

University of Groningen

Autofluorescence spectroscopy for the classification of oral lesions

Veld, Diana Cornelia Gerarda de

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2005

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Veld, D. C. G. D. (2005). *Autofluorescence spectroscopy for the classification of oral lesions*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Hoofdstuk 8

Chapter 8

Samenvatting

Summary

Samenvatting | Summary in Dutch

In de inleiding (hoofdstuk 1) worden **de klinische vraagstelling van dit proefschrift en het plan van aanpak** beschreven. Voor de behandeling van kwaadaardige afwijkingen in de mond is het van belang dat deze in een zo vroeg mogelijk stadium ontdekt worden. Het is echter onmogelijk om beginnende kwaadaardige afwijkingen met het oog te onderscheiden van sommige goedaardige afwijkingen, waardoor in de praktijk altijd een biopsie (proefstukje) genomen moet worden. Het is niet altijd duidelijk op welke lokatie een biopsie het beste genomen kan worden, waardoor er soms kwaadaardige afwijkingen gemist kunnen worden of de biopsie herhaald moet worden. Optische spectroscopie is een methode waarmee potentieel op een niet-invasieve manier informatie over het mondweefsel te verkrijgen is. Autofluorescentiespectroscopie is daar een veelbelovend, relatief goedkoop en eenvoudig uitvoerbaar voorbeeld van. In de inleiding staat beschreven waar de techniek op berust en welke vraagstellingen in dit proefschrift behandeld zullen worden.

In hoofdstuk 2 staat de **invloed van de anatomische locaties** waarop gemeten wordt centraal. In de mond zijn verschillende soorten weefsels aanwezig met vermoedelijk grote verschillen in basale autofluorescentie. Zo is bijvoorbeeld de tong anders van vorm en structuur dan de binnenzijde van de wang. Hierdoor kan het zijn dat de anatomische invloed op het spectrum de spectrale verschillen tussen gezond en afwijkend weefsel overschaduwet, waardoor de diagnostiek van afwijkingen bemoeilijkt wordt. Voor deze studie werden 97 vrijwilligers zonder afwijkingen aan het mondslijmvlies gemeten. De metingen vonden plaats op dertien verschillende locaties in de mond (tongrug, tongrand, lip, tandvlees, wang etc.) waarvan op grond van het weefseltype verschillen in autofluorescentiespectra verwacht konden worden. De spectra, gemeten met zeven verschillende excitatiegolflengten, werden onderling vergeleken met behulp van de statistische methode “principal components analysis” (PCA). Van de dertien locaties bleken er elf onderling weinig te verschillen, d.w.z. dat de variaties ten gevolge van anatomische locatie kleiner waren dan de spontane variaties binnen een locatie. De enige uitzonderingen waren het lippenrood en de tongrug. Spectra van het lippenrood vertoonden meer bloedabsorptie en hadden daardoor ook een lagere fluorescentie-intensiteit. Spectra van de tongrug bleken in 94% van de gevallen voor minstens één excitatiegolflengte een porfyrine-achtige piek te vertonen. Porphyrines worden geproduceerd door micro-organismen, die mogelijk een comfortabele behuizing vinden in de papillaire ruimten van de tong. In de literatuur is diezelfde porfyrinepiek genoemd als hulpmiddel bij het opsporen van kanker, maar aangezien deze zeer frequent voorkomt in gezond weefsel – met name op de tongrug, maar ook op andere locaties – is hij blijkens onze studie niet geschikt voor diagnostiek.

Concluderend kan gesteld worden dat de autofluorescentiespectra van de tongrug en het lippenrood beide apart geanalyseerd moeten worden, maar dat de overige elf locaties onderling vergelijkbaar zijn.

In hoofdstuk 3 wordt de **invloed van individuele kenmerken** op het autofluorescentiespectrum onderzocht in de populatie van vrijwilligers uit hoofdstuk 2. Met behulp van PCA en multivariate lineaire regressie technieken werden de invloeden van de individuele kenmerken op het spectrum bepaald. De onderzochte kenmerken waren leeftijd, geslacht, rookgewoonten, alcoholgebruik, huidskleur en het dragen van gebitsprotheses. Behalve leeftijd bleken alle factoren een statistisch significant invloed te hebben op de verhouding tussen de verschillende basisspectra (PC's) waartoe de spectra gereduceerd kunnen worden. Bij vrijwilligers die meer dan vijf alcoholische eenheden gebruiken, bleek de porfyrinecomponent sterker vertegenwoordigd te zijn, mogelijk

door een andere microbiële flora in de mond. Bij rokers was de poprhyrinepiek eveneens sterker aanwezig maar verschilde ook de bulk autofluorescentie. De verschillen waren het sterkst tussen zware rokers (meer dan 20 sigaretten per dag) en niet-rokers. Tussen niet-rokers en ex-rokers bestonden geen significante verschillen, wat erop wijst dat de invloed van roken op het autofluorescentiespectrum omkeerbaar is. De gevolgen van gebitsprotheses waren vooral zichtbaar in de bloedabsorptie die lager was. Mogelijk wordt dit verklaard door een verdikking van het mondslijmvlies die de invloed van bloedabsorptie zou kunnen verkleinen. De invloed leek echter niet erg afhankelijk van de anatomische lokatie waarop gemeten werd. Vrouwen vertoonden minder bloedabsorptie dan mannen, wat niet bevredigend verklaard kon worden. Huidskleur had van alle genoemde factoren de grootste invloed op het autofluorescentiespectrum. Door raciale pigmentatie werd een groot deel van de autofluorescentie geabsorbeerd. Bij diagnostiek van afwijkingen dient hier rekening mee te worden gehouden.

Voor hoofdstuk 4 werden autofluorescentiespectra van 172 goedaardige, dysplastische en kwaadaardige afwijkingen gemeten en onderling vergeleken om te komen tot **diagnostiek**. Ook de spectra van de gezonde vrijwilligers uit hoofdstuk 2 werden toegevoegd. De spectra werden gemeten bij zes excitatiegolflengten en zowel in het centrum van de afwijking als op de rand, in de gezond ogende omgeving en aan de contralaterale zijde. De spectra werden vergeleken met behulp van PCA, kunstmatige neurale netwerken (ANN) en vier fluorescentie-intensiteitsratio's zoals gebruikt in de literatuur. De scores werden vergeleken met behulp van ROC-curves, die minder afhankelijk zijn van een gekozen cut-off waarde dan de gebruikelijke sensitiviteit en specificiteit. Drie klinische vragen werden onderzocht:

1. Kunnen kwaadaardige tumoren worden onderscheiden van gezond mondslijmvlies?
2. Kunnen afwijkingen in het algemeen worden onderscheiden van gezond mondslijmvlies?
3. Kunnen kwaadaardige en dysplastische afwijkingen worden onderscheiden van goedaardige afwijkingen?

Het antwoord op de eerste twee vragen was bevestigend (maximale oppervlaktes onder de ROC-curve 0.97 en 0.88). Het onderscheid tussen kwaadaardige en dysplastische afwijkingen enerzijds, en goedaardige afwijkingen anderzijds, kon echter niet gemaakt worden (ROC-oppervlakte <0.65).

In hoofdstuk 5 wordt onderzocht wat de waarde is van **diffuse reflectantiespectra** voor diagnostiek van slijmvliesafwijkingen in de mondholte. De autofluorescentie- en diffuse reflectantiespectra van 172 afwijkingen en 70 gezonde vrijwilligers werden daartoe geanalyseerd met behulp van PCA. De drie klinische vraagstellingen van hoofdstuk vier werden opnieuw gesteld, maar nu voor diffuse reflectantiespectra en voor autofluorescentiespectra die in eerste orde gecorrigeerd waren voor bloedabsorptie- en verstrooiingsartefacten. De resultaten waren vergelijkbaar met die van hoofdstuk vier. De classificatie van kanker versus gezond mondslijmvlies gaf zowel voor diffuse reflectantie als voor gecorrigeerde autofluorescentiespectra ROC oppervlakten tot 0.98, wat een uitstekende classificatie inhoudt. Voor afwijkingen versus gezond weefsel was de classificatie voor beide methoden goed (ROC oppervlakten tot 0.90). Voor het onderscheid tussen goedaardige en (pre-)maligne afwijkingen bleken beide methoden echter eveneens ongeschikt. Het combineren van autofluorescentie- en diffuse reflectantiespectra verbeterde de resultaten nauwelijks. De relevante informatie voor de eerste twee klinische vragen bleek zodoende in zowel diffuse reflectantie als in autofluorescentiespectra aanwezig te zijn. De derde en meest relevante klinische vraag bleek door beide technieken niet beantwoord te kunnen worden.

In hoofdstuk 6 staat het **microscopisch onderzoek** centraal. Autofluorescentiebeelden en –spectra met twee excitatiegolflengten en Ramanspectra werden gemeten van gevriesdroogde weefselcoupes. De 37 coupes waren afkomstig van afwijkingen die ook *in vivo* gemeten waren voordat het biopt werd genomen. Vanwege de invloed van vriesdrogen en langdurige opslag op de autofluorescentie, konden de *in vivo* en *ex vivo* metingen niet met elkaar vergeleken worden. Autofluorescentiebeelden lieten een hoge intensiteit zien voor de keratine- en bindweefsellagen, maar nauwelijks intensiteit voor het epitheel. De spectra hadden hun maximum rond 520 nm en vertoonden geen specifieke kenmerken als porphyrinepieken of bloedabsorptiedippen. Met behulp van clusteranalyse kon geen verband gelegd worden tussen spectra enerzijds en de aard van de afwijking of de cellaag waarop gemeten was anderzijds. Met Raman spectra was het mogelijk te classificeren naar cellaag, maar in deze studie kon ook hier geen verband worden gelegd met de aard van de afwijking.

In hoofdstuk 7 bespreken we de **relevante literatuur over autofluorescentiespectroscopie en –imaging in de mondholte**. Tevens worden de resultaten uit de literatuur vergeleken met die van dit proefschrift en volgen hier enkele belangrijke conclusies uit.

Zowel autofluorescentiespectroscopie als –imaging geven goede resultaten voor het onderscheiden van afwijkingen van gezond weefsel. In het geval van imaging kan dit nuttig zijn voor het opsporen van nieuwe afwijkingen van het mondslijmvlies en mogelijk van onzichtbare uitbreidingen van reeds bestaande afwijkingen. Aangezien aangetoond is dat met name vroege, vlakke afwijkingen goed te onderscheiden zijn met autofluorescentie-imaging, is de potentie voor het vinden van nieuwe afwijkingen groot.

Autofluorescentiespectroscopie is echter niet geschikt om nieuwe afwijkingen op te sporen, vanwege de kleine oppervlakte die per meting onderzocht kan worden. Aangezien het onhaalbaar is de complete mondholte te scannen met behulp van puntmetingen, zal de probe in praktijk altijd geplaatst worden op een afwijking die al zichtbaar is, of met een andere methode als ‘verdacht’ is gekwalificeerd. De relevante vraag wordt dan of de afwijking goedaardig of (pre-)maligne is, aangezien dit van doorslaggevend belang is voor de behandelingsaanpak. Als autofluorescentiespectroscopie hiertoe in staat is, kan de methode gebruikt worden om te zoeken naar het meest dysplastische gedeelte van een afwijking, zodat dáár gebiopteerd kan worden. Helaas blijkt uit dit proefschrift en na een nauwkeurige analyse van de literatuur dat autofluorescentiespectroscopie deze klinische vraag niet kan beantwoorden. De eindconclusie is dan ook dat alleen autofluorescentie imaging geschikt kan zijn als gemakkelijk toepasbare, gevoelige en goedkope methode voor het opsporen van afwijkingen van het mondslijmvlies. Hiervoor is verder onderzoek noodzakelijk.