

KAROLINA BABIUCH, MARIA CHOMYSZYN-GAJEWSKA

Zastosowanie obrazowania autofluorescencji do wykrywania zmian przednowotworowych i nowotworowych na błonie śluzowej jamy ustnej – przegląd piśmiennictwa

Using Autofluorescence Visualization for Detection of Premalignant and Malignant Oral Lesions – Literature Review

Katedra i Zakład Periodontologii i Klinicznej Patologii Jamy Ustnej Instytutu Stomatologii CM Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Streszczenie

Wczesne wykrycie zmian przednowotworowych i nowotworowych na błonie śluzowej jamy ustnej umożliwia ich bardziej skuteczne i mniej okaleczające leczenie. Badanie wzrokiem w świetle białym, które jest powszechnie stosowane do wykrywania zmian na błonie śluzowej, nie jest metodą czułą w diagnozowaniu zmian subklinicznych. Podczas takiego badania wiele zmian na błonie śluzowej jamy ustnej, szczególnie we wczesnym stadium, pozostaje niezauważonych. Ostatnie doniesienia wskazują na dużą przydatność zjawiska autofluorescencji do wczesnego wykrycia zmian na błonie śluzowej jamy ustnej. Celem opracowania jest zwrócenie uwagi lekarzy dentystów na znaczenie technik obrazowania autofluorescencji w procesie oceny stanu błony śluzowej jamy ustnej i wczesnego wykrywania zmian przednowotworowych i nowotworowych. Autofluorescencja tkanek jest wywołana przez substancje tzw. fluorofory, które są umiejscowione w komórkach i macierzy tkankowej. Fluorofory absorbują światło o określonej długości fali, ulegają wzbudzeniu i emitują energię w postaci fluorescencji. Proces chorobowy toczący się w tkance powoduje zmiany jej właściwości autofluorescencyjnych. Wykorzystanie obrazowania autofluorescencji tkanek błony śluzowej jamy ustnej umożliwia wykrycie zmian przednowotworowych i nowotworowych zanim staną się widoczne w świetle białym. W związku z tym techniki obrazowania autofluorescencji mogą się stać pomocnym narzędziem w walce z dużą śmiertelnością spowodowaną rakiem jamy ustnej (**Dent. Med. Probl. 2011, 48, 2, 251–254**).

Słowa kluczowe: fluorescencja, zmiany przednowotworowe na błonie śluzowej jamy ustnej, rak jamy ustnej.

Abstract

Early detection of premalignant and malignant oral lesions enables their more effective and less invasive therapy. Visual inspection, that is commonly used for oral lesions detectings, is not a sensitive method. During such procedure many lesions of the oral mucosa, particularly in an early stage, are not detected. Last reports indicate usefulness of autofluorescence for early detection of oral lesions. The aim of this article is to call dentist attention to the role of autofluorescence visualization techniques in evaluation process of oral mucosa's condition and early detection of premalignant and malignant oral lesions. Autofluorescence of tissues is produced by substances called fluorophores, that are located in cells and tissue matrix. Fluorophores absorb light of a suitable wavelength, undergo excitation and produce fluorescence. Presence of disease process in the tissue causes changes of their autofluorescence specificity. Autofluorescence visualization of tissues of the oral mucosa enables detection of premalignant and malignant lesions before they become visible in the white light. Due to this fact, autofluorescence visualization techniques could become a helpful tool in a battle with high mortality caused by oral cancer (**Dent. Med. Probl. 2011, 48, 2, 251–254**).

Key words: fluorescence, premalignant oral lesions, oral cancer.

Pomimo coraz doskonalszych metod diagnostycznych, wykrywanie patologicznych zmian na błonie śluzowej jamy ustnej wciąż sprawia lekarzom duże trudności. Zwykle wykorzystują oni w tym celu badanie wzrokiem w świetle białym oraz badanie dotykiem. Nie jest to jednak metoda obiektywna. Charakteryzuje się ponadto małą czułością, co sprawia, że podczas takiego rutynowego badania wiele zmian subklinicznych pozostaje niezauważonych. Szczególnie ważne wydaje się wczesne wykrywanie zmian o charakterze przednowotworowym, które mogą doprowadzić do rozwoju raka jamy ustnej. Należą do nich m.in.: erytroplakia, leukoplakia (a zwłaszcza jej postać cętkowana i brodawkowata), owrzodzenia, postać nadżerkowa liszaja płaskiego, zmiany bliznowate i zanikowe, a także ograniczona melanoza [1].

Nie wszystkie z tych zmian w takim samym stopniu predysponują do rozwoju raka jamy ustnej. Największym ryzykiem zezłośliwienia charakteryzuje się erytroplakia (40 – 50%). Do zmian o średnim ryzyku metaplastji nowotworowej (10–20%) zalicza się: leukoplakię, wybrane choroby warg i owrzodzenia. Ryzyko powstania zmiany złośliwej na podłożu stanów takich, jak: nowotwory łagodne, postać nadżerkowa liszaja płaskiego, zmiany bliznowate i zanikowe, melanoza ograniczona jest najmniejsze (1–5%) [1]. Najskuteczniejszym sposobem różnicowania zmian jest badanie histopatologiczne podejranej tkanki. Bardzo ważne jest właściwe określenie miejsca pobrania materiału do badania histopatologicznego, aby ograniczyć wyniki fałszywie negatywne i uniknąć powtórnego pobierania wycinka [2].

Jedną z metod przydatnych do wykrywania zmian na błonie śluzowej jamy ustnej okazało się obrazowanie fluorescencyjne (FV – *fluorescencje visualisation*) [3]. Przekonano się o tym podczas stosowania terapii fotodynamicznej w leczeniu zmian nowotworowych [2]. Terapia fotodynamiczna (PDT – *photodynamic therapy*) polega na ogólnoustrojowej lub miejscowej aplikacji substancji fotouczulających, np. protoporfiryny IX lub kwasu gamma-aminolewulinowego, które kumulują się w tkankach zmienionych nowotworowo. Substancje te w wyniku wzbudzenia światłem o określonej długości powodują powstanie tlenu singletowego, który indukuje śmierć komórek [4]. Właściwość fotouczulacza, polegająca na gromadzeniu się w tkankach nowotworowo zmienionych, a następnie wywoływaniu ich fluorescencji, zaczęto stosować do wykrywania i określania zasięgu zmian przednowotworowych i nowotworowych, czyli diagnostyki fotodynamicznej (PDD – *photodynamic diagnostics*). Metoda ta okazała się jednak dość kłopotliwa dla pacjenta. Fotouczulacz osiąga bowiem optymalne stężenie w tkankach

zmienionych nowotworowo dopiero po pewnym czasie (ok. 48 godz.), a pacjent, któremu podano taką substancję jest przez kilka dni wrażliwy na światło [4].

W 1970 r. stwierdzono, że zjawisko autofluorescencji, które do tej pory uznawano za sygnał utrudniający skuteczną diagnostykę fotodynamiczną, może być stosowane do wykrywania zmian nowotworowych [5]. Autofluorescencja tkanek jest wywołana obecnością substancji, tzw. fluoroforów, które absorbują światło o określonej długości fali, ulegają wzbudzeniu i emitują energię w postaci fluorescencji [2]. Do endogennych fluoroforów należą: kolagen, elastyna, NADH, FAD, tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina, porfiryny i keratyna [2, 6]. Na intensywność autofluorescencji wpływa również absorpcja światła przez tkankę, co jest w znacznej mierze uzależnione od zawartości oksy- i dezoksyhemoglobiny. Kolejnym czynnikiem warunkującym intensywność autofluorescencji jest rozproszenie światła wywołane różnicą we współczynniku refrakcji jądra komórkowego i pozostałych organelli komórkowych [2].

Procesy chorobowe toczące się w tkankach prowadzą do zmian w zawartości odpowiednich fluoroforów na poziomie komórkowym i tkanekowym. W tkankach zmienionych nowotworowo dochodzi m.in. do zwiększenia aktywności procesów metabolicznych, a tym samym do zwiększenia koncentracji NADH i zmniejszenia FAD [6]. W tkankach dotkniętych procesem chorobowym zmienia się ponadto zdolność do absorpcji i rozproszenia światła. Jest to związane przede wszystkim ze zmianami w przepływie krwi, zmianą rozmiaru jądra komórkowego oraz grubości nabłonka. Na przykład hiperplazja nabłonka może prowadzić do zmniejszenia intensywności fluorescencji, ponieważ warstwa zawierająca kolagen, który ma silne właściwości fluorescencyjne, jest pokryta grubą warstwą nabłonka. Nadmierne rogowacenie nabłonka i zwiększenie wytwarzania keratyny mogą prowadzić do zwiększenia intensywności fluorescencji [2]. Proces nowotworowy prowadzi również do zwiększenia liczby naczyń włosowatych, wzmożonego przepływu krwi, a tym samym do osłabienia fluorescencji [7].

To, że zjawisko autofluorescencji może skutecznie różnicować tkanki zdrowe i zmienione nowotworowo dowiedli już w 1984 r. Alfano et al. [cyt. wg 8]. Wykazali przydatność tej metody w diagnostyce ginekologicznej, poszukiwaniu zmian w obrębie układu pokarmowego oraz oddechowego [8]. W 1991 r. Palcic et al. zaobserwowali, że stosując laser He–Cd o długości fali 442 nm, jest możliwe wykrywanie zmian przednowotworowych i nowotworowych w oskrzelach, z czułością i swoistością większą niż w przypadku

klasyknej bronchoskopii i bronchoskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem fotouczulaczy [cyt. wg 2]. W związku z tym odkryciem wiele firm rozpoczęło produkcję bronchoskopów autofluorescencyjnych, które są powszechnie stosowane w diagnostyce zmian przednowotworowych i nowotworowych w obrębie dróg oddechowych [2].

Badanie z wykorzystaniem zjawiska autofluorescencji do obrazowania zmian na błonie śluzowej jamy ustnej, przeprowadzili jako pierwsi w 1987 r. Harris i Werkhaven [9]. Zaobserwowali zjawisko autofluorescencji zarówno w obrębie guzów, jak i zdrowej błony śluzowej. Tkanki te świeciły na kolor jasnoczerwony, a zjawisko to przypisano obecności porfiryn [9]. Jasnoczerwoną fluorescencję tkanek guzów złośliwych zaobserwowali również w swoim badaniu z 1996 r. oraz 1999 r. Onizawa et al. [10, 11]. Podczas oświetlania błony śluzowej jamy ustnej światłem laserowym o długości 480 nm zauważyli pewną prawidłowość u pacjentów ze zmianami łagodnymi i złośliwymi. Prawie wszystkie zmiany złośliwe świeciły na kolor jasnoczerwony, podczas gdy tylko nieliczne łagodne zmiany wykazywały taką fluorescencję [10, 11].

Niestety, dalsze badania wykazały, że inna wartość porfiryn w tkankach zdrowych i zmienionych nowotworowo jest spowodowana nie tylko różnicami w stężeniu endogennych porfiryn, lecz także obecnością bakterii wytwarzających porfiryny. Bakterie te umiejscawiają się w zmianach martwiczych, zmianach guzowatych z owrzodzeniami oraz w obrębie zdrowej błony śluzowej, np. na grzbietowej powierzchni języka i w kamieniu nazębnym. Dlatego też zaobserwowanie jasnoczerwonej fluorescencji tkanek nie musi świadczyć o ich transformacji nowotworowej [12].

Kulapaditharon et al. [13] porównywali skuteczność badania endoskopowego w obrębie głowy i szyi z użyciem światła białego oraz światła laserowego o długości 442 nm. Badaniem objęto zdrową błonę śluzową, zmiany zapalne, ziarniniaki, zmiany dysplastyczne i nowotworowe. Wykorzystanie światła laserowego i zjawiska autofluorescencji zwiększyło czułość badania z 68 do 93% w stosunku do zastosowania światła białego, a swoistość zwiększyła się z 70 do 79%. Zmiany patologiczne były rozpoznawane nie tylko na podstawie czerwonej fluorescencji wywołanej obecnością porfiryn, lecz także zmniejszenia intensywności bądź całkowitego zaniku zielonej fluorescencji i występowania ciemnych obszarów. Autorzy badania stwierdzili, że ze względu na bardzo dużą czułość zjawisko autofluorescencji może być szczególnie przydatne w wykrywaniu zmian na błonie śluzowej, a jego zbyt mała swoistość nie pozwala na różnicowanie wykrytych zmian bez wykonania dalszej diagnostyki [13].

W 1999 r. Betz et al. [12] opublikowali wyniki badań stanu błony śluzowej jamy ustnej z wykorzystaniem światła laserowego o długości między 375 a 440 nm. Ta długość światła powoduje zieloną fluorescencję prawie wszystkich fluoroforów umiejscowionych w ludzkich tkankach. Jedynie porfiryny świecą na jasnoczerwony kolor. Oświetlenie zdrowej błony śluzowej oraz zmian nowotworowych wykazało różnice we fluorescencji. Zdrowa błona śluzowa świeciła na intensywnie zielony kolor, podczas gdy tkanki zmienione nowotworowo wykazywały słabszą fluorescencję i ujawniały się jako obszary ciemniejsze, wyraźnie odgraniczone od zdrowych tkanek. Zmiany płaskie charakteryzowały się większym kontrastem autofluorescencji w stosunku do tkanek otaczających niż zmiany egzofityczne. Wyraźne odgraniczenie tkanek zmienionych od tkanek zdrowych na podstawie różnic w autofluorescencji było ponadto zależne od umiejscowienia zmiany. Autofluorescencja zmian znajdujących się w dnie jamy ustnej lub na podniebieniu wyraźniej odróżniała je od otaczającej zdrowej błony śluzowej niż to miało miejsce w przypadku zmian umiejscowionych na brzegu języka [12].

W 2006 r. Lane et al. [14] przeprowadzili badanie pilotażowe u 44 pacjentów, wykorzystując prostej konstrukcji aparat do bezpośredniej wizualizacji autofluorescencji tkanek jamy ustnej. Aparat ten oświetlał błonę śluzową jamy ustnej niebieskim światłem (400–460 nm), powodując wzbudzenie naturalnych fluoroforów znajdujących się w błonie śluzowej jamy ustnej i ich świecenie czerwonym i zielonym światłem. Zamontowane w urządzeniu specjalne filtry pochłaniały niebieskie światło i sprawiały, że osoba przeprowadzająca badanie widziała jedynie, emitowane przez oświetlone tkanki jamy ustnej, czerwone i zielone światło. Czułość badania przeprowadzonego tym aparatem oceniono na 98%, a jego swoistość na 100%, biorąc pod uwagę odróżnienie zdrowej błony śluzowej od ciężkiej dysplazji/raka *in situ* oraz raka inwazyjnego [14].

Wiele zmian przednowotworowych i nowotworowych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej, w początkowym stadium nie jest widocznych w świetle białym. Ich późne wykrycie prowadzi do gorszych wyników leczenia oraz dużej śmiertelności spowodowanej rakiem jamy ustnej. Dotychczasowe obserwacje wskazują na dużą przydatność zjawiska autofluorescencji w procesie wykrywania zmian na błonie śluzowej jamy ustnej. Jak wykazują badania, wykorzystanie zjawiska autofluorescencji może zwiększyć nie tylko czułość, lecz także swoistość badania w porównaniu z zastosowaniem światła białego. Dzięki wykorzystaniu zjawiska autofluorescencji możliwe jest wykrycie

zmian przednowotworowych i nowotworowych w stadium, w którym nie są one jeszcze widoczne w świetle białym. Wcześniejsze rozpoznanie tych zmian daje szansę bardziej skutecznego i mniej okaleczającego leczenia oraz wdrożenia profilaktyki raka jamy ustnej.

Należy jednak pamiętać, że wczesna diagnostyka zmian potencjalnie złośliwych nie jest je-

dynym sposobem zapobiegania rozwojowi raka jamy ustnej. Równie ważna jest edukacja społeczeństwa mająca na celu ograniczanie czynników ryzyka, do których należą m.in.: przewlekły uraz, niektóre nawyki (np. palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, żucie betelu), ekspozycja na światło słoneczne lub zakażenie wirusami onkogennymi (np. HPV [16]).

Piśmiennictwo

- [1] GÓRSKA R., KOWALSKI J.: Stany przedrakowe błony śluzowej jamy ustnej. W: Choroby błony śluzowej jamy ustnej. Red.: Górski R., Med Tour Press International, Otwock 2007, 139–154.
- [2] DE VELD D.C.G., WITJES M.J.H., STERENBORG H.J.C.M., ROODENBURG J.L.N.: The status of *in vivo* autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. *Oral Oncol.* 2005, 14, 117–131.
- [3] SAMSON P., CATHERINE F., WILLIAMS P.M., ZHANG L., MACAULAY C., ROSIN M.P.: Zastosowanie bezpośredniej wizualizacji fluorescencyjnej do identyfikacji zmian przedrakowych wysokiego ryzyka w jamie ustnej w prowincji Kolumbia Brytyjska. Use of direct fluorescence visualization to identify high – risk oral pre-malignant lesions in British Columbia. *eDENTICO* 2009, 5, 1, 32–36.
- [4] KRAWCZYK-KRUPKA A., SIEROŃ A., ADAMEK M.: Rola diagnostyki i terapii fotodynamicznej w stanach przednowotworowych i nowotworowych jamy ustnej. *Przegląd piśmiennictwa. Magazyn Stomatol.* 2000, 10, 7, 27–29.
- [5] PROFIO A.E., DOIRON D.R.: A feasibility study of the use of fluorescence bronchoscopy for localization of small lung tumors. *Phys. Med. Biol.* 1977, 22, 949–957.
- [6] LANE P.: Urządzenie wykorzystujące zjawisko fluorescencji do bezpośredniej wizualizacji błony śluzowej jamy ustnej, Fluorescence instrumentation for the direct visualization of oral mucosa. *eDENTICO* 2009, 5, 1, 8–18.
- [7] SVISTUN E., ALIZADEH-NADERI R., EL-NAGGAR A., JACOB R., GILLENWATER A., RICHARDS-KORTUM R.: Division enhancement system for detection of oral cavity neoplasia based on autofluorescence. *Head Neck* 2004, 26, 205–215.
- [8] INGRAMS D.R. et al.: Autofluorescence characteristics of oral mucosa. *Head Neck* 1997, 19, 27–32.
- [9] HARRIS D.M., WERKHAVEN J.: Endogenous porphyrin fluorescence in tumors. *Lasers Surg. Med.* 1987, 19, 7, 467–472.
- [10] ONIZAWA K., SAGINOYA H., FURUYA Y., YOSHIDA H.: Fluorescence photography as a diagnostics method for oral cancer. *Cancer Lett.* 1996, 108, 61–66.
- [11] ONIZAWA K., SAGINOYA H., FURUYA Y., YOSHIDA H., FUKUDA H.: Usefulness of fluorescence photography for diagnosis of oral cancer. *Int. J. Maxillofacial Surg.* 1999, 28, 206–210.
- [12] BETZ C.S., MEHLMANN M., STEPP H., GREVERS G., BAUMGARTNER R., LEUNIG A.: Autofluorescence imaging and spectroscopy of normal and malignant mucosa in patients with head and neck cancer. *Lasers Surg. Med.* 1999, 31, 323–334.
- [13] KALAPADITHAROM B., BOONKITTICHARON V.: Performance characteristics of fluorescence endoscope in detection of head and neck cancers. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2001, 110, 45–52.
- [14] LANE P. et al.: Simple device for the direct visualization of oral cavity tissue fluorescence. *J. Biomed. Opt.* 2006, 11, 024006-1-7.

Adres do korespondencji:

Karolina Babiuch
Katedra i Zakład Periodontologii
i Klinicznej Patologii Jamy Ustnej IS CM UJ
ul. Montelupich 4
31-155 Kraków
tel.: 606 830 283
e-mail: k.piatek@wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 28.01.2011 r.

Po recenzji: 24.06.2011 r.

Zaakceptowano do druku: 28.06.2011 r.

Received: 28.01.2011

Revised: 24.06.2011

Accepted: 28.06.2011