



Wydział Lekarski  
Oddział Stomatologiczny

**Paweł Tadeusz Milner**

**Ocena przydatności klinicznej urządzenia VELscope VX  
w diagnostyce zmian o nieokreślonym potencjale  
rozrostowym zlokalizowanych na powierzchni błony  
śluzowej jamy ustnej.**

**Rozprawa Doktorska**

**Zakład Chirurgii Stomatologicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

**Promotor:**

**dr hab. n. med. prof. nadzw. Anna Janas - Naze**

Łódź 2015

## VIII. STRESZCZENIE

### 1. Streszczenie w języku polskim.

Rak jamy ustnej jest chorobą o wysokiej śmiertelności. Wczesne wykrycie choroby oraz wdrożenie leczenia skutkuje pięcioletnim przeżyciem pacjentów w ok. 80-90%. Niestety ok. 90% przypadków jest wykrywana w zaawansowanym stadium. W krajach rozwiniętych współczynnik pięcioletniego przeżycia leczonych pacjentów wynosi zaledwie ok. 50%, zaś w krajach rozwijających się spada poniżej 30%, przy czym statystyki te nie uległy istotnej poprawie w ciągu ostatnich 30 lat. Powyższe fakty wskazują na potrzebę sprawnego wykrywania i diagnostyki wszelkich patologii tkankowych zlokalizowanych na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej i utrzymujących się powyżej 7 dni od wyeliminowania potencjalnego czynnika sprawczego, ponieważ mogą one być potencjalnym miejscem nowotworzenia.

Urządzenie Velscope VX zostało opracowane w tym właśnie celu. Według producentów badanie błony śluzowej za pomocą tej aparatury zwiększa skuteczność ujawniania takich zmian patologicznych oraz ich wstępną diagnostykę. Umożliwia ono obserwację autofluorescencji tkankowej czyli emisji zwrotnej fotonów energii po wzbudzeniu za pomocą światła niebieskiego fluoroforów komórkowych i tkankowych. Tkanka fizjologiczna wykazuje tzw. „zieloną fluorescencję”, a więc obraz zwrotnego pasma promieniowania przyjmuje barwę jasnozieloną. Tkanki patologiczne na skutek zaburzeń morfologicznych oraz zmian metabolicznych objawiają się jako obszary tzw. „ubytku autofluorescencji”, a więc ciemne plamy, o różnym stopniu nasilenia czerni. Zjawisko jest obserwowane w czasie rzeczywistym poprzez wizjer urządzenia VELscope VX, a także może być rejestrowane.

Celem moich badań była ocena przydatności klinicznej powyższej aparatury w diagnostyce zmian o nieokreślonym potencjale rozrostowym, zlokalizowanych w wymienionym obszarze anatomicznym. Badaniem objęto grupę 80 pełnoletnich pacjentów (41 kobiet i 39 mężczyzn) którzy zgłosili się do Zakładu Chirurgii

Stomatologicznej w okresie 12 miesięcy (od 1.XII.2013 do 1.XII.2014) celem konsultacji specjalistycznej patologii tkankowych zlokalizowanych w jamie ustnej.

Pacjenci wypełniali ankiety zawierające informacje ogólne, wywiad lekarski, stomatologiczny, onkologiczny oraz informacje o narażeniu na podstawowe czynniki ryzyka raka jamy ustnej. Po zebraniu wywiadu oraz przeprowadzeniu badania stomatologicznego przystępowano do części klinicznej badania, obejmującej analizę powierzchni błony śluzowej jamy ustnej metodą wzrokową w świetle białym lampy unitu stomatologicznego. Etap ten wykonywał specjalista chirurgii szczękowej. Na podstawie dostępnych danych stawiał on rozpoznanie kliniczne. Następnie główny badacz (doktorant) badał autofluorescencję tkankową przy użyciu urządzenia VELscope VX, określając stopień nasilenia patologii w obszarze zmian według autorskiej, czterostopniowej skali oceny stopnia ubytku autofluorescencji (skali FVL). Później dokonywano 7-dniowej obserwacji zmiany po wykluczeniu potencjalnych czynników sprawczych. Utrzymywanie się zmian stanowiło wskazanie do pobrania wycinka próbnego. W przypadku tworów wzbudzających niepokój onkologiczny pomijano 7-dniowy czas karencji, od razu pobierając wycinek. Łącznie pobrano materiał z 60 zmian. Na ich podstawie wykonywano po dwa preparaty mikroskopowe dla każdego wycinka. Pierwszy poddawano standardowemu barwieniu hematoksyliną i eozyną. W drugim wykonywano odczyn immunohistochemiczny z surowicą anty Ki-67 MIB-1, co umożliwiło wykrycie jąder komórek będących w aktywnych fazach podziału komórkowego (mitozy). Następnie oba preparaty badał pod mikroskopem optycznym specjalista patomorfolog. Na podstawie preparatu pierwszego stawiał on rozpoznanie patomorfologiczne, warunkujące dalsze postępowanie terapeutyczne. Po analizie drugiego preparatu wyznaczano wartości Indeksu Proliferacyjnego (IP), który określa odsetek komórek proliferujących (znajdujących się w aktywnych fazach podziału mitotycznego) i może być pomocny w determinacji potencjału wzrostowego zmiany. Wartości Indeksu Proliferacyjnego nigdy nie mogą być analizowane w oderwaniu od obrazu histopatologicznego. Ze względu na architekturę nabłonka wielowarstwowego płaskiego jamy ustnej powyższe wartości procentowe podano z podziałem na warstwę podstawną (WP) oraz zrąb łącznotkankowy (ZŁ). Indeks Proliferacyjny 40-50% w warstwie podstawnej

obserwuje się w warunkach fizjologicznych, ponieważ jest to strefa intensywnej proliferacji w obrębie nabłonka. Stwierdzenie wartości Indeksu Proliferacyjnego do 20% w zrębie łącznotkankowym tkanki (ZŁ) przyjęto za oznakę zwiększonej aktywności proliferacyjnej tej strefy, obserwowaną w wielu różnych patologiach, jednak ich charakter nigdy nie był złośliwy. Istotny jest bowiem brak znaczących zaburzeń w architekturze tkanki. Jeśli występowały tego typu nieprawidłowości w warstwowej budowie tkanki nabłonkowej wyznaczano wartości Indeksu Proliferacyjnego w całej masie tkankowej (CM).

Przeprowadzono weryfikację aparatury VELscope VX oraz opracowanej czterostopniowej skali FVL pod kątem oceny aktywności proliferacyjnej w obrębie zmian śluzówki. Znaczne zaburzenia architektury tkankowej w połączeniu z wysokimi wartościami Indeksu Proliferacyjnego (20% CM i więcej) wskazują bowiem na obecność procesu nowotworowego o dużej dynamice. Finalnie zestawiono uzyskane wartości oceny stopnia ubytku autofluorescencji według skali FVL z uzyskanymi wartościami Indeksu Proliferacyjnego z uwzględnieniem architektury tkankowej.

Wyniki badania były następujące. Spośród 83 zmian u 80 przebadanych pacjentów weryfikacji histopatologicznej poddano 60 zmian. W tej grupie znalazło się 11 zmian złośliwych oraz 49 łagodnych. W przypadku zmian złośliwych wszystkie wartości stopnia ubytku autofluorescencji FVL wynosiły 3, poza jednym przypadkiem, gdzie wartość wynosiła 2. Wartości Indeksu Proliferacyjnego wyznaczone na podstawie badania materiału tkankowego pobranego z obszaru tych zmian we wszystkich 11 przypadkach były wyższe niż 20% CM (w całej masie tkankowej), co interpretuje się jako wartość wysoką, która sugeruje znaczne zaburzenia w budowie mikroskopowej tkanek oraz znaczne zaawansowanie procesu nowotworowego. Wysokie wartości Indeksu Proliferacyjnego w całej masie tkankowej wiązały się z najwyższymi ocenami stopnia ubytku autofluorescencji - FVL 3 w 10 przypadkach oraz FVL 2 w jednym, z czego wynika, iż obie metody zgodnie wskazywały zmiany rakowe. W zmianach, których stopień ubytku autofluorescencji określono na FVL 0 lub 1 we wszystkich przypadkach stwierdzono względnie zachowaną architekturę tkankową. Wartości Indeksu Proliferacyjnego nie przekraczały 50% w warstwie podstawnej oraz 20% w zrębie łącznotkankowym.

Ubytek autofluorescencji FVL 2 również towarzyszył wartościom nieprzekraczającym tej granicy, poza jednym przypadkiem, w którym odnotowano znaczne zaburzenia budowy tkankowej i określono wartość Indeksu Proliferacyjnego w całej masie tkankowej (wartość przekraczała 20%, a zmiana okazała się złośliwa).

Obiektywność badania autofluorescencji tkankowej przy użyciu VELscope VX jako indykatora kancerogenezy podważają jednak wyniki dotyczące zmian łagodnych, w których określono wysoki stopień FVL o wartości równej 3, a więc silny ubytek autofluorescencji. Zdarzyło się to w dwóch nadziąślakach, gdzie wartości Indeksu Proliferacyjnego nie przekroczyły jednak 50% w warstwie podstawnej oraz 20% w podścielisku łącznotkankowym i nie stwierdzono tam zaburzeń charakterystycznych dla kancerogenezy. Wskazuje to na bezwzględną potrzebę weryfikacji histopatologicznej obszarów o wysokim stopniu ubytku autofluorescencji przed postawieniem diagnozy, ponieważ badanie urządzeniem VELscope VX może mylnie sugerować proces nowotworowy. Ponadto zaobserwowano również brak zgodności między rozpoznaniem klinicznym a histopatologicznym w 17 przypadkach, co wskazuje na potrzebę każdorazowej weryfikacji histopatologicznej zmiany utrzymującej się na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej dłużej niż 7 dni, jeśli nie obserwuje się poprawy (gojenia).

Wnioski z wykonanych badań były następujące. Po pierwsze, urządzenie VELscope VX jest skuteczne w wykrywaniu podwyższonego potencjału proliferacyjnego, co dowodzi wzmożonej aktywności metabolicznej tkanek w obrębie zmian o nieokreślonym potencjale rozrostowym. Po drugie, stwierdzenie silnego ubytku autofluorescencji nie oznacza jednoznacznie obecności choroby nowotworowej. Po trzecie, jedynie pobranie wycinka próbnego oraz weryfikacja histopatologiczna zmiany umożliwia ustalenie ostatecznego rozpoznania. Urządzenie VELscope VX wydaje się również pomocne przy wyborze miejsca optymalnego do pobrania wycinka tkankowego, ponieważ najsilniejszy ubytek autofluorescencji stwierdza się w miejscach o największym nasileniu patologii.

## 2.    **Streszczenie w języku angielskim.**

Oral Cancer is characterized by high rate of mortality. Early detection and treatment of this disease strongly increases chances for therapeutic success, resulting in 5 year survival rate of 80-90%. Unfortunately 90% of oral cancer cases are detected in advanced stage. In developed countries 5 year survival rate is about 50%, and in developing countries it decreases to 30%. These statistics haven't improved much for 30 years. The described facts indicate the need of efficient detection and diagnosis of all lesions localized in oral cavity mucosa which persist for more than 7 days after a potential causing factor has been eliminated. Such lesions should be treated as potentially cancerogenic and must be quickly diagnosed.

Velscope VX is a device designed for screening, detection and early diagnosis of such lesions. According to the manufacturer, examination of oral cavity mucosa with this device improves screening efficiency and allows a better visualization of described lesions. It enables observation of tissue autofluorescence. This phenomenon depends on reverse emission of photons after initial excitation of cellular and tissue fluorophores with blue wavelength light. Physiological tissue emits „green autofluorescence”, which means that reverse radiation turns into bright-green colour. Pathological tissues, as a result of morphological and metabolic changes, turn into dark spots. In these areas reverse emission is retained or blocked. This state is called FVL – „fluorescence visualization loss” - and may be observed in real-time using Velscope VX device. Photographs of autofluorescence may also be taken for further analysis and documentation.

The aim of the study was evaluation of Velscope's usefulness, in clinical practice, for early diagnosis of pathological lesions with unidentified growth potential, which are localized on oral cavity mucosa. The study included 80 adult patients (41 women and 39 men). The study was conducted for 12 months (from 1.12.2013 to 1.12.2014). Patients were referred to the Oral Surgery Department, Lodz Medical University, by general dental practitioners for a specialist consultation, diagnostics and following treatment of pathological lesions localized in oral cavity mucosa.

At the beginning, the patients filled in questionnaires, including overall personal information, general and dental anamnesis, oncological treatment history (if necessary) and basic information about potential exposition to major oral cancer risk factors. Collecting this data was followed by clinical part of the study. Firstly, dental examination was performed by a specialist in dental surgery. He examined oral cavity mucosa visually (visual method) using lighting of the dental chair halogen lamp. Having gathered information, he issued a clinical diagnosis. Secondly, the general dental practitioner (doctoral student, author of this dissertation) examined oral cavity mucosa using Velscope VX. Evaluation of the autofluorescence visualization loss (FVL) level, according to the self-designed, 4-degree FVL scale, was conducted. As a follow up, the patients were instructed to exclude or reduce factors potentially irritating to the observed area, and come back for a control visit and further investigation after 7 days.

Persistence of pathological lesions indicated the need for collecting a bioplate (diagnostic biopsy) that includes the area of lesion and a fragment of surrounding unchanged tissues. Following the dental surgery specialist's opinion, in case of clinically alarming lesions (evaluated as high risk of cancerogenesis), 7-days observation time was omitted, and diagnostic biopsy was performed immediately. In total, tissue fragments from 60 lesions were collected.

The next step was performed in Dental Pathomorphology Department Laboratory, the Medical University of Lodz. From each collected tissue fragment, two microscopic slides were prepared. The first was stained with hematoxylin and eosin. The second was subjected to immunohistochemical reaction with anti- Ki-67 MIB-1 serum, which allowed detecting cells in active phases of cellular cycle. After preparing both microscopic slides, they were examined by a specialist in pathomorphology, using optical microscope. Based on the first slide analysis, he made pathomorphological diagnosis, crucial for further treatment. Analysis of the second slide allowed to determine the Index of Proliferation (IP). This marker brings information about percentage of proliferating cells (being in active phases of mitotic activity) and may be useful in determination of the lesion's growth potential. Index of Proliferation values should not be analyzed separately from histopathological image. Due to the architecture of oral cavity mucosa epithelium, the presented values

of IP correspond to the division into basal cell layer (WP), and connective tissue lining (ZŁ). Index of Proliferation values - about 40-50% in basal layer - were observed in physiological tissues since intensive cell proliferation occurs in physiological conditions only in this layer where epithelial cells multiply. Presence of proliferation in connective tissue lining (ZŁ) indicated by Index of Proliferation values of up to 20% was considered as a symptom of increased mitotic activity in this area, the same was observed in many pathological lesions. However, they were all benign. If major disturbances in epithelial morphology occurred, Index of Proliferation was set in all tissue mass (CM), which revealed unstructured cellular conglomerate.

The aim of the study was to compare results of autofluorescent examination with Velscope VX (according to 4-degree FVL scale) to Index of Proliferation values, considering the layer-structure of oral cavity epithelium explained above. Index of Proliferation values 20% and above in all tissue mass (CM) indicated presence of dynamically growing cancer.

The results of the study were as follows. Among 83 lesions in 80 patients only 60 were verified histopathologically. Among them, 11 were malignant and 49 benign. All malignant neoplasms were assigned FVL 3 (highest retention of autofluorescence), except for one case, where FVL value was 2. Index of Proliferation in all 11 malignant cases was higher than 20% CM (all tissue mass, tissue conglomerate), indicating high mitotic activity and suggesting major morphological tissue disturbances present in dynamic oral cancer with high growth potential. High Index of Proliferation values in all tissue mass were connected with highest autofluorescence visualisation loss (FVL 3 in 10 cases and FVL 2 in 1 case), which proved that both evaluated methods unanimously indicated oral cancer. In all lesions evaluated as FVL 0 or 1, tissue architecture was relatively correct. Index of Proliferation values in these cases didn't exceed 50% in basic layer and 20 % in connective tissue lining. These values were also borderlines for all lesions evaluated as FVL 2, with one exception, where Index of Proliferation value was over 20% in all tissue mass, and the lesion finally was diagnosed as malignant.

Autofluorescent examination of oral cavity mucosa using Velscope VX cannot be treated exclusively as a direct indicator of carcinogenesis, even if



fluorescence visualization loss is clearly and strongly visible. In the course of the study, 2 benign lesions (epules), evaluated as FVL 3, were identified. Yet, their Index of Proliferation values were lower than 50% in basic layer, and 20% in connective tissue lining and histological examination proved benign character of these lesions. This fact indicates absolute need of histopathological verification of the areas revealing strong loss of autofluorescence before stating a final diagnosis, because examination done with Velscope VX alone may be a cause of misdiagnosis and may incorrectly suggest cancerogenesis. Additionally, results of the study revealed certain discrepancies between clinical and histopathological diagnoses in many cases. This fact indicates crucial need of histopathological verification of every lesion persistent on oral cavity mucosa surface for longer than 7 days, if no improvement is observed.

Final conclusions from the study were as follows. Firstly, Velscope VX device is effective in detecting increased proliferation activity. Secondly, strong fluorescence visualization loss cannot be treated as an indicator of cancerogenesis. Thirdly, only histopathological verification of tissue bioptate collected from the area of lesion could determine a diagnosis. However, as our study team noticed, Velscope VX seems to be useful in detecting the area of lesions clinically best suited for collecting bioptate (revealing strongest loss of fluorescence), which improves the diagnostic process by creating higher chances of detecting cancerogenesis.