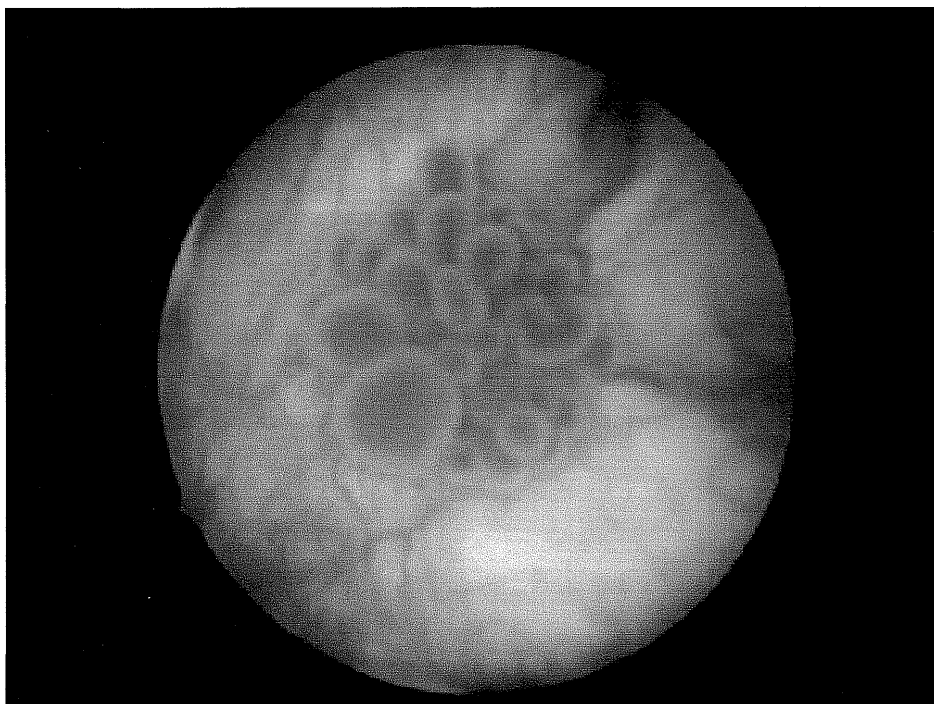


HÚGYHÓLYAG DAGANATOK IN-VIVO ÉS IN-VITRO FOTODINÁMIÁS DIAGNOSZTIKÁJA

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Pytel Ákos



Doktori iskola vezetője: Dr. Nagy Judit

Témavezető: Dr. Bellyei Árpád

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Urológiai Klinika

Pécs

2005

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. BEVEZETÉS

2. HÓLYAGDAGANATOK DIAGNOSZTIKÁJA

- 2.1. Tünettan
- 2.2. Fizikális vizsgálat
- 2.3. Laboratóriumi vizsgálatok
- 2.4. Vizelet citológia
- 2.5. Képkeltő eljárások
- 2.6. Cisztoszkópia és transzuretrális mintavétel
- 2.7. Új diagnosztikus tesztek, tumormarkerek

3. A FOTODINÁMIÁS DIAGNOSZTIKA ALAPJAI

- 3.1. Fizikai alapok
- 3.2. Biológiai alapok
 - 3.2.1. 5-amino-levulinsav (5-ALA)
 - 3.2.2. 5-amino-levulinsav hexil észtere (H-ALA)
 - 3.2.3. Hypericin

4. A FLUORESZCENS CISZTOSZKÓPIA

- 4.1. A fluoreszcens cisztoszkópia technikai háttere
 - 4.1.1. Fényforrás és cisztoszkóp
 - 4.1.2. Kamera
- 4.2. A fluoreszcens cisztoszkópia kivitelezése
- 4.3. A fluoreszcens cisztoszkópia diagnosztikus értékét befolyásoló tényezők

5. A FLUORESZCENS CISZTOSZKÓPIA KLINIKAI ALKALMAZÁSA

- 5.1. A hagyományos cisztoszkópia hiányosságai
- 5.2. A hólyagdaganatok in-vivo jelölésének története
- 5.3. Az 5-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópia klinikai alkalmazása

5.4. A H-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópia klinikai alkalmazása

5.5. Hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópia klinikai alkalmazása

6. A FLUORESZCENS CISZTOSZKÓPIÁVAL SZERZETT SAJÁT

TAPASZTALATOK

6.1. Anyag és módszer

6.2. 5-amino-levulinsav indukálta fluoreszcens cisztoszkópia

6.3. Hexil-amino-levulinsav indukálta fluoreszcens cisztoszkópia

6.4. Hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópia

6.5. Az eredmények összegzése

6.6. Megbeszélés

6.7. Következtetések

7. A FLUORESZCENS CITOLÓGIA

7.1. Bevezetés

7.2. Anyag és módszer

7.3. Eredmények

7.4. 5-ALA indukálta fluoreszcens citológia

7.5. Hypericin indukálta fluoreszcens citológia

7.6. Hexil-ALA indukálta fluoreszcens citológia

7.7. Megbeszélés

7.8. Következtetések

8. AZ ÉRTEKEZÉS ÖSSZEGZÉSE

8.1. Hólyagdaganatok in-vivo fotodinámiás diagnosztikája

8.2. Hólyagdaganatok in-vitro fotodinámiás diagnosztikája

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

IRODALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ALA-	Amino-levulinsav
BCG-	Bacillus Calmette Guerin
BP-	Band pass
BTA-	Bladder Tumor Antigen (Hólyagdaganat antigén)
Ch-	Charier
CIS-	Carcinoma in situ
Cit-	Vizelet citológia
CoA-	Koenzim A
DNS-	Dezoxi-ribonukleinsav
FC-	Fluoreszcens citológia
FDP-	Fibrin Degradations Particle (Fibrin degradációs termék)
G-	Grade (differenciáltsági fok)
H-ALA-	Hexil-amino-levulinsav
ISUP-	International Society of Urological Pathology (Nemzetközi Urológiai Korbonctani Társaság)
LP-	Long pass
NADH-	Nicotineamid adenin dinucleotid
NMP-	Nuclear Matrix Protein (Nukleáris mátrix fehérje)
PDD-	Photodynamic diagnosis (Fotodinámiás diagnosztika)
PVP-	Polivinilpirrolidon
RNS-	Ribonukleinsav
TNM-	Tumor, Nodus, Metastasis (daganat, nyirokcsomó, áttét)
TUR-	Transzuretrális rezekció
UH-	Ultrahang
UICC-	Union Internationale Contra le Cancer (Nemzetközi Rákellenes Egyesület)
UV-	Ultraviola (ibolyántúli)
WHO-	World Health Organisation (Egészségügyi Világszervezet)

1. BEVEZETÉS

A hólyagdaganatok diagnosztikája, terápiája a mindennapi urológiai munkában kiemelkedő jelentőséggel bír, mivel a hólyagdaganatos betegek képezik az egyik legnagyobb urológiai betegcsoportot. A hólyagdaganat a második leggyakoribb malignóma a férfi urogenitális traktuson belül és a leggyakoribb urológiai daganatos megbetegedés a nők esetében. Közel háromszor több férfi betegszik meg, mint nő, férfiaknál a negyedik, nőknél a nyolcadik leggyakoribb daganatos halálok. Incidenciája folyamatosan növekszik (évente mintegy 2%-al) és jelenleg az Egyesült Államokban a középkorú, illetve idős férfi populáció második leggyakoribb daganatos megbetegedése.¹

A daganat kialakulása többlépcsős folyamat. Egy iniciátor anyag, vagy annak metabolitja az egészséges sejt DNS-ében elváltozást indukál, ami kóros DNS-RNS transzformációt és végül kóros fehérjeprodukciót okoz. Promoter anyagok a már malignusan transzformálódott sejtek felszínéhez kötődve azok proliferációját idézik elő. Több hólyagdaganat iniciátor és promoter anyagot sikerült azonosítani. Az egyik legfontosabb etiológiai tényezőként tarthatjuk számon a dohányosok vizeletével szekretálódó alfa- és béta-naftilamin karcinogén szerepét.²⁻³ Ipari munkások (gumi, festék, bőrfeldolgozás, nyomda) között magasabb a hólyagdaganat incidenciája, amiért az aromás aminok karcinogén hatása tehető felelőssé.⁴⁻⁵ Mikrobiális ágensek is lehetnek karcinogének, egyértelműen bizonyított a *Schistosoma haematobium* fertőzés és a hólyag laphámrákja közötti összefüggés.⁶ Ciklofoszfamid terápiában részesülteknél, fenacetin abuzus után, krónikus mechanikai irritáció talaján is magasabb a hólyagdaganat incidenciája.⁷⁻⁹ A daganat kialakulásáért felelős genetikai változások még nem teljes egészében felderítettek, de bizonyos onkogének (ras, c-myc) jelenléte, tumor szupresszor gén lokuszok elvesztése (9-es, 13-as, 17-es kromoszóma), abnormális proteinek termelése (p15, p16, p53) bizonyított az esetek nagy többségében.¹⁰⁻¹¹

Ha a malignus elváltozás kialakult, a daganat maradhat felületes, vagy progrediálhat invazív folyamattá. A tumorprogresszióért felelős események természete nem teljességében tisztázott, jelenleg a Liota által megfogalmazott háromlépcsős progresszió elmélet a legáltalánosabban elfogadott.¹² Első lépésben a tumoros sejtek a bazális membránhoz kötődnek. A tumoros sejtek a felszínükön található laminin receptoraikkal a bazális membrán glikoprotein komponenséhez, a lamininhez kötődnek. A felszíni laminin receptorok száma magasabb invazív daganatok esetében, mint a nem invazív daganatoknál. A kötődés után a

membrán degradációja indul el a tumorsejtek által termelt proteázok (kollagenáz IV) segítségével. Azoknál a sejteknél, ahol citokinek és autokrin motilitási faktorok szekretálódnak, lehetővé válik a sejtek inváziója és a folyamat progressiója.

A húgyhólyagot felépítő szövetekből kiinduló daganatok döntő többsége (95%) epitheliális eredetű. Ezen elváltozások 90-92%-a urotheliumból indul ki.¹³ A primer hólyagdaganatok 5-6 %-a laphám eredetű, bár itt meg kell jegyezni, hogy nagy különbségek vannak a földrajzi elhelyezkedés szerint. Schistosoma endémiás területeken (közel-kelet) a laphámrákok teszik ki a hólyagdaganatok mintegy 75%-át.⁶ Az esetek kevesebb, mint 2%-ban találkozunk adenocarcinomával.¹⁴ Az egyes epithelium eredetű malignus elváltozások egyszerre, tehát kevert carcinoma (mixed carcinoma) formájában is jelentkezhetnek. A nem epitheliális eredetű daganatok ritkák, myosarcoma, osteogen sarcoma, lymphoma, pheochromocytoma fordulhat elő.

A hólyagdaganatok stádium meghatározásában, osztályozásában a Union Internationale Contra le Cancer (UICC) és az American Joint Committee on Cancer Staging (AJC) által javasolt 1997-es TNM klasszifikáció a legelterjedtebb, ahol a tumor mélységi terjedése (T), a regionális nyirokcsomók érintettsége (N) valamint a távoli metasztázisok (M) alapján történik a besorolás.¹⁵ Epitheliumra korlátozódó exofitikus folyamatok Ta, az in situ carcinomák Tis jelzésűek. A lamina propriát infiltráló daganatok a T1 besorolásúak. Izominvázio esetén attól függően, hogy a felületes, vagy a mély izomréteg érintett, beszélünk T2a illetve T2b stádiumról. Ha a folyamat a perivezikális zsírszövetet infiltrálja, akkor a jelzése T3 (T3a mikroszkópos, T3b makroszkópos infiltráció). T4 a daganat besorolása, ha kismedencei szervek (prosztata, rectum, uterus, vagina (T4a)), vagy a medence fala (T4b) is érintettek. A szöveti atipia megítélésére leginkább a háromfokozatú Grading (G) besorolás használatos, ahol az első fokozat a jól differenciált, a második a közepesen differenciált, a harmadik a differenciálatlan, anaplasztikus daganatokat jelenti.

A hólyagdaganatok mélységi terjedése alapján a folyamatokat két nagy csoportra, felületes és invazív folyamatokra oszthatjuk. Konvencionálisan a Ta, Tis, T1 folyamatok tartoznak a felületes hólyagdaganatok, míg a T2-T4 mélységi terjedésűek az invazív daganatok csoportjába.

A diagnosztikai eltéréseket, félreértéseket elkerülendő, a nomenklatúrát egységesítendő a World Health Organisation (WHO) International Society of Urological Pathology (ISUP) az urotheliális daganatok új beosztását javasolta, ahol az egyes kategóriákat a mélységi terjedés, a szöveti atipia, a valószínűsíthető prognózis alapján állapították meg, segítve ezzel a követendő terápia kiválasztását.¹⁶ Öt fő csoportba történt a szövettani minták

besorolása. Az első két csoportban (normális és hiperplastikus urothelium) szöveti atipia nem mutatható ki. A szöveti atipiát mutató lapos elváltozások képezik a harmadik csoportot. Ide a reaktív atipia, az ismeretlen eredetű atipia, a diszplázia (alacsony grádusú intraurotheliális neoplázia), valamint a carcinoma in situ (magas grádusú intraurotheliális neoplázia (UICC szerint Tis)) tartozik. A negyedik csoport a papilláris neoplazmák elnevezést kapta, ahova a papillóma (UICC TaG0), az invert papillóma, a kis malignitású potenciállal rendelkező papilláris neoplazma (UICC TaG1), az alacsony grádusú papilláris carcinoma (UICC TaG2), valamint a magas grádusú papilláris carcinoma (UICC TaG3) tartozik. Az invazív urotheliális neoplazmák csoportjába kerültek a lamina propriát infiltráló daganatok (UICC T1G1-3) és a muscularis propriát (detruzor) infiltráló daganatok (T2-4G1-3).

Egyelőre a nomenklatúrát illetően nincs teljes egyetértés, országonként, sőt intézetenként is más-más felosztás szerint osztályozzák a hólyagdaganatokat.¹⁷⁻¹⁹ Magyarországon jelenleg a leginkább elfogadott és használt rendszer a UICC által javasolt TNM beosztás.

A hólyagdaganatok többszöröségét, panurotheliális természetét bizonyítja, hogy a tumor az urotheliummal borított húgyúti traktus bármelyik pontján, egy helyen, vagy több helyen egyszerre, vagy akár évekkel a primer daganat eltávolítása után ismételtén is kialakulhat.²⁰ Polikronotópiának nevezzük a hólyagdaganatok térbeli és időbeli multicentricitását.

A frissen felismert daganatok 55-60%-a jól, vagy közepesen differenciált, felületes folyamat, 40-45%-a rosszul differenciált daganat, melyeknek a fele izominvazív. Az urotheliális daganatoknak magas a recidíva aránya (75-80%) és a felületes daganatok mintegy 20%-a progrediál.²¹

A hólyagdaganatok magas száma, a növekvő incidencia, a magas recidíva és progresszióarány ismeretében érthető, milyen fontos szerepet tölt be az urológiai gyakorlatban a hólyagdaganatok diagnosztikája és nyomon követése, valamint a minél tökéletesebb diagnosztikai eljárások kifejlesztésére irányuló törekvések.

2. HÓLYAGDAGANATOK DIAGNOSZTIKÁJA

2.1. Tünettan

A fájdalomtalan, „néma” hematuria a leggyakoribb tünet hólyagtumoros betegekben.²²⁻
²⁴ Az esetek mintegy 85%-ában kimutatható mikroszkópos, vagy makroszkópos hematuria. A vérvizelés foka nem mutat egyértelmű korrelációt a daganat kiterjedésével, stádiumával. Kisméretű, felszínes daganat is okozhat súlyos vérvizelést, ugyanakkor invazív folyamatoknál elképzelhető, hogy csak mikroszkópos hematuria detektálható. Mindezekből következik, hogy minden vérvizelés esetén ki kell zárni a hólyagtumor lehetőségét.

A hólyag irritabilitásával kapcsolatos tünetek állnak a második helyen a gyakoriságukat illetően. Diszúriás panaszok, sürgető vizelési késztetés, gyakori vizeletürítés leggyakrabban invazív folyamatoknál és carcinoma in situ esetében észlelhető.²⁵ Minden esetben gondolni kell a hólyagdaganat fennállásának lehetőségére.

A késői tünetek közé a propagáció, illetve metasztázis következtében fellépő vese, deréktájéki, hasi és csontfájdalmak tartoznak.^{26, 27}

2.2. Fizikális vizsgálat

Hólyagtumor gyanúja esetén rektális digitális vizsgálat és bimanuális kismedencei palpáció javasolt. A vizsgálatoktól érdemi diagnosztikai eredményt csak narkózisban végrehajtva, nagykiterjedésű, invazív folyamatok esetében várhatunk.²⁸ Mivel a hólyagtumorok 85%-a felületes daganat formájában jelentkezik, a fizikális vizsgálat szerepe, az esetleges komorbiditás kizárásától eltekintve, limitált.

2.3. Laboratóriumi vizsgálatok

A leggyakoribb laboratóriumi eltérés a vizeletüledék vizsgálata során észlelt hematuria, ami szuperinfekciók miatt társulhat piúriával. A vérkémiái vizsgálatoknak elsősorban előrehaladott betegség esetén van jelentősége, ureterokklúzió esetén azotémiát, csontmetasztázis esetén emelkedett alkalikus foszfatáz értéket észlelhetünk. Anémia és gyorsult süllýedés is előrehaladott betegség esetén jellemző.²⁵

2.4. Vizelet citológia

A vizeletben megjelenő malignus sejtek kimutatását felhasználhatjuk hólyagtumor gyanúja esetén is, de elsősorban a daganatos betegek nyomon követésében elterjedt diagnosztikai módszer.^{29, 30} A spontán vizelet citológiai vizsgálatánál jobb eredmény várható a hólyagmosásból származó minta felhasználásától. A vizsgálat legnagyobb hátránya, hogy jól differenciált tumorok esetében alacsony a szenzitivitása.³¹⁻³³

2.5. Képkötő eljárások

A legelterjedtebb radiológiai vizsgálat a kiválasztásos urográfia. Mind a mai napig ez a legelterjedtebb képkötő eljárás a világon hematuria esetében. Bár kis elváltozások nem mutathatók ki a vizsgálatnál, exofitikus, intralumináris folyamatok telődési defektusok, invazív folyamatok fali egyenetlenség, aszimmetrikus hólyagtelődés formájában jelentkezhetnek. Veseüregrendszeri tágulat invazivitásra, ureterokklúzióra hívhatja fel a figyelmet. A módszer legnagyobb előnye, hogy a felső húgyútról és az esetleges itt lévő urotheliális daganatokról is felvilágosítással szolgál.^{28, 34-36}

Egyre elterjedtebb és sok centrumban az elsődlegesen indikált vizsgálat hólyagtumor esetében az ultrahangos vizsgálat. Transzabdominálisan, telt hólyag esetén, az intravezikális térfoglalás, a hólyagfal megvastagodása diagnosztizálható, valamint a környező szervekről és a vesék állapotáról is informál. Intravezikális transzducer alkalmazásával pontosabb képet kaphatunk, olykor a mélységi terjedés megállapítása is lehetséges.^{35, 37}

Komputertomográfiának, mágneses rezonancia vizsgálatnak elsősorban invazív folyamatok esetében a hólyag környezetének, a hasi szerveknek és a nyirokcsomók állapotának feltérképezésében van szerepe.^{37, 38}

2.6. Cisztoszkópia és transzuretrális diagnosztikus mintavétel

A hólyagtumor diagnózisát csak uretrocisztoszkópia után, a mintavétel szövettani vizsgálatát követően mondhatjuk ki.²⁵ A cisztoszkópiát flexibilis és rigid eszközzel egyaránt végrehajthatjuk. A vizsgálat során a daganat méretéről, elhelyezkedéséről, növekedési formájáról és az esetleges többgócúságáról kapunk pontos információt. Amennyiben a cisztoszkópia során a hólyagtumor gyanúja megerősítést nyert, vagy a vizelet citológiai

vizsgálata pozitív volt, a beteget műtéti körülmények között végrehajtott cisztoszkópiához kapcsolt diagnosztikus mintavételhez vagy rezekcióhoz készítjük elő. Ekkor kényelmesen, különböző optikákat használva pontosan fel lehet térképezni a hólyagot és a gyanús területek rezekciója, biopsziája végrehajtható. Cisztoszkóppal nem detektálható elváltozások felismeréséhez számos szerző a hólyag több pontjáról vett, Rübben-séma szerinti „random” biopsziát javasolja.^{39, 40}

2.7. Új diagnosztikus tesztek, tumormarkerek

Az utóbbi időben számos közlemény számolt be új, vizeletből történő diagnosztikus módszerek, tumormarkerek kipróbálásáról, klinikai alkalmazhatóságukról.^{32, 33, 41-44} A legtöbb adat a flow-citometriáról, a hólyagtumor antigén (BTA), a fibrin degradációs termék (FDP), a nukleáris mátrix fehérje (NMP-22) kimutatásáról, a telomeráz reakcióról áll rendelkezésünkre (lsd. 1. számú táblázat). Az eltérő eredmények, a nem kielégítő szenzitivitás és specificitás miatt eddig egyik sem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, és a mindennapi rutin diagnosztikában az ideális tumormarker, egyelőre nem létezik.

	szenzitivitás (%)	specificitás (%)
citológia	35 – 61	90 - 100
NMP-22	47 - 81	64,3 - 81,6
BTA	28 - 100	40 - 95,9
BTA Stat	57 – 82,8	68 – 72
BTA TRAK	66 – 77,5	50,5 – 75
FDP	33 - 83	66 – 84,6
Telomeráz	62 - 81	60 – 96,4
Flow-citometria	45 - 72	80 - 87

1. táblázat: Különböző hólyagtumor tesztek és markerek szenzitivitási és specificitási adatai⁴²

3. A FOTODINÁMIÁS DIAGNOSZTIKA ALAPJAI

3.1. Fizikai alapok

A daganatok fotodinámiás diagnosztikája az egyes szövetek fluoreszcens tulajdonságainak vizsgálatán, és azok tumorspecifikus különbségének kimutatásán alapszik.

Molekuláris szinten a fény és a szövetek kölcsönhatását, egy „fényrészecskének” (foton) egy molekulával történő interakciójaként írhatjuk le. Egy foton különböző energiaszinteken lehet, ami az elektromagnetikus rezgés frekvenciájában, illetve hullámhosszában nyilvánul meg és az emberi szem ezt különböző színekként érzékeli. Minél magasabb a frekvencia (minél kisebb a hullámhossz), annál magasabb a foton energiaszintje. Ezek alapján a színspektrum két végén elhelyezkedő „kék”, illetve „vörös” fotonok közül az előbbi rendelkezik magasabb energiaszinttel. A fotonok a molekulák elektronhéjával lépnek kölcsönhatásba. Fényelnyelés során a fotonok energiája a molekulára tevődik át, miáltal az, energetikailag gerjesztett állapotba kerül. Ez azt jelenti, hogy az elektron belső energiapályáról külső energiapályára kerül, elérve ezzel a gerjesztett állapotot. Ahhoz, hogy a kölcsönhatás létrejöhessen, a foton energiájának (tehát a színének) meg kell felelni a molekula két energiahéján lévő energiaszintek különbségének. A különböző atomok esetén jól definiálható az energia, amit elnyelve gerjesztett állapotba kerülnek, ami az atomok abszorpciós spektrumát adja meg.

Sikeres abszorpció esetén tehát a molekulák gerjesztett állapotba kerülnek. Ez az állapot nem stabil, a többletenergia különböző formákban leadásra kerül. Ez egyrészt az anyagok felmelegedésével, másrésztől új fotonok kibocsátásával történik meg. Ilyen új fotonok kibocsátása által történő energia-leadás a fluoreszcencia. Mivel a gerjesztő fény energiájának egy része nem új fotonok kibocsátásával kerül leadásra, a fluoreszcencia során emittált fotonok energiája mindig kisebb, mint a gerjesztő fotonoké. A fotodinámiás diagnosztikában legelterjedtebb anyagok esetén ez kék gerjesztő fény mellett vörös fluoreszcenciát jelent.

Az, hogy mennyire hatékony egy anyag gerjesztés utáni fluoreszcenciája, azt a fluoreszcens kvantum hatásfokkal jellemezhetjük, ahol az emittált fotonok számát az abszorbeált fotonok százalékában adjuk meg. Bár a klinikumban leginkább elterjedt anyagok

fluoreszcens hatásfoka alacsony, megfelelő, az emissziós csúcsokhoz kifejlesztett detektorok alkalmazásával a fluoreszcens spektroszkópia igen érzékeny mérési eljárást jelent.

3.2. Biológiai alapok

Az emberi szöveteket optikai szempontból kevert, „nem tiszta” anyagként foghatjuk fel, hiszen sokféle, különböző spektrális karakterisztikájú részekből állnak. A szövetekből származó saját, gerjeszthető fluoreszcenciát autofluoreszcenciának nevezzük. A fluoreszcenciát okozó anyagokat fluorokrómoknak nevezzük. Számos endogén fluorokróm ismert az emberi szövetekben, melyek gerjeszthetőek és autofluoreszcenciát okoznak. Az, hogy egyes szövetek milyen autofluoreszcens tulajdonsággal rendelkeznek, a bennük található fluorokrómok aránya, illetve a gerjesztő fény határozza meg. A leggyakoribb gerjeszthető endogén fluorokróm a triptofán, a kollagén, az elasztin, a NADH, a flavin és a porfirin. A húgyhólyag a fotodinámiás diagnosztika során, a legelterjedtebb kék gerjesztőfény alkalmazásakor zöld autofluoreszcenciájú.⁴⁵⁻⁴⁸

Amennyiben exogén úton juttatunk a szervezetbe fotoszenzitivizáló fluorokrómokat, megfelelő gerjesztés mellett azok fluoreszcenciáját vizsgálhatjuk. Az így észlelhető fénykibocsátást indukált fluoreszcenciának nevezzük. Az exogén fluorokróm lehet olyan anyag, ami a szervezetben endogén anyagként is megtalálható és lehet a szervezet sejtjeiben nem fellelhető vegyület, melyet a sejtek exogén bevitel után vesznek fel. A hólyagdaganatok diagnosztikájában az 5-amino-levulinsav és annak észterei, valamint a hypericin használatos fotoszenzitivizáló anyagként.

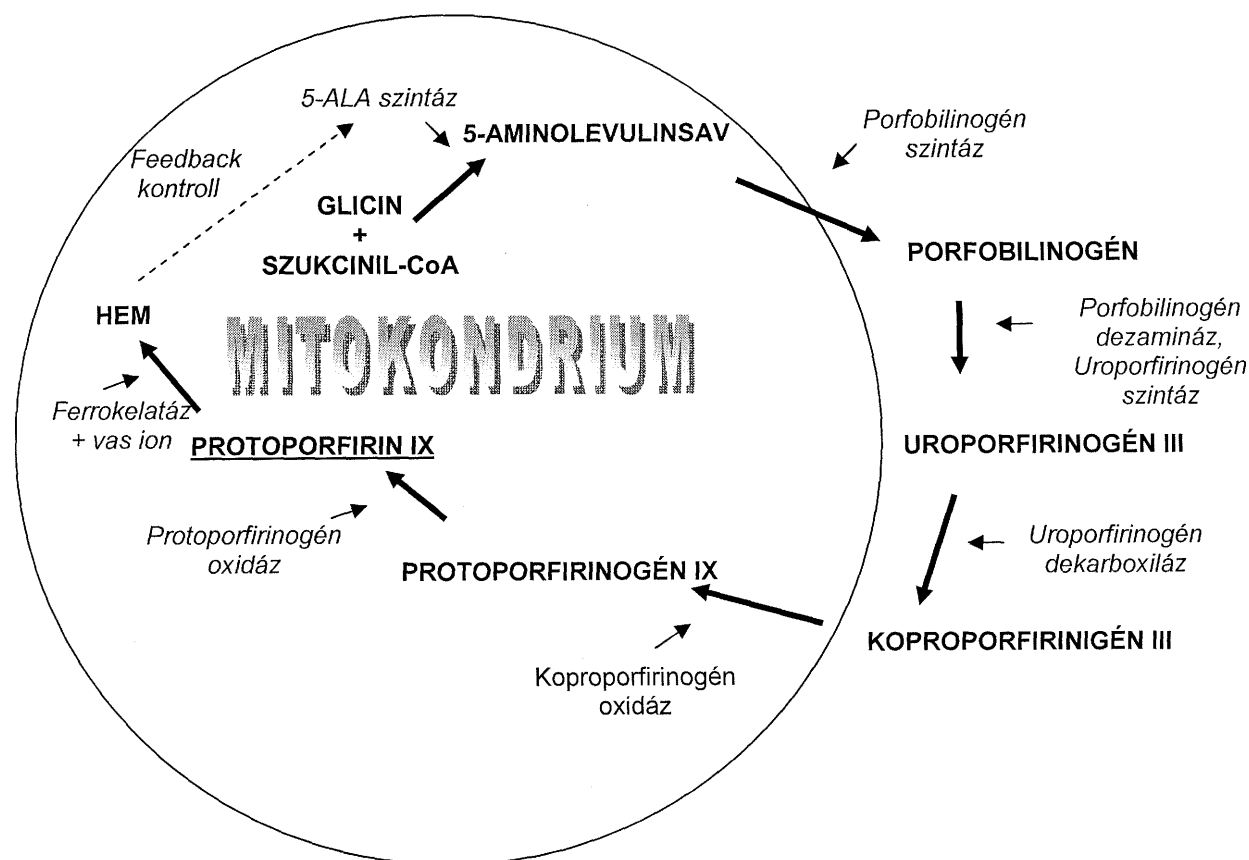
3.2.1. 5-amino-levulinsav (5-ALA)

Az 5-ALA önmagában nem fluoreszkáló vegyület. A hem bioszintézis intracelluláris kiinduló pontjaként szerepel, a sejtek mitokondriumában lezajló szintézis során 5-ALA szintáz hatására glicinből és szukcinil-CoA-ból alakul ki, tehát normális körülmények között is megtalálható a sejtekben. A szintézis többlépcsős folyamata során kialakul a protoporfirin IX, amiből vas jelenlétében a ferrokelatáz hatására képződik a hem molekula. A hem molekula prekursora a protoporfirin IX, a tulajdonképpeni fluorokróm, aminek fluoreszcenciáját vizsgálhatjuk. A hem szintézis negatív feedback ellenőrzés alatt áll, a

megfelelő mennyiségű szabad hem gátolja a további 5-ALA kialakulását, ami normális körülmények között a protoporfirin IX akkumulációját megakadályozza.

1987-ben Malik számolt be elsőként exogén 5-ALA adása után kialakult tumorszelektív porfirin akkumulációról, majd 1992-ben Kriegmair közölte le az első eredményeit emberi hólyagdaganatos betegcsoporton.^{49, 50}

Jelenleg is folynak kutatások az exogén 5-ALA bevitelét követően kialakult tumorszelektív porfirin akkumuláció okainak pontos felderítésére, azonban számos tényezőt, ami a folyamatért felelős, már sikerült kimutatni. A tumoros sejtek barrier funkciója lecsökkent az ép sejtekéhez képest. Ezen kívül nagyobb számban sikerült daganatos sejtekben ALA számára átjárható membráncsatornákat kimutatni és ezek a lecsökkent barrier működéssel együtt fokozott 5-ALA felvételt eredményeznek.⁵¹⁻⁵³ Mivel a negatív feedback ellenőrzése alatt csak az 5-ALA kialakulása áll, exogén felvétel esetén nagyobb mennyiségű kiindulási vegyület áll a szintetizáló folyamat rendelkezésére. A daganatos sejtekben citoplazmatikus enzimaktivitás változás is kimutatható. Megemelkedett a porfobilinogén dezamináz és csökkent a ferrokelatáz aktivitása és csökkent a daganatos sejtekben a megköthető vasionok száma.⁵⁴ Ezek a tényezők együttesen, vagy akár külön-külön a protoporfirin IX, mint fluorokróm, tumorszelektív akkumulációjához vezetnek (1. ábra).



1. ábra: A hem bioszintézis sematikus ábrázolása

3.2.2. 5-amino-levulinsav hexil észtere (H-ALA)

Az 5-ALA indukálta (első generációs protoporfirin IX prekursor) fluoreszcencia detektálásán alapuló diagnosztika térhódítása után számos próbálkozás történt a mind tökéletesebb prekursor vegyület előállítására érdekében. A kísérletek fókuszában a minél tökéletesebb membránpenetráció, illetve enzimaktivitás befolyásolása révén elért magasabb protoporfirin IX szint volt.

Dimetil-sulfoxid adása a transzmembrán transzport emelése, desferroxiamin adása a ferrokelatáz aktivitás gátlása révén potenciózza az exogén 5-ALA hatását. Jelenleg ezek a vizsgálatok kísérleti stádiumban vannak, in-vivo bevezetésük még várat magára.⁵⁵

Lange és mtsai. az 5-ALA észterifikálásával előállított lipofil vegyület membránpenetrációját és az azt követő protoporfirin IX akkumulációját vizsgálták. Eredményeik alapján az 5-ALA hexil észterét tartották a legmegfelelőbb második generációs prekursoroknak.^{56, 57}

A lipofil H-ALA sejtmembrán penetrációt követően nem specifikus észterázok hatására 5-ALA-vá alakul, ami a már korábban ismertetett úton protoporfirin IX akkumulációt hoz létre.

3.2.3. Hypericin

A hypericin természetes, növényi eredetű, aromás, policiklikus kinonvegyület, amit a Hypericum családba tartozó növények szintetizálnak. Ezek a növények a világon széles körben elterjedtek, legismertebb képviselőjük az orbáncfű (*Hypericum perforatum*). A hypericin antidepresszánsként való felhasználása és fotoszenzitivizáló hatása régóta ismert. Hólyagdaganatok diagnosztikájában és terápiájában való felhasználhatósága az elmúlt években keltette fel a kutatók figyelmét. Kamuhabwának sikerült hólyagdaganatos betegeknél a hypericin tumorszelektív celluláris felvételét bizonyítani, de a pontos mechanizmus egyelőre nem tisztázott.⁵⁸ A tumorsejtek fokozott membránpermeabilitásán kívül, a megváltozott intracelluláris albumin és lipoprotein kötődést, valamint glutation s-transferázzal való interakciót tételezik fel oki tényezőként.⁵⁹⁻⁶³ Mivel sejtkultúrákon in-vitro nem sikerült ugyanolyan tumorszelektivitást demonstrálni mint élő modelleken, egy eddig ismeretlen in-vivo faktornak tulajdonítják a legnagyobb szerepet a tumorszelektivitásban.⁵⁸

4. A FLUORESZCENS CISZTOSZKÓPIA

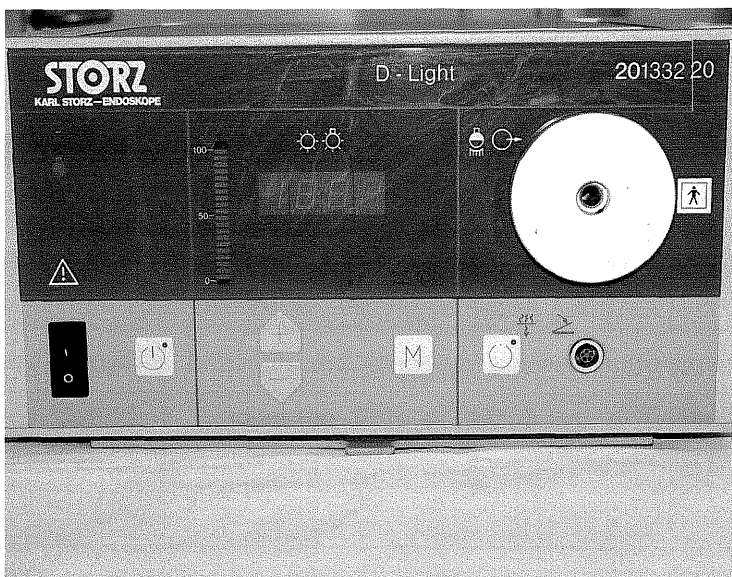
4.1. A fluoreszcens cisztoszkópia technikai háttere

A fluoreszcens cisztoszkópia kivitelezéséhez a hagyományos urológiai endoszkópos eszköztárat ki kell bővíteni. Alapvető fontosságú a megfelelő gerjesztéshez egy nagy teljesítményű fényforrás, és a fluoreszcencia detektálásához megfelelő speciális optikák. Videovezérelt cisztoszkópiához ezek mellett speciális kamera is szükséges. A fotodinamiás diagnosztikához kifejlesztett eszközök egyik nagy előnye, hogy korlátozás nélkül felhasználhatóak mint hagyományos cisztoszkópok, és kombinálhatóak a megfelelő, hagyományos endoszkópia során bevethető eszközökkel (TUR kacs, biopsziás fogó, stb.).

4.1.1. Fényforrás és cisztoszkóp

A fotodinamiás diagnosztika kiviteléhez olyan speciális fényforrás szükséges, amely elsősorban a kék spektrumtartományban képes nagy teljesítményre, mivel a hólyagdaganatok diagnosztikájában felhasznált fluorokrómok gerjesztési optima ebbé a tartományba esik. A fluoreszcencia detektálása csak akkor lehetséges, ha a gerjesztő fény egy része a vizsgálatot végző szeme előtt kiszűrésre kerül. A speciális optikát ezért egy filterrel látták el. A vizsgáló által detektált visszavert gerjesztőfény intenzitását a fényforrás gerjesztő filtere és az optika filtere együttesen határozza meg. Ahhoz, hogy optimális kontraszthatás érvényesüljön fluoreszkáló és nem fluoreszkáló területek között, a visszavert gerjesztőfény intenzitásának és a fluoreszcencia intenzitásának összeegyeztethetőnek kell lennie. A gerjesztőfilter csak lilás-kék fényt enged át, míg az optika filtere minden 440 nm feletti hullámhosszúságú fény számára átjárható. Így a vörös indukált fluoreszcencia, és a zöld autofluoreszcencia mellett a visszavert kék fény kis százalékát is átengedi. Ez a kék fény semlegesíti az endogén fluorokrómok piros fluoreszkálását és létrejön az erős kék-vörös szinkontraszt a normál és a gyanús területek között. A fényforrás filtere egy forgótárcsára van szerelve, ami lehetővé teszi az egyszerű, gyors váltást a hagyományos és a fluoreszcens cisztoszkópia között. A váltás a fényforráshoz tartozó lábpedállal hajtható végre.^{64, 65} A fényforrás megfelelő teljesítményét xenon ívfénylámpa biztosítja (1.kép).

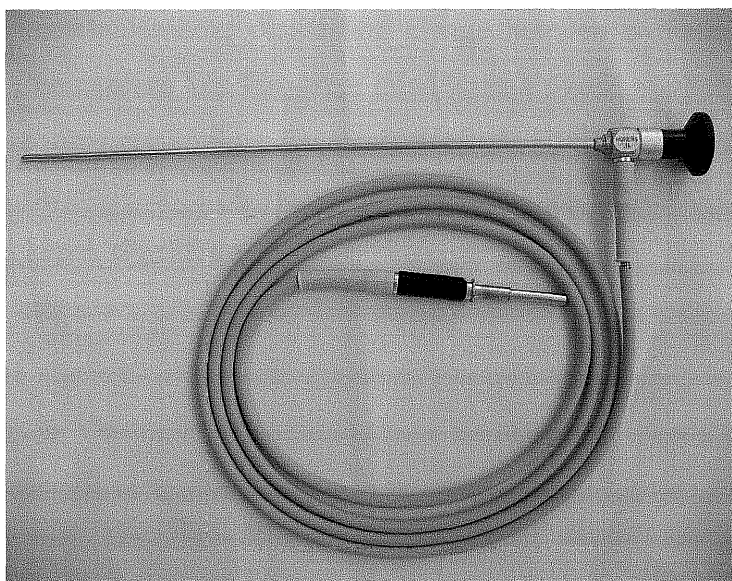
Minimális energiaveszteségű fényátvitel szükséges a fényforrásról az optikára, amihez vagy integrált száloptikás fénykábel használható (2.kép), vagy egy újabban kifejlesztett fénykábel, ahol a fényátvitel folyadékkezelésben valósul meg. A folyadékban történő fényátvitel előnye, hogy kiszűri a reziduális infravörös fényt, és elenyésző ezzel a módszerrel a saját



1. kép: Storz D-light fényforrás

fluoreszcencia. Megjegyzendő, hogy az új kábelek nem autoklávozhatóak, szemben a hagyományos fénykábelekkel.^{64, 65}

A fotodinámiás diagnosztika során ügyelni kell arra, hogy az endoszkópiához szükséges felszerelés minden része megfelelő legyen a fluoreszcens detektáláshoz. Hagyományos cisztoszkópiához tetszőlegesen kombinálhatjuk a fényforrást, a fénykábelt és az optikát, de fluoreszcens cisztoszkópia esetében nem járhatunk el hasonlóan. Hagyományos



2. kép: PDD optika, speciális fluoreszcens diagnosztikához alkalmas integrált fénykábel

fényforrást használva, elégtelen teljesítmény és nem megfelelő gerjesztés miatt nem lehet a vizsgálatot végrehajtani. Hagyományos fénykábel esetén igen jelentős fényvesztéssel kell számolni, és bár bizonyos mértékű fluoreszcens detektálás lehetséges, de ez a pontos diagnosztikát nem teszi lehetővé. Speciális optika nélkül, a hiányzó filter miatt egynemű, homogén, lilás-kékes hólyagképet kapunk és a diagnosztika alapját képező szíkontraszt a különböző szövetek között eltűnik. Amennyiben a fotodinámiás diagnosztikához kifejlesztett fényforrást "fehér fényű" üzemmódba kapcsoljuk, akkor a teljesítménye automatikusan lecsökken a csúcsteljesítmény 10%-ra. Ez megakadályozza, hogy a vizsgálat a túl erős fény

elvakítsa, és a hagyományos cisztoszkópia során megszokott megvilágítás mellett végezheti el a beavatkozást. Itt kell megjegyezni, hogy az optika filtere által kiszűrt kék fény nagy része miatt a hagyományos képhez képest kissé sárgásabb képet kapunk, ami a diagnosztikát nem zavarja.

A használni kívánt optika kiválasztásánál, csakúgy, mint a hagyományos hólyagtükrözésnél, a vizsgálni kívánt terület elhelyezkedése, hólyagon belüli lokalizációja az irányadó. 0° , 12° , 30° és 70° látószögű optika hozzáférhető jelenleg, amivel fluoreszcens cisztoszkópiát végezhetünk. Felhasználásukkor figyelembe kell venni, hogy a nagyobb látószögű optikák kevesebb gerjesztőfényt tudnak átengedni, ami a vizsgálatot kis mértékben befolyásolhatja.

4.1.2. Kamera

Az elvégzett vizsgálatok dokumentálásához, oktatáshoz elengedhetetlen a látottak rögzítése. A hólyagfalról regisztrált fluoreszcens kép fényereje mindössze a tizede a „fehér” fényvel kapott képnek. Az emberi szem logaritmikus fényérzékelésének köszönhetően ez azonban elégséges a hólyag pontos megítéléséhez. A hagyományos endokamerák azonban nem alkalmasak a kis fényintenzitású képek rögzítésére.

Fluoreszcens képek felvételére alkalmas kameráknál (3.kép) több jelentős módosítást figyelhetünk meg. A fluoreszcenskamerák hullámhosszfüggő érzékenysége eltér a hagyományos kamerákétól. A vörös színsatoma 600 és 700 nm közötti részének érzékenysége jelentősen megemelkedett, ami az érzékelőchipe történő magas fényátvitelt eredményezi az



3. kép: Storz telecam kamera

indukált fluoreszcencia hullámhosszán. Ez az erősítés legkifejezettebben a három alapszínnek megfelelően három érzékelő chippel rendelkező kameráknál érvényesül. Hagyományos kameráknál az expozíciós idő átlagosan videoképenként $1/50$ másodperc és a képernyőn 50 kép jelenik meg másodpercenként. Ez a képfrekvencia már lehetővé teszi az emberi szem

számára a folyamatos kép érzékelését. Ez az idő azonban gyakran kevés ahhoz, hogy a fluoreszcens képről megfelelő mennyiségű fényt gyűjtsön a kamera. Ezért a speciális kamerán a fényt akár fél másodpercig is lehet integrálni. Az integrációs idő 1/2 másodperc és 1/60 másodperc között állítható. A képintegrálás hátránya, hogy növekvő integrációs idővel egyre szaggatottabbá válik a monitoron megjelent kép. Elektronikus úton ugyan sikerült a kép szaggatottságát csökkenteni, de fluoreszcens cisztoszkóppal vezérelt beavatkozások esetében az integrációs időt nem ajánlatos 1/15 másodperc fölé emelni. Az analóg videojelek elektronikus erősítése (gain) további fényerősítést jelent. Három fokozat (alacsony, közepes, magas) közül lehet választani. Az erősítés emelésével a kép „zajossá” válik ezért hagyományos üzemmódban az alacsony erősítés, fluoreszcens üzemmódban (ahol a szíkontraszt fontosabb, mint a kép tisztasága) a magas erősítés javasolt.^{64, 65}

4.2. A fluoreszcens cisztoszkópia kivitelezése

Ahhoz, hogy a fluoreszcens cisztoszkópia diagnosztikus előnyeit ki tudjuk használni, elengedhetetlen a megfelelő beteg-előkészítés. A beavatkozás tervezett ideje előtt 1-4 órával puha, vékony (10 Ch) katéterrel kiürítjük a beteg hólyagját és a fluorokrómot (5-ALA, H-ALA, hypericin) tartalmazó oldatot (hypericin:40 ml, 5-ALA, H-ALA:50 ml) a katéteren át a hólyagba instilláljuk. A megfelelő hatás eléréséhez az oldatnak minimálisan 1 órán át kell a hólyagban maradnia. Az optimális fluoreszcens kép az instillációt követő 4 órán belül látható, ezért javasolt ezt az időkorlátot nem túllépni.^{50, 56, 66}

A vizsgálat kivitelezésének első része megegyezik a hagyományos cisztoszkópia során követendő irányelvekkel. Műteti körülmények között, az aszepszist figyelembe véve hajtjuk végre a beavatkozást. Tisztán diagnosztikus célból végrehajtott művelet esetében helyi érzéstelenítés is elegendő, de tekintve, hogy a beavatkozásokat az esetek döntő többségében biopsziás mintavétellel, illetve transzuretrális rezekcióval szükséges kombinálni, általános érzéstelenítés (spinális, epidurális, altatás) javasolt. A kőmetsző helyzetben fekvő beteg húgycsőnyílásának környékét dezinficiáljuk, és steril kendőkkel izoláljuk, majd előretekintő optikát használva szemkontroll mellett hatolunk be a hólyagba. A hólyagban lévő vizeletet (az előzetesen instillált oldattal együtt) leszívjuk, majd a hagyományos fény melletti cisztoszkópiát végrehajtuk. Ezt követően a fényforrást kék fényű üzemmódba kapcsolva végrehajtuk a fluoreszcens cisztoszkópiát, melynek során az indukáltan fluoreszkáló (piros) területek detektálására törekszünk. Pozitív vizsgálati lelet esetén a diagnosztikával egy ülésben elvégezhetjük a gyanús területek biopsziáját, illetve rezekcióját. A beavatkozás

befejezése a cisztoszkópiánál, illetve transzuretrális rezekciónál megszokottak szerint történik.

4.3. A fluoreszcens cisztoszkópia diagnosztikus értékét befolyásoló tényezők

Megfelelő felszereltség, kifogástalan technikai háttér mellett is előfordulhatnak olyan körülmények, melyek a vizsgálat diagnosztikus értékét jelentősen befolyásolják. Ezek lehetnek vizsgálófüggő és a vizsgálatot végző személytől független okok egyaránt. Általában vagy a túl kevés, vagy ellenkezőleg a túl erős fluoreszcencia képében jelentkeznek a problémák.

Amennyiben jó látási viszonyok mellett, fluoreszcens üzemmódban nem észlelünk a hólyagban indukált fluoreszcenciát, felmerül (a negatív hólyagstátusz mellett), hogy nem volt megfelelő a beteg előkészítése, az instillált fluorokróm nem tudta kifejteni hatását. Ilyenkor az optikát visszahúзва a húgycsőbe, megtekintjük a hólyagnyakat, ahol a tangenciális fényhatás miatt, geometriai artefaktnak nevezett fenomén miatt (ld. később), megfelelő fluorokróm hatás mellett, mindig észlelhető piros fluoreszcencia. Amennyiben ezen a területen sem látunk indukált fluoreszcenciát, joggal tételezhetjük fel, hogy a beteg előkészítése nem volt megfelelő.

A vizsgálat során folyamatosan ügyelni kell a hólyagfaltól való megfigyelési távolságra. Az endoszkópos kép világosságát elsősorban a megvilágítás erőssége határozza meg, ami az endoszkóp faltól való távolságának növelésével négyzetes arányban csökken. Amennyiben a távolság a kétszeresére nő (a hólyagfaltól távolodunk) a megvilágítás a negyedére csökken. Ez a hatás hagyományos cisztoszkópia esetében nem okoz gondot, de fluoreszcens vizsgálatkor nehezítheti a diagnosztikát. Általánosságban elmondhatjuk, hogy egy kinyújtott reszektorkacsnyi távolságból, tiszta mosófolyadék mellett, megfelelő képet kell kapnunk. Amennyiben a kép világossága ebben a távolságban nem megfelelő, technikai hibával állunk szemben (fényforrás, fénykábel, optika, kamera).

Vérző hólyagban, akárcsak a hagyományos cisztoszkópia során, nehezebb a tájékozódás. A vér fényabszorpciója és fényszórása miatt a kép világossága és élessége romlik, de csökken a tumoros és negatív területek közötti színkontraszt is. Ez ellentétben a fehérfényű vizsgálatnál, ahol a kép pirosas lesz, azt eredményezi, hogy a kép kékesebb árnyalatúvá válik és az indukált, piros fluoreszcencia csökken. Megjegyzendő, hogy ugyanolyan mértékű vérzés esetén fluoreszcens üzemmódban jobbak a látásviszonyok, mint fehér fény mellett, de a vizsgálat szenzitivitása jelentősen lecsökken.

A detektálható fluoreszcencia csökkenése fény hatására az úgynevezett fotoelhalványulás (photobleaching) effektus. Ezt megfigyelhetjük 5-ALA és H-ALA instillálása után végzett vizsgálat során, amikor az indukált fluoreszcencia intenzitása folyamatosan csökken, majd eltűnik. Főleg kis léziók esetén okozhat ez diagnosztikus tévedéseket, ezért multilokuláris folyamatok esetén mindig a kisebbeknél javasolt a biopsziát elkezdeni. Általános szabály, hogy mennyi idő után, milyen mértékben következik be a halványulás, egyelőre nem fogalmazható meg, igen eltérő az egyes vizsgálatoknál tapasztalt idő. Az elhalványulás általában csak kifejezetten hosszú (legtöbbször oktatási, vagy dokumentációs célból) beavatkozásoknál jelent problémát.⁶⁶⁻⁶⁸

Amennyiben koncentrált vizelet van a hólyagban, úgy érvényesülhet annak autofluoreszcenciája, zöldes színűvé válik a kép, ami a tumordiagnosztikát hátrányosan befolyásolhatja. Ez a zavaró hatás megfelelő hólyagmosással könnyen kiküszöbölhető.

Ha a vizsgálat során viszonylag lapos a fény beesési szöge, úgy az urothelium felső rétege pirosasan fluoreszkál. Ezt geometriai artefaktnak nevezzük és az urothelium nem specifikus, fluorokróm akkumulációjából származik. Ez a hatás csak a közel tangenciális fénybeesésnél tapasztalható, mivel ebben a szögben a vékony urotheliumréteg relatíve kiszélesedik és a normál szövetekben található fluorokrómok fluoreszcenciáját is pirosas területként detektáljuk. Amennyiben a fény beesési szögét megváltoztatjuk (az endoszkópot mozgatjuk) az ilyen fluoreszcencia eltűnik. Hasonló magyarázata van az összeesett hólyagfal mellett észlelt gyakori álpozitivitásnak. Ilyenkor a redőzött, összefekvő epithelium viszonylag vastagabb réteget képez, és ez miatt ilyen esetekben is detektálhatunk gyengébb indukált fluoreszcenciát, ami a hólyag telítődésekor eltűnik. Ezt elkerülendő javasolt a vizsgálatot mindig telt hólyag mellett elvégezni.⁶⁴

5. A FLUORESzcENS CISZTOSZKÓPIA KLINIKAI ALKALMAZÁSA

5.1. A hagyományos cisztoszkópia hiányosságai

A hólyagdaganatok döntő többsége felismerésekor felületes; izominvázio, metasztázis nem mutatható ki. A megfelelő terápia ellenére ezeknek a daganatoknak az 50-70%-ában lokális recidíva és 15-20%-ában izominvazivitás alakul ki.^{40, 69-72} Mind a magas recidíva, mind a magas progresszió arány jelentős kihatással van a beteg életvitelére, életminőségére és az egészségügyi hálózat munkájára. Ebben a problémakörben figyelembe kell venni a daganatok természetes biológiai viselkedésén kívül a rutindiagnosztika hiányosságait is. Két jelentős oki tényező hatása bizonyítottan közrejátszik az említett morbiditási adatokba. Az egyik legfontosabb ilyen tényező a transzuretrális rezekciók után a hólyagban visszamaradt reziduális daganat. 2-6 héttel a primer beavatkozás után az esetek több mint a felében mutatható ki tumorrezidum a hólyagban. Még szoliter papilláris folyamat esetén is mintegy 25%-ban sikerült a vizsgálóknak reziduális daganatot kimutatni.^{70, 73-77} A reziduális tumorok mellett igen jelentős szerepük van a recidíva, illetve progresszió kialakulásában az úgynevezett lapos neoplasztikus elváltozásoknak. Ide a hólyag diszplasztikus elváltozásai és a carcinoma in situ (CIS) tartoznak. A diszpláziák prekancerózus jellege bizonyított és gyakran már kialakult daganatok mellett találhatóak a hólyagban. (az ISUP az urotheliális neoplazmák közé sorolja a diszpláziát).^{16, 73, 78, 79} A carcinoma in situ progresszióban betöltött szerepe igazolt. Több tanulmánynak sikerült összefüggést igazolnia a CIS elváltozások és a progresszió kialakulása között. Egyes szerzők 50%-os progressziórátát mutattak ki CIS-es betegeknél. CIS esetében a recidívaarány is igen magas, megközelíti a 70%-ot.^{40, 80, 81}

A legnagyobb problémát ezeknek, a recidíva és a progresszió egy részéért felelős elváltozásoknak, a diagnosztikája jelenti. Míg a papilláris, exofititikus, a hólyag lumene felé növekvő daganatok cisztoszkópia során jól diagnosztizálhatóak, a lapos elváltozások és a kimutatható tumorok széli részein elhelyezkedő, a nyálkahártya szintjéből nem kiemelkedő malignus elváltozások gyakran felfedezetlenek maradnak a cisztoszkópos vizsgálat során. Ezen elváltozások felderítésében a vizelet citológiai vizsgálata, a kvadráns és random biopszia terjedt el a konvencionális diagnosztikában. A randombiopszia során, mikor negatívnak imponáló hólyagfali részekről történik a mintavétel, a találati arány a véletlen függvénye.^{82, 83} Ennek ismeretében, bár a citológia magas szenzitivitással képes ezeket az elváltozásokat

kimutatni, hisztológiai igazolásuk kétséges. Ugyanakkor jól differenciált daganatok, diszpláziák esetében a citológia szenzitivitása alacsony és pozitívitás esetén sem ad felvilágosítást a folyamat mélységi terjedéséről. Ezek ismeretében érthető az urológusok törekvése új diagnosztikus módszerek kialakítására, melynek során a megjelölt malignus elváltozásokat célzottan lehet eltávolítani.

5.2. A hólyagdaganatok in-vivo jelölésének története

Whitemore és munkatársai 1966-ban számoltak be először hólyagdaganatok in-vivo jelölésén alapuló diagnosztikus eljárásról. Szisztémás tetraciklin adása után végeztek UV cisztoszkópiát. Ezek a kísérletek a mellékhatások miatt, és mivel biopsziás mintavétel nem volt kivitelezhető UV fény mellett, nem kerültek továbbfejlesztésre.^{82, 84}

1983-ban Fukui és munkatársai metilénkék intravezikális instillációja után végeztek cisztoszkópiát és biopsziás mintavételt. Ennek az eljárásnak az elterjedését a vizsgálat igen alacsony szenzitivitása akadályozta meg.⁸⁵⁻⁸⁷

A nyolcvanas évek második felében szisztémásan adott porfirinek indukálta fluoreszcens cisztoszkópiát hajtottak végre. Jocham fotofirin-2-t, D'Hallewin fotofirin-6-ot alkalmazott fluorokrómként.⁸⁸ A főleg bőrön jelentkező fototoxicitás miatt ezek az eljárások sem terjedtek el a klinikai gyakorlatban.

1992-ben számolt be Kriegmaier az 5-ALA intravezikális instillációja utáni protoporfirin IX indukálta fluoreszcens cisztoszkópiáról.⁵⁰ Az azóta eltelt időben ez az eljárás vált a fotodinámias diagnosztika arany standardjává és világszerte létjogosultságot szerzett a hólyagdaganatok diagnosztikájában.

Lange, Jichlinski és munkatársai alkalmaztak először második generációs protoporfirin IX prekursorként H-ALA-t, fotoszenzitivizáló anyagként.⁵⁶ A módszerrel jelenleg folynak a klinikai tanulmányok, 2001 októberében indult a módszer multicentrikus, klinikai vizsgálata.⁸⁹

2000-ben írta le D'Hallewin hypericin instillációt követően végrehajtott fluoreszcens cisztoszkópiával szerzett tapasztalatait.⁶⁶ Mindezidáig más szerző ezzel a módszerrel szerzett tapasztalatairól nem számolt be.

5.3. Az 5-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópia klinikai alkalmazása

Kriegmair 1992-es közleménye óta a világon széles körben elterjedt diagnosztikus módszer az 5-ALA instillációja utáni protoporfirin IX indukálta fluoreszcencia detektálásán alapuló cisztoszkópia.

Az instillációhoz 50 ml 3%-os 5-ALA oldat a legáltalánosabban elfogadott. Az intravezikális retenció idejét a szerzők többsége 2 órában határozza meg, és minden szerző az instillációt követően 4 órán belül javasolja a vizsgálat végrehajtását. Minden cisztoszkópia és fluoreszcens cisztoszkópia során gyanús terület rezekcióját, illetve biopsziáját tartják a követendő eljárásnak. Minden szerző rendkívül magas szenzitivitásról számol be, de a specificitás megítélésében nagy változatosságot találunk az egyes szerzők által publikált adatok között. A vizsgálat szenzitivitása 83-100% között, specificitása 42-84% között mozog (ld. 2.számú táblázat).^{73, 90-95} Az igen eltérő specificitási adatokat a vizsgálatot végző személy gyakorlottságával, fluoreszcens cisztoszkóppal szerzett tapasztaltságával magyarázhatjuk. Nagy beteganyaggal rendelkező centrumokból származó 65-80% körüli specificitást tarthatjuk reálisnak. Magyarországi tapasztalatainkról Székely és munkatársai, valamint Kovács és munkatársai számoltak be.^{96, 97} Jelenleg folynak kutatások a specificitás javítására, a fluoreszcencia kvantitatív meghatározásával.⁹⁸

	5-ALA indukálta fluoreszcens cystoscopy szenzitivitása	5-ALA indukálta fluoreszcens cystoscopy specificitása
Zaak	92,4%	65,3%
Kriegmair	100%	68,5%
Jichlinski	82,9%	81,3%
Ehsan	98%	65%
Jeon	98%	42,9%
Matveev	98%	76,3%
Cheng	89,1%	83,8%

2. táblázat: 5-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópia szenzitivitási és specificitási adatai

5.4. A H-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópia klinikai alkalmazása

Az 5-ALA észterifikálásával a szabad savnál lipofilebb vegyületet sikerült előállítani, melynek sejtpenetrációja sokkal jobb a hidrofil tulajdonságú eredeti vegyületnél. A jobb penetráció miatt nagyobb protoporfirin IX akkumuláció és jobban detektálható fluoreszcencia várható. Az 5-ALA észterei közül a hexil-aminolevulinsav váltotta be kísérletes körülmények között a hozzáfűzött reményeket.⁵⁵⁻⁵⁶ Jelenleg is folynak multicentrikus tanulmányok az új, második generációs protoporfirin IX prekursor alkalmazásával. Jichlinski és munkatársai, valamint a Hexvix PCB 301/01 Study Group adatai alapján a hexyl-ALA indukálta fluoreszcens cystoscopy specificitási, szenzitivitási értékei az első generációs protoporfirin IX prekursorokéhoz hasonló.^{89, 99}

5.5. Hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópia klinikai alkalmazása

A gyógyászatban régóta ismert növényi eredetű (orbáncfű) fluorokrómról Kamuhabwa vizsgálatai igazolták, hogy urotheliális carcinoma sejtek akkumulálják. D'Hallewin számolt be először hypericin instillálása utáni fluoreszcens cisztoszkópiával szerzett tapasztalatairól. Bevezető tanulmányában 40 beteget vizsgált, és a módszerrel 93%-os szenzitivitás mellett, igen figyelemreméltó 98,5 %-os specificitást ért el.⁶⁶ Ugyanő később nagyobb beteganyagot szerzett tapasztalatok alapján 94%-os szenzitivitás mellett 93%-os specificitásról számolt be.¹⁰⁰ Mindezidáig az irodalomban senki más nem számolt be hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópiával szerzett tapasztalatokról, a további vizsgálatoknak kell eldönteni a vizsgálat valódi értékét.

6. A FLUORESZCENS CISZTOSZKÓPIÁVAL SZERZETT SAJÁT TAPASZTALATOK

6.1. Anyag és módszer

A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvosi Kar Urológiai Klinikáján, valamint a salzburgi St. Johannis Spital Urológiai és Andrológiai Osztályán, 2000 júniusa és 2003 decembere között 89 betegnél végeztük el. Transzuretrális mintavételt hajtottunk végre minden fluoreszcens cisztoszkópia során pozitívítást mutató hólyagterületről, minden hagyományos cisztoszkópia során daganatra gyanús elváltozásból és válogatott esetekben (cisztoszkópia negatív, fluoreszcens cisztoszkópia negatív, vizeletcitológia pozitív) térképbiopsziás mintavételt végeztünk. Összesen 342 mintavétel történt.

A betegek átlag életkora 65,2 év (41-84 év) volt. 51 beteg anamnézisében szerepelt hólyagtumor miatti rezekció és közülük 28 részesült korábban intravezikális kezelésben (BCG, mytomycin). A vizeletüledék vizsgálat 29 esetben negatív volt, 45 betegnek volt mikroszkópikus és 15 betegnek makroszkópos hematuriája.

A betegeknek transzuretrális műtétük előtt 10 Ch-s katéteren keresztül instilláltuk a hólyagjukba a fotoszenzitivizáló anyagot.

59 esetben 1.5 g 5-amino-levulinsavat 50 ml 1.4%-os nátriumbikarbonát oldatban, 18 esetben 40 ml 8 mikromolos hypericin oldatot (0.16 mg hypericin, 4 mikromol polivinilpirrolidon 10 (PVP 10), 4 mikromol polivinilpirrolidon 40 (PVP 40) 40 ml 0.9%-os nátriumklorid oldatban) és 12 esetben 1 g hexil-aminolevulinsavat (Hexvix®) 50 ml 1.4 %-os nátriumbikarbonát oldatban instilláltunk. Az intravezikális retenció ideje 60 és 120 perc között változott.

Műtéti körülmények között hagyományos cisztoszkópiát, majd fluoreszcens cisztoszkópiát végeztünk a tumorgyanús területek detektálása céljából. Ezt követően a hagyományos, majd fluoreszcens cisztoszkóp vezérelte biopsziás mintavételt, illetve transzuretrális rezekciót elvégeztük.

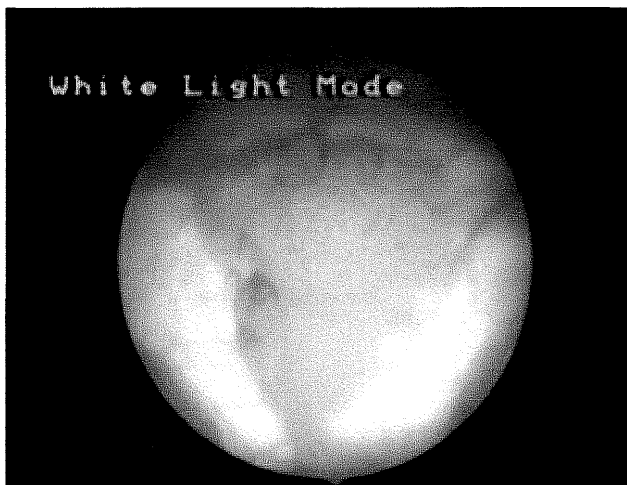
A fluoreszcens cisztoszkópia során a Storz cég által gyártott D-light® fényforrást, fénykábelt, 30 és 70 fokos PDD optikát és Urocam® PDD kamerát használtunk.

6.2. 5-aminolevulinsav indukálta fluoreszcens cisztoszkópia

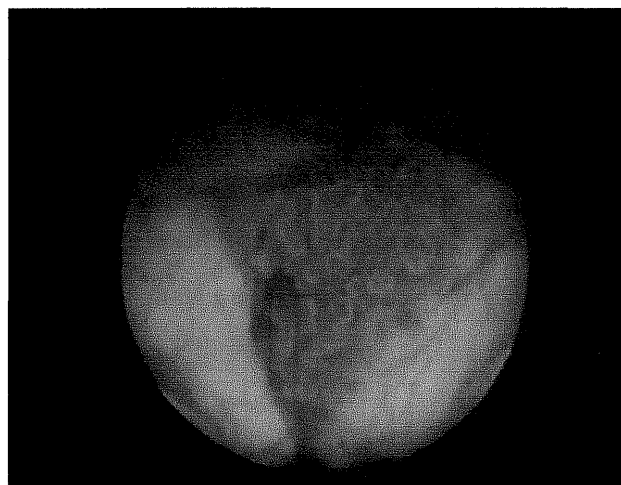
59 betegnél 205 biopsziás mintavételt végeztünk. A szövettani vizsgálat 93 esetben nem igazolt malignitást. 112 biopsziás minta bizonyított hólyagdaganatot.

TxGIII:	1	T1GI:	4	T2aGII:	2	Negatív:	93
TaG0:	5	T1GII:	9	T2aGIII:	8		
TaGI:	37	T1GIII:	21	T3aGIII:	3		
TaGII:	9	CIS:	10	T4aGIII:	2		
TaGIII:	1						

A 112 szövettanilag igazolt daganatos minta közül 109 elváltozás mutatott indukált fluoreszcenciát a fotodinámiás diagnosztika során (4.,5. kép).



4. kép: Papilláris hólyagtumor cisztoszkópos képe



5. kép: A 4. képen látható daganat 5-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópos képe

Három TaGI uroepitheliális carcinoma esetében nem észleltünk indukált fluoreszcenciát.

A 93 szövettanilag malignitás szempontjából negatív minta közül 14 mutatott pozitívítást fluoreszcens cisztoszkópia alkalmazásakor. Ezen esetekben a betegek anamnézisében intravezikális instillációs kezelés szerepelt.

Hagyományos cisztoszkópia során 17 daganatos elváltozás nem került felismerésre.

79 hagyományos cisztoszkópia vezérelte biopszia felesleges volt.

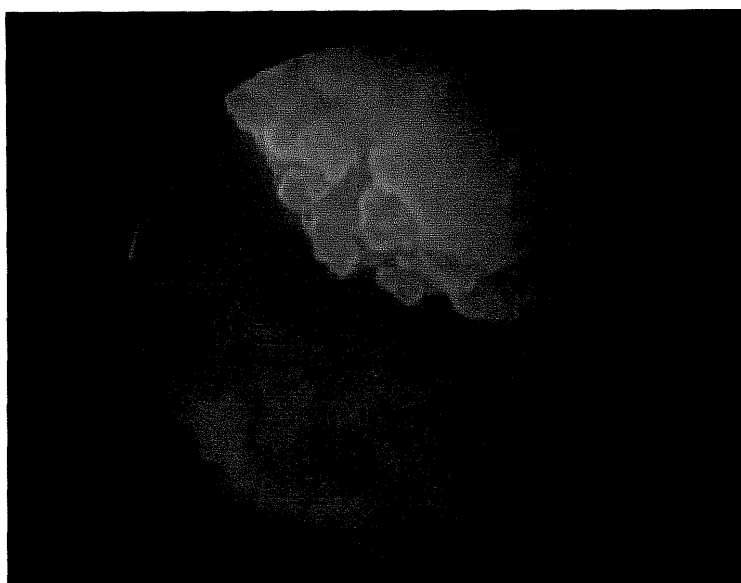
Vizsgálati anyagunkban az 5-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópia szenzitivitása 98%, specificitása 82% volt.

6.3. Hexil-aminolevulinsav által indukált fluoreszcens cisztoszkópia

12 beteg esetében 61 biopsziás mintavételt hajtottunk végre. A szövettani vizsgálat 22 esetben malignitást nem igazolt. 39 esetben a hólyagtumor szövettanilag is igazolódott.

Diszplázia:	5	T1GI:	1	Negatív:	22
TaGI:	22	T1GIII:	3		
TaGII:	1	TxGI:	1		
TaGIII:	1	CIS:	5		

A 39 daganatos elváltozás közül 38 mutatott indukált fluoreszcenciát, fluoreszcens cisztoszkópia során (6. kép).



6. kép: Papilláris hólyagtumor H-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópos képe

Egy diszplasztikus elváltozás esetében nem észleltünk indukált fluoreszcenciát.

A 22 malignitás szempontjából negatív minta közül 6 esetben észleltünk pozitívítást fotodinámiás diagnosztika során. Az álpozitív elváltozások esetében a betegek korábban intravezikális recidíva profilaxisban részesültek.

Konvencionális cisztoszkópia során 8 daganatos elváltozás nem került felismerésre.

4 diszplasztikus elváltozást és 4 in situ carcinomát sikerült fluoreszcens cisztoszkóppal detektálnunk.

16 hagyományos cisztoszkóppal végrehajtott biopszia felesleges volt.

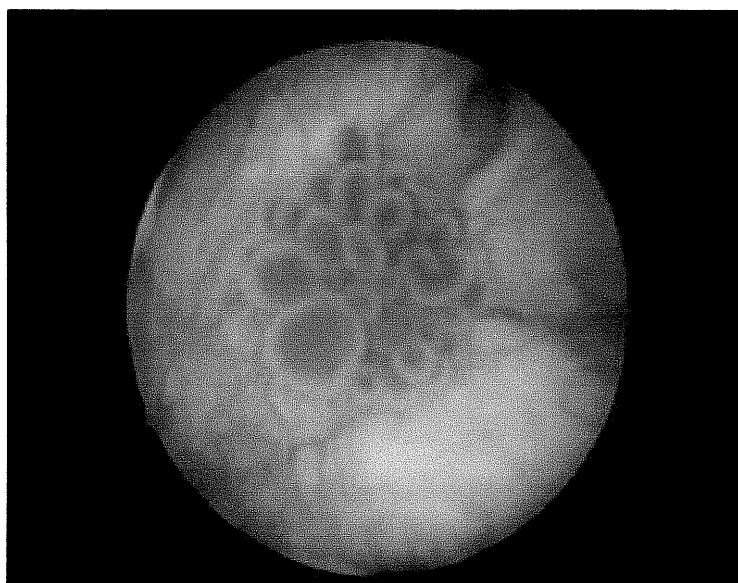
A hexil-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópia szenzitivitása 97 %, specificitása 72 % volt.

6.4. Hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópia

18 betegnél 76 biopsziás mintavételt hajtottunk végre. 43 esetben a szövettani vizsgálat malignitást nem igazolt, 33 mintában sikerült malignitást kimutatni.

Diszplázia:	2	T1GI:	2	T2aGII:	1	Negatív:	43
TaGI:	15	T1GII:	3				
TaGII:	2	T1GIII:	1				
TaGIII:	1	CIS:	6				

Az összes hisztológiailag igazolt tumoros terület pozitív volt fluoreszcens cisztoszkópia során. A 43 negatív szövettani minta közül 8 esetben észleltünk indukált fluoreszcenciát a fotodinámiás vizsgálat során (7. kép).



Ezek a betegek is intravezikális terápián estek át korábban.

Nyolc tumoros területet nem sikerült cisztoszkópia során detektálni. Fluoreszcens cisztoszkóppal 1 TaGI, 1 T1GI daganatot, valamint 6 in situ carcinomát sikerült felismernünk.

Vizsgálataink során a hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópia szenzitivitása 100

7. kép: Papillaris hólyagtumor hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópos képe

%, specificitása 81 % volt.

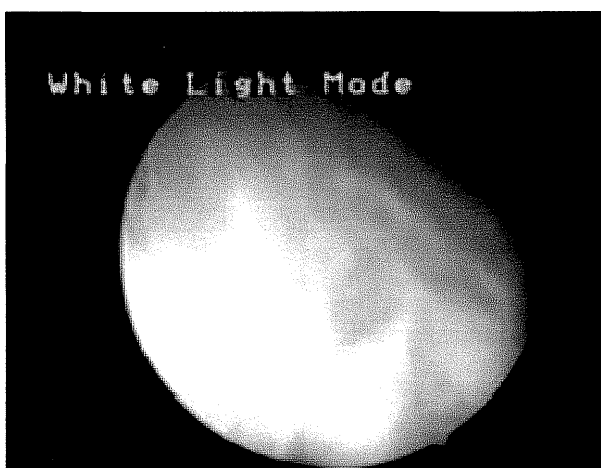
6.5. Az eredmények összegzése

Vizsgálati anyagunkban 89 betegnél 342 mintavételt hajtottunk végre. 184 minta szövettani vizsgálata igazolt urotheliális daganatos elváltozást, míg 158 minta vizsgálata során malignitás nem igazolódott. Összesen 208 indukált fluoreszcenciát mutató területből történt mintavétel, ezek közül 145 elváltozás hagyományos cisztoszkópia során is tumorgyanús volt. 133 biopsziás mintavételi hely nem mutatott indukált fluoreszcenciát.

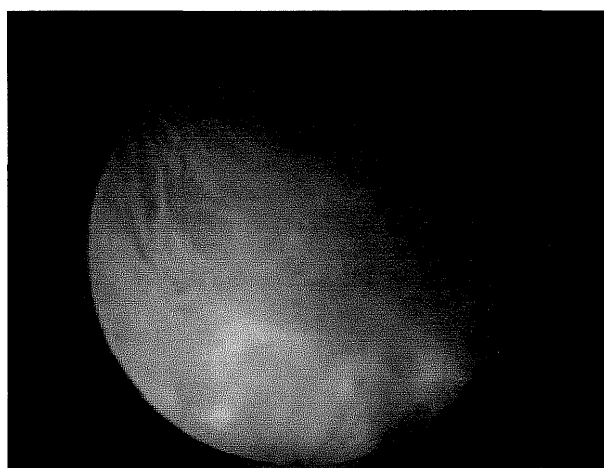
Diszplázia:	7	T1GI:	7	T2aGIII:	8	Negatív:	158
TaG0:	5	T1GII:	12	T3aGIII:	3		
TaGI:	74	T1GIII:	25	T4aGIII:	2		
TaGII:	12	CIS:	21	TxGI:	1		
TaGIII:	3	T2aGII:	3	TxGIII:	1		

184 igazolt daganatos elváltozás közül 180 mutatott indukált fluoreszcenciát, míg 158 negatív területből 29 mutatott ál pozitivitást a fotodinámiás diagnosztika során. Minden beteg, akinél álpozitivitást észleltünk a fotodinámiás vizsgálat során, korábban intravezikális terápiában részesült. Vizsgálati anyagunkban három TaGI daganatot és egy diszplasztikus elváltozást nem sikerült fluoreszcens cisztoszkópia során detektálnunk. A diszpláziát (low grade intraurotheliális neoplázia) a tanulmányunk során tumoros elváltozásként vettük figyelembe.

Hagyományos cisztoszkópia során 33 daganatos elváltozás (6 diszplázia, 19 CIS, 4 TaGI, 1 T1GI, 1 T1GII, 2 T1GIII) nem került felismerésre, ezeket a fluoreszcens cisztoszkópia során sikerült detektálnunk (8., 9. kép).



8. kép: Carcinoma in situ hagyományos cisztoszkópia során



9. kép: A 8. képen látható CIS fluoreszcens cisztoszkópos képe

129 hagyományos cisztoszkóp által vezérelt mintavétel felesleges volt.

A fluoreszcens cisztoszkópia összesített szenzitivitása vizsgálati anyagunkban 98%, specificitása 82% volt.

6.6. Megbeszélés

Vizsgálatainkkal az irodalomban publikált szenzitivitási és specificitási adatokkal összevethető, azoknak megfelelő értékeket igazoltunk. A három különböző fotoszenzitivizáló anyaggal végzett vizsgálataink során szenzitivitásbeli lényeges különbséget nem észleltünk. Specificitási adataink közül a hexil-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópia specificitása

szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az 5-ALA és a hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópia specificitása, bár az alacsony esetszám miatt ennek értékelhetősége kérdéses. Megfigyelhető volt anyagunkban, hogy a vizsgálat specificitását a korábbi intravezikálisan alkalmazott terápia (BCG, mitomycin) jelentősen rontotta. Hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópiáról tudomásunk szerint mindezidáig egy munkacsoport tanulmányai kerültek publikálásra. Beteganyagunkon nem sikerült D'Hallewin által közölt kiváló specificitási értéket reprodukálni, szignifikáns különbség a hypericin és az 5-aminolevulinsav indukálta fluoreszcens cisztoszkópia specificitása között nem volt, korábbi intravezikális kezelés a hypericin indukálta fluoreszcencia specificitását is rontotta. Fotoszenzitivizáló anyagtól függetlenül kiváló szenzitivitásúnak bizonyult a fluoreszcens cisztoszkópia. Saját anyagunkban 184 szövettanilag igazolt tumoros folyamatból 180 elváltozás mutatott indukált fluoreszcenciát, három TaGI daganatot és egy diszplastikus elváltozást hagyományos cisztoszkópia vezérelte mintavétel során sikerült detektálnunk. Ezzel szemben 129 cisztoszkóp vezérelte mintavételt feleslegesen végeztünk el, és a cisztoszkópia során a tumoros folyamatok jelentős hányadát (18%) nem sikerült felismerni. Külön figyelmet érdemel hogy 21 in situ carcinoma közül fluoreszcens cisztoszkópia nélkül csak három került detektálásra (14%). négy beteg esetében a CIS diagnosztizálása terápiás terv módosítását jelentette.

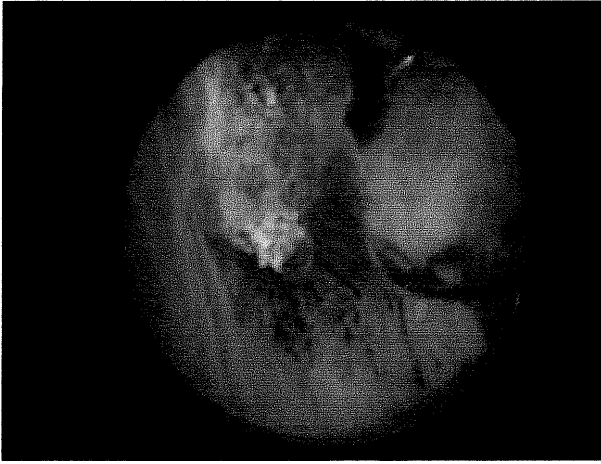
A fluoreszcens endoszkópiák során jól ismert fotoelhalványulást saját anyagunkban is észleltük aminolevulinsav és észterének instillációját követően végzett fluoreszcens cisztoszkópia során, de ez a fenomén nem volt olyan mértékű, hogy a diagnosztikát jelentősen befolyásolta volna. Multiplex elváltozásoknál javasoljuk először a cisztoszkópia során nem, vagy nehezen vizualizálható területek rezekcióját elvégezni. Hypericin alkalmazása során a fotoelhalványulást nem észleltük.

Instillációból származó nem kívánatos mellékhatást, szövődményt nem észleltünk.

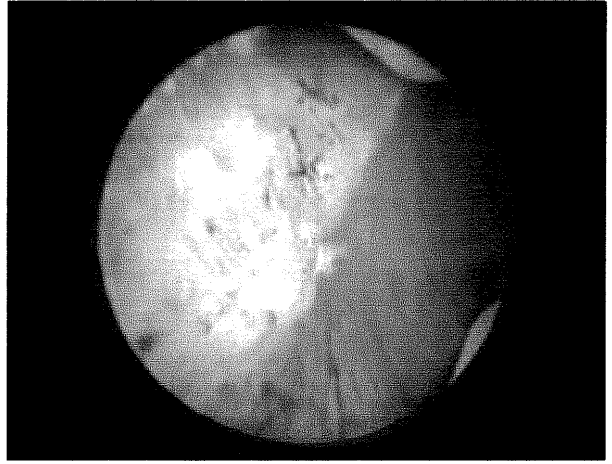
6.7. Következtetések

A fluoreszcens cisztoszkópia biztonságos, igen magas szenzitivitású módszer. Segítségével a nehezen felismerhető, nem exofitikus daganatok is diagnosztizálhatók, így szükség esetén a korábbi kezelési stratégia megváltoztatható.

Nyilvánvaló exofitikus folyamatok mellett elhelyezkedő kisebb folyamatok, malignus, lapos folyamatok diagnosztizálásával és kezelésével, a rezekciós szél pozitivitásának megítélésével a recidíva és a progresszió aránya javítható (10., 11.kép).



10. kép: CIS fluoreszcens cisztoszkópia segítségével történő rezekciója



11. kép: A rezekciós szél érintettsége jól látható fluoreszcens cisztoszkópia során

A kiváló szenzitivitási adatok alapján kimondható, hogy a vakon végzett térkép biopsziák elkerülhetők, így a feleslegesen elvégzett mintavételek száma csökkenthető.

Intravezikális terápián átesett betegeknél számolni kell a magasabb álpozitív esetszámmal.

7. A FLUORESZCENS CITOLÓGIA

7.1. Bevezetés

A hólyagdaganatok diagnosztikájában és nyomon követésében a cisztoszkópia számít az aranystandard eljárásnak. A cisztoszkópia invazív, a betegeknek kellemetlen, gyakoriak a szövődményei. A szakirodalomban számos tanulmány látott napvilágot, ahol új, kevésbé invazív diagnosztikai módszereket próbáltak megalkotni. A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján a különböző eljárások szenzitivitása és specificitása nagyon változó, és egyik sem képes a cisztoszkópiát kiváltani.⁴¹⁻⁴⁴

Célunk olyan új diagnosztikus eljárás megalkotása volt, mellyel a cisztoszkópiák száma csökkenthető a hólyagdaganatok detektálása és nyomon követése során.

Hólyagdaganatok diagnosztikájában a vizelet citológiai vizsgálatának magas a specificitása a differenciáltsági foktól függetlenül, de jól differenciált daganatok esetében alacsony a szenzitivitása. A fotodinámiás diagnosztika a hólyagba juttatott fluorokrómok normál urothelium sejtek és a tumorsejtek eltérő felvételén alapszik, melyet a fluoreszcens cisztoszkópia során évek óta kihasznál az urológia.

A vizeletcitológia és a fotodinámiás diagnosztika alapelveinek ötvözésével kialakítottunk egy új diagnosztikus eljárást, a fluoreszcens citológiát.

7.2. Anyag és módszer

A tanulmányt a salzburgi Landeskrankenhaus St.Johanns Spitalban az Urológiai és Andrológiai Osztályon végeztük el 2001 áprilisa és 2002 februárja között. Összesen 78 beteget vizsgáltunk meg, akik a fluoreszcens citológiai vizsgálat után transzuretrális rezekción estek át. Csak olyan beteget vontunk be a tanulmányba, akiknél a korábbi ambuláns vizsgálatok (cisztoszkópia, citológia, UH) hólyagdaganat alapos gyanúját vetették fel.

A betegek átlag életkora 66,7 év (47-84 év) volt. 42 beteg anamnézisében már szerepelt hólyagtumor miatti rezekció és közülük 23 részesült intravezikális kezelésben korábban (BCG, mitomycin). A vizeletüledék vizsgálat 25 esetben negatív volt, 39 betegnek volt mikroszkópos és 14 betegnek makroszkópos hematuriaja. A betegeknek transzuretrális műtétük előtt 10 Ch-s katéteren keresztül instilláltuk a hólyagjukba a fotoszenzitivizáló anyagot.

48 esetben 1.5 g 5-amino-levulinsavat 50 ml 1.4%-os nátriumbikarbonát oldatban, 18 esetben 40 ml 8 mikromolos hypericin oldatot (0.16 mg hypericin, 4 mikromol polivinilpirrolidon 10 (PVP 10), 4 mikromol polivinilpirrolidon 40 (PVP 40) 40 ml 0.9%-os nátriumklorid oldatban) és 12 esetben 1 g hexil-aminolevulinsavat (Hexvix®) 50 ml 1.4 %-os nátriumbikarbonát oldatban instilláltunk. Az intravezikális retenció ideje 60 és 120 perc között változott. Minimálisan egy órás inkubáció után vizeletmintát vettünk hagyományos és fluoreszcens citológiai vizsgálathoz. Ezt követően a betegek átestek a transzuretrális rezekción.

A fluoreszcens citológiai vizsgálathoz levett vizeletmintát öt percig (1500 fordulat/perc) centrifugáltuk (cytospin). Az indukált fluoreszcenciát Leica DM L mikroszkóppal detektáltuk. Gerjesztéshez 380-425 nm BP szűrőt, az emisszió detektálásához 470 nm LP szűrőt használtunk.

Indukált fluoreszcencia detektálása esetén pozitívnak véleményeztük a fluoreszcens citológiai vizsgálatot. Pozitivitás esetén piros fluoreszkáló sejteket észleltünk a zöld színű normál urothelium sejtek mellett. A vizsgálatokat patológus bevonása nélkül végeztük. Az eredményeket a szövettani vizsgálatok és a hagyományos citológia eredményeivel hasonlítottuk össze.

7.3. Eredmények

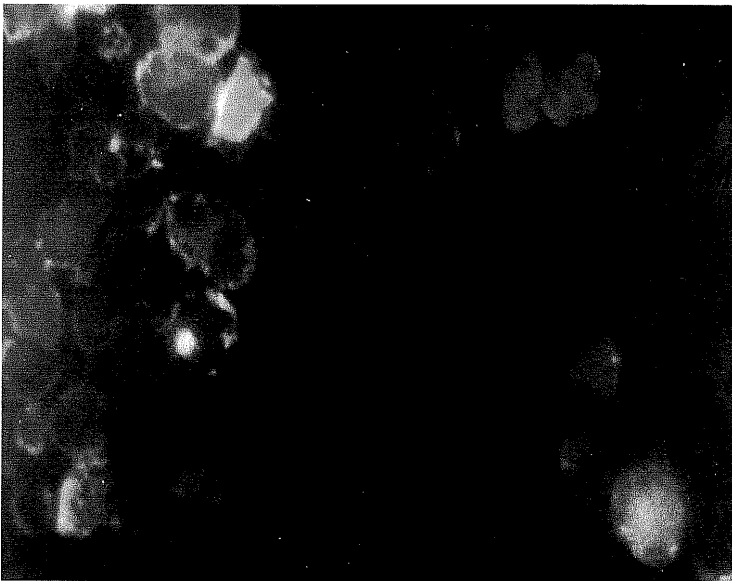
A szövettani vizsgálat 8 esetben nem mutatott malignitást. 32 esetben Ta, 17 esetben T1, 8 esetben CIS, 13 esetben invazív (T2-T4) urotheliális carcinoma igazolódott. Differenciáltsági fok alapján 30 Grade I, 15 Grade II, 25 Grade III tumor nyert bizonyítást. A 8 eset közül, ahol malignitás nem igazolódott 5 beteg 5-ALA, 3 hypericin instillációban részesült.

A 70 hólyagtumoros beteg közül 69-nél volt pozitív a fluoreszcens citológiai vizsgálat, míg a konvencionális citológiai vizsgálat 53 esetben volt pozitív. A fluoreszcens citológia vizsgálat összesített szenzitivitása 98,5 %, míg beteganyagunkban a citológiai vizsgálat összesített szenzitivitása 76 % volt.

Ta:	32	FC pozitív:	31 (97%)	Cit. pozitív:	22 (69%)
T1:	17	FC pozitív:	17 (100%)	Cit. pozitív:	13 (76%)
CIS:	8	FC pozitív:	8 (100%)	Cit. pozitív:	7 (87,5%)
T2-4:	13	FC pozitív:	13 (100%)	Cit. pozitív:	11 (85%)
GI:	30	FC pozitív:	29 (97%)	Cit. pozitív:	18 (60%)
GII:	15	FC pozitív:	15 (100%)	Cit. pozitív:	12 (80%)
GIII:	25	FC pozitív:	25 (100%)	Cit. pozitív:	23 (92%)

7.4. 5-ALA indukálta fluoreszcens citológia

A 48 5-ALA instilláción átesett beteg esetében 44 alkalommal volt a fluoreszcens citológiai vizsgálat pozitív, ezek közül két esetben a hisztológiai vizsgálat malignitást nem igazolt. A 43 hisztológiailag pozitív esetben 42 alkalommal volt a fluoreszcens, és 33 esetben a konvencionális citológiai vizsgálat pozitív. Az 5-ALA által indukált fluoreszcens citológia szenzitivitása 98 %, míg ebben a vizsgálati csoportban a hagyományos citológiai vizsgálaté 77% volt (12. kép).

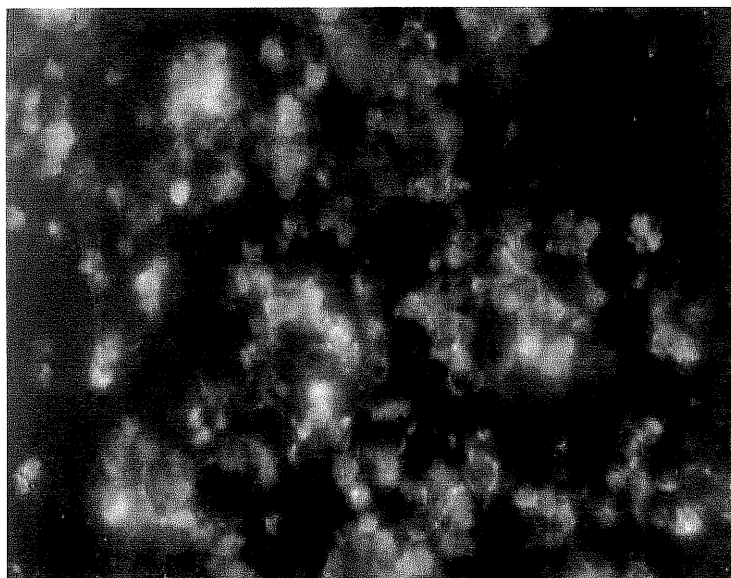


12.kép: T1GI urotheliális carcinoma fluoreszcens citológiai képe 5-ALA instilláció után. Jól látható a malignus sejtek piros indukált fluoreszcensziája és a normál urotheliális sejtek zöld autofluoreszcensziája.
(eredeti nagyítás 400x)

Ta:	21	FC pozitív:	20 (95%)	Cit. pozitív:	14 (66%)
T1:	10	FC pozitív:	10 (100%)	Cit. pozitív:	8 (80%)
CIS:	2	FC pozitív:	2 (100%)	Cit. pozitív:	1 (50%)
T2-4:	10	FC pozitív:	10 (100%)	Cit. pozitív:	10 (100%)
GI:	19	FC pozitív:	18 (94%)	Cit. pozitív:	11 (58%)
GII:	8	FC pozitív:	8 (100%)	Cit. pozitív:	7 (87,5%)
GIII:	16	FC pozitív:	16 (100%)	Cit. pozitív:	15 (94%)

7.5. Hypericin indukálta fluoreszcens citológia

18 betegnél végeztünk hypericin instillációt. három esetben malignitás nem igazolódott, ezek közül egy esetben a fluoreszcens citológiai vizsgálat pozitív volt. A 15 igazolt tumoros beteg közül mindenkinél pozitív volt a fluoreszcens citológiai vizsgálat, míg a hagyományos citológiai vizsgálat 12 esetben. Ebben a vizsgálati csoportban a fluoreszcens citológia szenzitivitása 100 %, a hagyományos citológia szenzitivitása 80 % volt (13. kép).



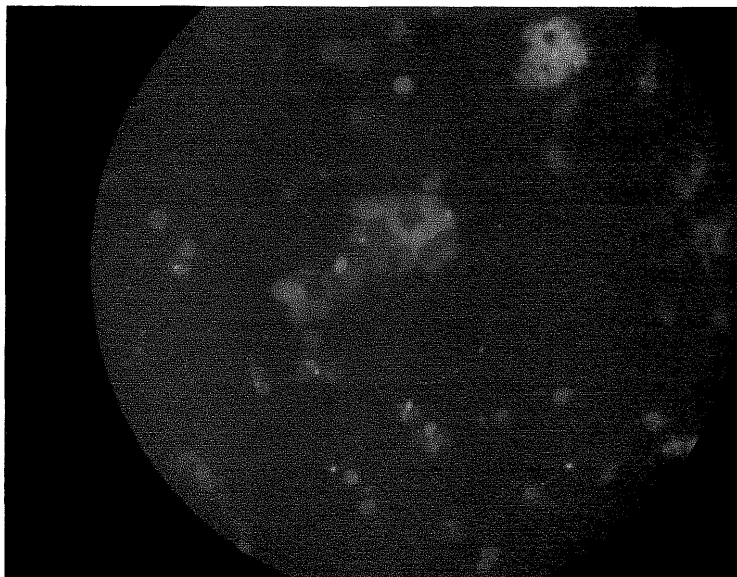
13. kép: TaG I urotheliális carcinoma fluoreszcens citológiai képe hypericin instilláció után (eredeti nagyítás 400x)

Ta:	4	FC pozitív:	4 (100%)	Cit. pozitív:	4 (100%)
T1:	5	FC pozitív:	5 (100%)	Cit. pozitív:	4 (80%)
CIS:	3	FC pozitív:	3 (100%)	Cit. pozitív:	3 (100%)
T2-4:	3	FC pozitív:	3 (100%)	Cit. pozitív:	1 (33%)
GI:	4	FC pozitív:	4 (100%)	Cit. pozitív:	4 (100%)
GII:	6	FC pozitív:	6 (100%)	Cit. pozitív:	4 (67%)
GIII:	5	FC pozitív:	5 (100%)	Cit. pozitív:	4 (80%)

7.6. Hexil-ALA indukálta fluoreszcens citológia

12 beteg esett át hexil-ALA instilláción. Minden betegnél igazolódott a hisztológiai vizsgálat során a tumorgyanú, a fluoreszcens citológia is minden esetben pozitív volt, míg a hagyományos citológiai vizsgálat nyolc esetben volt pozitív.

A fluoreszcens citológia szenzitivitása 100 % volt, míg a konvencionális vizeletcitológia szenzitivitása 67 % (14. kép).



14. kép: T1G II urotheliális carcinoma fluoreszcens citológiai képe H-ALA instilláció után (eredeti nagyítás 400x)

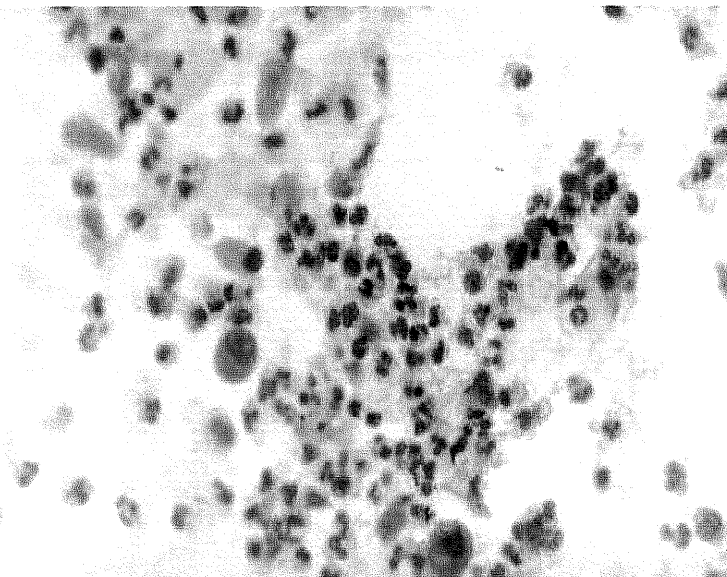
Ta:	7	FC pozitív:	7 (100%)	Cit. pozitív:	4 (57%)
T1:	2	FC pozitív:	2 (100%)	Cit. pozitív:	1 (100%)
CIS:	3	FC pozitív:	3 (100%)	Cit. pozitív:	3 (100%)
G1:	7	FC pozitív:	7 (100%)	Cit. pozitív:	3 (43%)
GII:	1	FC pozitív:	1 (100%)	Cit. pozitív:	1 (100%)
GIII:	4	FC pozitív:	4 (100%)	Cit. pozitív:	4 (100%)

7.7. Megbeszélés

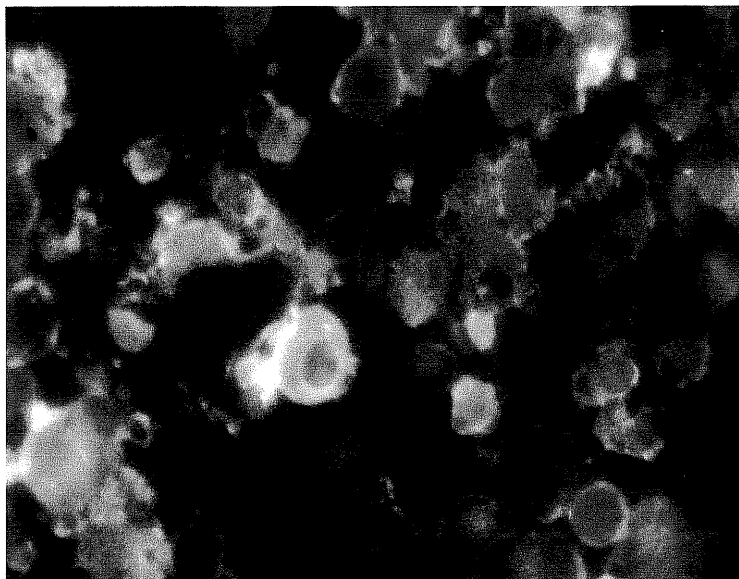
A kezdeti eredmények statisztikai analízise az új módszerünk esetében magas szenzitivitási értéket mutat, bár az esetszám viszonylag alacsony.

A lapos urotheliális léziók detektálása nehéz cisztoszkópia során. Az eredményeink a fluoreszcens citológia jó diagnosztikai értékét támasztják alá lapos elváltozások esetében is. Az indukált fluoreszcenciát mutató daganatos sejtek felismerése sokkal egyszerűbb, mint a malignus sejtek detektálása hagyományos citológiai vizsgálat során (15., 16. kép).

Sem vörösvértestek, sem fehérvérsejtek nem mutattak indukált fluoreszcenciát. A tumorgrádus, a mélységi terjedés és a korábbi intravezikális terápia nem befolyásolta a vizsgálati eredményeket. A hagyományos citológiai vizsgálatok esetében saját anyagunkban is megfigyelhető volt ezzel szemben a tumorgradustól függő szenzitivitás változása.



15. kép: T1G III urotheliális carcinoma citológiai képe (Papanikolau festés, eredeti nagyítás 400x)



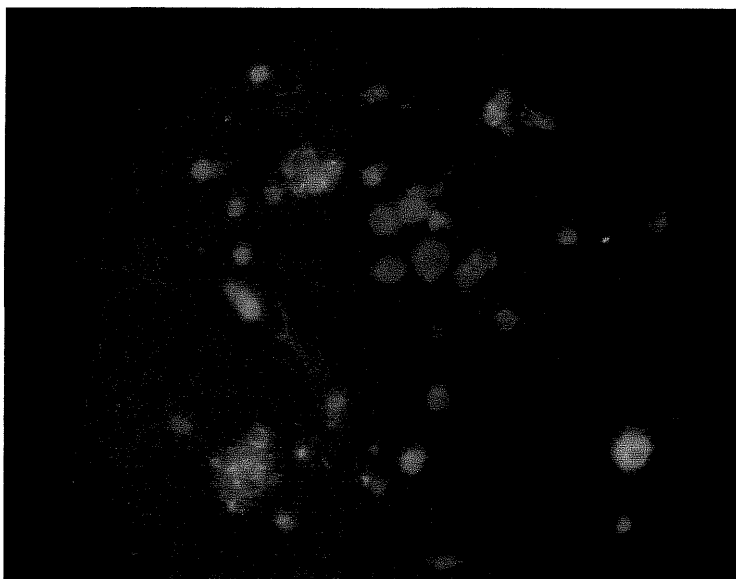
16. kép: A 15. képen látható daganat fluoreszcens citológiai képe 5-ALA instilláció után

A fluoreszcens citológiai vizsgálatot a betegek jól tolerálták, mellékhatást nem észleltünk. A betanulási idő minimális, a hagyományos citológiáéhoz képest összehasonlíthatatlanul rövidebb, és bár szubjektív vizsgálatról van szó, a szubjektivitás sokkal kisebb mértékben játszik szerepet új módszerünknel, mint a hagyományos citológia esetében.

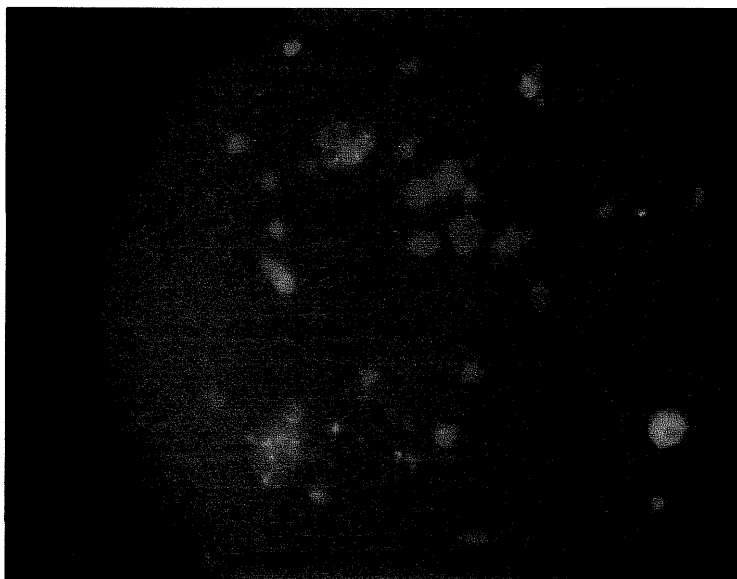
A fotoelhalványulás a látható fluoreszcencia csökkenését jelenti megvilágítás során. A hatás fehér fény esetében is tapasztalható, de kék fényvel történő megvilágítás során sokkal kifejezettebb. Ez a fenomén jól ismert és dokumentált az irodalomban fluoreszcens endoszkópia kapcsán. Aminolevulinsav és hexil észterének alkalmazása során a fluoreszcens citológia során is erős fotoelhalványulást észleltünk, a malignus sejtek piros fluoreszcenciája másodpercek alatt detektálási szint alá csökkent (17., 18. kép).

Ez a vizsgálatok dokumentálásában okozott problémát, magát a diagnosztikát nem befolyásolta. Hypericin instillálása után fotoelhalványulást nem észleltünk.

A fluoreszcens cisztoszkópia szenzitivitásáról és specificitásáról publikált adatokhoz közelítő adatokat kaptunk fluoreszcens citológiai vizsgálataink során.



17. kép: TaG II urotheliális carcinoma fluoreszcens citológiai képe H-ALA instilláció után (eredeti nagyítás 400x)



18. kép: A 17. képen látható daganatról pár másodperccel később készített felvételen jól látható a H-ALA indukálta fluoreszcencia elhalványulása (eredeti nagyítás 400x)

A fluoreszcens citológiai vizsgálatot mind az angol, mind a német nyelvű szakirodalomban leközlöttük.^{67, 101} A közelmúltban munkacsoportunktól független fluoreszcens citológiai vizsgálatok eredményéről számoltak be hasonló eredményekkel.^{68, 102}

A fotoelhalványulás hiánya miatt hypericin instillációját javasoljuk fluoreszcens citológiai vizsgálatoknál.

7.8. Következtetés

A fluoreszcens citológia kevésbé invazív mint a cisztoszkópia és szenzitívebb, mint más, a hólyagtumorer diagnosztikájában alkalmazott eljárás. Az indukált fluoreszcencia detektálása könnyű, a tanulási időszak rövid. További multicentrikus, randomizált vizsgálatok után a mindennapi urológiában bevezethető, a cisztoszkópiák számát csökkentő eljárássá válhat új módszerünk.

8. AZ ÉRTEKEZÉS ÖSSZEGZÉSE

8.1 Hólyagdaganatok in-vivo fotodinámiás diagnosztikája

A hólyagdaganat a férfiak második leggyakoribb, és a nők leggyakoribb urológiai daganatos betegsége, így igen nagyszámú beteget érint. A pontos diagnosztika alapvetően befolyásolja a terápiás terv felállítását és a beteg életkilátásait. Érthető törekvés, a minél pontosabb diagnosztikai módszerek kialakítása, és ezek mindennapi rutin ellátásba történő bevezetése.

A hólyagdaganatok diagnosztikájában és nyomon követésében a cisztoszkópiának van a legnagyobb szerepe, bár hiányosságai ismertek. A hólyag lapos, neoplasztikus elváltozásainak detektálása és az ezzel összefüggő, helyes terápiás terv felállítása a recidíva és progresszió arányt csökkenti. Fluoreszcens cisztoszkópia során ezek az elváltozások jól diagnosztizálhatóak. Fluoreszcens cisztoszkóppal vezérelt biopszia, illetve transzuretrális rezekció során a szövettani diagnózis biztosítása lehetséges, ezen kívül kiemelő a rezekciós szélek épségének megítélése.

A hólyagdaganatok fotodinámiás diagnosztikájában az 5-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópia több éves múltra tekint vissza, számos közlemény alapján bizonyított a szerepe a tumorok diagnosztizálásában. A vizsgálat szenzitivitása 90-95 %, specificitása 65-80 % körüli a nagy beteganyaggal rendelkező centrumok által publikált adatok szerint.

Hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópia alkalmazásáról kevés adat áll rendelkezésünkre, ezek alapján a kiváló szenzitivitás mellett kiváló specificitást sikerült elérni.

Vizsgálataink során három, különböző fluorokróm által indukált fluoreszcens cisztoszkópia adatait vizsgáltuk. Az irodalomban publikált szenzitivitási és specificitási adatokkal összevethető, azoknak megfelelő értékeket igazoltunk 5-ALA indukálta vizsgálatok során.

A három különböző fotoszenzitivizáló anyaggal végzett vizsgálataink kapcsán szenzitivitásbeli lényeges különbséget nem észleltünk. Specificitási adataink közül a hexil-ALA indukálta fluoreszcens cisztoszkópia specificitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az 5-ALA és a hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópia specificitása, bár az alacsony esetszám miatt ennek értékelhetősége kérdéses.

Megfigyelhető volt anyagunkban, hogy a vizsgálat specificitását a korábbi intravezikálisan alkalmazott terápia jelentősen rontotta.

Hypericin indukálta fluoreszcens cisztoszkópiáról tudomásunk szerint mindezidáig egy tanulmány került publikálásra. Beteganyagunkon nem sikerült D'Hallewin által közölt kiváló specificitási értéket reprodukálni, szignifikáns különbség a hypericin és az 5-aminolevulinsav indukálta fluoreszcens cisztoszkópia specificitása között nem volt. Korábbi intravezikális kezelés a hypericin indukálta fluoreszcencia specificitását is rontotta.

Fotoszenzitivizáló anyagtól függetlenül kiváló szenzitivitásának bizonyult a fluoreszcens cisztoszkópia. Vizsgálati anyagunkban a fluoreszcens cisztoszkópia szenzitivitása 98 %, specificitása 82 % volt.

Kiemelendő vizsgálati eredményeinkből, hogy a hagyományos cisztoszkópia vezérelte predilekciós helyekről, valamint a csak hagyományos cisztoszkópiával gyanúsnak ítélt területekről vett biopsziák diagnosztikai értékkel nem bírtak. Ezen eredmények és a fluoreszcens cisztoszkópia kiváló szenzitivitása alapján kimondható, hogy a korábban több szerző által javasolt, vakon végzett, random biopszia helyett fluoreszcens cisztoszkópia vezérelte célzott mintavétel szükséges a lapos, hagyományos cisztoszkóppal nem detektálható daganatok diagnosztizálására. A fluoreszcens cisztoszkópia biztonságos, igen magas szenzitivitású módszer. Segítségével a nehezen felismerhető, nem exofitikus daganatok is diagnosztizálhatók, így szükség esetén a korábbi kezelési stratégia megváltoztatható. Nyilvánvaló exofitikus folyamatok mellett elhelyezkedő kisebb folyamatok, malignus, lapos folyamatok diagnosztizálásával és kezelésével, a rezekciós szél pozitivitásának megítélésével a recidíva és a progresszió aránya javítható.

8.2. Hólyagdaganatok in-vitro fotodinámiás diagnosztikája

A cisztoszkópia kiváltását célzó próbálkozásokról a szakirodalomban számos tanulmány látott napvilágot, ahol új, kevésbé invazív diagnosztikai módszereket próbáltak megalkotni. A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján a különböző eljárások szenzitivitása és specificitása nagyon változó, és egyik sem képes a cisztoszkópiát kiváltani.

Célunk olyan új diagnosztikus eljárás megalkotása volt, mellyel a cisztoszkópiák száma csökkenthető a hólyagdaganatok detektálása és nyomon követése során.

A vizeletcitológia és a fotodinámiás diagnosztika alapelveinek ötvözésével kialakítottunk egy új diagnosztikus eljárást, a fluoreszcens citológiát.

Fluorokrómok instillálása után nyert vizeletmintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A normál autofluoreszcencia mellett, a daganatos sejtek indukált fluoreszcenciáját detektáltuk. A betegeket ezt követően transzuretrális rezekción estek át. A fluoreszcens citológiai vizsgálat eredményét a szövettani és a hagyományos citológiai vizsgálat eredményeivel hasonlítottuk össze.

Három különböző fluorokrómmal végeztük a vizsgáatainkat. A fotoszenzitivizáló anyagtól függetlenül igen magasnak bizonyult az új eljárás szenzitivitása. A hagyományos citológiai vizsgálat szenzitivitása vizsgálati anyagunkban 76 %, míg a fluoreszcens citológia szenzitivitása 98,5 % volt.

5-ALA és hexil észterének instillálása után végzett vizsgálatnál a fotoelhalványulás jelensége volt észlelhető, ami a diagnosztikát nem, csak a vizsgálat dokumentálását nehezítette. Hypericin alkalmazásakor a fotoelhalványulást nem tapasztaltunk, ezért a vizsgálatához ezt a fluorokrómot javasoljuk.

A fluoreszcens citológiai vizsgálatot a betegek jól tolerálták, mellékhatást nem észleltünk. A betanulási idő minimális, a hagyományos citológiához képest összehasonlíthatatlanul rövidebb, és bár szubjektív vizsgálatról van szó a szubjektivitás sokkal kisebb mértékben játszik szerepet új módszerünknel, mint a hagyományos citológia esetében. Az indukált fluoreszcenciát mutató daganatos sejtek felismerése sokkal egyszerűbb, mint a malignus sejtek detektálása hagyományos citológiai vizsgálat során.

Az általunk kifejlesztett új eljárást az angol és német nyelvű szakirodalomban is leközöltük. A közelmúltban munkacsoportunktól független szerzők hasonló eredményekről számoltak be a fluoreszcens citológiával kapcsolatban.

A fluoreszcens citológia rendkívül szenzitív, a cisztoszkópiánál kevésbé invazív vizsgálat, ami további multicentrikus, randomizált vizsgálatok után a mindennapi urológiai gyakorlatba bevezethető, a cisztoszkópiák számát csökkenthető eljárássá válhat.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Örök hálával tartozom **dr. Nikolaus Theodor Schmeller** professzor úrnak, akinek segítségével, atyai támogatása nélkül PhD munkám nem készülhetett volna el.

Köszönöm **dr. Farkas László** professzor úrnak, hogy lehetővé tette és messzemenőig támogatta tudományos munkámat és köszönöm **dr. Götz Frigyes** professzor úrnak emberi jóságát, és azt, hogy urológiai pályámon elindított.

Külön köszönet illeti **dr. Klaus Fink** főorvos urat, aki salzburgi munkám idején szakmai és emberi segítségével megkönnyítette munkámat, **dr. Buzogány István** adjunktus urat, akinek támogatása, biztatása nélkül nem vágtam volna bele a külföldi munkavállalásba, valamint **dr. Somogyi László** docens urat szakmai tanácsaiért. Köszönöm **dr. Szántó Árpád** és **dr. Fábos Zoltán** adjunktus uraknak, hogy ausztriai tartózkodásom során nehéz pillanataimban is mindig mellettem álltak és tartották bennem a lelket és az „otthonhoz” a kapcsolatot szolgáltatták. Köszönöm **dr. Sülecz Istvánnak** a tördelési és szerkesztési munkában nyújtott segítségét.

Ezen kívül szeretnék köszönetet mondani a **Pécsi Urológiai Klinika**, valamint a **Salzburgi Kórház Urológiai és Andrológiai Osztály minden dolgozójának** segítségükért.

Hála és köszönet szüleimnek, **dr. Pytel Józsefnek** és **dr. Horváth Katalinnak** mindenért. Köszönöm feleségemnek **dr. Németh Dórának**, hogy számomra a nyugodt családi háttérrel biztosította, hogy támogatott, bízott.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Waters W.B.: Invasive bladder cancer-where do we go from here? Editorial. *J Urol*, 155: 1910-1911, 1996
2. Raitanen M.P., Nieminen P., Tamella T.L.J.: Impact of tumor grade, stage, number and size, and smoking and sex on survival in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol*, 76: 470-474, 1995
3. Chinegwundoh F.I., Kaisary A.V.: Polymorphism and smoking in bladder carcinogenesis. *Br J Urol*, 77: 672-675, 1996
4. McCahy P.J., Harris C.A., Neal E.: The accuracy of recording of occupational history in patients with bladder cancer. *Br J Urol*, 79: 91-93, 1997
5. Vineis P., Simonato L.: Proportion of lung and bladder cancers in males resulting from occupation: a systematic approach. *Arch Environ Health*, 46: 6-15, 1991
6. Lucas S.B.: Squamous cell carcinoma of the bladder and schistosomiasis. *East Afr Med J*, 59: 345-349, 1982
7. Piper J.M., Tonascia J., Metanoski G.M.: Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 40 years. *N Engl J Med*, 313: 292-295, 1985
8. Cohen S.M., Johansson S.L.: Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am*, 3: 421-427, 1992
9. Tuttle T.M., Williams G.M., Marshall F.F.: Evidence for cyclophosphamide-induced transitional cell carcinoma in a renal transplant patient. *J Urol*, 140:1009-1014, 1988
10. Messing E.M., Catalona W.: Urothelial tumours of the urinary tract, in Walsh P.C., Retik A.B., Vaughan E.D., Wein A.J. (Eds): *Campbell's Urology*. Philadelphia, W.B Saunders Company 1998 pp 2332-2333
11. Vogelstein B.: A deadly inheritance. *Nature (London)*, 348: 681-690, 1990
12. Liota L.A. Tumor invasion and metastasis. Role of extracellular matrix. *Cancer Res*, 46: 1-7, 1989
13. Mostofi F.K.: Potentialities of bladder epithelium. *J Urol*, 71: 715-723, 1954
14. Kantor A.F., Hartge P., Hoover R.N. et al: Epidemiological characteristics of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 48:3853-3867, 1988
15. Sobin D.H., Witteking C.H.: *Classification of Malignant Tumours*, 5th edn. New York, Wiley-Liss 1997

16. Epstein J.I., Amin M.B., Reuter V.R., Mostofi F.K. and the Bladder Consensus Conference Committee: The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Urinary Bladder. *Am J Surgical Pathology*, 22(12):1435-1448, 1998
17. Tosini I., Wagner U., Sauter G. et al: Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. *BJU Int*, 85:48-53, 2000
18. Abel P.D., Henderson D., Burnett M.K. et al: Differing interpretations by pathologists of pT category and grade of transitional cell cancer of the bladder. *Br J Urol*, 62: 339-342, 1988
19. Sharkey F.E., Sarosdy M.F.: The significance of central pathology review in clinical studies of transitional cell carcinoma in situ. *J Urol*, 157: 68-71, 1997
20. Cookson M.S., Herr H.W., Zhang W. et al: The treated natural history of high risk superficial bladder cancer: 15 year outcome. *J Urol*, 158: 62-67, 1997
21. Herr H.W.: Tumour progression and survival in patients with T1 G3 bladder tumours: 15 year outcome. *Br J Urol*, 80: 762-765, 1997
22. Mariani A.J., Mariani M.C., Machioni C. et al.: The significance of adult hematuria: 1000 hematuria evaluations including a risk-benefit and cost effectiveness analysis. *J Urol*, 141: 350-355, 1988
23. Mohr D.N., Offord K.P., Owen R.A., Melton L.I.: Asymptomatic microhematuria and urologic disease. A population based study. *JAMA*, 256: 224-229, 1986
24. Sultana S.R., Goodman C.M., Byrne D.J., Baxby K.: Microscopic hematuria: urological investigations using a standard protocol. *Br J Urol*, 78: 691-698, 1996
25. Cummings K.B., Barone J.G., Ward W.S.: Diagnosis and staging of bladder cancer. *Urol Clin North Am*, 19: 455-465, 1992
26. Guilliford M.C., Petruckevitch A., Burney P.G.J. et al.: Survival with bladder cancer, evaluation of delay in treatment, type of surgeon, and modality of treatment. *BMJ*, 303: 437-440
27. Manson A., Anderson H., Colleen S.: Time lag to diagnosis of bladder cancer – influence of psychosocial parameters and level of health-care provision. *Scand J Urol Nephrol*, 27: 363-365, 1993
28. See W.A., Fuller J.R.: Staging of advanced bladder cancer: current concepts and pitfalls. *Urol Clin North Am*, 19: 663-683, 1992

29. Badalament R.A., Fair W.R., Whitmore W.F., Melaned M.R.: The relative value of cytometry and cytology in the management of bladder cancer. *Semin Urol*, 6: 22-30, 1988
30. Brown F.M.: Urine cytology. Is still the gold standard for screening? *Urol Clin North Am*, 27:25-37, 2000
31. Bastacky S., Ibrahim S., Wilczynski S.P. et al: The accuracy of urinary cytology in daily practice. *Cancer*, 87: 118-128, 1999
32. Planz B., Synek C., Robben J., et al: Diagnostic accuracy of DNA image cytometry and urinary cytology with cells from voided urine in the detection of bladder cancer. *Urology*, 56: 782-786, 2000
33. Lahme S., Bichler K.H., Feil G., et al: Comparison of cytology and nuclear matrix protein 22 for the detection and follow-up of bladder cancer. *Urol Int*, 66: 72-77, 2001
34. Dershaw D.D., Panicek D.M.: Imaging of invasive bladder cancer. *Semin Oncol*, 17: 544-550, 1990
35. Goessl C., Knispel H.H., Miller K., Klan R.: Is routine excretory urography necessary at first diagnosis of bladder cancer? *J Urol*, 157:480-481, 1997
36. Holmäng S., Hedelin H., Anderström C, et al: Long-term follow-up of bladder carcinoma cohort: routine follow-up urography is not necessary. *J Urol*, 160:45-48, 1998
37. Husband J.E.: Staging bladder cancer. *Clin Radiol*, 46: 153-159, 1992
38. Malmstrom P.U., Lonnemark M., Busch C., Magnusson A.: Staging of bladder carcinoma by computer tomography-guided trans-mural core biopsy. *Scand J Urol Nephrol*, 27: 193-198, 1993
39. Soloway M., Murphy W., Rao M., Cox C.: Serial multiple site biopsies in patients with bladder cancer. *J Urol*, 120: 57-59, 1978
40. Kiemeny L., Witjes J.A., Heijbroek R., et al: Should random urothelial biopsies be taken from patients with primary superficial bladder cancer? A decision analysis. Members of the Dutch South-East-Co-operative Urological Group. *Br J Urol*, 73: 164-171, 1994
41. Lokeshwar V.B., Soloway M.S.: Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? *J Urol*, 165: 1067-1077, 2001
42. Konety B.R., Getzenberg R.H.: Urine based markers of urological malignancy. *J Urol*, 165: 600-611, 2001

43. Grossman H.B.: Biomarkers for transitional cell carcinoma – pro. *Urology*, 57: 847-848, 2001
44. Schoenberg M.: Biomarkers for transitional cell carcinoma – con. *Urology*, 57: 849-851, 2001
45. Stepp H.: Autofluorescence, in Baumgartner R., Kriegmair M., Hofstetter A. (Eds.): Fluorescence diagnosis of bladder tumor using 5-aminolevulinic acid – Fundamentals and Results, Tuttlingen, Verlag Endo-Press 2000, pp 22-23
46. Lam S., Kennedy T., Unger M. et al: Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest*, 113: 696-702, 1998
47. Anidjar M., Etori D., Cussenot O. et al: Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder tumors: dependence on the excitation wavelength. *J Urol*, 156: 1590-1596, 1996
48. König F., McGovern F.J., Althausen A.F. et al: Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. *J Urol*, 156: 1597-1601, 1996
49. Malik Z., Lugaci H.: Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br J Cancer*, 56: 589-595, 1987
50. Kriegmair M., Baumgartner R.: Intravesikukäre Instillation von Delta-Aminolävulinsäure (ALA) – Eine neue Methode zur photodynamischen Diagnostik und Therapie. *Laser-Medizin*, 8: 83, 1992
51. Steinbach P., Weingandt H., Baumgartner R. et al: Cellular fluorescence of the endogeneous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol*, 62: 887-895, 1995
52. Kennedy J.C., Pottier R.H., Pross D.C.: Photodynamic therapy with endogeneous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photocem Photobiol* 6: 143-148, 1990
53. Steinbach P., Kriegmair M., Baumgartner R. et al: Intravesical instillation of δ -aminolevulinic acid (ALA): The fluorescent metabolite is limited to urothelial cells. *Urology*, 44: 676:681, 1994
54. Rubino G.F., Rasetti L.: Porphyrin metabolism in human neoplastic tissues. *Panminerva Med*, 8: 290-292, 1966
55. Marti A., Lange N., van den Bergh H. et al: Optimisation of the formation and distribution of protoporphyrin IX in the urothelium: an in vitro approach. *J Urol*, 162: 546-552, 1999

56. Lange N., Jichlinski P., Zellweger M. et al: Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. *Br J Cancer*, 80: 185-193, 1999
57. Uehlinger P., Zellweger M., Waginieres G. et al: 5-aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 000: 000-000 (1-9), 2000
58. Kamuhabwa A.R., Agostinis P., D'Hallewin M.A. et al: Photodynamic activity of hypericin in human urinary bladder carcinoma cells. *Anticancer Res*, 20:2579-2584, 2000
59. Lavie G., Mazur Y., Lavie D., Meruelo D.: The chemical and biological properties of hypericin – a compound with a broad spectrum of biological activities. *Med Res Rev*, 15: 111-119, 1995
60. Diwu Z., Lown J.W.: Photosensitization with anticancer agents. 17. EPR studies of photodynamic action of hypericin: formation of semiquinone radical and activated oxygen species on illumination. *Free Radic Biol Med*, 14: 209-215, 1993
61. Vandenbergarde A.L., Geboes K.R., Cuveele J.F. et al: Antitumor activity of photosensitized hypericin on A4: Antitumor activity of photosensitized hypericin on A431 cell xenografts. *Anticancer Res* 16: 1611-1618, 1996
62. Vandenbergarde A.L., Kamuhabwa A., Delaey E. et al: Photocytotoxicity effect of pseudohypericin versus hypericin. *J Photochem Photobiol B*, 45: 79-87, 1998
63. Andreoni A., Colasanti A., Colasanti P. et al: Laser photosensitization of cells by hypericin. *Photochem Photobiol*, 59: 529-533, 1994
64. Wagner S., Stepp H.: Technical principles of fluorescence cystoscopy, in Baumgartner R., Kriegmair M., Hofstetter A. (Eds.): *Fluorescence diagnosis of bladder tumor using 5-aminolevulinic acid – Fundamentals and Results*, Tuttlingen, Verlag Endo-Press 2000, pp 25-36
65. Kriegmair M., Hofstetter A.: Photodynamische Diagnose (PDD) zur Früherkennung des Harnblasenkarzinoms. *Endo World Uro* 17/3: 1-12, 1998
66. D'Hallewin M.A., De Witte P.A., Waelkens E. et al: Fluorescence detection of flat bladder carcinoma in situ after intravesical instillation of hypericin. *J Urol*, 164: 349-351, 2000
67. Pytel A., Scmeller N.: New aspect of photodynamic diagnosis of bladder tumors: Fluorescence cytology, *Urology* 59: 216-219, 2002

68. Olivo M., Lau W., Manivasagern V. et al: Novel photodynamic diagnosis of bladder cancer: ex vivo fluorescence cytology using hypericin. *Int J Oncol* 23(6): 1501-1504 2003
69. Oosterlinck W., Kurth K.H., Schroeder F. et al: A prospective European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol* 149: 749-752, 1993
70. Fitzpatrick J.M., West A.B., Butler M.R. et al: Superficial bladder tumors (stage pTa, grades 1 and 2): the importance of recurrence pattern following initial resection. *J Urol* 135: 920-922, 1986
71. Pryor J.P.: Factors influencing the survival of patients with transitional cell tumours of the urinary bladder. *Br J Urol* 45:586-592, 1973
72. Holmäng S., Hedelin H., Anderstrom C. et al: Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol* 162: 702-707, 1999
73. Zaak D., Kriegmair M., Stepp H. et al: Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid: results of 1012 fluorescence endoscopies. *Urology* 57: 690-694, 2001
74. Klän F., Loy V., Huland H.: Residual tumor discovered in routine second transurethral resection in patients with stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 146: 316-318, 1991
75. Köhrmann K.U., Woeste M., Kappes J. et al: Der Wert der transurethralen Nachresektion beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom. *Akt. Urol* 25: 208-213, 1994
76. Mersdorf A., Brauers A., Wolff J.M. et al: 2nd TUR for superficial bladder carcinoma: A must? *J Urol* 159: 5 (Suppl) 1998
77. Vögeli T.A., Grimm M.O., Ackermann R.: Prospective study for quality control of TUR of bladder tumors by routine 2nd TUR (ReTUR). *J Urol* 159:5 (Suppl) 1998
78. Hartmann A., Rösner U., Schlake G. et al: Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis. *Lab Invest* 80: 709-718, 2000
79. Hartmann A., Moser K., Kriegmair M. et al: Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 154: 721-727, 1999

80. Althausen A.F., Prout G.R., Daly J.J.: Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol* 116: 575-580, 1976
81. Flamm J., Dona S.: The significance of bladder quadrant biopsies in patients with primary superficial bladder carcinoma. *Eur Urol* 16: 81-85, 1989
82. Zaak D.: Bladder cancer, in Baumgartner R., Kriegmair M., Hofstetter A. (Eds.): Fluorescence diagnosis of bladder tumor using 5-aminolevulinic acid – Fundamentals and Results, Tuttlingen, Verlag Endo-Press 2000, pp 8-10
83. Kiemeny L.A., Witjes J.A., Heijbroek R.P. et al: Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. *J Urol* 150: 60-64, 1993
84. Whitmore W.F., Bush I.M.: Ultraviolet cystoscopy in patients with bladder cancer. *J Urol* 95: 201 (1966)
85. Fukui I., Yokokawa M., Mitani G. et al: In vivo staining test with methylene blue for bladder cancer. *J Urol* 130: 252-255, 1983
86. Schmeller N., Löhns U., Hofstetter A.: In-vivo Anfärbung maligner Areale durch Methylenblau-Instillation in die Blase. *Verh Dtsch Ges Urol* 37: 580, 1985
87. Vicente J., Chechile G., Algabe F.: Value of in vivo mucosa-staining with methylene blue in the diagnosis of pretumoral and tumoral lesions of the bladder. *Eur Urol* 13:15, 1987
88. Jocham D., Baumgartner R., Fuchs N. et al: Die Fluoreszenzdiagnose Porphyrinmarkierter urothelialer Tumoren. *Urologe*, 28: 59, 1989
89. Jichlinski P., Guillou I., Karlsen S.J. et al: Hexyl aminolevulinat fluorescence cystoscopy: new diagnostic tool for photodiagnosis of superficial bladder cancer – a multicenter study. *J Urol*, 170: 226-229, 2003
90. Kriegmair M., Baumgartner R., Knuechel R. et al: Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology*, 44: 836-841, 1994
91. Jichlinski P., Wagnieres G., Forrer M. et al: Clinical assesment of fluorescence cystoscopy durin transurethral bladder resection in superficial bladder cancer. *Urol Res*, 25: 3-6, 1997
92. Cheng C.W., Lau W.K., Tan P.H., Olivo M.: Cystoscopic diagnosis of bladder cancer by intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence – the Singapore experience. *Ann Acad Med Singapore*, 29: 253-158, 2000

93. Jeon S.S., Kang I., Hong J.H. et al: Diagnostic efficacy of fluorescence cystoscopy for detection of urothelial neoplasms. *J Endourol* 15: 753-759, 2001
94. Matveev B.P., Kudashev B.V., Bukharin B.V. et al: Role of fluorescent control in raising radicality of surgical treatment for superficial bladder cancer. *Urologiia*, 3: 22-26, 2000
95. Ehsan A., Sommer F., Haupt G., Engelmann U.: Significance of fluorescence cystoscopy for diagnosis of superficial bladder cancer after intravesical instillation of delta aminolevulinic acid. *Urol Int*, 67: 298:304, 2001
96. Székely J., Somogyi L., Villányi K.: Kezdeti tapasztalataink urothelialis neoplasticus folyamatok kimutatásával 5-amino-levulinsav intravesicalis instillációját követően. *LAM*, 8: 276-279, 1998
97. Kovács A., Szolnoki Gy., Szapanidisz J., Wabrosch G.: A fotodinámiás diagnosztika (PDD) bevezetése felületes hólyagdaganatok eseteiben osztályunkon. *Magyar Urol.*, 2: 155-158, 1999
98. Zaak D., Frimberger D., Stepp H. et al: Quantification of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection. *J Urol* 166: 1665-1669, 2001
99. Scmiedbauer J., Witjes F., Schmeller N. et al.; Hexvix PCB301/01 Study Group: Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy. *J Urol* 171: 135-138, 2004
100. D'Hallewin M.A., Kamuhabwa A., Roskams T. et al: Hypericin-based fluorescence diagnosis of bladder carcinoma. *BJU Int* 89: 760-763, 2002
101. Pytel A., Meissner P., Fink K.G., Schmeller N.: Die Fluoreszenz-Zytologie in der Diagnostik von Blasentumoren. *J Urol und Urogynec* 3: 45-45, 2001
102. Tauber S., Schneede P., Liedl B. et al: Fluorescence cytology of the urinary bladder. *Urology*, 61: 1067-1071, 2003

NEW ASPECT OF PHOTODYNAMIC DIAGNOSIS OF BLADDER TUMORS: FLUORESCENCE CYTOLOGY

AKOS PYTEL AND NIKOLAUS SCHMELLER

ABSTRACT

Objectives. To establish a new diagnostic method for the detection and follow-up of bladder cancer that combines the principles of photodynamic diagnosis and urinary cytology.

Methods. We investigated 46 patients scheduled for transurethral resection of a bladder tumor immediately before the resection was carried out. After intravesical instillation of either 5-aminolevulinic acid (ALA) or hypericin, urinary cytology specimens were obtained. Induced fluorescence of urothelial cells was detected by fluorescence microscopy. The results were compared with the conventional cytologic and histologic findings.

Results. In the 46 patients, 42 cases of urothelial carcinoma and 4 cases of nonspecific inflammation were diagnosed. Of the 42 patients with cancer, 19 had Stage Ta, 9 had T1, 3 had carcinoma in situ, and 11 had invasive bladder cancer. The grading was G1 in 17 patients, G2 in 6 patients, and G3 in 19 patients. In 38 cases we instilled ALA and in 8 hypericin. All 4 patients diagnosed with nonspecific inflammation had received ALA. We detected ALA-induced fluorescence in 34 of 38 cases. One of the four histologically negative cases had a false-positive finding and 1 case of urothelial carcinoma did not show fluorescence. After instillation of hypericin we could detect induced fluorescence in all cases.

Conclusions. Our first results suggest that fluorescence cytology is more sensitive than other noninvasive tests. After additional investigation, it may become a valuable diagnostic method and may reduce the number of cystoscopies in the follow-up of bladder tumors. *UROLOGY* 59: 216-219, 2002. © 2002, Elsevier Science Inc.

Cystoscopy is the reference standard in the detection and follow-up of bladder tumors. Several studies have been published that tried to establish new, less invasive, diagnostic methods. The currently available data show a high variability regarding sensitivity and specificity in different tests, but none can replace cystoscopy.¹⁻⁴ The aim of our study was to establish a new diagnostic method in the detection and follow-up of bladder cancer that may spare patients cystoscopy. Urinary cytology has high specificity for all grades of cancer but low sensitivity in the case of well-differentiated tumors.⁵⁻⁷ With photodynamic diagnosis (PDD) of bladder tumors, differences between the normal

urothelium and urothelial tumors in the uptake of different fluorescent compounds is used. This results in visible red fluorescence of urothelial tumors when seen under blue light. Administration of 5-aminolevulinic acid (ALA), a compound in the heme biosynthesis pathway, causes tumor-specific accumulation of protoporphyrin IX, a fluorescent compound.⁸ Hypericin, a polycyclic aromatic quinone, is a natural pigment synthesized by plants of the *Hypericum* family (St. John's wort). After intravesical instillation of hypericin, the selective cellular uptake of this fluorescent compound by urothelial carcinoma cells occurs.⁹ After appropriate excitation with violet light (wavelength 385 to 450 nm), orange-red fluorescence (wavelength 600 to 640 nm) of the urothelial neoplastic cells can be detected. PDD of bladder tumors provides high sensitivity at an acceptable specificity, but it is more invasive than other tests for the detection and follow-up of bladder cancer.^{10,11} By combining the principles of conventional cytology and PDD, we hoped to establish a new diagnostic method, fluorescence cytology.

A. Pytel was supported by a scholarship from the European Scholarship Programme (EUSP).

From the Department of Urology and Andrology, St. Johanns-Spital Landeskrankenhaus, Salzburg, Austria

Reprint requests: Akos Pytel, M.D., Department of Urology and Andrology, St. Johanns-Spital Landeskrankenhaus, Muellner Hauptstrasse 48, Salzburg 5020, Austria

Submitted: July 2, 2001, accepted (with revisions): October 1, 2001

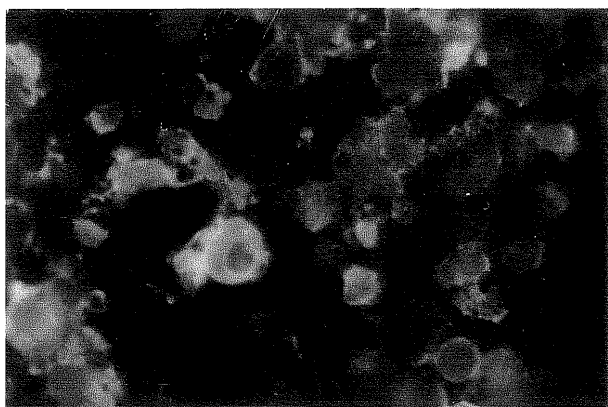


FIGURE 1. Fluorescence cytologic view of a T1G1 urothelial carcinoma, using ALA for photosensitization. Red fluorescence of malignant and green autofluorescence of normal urothelial cells are seen. Original magnification $\times 400$.

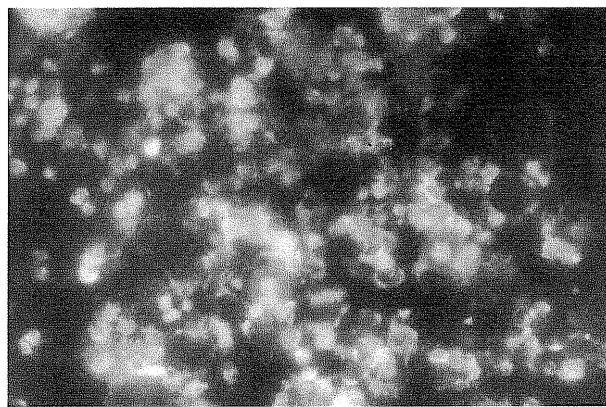


FIGURE 2. Fluorescence cytologic view of TaG1 urothelial carcinoma using hypericin for photosensitization. Green-appearing normal (autofluorescence) and red malignant (induced fluorescence) urothelial cells are seen. Original magnification $\times 400$.

TABLE I. Sensitivity of fluorescence cytology and conventional cytology regarding tumor grading

	Grade 1	Grade 2-3	All Cases
Patients (n)	17	25	42
Positive FC finding (n)	16	25	41
Positive Cyt. finding (n)	10	22	32
Sensitivity of FC (%)	94	100	98
Sensitivity of Cyt. (%)	59	88	76

KEY: FC = fluorescence cytology; Cyt. = conventional cytology.

MATERIAL AND METHODS

A total of 46 patients were investigated in this study before they underwent transurethral resection of the bladder. Only patients with a suspicion of bladder cancer diagnosed by outpatient cystoscopy were included in this pilot study. The mean age of the patients was 66.7 years (range 47 to 84). Twenty-one patients had a history of bladder tumor and 10 had undergone previous intravesical therapy (bacille Calmette-Guérin or mitomycin). The urine sediment analysis was negative in 12 patients, and 26 patients had microscopic and 8 patients macroscopic hematuria. Using a 10F catheter, we instilled a solution of 1.5 g ALA in 50 mL 1.4% sodium bicarbonate intravesically in 38 patients. Several months after starting our experiments with ALA, we were able to obtain hypericin solution and began examining this fluorescent compound also. In 8 patients, 40 mL of an 8- $\mu\text{mol/L}$ solution of hypericin (0.16 mg hypericin, 4 $\mu\text{mol/L}$ polyvinylpyrrolidone 10, 4 $\mu\text{mol/L}$ polyvinylpyrrolidone 40 in 40 mL 0.9% NaCl) was instilled. The time of intravesical retention was between 60 and 120 minutes. After incubation of at least 1 hour, urine specimens were obtained for conventional and fluorescence cytologic examination. Afterward, patients underwent transurethral resection. The ALA and hypericin-induced fluorescence of urothelial cells was detected after centrifugation (1500 rpm for 5 minutes) and resuspension with a fluorescence microscope (Leica DM L). We used a bandpass filter (bandpass 380 to 425 nm) for the excitation and a long-pass filter (long-pass 470 nm) for the emission. Fluorescence cytology was considered

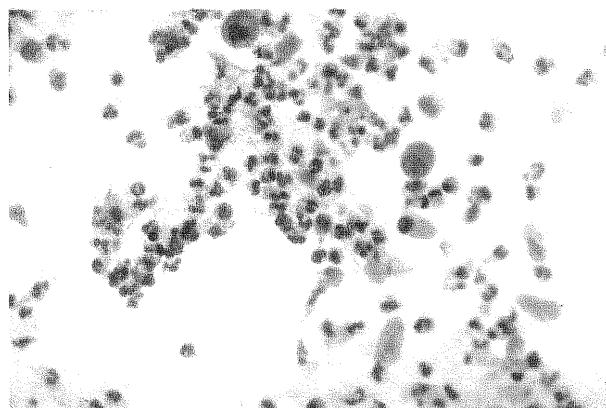


FIGURE 3. Conventional cytologic view of T1G3 urothelial carcinoma. Papanicolaou stain, original magnification $\times 400$.

positive if induced fluorescence of the urothelial cells was detected. Red fluorescent cells beside the green-appearing normal urothelial cells were detected when the test was positive (Figs. 1 and 2). No pathologist was involved in the evaluation of the fluorescence cytologic probes. The results were compared with the histologic and conventional cytologic findings.

RESULTS

Of the 46 patients, 42 were diagnosed with urothelial carcinoma and 4 with nonspecific inflammation. Of the 42 patients with cancer, 19 had Stage Ta, 9 had T1, 3 had carcinoma in situ, and 11 had invasive bladder cancer (T2 to T4). The grading of the probes was G1 in 17 patients, G2 in 6, and G3 in 19. All 4 patients diagnosed with nonspecific inflammation had received ALA. Of the 38 patients who had an instillation with ALA, we detected red fluorescent cells in 34. One false-positive finding occurred in the four histologically neg-

TABLE II. Sensitivity of fluorescence cytology regarding tumor staging

	Ta	T1	CIS	T2-T4	All Cases
Patients (n)	19	9	3	11	42
Positive FC finding (n)	18	9	3	11	41
Sensitivity of FC (%)	94	100	100	100	98

KEY: CIS = carcinoma in situ; FC = fluorescence cytology.

ative cases. After instillation of hypericin, we detected induced fluorescence in all 8 cases, and all histologic findings were positive for tumor (2 cases of carcinoma in situ, 3 cases of TaG1, 2 cases of T1G1, and 1 case of T1G3 urothelial carcinoma). The red fluorescence was always detected in the cytoplasm of the urothelial cells. The overall sensitivity of fluorescence cytology was 98% compared with 76% for conventional cytology. Nine of the cytologically negative probes showed red fluorescent cells on fluorescence microscopy. In the case of well-differentiated tumors (G1), fluorescence cytology was positive in 16 cases and conventional cytology in 10 cases (sensitivity 94% versus 59%). In the case of poorly differentiated tumors (G2 to G3), all fluorescence cytology probes were positive, but conventional cytology was negative in 3 cases (sensitivity 100% versus 88%). The results of our study are summarized in Tables I and II.

COMMENT

The statistical analysis of the results revealed a high sensitivity for the new method, although the number of cases was small. Flat urothelial neoplasias are difficult to visualize with conventional cystoscopy and with the less invasive, flexible cystoscopy. Our preliminary data suggest a good diagnostic value for fluorescence cytology even in the case of flat lesions. The detection of fluorescent cells is much easier than the detection of atypical cells in conventional cytology (Fig. 3). Neither erythrocytes nor leukocytes have shown induced fluorescence and neither the grade nor stage of tumors had any influence on the diagnostic value of fluorescence cytology. A history of intravesical bacille Calmette-Guérin or chemotherapy did not seem to influence the sensitivity and specificity of the test. The procedure was well tolerated in all cases, and no side effects were observed. The learning curve for fluorescence cytology is minimal. The reduction of fluorescence during the exposure to light is called photobleaching. Photobleaching causes a reduction in the visible fluorescence during fluorescence endoscopy. This effect is induced with both white and violet light, but it is much stronger with violet light.¹² Using ALA for fluorescence cytology, we observed a strong photobleach-

ing effect in our study. The red fluorescence of urothelial carcinoma cells was below the detection limit within a few seconds. When using hypericin, we did not detect the photobleaching of the red fluorescent cells, which made the procedure easier for detection and documentation. The published data on the sensitivity and specificity of PDD for the detection of bladder tumors with ALA are comparable with our statistical data. Recently published reports on the use of hypericin for PDD have shown a higher specificity with excellent sensitivity.¹³ The selective cellular uptake of hypericin by urothelial carcinoma cells has been demonstrated in published reports; therefore, we are convinced that the specificity of our method is superior when using hypericin. Because of the possible higher specificity and because of the lack of photobleaching, we recommend the use of hypericin for fluorescence cytology.

CONCLUSIONS

Fluorescence cytology is less invasive than cystoscopy, and our preliminary results suggest that it is more sensitive than other noninvasive tests for the diagnosis of bladder cancer. The detection of induced fluorescence of malignant urothelial cells is easy and the learning curve minimal, making fluorescence cytology appropriate for daily practice. After additional investigation, it may become a new diagnostic method that may reduce the number of cystoscopies in the follow-up of bladder tumors.

REFERENCES

1. Lokeshwar VB, and Soloway MS: Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? *J Urol* 165: 1067-1077, 2001.
2. Konety BR, and Getzenberg RH: Urine based markers of urological malignancy. *J Urol* 165: 600-611, 2001.
3. Grossman HB: Biomarkers for transitional cell carcinoma—pro. *Urology* 57: 847-848, 2001.
4. Schoenberg M: Biomarkers for transitional cell carcinoma—con. *Urology* 57: 849-851, 2001.
5. Bastacky S, Ibrahim S, Wilczynski SP, *et al*: The accuracy of urinary cytology in daily practice. *Cancer* 87: 118-128, 1999.
6. Planz B, Synek C, Robben J, *et al*: Diagnostic accuracy of DNA image cytometry and urinary cytology with cells from voided urine in the detection of bladder cancer. *Urology* 56: 782-786, 2000.
7. Lahme S, Bichler KH, Feil G, *et al*: Comparison of cy-

tology and nuclear matrix protein 22 for the detection and follow-up of bladder cancer. *Urol Int* 66: 72–77, 2001.

8. Stepp H: Physical principles of fluorescence cystoscopy, in Baumgartners R, Kriegmairs M, and Hofstetters A (Eds): *Fluorescence Diagnosis of Bladder Tumor*. Tuttingen, Verlag Endo-Press, 2000, pp 12–13.

9. Kamuhabwa AR, Agostinis P, D'Hallewin MA, *et al*: Photodynamic activity of hypericin in human urinary bladder carcinoma cells. *Anticancer Res* 20: 2579–2584, 2000.

10. Kriegmair M, Zaak D, Knuechel R, *et al*: 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy for the detection of lower urinary tract tumors. *Urol Int* 63: 27–31, 1999.

11. Kriegmair M, Baumgartner R, Knuechel R, *et al*: Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology* 44: 836–841, 1994.

12. Wagner S, and Stepp H: Practical aspects of fluorescence diagnosis, in Baumgartners R, Kriegmairs M, and Hofstetters A (Eds): *Fluorescence Diagnosis of Bladder Tumor*. Tuttingen, Verlag Endo-Press, 2000, pp 30–36.

13. D'Hallewin MA, De Witte PA, Waelkens E, *et al*: Fluorescence detection of flat bladder carcinoma in situ after intravesical instillation of hypericin. *J Urol* 164: 349–351, 2000.