

Confocal laser scanning endomicroscopy Initial experience in the Czech Republic

Marcela Kopáčová¹, Stanislav Rejchrt¹, Věra Tyčová², Ilja Tachecí¹, Aleš Ryška², Jan Bureš¹

¹2nd Department of Medicine, Charles University in Praha, Faculty of Medicine at Hradec Králové, University Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

²The Fingerland Institute of Pathology, Charles University in Praha, Faculty of Medicine at Hradec Králové, University Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

Summary

Confocal laser scanning endomicroscopy (CLSE) seems to be a key technology for obtaining endoluminal non-invasive optical biopsies. The method promises better screening and improves biopsy selection. CLSE has to be used for microscopic imag-

ing at a quality approaching that of histopathologically prepared samples. Accurate detection of premalignant lesions and early cancers is essential for curative endoscopic or surgical therapy, since the prognosis for the affected patients is closely rela-

ted to the size and stage of the neoplastic lesion.

KEY WORDS: CONFOCAL, ENDOMICROSCOPY, LASER, OPTICAL BIOPSY

Recent advances in endoscopic imaging technology have enabled visualisation of early-stage cancer and its precursors in the gastrointestinal tract. Chromoendoscopy, magnifying endoscopy, endoscopic optical coherent tomography, spectroscopy, and various combinations of these technologies, are all important for the recognition of small and unclear lesions. To observe cancer cells in vivo, an ultra-high magnifying laser-scanning confocal endoscope, that has a maximum of more than 1000-fold magnifying power has been developed. These endoscopes can generate high-quality images of both living cancer cells and normal cells in the gastrointestinal tract, with a quality comparable to that possible with conventional cytology or histology. This novel imaging technology may make in vivo histological diagnosis by virtual histology possible [7]. It can also be used to obtain high-resolution images and 3-dimensional reconstructive images from various kinds of tissue samples [1,17]. Introduction of this important method allows for study of dynamic processes in living cells [19]. The gold standard of final diagnosis, however, relies on histopatho-

logical examination of a biopsy specimen [1]. Confocal laser scanning endomicroscopy (CLSE) may be able to provide a microscopic image from an untreated tissue specimen. Initially, CLSE has been used to analyse skin, cornea, oral cavity, and the bladder [6,18].

CLSE is possible due to the integration of a confocal microscope in the distal tip of a conventional endoscope. Pentax joined Optiscan Imaging Ltd., an Australian company (Melbourne) to develop a confocal endoscopy system that allows generation of in vivo histology images during conventional endoscopy. To gain this, a confocal microscope was miniaturised to a size that made it possible for it to be integrated in the distal end of a common high-resolution video endoscope. It enables confocal microscopy on a second monitor in addition and simultaneously to standard video endoscopy [10]. CLSE enables subsurface analysis of the gastrointestinal mucosa and in vivo histology during ongoing endoscopy in full resolution by point scanning laser fluorescence analysis. Cellular, vascular and connective tissue structures

can be seen in detail. The new and detailed images seen with confocal laser endomicroscopy are unequivocally the beginning of a new era where this optical development will allow a unique look at cellular structures and functions at and below the surface of the gut [5,11].

PRINCIPLE OF THE METHOD

The principle of CLSE is not new: Marvin Minsky had it patented as early as in 1957. During CLSE a laser light source delivers blue excitation light at a wavelength of 488 nm. Fluorescence substances in the tissue absorb this light and emit green-yellowish light at a longer wavelength 510–580 nm by themselves. Only fluorescence light coming from a specific focal plane is detected afterwards by the endomicroscopy system. Light from outside the focal plane is rejected. This results in high-resolution images providing an excellent image quality for visualisation of the tiniest details.

Digital images of cells magnified 1000-fold appear in real time on a computer screen, which enables immediate detection of changes in cellular structure without the need for

Konfokální laserová endomikroskopie První zkušenosti v České republice

Marcela Kopáčová¹, Stanislav Rejchrt¹, Věra Tyčová², Ilja Tachecí¹, Aleš Ryška², Jan Bureš¹

¹2. interní klinika LF UK a FN Hradec Králové

²Fingerlandův ústav patologie, LF UK a FN Hradec Králové

Souhrn

Konfokální laserová endomikroskopie (KLE) se zdá být klíčovou technologií pro získání endoluminálních neinvazivních optických biopsií. Metoda je příslušným pro lepší vyhledávání a zlepšení výběru míst pro odběr biopsií. KLE by měla

dosahovat mikroskopického zobrazení, blízkého se histologickému. Přesné zjištění premaligních lézí a časného karcinomu jsou zásadně důležité pro endoskopickou nebo chirurgickou terapii, protože prognóza postižených pacientů úzce

souvisí s velikostí a stadiem neoplastické léze.

KLÍČOVÁ SLOVA: KONFOKÁLNÍ LASEROVÁ ENDOMIKROSKOPIE, OPTICKÁ BIOPSIE

Současný vývoj endoskopických zobrazovacích metod umožňuje zobrazení časných neoplázií trávicí trubice a jejich vývojových předstupňů. Chromoendoskopie, zvětšovací endoskopie, endoskopická optická koherentní tomografie, spektroskopie a nejrůznější kombinace těchto technik dovolují rozlišení malých a nejasných lézí na sliznici. K tomu, abychom mohli pozorovat rakovinné buňky in vivo slouží konfokální laserová endomikroskopie (KLE). Tato metoda nám dovoluje využívat 1000násobného zvětšení pozorované tkáně. Zařízení je schopno generovat velmi kvalitní obrázky buněk normální i patologicky změněné sliznice trávicího traktu; kvalita zobrazení je srovnatelná s obrazy z klasické cytologie či histologie. Tato nová zobrazovací metoda tedy přináší možnost stanovení histologické diagnózy in vivo [7]. Může být současně využita i k získání 3rozměrných zobrazení pomocí rekonstrukce z konfokálních obrazů z jednotlivých vrstev různých tkání [1,17]. Zavedení KLE do praxe dovoluje zkoumání dynamických procesů v žijících buňkách [19]. Přesto však zlatým standardem pro stano-

vení konečné diagnózy zůstává histopatologické vyšetření bioptického vzorku tkáně [1]. KLE naopak přináší možnost mikroskopického vyšetření nezpracovaného nativního vzorku. KLE byla doposud v humánní medicíně používána k vyšetření kůže, rohovky, dutiny ústní a močového měchýře [6,18].

Možnost využití KLE v endoskopii přineslo začlenění konfokálního endoskopu do distálního konce konvenčního endoskopu. Společnost Pentax se spojila se společností Optiscan Imaging Ltd. (Austrálie, Melbourne) a společně vyvinuli endoskopický konfokální systém, který spojuje možnost snímání konfokálních zobrazení, tedy histologie in vivo, s klasickým endoskopickým vyšetřením. Konfokální mikroskop musel být natolik miniaturizován, aby jej bylo možno začlenit do distálního konce videoendoskopu s vysokým rozlišením. Tato kombinace je optimální, protože současně můžeme sledovat endoskopický obraz na monitoru a snímat a pozorovat obraz z KLE na jiné obrazovce [10]. KLE využívá bodového laseru jako zdroje světla. Laser je fokusován na clonku, která je objek-

tivem mikroskopu zobrazena na vzorek. Tentýž objektiv pak snímá fluorescenci vzorku, kterou dále zpracovává pro získání obrazů. Při běžném endoskopickém vyšetření se tedy zobrazují detaily buněčných struktur, cévy a pojivová tkáň. KLE nyní umožňuje zcela nové mikroskopické zobrazení, které je nepochybně počátkem nové epochy rozvoje zobrazovacích metod. Přináší unikátní pohledy na buněčné struktury a buněčné funkce na povrchu i pod povrchem střevní sliznice [5,11].

PRINCIP METODY

Myšlenka konfokálního zobrazení není nová: Marvin Minsky patentoval metodu KLE již v roce 1957. V průběhu vyšetření vysílá laserový zdroj endoskopu modré světlo o vlnové délce 488 nm. Fluoreskující látky ve tkáni toto světlo absorbují a odrážejí zpět žluto-zelené světlo o delší vlnové délce 510–580 nm. Endomikroskopický systém zpracovává pouze toto fluorescenční světlo a vytváří obraz s vysokým rozlišením. Světlo mimo roviny zobrazení je eliminováno. Výsledkem jsou obrazy s vysokým rozlišením v takové kvalitě,

a biopsy [7,8,14]. Due to this magnification the endoscopic images enable recognition of structures down to the size of cell nuclei. Compared to conventional zoom scopes, which provide a magnification of only 100-fold, CLSE protrudes in totally new dimensions. The strength of CLSE is not only the high magnification of tissue structures but also the possibility to acquire images. CLSE images show a horizontal view of approximately the upper 2/3 of the mucosa (250 μm). The optical slice thickness is 7 μm , with a lateral resolution of 0.7 μm . Confocal

image data are collected at a scan rate of 0.8 frames per second (1024 \times 1024 pixels) or 1.6 frames per second (1024 \times 512 pixels). The field of vision is 500 \times 500 μm , and the range of the z-axis is 0 – 250 μm below the surface layer [10].

There are some problems with the in-vivo application of the CLSE. Firstly the tip of the endomicroscope has to be placed vertically against the target point on the mucosa during the examination. However, it may be difficult to scan vertically against the mucosa in some parts of the gastrointestinal

tract. Secondly, any movement in the digestive tract during an examination makes CLSE difficult [18].

Fluorescence CLSE can take advantage of dyes that stain specific cellular structures, so that it is closer to traditional histopathological imaging. The use of endoluminal fluorescence CLSE has been problematic as successfully tested dyes such as Syto 17 or acridine orange, are potentially mutagenic. Potentially suitable agents are fluorescein, acriflavine, tetracycline, or cresyl violet [5]. Some studies present the potential use of 2% cresyl

Fig. 1.

Normal colonic mucosa (a surface slice). Regular luminal openings (asterisk) and distribution of crypts covered by a homogenous layer of epithelial cells, including goblet cells (arrow).

Obr. 1.

Normální sliznice tračníku (povrchový řez). Pravidelná ústí lumen žlázek (hvězdička) a uspořádání krypt, na povrchu homogenní vrstva epitelálních buněk s četnými pohárkovými buňkami (šipka).

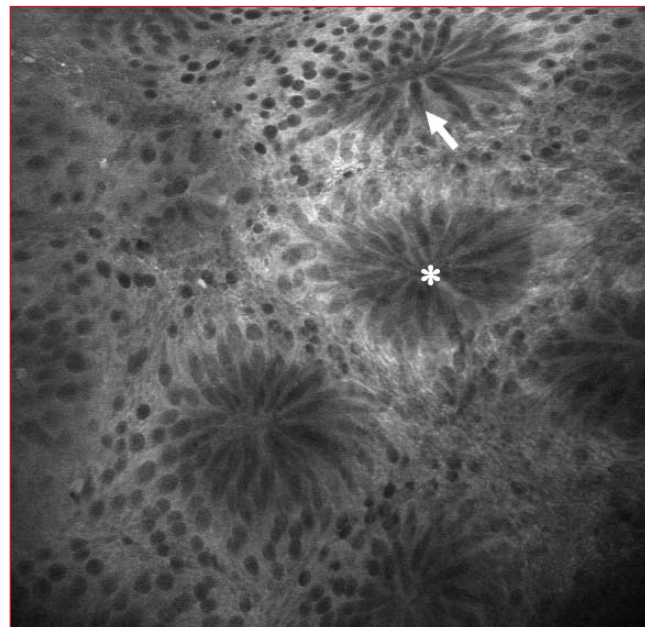
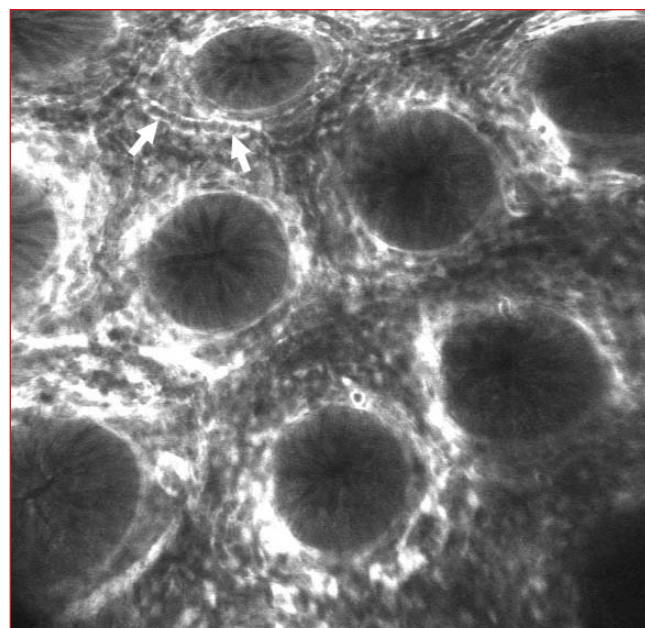


Fig. 2.

Normal colonic mucosa (a deeper slice). Hexagonal, honeycomb appearance that presents a network of capillaries (arrows) outlining the stroma surrounding the luminal openings of the crypts.

Obr. 2.

Normální sliznice tračníku (hlubší řez). Hexagonální vzhled uspořádání krypt typu medové plástve, které je tvořeno sítí kapilár (šipky) obklopující lumen jednotlivých krypt.



kteřá dovoluje vizualizovat nejdrobnější struktury.

Digitální zobrazení buněk o 1000násobném zvětšení můžeme pozorovat v reálném čase na obrazovce a můžeme tedy okamžitě odlišit změny v celulární struktuře, aniž bychom museli vyčkávat výsledku histologie [6,8,14]. Zvětšení tkáně, jakého dosahuje KLE, je dostatečné k rozlišení takových buněčných struktur, jakými jsou například jádra buněk. Ve srovnání s konvenčními zvětšovacími endoskopy, které dosahují 100násobného zvětšení tkáně,

otevřít KLE zcela nové prostory. Přínos metody nespočívá jen ve vizualizaci mikroskopických struktur sliznice, ale i v možnosti snímat a uchovávat jednotlivé obrazy. Ty jsou snímány směrem od povrchu sliznice v horizontálních řezech až do hloubky přibližně 2/3 sliznice (250 μm). Vzdálenost jednotlivých optických řezů je 7 μm s laterálním rozlišením 0,7 μm . Obrazová data jsou snímána s frekvencí 0,8 obrázků za sekundu (při rozlišení 1024 \times 1024 pixelů) nebo 1,6 obrázků za sekundu (1024 \times 512 pixelů). Zorné pole má velikost

500 \times 500 μm , rozsah možné hloubky vyšetření tkáně je 250 μm pod povrch sliznice [10].

Při vyšetření metodou KLE se mohou vyskytnout některé těžkosti. V první řadě konec endoskopu musí být umístěn přísně vertikálně proti sledovanému okrsku sliznice. V některých částech trávicího traktu je obtížné takovéto polohy dosáhnout. Druhým častým problémem bývá pohyb, který způsobuje rušivé artefakty v konfokálním zobrazení. Peristaltika a přenesené pulzace mohou vyšetření komplikovat [18].

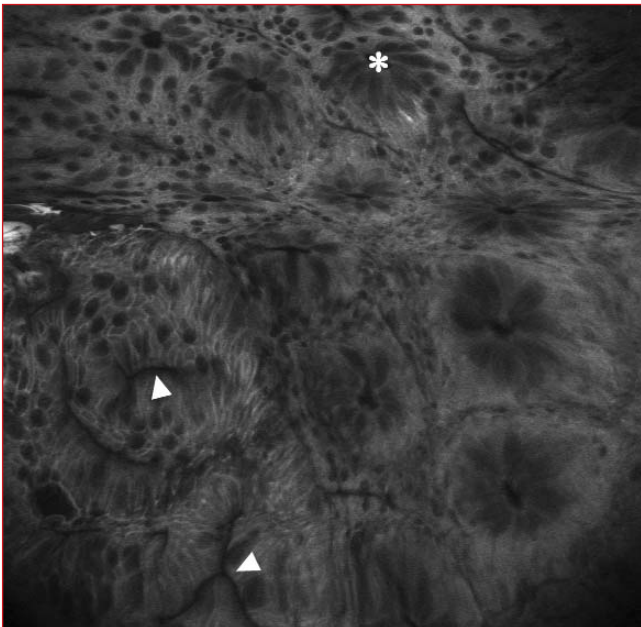


Fig. 3.

Hyperplastic polyp. Star-shaped luminal crypt openings (arrowheads) with a regular or reduced amount of goblet cells; the boundary between normal (asterisk) and hyperplastic mucosa.

Obr. 3.

Hyperplastický polyp. Hvězdicovitá ústí lumen žlázek nepravidelného tvaru (hroty) s normálním či redukováným množstvím pohárkových buněk, rozhraní s normální sliznicí (hvězdička).

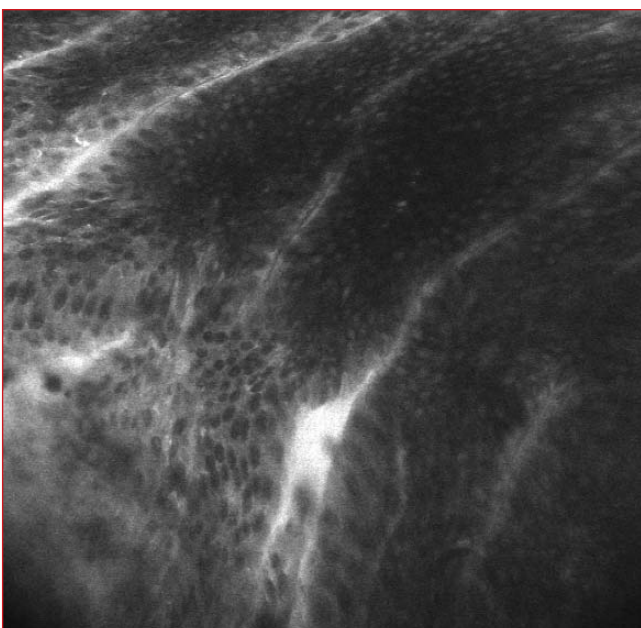


Fig. 4.

Colonic villous adenoma (a surface slice). Frondlike villiform extensions of the mucosa covered by columnar epithelium.

Obr. 4.

Vilózní adenom tračniku (povrchový řez). Vilózní uspořádání sliznice s vrstvou cylindrického epitelu na povrchu.

violet as a staining agent for endoluminal CLSE. It allows identification and differentiation of nuclei, membranes, and cytoplasm in various tissue layers in the digestive tract. Cresyl violet is frequently applied in chromoendoscopy for pit-pattern classification [3,15,16].

For safety reasons only a limited range of fluorescent dyes have been registered for clinical use in patients so far [4]. For the currently running clinical studies, 2 different fluorescent agents are used: fluorescein sodium 5-10 mL of a 10% solution for intra-

venous application and acriflavine hydrochloride 0.05% in saline for topical use only.

With regards to fluorescein, no immediate toxicity was observed after topical or systemic application. Fluorescein sodium that has been safely used in ophthalmology for decades gives a good overall impression of the mucosa after partly leaking from circulation into the tissue. It renders many subcellular details such as mucin in colonic goblet cells. A sufficient contrast is also observed in vessels where fluorescein is partly retained because

of its plasma protein binding. Due to its pharmacological properties, fluorescein does not stain nuclei [4,5]. Fluorescein is administered intravenously usually at a dose of 5 mL. Within 30 seconds an endoscopic image can be obtained due to very rapid distribution of the substance in the human body. The effect remains for approximately 1 hour. A side effect is yellowish coloration of the skin and urine of the patient. The skin coloration appears within a few minutes and lasts up to 12 hours. The colour of the urine becomes normal within 36 hours.

Fig. 5.
Colonic villous adenoma (a deeper slice). Dilated and distorted vessels with increased leakage (arrow); villous arrangement of the mucosa.

Obr. 5.
Vilózní adenom tračníku (hlubší řez). Rozšířené a pokroucené cévy se zvýšeným prosakováním (šipka), vilózní uspořádání sliznice.

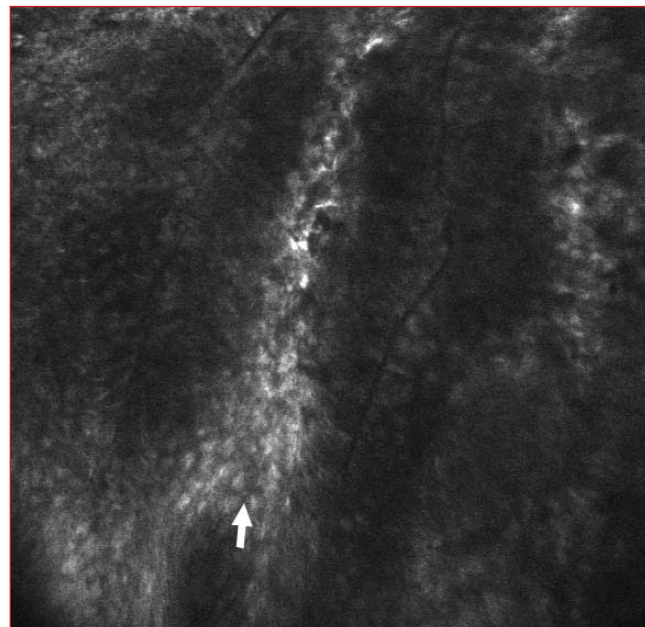
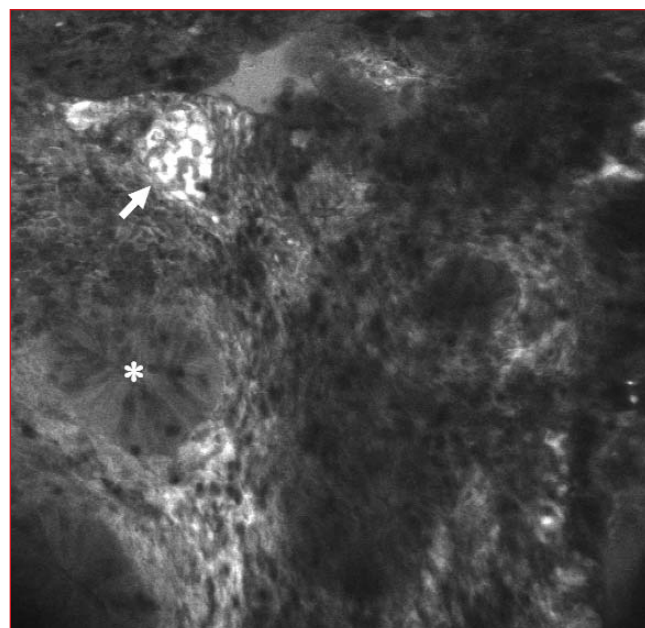


Fig. 6.
Colonic carcinoma. The boundary between normal (asterisk) and tumorous mucosa. Increased leakage (arrow).

Obr. 6.
Karcinom tračníku. Rozhraní mezi normální (hvězdička) a nádorovou sliznicí. Zvýšené prosakování (šipka).



Využití fluorescenčních barviv, která odlišují různé buněčné struktury, přibližuje KLE tradičnímu histopatologickému zobrazení, ačkoli obraz zůstává černobílý. Využití endoluminální fluorescence je však komplikováno spektrem barviv, které lze v humánní medicíně využít. Některá z barviv, jako Syto 17 či akridinová oranž, jsou diskriminována pro svou potenciální mutagenitu. Jako potenciální fluorescenční barviva se jeví fluorescein, akriflavin, tetracyklin a kresylová violeť [5]. Některé studie využívaly kresylovou violeť ve 2% koncentraci

k endoluminální fluorescenci. Pomocí tohoto barviva se zvýrazňují jádra, membrány a cytoplasma buněk ve sliznici trávicího traktu. Kresylová violeť má výhodu současného využití v chromoendoskopii ke zhodnocení pit-pattern, umožňuje tedy syntézu obou metod [3,15,16].

Z bezpečnostních důvodů je však dosud pro klinické využití registrována jen nepatrná část fluorescenčních barviv [4]. V současných klinických studiích je možno v literatuře nalézt pouze 2 různá fluorescenční barviva: natrium fluorescein 10% roztok, který

aplikujeme nitrožilně v dávce 5–10 ml pro 1 vyšetření, a akriflavin hydrochlorid 0,05% roztok ve fyziologickém roztoku pro topickou aplikaci na sliznici.

Po podání fluoresceinu, ať již lokálním či systémovým, nebyla dosud podle literatury zaznamenána toxická reakce. Fluorescein je již po desetiletí bezpečně využíván v očním lékařství k zobrazení sítnice. Po jeho intravenózním podání dochází k průniku do tkání a velmi dobrému zobrazení sliznice trávicí trubice se zvýrazněním hlenu a pohárkových buněk. Díky

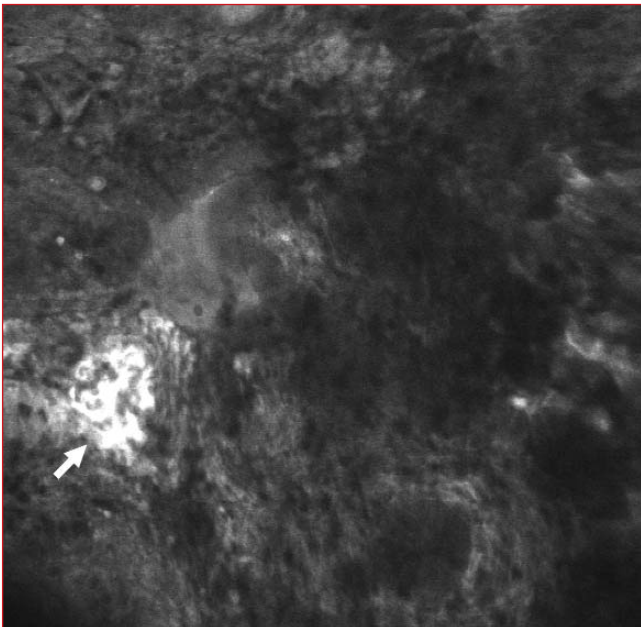


Fig. 7. Colonic carcinoma. Dilated and distorted vessels with increased leakage (arrow); irregular architecture, with no orientation to the adjoining normal tissue. This view continues the preceding one (Fig. 6).

Obr. 7. Karcinom tračníku. Rozšířené a pokroucené cévy se zvýšeným prosakováním (šipka), nepravidelná architektura korespondující málo nebo vůbec s přilehlou normální tkání. Zorné pole navazuje na předchozí (obr. 6).

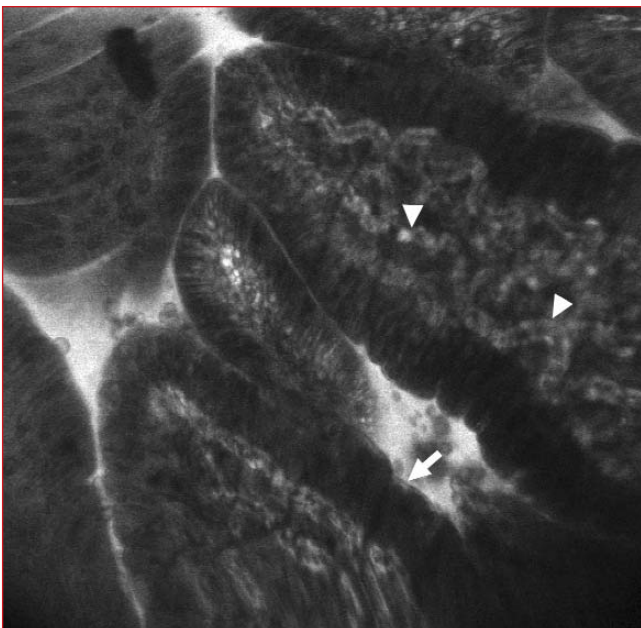


Fig. 8. Small intestine. Villi in the small intestinal mucosa appear as club-shaped protrusions with typical vasculature in the lamina propria - tortuous vessels with erythrocytes are nicely seen (arrowheads), single goblet cells can be identified as well as a thin layer of brush border (arrow) at the top of enterocytes.

Obr. 8. Tenké střevo. Zobrazeny klky jako kyjovité výběžky s typickou vaskularizací lamina propria - velmi dobře jsou patrné vinuté cévy s erytrocyty v lumen (hroty), jednotlivé pohárkové buňky a tenký lem kartáčového lemu na povrchu enterocytů (šipka).

With regards to the second fluorescent agent acriflavine, this is applied topically on the surface of the mucosa via a spray catheter, which is introduced through the working channel of the scope. As a result of the topical application acriflavine is immediately active, but stays mainly on the mucosal surface and is not distributed to the deeper tissue layers. Acriflavine interacts with nucleic acids in the cell nucleus, so it mainly stains the nuclei of the cells including bacteria (*Helicobacter pylori*), but it also stains the cytoplasm to a sufficient

extent to permit tissue characterization [4].

The diagnostic spectrum of CLSE is currently expanding from screening and surveillance for colorectal cancer towards Barrett's oesophagus, *Helicobacter pylori* associated gastritis and early gastric cancer. The new detailed images seen with confocal laser endomicroscopy are unequivocally the beginning of a new era where this optical development will allow a unique look at cellular structures and functions at and below the surface of the gut [2,9,12].

Barrett's oesophagus is known to be a premalignant condition in patients with gastro-oesophageal reflux disease, and most adenocarcinomas of the distal oesophagus have been shown to arise in Barrett's tissue. Barrett's oesophagus is defined histologically by the presence of specialised columnar epithelium with goblet cells (colonic type intestinal metaplasia). The columnar-lined lower oesophagus can be identified during standard gastroscopy. Four-quadrant step biopsies within columnar-lined lower oesophagus are considered as

Fig. 9.

Small intestine. Vasculature in the lamina propria, layer of enterocytes with goblet cells on the surface of villi.

Obr. 9.

Tenké střevo. Vaskularizace lamina propria, zona enterocytů s pohárkovými buňkami na povrchu klků.

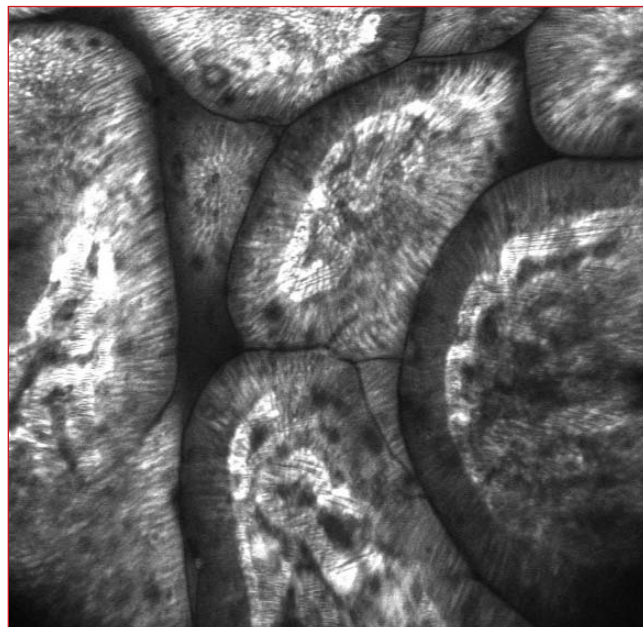
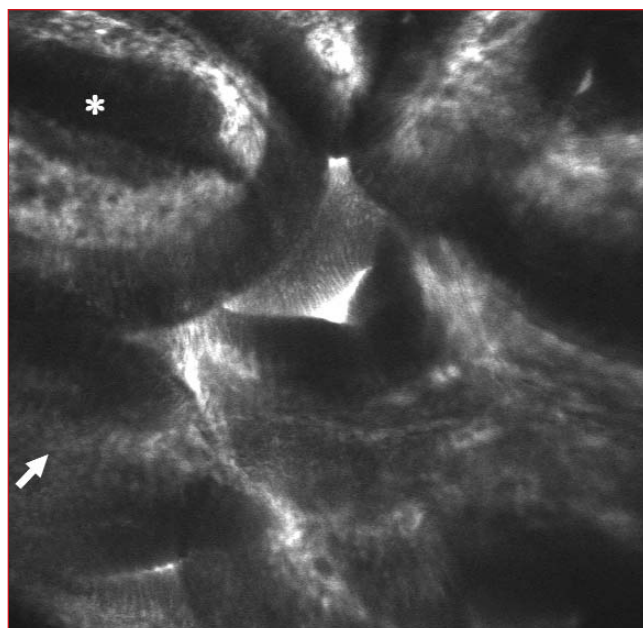


Fig. 10.

Stomach. Typical oblong crypts (asterisk) with cobblestone appearance of the surface cells (arrow).

Obr. 10.

Žaludek. Typické protáhlé krypty (hvězdička) s dlaždicovitou strukturou povrchových epitelů (šipka).



vazbě fluoresceinu na plasmatické bílkoviny zůstává také v cévách dostatečné množství kontrastu. Farmakokinetika fluoresceinu však neumožňuje zbarvení jader [4, 5]. Fluorescein aplikujeme intravenózně obvykle v dávce 5 ml. Endomikroskopické obrazy můžeme začít snímat přibližně půl minuty po aplikaci, fluorescence je dostatečná obvykle ještě hodinu po podání fluoresceinu. Nezávažným vedlejším efektem je žluté zbarvení sliznic a kůže, které se objeví během několika minut a odeznívá do 12 hod po aplikaci, a žlutooranžové zbarvení moči, které může přetrvávat až 36 hod.

Druhým fluorescenčním barvivem je akriřavin, který aplikujeme topicky na povrch sliznice sprayovým katectrem zavedeným pracovním kanálem endoskopu. Po nástřiku sliznice

můžeme snímat konfokální obrazy ihned, protože akriřavin barví pouze povrch sliznice a neproniká do hlubších vrstev. Zvýrazňuje nukleové kyseliny, tedy zejména buněčná jádra včetně jader bakterií na povrchu sliznice (*Helicobacter pylori*), ale i zbarvení cytoplasmy je dostatečné pro pozorování konfokálním mikroskopem [4].

Nejdůležitějšími oblastmi pro využití KLE v gastroenterologii se nyní jeví screening a dispenzarizace kolorektálního karcinomu, Barrettův jícen, *Helicobacter pylori* pozitivní gastritida a časný karcinom žaludku. Nová progresivní metoda vyšetření konfokálním mikroskopem je nepochybně počátkem nové éry, ve které rozvoj optického zobrazení přinese pohled na buněčné struktury nejen na povrchu, ale i pod povrchem

trávicí trubice [2,9,12]. Barrettův jícen považujeme za prekancerózu u nemocných s gastroesofageální refluxní chorobou, většina adenokarcinomů distálního jícnu pochází právě z Barrettovy sliznice. Barrettův jícen je definován histologicky přítomností specializovaného cylindrického epitelu s pohárkovými buňkami (intestinální metaplasie kolonického typu). Cylindrický epitel v distálním jícnu snadno identifikujeme v průběhu klasické endoskopie. Čtyřkvadrantová biopsie odebraná z úseku cylindrického epitelu v jícnu je považována za zlatý standard pro diagnózu Barrettova jícnu a/nebo případné časně neoplázie v Barrettově jícnu. V průběhu KLE můžeme v cylindrickém epitelu distálního jícnu identifikovat pohárkové buňky mikroskopicky (tab. 1) [5].

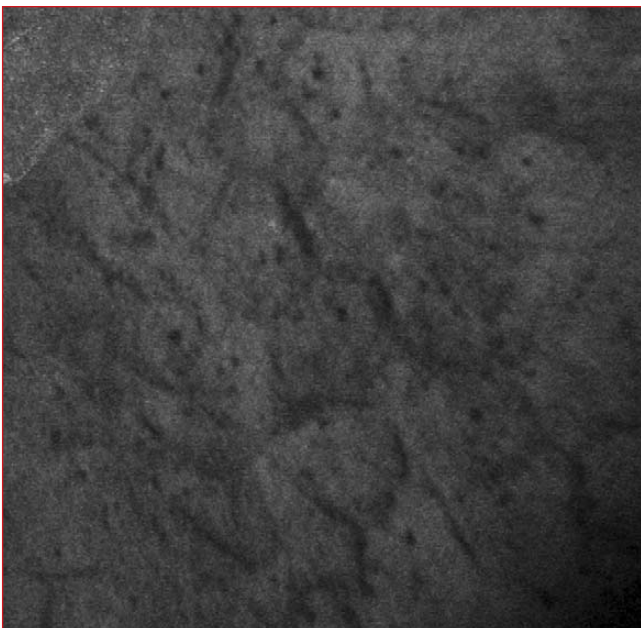


Fig. 11.

Oesophagus. Non-keratinised squamous epithelium at the surface layer of oesophagus.

Obr. 11.

Jícen. Polygonální epiteliální buňky nerohovějícího dlaždicového epitelu.

Table 1. Confocal laser endomicroscopy classification of Barrett's oesophagus [5].

confocal diagnosis	vessel architecture	crypt architecture
gastric-type epithelium	capillaries with a regular shape only visible in the deeper parts of the mucosal layer	regular columnar-lined epithelium with round glandular openings and typical cobble-stone appearance
Barrett's epithelium	subepithelial capillaries with a regular shape underneath columnar-lined epithelium visible in the upper and deeper parts of the mucosal layer	columnar-lined epithelium with intermittent dark mucin in goblet cells in the upper parts of the mucosa, villous, dark, regular cylindrical Barrett's epithelial cells are present in the deeper parts
neoplasia	irregular capillaries visible in the upper and deeper parts of the mucosa, leakage of vessels leads to a heterogeneous and brighter signal intensity within the lamina propria	black cells with irregular apical and distal borders and shapes, with strong dark contrast against the surrounding tissue

Table 2. Confocal laser endomicroscopy classification of patterns in colorectal lesions [5].

grading	vessel architecture	crypt architecture
normal	hexagonal, honeycomb appearance that presents a network of capillaries outlining the stroma surrounding the luminal openings of the crypts	regular luminal openings and distribution of crypts covered by a homogenous layer of epithelial cells, including goblet cells
regeneration	hexagonal, honeycomb appearance with no increase or only a slight increase in the number of capillaries	star-shaped luminal crypt openings or focal aggregation of regular-shaped crypts with a regular or reduced amount of goblet cells
neoplasia	dilated and distorted vessels with increased leakage; irregular architecture, with little or no orientation to the adjoining tissue	ridge-lined irregular epithelial layer with loss of crypts and goblet cells; irregular cell architecture, with little or no mucin

a gold standard for diagnosing Barrett's epithelium and Barrett's-associated neoplastic changes. CLSE makes it possible to identify columnar-lined lower oesophagus macroscopically and identify goblet cells microscopically in the distal oesophagus (see Tab. 1) [5].

There have been several innovations in the endoscopic diagnosis of gastrointestinal neoplastic lesions in recent years. In addition to conventional endoscopy, chromoendoscopy and magnifying endoscopy are now used. Magnifying endoscopy has become established as a clinically useful tool, especially for diagnosing early colorectal lesions. Magnifying colonoscopy allows visualisation of the orifices of the colonic glands (pits). This pit-pattern diagnosis makes it possible to predict the histological diagnosis before obtaining a tissue sample. The ideal would be a method capable of provid-

ing immediate histological images during endoscopy [13,18]. Thanks to CLSE we are closer to this goal.

OWN INITIAL EXPERIENCE

We started with CLSE on January 2007 and our experience so far has been limited. The endoscope is rather more complicated and sophisticated than standard ones, so it is more exacting to handle, especially for nurses (preparation, calibration of the laser, cleansing and disinfection). Initial on-the-job training is fundamental.

It is very difficult to eliminate any movement in the gastrointestinal tract. The rectum is the easiest examination site for the CLSE from this point of view. It may be more difficult to apply the system in other parts of the gastrointestinal tract that are affected by respiratory or cardiac movements. Being aware of this fact, we started with investigation of the colon and rec-

tum and did not investigate other parts of the gastrointestinal tract until we had gained some experience. The oesophagus is the most difficult for CLSE in our opinion. Not only due to the above-mentioned movements but also because vertical access to the mucosa might be uneasy.

In our opinion the presence of an experienced gastrointestinal pathologist in the endoscopy room during CLSE is essential, particularly during the course of initial investigations. Moreover it is necessary to subsequently compare the CLSE results with conventional histology. Chromoendoscopy in conjunction with the use of CLSE can further improve detailed visualisation and analysis of lesions.

In the colon, mucin-containing goblet cells and columnar epithelial cells can be easily identified (see Figs 1, 2). The luminal openings of the crypts appear as black holes, crypts are

Tab. 1. KLE klasifikace Barrettova jícnu [5].

konfokální diagnóza	architektonika cév	architektonika krypt
epitel žaludečního typu	kapiláry pravidelného tvaru viditelné pouze v hlubších vrstvách sliznice	pravidelný cylindrický epitel s okrouhlými ústími krypt a typickým dlaždicovým charakterem na povrchu
epitel Barrettova typu	podpovrchové kapiláry pravidelného tvaru pod cylindrickým epitelem viditelné	cylindrický epitel s vmezeřenými tmavými pohárkovými buňkami v horní části sliznice, v hlubších partiích patrný v horních i hlubších slizničních vrstvách buňky Barrettova epitelu – tmavé pravidelné cylindrické buňky s kartáčovým lemem
neoplázie	nepravidelné kapiláry v povrchových i hlubších vrstvách sliznice, prosakování cév s následným heterogenním a světlejším zbarvením lamina propria	tmavé buňky s nepravidelným apikálním a distálním ohraničením a nepravidelným tvarem, tmavě kontrastují s okolní tkání

Tab. 2. KLE klasifikace kolorektálních slizničních lézí [5].

stupeň	architektonika cév	architektonika krypt
normální tkáň	hexagonální vzhled uspořádání krypt typu medové plástve, které je tvořeno sítí kapilár obklopující lumen jednotlivých krypt	pravidelná ústí lumen žlázek a uspořádání krypt, na povrchu homogenní vrstva epiteliálních buněk s četnými pohárkovými buňkami
regenerace	hexagonální vzhled uspořádání krypt typu medové plástve s normálním množstvím kapilár nebo jen s jejich mírným zmnožením	hvězdicovitá ústí lumen žlázek nebo ložiskové nahromadění krypt nepravidelného tvaru s normálním či redukováným množstvím pohárkových buněk
neoplázie	rozšířené a pokroucené cévy se zvýšeným prosakováním, nepravidelná architektonika korespondující málo nebo vůbec s přilehlou normální tkání	ostře ohraničená vrstva nepravidelných epiteliálních buněk se ztrátou architektoniky krypt, bez pohárkových buněk a hlenu (nebo s jeho redukováným množstvím)

V posledních letech získala endoskopie několik nových metod, které usnadňují diagnostiku časných neoplázií trávicího traktu. Konvenční endoskopie byla obohacena o metodu chromoendoskopie a zvětšovací endoskopie. Zvětšovací endoskopie se rychle začlenila do běžné praxe a je využívána zejména k časně diagnostice kolorektálního karcinomu. Při 100násobném zvětšení jsou dobře patrná ústí kolonických žlázek (pits). Hodnocení vzhledu žlázek (pit-pattern) slouží k odhadu histologické diagnózy a cílenému odběru vzorků tkáně. Ideální by byla metoda, která by přinesla histologické zobrazení již v průběhu konvenční endoskopie [13,18]. Díky KLE jsme se již tomuto cíli přiblížili.

PRVNÍ VLASTNÍ ZKUŠENOSTI

Na našem pracovišti jsme zavedli metodu KLE v lednu 2007 a naše

zkušenosti jsou tedy dosud omezené. Vlastní přístroj pro KLE je oproti klasickému endoskopu poněkud komplikovanější. Klade větší nároky zejména na sesterskou péči (příprava endoskopu, kalibrace laseru, očista a dezinfekce přístroje). Metodu nelze zavést bez počátečního zaškolení na pracovišti.

Eliminovat pohyby v trávicím traktu je velmi složité. Z tohoto důvodu je nejnepohodlnější oblastí k provádění KLE rektum. Naopak v ostatních částech trávicí trubice je vyšetření podstatně komplikovanější vzhledem k pohybům bránice při respiraci a přeneseným pulzacím srdce a velkých tepen. Z tohoto důvodu jsme nejprve prováděli vyšetření tračnicku, zpočátku v oblasti rekta, a k vyšetření ostatních částí trávicí trubice jsme přešli teprve po získání určitých zkušeností. Podle našeho názoru je nejobtížnější částí k vyšetření metodou KLE oblast jícnu,

a to ze dvou důvodů. Prvním jsou zmíněné pohyby (peristaltika a přenesené pulzace) a druhým je obtížné získání kolmému přístupu ke sliznici.

Přítomnost zkušeného patologa, který se zabývá patologií trávicího traktu, považujeme při KLE za esenciální, zejména při počátečních vyšetřeních. Pro získání zkušeností je rovněž nezbytné odebrat vzorky na klasickou histologii a porovnat následně výsledky obou vyšetření. Kombinace chromoendoskopie a KLE se nám osvědčila, přináší snadnější identifikaci lézí, které potom vyšetříme konfokálním mikroskopem.

Při vyšetření tračnicku jsou dobře patrné pohárkové buňky obsahující hlen a cylindrický epitel (obr. 1, 2). Luminální ústí krypt se jeví jako černé body obkroužené cylindrickým epitelem. V hlubších partiích vidíme lamina propria obsahující četné cévy s erytrocyty obarvenými fluorescei-

covered with a layer of epithelial cells. In deeper parts, vascular structures of lamina propria with erythrocytes labelled using fluorescein are nicely seen. Crypts with their vasculature show a typical regular honeycomb appearance.

Intraepithelial neoplasias and colon cancers showed a tubular, villous or irregular architecture, with a reduced number of goblet cells. Neovascularisation in neoplasms is characterised by an irregular vessel architecture with fluorescein leakage (see Tab. 2, Figs 3-7).

Villi in the small intestinal mucosa appear as club-shaped protrusions

with typical vasculature in the lamina propria - tortuous vessels with erythrocytes are nicely seen (see Figs 8, 9), single goblet cells can be identified as well as thin layer of brush border at the top of enterocytes.

Typical oblong crypts can be observed in the stomach with typical cobblestone appearance of the surface cells (see Fig. 10). Polygonal epithelial cells of nonkeratinised squamous epithelium are seen at the surface layer of the oesophagus (see Fig. 11). Deeper microvasculature loops within the papillae of lamina propria can be observed.

CONCLUSION

Confocal laser scanning endomicroscopy is an old technique that has recently been introduced into live endoscopy. It provides immediate images that correspond well with those of haematoxylin-eosin staining. Close cooperation between the endoscopist and pathologist concerned with gastrointestinal pathology is indispensable.

Acknowledgements

The study was supported by research project MZO 00179906 from the Ministry of Health, Czech Republic.

References

1. Chiu PWY, Inoue H, Satodate H et al. Validation of the quality of histological images obtained of fresh and formalin-fixed specimens of esophageal and gastric mucosa by laser-scanning confocal microscopy. *Endoscopy* 2006; 38: 236-240.
2. Dekker E, Fockens P. Advances in colonic imaging: new endoscopic imaging methods. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 803-808.
3. George M, Meining A. Cresyl violet as a Fluorophore in confocal laser scanning microscopy for future in-vivo histopathology. *Endoscopy* 2003; 35: 585-589.
4. Goetz M, Memadathil B, Biesterfeld S et al. In vivo subsurface morphological and functional cellular and sub-cellular imaging of the gastrointestinal tract with confocal mini-microscopy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2160-2165.
5. Hoffman A, Goetz M, Vieth M et al. Confocal laser endomicroscopy: technical status and current indications. *Endoscopy* 2006; 38: 1275-1283.
6. Inoue H, Kudo S, Shiokawa A. Novel endoscopic imaging techniques toward in vivo observation of living cancer cells in the gastrointestinal tract. *Dig Dis* 2004; 22: 334-337.
7. Inoue H, Kudo S, Shiokawa A. Technology insight: Laser scanning confocal microscopy and endocytoscopy for cellular observation of the gastrointestinal tract. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 31-37.
8. Kakeji Y, Yamaguchi S, Yoshida D et al. Development and assessment of morphologic criteria for diagnosing gastric cancer using confocal endomicroscopy: an ex vivo and in vivo study. *Endoscopy* 2006; 38: 886-890.
9. Kiesslich R, Goetz M, Burg J et al. Diagnosing *Helicobacter pylori* in vivo by confocal laser endoscopy. *Gastroenterology* 2005; 128: 2119-2123.
10. Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K et al. Chromoscopy-guided

nem. Krypty jsou uspořádány typicky pravidelně do obrazu buněk medové pláště.

Intraepiteliální neoplázie a karcinom tračníku mají odlišnou tubulární, vilózní nebo nepravidelnou architekturu. Je zde redukován počet pohárkových buněk. Tumorózní neovaskularizace se projevuje nepravidelností cév a prosakováním fluoresceinu do mimocévních prostor (tab. 2, obr. 3–7).

Na sliznici tenkého střeva zobrazujeme klky jako kyjovité výběžky s typickou vaskularizací lamina propria – velmi dobře jsou patrné vinuté cévy s erytrocyty v lumen (obr. 8, 9), jed-

notlivé pohárkové buňky a tenký lem kartáčového lemu na povrchu enterocytů.

V žaludeční sliznici se vizualizují typické protáhlé krypty s dlaždicovitou strukturou povrchových epitelí (obr. 10). V povrchové vrstvě sliznice jícnu jsou typické polygonální epitelíální buňky nerohovějícího dlaždicového epitelu (obr. 11). V hlubší vrstvě se objevují v oblasti papil lamina propria cévní klíčky připomínající klubíčka.

ZÁVĚR

Konfokální laserová endomikroskopie je starou technologií, která je nyní

nově zavedena do digestivní endoskopie. Přináší bezprostřední možnost získání mikroskopických obrazů, které velmi dobře korespondují s obdobnými histologickými řezy barvenými hematoxylinem-eosinem. Základní podmínkou úspěchu metody je velmi těsná spolupráce endoskopisty a patologa zabývajícího se patologií trávicího traktu.

Dedikace

Práce byla podpořena z výzkumného záměru MZO 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 874-882.

11. Kiesslich R, Goetz M, Neurath MF, Galle PR. Endomicroscopy - technology with future. *Internist (Berl)* 2006; 47: 8-17.

12. Kiesslich R, Goetz M, Vieth M et al. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2005; 15: 715-731.

13. Kiesslich R, Hoffman A, Neurath MF. Colonoscopy, tumors, and inflammatory bowel disease - new diagnostic methods. *Endoscopy* 2006; 38: 5-10.

14. Kiesslich R, Neurath MF. Endoscopic detection of early lower gas-

trointestinal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 941-961.

15. König F, Knittel J, Stepp H. Diagnosing cancer in vivo. *Science* 2001; 291: 1401.

16. Kudo S, Rubio CA, Teixeira CR et al. Pit pattern in colorectal neoplasia: endoscopic magnifying view. *Endoscopy* 2001; 33: 367-373.

17. Nakayoshi T, Tajiri H, Matsuda K et al. Magnifying endoscopy combined with narrow band imaging system for early gastric cancer: correlation of vascular pattern with histopathology (including video). *Endoscopy* 2004; 36: 1080-1084.

18. Sakashita M, Inoue H, Kashida H

et al. Virtual histology of colorectal lesions using laser-scanning confocal microscopy. *Endoscopy* 2003; 35: 1033-1038.

19. Stephens DJ, Allan VJ. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 2003; 300: 82-86.

Correspondence to /

adresa pro korespondenci:
Marcela Kopáčová, MD, PhD
2nd Department of Medicine, Charles University Teaching Hospital, Sokolská 581,
500 05 Hradec Králové,
Czech Republic
E-mail: kopacmar@fnhk.cz