

Konfokale Laserscanningmikroskopie von Urothel

Ein Laserscanningmikroskop ist ein Lichtmikroskop, bei dem der fokussierte Laser das Präparat Punkt für Punkt abtastet. Die Rasterung wird erreicht, indem der Laserstrahl durch zwei sog. Scanspiegel waagrecht und senkrecht abgelenkt wird, bevor er durch das Objektiv auf den Anregungspunkt im Präparat fokussiert wird (**Abb. 1**). Das Lichtsignal, das durch die Laseranregung erzeugt wird, wird durch spezielle Detektoren (meist Photomultiplier) für jeden Bildpunkt nacheinander aufgenommen. Daher entsteht zu keinem Zeitpunkt im Mikroskop ein vollständiges Bild. Dieses wird erst im Steuerungscomputer zusammengesetzt. Es resultiert also eine „indirekte“ Betrachtung.

Die konfokale Laserscanningmikroskopie hat sich in vielen naturwissenschaftlichen Bereichen zu einer etablierten Untersuchungsmethode entwickelt. Auch in der Medizin besteht seit einigen Jahren Interesse am Einsatz der konfokalen Lasermikroskopie, vorzugsweise in der Ophthalmologie [2, 3]. Der Vorteil gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie wird dabei schnell offensichtlich, denn ein konfokales Laserscanningmikroskop kann immer dann sinnvoll eingesetzt werden, wenn Präparate im Gewebeverbund untersucht werden sollen. Die Laserscanningmikroskopie ermöglicht im Prinzip eine „histologische“ In-vivo-Beurteilung oberflächennaher Gewebestrukturen, die gänzlich ohne Gewebeaufbereitung oder Färbemethoden auskommt. In der Augenheilkunde spielt die konfokale Laserscanningmikroskopie als In-vivo-Untersuchung bereits eine Rolle [2, 3]. Die Untersuchung der Hornhaut mit ihrer oberflächlichen Lage und der Transparenz der

Cornea prädestinieren diese Anwendung als erstes Untersuchungsobjekt in der Augenheilkunde.

Bislang publizierte Arbeiten zur klinischen Anwendung der Laserscanningmikroskopie beziehen sich daher auf die Untersuchung oberflächlicher Strukturen, eben in der Ophthalmologie, aber auch der Dermatologie, Gastroenterologie und der Zahnheilkunde [1, 4, 5, 10, 11, 14].

Auch das Epithel von Hohlorganen wie der Harnblase ist grundsätzlich eine oberflächennahe Struktur. Prinzipiell wäre daher die Anwendung der Laserscanningmikroskopie zur Untersuchung des Urothels geeignet, wenn es gelänge, technische Vorraussetzungen zur Verbindung dieser komplizierten optischen mit der konventionellen Endoskopie zu schaffen. Bevor dieser Schritt sinnvoll ist, sollte die Anwendung der Laserscanningmikroskopie zur Beurteilung des Urothels ausreichend geprüft sein. Wir haben daher in dieser Pilotstudie die Anwendbarkeit und

die diagnostische Aussagekraft der Urothelbeurteilung mittels Laserscanningmikroskopie an Harnblasenexzisionen von frisch radikal zystektomierten Präparaten untersucht und deskriptiv beurteilt.

Dieser Ansatz scheint potentiell sinnvoll zu sein. Eine ungenügende zystoskopische Erkennbarkeit flächenhafter Urothelkarzinome (höhergradige Dysplasien, Carcinoma in situ) ist ein wesentlicher Mangel der konventionellen Zystoskopie. Für andere Möglichkeiten zur Verbesserung der endoskopischen Detektierbarkeit flächenhafter Läsionen (Fluoreszenzzytoskopie) wurden deutlich erhöhte Tumordetektionsraten beschrieben, so dass der klinische Nutzen einer potentiellen Verbesserung der optischen Erkennung von z. B. Carcinoma in situ der Harnblase außer Frage steht.

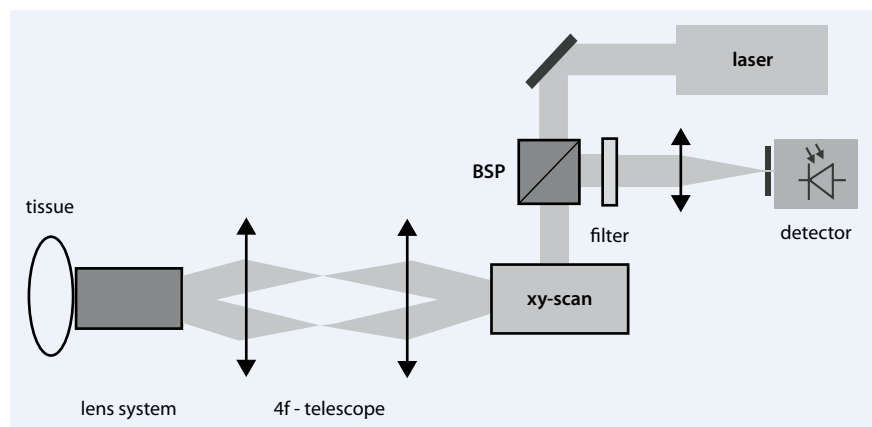


Abb. 1 ▲ Optisches Prinzip der Laserscanningmikroskopie, HRT (Heidelberg Retina Tomograph) + RCM (Rostock Cornea Module)

Konfokale Laserscanningmikroskopie von Urothel

Zusammenfassung

Eine Verbesserung der optischen Detektion flächenhafter Urothelkarzinome ist potentiell von klinischem Interesse, wenn sie eine bessere Erkennung zu biopsierender Areale erlaubt. Wir untersuchten dazu in einer Pilotstudie die Anwendung hochauflösender optischer Systeme mit zellulärer Lasermikroskopie, welche die Beurteilung einzelner Zellen im Epithelverband erlaubt.

Ex-vivo-Präparate von radikal zystektomierten Patienten wurden mit einer eigens entwickelten Methode der konfokalen Laserscanningmikroskopie (Wellenlänge 670 nm) untersucht, wobei oberflächenparallele optische Schnitte (Kantenlänge 200×200 µm) bis zu einer Gewebetiefe von 120 µm aufgenommen wurden. Ausgewählte Datensätze wurden mittels AMIRA dreidimensional rekonstruiert. Insgesamt 35 Ex-vivo-Präparate von 20 Patienten wurden konfokal-mikroskopisch untersucht und die Befunde mit denen der histologischen Schnittpräparate verg-

lichen. In allen Fällen konnten makroskopisch tumorbefallene Bezirke lasermikroskopisch aufgrund deutlich erkennbarer zellulärer Atypien eindeutig identifiziert werden. Zusätzliche Befunde waren vielfach eine subepithelial nachweisbare Hypervaskularisation in tumortragenden Bereichen. Bei flächenhaften Karzinomen (CIS) konnten diese in vielen Fällen ebenfalls mittels der Streulichtmikroskopie eindeutig identifiziert werden.

Die konfokale Streulichtmikroskopie erlaubt eine Visualisierung und Analyse einzelner Zellen und ihrer Atypien bezüglich der Kernstruktur, die weit über die normalen zytoskopischen Beurteilungsmöglichkeiten hinausgeht. Die entwickelte Methode liefert eine Basis für weitere Untersuchungen mit der potentiellen Möglichkeit einer endoskopischen In-vivo-Bildgebung.

Schlüsselwörter

Blasenkarzinom · Diagnose · Carcinoma in situ · Mikroskopie · Laserscanningmikroskopie

Confocal laser scanning microscopy of the urothelium

Abstract

In order to improve the detection of flat urothelial neoplasia an improvement in optical methods might be helpful. We investigated the use of confocal laser scanning microscopy in a pilot study of specimens with bladder cancer.

A total of 35 fresh ex vivo specimens of 20 human bladders of patients who underwent radical cystectomy were examined with a modified confocal laser scanning microscope (670 nm). The field size was 200×200 µm and tissue was investigated up to depths of 120 µm. Resulting data sets were reconstructed three-dimensionally by computer software. Results were compared with conventional histology. Microscopically diseased bladder mucosa showed cytological and histological criteria of malignancy which were readily identifiable by laser scanning micros-

copy. In all cases we were able to detect the presence of malignancy with the images generated by the confocal laser scanning technique. Atypical cellular structures and subepithelial hypervascularization were prominent features. Carcinoma in situ lesions could also be identified in many cases.

Confocal laser scanning microscopy allows the analysis of cellular and epithelial architecture of the urothelium in a detail which is beyond the limitations of conventional endoscopy by white light cystoscopy. Therefore, the principle would probably be of benefit if the technical limitations can be overcome. AbstractSection Stop

Keywords

Bladder carcinoma · Diagnosis · Carcinoma in situ · Microscopy · Laser scanning microscopy

Methodik

Von insgesamt 20 Patienten mit histologisch nachgewiesenem muskelinvasivem Urothelkarzinom wurden 35 Ex-vivo-Präparate (frische Zystektomiepräparate) untersucht. Die Präparate wurden mit einer von der Universitäts-Augenlinik eigens entwickelten Methode der konfokalen Laserscanningmikroskopie untersucht (basierend auf dem Laserscanningtomographen HRTII der Fa. Heidelberg Engineering, Heidelberg; ■ Abb. 2, [15]). Das Gerät arbeitet im Kontaktverfahren über ein Wasserimmersionsobjektiv und einen Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 670 nm. Mittels eines computergesteuerten Z-Scans können optische Schnitte in definierten Gewebetiefen erzeugt werden.

Unter Verwendung einer 0,5 mm dicken sterilen PMMA-Kappe ist es möglich, Ergebnisse mit exakten Tiefeninformationen in einer sehr guten optischen Qualität zu erhalten. Es wurden oberflächenparallele optische Schnitte (Kantenlänge 200×200 µm) bis zu einer Tiefe von 120 µm aufgenommen. Ausgewählte Datensätze wurden mittels AMIRA-Software dreidimensional rekonstruiert. Die erhaltenen Befunde wurden deskriptiv ausgewertet. Die untersuchten Bezirke von makroskopisch befallenen Urothel und von makroskopisch nicht befallenen Urothel wurden markiert und anschließend histologisch aufgearbeitet.

Ergebnisse

In allen Fällen ergab sich eine gute Beurteilbarkeit der verschiedenen normalen Urothelschichten (■ Abb. 3, 4, 5, 6). Makroskopisch tumorbefallene Bezirke konnten auch lasermikroskopisch aufgrund sehr deutlich erkennbarer zellulärer Atypien identifiziert werden (■ Abb. 7). Die Beurteilungskriterien lehnen sich dabei sowohl an zytologische (Kern-Plasma-Relation, Kerndichte) wie auch histologische Indikatoren (Störung der Gewebearchitektur, Kernprominenz) an [12, 13]. Diese Beurteilungskriterien waren in vielen Fällen offensichtlich, in anderen diskret ausgeprägt. Bei der Beurteilung makroskopisch nicht tumorbefallener Bezirke ergaben sich in vielen Fällen auch

Hier steht eine Anzeige.





Abb. 2 ◀ Laserscanningmikroskopie mit Standardobjektivsystem und endoskopischer Anordnung

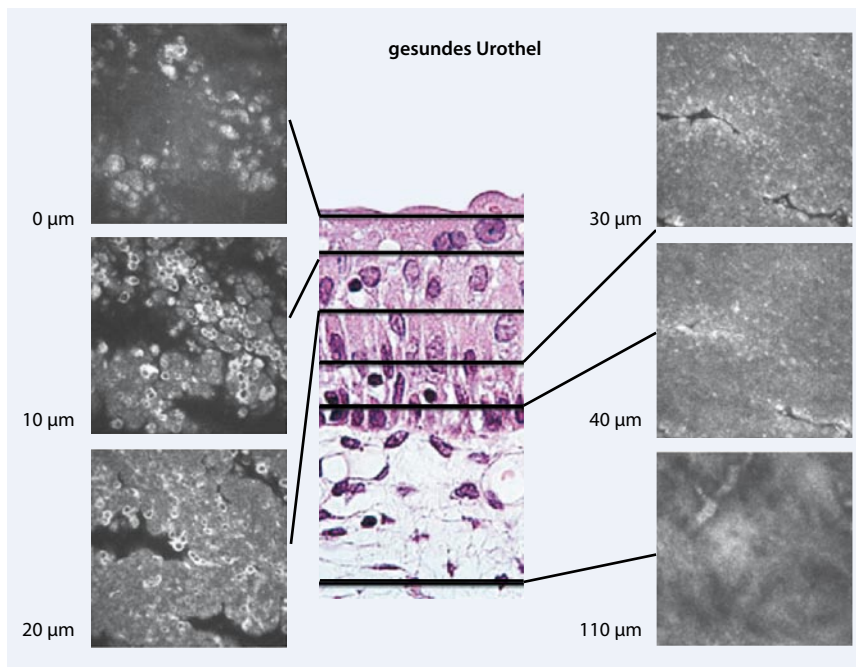


Abb. 3 ▲ Konfokale Laserscanningaufnahme von gesundem Urothel im Vergleich zum konventionellen HE-Schnitt

auffällige Befunde besonders der Kern-Plasma-Relation, vielfach aber auch unauffällig erscheinende Befunde.

Bei den tumorbefallenen Arealen war als häufiger und typischer Befund vielfach eine deutliche subepitheliale Hypervaskularisation auffällig (■ **Abb. 8**). Diese war insgesamt in tumortragenden Bereichen typisch und mag daher möglicherweise als ein zusätzliches Kriterium dienen, welches auf Malignität hinweist. Vom tumorbiologischen Verständnis her wäre dies plausibel, kann aber bei dieser Untersuchung natürlich nur rein deskriptiv als Phänomen beschrieben werden.

Bei flächenhaften Karzinomen (CIS) konnten diese in zahlreichen Fällen mit der Streulichtmikroskopie eindeutig identifiziert werden. Diese zeichneten sich durch ausgesprochen deutliche Verschiebungen der Kern-Plasma-Relation bei wenig gestörter Epithelarchitektur aus. Eine Quantifizierung der Befunde wurde in dieser Studie nicht vorgenommen.

Diskussion

Die konfokale Streulichtmikroskopie erlaubt eine Visualisierung und Analyse der zellulären Struktur, die weit über die nor-

malen zystoskopischen Beurteilungsmöglichkeiten hinausgeht. Unsere Ergebnisse aus einer deskriptiven Pilotstudie zeigen, dass eine konfokale Laserscanningmikroskopie (KLSM) von Urothel möglich ist. Mit der entwickelten Methode ist die eindeutige Identifizierung tumortragender Harnblasenabschnitte möglich.

König et al. [7, 8] beschrieben bereits 1999 ihre Erfahrungen in der Anwendung eines solchen Verfahrens am Urothel im Tiermodell mit ähnlichen Befunden, wie wir sie beschreiben. In den Untersuchungen von König et al. wurden am anästhesierten Tier (Ratte) In-vivo-Untersuchungen der intakten Blasenwand durchgeführt. Zu einer Weiterentwicklung der Technik aufgrund dieser ersten Untersuchungen scheint es nicht gekommen zu sein; weitere Veröffentlichungen zu KLSM von Urothel, insbesondere an menschlichem Urothel, existieren nicht.

Für den Bereich der gastroenterologischen endoskopischen Diagnostik existieren dagegen bereits kommerziell erhältliche Laserscanningendoskope (CellvizioGI®, Fa. Mauna Kea Technologies). Das CellvizioGI®-System besteht aus einer Laserscanningeinheit, einer Reihe von Faserobjektiven und einer Software, welche es ermöglicht 12 Bilder/s zu verarbeiten und darzustellen. Diese Bilder haben eine Auflösung von $2,5 \times 15,0 \mu\text{m}$, ein Gesichtsfeld von $600 \times 500 \mu\text{m}$ und können bis zu einer Gewebetiefe von $100 \mu\text{m}$ gewonnen werden [6, 9].

Unsere Ergebnisse zeigen, dass solche Auflösungen und Tiefendarstellungen bereits kommerziell erhältlicher Systeme auch für die Anwendung und Beurteilung

Hier steht eine Anzeige.



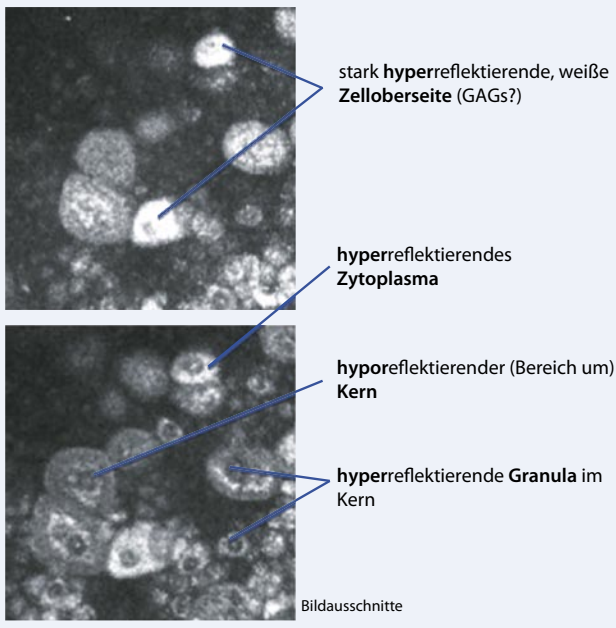


Abb. 4 ▲ Normales Urothel in 0 µm Tiefe

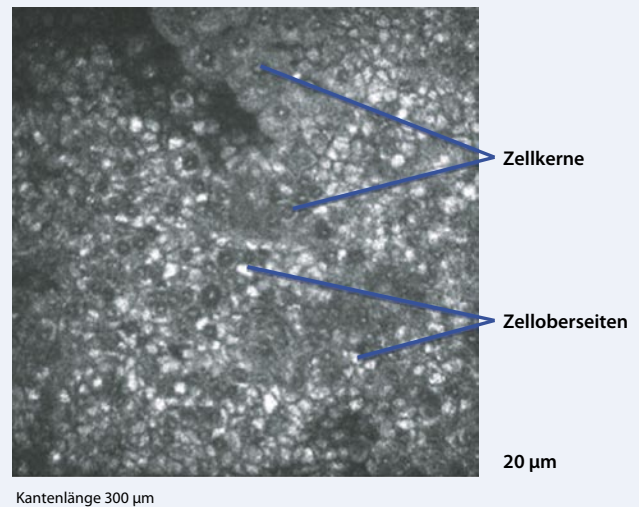


Abb. 5 ▲ Normales Urothel in 20 µm Tiefe

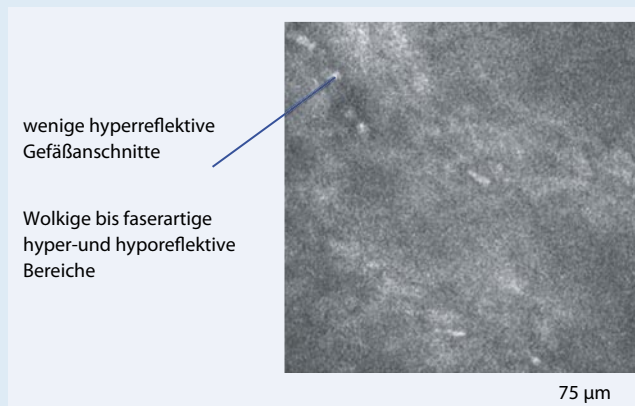


Abb. 6 ▲ Normales Urothel in 75 µm Tiefe

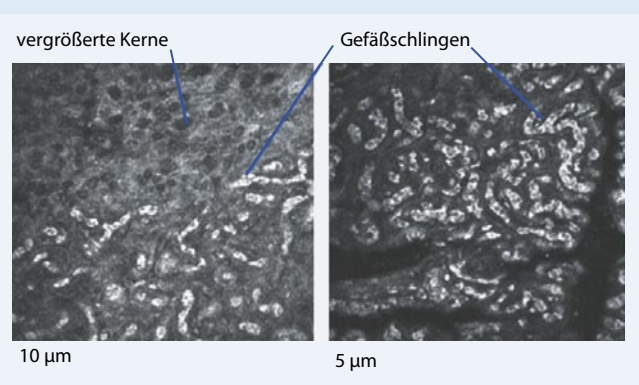


Abb. 8 ▲ Malignes Urothel mit Kapillarbildung in 5 µm Tiefe

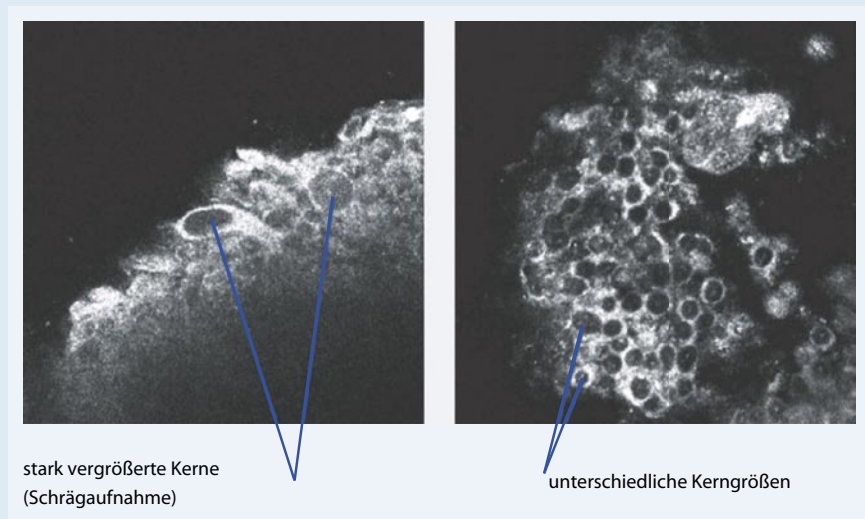


Abb. 7 ◀ Malignes Urothel mit Kernatypien (Anisokaryose)

von humanem Urothel ausreichend sind und die Identifizierung maligner Veränderungen erlaubt.

Fazit für die Praxis

Die von uns entwickelte Methode zur Ex-vivo-Untersuchung von humanem Urothel liefert eine erste Basis für weitere Untersuchungen mit dem Ziel, eine endoskopische In-vivo-Bildgebung im Rahmen einer Urethrozystoskopie zu entwickeln. Ob dies sinnvoll möglich sein wird, muss gegenwärtig dahingestellt bleiben. Fraglich ist bislang natürlich die klinische Praktikabilität der möglichen Anwendung der Laserscanningmikroskopie bei einer endoskopischen Untersuchung der Harnblase. Der Geräte- und Zeitaufwand für mögliche In-vivo-Untersuchungen ist hoch und wird auch unter dem Gesichtspunkt der Kosten-Nutzen-Relation gesehen werden müssen. Auch wäre ein klinischer Nutzen erst nachzuweisen. Ferner bestehen bislang keine weiteren berichteten Ex-vivo-Erfahrungen in der Beurteilung von humanem Urothel mittels KLSM. Hier sind weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven notwendig, um qualitative und vielleicht quantitative Beurteilungskriterien zu entwickeln und zu verifizieren. Potentiell stellt ein solches endoskopisches KLSM-Verfahren eine interessante und entwicklungsfähige Technik dar, welches eine sinnvolle Ergänzung der uroonkologischen Diagnostik darstellen und Anwendung in der urologischen Nachsorge und Diagnostik v. a. des flächenhaft, intraepithelial wachsenden Carcinoma in situ finden könnte.

Korrespondenzadresse

Dr. C. Nohr-Westphal
Urologische Klinik und Poliklinik,
Universität Rostock,
Ernst-Heydemann-Straße 6, 18057 Rostock
cnohrwest@aol.com

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Burmeister M, von Schwanewede H et al (2009) Intraorale Diagnostik mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. *Biomed Tech (Berl)* 54:23–28

2. Guthoff RF, Stave J (2006) In vivo micromorphology of the cornea: confocal microscopy and clinical applications. *Cornea External Eye Disease* 13:173–208
3. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O (2009) In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 37:100–117
4. Inoué H, Rius F, Rajadhyaksha M et al (2001) Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 116:846–852
5. Inoue H, Igari T, Nishikage T et al (2000) A novel method of virtual histopathology using laser-scanning confocal microscopy in-vitro with untreated fresh specimens from the gastrointestinal mucosa. *Endoscopy* 32:439–443
6. Kahl S (2006) Interventionelle Endoskopie, Lehrbuch und Atlas. Urban & Fischer, München, S 193–195
7. Koenig F, Gonzales S, White WM et al (1999) Near-infrared confocal laser scanning microscopy of bladder tissue in vivo. *Urology* 53:853
8. Koenig F, Loening SA (1999) Strategien in der bildgebenden Diagnostik des Harnblasenkarzinoms. *Urologe B* 39:303–306
9. Layer P, Rosien U (2008) Praktische Gastroenterologie. Urban & Fischer, München
10. Rajadhyaksha M, Anderson R, Webb RH (1999) Videorate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues in vivo. *Appl Opt* 38:2105–2115
11. Rajadhyaksha M, Gonzales S, Zavislan JM et al (1999) In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: Advances in instrumentation and comparison with histology. *Journal of Investigative Dermatology* 113:293–303
12. Rathert P, Roth S (2008) Urinzytologie: Praxis und Atlas, 4. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York
13. Seitz M, Zaak D, Knüchel-Clarke R, Stief C (2005) Harnblasentumoren, Die neue WHO-Klassifikation 2004. *Urologe* 44:1073–1086
14. Sokolov K, Sung KB, Collier T et al (2002) Endoscopic microscopy. *Dis Markers* 18:269–291
15. Stave J, Zinser G, Grümmer G, Guthoff R (2002) Der modifizierte Heidelberg-Retina-Tomograph HRT. Initial results of in vivo presentation of corneal structures. *Ophthalmologie* 99:276–280

Neues Angriffsziel für Antibiotika

Immer mehr Bakterienstämme entwickeln Mehrfachresistenzen gegen die bisher lebensrettenden Antibiotika. Mediziner warnen, dass die Todesraten aufgrund von Infektionen schon in naher Zukunft dramatisch ansteigen könnten. Forscher der Technischen Universität München (TUM) haben nun einen Stoffwechselschritt aufgeklärt, der bei vielen aggressiven Mikroorganismen, wie dem Tuberkulose- oder Malariaerreger vorkommt und deshalb ein lohnendes Ziel für eine neue Klasse von Antibiotika werden könnte. Die lebenswichtigen Naturstoffe aus der Terpen- und Steroidklasse stellen die Zellen fast aller Organismen aus den kleinen Isoprenbausteinen Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) her. Säugetiere und eine große Zahl weiterer Organismen bauen diese über den so genannten Mevalonat-Weg auf. Fast alle pathogenen Bakterien, so auch der Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, verwenden dagegen einen Sonderweg. Die Forscher haben nun die strukturellen Grundlagen des letzten Schritts der bakteriellen Isopren-Synthese aufgeklärt. Das entscheidende Enzym verfügt über eine äußerst ungewöhnliche Struktur. Seine Röntgenkristallstruktur der geschlossenen Form, sowie die genaue Faltung der Proteinkette und die chemische Umgebung des aktiven Zentrums sind inzwischen bestimmt worden. Diese Erkenntnisse können als neue Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Antibiotika genutzt werden.

Literatur: Gräwert T, Rohdich F, Span I et al (2009) Das IspH-Protein von *Escherichia coli* - Struktur und Mechanismus. *Angew. Chem.* 121:12165–12177

Quelle: Technische Universität München (TUM), portal.mytum.de