



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Raman spectroscopy in bladder cancer diagnosis

Stomp-Agenant, M.

Citation

Stomp-Agenant, M. (2023, October 4). *Raman spectroscopy in bladder cancer diagnosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3642844>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3642844>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

SAMENVATTING EN ALGEMENE CONCLUSIE (DUTCH)

Het belangrijkste doel van dit proefschrift is de waarde van Ramanspectroscopie in blaaskanker diagnostiek te begrijpen en manieren te vinden om de toepassing te verbeteren. Wij evalueerden een nieuw ontwikkelde Ramanprobe in een fantoommodel en in vivo. We gebruikten deze probe ook om weefselheterogeniteit te onderzoeken in cystectomiepreparaten. Als spin-off, om herhaalde Ramanmetingen te kunnen doen op specifieke locaties, ontwikkelden we een blaasregistratie en navigatiesysteem en evalueerden we dit systeem in een fantoommodel.

In de introductie (**Hoofdstuk 1**) wordt de standaard diagnostiek en behandeling van blaaskanker (urotheelcarcinoom (UC)) beschreven. De achtergrond van Ramanspectroscopie wordt besproken en we beoordeelden de publicaties over het gebruik van Ramanspectroscopie in blaaskankerdiagnostiek. In **Hoofdstuk 2** worden twee verschillende fiber-optische probes geëvalueerd en vergeleken met elkaar in een fantoommodel. Een oppervlakkige en een niet-oppervlakkige Ramanprobe worden geëvalueerd met betrekking tot de signaaldiepte en signaal-ruis verhouding. Omdat de urotheellaag maar 3-7 cellagen dik is, ongeveer 200 micron, zou een probe gericht moeten zijn op de oppervlakkige laag, om het irrelevante signaal van diepere lagen te beperken. De signaaldiepte van de oppervlakkige probe was 0-200 micron, terwijl de signaaldiepte van de niet-oppervlakkige probe 0-300 micron was. Hiernaast had de oppervlakkige probe ook een tweemaal zo hoge signaal-ruis verhouding bij meting op 200 micron diepte. Om deze reden verwachten we dat de nieuw ontwikkelde oppervlakkige Ramanprobe een betere in vivo urotheelcarcinoom detectie zal hebben.

In **Hoofdstuk 3** wordt de oppervlakkige probe met de niet-oppervlakkige probe vergeleken bij in vivo metingen. In vivo Ramanmetingen werden verricht tijdens een transurethrale resectie van een blaastumor (TURBT) voorafgaand aan de resectie en pathologische evaluatie. Nieuw verkregen oppervlakkige probe metingen werden vergeleken met eerder verkregen in vivo metingen van de niet-oppervlakkige probe [1]. De kwaliteit (performance) van de oppervlakkige probe voor UC detectie was beter in vergelijking met de niet-oppervlakkige probe op verschillende kwaliteitsparameters; de oppervlakte onder de curve van de receiver operating characteristic curve (wat is een maat berekend uit het aantal echte-positieven en vals-positieven) verbeterde van 0.88 naar 0.95, de sensitiviteit van 80% naar 90% en de specificiteit van 85% naar 87%. Dit kan deels verklaard worden door de verbeterde signaal-ruis verhouding van de oppervlakkige probe met een factor van 1.92 vergeleken met de niet-oppervlakkige probe, vergelijkbaar met de resultaten van hoofdstuk 2. Een andere verklaring voor deze superieure prestatie kan de beperkte signaaldiepte van de oppervlakkige probe

zijn, waarbij het spectrum niet "vervuild" wordt door Ramansignalen van diepere weefsellagen. Ondanks dat we een duidelijke kwalitatieve verbetering zagen, konden we dit niet kwantificeren; verder onderzoek is nodig om deze hypothese te bevestigen. In hoofdstuk 3 wordt de oppervlakkige probe ook geëvalueerd in zijn capaciteit om verschillende graden UC te kunnen onderscheiden. Hooggradig UC was niet duidelijk van laaggradig UC te onderscheiden op basis van de Ramanmetingen. Wij denken dat dit te verklaren is door weefselheterogeniteit (sampling error), of doordat de biochemische karakteristieken van weefsel geleidelijk van benigne naar maligne veranderen in de ontwikkeling van UC.

Hoofdstuk 4 beschrijft een ruimtelijke evaluatie van blaaskanker met het gebruik van Ramanspectroscopie op cystectomiepreparaten. Een representatie van het gehele oppervlakte van drie cystectomiepreparaten wordt gepresenteerd in een 2D-kaart overeenkomstig met de histopathologische diagnose en de Ramanuitkomst voor elke meetlocatie. Voor tumordetectie werden een AUC van 93%, sensitiviteit van 86% en specificiteit van 92% behaald. De regio's rondom tumorweefsel lieten een hogere Ramandiagnose-onzekerheid zien dan de tumor zelf en weefsel verder weg van de tumor. Daarom suggereert deze Ramanspectroscopiedata een geleidelijke ruimtelijke verandering van benigne naar maligne weefsel. Dit kan verklaard worden door twee theorieën; De eerste is weefsel heterogeniteit (sampling error), waarbij meerdere cellen in een weefsel locatie worden geëvalueerd in een Ramanspectrum. Hierbij worden verschillende biochemische composities gemeten die toebehoren aan verschillende pathologische entiteiten. De tweede theorie is gebaseerd op de aanwezigheid van een geleidelijke overgang van normaal weefsel naar maligne weefsel, wat betekent dat er geen harde afkapwaarden zijn tussen tumor en normaal weefsel. Sommige (pre-) maligne veranderingen worden dan gedetecteerd door Ramanspectroscopie, terwijl ze nog niet duidelijk zijn in de pathologische evaluatie (die harde afkapwaarden gebruikt voor de classificatie). Daarom zou Ramanspectroscopie gebruikt kunnen worden als een vroege indicator voor progressie of recidief, en ook als een meer accurate manier om de tumorgrens te markeren. Als Ramanspectroscopie deze (pre-) maligne veranderingen detecteert, kunnen meer accurate resecties worden verricht welke kunnen leiden tot minder residuen en recidieven.

Een spin-off van dit Ramanspectroscopie onderzoek wordt gepresenteerd in **Hoofdstuk 5**. Huidige diagnostische hulpmiddelen zoals phothodynamische diagnostiek (PDD) worden gebruikt om een gehele blaas te beoordelen om blaaskanker te detecteren. Technieken zoals deze hebben een hoge sensitiviteit maar hebben een beperkte specificiteit [2]. Dit betekent dat veel afwijkingen worden gedetecteerd, maar dat vals positieven vaak voorkomen wat resulteert in onnodige resecties van benigne

weefsel in de huidige urologische praktijk. Ramanspectroscopie kan worden gebruikt in combinatie met zulke technieken als diagnostisch screeningstool om een optisch biopt te verkrijgen op specifieke verdachte locaties, met een hoge specificiteit. Om specifieke locaties te vervolgen met Ramanspectroscopie is een real-time registratie en navigatie systeem ontwikkeld. Herhaalde metingen op specifieke locaties zouden een verandering naar maligniteit in tijd kunnen aantonen zodat deze gereceerd kan worden op het juiste moment. In dit hoofdstuk presenteren we een fantoom studie met dit real-time blaasregistratie en navigatieproces. Het nieuw ontwikkelde systeem liet een acceptabele nauwkeurigheid zien voor blaasafwijkingregistratie en navigatie. Het voordeel van het ontwikkelde systeem is dat de detectie niet wordt gelimiteerd tot afwijkingen van >5 mm, zoals bij CT, MRI en/of echografie [3–13]. Tevens zijn er geen pre-operatieve beeldvormingstechnieken of kunstmatige oriëntatiepunten nodig. Dit systeem zou eventueel ook kunnen worden gebruikt in patiënten met ernstige hematurie, die het zicht belemmert tijdens cystoscopie of als het licht wordt gereduceerd zoals tijdens PDD. We constateerden beperkingen zoals verminderde nauwkeurigheid bij volumeveranderingen van het model. In vivo studies zijn nodig om de haalbaarheid van navigatie te beoordelen met verschillende blaasvolumina en verschillende rectale vullingstadia.

DISCUSSIE, TOEKOMSTPERSPECTIEVEN EN CONCLUSIE

Directe optische biopten in blaaskanker diagnostiek

Blaaskankerdiagnostiek kost tijd. Als een patiënt bloed plast (hematurie heeft) wordt een cystoscopie verricht op de polikliniek. Wanneer een verdachte afwijking wordt gedetecteerd tijdens cystoscopie, wordt de patiënt ingepland voor een transurethrale resectie van de blaastumor (TURBT). Na akkoord van de anesthesioloog wordt de operatie uitgevoerd, meestal binnen een aantal weken. Het gereceerde weefsel of de biopten worden beoordeeld door de patholoog, wat ongeveer 10 dagen tijd kost. Uiteindelijk komt de patiënt bij de uroloog voor de uitslag en wordt het vervolg plan opgesteld, dat kan bestaan uit follow up of aanvullende behandelingen. Vanaf het eerste polikliniek bezoek tot de definitieve therapie zal het in totaal ongeveer een maand of meer duren. Als een direct biopt op de polikliniek afgenomen zou kunnen worden, worden veel tijd, kosten en mogelijk onnodige behandelingen bespaard. Een direct optisch biopt op de polikliniek kan leiden tot een langer afwachtend beleid, voorafgaand inplannen van de juiste blaasspoelingen postoperatief of directe upstaging naar cystectomy, waarbij een TURBT niet meer nodig is. Zo een biopt zal moeten voldoen aan bepaalde eisen zoals hoge specificiteit en goede tolerantie voor de patiënt op de polikliniek.



Endoscopische Ramanspectroscopie is een dergelijke techniek, die niet-invasief is met hoge specificiteit waarmee van de biochemische achtergrond van een afwijking bepaald kan worden. Het grootste obstakel voor het gebruik van Ramanspectroscopie in de klinische praktijk is dat het signaal van Raman scattering erg zwak is, een van de 10^6 - 10^8 verstrooide fotonen. Deze inefficiënte scattering zorgt ervoor dat een hoog laser vermogen en lange acquisitietijden nodig zijn [14]. Hierdoor wordt de translatie en implementatie naar de klinische praktijk gehinderd. Compromissen om de acquisitietijden te verkorten, resulteren in een verlaagde diagnostische nauwkeurigheid. Nieuwe strategieën om deze beperkingen tegen te gaan, zijn in ontwikkeling. Hardware ontwikkelingen voor verbeterde ontvangst van het Ramansignaal, maar ook softwareontwikkelingen zoals verschillende analytische methoden, worden door verschillende groepen geëvalueerd om de diagnostische mogelijkheden van Ramanspectroscopie te verbeteren. Beeldvorming modaliteiten gebaseerd op niet-lineaire Raman scattering, multimodale integratie van Ramanspectroscopie en selectieve sampling van Raman Microscopie (RM), zijn hulpmiddelen om Ramanspectroscopie te verbeteren. Hiernaast worden ook nanomaterialen en fotonische structuren geëvalueerd om het Ramansignaal te vergroten. Nieuw analysemethoden worden verkend waaronder artificiële intelligentie technieken zoals Deep Convolutional Neural Networks en Spatial Bagging [15,16]. Al deze ontwikkelingen zijn belangrijke stappen op weg naar verbetering van de diagnostische nauwkeurigheid en snelheid van Ramanspectroscopie. Verdere verbeteringen moeten ook leiden tot betere kosteneffectiviteit, waardoor Ramanspectroscopie gemakkelijker in klinische praktijk geïmplementeerd kan worden [17].

In dit proefschrift wordt een nieuw hardware ontwerp geëvalueerd, met als doel verbeterde signaalontvangst. Een nieuwe oppervlakkige Ramanprobe voor klinisch gebruik werd ontwikkeld die voldoet aan de Medical Device Directives vereisten en geschikt is voor endoscopisch gebruik. Deze oppervlakkige probe is gericht op de benodigde signaaldiepte en heeft een hogere signaal-ruis verhouding dan de niet-oppervlakkige probe. Hiernaast interfereren de componenten (waaronder silica) niet met het Ramansignaal van urotheel, in tegenstelling tot de componenten van andere probes met afgeschuinde of bal lenzen ten behoeve van een oppervlakkige meting. De signaaldiepte en verbeterde signaal-ruis verhouding werden bevestigd in de evaluatie met het fantoom model maar ook in vivo (hoofdstuk 2 en 3). Het was goed mogelijk om met behulp van Ramanspectroscopie benigne van maligne weefsel te onderscheiden in hoofdstuk 3; maar onderscheiden van verschillende graderingen van UC was beperkt in de in vivo studie. Dit kan worden verklaard door weefsel heterogeniteit of een transitie naar maligniteit. Om deze techniek toe te passen op de polikliniek zullen aanpassingen nodig zijn om de probe door een flexibele cystoscoop te kunnen laten passeren.

Om de diagnostische mogelijkheden van Ramanspectroscopie te verbeteren zijn meer dan alleen hardware- en softwareverbeteringen nodig. Voldoende data is nodig om de Ramanspectroscopische kennis van blaaskanker te ontwikkelen. De impact van weefsel heterogeniteit van UC kan in de toekomst geëvalueerd worden middels een ruimtelijke micro-Ramananalyse. Hierbij wordt gebruikt gemaakt van een meetrooster waarbij de verschillende metingen dichter op elkaar worden verricht met automatische plaatsing van de probe op een cystectomie preparaat. Ontwikkeling van een grote multicenter database van Ramanmetingen en biopten van verschillende UC entiteiten (meer power) kan de diagnostische nauwkeurigheid van Ramanspectroscopie verbeteren omdat het diagnostische algoritme is gebaseerd op eerdere Ramanmetingen. Kennis over specifieke Raman eigenschappen van bepaalde biochemische tumor samenstellingen, gelinkt aan de bijpassende biochemische veranderingen, geeft informatie over de tumorbiologie.

Raman karakteristieken van weefsel locaties waarbij de classificatie tussen Ramanspectroscopie en de pathologische evaluatie niet overeen komt, kunnen inzicht geven in het biochemische substraat dat verantwoordelijk is voor de verandering in maligniteit. Hieruit zouden therapeutische aangrijpingspunten voor blaaskankerbehandeling afgeleid kunnen worden. Tevens kan dit de basis zijn voor onderzoek naar preventie van blaaskanker recidieven of progressie. Omdat Ramanspectroscopie de biologische vingerafdruk van weefsel bepaalt, waarbij geen menselijke interpretaties nodig zijn, heeft deze techniek geen last van de inter- en intra-observer variabiliteit die inherent is aan de pathologische evaluatie. Ramanspectroscopie meet biochemische eigenschappen, in tegenstelling tot pathologische analyse die gebaseerd is op morfologische en histopathologische eigenschappen. De reproduceerbaarheid van de pathologische analyse zou mogelijk kunnen verbeteren als Ramanspectroscopie geïncorporeerd wordt in de pathologische analyse.

Tenslotte, als een direct optisch biopt mogelijk zou zijn op de polikliniek met een hoge nauwkeurigheid, zoals we verwachten van Ramanspectroscopie, kunnen directe behandelingsbeslissingen genomen worden zoals hierboven beschreven. Als een blaasafwijking vervolgd dient te worden, moet de exact zelfde locatie steeds beoordeeld worden. Een navigatie systeem voor blaasafwijkingen, zou in combinatie met deep learning augmented blaas tumor detectie, de nauwkeurigheid van navigatie systemen en de reproduceerbaarheid van cystoscopie kunnen verbeteren. Tevens kan de kwaliteit van cystoscopieën geverifieerd worden door middel van navigatie systemen en deze systemen zouden een rol kunnen spelen in de documentatie van cystoscopie bevindingen. Echter het beschreven registratie en navigatie systeem staat nog in de



kinderschoenen. Combinaties van verschillende navigatie technieken moeten worden verkend in verdere klinische studies.

Andere Raman spectroscopische toepassingen voor blaaskanker

Zoals beschreven in hoofdstuk 1, worden er in de huidige literatuur meer toepassingen van Ramanspectroscopie in blaaskanker diagnostiek onderzocht zoals de evaluatie van urine of serum bestanddelen. Ramanspectroscopie op urinemonsters wordt onderzocht om vroege recidieven op te sporen. We zoeken alternatieven voor urinecytologie en follow-up cystoscopieën. Hoge sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid van Ramanspectroscopie op urinemonsters worden gepresenteerd [15,16,18–23]. Echter is Ramanspectroscopie nog niet geïmplementeerd in de standaard blaaskankerdiagnostiek. De vele cystoscopieën zijn invasief en niet kosteneffectief en bovendien nemen de wachtlijsten toe. Een paradigma verandering is nodig om de diagnostische kosten, tijd en complicaties van cystoscopieën en cytologie te beperken, zodat ook niet klinisch relevante, vals positieve bevindingen geregistreerd kunnen worden en niet onnodig opnieuw gebiopteerd worden.

Alternatieve toepassingen worden geëxploreerd in basaal onderzoek. Verschillende studies zijn uitgevoerd om blaastumor specifieke biomarkers middels (Surface Enhanced) Raman spectroscopy (SERS) te detecteren. Voorbeelden van specifieke biomarkers om tumoren te detecteren in urine zijn: anti-EGFR antilichaam, circulating cancer-derived small extracellular vesicles, Alfa-1-Antitrypsin antigeen en Hyaluron acidase en telomerase activiteit. In de toekomst zou cytologie vervangen kunnen worden door detectie van deze biomarkers [24–29]. In de zoektocht naar alternatieven voor urinecytologie, worden ook andere biomarkers onderzocht. Voorbeelden van deze biomarkers zijn; Circulating Tumor Cells, urinary long-coding RNA's (prognostische marker voor niet-spier-invasief blaascarcinoom (NMIBC)), neutrofiel-lymfocyt ratio (prognostische marker voor primair T1 hooggradig UC) en systemische inflammatie biomarkers die worden gerelateerd aan de oncologische uitkomsten van patiënten met hoog risico NMIBC [30–34]. In de toekomst zou Ramanspectroscopie ingezet kunnen worden om dit soort biomarkers te detecteren.

Ramanspectroscopie voor blaaskankerdetectie, wordt in bepaalde onderzoeken ook toegepast op serum, een andere vorm van een vloeibaar biopt [35,36]. Interessant is dat deze groepen NMIBC en spier invasief blaas carcinoom (MIBC) konden detecteren in het bloed, terwijl logischerwijs, als de ziekte beperkt is tot de blaas, geen kanker karakteristieken gevonden zouden moeten kunnen worden in het bloed. Omgekeerd, als (micro-)metastasen aanwezig zijn, zullen deze ook detecteerbaar kunnen zijn in serum omdat ze worden verspreid via het serum. Hierdoor ontstaat een nieuwe toepassing van

Ramanspectroscopie in blaaskankerdiagnostiek; als detectiehulpmiddel voor (micro-) metastasen, die niet te detecteren zijn middels reguliere beeldvormingstechnieken. Dit is belangrijk voor het kiezen van de juiste behandeling. De 5-jaars mortaliteit na cystectomie is ongeveer 50% en is onveranderd gedurende de laatste tientallen jaren [37,38]. Veel van deze patiënten overlijden door preoperatief niet-gedetecteerde (micro-) metastasen. Om deze reden is het nodig om meer onderzoek te doen naar detectie van (micro-) metastasen in serum vooraf aan cystectomie, wat middels Ramanspectroscopie mogelijk zou zijn.

Om de uitkomsten van deze patiëntengroep te verbeteren, is het ook belangrijk om te kunnen voorspellen wat de respons zal zijn op (neo-)adjuvante chemo- of immunotherapie. Als patiënten geen respons hebben op neo-adjuvante therapie, wordt de cystectomie ongewenst uitgesteld omdat de tumor dan meer tijd heeft om te verspreiden en metastaseren. Ramanspectroscopie zou bepaalde tumor karakteristieken kunnen detecteren die kunnen voorspellen wat de respons zal zijn op de (neo-)adjuvante therapie waardoor een keuze gemaakt kan worden voor het soort (neo-)adjuvante therapie of afgezien kan worden van de therapie. Een aangrijpingspunt kan het soort inflammatie in de tumor of serum zijn. Dit kan gerelateerd zijn aan de respons van het immuunsysteem op tumorgenese. Het soort en de kwantiteit van de inflammatie die gedetecteerd zou kunnen worden door Ramanspectroscopie kan een prognostische factor voor tumorprogressie zijn of voor de respons op immunotherapie.

Ramanspectroscopie wordt ook gebruikt om biochemische processen in blaastumor ontwikkeling te evalueren. Green Fluorescent Protein kan door Ramanspectroscopie worden gedetecteerd in blaaskanker cellijnen. Het corresponderende gen wordt gebruikt in gene engineering om bepaalde veranderingen in functie of expressie te kunnen detecteren binnen de celbiologie, speciaal voor gene silencing [39]. In een andere studie wordt SERS gebruikt om leak-resistance DNA hybridization chain reaction in urinemonsters te evalueren. Deze detectie is een belangrijk hulpmiddel in DNA nanotechnologie studies, om meer informatie te genereren over DNA breakage in tumorontwikkeling [40]. SERS wordt ook gebruikt om een enhanced surface permeability en retention effect in menselijk blaaskankerweefsel te detecteren [41]. Ten slotte, zijn er eerste resultaten gepubliceerd over het gebruik van Ramanspectroscopie voor de detectie van intracellulaire nano-transporters, die bestanddelen kunnen bevatten voor therapeutische targeted drug delivery of voor beeldvormende doeleinden binnen de oncologie [42].



CONCLUSIE

In dit proefschrift worden verbeteringen voor de klinische toepassing van Ramanspectroscopie geëvalueerd. Belangrijke stappen worden gemaakt voor het gebruik van Ramanspectroscopie bij blaaskankerdiagnostiek in vivo. Niet-invasieve blaaskankerdiagnostiek is een voortdurende uitdaging omdat de gouden standaarden, cystoscopie en TURBT, invasieve procedures zijn die veel tijd en geld kosten. Ramanspectroscopie is een veelbelovende analytische methode die de chemische bestanddelen in complexe biologische samenstellingen kan meten, zoals cellen, weefsel en biologische vloeistoffen. Wij hebben faciliteiten voor in vivo metingen ontwikkeld, maar het systeem is nog niet bruikbaar op de polikliniek met flexibele cystoscopen. Bij het onderscheiden tussen benigne en maligne cellen wordt een hoge nauwkeurigheid behaald. Voor vloeistofbiopten, zijn de resultaten beter dan de huidige standaard pathologische urine cytologie. Tevens heeft Ramanspectroscopie een rol in basaal onderzoek. Concluderend kan Ramanspectroscopie op vele manieren een rol hebben in onderzoek naar blaaskanker. Verdere studies zijn nodig om de klinische toepasbaarheid te verbeteren ten behoeve van de verbetering van blaaskankerdiagnostiek.