



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Advanced endoscopic imaging of esophageal neoplasia; old looks and new visions

Boerwinkel, D.F.

Publication date
2014

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Boerwinkel, D. F. (2014). *Advanced endoscopic imaging of esophageal neoplasia; old looks and new visions*.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.



SAMENVATTING

Deel 1: Geavanceerde beeldvormingstechnieken in perspectief

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van alle huidige beeldvormingsmodaliteiten en de technieken in ontwikkeling die gebruikt worden voor de surveillance, work-up en behandeling van het adenocarcinoom en plaveiselcelcarcinoom in de slokdarm. Deze technieken omhelzen zowel topisch toegepaste contrastmiddelen, als optische filtertechnieken en functionele beeldvorming. De meeste studies hebben zich gericht op oppervlakkige beeldvorming van de Barrett slokdarm. Chromoendoscopie met contrastmiddelen heeft geen bewezen waarde getoond vergeleken met standaard wit licht endoscopie (WLE). Optische chromoendoscopie, zoals narrow band imaging (NBI), leek aanvankelijk een detectie- en differentiatievoordeel te laten zien, maar latere studies konden dit effect niet bevestigen. Autofluorescentie endoscopie (AFI) kan weliswaar de gerichte detectie van vroege neoplasie vergroten, maar op patient niveau is er geen additionele waarde wanneer AFI vergeleken wordt met WLE in combinatie met willekeurige bipten (Seattle protocol). Geen van deze technieken kan daarom aangeraden worden voor routinematig gebruik tijdens endoscopische controle van Barrett's slokdarm. Voor het plaveiselcelcarcinoom van de slokdarm is inspectie met Lugol kleuring al decennia de norm. Tegenwoordig biedt NBI mogelijk praktische voordelen boven Lugol's kleuring, en de eerste studies laten een vergelijkbare effectiviteit zien.

Met de huidige kwaliteit WLE lijkt de herkenning van vroege neoplasie door de endoscopist nu de zwakste schakel. Daarom zal training de kwaliteit van de endoscopisten moeten verbeteren, en daarmee de detectie van slokdarm neoplasie.

In *hoofdstuk 2* hebben we de huidige stand van zaken rondom (auto)fluorescentie endoscopie en spectroscopie geëvalueerd. Functionele beeldvorming van Barrett's neoplasie door middel van fluorescentie is succesvol geïntegreerd in detaillistische probe's, maar ook in endoscopen die een overzichtsbeeld van de slokdarm kunnen geven.

Na teleurstellende resultaten met de tweede generatie AFI is een derde generatie ontwikkeld, die de neoplastische cellen zelf in beeld tracht te brengen, in plaats van architecturale veranderingen in het omliggende weefsel. In *hoofdstuk 3* beschrijven we hoe Barrett's patienten twee diagnostische endoscopen (AFI-II/AFI-III) ondergingen in een sessie, en keken we naar het aantal patienten en afwijkingen dat we vonden met een van beide systemen. In totaal werden 45 patienten geïncludeerd, van wie 19 high grade intraepithelial neoplasia of intramucosal cancer (HGIN/IMC) lieten zien. Beide systemen lieten een gelijkwaardige toename in detectie van patienten en afwijkingen met neoplasie zien, en ook een vergelijkbaar fout-positieve uitslag. We concludeerden daarom dat AFI-III weliswaar ook een toegevoegde waarde laat zien ten opzichte van WLE, maar dat er geen significante verbetering is vergeleken met het huidige AFI-II systeem. Na vele studies naar AFI bleef er een belangrijke vraag staan: heeft AFI wel klinische waarde voor de behandeling van patienten met Barrett's slokdarm? In *hoofdstuk 4* zijn we hierop ingegaan door 5 eerder verrichte studies naar AFI te analyseren op toegevoegde diagnostische en therapeutische waarde. Alle endoscopische en histologische data uit deze studies werden samengenomen en gerelateerd aan behandeluitkomst en follow-up.

In de 5 studies werden 371 Barrett's patiënten geïncludeerd: 211 voor surveillance en 160 voor work-up van vroege neoplasie. HGIN/IMC werd in 147 patiënten gediagnostiseerd. Van de 211 surveillance patiënten lieten 39 patiënten HGIN/IMC zien: WLE detecteerde 23 patiënten, random bipten (RBx) 11 en AFI 5 patiënten. De diagnostische waarde in de surveillance – neoplasie naïeve – populatie was daarom 5/211 (2%).

AFI alleen detecteerde in 24/371 patiënten HGIN/IMC. In 33/371 patiënten, AFI detecteerde additionele HGIN/IMC naast de primair met WLE/RBx gevonden afwijkingen. Deze 57 patiënten ondergingen therapie: 26 patiënten kregen radiofrequency ablation (RFA) and hadden vervolgens volledige remissie van neoplasie. 31 patiënten ondergingen endoscopische resectie van de met AFI gevonden afwijkingen. In 6 gevallen werd IMC gevonden, die anders geableerd of zelfs niet behandeld zou zijn. De toegevoegde therapeutische waarde van AFI was daarom 6/371 (2%). We concludeerden daarom dat de rol van AFI voor de routinematige toepassing tijdens surveillance en work-up voor vroege neoplasie in Barrett's zeer beperkt is.

In *hoofdstuk 5* hebben we de klinische relevantie van de meest gangbare endoscopische beeldvormingstechnieken op een rijtje gezet. Na gedegen overweging beargumenteren we dat de work-up en behandeling gecentraliseerd moet worden, omdat de prevalentie van vroege neoplasie hoger is en endoscopieën worden verricht door expert endoscopisten onder optimale omstandigheden. Geavanceerde technieken hebben een beperkte rol hierin, en training is minstens zo belangrijk.

Deel Twee: Drie-Modaliteiten Beeldvorming en Moleculaire Eindpunten [TIME studies]

In deze studies hebben we de hypothese uitgewerkt dat de fout-positieve gebieden bij autofluorescentie imaging (AFI) mogelijk vroege moleculaire veranderingen laten zien die de aanwezigheid of zelfs het ontstaan van vroege neoplasie kunnen voorspellen. In *hoofdstuk 6* hebben we daarom een retrospectieve analyse gedaan van AFI geleide bipten, en de AFI karakteristieken gecorreleerd aan een vooraf vastgesteld panel van biomarkers.

performed a retrospective analysis of AFI guided biopsies and correlated AFI features to a predefined panel of biomarkers; the retrospective TIME study. We selected 58 samples from a previous prospective study on AFI: 15 true-positive (TP: AFI-positive, HGIN/IMC), 21 false-positive (FP: AFI-positive, no HGIN/IMC), 12 true-negative (TN1; AFI-negative, no HGIN/IMC in sample), 10 true-negative (TN2: AFI-negative, no HGIN/IMC in esophagus). Methylation-specific RT-PCR was performed for HPP1, RUNX3, p16, and immunohistochemistry for Cyclin A, p53. $p < 0.05$ was considered statistical significant. Bonferroni correction was used for multiple comparisons. P16, Cyclin A, p53 correlated with dysplasia ($p < 0.01$, $p = 0.003$, $p < 0.001$ respectively). Increased p16 methylation was observed between TP vs TN2 ($p = 0.003$) and TN1 vs TN2 ($p = 0.04$) subgroups, suggesting a field defect. Only p53 correlated with AFI-status ($p = 0.003$). After exclusion of HGIN/IMC-samples, significance was lost. We concluded that none of the investigated biomarkers correlated with AFI status. Correlation with dysplasia status was confirmed for p16, Cyclin A and p53, underlining the importance of these biomarkers as an early event in neoplastic progression.



We subsequently evaluated and validated the correlation between AFI characteristics and a larger panel of biomarkers in a prospective multicenter study with short-term follow up, described in **chapter 7**. A cross-sectional prospective study on 175 Barrett's patients was performed in three tertiary referral centers. All patients underwent high resolution endoscopy followed by AFI. Aneuploidy/tetraploidy; 9p and 17p loss of heterozygosity (LOH); *RUNX3*, *HPPI* and *p16* methylation; p53 and Cyclin A immunohistochemistry (IHC) were assessed on biopsies targeted by AFI. Bootstrap resampling was used to select the best predictive biomarker panel for HGIN/IMC.

Aneuploidy, p53 IHC and Cyclin A had the strongest association with dysplasia in the per-biopsy analysis and, as a panel, had an area under the curve of 0.97 (95%CI 0.95-0.99) for the diagnosis of HGIN/IMC. We found biomarker enrichment in AFI-positive compared to AFI- negative areas and the diagnostic accuracy for patients with HGIN/IMC of the 3-biomarker panel from AFI-positive areas was superior to AFI-negative areas ($p < 0.001$). Furthermore, this 3-biomarker panel had equal sensitivity to the standard protocol with a 4.5-fold reduction in the number of biopsies. FOLLOW UP

The prospective TIME study demonstrated that the combination of AFI and a 3-biomarker panel provides an objective assessment of the overall dysplasia status with a significant reduction in the number biopsies needed compared to the standard protocol.

Deel Drie: Terug naar de basis: probe based fluorescence spectroscopy.

In **hoofdstuk 9** hebben we een optische biopsie tang onderzocht, waarin een 405nm fluorescentie spectroscopie probe werd geïntegreerd in een standaard biopsie tang. Hiermee kan het gemeten fluorescentie spectrum precies gecorreleerd worden met het genomen biopt. In deze eerste haalbaarheidsstudie met 47 patiënten wilden we een algoritme ontwikkelen waarmee normaal van neoplastisch Barrett's weefsel kan worden onderscheiden. Het algoritme hebben we vervolgens geïntegreerd in het optisch biopsie systeem (OBS). Het OBS alleen toonde beperkte sensitiviteit en specificiteit, maar toegevoegd aan de beoordeling van de endoscopist steeg deze tot respectievelijk 91% en 50%. Met dit protocol zouden dus de helft van de biopsies vermeden kunnen worden, maar helaas ook enkele neoplastische patiënten gemist worden. Een verbeterd systeem heeft de potentie om de surveillance effectiever en efficiënter te maken. Een van de manieren om het te verbeteren is het optimaliseren van de fluorescentie golflengte. Daarom hebben we in **hoofdstuk 10** een multi-golflengte fluorescentie systeem gebouwd, om de autofluorescentie karakteristieken bij verschillende excitatie golflengtes ($\lambda_{exc} = 369 \text{ nm to } 416 \text{ nm}$) te kunnen correleren aan histologie. Uit 58 biopsies en corresponderende autofluorescentiespectra bleek dat excitatie met 395 nm het meest betrouwbaar onderscheid kon maken tussen neoplastisch en niet-neoplastisch weefsel. Hieropvolgend speculeerden we dat met het toevoegen van een contrast-stof dit onderscheid nog konden verhogen.

In **hoofdstuk 11** hebben we daarom hetzelfde systeem gebruikt om 5-ALA geïnduceerde protoporphyrine IX (PpIX) fluorescentie te meten. Hiervoor hebben we een chorioallantoic membrane (CAM) model gebruikt om de in-vivo situatie na te bootsen. Hiervoor werden 55 slokdarmbiopsies en 16 OE19 cel-monsters getransplanteerd op een kippenembryo, gevolgd door de toediening van 5-ALA. De optimale excitatie golflengte bleek hier 410 en 416nm te zijn.

Met deze kennis kunnen toekomstige spectroscopische studies gedaan worden in combinatie met 5-ALA om het contrast tussen normaal en neoplastisch Barrett's weefsel te vergroten.

Deel Vier: Optical Frequency Domain Interferometry

In **hoofdstuk 12** hebben we Optical Frequency Domain Interferometry (OFDI) bestudeerd. Met deze techniek kan een 6 cm lang deel van de slokdarm in 90 seconden circumferentieel in beeld gebracht worden tot een diepte van 2mm met een microscopische resolutie. Gezien de nieuwigheid van de techniek wilden we de beeldkarakteristieken van OFDI één-op-één correleren aan de corresponderende histologische karakteristieken. Hiervoor hebben we OFDI zowel in-vivo gebruikt tijdens endoscopie, als ex-vivo op endoscopische resectie preparaten. Het bleek dat bepaalde correlatiemarkers, geplaatst met electrocoagulatie, een complexe maar goede paring van de OFDI karakteristieken met de histologische preparaten konden waarborgen. Uiteindelijk zal met de bepaling van de juiste OFDI karakteristieken het betrouwbaar detecteren van vroege neoplasie in de Barrett's slokdarm mogelijk worden. Een van de doelen om dit in praktijk te brengen is het onderzoeken van neosquameus epitheel na radiofrequente ablatie (RFA) voor vroege neoplasie. Mogelijk zou onder dit epitheel namelijk begraven Barrett's weefsel kunnen groeien. In **hoofdstuk 13** hebben we OFDI daarom toegepast in 9 patiënten na RFA behandeling en in- en ex-vivo gezocht naar begraven Barrett's weefsel. Met de kennis opgedaan in hoofdstuk 12 konden de in- en ex-vivo OFDI beelden aan de histologie gekoppeld worden. Uiteindelijk bleek in 1 gebied begraven Barrett's te vinden. Het belang hiervan is nog onduidelijk, maar OFDI heeft de potentie om in de toekomst de evaluatie van Barrett's slokdarm meer effectief en efficiënt te maken en zal als basis dienen voor nieuw beeldvormingsonderzoek in Barrett's slokdarm.