

**Analyse zur Qualität der kolorektalen Submukosa in
histologischen Präparaten**
**Eine Pilotstudie zum Vergleich von endoskopischer
Submukosadisektion (ESD) und endoskopischer
Mukosaresektion (EMR)**

Publikations-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Nathalie Marianne Clees

aus Tübingen

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Franz Ludwig Dumoulin
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Steffen Manekeller

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.07.2023

Aus der Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Gastroenterologie und Diabetologie
im Gemeinschaftskrankenhaus Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Franz Ludwig Dumoulin

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Material und Methoden	10
1.3	Ergebnisse	14
1.4	Diskussion	17
1.5	Zusammenfassung	21
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	22
2.	Veröffentlichung	24
	Abstract	24
	Introduction	24
	Materials and Methods	25
	Results	26
	Discussion	26
	Conclusion	28
	References	28
3.	Danksagung	30

Abkürzungsverzeichnis

COV	Variationskoeffizient
EMR	Endoskopische Mukosaresektion
ESD	Endoskopische Submukosadissektion
ESGE	European Society of Gastrointestinal Endoscopy
HE	Haematoxylin-Eosin Färbung
JSCCR	Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum
KRK	kolorektales Karzinom
LKM	Lymphknotenmetastasen
PAS	Perjodsäure-Schiff-Färbung
SEM	Standardfehler
SM	Submukosa

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist das vierthäufigste Krebsleiden weltweit und gilt, nach dem Lungenkarzinom, als zweithäufigste Krebsart mit tumorassoziierter Mortalität (Gupta & East, 2020). Das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts gibt in Deutschland im Jahr 2018 bei Frauen 26.710 und bei Männern 33.920 Neuerkranken an KRK an (Robert Koch-Institut, 2021).

Die Erkrankung entwickelt sich meist über die Adenom-Karzinom-Sequenz aus gutartigen Vorläufern (Nguyen, Goel, & Chung, 2020). Die Vorläuferläsionen können endoskopisch diagnostiziert und entfernt werden. Seit der Einführung der Vorsorgekoloskopie im Jahr 2002 werden so immer mehr auch fortgeschrittene Adenome und Frühkarzinome detektiert (S3 Leitlinien Kolorektales Karzinom Januar 2019; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf; Zugriff am 04.10.2022). Im Jahr 2019 wurden im Rahmen der Darmkrebsvorsorge in Deutschland 512.428 Koloskopien durchgeführt (Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland, 2020)

Die endoskopische Resektion kann bei sogenannten Polypenkarzinomen als alleinige Therapie ausreichend sein (S3 Leitlinien Kolorektales Karzinom Januar 2019; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf; Zugriff am 04.10.2022). Voraussetzung für eine kurative endoskopische Resektion ist ein niedriges Lymphknotenmetastasen (LKM) Risiko (Tanaka et al., 2020). Eine *low-risk* Situation für LKM ist dann gegeben, wenn neben kompletter Abtragung der Läsion im Gesunden (R0), eine gute Differenzierung (G1/G2) vorliegt sowie eine Lymph- oder Blutgefäßinvasion (L0/V0) ausgeschlossen ist. Zusätzlich sollte eine maximale vertikale Infiltrationstiefe der Submukosa (SM) von 1000 µm nicht überschritten sein. Der Grad des Tumorbuddings kann als zusätzlicher Faktor herangezogen werden (S3 Leitlinien Kolorektales Karzinom Januar 2019; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf; Zugriff am 04.10.2022). Im Falle einer *low-risk* Situation ist das Risiko

einer Lymphknotenmetastasierung < 1 % und eine endoskopische Resektion ist ausreichend (Ferlitsch et al., 2017). Im Gegensatz zur *high-risk*-Situation (SM Invasion > 1000 µm, Lymphgefäß- und Veneninvasion, G3/G4) in welcher, nach vorheriger kompletter endoskopischer Entfernung der Läsion, eine radikale chirurgische Behandlung erfolgen sollte (S3 Leitlinie Kolorektales Karzinom Januar 2019; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf; Zugriff am 04.10.2022).

Die histopathologische Untersuchung mitsamt der Messung der submukösen Infiltrationstiefe der endoskopisch abgetragenen Läsionen ist somit sehr wichtig um zwischen *low*- und *high-risk* Situation für eine Lymphknotenmetastasierung zu unterscheiden (Ichimasa et al., 2021).

Die endoskopische Mukosaresektion (EMR) wird standardmäßig durchgeführt bei benignen imponierenden kolorektalen Läsionen (S3 Leitlinien Kolorektales Karzinom Januar 2019; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf; Zugriff am 04.10.2022). Vorteile der EMR sind die relativ kurze Interventionszeit von ca. 35 Minuten für größere Läsionen, eine niedrige Komplikationsrate mit wenig Nachblutungen und eine geringe Perforationsrate. Nachteil der EMR ist, dass sie in der Regel große Läsionen von > 20 mm nicht en bloc reseziert, sondern in Fragmenten mittels piecemeal-Technik (Dumoulin & Hildenbrand, 2019).

Die piecemeal-Resektion ist suboptimal für die histopathologische Untersuchung da keine Beurteilung der seitlichen Ränder möglich ist und somit keine Aussage zur Entfernung im Gesunden möglich ist. Zusätzlich können Koagulationsartefakte die Diagnostik verfälschen, indem diese durch Koagulation eine ursprüngliche *high-risk* Situation zerstören.

Mit der endoskopischen Submukosadisektion (ESD) können größere Läsionen en bloc abgetragen werden. Diese Technik ist der EMR überlegen wenn es um die en bloc-Resektion von flachen oder sessilen Polypen > 15-20 mm handelt (Russo et al., 2019).

Die ESD ist technisch anspruchsvoller und zeitintensiver als die EMR mit einer medianen Prozedurenzeit von ca. 70 Minuten. Bezüglich der endoskopischen Verfahren hat die ESD

dank der höheren en bloc-Resektionsrate den Vorzug in der Behandlung von *high-grade* Dysplasien und Frühkarzinomen. Aufgrund der technisch schwierigen Durchführung, des erhöhten Zeitaufwands und der Kosten, sollte sie jedoch bevorzugt bei malignitätssuspekten Läsionen zum Einsatz kommen (Dumoulin & Hildenbrand, 2019).

Beide Verfahren sind sicher und mit geringer perinterventioneller Mortalität verbunden (Russo et al., 2019).

Die Leitlinie der European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) empfiehlt die endoskopische en bloc-Resektion mittels ESD für große sessile oder flache kolorektale Läsionen, falls lediglich Verdacht auf eine oberflächige Invasion der Submukosa besteht (Pedro Pimentel-Nunes et al., 2022). Bei tieferer submuköser Invasion wird eine chirurgische Resektion empfohlen (S3 Leitlinien Kolorektales Karzinom Januar 2019; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf; Zugriff am 04.10.2022).

Aus histopathologischer Sicht ist bisher wenig bekannt über die Bedeutung der Qualität der resezierten Submukosa Schicht. Bisherige Studien haben vor allem en bloc, R0 Resektionsraten und Komplikationen der unterschiedlichen endoskopischen Verfahren analysiert. Kaum jemand hat jedoch die Beschaffenheit der Submukosa des Resektats untersucht. Die Qualität der submukösen Resektion ist vor allem bei submukös invasiven Frühkarzinomen von großer Bedeutung da die Submukosainvasion die Einteilung in *low*- oder *high risk* für Lymphknotenmetastasierung definiert (Ichimasa et al., 2021). Daher ist es wichtig für die histopathologische Beurteilung der Submukosa ein optimales Präparat zu erzielen.

Die vorliegende retrospektive Pilotstudie vergleicht die Qualität der Submukosa von insgesamt 12 kolorektalen Resektaten, von denen 6 Läsionen mittels EMR (50 % en bloc sowie 50 % piecemeal-Verfahren) und 6 Läsionen mittels ESD (en bloc) reseziert wurden.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Datenkollektiv

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 12 (n=12) endoskopisch abgetragene kolorektale Läsionen des rechten Kolons unterschiedlicher Patienten, welche in der Zeitspanne von 2013 bis 2016 reseziert worden sind, eingeschlossen. Die 12 Patienten waren zurzeit der Studie zwischen 56 und 81 Jahren alt (medianes Alter von 72 Jahren). Die Patientendaten wurden alle anonymisiert und alle Resektate haben zuvor einer histopathologischen Diagnosestellung gedient.

In diese Studie wurden 6 EMR und 6 ESD Resektate eingeschlossen. In der EMR Gruppe handelte es sich um jeweils 3 en bloc- und 3 piecemeal-Resektionen, bei der ESD Gruppe um 6 en bloc-Resektionen. Die Auswahl der Präparate in den unterschiedlichen Gruppen erfolgte per Zufallsprinzip.

Die endoskopischen Abtragungen der Läsionen erfolgten alle durch Prof. Dr. med. FL Dumoulin in der Abteilung für Innere Medizin des Gemeinschaftskrankenhauses Bonn.

Die en bloc-Resektate wurden auf eine Korkplatte aufgezogen und anschließend mit Formaldehyd fixiert. Bei den piecemeal-Resektaten wurden die Fragmente in einem Behälter gesammelt und anschließend mit Formaldehyd fixiert.

1.2.2 Histopathologische Aufarbeitung und Untersuchung

Die histopathologische Aufarbeitung und Untersuchung erfolgte in der Pathologie in Bonn-Duisdorf. Nach Entwässerung mit Isopropanol in aufsteigender Alkoholreihe wurde das Gewebe in heißes Paraffin eingebettet. Aus dem Paraffin-Block wurden zwischen 2-6 µm dünne Gewebeschnitte gewonnen. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgezogen um anschließend mit HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung), als auch mit PAS-Reaktion-Färbung (Perjodsäure-Schiff-Färbung) angefärbt zu werden (Abb. 1). Die histopathologische Diagnosestellungen erfolgten durch die Pathologen Prof. Dr. med. Hildenbrand und Dr. med. Varnai-Händel. Histologisch wurden Adenome mit villöser, tubulärer, tubulovillöser und serratierter Histologie unterschieden und in Dysplasiegrade unterteilt. Bei einem der ESD- Präparate handelte es sich um ein Adenokarzinom pT1, G2, L0, V0, R0.

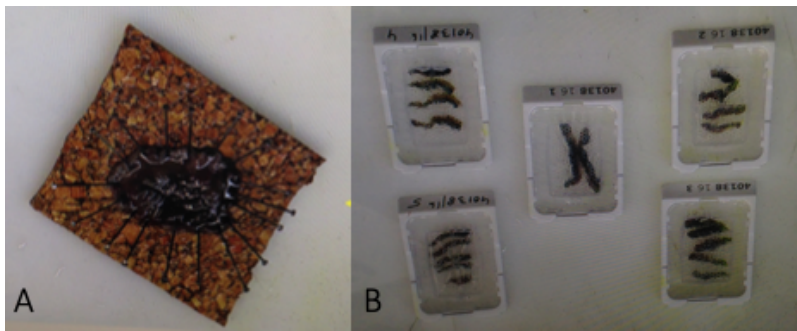


Abb. 1: A: en bloc-Resektat auf Korkplatte (ESD), B: Kassetten mit Gewebeschnitten

1.2.3 Messungen

Um präzise Messungen zu gewährleisten, wurden die Gewebeschnitte digital ausgemessen. Hierzu wurden die Objektträger mittels Epson Scan (Seiko Epson Corporation, Suwa, Nagano, Japan) eingescannt und die Submukosa mittels der Software TelPath (Firma Bollmann.com) ausgemessen. Nur Gewebeschnitte mit sichtbarer, längsgeschnittener Submukosa und Lamina muscularis mucosae wurden in die Studie einbezogen. Präparate mit Fixationsartefakten wurden nicht verwendet. Bei, bedingt durch ihre Nähe zueinander liegenden makroskopisch identisch aussehenden, ca. 5 µm dünnen Schnitten, wurde jeweils nur einer der Schnitte in die Studie aufgenommen. Dies kam bei allen Präparaten vor und war vor allem der Fall, wenn die Schnitte aus dem gleichen Paraffin-Block stammten. In der EMR-Gruppe wurden 18 von 278 (6,5 %) Schnitte und in der ESD-Gruppe 34 von 381 (8,9 %) Schnitte ausgemessen (Tab. 1).

Bei allen Präparaten wurde als Bezugslinie für die Messungen der SM die Lamina muscularis mucosae ausgewählt. Zusätzlich wurde bei jedem Gewebeschnitt ein Resektionsrand von 2 mm nicht ausgewertet, um Fixationsartefakte zu umgehen. In Anlehnung an die Leitlinie der Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) wird die Messung der SM-Dicke vom unteren Rand der Lamina muscularis mucosae vertikal bis zum unteren Resektionsrand durchgeführt (Tanaka et al. 2020).

Zur Semiquantitativen Analyse der submukösen Präparation wurden folgende 4 Parameter festgelegt: Homogenität der resezierten SM, Anteil der resezierten Submukosafäche mit einer Tiefe ≥ 1000 µm, resezierte absolute Submukosatiefe Maximum sowie resezierte absolute Submukosatiefe Minimum (Abb. 2 und 3).

Der Parameter des resezierten Anteils über die 1000 μm hinaus ist gewählt worden da hiermit im Falle von submukös invasiv wachsendem Karzinom eine Aussage bezüglich einer kurativen Resektion erlangt werden kann (Kouyama et al., 2018).

Zur zuverlässigen Aussage bezüglich der Homogenität des Resektionsrandes wurde der Variationskoeffizient, der in 1 mm Abständen gemessenen Submukosatiefen berechnet. Desto kleiner der Variationskoeffizient, desto homogener ist reseziert worden.

Zur Messung des Prozentanteils an SM Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$ wurde die gemessene SM Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$ durch die Gesamtfläche der SM dividiert und mit der Zahl 100 multipliziert. Für die Parameter Homogenität und Anteil an SM Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$ wurde der Mittelwert aller Messungen eines Resektats bestimmt. Für die Parameter absolute SM Maxima und SM Minima wurde der jeweils höchste Wert aller Schnitte eines Resektats gewählt.

Tab. 1: eingeschlossene Gewebeschnitte in der EMR und ESD Gruppe

EMR	gemessene Schnitte/ total, n (%)	ESD	gemessene Schnitte/ total, n (%)
1	4/36 (11,1%)	1	8/66 (12,1%)
2	3/49 (6,1%)	2	7/69 (10,1%)
3	4/86 (4,6%)	3	3/43 (7,0%)
4	2/18 (11,1%)	4	53/52 (5,8%)
5	3/65 (4,6%)	5	9/48 (18,8%)
6	2/24 (8,3%)	6	4/103 (3,9%)
Total	18/278 (6,5%)	Total	34/382 (8,9%)

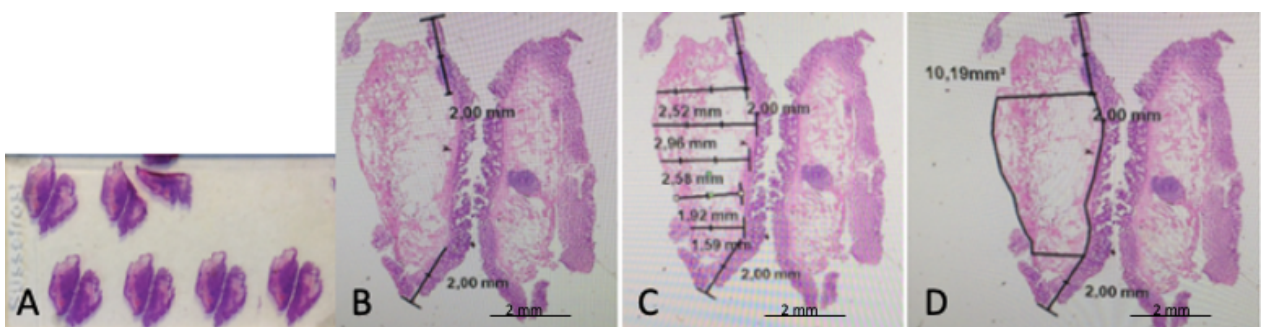


Abb. 2: EMR-Resektat, HE-Färbung, digitale Messungen: A: OT mit Färbung, B: 2 mm Resektionsrand, C: SM Tiefen der 1 mm Abstände, D: SM Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$

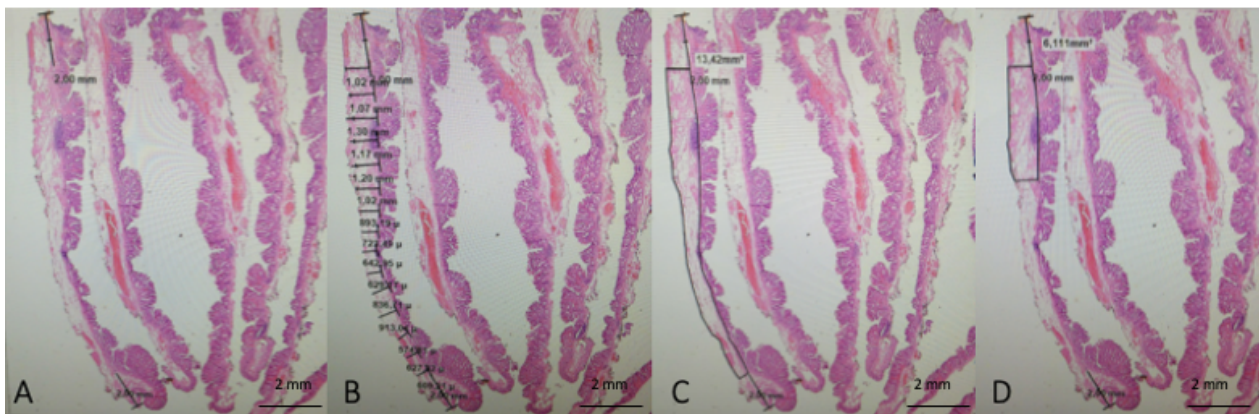


Abb. 3: ESD-Resektat, HE-Färbung, digitale Messungen: A: Resektionsrand von 2 mm, B: SM Tiefen der 1 mm Abstände, C: SM Fläche, D: SM Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$

1.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Unterstützung von Herrn Dr. rer. nat. Moritz Berger vom Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) in Bonn. Die Datensammlung erfolgte in Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Die statistischen Analysen wurden mittels des Statistik Programms R (Version 4.1.2) durchgeführt. Zur Analyse wurden die beiden Hauptgruppen EMR und ESD verglichen. Zur Auswertung der submukösen Qualität hinsichtlich beider Methoden EMR und ESD, wurde eine deskriptive Statistik im Sinne von Anzahl an Fällen, Mittelwert und Standardfehler (SEM) der Parameter durchgeführt. Boxplot Diagramme dienten der graphischen Veranschaulichung der Ergebnisse.

Mithilfe des Shapiro-Wilk's Test einer Stichprobe wurden alle Werte auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft. Da die Signifikanzwerte fast aller Parameter unter dem Signifikanzniveau $p = 0,05$ lagen, war davon auszugehen, dass die meisten Wertepaare nicht normal verteilt waren.

Für alle weiteren Berechnungen wurde der nicht-parametrische Wilcoxon Test angewendet. Mit dem Wilcoxon Test für 12 unabhängige Stichproben wurden die einzelnen Parameter untersucht und verglichen. Der Wilcoxon Test ist zweiseitig. Die Wahl eines zweiseitigen Verfahrens ist dadurch bedingt, dass die Untersuchungen ungerichtet stattfanden. Zusätzlich wird das Testverfahren auf Signifikanz geprüft und ein Signifikanz-Wert p berechnet. Werte $< 0,05$ wurden als signifikant (*) gekennzeichnet. Hochsignifikante Werte mit $p < 0,001$ (**) kamen in der Studie nicht vor.

1.3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 12 kolorektale Resektate bezüglich der Qualität der Submukosapräparation untersucht. Davon waren 6 Läsionen mittels EMR und 6 Läsionen mittels ESD abgetragen worden. Es wurden nur Gewebeschnitte in die Studie einbezogen, welche den im Kapitel Methodik (Kapitel 1.2.3) genannten Einschlusskriterien entsprachen (Tab. 1). Zur Messung der submukösen Qualität wurden die Parameter Homogenität der Submukosapräparation, Anteil an resezierter SM-Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$, absolute Maximum und Minimum der Submukosadiecke bestimmt.

In der EMR-Gruppe handelte es sich um 3 en bloc-Resektionen von Läsionen einer Größe $< 20 \text{ mm}$ und 3 piecemeal Resektionen von Läsionen einer Größe $\geq 20 \text{ mm}$. Hiervon ergaben sich histologisch 6 low grade Adenome (davon 66 % tubulös und 34 % tubulovillös). Lokalisiert waren diese im Coecum (1 x) und Colon ascendenz (5 x).

In der ESD-Gruppe handelte es sich um 6 en bloc-Resektionen von Läsionen einer Größe $\geq 20 \text{ mm}$. Hiervon ergaben sich histologisch ein Adenokarzinom pT1, G2, L0, V0, R0 (17 %) und 5 low grade Adenome (davon 33 % tubulös, 33 % flach tubulös und 17 % tubulovillös). Lokalisiert waren die Läsionen im Coecum (3 x), Colon ascendenz (1 x) und Colon transversum (2 x).

Im Wilcoxon Test zeigte sich im Vergleich der beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied bezüglich der resezierten SM Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$ und des absoluten resezierten SM Minimums. Dieser Unterschied spricht zugunsten der EMR-Gruppe. Mittels EMR wurde zu $91,20 \% \pm 6,6$ eine Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$ reseziert, wobei die ESD dies nur zu $47,13 \% \pm 10,6$ ($p = 0,018^*$) schaffte. Das absolute Minimum der SM Tiefe betrug in der EMR-Gruppe $933,67 \mu\text{m} \pm 125,12$. Dies stellt eine deutlich tiefere Resektion dar als die Resektion in der ESD-Gruppe, welche nur ein absolutes Minimum der SM Tiefe von $319,0 \mu\text{m} \pm 123,62$ aufweisen konnte ($p = 0,009^*$).

Keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Methoden zeigten die Parameter SM Homogenität und absolute SM Maximum. Beide Methoden haben homogen präpariert, mit einem Variationskoeffizient in der EMR-Gruppe von $0,20 \pm 0,02$ versus in der ESD-Gruppe von $0,32 \pm 0,06$ ($p = 0,064$). Das absolute SM Maximum betrug $2218,33$

$\mu\text{m} \pm 203,72$ in der EMR-Gruppe versus $2055,0 \mu\text{m} \pm 274,21$ in der ESD-Gruppe ($p = 0,70$) (Tab. 2-4 und Abb. 4-7).

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die EMR der ESD hinsichtlich des Anteils an resezierter Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$ sowie des resezierten SM Minimums überlegen ist. Zur Homogenität der Präparation sowie zum absoluten SM Maximum besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verfahren.

Tab. 2: Zusammenfassung aller Messungen pro Fall ($n = 6$) in der EMR-Gruppe

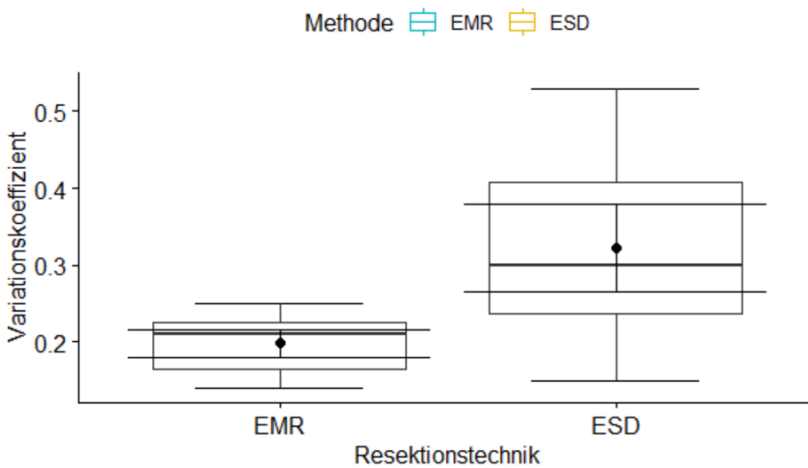
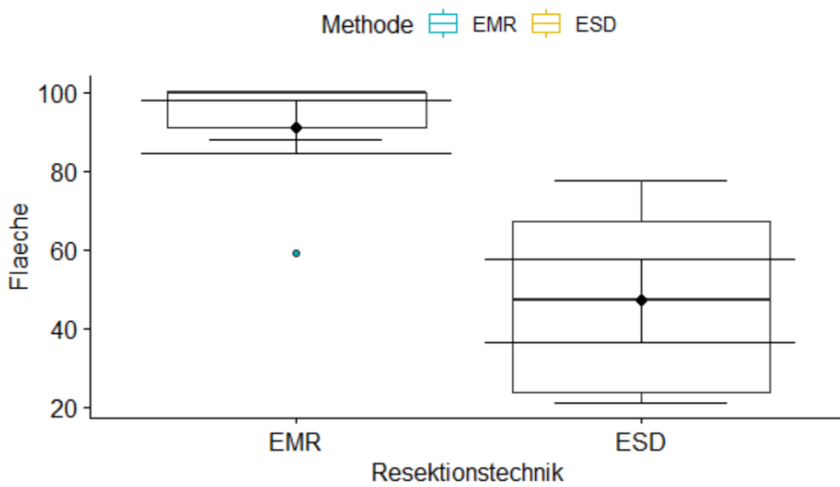
EMR	1	2	3	4	5	6	Mittelwert
Anteil Fläche > 1mm (%)	59,26	100	100	100	87,96	100	91,20
Homogenität (COV)	0,25	0,14	0,21	0,21	0,23	0,15	0,20
abs. Max. (μm)	1820	2430	2590	1870	1680	2920	2218,33
abs. Min. (μm)	678	1000	1005	1001	518	1400	933,67
Histologie	tubulovillöses Adenom	tubulöses Adenom	sessil, tubulovillöses Adenom	tubulöses Adenom	tubulöses Adenom	tubulöses Adenom	
Dysplasie	low grade	low grade	low grade	low grade	low grade	low grade	
Größe (cm)	1,7	2,3	2,2	0,8	1,2	1,2	1,57
Resektion	piecemeal	piecemeal	en bloc	en bloc	en bloc	piecemeal	
Lokalisation	Coecum	Colon asc.	Colon asc.	Colon asc.	Colon asc.	Colon asc.	
Geschlecht	w	w	w	m	m	m	
Alter (Jahre)	71	70	56	76	74	81	71,3

Tab. 3: Zusammenfassung aller Messungen pro Fall ($n = 6$) in der ESD-Gruppe

ESD	1	2	3	4	5	6	Mittelwert
Anteil Fläche > 1mm (%)	77,61	21,0	22,23	66,67	67,24	28,03	47,13
Homogenität (COV)	0,43	0,34	0,53	0,15	0,26	0,23	0,32
abs. Max. (μm)	3290	1300	1990	2050	2040	1660	2055
abs. Min. (μm)	155	108	142	892	192	425	319
Histologie	AdenoCa pT1,G2,L0,R0	tubulöses Adenom	tubulöses Adenom	flaches, tubulöses Adenom	flaches, tubulöses Adenom	tubulovillöses Adenom	
Dysplasie	Karzinom	low grade	low grade	low grade	low grade	low grade	
Größe (cm)	3,3	3,3	2,7	2,2	3,3	3,6	3,07
Resektion	en bloc	en bloc	en bloc	en bloc	en bloc	en bloc	
Lokalisation	Coecum	Coecum	Coecum	Colon asc.	Colon transv.	Colon transv.	
Geschlecht	m	w	m	m	w	m	
Alter (Jahre)	76	74	70	68	72	72	72

Tab. 4: statistische Auswertung der EMR-Gruppe (n = 6) und ESD-Gruppe (n = 6)

Methode		Homogenität (Variationskoeff.)	Anteil Fläche > 1000 μm (%)	absolute Minimum (μm)	absolute Maximum (μm)
EMR	N	6	6	6	6
	Mittelwert	0,20	91,20	933,67	2218,33
	SEM	0,02	6,65	125,12	203,72
ESD	N	6	6	6	6
	Mittelwert	0,32	47,13	319,00	2055,00
	SEM	0,06	10,62	123,62	274,21

**Abb. 4:** Homogenität der submukösen Präparation (Dargestellt mittels Variationskoeffizient). Boxplot-Darstellung mit Mittelwert, Medianwert, Quartilwerten und Standardfehler (SEM). P-Wert = 0,064**Abb. 5:** Anteil an Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$ (%). Boxplot-Darstellung mit Mittelwert, Medianwert, Quartilwerten und Standardfehler (SEM). P-Wert = 0,018*

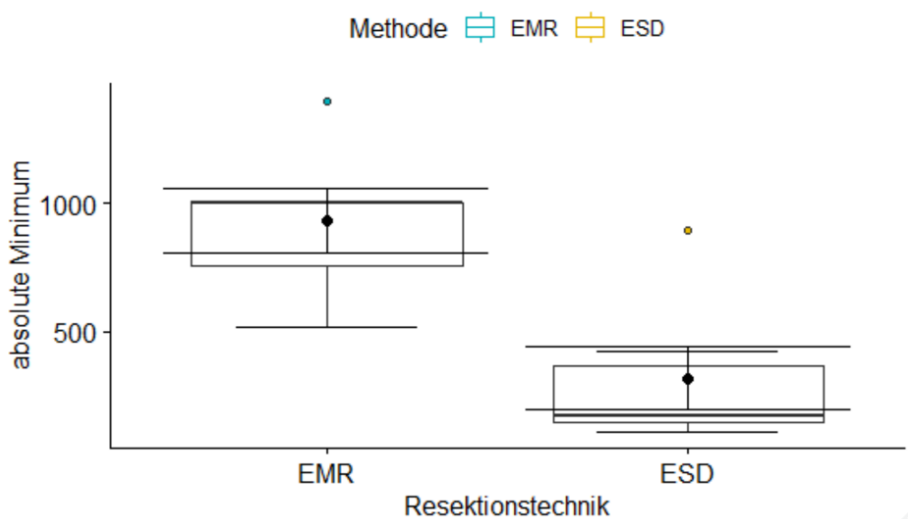


Abb. 6: absolute SM Minimum (μm). Boxplot-Darstellung mit Mittelwert, Medianwert, Quartilwerten und Standardfehler (SEM). P-Wert = 0,009*

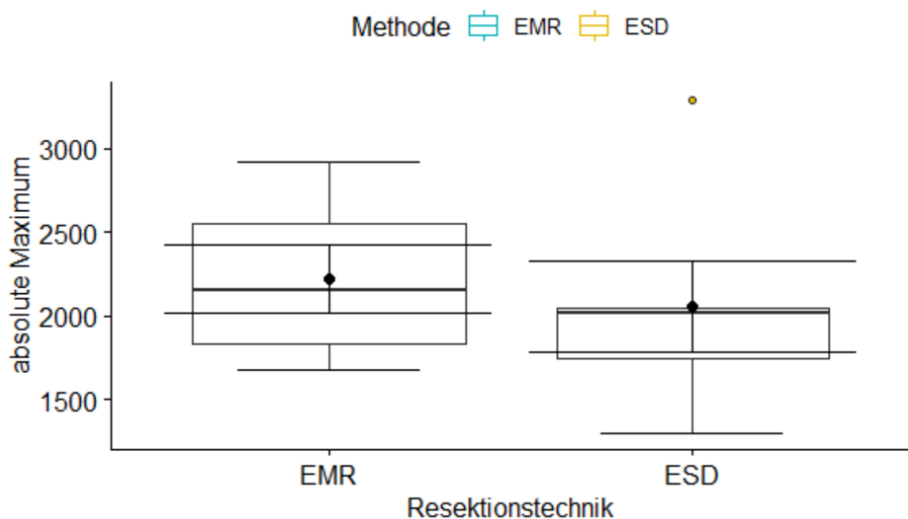


Abb. 7: absolute SM Maximum (μm). Boxplot-Darstellung mit Mittelwert, Medianwert, Quartilwerten und Standardfehler (SEM). P-Wert = 0,70

1.4 Diskussion

Diese Pilotstudie zeigte unerwarteterweise, dass die SM Dicke in EMR Präparaten qualitativ besser war als in ESD Präparaten. Gemäß dem heutigen Wissensstand ist die ESD jedoch Mittel der Wahl zur endoskopischen Therapie der Frühkarzinome, weil sie eine optimale Kontrolle der lateralen Tumorresektionsränder aufweist, größere Läsionen

en bloc reseziert und Verbrennungsartefakte vermieden. Die unerwarteten Ergebnisse dieser retrospektiven Pilotstudie zugunsten der EMR werden anhand folgender Erklärungen diskutiert.

Bei der EMR Technik wird mittels Schlinge eine große Gewebemasse gefasst und homogen in einer Schnittebene und in einem Schritt abgetragen. Bei der ESD wird mittels mehrerer Schritte die SM um die Läsion vorsichtig präpariert. Aufgrund der Sorge vor einer Perforation wird bei vermuteten benignen Läsionen eine Schnittebene in Richtung Befund hin gewählt. Hierdurch ist die deutlich geringere Prozentzahl an SM-Fläche > 1000 µm in der ESD Gruppe zu erklären (91,2 % in der EMR-Gruppe versus 47,1 % in der ESD-Gruppe). Man müsste im Falle von Frühkarzinomen darauf achten die SM in Richtung der Muskularis propria zu resezieren um einen höheren Anteil an SM Fläche > 1000 µm zu erlangen bei steigendem Risiko einer Perforation (Clees et al., 2022).

Diese Studie ist anhand der Wahl der Gewebeschnitte limitiert. In beiden Gruppen wurden jeweils nur wenige Schnitte in die Messungen einbezogen, da die Mehrheit der Schnitte nicht den Einschlusskriterien entsprach. Der Grund dieser kleinen Anzahl an Schnitte waren Artefakte oder nicht sichtbare Lamina muscularis mucosae. Um mehrere Schnitte in Zukunft einschließen zu können müsste man die Einschlusskriterien erweitern und sich zum Beispiel zur SM-Invasionstiefenmessung einer Läsion auf die Guidelines der JSCCR von 2016 beziehen. Hier werden auch Messungen ohne sichtbare Lamina muscularis mucosae einbezogen (Watanabe et al., 2018). Zusätzlich wäre eine standardisierte Schnittebene sinnvoll.

Ein weiterer Punkt ist, dass diese Studie keine Rücksicht auf die Morphologie der Läsion genommen hat. Die Lamina muscularis mucosae wurde bei allen Messungen als Ausgangslinie für die SM-Tiefenmessung gewählt. Bei gestielten Läsionen ist diese jedoch teilweise deutlich höher gelegen als bei flachen Neoplasien. Somit wird automatisch eine größere Distanz gemessen. In dieser Studie dominiert in der EMR-Gruppe die tubuläre Morphologie. Um diesen Messfehler zu Umgehen hat die Gruppe von Kitajima et al. im Jahr 2004 zur Ausmessung der SM-Invasion einer gestielten und zusätzlich in die Submukosa infiltrierend wachsenden Läsion das Level 2 nach Haggitt als Baseline genommen (Kitajima et al., 2004) (Abb. 8).

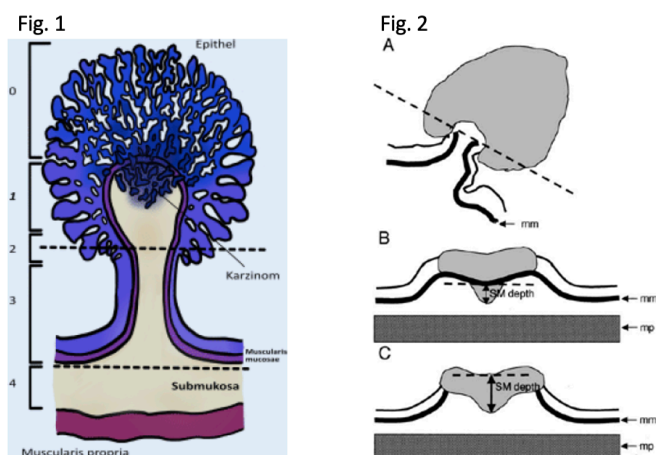


Abb. 8: Fig 1: Klassifikation der Eindringtiefe einer gestielten Läsion nach Haggitt (Scheidl, Öfner, & Margreiter, 2016) **Fig 2:** Baseline Festlegung in der Studie von K. Kitajima et al. 2004 (A: bei gestielten Läsionen wird Haggitt Level 2 benutzt, B: bei nicht gestielten Läsionen wird die Lam. muscularis mucosae benutzt, C: bei nicht gestielten Läsionen ohne erkennbare Lam. Muscularis mucosae wird die Oberfläche der Läsion benutzt) (Kitajima et al., 2004).

Zusätzlich wurde die Lokalisation der Läsion in dieser Pilotstudie nicht berücksichtigt. Bezüglich der Lokalisation ist bekannt, dass die Resektion im rechten Kolon die herausforderndste ist. In der Gruppe der ESD befanden sich 50 % der Läsionen im Coecum, 17 % im Colon ascendenz und 33 % im Colon transversum. In der EMR-Gruppe befanden sich 83 % der Läsionen im Colon ascendenz und 17 % im Coecum. Die ESD wurde also vor allem im Coecum, dem weiter distalen und somit schwierigsten Kompartiment angewendet.

Des Weiteren wurde die Größe der resezierten Läsion und die en bloc- Resektionsrate nicht mit in die Qualitätsberechnung einbezogen. Die Neoplasien in der ESD-Gruppe hatten eine Größe zwischen 22 mm und 36 mm (Mittelwert 30,7 mm). Alle wurden mittels ESD en bloc reseziert. In der EMR-Gruppe waren die Adenome zwischen 8 mm und max. 23 mm (Mittelwert 15,7 mm) groß. In der EMR-Gruppe erfolgte in der Hälfte der Fälle eine piecemeal-Resektion. Durch das piecemeal-Verfahren ist die genaue Größenangabe bei Läsionen > 20 mm erschwert und sie kann nur durch das Messen der verschiedenen Fragmente geschätzt werden. Zusätzlich ist zu bedenken, dass die piecemeal-Technik die präzise histopathologische Aufarbeitung des Resektats erheblich erschwert und somit

die Risikoabschätzung beeinträchtigt. Nur mittels en bloc-Resektion können genaue Angaben zum tumorfreien Resektionsrand gemacht werden. In dieser Studie wurde die en bloc-Resektion zwar dokumentiert, jedoch nicht zum Qualitätsgrad der SM mitberechnet. Dies wäre ein relevanter Faktor zu den Gunsten der ESD, welcher jedoch nicht Gegenstand dieser Studie ist, die sich ausschließlich mit der Ausmessung der SM der Präparate befasst.

Zusätzlich wurde die Anzahl an Verbrennungsartefakte in beiden Verfahren nicht dokumentiert. Durch die Koagulation der Schlinge entstehen Verbrennungen und somit könnte eine eventuell vorliegende Lymphgefäßinvasion übersehen werden und fälschlicherweise eine low risk Situation für Lymphknotenmetastasierung diagnostiziert werden. Bei der ESD sind diese Artefakte gering.

Eine weitere mögliche Erklärung der unerwartet vorteilhaften Ergebnisse in der EMR Gruppe wäre, dass die en bloc Resektate durch die Anspannung auf eine Korkplatte in die Länge gezogen und somit die SM schmaler wurde. Bei dem piecemeal-Verfahren wurden die Fragmente lose in einem Behälter aufbewahrt. In der ESD Gruppe wurden alle Präparate en bloc reseziert. Da jedoch in der EMR Gruppe die Hälfte der Präparate en bloc, die andere in piecemeal-Technik abgetragen wurden ist diese mögliche Erklärung unwahrscheinlich.

Zusätzlich könnte man davon ausgehen, dass die SM-Dicke durch die Unterspritzung von submuköser Flüssigkeit (in allen Fällen 0,9 % NaCl Lösung) beeinflusst wurde. Da die ESD zeitaufwendiger als die EMR ist, hätte die injizierte Flüssigkeit hier mehr Zeit, um aus dem Gewebe hinaus zu diffundieren. Dieses Argument entfällt jedoch da in der anschließenden histopathologischen Aufarbeitung alle Präparate mit Isopropanol in aufsteigender Alkoholreihe entwässert wurden.

Schlussendlich handelt es sich um eine retrospektive Pilotstudie mit nur kleiner Fallzahl (n= 12). Um die Submukosapräparation zu bewerten wäre eine größere prospektive Studie sinnvoll. Hier könnte man Läsionen gleicher Größe, Morphologie und Lokalisation einschließen, die Einschlusskriterien sowie die Qualitätsparameter erweitern und eine standardisierte Schnitteben vorgeben.

Es gibt alternative Verfahren wie zum Beispiel das Flat Adenoma Resection Instrument (FARIn) welches endoskopisch flache Läsionen mittels geringen thermischen Artefakten nahe der Muskularis propria reseziert. Hierzu gibt es jedoch nur wenige Kohortenstudien und Fallberichte (Clees et al., 2015).

Letztendlich ist gemäß aktueller Forschungsstände die ESD, aufgrund ihrer optimalen Kontrolle der lateralen Tumorresektionsränder und en bloc Resektion größerer Befunde, die Methode der Wahl zur endoskopischen Resektion von malignitätsverdächtigen Läsionen.

1.5 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden retrospektiven Pilotstudie war der Versuch der semiquantitativen Bewertung der Qualität der Submukosa in Kolonresektaten, welche mittels der endoskopischen Verfahren EMR und ESD abgetragen worden sind.

Die Qualität der resezierten Submukosa der Präparate ist insbesondere wichtig, da die exakte Analyse einer möglichen Tumordinfiltration in die Submukosa ein wesentlicher Aspekt in der Beurteilung des Lymphknotenmetastasierungsrisikos endoskopisch abgetragener kolorektaler Karzinome ist.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass die EMR der ESD hinsichtlich der vertikalen Schnittebene der Submukosa überlegen sein könnte. Signifikante Ergebnisse zum Vorteil der EMR zeigte sich beim Anteil an resezierter submuköser Fläche $\geq 1000 \mu\text{m}$ sowie des resezierten submukösen Minimums. Zur Homogenität der Präparation sowie zum absoluten SM Maximum besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verfahren.

Gemäß den aktuellen Forschungsständen ist jedoch die ESD die Methode der Wahl zur endoskopischen Resektion von malignitätssuspekten Läsionen. Die ESD kann größere Läsionen en bloc resezieren und optimale laterale Tumorresektionsränder erlangen bei jedoch erhöhtem Zeitaufwand und Perforationsrisiko.

Die Kombination aus einer en bloc Resektion mit optimalen lateralen Tumorresektionsränder sowie einer tiefmöglichsten SM Präparation ohne erhöhtes Perforationsrisiko wäre eine ideale endoskopische Resektion.

Bisher haben sich kaum Studien mit der endoskopischen submukösen Präparation befasst. Limitation dieser Pilotstudie ist, dass die Gewebeschnitte nicht standardisiert wurden, es sich um eine kleine Fallzahl handelt (n=12) und nur eine kleine Anzahl der Gewebeschnitte den Einschlusskriterien entsprachen. Diese Studie stellt jedoch einen Ausgangspunkt und eine Inspiration für weitere folgende Studien dar, welche endoskopische Verfahren bezüglich ihrer submukösen Präparation vergleichen wollen.

Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Clees N., Hildenbrand R., Farin G., Grund K., Dumoulin F.L. (2015). Endoskopische Submukosadisektion (ESD) grösserer sessiler/flacher Adenome im Kolorektum mit dem neuartigen Flat Adenoma Resection Instrument (FARIn)- eine Pilotstudie mit 11 Patienten. *Z Gastroenterol*, 53, pp 292. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1559318>

Clees N., Rodriguez-Monaco F., Hildenbrand R., Vernai-Händel A., Grund K.E., Metter K., Dumoulin F. L. (2022). assessment of submucosal layer quality of colorectal EMR versus ESD specimens-a pilot study. *Endoscopy*, 54 S01(DOI 10.1055/s-0042-1744870), pp 119. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1744870>

Dumoulin, F. L., & Hildenbrand, R. (2019). Endoscopic resection techniques for colorectal neoplasia: Current developments. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 25, pp. 300-307. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i3.300>

Ferlitsch, M., Moss, A., Hassan, C., Bhandari, P., Dumonceau, J. M., Paspatis, G., ... Bourke, M. J. (2017). Colorectal polypectomy and endoscopic mucosal resection (EMR): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy*, Vol. 49, pp. 270–297. <https://doi.org/10.1055/s-0043-102569>

Gupta, V., & East, J. E. (2020). Optimal endoscopic treatment and surveillance of serrated polyps. *Gut and Liver*, 14(4), 423–429. <https://doi.org/10.5009/gnl19202>

Ichimasa, K., Kudo, S. E., Miyachi, H., Kouyama, Y., Misawa, M., & Mori, Y. (2021). Risk stratification of T1 colorectal cancer metastasis to Lymph nodes: Current status and perspective. *Gut and Liver*, Vol. 15, pp. 818–826. <https://doi.org/10.5009/gnl20224>

Kitajima, K., Fujimori, T., Fuji, S., Takeda, J., Ohkura, Y., Kawamata, H., ... Nagasako, K. (2004). Correlations between lymph node metastasis and depth of submucosal

invasion in submucosal invasive colorectal carcinoma: A Japanese collaborative study. *Journal of Gastroenterology*, 39(6), 534–543. <https://doi.org/10.1007/s00535-004-1339-4>

Kouyama, Y., Kudo, S. ei, Miyachi, H., Ichimasa, K., Matsudaira, S., Misawa, M., ... Hamatani, S. (2018). Risk factors of recurrence in T1 colorectal cancers treated by endoscopic resection alone or surgical resection with lymph node dissection. *International Journal of Colorectal Disease*, 33(8), 1029–1038. <https://doi.org/10.1007/s00384-018-3081-z>

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, A., & Onkologie, L. (2019). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1. AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, 1–328. Retrieved from https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01. [02.08.2022]

Nguyen, L. H., Goel, A., & Chung, D. C. (2020). Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158(2), 291–302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>

Pedro Pimentel-Nunes, Jean, M. D.-R. (2022). *Endoscopic submucosal dissection for superficial gastrointestinal lesions: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline – Update 2022.* [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1055/a-1811-7025.](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1055/a-1811-7025) [02.08.2022]

Robert Koch-Institut, die G. der epidemiologischen K. in D. e. V. und das Z. für K. (2021). Darm 2017/2018. *Krebs in Deutschland Für 2017/2018*, 13, 46–49. [02.08.2022]

Russo, P., Barbeiro, S., Awadie, H., Libânio, D., Dinis-Ribeiro, M., & Bourke, M. (2019). Management of colorectal laterally spreading tumors: a systematic review and meta-analysis. *Endoscopy International Open*, 07(02), E239–E259. <https://doi.org/10.1055/a-0732-487>

Scheidl, S., Öfner, D., & Margreiter, C. (2016). Management und Therapie des kolorektalen Frühkarzinoms. *Coloproctology*, 38(3), 199–212. <https://doi.org/10.1007/s00053-016-0090-7>

Tanaka, S., Kashida, H., Saito, Y., Yahagi, N., Yamano, H., Saito, S., ... Tajiri, H. (2020). Japan Gastroenterological Endoscopy Society guidelines for colorectal endoscopic submucosal dissection/endoscopic mucosal resection. *Digestive Endoscopy*, 32(2), 219–239. <https://doi.org/10.1111/den.13545>

Watanabe, T., Muro, K., Ajioka, Y., Hashiguchi, Y., Ito, Y., Saito, Y., ... Sugihara, K. (2018). Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2016 for the treatment of colorectal cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 23(1), 1–34. <https://doi.org/10.1007/s10147-017-1101-6>

Zentral Institut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland. (2020). *Früherkennungs-Koloskopie 2018 in Deutschland.* 1–21. Retrieved from <https://www.zi.de/presse/presseinformationen/10-juli-2020> [02.08.2022]

2. Veröffentlichung

Article published online: 2022-06-10

Innovation forum

Thieme

Colorectal submucosa thickness in specimens obtained by EMR versus ESD: a retrospective pilot study

OPEN
ACCESS



Authors

Natalie Clees¹, Alinda D. Várnai-Händel², Ralf Hildenbrand², Karl-E. Grund³, Klaus Metter⁴, Franz Ludwig Dumoulin¹

Institutions

- 1 Department of Medicine and Gastroenterology, Gemeinschaftskrankenhaus Bonn, Academic Teaching Hospital, University of Bonn, Bonn, Germany
- 2 Institute für Pathology Bonn-Duisdorf, Bonn, Germany
- 3 Institute for Experimental Surgical Endoscopy, Tübingen University, Tübingen, Germany
- 4 Clinic for Gastroenterology, Hepatology and Diabetology, Göppingen, Germany

Fax: +49-228-508-1562
f.dumoulin@gk-bonn.de

submitted 18.12.2021

accepted after revision 30.3.2022

Bibliography

Endosc Int Open 2022; 10: E721–E726

DOI 10.1055/a-1816-6381

ISSN 2364-3722

© 2022. The Author(s).

This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution-NonDerivative-NonCommercial License, permitting copying and reproduction so long as the original work is given appropriate credit. Contents may not be used for commercial purposes, or adapted, remixed, transformed or built upon. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany

Corresponding author

Prof. Dr. Franz Ludwig Dumoulin, Gemeinschaftskrankenhaus Bonn – Medicine/Gastroenterology, Bonner Talweg 4-6, Bonn 53113, Germany

ABSTRACT

Accurate histopathology is the mainstay for reliable classification of resected early colorectal cancer lesions in terms of potential risk of lymph node metastasis. In particular, thickness of resected submucosa is important in cases of submucosal invasive cancer. Nevertheless, little is known about the quality and thickness of submucosal tissue obtained using different endoscopic resection techniques. In this small pilot study, we performed morphometric analysis of submucosal thickness in specimens obtained from right-sided colorectal lesions using endoscopic mucosal resection (EMR) versus endoscopic submucosal resection (ESD). Comparative measurements showed significant differences in submucosal area $\geq 1000 \mu\text{m}$ and minimum submucosal thickness per tissue section analyzed (EMR vs. ESD: $91.2\% \pm 6.6$ vs. $47.1\% \pm 10.6$, $P=0.018$; $933.7 \mu\text{m} \pm 125.1$ vs. $319.0 \mu\text{m} \pm 123.6$, $P=0.009$). In contrast, no significant differences were observed in variation coefficient and mean maximum submucosal thickness. Thus, unexpectedly, in this small retrospective pilot study, specimens obtained using EMR had a better preserved submucosal layer than those obtained using ESD – possibly due to the different methods of specimen acquisition. The findings should be kept in mind when attempting to resect lesions suspicious for submucosal invasive cancer.

Introduction

Endoscopic resection of early colorectal neoplasia is the current standard of care. In cases of endoscopic resection of early colorectal cancer, resection is considered curative if the predicted lymph node metastasis risk is absent or very low [1–3]. Accepted features of low risk of lymph node metastasis are well-differentiated histology (G1/2), absence of lymph or blood vessel infiltration (L0/V0), complete (R0) resection, low tumor cell budding, and limited submucosal infiltration depth of <1000

μm [4, 5]. Accurate histopathology, therefore, is of great importance to reliably classify a resected lesion as low or high risk, particularly in patients who have submucosal invasion. The thickness of submucosal tissue becomes even more important because even a submucosal tumor infiltration depth of $>1000 \mu\text{m}$ with no other risk factors for lymphatic spread is probably not associated with an increased risk of lymph node metastasis [5].

The current standard for endoscopic resection of benign-appearing colorectal lesions is endoscopic mucosal resection

► **Table 1** Specimens selected for morphometric analysis.

EMR cases	Location	Size (mm)	ESD cases	Location	Size (mm)
#1	Cecum	17 (piecemeal)	# 1	Cecum	33 (en bloc)
#2	Ascending colon	23 (piecemeal)	# 2	Cecum	33 (en bloc)
#3	Ascending colon	22 (en bloc)	# 3	Ascending colon	27 (en bloc)
#4	Ascending colon	8 (en bloc)	# 4	Ascending colon	22 (en bloc)
#5	Ascending colon	12 (en bloc)	# 5	Transverse colon	33 (en bloc)
#6	Ascending colon	12 (piecemeal)	# 6	Transverse colon	36 (en bloc)

EMR: endoscopic mucosal resection; ESD: endoscopic submucosal dissection.

(EMR), which has to be carried out as fragmented resection (piecemeal EMR) in patients who have of larger flat or sessile lesions [6, 7]. The resulting specimens are suboptimal for histopathology due to fragmentation and coagulation artifacts. In patients who have invasive cancer, this can lead to unclear resection status. Moreover, coagulation artifacts may lead to destruction of possible high-risk features, and thus, result in a misclassification of high-risk lesions as low-risk. In contrast, endoscopic submucosal dissection (ESD) is superior to EMR with regard to en bloc resection rates for flat or sessile lesions measuring > 15 to 20 mm [8]. Therefore, it has been advocated for larger colorectal lesions suspected of harboring invasive cancer [1–3]. While the majority of studies focus on en bloc and R0 resection rates, little is known about quality and abundance of submucosal layer in the resected specimens, which is of particular importance in patients who have submucosal invasive cancer.

Here, we report data from a retrospective morphometric pilot study comparing submucosa quality and thickness from routine specimens obtained by piecemeal EMR versus ESD.

Methods

We analyzed tissue sections that had been processed for routine staining with hematoxylin and eosin (H&E) or periodic acid/Schiff (PAS). EMR and ESD were carried out by an experienced endoscopist (> 1000 EMR/> 300 colorectal ESD procedures). Normal saline with 0.05% indigo carmine was used for submucosal injection.

At the end of the procedure, en bloc EMR and ESD specimens were loosely stretched out on corkboard and immersed in 4% formaldehyde fixative. Tissue fragments from piecemeal EMR were collected directly into a vial containing the fixative solution. The pre-embedding procedure consisted of automated sequential dehydration of the tissue with increasing alcohol concentrations and gradual replacement of alcohol with paraf-

fin solvent. Finally, the specimens were embedded and sectioned for histopathology. All sections had been previously used for histopathology diagnosis carried out by certified gastrointestinal pathologists. Specimens obtained from six EMR and six ESD resections from the right colon were included in our analysis (► **Table 1**). We selected tissue sections suitable for morphometric analysis according to the following criteria: 1) sections cut in parallel to the submucosal layer; 2) no or minimal fixation artifacts; and 3) exclusion of the lateral 2-mm areas of the specimen, which are prone to artifacts. We excluded poorly oriented or directly adjacent sections. Using these selection criteria, the EMR group comprised 18 of 278 (6.5%) routine sections and the ESD group 34 of 381 (8.9%) sections for further morphometric analysis (► **Table 2**). Submucosal thickness was measured perpendicularly from the muscularis mucosae down to the vertical resection margin of the specimen in accordance with Japanese Guidelines [2]. We assessed quality and quantity of the submucosal layer in each of the clinical cases with four parameters. First, as an approach to gather information about the homogeneity (or variation) of submucosal thickness, we calculated the variation coefficient from repetitive measurement of submucosal thickness every 1000 µm. Moreover, we identified minimal submucosal thickness and maximal submucosal thickness. Finally, to obtain data on the average thickness of submucosal layer, we calculated a ratio of the area of submucosal layer ≥ 1000 µm relative to the total submucosal area (► **Fig. 1**). The 1000-µm threshold was used because it represents an important landmark for assessment of curative endoscopic resections in patients who have submucosal invasive cancer [4, 5]. Morphometric measurements were performed on scanned photographic images with a commercially available scanner system (Seiko Epson Corporation; Suwa, Nagano, Japan). Statistical calculations were carried out with Microsoft Excel (Microsoft Corporation; Redmond, Washington, United States) and the R-Studio software (R-Studio Inc.; Boston, Massachusetts, United States). Data from EMR

► **Table 2** Characteristics of specimens selected for morphometric analysis.

EMR	Sections analyzed/total, n (%)	ESD	Sections analyzed/total, n (%)
# 1	4/36(11.1%)	1	8/66(12.1%)
# 2	3/49(6.1%)	2	7/69(10.1%)
# 3	4/86(4.6%)	3	3/43(7.0%)
# 4	2/18(11.1%)	4	3/52(5.8%)
# 5	3/65(4.6%)	5	9/48(18.8%)
# 6	2/24(8.3%)	6	4/103(3.9%)
Total	18/278(6.5%)	Total	34/381(8.9%)

EMR: endoscopic mucosal resection; ESD: endoscopic submucosal dissection.

and ESD specimens were compared using a two-sided Wilcoxon-test for unpaired samples. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The EMR group comprised specimens from three en bloc and three piecemeal resections and the ESD group en bloc resections only; all specimens were from the right colon (► **Table 1**). Histology was tubular or tubular-villous with low-grade dysplasia and one tubular-villous adenoma, with the exception of one adenoma with partial transformation into a G2 adenocarcinoma in the ESD group.

Comparative measurements from both groups showed significant differences in minimum submucosal thickness and in the fraction of resected submucosal thickness area $\geq 1000 \mu\text{m}$. No significant differences were observed in homogeneity (variation coefficient) or maximum submucosal thickness (► **Table 3**, ► **Fig. 2**).

Discussion

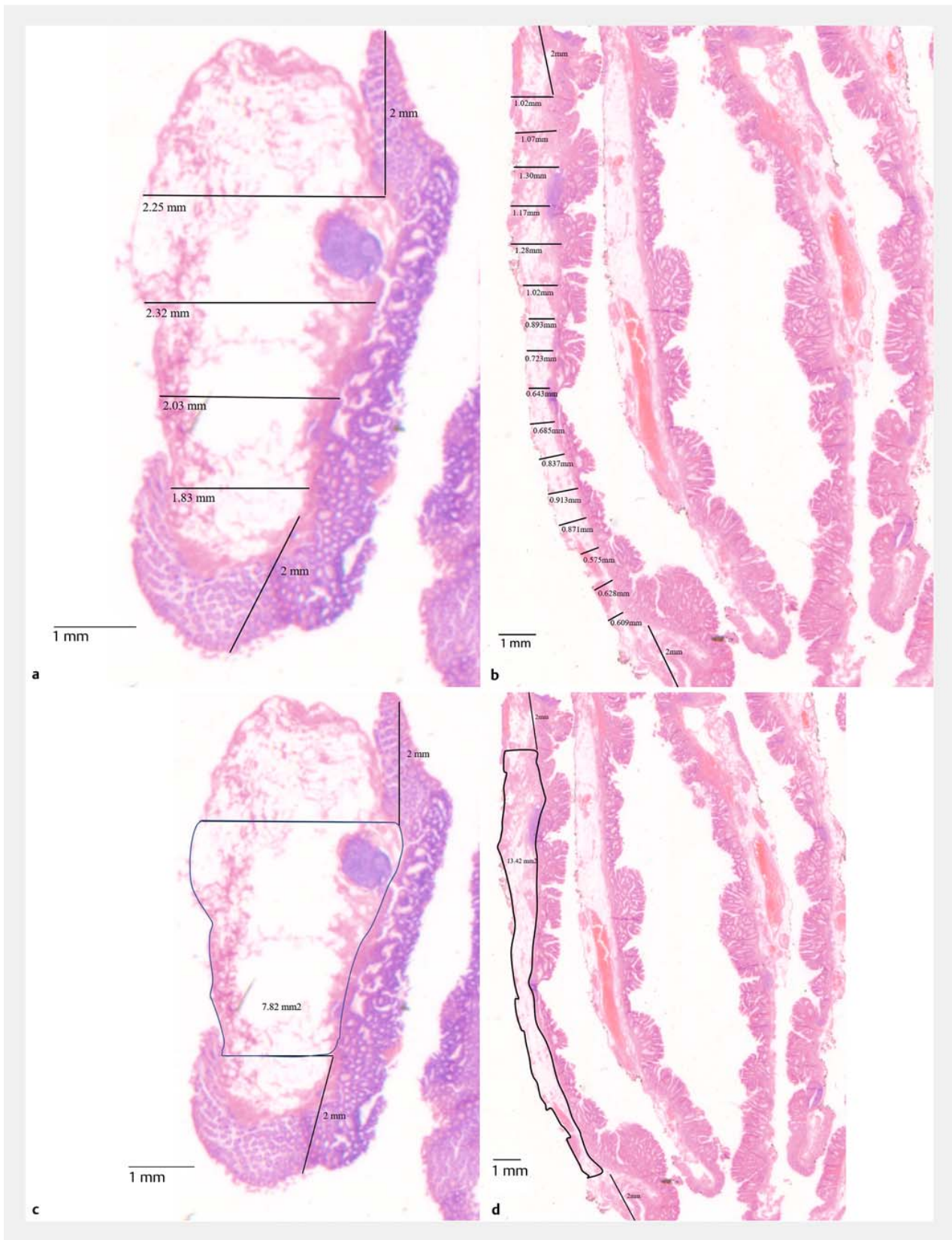
In this small pilot study, we retrospectively analyzed submucosal thickness in routine histopathology specimens obtained using EMR or ESD. We observed a significantly higher fraction of submucosal layer thickness $> 1000 \mu\text{m}$ as well as a higher mean minimal submucosal thickness for EMR specimens than for specimens obtained using ESD. No difference was found in variability of submucosal thickness or mean maximum submucosal thickness.

Although a small pilot study obviously does have limitations, these results suggest more abundant submucosal tissue in specimens obtained using EMR rather than using ESD. Several possible explanations can be considered to account for the observed differences. First, the differences might reflect different handling of specimens – in particular, stretching/pinning of en bloc specimens on corkboard versus direct collection of tissue fragments into the fixative solution. However, in our study, three of six EMR specimens were resected en bloc, which makes this an unlikely explanation. Second, variation in submucosal thickness might be due to the quantity of submucosal injection

solution. In this study, normal saline was used for submucosal injection in both EMR and ESD and the amount of submucosal fluid present in tissue specimens at the end of an endoscopic procedure would have varied greatly, particularly due to different procedure times. Nevertheless, this would probably not translate into differences in submucosal thickness because specimens are dehydrated during the pre-embedding procedure followed by paraffin embedding. Third, interindividual variability of submucosal thickness cannot be ruled out. This is an obvious limitation of the small sample size and will need to be analyzed in a larger number of specimens, including full-thickness specimens (e.g. from endoscopic full-thickness resection or laparoscopic surgery). Finally, and perhaps most likely, the observed difference could result from differences in preparation technique. ESD is carried out with dedicated knives. The cutting line will be oriented toward the mucosal layer to prevent perforation of the proper muscle, unless a lesion is suspicious for submucosal invasive cancer. In contrast, for piecemeal EMR, tissue is grasped when closing the snare around the specimen, thus possibly yielding thicker submucosal tissue.

As previously described, ESD is recommended for resection of lesions that may be malignant. This still seems to be justified, because ESD allows better definition of lateral margins and has a higher en bloc resection rate for larger flat or sessile lesions [1]. Thus, ESD will remain the method of choice for lesions confined to the mucosal layer. However, the data presented above suggest that in patients suspected to have cancer with slight submucosal infiltration, care should be taken to resect the submucosal layer close to the propria muscle layer. Alternatively, an endoscopic full-thickness resection might be considered for smaller lesions suspected to have submucosal invasion [9]. Moreover, a modified hybrid EMR technique referred to as endoscopic submucosal resection has been introduced using a newly designed, partially insulated snare that allows cutting close to the propria muscle layer [10, 11].

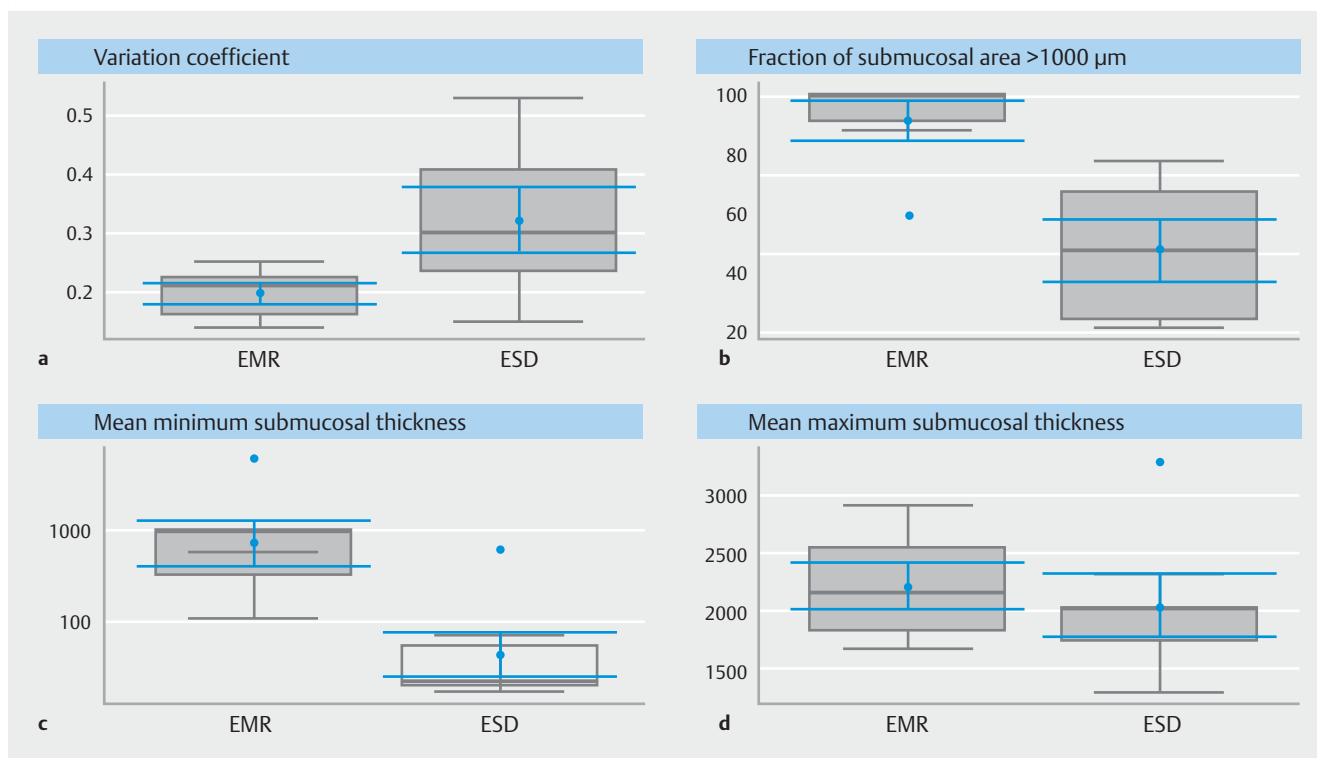
This pilot study has obvious limitations. The design was retrospective and the study comprised only a small sample size. Therefore, the quality of routine specimens was not optimal for morphometric analysis. Moreover, optimal matching of samples was not possible and, given the small sample size, differences therefore might be overestimated or underestimated.



► **Fig. 1** Representative examples of digital measurements from analyzed slices (H&E stain). **a** Measurement of submucosal thickness from an EMR specimen. **b** Measurement of submucosal thickness from an ESD specimen. **c** Measurement of submucosal area from an EMR specimen. **d** Measurement of submucosal area from an ESD specimen.

► **Table 3** Comparison of semi-quantitative measurements.

	EMR (n=6)	ESD (n=6)	P value
Variation coefficient	0.20±0.02	0.32±0.06	0.064 (n.s.)
Minimum submucosal thickness (µm)	933.67±125.12	319.00±123.62	0.009
Maximum submucosal thickness (µm)	2218.33±203.72	2055.00±274.21	0.70 (n.s.)
Submucosal area fraction ≥ 1000µm (%)	91.20±6.65	47.13±10.62	0.018



► **Fig. 2** Results of digital measurements of specimens by EMR vs. ESD given as box and whisker plots, **a** variation coefficient, **b** fraction of submucosal areal >1000µm, **c** mean minimum submucosal thickness, **d** mean maximum submucosal thickness.

Moreover, most procedures were done on lesions not suspected of harboring cancer. Thus, the dissection plane for ESD might have been directed toward the mucosal layer to avoid propria muscle injury, which might explain the submucosal layer was thinner in these specimens.

Conclusions

In summary, in this small pilot study of submucosa thickness, specimens obtained using EMR rather than ESD appeared to be better suited for histological analysis of submucosal infiltration. On the other hand, ESD allows better control of lateral resection margins. An ideal endoscopic resection technique should combine both optimal control of lateral resection margins and resection of the largest possible amount of submucosal tissue without increasing perforation risk. Notwithstanding the above-mentioned limitations, we think that the data will be a useful starting point for further studies of the submucosal

layer in tissue specimens obtained using different endoscopic resection techniques.

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Pimentel-Nunes P, Dinis-Ribeiro M, Ponchon T et al. Endoscopic submucosal dissection: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy* 2015; 47: 829–854
- [2] Tanaka S, Kashida H, Saito Y et al. Japan Gastroenterological Endoscopy Society guidelines for colorectal endoscopic submucosal dissection/endoscopic mucosal resection. *Dig Endosc* 2020; 32: 219–239

- [3] Draganov PV, Wang AY, Othman MO et al. AGA Institute Clinical Practice Update: Endoscopic Submucosal Dissection in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019; 17: 16–25.e11
- [4] Ichimasa K, Kudo SE, Miyachi H et al. Risk stratification of T1 colorectal cancer metastasis to lymph nodes: current status and perspective. *Gut Liver* 2021; 15: 818–826
- [5] Kouyama Y, Kudo SE, Miyachi H et al. Risk factors of recurrence in T1 colorectal cancers treated by endoscopic resection alone or surgical resection with lymph node dissection. *Int J Colorectal Dis* 2018; 33: 1029–1038
- [6] Ferlitsch M, Moss A, Hassan C et al. Colorectal polypectomy and endoscopic mucosal resection (EMR): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy* 2017; 49: 270–297
- [7] Kaltenbach T, Anderson JC, Burke CA et al. Endoscopic removal of colorectal lesions—recommendations by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2020; 158: 1095–1129
- [8] Russo P, Barbeiro S, Awadie H et al. Management of colorectal laterally spreading tumors: a systematic review and meta-analysis. *Endosc Int Open* 2019; 7: E239–E259
- [9] Meier B, Stritzke B, Kuellmer A et al. Efficacy and safety of endoscopic full-thickness resection in the colorectum: results from the German Colonic FTRD Registry. *Am J Gastroenterol* 2020; 115: 1998–2006
- [10] Gölder SK, Schaller T, Farin G et al. Partially insulated cutting instruments for hybrid endoscopic submucosal dissection - the Flat Adenoma Resection Instruments (FARIn). *Endoscopy* 2016; 48: E218–E219
- [11] Metter K, Aepli P, Dumoulin FL et al. Endoscopic submucosal resection (ESR) – a technique using novel devices for incision and resection of neoplastic lesions. *Endoscopy* 2021: doi:10.1055/a-1723-3194

3. Danksagung

Mein Dank geht an alle Menschen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. med. FL Dumoulin für das Thema für diese Arbeit, für seine Unterstützung bei der Ausarbeitung der Messungen und Auswertung der Ergebnisse, sowie seine Betreuung während der ganzen Zeit.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. med. Hildenbrand und Dr. med. Varnai-Händel für ihre spontane und jederzeit mögliche Zurverfügungstellung der Präparate und des Ausmessungsprogramms in der Pathologie, sowie für ihre Hilfestellung bei der Ausmessung der Präparate. Mein Dank geht auch an die Mitarbeiter der Pathologie.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Moritz Berger vom Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie für die Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken.

Ein weiterer großer Dank geht an meine Familie und Freunde, welche mich die ganze Zeit beim Schreiben unterstützt haben. Zusätzlich ein Dank an meine Mutter Martine Deloos und an meine Schwester Caroline Clees für die moralische Hilfe und Rechtschreibkorrekturen. Meinem Mann, Dr. med. François Leboutte, danke ich vielmals für die Hilfestellung bei der Formatierung, Statistik, Literaturrecherche und Motivation.