لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۸، دورهٔ ۱۶، شمارهٔ ۲، صفحات: ۴۳-۳۴ .

مقاله مروری

کاربرد روش‌های تشخیصی نوری غیر تهاجمی در بیماری‌های سرطان دهان

افشان شیرکوند[۲،۱]
آسیه رحیمی[۳]
مژده بابادی[۲]

۱. گروه پژوهشی *لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران*

۲. گروه *طیف‌سنجی زیستی، دپارتمان فوتونیک، پژوهشکدهٔ لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران*

۳. گروه *پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران*

نویسندهٔ مسئول: افشان شیرکوند، تلفن: ۰۲۱۶۶۴۶۴۸۶۲
پست الکترونیک: a_shirkavand@sbu.ac.ir

خلاصه

تکنیک‌های تشخیص نوری اغلب دارای مزیت‌های بسیاری نسبت به روش‌های سنتی ازجمله سرعت، هزینه، دقت و روش‌های غیرتهاجمی هستند و منجر به تغییر مدیریت سرطان در آینده می‌شوند. حفرهٔ دهان به‌طور ویژه قابل بررسی است بنابراین چنین روش‌هایی می‌توانند به‌عنوان ابزاری جایگزین یا در کنار روش‌های سنتی عمل کنند. بررسی جامعی از روش‌های نوری در تشخیص سرطان دهان ارائه شده است. پس از معرفی اپیدمیولوژی و عوامل زمینه‌ای مرتبط با سرطان در حال حاضر، روش‌های تشخیصی و محدودیت‌های آن‌ها ارائه می‌شود. بررسی جامع روش‌های فلوئورسانس، طیف سنجی جذبی مادون قرمز و رامان در تشخیص سرطان دهان بیان شده است. همچنین کاربرد روش‌هایی با حداقل تهاجم براساس سرم/بزاق نیز مورد بررسی قرار گرفته است. این بررسی با بحث دربارهٔ نیازهای آینده و دامنهٔ تحولات از نقطه‌نظر بالینی نتیجه‌گیری می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تکنولوژی های نوری، تشخیص، سرطان دهان

مقدمه

کارسینوم سلول سنگ‌فرشی دهان (OSCC[1]) با رتبهٔ پانزده، شایع‌ترین سرطان در جهان و دهمین سرطان در بین مردان است که حدود ۲/۱ درصد کل بیماران سرطانی در سراسر جهان را تشکیل می‌دهد[۱]. احتمال و میزان وقوع این بیماری در میان مردان در بخش مرکزی آسیا و در میان زنان در شرق و مرکز اروپا بالاتر است. هرچند که میزان مرگ و میر از سرطان دهان در چند دههٔ گذشته کاهش یافته است اما، هنوز هم درصد آن بالا است به‌طوری‌که احتمال بقاء بیماران در مدت ۵ سال حدود ۵۰ درصد می‌باشد. ضایعات دهانی با به‌صورت بالقوه با تغییرات بدخیمی همراه هستند[۲]. از این موارد، متداول‌ترین رخداد لکوپلاکیا[2] است که به‌صورت یک ضایعهٔ متداول مخاط دهانی است که نمی‌تواند به‌سهولت قابل تشخیص باشد (شکل 1B). طیف گسترده‌ای از نرخ تغییرات بدخیم از ۰/۱۳ درصد تا ۳۶/۴۳ درصد گزارش شده است که به حضور و میزان دیسپلازیا[3]، موقعیت حفرهٔ دهان و رشد ضایعه وابسته است[۳]. برعکس، اریتروپلاکیا[4] یک ناحیهٔ سرخ رنگ است که نمی‌تواند از نظر پاتولوژیکی یا بالینی به‌عنوان ضایعهٔ قابل تشخیص دیگر شناخته شود. این بیماری شیوع کمتری دارد و توانایی بالایی برای تغییر بدخیم ۱۴/۳۵ درصد تا ۶۶/۷۶ درصد است[۵-۳]. فیبروز مخاطی دهان[5] یک بیماری حاد است که مخاط دهان و حلق را تحت تأثیر قرار می‌دهد و عمدتاً به‌علت جویدن areca nut یا betel quid رخ می‌دهد. آهنگ این تغییرات ۷/۶ درصد گزارش شده است. لیکن‌پلان دهانی[6] یک بیماری التهابی مخاط دهان است و مانند لوکاپلاکیا به‌صورت یک پلاک یا پچ (ناحیه) سفید است. با این حال میزان تغییرات بدخیم آن بسیار کمتر از لکوپلاکیا (تقریبا ۱ درصد) است (شکل 1C)[۶].

عوامل خطر شامل سیگار کشیدن و مصرف الکل به‌ترتیب به‌میزان ۴۲ درصد و ۱۶ درصد منجر به مرگ ناشی از سرطان دهان می‌شوند[۷]. سرطان‌زایی دود سیگار بر اثر آسیب DNA و افزایش جهش‌های P53 مدت‌هاست که اثبات شده است. ارتباط بین سرطان دهان با الکل به دوز و تعدادی از عواملی شامل اسیدآلدهید و متابولیک الکل که می‌تواند منجر به سرطان‌زایی شود، وابسته است. علاوه‌براین، الکل به‌عنوان یک حلال برای سایر مواد سرطان‌زا عمل می‌کند. عادات دهانی مانند جویدن betel quid و تنباکو بی‌دود در توسعهٔ سرطان دهان دخیل هستند که آن‌ها بیشتر در آسیا رایج می‌باشند[۱۰-۷]. در هند ۵۰ درصد از سرطان‌های دهان به‌علت جویدن تنباکو بی‌دود به‌وجود می‌آیند. درواقع، سرطان‌زایی مصرف تنباکو به‌علت تولید نیتروزامین‌ها رخ می‌دهد. OSCC با Epstein-Barr virus و ویروس پاپیلوم انسان[7] مرتبط است، هرچند که نقش احتمالی آن بحث برانگیز است. حدود ۲۳ درصد از OSCCها برای ویروس پاپیلوم انسانی پرخطر ۱۶ و ۱۸ مثبت بودند[۱۱و۱۲].

روش‌های تشخیصی-غربالگری معمول

آزمایش‌های غربال‌گری یا ابزار تشخیصی که در حال حاضر برای سرطان دهان در دسترس هستند، شامل معاینهٔ شفاهی دهان[8]، رنگ‌آمیزی با تولوئیدین آبی[9]، بیوپسی براش دهان و بیوپسی اسکالپ همراه با بافت‌شناسی[10] می‌شوند.

معاینهٔ معمول حفرهٔ دهان

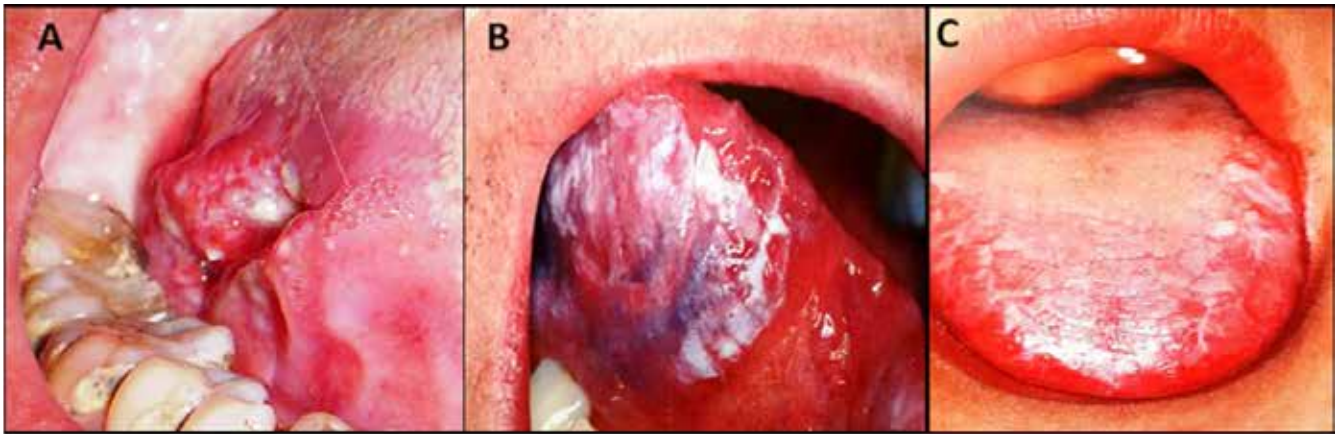
معاینهٔ دهان با استفاده از نور معمولی(رشته‌ای) برای مدت طولانی یک روش غربالگری استاندارد برای ناهنجاری‌های دهانی محسوب می‌شود. ازآنجاکه روشی بصری است، قادر به تشخیص آنکه ناهنجاری‌های مخاطی زودرس منجر به سرطان دهان می‌شوند یا خیر، نیست. حدود ۵ تا ۱۵ درصد از جمعیت عمومی دارای ناهنجاری‌های مخاطی دهان هستند و بیشتر این ضایعات به‌طور طبیعی خوش‌خیم هستند. علاوه بر این، تنها درصد کمی از لکوپلاکیا پیشرفته یا بدخیم هستند و معاینهٔ شفاهی دهان نمی‌تواند بین این‌ها و نمونه‌های غیرپیشرفتهٔ آن‌ها تبعیضی قائل شود. بنابراین این روش معاینه ممکن است در تشخیص برخی از ضایعات دهانی مفید باشد اما، توانایی آن در شناسایی همهٔ ضایعات زودرس یا جراحات بیولوژیکی که احتمالاً منجر به سرطان می‌شوند، مشکوک است[۱۳].

رنگ‌آمیزی با مادهٔ تولوئیدین آبی

تولوئیدین آبی بیش از ۴۰ سال به‌عنوان کمک به تشخیص ناهنجاری‌های مخاط دهانهٔ رحم و حفرهٔ دهان مورد استفاده است. تولوئیدین آبی یک رنگدانهٔ اسیدوفیلیک متاکروماتیک[11] است که عمدتاً به بافت‌های تحت تقسیم سلولی سریع (التهاب، احیاءکننده و بافت نئوپلاستیکی) متصل و منجر به رنگ‌آمیزی بافت غیرطبیعی می‌شود. به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد که تولوئیدین آبی در تشخیص کارسینوم مفید باشد اما، تنها حدود ۵۰ درصد از ضایعات با دیسپلازیا مثبت است. به‌علاوه این روش اکثر شرایط خوش‌خیم معمولی مانند زخم‌های عمومی را رنگ می‌کند. از جمله محدودیت‌های قابل قبول این تکنیک شامل میزان زیادی از رنگ مثبت کاذب و خصوصیات کم در رنگ‌آمیزی دیسپلازیا هستند[۱۴و۱۵].

---

1. Oral squamous cell carcinoma
2. Leukoplakia
3. dysplasia
4. erythroplakia
5. Oral submucous fibrosis
6. Oral lichen planus
7. human papillomavirus
8. conventional oral examination
9. staining with toluidine blue
10. scalpel biopsy coupled with histology
11. Metachromatic acidophilic dye



شکل۱: نمونهٔ بالینی A) سرطان زبان، B) لوکوپلاکیا و C) لیکن‌پلان

بیوپسی دهان

بیوپسی پرز رویهٔ دهان[۱۲] یک نمونهٔ بیوپسی ترنس‌اپیتلیال کامل را از هر سه لایه (زایا[۱۳]، میانی و سطحی) استخراج می‌کند. ازآنجایی‌که بافت بیوپسی تنها فرم غیرمعمول سلولی را تشخیص می‌دهد، نتایج مثبت باید با یک بیوپسی[۱۴] برای تشخیص اسکالپل هم تأیید شود. ازاین‌رو این تکنیک به‌دلیل افزودن زمان و هزینه به تشخیص ضایعات دهانی بدون مزایای اضافه برای بیماران، مورد انتقاد قرار گرفته است. به‌طور کلی این یک روش شناسایی سرطان‌های دهانی ناخواسته است که طی یک معاینهٔ بصری در مراحل اولیه و درمانی قابل بررسی است[۱۶].

بافت‌شناسی

درحال‌حاضر بافت‌شناسی یک استاندارد طلایی برای تشخیص سرطان به‌حساب می‌آید که شامل انجام بیوپسی جهت به‌دست آمدن نمونهٔ بافت برای رنگ‌آمیزی و بررسی میکروسکوپی توسط یک پاتولوژیک است. بااین‌حال، تهیهٔ نمونهٔ بافت یا بیوپسی ذاتاً روش تهاجمی است و منجر به بروز خطر و عوارضی در محل آناتومیکی می‌شود. اشتباهات نمونه‌برداری در جمع‌آوری یا تفسیر بیوپسی‌ها به‌دلیل اختلاف بین ناظران می‌تواند قابل توجه باشد. پس از حذف شدن، بافت می‌تواند تغییرات بیوشیمیایی که منجر به مصنوعات شود را داشته باشد. در بسیاری از بیماری‌ها، بافت به‌صورت یکنواخت درگیر نیست و به‌میزان زیادی منجر به اشتباهات نمونه‌برداری می‌شود. به‌خصوص در سرطان‌های دهانی، بعضی از ضایعات اولیه در شرایط خوش‌خیم به‌طور بالینی قابل تشخیص نیستند. علاوه‌براین ازنظر بافت‌شناسی، شناسایی تغییرات دقیق در ضایعات پیش‌سرطانی یا در مخاط طبیعی که این‌ها نشانگر تبدیل اولیهٔ نئوپلاستیک هستند، درونی است و می‌تواند منجر به اختلاف بین ناظران شود[۱۶و۱۷].

بنابراین قابل‌تصور است که پیشگیری اولیه از ابتلا به بیماری شامل فعالیت‌هایی برای کاهش یا حذف استفاده از تنباکو و الکل می‌شود. پیشگیری ثانویه شامل فعالیت‌هایی است که هدف آن‌ها شناسایی بیماری در مراحل اولیه است و منجر به پیش‌آگاهی بهتر و کاهش بیماری می‌شود. روش‌های کنونی تشخیص سرطان‌های دهانی عمدتاً براساس مشاهده‌های بصری ناهنجاری‌ها در بافت یا موفولوژی سلولی هستند. بنابراین ازنظر حساسیت و خاصیت به‌ویژه در مراحل اولیه، محدود می‌شوند. در بخش بعد، یک بحث عمومی در مورد عملکرد شیوهٔ طیف‌سنجی نوری به‌عنوان یک ابزار تشخیصی جایگزین/جانبی برای سرطان دهان ارائه شده است[۱۷].

روش‌هایی با حداقل تهاجم در تشخیص سرطان دهان

مایع‌های بیولوژیک مانند خون، ادرار، لنفاوی و بزاق می‌توانند اطلاعات قابل‌توجهی در مورد سلامت انسان ارائه دهند و به‌طور گسترده برای تشخیص بالینی انواع بیماری‌ها مانند سرطان‌های دهان مورد بررسی قرار گیرند. جاذبهٔ این نمونه به‌خاطر این حقیقت است که از آن‌ها می‌توان برای غربالگری توده به‌دلیل سهولت در جمع‌آوری، انتقال و هزینهٔ کم استفاده کرد. مطالعات انجام‌شده برروی خواص فیزیک و شیمیایی بزاق با استفاده از بازجذب لیزری بهبودیافتهٔ سطح[۱۵] و یونیزاسیون زمان پرواز[۱۶] همراه با طیف‌سنجی جرمی و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا برای شناسایی نشانگرهای آنزیمی و پروتئومیک مرتبط با سرطان دهان است. تکنیک‌های دیگر مانند فلوئورسانس القای لیزری[۱۷] همراه با کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا و الکتروفورز مویرگی همراه با طیف‌سنجی جرمی برای متابولیت‌های بزاقی مشخص در بیماران مبتلا به سرطان دهان مورد استفاده قرار گرفته است[۱۵].

12. Oral brush biopsy
13. Basal
14. Scalpel biopsy
15. surface-enhanced laser desorption
16. ionization time of flight
17. laser-induced fluorescence

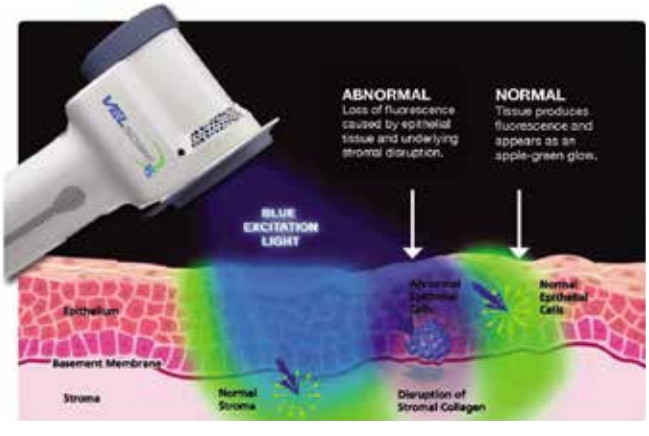
VELscope

VEL scope یک ابزار غربالگری نوری بیماری‌های دهان است که بسیار برای استفاده توسط متخصصان دهان، دارای دقت و کاربری آسانی می‌باشد[۱۸]. این ابزار دستی که از سال ۲۰۰۶ تأیید FDA را اخذ نموده است، به روش اتوفلورسانس با تاباندن نور آبی با طول‌موج ۴۶۰-۴۰۰ نانومتر می‌تواند موکوس دهانی را تصویر کند و برای تشخیص و اندازه‌گیری ضایعات دارای رنگدانهٔ ذاتی فلورسانس‌کننده مناسب می‌باشد[۱۸].

تکنیک طیف‌سنجی نوری در تشخیص سرطان دهان

طیف‌سنجی، مطالعهٔ وابستگی فرکانس ناشی‌از برهمکنش تابش الکترومغناطیس (نور) با ماده است. به‌طورکلی، نور ازطریق جذب، انتشار، پراکندگی و بازتاب با ماده اندرکنش می‌کند. در هرمورد طیف کسب‌شده اطلاعاتی را در مورد ساختار و محتوای شیمیایی نمونه می‌دهد. اندازه‌گیری نوری اطلاعات کمّی را براساس اثر طیفی از عناصر بیوشیمیایی نمونه ارائه می‌دهد که این اطلاعات جهت رسیدن به تشخیص دیداری همزمان و به‌سرعت آنالیز می‌شوند. تشخیص به‌جای تغییرات میکروسکوپی یا عینی در مورفولوژی بافت یا سلول، براساس تغییرات بیوشیمیایی مبتنی‌بر پاتولوژی است. دستگاه‌هایی که این اندازه‌گیری‌ها را به‌دلیل پیشرفت در محاسبات، تکنولوژی نوری، فیبر نوری و نیمه‌رسانا انجام می‌دهند، ارزان‌تر، قوی و قابل حمل هستند. رویکردهای مبتنی‌بر طیف‌سنجی فلوئرسانس[۱۸]، طیف‌سنجی جذبی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز[۱۹] و طیف‌سنجی پراکندگی رامان[۲۰] توانایی بالقوه‌ای برای بهبود تشخیص سرطان‌های دهان نشان می‌دهند[۱۵].

در بخش بعد، بیان مختصری از این تکنیک‌ها و کاربردهای آن‌ها در تشخیص سرطان دهان ارائه شده است. شکل ۲ نشان‌دهندهٔ تصویری کلی از شیوهٔ طیف‌سنجی نوری است

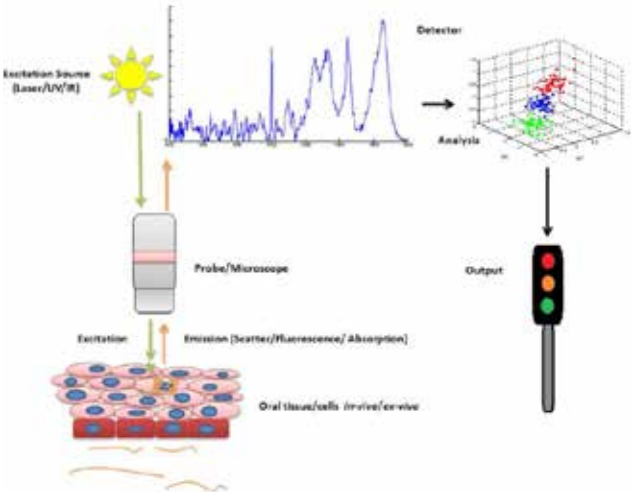


شکل۲: سیستم نوری تشخیصی VELscope

مطابق با شکل۳ منبع نور از طریق پروب یا میکروسکوپ (برای کاربردهای in vivo or ex vivo/in vitro) به نمونه می‌رسد. پس از تحریک با یک منبع مناسب، مولکول‌ها یا می‌توانند به یک حالت برانگیخته بروند و نور را به‌صورت فلوئورسانس (لامپ فرابنفش/مرئی) بازنشر کنند یا نور را برای تولید ارتعاشات درون مولکول (لامپ مادون قرمز) جذب کنند یا توسط برهم‌کنش با مدهای ارتعاشی مولکول در سلول‌ها نور را به‌صورت رامان پراکنده کنند (لیزر مادون قرمز یا مرئی). نور پراکنده‌شده/انتشار یافته/عبوری سپس توسط میکروسکوپ یا پروب جمع‌آوری و به آشکارساز منتقل می‌شود. سپس اپراتور می‌تواند نتایج طیفی را آنالیز کند و با استفاده از طبقه‌بندی مناسب با بررسی خروجی می‌توان در تشخیص سرطان نظر دهد. این تکنیک را می‌توان با توجه به کاربردهای in vivo،ex vivo (بافت‌شناسی یا سیتولوژی) یا in vitro تغییر داد[۱۵و۱۹].

طیف‌سنجی فلوئورسانس

وقتی‌که یک مولکول در طول‌موج برانگیختگی تابش می‌کند، به‌حالت پایه در طول‌موجی که جذب داشته است می‌رسد. همچنین با جذب انرژی از تراز پایه به تراز برانگیخته منتقل می‌شود. مولکول می‌تواند به‌آرامی از تراز برانگیخته به تراز پایه با گسیل نور در طول‌موج‌های خاص منتقل شود. در ناحیهٔ فرابنفش/مرئی/مادون قرمز طیف الکترومغناطیس(تقریباً ۱۰۰۰-۲۰۰ نانومتر)، انتشار نور به‌صورت فلوئورسانس (یا گاهی فسفرسانس) رخ می‌دهد[۲۰]. طیف انتشار فلوئورسانس نشان‌دهندهٔ شدت فلوئورسانس اندازه‌گیری‌شده است که در محدودهٔ طول‌موج‌های انتشار، در یک طول‌موج برانگیخته ثابت می‌شود و می‌تواند اطلاعات مربوط به ویژگی‌های مولکولی فلوروفورها را فراهم کند(شکل۴)[۲۳-۲۰] در اواخر دههٔ ۱۹۷۰، تشخیص سرطان براساس اتوفلوئورسانس[۲۱] (همچنین به‌نام فلوئورسانس طبیعی، ذاتی یا درونی) از فلوروفورها به‌طور



شکل۳: ساختمان و عملکرد معمول تکنیک طیف‌سنجی نوری برای اهداف تشخیصی

18. Fluorescence spectroscopy
19. Fourier-transform infrared absorption spectroscopy
20. Raman scattering spectroscopies
21. Autofluorescence

طبیعی مانند کلاژن، الاستین، کراتین و NADH [۲۲] آغاز شد[۲۴]. حضور بیماری می‌تواند منجر به تغییراتی در غلظت خون، اندازهٔ هسته، محتوای کلاژن یا ضخامت اپیتلیال شود که می‌تواند غلظت و ویژگی‌های فلوروفورها را تغییر دهد. در سرطان‌های دهانی نشان داده شده است که لایهٔ اپیتلیال به‌میزان زیادی فلورسنت لایهٔ کلاژن را می‌پوشاند و منجر به کاهش شدت فلوئورسانس در سرطان‌ها می‌شود. در یک مطالعهٔ ex-vivo از کیسه باکال همستر به‌عنوان مدلی تجربی، برای شناسایی نشانگرهای طیفی مرتبط با مراحل مختلف سرطان دهان استفاده شد. با مقایسهٔ طیف فلوئورسانس بیوپسی همستر و انسان و خطوط سلولی سرطان دهان پیشنهاد کردند که تغییرات در فلوئورسانس ریبوفلاوین[۲۳] و پورفیرین[۲۴] می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر طیفی برای شرایط طبیعی و سرطانی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین نشان داده شد که بیوپسی‌های طبیعی و سرطانی انسان می‌تواند براساس پروفایل طیفی اتوفلوئورسانس خود متمایز شوند. مطالعهٔ ex vivo دیگر امکان‌سنجی کمّی پاسخ طیفی درجات مختلف بدخیمی را پیگیری کرد[۲۸-۲۵].

در اولین مطالعهٔ in vivo با استفاده از طیف‌سنجی اتوفلوئورسانس تفاوت بین مخاط تومور و سالم براساس باند انتشار پورفیرین گزارش شد. این تفاوت‌ها به میکرو ارگانیسم‌های زنده روی سطوح نکروز یا زخمی مربوط می‌شود و در روش‌های in vivo برای پیگیری پیشرفت سرطان دهان در مدل‌های حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است. در ادامه، اتوفلوئورسانس in vivo از مخاط دهان ۸ داوطلب سالم و ۱۵ بیمار با ضایعات بدخیم و خفیف ثبت شد. شدت در ناحیهٔ طیفی آبی کاهش یافت و افزایش فلوئورسانس پورفیرین در ناحیهٔ قرمز مشاهده شد. براساس نسبت بین این‌ها، حساسیت ۸۲ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد گزارش شد. مطالعات مختلف دیگر، شواهد بیشتری را در پشتیبانی از طیف‌سنجی فلوئورسانس in vivo برای تشخیص سرطان دهان به‌صورت غیرتهاجمی فراهم می‌کند. مطالعات اخیر نیز نشان دادند که طیف‌سنجی اتوفلوئورسانس می‌تواند برای شناسایی اختلالات حفرهٔ دهان در اثر عادت‌های طولانی‌مدت تنباکو استفاده شود. یافته‌های آن‌ها نشان داد که سطوح پایین کلاژن و افزایش نسبت فلاوین آدنین‌دی‌نوکلئوتید به NADH می‌تواند به‌عنوان نشانگر پیش‌آگهی برای خطر سرطان دهان استفاده شود. بااین‌حال، بافت حاوی تعدادی فلوئوروفور طبیعی با ویژگی‌های طیفی گسترده و دارای همپوشانی است. به‌این دلیل تشخیص آن‌ها ضعیف است و ویژگی طیف‌سنجی فلوئورسانس را برای کاربردهای تشخیصی کاهش می‌دهند[۳۱-۲۸].

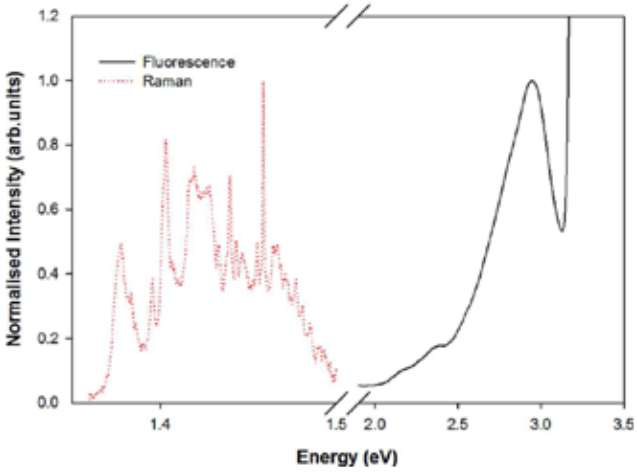
22. Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)

23. Niboflavin

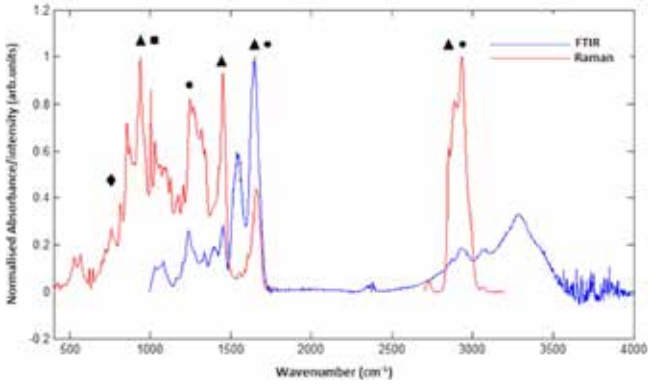
24. Porphyrin

طیف‌سنجی جذبی تبدیل فوریه مادون قرمز

طیف‌سنجی ارتعاشی زیرمجموعه‌ای از طیف‌سنجی است که موجب آنالیز ارتعاشات درون یک مولکول (یا ماده) می‌شود. ارتعاشات، مشخصهٔ ساختار مولکولی هستند و در مولکول‌های چندگانه "اثر انگشت"[۲۵] طیفی را ایجاد می‌کنند[۳۳-۳۱]. بنابراین طیف انرژی‌های ارتعاشی یا فرکانس‌ها (به‌عنوان عدد موج cm^{-1} بیان می‌شود) می‌تواند برای توصیف ساختار مولکولی یا تغییرات آن ناشی از عوامل محیطی یا خارجی مورد استفاده قرار گیرد. انرژی‌های ارتعاشی در محدودهٔ مادون قرمز میانه طیف الکترومغناطیس قرار دارند و معمولاً از طریق طیف‌سنجی جذبی مادون قرمز مورد بررسی قرار می‌گیرند. ارتعاشات با انرژی یا فرکانس بالا مشخصه‌ای از نور و مرز گروه‌های سبک مانند C-H، N-H و O-H هستند. درحالی‌که فرکانس‌های پایین با گروه‌های سنگین یا ارتعاشات جمعی ماکرومولکول‌ها ارتباط دارند (شکل۵)[۳۴].



شکل۴: مقایسهٔ طیف معمول فلوئورسانس(ریبوفلاوین) و طیف معمول رامان بافت(هر دو نرمالیزه هستند) در مقیاس انرژی



شکل۵: مقایسهٔ طیف جذبی مادون قرمز و طیف رامان نمونه‌های بافت انسان.

25. fingerprint

درحال‌حاضر طیف‌سنجی مادون قرمز یک روش معمول برای توصیف مواد است و در زمینهٔ پزشکی قانونی، علم محیط‌زیست و داروشناسی کاربرد فراوانی دارد. برای اولین بار، کاربرد نمونه‌های بافت برای تشخیص (سرطان) در اوایل دههٔ ۱۹۲۰ گزارش شد و از آن زمان تاکنون دامنهٔ آسیب‌شناسی‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

Wu و همکاران نشان دادند که براساس محتوای لیپید و پروتئین، بافت‌های دهانی سالم و دارای تومور می‌توانند متمایز باشند. در مطالعهٔ دیگری از ۱۰ بافت زیرلثه‌ای سالم[۲۶] و ۱۵ بافت OSCC نشان دادند که طیف‌های سالم به‌میزان زیادی تحت تأثیر کلاژن قرار می‌گیرند. آن‌ها همچنین پیشنهاد کردند که طیف‌ها تحت تأثیر کراتین موجود در سلول‌های اکتودرمی قرار می‌گیرند. مطالعهٔ دیگری با استفاده از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز برای شناخت سرطان‌زایی دهان در مدل‌های حیوانی گزارش شده است. روش‌های تصویربرداری طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز برای آنالیز گونه‌های مختلف سرطان دهان مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعه‌ای برای ارزیابی تغییرات در بیوشیمی و تناقض ضعیف میکروطیف‌سنجی مادون قرمز کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی/ اوروفارنکس[۲۷] نشان می‌دهد که DNA و کراتین می‌توانند نشانگرهای طیفی برای تمایز و تفکیک بین بیوپسی‌های کارسینوم سلول سنگفرشی و سالم فراهم کنند. همچنین با تولید نقشه‌های مادون قرمز سه‌بعدی نشان دادند که حالت‌های تکثیر یا کاهش تومورهای سر و گردن قابل شناسایی هستند. به‌منظور آنالیز اتوماتیک با توان بالا نشان داده شد که تصاویر طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز با کیفیت خوبی می‌تواند از بخش‌های میکروآرایهٔ بافت ثابت‌شده در فرمالین و پارافین[۲۸] که اطلاعات سطح مولکولی را به‌عنوان پایه‌ای برای تشخیص ارائه می‌دهند، به‌دست آید. در مقایسه با فلوئورسانس، طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز یک اثر انگشت دقیق از محتوای بیوشیمیایی نمونه فراهم می‌آورد. بااین‌وجود، اگرچه طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز برای آنالیز بافت‌های ex vivo انسان استفاده می‌شود، اما کاربرد این روش برای تشخیص in vivo به‌دلیل عمق نفوذ کم و این واقعیت که آب در محدودهٔ مادون قرمز یک جاذب قوی به‌شمار می‌رود، محدود است. فیبرهای نوری معمولی در ناحیهٔ مادون قرمز شفافیت محدودی دارند و بنابراین در مطالعات in vivo نسبت به کاربردهای فیبر نوری رامان یا فلوئورسانس کمتر مورد استفاده هستند. تحولات جدید مبتنی‌بر عناصر بازتاب کلی تضعیف‌شده[۲۹] در اجرای برنامه‌های in vivo کمک کنند[۳۹-۳۴].

26. normal sub-gingival tissues (NSTs)

27. oropharyngeal

28. formalin-fixed paraffin-embedded

29. Attenuated total reflection (ATR)

طیف‌سنجی رامان

طیف‌سنجی رامان یک روش مکمل برای طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز است و منشأ آن در کشف اثر رامان در سال ۱۹۲۸ توسط سی وی رامان است که منجر به دریافت جایزهٔ نوبل در سال ۱۹۳۰ شد [۴۲-۴۰]. مشابه طیف‌سنجی مادون قرمز، رامان جفت‌شدگی تابش برخوردی با ارتعاشات مولکولی را شامل می‌شود و طیف حاصل از آن به‌طور مشابه مشخصهٔ مواد است. بااین‌وجود، درحالی‌که طیف‌سنجی مادون قرمز شامل جذب تابش می‌شود، طیف‌سنجی رامان یک روش پراکندگی است به‌طوری‌که تابش برخوردی با قطبش مولکول مرتعش جفت می‌شود و موجب تولید یا حذف یک ارتعاش می‌شود. به‌این ترتیب ارتعاشات باندهای قطبی نامتقارن در طیف مادون قرمز قوی است درحالی‌که رامان منحصراً به‌عنوان یک پروب از گروه‌های متقارن و غیرقطبی مناسب است. ارتعاشات O-H آب در طیف مادون قرمز بسیار قوی اما، در طیف رامان بسیار ضعیف است. رامان روشی مناسب‌تر برای کاربردهای in vivo است (مطابق شکل۳). یکی دیگر از تفاوت فیزیکی این تکنیک‌ها این است که درحالی‌که مانیتورهای مادون قرمز، جذب تابش مادون قرمز را می‌دهد اما، پراکندگی رامان می‌تواند در ناحیهٔ طیفی فرابنفش، مرئی یا مادون قرمز نزدیک استفاده شود[۴۳]. بنابراین پراکندگی رامان به‌طور ذاتی بیشترین رزولوشن فضایی را برای نقشه‌برداری یا تعیین پروفایل در یک روش میکروسکوپی کانفوکال ارائه می‌دهد و محدودیت رزولوشن فضایی توسط طول‌موج تعیین می‌شود (کمتر از ۱ میکرومتر برای رامان، حدود ۱۰-۵ میکرومتر برای مادون قرمز). کاربرد طیف‌سنجی رامان برای بیومولکول‌ها در ابتدا در سال ۱۹۶۰ نشان داده شد و کاربرد آن در سال ۱۹۷۰ برای زیست پزشکی مورد بررسی قرار گرفت. انجام مطالعات بر تمام سلول‌ها، بافت‌ها و به‌صورت in vivo بر گسترهٔ آسیب‌شناسی‌ها نشان‌دهندهٔ توانایی کاربردهای تشخیصی است. کاربردهای طیف‌سنجی رامان در تشخیص سرطان دهان با تجزیه و تحلیل بافت سالم و دیسپلازیا در یک مدل موش اغاز گردید[۴۳]. دیسپلازیا در سقف دهان با استفاده از کاربرد موضعی کارسینوژن 4-nitroquinoline 1-oxide القاء شد و حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد مشاهده شد. این تحقیق سپس در مطالعهٔ دیگری از بیوپسی‌های سرطان دهان دنبال شد[۴۴]. در سال ۲۰۰۴، مطالعه ای نشان داد که قابلیت تشبیت در فرمالین بافت‌های دهانی برای آسیب‌شناسی نوری، نشانگر اختلاف معنی‌داری در ناحیهٔ اپیتلیال نمونه‌های سالم و بدخیم ناشی از ترکیب پروتئین، تغییرات ساختاری و امکان افزایش در مقدار پروتئین در اپتلیال بدخیم است[۴۵]. در سال ۲۰۰۶ اثربخشی روش‌های طیف‌سنجی رامان در تشخیص شرایط سالم، سرطانی، پیش‌سرطانی و التهابی را نشان دادند. ویژگی‌های غنی لیپید در شرایط سالم و ویژگی‌های پروتئینی برجسته در تومورها و سایر شرایط پاتولوژیک مشاهده شد[۴۶]. دسته‌بندی بین گروه‌های مختلف با استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد را

تولید می‌کند. نقشه‌برداری رامان از بخش‌های بافت بیشتر توسط تغییرات بیوشیمیایی درون لایه‌های اپیتلیال مختلف که همراه با شروع بیماری است، بیان می‌شود[۴۷]. مطالعه‌ای هم نشان داد که کارسینوم‌های دهانی از انواع مختلف پاتولوژی می‌توانند براساس شدت نسبی گروه‌های مرتبط با لیپیدها و پروتئین‌ها متفاوت باشند[۴۸]. در طیف‌سنجی in vivo رامان با استفاده از پروب‌های فیبر نوری برای شناسایی تغییرات مشخصهٔ منطقه در حفرهٔ دهان گزارش شده است، آن‌ها نشان دادند که بخش‌های دهانی متفاوت براساس سطح کراتینیزاسیون می‌توانند متفاوت باشند[۴۹]. پروفایل‌های مختلف طیف‌سنجی رامان از نواحی حفرهٔ دهان (لب درونی، لثه[۳۰]، کف، زبان پشتی، نرم‌کام، سخت‌کام، مخاط باکال) نیز در مطالعه‌ای مشابه مشخص گردید[۵۰و۵۱]. برای ارزیابی تغییرات بینابینی آناتومیک، مماس بین بیوشیمیایی‌های مرجع(هیروکسی آپاتیت، کراتین، کلاژن، DNA، اسید اولیک) و آنالیز تفکیک حداقل مربعات جزئی مورد استفاده قرار گرفت. یافته‌ها نشان می‌دهد که ویژگی‌های مورفولوژیکی و بافت‌شناسی بخش‌های مختلف تأثیر قابل توجهی بر طیف رامان in vivo دارد و بخش‌های مختلف را می‌تواند با حساسیت و ویژگی ۸۵ درصد طبقه‌بندی کرد. طیف in vivo را می‌توان در زمان‌بندی‌های بالینی قابل اجرا به‌دست آورد و امکان طبقه‌بندی شرایط طبیعی و پاتولوژیک را نشان دادند. این موضوع توسط مطالعهٔ دیگری از اثرات میدان سرطان ناشی از دخانیات در مخاط سرطان پیگیری شد[۱۵و۵۱].

خلاصه و چشم‌انداز

اگرچه حفره دهان با هدف بررسی به‌راحتی قابل دسترس است، اما اغلب بیماران با سرطان دهان در مرحلهٔ پیشرفتهٔ بیماری زمانی که موفقیت در درمان حداقل است، مراجعه می‌کنند و این امر منجر به افزایش مرگ و میر می‌شود. تشخیص زودهنگام بهترین راه برای اطمینان از بقای بیمار و کیفیت زندگی آن است. استاندارد طلایی کنونی برای تشخیص بالینی ضایعات دهان، بیوپسی و تأیید هیستوپاتولوژیک است. این فرآیند تهاجمی، وقت‌گیر و مستعد اشتباه ناشی از مشاهده‌گر است. یک روش جایگزین تشخیصی وجود دارد که می‌تواند تشخیص غیرتهاجمی حفرهٔ دهان را در افرادی با ضایعات دهانی مشکوک تضمین کند.

در حال حاضر روش‌هایی که براساس طیف‌سنجی نوری هستند، به‌خوبی شناسایی شده‌اند و می‌توانند نقش مهمی را در این راستا ایفا کنند. اندازه‌گیری‌های طیف‌سنجی بیوشیمیایی بافت با حساسیت و ویژگی بهبود تغییرات موضعی توسط تصویربرداری، نشان‌دهندهٔ اندازه‌گیری وضعیت نرمال یا بیمارگونه در شرایط غیرقابل دسترس است و می‌تواند حساسیت بالایی برای تشخیص زودهنگام بیوشیمیایی نسبت به ناهنجاری‌ها و مورفولوژی فراهم کند. از جمله تکنیک‌های طیفی بیان‌شده، فلوئورسانس شاید از نظر تکنولوژی بیشتر قابل دسترس باشد، زیرا برمبنای آنالیز نوری است که بعد از روشنایی توسط یک لامپ فرابنفش منتشر می‌شود. نور منتشرشده در ناحیهٔ مرئی است و از این رو پروب‌ها می‌توانند از فیبرهای نوری ارزان با درجهٔ پایین یا فضای آزاد استفاده کنند. این تکنیک تنها بخش کوچکی از بیومولکلول‌های درونی که فلوئورسانس هستند را تشخیص می‌دهد و بر شناسایی نشانگرهای خاص پاتولوژی در میان آن‌ها متکی است. از سوی دیگر طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز یک اثرانگشت بدون برچسب کامل از محتوای بیوشیمیایی بافت، سلول یا مایعات بیولوژیکی را فراهم می‌کند و این امر می‌تواند به میزان بیشتری تغییرات خاص پاتولوژیک را بررسی کند. بااین‌حال، آب یک جاذب بسیار قوی در طیف‌سنجی تبدیل فوریهٔ مادون قرمز است و بنابراین عملکرد تشخیصی in vivo برای آن ممکن است محدود باشد. طیف‌سنجی رامان یک اثر انگشت بدون برچسب و کامل از نمونه فراهم می‌کند و همچنین دارای مزیت کارکردن در ناحیهٔ مرئی را دارد. آب یک پراکنندهٔ رامان ضعیف است و بنابراین این تکنیک بیشتر برای غربالگری معمول in vivo بیمار یا سیتولوژی یا بافت‌شناسی طیفی ex vivo مناسب است. بنابراین دارای ویژگی و حساسیت بالایی است و می‌تواند یک هدف آزمایشی کمی بدون برچسب در زمینهٔ گسترش و پیشرفت زودهنگام بیماری براساس محتوای بیومولکولی نمونهٔ بیمار انجام شود.

ضخامت متغیر و درجهٔ کراتینیزاسیون در بخش‌های مختلف درون حفرهٔ دهان می‌تواند تأثیر تشخیص توسط روش‌های نوری، مخصوصاً برای ضایعات اولیه را تحت تأثیر قرار دهد. این موضوع توسط جامعهٔ زیست‌پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات مختلف توانایی روش‌های طیف‌سنجی در شناسایی تغییرات آناتومیکی را به‌خوبی نشان داده‌اند و این به‌دلیل سطوح مختلف کراتینیزاسیون موجود است. این مطالعات شواهدی در حمایت از تفاوت‌های ذاتی بین موقعیت‌های متفاوت فراهم می‌آورند و پیشنهاد می‌کنند که هر بخش به‌صورت مستقل درمان شود. برای مثال، مدل‌های طیفی که توسط طیف‌هایی از سرطان مخاطی باکال گسترش یافته نمی‌توانند برای شناسایی ناهنجاری‌های موجود در زبان یا کام استفاده شوند. بسیاری از مطالعات اخیر تحت این دستورالعمل که تومورهای هر بخش به‌طور جداگانه درمان شود، انجام می‌شوند. همان‌طورکه تمام تکنیک‌های نوری دارای حساسیت بالایی هستند اما، توسط پدیدهٔ جذب و پراکندگی محدود می‌شوند. آزمایش در مادون قرمز نزدیک می‌تواند حساسیت عمقی پروب‌های رامان را بهینه کند و روش‌های جدیدی مانند طیف‌سنجی فضایی رامان و افزایش عمق نفوذ چند میلی‌متری را برای ضایعات عمیق‌تر نشان دهد. چنین پیشرفت‌های تکنولوژی به‌طور بالقوه رامان را قبل از این موضوع به‌عنوان نامزدی برای کاربردهای تشخیص نوری in vivo قرار می‌دهد.

در سال‌های آینده، آزمایش‌های بالینی گسترده برای به‌دست آوردن

30. attached gingiva

اطلاعات بخش خاص مورد نیاز برای ایجاد اندازهٔ مناســب و مجموعه‌های آزمون برای آنالیز و گســترش الگوریتمی قوی مورد نیاز است. مدل‌های استاندارد برای هریک از بخش‌های خاص در حفرهٔ دهان باید قبل از آنکه برای استفادهٔ روزمره بررسی شود، دقیق مورد آزمایش قرار بگیرد. پیشرفت تکنولوژی در زمینهٔ پروب‌های فیبر نوری و کوچک‌ســازی ابزارها است و همچنین برای تشــخیص زمان واقعی و معمول مورد نیاز اســت. حذف مؤثر ســیگنال زمینه، بهینه‌سازی نور جمع‌آوری‌شده و ترکیب فیلترهای تداخلی کوچک‌شــده در پروب‌های فیبر نوری بخشی از مواردی هستند که بســیار مورد توجه قرار می‌گیرند. بهبود بیشتر در الگوریتم‌های آنالیز داده نیازمند گسترش ســریع، هدفمند و کاربرپسند از نقطه‌نظر استفادهٔ معمول بالینی هستند که در آن یک پزشک یا یک تکنسین می‌تواند طیف به‌دست آمدهٔ مخالف با همهٔ نمونه‌های موجود برای تشخیص یک مورد را آنالیز کند. ســازگاری روش‌های طیف‌سنجی نوری برای تشخیص بالینی معمول، تعداد معاینه‌های بالینی و اضطراب بیماران را با به حداقل رساندن زمان انتظار برای تشخیص هیستوپاتوژیکی کاهش می‌دهد. این تکنولوژی برای بیماران خطری ایجاد نمی‌کند و بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک روش مکمل یا جایگزین ایمن برای روش‌های تشــخیصی موجود استفاده شود

References:

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015; 136: E359–E386.

2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol 2009; 45: 309–16.

3. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. Berlin, Germany: Springer; 1997.

4. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. Cancer 1984; 53: 563–8.

5. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995; 79: 321–9.

6. Murti PR, Bhonsle RB, Pindborg JJ, Daftary DK, Gupta PC, Mehta FS. Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. Community Dent Oral Epidemiol 1985; 13: 340–1.

7. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada–Nur F. A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission, and malignant association. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1985; 60: 30–4.

8. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res 1988; 48: 3282–7.

9. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. Oncogene 2002; 21: 7435–51.

10.Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. Lancet Oncol 2006; 7: 149–56.

11.Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. Smokeless tobacco and cancer. Lancet Oncol 2008; 9: 667–75.

12.Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 467–75.

13.Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thomas G. Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial. Lancet 2005; 365: 1927–33.

14.Gandolfo S, Pentenero M, Broccoletti R, Pagano M, Carrozzo M, Scully C. Toluidine blue uptake in potentially malignant oral lesions in vivo: clinical and histological assessment. Oral Oncol 2006; 42: 89–95.

15.SinghSP, Ibrahim O, Byrne HJ, Mikkonen JW, Koistinen AP, Kullaa AM, LyngFM. Recent advances in optical diagnosis of oral cancers: Review and future perspectives. Head & Neck, APRIL 2016.

16.Fist S. The oral brush biopsy: separating fact from fiction. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; 96: 654–5.

17.Eisen D, Frist S. The relevance of the high positive predictive value of the oral brush biopsy. Oral Oncol 2005; 41: 753–5; author reply 756.

18.Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995; 80: 188–91.

19.Mascitti M, Orsini1 G, Tosco1 V, Monterubbianesi R, Balercia A, Putignano A, Procaccin M, Santarelli A. An Overview on Current Non-invasive Diagnostic Devices in Oral Oncology. Frontiers in Physiology, 9(1510)October 2018.

20.Profio AE, Doiron DR. A feasibility study of the use of fluorescence bronchoscopy for localization of small lung tumours. Phys Med Biol 1977; 22: 949–57.

21.Kolli VR, Savage HE, Yao TJ, Schantz SP. Native cellular fluorescence of neoplastic upper aerodigestive mucosa. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995; 121: 1287–92.

22.Farwell DG, Meier JD, Park J. Time-resolved fluorescence spectroscopy as a diagnostic technique of oral carcinoma: validation in the hamster buccal pouch model. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2010; 136: 126–33.

23.Onizawa K, Okamura N, Saginoya H, Yusa H, Yanagawa T, Yoshida H. Analysis of fluorescence in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2002; 38: 343–8.

24.Ingrams DR, Dhingra JK, Roy K. Autofluorescence characteristics of oral mucosa. Head Neck 1997; 19: 27–32.

25.M€uller MG, Valdez TA, Georgakoudi I. Spectroscopic detection and evaluation of morphologic and biochemical changes in early human oral carcinoma. Cancer 2003; 97: 1681–92.

26.Harris DM, Werkhaven J. Endogenous porphyrin fluorescence in tumors. Lasers Surg Med 1987; 7: 467–72.

27.Wang CY, Tsai T, Chen HC, Chang SC, Chen CT, Chiang CP. Autofluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of DMBA-induced hamster buccal pouch pre-cancers and cancers. J Oral Pathol Med 2003; 32: 18–24.

28.Gillenwater A, Jacob R, Ganeshappa R. Noninvasive diagnosis of oral neoplasia based on fluorescence spectroscopy and native tissue autofluorescence. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1998; 124: 1251–8.

29.Chaturvedi P, Majumder SK, Krishna H, Muttagi S, Gupta PK. Fluorescence spectroscopy for noninvasive early diagnosis of oral mucosal malignant and potentially malignant lesions. J Cancer Res Ther 2010; 6: 497–502.

30.Mallia RJ, Subhash N, Sebastian P. In vivo temporal evolution of ALA-induced normalized fluorescence at different anatomical locations of oral cavity: application to improve cancer diagnostic contrast and potential. Photodiagnosis Photodyn Ther 2010; 7: 162–75.

31.Schwarz RA, Gao W, Daye D, Williams MD, Richards–Kortum R, Gillenwater AM. Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy of oral epithelial tissue using a depth-sensitive fiber-optic probe. Appl Opt 2008; 47: 825–34.

32.Nazeer Shaiju S, Ariya S, Asish R. Habits with killer instincts: in vivo analysis on the severity of oral mucosal alterations using autofluorescence spectroscopy. J Biomed Opt 2011; 16: 087006.

33.Messerschmidt RG, Harthcock MA, editors. Infrared microscopy, theory and applications.

New York, Marcel Dekker; 1988. 32. Dukor RK. Vibrational spectroscopy in the detection of cancer. Handbook of vibrational spectroscopy. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd; 2006.

34.Wu JG, Xu YZ, Sun CW. Distinguishing malignant from normal oral tissues using FTIR fiber-optic techniques. Biopolymers 2001; 62: 185–92.

35.Fukuyama Y, Yoshida S, Yanagisawa S, Shimizu M. A study on the differences between oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosas measured by Fourier transform infrared spectroscopy. Biospectroscopy 1999; 5: 117–26.

36.Krishnakumar N, Sulfikkarali NK, Manoharan S, Nirmal RM. Screening of chemopreventive effect of naringenin-loaded nanoparticles in DMBAinduced hamster buccal pouch carcinogenesis by FT-IR spectroscopy. Mol Cell Biochem 2013; 382: 27–36.

37.Schultz CP, Liu KZ, Kerr PD, Mantsch HH. In situ infrared histopathology of keratinization in human oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. Oncol Res 1998; 10: 277–86.

38.Bruni P, Conti C, Giorgini E, Pisani M, Rubini C, Tosi G. Histological and microscopy FT-IR imaging study on the proliferative activity and angiogenesis in head and neck tumours. Faraday Discuss 2004; 126: 19–26, discussion 77–92.

39.Pallua JD, Pezzei C, Zelger B. Fourier transform infrared imaging analysis in discrimination studies of squamous cell carcinoma. Analyst 2012; 137: 3965–74.

40.Raman CV, Krishnan KS. A change of wave-length in light scattering. Nature 1928; 121: 619.

41.Walton AG, Deveney MJ, Koenig JL. Raman spectroscopy of calcified tissue. Calcif Tissue Res 1970; 6: 162–7.

42.Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. Phys Med Biol 2000; 45: R1–R59.

43.Bakker Schut TC, Witjes MJ, Sterenborg HJ. In vivo detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy. Anal Chem 2000; 72: 6010– 8.

44.Venkatakrishna K, Kurien J, Keerthilata MP. Optical pathology of oral tissue: a Raman spectroscopy diagnostic method. Curr Sci 2001; 80: 665–9.

45.Krishna CM, Sockalingum GD, Kurien J. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. Appl Spectrosc 2004; 58: 1128–35.

46.Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. Biopolymers 2006; 81: 179–93.

47.Cals FLJ, Bakker Schut TC, Koljenovic´ S, Puppels GJ, Baatenburg de Jong RJ. Method development: Raman spectroscopy-based histopathology of oral mucosa. J Raman Spectrosc 2013; 44: 963–72.

48.Shyam Sunder N, Nirmala NR, Kartha VB, Ullas G, Kurien J. Laser Raman spectroscopy: a novel diagnostic tool for oral cancer. J Orofac Sci 2011; 3: 15–9.

49.Guze K, Short M, Sonis S, Karimbux N, Chan J, Zeng H. Parameters defining the potential applicability of Raman spectroscopy as a diagnostic tool for oral disease. J Biomed Opt 2009; 14: 014016.

50.Bergholt MS, Zheng W, Huang Z. Characterizing variability in in vivo Raman spectroscopic properties of different anatomical sites of normal tissue in the oral cavity. J Raman Spectrosc 2012; 43: 255–62.

51.Singh SP, Deshmukh A, Chaturvedi P, Murali Krishna C. In vivo Raman spectroscopic identification of premalignant lesions in oral buccal mucosa. J Biomed Opt 2012; 17: 105002.