

Aus dem
Akademischen Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen
Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie

**Evaluation der intraduktalen Kryobiopsie bei nativen
Gallenwegen und neoplastischen Läsionen der
Gallenwege im Tiermodell und im Explantat**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Wirsing, Lukas Benjamin**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Albert

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-C. Bösmüller

Tag der Disputation: 31.07.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung	1
1.1 Abklärung unklarer Gallengangsstenosen	1
1.2. Einteilung der biliären Stenosen	2
1.2.1 Benigne Stenosen.....	2
1.2.2 Maligne Stenosen	2
1.3 Diagnostik der Gallenwege.....	4
1.3.1 Nichtinvasive Diagnostik der Gallenwege.....	4
1.3.1.1 Sonographie und Endosonographie	4
1.3.1.2 Computertomographie	5
1.3.1.3 Magnetresonanztomographie	5
1.3.1.4 Zukunftsträchtige bildgebende Verfahren	6
1.3.2 Invasive Diagnostik der Gallenwege	6
1.3.2.1 Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie	6
1.3.2.2 Endosonographisch gesteuerte Feinnadelpunktion	10
1.3.2.3 Cholangioskopie	11
1.4 Neue Technik Kryobiopsie.....	13
1.5 Ziel der Studie/Aufbau	15

2. Material und Methoden	16
2.1 Untersuchungsaufbau und Durchführung Tiermodell.....	16
2.1.1 Material Tiermodell	16
2.1.2 Präparation des Gewebes.....	20
2.1.3 Gewebeentnahme.....	21
2.1.4 Gewebeverarbeitung.....	25
2.1.5 Histologische Begutachtung.....	26
2.1.6 Größenausmessung	26
2.2 Untersuchungsaufbau und Durchführung humaner Teil.....	27
2.2.1 Material humanes Gewebe	27
2.2.2 Studienpopulation	29
2.2.3 Ethikvotum	29
2.2.4 Aufklärung.....	30
2.2.5 Datenerfassung und Datenschutz	30
2.2.6 Gewebeentnahme und Präparation.....	31
2.2.7 Histologische Beurteilung/Repräsentativität	33
2.2.8 Größenausmessung	35
2.3 Statistik	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Auswertung Tiermodell.....	37
3.1.1 Makroskopische Auswertung	37
3.1.2 Histologische Beurteilung.....	38
3.1.3 Größenauswertung	38
3.1.4 Spezielle Beurteilung des Gewebsschadens bei Elevation	42
3.2 Auswertung humaner Teil.....	43
3.2.1 Patientenpopulation	43
3.2.2 Makroskopische Auswertung	44
3.2.3 Histologische Beurteilung.....	47
3.2.4 Repräsentativität	49
3.2.5 Größenausmessung	52

4. Diskussion.....	54
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis.....	66
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	74
8. Veröffentlichungen	75
9. Lebenslauf.....	76
Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prototyp der Kryosonde von ERBE	19
Abbildung 2: Prototyp der Kryosonde in Vergrößerung	19
Abbildung 3: Präparierter Gallengang ⁽¹⁾	21
Abbildung 4: Sondenanlage ⁽¹⁾	22
Abbildung 5: Aktivierung der Sonde mit Anfrieren des Gewebes ⁽¹⁾	22
Abbildung 6: Entnommenes schockgefrorenes Gewebe ⁽¹⁾	23
Abbildung 7: Gewebe anhaftend an Sonde nach erfolgter Kryobiopsie ⁽¹⁾	23
Abbildung 8: Gewebsdefekt nach Kryobiopsie ⁽¹⁾	24
Abbildung 9: Versuchsaufbau mit den verschiedenen Systemen im Tiermodell	25
Abbildung 10: Größenausmessung histologisches Präparat	26
Abbildung 11: Biopsiestelle nach Gewebsentnahme mit Kryosonde	32
Abbildung 12: Entnommenes Gewebe durch Kryobiopsie	32
Abbildung 13: Beispiel der Größenausmessung	35
Abbildung 14: Größenauswertung der Subgruppen in mm ² aus n= 4 / Instrumentengruppe	40
Abbildung 15: Größenauswertung in mm ² nach Zusammenführung der Subgruppen .	40
Abbildung 16: Repräsentative Schnitte für Kryobiopsien (links) und Zangenbiopsien (rechts).	41
Abbildung 17: Histologischer Schnitt (HE-Färbung) nach Unterspritzung mit Gewebsmarkierungsfarbe (blaues Gewebe)	42
Abbildung 18: Anzahl der Biopsieversuche für jedes Instrument	45
Abbildung 19: Streudiagramm/Verteilungsmuster der histologischen Beurteilung	48
Abbildung 20: Anzahl der repräsentativen Biopsien	50
Abbildung 21: Beispiele von histologischen Schnitten	51
Abbildung 22: Beispiel der digitalen Umrandung des fixierten und abfotografierten Gewebes	52
Abbildung 23: Streudiagramm/Verteilungsmuster der Größenausmessungen von Kryobiopsie und Standardbiopsiezange ⁽¹⁾	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendetes Material im Tiermodell.....	17
Tabelle 2: Verwendetes Material in der humanen Studie	28
Tabelle 3: Originaler histologischer Bewertungsbogen nach Likert	34
Tabelle 4: Verteilung der erfolgreichen Biopsien und Biopsieversuche auf die einzelnen Methoden.....	37
Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der ausgemessenen Areale der vier Subgruppen	39
Tabelle 6: Endgültige Histologie der Patienten und Verteilung der erfolgreichen Biopsien/ Biopsieversuche pro Patient ⁽¹⁾	43
Tabelle 7: Verteilung der Biopsieversuche der verschiedenen Modalitäten ⁽¹⁾	46

Abkürzungsverzeichnis

CB (Kryobiopsie)

CCC (Cholangiokarzinom)

CF (Cholangioscopic Forceps/Cholangioskopiezange)

CLE (Confocal Laser Endomicroscopy)

CT (Computertomographie)

DPOC (direkte perorale Cholangioskopie)

ERCP (Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie)

EUS (Endoskopische Ultraschalldiagnostik)

FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)

GBF (Gastric Biopsy Forceps/Magenbiopsiezange)

HF-Chirurgie (Hochfrequenz-Chirurgie)

IBS (indeterminate biliary stricture/unklare biliäre Stenose)

IDUS (Intraductal Ultrasonography/intraduktale Sonographie)

IKP (Institut für klinische Pharmakologie)

MRCP (Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie)

MRT (Magnetresonanztomographie)

OCT (Optical Coherence Tomography/optische Kohärenztomographie))

PCR (Polymerase Kettenreaktion)

RBK (Robert-Bosch-Krankenhaus)

1. Einleitung

1.1 Abklärung unklarer Gallengangsstenosen

Die Abklärung einer Stenose der Gallenwege stellt gegenwärtig in der Medizin eine Herausforderung dar (Moura et al. 2018). Häufig gestaltet sich die Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen Stenosen schwierig (Tanaka et al. 2018). Zum einen ist der Zugang erschwert, um Gewebeproben zu gewinnen: In der perkutanen, bildgebend gesteuerten Biopsieentnahme werden die auf die Gallenwege beschränkten Tumorzellen oft nicht sicher getroffen und im intraduktalen Zugang ist es schwierig, ausreichend Gewebematerial zu entnehmen. Zudem ist das Wachstumsmuster der Cholangiokarzinome oft mit einer ausgedehnten desmoplastischen Umgebungsreaktion verknüpft, so dass eine sichere Malignitätsbestimmung immer wieder nicht gelingt. Dabei sind die Analyse und Aufarbeitung des erhaltenen Gewebes, Zytologie oder Histologie, und dadurch die Differenzierung zwischen einer benignen oder malignen Genese wichtig für die weitere Therapieentscheidung (Navaneethan et al. 2015b).

Trotz unterschiedlicher Verfahren zur Gewebegewinnung findet sich weiterhin, auch unter Kombination verschiedener Methoden, eine unzureichende Sensitivität bei der Diagnostik von Malignomen der Gallenwege (Kushnir et al. 2018). Als neue Methode der Gewebegewinnung wird in dieser Arbeit das Verfahren der Kryobiopsie (CB) im Bereich der Gallenwege untersucht, welches in der Lungenheilkunde bereits in klinischen Studien eine deutliche Überlegenheit gegenüber den herkömmlichen Biopsietechniken gezeigt hat und bereits im klinischen Alltag verwendet wird (Hetzl et al. 2012). Weiterhin konnten Klein et al. in ex-vivo Modellen im Bereich der Urologie eine Überlegenheit der CB gegenüber einer herkömmlichen Zangenbiopsie nachweisen (Klein et al. 2019, Klein et al. 2022).

1.2. Einteilung der biliären Stenosen

1.2.1 Benigne Stenosen

Es gibt viele unterschiedliche Ursachen für die Entstehung von gutartigen Engstellen (benigne Strikturen) im Gallengang. Mit bis zu 80% gehören in der westlichen Welt die iatrogen entstandenen Stenosen zu den häufigsten Ursachen. Diese entstehen zu einem großen Teil durch Eingriffe im Bereich des Gallenwegsystems wie beispielsweise bei der Cholezystektomie oder Lebertransplantation (Shanbhogue et al. 2011). Weitere Ursachen benigner Stenosen können als Folge entzündlicher Prozesse (10% aller Strikturen durch chronische Pankreatitis) oder auf dem Boden einer Autoimmunerkrankung entstehen (primär sklerosierende Cholangitis, IgG-4 assoziierte sklerosierende Erkrankung). Dabei stellt beispielsweise die eosinophile Cholangitis eine häufig nicht diagnostizierte Unterform der sklerosierenden Cholangitis dar (Walter et al. 2017). Auch bei infektiösen Erkrankungen (HIV, Parasitenbefall), obstruktiven Beschwerden (Choledocholithiasis, Mirizzi-Syndrom) oder ischämischer Genese (Vaskulitis/Lebertransplantation) können Gallengangsstenosen entstehen (Altman et al. 2016).

1.2.2 Maligne Stenosen

Der Großteil maligner biliärer Strikturen entsteht auf dem Boden eines Pankreaskarzinoms, eines Cholangiokarzinoms oder eines Papillenkarzinoms (Moura et al. 2018). Weitere Ursachen können ein Gallenblasenkarzinom oder Tumormetastasen sein (Tanaka et al. 2018). Das Gallengangskarzinom stellt hierbei die häufigste direkt von den Gallenwegen ausgehende maligne Erkrankung dar und hat eine schlechte Prognose. Die Inzidenz der Erkrankung ist abhängig von der geographischen Lage, wobei die höchste Inzidenz in Südostasien besteht (Blechacz et al. 2011). Ursächlich für die schlechte Prognose sind die schwierige Diagnose des Gallengangskarzinoms und die lange Abwesenheit spezifischer Symptome, so dass eine Diagnose meist erst in spät fortgeschrittenem Stadium gestellt wird (Harewood 2008, Blechacz 2017).

Die häufigste Vorstellung (ca. 90%) betroffener Patienten in der Klinik erfolgt mit unklarem Ikterus. Zehn Prozent der Patienten stellen sich mit einer Entzündung der Gallenwege vor, einer sogenannten Cholangitis (Blechacz et al. 2008). Zum aktuellen Zeitpunkt ist die chirurgische Resektion des Tumors die einzige kurative Behandlung und bei fortgeschrittenem Stadium häufig nicht mehr möglich (Joo et al. 2018). Daher besteht die Indikation für eine schnelle und sichere Diagnostik mit ausreichender Sensitivität.

1.3 Diagnostik der Gallenwege

1.3.1 Nichtinvasive Diagnostik der Gallenwege

Eine eindeutige Diagnose und Differenzierung der Ursache unklarer Stenosen der Gallenwege mittels bildgebender Verfahren ist häufig nicht möglich (Walter et al. 2016, Tabibian et al. 2015). Zu den relevanten bildgebenden Verfahren in der Gallengangdiagnostik gehören die Sonographie, die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) und die endoskopische Ultraschalldiagnostik (EUS).

1.3.1.1 Sonographie und Endosonographie

Die transabdominelle Sonographie ist meist die erste durchgeführte Untersuchung bei Verdacht auf eine Leber- oder Gallenwegserkrankung (van Beers 2008). Studien haben gezeigt, dass mit der Sonographie beispielsweise bösartige Tumoren wie ein Gallengangskarzinom diagnostiziert und ihre Morphologie charakterisiert werden kann (L E Hann et al. 1997). Die Sensitivität und Spezifität der Untersuchung hängen dabei jedoch stark von der Tumorlokalisation, der Qualität der Ultraschallausrüstung und der Erfahrung des Untersuchers ab (Weber et al. 2008). Auch die Endosonographie kann als ergänzendes Verfahren zur Diagnostik der Gallenwege und Abklärung unklarer Strikturen genutzt werden (Rösch et al. 2002). Sie gilt beispielsweise als sensitive Methode zur Beurteilung von regionalen Lymphknoten (Blechacz et al. 2008).

1.3.1.2 Computertomographie

Die kontrastmittelgestützte Computertomographie (CT) stellt aktuell eine Standardmethode als bildgebende Diagnostik des Gallengangskarzinoms dar (Joo et al. 2018). Mit ihrer Hilfe kann eine gute Beurteilung des Primärtumors erfolgen. Auch können eine Erweiterung der Gallengänge, Gefäßeinbrüche des Tumors oder Metastasen festgestellt werden (Weber et al. 2008). Einschränkungen der Diagnostik zeigen sich bei der Erfassung von Lymphknotenmetastasen, kleiner Lebermetastasen oder einer Peritonealkarzinose (Vilgrain 2008). Auch die Beurteilung einer möglichen Resezierbarkeit bei hilären Cholangiokarzinomen kann auf Grund falscher Abschätzung der Ausdehnung des Tumors entlang der Gallenwege eingeschränkt sein (M Tillich et al.1998). Vorteile beispielsweise gegenüber der MRT stellt die geringere Anfälligkeit gegenüber Artefakten dar (Yeh et al. 2009).

1.3.1.3 Magnetresonanztomographie

In den letzten Jahren nimmt die MRT eine zunehmend wichtige Rolle im Bereich der Diagnostik der Gallenwege ein. Speziell in der Diagnostik des Gallengangskarzinoms dient sie zur Beurteilung der Ausdehnung des Tumors und einer möglichen Resektabilität (Joo et al. 2018, Weber et al. 2008). Mit Hilfe der MR-Technik können die verschiedenen Anteile des Gewebes wie Gallengänge, Blutgefäße und die angrenzende Leberparenchymbeteiligung beurteilt werden. Der hohe Weichteilkontrast der MRT erleichtert das Erfassen und die Darstellung von infiltrierend wachsenden Tumoren (Manfredi et al. 2003).

Mit dem Verfahren der Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) steht die genaueste nicht invasive Methode zur Darstellung der Gallenwege zur Verfügung. Mit ihrer Hilfe können Aussagen über die Tumorausdehnung im Gallengang vor und hinter einer Stenose getroffen werden (Jhaveri et al. 2015). Sie stellt aktuell den Goldstandard der nicht invasiven Diagnostik dar und kann dem Patienten in bestimmten Fällen eine invasive Diagnostik (beispielsweise durch eine endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie ERCP) ersparen (Joshi et al. 2014). Mit Hilfe der MRCP kann im Gegensatz zur ERCP

eine nicht invasive, detailreiche Darstellung des Gallengangsystems erfolgen und es können 3D-Rekonstruktionen zur genaueren Beurteilung erstellt werden (Joshi et al. 2014). Die MRCP wird routinemäßig im klinischen Alltag genutzt (Chandarana et al. 2016).

1.3.1.4 Zukunftsträchtige bildgebende Verfahren

Die Confocal Laser Endomicroscopy (CLE) ermöglicht die mikroskopische Darstellung von epithelalem und subepithelalem Gewebe des Gallengangs in Echtzeit während einer ERCP/Cholangioskopie. Dabei wird eine spezielle Sonde in den Gallengang eingeführt und nach intravenöser Gabe von Fluoreszin kann das Zielgewebe mittels Applikation eines Lasers beleuchtet werden und es entstehen Echtzeitbilder zur Gewebebeurteilung.

Weitere bildgebende Verfahren sind die intraduktale Sonographie (IDUS) und die Optical Coherence Tomography (OCT). IDUS nutzt eine kleine Ultraschallsonde, die vom Gallengang ausgehend Ultraschallbilder mit höherer Auflösung im Vergleich zu herkömmlichen endoskopischen Ultraschalls generieren kann, während bei der OCT anstelle Ultraschall Infrarotlicht zur Darstellung des Zielgewebes genutzt wird (Mukewar et al. 2019).

1.3.2 Invasive Diagnostik der Gallenwege

1.3.2.1 Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie

Bildgebende Verfahren wie die CT- oder MRT-Diagnostik sind hilfreich zur Beurteilung unklarer Strikturen des Gallengangs. Für eine eindeutige Diagnosestellung wird jedoch meist eine Gewebeprobe benötigt (Lee et al. 2014). Die ERCP wird als Standardmethode zur invasiven Abklärung von Gallengangsstenosen oder eines unklaren Ikterus genutzt. Mit ihrer Hilfe kann einerseits eine Diagnostik mittels Gewebeentnahme und andererseits ein therapeutischer Eingriff zur Entlastung der Gallenwege (beispielsweise durch eine Stenteinlage) erfolgen (Lee et al. 2019). Während der ERCP erfolgt mit Hilfe eines Drahtes die Kanülierung der Gallenwege und im Anschluss die

Kontrastmitteldarstellung des Gallengangstraktes oder einer Strikture unter Röntgendurchleuchtung (Ma et al. 2019, Tabibian et al. 2015). Die Gewebeentnahme wird nach Darstellung der Stenose mit Hilfe einer Bürstenzytologie oder durch eine Zangenbiopsie unter Röntgendurchleuchtung durchgeführt (Albert et al. 2015, Navaneethan et al. 2015b).

Bei der Bürstenzytologie wird die Bürste unter Durchleuchtung mit Hilfe eines Katheters mit oder ohne Drahtführung in die Gallenwege eingeführt. Im Anschluss wird die Bürste aus dem Katheter vorgeschoben, über die Strikture mehrfach vor- und zurückbewegt, wieder in den Katheter zurückgezogen und gemeinsam mit dem Katheter aus dem Endoskop entfernt. Im Anschluss wird das erhaltene Gewebe entweder direkt auf einen Objektträger gegeben oder die Bürste wird inklusive des Zellmaterials zur Untersuchung eingeschickt (Bellis et al. 2002b).

Vorteile der Bürstenzytologie sind eine niedrige Komplikationsrate, eine weitreichende Verfügbarkeit, eine relativ einfache Anwendung und die Möglichkeit, Gewebe aus fast den gesamten Gallenwegen erhalten zu können (Costa et al. 2018).

Die Zangenbiopsie ermöglicht, falls erfolgreich, eine tiefere Gewebeentnahme im Gallengang im Vergleich zur Bürstenzytologie. Dabei wird die Biopsiezange unter Durchleuchtung vom Endoskop aus in den Gallengang geführt und durch Öffnen und Schließen der Zange im Bereich der Stenose Gewebe gewonnen. Hierzu wird eine Papillotomie (Eröffnung des Gallenganges) benötigt. Nachteilig an der Zangenbiopsie ist, dass sie zeitlich und technisch deutlich aufwendiger ist als die Bürstenzytologie (Bellis et al. 2002b) und insbesondere bei Biopsiezielen proximal des Leberhilus häufig nicht erfolgreich ist.

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass die Sensitivität der Diagnostik für die Gewebeentnahme mittels Bürstenzytologie oder Zangenbiopsie eingeschränkt ist (Hartman et al. 2012).

Ursachen der eingeschränkten Sensitivität

Ein Grund für die eingeschränkte Sensitivität ist, dass bei kleinen Gallengangstumoren nur wenig Gewebematerial gewonnen werden kann und häufig eine diskontinuierliche Tumorausbreitung besteht (Bankov et al. 2018).

Auch erfolgt die Darstellung des Tumoreareals nicht unter direkter Sicht, sondern unter Röntgendurchleuchtung. Hier kann es unter Umständen schwierig sein, die Zielstruktur eindeutig darzustellen. Ein Einfluss auf den Gewinn histologischer Proben mit der Biopsiezange kann die Lage der Strikturen haben. Es hat sich gezeigt, je weiter distal die Strikturen lag, desto erfolgreicher war die Gewebegewinnung war (Bellis et al. 2002a).

Ein weiteres Problem ist die Qualität der Biopsien, da bei der Zangenbiopsie häufig nur oberflächliches und fragmentiertes Gewebe gewonnen werden kann. Ursache hierfür sind beispielsweise beim Gallengangskarzinom die histologische Beschaffenheit des Tumors mit einer teilweise sehr festen Struktur auf Grund der desmoplastischen Eigenschaften des Tumorgewebes und auch der Subtyp des Tumors (Bellis et al. 2002a, Blechacz et al. 2011). Auch technische Fehler bei der Anfertigung der histologischen Schnitte für die Bürstenzytologie können die Diagnostik erschweren (Logrono et al. 2000).

In Hinblick auf die histopathologische Beurteilung und Interpretation muss berücksichtigt werden, dass diese häufig subjektiv ist und es bei Zweitmeinungen deutliche Diskrepanzen zur ursprünglichen Beurteilung geben kann (Bellis et al. 2002a, Hahm et al. 2001). So werden teilweise die gewonnenen Proben einer Bürstenzytologie abhängig vom Zelltyp in vier Kategorien eingeteilt: gutartig (benigne), atypisch, malignitätsverdächtig und maligne. Dabei kann nicht eindeutig gesagt werden, ob die malignitätsverdächtigen/atypischen Zellen bösartig sind oder nicht und hierdurch ihre Behandlung erschweren. Dies gilt vor allem, wenn die Gallengangsstenosen auch in den bildgebenden Verfahren nicht eindeutig einzuordnen sind (Park et al. 2019). Bei den pathologischen Kriterien unklarer Histologien (atypische Zellen) finden sich zusätzlich unterschiedliche Ansätze zur Einteilung. Hieraus können sich auch Änderungen für die gezogene Relevanz und die Therapieplanung ergeben (Renshaw et al. 1998).

Möglichkeiten zur Verbesserung der Diagnostik

Kombination diagnostischer Verfahren

Eine Verbesserung der Sensitivität der Diagnostik kann durch eine Kombination von mehreren Gewebeentnahmetechniken erreicht werden. So ermöglicht die Kombination der Methoden Bürstenzytologie und Zangenbiopsie eine höhere Sensitivität, als wenn die Verfahren einzeln angewendet werden (Weilert et al. 2014, Navaneethan et al. 2015b).

Auf Grund dieser Erkenntnis ergänzten beispielsweise Jailwala et al. die Diagnostik bei Verdacht auf eine maligne Erkrankung der Gallenwege um ein drittes Verfahren. Dabei wurden die Bürstenzytologie, Zangenbiopsie und die Feinnadelaspiration kombiniert. Die Autoren stellten eine deutliche Verbesserung der diagnostischen Sensitivität bei Anwendung des Dreifachverfahrens fest und empfahlen generell, mindestens zwei Methoden zur Gewebegewinnung zu nützen.

Weitere Arbeiten bestätigten diese Ergebnisse (Jailwala et al. 2000, Lee et al. 2014). Allerdings muss hier ein hoher Aufwand betrieben werden, um die Sensitivität geringfügig zu erhöhen. Aktuelle Arbeiten steigern die diagnostische Sensitivität durch den Zusammenschluss mehrerer unterschiedlicher Methoden zur Gewebegewinnung. Tanaka et al. 2018 erhielten eine Sensitivität von 72% durch die Kombination von bis zu vier unterschiedlichen Verfahren der Gewebegewinnung. Nachteil dieser Herangehensweise ist, dass dies einen größeren Aufwand bei der Diagnostik und die erforderliche Expertise bei Verfahrenskombinationen mit bislang weiter nicht zufriedenstellender Sensitivität erfordern (Gonda et al. 2017).

Gewebeverarbeitung

Ein weiterer Ansatz zur Optimierung der Sensitivität stellt die zusätzliche Diagnostik und Aufarbeitung des gewonnenen Gewebes auf molekulargenetischer Ebene dar. So können mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) die aus der Bürstenzytologie gewonnenen Zellen und fluoreszenzmarkierten DNA-Proben beispielsweise auf chromosomale Veränderungen untersucht werden. Hilfreich ist dabei, dass die meisten soliden

Tumoren zahlreiche strukturelle chromosomale Anomalien aufweisen. FISH kann in Kombination mit Bürstenzytologie und Zangenbiopsie zusätzlich erfolgen und damit die Sensitivität steigern (Kipp et al. 2004, Nanda et al. 2015). Auch die Technik der DNA-Sequenzierung mittels PCR (Polymerase Kettenreaktion) zur Untersuchung der erhaltenen Zytologie auf Mutationen wird durchgeführt und zeigt vielversprechende Ergebnisse (Gonda et al. 2017, Bankov et al. 2018, Singhi et al. 2019). Vereinzelt berichten Studien von einer Überlegenheit der DNA-Sequenzierung gegenüber der FISH-Analyse bei der Analyse von Zytologieproben. Ein Vorteil scheint hier, dass die DNA-Sequenzierung weniger aufwendig und kostengünstiger ist (Dudley et al. 2016).

1.3.2.2 Endosonographisch gesteuerte Feinnadelpunktion

Eine weitere Möglichkeit der Gewebeakquisition stellt die endosonographisch gesteuerte Feinnadelaspiration (EUS-FNA) dar. Sie wird mittlerweile zunehmend zur Abklärung unklarer biliärer Strikturen angewendet. Die Sensitivität dieser Diagnostik wird in Studien sehr unterschiedlich beschrieben, weist jedoch in Metaanalysen beispielsweise eine deutlich höhere Sensitivität als die ERCP mit Bürstenzytologie auf. Sie wird aktuell als ergänzendes Diagnoseverfahren zusätzlich zur ERCP und Cholangioskopie bei Fällen empfohlen, in denen bis dahin bei Malignitätsverdacht noch keine eindeutige Histologie gewonnen wurde (Sadeghi et al. 2016). Lee et al. stellen in ihrer Arbeit fest, dass distale Strikturen der Gallenwege auf Grund der Lage und Darstellbarkeit teilweise besser mit der EUS-FNA zu erreichen sind als per direkter Cholangioskopie. Auch im Vergleich zur ERCP scheint die EUS-FNA bei distalen Strikturen diagnostisch überlegen (Lee et al. 2019, Novikov et al. 2019). Ein Vorteil der EUS-FNA ist die Darstellung suspekter Lymphknoten und die gegebenenfalls mögliche Punktion mit Gewebeentnahme. In Bezug auf beispielsweise das Cholangiokarzinom kann dies zusätzliche Informationen bezüglich der Prognose geben und eventuell auch in einer Änderung der Therapie resultieren (Harewood 2008). Weiterhin wird eine niedrigere interventionelle Komplikationsrate im Vergleich zur ERCP beschrieben (Novikov et al. 2019). Ein Nachteil kann eine mögliche Streuung des Tumors bei der Gewebeentnahme sein (Kushnir et al. 2018, Heimbach et al. 2011). Auch

wird ähnlich wie bei der ERCP mit Gewebeentnahme durch die Bürste lediglich eine Zytologie erhalten, anhand der es schwierig sein kann, eine Diagnose zu stellen (Varadarajulu et al. 2004).

1.3.2.3 Cholangioskopie

Die Technik der Cholangioskopie ermöglicht eine direkte visuelle Darstellung des Gallenwegsystems, wobei gleichzeitig diagnostische/therapeutische Eingriffe durchgeführt werden können. Erste Erwähnungen dieser Technik finden sich bereits in den 1950er Jahren (Ayoub et al. 2018). In den 1970er Jahren wurde die Cholangioskopie (damals als Choledochoskopie) im Bereich der Chirurgie intraoperativ zur Behandlung von Gallensteinen und auch bereits zur Tumordiagnostik verwendet (Berci 1977).

Die ersten endoskopischen Durchführungen der Cholangioskopie erfolgten circa 1976. Diese wurden mit Hilfe der sogenannten Mother-Baby-Technik durchgeführt. Hierbei wird das Cholangioskop durch den Arbeitskanal eines Duodenoskops über einen Führungsdraht in die Gallenwege eingeführt. Nachteile dieser Technik waren die Zerbrechlichkeit des Cholangioskops, eine eingeschränkte Beweglichkeit/Manövrierfähigkeit, hohe Kosten und der Bedarf eines zweiten erfahrenen Untersuchers (Beyna et al. 2016, Ayoub et al. 2018). Eine weitere Möglichkeit der visuellen Darstellung der Gallenwege stellt die direkte perorale Cholangioskopie (DPOC) dar (Albert et al. 2011). Dabei werden nach Sphinkter-Papillotomie ein dünnes Gastroskop oder ein sehr dünnes Cholangioskop direkt in den Gallengang eingeführt. Es wird kein zweites Endoskop benötigt und der Eingriff kann von nur einer Person durchgeführt werden. Vorteile dieser Untersuchungstechnik sind eine gute Bildqualität, ein größerer Arbeitskanal und eine genaue Handhabung des Endoskops (Thaker et al. 2017). Nachteile finden sich durch die sehr anspruchsvolle Untersuchungstechnik, die schwierige Intubation des Gallengangs und die Labilität des Endoskops. Außerdem erschwert der deutlich größere Durchmesser des Gerätes die Diagnostik in kleineren Gallengängen (Ayoub et al. 2018).

Eine Weiterführung der Mother-Baby-Technik gibt es seit 2005, in Form des fiberoptischen Cholangioskopiesystems SpyGlass™ (Boston Scientific Corp), welches ebenfalls nur einen Untersucher zur Bedienung benötigt. Dabei wird während einer ERCP über den Arbeitskanal des Duodenoskops das Cholangioskopiesystem eingeführt und über einen Führungsdraht in den Gallengang gelenkt. Nach Intubation des Gallenganges kann der Führungsdraht entfernt werden und eine bildliche Darstellung der Gallenwege mit Hilfe des fiberoptischen Systems erfolgen (Ayoub et al. 2018, (Navaneethan et al. 2016). Vorteilhaft bei dieser Untersuchungstechnik sind die sehr gute bildliche Darstellung bei nur einem Untersucher und die Bewegungsfreiheit auf Grund der Beweglichkeit des Endoskops in alle vier Richtungen.

Diagnostik unklarer Strikturen in der Cholangiskopie

Die Cholangioskopie mit gezielter Biopsie wird aktuell als ergänzendes Verfahren bei der Abklärung unklarer Stenosen des Gallengangs empfohlen (Thaker et al. 2017). Dabei liegt ihr Vorteil gegenüber der ERCP in der direkten bildlichen Darstellung der Striktur und visuellen Erfassung eventueller Veränderungen des Gewebes, welche unter Durchleuchtung vielleicht nicht wahrgenommen worden wären. Es können unter Sicht Biopsien eines auffälligen oder malignomverdächtigen Areals genommen werden (Shah et al. 2006). Ein Nachteil der Cholangioskopie gegenüber der reinen ERCP kann eine möglicherweise höhere interventionelle/postinterventionelle Komplikationsrate sein. Ein häufigeres Auftreten von Cholangitiden wird in der Literatur beschrieben (Sethi et al. 2011).

Diverse wissenschaftliche Arbeiten zeigen eine mäßige bis gute Sensitivität bei der Diagnostik unklarer Strikturen des Gallengangs (Navaneethan et al. 2016, Navaneethan et al. 2015a, Kurihara et al. 2016). Einschränkungen finden sich teilweise zum Beispiel bei nicht ausreichend gewonnenem Gewebe auf Grund einer zu kleinen Biopsiezange (Kanno et al. 2018, Sekine et al. 2022).

Trotz einiger Vorteile der Cholangioskopie gegenüber der ERCP lässt sich sagen, dass die Abklärung von unklaren Gallengangsstenosen, auch auf Grund

der verschiedenen morphologischen Begebenheiten des Gewebes, erschwert bleibt (Lee et al. 2019). Ein Drittel aller maligner Strikturen wird auch mittels Cholangioskopie nicht richtig diagnostiziert (Novikov et al. 2019). Walter et al. stellten in einer retrospektiven Studie fest, dass cholangioskopisch gesteuerte Biopsien bei IBS (indeterminate biliary stricture) keinen diagnostischen Vorteil gegenüber der fluoroskopisch gewonnenen Biopsie aufweisen (Walter et al. 2016).

1.4 Neue Technik Kryobiopsie

Ein gänzlich neuer Ansatz zur Verbesserung der Gallengangdiagnostik stellt die Untersuchung mit einer alternativen Biopsietechnik, der CB, dar. Sie findet als diagnostisches Verfahren in der Pneumologie bereits im klinischen Alltag Anwendung (Troy et al. 2020). Das thermische Verfahren mit Kältesonden wurde bereits vor 1980 in der Akuttherapie verwendet beispielsweise zur Behandlung von endobronchial exophytisch wachsenden malignen Tumoren (Hetzl et al. 2008).

Die ersten CB zur diagnostischen Beurteilung erfolgten im Jahr 1987 während einer Thorakoskopie (Bonniot et al. 1989). Die CB macht sich die physikalische Eigenschaft des Joule-Thomson-Effektes zu Nutze. Grundprinzip hierbei ist, dass durch Entspannung (Dekompression) eines unter Druck stehenden Gases es zu einem Kälteeffekt kommt, der dann eine damit verbundene Kältesonde im Bereich der Metallspitze abkühlt (Hetzl et al. 2008). Die gefrorene Kryosonde haftet an wasserhaltigem Gewebe durch Adhäsion an und es können im Bereich der Pneumologie beispielsweise Stenosen entfernt werden, Biopsien mit größerem Gewebeanteil erfolgen oder Fremdkörper geborgen werden (Hetzl et al. 2004, Babiak et al. 2009, Schumann et al. 2010b).

Speziell in Bezug auf den Gewebeerhalt für die weitere Aufarbeitung haben wissenschaftliche Arbeiten in der Pneumologie einen deutlichen Vorteil der CB gegenüber einer herkömmlichen Zangenbiopsie ergeben (Schumann et al. 2010a). Im Vergleich zur Zangenbiopsie konnten mit der CB größere Gewebeproben mit weniger Artefakten (Quetschartefakte durch mechanische

Kompression) gewonnen und somit die Qualität der Proben deutlich angehoben werden. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Zangenbiopsie zeigte sich darin, dass die Kryosonde so konzipiert ist, dass sie tangential und frontal eingesetzt werden kann und somit das Zielgewebe leichter erreicht werden kann (Hetzel et al. 2012).

Basierend auf oben genannten Eigenschaften der CB und der bestehenden Problematik der Diagnostik im Bereich der Gallenwege wurde im Rahmen dieser Arbeit der Ansatz verfolgt, die CB im Gallengang als neue diagnostische Verfahrenstechnik zu untersuchen.

Elevation

Als Zusatztechnik wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit der Elevation des Gewebes in Kombination mit CB untersucht. Bei der Elevation wird das Zielgewebe beispielsweise mit Kochsalzlösung unterspritzt, um eine Abhebung der Läsion zu ermöglichen und somit das Risiko einer Gewebeverletzung zu reduzieren und eine sichere Abtragung zu ermöglichen. Diese Technik wird im Rahmen endoskopischer Eingriffe im Magen- und Darmtrakt bereits regelmäßig eingesetzt (Al-Taie et al. 2012).

1.5 Ziel der Studie/Aufbau

Ziel dieser Studie war es die Technik der CB in nativen und veränderten Gallenwegen am ex vivo Modell des Schweins und am humanen ex vivo Explantat zu untersuchen. Die Arbeit sollte die Machbarkeit und eine mögliche Verbesserung der diagnostischen Sensitivität im Bereich der Gallenwege durch eine neue Verfahrenstechnik (CB) eruieren und prüfen, ob diese in Zukunft eine mögliche Alternative zu den aktuellen Gewebeentnahmemethoden darstellen könnte. Primäre Endpunkte stellten die Machbarkeit beziehungsweise der Erhalt von verwertbarem Gewebe dar (Gewebe erhalten Ja/Nein). Als sekundäre Endpunkte wurden die Qualität und Quantität des Gewebes beurteilt (Histologische Beurteilung, Größenauswertung, Repräsentativität).

Die Durchführung der Studie erfolgte in zwei Teilen. Zunächst wurde am Tiermodell eine Standardisierung der CB im Gallengangsgewebe durchgeführt. Unter Hinzunahme zwei weiterer Techniken, der Hydrotechnik (Elevation des Gewebes) und der HF-Chirurgie (Defektsetzung), wurde die CB in Vergleich zur herkömmlichen Zangenbiopsie gesetzt. Das erhaltene Gewebe wurde histologisch in Bezug auf Qualität und auf seine Größe beurteilt.

Im zweiten Teil der Studie wurde anhand explantierter humaner Präparate des Gallengangs (post-operativ; entweder natives oder neoplastisch verändertes Gewebe) einerseits mittels Zangenbiopsie und andererseits mittels CB Gewebeproben entnommen und im Anschluss miteinander verglichen. Hierzu erfolgte eine Beurteilung durch zwei erfahrene Histopathologen in Hinblick auf diagnostische Aussagekraft, Gewebetiefe und Qualität. Weiterhin wurde eine Größenausmessung zur Beurteilung der Quantität im Vergleich durchgeführt. Tabelle eins listet das verwendete Material im Tiermodell auf.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsaufbau und Durchführung Tiermodell

2.1.1 Material Tiermodell

Die Technik und der Ablauf der CB wurden zunächst im Tiermodell getestet und optimiert. Zusätzlich zur bereits in der Einleitung beschriebenen CB wurden im Rahmen der Testreihen weitere unterstützende Verfahren aus der Hochfrequenz-Chirurgie (HF-Chirurgie) und aus der Hydrochirurgie in Kombination mit CB oder Zangenbiopsie angewendet und auf ihre Eignung geprüft. Hierzu zählen die Gewebeelevation mit Wasserstrahlsonde und der Einsatz der HF-Chirurgie (Defektsetzung mit HF-Sonde).

Im Einzelnen wurde für diese Untersuchung folgendes Material verwendet:

Hersteller	Bezeichnung	Einsatzgebiet	Artikelnummer
ERBE	ERBEJET® 2	Hydrochirurgie	10150-000
ERBE	Flexible Wasserstahl-Sonde	Elevation	20150-020
ERBE	ERBECRYO® 2	Biopsie, Rekanalisation, Devitalisierung in Kryotechnik	10402-000
ERBE	Flexible Kryosonde Ø 1,1 mm Länge 130 cm	Prototyp für Kryobiopsien	Prototyp
ERBE	VIO® 300D Generatormodul	HF-Chirurgie	10140-100
ERBE	Slim Line Elektrodengriff mit 2 Tasten Schaftdurchmesser 4mm	HF-Chirurgie	20190-065
ERBE	Drahtschlingenelektrode Ø 6 mm gerade	HF-Chirurgie	20191-215

Medwork	EndobBite Cholangioskopiezange 260 cm Länge	Cholangioskopie	BIO1-C4-18- 260
Boston Scientific	Radial Jaw 4 Standard Capacity 240 cm Länge 2.8 mm Ø Arbeitskanal	Biopsiezange des gastrointestinalen Traktes	M00513400
Julabo	Typ Model EH	Umwälzpumpe zur Temperierung Wasserbad	Wird nicht mehr vertrieben
neoLab	Bad Stabil®	Wasserbadstabilisator	1-6095
WAK- Chemie Medical GmbH	Histological marking colours	Gewebsmarkierungs- farbe	WAK-HM- BL5/60
ZEISS	Zeiss Axio Scope.A1	Lichtmikroskop	Seriennummer 3322000739
ZEISS	Axiocam MRc	Mikroskopkamera zur Digitalisierung	Art.Nr. 1600- 426508-9902- 000
ZEISS	ZEN (blue edition)	Software für digitale Bildverarbeitung von Lichtmikroskopen	
ZEISS	Plan-Neo fluar	Objektiv Maßstab 1,25 x	
ZEISS	A-Plan	Objektiv Maßstab 2,5 x, 5x, 10x	
ZEISS	N-Achroplan	Objektiv Maßstab 20x	

Tabelle 1: Verwendetes Material im Tiermodell

Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Wasserbades durch die Umwälzpumpe der Firma Julabo-EH temperiert. Als Wasserbadstabilisator diente hierzu der Bad Stabil® der Firma neoLab. Die CB erfolgten durch das Basismodul ERBECRYO®2 und einen ERBE Kryosondenprototyp mit 1,1 mm Durchmesser und 130 cm Länge (Abbildung 1 und 2). Für die Zangenbiopsien wurden die Cholangioskopiezange EndoBite der Firma Medwork (Medwork, Höchstadt, Deutschland) mit einem Durchmesser von 1,8 mm und einer Länge von 260 cm (CF) und die Biopsiezange Radial Jaw 4 Standard der Firma BostonScientific (Boston Scientific, Marlborough, Massachusetts, USA) mit dem Durchmesser 2,8 mm und einer Länge von 240 cm (GBF) verwendet.

Zur Elevation des Gewebes wurden das Basismodul ERBEJET® 2 und eine passende flexible Wasserstrahlsonde der Firma ERBE (ERBE Elektromedizin GmbH, Tübingen, Deutschland) verwendet. Die Anwendung der HF-Chirurgie wurde mit Hilfe des ERBE Generatormoduls VIO®300 und einem ERBE slim line Elektrodengriff mit zwei Tasten durchgeführt, an dessen Griff sich eine gerade Drahtschlingenelektrode befand.

Die teilweise durchgeführte Anfärbung der Schnitte wurde mit histologischer Gewebemarkierungsfarbe der Firma WAK-Chemie Medical GmbH des Typs Histological marking colours durchgeführt. Die weitere histologische Beurteilung und Ausmessung des Gewebes erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops Zeiss Axioscope.A1 der Firma ZEISS. Es wurden Objektive der Firma ZEISS im Maßstab 1,25x (Typ Plan-Neo fluar), 2,5/5/10x (Typ A-Plan) und Maßstab 20x (Typ N-Achroplan) genutzt. Als Mikroskopkamera zur Digitalisierung der histologischen Schnitte wurde die AXiocam MRc der Firma ZEISS verwendet und zur weiteren digitalen Bildverarbeitung die Software ZEN (blue edition) von ZEISS.

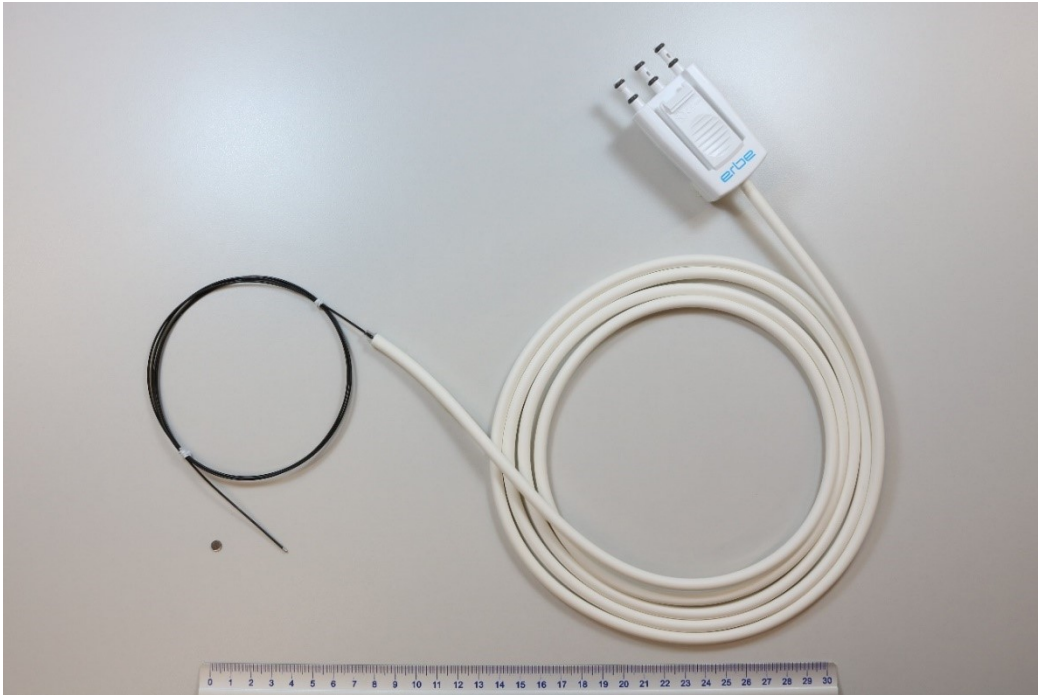


Abbildung 1: Prototyp der Kryosonde von ERBE

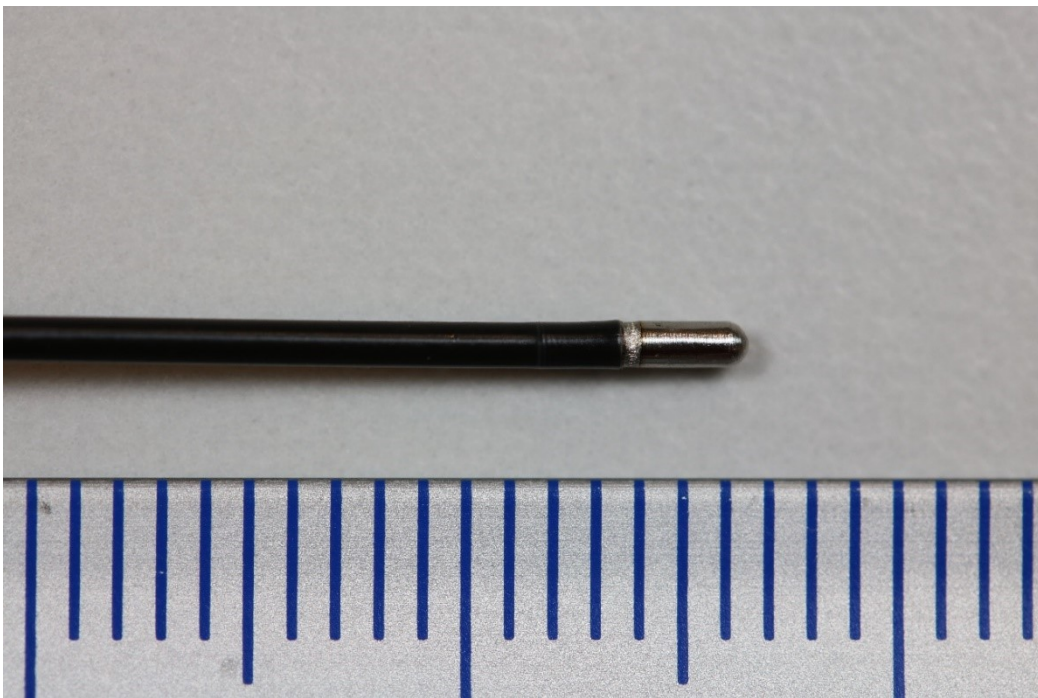


Abbildung 2: Prototyp der Kryosonde in Vergrößerung

2.1.2 Präparation des Gewebes

Das untersuchte und präparierte Material im Tiermodell wurde als explantiertes Schweinegewebe von einem nahegelegenen Schlachthof bezogen. Als Präparat wurden die Leber inklusive Gallenblase, Dünn- und Dickdarm erhalten. Es erfolgte zunächst eine grobe Präparation des Gewebes mit Schere und Skalpell. Dünn- und Dickdarm wurden bis auf die Einmündung des Gallengangs in den Dünndarm vollständig entfernt und das Restgewebe mit Wasser gereinigt. Im Anschluss wurde das Präparat in ein Wasserbad mit 37,8°Celsius gelegt, welches die Kerntemperatur des Schweines simulieren und den Verfall des Gewebes aufhalten sollte. Nach einer Stunde im Wasserbad erfolgte die Feinpräparation auf einem Metalltablett mit Schere, Skalpell und Pinzette. Zunächst wurde die Gallenblase per Schnittinzision eröffnet, die sich entleerende Gallenflüssigkeit aufgesaugt und das Restgewebe getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Sondierung des Gallengangs mit einer kleinen Metallsonde bis zur Einmündung in die Papille/Dünndarm und die vorsichtige Eröffnung des Gallengangs entlang der Sonde mit einer Schere. Der eröffnete Gallengang wurde mit Hilfe von kleinen Metallklammern fixiert und offengehalten. Es wurden kleine Metallplättchen zur Festlegung und Markierung der Biopsiestellen eingelegt. Die erste Biopsiestelle und die Durchnummerierung wurden durch das schwarze Färben des gallenblasennahen Metallplättchens bestimmt und dieses als Nummer eins festgelegt (Abbildung 3). Im Anschluss an die Präparation wurden abwechselnd die unterschiedlichen Biopsietechniken angewendet.

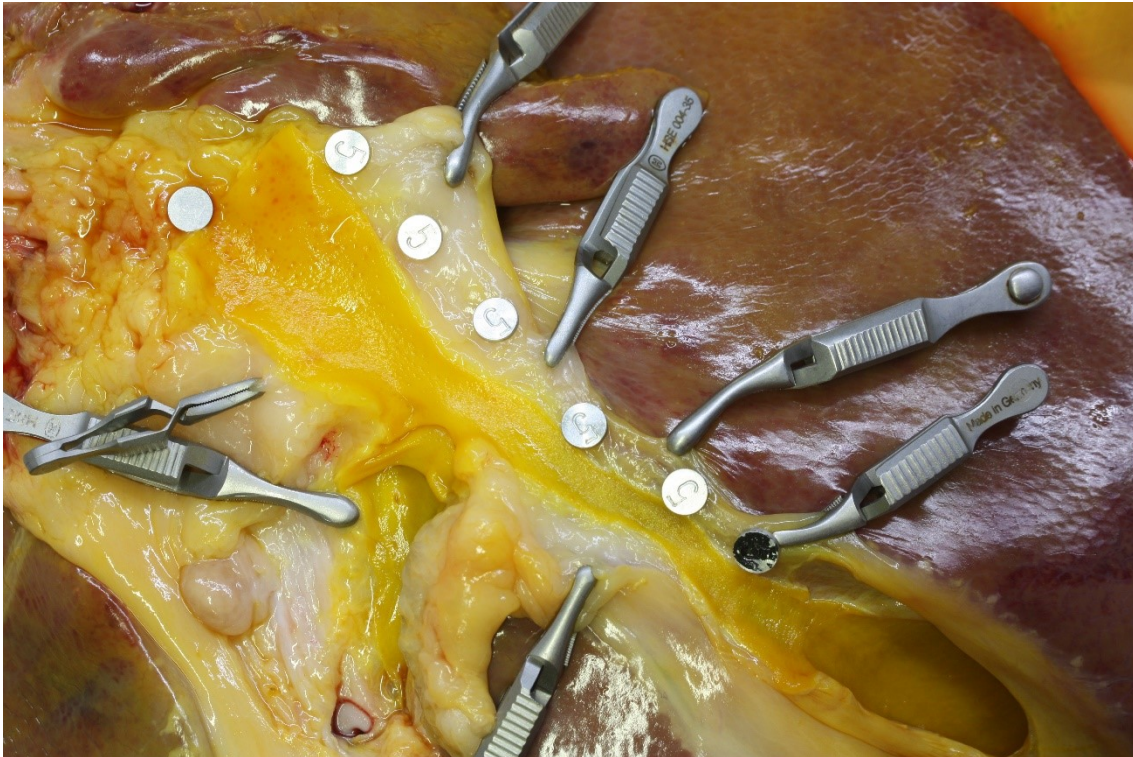


Abbildung 3: Präparierter Gallengang ⁽¹⁾

Präparierter Gallengang mit Fixierung durch Metallklammern und Markierung der Biopsiestellen durch Metallplättchen (schwarz gefärbtes Blättchen Biopsiestelle Nummer eins)

2.1.3 Gewebeentnahme

Die Gewebeentnahme mittels Zangenbiopsie erfolgte unter direkter Sicht frontal entweder mit der Cholangioskopiepinzette (CF) oder der Standardbiopsiepinzette (GBF) an der vorher markierten Stelle. Das erhaltene Gewebe wurde in einen bereitgestellten Behälter gelegt. Zur Entnahme von Gewebe in Kryobiopsietechnik wurden zunächst Voreinstellungen am Basismodul ERBECRYO2® vorgenommen. An das Modul wurde eine Kohlenstoffdioxidflasche angeschlossen. Der Effekt wurde auf Effekt eins festgelegt. Der CO₂-Eingangsdruck lag bei 60 bar. Zur Durchführung der Biopsie wurde der flexible Kryosondenprototyp an markierter Stelle mit der Metallspitze der Sonde entweder frontal oder tangential am Gewebe angelegt. Im Anschluss erfolgte die Aktivierung mit Fußschalter und unterschiedlicher Aktivierungszeit (ein bis drei Sekunden). Die Sonde wurde durch oben genannte Aktivierung heruntergekühlt und nach Anfrieren des Gewebes abhängig von der

Aktivierungszeit ruckartig zurückgezogen. Anhaftendes Material wurde in die vorher bereitgestellten Behälter überführt (Ablauf siehe Abbildung 4-8).

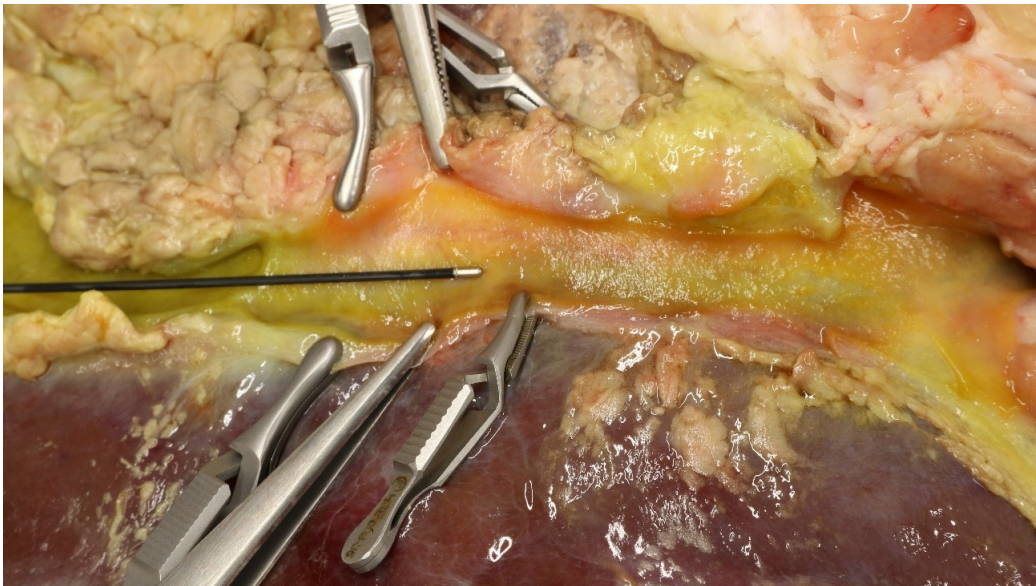


Abbildung 4: Sondenanlage ⁽¹⁾

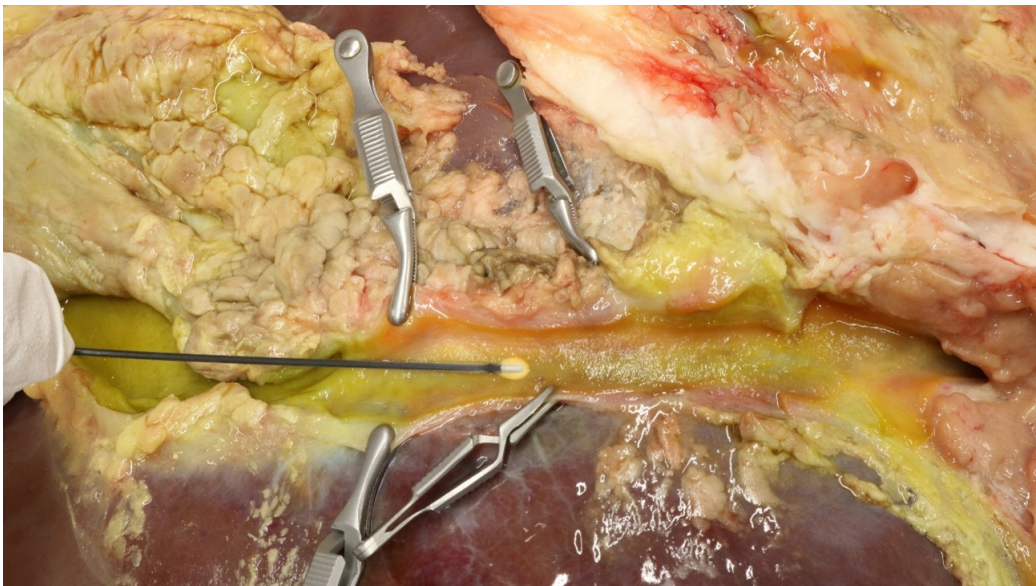


Abbildung 5: Aktivierung der Sonde mit Anfrieren des Gewebes ⁽¹⁾

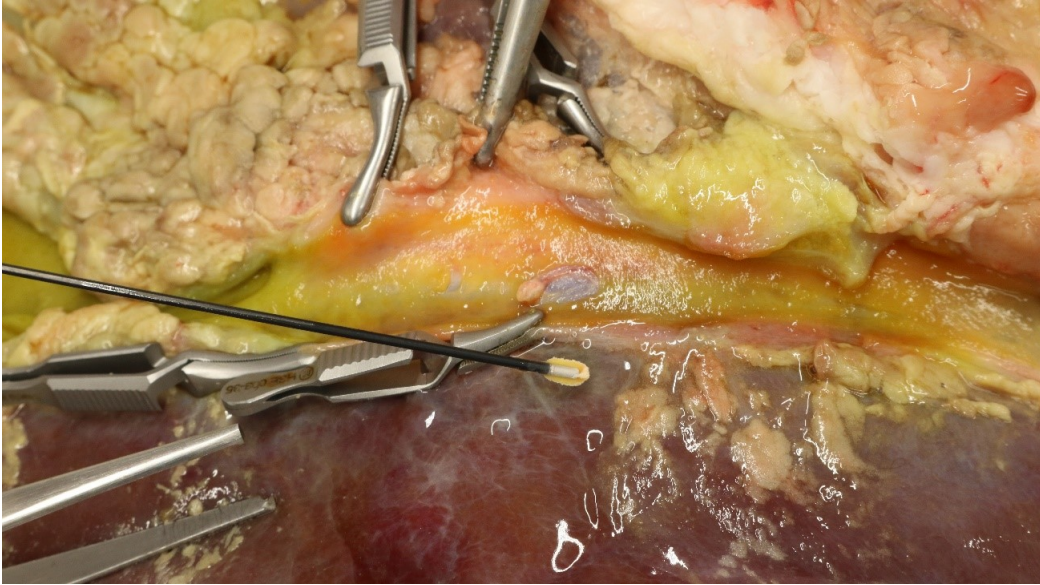


Abbildung 6: Entnommenes schockgefrorenes Gewebe ⁽¹⁾

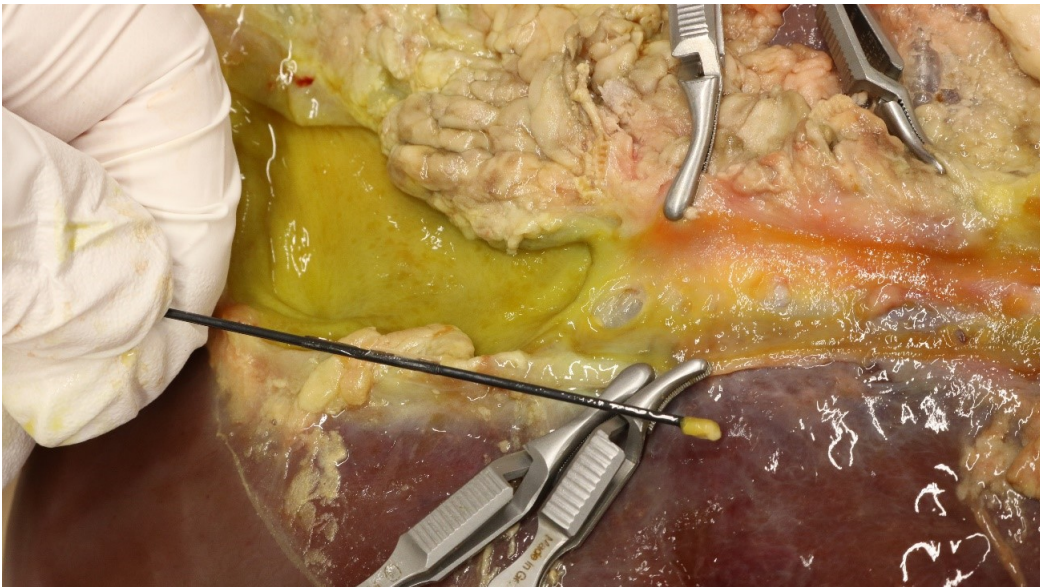


Abbildung 7: Gewebe anhaftend an Sonde nach erfolgter Kryobiopsie ⁽¹⁾

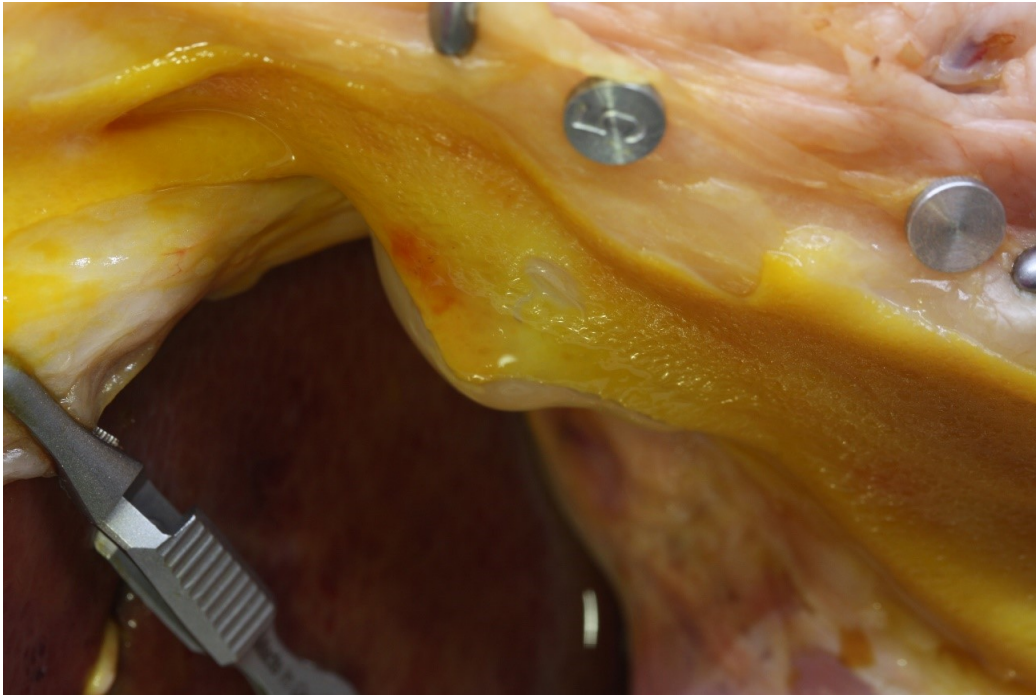


Abbildung 8: Gewebsdefekt nach Kryobiopsie ⁽¹⁾

Zur Gewebeentnahme mit Elevation in Kombination mit einer der oben genannten Biopsietechniken erfolgten zunächst Voreinstellungen des Basismoduls ERBEJET®2. Als Grundprogramm wurde null * gewählt. Der Effekt lag bei 40. An die markierte Entnahmestelle wurde eine flexible Wasserstrahlsonde frontal angelegt und durch die Aktivierung des Fußschalters eine Menge von 1-2 ml 0,9-prozentige Kochsalz-Lösung (0,9% NaCl) unter das Gewebe gespritzt, bis eine ausreichende Anhebung der obersten Gewebeschicht sichtbar wurde. Im Anschluss erfolgte entweder die Gewebeentnahme mit Zange (CF/GBF) oder mit CB nach oben genannter Beschreibung.

Eine weitere Biopsietechnik wurde in Kombination mit HF-Chirurgie durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Einstellung des Gerätemoduls VIO®300 D der Firma ERBE, geeignet für unterschiedliche Formen der HF-Chirurgie, vorgenommen. Es wurde das Grundprogramm null * mit monopolarer Buchse und der Modus Auto Cut ausgewählt. Der Effekt wurde auf eins festgelegt und die maximale Wattzahl auf 180. Ein Slim Line Elektrodengriff mit zwei Tasten und Drahtschlingenelektrode wurde angeschlossen. Auf Knopfdruck konnte die Drahtschlingenelektrode aktiviert und ein Gewebedefekt im Bereich der

vormarkierten Stelle gesetzt werden. Im Anschluss wurde eine Kryosonde im Bereich des Defektes aufgesetzt und mit unterschiedlicher Aktivierungszeit versucht, Gewebe zu gewinnen. Abbildung neun zeigt den Versuchsaufbau im Überblick.



Abbildung 9: Versuchsaufbau mit den verschiedenen Systemen im Tiermodell

2.1.4 Gewebeverarbeitung

Die erhaltenen Gewebeproben wurden in vorher bereitgestellte Behälter gefüllt und in 4,5% Formalin fixiert. Das in Formalin eingelegte Gewebe wurde als histologischer Schnitt angefertigt. Von den erhaltenen Gewebeproben wurden exemplarisch jeweils vier Schnitte von den Verfahrenstechniken CB, CB Elevation, Zangenbiopsie und Zangenbiopsie Elevation hergestellt. Die Zangenbiopsie zeigte sich nur mit GBF erfolgreich, denn nur mit dieser Technik konnte Gewebe gewonnen und fixiert werden. Die Gewebeentnahme mittels CF war nicht erfolgreich. Mit dieser Technik konnte kein Gewebe erhalten werden.

2.1.5 Histologische Begutachtung

Die Begutachtung der histologischen Schnitte und die Beurteilung des Gewebsschadens bei Elevation erfolgten durch eine histopathologische Fachkraft.

2.1.6 Größenausmessung

Die Ausmessung der Größenfläche des gewonnenen Präparates wurde nach Anfertigung der histologischen Schnitte durchgeführt. Hierzu wurden die erhaltenen Schnitte lichtmikroskopisch (ZEISS Zeiss Axioscope.A1) dargestellt und mit Hilfe einer Mikroskopkamera (ZEISS AXiocam MRc) fotografiert und digitalisiert. Im Anschluss erfolgte die Größenausmessung durch Umrandung des fixierten Gewebes und automatischer Berechnung der Oberfläche mit Hilfe des Software-Tools ZEN (blue Edition) (Abbildung 10).

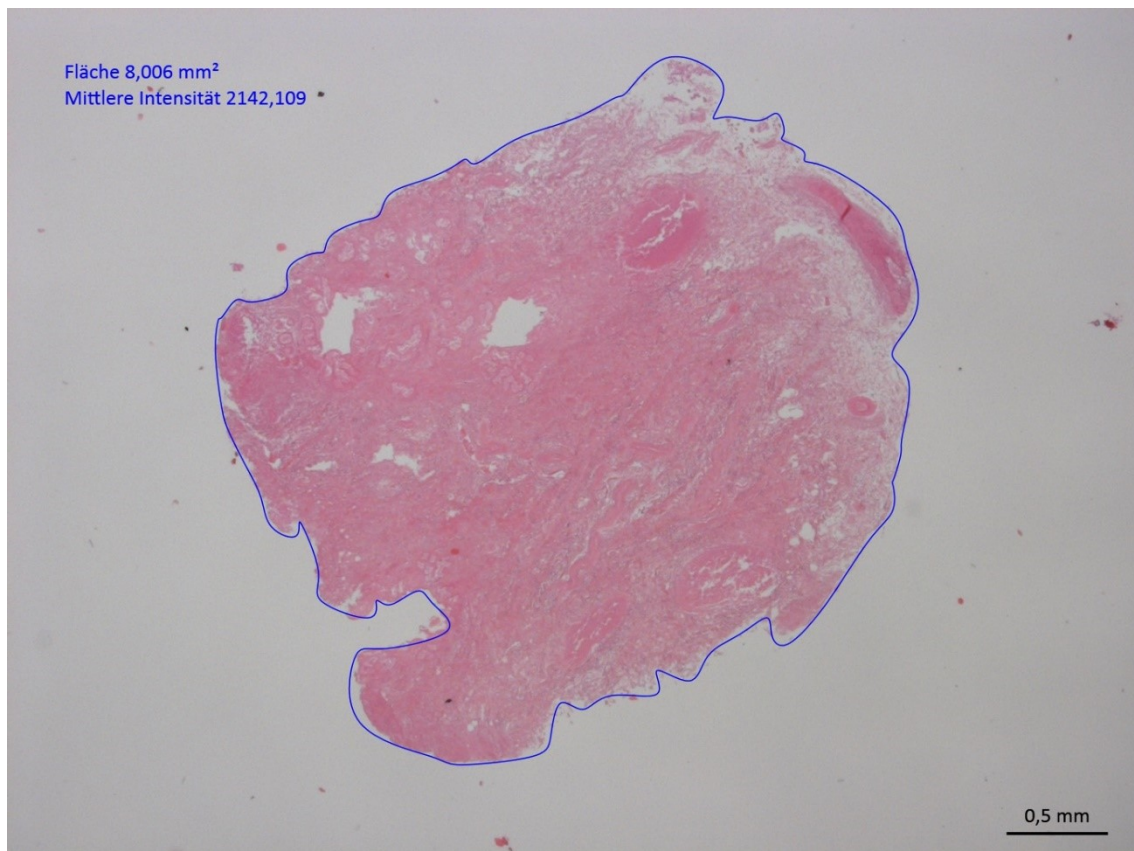


Abbildung 10: Größenausmessung histologisches Präparat

2.2 Untersuchungsaufbau und Durchführung humaner Teil

2.2.1 Material humanes Gewebe

Für die humane Studie wurde folgendes Material verwendet:

Hersteller	Bezeichnung	Einsatzgebiet	Artikelnummer
ERBE	ERBECRYO® 2	Biopsie, Rekanalisation, Devitalisierung in Kryotechnik	10402-000
ERBE	Flexible Kryosonde Ø 1,1 mm Länge 130 cm	Prototyp für Kryobiopsien	Prototyp
Medwork	EndoBite Cholangioskopiezange 260 cm Länge 2mm Ø Arbeitskanal	Cholangioskopie	BIO1-C4-18-260
Boston Scientific	Radial Jaw 4 Standard Capacity 240 cm Länge 2.8 mm Ø Arbeitskanal	Biopsezange im gastrointestinalen Trakt	M00513400
ZEISS	Zeiss Axioscope.A1	Lichtmikroskop	Seriennummer 3322000739
ZEISS	Axiocam MRc	Mikroskopkamera zur Digitalisierung	Art.Nr. 1600- 426508-9902- 000
ZEISS	ZEN (blue Edition)	Software für digitale Bildverarbeitung von Lichtmikroskopen	

ZEISS	Plan-Neofluar	Objektiv Maßstab 1,25 x	
ZEISS	A-Plan	Objektiv Maßstab 2,5 x, 5x, 10x	
ZEISS	N-Achroplan	Objektiv Maßstab 20x	
OLYMPUS	BX53F	Mikroskop	
OLYMPUS	PlanAPO N	Objektiv Maßstab 2x	
OLYMPUS	UPlan FLN	Objektiv Maßstab 4x	
OLYMPUS	UPlan FLN	Objektiv Maßstab 10x	
OLYMPUS	UPlan FLN	Objektiv Maßstab 20x	
OLYMPUS	UPlan FLN	Objektiv Maßstab 40x	

Tabelle 2: Verwendetes Material in der humanen Studie

Die CB wurden mit dem Basismodul ERBECRYO®2 und einem ERBE Kryosondenprototyp mit 1,1 mm Durchmesser und 130 cm Länge durchgeführt. Die Zangenbiopsien wurden mit der Cholangioskopiezange (CF) EndoBite der Firma Medwork (Medwork, Höchststadt, Deutschland) mit einem Durchmesser von 1,8 mm und einer Länge von 260 cm und mit der Biopsiezange Radial Jaw 4 Standard der Firma BostonScientific (Boston Scientific, Marlborough, Massachusetts, USA) mit dem Durchmesser 2,8 mm und einer Länge von 240 cm durchgeführt.

Die histologische Beurteilung des Gewebes erfolgte mit einem Mikroskop des Typs BX53F und Objektiven der Firma OLYMPUS. Als Objektive für den Maßstab

2x wurde der Typ PlanAPO N verwendet. Für die Maßstäbe 4x/10x/20x/40x wurden Objektive des Typ UPlan FLN eingesetzt. Die Größenausmessung des Gewebes erfolgte durch das Lichtmikroskop Zeiss Axioscope.A1 der Firma ZEISS. Es wurden Objektive der Firma ZEISS im Maßstab 1,25x (Typ Plan-Neofluar), 2,5/5/10x (Typ A-Plan) und Maßstab 20x (Typ N-Achroplan) genutzt. Als Mikroskopkamera zur Digitalisierung der histologischen Schnitte wurde die Axiocam MRc der Firma ZEISS verwendet und zur weiteren digitalen Bildverarbeitung und Größenausmessung die Software ZEN (blue edition) der Firma ZEISS. Tabelle zwei listet das verwendete Material im humanen Teil der Studie auf.

2.2.2 Studienpopulation

Die Probandenrekrutierung erfolgte in Kooperation mit der Abteilung für Viszeralchirurgie des Robert-Bosch-Krankenhauses. Die angestrebte Fallzahl betrug n=10-15. Eingeschlossen wurden Patienten, bei denen der Verdacht oder bereits die histologische Bestätigung auf eine Tumormorphose im Bereich des Pankreas oder der großen Gallenwege bestand und die sich einer Duodenopankreatektomie (Whipple-Operation) unterzogen.

2.2.3 Ethikvotum

Die geplante Studie wurde der Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen am 28.07.2017 vorgelegt. Am 28.09.2017 erfolgte die Bestätigung, dass seitens der Ethikkommission bezüglich der Studie keine Bedenken beständen (Projektnummer 495/2017BO2). In dieser Studie wurden alle Analysen explizit mit Restmaterialien durchgeführt, die im Rahmen der Blut- und Gewebebank des Robert-Bosch-Krankenhauses (IKP 238, Zeichen der Universitätsklinikum Tübingen Ethik-Kommission: 448/2009BO2) gesammelt wurden.

2.2.4 Aufklärung

Die Patienten wurden über die oben genannte Blut- und Gewebebank des Robert-Bosch-Krankenhauses/Instituts für klinische Pharmakologie schriftlich/mündlich am Vortag der Operation informiert und aufgeklärt. Voraussetzung für die Teilnahme eines Patienten als Proband war eine schriftliche Einwilligung.

Die schriftliche Patienteninformation stellte klar, dass eine Weigerung, an der Untersuchung teilzunehmen, oder der Rücktritt von den Untersuchungen zu jedem beliebigen Zeitpunkt ohne nachteilige Folgen für den Patienten bliebe. In jedem Falle bestätigte die Unterschrift, dass der Patient sich freiwillig entschlossen hatte, an der oben genannten Blut- und Gewebebank teilzunehmen, unbeschadet gesetzlicher und ethischer Rechte und mit der Möglichkeit, jederzeit ohne Angabe von Gründen von der Teilnahme zurückzutreten.

2.2.5 Datenerfassung und Datenschutz

Die Einwilligung der Patientin/des Patienten zur Aufbewahrung und Analyse von Biomaterialien im Rahmen der oben genannten Blut- und Gewebebank des Robert-Bosch-Krankenhauses/Instituts für klinische Pharmakologie beinhaltete auch die Einwilligung in die Erfassung der demografischen (zum Beispiel Alter, Geschlecht) und krankheitsbezogenen Daten die routinemäßig in der Krankenakte erfasst werden. Alle relevanten projektbezogenen klinischen Daten wurden aus der Krankenakte in einem gesonderten Studienfile pseudonymisiert gespeichert. Die Daten und Biomaterialien, die im Rahmen dieses Projektes erhoben und analysiert wurden, werden für 10 Jahre gespeichert beziehungsweise aufbewahrt. Danach werden alle erhobenen persönlichen und klinischen Daten sowie alle Proben anonymisiert. Im Anschluss ist ein Widerruf nicht mehr möglich. Darauf wurden die teilnehmenden Probanden hingewiesen. Im Rahmen der neuen Europäischen Datenschutz-Grundverordnung vom 25.05.2018 erfolgte zusätzlich die schriftliche Information der Studienbeteiligten, die vor dem 25.05.2018 an der Studie teilnahmen. Probanden die nach dem

25.05.2018 in die Studie eingeschlossen wurden, unterschrieben eine zusätzliche Ergänzung zur Patienteninformation und Einwilligungserklärung für Studien.

2.2.6 Gewebeentnahme und Präparation

Das explantierte humane Präparat beinhaltete Pankreasgewebe, Duodenum und Gallengang, welcher in die Papille mündete. Nach durchgeführter Operation (Duodenopankreatektomie) wurde das Gewebe nativ in die Abteilung für Pathologie gebracht. Hier erfolgten die Inspektion und Aufbereitung des Gewebes durch einen erfahrenen Pathologen. Der distale Gallengang wurde mit einer Schere in Richtung Papille im Längsschnitt eröffnet. Die Geräteeinstellung des ERBECRYO®2 wurden mit Effekt eins und 60 bar CO₂-Druck festgelegt. Im Anschluss wurde das Präparat manuell mit zwei Pinzetten fixiert und es erfolgten Gewebeentnahmen durch CB mit unterschiedlichen Aktivierungszeiten oder eine der zwei Biopsiezangen (Durchführung siehe auch Abschnitt Tiermodell) aus dem präparierten Gallengang von proximal nach distal zur Papillenregion. Abbildung 11 zeigt die Biopsiestelle nach Gewebeentnahme und Abbildung 12 das erhaltene Gewebe. Das gewonnene Gewebe wurde in vierprozentigem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, aus den Gewebelöcken histologische Schnitte zur mikroskopischen Beurteilung angefertigt und im Anschluss mit Hämatoxylin Eosin gefärbt.

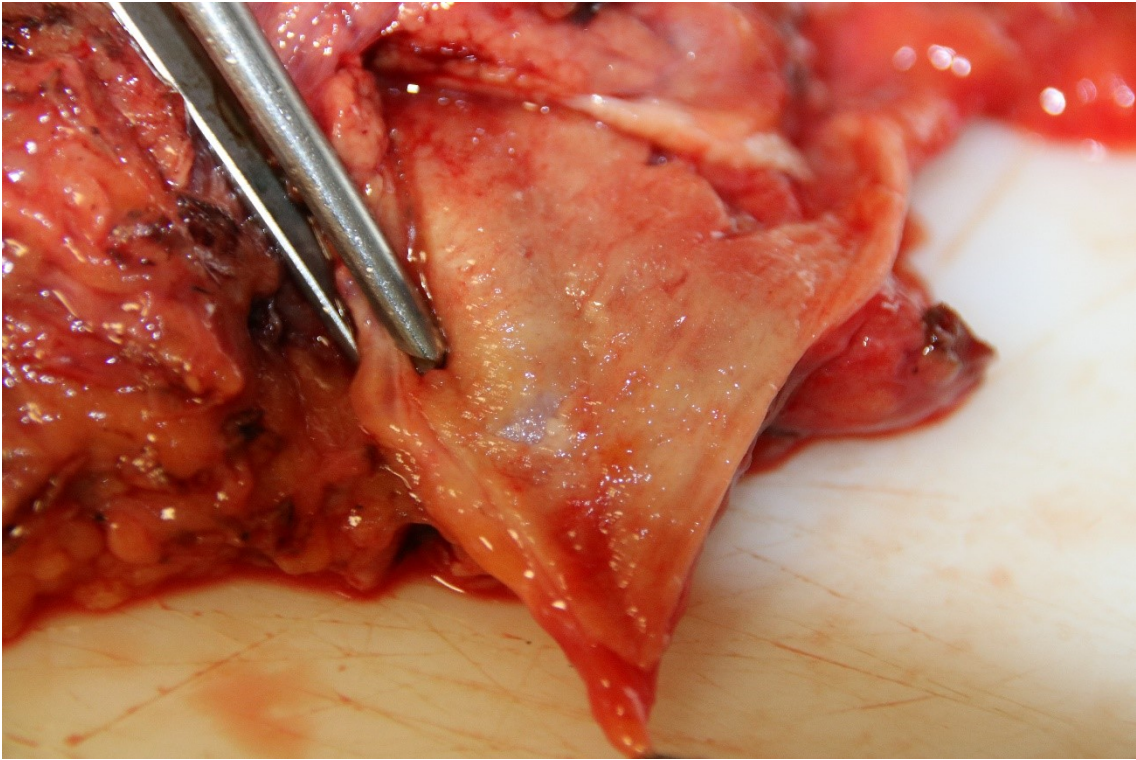


Abbildung 11: Biopsiestelle nach Gewebentnahme mit Kryosonde

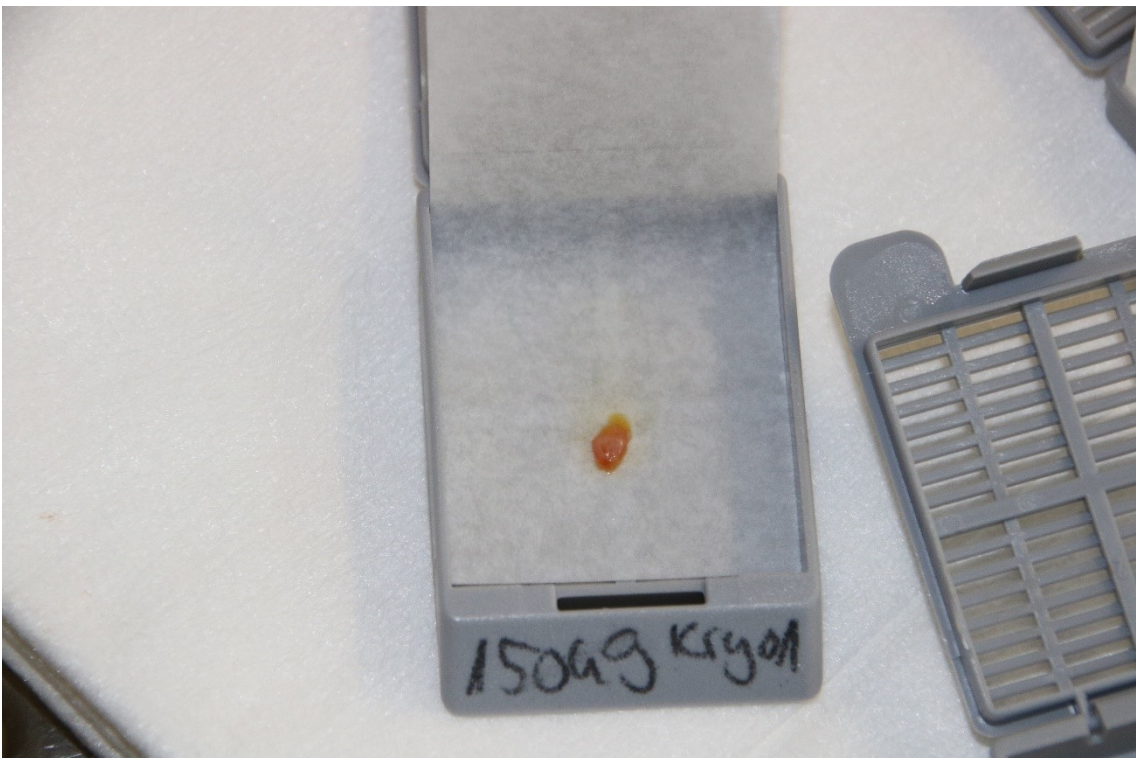


Abbildung 12: Entnommenes Gewebe durch Kryobiopsie

2.2.7 Histologische Beurteilung/Repräsentativität

Die histologische Beurteilung des erhaltenen Gewebes wurde von zwei klinisch erfahrenen Histopathologen, verblindet zur Biopsietechnik, durchgeführt. Zur Qualitätsbeurteilung des erhaltenen Gewebes diente ein vorgefertigter Fragebogen. Erster Punkt des Fragebogens war eine Beurteilung in Hinsicht auf Artefakte. Mögliche Angaben waren: keine, niedrige, mäßige oder hohe Rate (in Zahlen null, eins, zwei, drei) an Quetschartefakten oder andere Ursache für Artefakte.

Als nächster Punkt wurde die Frage nach der Verwertbarkeit der Probe gestellt, der sogenannten Repräsentativität. Anzukreuzen war Ja oder Nein (in Zahlen null oder eins) mit eventueller Begründung (zu klein, Quetschartefakte, kein Gallengangsgewebe). Repräsentativität wurde definiert als das Vorhandensein von ausreichend auswertbarem Gallengangsepithel, um eine Bösartigkeit auszuschließen, oder, im Falle eines Karzinoms, das Vorhandensein von ausreichend Tumorzellen und möglichem invasivem Wachstum, das eine eindeutige Diagnose einer Bösartigkeit ermöglicht.

Der nächste Fragepunkt beinhaltete die histopathologische Beurteilbarkeit und Qualität des Gewebes. Hierzu wurde ein semiquantitativer Score (Likert-Skala) von null bis sechs in aufsteigender Wertung genutzt (Tabelle 3). Null stellte als niedrigste Bewertung fest, dass auf Grund der sehr schlechten Qualität der gewonnenen Probe eine Beurteilung der Morphologie und der histopathologischen Merkmale nicht möglich sei. Der Score zwei wurde als schlechte Qualität der Probe eingestuft und somit bestand eine deutliche Beeinträchtigung der Beurteilbarkeit der Morphologie und der histopathologischen Merkmale. Als Score vier wurde festgelegt, dass trotz leichter Einschränkungen der Probenqualität eine Beurteilung der relevanten Morphologien und histopathologischen Merkmale/Strukturen erfolgen könne. Die maximale Punktzahl sechs beschrieb die vollständige und uneingeschränkte Beurteilbarkeit aller relevanter Morphologien und histopathologischen Merkmale/Strukturen.

Die Fragebögen wurden zu jedem einzelnen histologischen Präparat von beiden Histopathologen unabhängig voneinander ausgefüllt.

Assessability Grade	Histologic Description
0	Due to very poor specimen quality, it is not possible to assess the relevant morphological and histopathological features <i>Aufgrund der sehr schlechten Probenqualität ist es nicht möglich, die relevanten morphologischen und histopathologischen Merkmale zu beurteilen</i>
1	
2	Due to poor specimen quality assessment of relevant morphological and histopathological structures and features is severely compromised <i>Aufgrund schlechter Probenqualität ist die Beurteilung relevanter morphologischer und histopathologischer Strukturen und Merkmale stark beeinträchtigt</i>
3	
4	Despite moderate limitations in specimens' quality assessment of the relevant morphological and histopathological structures and features is compromised but possible <i>Trotz moderater Einschränkungen der Proben ist die Qualitätsbeurteilung der relevanten morphologischen und histopathologischen Strukturen und Merkmale beeinträchtigt, aber möglich</i>
5	
6	The specimen allows for complete and unrestricted assessment of all relevant morphological and histopathological structures and features <i>Die Probe ermöglicht eine vollständige und uneingeschränkte Beurteilung aller relevanten morphologischen und histopathologischen Strukturen und Merkmale</i>

Tabelle 3: Originaler histologischer Bewertungsbogen nach Likert

(Likert-Skala 0-6) zur Beurteilbarkeit der Qualität des erhaltenen Gewebes ⁽¹⁾ und deutsche Übersetzung

2.2.8 Größenausmessung

Das erhaltene Gewebe wurde nach der Anfertigung der histologischen Schnitte zur weiteren Beurteilung ausgemessen. Hierzu wurden die Schnitte lichtmikroskopisch (ZEISS Zeiss Axioscope.A1) dargestellt. Mit Hilfe einer Mikroskopkamera (ZEISS AxioCam MRc) wurden diese fotografiert und digitalisiert. Im Anschluss wurde die Größe durch digitale Umrandung des fixierten Gewebes und automatisches Berechnen der Oberfläche mit der Software-Tool ZEN (blue edition) ausgemessen (Abbildung 13 und 22). Die Ergebnisse der Größenausmessung wurden tabellarisch festgehalten.



Abbildung 13: Beispiel der Größenausmessung

2.3 Statistik

Tiermodell

Sämtliche Daten wurden mit der Graph Pad Prism Software Version 8 (Graph Pad Software, LCC) und R (R Core Team [2020], tidyverse package Version 1.3.0.) analysiert und ausgewertet. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurden je nach Datenart der Mann-Whitney-Test, der Wilcoxon-Test oder der Chi-Quadrat-Test angewendet. Sämtliche p-Werte sind zweiseitig und ein p-Wert von kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Humaner Teil

Die Übereinstimmung der beiden Pathologen (Interrater-Reliabilität) bezüglich der Repräsentativität wurde durch den Cohen's Kappa Koeffizient ausgedrückt. Zur Vermeidung von Fehlern bei multiplen Tests wurde die Bonferroni-Holm Methode angewandt. Ausgehend von den erhaltenen Daten der Studie wurde eine Post-hoc Poweranalyse durchgeführt. Die Powerberechnung der Studie wurde mit der Funktion `power.t.test` in R durchgeführt und lag bei 47%. Da es sich nicht um eine randomisierte Studie handelte, wurde eine Post-hoc-Analyse durchgeführt, um ein mögliches Bias in der chronologischen Reihenfolge der Biopsiever-suche aufzudecken. Obwohl die Verteilung der Biopsiever-suche zwischen den Patienten und der Biopsietechnik nicht völlig gleich war ($p=0,089$), gab es keine eindeutige statistische Verzerrung.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung Tiermodell

3.1.1 Makroskopische Auswertung

Die erfolgreichen Biopsien und Biopsieversuche verteilten sich auf die einzelnen Methoden wie folgt:

Methode	Anzahl Biopsien gesamt	Erfolgreich	Nicht erfolgreich
CB	27	5	22
CB + Elevation	44	13	31
CB + HF	16	11	5
CF	16	0	16
GBF	9	9	0
CF + Elevation	3	0	3
GBF +Elevation	9	5	4
CB gesamt	87	29	58
CF/GBF gesamt	37	14	23
Biopsien gesamt	124	43	81

Tabelle 4: Verteilung der erfolgreichen Biopsien und Biopsieversuche auf die einzelnen Methoden

In Summe wurden 124 Biopsien durchgeführt. Tabelle vier listet die Verteilung der erfolgreichen Biopsien und Biopsieversuche auf. 87 Biopsien erfolgten in Kryobiopsietechnik/Kombinationstechnik und 37 Biopsien in Zangenbiopsie/Kombinationstechnik. Von den insgesamt 124 Biopsien waren 43 Biopsien (35%) erfolgreich. 81 Biopsien (65%) waren nicht erfolgreich. (Verteilung der Biopsieversuche und erfolgreicher Biopsien der einzelnen Methoden siehe Tabelle 4). Mit CF konnten keine Proben gewonnen werden.

Insgesamt betrachtet waren 29 Biopsien in Kryobiopsietechnik und 14 in Zangentechnik erfolgreich. Der p-Wert der beiden Gruppen lag bei $p = 0,682$ und ist somit statistisch nicht signifikant.

3.1.2 Histologische Beurteilung

Die histologische Beurteilung der erhaltenen Gewebeproben konnte nur sehr eingeschränkt erfolgen (gesamt 16 Proben). Nur bei vier von 16 ausgewerteten Gewebeproben konnte eine Unterscheidung der verschiedenen Gewebetypen mikroskopisch getroffen werden. Drei dieser vier Proben zeigten eine Perforation des Gallenganges. Eine Beurteilung der Qualität des Gewebes und möglicher Artefakte war nicht möglich.

3.1.3 Größenauswertung

Angefertigt und ausgewertet wurden jeweils vier exemplarische histologische Schnitte der vier verschiedenen Entnahmetechniken (CB, CB+Elevation, GBF, GBF/Elevation). Die Entnahmetechnik CB/HF-Chirurgie wurde auf Grund der zu großen Destruktion des Gewebes nicht berücksichtigt. Ebenfalls entfiel die Auswertung der CF, da mit dieser Technik keine verwertbaren Proben gewonnen werden konnten. Der Mittelwert der vier Schnitte des ausgemessenen Areals lag für die CB bei $9,65 \text{ mm}^2$ bei einer Standardabweichung von $8,03$ und für die CB mit Elevation bei einem Mittelwert von $8,66 \text{ mm}^2$ bei einer Standardabweichung von $7,0$. Der Mittelwert der vier Schnitte des ausgemessenen Areals für die GBF lag bei $2,14 \text{ mm}^2$ bei einer Standardabweichung von $0,93$ und für GBF mit Elevation lag der Mittelwert bei $2,11 \text{ mm}^2$ mit einer Standardabweichung von $0,89$. Nach Zusammenführung der Subgruppen (CB/CB + Elevation und GBF/GBF + Elevation) ergab sich für die CB ein Mittelwert von $9,15 \text{ mm}^2$ und für die Zangenbiopsie ein Mittelwert von $2,13 \text{ mm}^2$ ($p=0,014$) (Tabelle 5, Abbildung 14 und 15).

	CB	CB/Elevation	GBF	GBF/Elevation
Probe no.	Area mm ²	Area mm ²	Area mm ²	Area mm ²
2	20,79			
9	6,24			
11		4,88		
13	9,52			
17			1,54	
21			1,15	
26	2,04			
27		3,04		
28			3,02	
30			2,84	
32		18,69		
35		8,01		
37				1,90
38				1,97
39				3,35
40				1,23
MW:	9,65	8,66	2,14	2,11
STABW:	8,03	7,00	0,93	0,89

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der ausgemessenen Areale der vier Subgruppen

MW=Mittelwert, STABW=Standardabweichung, CB (Kryobiopsie), GBF (Standardbiopsiezange)

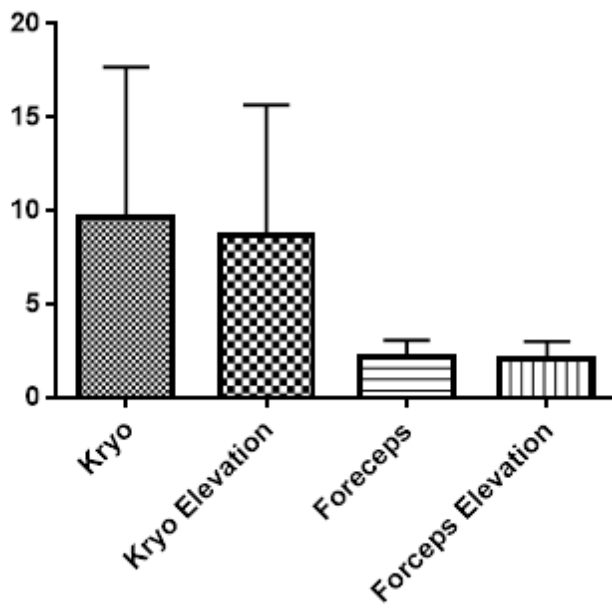


Abbildung 14: Größenauswertung der Subgruppen in mm² aus n = 4 / Instrumentengruppe

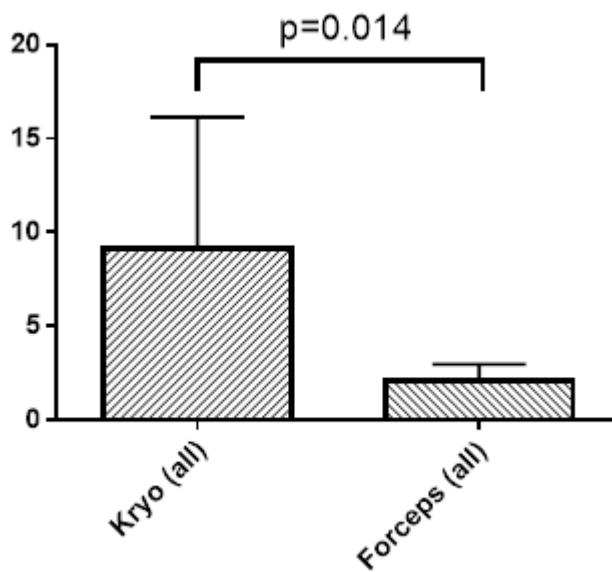


Abbildung 15: Größenauswertung in mm² nach Zusammenführung der Subgruppen pro Instrument zu je n = 8 / Instrument

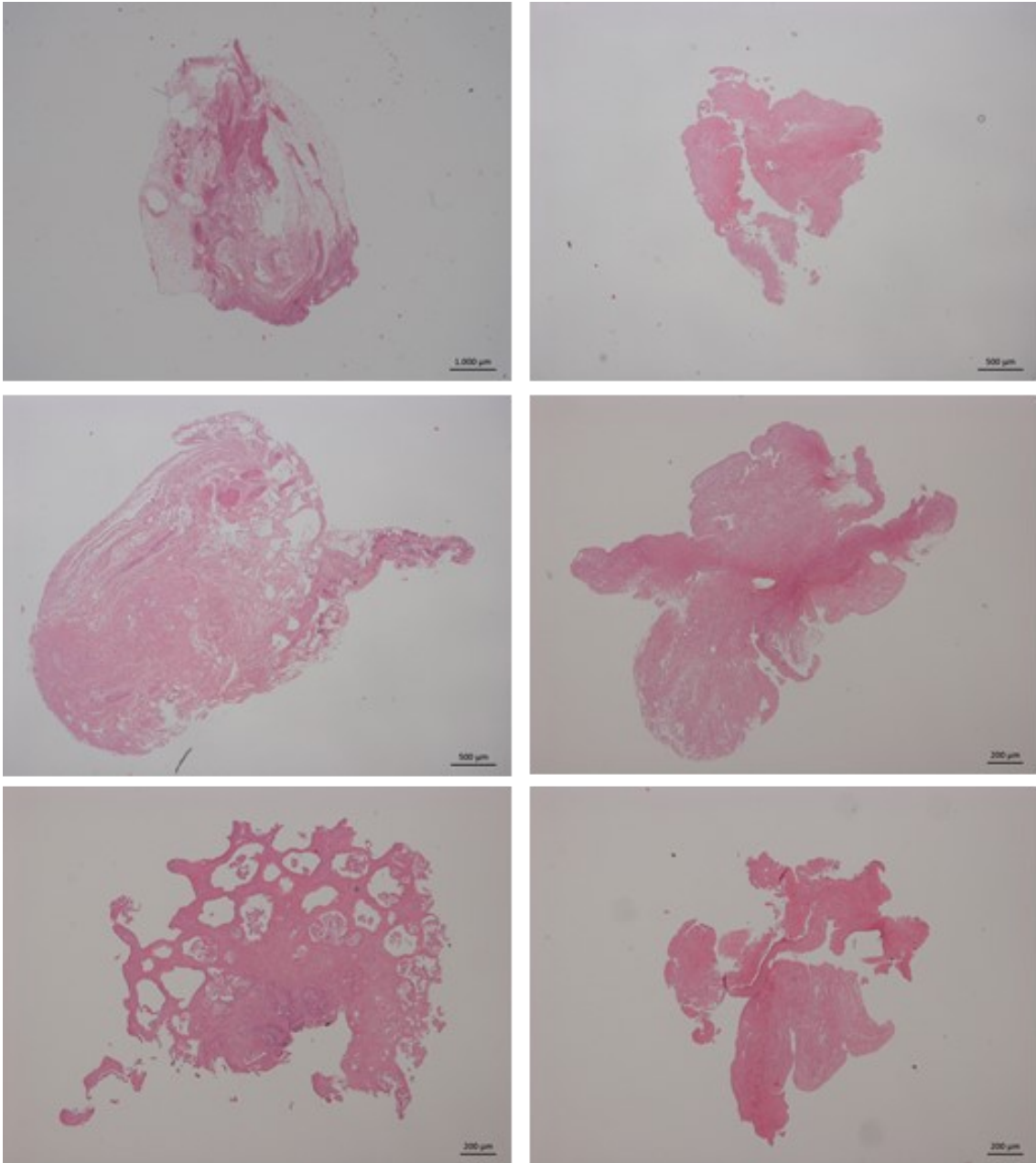


Abbildung 16: Repräsentative Schnitte für Kryobiopsien (links) und Zangenbiopsien (rechts).

Die Schnitte sind nach den größten (oben), mittleren (Mitte) und kleinsten (unten) Biopsien, die mit dem jeweiligen Instrument erhalten wurden, sortiert. Zu beachten ist die teilweise unterschiedliche Maßeinheit

3.1.4 Spezielle Beurteilung des Gewebsschadens bei Elevation

Die histologische Beurteilung des Gewebeschadens nach Elevation zeigte eine deutlich zu tiefe Eindringtiefe des Wasserstrahls für alle drei durchgeführten Effekte (Effekt 30bar, Effekt 40bar, Effekt 50bar) mit Perforation des Gallengangs und Eindringen des Wasserstrahls bis ins tieferliegende Fettgewebe. Die gewünschte Elevation des Gewebes konnte nicht erreicht werden (Beispiel Abbildung 17).

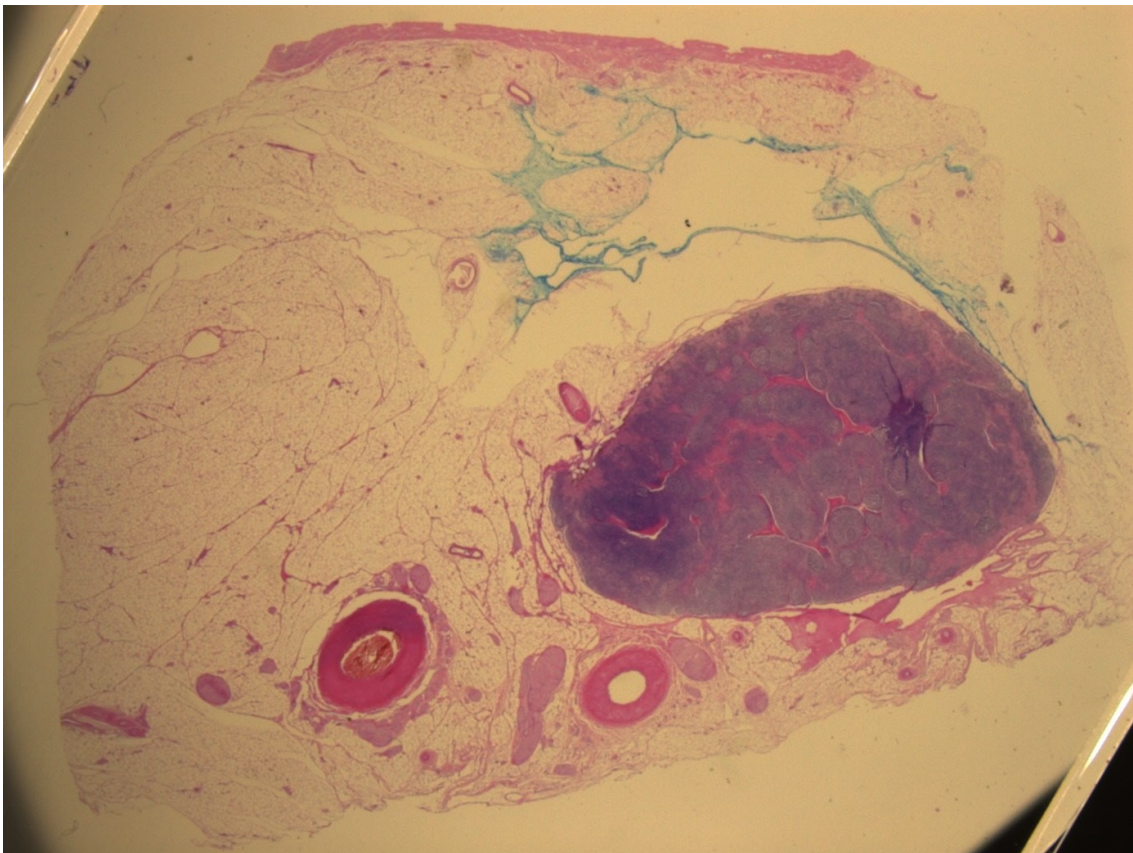


Abbildung 17: Histologischer Schnitt (HE-Färbung) nach Unterspritzung mit Gewebsmarkierungsfarbe (blaues Gewebe)

3.2 Auswertung humaner Teil

3.2.1 Patientenpopulation

Die Anzahl der eingeschlossenen Patienten der Studie war n = 14. Der Mittelwert des Alters lag bei 70,8 Jahren. Der jüngste Patient war 50 Jahre alt, der älteste Patient 84 Jahre. Neun der 14 Patienten waren männlichen Geschlechts und fünf Patienten weiblichen Geschlechts (Auflistung der endgültigen Histologie und Verteilung Biopsieversuche/erfolgreiche Biopsien siehe Tabelle sechs).

Patient	Geschlecht	Alter bei OP	Histologie/Tumor	Erfolgreich/ Versuch
1	weiblich	69	Pankreaskarzinom	3/3
2	weiblich	79	Pankreaskarzinom	0/6
3	männlich	61	Pankreaskarzinom	4/9
4	weiblich	77	Pankreaskarzinom	3/6
5	männlich	76	Pankreaskarzinom	5/8
6	weiblich	56	Cholangiokarzinom	4/7
7	männlich	76	Pankreaskarzinom	4/7
8	männlich	83	Pankreaskarzinom	5/10
9	männlich	64	Papillenkarzinom	4/10
10	weiblich	50	Chronische Pankreatitis	6/9
11	männlich	60	Neuroendokriner Tumor	5/9
12	männlich	82	Pankreaskarzinom	2/9
13	männlich	84	Cholangiokarzinom	9/9
14	männlich	74	Zystadenom	3/10

Tabelle 6: Endgültige Histologie der Patienten und Verteilung der erfolgreichen Biopsien/ Biopsieversuche pro Patient ⁽¹⁾

3.2.2 Makroskopische Auswertung

Es wurden insgesamt 112 Biopsieversuche an 14 Explantaten mit CB, CF oder GBF durchgeführt. Hiervon waren 57 (50,9%) erfolgreich, das heißt, es konnte Gewebematerial aus dem Gallengang gewonnen werden. Bei einem Explantat waren weder CB noch Zangenbiopsie erfolgreich. Zehn erhaltene Gewebeproben mussten von der Größenausmessung und histologischen Beurteilung ausgeschlossen werden, da sie kein histopathologisch auswertbares Material enthielten (entweder auf Grund technischer Fehler oder fehlenden Gallengangsgewebes innerhalb der Probe, Abbildung 18).

Die Erfolgsrate mit CF lag bei 6/29 (20,7%) und mit GBF bei 23/33 (69,7%) erhaltenen Biopsien. In Kryobiopsietechnik konnten 28/50 (56%) erfolgreiche Proben gewonnen werden. Die Erfolgsrate der CB ($p = 0,005$) und GBF ($p = 0,003$) war signifikant höher im Vergleich zur CF. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Erfolgsrate von CB und GBF ($p = 0,31$). Da nur drei Cholangioskopiezangenbiopsien eines einzigen Patienten vollständig auszuwerten waren, wurde diese Modalität/Biopsietechnik von den weiteren Auswertungen ausgeschlossen.

In der endgültigen histologischen Auswertung fand sich bei drei Probanden ein Tumor beziehungsweise eine Entzündung der Gallenwege. In dieser Untergruppe mit pathologisch verändertem Gewebe lag die Erfolgsrate von erhaltenem Gewebe bei 50% (3/6) für die CF, 55,5% (5/9) für die GBF und 81,8% (9/11) für die CB ohne statistisch signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppe (CB vs. GBF $p = 0,20$; CB vs. CF $p = 0,17$; CF vs. GBF $p = 0,83$).⁽²⁾ Tabelle sieben zeigt die Verteilung der Biopsieversuche betreffend die verschiedenen Modalitäten.

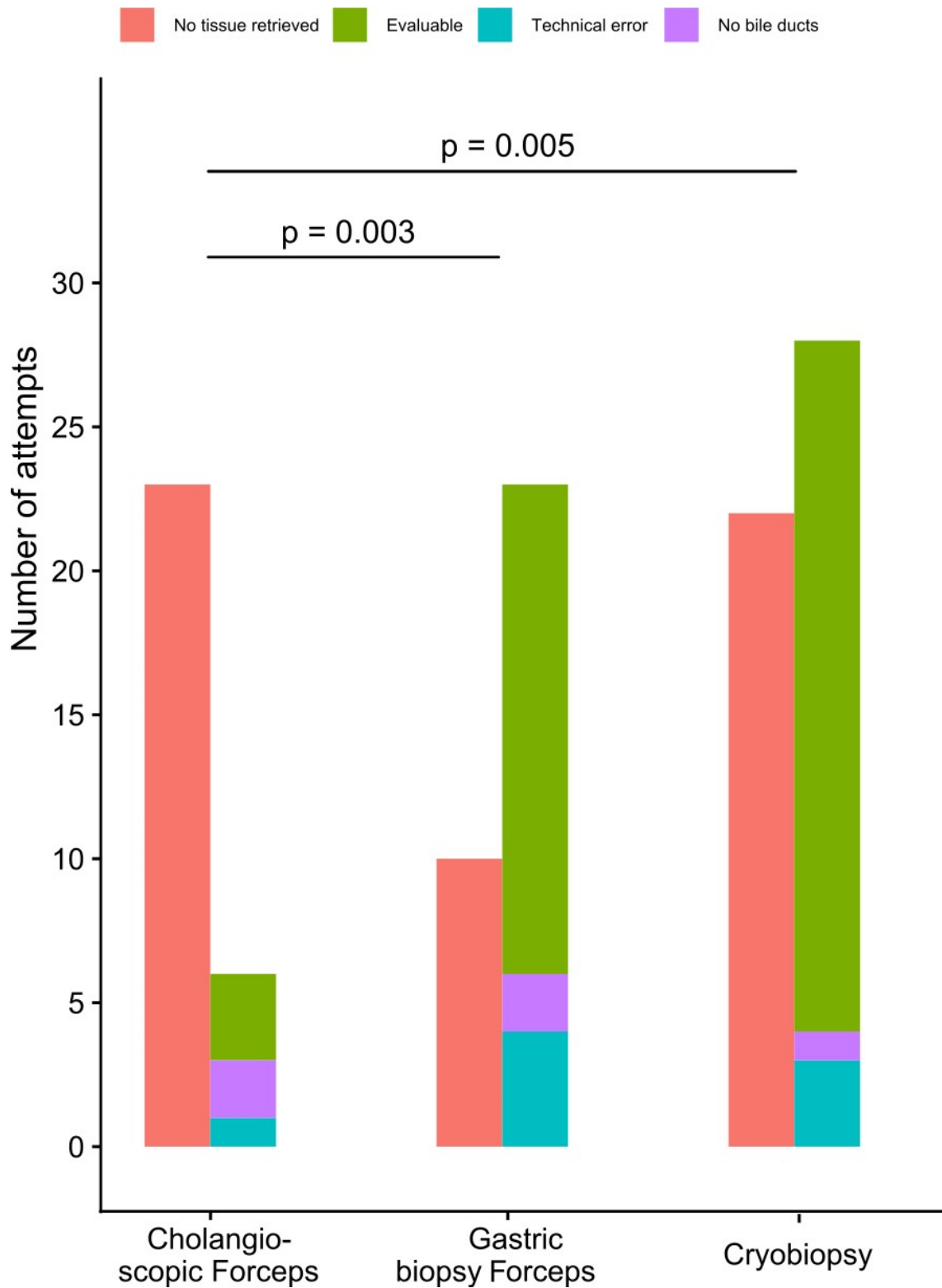


Abbildung 18: Anzahl der Biopsieversuche für jedes Instrument

(rot: kein Gewebe erhalten; grün: auswertbar für alle nachfolgenden Analysen; blau: technischer Fehler bei der Verarbeitung; lila: keine auswertbaren Gallengänge im histopathologischen Präparat). ⁽¹⁾

Methode	CB	CF	GBF	Alle Methoden
	Erfolgreich/ gesamt	Erfolgreich/ gesamt	Erfolgreich/ gesamt	Erfolgreich/ gesamt
Patient				
1	3/3	0/0	0/0	3/3
2	0/3	0/3	0/0	0/6
3	3/4	1/5	0/0	4/9
4	0/3	0/0	3/3	3/6
5	3/5	0/0	2/3	5/8
6	3/4	0/0	1/3	4/7
7	3/4	0/0	1/3	4/7
8	3/4	0/3	2/3	5/10
9	3/4	0/3	1/3	4/10
10	2/3	1/3	3/3	6/9
11	1/3	1/3	3/3	5/9
12	1/3	0/3	1/3	2/9
13	3/3	3/3	3/3	9/9
14	0/4	0/3	3/3	3/10
Total	28/50	6/29	23/33	57/112

Tabelle 7: Verteilung der Biopsieversuche der verschiedenen Modalitäten ⁽¹⁾

3.2.3 Histologische Beurteilung

Die histologische Beurteilung erfolgte durch zwei Pathologen mit Hilfe eines vorgefertigten Fragebogens anhand eines semiquantitativen Scores (Likert Skala) von 0-6 Punkten (siehe auch 2.2.7). Der Mittelwert der histologischen Beurteilbarkeit der GBF lag im Durchschnitt bei $3,29 \pm 1,34$ Punkten mit einem maximalen Wert von sechs Punkten und einem minimalen Wert von null Punkten. Die histologische Beurteilbarkeit der CB wurde durchschnittlich mit $4,35 \pm 1,20$ Punkten bewertet. Der Maximalwert lag bei sechs Punkten und der Minimalwert bei einem Punkt. Die CB zeigte sich statistisch signifikant überlegen in Bezug auf die histologische Beurteilung gegenüber der GBF ($p = 0,016$) (Abbildung 19).⁽²⁾

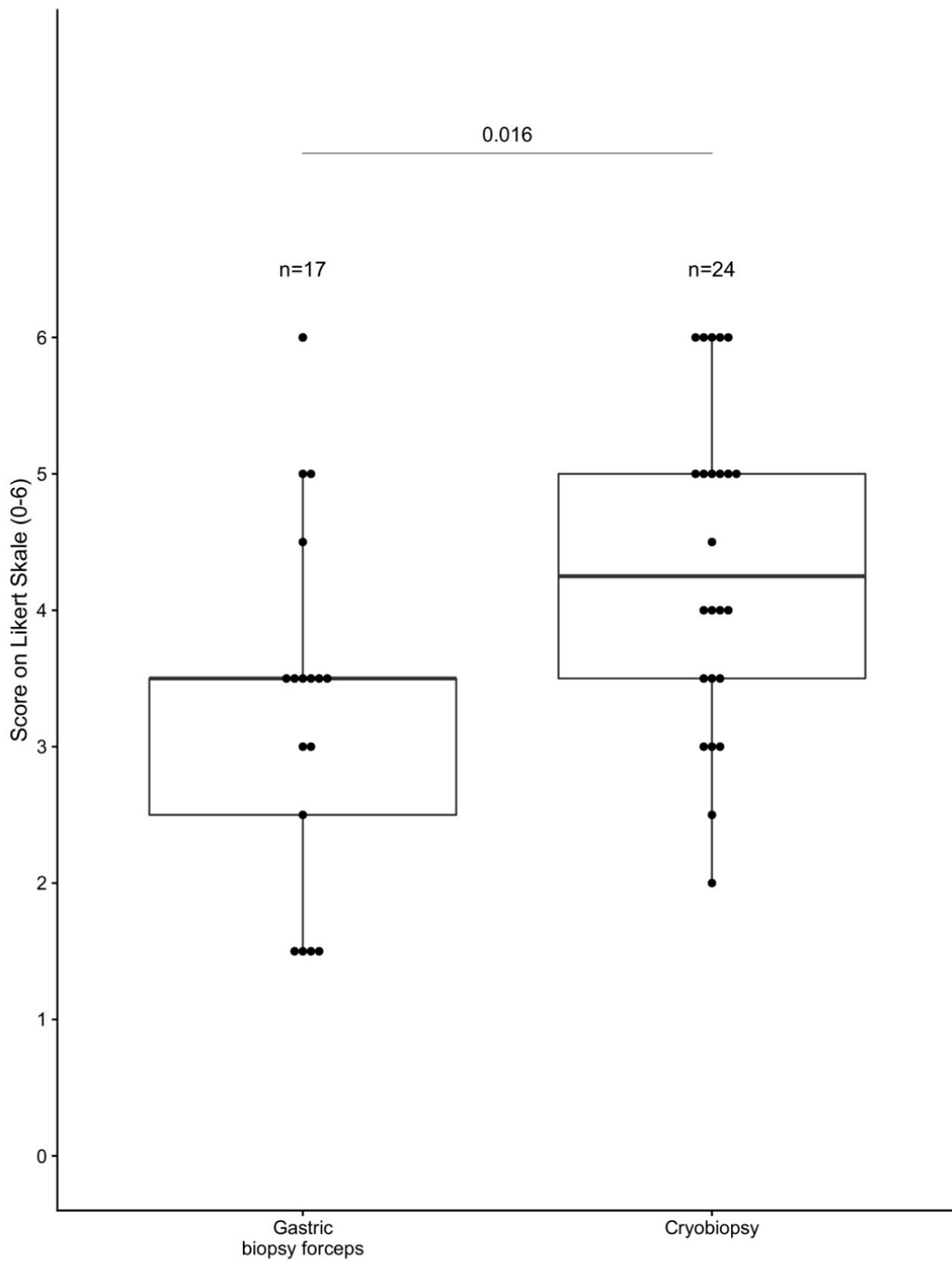


Abbildung 19: Streudiagramm/Verteilungsmuster der histologischen Beurteilung

Histologischen Beurteilung durch zwei unabhängige Pathologen mittels Likert-Skala (0-6) ⁽¹⁾

3.2.4 Repräsentativität

Es bestand eine gute Übereinstimmung zwischen den Bewertungen der beiden Pathologen (Übereinstimmung 87,5 %, Cohen's Kappa von 0,69). Drei Gewebeproben wurden von der Analyse der Größenausmessung und der histologischen Beurteilung ausgeschlossen, da sie kein auswertbares Gallengangsgewebe enthielten. Diese Proben wurden als nicht repräsentativ gewertet. Von 19 erhaltenen Proben für die GBF wurden 12 (63 %) von beiden Pathologen als repräsentativ bewertet. 23 der 25 durch CB erhaltene Proben (92 %) waren repräsentativ. Somit zeigte sich die CB statistisch signifikant überlegen in Bezug auf die Repräsentativität ($p = 0,027$; Abbildung 20).⁽²⁾

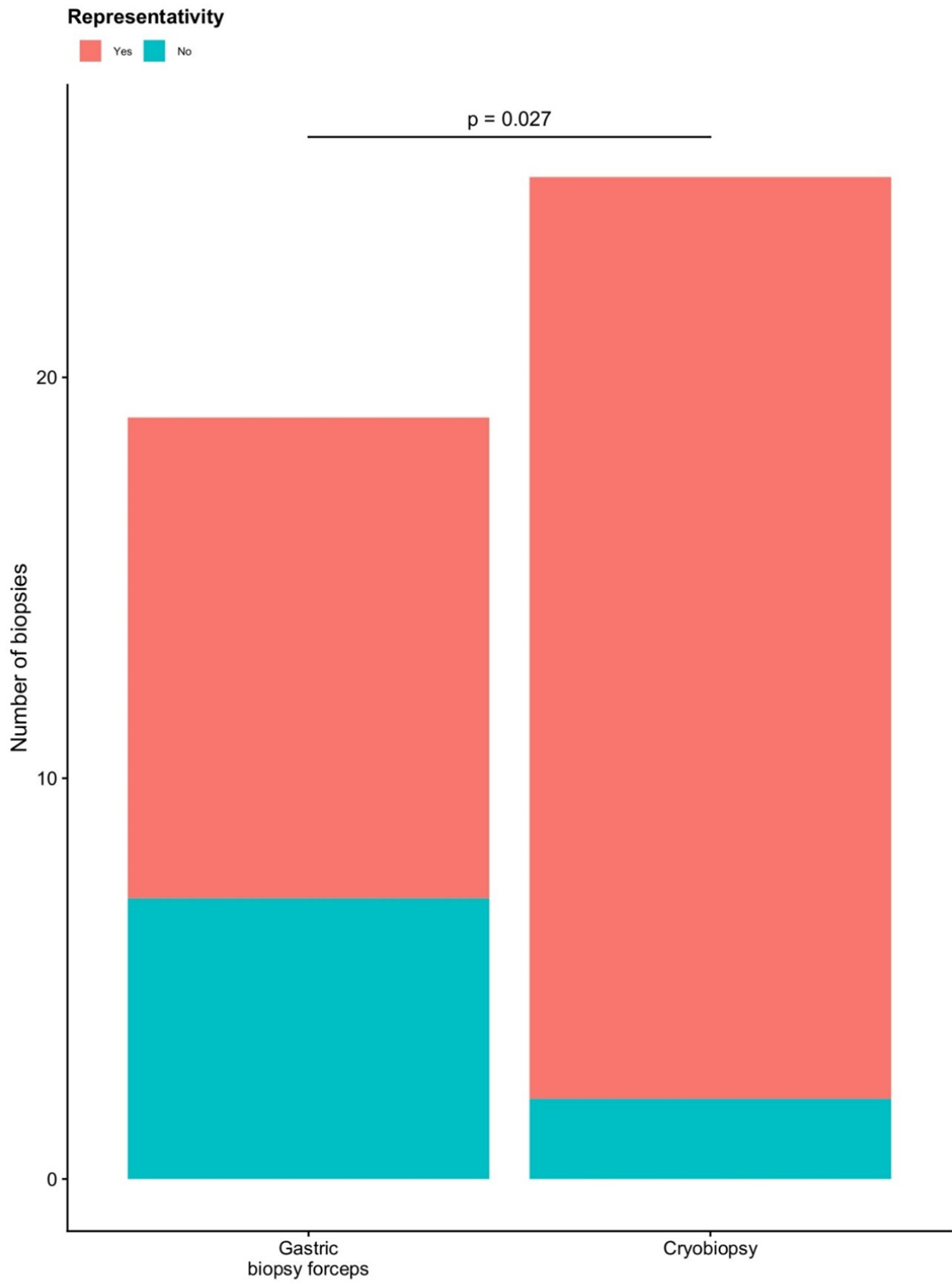


Abbildung 20: Anzahl der repräsentativen Biopsien
(CB vs. GBF, repräsentativ ja/rot und nein/blau). ⁽¹⁾

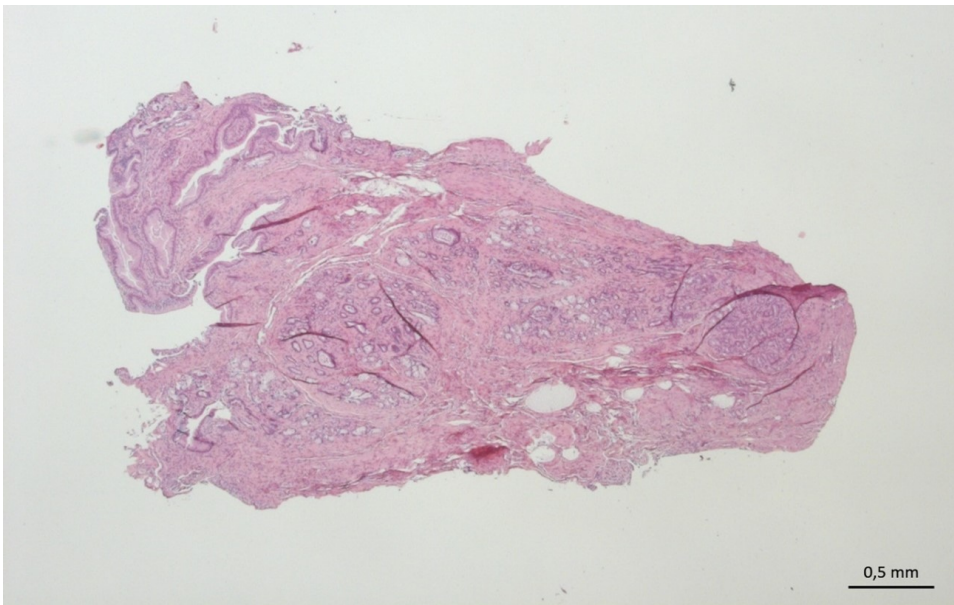
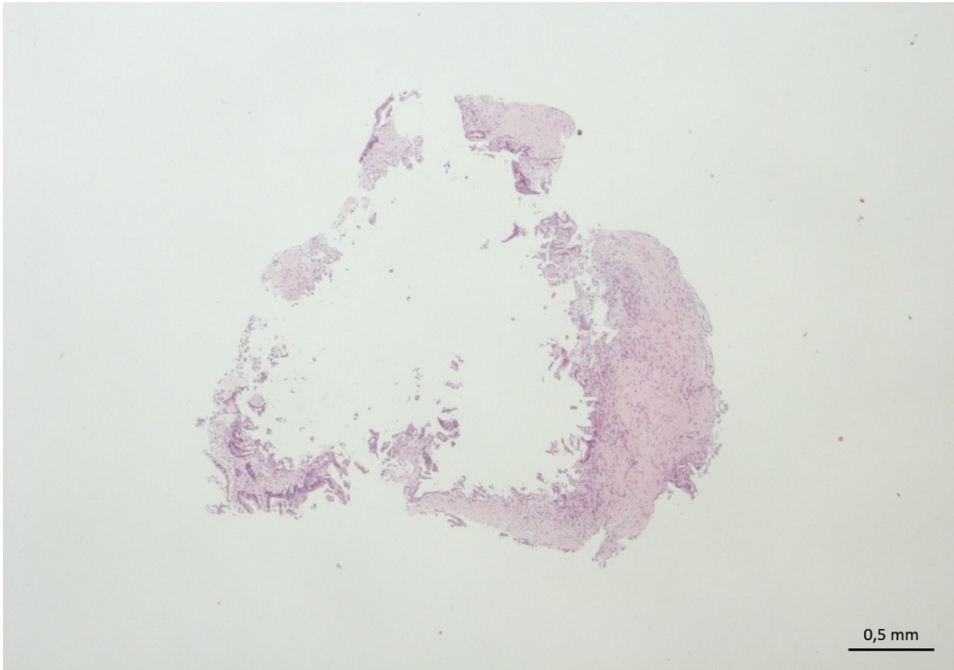


Abbildung 21: Beispiele von histologischen Schnitten
Standardbiopsiezange (oben) und Kryobiopsie (unten) ⁽¹⁾

3.2.5 Größenausmessung

Die durchschnittliche Flächengröße des erhaltenen Biopsiegewebes der GBF war $3,3 \pm 5,1 \text{ mm}^2$. Als Maximum fand sich eine Fläche von $21,17 \text{ mm}^2$ und als Minimum $0,17 \text{ mm}^2$. Für die CB lag die durchschnittliche Flächengröße des erhaltenen Biopsiegewebes bei $5,6 \pm 4,5 \text{ mm}^2$. Der maximale Wert lag bei $17,51 \text{ mm}^2$ und der minimale Wert bei $1,06 \text{ mm}^2$. Die durchschnittlich erhaltene Gewebefläche der CB war signifikant größer im Vergleich zur GBF ($p = 0,0059$, Abbildung 23).⁽²⁾

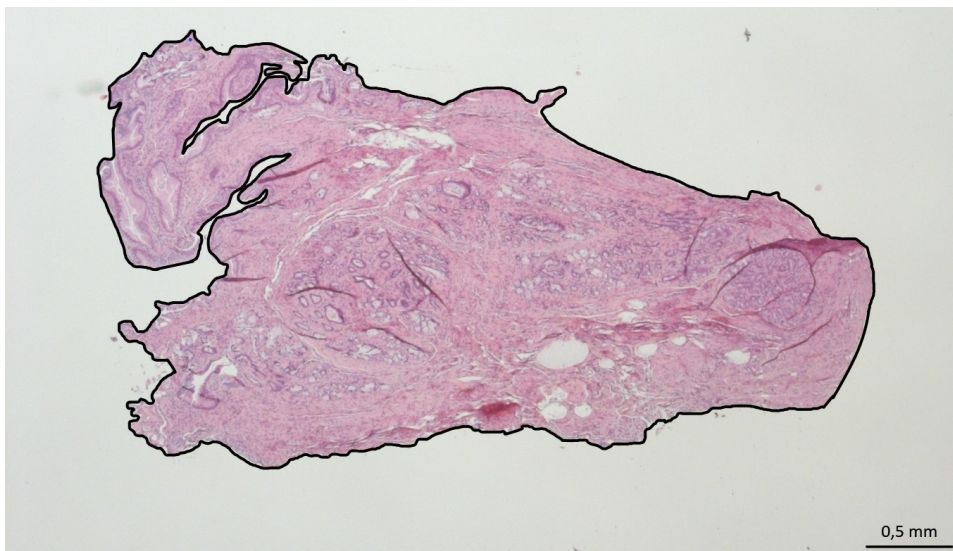


Abbildung 22: Beispiel der digitalen Umrandung des fixierten und abfotografierten Gewebes

(hier Gewebe mit Kryobiopsie erhalten) und des automatischen Berechnens der Oberfläche mit der Software Tool ZEN (blue edition)⁽¹⁾

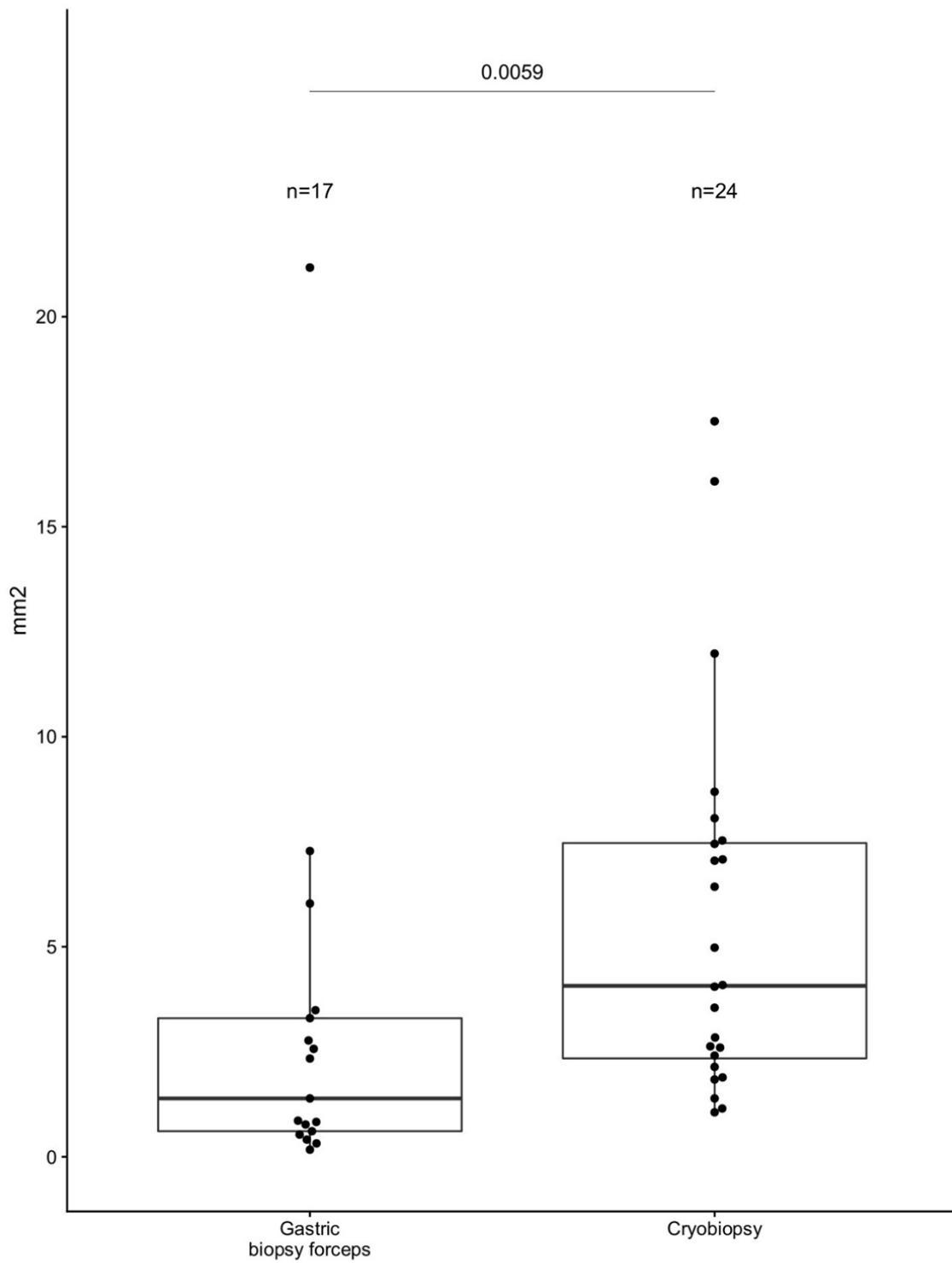


Abbildung 23: Streudiagramm/Verteilungsmuster der Größenausmessungen von Kryobiopsie und Standardbiopsiezange ⁽¹⁾

4. Diskussion

Die Unterscheidung benigner von malignen Strikturen im Gallengang stellt im klinischen Alltag eine große Herausforderung dar (Tanaka et al. 2018). Grund hierfür ist trotz verschiedenen eingesetzten Verfahrenstechniken zur Gewebegewinnung - als Standard werden die Bürstenzytologie und fluoroskopisch gesteuerte Zangenbiopsie während der ERCP genutzt - eine eingeschränkte Sensitivität der Diagnostik. Eine Kombination der Verfahrensmodalitäten auch unter Hinzunahme genetischer Diagnostik führt zu einer Verbesserung der Sensitivität (Navaneethan et al. 2015b, Nanda et al. 2015, Gonda et al. 2017, Bankov et al. 2018).

Neuere diagnostische Methoden wie die Cholangioskopie oder endosonographisch gesteuerte Feinnadelpunktion zeigen eine mäßige und in ausgewählten Studien gute diagnostische Sensitivität (Weilert et al. 2014, Kurihara et al. 2016, Navaneethan et al. 2015a). Dennoch konnte bislang keine Überlegenheit der direkten visuellen Biopsie der Cholangioskopie gegenüber der fluoroskopisch gesteuerten Biopsie gefunden werden (Walter et al. 2016).

Die zu erreichende Sensitivität mit Kombinationsverfahren oder mit Hilfe neuerer diagnostischer Methoden ist nicht zufriedenstellend. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine neue Gewebeentnahmetechnik, die CB, als mögliches Biopsieverfahren zur Verbesserung der diagnostischen Sensitivität im Bereich der Gallenwege untersucht. Es erfolgte die Beurteilung in Hinsicht auf Machbarkeit, Größe und Qualität im Vergleich zur herkömmlichen Zangenbiopsie. Die CB wird in der Pneumologie bereits im klinischen Alltag angewendet und Studien haben in diesem Bereich eine Überlegenheit gegenüber herkömmlichen diagnostischen Methoden mit Biopsiezange ergeben (Hetzl et al. 2012, Schumann et al. 2010a).

Tiermodell

In der makroskopischen Auswertung ergab sich für die Machbarkeit keine statistische Signifikanz zwischen CB und Zangenbiopsie ($p=0,682$). Allgemein zeigte sich bei beiden Verfahrenstechniken eine nicht zufriedenstellende Erfolgsquote bei der Gewebeentnahme. Eine Erklärung hierfür könnte die harte Oberfläche des Gallengangs mit ihrer festen Bindegewebebestruktur direkt unterhalb des Epithels sein.

Die Zangenbiopsie wurde zunächst mit einer herkömmlichen Cholangioskopiezange durchgeführt. Die Gewebeentnahme mit dieser Zange war jedoch nicht möglich (null Prozent Erfolgsquote), weshalb eine Umstellung auf eine Biopsiezange für den Gastrointestinaltrakt (GBF) erfolgen musste. Ein Grund für die frustrane Gewebeentnahme mit der CF und die bessere Erfolgsquote mit der GBF könnte die unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit der beiden Zangen sein. So wies die in dieser Arbeit genutzte CF eine geradlinige Kontur am Zangenkopf auf im Gegensatz zur Magenbiopsiezange mit ihrem gezackten Oberflächenrelief. Mit der CF war es somit schwieriger einen Defekt in der sehr derben Oberfläche des Gallengangs zu setzen. Im Gegensatz hierzu fiel es mit der GBF mit gezacktem Oberflächenrelief leichter, einen Defekt zu setzen und im Anschluss Gewebe zu erhalten. Weiterhin wurde als Biopsiezange eine Magenbiopsiezange verwendet, welche im Vergleich zur CF einen deutlich größeren Durchmesser aufweist.

Die histologische Bewertung im Tiermodell konnte wegen der kaum verwertbaren Proben nur sehr eingeschränkt erfolgen. Grund hierfür war das bereits degenerierte und nicht mehr beurteilbare Gewebe. Als Ursache kommen hier eine falsche Lagerung des erhaltenen Gewebes oder eine falsche Lösungszusammenstellung in Betracht. Auch der im Vorfeld längere Aufenthalt im Wasserbad (bis zu fünf Stunden) könnte eine Erklärung dafür sein, dass bereits ein Zerfall des Gewebes begonnen hatte. Hierdurch konnte an den angefertigten Schnitten keine adäquate Beurteilung der Qualität erfolgen. Diese Limitationen sind Grund für die darauffolgende Durchführung der humanen Explantat Studie.

Die Größenausmessung wurde anhand vier jeweils exemplarisch angelegter histologischer Schnitte pro Gewebeentnahmetechnik durchgeführt. Die mit der CB entnommenen Gewebeproben waren im Mittel mindestens um den Faktor vier größer als die gleichzeitig mittels Zangenbiopsie erhaltenen Gewebeproben. Die Ergebnisse decken sich mit einer aktuellen präklinischen Studie im Bereich der Urologie. Klein et al. konnten für die CB im Urogenitaltrakt nachweisen, dass im Vergleich zu herkömmlichen Biopsietechniken deutlich größere und qualitativ bessere Gewebeproben mit der CB erhalten werden können (Klein et al. 2022).

Als Limitation muss in dieser Arbeit die kleine Anzahl an einbezogenen Gewebeproben berücksichtigt werden. Die Untersuchungen im Tiermodell zeigten, dass die CB im Gallengang machbar ist und mit größeren erhaltenen Gewebeproben im Vergleich zur herkömmlichen Zangenbiopsie einhergeht. Die Erfolgsquote im nativen Gallengang war für beide Modalitäten gering. Auf Kombinationsverfahren musste bei zu großer subepithelialer Gewebeschädigung des Gallengangs verzichtet werden. Aus diesem Grund wurde für den humanen Teil der Studie die CB gegen die herkömmliche Zangenbiopsie untersucht.

Humaner Teil

Makroskopische Auswertung

Wegen oben genannter Limitationen in den Versuchen des Tiermodells (Beurteilung Qualität) erfolgte der Entschluss zur Durchführung von Versuchen am humanen ex-vivo Modell. Im humanen Teil der Studie wurden die CB und Zangenbiopsie an explantiertem Gallengangsgewebe miteinander verglichen. Die makroskopische Auswertung (erfolgreiche Biopsieversuche) zeigte eine signifikante Überlegenheit der CB gegenüber der CF. Dabei war eine sehr niedrige Rate erfolgreicher Biopsien mit der CF auffällig (20,7%). Dies hatte bereits im Tiermodell festgestellt werden können.

Dieses Ergebnis deckt sich mit klinischen Beobachtungen. Durch den kleinen Öffnungsdiameter der CF kann häufig nur eine geringe Menge an Gewebe gefasst werden. Die histologische Beschaffenheit des Gallengangs mit seinem straffen Bindegewebeanteil erschwert die Biopsie. ⁽²⁾ Sekine et al beschreiben

dieses bekannte Problem in einer aktuellen Arbeit in Bezug auf cholangioskopisch gewonnene Gewebeproben im Vergleich zur herkömmlichen Biopsie mittels ERCP. Dabei stellen die Autoren eine nicht ausreichende Quantität und Qualität der Gewebeproben mit der Cholangioskopiezange während der Cholangioskopie fest (Sekine et al. 2022).

Auf Grund der niedrigen Erfolgsrate der CF wurde auch im humanen Teil der Arbeit zusätzlich eine Magenbiopsiezange (GBF) verwendet. Mit ihrem größeren Öffnungsdiameter und dem gezackten Oberflächenrelief war die Erfolgsrate (69,7%) der Biopsien im Vergleich zur CF ($p=0,003$) und zur CB (wenn auch hier nicht statistisch signifikant $p=0,31$) deutlich höher. Dies lässt sich mit der einfacheren Defektsetzung durch das gezackte Oberflächenrelief der GBF im festen Bindegewebe des Gallenganges erklären. Dies war auch schon in den vorangehenden Tierversuchen zu beobachten. ⁽²⁾ Diese Erkenntnis zeigte sich ebenfalls bei der Untergruppe der Probanden mit pathologisch verändertem Gallengangsgewebe (entzündlich/Tumor). Auf Grund der hier anderen Oberflächenstruktur des Gallengangs mit nekrotischem/weicherem Epithel war es einfacher, Gewebe mit der Kryosonde (81,8%) oder der CF (50%) zu erhalten (GBF 55,5%).

Die bei der CB erhaltenen Gewebeproben waren von guter Qualität und Größe. Aus unserer Sicht können, im Gegensatz zu nativen Gallenwegen, im Bereich von pathologischen Veränderungen mit Hilfe der CB qualitativ und quantitativ sehr gute Biopsien erhalten werden. Da bei dieser Arbeit leider eine zu niedrige Fallzahl von Patienten mit pathologischem Gallengangsgewebe eingeschlossen wurde, sind die Ergebnisse rein deskriptiv und es fand sich keine statistisch nachweisbare Überlegenheit der CB gegenüber der Zangenbiopsie bezüglich der Machbarkeit bei pathologisch verändertem Gallengangsgewebe. ⁽²⁾

Größenauswertung

Im Vergleich zur Biopsiezange konnten in unserer Arbeit signifikant größere Gewebeproben mit der CB erhalten werden (durchschnittliche Größenfläche $5,6 \pm 4,5 \text{ mm}^2$, $p=0,0059$). Dennoch war die Größendifferenz nicht so ausgeprägt wie in vorangegangenen Studien im Bereich der Urologie und Pneumologie (Yarmus et al. 2016), (Klein et al. 2019), (Franke et al. 2016). Eine Erklärung hierfür könnte der im Vergleich zu einer Cholangioskopiezange oder Bronchoskopiezange bereits erwähnte größere Öffnungsdiameter der in dieser Arbeit verwendeten GBF sein. ⁽²⁾ Die verwendete GBF wird bei Gastroskopen genutzt und passt auf Grund ihres Durchmessers nicht durch den Arbeitskanal aktueller Cholangioskope.

Darüber hinaus wurden bei Anwendung der CB nur sehr niedrige Aktivierungszeiten verwendet. Der Grund hierfür war die noch ausstehende klinisch pathologische Beurteilung. Zudem sollte eine zu große Schädigung des Gewebes vor der weiteren Verarbeitung vermieden werden. Eine höhere Aktivierungszeit geht mit größeren Gewebeproben einher. Dies konnte bereits im Bereich der Pneumologie nachgewiesen werden (Franke et al. 2016). Vor allem bei Tumorgewebe/entzündlichem Gewebe, wahrscheinlich auf Grund seiner anderen Gewebestruktur, konnte problemlos und mit niedriger Aktivierungszeit mehr/adäquat Gewebe gewonnen werden. Die Änderung der Aktivierungszeit von einer Sekunde auf drei Sekunden zeigte hier eine deutliche Zunahme der Größe der Biopsie. Wie bereits erwähnt kann auf Grund der niedrigen Fallzahlen hier nur von Beobachtungen gesprochen werden. Andererseits könnte ein Nachteil zu großer Proben sein, dass diese nicht mehr durch den Arbeitskanal des Cholangioskops oder sogar des Duodenoskops passen würden und somit die Probeentnahme nur mit Entfernung des ganzen Untersuchungsgerätes vorgenommen werden könnte, so wie es bei bronchoskopischen Eingriffen der Fall ist (Hetzl et al 2020). ⁽²⁾ Außerdem könnte es bei einer zu hohen Aktivierungszeit während der Untersuchung zu einer Verletzung/ Perforation der Gallengangswege oder zu Blutungskomplikationen kommen. In der histologischen Beurteilung des erhaltenen Gewebes nach CB konnte zwar kein Hinweis auf eine tiefere, subepitheliale Schädigung gefunden werden, dennoch

können wir anhand des Studiendesigns (Ex-Vivo/Machbarkeitsstudie) keine Rückschlüsse auf Komplikationen während des diagnostischen Eingriffes ziehen. Dies muss in weiteren Studien geprüft werden. ⁽²⁾

Histologische Beurteilbarkeit und Repräsentativität

In Bezug auf die histologische Beurteilbarkeit und die Repräsentativität zeigte sich die CB gegenüber der GBF überlegen. Mit der CB konnten größere und damit qualitativ bessere Proben im Vergleich zur GBF gewonnen werden. Diese Ergebnisse befinden sich im Einklang mit vorherigen Arbeiten im Bereich der Pneumologie und Urologie.

Dabei zeigte sich die CB der Zangenbiopsie in Bezug auf die histologische Qualität und Beurteilbarkeit der gewonnenen Proben deutlich überlegen. Es konnten im Verhältnis qualitativ bessere Proben mit der CB erhalten werden (Klein et al. 2019), (Schumann et al. 2010a). Im Bereich der Pneumologie wird die CB bereits im klinischen Alltag genutzt. Hetzel et al. haben in einer groß angelegten multizentrischen Studie die diagnostische Überlegenheit der CB im Vergleich zu einer herkömmlichen Zangenbiopsie im Hinblick auf die diagnostische Aussagekraft bei Lungentumoren beschrieben. Dabei fand sich eine im Schnitt größere erhaltene Gewebeprobe mit der Kryobiopsietechnik im Vergleich zur herkömmlichen Zangenbiopsie und eine deutlich erhöhte Sensitivität in der Diagnosestellung bei kleinzelligen und nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (Hetzel et al. 2012).

Limitationen

Kritisch zu sehen ist die niedrige Fallzahl an Probanden in dieser Arbeit. Das Hauptziel der Studie war die Beurteilung der Machbarkeit und des Erfolges der CB im Gallengang. Es sollten erste Erfahrungen und Rückschlüsse in Bezug auf die bislang nicht durchgeführte CB im Gallengang erfolgen. Hierfür wurde eine Anzahl von 15 Fällen als ausreichend festgelegt, um Schlussfolgerungen in Bezug auf die generelle Machbarkeit ziehen zu können.

Weiterhin handelt es sich um eine unizentrische Studie. Dadurch fand sich nur eine begrenzte Fallzahl von Patienten, die eine Pankreatikoduodenektomie erhielten und somit untersuchbares Gewebe erhalten werden konnte. Multizentrische Studien wären wünschenswert. ⁽²⁾

Sämtliche Versuche wurden an einem längs eröffneten und manuell fixierten Gallengang durchgeführt, um ein standardisiertes Vorgehen für den Erhalt von Gewebe und die anschließende histopathologische Beurteilung zu ermöglichen. Daher wurde das Thema der Verbesserung der diagnostischen Sensitivität von unklaren Stenosen des Gallenganges in unserer Arbeit nicht gezielt adressiert. Hierzu sind weitere klinische Untersuchungen erforderlich. Dabei sollten die verschiedenen Biopsietechniken idealerweise während eines endoskopischen Eingriffes (Cholangioskopie oder fluoroskopische Untersuchung (ERCP)) miteinander verglichen werden. ⁽²⁾

Weiterhin findet sich als Limitation die Anzahl der Biopsien mit CF. Da letztlich nur drei Biopsien eines einzigen Patienten mit dieser Technik vollständig auszuwerten waren, musste diese Modalität/Biopsietechnik von den weiteren Auswertungen ausgeschlossen werden. ⁽²⁾

Mögliche Vorteile der Kryobiopsie gegenüber der Zangenbiopsie

Der Prototyp der Kryobiopsiesonde passt mit 1,1 mm Durchmesser in sämtliche Arbeitskanäle aktueller Cholangioskope und wurde im Anschluss an dieser Arbeit bereits in weiteren Untersuchungen getestet. Wir sehen einen Vorteil der Kryosonde im Vergleich zu herkömmlichen Biopsiezangen, da - wie auch vorangegangene Arbeiten gezeigt haben - die Sonde frontal und tangential mit

gleicher Wirksamkeit angewendet werden kann (Hetzel et al. 2012). Hieraus könnte eine erleichterte Anwendung bei verminderter Beweglichkeit/Flexibilität in kleineren Gallengängen während der Cholangioskopie/ERCP entstehen. ⁽²⁾

Schlussfolgerung

Diese erste systematische Machbarkeitsstudie zur CB in nativen und neoplastischen Läsionen der Gallenwege im Tiermodell und am humanen Explantat zeigt, dass die CB möglich ist und im Vergleich zur herkömmlichen Zangenbiopsie größere und qualitativ bessere Gewebeproben liefert. Dabei bestehen Einschränkungen im Bereich des nativen Gallengangs und observativ Stärken im Bereich neoplastischer Gewebeveränderungen. In Bezug auf die Abklärung unklarer Strikturen des Gallengangs und der früheren Diagnostik von Tumoren der Gallenwege sehen wir in der CB eine zukunftssträchtige Biopsietechnik, die eine Verbesserung der Diagnostik und Sensitivität ergeben kann. Hierzu sind weitere klinische Studien vor allem in Hinsicht auf die endoskopische Anwendung erforderlich.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Abklärung unklarer Stenosen/Strikturen der Gallenwege ist herausfordernd. Trotz unterschiedlicher Verfahrenstechniken in der Bildgebung und zur Gewebeentnahme findet sich eine eingeschränkte Sensitivität der Diagnostik. Eine Kombination der Verfahren zur Histologiegewinnung zeigt eine Verbesserung der Sensitivität. Dennoch kann häufig keine eindeutige Diagnose gestellt werden und somit erfolgt unter Umständen eine falsche Behandlung. Eine zuverlässigere Diagnostik mit besserer Sensitivität ist wünschenswert.

Fragestellung: Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Biopsietechnik, die Kryobiopsie (CB), auf Machbarkeit und Qualität im Bereich nativer Gallenwege im Tiermodell und nativer sowie neoplastischer Gallenwege im humanen ex-vivo Modell untersucht. Sie wurde mit herkömmlichen Biopsietechniken, der Zangenbiopsie, verglichen.

Methodik: Der erste Abschnitt der Arbeit bestand aus ex-vivo Versuchen im Tiermodell. Es erfolgten Gewebeentnahmen mit verschiedenen Techniken (inklusive Kombinationsverfahren wie Elevation mit Unterspritzung, HF-Chirurgie) am explantierten, mittels Schnittinzision offengelegten Gallengangsgewebe von Schweinen. Hierbei wurden die CB und die herkömmliche Zangenbiopsie in Bezug auf Machbarkeit, Qualität und Größe des erhaltenen Gewebes miteinander verglichen. Die Machbarkeit wurde mit erhaltenes Gewebe Ja/Nein definiert. Die Größenausmessung erfolgte durch Digitalisierung der histologischen Schnitte und die Auswertung mit einer speziellen Software.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit (humaner Teil) wurden Gewebeentnahmen an explantiertem, humanem Gallengangsgewebe (nativ/neoplastisch) mit CB oder Zangenbiopsie durchgeführt. Das Gewebe wurde, nach Aufklärung und Einverständnis, von 14 Patienten erhalten, bei denen eine Pankreatikoduodenektomie durchgeführt werden musste. Nach Eröffnung und Fixierung der Gallenwege im Explantat erfolgte die Gewebeentnahme mittels CB oder Zangenbiopsie und im Anschluss die Beurteilung der Machbarkeit (Gewebe erhalten Ja/Nein), Qualität (histologische Beurteilung und Repräsentativität) und Größe. Die Qualitätsbeur-

teilung und Repräsentativität wurde durch zwei erfahrene Histopathologen anhand eines speziellen Fragebogens und eines semiquantitativen Scores in aufsteigender Wertung (Likert-Skala 0-6) durchgeführt. Die Größenausmessung der histologischen Schnitte wurde nach deren Digitalisierung mit einer speziellen Software durchgeführt.

Ergebnisse: Die Ergebnisse im Tiermodell zeigten eine Machbarkeit der CB im Gallengang. Die Erfolgsquote im nativen Gallengang war für beide Modalitäten der Gewebeentnahme (CB /Zangenbiopsie) gering. In der Größenausmessung waren die mit CB erhaltenen Proben signifikant größer als die mit einer Biopsiezange gewonnenen Proben ($p=0,014$). Die Qualität der Proben (histologische Beurteilung) konnte auf Grund fehlender Verwertbarkeit (falsche Lagerung/ falsche Lösungszusammenstellung) nicht beurteilt werden. Auf Kombinationsverfahren wie mit Elevation durch Wasserunterspritzung oder HF-Chirurgie musste bei zu großer subepithelialer Gewebeschädigung des Gallengangs verzichtet werden. Aus diesem Grund wurde für den humanen Teil der Studie die CB gegen die herkömmliche Zangenbiopsie ohne Kombinationsverfahren untersucht.

Im humanen Teil der Studie zeigte sich die CB machbar im nativen und neoplastischen Gallengang. Im Vergleich zur Zangenbiopsie bestand keine statistische Überlegenheit bei der Erfolgsrate des erhaltenen Gewebes in der makroskopischen Auswertung. Die histologische Beurteilung zeigte eine überlegene Qualität der erhaltenen Biopsien ($p=0,016$) und eine bessere Repräsentativität der histologischen Schnitte ($p=0,027$) bei der CB. Die Größenausmessung ergab signifikant größere Gewebeproben durch CB im Vergleich zur Zangenbiopsie ($p=0,0059$).

Diskussion: Die diagnostische Sensitivität unklarer Strikturen der Gallenwege ist nicht zufriedenstellend. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine neue Gewebeentnahmetechnik, die CB, untersucht, welche in der Pneumologie bereits im klinischen Alltag eingesetzt wird und in zahlreichen Studien eine Überlegenheit gegenüber der Zangenbiopsie gezeigt hat.

Die Ergebnisse im Tiermodell ergaben eine Machbarkeit der CB mit größeren Proben im Vergleich zur Zangenbiopsie. Dennoch war die Erfolgsquote für

Zangenbiopsie und CB eingeschränkt, wohl bedingt durch die harte Oberfläche des Gallengangs mit ihrer festen Bindegewebestruktur direkt unterhalb des Epithels. Um eine ausreichende Vergleichbarkeit der Gewebeentahmetechniken zu erhalten, musste ein Wechsel der Biopsiezange (anstatt Cholangioskopiezange (CF) eine Magenbiopsiezange (GBF)) vorgenommen werden. Weiterhin konnte das erhaltene Gewebe nicht auf Qualität miteinander verglichen werden. Mögliche Ursachen hierfür waren eine falsche Lagerung des erhaltenen Gewebes, eine falsche Lösungszusammenstellung und der im Vorfeld längere Aufenthalt im Wasserbad. Bei der Größenauswertung konnte nur ein kleiner Anteil der Proben verwendet werden.

Im humanen Teil der Studie zeigte sich die CB in nativen und pathologischen Gallenwegen machbar. Im Bereich nativer Gallenwege fand sich wie in den Tierversuchen wohl auf Grund des festen Oberflächenepithels und der darunter liegenden Bindegewebeebenen für beide Modalitäten (CB /Zangenbiopsie) eine niedrige Erfolgsquote. Auf Grund der niedrigen Erfolgsrate der CF wurde ebenfalls zusätzlich eine Magenbiopsiezange (GBF) verwendet. Im Vergleich zur Biopsiezange konnten in unserer Arbeit signifikant größere Gewebeproben mit der CB erhalten werden. Dennoch war die Größendifferenz nicht so ausgeprägt wie in vorangegangenen Studien. Eine Erklärung hierfür könnte der bereits erwähnte im Vergleich zu einer Cholangioskopiezange oder einer Bronchoskopiezange größere Öffnungsdiameter der in dieser Arbeit verwendeten GBF sein. Darüber hinaus wurden bei Anwendung der CB nur sehr niedrige Aktivierungszeiten verwendet. Eine höhere Aktivierungszeit kann mit größeren Gewebeproben einhergehen, aber unter Umständen auch einschränkend bei der Entnahme des Gewebes beispielsweise durch ein Cholangioskop sein. Außerdem könnte bei längeren Aktivierungszeiten ein erhöhtes Gallengangspforationsrisiko bestehen.

In Bezug auf die histologische Beurteilbarkeit und die Repräsentativität zeigte sich die CB gegenüber der GBF überlegen. Dies war speziell bei pathologisch verändertem Gallengangsgewebe der Fall. Auf Grund der geringen Fallzahl an pathologisch verändertem Gewebe kann dies aber nur als Beobachtung qualifiziert werden. Mit der CB konnten größere und damit qualitativ bessere

Proben im Vergleich zur GBF gewonnen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit vorangegangenen Arbeiten im Bereich der Pneumologie und Urologie. Kritisch zu sehen ist die niedrige Fallzahl an Probanden im humanen Teil dieser Arbeit bedingt dadurch, dass die Studie unizentrisch durchgeführt wurde. Weiterhin wurden sämtliche Versuche an einem längs eröffneten und manuell fixierten Gallengang durchgeführt, um ein standardisiertes Vorgehen für den Erhalt von Gewebe und die anschließende histopathologische Beurteilung zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurde das Thema der Verbesserung der diagnostischen Sensitivität von unklaren Stenosen des Gallenganges in unserer Arbeit nicht gezielt adressiert. Zusätzlich musste im humanen Teil der Studie auf Grund der schlechten Erfolgsrate die Modalität/Biopsietechnik mit CF ausgeschlossen werden.

Wir kommen zu folgender Schlussfolgerung: Die CB in den Gallenwegen ist machbar und geht mit quantitativ/qualitativ besseren Proben einher als die Zangenbiopsie. Limitationen bestehen im Bereich der nativen Gallenwege. Es sind weitere Arbeiten in Bezug auf die Machbarkeit während des endoskopischen Eingriffes erforderlich. Vorteile der CB in der Anwendung sehen wir durch die Möglichkeit, die Sonde frontal und tangential zu nutzen. Auf Grund des kleinen Durchmessers der Sonde passt diese zudem in jedes Cholangioskop und ist damit entsprechend nutzbar.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit sehen wir die CB auch für die Gallenwege als zukunftssträchtige Gewebeentnahmemethode und gehen davon aus, dass durch dieses Biopsieverfahren eine Verbesserung der Sensitivität und der Diagnostik der Gallenwege ermöglicht werden kann. Hierzu sind weitere klinische Studien erforderlich.

6. Literaturverzeichnis

- Albert, J. G., Friedrich-Rust, M., Elhendawy, M., Trojan, J., Zeuzem, S., & Sarrazin, C. (2011). Peroral cholangioscopy for diagnosis and therapy of biliary tract disease using an ultra-slim gastroscope. *Endoscopy*, 43(11), 1004-1009.
- Albert, Jörg Gerhard; Waidmann, Oliver; Welzel, Tania Mara (2015): Das Gallengangskarzinom: Von neuen Erkenntnissen der Epidemiologie zur Früherkennung. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 140 (19), S. 1431–1434. DOI: 10.1055/s-0041-105627.
- Altman, Ashley; Zangan, Steven M. (2016): Benign Biliary Strictures. In: *Seminars in interventional radiology* 33 (4), S. 297–306. DOI: 10.1055/s-0036-1592325.
- Al-Taie, Oliver H.; Bauer, Yildiz; Dietrich, Christoph G.; Fischbach, Wolfgang (2012): Efficacy of submucosal injection of different solutions inclusive blood components on mucosa elevation for endoscopic resection. In: *Clinical and experimental gastroenterology* 5, S. 43–48. DOI: 10.2147/CEG.S29704.
- Ayoub, Fares; Yang, Dennis; Draganov, Peter V. (2018): Cholangioscopy in the digital era. In: *Translational gastroenterology and hepatology* 3, S. 82. DOI: 10.21037/tgh.2018.10.08.
- Babiak, Alexander; Hetzel, Jürgen; Krishna, Ganesh; Fritz, Peter; Moeller, Peter; Balli, Tahsin; Hetzel, Martin (2009): Transbronchial cryobiopsy: a new tool for lung biopsies. In: *Respiration; international review of thoracic diseases* 78 (2), S. 203–208. DOI: 10.1159/000203987.
- Bankov, Katrin; Döring, Claudia; Schneider, Markus; Hartmann, Sylvia; Winkelmann, Ria; Albert, Joerg G. et al. (2018): Sequencing of intraductal biopsies is feasible and potentially impacts clinical management of patients with indeterminate biliary stricture and cholangiocarcinoma. In: *Clinical and translational gastroenterology* 9 (4), S. 151. DOI: 10.1038/s41424-018-0015-6.
- Bellis, Mario de; Sherman, Stuart; Fogel, Evan L.; Cramer, Harvey; Chappo, John; McHenry, Lee et al. (2002a): Tissue sampling at ERCP in suspected malignant biliary strictures (Part 1). In: *Gastrointestinal endoscopy* 56 (4), S. 552–561. DOI: 10.1067/mge.2002.128132.
- Bellis, Mario de; Sherman, Stuart; Fogel, Evan L.; Cramer, Harvey; Chappo, John; McHenry, Lee et al. (2002b): Tissue sampling at ERCP in suspected malignant biliary strictures (Part 2). In: *Gastrointestinal endoscopy* 56 (5), S. 720–730. DOI: 10.1067/mge.2002.129219.
- Berci, G. (1977). General surgery: endoscopic exploration (choledochoscopy) of the biliary system at operation. *Western Journal of Medicine*, 126(5), 388.
- Beyna, Torsten; Farnik, Harald; Sarrazin, Christoph; Gerges, Christian; Neuhaus, Horst; Albert, Jörg G. (2016): Direct retrograde cholangioscopy with a new prototype double-bending cholangioscope. In: *Endoscopy* 48 (10), S. 929–933. DOI: 10.1055/s-0042-110395.

- Blechacz, Boris (2017): Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. In: *Gut and liver* 11 (1), S. 13–26. DOI: 10.5009/gnl15568.
- Blechacz, Boris; Gores, Gregory J. (2008): Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (1), S. 308–321. DOI: 10.1002/hep.22310.
- Blechacz, Boris; Komuta, Mina; Roskams, Tania; Gores, Gregory J. (2011): Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 8 (9), S. 512–522. DOI: 10.1038/nrgastro.2011.131.
- Bonniot, Jean-Pierre A.; Homasson, Jean-Paul D.; Roden, Serge L.; Angebault, Marc L.; Renault, Pierre C. (1989): Pleural and Lung Cryobiopsies during Thoracoscopy. In: *Chest* 95 (3), S. 492–493. DOI: 10.1378/chest.95.3.492.
- Chandarana, Hersh; Doshi, Ankur M.; Shanbhogue, Alampady; Babb, James S.; Bruno, Mary T.; Zhao, Tiejun et al. (2016): Three-dimensional MR Cholangiopancreatography in a Breath Hold with Sparsity-based Reconstruction of Highly Undersampled Data. In: *Radiology* 280 (2), S. 585–594. DOI: 10.1148/radiol.2016151935.
- Costa, Mariana; Canena, Jorge; Mascarenhas-Lemos, Luís; Loureiro, Rafaela; Silva, Mário; Carvalho, Diana et al. (2018): Outcomes of Different Methods for Analysis of Biliary Brush Cytology and of Factors Associated with Positive Diagnosis in an Age-Dependent Retrospective Review. In: *GE Portuguese journal of gastroenterology* 26 (1), S. 5–13. DOI: 10.1159/000487153.
- Dudley, Jonathan C.; Zheng, Zongli; McDonald, Thomas; Le, Long P.; Dias-Santagata, Dora; Borger, Darrell et al. (2016): Next-Generation Sequencing and Fluorescence in Situ Hybridization Have Comparable Performance Characteristics in the Analysis of Pancreaticobiliary Brushings for Malignancy. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 18 (1), S. 124–130. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2015.08.002.
- Franke, Karl-Josef; Linzenbold, Walter; Nuessle, Daniela; Enderle, Markus; Boesmueller, Hans; Nilius, Georg; Hetzel, Jürgen (2016): A New Tool for Transbronchial Cryobiopsies in the Lung: An Experimental Feasibility ex vivo Study. In: *Respiration; international review of thoracic diseases* 91 (3), S. 228–234. DOI: 10.1159/000443990.
- Gonda, Tamas A.; Viterbo, Domenico; Gausman, Valerie; Kipp, Claudine; Sethi, Amrita; Poneros, John M. et al. (2017): Mutation Profile and Fluorescence In Situ Hybridization Analyses Increase Detection of Malignancies in Biliary Strictures. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 15 (6), 913-919.e1. DOI: 10.1016/j.cgh.2016.12.013.
- Hahm; G. K., Niemann; T.H., Lucas; J.G., & Frankel, W.L. (2001) The value of second opinion in gastrointestinal and liver pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 125(6), 736-739.
- Harewood, Gavin C. (2008): Endoscopic tissue diagnosis of cholangiocarcinoma. In: *Current opinion in gastroenterology* 24 (5), S. 627–630. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32830bf7e1.

- Hartman, Douglas J.; Slivka, Adam; Giusto, Deborah A.; Krasinskas, Alyssa M. (2012): Tissue yield and diagnostic efficacy of fluoroscopic and cholangioscopic techniques to assess indeterminate biliary strictures. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 10 (9), S. 1042–1046. DOI: 10.1016/j.cgh.2012.05.025.
- Heimbach, Julie K.; Sanchez, William; Rosen, Charles B.; Gores, Gregory J. (2011): Trans-peritoneal fine needle aspiration biopsy of hilar cholangiocarcinoma is associated with disease dissemination. In: *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 13 (5), S. 356–360. DOI: 10.1111/j.1477-2574.2011.00298.x.
- Hetzel, Jurgen; Hetzel, Martin; Hasel, Cornelia; Moeller, Peter; Babiak, Alexander (2008): Old meets modern: the use of traditional cryoprobes in the age of molecular biology. In: *Respiration; international review of thoracic diseases* 76 (2), S. 193–197. DOI: 10.1159/000135934.
- Hetzel, J.; Eberhardt, R.; Herth, F. J. F.; Petermann, C.; Reichle, G.; Freitag, L. et al. (2012): Cryobiopsy increases the diagnostic yield of endobronchial biopsy: a multicentre trial. In: *The European respiratory journal* 39 (3), S. 685–690. DOI: 10.1183/09031936.00033011.
- Hetzel, Martin; Hetzel, Juergen; Schumann, Christian; Marx, Nikolaus; Babiak, Alexander (2004): Cryorecanalization: a new approach for the immediate management of acute airway obstruction. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 127 (5), S. 1427–1431. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2003.12.032.
- Hetzel · Linzenbold · Boesmueller · Enderle · Poletti: Evaluation of Efficacy of a New Cryoprobe for Transbronchial Cryobiopsy: A Randomized, Controlled in vivo Animal Study
Respiration 2020;99:248–256 2020.
- Jailwala, Jeegar; Fogel, Evan L.; Sherman, Stuart; Gottlieb, Klaus; Flueckiger, Joyce; Bucksot, Lois G.; Lehman, Glen A. (2000): Triple-tissue sampling at ERCP in malignant biliary obstruction. In: *Gastrointestinal endoscopy* 51 (4), S. 383–390. DOI: 10.1016/S0016-5107(00)70435-4.
- Jhaveri, Kartik S.; Hosseini-Nik, Hooman (2015): MRI of cholangiocarcinoma. In: *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 42 (5), S. 1165–1179. DOI: 10.1002/jmri.24810.
- Joo, Ijin; Lee, Jeong Min; Yoon, Jeong Hee (2018): Imaging Diagnosis of Intrahepatic and Perihilar Cholangiocarcinoma: Recent Advances and Challenges. In: *Radiology* 288 (1), S. 7–13. DOI: 10.1148/radiol.2018171187.
- Joshi, Anagha; Rajpal, Kishore; Kakadiya, Ketan; Bansal, Ashank (2014): Role of CT and MRCP in Evaluation of Biliary Tract Obstruction. In: *Curr Radiol Rep* 2 (11), S. 66. DOI: 10.1007/s40134-014-0072-x.

- Kanno, Yoshihide; Koshita, Shinsuke; Ogawa, Takahisa; Masu, Kaori; Kusunose, Hiroaki; Sakai, Toshitaka et al. (2018): Peroral cholangioscopy by SpyGlass DS versus CHF-B260 for evaluation of the lateral spread of extrahepatic cholangiocarcinoma. In: *Endoscopy international open* 6 (11), E1349-E1354. DOI: 10.1055/a-0743-5283.
- Kipp, Benjamin R.; Stadheim, Linda M.; Halling, Shari A.; Pochron, Nicole L.; Harmsen, Scott; Nagorney, David M. et al. (2004): A comparison of routine cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of malignant bile duct strictures. In: *The American journal of gastroenterology* 99 (9), S. 1675–1681. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2004.30281.x.
- Klein, Jan-Thorsten; Berger, Franziska; Linzenbold, Walter; Jäger, Luise; Enderle, Markus D.; Bösmüller, Hans et al. (2019): Cryobiopsy in the Upper Urinary Tract: Preclinical Evaluation of a Novel Device. In: *Urology* 123, S. 273–279. DOI: 10.1016/j.urology.2018.10.003.
- Klein, Jan T.; John, Axel; Bohnert, Lars; Enderle, Markus D.; Linzenbold, Walter; Bolenz, Christian (2022): Improving the Quality of Human Upper Urinary Tract Specimens by Cryobiopsy. In: *Frontiers in oncology* 12, S. 810367. DOI: 10.3389/fonc.2022.810367.
- Kurihara, Toshio; Yasuda, Ichiro; Isayama, Hiroyuki; Tsuyuguchi, Toshio; Yamaguchi, Taketo; Kawabe, Ken et al. (2016): Diagnostic and therapeutic single-operator cholangiopancreatography in biliopancreatic diseases: Prospective multicenter study in Japan. In: *World journal of gastroenterology* 22 (5), S. 1891–1901. DOI: 10.3748/wjg.v22.i5.1891.
- Kushnir, Vladimir M.; Mullady, Daniel K.; Das, Koushik; Lang, Gabriel; Hollander, Thomas G.; Murad, Faris M. et al. (2018): The Diagnostic Yield of Malignancy Comparing Cytology, FISH, and Molecular Analysis of Cell Free Cytology Brush Supernatant in Patients With Biliary Strictures Undergoing Endoscopic Retrograde Cholangiography (ERC): A Prospective Study. In: *Journal of clinical gastroenterology*. DOI: 10.1097/MCG.0000000000001118.
- Lee, Seung June; Lee, Yoon Suk; Lee, Min Geun; Lee, Sang Hyub; Shin, Eun; Hwang, Jin-Hyeok (2014): Triple-tissue sampling during endoscopic retrograde cholangiopancreatography increases the overall diagnostic sensitivity for cholangiocarcinoma. In: *Gut and liver* 8 (6), S. 669–673. DOI: 10.5009/gnl13292.
- Lee, Yun Nah; Moon, Jong Ho; Choi, Hyun Jong; Kim, Hee Kyung; Lee, Hyun Woo; Lee, Tae Hoon et al. (2019): Tissue acquisition for diagnosis of biliary strictures using peroral cholangioscopy or endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. In: *Endoscopy* 51 (1), S. 50–59. DOI: 10.1055/a-0645-1395.

- L E Hann; K V Greatrex; A M Bach; Y Fong; and L H Blumgart: Cholangiocarcinoma at the hepatic hilus: sonographic findings *American Journal of Roentgenology*. 1997; 168: 985-989. DOI: 10.2214/ajr.168.4.9124155
- Logrono, Roberto; Daniel F. Kurtycz; Claudia P. Molina; Vipul A. Trivedi; Jick Y. Wong; and Kevin P (2000). Analysis of false-negative diagnoses on endoscopic brush cytology of biliary and pancreatic duct strictures: The experience at 2 university hospitals. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 124(3), 387-392.
- M Tillich; H J Mischinger; K H Preisegger; H Rabl; and D H Szolar: Multiphasic helical CT in diagnosis and staging of hilar cholangiocarcinoma. *American Journal of Roentgenology*. 1998;171: 651-658. DOI: 10.2214/ajr.171.3.9725291
- Ma, Michael Xiang; Jayasekeran, Vanoo; Chong, Andre K. (2019): Benign biliary strictures: prevalence, impact, and management strategies. In: *Clinical and experimental gastroenterology* 12, S. 83–92. DOI: 10.2147/CEG.S165016.
- Manfredi, R.; Masselli, G.; Maresca, G.; Brizi, M. G.; Vecchioli, A.; Marano, P. (2003): MR imaging and MRCP of hilar cholangiocarcinoma. In: *Abdominal imaging* 28 (3), S. 319–325. DOI: 10.1007/s00261-002-0047-x.
- Moura, Diogo Turiani Hourneaux de; Moura, Eduardo Guimarães Hourneaux De; Bernardo, Wanderlei Marques; Moura, Eduardo Turiani Hourneaux de; Baraca, Felipe I.; Kondo, André et al. (2018): Endoscopic retrograde cholangiopancreatography versus endoscopic ultrasound for tissue diagnosis of malignant biliary stricture: Systematic review and meta-analysis. In: *Endoscopic ultrasound* 7 (1), S. 10–19. DOI: 10.4103/2303-9027.193597.
- Mukewar, Saurabh; Carr-Locke, David (2019): Advances in Endoscopic Imaging of the Biliary Tree. In: *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* 29 (2), S. 187–204. DOI: 10.1016/j.giec.2018.12.007.
- Nanda, Arjun; Brown, Jason M.; Berger, Stephen H.; Lewis, Melinda M.; Barr Fritcher, Emily G.; Gores, Gregory J. et al. (2015): Triple modality testing by endoscopic retrograde cholangiopancreatography for the diagnosis of cholangiocarcinoma. In: *Therapeutic advances in gastroenterology* 8 (2), S. 56–65. DOI: 10.1177/1756283X14564674.
- Navaneethan, Udayakumar; Hasan, Muhammad K.; Kommaraju, Kiran; Zhu, Xiang; Hebert-Magee, Shantel; Hawes, Robert H. et al. (2016): Digital, single-operator cholangiopancreatography in the diagnosis and management of pancreatobiliary disorders: a multicenter clinical experience (with video). In: *Gastrointestinal endoscopy* 84 (4), S. 649–655. DOI: 10.1016/j.gie.2016.03.789.
- Navaneethan, Udayakumar; Hasan, Muhammad K.; Lourdasamy, Vennisvasanth; Njei, Basile; Varadarajulu, Shyam; Hawes, Robert H. (2015a): Single-operator cholangioscopy and targeted biopsies in the diagnosis of indeterminate biliary strictures: a systematic review. In: *Gastrointestinal endoscopy* 82 (4), 608-14.e2. DOI: 10.1016/j.gie.2015.04.030.

- Navaneethan, Udayakumar; Njei, Basile; Lourdusamy, Vennisvasanth; Konjeti, Rajesh; Vargo, John J.; Parsi, Mansour A. (2015b): Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. In: *Gastrointestinal endoscopy* 81 (1), S. 168–176. DOI: 10.1016/j.gie.2014.09.017.
- Novikov, Aleksey; Kowalski, Thomas E.; Loren, David E. (2019): Practical Management of Indeterminate Biliary Strictures. In: *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* 29 (2), S. 205–214. DOI: 10.1016/j.giec.2018.12.003.
- Park, Ji Young; Jeon, Tae Joo (2019): Factors Associated with Malignant Biliary Strictures in Patients with Atypical or Suspicious Cells on Brush Cytology. In: *Clinical endoscopy*. DOI: 10.5946/ce.2018.105.
- Renshaw, A. A., Madge, R., Jiroutek, M., & Granter, S.R. (1998). Bile Duct Brushing Cytology: Statistical Analysis of Proposed Diagnostic Criteria. *American journal of clinical pathology*, 110(5), 635-640.
- Rösch, Thomas; Meining, Alexander; Frühmorgen, Silke; Zillinger, Christian; Schusdziarra, Volker; Hellerhoff, Karin et al. (2002): A prospective comparison of the diagnostic accuracy of ERCP, MRCP, CT, and EUS in biliary strictures. In: *Gastrointestinal endoscopy* 55 (7), S. 870–876. DOI: 10.1067/mge.2002.124206.
- Sadeghi, Anahita; Mohamadnejad, Mehdi; Islami, Farhad; Keshtkar, Abbas; Biglari, Mohammad; Malekzadeh, Reza; Eloubeidi, Mohamad A. (2016): Diagnostic yield of EUS-guided FNA for malignant biliary stricture: a systematic review and meta-analysis. In: *Gastrointestinal endoscopy* 83 (2), 290-8.e1. DOI: 10.1016/j.gie.2015.09.024.
- Schumann, Christian; Hetzel, Jürgen; Babiak, Alexander J.; Merk, Tobias; Wibmer, Thomas; Möller, Peter et al. (2010a): Cryoprobe biopsy increases the diagnostic yield in endobronchial tumor lesions. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 140 (2), S. 417–421. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2009.12.028.
- Schumann, Christian; Kropf, Cornelia; Rüdiger, Stefan; Wibmer, Thomas; Stoiber, Kathrin M.; Lepper, Philipp M. (2010b): Removal of an aspirated foreign body with a flexible cryoprobe. In: *Respiratory care* 55 (8), S. 1097–1099.
- Sekine, Katsunori; Yasuda, Ichiro; Doi, Shinpei; Kuniyoshi, Noriyuki; Tsujikawa, Takayuki; Takano, Yuichi et al. (2022): Peroral Cholangioscopy-Guided Targeted Biopsy versus Conventional Endoscopic Transpapillary Forceps Biopsy for Biliary Stricture with Suspected Bile Duct Cancer. In: *JCM* 11 (2), S. 289. DOI: 10.3390/jcm11020289.
- Sethi, Amrita; Chen, Yang K.; Austin, Gregory L.; Brown, William R.; Brauer, Brian C.; Fukami, Norio N. et al. (2011): ERCP with cholangiopancreatography may be associated with higher rates of complications than ERCP alone: a single-center experience. In: *Gastrointestinal endoscopy* 73 (2), S. 251–256. DOI: 10.1016/j.gie.2010.08.058.
- Shah, Raj J.; Langer, Daniel A.; Antillon, Mainor R.; Chen, Yang K. (2006): Cholangioscopy and Cholangioscopic Forceps Biopsy in Patients With Indeterminate Pancreaticobiliary Pathology. In: *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 4 (2), S. 219–225. DOI: 10.1016/S1542-3565(05)00979-1.

- Shanbhogue, Alampady Krishna Prasad; Tirumani, Sree Harsha; Prasad, Srinivasa R.; Fasih, Najla; McInnes, Matthew (2011): Benign biliary strictures: a current comprehensive clinical and imaging review. In: *AJR. American journal of roentgenology* 197 (2), W295-306. DOI: 10.2214/AJR.10.6002.
- Singhi, Aatur D.; Nikiforova, Marina N.; Chennat, Jennifer; Papachristou, Georgios I.; Khalid, Asif; Rabinovitz, Mordechai et al. (2019): Integrating next-generation sequencing to endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP)-obtained biliary specimens improves the detection and management of patients with malignant bile duct strictures. In: *Gut*. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-317817.
- Tabibian, James H.; Visrodia, Kavel H.; Levy, Michael J.; Gostout, Christopher J. (2015): Advanced endoscopic imaging of indeterminate biliary strictures. In: *World journal of gastrointestinal endoscopy* 7 (18), S. 1268–1278. DOI: 10.4253/wjge.v7.i18.1268.
- Tanaka, Hiroki; Matsusaki, Shimpei; Baba, Youichirou; Isono, Yoshiaki; Sase, Tomohiro; Okano, Hiroshi et al. (2018): Usefulness of Endoscopic Transpapillary Tissue Sampling for Malignant Biliary Strictures and Predictive Factors of Diagnostic Accuracy. In: *Clinical endoscopy* 51 (2), S. 174–180. DOI: 10.5946/ce.2017.082.
- Thaker, Adarsh M.; Muthusamy, V. Raman (2017): The role and utility of cholangioscopy for diagnosing indeterminate biliary strictures. In: *Gastrointestinal Intervention* 6 (1), S. 2–8. DOI: 10.18528/gii160035.
- Troy, Lauren K.; Grainge, Christopher; Corte, Tamera J.; Williamson, Jonathan P.; Vallely, Michael P.; Cooper, Wendy A. et al. (2020): Diagnostic accuracy of transbronchial lung cryobiopsy for interstitial lung disease diagnosis (COLDICE): a prospective, comparative study. In: *The Lancet Respiratory Medicine* 8 (2), S. 171–181. DOI: 10.1016/S2213-2600(19)30342-X.
- van Beers, B. E. (2008): Diagnosis of cholangiocarcinoma. In: *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 10 (2), S. 87–93. DOI: 10.1080/13651820801992716.
- Varadarajulu, S.; Fraig, M.; Schmulewitz, N.; Roberts, S.; Wildi, S.; Hawes, R. H. et al. (2004): Comparison of EUS-guided 19-gauge Trucut needle biopsy with EUS-guided fine-needle aspiration. In: *Endoscopy* 36 (5), S. 397–401. DOI: 10.1055/s-2004-814316.
- Vilgrain, V. (2008): Staging cholangiocarcinoma by imaging studies. In: *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 10 (2), S. 106–109. DOI: 10.1080/13651820801992617.
- Walter, D., Hartmann, S., Herrmann, E., Peveling-Oberhag, J., Bechstein, W. O., Zeuzem, S., ... & Albert, J. G. (2017). Eosinophilic cholangitis is a potentially underdiagnosed etiology in indeterminate biliary stricture. *World journal of gastroenterology*, 23(6), 1044.

- Walter, Dirk; Peveling-Oberhag, Jan; Schulze, Falko; Bon, Dimitra; Zeuzem, Stefan; Friedrich-Rust, Mireen; Albert, Jörg G. (2016): Intraductal biopsies in indeterminate biliary stricture: Evaluation of histopathological criteria in fluoroscopy- vs. cholangioscopy guided technique. In: *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 48 (7), S. 765–770. DOI: 10.1016/j.dld.2016.03.013.
- Weber, Andreas; Schmid, Roland M.; Prinz, Christian (2008): Diagnostic approaches for cholangiocarcinoma. In: *WJG* 14 (26), S. 4131. DOI: 10.3748/wjg.14.4131.
- Weilert, Frank; Bhat, Yasser M.; Binmoeller, Kenneth F.; Kane, Steve; Jaffee, Ian M.; Shaw, Richard E. et al. (2014): EUS-FNA is superior to ERCP-based tissue sampling in suspected malignant biliary obstruction: results of a prospective, single-blind, comparative study. In: *Gastrointestinal endoscopy* 80 (1), S. 97–104. DOI: 10.1016/j.gie.2013.12.031.
- Wirsing, L., Linzenbold, W., Jaeger, S. U., Stahl, P., Ott, G., Leibold, T., ... & Peveling-Oberhag, J. (2022). A new tool for bile duct tissue sampling: ex vivo clinical evaluation of intraductal cryobiopsy for cholangioscopy. *Endoscopy International Open*, 10(06), E809-E814.
- Yarmus, Lonny B.; Semaan, Roy W.; Arias, Sixto A.; Feller-Kopman, David; Ortiz, Ricardo; Bösmüller, Hans et al. (2016): A Randomized Controlled Trial of a Novel Sheath Cryoprobe for Bronchoscopic Lung Biopsy in a Porcine Model. In: *Chest* 150 (2), S. 329–336. DOI: 10.1016/j.chest.2016.01.018.
- Yeh, Benjamin M.; Liu, Peter S.; Soto, Jorge A.; Corvera, Carlos A.; Hussain, Hero K. (2009): MR imaging and CT of the biliary tract. In: *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 29 (6), S. 1669–1688. DOI: 10.1148/rg.296095514.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der gastroenterologischen Abteilung des Robert-Bosch-Krankenhauses unter Betreuung von Professor Dr. med. Jörg Albert durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Professor Albert (Leiter der Abteilung für Gastroenterologie, Robert-Bosch-Krankenhaus) und mich sowie in Zusammenarbeit mit Professor Dr. med. German Ott (Leiter des Instituts für Pathologie, Robert-Bosch-Krankenhaus), Professor Dr. med. Matthias Schwab (Leiter des Instituts für klinische Pharmakologie, Robert-Bosch-Krankenhaus), Professor Dr. med. Markus Enderle (Leitung der Forschungsabteilung ERBE Elektromedizin Tübingen) und Dr. med. Tobias Leibold (Leitender Oberarzt der Abteilung für Viszeralchirurgie, Robert-Bosch-Krankenhaus).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder und des Forschungsteams der Firma ERBE (Dr. rer. nat. Walter Linzenbold) von mir eigenständig und in Zusammenarbeit mit der Forschungsabteilung der Firma ERBE sowie dem Institut für Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses durchgeführt.

Die histologische Auswertung und Beurteilung der Schnitte anhand des Fragebogens erfolgte durch PD Dr. med. Phillip Stahl und Dr. med. Wolfgang Tränkenschuh (Oberärzte des Instituts für Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses).

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig und nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Walter Linzenbold (ERBE Elektromedizin), Dr.med. Simon Jäger (Institut für klinische Pharmakologie Robert-Bosch-Krankenhaus) und PD Dr. med. Jan Peveling-Oberhag (Oberarzt der Abteilung für Gastroenterologie Robert-Bosch-Krankenhaus).

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Ludwigsburg, den 29.01.2024

8. Veröffentlichungen

Der humane Teil der vorliegenden Dissertationsschrift wurde bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht: Wirsing, Lukas, et al. "A new tool for bile duct tissue sampling: ex vivo clinical evaluation of intraductal cryobiopsy for cholangioscopy." *Endoscopy International Open* 10.06 (2022): E809-E814. Der Autor der Dissertation ist Erstautor der englischsprachigen Publikation. Er war bei sämtlichen Schritten der Veröffentlichung involviert und federführend beteiligt. Das Einverständnis zur Nutzung der Texte und Abbildungen des veröffentlichenden Verlages liegt vor. Ebenfalls liegt das Einverständnis der Co-Autoren vor. Bereits veröffentlichte Abbildungen sind in der Dissertation mit ⁽¹⁾ gekennzeichnet. Ergebnisse und Inhalte aus der Veröffentlichung sind der Einfachheit halber mit ⁽²⁾ gekennzeichnet.

9. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Unterstützern bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben. Hervorzuheben ist hier zuallererst Herr Professor Dr. med. Jörg Albert, als Initiator der Studie und verlässlicher Ansprechpartner/Berater bei sämtlichen Fragen und Problemen. Weiterhin möchte ich Herr Dr. rer. nat. Walter Linzenbold für die technische und fachliche Unterstützung danken, sowie Herr PD Dr. med. Phillip Stahl für das Mithelfen und Observieren bei der Durchführung der humanen Versuche. Herr PD Dr. med. Jan Peveling-Oberhag und Herr Dr. med. Simon Jäger für die Beratung im Bereich Statistik und der englischen Veröffentlichung.

Simon Maier möchte ich danken für seine Computerexpertise.

Mein Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die aufmunternden Worte und dass sie mich stets unterstützt haben. Ein großes Dankeschön geht an meine Frau Clara Wirsing für ihre Geduld und ihre fachliche Expertise. Ich liebe Dich. Und meiner Tochter Luise, die mir Kraft in Zeiten der Ungewissheit gibt.