, transkripcionog faktora iz p53 familije proteina, smanjuje sintezu laminina A/C i laminina B1 u bazalnim keratinocitima i izaziva nepravilnost oblika jedra u ćelijama embriona miša (Rapisarda et al. 2017). Opservacija ćelija pankreasnog duktalnog karcinoma kod miševa sa deplecionisanim proteinom p53 ukazala je da p53 vrši represiju gena nuklearnih komponenata, uključujući Lmnb1, Tmpo, Nup205, Nup107, Nup85 i Nup35. Ovo istraživanje ukazalo je na značajnu vezu između komponenti nuklearne arhitekture, promene u morfologiji jedra i jedarceta tokom tumorigeneze i napredovanja karcinoma (Panatta et al. 2022). Wu i saradnici ispitivali su morfološke karakteristike jedara kod više od 30 000 klonova izvedenih iz roditeljskih ćelija karcinoma dojke. Ćelije sa visokim metastatskim potencijalom imale su velika jedra, sa velikim prosečnim brojem hromozoma (77 do 86). Studija je ukazala na značaj analize nuklearne morfometrije in vitro, gde je dokazana intratumoralna heterogenost i značajna razlika u ponašanju raznih linija tumorskih ćelija u smislu agresivnosti. Samim tim, zaključeno je da bi analiza oblika ćelija i jedara mogla da unapredi prognozu bolesti, ali i da preporuči najoptimalniji personalizovani modalitet lečenja baziran na nuklearno-strukturnim nepravilnostima tumorskih ćelija tkiva (Wu et al. 2020).

Jedan od aspekata koji razlikuju maligno od zdravog tkiva jeste promena organizacija ćelija unutar kancerogenog tkiva u poređenju sa normalnim tkivom, odnosno promene u citoarhitekturi i međućelijskoj organizaciji (Frost 2021). Međućelijska komunikacija igra ključnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva, koordinaciji rasta i reparacije, i obezbeđivanju pravilnih funkcija ćelija u zdravim tkivima. Postoji nekoliko ključnih načina međućelijske komunikacije, uključujući direktni kontakt ćelija putem međućelijskih veza, kao i indirektnu komunikaciju putem autokrinog, parakrinog i endokrinog signalnog puta (Kakun et al. 2022). Ovi procesi regulišu se složenom mrežom signalnih molekula, receptora i transkripcionih faktora koji omogućavaju ćelijama da odgovore na svoje mikrokruženje i susedne ćelije. Međutim, u slučaju raka, delikatna ravnoteža međućelijske interakcije postaje poremećena, što dovodi do promena u citoarhitekturi i aktivnosti ćelija (Najafi et al. 2019). Maligno izmenjen ćelije ne prestaju da se dele kada dođu u kontakt sa susednim ćelijama, odnosno izostaje fenomen kontaktne inhibicije, što dovodi do nekontrolisane proliferacije ćelija i

gubitka uobičajene strukture tkiva. Takođe, maligno izmenjene ćelije pokazuju smanjenu ekspresiju ili izmenjenu distribuciju vezujućih proteina, što dovodi do slabljenja adhezije ćelija, povećane sposobnosti invazije i metastaziranja. Ćelije raka često stiču mutacije koje utiču na signalne puteve koji su ključni za rast i preživljavanje ćelija (Park et al. 2020). Abnormalna aktivacija onkogeni i inaktivacija gena supresora tumora može podstaći nekontrolisanu proliferaciju i preživljavanje ćelija. Maligne ćelije mogu da proizvode faktore rasta na autokrin način, što promoviše njihov rast, ali i da utiču na okolne ćelije putem parakrine signalizacije, podstičući njihovu proliferaciju i preživljavanje. Ove promene doprinose formiranju tumorskih mikrookolina koje omogućavaju napredovanje raka. Drugi mehanizmi menjanja tkivne strukture prilikom karcinogeneze podrazumevaju stimulaciju angiogeneze, stvaranje hipoksičnih regija koje promovišu metastatski potencijal, kao i smanjenje ekspresije površinskih antigena koji bi bili prepoznati od strane ćelija imunskog sistema (Varga et al. 2017). Brojne studije dokazale su da mikrookolina tumora, kao i hronične abnormalne interakcije između parenhima i strome igraju veliku ulogu u razvoju i napredovanju karcinoma (Soto et Sonnenschein 2011; Chen et al. 2020; Liu et al. 2020; Wang et al. 2021).

Ponašanje ćelija raka izuzetno je kompleksno i utiče na mnogo međusobno povezanih faktora. Promena mikrookoline može izazvati da se ćelije raka vrate u fenotipski izgled i ponašanje slično ćelijama koje nisu kancerogene, uprkos kancerogenom genotipu. Mikrookolina ćelije može snažno uticati na njenu morfologiju, međućelijsko signaliziranje i diferencijaciju. Složena interakcija između genetskih mutacija i signala iz okoline utiče na ponašanje i sudbinu ćelije (Bissell et Hines 2011; Guo et al. 2014; Gadaleta et al. 2022). Ekstracelularni matriks (ECM)- kompleksan skup kolagena, proteoglikana i drugih molekula, predstavlja važnu strukturu normalnih tkiva i pruža ključne signale za razvoj, migraciju, adheziju, proliferaciju, preživljavanje i druge metaboličke funkcije ćelija. Glavni proteini u ECM-u su fibrozni proteini (kolagen, elastin, fibronektin, laminin) i proteoglikani (hondroitin sulfat, heparin sulfat, keratin sulfat i hijaluronska kiselina) koji doprinose krutosti tkiva i građenju bazalne membrane, koja funkcioniše kao barijera između tumorskih ćelija i strome. Kada govorimo o ECM-u, ne uzimamo u obzir samo proteine kao glavne komponente, već uključujemo i citokine, faktore rasta, hormone koji se izlučuju od strane stromalnih i tumorskih ćelija, fizičke i hemijske parametre kao što su pH vrednost, nivo kiseonika, intersticijalni pritisak i protok tečnosti koji regulišu napredovanje raka i metastatsko širenje. Tumorsko tkivo ima izmenjene osobine i strukturu ekstracelularnog matriksa. Tumorske ćelije, izmenjeni fibroblasti (engl. "cancer associated fibroblast", CAF) i druge ćelije mikrookoline tumora luče supstance koje menjaju fizičko-hemijske karakteristike ekstracelularnog matriksa. Takođe, mehaničke sile koje proizlaze iz samog rasta tumora mogu da dovedu do raskidanja međućelijskih veza i elastičnih vlakana. Izmenjeni fibroblasti mogu da modulišu arhitekturu malignog tkiva formiranjem različitog rasporeda i oblika vlakna u ekstracelularnom matriksu, stvarajući anizotropne puteve koji olakšavaju migraciju ćelija karcinoma. (Belli et al. 2018; Almagro et al. 2022).

U epitelnim tumorima, u koje spada i planocelularni karcinom larinksa, prelazak maligno izmenjenih ćelija epitela u mezenhim dešava se prilikom molekularnog fenomena koji se normalno javlja tokom embriogeneze, odnosno tokom epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT). Osnovne karakteristike ovog fenomena jesu smanjivanje epitelnih karakteristika i sticanje mezenhimalnih osobina od strane tumorskih ćelija koje na taj način povećavaju svoju migratornu sposobnost. Signalizacija EMT-a posreduje se kompleksnim molekularnim putevima i regulacijom ekspresije ključnih molekula koji doprinose metastatskom potencijalu tumora. Efekti epitelno-mezenhimne tranzicije podrazumevaju gubitak adhezije, preuređenje citoskeleta, smanjenje stepena apoptoze i imunog nadzora, povećanu ekspresiju metaloproteinaza, neoangiogenezu, sticanje svojstava matičnih ćelija i aktivaciju ćelija tumorske strome (Goulioumis et Gyftopoulos 2022; Kakun et al. 2022). Jedna od osobina maligno izmenjenog tkiva jeste i gubitak ćelijske adhezije. Na mukoznim površinama zdravih tkiva epitelne ćelije su polarizovane. Takođe, karakteristika zdravih epitelnih ćelija jeste i postojanje adhezionih struktura koje povezuju svaku epitelnu ćeliju sa susednom ćelijom i bazalnom membranom. Takve adhezivne strukture, uključujući čvrste veze (engl. "tight junctions"),

dezmozome i hemidezmozome, formiraju adhezioni molekuli, poput E-kadherina. E-kadherini su transmembranski proteini koji stvaraju homofilnu vezu sa E-kadherinima susednih ćelija. Istovremeno, vezani su i za aktinske filamente citoskeleta putem molekularnog kompleksa koji se sastoji od p-120 i β -katenina. Jedna od karakteristika EMT-a jeste smanjivanje ekspresije E-kadherina nishodnom regulacijom promotora transkripcionih faktora, zatim putem njihove razgradnje matriks-metaloproteinazama (MMP) ili njihove fosforilacije i kasnije degradacije putem sistema ubikvitin-proteazom. Smanjivanje količine ili nestanak E-kadherina rezultira odvajanjem epitelnih ćelija jedne od drugih kao i od bazalne membrane. Taj proces dalje dovodi do oslobađanja p-120 i β -katenina u citoplazmu. Kada ovi katenini stignu do jedra, funkcionišu kao transkripcioni faktori koji pojačavaju ekspresiju ključnih molekula, kao što su MMP-i i N-kadherin, koji dalje razgrađuju E-kadherin i dolazi do sve većeg gubitka ćelijske adhezije. Ovo smanjenje odnosa N-kadherina i E-kadherina predstavlja kritični događaj koji pojačava migratorni kapacitet tumorskih ćelija (Janiszewska et al. 2020; Loh et al. 2021). Tokom procesa onkogeneze epitelne ćelije prolaze kroz promene svog citoskeleta. Modulacijom signalnih proteina koji regulišu organizaciju aktina u ćeliji, dolazi do još jedne karakteristične osobine epitelno-mezenhimalne tranzicije- do zamene normalnih epitelnih citokeratina vimentinom, koji je intermedijarni filament karakterističan za mezenhimalne ćelije. Modifikacije citoskeleta dodatno doprinose gubitku polariteta, sticanju anaplastične morfologije ćelije i stvaranju struktura koje olakšavaju migraciju, kao što su lamelipodije. U uzorcima tkiva uznapredovalog karcinoma larinksa nađeno je da je citokeratin zamenjen vimentinom (Goulioumis et Gyftopoulos 2022). Takođe, dokazano je da lamelipodije povećavaju lokalnu invazivnost u različitim karcinomima glave i vrata (Ali et al. 2021).

Smanjenje apoptotskog indeksa ili potpuno izbegavanje apoptoze još jedna je od karakteristika maligno izmenjenog tkiva. Apoptoza je posredovana molekulima poznatim kao kaspaze, koje mogu biti aktivirane različitim molekularnim putanjama, a apoptotska ćelija uklanja se bez posledične zapaljenske reakcije. Odvajanje ćelija od bazalne membrane izaziva poseban tip apoptoze epitelnih ćelija koji se naziva anoikis. Bazalna membrana ćelijama šalje signale preživljavanja putem integrina vezanih za fokalne adhezije epitelnih ćelija. U normalnim okolnostima, epitelne tumorske ćelije koje se odvoje od bazalne membrane tokom metastaze trebalo bi da budu uklonjene putem anoikisa. Međutim, u okviru epitelno-mezenhimalne tranzicije, molekularne putanje poput kinaze povezane sa integrinima (ILK) i mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) održavaju signale preživljavanja tumorske ćelije. Posebno treba napomenuti da izbegavanje apoptoze ima veze sa otpornošću na različite hemioterapijske lekove (Lin et al. 2020; Peng et al. 2022). Sa druge strane, specifične molekularne putanje aktivirane tokom epitelno-mezenhimne tranzicije dovode tumorske ćelije u stanje nazvano autofagija, katabolički proces koji normalno pomaže ćelijsku homeostazu eliminacijom oštećenih organela i molekula. U autofagiji povezanoj s kancerom, dolazi do razlaganja određenih organela tumorskih ćelija kako bi se smanjila potreba maligno izmenjenih ćelija za energijom. Na taj način, one mogu ostati u stanju mirovanja dok ne pronađu povoljne uslove za ponovnu proliferaciju. Interakcija između EMT-a i autofagije je kompleksna: autofagija može pokrenuti ili suzbijati EMT, ali je takođe aktivirana putem putanja povezanih s EMT-om, kao što su hipoksija ili tumorski faktori rasta. Konačan efekat EMT-a na autofagiju može biti povezan s tipom ćelije i stadijumom napredovanja tumora: u ranim fazama tumorogeneze, autofagija može ometati proces EMT-a; s druge strane, nakon što ćelije prođu kroz EMT, mogu podsticati i koristiti autofagiju kao način izbegavanja apoptoze i imunog nadzora, povećavajući njihov metastatski potencijal (Babaei et al. 2021; Jinesh et Brohl 2022). U nekoliko neoplastičnih stanja glave i vrata, uključujući karcinom larinksa, pokazano je da aktivacija proteina fokalne adhezije kinaze štiti tumorske ćelije od anoikisa posredovanog kaspazama (Chrysovergis et al. 2019; Zhang et al. 2020).

Transkripcioni faktori aktivirani tokom epitelno-mezenhimne tranzicije dovode do ekspresije citokina, kao što je transformišući faktor rasta beta (TGF- β), koji funkcionise kao glavni regulator imunskog sistema. Povećana ekspresija TGF- β može da spreči da T-pomoćni limfociti prepoznaju tumorske ćelije kao izmenjene. Pored toga, epitelno-mezenhimna tranzicija dovodi do smanjenja

ekspresije proteina histokompatibilnog sistema kod tumorskih ćelija, što na kraju vodi do izbegavanja imunskog nadzora (Liu et al. 2020). U karcinomu larinksa, TGF- β reguliše ćelije prirodnog i stečenog imunskog sistema. Nakon izlaganja TGF- β , dendritične ćelije koje predstavljaju antigene postaju neaktivne. Pored toga, TGF- β usmerava diferencijaciju T-naivnih limfocita ka T-regulatornim limfocitima umesto ka imunsko-kompetentnim Th1 limfocitima. Ovo stanje čini imunski nadzor malignih ćelija u karcinomu larinksa manje efikasnim (Pang et al. 2018). Transkripcioni faktori kao što su AP-1 i β -katenin, koji se akumuliraju u jedru kao posledica aktivacije molekularnih putanja EMT-a, povećavaju ekspresiju matriks metaloproteinaza. Metaloproteinaze povećavaju migratornu sposobnost tumorskih ćelija na više načina. One mogu da aktiviraju signalne molekule kao što je fibroblastni faktor rasta, ili da razaraju molekule kao što je E-kadherin, i na taj način razlažu adhezione strukture. Takođe, učestvuju u preuređenju citoskeleta i izbegavanju apoptoze. Dodatno, MMP mogu da aktiviraju VEGF, ključni faktor za neovaskularizaciju. Osim toga, MMP na lamelipodijama mogu da probijaju put kroz stromu razlaganjem kolagenskih vlakana (Bhatt et al. 2021). Na kraju, supstance koje se oslobađaju iz strome nakon cepanja od strane MMP, kao što je elastin, mogu da deluju kao hemotaktički faktori koji doprinose migratornoj sposobnosti tumorskih ćelija (Heinz et al. 2020). Slabo diferencirani karcinomi larinksa pokazuju povećanu ekspresiju metaloproteinaza kao što su MMP-2 i MMP-9 i potisnutu ekspresijom tkivnih inhibitora metaloproteinaza TIMP-1 i TIMP-2. Imunohistohemijske studije pokazale su da su zapaljenske ćelije u stromi tumora glavni izvor MMP-9 u karcinomu larinksa (Wittekindt et al. 2011; Yang et al. 2021).

Neoangiogeneza predstavlja jedan od ključnih procesa za razvoj metastaza jer omogućava snabdevanje kiseonikom i hranljivim materijama ćelijama tumorske mase. Povećana ekspresija MMP-a povezana je sa aktivacijom vaskularnog endotelnog faktora rasta VEGF-A, koji je uključen u stvaranje novih krvnih sudova. MMP takođe doprinose aktivaciji faktora rasta VEGF-D, koji je uključen u formiranje novih limfnih sudova. Povećana ekspresija transkripcionog faktora TWIST, koji je povezan sa epitelno-mezenhimalnom tranzicijom, učestvuje u fenomenu vaskularne mimikrije. Ovaj fenomen se sastoji od pseudo-krvnih sudova, odnosno kanalića u tumorskoj masi koji imitiraju krvne sudove, a nisu formirani od strane endotelne ćelije. Međutim, ova vrsta pseudo-sudova takođe može otvoriti put za metastaziranje epitelne tumorske ćelije (Luo et al. 2020; Mohan et al. 2020). Dostupni podaci sugerišu da u uzorcima tkiva karcinoma larinksa postoji povećana aktivacija transkripcionog faktora ZEB2 što dalje povećava ekspresiju gena koji posreduju u formiranju novih krvnih sudova od strane aktiviranih endotelne ćelije. Što je veći stepen vaskularne mimikrije u tkivu karcinoma larinksa, veći je i rizik od razvoja metastaza u limfnim čvorovima (Franz et al. 2021).

Određeni broj ćelija u svakom tkivu poseduje osobine matičnih ćelija, a najkarakterističnije od njih su samoobnavljanje i pluripotentnost. Samoobnavljanje predstavlja sposobnost ćelija da prođu kroz brojne cikluse deljenja dok održavaju svoje nediferencirano stanje. Pluripotentnost je sposobnost ćelija da se diferenciraju u specijalizovane tipove ćelija. Ćelijske linije karcinoma koje stiču osobine matičnih ćelija ispoljavaju samoregeneraciju, visoku sposobnost invazivnosti i metastaziranja, kao i otpornost na radioterapiju i hemioterapiju (Prasetyanti et Medema 2017; Goulioumis et Gyftopoulos 2022). U studiji koja je ispitala ćelijsku liniju karcinoma larinksa uočeno je da smanjenje ekspresije miRNA-145, dovodi do povišene ekspresije površinskog glikoproteina CD-133 i sticanja osobina matičnih ćelija, kao što su pluripotentnost i samoobnavljanje. Ovo stanje se najčešće javlja u hipoksičnim okruženjima i povezano je sa povećanom proliferacijom i sposobnošću formiranja kolonija u Hep-2 ćelijskim linijama. Dodatni markeri povezani sa pluripotentnošću ćelija u karcinomu larinksa uključuju ekspresiju aldehyd-dehidrogenaze i površinskog glikoproteina CD44+. Konkretnije, CD44+ funkcioniše kao receptor za hijaluronsku kiselinu koja je uključena u adheziju i migraciju ćelija (Elkashty et al. 2020). Tumorske ćelije razvijaju posebnu interakciju sa okolnim stromom koja podstiče migraciju i metastaziranje. Maligne ćelije vrše funkcionalne modifikacije na stromi tkiva, što dovodi do njene aktivacije. Nakon toga, aktivirane ćelije strome posreduju u EMT tumorskih ćelija doprinoseći signalizaciji ovog molekularnog fenomena. U maligno izmenjenim tkivima pojavljuje se nova ćelija, takozvani kancer-asocirani fibroblast (CAF), koja je karakterisana

prisustvom alfa-glatkog mišićnog aktina (α -SMA). Fibroblasti povezani sa kancerom pokazuju funkcionalne i molekularne razlike u odnosu na normalne fibroblaste. Prethodno postojeći uobičajeni fibroblasti u tkivu bivaju transformisani pod dejstvom TGF- β i IL-6 koje proizvode tumorske i ćelije inflamacije, kao i putem direktnog kontakta sa malignim ćelijama. Potom CAF-ovi indukuju dodatnu transformaciju tumorskih ćelija putem proizvodnje faktora rasta, dodeljujući im migratorne sposobnosti. Pored toga, CAF-ovi proizvode MMP, angiogenetske i hemotaktičke faktore za ćelije inflamacije, posredujući u višestrukim fazama molekularnog procesa metastaze. CAF-ovi su prijavljeni da ispoljavaju veći migratorni i kontraktilni potencijal, zajedno sa sintezom i preoblikovanjem ECM-a, slično miofibroblastima. CAF-ovi regulišu progresiju maligne bolesti direktnim uticajem na proliferaciju, migraciju, invaziju i angiogenezu ćelija raka. U larinksu, CAF-ovi koji ekspresiraju α -SMA u stromi otkrivaju se samo u invazivnom karcinomu, ali ne i u stromi pripadajućeg normalnog tkiva (Asif et al. 2021; Butti et al. 2023; Fang et al. 2023). Važno je napomenuti da interleukini, miRNAs i faktori rasta sa mesta tumora mogu da se transportuju i putem egzozoma i na taj način mogu da aktiviraju stromu udaljenih tkiva. Egzozomi su nanometarske membrane vezikule koje potiču od tumorskih ćelija i ćelija tumorskog mikrookoline i otpuštaju se u cirkulaciju. Egzozomi mogu da prilagode mikrookolinu buduće metastatske niše, što predstavlja suptilnu manifestaciju teorije "seme i zemlja" (Akhtar et al. 2019; Goulioumis et Gyftopoulos 2022). Studija Rena ispitala je PCR i imunohistohemijskim metodama ekspresiju 315 gena povezanih sa imunološkim odgovorom kod tkiva karcinoma larinksa, kao i kod neizmenjenog tkiva. Dokazano je da ćelije karcinoma larinksa imaju nisku ekspresiju gena AQP9 (akvaporin 9) i ZAP70 (zeta lanac proteina kinaze 70 povezan sa receptorom T ćelija), dok je kod zdravog tkiva ekspresija ovih gena bila statistički značajno viša. Visok stepen ekspresije ovih gena dovodio je do uobičajene strukture tkiva, bez povećanja stepena ćelijske proliferacije. Kada su nivoi ekspresije ovih gena bili sniženi, povećavao se stepen nekontrolisanog deljenja ćelija, ćelijske migracije i invazije (Ren et al. 2022).

Patološki procesi koji su uključeni u nastanak i razvoj maligniteta uključuju prekomernu proliferaciju i otpornost na apoptozu neoplastičnih ćelija. Međutim, do danas, regulatorni mehanizam odgovoran za abnormalan rast ćelija karcinoma larinksa nije u potpunosti razjašnjen. Hipoksija je jedna od ključnih karakteristika mikrookoline solidnih tumora kod čoveka. Istraživanja su pokazala da hipoksija ima različite efekte na regulaciju apoptoze i proliferacije. kod ljudskih neoplazmi, što može biti posredovano nizom regulatornih mehanizama Hipoksija indukuje niz funkcionalno adaptivnih odgovora neoplastičnih ćelija, uključujući proliferaciju i apoptozu, koje su posredovane nizom molekularnih mehanizama (Lee et al. 2021). Hipoksija može da poveća ekspresiju mnogih gena uključenih u proliferaciju tumorskih ćelija, angiogenezu, proces glikolize i epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT). Slično tome, brojna istraživanja su pokazala da hipoksija reguliše različite maligne biološke fenotipove ćelija karcinoma larinksa, da dovodi do toga da maligne ćelije stiču biološka svojstva malignih ćelija slična matičnim ćelijama, lakše metastaziraju, ali i da budu višestruko otporne na hemioterapeutike (Li et al. 2016; Zuo et al. 2016). Nažalost, regulatorni efekti i mehanizmi hipoksije na proliferaciju i apoptozu ćelija karcinoma larinksa još uvek nisu jasni.

Notch signalizacija predstavlja međućelijski signalni put koji je uključen u proces diferencijacije ćelija u određene tipove ćelija koje obavljaju specifične funkcije u telu. Ovaj put takođe ima ulogu u proliferaciji, diferencijaciji i apoptozu ćelija. Notch signalizacija reguliše i različite biološke aspekte ponašanja neoplastičnih ćelija pod hipoksičnim uslovima i posreduje nishodnu regulaciju ekspresije ciljnih gena (Li et al. 2014). Istraživanja ovog signalnog puta ukazala su na to da je nivo ekspresije Notch 1 gena u tkivima karcinoma larinksa značajno viši u odnosu na normalna tkiva i pozitivno je povezan sa pojavom metastaza u limfnim čvorovima, što sugeriše da aberantna Notch 1 signalizacija može biti uključena u regulaciju malignog procesa karcinoma larinksa (Dai et al. 2015). U studiji Lija imunohistohemijska bojenja otkrila su prisustvo Notch1 gena u 68 (63,55%) od 107 uzoraka tkiva karcinoma larinksa, na membrani i u citoplazmi tumorskih ćelija. Prosečni indeks proliferacije ćelija u tkivima humanog planocelularnog karcinoma larinksa bio je statistički značajno viši u Notch 1 pozitivnoj grupi u odnosu na negativnu. Sa druge strane, indeks apoptoze bio je statistički značajno

niži u Notch1 pozitivnoj grupi u odnosu na Notch1 negativnu grupu. Inkubacija ćelija u normoksičnim ili hipoksičnim uslovima tokom 48 sati kako bi se posmatrali efekti hipoksije na proliferaciju i apoptozu neoplastičnih ćelija, dokazala je da je proliferacija neoplastičnih ćelija značajno povećana pod dejstvom hipoksije. S druge strane, procenat ćelija u apoptozi smanjio se nakon inkubacije u hipoksičnim uslovima tokom 48 sati. Rezultati real-time PCR potvrdili su da je hipoksija značajno povećala ekspresiju gena za Notch 1, Hes 1 i Hey 1 u tumorskim ćelijama. Rezultati Western blot analize pokazali su da je ekspresija proteina Notch1 u ćelijama karcinoma larinksa bila pojačana pod dejstvom hipoksije. Ovi rezultati ukazuju da se ekspresija Notch 1 i aktivnost Notch 1 signalizacije u ćelijama karcinoma larinksa može pojačati hipoksijom, odnosno da hipoksija može da podstiče proliferaciju i inhibira apoptozu ćelija karcinoma larinksa (Li et al. 2022). Zuo i saradnici istraživali su potencijalne mehanizme putem kojih hipoksija može dovesti do sticanja povećanog metastatskog potencijala ćelija planocelularnog karcinoma larinksa. Vršeno je poređenje ekspresije GLUT-1 membranskog proteina koji ima funkciju u održanju homeostaze glukoze kao i ekspresije proteina povezanih sa epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (vimentin, E-kadherin, N-kadherin) u neizmenjenom tkivu sluznice larinksa kao i u maligno izmenjenom tkivu. Dokazano je da je ekspresija GLUT-1 pozitivno povezana sa ekspresijom vimentina i N-kadherina u tkivima skvamocelularnog karcinoma larinksa, ali negativno povezana s ekspresijom E-kadherina. Takođe, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova metastazama bila je veća, a stopa preživljavanja pacijenata s pozitivnom ekspresijom GLUT-1, vimentina i N-kadherina bila je značajno kraća u poređenju s onima s negativnom ekspresijom GLUT-1, vimentina i N-kadherina. Eksperimentalno izazvana hipoksija ćelija analiziranog tkiva pojačala je ekspresiju GLUT-1, vimentina i N-kadherina, i podsticala je invaziju i migraciju ćelija karcinoma larinksa putem epitelno-mezenhimalne tranzicije (Zuo et al. 2016).

Meta analiza Hua (Hu et al. 2022) ukazala je na relativno smanjenje limfocita i relativno povećanje neutrofila i trombocita u tkivu planocelularnog karcinoma larinksa, odnosno na povećanje odnosa broja neutrofila i limfocita (engl. "neutrophile lymphocyte ratio", NLR) i povećanje odnosa broja trombocita i limfocita (engl. "platelet lymphocyte ratio", PLR). Studije su dale 2 objašnjenja zbog čega visoki NLR predviđa lošu prognozu kod raka. Jedno objašnjenje je da neutrofili, kao tipične ćelije upale, mogu da proizvedu faktore rasta endotela krvnih sudova, faktore rasta samih tumorskih ćelija, hemokine, molekule za međućelijsku adheziju, interleukine 6 i 8, faktor rasta transformacije-beta i matriks metaloproteinaze. Svi ovi faktori promovišu angiogenezu i rast ćelija, čime olakšavaju tumorigenezu, metastaziranje i razvoj tumora (Shamamian et al. 2001; Lança et Silva-Santos 2012; Franz et al. 2021). Takođe, neutrofili mogu da sekretuju slobodne radikale kiseonika, azotni oksid i arginazu kako bi suzbili limfocite i ćelije ubice. Putem vodonik-peroksida i integrina neutrofili mogu da infibiraju proliferaciju T-ćelija (Pillay et al. 2012). Prema drugom objašnjenju, limfociti kao osnovna komponenta imunološkog sistema, održavaju antitumorski imunitet, odnosno suzbijaju rast, proliferaciju i metastaziranje tumorskih ćelija (Shen et al. 2021). Stoga, smanjenje broja limfocita može da ukaže na agresivniju formu karcinoma i nepovoljniji ishod po pacijenta. Kod većine čvrstih tumorskih tipova, podaci podržavaju važnu vezu između većeg broja tumor-infiltrirajućih limfocita u tkivu i boljih kliničkih ishoda (Garaud et al. 2022). Kao i neutrofili, i trombociti moduliraju promene u tumorskom tkivu. Tumorske ćelije često sekretuju inflamatorne medijatore- trombopoetin i faktor inhibicije leukemije, koji promovišu diferencijaciju megakariocita u trombocite. Sekretija ovih medijatora takođe olakšava aktivaciju trombocita. Povećani trombociti, zauzvrat, oslobađaju inflamatorne medijatore i faktore rasta endotela krvnih sudova kako bi promovisali angiogenezu tumora (Sharma et al 2014). Na taj način trombociti mogu da podstiču rast i metastaziranje tumora i da suzbijaju imunološke odgovore. Trombociti indukuju epitelno-mezenhimalnu tranziciju tumorskih ćelija putem aktivacije TGF β /Smad i NF- κ B signalnih puteva, čime promovišu njihovu metastazu (Labelle et al. 2011). Ukratko, NLR i PLR odražavaju ravnotežu između upalnog odgovora tumora i antitumorskog imunološkog odgovora i povezani su sa napredovanjem tumora. Njihovo povećanje ukazuje na nedovoljan imunološki odgovor na tumor i formiranje mikrookoline koja pogoduje rastu

tumora, što omogućava. Vrednost NLR efikasnija je u predviđanju lošijih prognoza maligniteta od PLR (Chen et al. 2018; Hu et al. 2022).

Teksturalna analiza kao alat za opisivanje i poređenje heterogenosti tkiva, odnosno međucelijske interakcije, započela je svoju primenu u laringologiji 2013. godine, kada je primenjena kao metod analize slika glasnica 198 pacijenata. Videostroboskopskim pregledom prikazane su glasnice, eksponirane u celosti- od prednje komisure do interaritenoidne regije, a sa video snimaka zabeleženi su dvodimenzionalni zapisi. Slike glasnica podvrgnute su analizi teksture primenom parametara zasnovanih na GLCM matrici. Pacijenti su podeljeni u dve grupe: one sa makroskopski benignim izgledom lezija i one sa izgledom lezija karakterističnim za malignu promenu. Teksturalne nepravilnosti upoređene su pomoću parametara zasnovanih na GLCM-u. Zatim je statistički procenjena povezanost između parametara analize teksture i dijagnoze. Nepravilnost teksture bila je negativno korelisana sa energijom i momentom inverzne razlike i pozitivno korelisana sa entropijom, varijansom, kontrastom, različitosti i srednjom vrednošću. Rezultati studije ukazali su da GLCM analiza doprinosi postizanju objektivne analize lezija glasnica na osnovu slike, posebno u vezi sa diferencijalnom dijagnozom benignih i malignih bolesti. Zaključeno je da ovaj pristup može biti korišćen za stvaranje algoritama koji omogućavaju reproducibilnu klasifikaciju laringealnih patologija. Međutim, ovaj računarski bazirani sistem analize teksture nije bio koristan za razlikovanje premalignih od malignih lezija (Song et al. 2013).

U oblasti onkologije glave i vrata, dobijeni su značajni rezultati u korišćenju teksturalne analize prilikom razlikovanja citoarhitekture tkiva karcinoma sluznice orofarinksa u odnosu na zdravu sluznicu (Bicci et al. 2022). U studiji Kima i saradnika, GLMC analiza primenjena je na digitalne zapise koji su izdvojeni iz 18F-FDG PET/CT rađenih kod pacijenata sa karcinomom nepčanog krajnika, gde je radiološka slika kontralateralnog, zdravog krajnika korišćena kao kontrola. Studija je ukazala na statistički značajnu razliku svih GLCM parametara, posebno entropije u smislu diferencijacije zdravog tkiva i maligno izmenjenog, čak i kod najranijih oblika planocelularnog karcinoma sluznice orofarinksa (Kim et al. 2021).

Istraživanja su dokazala korisnost GLMC analize kao dopunske dijagnostičke metode i u razlikovanju planocelularnog karcinoma nepčanih krajnika i limfoma. Na osnovu analize radiomika izvedenih iz NMR ili 18F-FDG PET/CT, dobijeni su rezultati koji su ukazali na postojanje visoke tkivne heterogenosti u malignom tkivu planocelularnog karcinoma. Kod limfoma, zbog odsustva polja nekroze ili kolikvacije, tkivna heterogenost statistički je značajno niža (Bae et al. 2020; Mitamura et al. 2021). Studija Tomite i saradnika analizirala je digitalne zapise snimaka kompjuterizovane tomografije kod 23 pacijenta sa ukupno 201 cervikalnim limfnim čvorom koji su nakon radiološke dijagnostike hirurški uklonjeni u okviru disekcije vrata i potom histopatološki analizirani. GLCM analiza pokazala je da su 2 GLCM parametra- energija i entropija statistički značajni u razlikovanju patološki izmenjenih i patološki neizmenjenih limfonodusa (Tomita et al. 2021). Veliki izazov u onkologiji i otorinolaringologiji predstavlja dijagnostika primarnog karcinoma kod pacijenata kod kojih je klinički i histopatološki u limfnim čvorovima vrata verifikovana metastaza planocelularnog karcinoma neprepoznate primarne etiologije. Kod određenog broja pacijenata, primarni karcinom lokalizovan je unutar nepčanog krajnika koji klinički može izgledati zdravo. U retrospektivnoj studiji Lija i saradnika analizirani su NMR snimci nepčanih krajnika kod pacijenata kod kojih su kasnije rađene tonzilektomije sa histopatološkom verifikacijom tkiva zbog potrage za okultnim karcinomom. GLCM analiza tkivne heterogenosti kao dopunska analiza u tumačenju radioloških snimaka poboljšala je tačnost radiološke dijagnostike u smislu razlikovanja zdravih nepčanih krajnika i krajnika sa karcinomom za 34.6% (Lee et al. 2021). U retrospektivnoj studiji koju su sprovedli Rič i saradnici, analizirani su radiološki snimci pacijenata sa planocelularnim karcinomom nepčanih krajnika, pre početka onkološkog lečenja. U daljem toku bolesti, kod određenog broja pacijenata razvile su se udaljene metastaze, dok kod drugih nisu. GLCM analiza sprovedena je na radiomicima, a model mašinskog učenja baziran na GLCM analizi citoarhitekture

tkiva tonzila uspevao je da razlikuje 2 grupe izuzetno precizno, sa medijanom površine ispod krive ROC-a od 0,90 (Rich et al. 2021).

Teksturalna analiza izvršena na slikama kompjuterizovane tomografije planocelularnog karcinoma usne duplje pokazala je značajne razlike u nekoliko parametara između tkiva pozitivnog na humani papiloma virus (HPV) i tkiva u kojem se ovaj virus ne detektuje (Fujita et al. 2016; Lee et al. 2019; Mungai et al. 2019). Lee i saradnici objavili su da su vrednosti entropije i standardne devijacije kod HPV pozitivnih planocelularnih karcinoma usne duplje statistički značajno niže nego kod HPV negativnih lezija (Lee et al. 2019). Mungai i saradnici takođe su objavili da postoje značajne razlike u višestrukim parametrima teksture između HPV negativnih i HPV pozitivnih planocelularnih karcinoma usne duplje. Obe studije utvrdile su veću intratumorsku heterogenost u HPV negativnim karcinomima, što se objašnjava prisutnošću neovaskularizacije, nekrotičnih područja i obilnog ekstracelularnog matriksa unutar HPV negativnih tumora (Mungai et al. 2019). Studija Rena i saradnika iz 2020. godine analizirala je dvodimenzionalne slike i trodimenzionalne prikaze kompjuterizovane tomografije orofaringealnog planocelularnog karcinoma usne duplje koji su histopatološki i imunološki verifikovani kao HPV negativni ili HPV pozitivni i našla je slične rezultate kao u prethodno navedenim studijama (Ren et al. 2020). Studija koju su sprovedi Bos i saradnici na NMR snimcima 153 pacijenta pokazala je da je GLCM analiza korisna za diferencijaciju između HPV pozitivnih i HPV negativnih planocelularnih karcinoma sluznice orofarinksa zbog njihovih različitih bioloških karakteristika. HPV pozitivni primarni tumori imaju pravilniji oblik, kao i više vrednosti parametara homogenosti teksture. Nasuprot tome, HPV negativni primarni tumori su nepravilniji, sa različitim stepenima intratumorske diferencijacije koja se ogleda u heterogenosti teksture (Bos et al. 2021). Rezultati ovih istraživanja sugerišu da bi GLCM analiza mogla da ima potencijal i za opisivanje histopatološke razlike zasnovane na HPV statusu.

Meng-Jia i saradnici su 2018. godine analizirali dvodimenzionalni signal dobijen mikroskopiranjem i snimanjem 2 grupe histopatoloških uzoraka sluznice usne duplje, koji su čuvani u formalinu, a potom bojeni hematoksilin-eozinom, slično kao i u našem istraživanju. Jednu grupu uzoraka su činili uzorci normalnog tkiva sluznice, a drugu tkivo planocelularnog karcinoma usne duplje. Studija je pokazala da maligno izmenjeno tkivo ima viši kontrast, entropiju i nižu energiju, korelaciju i homogenost, sa statistički značajnom razlikom u većini opisivanih vrednosti (Meng-Jia et al. 2018). U radu Rahmana i saradnika na osnovu parametara GLCM analize klasifikovane su mikroskopske slike planocelularnog karcinoma usne duplje u 2 kategorije- benigno i maligno tkivo. Nakon analize teksturalnih karakteristika slika, za klasifikaciju je korišćen SVM (engl. "Support Vector Machine") model i postignuta je tačnost od 99.78 % u smislu klasifikacije tkiva (Rahman et al. 2020).

Studije koje su se fokusirale na procenu heterogenosti tkiva i njen uticaj na prognozu kod pacijenata sa T3 i T4 planocelularnim karcinomom sluznice orofarinksa, ukazale su da su parametri tkivne uniformnosti nezavisni prediktor ishoda, posebno prognoze progresije slobodnog preživljavanja i ukupnog preživljavanja (Cheng et al. 2013; Cheng et al. 2015). Studija sa analizom histopatoloških nalaza planocelularnog karcinoma usne duplje poredila je GLCM analize ovog tkiva sa karakteristikama neizmenjenog epitelnog, vezivnog i mišićnog tkiva usne duplje i dokazala da maligno izmenjeno tkivo ima značajno više vrednosti parametara kontrasta i entropije, a niže vrednosti korelacije, homogenosti i energije. Rezultati su pokazali da GLCM analiza precizno diferencira zdravo od malignog tkiva (Lian et al. 2018). U drugoj studiji, GLCM algoritam je sa stoprocentnom preciznošću diferencirao zdravu sluznicu usne duplje od prekanceroznih lezija, odnosno leukoplakije i eritroplakije (Shah et al. 2022).

U svom istraživanju, Hao i saradnici dizajnirali su model prepoznavanja i klasifikacije histopatoloških slika raka dojke na osnovu karakteristika analize teksture GLCM metodom. Uzorci za analizu prikupljeni su putem hirurške otvorene biopsije, a potom od strane patologa obojeni hematoksilinom i eozinom, kao i u našem istraživanju. Skup podataka obuhvatao je 7909

mikroskopskih slika tkiva tumora dojke 82 pacijenta, podjeljenih na benigne i maligne tumore, uključujući 2480 benignih (24 pacijenta) i 5429 malignih (58 pacijenata). Svaka vrsta je dodatno podjeljena na četiri potklase. Benigne vrste obuhvatale su adenozu, fibroadenom, filodni tumor i tubularni adenom, dok su maligne vrste obuhvatale duktalni karcinom, lobularni karcinom, mukozni karcinom i papilarni karcinom. Na dvodimenzionalne zapise histopatološkog preparata primjenjena je GLCM analiza. Studija je pokazala da su jedra maligno izmenjenog tkiva dojke veća od jedara neizmenjenog tkiva, kao i da su gusto raspoređena. Primena DenseNet konvolutivne mreže koja je razvijena za opisivanje strukture slika dala je veći broj informacija o tkivnoj arhitekturi i izmenjenosti ćelija u odnosu na samu GLCM analizu. Tačnost na nivou slike i pacijenta za klasifikaciju malignih i benignih stanja iznosila je 95,56% i 95,54%, redom. Studija je ukazala na veliki potencijal korišćenja GLCM analize i neuralnih mreža u kontekstu diferencijacije benignog i malignog tkiva (Hao et al. 2022). U radu Kana i saradnika, istraživane su GLCM teksturalne karakteristike ćelija tkiva dojke, a SVM-baziran klasifikator (engl. "Support Vectors Machines", metoda potpornih vektora) koristio se za klasifikaciju ćelija u maligne i benigne. Predloženi pristup je validiran kroz eksperimente nad stvarnim skupovima podataka citoloških slika u smislu segmentacije kancerogenih ćelija i klasifikacije ćelija u maligne i benigne. Eksperimenti su pokazali da predloženi pristup pruža značajna poboljšanja u detekciji i klasifikaciji ćelija u poređenju sa detekcijom i klasifikacijom baziranom na uobičajenoj proceni patologa rutinskim tehnikama. Eksperimentima je utvrđeno da predloženi pristup postiže visoku tačnost (96,3%) u klasifikaciji malignih i benignih ćelija (Khan et al. 2022). Slična studija iz 2023. godine (He et al. 2023) analizirala je 3000 slika dobijenih sa histopatoloških preparata sluznice grlića materice (1000 slika nepromenjenog tkiva, 1000 slika benigno izmenjenog tkiva i 1000 slika maligno izmenjenog tkiva). Teksturalne karakteristike dobijene su GLCM metodom. 80 procenata celokupnog skupa podataka nasumično je odabrano kao skup za treniranje modela dok je preostalih 20 procenata predstavljalo skup za testiranje, kao i u našem istraživanju. Tačnost klasifikacije SVM metodom iznosila je 96,8%, pri čemu su karakteristike jedra bile od ključnog značaja u SVM klasifikaciji slika histopatologije grlića materice.

Studija Dinčića i saradnika ispitivala je 2 vrste tkiva štitne žlezde- tkivo gde je histopatološki verifikovan Hashimoto tireoiditis i tkivo verifikovano kao papilarni karcinom tireoidne žlezde. Ove dve vrste patološki izmenjenog tkiva u određenom broju slučajeva dele slične nuklearne karakteristike. Studija je za cilj imala kvantifikaciju razlika između ispitivanih uzoraka korišćenjem fraktalnih parametara, kao i parametara tekture matrice pojavljivanja nivoa sive boje (GLCM) kako bi se smanjilo subjektivno iskustvo posmatrača. Analizirano je 250 segmentiranih jedara po grupi korišćenjem ImageJ softvera, kao i algoritmom za GLCM analizu. Srednje vrednosti parametara izračunate su za svakog pacijenta. Rezultati su pokazali da maligne ćelije iz uzoraka tkiva papilarnog karcinoma pokazuju nižu fraktalnu dimenziju hromatina i veću lakunarnost u poređenju sa odgovarajućim ćelijama iz uzoraka Hashimoto tireoiditisa. Takođe, postojala je statistički značajna razlika između ispitivanih uzoraka u kontrastu, korelaciji, angularnom drugom momentu i homogenosti GLCM-a. Zaključeno je da se razlike u fraktalnim i GLCM parametrima hromatina mogu integrisati sa drugim dijagnostičkim metodama, a u cilju povećanja preciznosti dijagnostike oboljenja štitne žlezde (Dincic et al. 2020). Studija Zaoa i saradnika iz 2023. godine analizirala je tkivo jajnika kombinacijom multimodalnih optičkih sistema sa računarskim algoritmima kako bi se detektovala različita patološka stanja (benigne promene, karcinom jajnika, nekroza tkiva). Dvodimenzionalni zapisi kreirani su snimanjem dvofotonskom fluorescentnom mikroskopijom. Brza Furijeova transformacija i GLCM analiza primenjene su za analizu tekture tkiva. Rezultati su pokazali da se benigni tumori, visoko-gradirani serozni karcinomi i nekrotično tkivo mogu precizno identifikovati na osnovu analize tekture tkiva i arhitekture rasporeda kolagenskih vlakana. Upoređivanje sa tradicionalnim metodama patološke dijagnostike je otkrilo da primena GLCM algoritama može biti brz i verodostojan alat za dijagnozu kancera (Zao et al. 2023).

U našem istraživanju dokazana je statistički značajna razlika u parametrima tkivne heterogenosti između tkiva karcinoma i tkiva maligno neizmenjene sluznice. Takođe, dokazano je i da epitelne

ćelije u karcinomu grkljana, u poređenju sa morfološki sličnim ćelijama benignog tkiva, imaju statistički značajno drugačije nuklearne GLCM karakteristike. Dokazano je i da postoje značajne razlike u pokazateljima DWT između ove dve grupe ćelija koje se pri konvencionalnoj mikroskopiji čine morfološki identičnim. Ovi nalazi impliciraju da nuklearni teksturalni obrasci u jedrima epitelnih ćelija u kancerogenom tkivu pokazuju suptilne razlike koje se mogu detektovati korišćenjem savremenih računarskih metoda (Valjarevic et al.2023). Postoji nekoliko mogućih objašnjenja za promene u nuklearnoj strukturi pločastih epitelnih ćelija specifičnih za planocelularni karcinom larinksa, koje bi mogle rezultirati приметnim promenama u pokazateljima GLCM i DWT. Maligne ćelije obično imaju nepravilnu distribuciju hromatina koja je ponekad, ali ne uvek vidljiva pri konvencionalnoj svetlosnoj mikroskopiji (Gupta et al. 2020). Područja kondenzovanog i vrlo gustog hromatina koja se često javljaju kao komadići i grudvice mogu se приметiti na različitim mestima u jedru. Pri standardnom bojenju biopsijskih uzoraka, nuklearna struktura malignih ćelija može biti grublja, što se može, ali ne mora odražavati na teksturalne karakteristike. Takođe, hromatin malignih ćelija često pokazuje tzv. "hiperhromaziju", fenomen gde se hromatin intenzivnije boji i izgleda tamnije u poređenju sa hromatinom nekancerogenih ćelija. Međutim, nijedna od ovih promena u izgledu hromatina nije specifična za kancerogene ćelije, jer su obrasci hromatina u fiziološkim uslovima vrlo raznoliki. Osim karcinoma, i druga patološka stanja (npr. oštećenje ćelija usled oksidativnog stresa ili događaji koji prethode smrti ćelija) takođe mogu biti povezane sa sličnim promenama u organizaciji ili distribuciji hromatina. (Pantic et al. 2021; Paunovic et al. 2021). Potencijalna vrednost naše studije ogleda se u činjenici da smo se prilikom analize ćelijskih jedara fokusirali isključivo na epitelne ćelije pločasto slojevitog epitela sa "intaktnim" izgledom nuklearne strukture. Drugim rečima, isključene su sve ćelije koje pokazuju pomenute strukturalne promene i ćelije sa očiglednim malignim karakteristikama (npr. nuklearna pleomorfija). Stoga možemo pretpostaviti da su GLCM i DWT metode bile sposobne da otkriju mnogo suptilnije promene u distribuciji hromatina pločastih epitelnih ćelija povezane sa karcinomom pločastih ćelija larinksa, koje nisu vidljive u standardnoj svetlosnoj mikroskopiji, iako ova pretpostavka zahteva potvrdu u budućim istraživanjima.

Integracija mašinskog učenja u proces analize histopatoloških slika ima potencijal da napravi ogroman pomak u smislu mogućnosti efikasnijeg rada i dobijanja preciznijih rezultata (Valjarevic et al. 2023). Metode mašinskog učenja mogle bi se koristiti kako bi se automatizovala identifikacija promena karakterističnih za maligno izmenjene ćelije i izvršila precizna klasifikacija ćelija, kao i mogućih dijagnoza (Corridon et al. 2022; Pantic et al. 2023). Međutim, i dalje ne postoji rutinski prihvaćena metoda u histopatologiji koja koristi alate bazirane na procesima mašinskog učenja. Najveća ograničenja predstavljaju skupe hardverske računarske komponente, ograničena generalizacija algoritama, kao i potreba za obučavanjem osoblja. Ipak, očekivan je dalji razvoj novih tehnika baziranih na mašinskom učenju koje bi se mogle primenjivati u kliničkoj praksi histopatološke dijagnostike planocelularnog karcinoma larinksa (Kundrotas et al. 2023). Objektivno i precizno postavljanje histopatološke dijagnoze nije uvek lako zbog kompleksnosti parametara koji se posmatraju i analiziraju. Automatizacija ovog dijagnostičkog procesa korišćenjem računarskih metoda, mogla bi da bude rešenje u povećanju efikasnosti histopatološke analize. Digitalna obrada slika patoloških preparata, uz primenu mašinskog učenja i višeslojnih veštačkih neuronskih mreža omogućila bi obavljanje velikog broja zadataka u kratkom vremenskom intervalu. Određeni alati bazirani na mašinskom učenju već se primenjuju u medicini. Na primer, za detekciju ili identifikaciju tumora mozga, kičmenog stuba i grudnog koša, mogu se primeniti sledeće metode: K-means, Level Set, Adaboost, Naive Bayes klasifikator, ANN klasifikator, konvolucijske neuronske mreže, višeslojne perceptronske mreže za analizu magnetne rezonance i analizu tipa podataka kompjuterske tomografije (Zhao et al. 2021; Kundrotas et al. 2023). Duboki neuronski mrežni i konvolucijski neuronski mrežni modeli koriste se kao pomoć u klasifikaciji lezija raka kože i histoloških uzoraka tkiva raka pluća (Jiang et al. 2020).

U računarskoj analizi dvodimenzionalnih zapisa histopatoloških preparata, kao problem se javlja obrada velikog broja informacija ukoliko bi se analizirali podaci sa cele slike (engl. "Whole Slide Image", WSI). Zbog toga, većina automatskih metoda teksturalne analize podrazumeva prethodno ručno označavanje područja interesa (engl. "Region of Interest", ROI), kao što je rađeno u našem istraživanju. U radu Zhaoa i saradnika razvijena je višerezolucijska konvolucijska neuronska mreža koja automatski locira regione od interesa, a potom se analizom istih klasifikuju podtipovi nemikrocelularnih karcinoma pluća. Korišćenjem ove mreže postignuta je vrednost AUC (engl. "area under curve") od 0,9602 u lokalizaciji ROI, odnosno 0,9671 za klasifikaciju podtipova karcinoma pluća kod 1002 pacijenta (Zhao et al. 2021). Rad Bel Hamide i saradnika fokusirao se na upotrebu metoda dubokog učenja za klasifikaciju i označavanje regija od interesa u slikama histopatoloških preparata kolorektalnog karcinoma. Brojne konvolucijske neuronske mreže, kao i tehnike prenosa učenja testirane su u cilju automatske segmentacije slika, a potom su rađene analize obeleženih regiona od interesa. Različite kombinacije računarskih tehnika pokazale su tačnost u segmentisanju WSI i klasifikaciji karcinoma kolona u opsegu od 80 do preko 98% (Bel Hamida et al. 2022).

Studija Fatija i saradnika istraživala je hibridnu primenu konvolutivnih neuronskih mreža (modeli AlexNet i ResNet-18) i algoritma podržanih vektora (SVM) u cilju rane dijagnostike planocelularnog karcinoma usne duplje. Analizirane su karakteristike boje, teksture i oblika ćelija. Navedeni parametri histopatološke slike ekstrahovani su korišćenjem histograma zamućenih boja (FCH), diskretnom wavelet transformacijom (DWT), lokalnim binarnim obrascem (LBP) i matricom pojavljivanja nivoa sive (GLCM). Svi predloženi sistemi su postigli superiorne rezultate u histološkoj dijagnostici slike. Neuronska mreža zasnovana na hibridnim karakteristikama korišćenjem AlexNet, DWT, LBP, FCH i GLCM, postigla je tačnost od 99,1%, specifičnost od 99,61%, osetljivost od 99,5%, preciznost od 99,71% i AUC od 99,52% (Fati et al. 2022). U studiji koja je analizirala kliničke podatke i radiološke karakteristike 18F-FDG-PET snimaka kod pacijenata sa karcinomom larinksa, zaključeno je da alati mašinskog učenja mogu pomoći u predviđanju prognoze. Pacijentima sa malignitetom larinksa je pre sprovođenja onkoloških tretmana urađen 18F-FDG-PET/CT, a klinički i radiološki podaci korišćeni su za trening (34 pacijenata) i test (15 pacijenata). Kliničkih parametri (uzrast, pol, veličina tumora, T stadijum, N stadijum, stadijum bolesti, vrsta lečenja) i 40 radiomskih karakteristika baziranih na 18F-FDG-PET-u korišćeni su za predviđanje napredovanja bolesti i preživljavanja. Najvažnijih 5 karakteristika za predviđanje progresije bolesti bile su: veličina tumora, T stadijum, N stadijum, teksturalni parametar ZLNU (engl. "zone-length-non-uniformity", nejednoličnost dužine zona) i GLCM entropija. U obe kohorte, Bajesova mreža konstruisana na ovim karakteristikama bila je najbolji klasifikator (trening: AUC = 0,805; testiranje: AUC = 0,842). Model slučajnih šuma pokazao je najbolje performanse u predviđanju progresije slobodnog preživljavanja (trening: C-index = 0,840; testiranje: C-index = 0,808). Zaključeno je da analize mašinskog učenja koje uključuju kliničke i radiomske karakteristike bazirane na 18F-FDG-PET-u mogu pomoći u predviđanju progresije bolesti i preživljavanja kod pacijenata sa karcinomom larinksa (Nakajo et al.2023).

Modeli mašinskog učenja koje smo predložili u našem istraživanju pripadaju porodici modela mašinskog učenja pod supervizijom (Davidovic et al. 2021b). Ovo suštinski znači da bi mašina dobila veliki broj primera gde su izlazni podaci (u ovom slučaju dijagnoza) povezani sa ulaznim podacima (u ovom slučaju parametri teksturalne kvantifikacije). Tokom treniranja, model postaje sposoban da prepozna specifične organizacijske obrasce u asocijaciji podataka. U našem istraživanju, 80% podataka je korišćeno za treniranje modela, dok je preostalih 20% korišćeno za testiranje, što je proporcija koja se relativno često koristi prilikom treniranja modela. U slučaju RF-a, konstruiše se veliki broj stabala odlučivanja sa različitim arhitekturama, nakon čega se donosi odluka o klasifikaciji na osnovu odluka većine stabala (Kanai et al. 2020; Iqbal et al. 2021). Svi predloženi modeli imaju svoje prednosti i nedostatke, i mogu se koristiti kako na linearnim, tako i na nelinearnim podacima. U našem istraživanju, slučajne šume su se pokazale kao bolji pristup u odnosu na model zasnovan na binomialnoj logističkoj regresiji, kao i na model zasnovan na veštačkim neuralnim mrežama višeslojnog perceptrona, međutim, ovo ne znači nužno da će RF biti superiorniji u svim budućim

dijagnostičkim postavkama i populacijama ćelija. Uprkos potencijalnoj praktičnoj vrednosti rezultata predstavljenih u ovoj studiji, naše istraživanje je imalo nekoliko važnih ograničenja koja treba razmotriti. Prvo, neophodno je napomenuti da su i GLCM i DWT novi i neispitani metod u kliničkim naukama i patologiji, i primetne razlike u teksturalnim indikatorima možda nisu nužno prisutne u drugim uzorcima i kliničkim uslovima. Analize teksture GLCM i DWT na obojenom tkivu dobijenom biopsijom su donekle izazovnije u poređenju sa konvencionalnim tkivnim sekcijama zbog poremećaja citoarhitekture i nemogućnosti adekvatne vizualizacije specifičnih morfoloških karakteristika tkiva. Drugo, na osnovu našeg prethodnog iskustva, postoji širok spektar rezultata GLCM i DWT kada se primenjuju različiti mikroskopski i histološki protokoli. Na primer, bojenje konvencionalnim hematoksilinom-eozinom i Giemskom daće potpuno različite rezultate u pogledu prosečnih vrednosti uglovnog drugog momenta, inverzne razlike u momentu i drugih karakteristika. Isto važi i za različite podešavanja tokom mikroskopije i akvizicije slika, kao što su varijacije u ekspoziciji, kontrastu, balansu bele boje i formatu datoteke digitalnih mikrografija (npr. JPG naspram BMP). Takođe, danas postoji više različitih softverskih platformi za analizu GLCM-a, i na osnovu ranijih istraživanja, ove platforme ne daju iste vrednosti teksturalnih karakteristika kada se primene na iste regije interesa unutar mikrografija (Nikolovski et al. 2019; Davidovic et al. 2022). Stoga, uprkos činjenici da su GLCM i DWT objektivne i automatizovane metode, reproduktivnost rezultata je donekle upitna, što predstavlja potencijalno ozbiljan problem koji treba rešiti u budućim istraživanjima.

Modeli mašinskog učenja primenjeni u našem istraživanju takođe imaju određena ograničenja koja treba uzeti u obzir. Modeli su trenirani i testirani na relativno malom uzorku, i vrlo je moguće da bismo povećanjem uzorka postigli još veću tačnost klasifikacije i diskriminatornu moć (kvantifikovanu kao površina ispod krive karakteristike operativnog značaja). Drugo, treba naglasiti da se radi samo o hipotetičkim modelima, treniranim koristeći podatke o GLCM i DWT dobijene iz regiona interesa. U budućnosti, da bi ovi modeli bili zaista validni i primenljivi u patologiji, možda će biti potrebno posmatrati uzorak biopsije kao statističku jedinicu merenja, umesto kao region interesa. Nažalost, da bi se takav model zaista trenirao i testirao, bilo bi potrebno veliki broj uzoraka biopsije (i pacijenata), pa je izvodljivost takvog istraživanja prilično upitna. Moraju se razmatrati i opšta ograničenja modela mašinskog učenja u vezi sa njihovom interpretabilnošću. Mnogi algoritmi veštačke inteligencije su suštinski "crne kutije" modeli, što znači da proizvode tačne izlaze na osnovu ulaznih podataka, ali unutarnji mehanizmi modela ostaju nejasni i nisu objašnjivi (Kim et al. 2020; Pantic et al. 2022a). Drugim rečima, model proizvodi izlaz, ali precizna računarska putanja korišćena za generisanje tog izlaza može ostati nepoznata čak i najvećim stručnjacima za veštačku inteligenciju. Ova "crna kutija" priroda je izuzetno karakteristična za veštačke neuronske mreže višeslojnog perceptrona, i može značajno da ograniči njihovu reproduktivnost i primenljivost u kliničkoj praksi, dok je kod modela logističke regresije problem "crne kutije" najmanje prisutan.

U budućnosti, algoritmi dubokog učenja mogu biti primenjeni kako bi prevazišli trenutni jaz u znanju između mašinskog učenja u patologiji planocelularnog karcinoma i pravih sistema veštačke inteligencije. Duboki modeli učenja, posebno oni zasnovani na višeslojnim perceptronima i konvolutivnim neuronskim mrežama (engl. "Convolutive Neural Network", CNN), mogli bi da izračunaju karakteristike direktno iz sirovih podataka slika i pikselnih vrednosti, što bi dovelo do preciznijih i efikasnijih predikcija. Postoji mogućnost obučavanja ovih neuronskih mreža da računaju GLCM i DWT karakteristike i koriste ih za obuku dodatnih mreža za klasifikaciju slika ili ROI-ja. Pored toga, CNN modeli se mogu obučiti da identifikuju druge kompleksne obrasce i karakteristike u digitalnim mikrografima histopatoloških preparata sluznice larinksa, što dodatno poboljšava tačnost klasifikacije i diskriminatornu moć u poređenju sa drugim metodama mašinskog učenja, kao što su slučajne šume i podrška vektorskim mašinama. Međutim, treba napomenuti da primena dubokih učenja zahteva značajno veći skup podataka, kao i podešavanje hiperparametara i testiranje različitih arhitektura neuronskih mreža, što zahteva značajne računarske resurse koji obično nisu dostupni u

standardnim laboratorijskim uslovima (Valjarevic et al.2023, Pantic et al. 2023). Bez obzira na to, metode dubokog učenja nude značajan potencijal za poboljšanje pristupa mašinskog učenja.

Klinički i molekularni podaci o karcinomu sve su obimniji, što podstiče očekivanje da bi računarski algoritmi mogli da donesu velike promene u dijagnostici i lečenju karcinoma. Do sada su računarski algoritmi najviše bili korišćeni u smislu formiranja baza podataka, informacionih sistema i olakšavanja komunikacije među lekarima i zdravstvenim institucijama. Potencijalna korist AI u otorinolaringologiji, hirurgiji i onkologiji obuhvata dijagnostiku, prognozu, predviđanje ishoda lečenja i donošenje odluke o najpovoljnijem tretmanu. Sa sve većom dostupnošću velikih kliničkih i molekularnih podataka o raku, veštačka inteligencija i mašinsko učenje sve više se istražuju radi pomoći u kompleksnom procesu donošenja odluka o lečenju raka (Derbal Y. 2022). Savremene računarske metode u najvećoj meri primenjuju se u analizi radioloških snimaka i histopatoloških preparata, ali se sa daljim razvojem informacionih tehnologija procenjuje da će one biti sastavni deo procesa odlučivanja o selekciji pacijenata za hirurško lečenje, kao i tipu hirurškog lečenja i hirurške rekonstrukcije (Hashimoto et al. 2018; Derbal et al. 2022). Analizirajući opšte stanje pacijenta, komorbiditete, laboratorijske analize i druge nalaze od značaja alati veštačke inteligencije mogli bi da procene koliko je sam hirurški zahvat rizičan po pacijenta i da li bi manje rizično bilo sprovesti drugi tip onkološkog lečenja (na primer, radioterapiju). Na osnovu računarske analize radioloških snimaka mogla bi se proceniti malignost uvećanih čvorova na vratu kod onih pacijenata kod kojih je zbog teškog opšteg stanja nemoguće raditi disekciju vrata. Postoje predviđanja da će u budućnosti, hirurg u redovnom praćenju pacijenta imati pristup rezultatima analiziranim postoperativnim parametrima (radiološki nalazi, rezultati krvne slike, gubitak mase, psihološki status pacijenta) koji će olakšati odluke o daljem tretmanu i ukazati na specifične probleme kod svakog pacijenta pojedinačno (Bassani et al. 2022). Automatska analiza svih dostupnih parametara vezanih za bolest mogli bi da doprinesu razvijanju personalizovane preoperativni i postoperativne nege. Takođe, hirurg bi mogao da utvrdi ili promeni odluku o obimu hirurške resekcije u toku same operacije, na osnovu računarskih programa koji bi integrisali podatke sa snimanja operativnog zahvata, kontaktne endoskopije, intraoperativne elektroneurografije i elektromiografije. Intraoperativni monitoring kliničkih parametara mogao bi da poboljša odlučivanje u realnom vremenu i da spreči nastanak intraoperativnih komplikacija (Derbal et al. 2022).

Hirurzi donose odluke na osnovu svoje edukacije, iskustva i znanja, ali određeni stepen pristrasnosti u donošenju istih može da postoji. Prisustvo kognitivnih pristrasnosti u medicinskom razmišljanju podrazumeva određeni stepen varijabilnosti, nepreciznosti i čak grešaka u fazama dijagnostike, terapijske odluke i praćenja (Loftus et al. 2020). U određenom broju slučajeva, lekari donose odluke koje nisu zasnovane na dokazima, zbog nepoznavanja ili neslaganja sa novim preporukama, prethodnog ličnog iskustva i inercije u praksi. Zbog razvijanja informacionih tehnologija i eksponencijalnog povećanja količine zdravstvenih podataka, računarski alati se brzo razvijaju i mogli bi da predstavljaju značajnu podršku medicinskom zaključivanju. Tehnike mašinskog učenja imale bi veliki potencijal da poboljšaju praksu hirurga u svim fazama upravljanja pacijentima: rano otkrivanje bolesti, dijagnostika, terapijska odluka, hirurški postupak, praćenje. Računarski sistemi omogućavaju obradu brojnih setova podataka o pacijentima, koji mogu biti preneti u matematičke modele i obogaćeni teoretskim znanjem da bi preporučili određeni vid lečenja. Veštačka inteligencija mogla bi da se koristi kao alat za podršku odlučivanju, gde bi imala dva osnovna zadatka: da nadoknadi različite nivoe znanja i iskustva hirurga objektivno i individualno analizirajući podatke o pacijentu; i da istakne klinički relevantne korelacije koje lekari možda ne prepoznaju (Derbal et al. 2022).

Takođe, alati bazirani na mašinskom učenju mogli bi da se koriste za poboljšanje unapređenja i deljenja znanja kroz sakupljanje velikih količina intraoperativnih podataka od strane brojnih hirurga širom sveta. Generisanje velike baze onkoloških protokola i procena ishoda lečenja imalo bi veliki značaj u edukaciji lekara ali i u komunikaciji među njima. Alati buduće veštačke inteligencije mogli bi da sadrže i video zapise u svojim bazama podataka. Na taj način zabeležili bi se specifični lokalni

intraoperativni nalazi ili varijeteti u anatomiji, sakupljali i integrisali podaci kroz pre-, intra- i postoperativne faze nege. Takve obimne i složene analize mogle bi stvoriti zaista značajnu inovaciju u generisanju i validaciji najboljih praksi za poboljšanje kvaliteta nege, zasnovanih na dokazima (Mahmood et al. 2021). AI takođe može biti korišćen za kreiranje realističnijih simulacionih okruženja, čime se omogućava vežbanje u kontrolisanim i realističnim virtuelnim prostorima (Pakkasjärvi et al. 2023). Brojni modeli mašinskog učenja već se razvijaju u oblasti predviđanja postoperativnih komplikacija. ACS kalkulator hirurškog rizika kao i brojni drugi algoritmi mašinskog učenja sa visokom preciznošću predviđali postoperativne komplikacije, kao i postoperativnu smrtnost kod hirurških pacijenata (Bertsimas et al. 2018; Clark et al. 2018; Bihorac et al. 2019; Hyde et al. 2019). U studiji Šikela i saradnika, analiziran je model dubokog učenja DeepSOFA, razvijen na Odeljenju za biomedicinsko inženjerstvo Univerziteta u Floridi, a koji je koristio SOFA (engl. "Sequential Organ Failure Assessment") varijable za predviđanje letalnog ishoda kod pacijenata u jedinici intenzivnog lečenja. SOFA uzima u obzir 13 varijabli koje predstavljaju šest različitih sistema organa (kardiovaskularni, respiratorni, nervni, funkcija jetre, bubrega i procesa koagulacije) i koristi vrednosti parametara njihove funkciju kako bi dodelio numeričke ocene za svaku komponentu. Model je validiran kroz 36 216 prijema, odnosno 48 948 prijema u intenzivnu negu u 2 različita medicinska centra. Model je treniran na slučajno odabranih 80% prijema, a testiran na preostalih 20% i predviđao je letalni ishod kod pacijenata sa većom preciznošću nego dotadašnje procene kliničara korišćenjem konvencionalnih skorova (AUC 0,90 naspram 0,85) (Shickel et al. 2019). Studija Brenana i saradnika analizirala je tačnost procene mogućih postoperativnih komplikacija kod pacijenata planiranih za hirurško lečenje. Komplikacije koje su se procenjivale bile su: potreba za lečenjem u jedinici intenzivne nege duže od 48 časova, potreba za mehaničkom ventilacijom duže od 48 časova, akutno otkazivanje bubrega, kardiovaskularne komplikacije, sepsa, neurološke, tromboembolizam, komplikacije rane i mortalitet unutar 30 dana. Studija je obuhvatila je 20 lekara (hirurga, anesteziologa i specijalista urgentne medicine) u kvartarnom akademskom medicinskom centru, gde je upoređivana upotrebljivost i tačnost preoperativne procene rizika između lekara i MySurgeryRisk, validiranog algoritma za mašinsko učenje, koristeći simulirani tok rada za platformu stvarnog vremena sa inteligentnom podrškom za donošenje odluka. Poređena je tačnost procene rizika od strane lekara i od strane računarskog algoritma za šest postoperativnih komplikacija. AUC vrednost tačnosti procene algoritma MySurgeryRisk kretala se između 0,73 i 0,85 i bila je značajno bolja od početnih procena rizika lekara (AUC između 0,47 i 0,69) za sve postoperativne komplikacije osim kardiovaskularnih. Nakon interakcije sa algoritmom, lekari su značajno poboljšali procenu rizika za akutno oštećenje bubrega i za prijem u jedinicu intenzivne nege duže od 48 sati, što je rezultiralo poboljšanjem reklasifikacije od 12% i 16% redom. Lekari su ocenili algoritam kao jednostavan za korišćenje i koristan (Brennan et al. 2019). U studiji Loftusa i saradnika, retrospektivno su analizirani podaci o pacijentima koji su bili podvrgnuti angiografiji ili endoskopiji gastrointestinalnog trakta. Na osnovu podataka kao što su vrednosti sistolnog krvnog pritiska, terapija aspirinom, vrednosti INRa i indeks komorbiditeta, veštačka neuronska mreža je tačnije predvidela ozbiljno krvarenje kod pacijenata nego uobičajen klinički skor koji koriste zdravstveni radnici. Preciznost predviđanja neuralne mreže bila je značajno veća, u odnosu na procenu lekara (AUC 0,66 u odnosu na 0,98) (Loftus et al. 2017). Model mašinskog učenja pod nazivom Artificial Intelligence Clinician razvijen je u cilju preporuke strategije lečenja sepse odraslih pacijenata u jedinicama intenzivnog lečenja. Studija koja je analizirala podatke o više od 90 000 pacijenata iz 128 različitih bolnica ukazala je da su najmanju smrtnost imali oni pacijenti kod kojih je ordiniranje vazopresora i intravenskih rastvora bilo u skladu sa preporukama iz računarskog modela (Komorowski et al. 2018).

Roboti i druge pomoćne tehnologije bazirane na alatima veštačke inteligencije u budućnosti mogu biti primenjeni za obavljanje određenih zadataka tokom hirurških procedura. Takvi zadaci mogu uključivati tehničke aspekte poput pravljenja rezova, ušivanja i zatvaranja rana, čime omogućavaju hirurgu da se usredsredi na suštinske komponente operacije (Pakkasjärvi et al. 2023). Robotski sistemi već se koriste u hirurgiji kako bi eliminisao fiziološki tremor, pružajući robotizovanim

hirurzima mnogo veću kontrolu u minimalno invazivnim procedurama i smanjujući rizik od jatrogenih povreda. Robotska asistencija može omogućiti efikasniju, smireniju i sigurniju endoskopsku hirurgiju. Ipak, potpuno autonomni hirurški roboti neće biti naša realnost u skorijem vremenskom periodu (Bhandari et al. 2020; Bramhe et al. 2022).

AI tehnologije postaju sve veći deo savremene medicine i nose veliki potencijal za unapređivanje brojnih aspekata onkološkog i hirurškog lečenja (Valjarevic et al. 2023). Nemoguće je predvideti u kom obimu i kojom brzinom će se menjati protokoli dijagnostike, lečenja i postoperativne nege, ali moguće je da će se uloga budućeg hirurga značajno razlikovati od onoga na šta smo trenutno navikli. Određene studije procenjuju da bi korišćenje sistema zasnovanih na veštačkoj inteligenciji dovelo do godišnjih ušteda od 300 do 450 milijardi dolara samo u Sjedinjenim Američkim državama (Groves et al. 2016), tako da postoji veliki ekonomski podsticaj za razvijanjem ovih sistema. Otorinolaringolozi, onkolozi i patolozi trebalo bi da budu angažovani u aktivnom učešću u uvođenju ovih inovacija, zajedno sa stručnjacima iz oblasti informacionih tehnologija. Zajedničkom saradnjom kreirala bi se automatizovana rešenja za probleme analiziranja podataka koji bi inače bili previše skupi ili vremenski zahtevni za obradu neautomatskim putem. Formiranje baza podataka o parametrima značajnim za oboljenje i o ishodima lečenja omogućila bi lekarima da unaprede kvalitet svih aspekata dijagnostike, lečenja i nege. Hirurzi bi trebalo da inženjerima prenesu razumevanje relevantnosti i značaja veze između bazičnih tema, kao što su anatomija i fiziologija organa, do složenijih fenomena, kao što su patofiziologija bolesti, hirurški tok planiranih intervencija ili postoperativne komplikacije. Ovi tipovi odnosa su važni za pravilno modeliranje i predviđanje kliničkih događaja i kritični su za poboljšanje interpretabilnosti AI pristupa. U oblasti hirurgije, sistemi zasnovani na veštačkoj inteligenciji mogli bi da budu primenjeni kao tehnološki nadograđena podrška za kliničke odluke u realnom vremenu, kao što je intraoperativno navođenje slično globalizacionom pozicionom sistemu GPS (Hashimoto et al. 2018).

Razvoj automatizovanih sistema koji bi poboljšali ljudske sposobnosti i pružili negu koja bi zadovoljila, ako ne i premašila postojeće standarde jeste nešto što bismo mogli očekivati u bliskoj budućnosti. Uz odgovarajući razvoj i implementaciju, alati bazirani na veštačkoj inteligenciji, imali bi potencijal da donesu značajnu promenu u načinu na koji se hirurgija uči i praktikuje. Obučavanje mlađih generacija za korišćenje novih tehnologija, sistematsko uključivanje podataka u institucionalne baze podataka i uvođenje zajedničkih medicinskih i inženjerskih kurseva omogućilo bi da se u godinama koje dolaze na najbolji način alati veštačke inteligencije integrišu u oblast otorinolaringologije (Haenlein et al. 2019; Derbal 2022). Razvijanje savremenih računarskih metoda već je dovelo do razvoja nove grane patologije, koja se naziva računarskom patologijom (engl. „computational pathology”, CPATH). Iako proces digitalizacije značajno olakšava čuvanje i analizu podataka, prelaz sa konzervativnog rada na računarski unapređen proces zahteva posebnu opremu za digitalnu patologiju, sisteme za upravljanje slikama, ali i dodatno obučene tehničare i lekare, što podrazumeva i značajne finansijske troškove (Kim et al. 2022). Ipak, određene studije pokazale su da su patolozi koji su koristili algoritamske podrške u svom radu imali veću preciznost u određivanju histopatoloških nalaza, kao i efikasnost u smislu utrošenog vremena (Serag et al. 2019; Jiang et al. 2020).

Jasno je da su računarski izračunate korelacije između tretmana i ishoda pacijenta ograničene u svojoj prediktivnoj snazi zbog različite i veoma često nepredvidive dinamike tumorskog rasta. Upotreba AI-a jeste vrlo efikasna u analiziranju velikog broja podataka za rešavanje zadatih problema, ipak, repliciranje uspeha AI-a u odlučivanju o lečenju u onkologiji nije sasvim potvrđeno (Strickland 2019). Heterogenost i brzina rasta karcinoma mogu učiniti svaki novodijagnostikovani karcinom dovoljno različitim od mašinski naučenih statističkih obrazaca tako da računarski algoritmi ne mogu dati pouzdane zaključke o preporukama za lečenje. Nadalje, longitudinalna priroda nege raka zahteva od AI algoritama da budu prilagodljivi neizbežnim promenama patofiziologije tumora koje se javljaju tokom vremena i nakon primenjenog hirurškog, radiološkog ili hemioterapijskog lečenja. S obzirom na te jedinstvene izazove, dosadašnja istraživanja potencijalne primene AI u

hirurgiji i onkologiji pokazala su da lečenje karcinoma predstavlja jedinstveni izazov koji ne može da se reši isključivo mašinskim modelima (Gatenby et Brown 2020; Derbal 2022).

Implementacija novih tehnologija koje donosi AI u svakodnevnu kliničku praksu mora odgovoriti na određene tehničke, društvene i etičke izazove. Algoritmi mašinskog učenja zahtevaju značajne količine podataka kako bi se obučili i pružili zadovoljavajuće rezultate. Potrebna količina podataka zavisi od nekoliko činilaca, kao što su vrsta podataka za obuku, vrsta algoritma, broj parametara u obuci i kvalitet podataka (Ngiam et al. 2019). Velika raznolikost zdravstvenih podataka sadržanih u medicinskoj dokumentaciji zahteva značajne napore u prikupljanju, organizovanju i standardizaciji podataka kako bi se postigla interoperabilnost na tehničkom, semantičkom i organizacionom nivou. Označavanje podataka potrebnih za nadzirano obučavanje obično vrši lekar koji ima pristup kompletnom medicinskom kontekstu koji se proučava. Ovaj zadatak zahteva veliku količinu vremena, oduzima vreme posvećeno brizi o pacijentima i može dovesti do grešaka u označavanju, a ponekad i do značajne intraopservatorske varijabilnosti. Sa druge strane, angažovanje više lekara koji su zaduženi za ovaj zadatak moglo bi dovesti do određene interopservatorske varijabilnosti u označavanju i samim tim do pristrasnosti skupa podataka (Rasteau et al. 2022). Naime, bilo kakva pristrasnost koja bi bila uneta u podatke za obuku bila bi naučena i reprodukovana od strane modela, što bi rezultiralo nepreciznim ili pogrešnim rezultatima. Stoga je neophodno validirati sposobnost generalizacije algoritama na novim podacima u opštoj populaciji, po mogućstvu obezbeđenim od strane druge ekipe i druge ustanove, kako bi se identifikovale i ograničile ove intrinzične pristrasnosti. Nedostatak kliničke validacije AI algoritama predstavlja jednu od značajnih prepreka za široko usvajanje AI modela u kliničkom odlučivanju (Derbal 2022). Na algoritamskom nivou, najvažnija prepreka za masovnu upotrebu AI u zdravstvu jeste loša objašnjivost mehanizama koji leže u osnovi dijagnostičkih ili prediktivnih rezultata modela. Naime, trenutno je teško znati koji je značaj različitih parametara predstavljenih algoritmima u donošenju odluke, čija je sve složenija arhitektura asimilirana u crnu kutiju (Pantic et al. 2022). Rešavanje ovog problema verovatno bi povećalo stepen prihvatanja AI u strukturama zdravstvene zaštite, kako od strane pacijenata, tako i od strane lekara.

U budućnosti se očekuje sve veći razvoj zakonskih okvira i propisa vezanih za primenu AI. Nedostatak propisa mogao bi da ima posledice štetne i po razvijanje i po implementaciju novih tehnologija u medicini, dok bi nas, sa druge strane, prestroga regulacija sprečila da u potpunosti iskoristimo sve potencijalne koristi koje AI može ponuditi. Zaštita ličnih podataka pacijenata predstavlja apsolutni prioritet, te se moraju razvijati prakse koje vode bezbednom i etičkom razvoju i upravljanju AI, kao što su osiguravanje integriteta podataka, algoritama i sistema; zaštita privatnosti i ličnih informacija. Zdravstveni podaci smatraju se osetljivim ličnim podacima i njihova zaštita mora da bude osigurana u svim fazama dizajna, implementacije i upotrebe algoritama. Bezbednosna ograničenja i propisi moraju da budu suštinski usmereni na to da se obezbedi da primene AI-a budu u potpunosti korisne i bezbedne (Keskinbora et al. 2019; Goirand et al. 2021; Kazim et Koshiyama 2021). Sa etičkog aspekta, potrebno je osigurati da se implementacija savremenih računarskih metoda sprovodi u skladu sa moralnim vrednostima koje su fundamentalne za praksu medicine-poboljšavanje nege pacijenata (princip dobrobiti), izbegavanje neželjene štete i potencijalne namerne štetne upotrebe (princip nenanošenja štete), kao i sprečavanje da odluke donete od strane računarskih sistema budu u sukobu sa slobodom zdravstvenih radnika da deluju samostalno (princip autonomije). Konačno, AI sistemi trebalo bi da doprinesu smanjenju društvenih nejednakosti u zdravlju, koje su još uvek vrlo prisutne u svetu. U tu svrhu, ovi sistemi će morati biti dostupni što većem broju ljudi, kako se ne bi pogoršao već postojeći disparitet (Keskinbora et al. 2019; Drabiak et al. 2023). Takođe, biće neophodno stalno sagledavanje i kritičko razmišljanje u vezi sa novim tehnologijama, posebno u kontekstu alata za dijagnostičku ili terapijsku podršku odlučivanju. Neophodno je da se izbegne eventualna automatizacijska pristrasnost, odnosno ljudska tendencija da se favorizuju odluke generisane mašinskim putem. Potrebno je razvijanje etičkih normi, ali i savremenih zakona koji bi bili usaglašeni sa potencijalnom primenom alata baziranih na veštačkoj inteligenciji i smanjili bojazan

pacijenata da sa korišćenjem automatizovanih, računarski baziranih procesa u medicini smanjuje ili potpuno nestaje odgovornost ordinirajućih lekara (Neri et al. 2020; Rasteau et al. 2022).

Pacijenti mogu biti nepoverljivi prema primeni alata baziranih na računarskim tehnologijama iz straha da bi korišćenje takvih alata smanjilo odgovornost zdravstvenih radnika i oslobađalo ih etičkih ili pravnih posledica vezanih za moguće neuspehe lečenja. Zakonodavni okviri u smislu preciznog definisanja pravnih posledica korišćenja novih računarskih metoda još uvek nisu razvijeni, ali dijagnoze i druge odluke donete uz pomoć bilo koje vrste računarske uvek dovode do odgovornosti, ne od strane mašine, već od strane ljudi koji su je izgradili i ljudi koji je koriste (Naik et al. 2022). Određeni broj pacijenata može da odbije primenu alata veštačke inteligencije u svojoj nezi jer ne žele da ih ova tehnologija dodatno udalji od kontakata sa zdravstvenim radnicima. Jasno je će postojati etičke dileme u onim slučajevima kada pacijent ne želi primenu alata baziranih na AI, a postoji visoka verovatnoća da bi primena istih poboljšala dijagnostiku i ishod lečenja pacijenata. Ova razmatranja ističu važnost neophodnosti dobre komunikacije između pacijenata i medicinskih radnika u vezi moguće zabrinutosti povezane sa računarskim tehnologijama u razvoju (Arambula et Bur. 2019). U određenoj meri, prisutni su i strahovi u vezi sa rastućom ulogom alata baziranih na savremenim računarskim metodama u zdravstvu i potencijalnom smanjenom potrebom za medicinskim osobljem. Potpuna zamena zdravstvenih radnika programima veštačke inteligencije čini se prilično nerealističnom, čak i u budućnosti. Trenutno razvijeni alati omogućavaju izvođenje samo vrlo specifičnih i ograničenih zadataka, i ne zadovoljavaju očekivane veštine empatije, komunikacije sa pacijentima i kontekstualizacije. Čini se da je verovatnije da ćemo videti razvoj AI-poboljšane medicine, gde bi automatizacija određenih ponavljajućih ili vremenski zahtevnih zadataka rasteretila zdravstvene radnike i oslobodila vreme neophodno za izvođenje složenih zadataka. Više vremena koje bi lekari imali na raspolaganju moglo bi da se iskoristi za bolju i kvalitetniju komunikaciju sa bolesnikom ili članovima njegove porodice te bi moglo da dođe i do veće humanizacije lekarskog poziva i većeg zadovoljstva među pacijentima, ali i zdravstvenim radnicima.

Razvijanje računarskih metoda i modela ima potencijal da donese izuzetno velike koristi pacijentima i lekarima, stoga je vredno razmotriti kako da se mogućnosti savremenih informacionih tehnologija maksimalno iskoriste, izbegavajući pri tome eventualne zamke. Usvajanje alata zasnovanih na primeni veštačke inteligencije predstavlja mogućnost za značajno unapređenje na polju otorinolaringologije, medicine, ali i celog društva.

6. ZAKLJUČCI

1. Postoji značajna razlika između tkivne citoarhitekture planocelularnog karcinoma larinksa i hroničnog laringitisa u pogledu teksturalnih karakteristika kvantifikovanih GLCM tehnikom. Angularni drugi momenat i inverzni momenat razlike imaju najveću senzitivnost u razlikovanju malignog i benignog tkiva.
2. Postoji značajna razlika između tkivne citoarhitekture planocelularnog karcinoma larinksa i hroničnog laringitisa u pogledu indikatora vejevlet matematičke analize.
3. Morfološki slična jedra epitelnih ćelija u tkivu planocelularnog karcinoma larinksa i tkivu kod hroničnog laringitisa pokazuju značajne razlike u vrednostima teksturalnih i vejevlet indikatora.
4. Moguće je razviti modele mašinskog učenja zasnovane na logističkoj regresiji, slučajnim šumama i višeslojnom perceptronu za razlikovanje malignog od benignog tkiva koristeći teksturalne i vejevlet indikatore kao ulazne podatke. Model zasnovan na algoritmu slučajnih šuma ima najveću klasifikacionu preciznost i površinu ispod krive radnih karakteristika prijemnika.
5. Teksturalna i vejevlet matematička analiza ćelija i tkiva, kao i modeli mašinskog učenja bazirani na njima imaju potencijal da u budućnosti, nakon dodatne evaluacije i razvoja, budu uključeni u konvencionalne protokole u otorinolaringologiji za dijagnozu i hirurško lečenje planocelularnog karcinoma larinksa.

7. LITERATURA

1. Abdurehim Y, Hua Z, Yasin Y, Xukurhan A, Imam I, Yuqin F. Transoral laser surgery versus radiotherapy: Systematic review and meta-analysis for treatment options of T1a glottic cancer. *Head Neck*. 2012;34:23-33.
2. Agnello F, Cupido F, Sparacia G, Midiri F, Miroddi M, Grassedonio E, Galia M. Computerised tomography and magnetic resonance imaging of laryngeal squamous cell carcinoma: A practical approach. *Neuroradiol J*. 2017;30(3):197-204.
3. Ahn D, Kwak JH, Lee GJ, Sohn JH. Ultrasonography for masses of the pharynx and larynx and assessment of laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2022;49(5):868-874.
4. Ahsan MM, Siddique Z. Machine learning-based heart disease diagnosis: A systematic literature review. *Artif Intell Med*. 2022;128:102289.
5. Akhtar M, Haider A, Rashid S, Al-Nabet ADMH. Paget's "Seed and Soil" Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. *Adv Anat Pathol*. 2019;26(1):69-74.
6. Albahra S, Gorbett T, Robertson S, D'Aleo G, Kumar SVS, Ockunzzi S, Lallo D, Hu B, Rashidi HH. Artificial intelligence and machine learning overview in pathology & laboratory medicine: A general review of data preprocessing and basic supervised concepts. *Semin Diagn Pathol*. 2023;40(2):71-87.
7. Ali A, Soares AB, Eymael D, Magalhaes M. Expression of invadopodia markers can identify oral lesions with a high risk of malignant transformation. *J Pathol Clin Res*. 2021;7(1):61-74.
8. Alicandri-Ciufelli M, Bonali M, Piccinini A, Marra L, Ghidini A, Cunsolo EM, Maiorana A, Presutti L, Conte PF. Surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma: what is 'close'? . *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270(10):2603-2609.
9. Almagro J, Messal HA, Elosegui-Artola A, van Rheenen J, Behrens A. Tissue architecture in tumor initiation and progression. *Trends Cancer*. 2022;8(6):494-505.
10. Alsaade FW, Aldhyani THH, Al-Adhaileh MH. Developing a Recognition System for Diagnosing Melanoma Skin Lesions Using Artificial Intelligence Algorithms. *Comput Math Methods Med*. 2021;2021:9998379.
11. Altieri A, Garavello W, Bosetti C, Gallus S, La Vecchia C. Alcohol consumption and risk of laryngeal cancer. *Oral Oncol*. 2005;41(10):956-965.
12. American Society of Clinical Oncology; Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, Ang KK, Clayman GL, Fisher SG, Forastiere AA, Harrison LB, Lefebvre JL, Leupold N, List MA, O'Malley BO, Patel S, Posner MR, Schwartz MA, Wolf GT. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(22):3693-3704.
13. Anis MM, Razavi MM, Xiao X, Soliman AMS. Association of gastroesophageal reflux disease and laryngeal cancer. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2018;4(4):278-281.
14. Annovazzi A, Ferraresi V, Covello R, Ascione A, Vari S, Petrongari MG, Baldi J, Biagini R, Sciuto R. Prognostic Value of Pre-Treatment [18F]FDG PET/CT Texture Analysis in Undifferentiated Soft-Tissue Sarcoma. *J Clin Med*. 2022;12(1):279.

15. Antmen E, Demirci U, Hasirci V. Amplification of nuclear deformation of breast cancer cells by seeding on micropatterned surfaces to better distinguish their malignancies. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;183:110402.
16. Arambula AM, Bur AM. Ethical Considerations in the Advent of Artificial Intelligence in Otolaryngology. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020;162(1):38-39.
17. Armstrong WB, Vokes DE, Verma SP. Malignant tumors of the larynx. In: Flint PW, Haughey BH, Lund V, Niparko JK, Robbins KT, Thomas JR et al., editors. *Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. pp. 1601–33.
18. Arutyunyan IV, Soboleva AG, Gordon KB, Kudashkina DS, Miroshnichenko DA, Polyakov AP, Rebrikova IV, Makarov AV, Lokhonina AV, Fatkhudinov TK. Differential Markers of Subpopulations of Epithelial Cells of the Larynx in Squamous Cell Carcinoma. *Bull Exp Biol Med*. 2022;173(4):553-559.
19. Asif PJ, Longobardi C, Hahne M, Medema JP. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Cancer Invasion and Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(18):4720.
20. Babaei G, Aziz SG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed Pharmacother*. 2021;133:110909.
21. Bae S, Choi Y.S, Sohn B, Ahn S.S, Lee S.K, Yang J, Kim, J. Squamous Cell Carcinoma and Lymphoma of the Oropharynx: Differentiation Using a Radiomics Approach. *Yonsei Med. J*. 2020;61:895–900.
22. Barbosa MM, Araújo VJ Jr, Boasquevisque E, Carvalho R, Romano S, Lima RA, Dias FL, Salviano SK. Anterior vocal commissure invasion in laryngeal carcinoma diagnosis. *Laryngoscope*. 2005;115(4):724-730.
23. Barzan L, Montomoli C, Di Carlo R, Bertinazzi M, Colangeli R, Martini A, Nicolai P, Gaio E, Artico R, Lupato V, Giacomarra V, Boscolo Nata F, Tirelli G, Lora L, Politi D, Spinato R, Menegaldo A, Boscolo Rizzo P, Da Mosto MC, Fiorino F, Herman I, Benazzo M, La Boria A, Grandi C, Fanetti G, Franchin G, Canzonieri V, Sulfaro S, Mazzoleni G, Vaccher E. Multicentre study on resection margins in carcinoma of the oral cavity, oro-hypopharynx and larynx. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2022;42(2):126-139.
24. Bassani S, Santonicco N, Eccher A, Scarpa A, Vianini M, Brunelli M, Bisi N, Nocini R, Sacchetto L, Munari E, Pantanowitz L, Girolami I, Molteni G. Artificial intelligence in head and neck cancer diagnosis. *J Pathol Inform*. 2022;13:100153.
25. Beale L. Examination of sputum from a case of cancer of the pharynx and the adjacent parts. *Arch Med* 2, 1860;(44):1860–1861.
26. Belli C, Trapani D, Viale G, D'Amico P, Duso BA, Della Vigna P, Orsi F, Curigliano G. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2018;65:22-32.
27. Ben Hamida A, Devanne M, Weber J, Truntzer C, Derangère V, Ghiringhelli F, Forestier G, Wemmert C. Deep learning for colon cancer histopathological images analysis. *Comput Biol Med*. 2021;136:104730.
28. Ben-David U, Amon A. Context is everything: aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet*. 2020;21(1):44-62.
29. Benson R, Mallick S, Rath GK. Neoadjuvant chemotherapy for larynx preservation: Has it lost importance? *Indian J Med Paediatr Oncol* 2018;39:227-33.

30. Bergström L, Ward EC, Finizia C. Voice rehabilitation after laryngeal cancer: Associated effects on psychological well-being. *Support Care Cancer*. 2017;25(9):2683-2690.
31. Bertsimas D, Dunn J, Velmahos GC, Kaafarani HMA. Surgical risk is not linear: derivation and validation of a novel, user-friendly, and machine-learning-based Predictive Optimal Trees in Emergency Surgery Risk (POTTER) calculator. *Ann Surg*. 2018;268(4):574-583.
32. Bhandari M, Zeffiro T, Reddiboina M. Artificial intelligence and robotic surgery: current perspective and future directions. *Curr Opin Urol*. 2020;30(1):48-54.
33. Bhatt AB, Patel S, Matossian MD, Ucar DA, Miele L, Burow ME, Flaherty PT, Cavanaugh JE. Bhatt AB, Patel S, Matossian MD, et al. Molecular Mechanisms of Epithelial to Mesenchymal Transition Regulated by ERK5 Signaling. *Biomolecules*. 2021;11(2):183.
34. Bhattacharjee S, Kim CH, Park HG, Prakash D, Madusanka N, Cho NH, Choi HK. Multi-Features Classification of Prostate Carcinoma Observed in Histological Sections: Analysis of Wavelet-Based Texture and Colour Features. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12):1937.
35. Biccì E, Nardi C, Calamandrei L, Pietragalla M, Cavigli E, Mungai F, Bonasera L, Miele V. Role of Texture Analysis in Oropharyngeal Carcinoma: A Systematic Review of the Literature. *Cancers (Basel)*. 2022;14(10):2445.
36. Bihorac A, Ozrazgat-Baslanti T, Ebadi A, Motaei A, Madkour M, Pardalos PM, Lipori G, Hogan WR, Efron PA, Moore F, Moldawer LL, Wang DZ, Hobson CE, Rashidi P, Li X, Momcilovic P. MySurgeryRisk: Development and Validation of a Machine-learning Risk Algorithm for Major Complications and Death After Surgery. *Ann Surg*. 2019;269(4):652-662.
37. Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression *Nat. Med*. 2011;17:320-9.
38. Blitz AM, Aygun N. Radiologic evaluation of larynx cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 2008;41(4):697-vi.
39. Bollig C, Ahmad J, Dooley L. Effect of medical comorbidities on treatment regimen and survival in T3/T4 laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 2020;130(6):1459-1464.
40. Boon IS, Au Yong TPT, Boon CS. Assessing the Role of Artificial Intelligence (AI) in Clinical Oncology: Utility of Machine Learning in Radiotherapy Target Volume Delineation. *Medicines (Basel)*. 2018;5(4):131.
41. Bos P, van den Brekel MWM, Gouw ZAR, Al-Mamgani A, Waktola S, Aerts H, Beets-Tan RGH, Castelijns J.A, Jasperse B. Clinical variables and magnetic resonance imaging-based radiomics predict human papillomavirus status of oropharyngeal cancer. *Head Neck* 2021;43:485-495.
42. Bramhe S, Pathak SS. Robotic Surgery: A Narrative Review. *Cureus*. 2022;14(9):e29179.
43. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin*. 2018;68:394-424.
44. Brennan M, Puri S, Ozrazgat-Baslanti T, Feng Z, Ruppert M, Hashemighouchani H, Momcilovic P, Li X, Wang DZ, Bihorac A. Comparing clinical judgment with the MySurgeryRisk algorithm for preoperative risk assessment: a pilot usability study. *Surgery*. 2019; 65(5):1035-1045.

45. Butti R, Khaladkar A, Bhardwaj P, Prakasam G. Heterotypic signaling of cancer-associated fibroblasts in shaping the cancer cell drug resistance. *Cancer Drug Resist.* 2023;6(1):182-204.
46. Canis M., Martin A., Ihler F., Wolff H.A., Kron M., Matthias C., Steiner W. Results of transoral laser microsurgery for supraglottic carcinoma in 277 patients. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2013;270:2315–2326.
47. Cavaliere M, Bisogno A, Scarpa A, D'Urso A, Marra P, Colacurcio V, De Luca P, Ralli M, Cassandro E, Cassandro C. Biomarkers of laryngeal squamous cell carcinoma: a review. *Ann Diagn Pathol.* 2021;54:151787.
48. Celaya A, Actor JA, Muthusivarajan R, Gates E, Chung C, Schellingerhout D, Riviere B, Fuentes D. PocketNet: A Smaller Neural Network for Medical Image Analysis. *IEEE Trans Med Imaging.* 2023;42(4):1172-1184.
49. Chai RJ, Werner H, Li PY, Lee YL, Nyein KT, Solovei I, Luu TDA, Sharma B, Navasankari R, Maric M, Sim LYE, Loh YJ, Aliwarga E, Cheong JW, Chojnowski A, Autio MI, Haiyang Y, Boon Tan KK, Keng CT, Ng SL, Chew WL, Ferenczi M, Burke B, Foo RSY, Stewart CL. Disrupting the LINC complex by AAV mediated gene transduction prevents progression of Lamin induced cardiomyopathy. *Nat Commun.* 2021;12(1):4722.
50. Chang W, Antoku S, Östlund C, Worman HJ, Gundersen GG. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex -mediated actin dependent nuclear positioning orients centrosomes in migrating myoblasts. *Nucleus.* 2015;6(1):77-88.
51. Chen H, Li W, Youyu Zhu Y. Improved window adaptive gray level co-occurrence matrix for extraction and analysis of texture characteristics of pulmonary nodules. *Comput. Methods Prog. Biomed.* 2021;2:93-103.
52. Chen L, Wang G, Qiao X, Wang X, Liu J, Niu X, Zhong M. Downregulated miR-524-5p participates in the tumor microenvironment of Ameloblastoma by targeting the Interleukin-33 (IL-33)/suppression of Tumorigenicity 2 (ST2) Axis. *Med Sci Monit.* 2020;26:e921863.
53. Chen L, Zeng H, Yang J, Lu Y, Zhang D, Wang J, Kuang C, Zhu S, Wang M, Ma X. Survival and prognostic analysis of preoperative inflammatory markers in patients undergoing surgical resection for laryngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2018;18(1):816.
54. Cheng NM, Fang YH, Chang JT, Huang CG, Tsan DL, Ng SH, Wang HM, Lin CY, Liao CT, Yen TC. Textural features of pretreatment 18F-FDG PET/CT images: Prognostic significance in patients with advanced T-stage oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J. Nucl. Med.* 2013;54:1703–1709.
55. Cheng NM, Fang YH, Lee LY, Chang JT, Tsan DL, Ng SH, Wang HM, Liao CT, Yang LY, Hsu CH, Yen TC. Zone-size nonuniformity of 18F-FDG PET regional textural features predicts survival in patients with oropharyngeal cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2015;42:419–428.
56. Cherkezyan L, Stypula-Cyrus Y, Subramanian H, White C, Dela Cruz M, Wali RK, Goldberg MJ, Bianchi LK, Roy HK, Backman V. Nanoscale changes in chromatin organization represent the initial steps of tumorigenesis: a transmission electron microscopy study. *BMC Cancer.* 2014;14:189.
57. Chiesa-Estomba CM, González-García JA, Larruscain E, Calvo-Henríquez C, Mayo-Yáñez M, Sistiaga-Suarez JA. CO2 Transoral Laser Microsurgery in Benign, Premalignant and Malignant (Tis, T1, T2) Lesion of the Glottis. A Literature Review. *Medicines (Basel).* 2019;6(3):77.

58. Chone CT. Changing paradigms in treatment of larynx cancer. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2014;80:96-7.
59. Chrysovergis A, S Papanikolaou V, Tsiambas E, Kikidis D, Maragoudakis P, Ragos V, Kyrodimos E.. Caspase complex in laryngeal squamous cell carcinoma. *J BUON.* 2019;24(1):1-4.
60. Chu EA, Kim YJ. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up. *Otolaryngol Clin North Am.* 2008;41(4):673-v.
61. Ciolofan MS, Vlăescu AN, Mogoantă CA, Ioniță E, Ioniță I, Căpitănescu AN, Mitroi MR, Anghelina F. Clinical, Histological and Immunohistochemical Evaluation of Larynx Cancer. *Curr Health Sci J.* 2017;43(4):367-375.
62. Cîrstea AI, Berteșteanu ȘVG, Scăunașu RV, Popescu B, Bejenaru PL, Simion-Antonie CB, Berteșteanu GS, Diaconu TE, Taher PB, Rujan SA, Oașă ID, Grigore R. Management of Locally Advanced Laryngeal Cancer-From Risk Factors to Treatment, the Experience of a Tertiary Hospital from Eastern Europe. *Int J Environ Res Public Health.* 2023;20(6):4737.
63. Clark DE, Fitzgerald TL, Dibbins AW. Procedure-based postoperative risk prediction using NSQIP data. *J Surg Res.* 2018;221:322–327.
64. Cohen S, Levenson R, Pantanowitz L. Artificial Intelligence in Pathology. *Am J Pathol.* 2021;191(10):1670-1672.
65. Corridon PR, Wang X, Shakeel A, Chan V. Digital Technologies: Advancing Individualized Treatments through Gene and Cell Therapies, Pharmacogenetics, and Disease Detection and Diagnostics. *Biomedicines.* 2022;10(10):2445.
66. Cosetti M, Yu GP, Schantz SP. Five-year survival rates and time trends of laryngeal cancer in the US population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;134(4):370-379.
67. Coskun H, Mendenhall WM, Rinaldo A, Rodrigo JP, Suárez C, Strojan P, López F, Mondin V, Saba NF, Shaha AR, Smee R, Takes RP, Ferlito A. Prognosis of subglottic carcinoma: Is it really worse? *Head Neck.* 2019;41(2):511-521.
68. Cossu AM, Mosca L, Zappavigna S, Misso G, Bocchetti M, De Micco F, Quagliuolo L, Porcelli M, Caraglia M, Boccellino M. Long non-coding RNAs as important biomarkers in laryngeal cancer and other head and neck tumours. *Int J Mol Sci* 2019;20(14):3444.
69. Crissman JD, Fu YS. Intraepithelial neoplasia of the larynx: a clinicopathologic study of six cases with DNA analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1986;112(5):522–8.
70. Crowson MG, Ranisau J, Eskander A, Babier A, Xu B, Kahmke RR, Chen JM, Chan TCY. A contemporary review of machine learning in otolaryngology-head and neck surgery. *Laryngoscope.* 2020;130(1):45-51.
71. da Silva LG, da Silva Monteiro WRS, de Aguiar Moreira TM, Rabelo MAE, de Assis EACP, de Souza GT. Fractal dimension analysis as an easy computational approach to improve breast cancer histopathological diagnosis. *Appl Microsc.* 2021;51(1):6.
72. Dai MY, Fang F, Zou Y, Yi X, Ding YJ, Chen C, Tao ZZ, Chen SM. Downregulation of Notch1 induces apoptosis and inhibits cell proliferation and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. [published correction appears in *Oncol Rep.* 2023 Jul;50(1):]. *Oncol Rep.* 2015;34(6):3111-3119.
73. Davidovic LM, Cumic J, Dugalic S, Vicentic S, Sevarac Z, Petroianu G, Corridon P, Pantic I. Gray-Level Co-occurrence Matrix Analysis for the Detection of Discrete, Ethanol-Induced,

- Structural Changes in Cell Nuclei: An Artificial Intelligence Approach. *Microsc Microanal.* 2022;28(1):265-271.
74. Davidovic LM, Laketic D, Cumic J, Jordanova E, Pantic I. Application of artificial intelligence for detection of chemico-biological interactions associated with oxidative stress and DNA damage. *Chem Biol Interact.* 2021;345:109533.
 75. Davis M, Ifrah G. The Universal Computer: The Road from Leibniz to Turing. *The American Mathematical Monthly.* 2002; 109(6):581.
 76. de Andrea CE, Petrilli AS, Jesus-Garcia R, Bleggi-Torres LF, Alves MT. Large and round tumor nuclei in osteosarcoma: good clinical outcome. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4(2):169-174.
 77. de Juan J, García J, López M, Orús C, Esteller E, Quer M, León X. Inclusion of extracapsular spread in the pTNM classification system: a proposal for patients with head and neck carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;139(5):483-488.
 78. Debes JD, Sebo TJ, Heemers HV, Kipp BR, Haugen DL, Lohse CM, Tindall DJ. p300 modulates nuclear morphology in prostate cancer. *Cancer Res.* 2005;65(3):708-712.
 79. Deganello A, Ruaro A, Gualtieri T, Berretti G, Rampinelli V, Borsetto D, Russo S, Boscolo-Rizzo P, Ferrari M, Bussu F. Central Compartment Neck Dissection in Laryngeal and Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma: Clinical Considerations. *Cancers (Basel).* 2023;15(3):804.
 80. Derbal Y. Can artificial intelligence improve cancer treatments? *Health Informatics J.* 2022;28(2):14604582221102314.
 81. Devakumar D, Sunny G, Sasidharan BK, Bowen SR, Nadaraj A, Jeyseelan L, Mathew M, Irodi A, Isiah R, Pavamani S, John S, T Thomas HM. Framework for Machine Learning of CT and PET Radiomics to Predict Local Failure after Radiotherapy in Locally Advanced Head and Neck Cancers. *J Med Phys.* 2021;46(3):181-188.
 82. Dey P, Arnold D, Wight R, Mackenzie K, Kelly C, Wilson J. Radiotherapy versus open surgery versus endolaryngeal surgery (with or without laser) for early laryngeal squamous cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(2):CD002027.
 83. Dinčić M, Todorović J, Nešović Ostojić J, Kovačević S, Dunđerović D, Lopičić S, Spasić S, Radojević -Škodrić S, Stanisavljević D, Ilić AŽ. The Fractal and GLCM Textural Parameters of Chromatin May Be Potential Biomarkers of Papillary Thyroid Carcinoma in Hashimoto's Thyroiditis Specimens. *Microsc Microanal.* 2020;26(4):717 -730.
 84. Djordjević VZ, Dimitrijević MV, Jesić SD, Petrović ZM, Arsović NA, Milovanović JP, Nesić VS. Occult metastases in patients with supraglottic larynx cancer. *Acta Chir Iugosl.* 2009;56(3):117-120.
 85. Drabiak K, Kyzer S, Nemov V, El Naqa I. AI and machine learning ethics, law, diversity, and global impact [published online ahead of print, 2023 May 23]. *Br J Radiol.* 2023;20220934.
 86. Dufour X, Hans S, De Mones E, Brasnu D, Ménard M, Laccourreye O. Local control after supracricoid partial laryngectomy for “advanced” endolaryngeal squamous cell carcinoma classified as T3. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:1092–9.
 87. Durgamahanthi V, Anita Christaline J, Shirly Edward A. GLCM and GLRLM Based Texture Analysis: Application to Brain Cancer Diagnosis Using Histopathology Images. In: Dash S.S, Das S, Panigrahi B.K. (eds) *Intelligent Computing and Applications. Advances in Intelligent Systems and Computing.* Springer, Singapore, 2021;1172:691–706.

88. Dutta S, Bandyopadhyay SK. Brain Tumour Texture Analysis-A Method. *J Qual Healthcare Eco* 2021;4(4):000231.
89. Dym H, McKean H.P, Fourier Series and Integrals. Academic Press, New York, 1972.
90. Eckel HE, Simo R, Quer M, Odell E, Paleri V, Klussmann JP, Remacle M, Sjögren E, Piazza C. European Laryngological Society position paper on laryngeal dysplasia Part II: diagnosis, treatment, and follow-up. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021;278(6):1723-1732.
91. Elicin O, Giger R. Comparison of Current Surgical and Non-Surgical Treatment Strategies for Early and Locally Advanced Stage Glottic Laryngeal Cancer and Their Outcome. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):732.
92. Elkashty OA, Abu Elghanam G, Su X, Liu Y, Chauvin PJ, Tran SD. Cancer stem cells enrichment with surface markers CD271 and CD44 in human head and neck squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 2020;41(4):458-466.
93. Fang SH, Tsao Y, Hsiao MJ, Chen JY, Lai YH, Lin FC, Wang CT. Detection of Pathological Voice Using Cepstrum Vectors: A Deep Learning Approach. *J Voice*. 2019;33(5):634-641.
94. Fang Z, Meng Q, Xu J, Wang W, Zhang B, Liu J, Liang C, Hua J, Zhao Y, Yu X, Shi S. Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts: recent advances and future perspectives. *Cancer Commun (Lond)*. 2023;43(1):3-41.
95. Fati SM, Senan EM, Javed Y. Early Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Based on Histopathological Images Using Deep and Hybrid Learning Approaches. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(8):1899.
96. Feng Q, Ding Z. MRI Radiomics Classification and Prediction in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Review. *Curr Alzheimer Res*. 2020;17(3):297-309.
97. Ferlito A, Silver CE, Rinaldo A, Smith RV. Surgical treatment of the neck in cancer of the larynx. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2000;62(4):217-225.
98. Fischer EG. Nuclear Morphology and the Biology of Cancer Cells. *Acta Cytol*. 2020;64(6):511-519.
99. Flemming, W. Studien über Regeneration der Gewebe. *Archiv f. mikrosk. Anatomie* 1884;(24);50–91.
100. Forastiere AA, Ismaila N, Lewin JS, Nathan CA, Adelstein DJ, Eisbruch A, Fass G, Fisher SG, Laurie SA, Le QT, O'Malley B, Mendenhall WM, Patel S, Pfister DG, Provenzano AF, Weber R, Weinstein GS, Wolf GT. Use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2018;36(11):1143–69.
101. Franz L, Alessandrini L, Fasanaro E, Gaudio P, Carli A, Nicolai P, Marioni Prognostic impact of neutrophils-to-lymphocytes ratio (NLR), PD-L1 expression, and tumor immune microenvironment in laryngeal cancer. *Ann Diagn Pathol* 2021;50:151657.
102. Franz L, Nicolè L, Frigo AC, Ottaviano G, Gaudio P, Saccardo T, Visconti F, Cappellesso R, Blandamura S, Fassina A, Marioni G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Neoangiogenesis in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13):3339.
103. Friedmann I, Ferlito A. Precursors of squamous cell carcinoma. In: Ferlito A, editor. *Neoplasms of the larynx*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1993. pp. 97–111.

104. Friedmann I, Osborn DA. The larynx. In: Symmers WSTC, editor. Systemic pathology. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1976.
105. Friedmann I. Precancerous lesions of the larynx. *Can J Otolaryngol.* 1974;3(4):528–32.
106. Frost HR. Analyzing cancer gene expression data through the lens of normal tissue-specificity. *PLoS Comput Biol.* 2021;17(6):e1009085.
107. Fujita A, Buch K, Li B, Kawashima Y, Qureshi MM, Sakai O. Difference Between HPV-Positive and HPV-Negative Non-Oropharyngeal Head and Neck Cancer: Texture Analysis Features on CT. *J Comput Assist Tomogr.* 2016;40(1):43-47.
108. Fourier J, The analytical theory of heat. Paris: Firmin Didot Père et Fils, 1822.
109. Furusawa T, Rochman M, Taher L, Dimitriadis EK, Nagashima K, Anderson S, Bustin M. Chromatin decompaction by the nucleosomal binding protein HMG5 impairs nuclear sturdiness. *Nat Commun.* 2015;6:6138.
110. Gadaleta E, Thorn GJ, Ross-Adams H, Jones LJ, Chelala C. Field cancerization in breast cancer. *J Pathol.* 2022;257(4):561-574.
111. Gale N, Blagus R, El-Mofty SK, Helliwell T, Prasad ML, Sandison A, Volavšek M, Wenig BM, Zidar N, Cardesa A. Evaluation of a new grading system for laryngeal squamous intraepithelial lesions: a proposed unified classification. *Histopathology.* 2014;65(4):456–64.
112. Gale N, Hille J, Jordan RC, Nadal A, Williams MD. Precursor Lesions. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. WHO Classification of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC. 2017; pp. 91–93.
113. Gale N, Cardesa A, Hernandez-Prera JC, Slootweg PJ, Wenig BM, Zidar N. Laryngeal Dysplasia: Persisting Dilemmas, Disagreements and Unsolved Problems-A Short Review. *Head Neck Pathol.* 2020;14(4):1046-1051.
114. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. Pathology and genetics of head and neck tumours. 3rd ed. Lyon: IARC Press: 2005. pp. 140–143.
115. Ganly I, Patel SG, Matsuo J, Singh B, Kraus DH, Boyle J, Wong R, Shaha AR, Shah JP. Analysis of postoperative complications of open partial laryngectomy. *Head Neck.* 2009;31(3):338-345.
116. Garaud S, Dieu-Nosjean MC, Willard-Gallo K. T follicular helper and B cell crosstalk in tertiary lymphoid structures and cancer immunotherapy. *Nat Commun.* 2022;13(1):2259.
117. Gatenby RA, Brown JS. Integrating evolutionary dynamics into cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17:675–686.
118. Gell L, Meier PS, Goyder E. Alcohol consumption among the over 50s: international comparisons. *Alcohol Alcohol.* 2015;50(1):1-10.
119. Genden EM, Desai S, Sung CK. Transoral robotic surgery for the management of head and neck cancer: a preliminary experience. *Head Neck.* 2009;31(3):283-289.
120. Gershenwald JE, Amin MB, Schilsky RL, Gaspar LE, Washington MK, Sullivan DC, et al. AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition 8ed. Shah JP, Ridge JA, Lydiatt WM, Patel SG, Glastonbury CM, Brandwein-Weber M, et al., editors. New York: Springer International Publishing; 2017; p. 1032.

121. Gertych A, Swiderska-Chadaj Z, Ma Z, Ing N, Markiewicz T, Cierniak S, Salemi H, Guzman S, Walts AE, Knudsen BS. Convolutional neural networks can accurately distinguish four histologic growth patterns of lung adenocarcinoma in digital slides. *Sci Rep* 2019;9:1483.
122. Gigot M, Dignonnet A, Rodriguez A, Lechien JR. Salvage Partial Laryngectomy after Failed Radiotherapy: Oncological and Functional Outcomes. *J Clin Med.* 2022;11(18):5411.
123. Goirand M, Austin E, Clay-Williams R. Implementing Ethics in Healthcare AI-Based Applications: A Scoping Review. *Sci Eng Ethics.* 2021;27(5):61.
124. Gökmen MF, Büyükkatalay ZÇ, Beton S, Gökcan MK, Dursun G, Meço C, Küçük TB. Functional and Oncological Outcomes of Open Partial Laryngectomy vs. Transoral Laser Surgery in Supraglottic Larynx Cancer. *Turk Arch Otorhinolaryngol.* 2020;58(4):227-233.
125. Goulioumis A, Gyftopoulos K. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Metastasis: Focus on Laryngeal Carcinoma. *Biomedicines.* 2022;10(9):2148.
126. Gourin CG, Conger BT, Sheils WC, Bilodeau PA, Coleman TA, Porubsky ES. The effect of treatment on survival in patients with advanced laryngeal carcinoma. *Laryngoscope.* 2009;119(7):1312-1317.
127. Grossmann A, Morlet J. Decomposition of hardy functions into square integrable wavelets of constant shape. *SIAM J Math Anal.* 1984;15(4):723-736.
128. Grover S, Swisher-McClure S, Mitra N, Li J, Cohen RB, Ahn PH, Lukens JN, Chalian AA, Weinstein GS, O'Malley BW Jr, Lin A. Total Laryngectomy Versus Larynx Preservation for T4a Larynx Cancer: Patterns of Care and Survival Outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015;92(3):594-601.
129. Groves P, Kayyali B, Knott D, Kuiken SV. The 'big data' revolution in healthcare: Accelerating value and innovation, 2016:1-32.
130. Guo X, Bonin K, Scarpinato K, Guthold M. The effect of neighboring cells on the stiffness of cancerous and non-cancerous human mammary epithelial cells. *New Journal of Physics.* 2014;16(10):105002.
131. Gupta S, Savala R, Gupta N, Dey P. Fractal dimension and chromatin textural analysis to differentiate follicular carcinoma and adenoma on fine needle aspiration cytology. *Cytopathology.* 2020;31(5):491-493.
132. Haenlein M, Kaplan A. A Brief History of Artificial Intelligence: On the Past, Present, and Future of Artificial Intelligence. *California Management Review.* 2019;61(4):5–14.
133. Hakeem AH, Tubachi J, Pradhan SA. Significance of anterior commissure involvement in early glottic squamous cell carcinoma treated with trans-oral CO2 laser microsurgery. *Laryngoscope.* 2013;123(8):1912-1917.
134. Hammond IM, Hammond AM, Camacho RM. Deep learning-enhanced, open-source eigenmode expansion. *Opt Lett.* 2022;47(6):1383-1386.
135. Hans S, Baudouin R, Circiu MP, Couineau F, Lisan Q, Crevier-Buchman L, Lechien JR. Laryngeal Cancer Surgery: History and Current Indications of Transoral Laser Microsurgery and Transoral Robotic Surgery. *J Clin Med.* 2022;11(19):5769.
136. Hao Y, Zhang L, Qiao S, Bai Y, Cheng R, Xue H, Hou Y, Zhang W, Zhang G. Breast cancer histopathological images classification based on deep semantic features and gray level co-occurrence matrix. *PLoS One.* 2022;17(5):e0267955.

137. Haralick R.M, Shanmugam K, Dinstein I. Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, Cybernetics*. 1973;3(6):610-621.
138. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang ZF, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(2):541-550.
139. Hashimoto DA, Rosman G, Rus D, Meireles OR. Artificial Intelligence in Surgery: Promises and Perils. *Ann Surg*. 2018;268(1):70-76.
140. He S, Xiao B, Wei H, Huang S, Chen T. SVM classifier of cervical histopathology images based on texture and morphological features. *Technol Health Care*. 2023;31(1):69-80.
141. Heinz A. Elastases and elastokines: elastin degradation and its significance in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2020;55(3):252-273.
142. Hendriksma M, Sjögren EV. Involvement of the Anterior Commissure in Early Glottic Cancer (Tis-T2): A Review of the Literature. *Cancers*. 2019;11(9):1234.
143. Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ, Ang KK, Gay G, Stewart A, Robinson RA. Laryngeal Cancer in the United States: Changes in demographics, patterns of care, and survival. *Laryngoscope*. 2006;116:1-13.
144. Hrelec C. Management of Laryngeal Dysplasia and Early Invasive Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2021;22(10):90.
145. Hu X, Tian T, Sun Q, Jiang W. Prognostic value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in laryngeal cancer: What should we expect from a meta-analysis?. *Front Oncol*. 2022;12:945820.
146. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(7):40.
147. Hyde LZ, Valizadeh N, Al-Mazrou AM, Kiran RP. ACS-NSQIP risk calculator predicts cohort but not individual risk of complication following colorectal resection. *Am J Surg*. 2019;218(1):131–135.
148. Iliadou V, Kakkos I, Karaikos P, Kouloulis V, Platoni K, Zygogianni A, Matsopoulos GK. Early Prediction of Planning Adaptation Requirement Indication Due to Volumetric Alterations in Head and Neck Cancer Radiotherapy: A Machine Learning Approach. *Cancers (Basel)*. 2022;14(15):3573.
149. Iqbal N, Mumtaz R, Shafi U, Zaidi SMH. Gray level co-occurrence matrix (GLCM) texture based crop classification using low altitude remote sensing platforms. *PeerJ Comput Sci*. 2021;7:e536.
150. Jamal N, Sofer E, Chhetri DK. Treatment considerations for early glottic carcinoma: lessons learned and a primer for the general otolaryngologist. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;150(2):169-173.
151. Janiszewska M, Primi MC, Izard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem*. 2020;295(8):2495-2505.

152. Jethwa AR, Khariwala SS. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(3):411-423.
153. Jiang Y, Yang M, Wang S, Li X, Sun Y. Emerging role of deep learning-based artificial intelligence in tumor pathology. *Cancer Commun (Lond).* 2020;40(4):154-166.
154. Jinesh GG, Brohl AS. Classical epithelial-mesenchymal transition (EMT) and alternative cell death process-driven blebbishield metastatic-witch (BMW) pathways to cancer metastasis. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):296.
155. Joshi P, Joshi A, Norohna V, Chaturvedi P, Patil V, Agarwal JP, Juvekar S, Prabhash K. Role of neoadjuvant chemotherapy in advanced carcinoma of the hypopharynx and larynx. *South Asian J Cancer.* 2017;6(1):15-19.
156. Kakun RR, Melamed Z, Perets R. PAX8 in the Junction between Development and Tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7410.
157. Kalinin AA, Allyn-Feuer A, Ade A, Fon GV, Meixner W, Dilworth D, Husain SS, de Wet JR, Higgins GA, Zheng G, Creekmore A, Wiley JW, Verdone JE, Veltri RW, Pienta KJ, Coffey DS, Athey BD, Dinov ID. 3D Shape Modeling for Cell Nuclear Morphological Analysis and Classification [published correction appears in *Sci Rep.* 2018 Oct 26;8(1):16142]. *Sci Rep.* 2018;8(1):13658.
158. Kambič V, Lenart I. Our classification of hyperplasia of the laryngeal epithelium from the prognostic point of view. *J Fr Otorhinolaryngol Audiophonol Chir Maxillofac.* 1971;20(10):1145–50.
159. Kanai R, Ohshima K, Ishii K, Sonohara M, Ishikawa M, Yamaguchi M, Ohtani Y, Kobayashi Y, Ota H, Kimura F. Discriminant analysis and interpretation of nuclear chromatin distribution and coarseness using gray-level co-occurrence matrix features for lobular endocervical glandular hyperplasia. *Diagn Cytopathol.* 2020;48(8):724 -735.
160. Kaur K, Sonkhya N, Bapna AS. Nodal metastases from laryngeal carcinoma and their correlation with certain characteristics of the primary tumor. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;54(4):255-263.
161. Kazim E, Koshiyama AS. A high-level overview of AI ethics. *Patterns (N Y).* 2021;2(9):100314.
162. Keskinbora KH. Medical ethics considerations on artificial intelligence. *J Clin Neurosci* 2019;64:277–82.
163. Khan SU, Islam N, Jan Z, Haseeb K, Ali Shah SI, Hanif M. A machine learning-based approach for the segmentation and classification of malignant cells in breast cytology images using gray level co-occurrence matrix (GLCM) and support vector machine (SVM). *Neural Computing and Applications.* 2022;34:8365–8372.
164. Kim H, Kim E, Lee I, Bae B, Park M, Nam H. Artificial Intelligence in Drug Discovery: A Comprehensive Review of Data-driven and Machine Learning Approaches. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2020;25(6):895-930.
165. Kim I, Kang K, Song Y, Kim TJ. Application of Artificial Intelligence in Pathology: Trends and Challenges. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(11):2794.
166. Kim T.Y, Lee J.Y, Lee Y.J, Park D.W, Tae K, Choi Y.Y. CT texture analysis of tonsil cancer: Discrimination from normal palatine tonsils. *PLoS ONE.* 2021;16: e0255835.

167. Kleinsasser O. The classification and differential diagnosis of epithelial hyperplasia of the laryngeal mucosa on the basis of histomorphological features. II. *Z Laryngol Rhinol Otol.* 1963;42:339-362.
168. Kociołek M, Materka A, Strzelecki M, Szczypinski P. Discrete wavelet transform-derived features for digital image texture analysis. In *Proc. Of International Conference on Signals and Electronic Systems.* 2001;18(21):163–168.
169. Komorowski M, Celi LA, Badawi O, Gordon AC, Faisal AA. The Artificial Intelligence Clinician learns optimal treatment strategies for sepsis in intensive care. *Nat Med.* 2018;24(11):1716–1720.
170. Korda AI, Ruef A, Neufang S, Davatzikos C, Borgwardt S, Meisenzahl EM, Koutsouleris N. Identification of voxel-based texture abnormalities as new biomarkers for schizophrenia and major depressive patients using layer-wise relevance propagation on deep learning decisions. *Psychiatry Research Neuroimaging.* 2021;313:111303.
171. Kramer IR. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;46:518-39.
172. Kriegeskorte N, Golan T. Neural network models and deep learning. *Curr Biol.* 2019;29(7):R231-R236.
173. Kundrotas M, Mažonienė E, Šešok D. Automatic Tumor Identification from Scans of Histopathological Tissues. *Applied Sciences.* 2023;13(7):4333.
174. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med.* 2002;252(3):206-224.
175. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011;20(5):576–90.
176. Lança T, Silva-Santos B. The split nature of tumor-infiltrating leukocytes: Implications for cancer surveillance and immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2012;1(5):717–25.
177. Leblanc A, Thomas TV, Bouganim N. Chemoradiation for Locoregionally Advanced Laryngeal Cancer. *Otolaryngol Clin North Am.* 2023;56(2):285-293.
178. Lee HS, Chun BG, Kim SW, Kim ST, Oh JH, Hong JC, Lee KD. Transoral laser microsurgery for early glottic cancer as one- stage single-modality therapy. *Laryngoscope* 2013;123: 2670–4.
179. Lee JH, Ha EJ, Roh J, Lee SJ, Jang JY. Technical feasibility of radiomics signature analyses for improving detection of occult tonsillar cancer. *Sci. Rep.* 2021;11:192.
180. Lee JY, Han M, Kim KS, Shin SJ, Choi JW, Ha EJ. Discrimination of HPV status using CT texture analysis: tumour heterogeneity in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Neuroradiology.* 2019;61(12):1415-1424.
181. Lee MY, Belfiglio M, Zeng J, Fleming CW, Koyfman S, Joshi NP, Lamarre E, Prendes B, Scharpf J, Lorenz RR, Woody NM, Adelstein DJ, Geiger JL, Chute DJ, Ku JA. Primary Total Laryngectomy versus Organ Preservation for Locally Advanced T3/T4a Laryngeal Cancer. *Laryngoscope.* 2023;133(5):1122-1131.
182. Lee OH, Park YM, Ko SH, Lee K, Kim Y, Han K, Cho JH. Synergistic association between underweight and type 2 diabetes on the development of laryngeal cancer: a national population-based retrospective cohort study. *BMC Cancer.* 2022;22(1):345.

183. Lee S, Ahn YM, Kim JY, Cho YE, Park JH. Downregulation of NOP53 Ribosome Biogenesis Factor Leads to Abnormal Nuclear Division and Chromosomal Instability in Human Cervical Cancer Cells. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(1):453-459.
184. Lee SH, Hyeon DY, Yoon SH, Jeong JH, Han SM, Jang JW, Nguyen MP, Chi XZ, An S, Hyun KG, Jung HJ, Song JJ, Bae SC, Kim WH, Hwang D, Lee YM. RUNX3 methylation drives hypoxia-induced cell proliferation and antiapoptosis in early tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2021;28:1251–1269.
185. Lee SR, Roh YG, Kim SK, Lee JS, Seol SY, Lee HH, Kim WT, Kim WJ, Heo J, Cha HJ, Kang TH, Chung JW, Chu IS, Leem SH. Activation of EZH2 and SUZ12 Regulated by E2F1 Predicts the Disease Progression and Aggressive Characteristics of Bladder Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(23):5391-5403.
186. Leszczyńska M, Tokarski M, Jarmołowska-Jurczyszyn D, Kosikowski P, Szyfter W, Wierzbicka M. Adverse histopathological findings in glottic cancer with anterior commissure involvement. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015;272(8):1973-1981.
187. Li D, Dong P, Chunping W, Cao P, Zhou L. Notch1 overexpression associates with poor prognosis in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2014;123:705–710.
188. Li D, Xu D, Zhang Y, Chen P, Xie J. Effect of Notch1 signaling on cellular proliferation and apoptosis in human laryngeal carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2022;20(1):262.
189. Li D, Zhou L, Huang J, Xiao X. Effect of multidrug resistance 1/P-glycoprotein on the hypoxia-induced multidrug resistance of human laryngeal cancer cells. *Oncol Lett.* 2016;12:1569–1574.
190. Li Y, Hecht SS. Carcinogenic components of tobacco and tobacco smoke: A 2022 update. *Food Chem Toxicol.* 2022;165:113179.
191. Lian MJ, Huang C, Min T. Automation Characterization for Oral Cancer by Pathological Image Processing with Gray-Level Co-occurrence Matrix. *Journal of Image and Graphics.* 2018;6(1):80-83.
192. Lian MJ, Huang CL. Texture feature extraction of gray-level co-occurrence matrix for metastatic cancer cells using scanned laser pico-projection images. *Lasers Med Sci.* 2019; 34:1503–1508.
193. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragozcy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES, Dekker J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science.* 2009;326(5950):289-93.
194. Lin C, Cheng W, Liu X, Li H, Song Y. The global, regional, national burden of laryngeal cancer and its attributable risk factors (1990-2019) and predictions to 2035. *Eur J Cancer Care.* 2022;31(6):e13689.
195. Lin J, Song T, Li C, Mao W. GSK-3 β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(5):118659.
196. Liu M, Kuo F, Capistrano KJ, Kang D, Nixon BG, Shi W, Chou C, Do MH, Stamatiades EG, Gao S, Li S, Chen Y, Hsieh JJ, Hakimi AA, Taniuchi I, Chan TA, Li MO. TGF- β suppresses type 2 immunity to cancer. *Nature.* 2020;587(7832):115-120.

197. Liu S, Wang Y, Xu K, Wang Z, Fan X, Zhang C, Li S, Qiu X, Jiang T. Relationship between necrotic patterns in glioblastoma and patient survival: fractal dimension and lacunarity analyses using magnetic resonance imaging. *Sci Rep*. 2017;7(1):8302.
198. Liu X, Niu X, Qiu Z. A five-gene signature based on stromal/immune scores in the tumor microenvironment and its clinical implications for liver Cancer. *DNA Cell Biol*. 2020;39(9):1621–1638.
199. Liu YH, Xu SC, Tu LL, Zhang KL, Lu DH, Zhang M. A rich lymphatic network exists in the inferior surface of the vocal cord. *Surg Radiol Anat*. 2006;28(2):125-128.
200. Liu Z, Alavi A, Li M, Zhang X. Self-Supervised Contrastive Learning for Medical Time Series: A Systematic Review. *Sensors (Basel)*. 2023;23(9):4221.
201. Loftus TJ, Brakenridge SC, Croft CA, Smith RS, Efron PA, Moore FA, Mohr AM, Jordan JR. Neural network prediction of severe lower intestinal bleeding and the need for surgical intervention. *J Surg Res*. 2017;212:42-47.
202. Loftus TJ, Tighe PJ, Filiberto AC, Efron PA, Brakenridge SC, Mohr AM, Rashidi P, Upchurch GR Jr, Bihorac A. Artificial Intelligence and Surgical Decision-making. *JAMA Surg*. 2020;155(2):148-158.
203. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, Chong PP, Looi CY. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells* 2019;8(10):1118.
204. Loh ND, Hampton CY, Martin AV, Starodub D, Sierra RG, Barty A, Erratum: Fractal morphology, imaging and mass spectrometry of single aerosol particles in flight. *Nature*. 2012; 123:11-99.
205. Long SR, Cohen MB. Classics in cytology. VI: the early cytologic discoveries of Lionel S. Beale. *Diagn Cytopathol* 1993;9(5):595–8.
206. Losa GA, Castelli C. Nuclear patterns of human breast cancer cells during apoptosis: characterisation by fractal dimension and co-occurrence matrix statistics. *Cell Tissue Res*. 2005;322(2):257-67.
207. Luna-Ortiz K, Reynoso-Noverón N, Zacarías-Ramón LC, Luna-Peteuil Z, García-Ortega DY. Role of Neck Dissection in Organ-Preservation for Glottic Squamous Cell Carcinoma. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2022;74(3):5865-5870.
208. Luo Q, Wang J, Zhao W, Peng Z, Liu X, Li B, Zhang H, Shan B, Zhang C, Duan C. Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):19.
209. Madakam S, Uchiya, T, Mark S, Lurie, Y. Artificial Intelligence, Machine Learning and Deep Learning (Literature: Review and Metrics). *Asia-Pacific Journal of Management Research and Innovation*. 2022;18(1–2):7–23.
210. Mahmood H, Shaban M, Rajpoot N, Khurram SA. Artificial Intelligence-based methods in head and neck cancer diagnosis: an overview. *Br J Cancer*. 2021;124(12):1934-1940.
211. Manda NK, Golla U, Sesham K, Desai P, Joshi S, Patel S, Nalla S, Kondam S, Singh L, Dewansh D, Manda H, Rokana N. Tuning between Nuclear Organization and Functionality in Health and Disease. *Cells*. 2023; 12(5):706.

212. Mandelbrot BB, Kol B, Aharony A. Angular gaps in radial diffusion-limited aggregation: two fractal dimensions and nontransient deviations from linear self-similarity. *Phys Rev Lett.* 2002;88(5):055501.
213. Manterola L, Aguirre P, Larrea E, Arestín M, Gaafar A, Elorriaga K, Goicoechea I, Armesto M, Fernández-Mercado M, Zabalza I, López-Duque JC, Larruskain E, Sistiaga JA, Landa M, Zabala A, Santaolalla F, Municio JA, Ispizua Á, García-Pedrero JM, Rodrigo JP, Lawrie CH. Mutational profiling can identify laryngeal dysplasia at risk of progression to invasive carcinoma. *Sci Rep.* 2018;8(1):6613.
214. Martins J, Magalhães C, Rocha M, Osório NS. Machine Learning-Enhanced T Cell Neoepitope Discovery for Immunotherapy Design. *Cancer Inform.* 2019;18:1176935119852081.
215. Martins RH, do Amaral HA, Tavares EL, Martins MG, Gonçalves TM, Dias NH. Voice Disorders: Etiology and Diagnosis. *J Voice.* 2016;30(6):761.e1-761.e9.
216. Mayerhoefer ME, Materka A, Langs G, Häggström I, Szczypiński P, Gibbs P, Cook G. Introduction to Radiomics. *J Nucl Med.* 2020;61(4):488-495.
217. McCarter K, Baker AL, Wolfenden L, Wratten C, Bauer J, Beck AK, Forbes E, Carter G, Leigh L, Oldmeadow C, Britton B. Smoking and other health factors in patients with head and neck cancer. *Cancer Epidemiol.* 2022;79:102202.
218. Megwalu UC, Sikora AG. Survival outcomes in advanced laryngeal cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;140:855–60.
219. Mesolella M, Iorio B, Buono S, Cimmino M, Motta G. Supracricoid Partial Laryngectomy: Oncological and Functional Outcomes. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2021;26(1):e075-e084.
220. Mijovic Z, Kostov M, Mihailovic D, Zivkovic N, Stojanovic M, Zdravkovic M. Correlation of nuclear morphometry of primary melanoma of the skin with clinicopathological parameters and expression of tumor suppressor proteins (p53 and p16(INK4a)) and bcl-2 oncoprotein. *J BUON.* 2013;18(2):471-476.
221. Miljus D, Zivkovic S, Bozić Z. Malignant tumors in Republic of Serbia 2020. Serbian cancer registry. Institute of Public Health of Serbia Dr Milan Jovanovic Batut. 2022;ISBN 978-86-7358-111-8.
222. Miranda-Galvis M, Loveless R, Kowalski LP, Teng Y. Impacts of Environmental Factors on Head and Neck Cancer Pathogenesis and Progression. *Cells.* 2021;10(2):389.
223. Mirestean CC, Pagute O, Buzea C, Iancu RI, Iancu DT. Radiomic Machine Learning and Texture Analysis - New Horizons for Head and Neck Oncology. *Maedica (Bucur).* 2019;14(2):126-130.
224. Mishra S, Majhi B, Kumar Sa P, Sharma L. Gray level co-occurrence matrix and random forest based acute lymphoblastic leukemia detection. *Biomedical Signal Processing and Control.* 2017; 33:272-280.
225. Mitamura K, Norikane T, Yamamoto Y, Ihara-Nishishita A, Kobata T, Fujimoto K, Takami Y, Kudomi N, Hoshikawa H, Nishiyama Y. Texture Indices of 18F-FDG PET/CT for Differentiating Squamous Cell Carcinoma and Non-Hodgkin's Lymphoma of the Oropharynx. *Acta Med. Okayama* 2021;75:351–356.
226. Mohan V, Das A, Sagi I. Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020;62:192-200.

227. Molina-Fernández E, Palacios-García JM, Moreno-Luna R, Herrero-Salado T, Ventura-Díaz J; Sánchez-Gómez S; Vilches Arenas Á. Survival Analysis in Patients with Laryngeal Cancer: A Retrospective Cohort Study. *Life*. 2023;13:295.
228. Morris RG, D.O. Hebb: *The Organization of Behavior*, Wiley: New York; 1949. *Brain Res Bull*. 1999;50(5-6):437.
229. Mucha-Malecka A, Skladowski K. High-dose radiotherapy alone for patients with T4-stage laryngeal cancer. *Strahlenther Onkol* 2013;189:632–8.
230. Mungai F, Verrone GB, Pietragalla M, Berti V, Addeo G, Desideri I, Bonasera L, Miele V. CT assessment of tumor heterogeneity and the potential for the prediction of human papillomavirus status in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Radiol Med*. 2019;124(9):804-811.
231. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004;78(21):11451-11460.
232. Mutlu V, Ucuncu H, Altas E, Aktan B. The Relationship between the Localization, Size, Stage and Histopathology of the Primary Laryngeal Tumor with Neck Metastasis. *Eurasian J Med*. 2014;46(1):1-7.
233. Naik N, Hameed BMZ, Shetty DK, Swain D, Shah M, Paul R, Aggarwal K, Ibrahim S, Patil V, Smriti K, Shetty S, Rai BP, Chlosta P, Somani BK. Legal and Ethical Consideration in Artificial Intelligence in Healthcare: Who Takes Responsibility?. *Front Surg*. 2022;9:862322.
234. Najafi M, Mortezaee K, Ahadi R. Cancer stem cell (a)symmetry & plasticity: Tumorigenesis and therapy relevance. *Life Sci*. 2019;231:116520.
235. Nakajo M, Nagano H, Jinguji M, Kamimura Y, Masuda K, Takumi K, Tani A, Hirahara D, Kariya K, Yamashita M, Yoshiura T. The usefulness of machine-learning-based evaluation of clinical and pretreatment 18F-FDG-PET/CT radiomic features for predicting prognosis in patients with laryngeal cancer [published online ahead of print, 2023 Jul 10]. *Br J Radiol*. 2023;20220772.
236. Nakayama M, Wada T, Isono Y, Sano D, Nishimura G, Oridate N, Holsinger FC, Orosco R. Narrow-field supracricoid partial laryngectomy: Procedure development and initial clinical experiences. *Auris Nasus Larynx*. 2023;50(3):403-409.
237. Neri E, Coppola F, Miele V, Bibbolino C, Grassi R. Artificial intelligence: who is responsible for the diagnosis? *Radiol Med* 2020;125:517–21.
238. Ngiam KY, Khor IW. Big data and machine learning algorithms for health-care delivery. *Lancet Oncol* 2019;20:e262–73.
239. Nikolovski D, Cumic J, Pantic I. Application of Gray Level co-Occurrence Matrix Algorithm for Detection of Discrete Structural Changes in Cell Nuclei After Exposure to Iron Oxide Nanoparticles and 6-Hydroxydopamine. *Microsc Microanal*. 2019;25(4):982-988.
240. Nocini R, Molteni G, Mattiuzzi C, Lippi G. Updates on larynx cancer epidemiology. *Chin J Cancer Res*. 2020;32(1):18-25.
241. Noor F, Asif M, Ashfaq UA, Qasim M, Tahir Ul Qamar M. Machine learning for synergistic network pharmacology: a comprehensive overview. *Brief Bioinform*. 2023;24(3):bbad120.
242. Obid R, Redlich M, Tomeh C. The Treatment of Laryngeal Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2019;31(1):1-11.

243. Olaniyi EO, Komolafe TE, Oyedotun OK, Oyemakinde TT, Abdelaziz M, Khashman A. Eye Melanoma Diagnosis System using Statistical Texture Feature Extraction and Soft Computing Techniques. *J Biomed Phys Eng.* 2023;13(1):77-88.
244. Özbilgin F, Kurnaz Ç, Aydın E. Prediction of Coronary Artery Disease Using Machine Learning Techniques with Iris Analysis. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(6):1081.
245. Pakkasjärvi N, Luthra T, Anand S. Artificial Intelligence in Surgical Learning. *Surgeries.* 2023;4(1):86-97.
246. Panatta E, Butera A, Celardo I, Leist M, Melino G, Amelio I. p53 regulates expression of nuclear envelope components in cancer cells. *Biol Direct.* 2022;17(1):38.
247. Pang X, Tang YL, Liang XH. Transforming growth factor- β signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Insights into cellular responses. *Oncol Lett.* 2018;16(4):4799-4806.
248. Pantic I, Cumic J, Skodric SR, Dugalic S, Brodski C. Oxidopamine and oxidative stress: Recent advances in experimental physiology and pharmacology. *Chem Biol Interact.* 2021;336:109380.
249. Pantic I, Harhaji-Trajkovic L, Pantovic A, Milosevic NT, Trajkovic V. Changes in fractal dimension and lacunarity as early markers of UV-induced apoptosis. *J Theor Biol.* 2012;303:87-92.
250. Pantic I, Pantic S, Basta-Jovanovic G. Gray Level Co-Occurrence Matrix Texture Analysis of Germinal Center Light Zone Lymphocyte Nuclei: Physiology Viewpoint with Focus on Apoptosis. *Microscopy and Microanalysis.* 2012;18(3):470-475.
251. Pantic I, Paunovic J, Cumic J, Valjarevic S, Petroianu GA, Corridon PR. Artificial neural networks in contemporary toxicology research. *Chem Biol Interact.* 2023;369:110269.
252. Pantic I, Paunovic J, Pejic S, Drakulic D, Todorovic A, Stankovic S, Vucevic D, Cumic J, Radosavljevic T. Artificial intelligence approaches to the biochemistry of oxidative stress: Current state of the art. *Chem Biol Interact.* 2022;358:109888.
253. Pantić I, Paunović Pantić J, Radojević Škodrić S. Primena fraktalne i teksturalne analize u medicinskoj fiziologiji, patofiziologiji i patologiji. *Medicinska istraživanja.* 2022;55(3):43-51.
254. Pantic I, Petrovic D, Paunovic J, Vucevic D, Radosavljevic T, Pantic S. Age-related reduction of chromatin fractal dimension in toluidine blue - stained hepatocytes. *Mech Ageing Dev.* 2016;157:30 -34.
255. Pantic IV, Cumic J, Valjarevic S, Shakeel A, Wang X, Vurivi H, Daoud S, Chan V, Petroianu GA, Shibru MG, Ali ZM, Nesic D, Salih AE, Butt H, Corridon PR. Computational approaches for evaluating morphological changes in the corneal stroma associated with decellularization. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11:1105377.
256. Paone G, Martucci F, Espeli V, Ceriani L, Treglia G, Ruberto T, Richetti A, Piantanida R, Giovannella L. 18F-FDG-PET/CT Imaging in Advanced Glottic Cancer: A Tool for Clinical Decision in Comparison with Conventional Imaging. *Contrast Media Mol Imaging.* 2019;2019:4051206.
257. Park JH, Pyun WY, Park HW. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells.* 2020;9(10):2308.

258. Patel SA, Qureshi MM, Dyer MA, Jalisi S, Grillone G, Truong MT. Comparing surgical and nonsurgical larynx-preserving treatments with total laryngectomy for locally advanced laryngeal cancer. *Cancer*. 2019;125(19):3367-3377.
259. Paunovic J, Vucevic D, Radosavljevic T, Vukomanovic Djurdjevic B, Stankovic S, Pantic I. Effects of Iron Oxide Nanoparticles on Structural Organization of Hepatocyte Chromatin: Gray Level Co-occurrence Matrix Analysis. *Microsc Microanal*. 2021;27(4):889-896.
260. Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, Blondel M, Prettenhoffer R, Weiss R, Dubourg V. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *J Mach Learn Res*. 2011;12:2825–2830.
261. Peng F, Liao M, Qin R, Zhu S, Peng C, Fu L, Chen Y, Han B. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):286.
262. Perkel JM. Ten computer codes that transformed science. *Nature*. 2021;589(7842):344-348.
263. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through mac-1. *J Clin Invest*. 2012;122(1):327–36.
264. Pointreau Y, Garaud P, Chapet S, Sire C, Tuchais C, Tortochaux J, Faivre S, Guerrif S, Alfonsi M, Calais G. Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(7):498-506.
265. Porras Alonso E, Vilaseca González I, García Teno M, Barberá Durbán R, Viscasillas Pallàs G, Sancho Mestre M, Rebollo Otal J, Menoyo Bueno A, Díaz de Cerio Canduela P. Early glottic tumours with anterior commissure involvement. Literature review and consensus document. Head and Neck and Skull Base Commission, SEORL-CCC. *Acta Otorrinolaringol Esp (Engl Ed)*. 2020;71(1):1-20.
266. Prades JM, Peoc'h M, Petcu C, Karkas A, Dumollard JM, Gavid M. The anterior commissure of the human larynx revisited. *Surg Radiol Anat*. 2017;39(8):871-876.
267. Prasetyanti PR, Medema JP. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer*. 2017;16(1):41.
268. Qian JM, Schoenfeld JD. Radiotherapy and Immunotherapy for Head and Neck Cancer: Current Evidence and Challenges. *Front Oncol*. 2021;10:608772.
269. Qin L, Lai L, Wang H, Zhang Y, Qian X, He D. Machine Learning-Based Gray-Level Co-Occurrence Matrix (GLCM) Models for Predicting the Depth of Myometrial Invasion in Patients with Stage I Endometrial Cancer. *Cancer Manag Res*. 2022;14:2143-2154.
270. Rahman TY, Mahanta LB, Choudhury H, Das AK, Sarma JD. Study of morphological and textural features for classification of oral squamous cell carcinoma by traditional machine learning techniques. *Cancer Rep (Hoboken)*. 2020;3(6):e1293.
271. Ranganath K, Feng AL, Franco RA, Varvares MA, Faquin WC, Naunheim MR, Saladi SV. Molecular Biomarkers of Malignant Transformation in Head and Neck Dysplasia. *Cancers*. 2022;14(22):5581.
272. Rapisarda V, Malashchuk I, Asamaowei IE, Poterlowicz K, Fessing MY, Sharov AA, Karakesisoglou I, Botchkarev VA, Mardaryev A. p63 Transcription Factor Regulates Nuclear Shape and Expression of Nuclear Envelope-Associated Genes in Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2017;137(10):2157-2167.

273. Rasteau S, Ernenwein D, Savoldelli C, Bouletreau P. Artificial intelligence for oral and maxillo-facial surgery: A narrative review. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2022;123(3):276-282.
274. Reljin, B, Reljin I, *Fraktalna i multifraktalna analiza signala*, Elektrotehnički fakultet, Beograd, 2001.
275. Remacle M, Van Haverbeke C, Eckel H, Bradley P, Chevalier D, Djukic V, de Vicentiis M, Friedrich G, Olofsson J, Peretti G, Quer M, Werner J. Proposal for revision of the European Laryngological Society classification of endoscopic cordectomies [published correction appears in *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007 Jun;264(6):709]. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007;264(5):499-504.
276. Ren J, Yuan Y, Qi M, Tao X. Machine learning-based CT texture analysis to predict HPV status in oropharyngeal squamous cell carcinoma: comparison of 2D and 3D segmentation. *Eur Radiol.* 2020;30(12):6858-6866.
277. Ren L, Li P, Li Z, Chen Q. AQP9 and ZAP70 as immune-related prognostic biomarkers suppress proliferation, migration and invasion of laryngeal cancer cells. *BMC Cancer.* 2022;22(1):465.
278. Rich B, Huang J, Yang Y, Jin W, Johnson P, Wang L, Yang F. Radiomics Predicts for Distant Metastasis in Locally Advanced Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021;13(22):5689.
279. Rinaldo A, Coca-Pelaz A, Silver CE, Ferlito A. Paraneoplastic Syndromes Associated with Laryngeal Cancer. *Adv Ther.* 2020;37(1):140-154.
280. Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW. Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991;117(6):601-605.
281. Rodrigo JP, Villaronga MÁ, Menéndez ST, Hermida-Prado F, Quer M, Vilaseca I, Allonca E, Pedregal Mallo D, Astudillo A, García-Pedrero JM. A Novel role for Nanog as an early cancer risk marker in patients with laryngeal precancerous lesions. *Sci Rep.* 2017;7(1):11110.
282. Sanabria A, Shah JP, Medina JE, Olsen KD, Robbins KT, Silver CE, Rodrigo JP, Suárez C, Coca-Pelaz A, Shaha AR, Mäkitie AA, Rinaldo A, de Bree R, Stojan P, Hamoir M, Takes RP, Sjögren EV, Cannon T, Kowalski LP, Ferlito A. Incidence of Occult Lymph Node Metastasis in Primary Larynx Squamous Cell Carcinoma, by Subsite, T Classification and Neck Level: A Systematic Review. *Cancers (Basel).* 2020;12(4):1059.
283. Santos GNM, da Silva HEC, Ossege FEL, Figueiredo PTS, Melo NS, Stefani CM, Leite AF. Radiomics in bone pathology of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol.* 2023;52(1):20220225.
284. Santos TA, Maistro CE, Silva CB, Oliveira MS, França MC Jr, Castellano G. MRI Texture Analysis Reveals Bulbar Abnormalities in Friedreich Ataxia. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;36(12):2214-8.
285. Saulle R, Semyonov L, Mannocci A, Careri A, Saburri F, Ottolenghi L, Guerra F, La Torre G. Human papillomavirus and cancerous diseases of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2015;21(4):417-431.
286. Serag A, Ion-Margineanu A, Qureshi H, McMillan R, Saint Martin MJ, Diamond J, O'Reilly P, Hamilton P. Translational AI and Deep Learning in Diagnostic Pathology. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:185.

287. Shah P, Roy N, Dhandhukia P. Algorithm mediated early detection of oral cancer from image analysis, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 2022;133(1):70-79.
288. Shajji A, Numanagic I, Leighton AT, Greenyer H, Amarasinghe S, Berger B. A Python-based programming language for high-performance computational genomics. *Nat Biotechnol*. 2021;39(9):1062-1064.
289. Shamamian P, Schwartz JD, Pocock BJ, Monea S, Whiting D, Marcus SG, Mignatti P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol*. 2001;189(2):197-206.
290. Shanmugaratnam K, Sobin L.H. Histological typing of upper respiratory tract tumours / K. Shanmugaratnam, in collaboration with L. H. Sobin and pathologists in 10 countries. World Health Organization. Geneva. 1978.
291. Sharaf K, Lechner A, Haider SP, Wiebringhaus R, Walz C, Kranz G, Canis M, Haubner F, Gires O, Baumeister P. Discrimination of cancer stem cell markers ALDH1A1, BCL11B, BMI-1, and CD44 in different tissues of HNSCC patients. *Curr. Oncol*. 2021;28(4):2763-2774.
292. Sharma D, Brummel-Ziedins KE, Bouchard BA, Holmes CE. Platelets in tumor progression: a host factor that offers multiple potential targets in the treatment of cancer. *J Cell Physiol* 2014;229(8):1005–15.
293. Sharp L, McDevitt J, Carsin AE, Brown C, Comber H. Smoking at diagnosis is an independent prognostic factor for cancer-specific survival in head and neck cancer: findings from a large, population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(11):2579-2590.
294. Sheikh K, Lee SH, Cheng Z, Lakshminarayanan P, Peng L, Han P, McNutt TR, Quon H, Lee J. Predicting acute radiation induced xerostomia in head and neck Cancer using MR and CT Radiomics of parotid and submandibular glands. *Radiat Oncol*. 2019;14(1):131.
295. Shen LF, Wang QY, Yu Q. The systemic immune-inflammation index and albumin as prognostic predictors in laryngeal carcinoma. *Nutr Cancer*. 2021;73(10):1916–23.
296. Shickel B, Loftus TJ, Adhikari L, Ozrazgat-Baslanti T, Bihorac A, Rashidi P. DeepSOFA: a continuous acuity score for critically ill patients using clinically interpretable deep learning. *Sci Rep*. 2019;9(1):1879.
297. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2016;66:7–30.
298. Sievert M, Goncalves M, Binder B, Mueller SK, Rupp R, Koch M, Dürr S, Traxdorf M, Hecht M, Iro H, Gostian AO. Salvage laryngectomy after primary radio- and radiochemotherapy : A retrospective study. *Salvage-Laryngektomie nach primärer Radio- und Radiochemotherapie : Eine retrospektive Fallzusammenfassung*. *HNO*. 2021;69(Suppl 2):47-52.
299. Singh I, Lele TP. Nuclear Morphological Abnormalities in Cancer: A Search for Unifying Mechanisms. *Results Probl Cell Differ*. 2022;70:443-467.
300. Smee RI, Williams JR, Broadley K, Bridger GP. Early glottic carcinoma treated by radiotherapy: defining a population for surgical salvage. *Laryngoscope*. 2013;123(1):171-176.

301. Song CI, Ryu CH, Choi SH, Roh JL, Nam SY, Kim SY. Quantitative evaluation of vocal-fold mucosal irregularities using GLCM-based texture analysis. *Laryngoscope*. 2013;123(11):E45-E50.
302. Soto AM, Sonnenschein C. The tissue organization field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory. *Bioessays*. 2011;33(5):332-340.
303. Stachler RJ, Francis DO, Schwartz SR, Damask CC, Digoy GP, Krouse HJ, McCoy SJ, Ouellette DR, Patel RR, Reavis CCW, Smith LJ, Smith M, Strode SW, Woo P, Nnacheta LC. Clinical Practice Guideline: Hoarseness (Dysphonia) (Update) [published correction appears in *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018 Aug;159(2):403]. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;158(1_suppl):S1-S42.
304. Stanisce L, McGlone M, Koshkareva Y, Swendseid B, Lawrence I, Kubicek GJ, Gaughan JP, Solomon DH, Ahmad N. Socioeconomic Influence on Speech Rehabilitation After Total Laryngectomy [published online ahead of print]. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2023;10.1002/ohn.412.
305. Stephens AD, Banigan EJ, Marko JF. Chromatin's physical properties shape the nucleus and its functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2019;58:76-84.
306. Stephens AD, Liu PZ, Banigan EJ, Almassalha LM, Backman V, Adam SA, Goldman RD, Marko JF. Chromatin histone modifications and rigidity affect nuclear morphology independent of lamins. *Mol Biol Cell*. 2018;29(2):220-233.
307. Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, Higgins KA, Saba NF. An update on larynx cancer. *CA Cancer J Clin*. 2017;67:31-50.
308. Stevanović S, Gregurić T, Pažanin L, Ivkić B, Geber A, Hadžavdić A, Košec A. Diagnostic Accuracy of Preoperative CT and Endoscopy Staging in Early Laryngeal Cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2023;168(4):769-774.
309. Strickland E. IBM Watson, heal thyself: How IBM overpromised and underdelivered on AI health care. *IEEE Spectrum* 2019;56:24–31.
310. Suárez C, Rodrigo JP. Transoral microsurgery for treatment of laryngeal and pharyngeal cancers. *Curr Oncol Rep* 2013;15:134.
311. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71: 209- 249.
312. Szczypinski P, Strzelecki M, Materka. MaZda - A software for texture analysis. *Proc. of ISITC*. 2007;2007:245–249.
313. Szczypinski P, Strzelecki M, Materka A, Klepaczko A. MaZda – A software package for image texture analysis. *Comput Meth Prog Bio* . 2009;94(1): 66–76.
314. Tahir M. Pattern Analysis of protein images from fluorescence microscopy using Gray Level Co-occurrence Matrix. *Journal of King Saud University - Science*. 2016; 30: 29-40.
315. Tanaka S, Kadoya N, Sugai Y, Umeda M, Ishizawa M, Katsuta Y, Ito K, Takeda K, Jingu K. A Deep Learning-Based Radiomics Approach to Predict Head and Neck Tumor Regression for Adaptive Radiotherapy. *Sci. Rep*. 2022;12:8899.
316. Tang ZX, Gong JL, Wang YH, Li ZH, He Y, Liu YX, Zhou XH. Efficacy comparison between primary total laryngectomy and nonsurgical organ-preservation strategies in

- treatment of advanced stage laryngeal cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(21):e10625.
317. Taylor AM, Shih J, Ha G, Gao GF, Zhang X, Berger AC, Schumacher SE, Wang C, Hu H, Liu J, Lazar AJ; Cancer Genome Atlas Research Network; Cherniack AD, Beroukhir R, Meyerson M. Genomic and Functional Approaches to Understanding Cancer Aneuploidy. *Cancer Cell*. 2018;33(4):676-689.e3.
 318. Tocco VJ, Li Y, Christopher KG, Matthews JH, Aggarwal V, Paschall L, Luesch H, Licht JD, Dickinson RB, Lele TP. The nucleus is irreversibly shaped by motion of cell boundaries in cancer and non-cancer cells. *J Cell Physiol*. 2018;233(2):1446-1454.
 319. Tomita H, Yamashiro T, Heianna J, Nakasone T, Kimura Y, Mimura H, Murayama S. Nodal-based radiomics analysis for identifying cervical lymph node metastasis at levels I and II in patients with oral squamous cell carcinoma using contrast-enhanced computed tomography. *Eur. Radiol*. 2021;31:7440–7449.
 320. Turing A. Computing machinery and intelligence. *Mind* 59. 1950;433-60.
 321. Valjarevic S, Jovanovic MB, Miladinovic N, Cumic J, Dugalic S, Corridon PR, Pantic I. Gray-Level Co-occurrence Matrix Analysis of Nuclear Textural Patterns in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: Focus on Artificial Intelligence Methods. *Microsc Microanal*. 2023;29(3):1220-1227.
 322. Valjarevic S, Jovanovic MB, Pantic I. Primena savremenih računarskih metoda u dijagnostici i lečenju karcinoma larinksa. *Medicinski podmladak* 2023;4(5):14-20
 323. Varga J, Greten FR. Cell plasticity in epithelial homeostasis and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*. 2017;19(10):1133-1141.
 324. Vujasinovic T, Pribic J, Kanjer K, Milosevic N, Tomasevic Z, Milovanovic Z, Nikolic-Vukosavljevic D, Radulovic M. Gray-Level Co-Occurrence Matrix Texture Analysis of Breast Tumor Images in Prognosis of Distant Metastasis Risk. *Microscopy and Microanalysis*. 2015;21(3):646-654.
 325. Wang BT, Liu MX, Chen ZY. Differential Diagnostic Value of Texture Feature Analysis of Magnetic Resonance T2 Weighted Imaging between Glioblastoma and Primary Central Neural System Lymphoma. *Chin Med Sci J*. 2019;34(1):10-17.
 326. Wang H, Wei J, Wang B, Meng L, Xin Y, Dong L, Jiang X. Role of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: A meta-analysis of cohort study. *Cancer Med*. 2020;9(1):204-214.
 327. Wang JY, Zhang QW, Wen K, Wang C, Ji X, Zhang L. Temporal trends in incidence and mortality rates of laryngeal cancer at the global, regional and national levels, 1990-2017. *BMJ Open*. 2021;11(10):e050387.
 328. Wang P, Dreger M, Madrazo E, Williams CJ, Samaniego R, Hodson NW, Monroy F, Baena E, Sánchez-Mateos P, Hurlstone A, Redondo-Muñoz J. WDR5 modulates cell motility and morphology and controls nuclear changes induced by a 3D environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(34):8581-8586.
 329. Wang X, Tian L, Li Y, Wang J, Yan B, Yang L, Li Q, Zhao R, Liu M, Wang P, Sun Y. RBM15 facilitates laryngeal squamous cell carcinoma progression by regulating TMBIM6 stability through IGF2BP3 dependent. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):80.
 330. Wang Y, Hu Z, Zhu T, Su Z, Fang X, Lin J, Chen Z, Su Z, Ye P, Ma J, Zhang L, Li J, Feng L, Sun CB, Zhang Z, Shentu X. Optical Coherence Tomography Angiography-Based

- Quantitative Assessment of Morphologic Changes in Active Myopic Choroidal Neovascularization During Anti-vascular Endothelial Growth Factor Therapy. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:657772.
331. Warner L, Chudasama J, Kelly CG, Loughran S, McKenzie K, Wight R, Dey P. Radiotherapy versus open surgery versus endolaryngeal surgery (with or without laser) for early laryngeal squamous cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(12):CD002027.
 332. Wei JW, Tafe LJ, Linnik YA, Vaickus LJ, Tomita N, Hassanpour S. Pathologist-level classification of histologic patterns on resected lung adenocarcinoma slides with deep neural networks. *Sci Rep* 2019; 9:3358.
 333. Weller MD, Nankivell PC, McConkey C, Paleri V, Mehanna HM. The risk and interval to malignancy of patients with laryngeal dysplasia; a systematic review of case series and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*. 2010;35(5):364–72.
 334. Wenig BM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: dysplasia and select variants. *Mod Pathol*.2017;30(s1):S112–8.
 335. West J, You L, Zhang J, Gatenby RA, Brown JS, Newton PK, Anderson ARA. Towards Multidrug Adaptive Therapy. *Cancer Res*. 2020;80(7):1578-1589.
 336. Wittekindt C, Jovanovic N, Guntinas-Lichius O. Expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and blood vessel density in laryngeal squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol*. 2011;131(1):101-106.
 337. Wu PH, Gilkes DM, Phillip JM, Narkar A, Cheng TW, Marchand J, Lee MH, Li R, Wirtz D. Single-cell morphology encodes metastatic potential. *Sci Adv*. 2020 Jan 22;6(4):eaaw6938.
 338. Xu L, Gao Q, Yousefi N. Brain tumor diagnosis based on discrete wavelet transform, gray-level co-occurrence matrix, and optimal deep belief network. *SIMULATION*. 2020;96(11):867-879.
 339. Xu M, Chen G, Fu W, Liao M, Frank JA, Bower KA, Fang S, Zhang Z, Shi X, Luo J. Ethanol disrupts vascular endothelial barrier: implication in cancer metastasis. *Toxicol Sci*. 2012;127(1):42-53.
 340. Yang C, Cao H, Yang JW, Liu T, Wang JT, Wang BS. The matrix metalloproteinase gene family: a significant prognostic gene lineage correlated with immune infiltrates in laryngeal squamous cell carcinoma. *Neoplasma*. 2021;68(6):1212-1224.
 341. Yang P, Yang G. Feature Extraction using Dual-Tree Complex Wavelet Transform and Gray Level Co-occurrence Matrix. *Neurocomputing*. 2016; 212–220.
 342. Yang, B. A., Westerhof, T. M., Sabin, K., Merajver, S. D., Aguilar, C. A., Engineered Tools to Study Intercellular Communication. *Adv. Sci*. 2021;8:2002825.
 343. Yi CH, Jim Zhai Q, Wang BY. Updates on immunohistochemical and molecular markers in selected head and neck diagnostic problems. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2017;141(9):1214-1235.
 344. Yoo J, Lacchetti C, Hammond JA, Gilbert RW; Head and Neck Cancer Disease Site Group. Role of endolaryngeal surgery (with or without laser) versus radiotherapy in the management of early (T1) glottic cancer: a systematic review. *Head Neck*. 2014;36(12):1807-1819.
 345. Yusufova N, Kloetgen A, Teater M, Osunsade A, Camarillo JM, Chin CR, Doane AS, Venters BJ, Portillo-Ledesma S, Conway J, Phillip JM, Elemento O, Scott DW, Béguelin W, Licht JD, Kelleher NL, Staudt LM, Skoultchi AI, Keogh MC, Apostolou E, Mason CE, Imielinski M, Schlick T, David Y, Tsirigos A, Allis CD, Soshnev AA, Cesarman E, Melnick AM.

- Histone H1 loss drives lymphoma by disrupting 3D chromatin architecture. *Nature*. 2021;589(7841):299-305.
346. Zandoni DK, Patel SG, Shah JP. Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Head and Neck Cancer: Rationale and Implications. *Curr Oncol Rep*. 2019;21(6):52.
 347. Zeitels SM, Burns JA. Oncologic efficacy of angiolytic KTP laser treatment of early glottic cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2014;123(12):840-846.
 348. Zhang Y, Sun X. Role of Focal Adhesion Kinase in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Its Therapeutic Prospect. *Onco Targets Ther*. 2020;13:10207-10220.
 349. Zhao L, Xu X, Hou R, Zhao W, Zhong H, Teng H, Han Y, Fu X, Sun J, Zhao J. Lung cancer subtype classification using histopathological images based on weakly supervised multi-instance learning. *Phys Med Biol*. 2021;66(23):10.1088/1361-6560/ac3b32.
 350. Zhao TY, Zhao ZW, Wang SQ, Pan Y. Quantitative analysis of ovarian cancer pathology using nonlinear optical imaging and lifetime microscopy. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2023;51:1-100207.
 351. Zidar N, Gale N. Cancer of the Larynx; Pathology and Genetics. In: Boffetta P, Hainaut P, editors. *Encyclopedia of Cancer*, 3rd Edition. Academic Press: Elsevier; 2019. p.346-355.
 352. Zinreich SJ. Imaging in laryngeal cancer: computed tomography, magnetic resonance imaging, positron emission tomography. *Otolaryngol Clin North Am*. 2002;35(5):971-v.
 353. Zuo J, Wen J, Lei M, Wen M, Li S, Lv X, Luo Z, Wen G. Hypoxia promotes the invasion and metastasis of laryngeal cancer cells via EMT. *Med Oncol*. 2016;33:15.

POPIS CITIRANIH INTERNET STRANA

(prema redosledu pojavljivanja u tekstu)

Internet strana	Sadržaj	Datum pristupa
www.wcrf.org/cancer-trends/global-cancer-data-by-country	cancer trends	21.09.2023.

IZVORI SLIKA

Slika 1. Originalna, Svetlana Valjarević (obrada fotografije- Milan B. Jovanović)

Slika 2. Originalni dijagram, Svetlana Valjarević

Slike 3-19. Originalne, proistekle iz rezultata doktorske disertacije

LISTA SKRAĆENICA

DALY engl. “disability adjusted life years”

ASR engl. “age-standardized incidence rate”

TSNA engl. “tobacco-specific nitrosamine”

DNK dezoksiribonukleinska kiselina

HIF-1 α hipoksijom izazvan faktor 1-alfa

HPV humani papiloma virus

hTERT engl. “human telomerase reverse transcriptase”

AAO-HNS engl. American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery

CT kompjuterizovana tomografija

NMR nuklearna magnetna rezonanca

PET pozitronska emisiona tomografija

G gradus

CK citokeratin

TNM engl. “Tumor Node Metastasis”

UICC engl. “Union for International Cancer Control”

AJCC engl. “American Joint Committee on Cancer”

ENE ektranodalna ekstenzija

SEER engl. “Surveillance, Epidemiology, and End Results”

NCDB engl. “National Cancer Data Base”

Nd:YAG neodijum-itrijum-aluminijum-granat

ELS engl. “European Laryngological Society”

FDA engl. “Food and Drug Administration”

Df fraktalna dimenzija

GLCM engl. “Gray-level Co-occurrence Matrix”

18F-FDG fludeoksiglukoza

DSRPAI engl. “Dartmouth Summer Research Project on Artificial Intelligence”

AI engl. “Artificial intelligence”

IGRT engl. “Image-Guided Radiotherapy”

WSI engl. “Whole Slide Imaging”

LIN laringealna intraepitelna neoplazija

SIL Skvamozna intraepitelna lezija

WHO engl. “World Health Organization”

PCR engl. “Polymerase chain reaction”

DWT engl. "discrete wavelet transform"
LINC engl. "Linker of Nukleoskeleton and Cytoskeleton"
LAP2 engl. "Lamina-associated polypeptide 2"
MEF mišji embrionalni fibroblast
CAF engl. "cancer associated fibroblast"
EMT epitelno-mezenhimalna tranzicija
MMP matriks-metaloproteinaza
ILK engl. "integrin linked kinase"
MAPK engl. "mitogen-activated protein kinase"
TGF- β engl. "Transforming growth factor beta"
VEGF vaskularni endotelni faktor rasta (engl. "Vascular endothelial growth factor")
miRNA, engl. "microribonucleic acid"
 α -SMA alfa-glatkog mišićni aktin (engl. "alpha smooth muscle actin")
dpi, engl. „dots per inch“
IL interleukin
AQP akvaporin (engl. "aquaporin")
NLR odnos broja neutrofila i limfocita (engl. "neutrofile lymphocyte ratio")
PLR odnos broja trombocita i limfocita (engl. "platelet lymphocyte ratio")
ROC kriva radne karakteristike prijemnika (engl. "receiver operating characteristic")
SMV metoda potpornih vektora (engl. Support Vectors Machines)
DWT diskretna talasna transformacija (engl. "discrete wavelet transform")
AUC površina ispod krive (engl. area under curve)
ROI region od interesa (engl. "region of interest")
FCH histogram zamućnih boja (engl. "fuzzy color histogram")
LBP lokalni binarni obrazac (engl. "local binary pattern")
ZLNU nejednoličnost dužine zona (engl. "zone-length-non-uniformity")
RF slučajne šume (engl. "random forests")
CNN konvolutivna neuronska mreža (engl. "Convolutive Neural Network")
SOFA sekvencijalna ocena zatajenja organa (engl. "Sequential Organ Failure Assessment")
GPS globalizacioni pozicioni sistem
CPATH kompjuterizovana patologija (engl. „computational pathology“)

PODACI O PUBLIKOVANIM RADOVIMA PROISTEKLIM IZ DISERTACIJE

Valjarevic S, Jovanovic MB, Miladinovic N, Cumic J, Dugalic S, Corridon PR, Pantic I. Gray-Level Co-occurrence Matrix Analysis of Nuclear Textural Patterns in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: Focus on Artificial Intelligence Methods. *Microsc Microanal.* 2023;29(3):1220-1227 (kategorija M21; IF: 4.099) doi:10.1093/micmic/ozad042

Valjarevic S, Jovanovic MB, Pantic I. Primena savremenih računarskih metoda u dijagnostici i lečenju karcinoma larinksa. *Medicinski podmladak* 2023;4(5):14-20 DOI 10.5937/mp74-43594

BIOGRAFIJA AUTORA

Kl. asist. dr Svetlana Valjarević (rođ. Milošević) rođena je 1981. godine u Smederevskoj Palanci. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Velikoj Plani. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu završila je 2008. godine sa prosekom ocena 9,46. Specijalističke akademske studije iz oblasti otorinolaringologije završila je 2012. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Milana B. Jovanovića, sa završnim radom "Efekti primene antibiotika na postoperativni tok i morbiditet kod tonzilektomisanih pacijenata". Specijalistički ispit iz otorinolaringologije položila je u oktobru 2018. godine na Klinici za otorinolaringologiju sa maksilofacijalnom hirurgijom sa odličnim uspehom. Doktorske akademske studije upisala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu školske 2014/5. godine i položila ispite sa prosečnom ocenom 9,83.

Zaposlena je u Kliničko-bolničkom centru „Zemun“, u Službi otorinolaringologije sa maksilofacijalnom hirurgijom kao lekar specijalista otorinolaringologije. Od novembra 2019. godine u zvanju je kliničkog asistenta za užu naučnu oblast Otorinolaringologija sa maksilofacijalnom hirurgijom Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U novembru 2021. godine izabrana je za sekretara za poslediplomsku nastavu Katedre otorinolaringologije sa maksilofacijalnom hirurgijom na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od maja 2023. godine urednik časopisa *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (kategorija M21). Do sada je publikovala 12 in extenso naučnih radova u međunarodnim časopisima indeksiranim u JCR bazi (42 heterocitata prema SCOPUS indeksnoj bazi citiranosti).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Svetlana Z. Valjarević

Broj indeksa RH 01/14

Izjavljujem

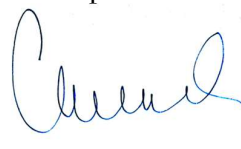
da je doktorska disertacija pod naslovom

Primena savremenih računarskih metoda za analizu međućelijske interakcije u cilju unapređenja dijagnostike i hirurškog lečenja planocelularnog karcinoma larinksa

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 20.11.2023.

Potpis autora



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Svetlana Z. Valjarević**

Broj indeksa: RH 01/14

Studijski program: Rekonstruktivna hirurgija

Naslov rada: **Primena savremenih računarskih metoda za analizu međucelijske interakcije u cilju unapređenja dijagnostike i hirurškog lečenja planocelularnog karcinoma larinksa**

Mentor 1: **Prof. Milan B. Jovanović**

Mentor 2: **Prof. Igor V. Pantić**

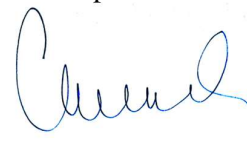
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 20.11.2023.

Potpis autora



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Primena savremenih računarskih metoda za analizu međucelijske interakcije u cilju unapređenja dijagnostike i hirurškog lečenja planocelularnog karcinoma larinksa

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

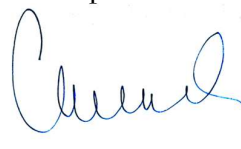
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, 20.11.2023.

Potpis autora



1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.