

! Referentgranskad – accepterad
för publicering 25 augusti 2023.

AI, biomarkörer och precisionsmedicin

– banar väg för paradigmskifte inom tandvården

Med ett paradigmskifte till en alltigenom faktabaserad djupanalys av individuella patientdata ökar bland annat möjligheterna att tidigt hitta de individer som löper hög risk för att drabbas av karies, parodontit och oral cancer. Även om det är en lång väg kvar, finns betydande förutsättningar för att robusta biomarkörer ska kunna identifieras inom tandvården, vilket kommer att ha betydelse för arbetet med att förebygga munhålets sjukdomar.



Foto: Mikael Wallerstedt

Författare

Joakim Lindblad (bild), prof, inst för informationsteknologi, Centrum för bildanalys, Uppsala universitet.

Julia Davies, prof, sektionen för oral biologi och patologi, odontologiska fakulteten, Malmö universitet.

Caroline Dahlström, biomedicinsk analytiker, inst för immunologi, genetik och patologi, Uppsala universitet. →

Precisionsmedicin handlar om att kunna ta beslut som är bättre anpassade till den enskilda individen genom att nyttja mer högupplöst faktabaserad information om patienten.

Precisionsmedicin framstår som allt viktigare för att tidigt kunna bedöma risk för sjukdom och sjukdomsprogression, förbättra diagnostik och bota eller minska besvär för de drabbade. Med förfinade metoder för att hitta de individer som riskerar att insjukna finns bättre möjligheter till såväl primär som sekundär prevention, vilket minskar vårdbehov och kostnader samt resulterar i minskad morbiditet. Härigenom ges större förutsättningar att bevara funktion, utseende och livskvalitet.

Det görs kontinuerligt ansträngningar inom odontologin för att hitta ny metodik för att garantera våra patienter en god munhälsa. Tyvärr identifieras i dagsläget inte den enskilda individens specifika riskfaktorer utan odontologin har på grund av otillräcklig förståelse för munhålets sjukdomar i hög utsträckning fastnat i traditionella strategier för riskklassificering. Med begränsade diagnostiska möjligheter och behandlingsalternativ utförs behandlingen i stort som för hundra år sedan, huvudsakligen med lokalanestesi, en borrh, skalpell eller en extraktionstång.

I dag öppnar sig fler alternativ än någonsin tidigare, vilket på sikt kan komma att avsevärt förbättra

vården. Nu är den största utmaningen att följa med i utvecklingen, se möjligheterna och förändra praxis [1]. Med precisionsmedicin öppnar sig möjligheter att förändra vår kliniska vardag genom att gå från en vårdplan för alla till en individanpassad behandling [2]. För detta krävs en kraftsamling inom vetenskapsområdet för att skapa en nationell infrastruktur för klinisk forskning och vård för framtida satsningar.

I Sverige lider cirka 10 procent av befolkningen av omfattande kariesskador eller allvarlig parodontit, som är de vanligaste sjukdomarna i världen. Det betyder att mycket stora primär- och sekundärpreventiva insatser behövs. Baserat på en begränsad förståelse för komplexiteten hos orala sjukdomar har tandvården hanterat tillstånd som karies eller parodontit på liknande sätt för alla patienter [1]. De metoder som används i dag för att bedöma risken för en patient att drabbas och progressionen av sjukdomen över tid har inte tillräckligt hög sensitivitet och specificitet, vilket får konsekvenser då vårdplanen riskerar att missa målet. För att komma åt problemet bedrivs forskning för att hitta biomarkörer som definierar risken för sjukdom på individnivå.

PARODONTIT

Parodontit är ett komplext tillstånd med ett inflammatoriskt svar hos värden på närvaron av en subgingival mikrobiell biofilm. Sjukdomen initieras av

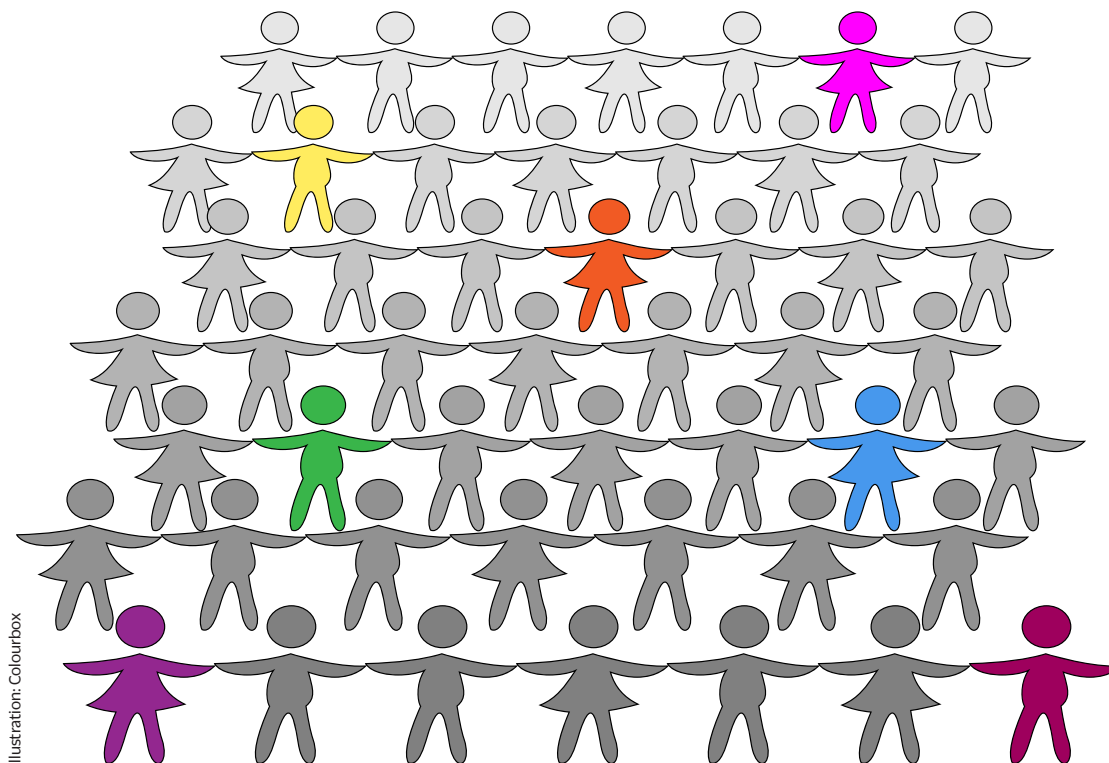


Illustration: Colourbox

”Med precision-medicin öppnar sig möjligheter att förändra vår kliniska vardag genom att gå från en vårdplan för alla till en individanpassad behandling.”

ett ökat flöde av proteinrik gingivalvätska (gingival crevicular fluid, GCF), som kommer att omge biofilmen som koloniserar tand och tandköttsficka, och denna ekologiska förändring gynnar tillväxt av bakteriearter som kan utnyttja proteiner som näringsämnen. Proteolytiska enzymer som frisätts av bland annat gramnegativa anaeroba bakterier i dysbiotiska subgingivala biofilmer stimulerar både värdens respons och kan bidra direkt till nedbrytningen av de parodontala vävnaderna.

Parodontit visar sig ofta som en gradvis övergång från hälsa till sjukdom, vilket innebär att det finns tillräckligt med tid för att ingripa för att förhindra sjukdomsprogression. Eftersom implementering av primära förebyggande åtgärder skulle bidra avsevärt till att minska vårdkostnaderna, finns ett stort behov av att hitta biomarkörer som med hög känslighet och specificitet kan identifiera individer som löper hög risk för allvarlig sjukdom och tandförlust. Forskning pågår därför just för att hitta prediktiva biomarkörer i GCF.

I dagsläget tyder mycket på att sjukdomsutvecklingen vid parodontit beror på ett komplext samspel mellan den subgingivala mikrobiotan och värdsvaret, och det är därför osannolikt att en enda biomarkör har det som krävs för att med hög säkerhet kunna förutsäga allvarlig sjukdom. Sedan upptäckten av det så kallade röda komplexet, ett bakteriellt konsortium

bestående av *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* och *Tannerella forsythia* [3, 4], har mycket forskning kommit att fokusera på *P. gingivalis* som har föreslagits vara en nyckelspelare på grund av sin produktion av gingipainer; proteolytiska enzymer som orsakar vävnadsdestruktion och aktiverar epitelceller, fibroblaster och granulocyter [5]. Det visar sig dock vid försök på bakteriefria möss att *P. gingivalis* ensam inte orsakar vävnadsdestruktion, vilket tyder på att närvaron av endast denna bakterie i tandköttsfickan inte är tillräcklig för att orsaka sjukdom. Därmed står det klart att *P. gingivalis* inte är den känsliga biomarkör som vi söker.

Senare rön har visat att vid parodontit finns ett omfattande subgingivalt mikrobiom som innehåller många arter, och studier av hur dessa samexisterar i den subgingivala miljön är ännu i sin linda. Vad som är klart är att tillväxt och uttryck av gingipainer hos *P. gingivalis* påverkas av en annan subgingival kolonisatör; *Parvimonas micra* [5, 6]. Att flytta fokus från studier av enskilda bakterier till interaktioner mellan olika arter öppnar dörren för ett nytt tillvägagångssätt för identifiering av biomarkörer vid parodontit. Detta ger hopp om att kunna påvisa förändringar som inträffar i den subgingivala miljön innan omfattande vävnadsdestruktion börjar.

Den andra viktiga aspekten av parodontit, som många studier inriktat sig på, är världens inflam-

Författare

→ **Ronak Sandy**, ötdl käkkirurgi, Folk-tandvården Stockholms län AB, Eastmaninstitutet käkkirurgi.

Bengt Hasseus, prof, avd för oral medicin och patologi, inst för odontologi, Sahlgrenska akademien, Göteborgs universitet.

Jan-Michaél Hirsch, prof emeritus, inst för kirurgiska vetenskaper, odontologi & maxillofacial kirurgi, medicinska fakulteten, Uppsala universitet; Folk-tandvården Stockholms län AB, Forsknings-, utvecklings- och utbildningsavd. E-post: jan.hirsch@regionstockholm.se



matoriska svar på det dysbiotiska mikrobiomet. Proinflammatoriska cytokiner kan användas som markörer för pågående inflammation, men studier har hittills inte kunnat identifiera specifika molekyler eller tröskelnivåer av kända cytokiner som exakt kan förutsäga risken för svår parodontit. Det som hittills har visats i en modell som simulerar tillstånd i tandköttsfickor är att orala epitelceller som exponeras för en dysbiotisk mikroflora ger upphov till ett mönster av cytokinfrisättning som avsevärt skiljer sig från det som induceras av frisk mikrobiota. Hos patienter med aktiv parodontit har det dessutom, med masspektroskopi av GCF, gått att mäta höga nivåer av proteolytiska enzymer som produceras av de neutrofila granulocyterna, vilka också bidrar till vävnadsnedbrytning.

Således tyder de för närvarande tillgängliga data på att ingen enskild bakterieart eller molekyl kommer att vara tillräcklig för att spegla komplexiteten i de processer som sker under uppkomsten och progressionen av parodontit. Fenotypiska markörer som är nära involverade i sjukdomsprogression, såsom höga nivåer av proteolytisk aktivitet i tandköttsfickan, oavsett hur de uppstår, erbjuder en potentiell lösning. Men vår snabbt ökande förståelse av sjukdomen på molekylärnivå öppnar också för möjligheten att använda en rad specifika molekyler som kan mätas i tandköttsvätskan för att utveckla en panel av biomarkörer som speglar risk för allvarlig sjukdom.

KARIES

I Sverige får cirka 30 procent av den vuxna befolkningen sina tänder lagade på grund av kariesskador, med en något lägre andel i grupperna 20–30 år [7], och andelen kariesfria förskolebarn har sedan 2010 stadigt minskat medan karies fortsätter att öka i det primära bettet [8].

I och med det ökande intresset för icke-invasiv och individualiserad tandvård görs stora ansträngningar för att hitta biomarkörer som kan bedöma en patients kariesrisk och prognos. Förhoppningen är att molekylära analyser ska identifiera biomarkörer som kan hitta högriskpatienter så att åtgärder mot karies kan sättas in i ett tidigt skede. Detta skulle ha en betydande påverkan på den kliniska vardagen genom att möjliggöra ett mer konservativt och individuellt förhållningssätt till diagnostik och behandling [8].

I likhet med parodontit är karies en multifaktoriell sjukdom, vilket gör det svårt att hitta enkla markörer som kan förutsäga risk. På molekylärnivå är kari-

esutveckling associerad med dysbios, en störning av den mikrobiella gemenskapen i supragingivala biofilmer, vilket resulterar i utvecklingen av en acidogen och acidurisk mikrobiota som har ett tydligt skadligt inflytande på tanden.

Streptococcus mutans har länge varit av intresse som en mikrobiell biomarkör för karies, och dess närvaro återspeglar troligen en sur miljö i biofilmen. Detta är dock inte samma sak som att närvaron av *S. mutans* är en biomarkör för sjukdomsrisk, då karies kan utvecklas i frånvaron av *S. mutans*. Detta stöds av studier som visar att andra bakteriearter kan anpassa sig till ett lågt pH [9]. Detta förklarar möjligen den låga sensitiviteten och specificiteten hos tester baserade på denna bakterie som fristående biomarkör. Studier har dock visat att närvaro av *S. mutans*-biotyper med ytproteiner som tillåter bindning till specifika salivproteiner är associerad med ökad kariesutveckling över en femårsperiod [10].

En alternativ strategi till identifiering av specifika bakteriearter är att fokusera på sjukdomsrelaterade specifika biofilmfenotyper. Syratolerans och syraproduktion vid lågt pH bör utvecklas i biofilmer innan betydande vävnadsförstöring inträffar, vilket gör dessa fenotyper attraktiva kandidater som tidiga biomarkörer för karies. Lovande resultat har erhållits i kliniska undersökningar [11–13] men behöver bekräftas i långtidsuppföljningsstudier.

Tänderna och de vidhäftande biofilmerna badar i saliv, vilket står för en betydande del av skyddet mot demineralisering och tandslitage och underlättar remineralisering. Salivens pH, buffrande kapacitet och ingående proteiner, elektrolyter, antioxidanter och enzymer är centrala för dessa funktioner [14, 15]. Saliv är lättillgängligt för provtagning och är därför ett attraktivt alternativ i sökandet efter biomarkörer för att förutsäga kariesrisk. Hicks et al (2003) presenterade olika biokemiska markörer i salivprover, inklusive antimikrobiella peptider (AMP), molekyler (katelicidinpeptid LL-37, beta-defensiner, statherin), histatiner, viktiga salivglykoproteiner (prolinrika proteiner (PRP) och muciner) och immunglobuliner samt mindre salivglykoproteiner, som anses vara särskilt viktiga för försvaret av munhålan, även om de olika molekylernas exakta mekanismer i kariesprocessen är oklara [16].

Det är dock utan tvivel så att det föreligger signifikanta skillnader mellan de individer som har och de som inte har utvecklat karies, och den skillnaden återspeglas delvis i salivens sammansättning. Detta betyder att biomarkörer som kan förutsäga karies borde kunna finnas i saliven [17]. En fråga att ta hänsyn till är variationer i salivsekretion mellan olika individer och variationer inom en individ samt andelen salivsekretion från olika spottkörtlar över tid. Detta innebär att standardiserad utvärdering av nivåer av särskilda proteiner avsedda som potentiella biomarkörer kan vara en utmaning. Analyser som syftar till att bedöma effekten av skyddande

”Syratolerans och syraproduktion vid lågt pH bör utvecklas i biofilmer innan betydande vävnadsförstöring inträffar, vilket gör dessa fenotyper attraktiva kandidater som tidiga biomarkörer för karies.”

molekyler kan vara en alternativ väg framåt. En lovande studie i detta avseende är den av Strömberg et al (2017) som visar att genetiska variationer i sura PRP-molekyler i saliv är relaterad till ungdomars riskprofil för kariesutveckling [18].

ORAL CANCER

Under perioden 2008–2020 ökade den åldersstandardiserade förekomsten av huvud- och halscancer i Sverige med 20 procent. Under 2021 diagnostiserades 857 personer i Sverige med elakartade tumörer i läpp eller munhåla [19]. Eftersom symtomen i ett tidigt skede är lindriga diagnostiserar patienterna sent, vilket får till följd att behandlingen blir omfattande med sämre livskvalitet som följd. Studier har pekat på de stora fördelarna med screening för munhålecancer och systematisk uppföljning av riskpatienter, som främst berör patienter med potentiellt premaligna orala slemhinnesjukdomar, som leukoplakier och oral lichen planus, hög alkoholkonsumtion och tobaksvanor [20, 21]. Oral skivepitelcancer (OSCC), som utgår från keratinocyterna i epitel, är en aggressiv tumör som sprider sig tidigt och ger en femårsöverlevnad på endast 20 till 40 procent vid sen diagnostik jämfört med tidig, då överlevnaden ligger på mellan 76 och 94 procent [22, 23].

Förbättrad diagnostik och behandling

Standardförandet vid diagnostik av leukoplakier (OL) är vävnadsbiopsi. Eftersom vi vet att i Sverige maligniserar minst 3,5 procent av OL till OSCC årligen och 11,5 procent över en nioårsperiod, bör patienter med OL kontrolleras livslångt [23]. Då ansvarig specialist för närvarande inte kan, med hög tillförlitlighet, identifiera de patienter som är i riskzonen med enbart klinisk och histopatologisk bedömning, behövs sannolikt ett stort antal biopsier under kontrolltiden. Därför har WHO Collaborating Centre for Oral Cancer konstaterat att man bör arbeta med att identifiera tillförlitliga molekylära prediktiva och prognostiska biomarkörer för att förbättra diagnostik och överlevnad i OSCC [24]. Eftersom cancer är en genetisk sjukdom bör forskningen inrikta sig på att hitta specifika förändringar i DNA, RNA eller proteiner som initierar utveckling och progression av en tumör. Med sådan kunskap skulle behandlingen kunna bli individualiserad i stället för att följa en standardiserad vårdplan, som för oral cancer är kirurgi och strålbehandling [24].

Icke-invasiv diagnostik av potentiellt maligna munslemhinneslesioner

I ett första steg mot att hitta bättre, enklare, säkrare och mer kostnadseffektiva metoder för fortlöpande kontroll av potentiellt maligna lesioner och för storskalig insamling av prover som på sikt kan bli ett led i att minska oral skivepitelcancer, har vi granskat icke-invasiva metoder som kan påvisa höggradiga cellförändringar och tumörer. Det vi-

Ordlista

Djup maskininlärning eller djupinlärning (eng *deep learning*)

En metodik inom området maskininlärning som bygger på modeller som hierarkiskt lär sig att representera en komplex funktion genom att dela upp den i en sekvens av enklare funktioner. Typiskt används (djupa) artificiella neuronnät med många lager av ickeinjära funktioner som successivt transformerar indata till modellens slutliga utdata.

Faltningsnätverk (eng *convolutional neural network, CNN*)

En typ av artificiella neuronnät som är särskilt användbara för bildigenkänning. Karakteristiskt är att faltningsnätverk successivt söker igenom hela bilden efter motiv eller delar av motiv som det känner igen. Det har visat sig att synsinnet hos djur analyserar synintryck på ett liknande sätt.

Genomik (eng *genomics*)

Experimentella analyser som påvisar den kompletta uppsättningen gener som finns i en vävnad eller i enskilda celler av en viss typ. Även här genereras mycket stora datamängder.

in situ proximitetsligerings-tekniken (isPLA)

Tekniken använder par av DNA-konjugerade antikroppar för att initiera RCA-reaktioner. Förutom ökad känslighet erbjuder isPLA-tekniken också förbättrad specificitet vid proteinanalyser, som gör det möjligt att undersöka om proteiner interagerar med varandra eller om de genomgått modifieringar.

Intracellulära signaltransduktionsvägar

Det är signalvägar som sammankopplar cellens yta med cellens kärna. En substans binder till receptor på cellytan och en till cellkärnan, vilket påverkar genuttrycket som i sin tur påverkar cellens fortsatta aktivitet eller apoptos.

Multipelinstansinlärning (MIL)

En typ av övervakad inlärning där modellen (typiskt ett djupt faltningsnätverk) under träning inte har tillgång till facit (måldata) för varje enskilt objekt, utan bara ges information om huruvida någon av ett flertal objekt (instanser) uppfyller ett visst kriterium. Inom medicin är många problem av MIL-karaktär, där man har pålitlig information på en storskalig (ofta patient-) nivå, men där det inte är möjligt att veta exakt alla detaljer om exempelvis enskilda celler.

Proteomik (eng *proteomics*)

Experimentella analyser som påvisar vilka proteiner som uttrycks i eller på en cell eller vävnad, till exempel munslemhinnan, eller i enskilda celler av en viss typ. Det ger en djupare förståelse över struktur, interaktioner och cellens aktivitet. Metoden ger stora datamängder om vilka proteiner som uttrycks. Slutsatser kan då dras om biologiska processer, utifrån vilka proteiner som detekteras.

Rullande cirkel-amplifiering (RCA) (eng *rolling circle amplification*)

En teknik som förstärker detektionssignaler, genom att en cirkulär oligonucleotid amplifieras med hjälp av enzymet Polymerase phi29, så att flera fluoroforer kan binda till den amplifierade produkten. Detta höjer känsligheten för en kamera att identifiera signalen.

Transkriptomik (eng *transcriptomics*)

Experimentella analyser som påvisar förekomst av uttryckta gener i en specifik celltyp, alla RNA-molekyler, både kodande och icke-kodande, som finns i en vävnad. Transkriptomik ger stora datamängder, och utifrån vilket protein RNA kodar för kan man dra slutsatser om motsvarande gener är påkopplade.



”Eftersom cancer är en genetisk sjukdom bör forskningen inrikta sig på att hitta specifika förändringar i DNA, RNA eller proteiner som initierar utveckling och progression av en tumör.”

sade sig att endast fluorescensavbildning och oral borstprovtagning för cytologi har tillräcklig sensitivitet och specificitet i dagsläget, och därmed är kliniskt användbara [25].

Borstprover för cytologisk diagnostik

Med borstprover från munslemhinna för cytologisk diagnos har vi en icke-invasiv, billig och effektiv metod för att undersöka förekomsten av inflammation och infektion, eller tecken på malignitet. Metoden anses numera ha hög tillförlitlighet och är därmed ett värdefullt alternativ till traditionell biopsi vid kontroll av orala leukoplakier [26, 27].

Vid cytologisk diagnostik används numera uteslutande vätskebaserade biopsier som visat sig fungera bra för cancerdetektion och behandlingsplanering samt vid arbetet med att utveckla precisionsmedicin [28, 29]. Vid vätskebaserade borstbiopsier slammas cellmaterialet upp i ett metanolbaserat medium för att sedan på laboratoriet maskinellt prepareras till ett tunt cellager på glas utan överlappning av celler. Cellagret färgas och analyseras sedan i ljusmikroskop (analog cytologi) och/eller skannas för digital cytologisk analys; det senare möjliggör användande av kraftfull och effektiv AI-analys [29].

Precisionsbehandling

Den snabba teknikutvecklingen inom gensekvensering ger nya behandlingsmöjligheter av tumörer i till exempel bröst, tjocktarm och hud, där förändringar i genomet har identifierats så att det är möjligt att ta fram och behandla med målsökande läkemedel eller med immunoterapi [30, 31]. Med en individanpassad vård ökar möjligheterna till bot, samtidigt som biverkningar vid till exempel kirurgi och strålning kan elimineras eller reduceras. Det är dock extremt komplicerat att hitta rätt behandling i det enskilda fallet, då en tumör kan bestå av många olika mutationer där nya typer av kloner av tumörceller uppstår. Med hjälp av storskalig insamling av patientprover över tid och i kombination med moderna maskininlärningsbaserade AI-metoder för att hitta mönster i data, ökar dock möjligheterna att bättre kunna matcha patienter med specifika terapier.

Vätskebaserad borstprovtagning för bedömning av orala keratinocyter

För att fördjupa vår kunskap om hur oral cancer utvecklas och kan förebyggas har under 2023 en öppen kontrollerad randomiserad femårig longitudinell multicenterstudie påbörjats, där mer än 1 000 patienter med diagnosen oral leukoplaki ska inkluderas. Vi tror att med borstbiopsi för cytologisk diagnostik som tas vid varje kontroll (studiegrupp) har vi ett fullgott alternativ till kontroller där vävnadsbiopsi endast tas när ansvarig anser att detta behövs (kontrollgrupp). Hypotesen är att höggradiga cellförändringar och tidig cancer diagnostise-

ras bättre med borstbiopsier och AI-stödd diagnostik, och därmed kan antalet cancerfall reduceras. Studien kommer att generera en biobank med orala keratinocyter från en grupp som utvecklar skivepitelcancer och en grupp som förblir tumörfria som ska analyseras avseende förekomst av biomarkörer som kan prognostisera malign celltransformation.

Singlecellanalys av RNA-transkript från orala keratinocyter för att identifiera cellkloner med proliferativ aktivitet

Genomsekvensering av OL försvåras när vävnadsbiopsier tas och analyseras, då cellpopulationer inte endast innehåller keratinocyter utan celler från alla vävnadslager, bland annat inflammatoriska celler från den subepiteliala vävnaden. Detta har medfört att genomiska och transkriptomiska analyser inte enbart påvisar gener eller mRNA från keratinocyter.

Med exfoliativ cytologi kommer borstbiopsierna att innehålla huvudsakligen keratinocyter vars cellkärnor kan analyseras enligt ett singlecells-RNA-sekvenseringsprotokoll. Singlecells-RNA-sekvensering (scRNA-seq) är ett kraftfullt verktyg som kan beskriva cellernas utseende, tillstånd och funktion på cellnivå [32, 33]. Med scRNA-seq-baserade transkriptomanalyser av leukoplakier och tumörer går det härigenom att göra omfattande analyser och objektiva jämförelser av celler som spelar en kritisk roll i sjukdomsprogression [34].

Med en systematisk enkelcells-RNA-sekvensering av det mycket omfattande material som den longitudinella studien genererar från de personer som utvecklar skivepitelcancer och de som förblir tumörfria under studien, kan förändringar i genetisk profil – baserat på RNA-uttryck – sannolikt påvisa viktiga biomarkörer som förutser malign celltransformation. För att vidare erhålla molekylärbiologisk information och se vilka proteiner cellerna uttrycker används antikroppar mot ytprotein eller intracellulära molekyler som visar cellernas status på direktutstryk på glas med immunohistokemi eller immunofluorescens.

Under senare år har varianter av dessa metoder utvecklats där antikropparna länkas till korta DNA-strängar, vilket används för att förstärka detektions-signalen genom så kallad rullande cirkel-amplifiering (RCA) i form av immunRCA. I den besläktade *in situ*-proximitetsligerings-tekniken (isPLA) används par av DNA-konjugerade antikroppar för att initiera RCA-reaktioner. Förutom ökad känslighet erbjuder isPLA-tekniken förbättrad specificitet vid proteinanalyser, som gör det möjligt att undersöka om proteiner interagerar med varandra eller om de genomgått modifieringar i form av till exempel fosforyleringar som påverkar deras aktivitetstillstånd.

Cytologi är alltså en värdefull teknik, men till skillnad från vävnadsprover ger cytologi inga insikter om den mikroskopiska strukturen av vävnader eller distributionen av olika celler i provet, varvid

en kombination av tekniker kan vara lämplig när så bedöms relevant.

ARTIFICIELL INTELLIGENS

Mycket forskning pågår för att utveckla AI som ett diagnostiskt komplement vid kontroll av munslemhinnelesioner med cytologi. Automatisk objektiv karakterisering med djupinlärande förståelig AI kan bli en lätthanterlig metodik för att hitta de OL som har hög risk att utveckla malignitet eller tidig skivepitelcancer.

För att nå en robust och pålitlig funktion hos AI-system behövs en stor mängd representativt träningsmaterial för att lära systemet att förutse den framtida utvecklingen. Ett välfungerande AI-system behöver även kunna identifiera olika former av anomalier och uppmärksamma en användare om exempelvis ett prov inte har tillräckligt hög kvalitet för en pålitlig bedömning.

Många forskningsprojekt

Ett stort antal forskningsprojekt fokuserar på att utveckla pålitlig och förklarbar AI som i samarbete med en mänsklig användare kan nå en effektiv och tillförlitlig implementation i vården [35, 36]. Med det stora antalet orala keratinocyter, insamlade i den öppna kontrollerade randomiserade femåriga longitudinella multicenterstudien som påbörjats 2023, öppnas möjligheter för att identifiera tillförlitliga molekylära prediktiva och prognostiska biomarkörer i cellerna med automatisk objektiv djupinlärande AI.

På senare tid har maskininläring, särskilt djupinläring med hjälp av djupa falttningsnätverk (DCNN), visat sig vara mycket framgångsrikt för analys av stora datamängder, speciellt vid uppgifter där det finns en tydlig grundläggning för inläring, såsom identifiering av objekt från medicinska bilder, som här för analys av skannade cytologiglas. Vi kommer att använda tekniker från förklarbar AI (Explainable AI) för att identifiera de mest relevanta egenskaperna. Genom att ordna prover efter likheten mellan dessa egenskaper, visualiserade med moderna verktyg, kan malignitetsrelaterade länkar hittas och associeras med relevanta biomarkörer. Detta kan användas för diagnostik av dysplastiska celler eller med malignitet associerade celler, vilket ger ett intuitivt tillvägagångssätt för diagnostik, bedömning av terapier och interventioner, samtidigt som man tar hänsyn till demografi, klinisk historia och andra parametrar.

Genom att nyttja kraften hos modern AI kan vi objektivt identifiera normala och onormala mönster, vilket möjliggör skapandet av ett effektivt, robust och objektivt kliniskt användarvänligt system. Genom att endast träna nätverken med hjälp av diagnos på patientnivå undviker vi bias från att införliva stundtals osäkra bedömningar på cellnivå gjorda av patolog/cytolog. Genom multipelinstansinläring

(MIL) hanteras problem med ofullständig kunskap om vad som finns i provet, och med tolkningsbara MIL-metoder [37] har vi sammanställt information om vad som krävs för att kunna ta beslut på patientnivå.

Internationell multicentersatsning

I en internationell multicentersatsning arbetar sedan ett antal år ett 20-tal aktörer mot AI-stödd screening för munhåle- och orofaryngeal cancer baserat på borstbiopsier. Projektet kopplar samman forskare och slutanvändare i Sverige vid universitet, universitetssjukhus, lasarett, folktandvård och cancercentrum i Indien. Baserat på detta material har vi framgångsrikt utvecklat ett väl fungerande djupinlärande AI-system för oral cancerdetektering från helglasskannade cytologiska bilder [36] som visar användbarheten för storskalig screening.

Det finns nu en tilltagande mängd data som karakteriserar den genomiska och transkriptomiska signaturen av OL [38] som, tillsammans med kandidatmarkörer som singlecellsanalyserna genererar, kommer att användas för att ytterligare förbättra och validera den AI-stödda mjukvaran. Vid analys av borstbiopsier kommer proteinmarkörer som kan vara av intresse att identifieras och visualiseras i den enskilda cellen med fluorescensmikroskopi [39–42] plus intracellulära signaltransduktionsvägar som ofta förstärks vid malignitet. Denna aktivering kan visualiseras, och fördelen ligger i den förbättrade möjligheten att identifiera dysplastiska celler och deras proteinuttryck.

För att undersöka kunskapsläget inom området gjordes en systematisk genomgång av tillgänglig litteratur för att ta reda på om biomarkörer tidigare påvisats i orala keratinocyter som identifierar orala leukoplakier med risk för malign celltransformation och oral skivepitelcancer. I prover från patienter med oral skivepitelcancer identifierades 39 biomarkörer, men på grund av att studierna redovisade allt för få analyserade prover och ett otillräckligt antal fall av progression till malignitet måste resultaten verifieras i utökade och bättre designade studier. I dagsläget saknas således markörer som är kliniskt användbara för att bedöma risken, ett resultat som överensstämmer med vad Monteiro och medarbetare konkluderade 2020 [43, 44]. Även om morfologin visuellt ser likadan ut i ljusfältmikroskopet, finns det sannolikt signifikanta skillnader på molekylär nivå.

AI-programvaran kommer att användas för att karakterisera cellernas morfologi och mönster. Informationen från den proteomiska och transkriptomiska bulkanalysen kommer att identifiera kandidatbiomarkörer som förväntas korrelera med dysplasi och endotelial mesenkymal differentiering till en mer aggressiv fenotyp (EMT) som kan påvisa risk för malign transformation eller tidig cancer i orala keratinocyter från OL.

”Mycket forskning pågår för att utveckla AI som ett diagnostiskt komplement vid kontroll av munslemhinnelesioner med cytologi.”



”Med en ökad förståelse av våra vanliga sjukdomar finns betydande förutsättningar för att kunna identifiera robusta biomarkörer även inom tandvården.”

KONKLUSION

- Analys på molekylärnivå kan påvisa ett antal tänkbara biomarkörer för sjukdomsrisk.
- Med artificiell intelligens går det bland dessa tänkbara biomarkörkandidater att hitta de som indikerar hög risk för sjukdom.
- Med precisionsmedicin går det att göra en individuell bedömning av sjukdomsrisk och risk för sjukdomsprogression samt att förbättra möjligheterna för en tidig diagnos.
- Genom att gå från en vårdplan som ska passa för alla till en skräddarsydd individuell vård ökar möjligheterna till bot eller lindring.
- Odontologin bör följa i de medicinska disciplinernas fotspår och skapa en nationell struktur och en strategi för vårdutveckling och forskning inom precisionsmedicin.

KLINISK RELEVANS

Med ett paradigmskifte till en alltigenom faktabaserad djupanalys av individuella patientdata ökar möjligheterna att hitta de individer som löper hög risk för att drabbas av munhålesjukdomar. Med primärpreventiva insatser i form av en individanpassad vårdplan eller sekundärprevention i form av tidiga insatser kommer färre att insjukna eller utveckla svår sjukdom. Även om det är en lång väg kvar, intensifierar den odontologiska forskningen sina ansträngningar och anammar alltmer samma strategier som används för att hitta biomarkörer

för andra specifika diagnoser, med känsliga, snabba och kostnadseffektiva analysmetoder med proteomik, transkriptomik och genomik. Med en ökad förståelse av våra vanliga sjukdomar finns betydande förutsättningar för att kunna identifiera robusta biomarkörer även inom tandvården, vilket kommer att ha betydelse för arbetet med att förebygga munhålesjukdomar.

ENGLISH SUMMARY

Artificial intelligence, biomarkers and precision medicine, a paradigm shift in the prevention, diagnosis and treatment in oral diseases
Joakim Lindblad, Julia Davies, Caroline Dahlström, Ronak Sandy, Bengt Hasseus and Jan-Michael Hirsch
Tandläkartidningen 2023; 115 (9): 74–80
Aligned patient data, with proteomic, transcriptomic and genomics analyzes, may generate information that could be used for reliable and explainable AI-based identification of disease indicators. Clinically applicable methods are needed to identify biomarkers with high sensitivity that specifically identify patients at risk of developing a disease. This approach is the key to individual assessment of disease and disease progression, as well as to improve diagnostics and tailored therapeutic approaches towards a specific patient. In this article, we focus on the current status of precision medicine in the fields of cariology and periodontology, and oral cancer. ●

Projektet finansieras av Folk tandvården Stockholms län AB, referens 7071, Vinnova, projekt 2017–02447, 2020–03611 och 2021–01420, Vetenskapsrådets projekt 2017–04385, Cancerfondens projekt 22 2353 och The Foresight Research Programme vid Malmö Universitet. Open access-finansiering från Uppsala universitet.

Referenser

- Innes NPT et al. A century of change towards prevention and minimal intervention in cariology. *J Dent Res* 2019; 98 (6): 611–7. doi: 10.1177/0022034519837252.
- Schwendicke F, Krois J. Precision dentistry – what it is, where it fails (yet), and how to get there. *Clin Oral Invest* 2022 Apr; 26 (4): 3395–403. doi: 10.1007/s00784-022-04420-1. Epub 2022 Mar 14.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134–44.
- Darveau RP, Hagishengalis G, Curtis MA. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *J Dent Res* 2012; 91: 816–20.
- Neilands J, Davies JR, Bikker FJ, Svensäter G. *Parvimonas micra* stimulates expression of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* in multi-species communities. *Anaerobe* 2019 Feb; 55: 54–60. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.10.007.
- Davies JR, Kad T, Neilands J et al. Polymicrobial synergy stimulates *Porphyromonas gingivalis* survival and gingipain expression in a multi-species subgingival community. *BMC Oral Health* 2021; 21: 639. doi: 10.1186/s12903-021-01971-9.
- Socialstyrelsen. Statistik om tandhälsa 2018 (socialstyrelsen.se).
- Socialstyrelsen. Karies bland barn och ungdomar – epidemiologiska uppgifter för år 2019 (socialstyrelsen.se).
- Boisen G, Davies JR, Neilands J. Acid tolerance in early colonizers of oral biofilms. *BMC Microbiol* 2021; 21: 45. doi: 10.1186/s12866-021-02089-2.
- Esberg A, Sheng N, Mårell L et al. *Streptococcus mutans* adhesin biotypes that match and predict individual caries development. *EBioMedicine* 2017; 24: 205–15.
- Senneby A, Davies JR, Svensäter G, Neilands J. Acid tolerance properties of dental biofilms *in vivo*. *BMC Microbiol* 2017; 17: 165. doi: 10.1186/s12866-017-1074-7.
- Paqué PN, Herz C, Wiedemeier DB et al. Salivary biomarkers for dental caries detection and personalized monitoring. *J Pers Med* 2021; 11: 235. doi: 10.3390/jpm11030235.
- Ahsan H. Biomolecules and biomarkers in oral cavity: biosays and immunopathology. *J Immunoassay Immunochem* 2019; 40: 52–69. doi: 10.1080/15321819.2018.1550423.
- Pedersen L, Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J Dent* 2019; 80: 3–12. doi: 10.1016/j.jdent.2018.08.010.
- Hegde MN, Attavar SH, Shetty N et al. Saliva as a biomarker for dental caries: A systematic review. *J Conserv Dent* 2019 Jan–Feb; 22 (1): 2–6. doi: 10.4103/JCD.JCD_531_18.
- Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: Role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent* 2003; 28: 47–52. doi: 10.17796/jcpd.28.1yg6m443046k50u20.
- Alamoudi A, Alamoudi R, Yara-Gazzaz Y, Alqahtani AM. Role of salivary biomarkers in diagnosis and detection of dental caries: a systematic review. *Diagnostics (Basel)* 2022 Dec 7; 12 (12): 3080. doi: 10.3390/diagnostics12123080.
- Strömberg N, Esberg A, Sheng N et al. Genetic and lifestyle-dependent dental caries defined by acidic proline-rich protein genes PHRH1 and PRH2. *EBioMedicine* 2017; 246: 38–46.
- Statistikdatabas för cancer [cited 2021]. https://sdb.socialstyrelsen.se/if_can/val.aspx
- Johnson DE, Burtness B, Leemans CR et al. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* [Internet] 2020; 6 (1): 92. doi: 10.1038/s41572-020-00224-3.
- Viens LJ, Henley SJ, Watson M et al. Human Papillomavirus-associated cancers – United States, 2008–2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet] 2016; 65 (26): 661–6. doi: 10.15585/mmwr.mm6526a1.
- Nationellt vårdprogram för huvud- och halscancer (cancercentrum.se).
- Jäwert F, Pettersson H, Jagefeldt E et al. Clinicopathologic factors associated with malignant transformation of oral leukoplakias: a retrospective cohort study. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet] 2021; 50 (11): 1422–8. doi: 10.1016/j.ijom.2021.01.012.

Den kompletta referenslistan återfinns i webbversionen av artikeln på tandläkartidningen.se.



Referenser

- 24. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouqurot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement: Oral epithelial dysplasia classification systems. *J Oral Pathol Med [Internet]* 2008; 37(3): 127–33. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00584.x.
25. Haj-Hosseini N, Lindblad J, Hasseús B et al. Early detection of oral potentially malignant disorders: A review on prospective screening methods with regard to global challenges. *J Maxillofac Oral Surg* 2022. doi: 10.1007/s12663-022-01710-9.
26. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* 2019; 20(2): 71–88.
27. Patel A, Patel S, Patel P, Tanavde V. Saliva based liquid biopsies in head and neck cancer: how far are we from the clinic? *Front Oncol* 2022; 12: 828434.
28. Idrees M, Farah CS, Sloan P, Kujan O. Oral brush biopsy using liquid-based cytology is a reliable tool for oral cancer screening: A cost-utility analysis. *Cancer Cytopathology* 2022; 130(9): 740–8. doi: 10.1002/cncy.22599.
29. Tomić U, Petrović ST, Soldatović I et al. Comparison of transepithelial cytology and histopathology in the diagnosis of potentially malignant and malignant lesions of the oral mucosa. *Balkan J Dent Med* 2022; 26(2): 113–7. doi: 10.5937/bjdm20220531-001.
30. Sun J, Wei Q, Zhou Y et al. A systematic analysis of FDA-approved anticancer drugs. *BMC Syst Biol [Internet]* 2017; 11(S5). doi: 10.1186/s12918-017-0464-7.
31. Mezheyeuski A, Backman M, Mattsson J et al. An immune score reflecting pro- and anti-tumoural balance of tumour microenvironment has major prognostic impact and predicts immunotherapy response in solid cancers. *EBioMedicine [Internet]* 2023; 88: 104452. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104452.
32. Puram V, Tirosh I, Parikh AS et al. Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell* 2017 Dec 14; 171(7): 1611–24.e24. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.044.
33. Smillie CS, Biton M, Ordovas-Montanes J et al. Intra- and inter-cellular rewiring of the human colon during ulcerative colitis. *Cell* 2019 Jul 25; 178(3): 714–30.e22. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.029.
34. Ji AL, Rubin AJ, Thrane K et al. Multimodal analysis of composition and spatial architecture in human squamous cell carcinoma. *Cell* 2020 Jul 23; 182(2): 497–514.e22.
35. Tosun AB, Pullara F, Becich MJ et al. HistoMapr™: An explainable AI (xAI) platform for computational pathology solutions. In: Holzinger A, Goebel R, Mengel M, Müller H (eds). *Artificial intelligence and machine learning for digital pathology*. Lecture Notes in Computer Science 2020; vol 12090. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-030-50402-1_13.
36. Lu J, Sladoje N, Runow-Stark C et al. A deep learning based pipeline for efficient oral cancer screening on whole slide images. In *Proc International Conference on Image Analysis and Recognition (ICIAR), LNCS, 2020*. arXiv preprint:1910.10549.
37. Koriakina N, Sladoje N, Bašić V, Lindblad J. Oral cancer detection and interpretation: Deep multiple instance learning versus conventional deep single instance learning. arXiv:2202.01783.
38. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* 2019; 20(2): 71–88.
39. Farah CS. Molecular, genomic, and mutational landscape of oral Leukoplakia. *Oral Dis* 2021 May; 27(4): 803–12.
40. Klaesson A, Grannas K, Ebai T et al. Improved efficiency of in situ protein analysis by proximity ligation using UnFold probes. *Sci Rep* 2018; 8: 5400.
41. Löf L, Arngården L, Olsson-Strömberg U et al. Flow cytometric measurement of blood cells with BCR-ABL1 fusion protein in chronic myeloid leukemia. *Sci Rep* 2017; 7: 623. doi: 10.1038/s41598-017-00755-y.
42. Zhu F, Wang KB, Rui L. STAT3 Activation and oncogenesis in lymphoma. *Cancers* 2019; 12(1): 19. doi: 10.3390/cancers12010019.
43. Hasan R. Can biomarkers identify oral leukoplakia at high risk of malignant transformation? A systematic review. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1737082/FULLTEXT01.pdf>
44. Monteiro L, Mello FW, Warnakulasuriya S. Tissue biomarkers for predicting the risk of oral cancer in patients diagnosed with oral leukoplakia: A systematic review. *Oral Dis [Internet]* 2021; 27(8): 1977–92. doi: 10.1111/odi.13747.32.

Forskare? Vill du bidra med en **vetenskapsartikel?**

SÄND DITT MANUSKRIFT FÖR BEDÖMNING TILL:

Tandläkartidningen

Box 1217, 111 82 Stockholm
manus@tandlakartidningen.se
08-666 15 00



Tandläkar
tidningen