

# Konfokal laserendomikroskopi er en lovende ny endoskopisk metode til diagnostik af kolorektal neoplasasi og inflammatorisk tarmsygdom

Marie Louise Malmstrøm<sup>1</sup>, John Gásdal Karstensen<sup>1</sup>, Adrian Săftoiu<sup>1</sup>, Lene Buhl Riis<sup>2</sup>, Ismail Gögenur<sup>1</sup> & Peter Vilmann<sup>1</sup>

## STATUSARTIKEL

1) Kirurgisk Afdeling,  
Herlev Hospital  
2) Patologisk Afdeling,  
Herlev Hospital

Ugeskr Læger  
2014;176:V05130311

Inden for de seneste år er konfokal laserendomikroskopi (CLE) blevet introduceret. Med denne teknik kan mikroskopiske strukturer i tarmens øverste lag vurderes in vivo i alle endoskopisk tilgængelige tarmafsnit under en endoskopisk undersøgelse. Teknikken er ligeledes ved at vinde indpas i andre specialer såsom urologi og pulmonologi. Anvendelsesmulighederne kommer formentlig i fremtiden til at krydse endnu flere specialegrænser. Da vores erfaringer knytter sig til neoplasier og inflammatorisk tarmsygdom (IBD) i den nedre gastrointestinalkanal, vil vi i denne artikel fokusere på kolorektal cancer, polypper og IBD. Hensigten er at beskrive CLE-teknikken, redegøre for anvendelsesmulighederne og evaluere de foreløbige resultater ift. ovenstående for en ny teknik i hastig udvikling.

## KONFOKAL LASERENDOMIKROSKOPI – TEKNIK OG KONTRASTMIDLER

### Den tekniske opbygning

CLE er en kombination af et almindeligt endoskop, en laserenhed og et konfokalt mikroskop. Ved metoden benytter man sig af blå laserlys, der med en bølglængde på 488 nm fokuseres på mucosa i et lille område og i en prædefineret dybde på 0-250 mikrometre. Via mikroskopet opfanges kun det reflekterede fokuserede lys, mens alt uden for fokus, og dermed støjskabende lys, frasorteres [1]. Resultatet bliver et forstørret billede af mucosa i høj opløsning – en »optisk« eller »virtuel« biopsi, som kan sammenlignes med et tilsvarende mikroskopisk billede (Figur 1 og

Figur 2). Billedet lagres digitalt, så det også efterfølgende kan vurderes. Ved CLE tages der multiple billeder i sekundet, og de lagres kontinuerligt, hvorved der dannes en filmsekvens, således at den mikroskopiske vurdering af vævet bliver dynamisk.

Der findes i øjeblikket to CLE-systemer på markedet: 1) Et endoskopbaseret system (Pentax EC 3870CIFK, Pentax, Tokyo, Japan), hvor det konfokale mikroskop udgør en integreret del af endoskopets spids. Med det kan man fremstille et mucosabillede med et areal på 500 × 500 mikrometer, en variabel dybde på 0-250 mikrometer og en opløsning på otte mikrometer [2]. Erfaringsmæssigt er billedkvaliteten ved dette system den bedste. 2) Et probebaseret system (Cellvizio, Mauna Kea Technologies, Paris, France), der modsat det endoskopbaserede har en fikseret dybde. De enkelte prober har en dybde, som passer til det organ, der ønskes undersøgt. Dybden kan variere mellem 55 mikrometer og 130 mikrometer afhængigt af proben. Systemet kan ved behov appliceres via endoskopets instrumentkanal under den endoskopiske procedure. Dette har udvidet indikationsområdet til også at involvere galdeveje og ductus pancreaticus [3]. Proberne har en begrænset levetid, idet de kun kan anvendes 20 gange, og de optager en af endoskopets arbejdskanaler [4].

### Kontrastmidler

I forbindelse med CLE-undersøgelsen er det nødvendigt at forstærke vævets egen autofluorescens, hvorfor man benytter sig af et fluorescerende kontraststof. I dag er kun fluorescein godkendt til systemisk brug. Fluorescein administreres intravenøst, én del bindes til albumin, og den frie del diffunderer ud i vævene inden for 10-20 sekunder, hvorefter vaskularisering og vævets arkitektur, fraset cellekerner, visualiseres [5]. Halveringstiden for fluorescein er 24 minutter, og stoffet persisterer i vævet i ca. 30 minutter [6]. Som alternativt til fluorescein eller som supplement kan man benytte acriflavin, som administreres topisk. Acriflavin bindes til DNA og RNA og farver cytoplasma og cellekerner [7].

Ud over farvning med de to ovenstående fluor-



## FAKTABOKS

Konfokal laserendomikroskopi (CLE) er en ny endoskopisk metode, der giver realtidshistologiske oplysninger – »optiske biopsier«, som er sammenlignelige med vanlige histopatologiske billeder.

Ved CLE kan biopsier målrettes mod dysplastisk udseende væv, og metoden har i flere studier af kolorektale polypper og cancer vist sig at være nyttig til at skelne neoplastisk fra nonneoplastisk væv.

CLE kan anvendes til vurdering af risikoen for tilbagefald ved inflammatorisk tarmsygdom i remission.

De sidste nye studier tyder på, at metoden også kan anvendes til monitorering af behandlingsrespons ved specielle farvninger med monoklonale antistoffer.

escerende farvestoffer benyttes der i tiltagende grad supplerende farvninger med monoklonale antistoffer, som kan f.eks. bruges i forbindelse med monitorering af behandlingsrespons ved antiangiogen terapi.

## KOLOREKTAL PATOLOGI

### Kolorektal cancer

Kolorektal cancer er, efter lungecancer, den hyppigste cancersygdom i Skandinavien. I Danmark diagnosticeres der ca. 3.100 patienter om året med kolorektal cancer [8], og der er i de senere år set en stigning i antallet af patienter med coloncancer og et fald i antallet af patienter med rectumcancer, alt i alt udgør cancer recti nu omtrent 33% [8]. Mortaliteten er relateret til høj risiko for metastasering, hvorfor tidlig diagnosticering af cancer er afgørende for prognosen [9]. Indtil videre anses koloskopi med biopsi for at være guldstandard til diagnostik. Mens den normale slimhinde i colon ved CLE vil kunne ses med jævnt fordelte regelmæssige krypter, tydelige mucinproducerende celler og intakt cylinderepitel, vil slimhinden ved coloncancer fremstå med tab af krypter og bægerceller og med generel disorganisering i vævets arkitektur. Ofte vil det makroskopisk ikke være svært at skelne avanceret cancer fra raskt væv – anderledes forholder det sig med forstadierne til kolorektal cancer, hvor det er vanskeligt alene på baggrund af endoskopien at skelne mellem nonneoplastiske og neoplastiske forandringer.

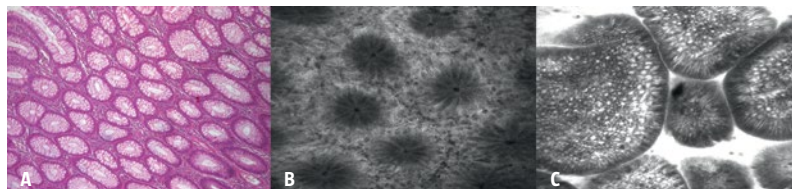
### Kolorektale polypper

Det formodes, at langt de fleste kolorektale cancere udvikles fra benigne polypper (adenomer) [8]. Små neoplastiske polypper overses nemt under den endoskopiske procedure [10]. Flere forskergrupper har inden for de seneste år undersøgt brugen af CLE ved kolorektale polypper og cancer [2, 11, 12]. De har fundet, at man ved brug af CLE kan målrette sine biopsier og derved i højere grad opdage intraepitelliale neoplasier, end det er muligt ved konventionel koloskopi med biopsi [3, 9]. I et studie har man sammenlignet histopatologi og CLE-billeder af 116 polypper hos 72 patienter – som evaluering af metodens anvendelighed til differentiering mellem neoplastiske og nonneoplastiske forandringer – og fundet en sensitivitet på 97,3% og en specificitet på 92,8% [10]. Således er man under koloskopien i stand til med stor sikkerhed at afgøre, om polyppen skal fjernes eller ej.

Der findes endnu ikke noget standardiseret system til inddeling af dysplasi graden af kolorektale polypper ved eCLE. Typisk bruges Mainz kriterierne, som i 2004 blev udviklet af *Kiesslich et al.* Her skelner man mellem neoplastiske og nonneoplastiske læsioner afhængigt af krypternes og karrenes arkitektur,

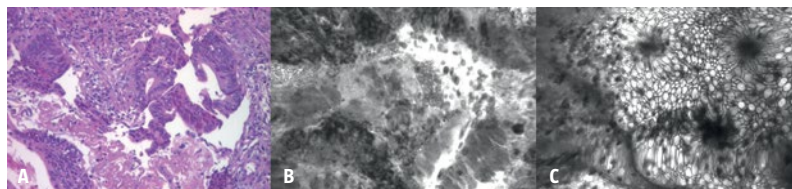
FIGUR 1

Normal colon og inflammatorisk tarmsygdom. **A.** Hæmatoxylin-eosin-farvning af normal colon. **B.** Normal konfokal laserendomikroskopi (CLE)-billede med fluorescein som intravenøst kontraststof. Der ses normal fordeling af regulære krypter, hvor cylinderepitellet er intakt, og de mucinproducerende celler fremstår tydeligt. Kapillærnetværket i lamina propria ses som en bikubeligende heksagonal struktur. **C.** CLE-billede med fluorescein som intravenøst kontraststof ved Crohns sygdom. I den terminale ileum ses der velbevaret villusstruktur, men fluoresceinlækage som udtryk for defekt barrierefunktion.



FIGUR 2

Kolorektal cancer. **A.** Hæmatoxylin-eosin-farvning. **B.** Konfokal laserendomikroskopi (CLE) med fluorescein som intravenøst kontraststof. **C.** CLE med acriflavin som lokalt administreret kontraststof, hvorved cellekernerne visualiseres. Fælles for billederne er, at de viser neoplastisk væv med ødelagte kar uden orientering i forhold til omgivende væv, tab af krypter og bægerceller samt generelt ødelagt vævsarkitektur.



ved at underinddele dem i tre kategorier: normalt, regenerativt eller dysplastisk [12] (Tabel 1). Tilsvarende findes der for pCLE-teknikken et Miami klassifikationssystem [13].

### Inflammatorisk tarmsygdom

Ved at anvende CLE i vurderingen af patienter med mb. Crohn og colitis ulcerosa kan der påvises en barrieredysfunktion i den terminale ileum, hvor der i forhold til hos raske kontrolpersoner ses længere afstand mellem de enkelte epitelceller [14]. Endvidere kan man ved CLE identificere afstødning af epitelceller og lækage af fluorescein som udtryk for defekt endotel. Hos patienter i remission udgør disse fund en selvstændig risikofaktor for tilbagefald inden for et år [15]. En anden implikation på defekt barrierefunktion er, at der ved CLE identificeres flere bakterier i mucosa hos patienter med mb. Crohn og ulcerøs colitis end hos raske kontrolpersoner [16].

### ANGIOGENESE

Da man ved CLE er i stand til også at visualisere den øverste del af submucosa, kan man også visualisere



TABEL 1

Kiesslichs klassifikationsystem til vurdering af kar- og kryptarkitektur i colon og rectum.

	Kararkitektur	Kryptarkitektur
Normalt	Heksagonalt, regulært udseende	Regulære lumenale åbninger, homogen epitelial beklædning
Regenerativt	Heksagonalt udseende med ingen eller let forøgelse af antallet af kapillærer	Stjerneformede lumenale åbninger eller fokal aggregation af regulære krypter med reduceret antal bægerceller
Neoplastisk	Dilaterede og ødelagte kar, irregulær arkitektur uden orientering i forhold til omgivende væv	Irregulær epitelial beklædning med tab af krypter og bægerceller Irregulær cellulær arkitektur med sparsom eller ingen mucin

kar og celler i dette lag ved hjælp af metoden. Angiogenese finder sted både under normale fysiologiske forhold og i forbindelse med cancer. Væv kan ikke forsynes tilstrækkeligt med O<sub>2</sub> og næringssubstanser ved simpel diffusion ud over et par mm. Tumorstofferne derfor substanser, heriblandt vaskular endotelial vækstfaktor [17], der fremmer angiogenesen. Modsat normale kapillærer er tumorinducerede, nye kar irregulære og utætte, jf. Mainzkriterierne. Intra-venøst administreret fluorescein diffunderer derfor ud af kapillærerne og fordeler sig i det omgivende væv. Netop dette fænomen kan sammen med den irregulære kapillærbygning visualiseres ved CLE [11]. Der forskes p.t. i brugen af CLE ved tumorstoffer og angiogenese blandt andet i forbindelse med monitorering af behandlingsrespons ved antiangiogen terapi [11]. En anden angiogen faktor, som er øget i forbindelse med tumorstof, er det transmembrane glykoprotein CD31. Der forskes p.t. i tråd med ovenstående i at påvise disse proteiner med anti-CD31-antistoffer farvet med fluorescens [18].

#### FORDELE OG ULEMPER

Fordele ved CLE er allerede nævnt: Meget tyder på, at patienten kan få sin diagnose under endoskopien og dermed komme hurtigt i gang med relevante tiltag, f.eks. relevant medikamentel behandling ved IBD eller umiddelbar resektion af en neoplastisk polyp. Dette vil i nogle tilfælde kunne skåne patienten for en opfølgende endoskopi og dermed reducere risikoen for komplikationer samt spare tid for endoskopien [9]. Ulemperne er, at kun små områder af mucosa visualiseres ad gangen, hvorved proceduren bliver mere tidskrævende, især hvis større områder ønskes undersøgt. Metoden fordrer også, at patienten ligger helt stille. Vurderingen af de optiske biopsier vanskeliggøres ved blødning. Slutteligt er det påkrævet, at den enkelte endoskopør skal have et vist kendskab til histopatologi.

#### STATUS INTERNATIONALT OG I DANMARK

CLE er et udviklingsområde og indgår dermed endnu ikke som standardtilbud hverken i Danmark eller andre steder i verden. Der er tiltagende interesse for metoden internationalt, hvilket blandt andet kan ses ved et stigende antal publikationer. Endoskopienheden på Herlev Hospital har som den første i Danmark indført metoden. Der pågår i øjeblikket flere studier, som blandt andet skal belyse CLE's rolle ved kolorektal cancer og hos patienter med IBD. CLE kan få en central plads i fremtidens endoskopiafsnit til at bedre diagnostik og monitorering af flere gastrointestinale sygdomme, målrette bioptering og spare tid for læger og patienter og herved danne grundlag for bedre behandlingsforløb.

**KORRESPONDANCE:** Marie Louise Malmstrøm, Kirurgisk Afdeling, Herlev Hospital, Herlev Ringvej 75, 2730 Herlev. E-mail: malmstroem@gmail.com

**ANTAGET:** 18. juli 2013

**PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK:** 14. oktober 2013

**INTERESSEKONFLIKTER:** Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

**TAKSIGELSE:** Pia Helene Klausen takkes for støtte og opbakning, og Tatiana Cartana takkes for lån af billeder.

#### LITTERATUR

- Wang TD. Confocal microscopy from the bench to the bedside. *Gastrointest Endosc* 2005;62:696-7.
- Ussui VM, Wallace MB. Confocal endomicroscopy of colorectal polyps. *Gastroenterol Res Pract* 2012;2012:545679.
- Neumann H, Kiesslich R, Wallace MB et al. Confocal laser endomicroscopy: technical advances and clinical applications. *Gastroenterology* 2010;139:388-92.
- Hoffman A, Goetz M, Vieth M et al. Confocal laser endomicroscopy: technical status and current indications. *Endoscopy* 2006;38:1275-83.
- Goetz M. Confocal laser endomicroscopy: applications in clinical and translational science – a comprehensive review. *Pathology* 2012;2012:1-13.
- Shahid MW, Crook JE, Meining A et al. Exploring the optimal fluorescein dose in probe-based confocal laser endomicroscopy for colonic imaging. *J Interv Gastroenterol* 2011;1:166-71.
- Paull PE, Hyatt BJ, Wassef W et al. Confocal laser endomicroscopy: a primer for pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:1343-8.
- Stadil F, Lund B, Nordling J et al. Kirurgisk Kompendium. København: Nyt Nordisk Forlag, 2003:886-8.
- Mascolo M, Staibano S, Ilardi G et al. Probe-based confocal laser endomicroscopy evaluation of colon preneoplastic lesions, with particular attention to the aberrant crypt foci, and comparative assessment with histological features obtained by conventional endoscopy. *Gastroenterol Res Pract* 2012;2012:645173.
- Sanduleanu S, Driessen A, Gomez-Garcia E et al. In vivo diagnosis and classification of colorectal neoplasia by chromoendoscopy-guided confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:371-8.
- Cannizzaro R, Mongiat M, Canzonieri V et al. Endomicroscopy and cancer: a new approach to the visualization of neoangiogenesis. *Gastroenterol Res Pract* 2012;2012:537170.
- Kiesslich R, Burg J, Vieth M et al. Confocal laser endoscopy for diagnosing intra-epithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 2004;127:706-13.
- Wallace M, Lauwers GY, Chen Y et al. Miami classification for probe-based confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy* 2011;43:882-91.
- Liu JJ, Wong K, Thiesen AL et al. Increased epithelial gaps in the small intestines of patients with inflammatory bowel disease: density matters. *Gastrointest Endosc* 2011;73:1174-80.
- Kiesslich R, Duckworth CA, Moussata D et al. Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. *Gut* 2012;61:1146-53.
- Moussata D, Goetz M, Gloeckner A et al. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo. *Gut* 2011;60:26-33.
- Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995;147:9-19.
- Cartana T, Saffoiu A, Gruionu LG et al. Confocal laser endomicroscopy for the morphometric evaluation of microvessels in human colorectal cancer using targeted anti-CD31 antibodies. *PLoS One* 2012;7:e52815.