

University of Groningen

Optical molecular imaging in head and neck tumors

Vonk, Jasper

DOI:
[10.33612/diss.579465855](https://doi.org/10.33612/diss.579465855)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2023

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Vonk, J. (2023). *Optical molecular imaging in head and neck tumors: advancing surgical precision by looking and listening to light*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.579465855>

Copyright

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

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

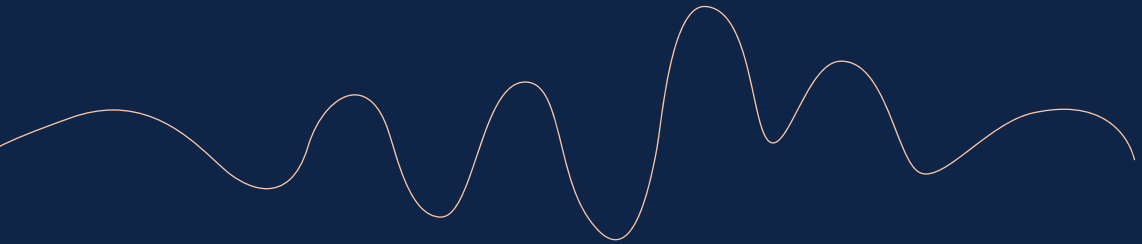
APPENDICES

Dutch summary | Nederlandse samenvatting

List of publications

About the author

Acknowledgements | Dankwoord



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Kanker is een wereldwijd gezondheidsprobleem en is één van de meest voorkomende doodsoorzaken met jaarlijks ongeveer 10 miljoen sterfgevallen¹. Chirurgie is de primaire behandeling voor de meeste kankersoorten, waarbij het resultaat sterk afhangt van in hoeverre nauwkeurig onderscheid kan worden gemaakt tussen tumorweefsel en goedaardig weefsel. Het maken van dit onderscheid begint met preoperatieve beeldvorming om de tumor te karakteriseren (kwaadaardig of goedaardig) en vast te stellen of er sprake is van uitzaaiingen in lymfeklieren of andere organen. Deze beeldvormingsresultaten worden gebruikt om patiënten te selecteren die waarschijnlijk baat hebben bij chirurgische behandeling, en om de optimale chirurgische procedure te plannen^{2,3}. Vervolgens is tijdens de operatie nauwkeurige tumordetectie en –afbakening van cruciaal belang om ervoor te zorgen dat de tumor in zijn totaliteit verwijderd wordt. Dit is namelijk één van de belangrijkste voorspellers voor ziektevrije en algemene overleving⁴⁻⁷. Met name in het hoofd-halsgebied is nauwkeurige afbakening van de marges noodzakelijk, aangezien het (onnodig) verwijderen van gezond weefsel esthetische of functionele gevolgen kan hebben.

Het doel van dit proefschrift was om het gebruik van optische moleculaire beeldvormingstechnieken te onderzoeken bij de chirurgische behandeling van hoofd-halstumoren. Voor preoperatieve beeldvorming werd multispectrale opto-akoestische tomografie (MSOT) bestudeerd, omdat deze techniek moleculaire processen met hoge spatiale resolutie kan visualiseren tot enkele centimeters diep, wat niet mogelijk is met volledig optische technieken. Voor intra-operatieve beeldvorming werd fluorescentie moleculaire beeldvorming (FMB) bestudeerd, daar deze techniek een uitstekende gevoeligheid en resolutie heeft om tumor-specifieke fluorescente tracers te detecteren tot enkele millimeters in weefsel (en dus kan beoordelen of de rand van het verkregen weefsel vrij is van tumorcellen). Dit hoofdstuk geeft een samenvatting en discussie van de belangrijkste resultaten en klinische implicaties, en geeft aanwijzingen voor toekomstig onderzoek.

SAMENVATTING DEEL 1: PREOPERATIEVE BEELDVORMING

Het eerste deel van dit proefschrift bevat twee pilotstudies naar het gebruik van MSOT voor preoperatieve tumordetectie. Na een algemene inleiding in hoofdstuk 1, beschrijft hoofdstuk 2 een klinische pilotstudie naar gebruik van MSOT voor preoperatieve beoordeling van schildklierknobbels. De huidige diagnostiek van schildklierknobbels, bestaande uit echografie en cytologische punctie, levert in 15-30% van de gevallen inconclusieve resultaten op.⁸ De meerderheid van deze patiënten ondergaat diagnostische chirurgie, waarbij de helft van de schildklier wordt verwijderd. Niettemin blijkt het merendeel van deze knobbels goedaardig te zijn. In 29 patiënten hebben we bepaald we of MSOT geschikt is voor het visualiseren en kwantificeren van chromoforen in schildklierweefsel die mogelijk geassocieerd zijn met een kwaadaardige ziekte. Verbeterde signaalverwerking en reconstructiemethoden resulteren in MSOT-beelden van schildklierknobbels met een sterk verbeterde resolutie (~ 170 nm) vergeleken met eerdere studies. Hierdoor zijn we in staat om kenmerken geobserveerd met optoakoestische beeldvorming te correleren aan de gouden standaard: histopathologie. Ten tweede demonstreren we dat 'blind spectral unmixing' slechts een gemiddelde

kwadratische fout heeft van 0,8%, vergeleken met 9,0% voor 'linear unmixing', dat gewoonlijk wordt toegepast in klinische studies⁹⁻¹¹. De vaatdiameters gemeten met MSOT correleren sterk met deze gemeten bij histopathologie ($R^2 = 0,94$). Er worden meerdere kenmerken geïdentificeerd die kunnen wijzen op een kwaadaardige schildklierknobbel, zoals een hoge dichtheid van microvascularisatie en uitbreiding buiten de schildklier. Deze resultaten bevorderen de klinische translatie van MSOT, waarbij de mogelijkheid wordt geboden 'hoge-resolutie' en spectrale informatie te verkrijgen om zo de preoperatieve beoordeling van schildklierknobbels te verbeteren. Uiteindelijk zou dit de noodzaak voor diagnostische chirurgie kunnen verminderen.

In de studie beschreven in hoofdstuk 3 onderzoeken we of MSOT kan worden gebruikt om preoperatief te differentiëren tussen kwaadaardige en goedaardige lymfeklieren bij patiënten met mondkanker. De huidige radiografische beeldvormingstechnieken (echografie, computertomografie [CT] en 'magnetic resonance imaging') zijn namelijk onvoldoende gevoelig om uitzaaiingen in de lymfeklieren te detecteren. Dit blijkt uit het feit dat 20-30% van de patiënten zonder aanwijzingen voor uitzaaiingen op beeldvorming, deze toch blijkt te hebben^{12,13}. We veronderstellen dat MSOT moleculaire veranderingen zou kunnen identificeren die doorgaans voorafgaan aan structurele veranderingen in tijdens het ontstaan van de tumor. Dit zou een diagnostisch voordeel kunnen hebben en zo mogelijk de preoperatieve detectie van uitzaaiingen in lymfeklieren (in een vroeg stadium) kunnen verbeteren. Eerst karakteriseren we de opto-akoestische eigenschappen van cetuximab-800CW, een tumor-specifieke fluorescente tracer gericht op epidermale groeifactor receptor, in een weefsel-nabootsend fantoom. De signaal genererende component, de fluorofoor IRDye800CW, wordt in literatuur ook geschikt geacht voor MSOT. We demonstreren een lineair verband tussen de cetuximab-800CW-concentratie en de cetuximab-800CW MSOT-coëfficiënt ($R^2 = 0,8996$) tot een concentratie van 400 μM , wat de minimaal detecteerbare concentratie definieert. In de hierop volgende klinische proof-of-concept studie krijgen patiënten twee dagen voor de operatie 75 mg cetuximab toegediend, gevolgd door 15 mg cetuximab-800CW. We zijn niet in staat om cetuximab-800CW *in vivo* met MSOT te detecteren bij deze patiënten. Vermoedelijk kan deze nabij-infrarode tracer niet genoeg opto-akoestisch signaal genereren uit de elektrische flux die wordt bereikt op diepte van de lymfeklieren (2-3 centimeter). Het signaal kan worden verhoogd door ofwel de lokale elektrische flux te vergroten, ofwel door een opto-akoestische tracer met betere fotofysische eigenschappen te gebruiken. Wel observeren we verschillen in de variantie van intrinsieke weefselchromoforen tussen kwaadaardige en goedaardige lymfeklieren. Hemoglobine zonder gebonden zuurstof toont een significant verhoogde variatie in kwaadaardige lymfeklieren. Deze klinische observaties dienen te worden onderzocht in een klinische vervolgstudie om deze bevindingen te staven.

SAMENVATTING DEEL 2: INTRA-OPERATIEVE BEELDVORMING

Het tweede deel van dit proefschrift bevat een review artikel en vier klinische studies naar FMB bij verschillende hoofd-halstumoren. Aansluitend volgt een perspectief artikel waarin de volgende stappen worden voorgesteld om implementatie in standaardzorg te

bewerkstelligen. Het algemene doel van deel 2 van het proefschrift is om intraoperatief onderscheid tussen tumor en aangrenzend weefsel te verbeteren. Dit zou kunnen fungeren als aanvullende informatiebron voor de chirurg. Hoofdstuk 4 beschrijft de huidige status van intra-operatieve weefselanalyse en geeft een overzicht van de huidige en toekomstige beeldvormingsmethoden die chirurgische besluitvorming kunnen ondersteunen in de toekomst. We introduceren het concept van een nauwe intra-operatieve samenwerking tussen chirurgen en pathologen, genaamd 'Intraoperative Pathology-Assisted Surgery' (IPAS). Aan de hand van drie typische klinische uitdagingen in de chirurgische oncologie demonstreren we de mogelijk toegevoegde waarde van IPAS. Elke casus stelt verschillende eisen aan de beeldvorming op basis van de klinische vraag. Bijvoorbeeld voor weefselbiopten zijn hoge resolutie en sensitiviteit de belangrijkste eisen. Daarentegen vereist de beoordeling van complete excisiepreparaten een grote 'field of view' en hoge beeldverwervingssnelheden om intra-operatieve besluitvorming mogelijk te maken. De benodigde beeldvormingsdiepte kan per tumortype verschillen, afhankelijk van de definitie van tumor-positieve of krappe marges.

Hoofdstuk 5 beschrijft een pilotstudie naar het gebruik van FMB voor visualisatie en afbakening van cutaan plaveiselcelcarcinoom tijdens chirurgie. Er is toenemende belangstelling voor methoden die tijdens de operatie feedback kunnen geven over de status van de resectiemarges, om zo de chirurgische en cosmetische resultaten te verbeteren. Mohs micrografische chirurgie wordt beschouwd als een effectieve chirurgische techniek, waarbij de zichtbare tumor wordt weggesneden en tijdens dezelfde setting microscopisch wordt onderzocht of de resectiemarges nog tumorcellen bevatten. Terwijl de patiënt wacht, wordt bepaald of het nodig is om extra weefsel te verwijderen, indien nodig meerdere keren. Deze procedure is echter arbeidsintensief, duurt soms een hele werkdag en gaat gepaard met logistieke uitdagingen¹⁵. Wij onderzoeken bij 10 patiënten of de fluorescente tracer cetuximab-800CW real-time kan differentiëren tussen tumor en omliggend weefsel. Hierbij bepalen we het potentieel voor intra-operatief gebruik tijdens zowel conventionele excisie als Mohs micrografische chirurgie. Onze dosering strategie bestaat uit een pre-dosis van 75 mg ongelabeld cetuximab om snelle plasmaklaring te verhinderen en off-target receptoren in niet-tumorweefsel te bezetten^{16,17}, gevolgd door 15 mg cetuximab-800CW. We tonen aan dat deze dosering strategie contrastrijke visualisatie van tumoren bewerkstelligt bij negen van de tien patiënten. *Ex vivo* beeldvorming van excisiepreparaten sterkt deze observatie met een mediane tumor-tot-achtergrond ratio van 2,29 voor conventionele chirurgie en 2,24 voor Mohs micrografische chirurgie. De intra-operatieve margebeoordeling met FMB toont 100% sensitiviteit, 63% specificiteit, 100% negatief voorspellende waarde en 57% positief voorspellende waarde. Deze studie suggereert dat FMB met cetuximab-800CW tumor-positieve marges met hoge sensitiviteit kan detecteren. Dit zou waardevolle informatie kunnen opleveren voor de chirurg tijdens resectie van grote of complexe cutane plaveiselcelcarcinomen die niet geschikt zijn voor Mohs micrografische chirurgie.

Bij mondkankerchirurgie komen inadequate resectiemarges voor bij tot 45% van de patiënten^{18,19}. Deze krappe (1-5 mm) en tumor-positieve (<1 mm) marges zijn geassocieerd met een verhoogde kans op lokaal recidief en verminderde overleving²⁰. Eerder toonde onze

groep aan dat het gebruik van een pre-dosis ongelabeld cetuximab voorafgaand aan de toediening van de fluorescente tracer cetuximab-800CW resulteert in een verhoogd contrast tussen tumor en achtergrondweefsel¹⁶. In Hoofdstuk 6 borduren we voort op deze resultaten en bepalen we de diagnostische prestaties van FMB voor intra-operatieve margebeoordeling in patiënten met mondkanker. In deze fase II studie krijgen 65 patiënten 75 mg ongelabeld cetuximab toegediend, gevolgd door 15 mg van de fluorescente tracer cetuximab-800CW. Intra-operatieve FMB toont een hoog *in vivo* contrast tussen tumor en omliggend weefsel. Dit wordt gevalideerd door middel van multi-diameter single-fiber reflectie/single-fiber fluorescentie spectroscopie, waarbij een mediane tumor-tot-achtergrondverhouding van 3,1 (bereik 2,0 – 5,4) in intrinsieke fluorescentie wordt aangetoond. Alle fluorescente spots die gedetecteerd zijn in de basale marge van het excisiepreparaat, worden gekwantificeerd door middel van een spot-tot-achtergrond ratio. Deze waarden worden gecorreleerd aan de histopathologische margestatus. Het gebruik van een spot-tot-achtergrond ratio van >2 als afkappwaarde leidt tot detectie van tumor-positieve marges met 100% sensitiviteit, 87% specificiteit, 58% positief sensitiviteit waarde en 100% negatief voorspellende waarde. Al met al kan FMB met hoge sensitiviteit inadequate (d.w.z. krappe of tumor-positieve) marges detecteren, onafhankelijk van de locatie van de tumor, het T-stadium of eerdere behandeling van dit gebied (bijvoorbeeld radiotherapie). We pleiten voor het gebruik van FMB als een 'red-flag' techniek om snel risicomarges te identificeren, die vervolgens kunnen worden geanalyseerd door middel van vriescoupes om onnodige resecties te voorkomen.

Hoofdstuk 7 beschrijft een proof-of-concept studie naar het gebruik van FMB voor visualisatie van het papilloma inversum. Hoewel in eerste instantie goedaardig, wordt het papilloma inversum gekenmerkt door agressieve groei met lokale destructie en mogelijke kwaadaardige transformatie²¹. De hoeksteen van de behandeling van het papilloma inversum is uitgebreide chirurgische resectie waarbij alle (microscopische) deposities worden verwijderd. Desalniettemin komt lokaal recidief voor bij ~19% van de operaties, wat sterk geassocieerd is met onvolledige resectie^{21,22}. In deze studie onderzoeken we of bevacizumab-800CW, een nabij-infrarood fluorescente tracer gericht op vasculaire endotheliale groeifactor (die tot overexpressie wordt gebracht in papilloma inversum), geschikt is om onderscheid maken tussen papilloma inversum en omliggend weefsel. In tegenstelling tot de chirurgische behandeling van de meeste solide tumoren, wordt het papilloma inversum papilloma verwijderd door middel van de zogenaamde 'piece-meal' chirurgie. We introduceren een 'fluorescentie grid analyse' waardoor het mogelijk is het fluorescentiesignaal in individuele weefselfragmenten te analyseren, en dus te beoordelen of het mogelijk is kleine residuen van het papilloma inversum te detecteren. Het papilloma inversum toont een significant verhoogde gemiddelde fluorescentie-intensiteit in vergelijking met niet-betrokken weefsel. Toch is er sprake van aanzienlijke variabiliteit in signaal, wat aan het licht wordt gebracht middels de 'fluorescentie grid analyse' dat een area under the curve toont van 0,78. Microscopisch onderzoek toont aan dat gebieden met verhoogde vasculaire endotheliale groeifactor expressie niet beperkt zijn tot het papilloma inversum, maar ook reactief stroma en submucosa omvat, wat het potentieel voor klinische implementatie beperkt. Concluderend

zou de 'fluorescentie grid analyse' kunnen dienen als een methode om FMB te evalueren bij 'piece-meal' chirurgie. Hoewel de gemiddelde fluorescentie-intensiteiten tussen papilloma inversum en niet-aangedane weefsels sterk verschillen, is bevacizumab-800CW mogelijk niet de ideale tracer voor het papilloma inversum vanwege de beperkte sensitiviteit en specificiteit.

Bij mondkanker heeft de aanwezigheid van uitzaaiingen in de lymfeklieren een negatieve invloed op de prognose en vermindert het de overleving aanzienlijk^{23,24}. Dientengevolge is de histopathologische status van de lymfeklieren belangrijk om de postoperatieve behandelstrategie voor te bepalen. Bij de meeste patiënten met mondkanker worden tijdens de chirurgische behandeling ook lymfeklieren verwijderd, hetzij voor stadiëring (in geval van negatieve preoperatieve beeldvorming), hetzij als onderdeel van de behandeling (in geval van positieve preoperatieve beeldvorming). Alle verwijderde lymfeklieren dienen te worden verwerkt op de afdeling Pathologie en vervolgens microscopisch beoordeeld worden door de patholoog. Op basis van het uiteindelijke pathologische lymfeklierstadium dat hieruit volgt, wordt de postoperatieve behandeling bepaald²⁵. In hoofdstuk 8 onderzoeken we bij 21 patiënten met mondkanker of cetuximab-800CW kan differentiëren tussen tumor-positieve (n=61) en tumor-negatieve (n=453) lymfeklieren. Tumor-positieve lymfeklieren vertonen ten minste driemaal hogere maximale en gemiddelde fluorescentie-intensiteiten dan tumor-negatieve lymfeklieren. Een afkapwaarde in maximale fluorescentie-intensiteit van 1,048 geeft 100% sensitiviteit en 87% specificiteit voor de detectie van uitzaaiingen. Bovendien werden lymfeklieren die op basis van FMB als "vals-positief" waren geïdentificeerd, aanvullend onderzocht. In 7,5% van deze gevallen werden alsnog uitzaaiingen gevonden die aanvankelijk niet werden gedetecteerd door standaard histopathologie. Al met al kan dit beeldgeleide concept het aantal lymfeklieren dat een microscopische beoordeling vereist binnen enkele seconden reduceren met 77%. Bovendien toont het de potentie om de algehele opbrengst van microscopische lymfeklier beoordeling verbeteren.

In de afgelopen decennia is de potentie van FMB aangetoond voor verschillende klinische indicaties. Hoewel de toepassing van FMB exponentieel is gegroeid, bijvoorbeeld door het toenemend aantal klinische studies, is het bij de meeste indicaties nog niet geïmplementeerd in standaard zorg. Hoofdstuk 9 geeft een leidraad voor het uitvoeren van klinische studies met FMB om reproduceerbare studies te garanderen die nodig zijn voor klinische translatie. We bespreken de belangrijkste onderdelen van een uniform fluorescentie beeldvormingsprotocol dat gebaseerd zou moeten zijn op de hoekstenen van de wetenschap: standaardisatie en reproduceerbaarheid. Alle belangrijke stappen bij het opzetten van een FMB-studie komen aan bod, inclusief praktische overwegingen met betrekking tot de klinische indicatie, het nauwkeurig definiëren en identificeren van het juiste 'target', het selecteren van een fluorescentie camerasysteem en een fluorescente tracer. We pleiten voor standaardisatie van beeldvormingsprocedures (dat wil zeggen tracertoediening en intra-operatieve beeldvorming) alsmede voor verwerking en analyse van data. Het consistente uitvoeren van onderzoeken, data-analyse en interpretatie zijn van cruciaal belang om de klinische waarde van FMB in fase II en III klinische studies te beoordelen.

DISCUSSIE

In dit proefschrift wordt het gebruik van optische moleculaire beeldvormingsmethoden voor preoperatieve en intra-operatieve visualisatie van hoofd-halstumoren geëxploreerd. De resultaten van deze studies worden hieronder besproken en toekomstperspectieven voor het gebruik optische moleculaire beeldvorming voor hoofd-halstumoren worden beschreven.

In deel één van dit proefschrift wordt aangetoond MSOT 'hoge-resolutie' beeldvorming van vasculatuur faciliteert tot een diepte van ~3 centimeter. Dit maakt dat MSOT een waardevolle modaliteit zou kunnen zijn voor tumordetectie in het hoofd-halsgebied zonder de noodzaak tot tracer toediening. De potentie van MSOT voor klinische implementatie is groot, daar het functionele en moleculaire informatie (bijv. zuurstofverzadiging bij tumorhypoxie) toevoegt aan echografie, een modaliteit die momenteel niet weg te denken is in de medische wereld. Echter om de volledige potentie van klinische MSOT te realiseren, is adequate gegevensverwerking nodig om de distributie van licht in het optisch heterogene weefsel te bepalen en te corrigeren voor artefacten (bijvoorbeeld elektrische ruis).

Recent is aangetoond dat datagedreven benaderingen bij MSOT de beeldreconstructie kan verbeteren, artefacten kan verwijderen, de resolutie kan verbeteren en de nauwkeurigheid van 'spectral unmixing' naar een hoger niveau kan tillen.²⁶⁻³¹ Om chromoforen diepgelegen in weefsel daadwerkelijk te kwantificeren, dient er gecorrigeerd te worden voor de nadelige effecten van 'spectral coloring', om zo te verzekeren dat het geregistreerde signaal de concentratie van de chromofoor weerspiegelt^{32,33}. In de hier gepresenteerde studies zijn verschillende methoden toegepast om te corrigeren voor diepte om zo de nauwkeurigheid van kwantificatie te verbeteren. Echter, de elektrische flux is niet voor alle golflengten homogeen verspreid in weefsel, omdat dit afhangt van de absorptie van licht in de daarboven gelegen weefsellagen. Er zijn verschillende methoden ontwikkeld om de (distributie van) elektrische flux beter in te schatten en zo kwantificatie te verbeteren^{30,31}. Onlangs is MSOT bijvoorbeeld op kwantitatieve wijze gebruikt om zuurstofsaturatie in een *in vivo* setting te voorspellen³⁰. Aangezien er met MSOT data in meerdere dimensies wordt verkregen, waaronder anatomische, moleculaire, spectrale en dynamische informatie, zouden op 'deep learning' gebaseerde methoden de classificatie van ziekten verder kunnen verbeteren, zoals aangetoond voor andere klinische toepassingen³⁴⁻³⁶. Momenteel zijn deze modellen in MSOT sterk afhankelijk van simulatiegegevens, die niet gemakkelijk kunnen worden geëxtrapoleerd naar *in vivo* gegevens. Er is daarom behoefte aan grote, systematisch verworven *in vivo* datasets geannoteerd door standaard histopathologie, om een robuust hulpmiddel voor tumordetectie te ontwikkelen.

Echter kunnen intrinsieke chromoforen, zoals hemoglobine, lipide, water en melanine, slechts informatie verstrekken over een beperkt aantal biologische processen. Moleculaire beeldvorming met MSOT, waarbij exogene contrastmiddelen worden gebruikt, maakt de visualisatie mogelijk van andere biologische processen die verband kunnen houden met tumorgenese. Bovendien kan het gebruik van contrastmiddelen resulteren in versterking van signaal, verbeterde specificiteit en contrast, en grotere beeldvormingsdiepte³⁷. In dit proefschrift wordt gedemonstreerd dat dat de momenteel beschikbare nabij-infrarood fluorescente tracers - deze vertonen een fluorescentie 'quantum yield' van slechts 0,138 - niet

de fotofysische eigenschappen hebben die nodig zijn om in een *in vivo* setting gedetecteerd te worden. Hoewel er op dit moment geen speciale opto-akoestische contrastmiddelen beschikbaar zijn voor klinisch gebruik, wordt hier steeds meer onderzoek naar gedaan^{37,39,40}. Deze tracers vertonen idealiter de volgende fotofysische eigenschappen: hoge molaire extinctiecoëfficiënt in het nabij-infrarood spectrum, een kenmerkend absorptiespectrum (bijvoorbeeld met scherpe pieken), hoge fotostabiliteit, hoge fothermische conversie-efficiëntie en lage fluorescentie quantum yield⁴⁰. Uiteraard moeten deze middelen voldoen aan biologische eisen, zoals lage toxiciteit, minimale accumulatie buiten de kankercellen en snelle klaring uit het lichaam. Grofweg kunnen signaalstoffen worden onderverdeeld in organische nabij-infrarood kleurstoffen en metalen nanodeeltjes. Over het algemeen zijn organische kleurstoffen zeer biocompatibel met beperkte toxiciteitsproblemen voor gebruik bij mensen. Echter, de fotofysische eigenschappen mogelijk niet toereikend zijn voor *in vivo* gebruik op dieptes van enkele centimeters, zoals ook wordt aangetoond in dit proefschrift (Hoofdstuk 3). Daarentegen bieden metalen nanodeeltjes optimale fotofysische eigenschappen met een hoge fotostabiliteit en een optimale opto-akoestische signaalgeneratie. Echter, problemen met toxiciteit en beperkte excretie uit het lichaam kunnen klinisch gebruik belemmeren. Contrastmiddelen die voldoen aan zowel de fotofysische als biologische vereisten zullen mogelijk in de nabije toekomst beschikbaar zijn, zoals 'semiconducting polymer nanoparticles'.

In deel twee van dit proefschrift wordt aangetoond dat FMB een zeer gevoelige techniek is voor tumordetectie. Dosering strategieën eerder ontwikkeld bij intra-operatieve FMB van mondkanker (bijv. EGFR) en borstkanker (bijv. VEGF) werden succesvol toegepast voor het visualiseren van een verscheidenheid aan hoofd-halstumoren en uitzaaïngen. De in Hoofdstuk 6 beschreven fase II studie bij mondkanker toont aan dat FMB een geschikte methode is om tumorweefsel met groot contrast te visualiseren. Gestandaardiseerde beeldvorming van het excisiepreparaat werd toegepast om de marges intra-operatief te beoordelen. Het gebruik van tumor-tot-achtergrond ratio's, waarbij het gezond weefsel van de patiënt als interne controle fungeert, kan gebruikt worden om een fluorescente spot te classificeren als verdacht voor een inadequate marge. De sensitiviteit van tumordetectie nam af met een toenemende marge, mogelijk als gevolg van afnemend contrast door absorptie en verstrooiing van licht⁴¹. De intra-operatieve margebeoordeling bij cutaan plaveiselcelcarcinoom gaf een vergelijkbare sensitiviteit, zij het met een hoger percentage fout-positieven door het detecteren van tumorcellen op >1 mm diepte. Deze marges worden als tumor-negatief beschouwd in plaats van krappe marges bij mondkanker, wat het verschil in specificiteit mogelijk verklaart.

De data die in dit proefschrift worden gepresenteerd, ondersteunen dat FMB kan worden gebruikt als een 'red-flag' techniek voor intra-operatieve margebeoordeling, waardoor snelle identificatie van verdachte marges mogelijk wordt. Echter, met de huidige specificiteit wordt een aanzienlijk aantal patiënten met een volledige resectie verkeerd geclassificeerd als een tumor-positieve marge te worden. Dientengevolge dienen fluorescente spots met een signaal-tot-achtergrond ratio >1.5 te worden gevalideerd door een vriescoupe, waarmee een veilige en gerechtvaardigde intra-operatieve correctie van tumor-positieve marges wordt gewaarborgd.

Er zijn verschillende manieren waarop de extra stap van het nemen van een vriescoupe overbodig kan worden, maar daarvoor is vooruitgang nodig in fluorescentie camerasystemen en dosering strategieën. De eerste mogelijkheid is het corrigeren voor de effecten van optische weefseleigenschappen die kunnen leiden tot foutieve tumorafbakening en dus margebeoordeling. Er worden verschillende technieken in fluorescentie beeldvorming bestudeerd om de effecten van optische weefseleigenschappen te verminderen (of hiervoor te corrigeren) en diepte-informatie te verkrijgen, zoals 'spatial domain frequency imaging' en 'angular-domain fluorescence optical projectiontomography'^{42,43}. Deze methoden kunnen meer inzicht geven in de diepte waar het fluorescente signaal ontstaat, hetgeen klinisch relevant is voor het beoordelen van de resectiemarges (bijv. 1-5 mm). De tweede manier om intra-operatieve FMB te verbeteren, is het ontwikkelen van nieuwe dosering strategieën die kunnen helpen onderscheid te maken tussen de aspecifieke en specifieke accumulatie van fluorescente tracers. In dit proefschrift werd namelijk geconstateerd dat tumor-specifieke tracers ook aspecifiek accumuleren in gebieden met toegenomen vasculariteit of verhoogde vasculaire permeabiliteit (reactieve lymfeklieren, reactief neusslijmvlies). Dit ondersteunt de bestaande literatuur die beschrijft dat passieve tracer accumulatie de tumorspecificiteit van FMB beperkt^{44,45}. Een voorbeeld om te corrigeren voor aspecifieke tracer opeenhoping en receptorexpressie beter te kwantificeren, is door middel van gepaarde fluorescente contrastmiddelen^{46,47}. Deze methoden zijn gebaseerd op het toevoegen van een tweede, niet-gerichte tracer met vergelijkbare farmacokinetiek maar met verschillende spectrale kenmerken. Het signaal van deze tweede aspecifieke tracer wordt afgetrokken van het signaal van de tumor-specifieke tracer, om zo specifieke traceraccumulatie te bepalen. De derde uitdaging ligt in het lokaliseren van gebieden die mogelijk een onvolledige resectie bevatten, een proces dat momenteel plaatsvindt door middel van subjectieve beoordeling van *ex vivo* beelden. Net als in andere medische beeldvormingsgebieden⁴⁸⁻⁵¹ kunnen computationele analyses en machine learning technieken de reconstructie en interpretatie van FMB data verbeteren^{52,53}. Zo zouden geautomatiseerde segmentatie- en classificatie-algoritmen kunnen helpen bij patroonherkenningstaken die nodig zijn om inadequate marges te lokaliseren, waardoor subjectieve beoordeling overbodig wordt.

Nu de potentie van optische moleculaire beeldvorming voor tumordetectie duidelijk is, zijn fase II en fase III (multicenter) studies nodig om de klinische impact van deze methoden te bepalen. In dit stadium ontbreekt het aan uniformiteit in optische en opto-akoestische beeldvormingsdata, wat de reproduceerbaarheid en onderlinge vergelijking van onderzoeken beperkt^{54,55}. In dit proefschrift wordt bij FMB aangetoond dat *ex vivo* beeldvorming standaardisatie van de beeldvormingsprocedure mogelijk maakt. Dit impliceert dat (semi-) kwantificering dichterbij komt, interpretatie van afbeeldingen minder operator-afhankelijk wordt, en resultaten gemakkelijker te reproduceren zijn. Al met al zal dit de klinische implementatie ten goede komen. Het verkrijgen en analyseren van data op gestandaardiseerde wijze, is van cruciaal belang voor het opzetten van effectieve en reproduceerbare klinische multicenter studies⁵⁶⁻⁵⁹. Bovendien moeten in deze multicenter studies universele standaarden gehanteerd worden voor het benchmarken van beeldvormingssystemen, om zo de kwaliteit te monitoren en te bewaken⁶⁰, zoals

reeds gebruikelijk is bij andere beeldvormingstechnieken^{61,62}. Voorbeelden van dergelijke indicatoren voor beeldkwaliteit zijn onder meer resolutie, geometrische nauwkeurigheid, penetratiediepte, 'field homogeneity', sensitiviteit en detecteerbaarheid met laag contrast. Benchmarking testen bieden niet alleen inzicht in de prestatie van apparatuur, maar kunnen ook helpen bij het vaststellen van prestatieverwachtingen en -beperkingen. Weefselsimulerende fantomen zijn zeer nuttig gebleken om verschillende systemen in verschillende centra te vergelijken en afwijkingen in prestaties van apparaten op te sporen om vervolgens de data te corrigeren voor effecten die de interpretatie kunnen beïnvloeden^{58,59,63}. Een dergelijk multicenteronderzoek (d.w.z. gestandaardiseerde gegevensverwerking en -analyse, kalibratie van beeldvormingssystemen) zou kunnen worden gebruikt om de klinische waarde van optische moleculaire beeldvormingstechnieken te bepalen op basis van nauwkeurig gedefinieerde klinische uitkomsten in plaats van een subjectieve interpretatie van fluorescentiebeelden. Een baanbrekend voorbeeld is de multi-center fase III studie over 5-ALA in glioomchirurgie, gepubliceerd in 2006, die een significant verbeterde 6 maanden progressievrije overleving aantoonde wanneer 5-ALA-begeleiding werd gebruikt in plaats van wit licht⁶⁴. Andere eindpunten moeten de logistiek (bijvoorbeeld het interval tussen tracer toediening en beeldvorming) en kosteneffectiviteit beoordelen. Deze modellen moeten onder meer de onmiddellijke financiële voordelen omvatten van het verminderen van het aantal operaties (vanwege de stadiëring met een hogere specificiteit), het verminderen van de behoefte aan secundaire operaties en adjuvante therapie, en het opnemen van een langetermijnanalyse van de uitkomsten voor de patiënt, zoals (procedure-geassocieerde) morbiditeit en ziekteprogressie naar uitgezaaide ziekte.

Ten slotte kan worden verwacht dat de biomedische beeldvorming metertijd steeds meer multimodaal van aard zal worden, aangezien uit diverse studies blijkt dat beeldvormingstechnieken elkaar kunnen aanvullen^{65,66}. In plaats van 'single end point'-onderzoeken zou de toediening van één contrastmiddel preoperatieve én intra-operatieve tumorbeeldvorming kunnen faciliteren. Een zogenaamde 'multiplexed' beeldvormingsbenadering maakt gelijktijdige of opeenvolgende verwerking van meerdere signalen mogelijk (bijv. multimodaliteit, multisignaal, multiparametrisch)^{67,68}. Dit zou meerdere klinische vraagstukken kunnen beantwoorden op basis van verschillende moleculaire biomarkers van de complexe tumor micro-omgeving. Kircher et al. demonstreerden een dergelijke aanpak bij beeldvorming van hersentumoren bij muizen, waarbij gebruik werd gemaakt van een triple-modality tracer voor preoperatieve (MRI) en intra-operatieve tumorvisualisatie (optoakoestische beeldvorming) en vervolgens intra-operatieve margebeoordeling (Raman spectroscopie)⁶⁹. Gezien de ontwikkelingen op het gebied van diverse beeldvormingsmodaliteiten en multimodale contrastmiddelen, die bovendien in toenemende mate tumor-specifiek zijn, zou multiplexing waardevolle preoperatieve en intra-operatieve informatie kunnen opleveren voor chirurgie van hoofdhalstumoren. Hierdoor kunnen de chirurgische procedures worden beperkt tot alleen patiënten die er baat bij hebben, en kunnen vervolgens de oncologische resultaten en dus de prognose worden verbeterd.

CONCLUSIE

Dit proefschrift beschrijft het gebruik van optische moleculaire beeldvormingstechnieken voor visualisatie van tumoren in het hoofd-halsgebied. Het potentieel van opto-akoestische beeldvorming voor preoperatieve tumordetectie wordt aangetoond, wat de selectie van patiënten die baat hebben bij chirurgische therapie kan verbeteren en onnodige chirurgie kan voorkomen. Bovendien wordt de mogelijkheid van optische beeldvorming van excisiepreparaten beschreven, waardoor intra-operatieve klinische besluitvorming mogelijk wordt om volledige verwijdering van de tumor te garanderen en zo de prognose te verbeteren. Deze optische beeldvormingstechnieken moeten rijpen en door middel van standaardisatie van methodologieën en de ontwikkeling van benchmarking criteria, om uiteindelijk hun klinische voordeel te bepalen op basis van klinische uitkomsten in multicenterstudies. Ik voorzie dat een multimodale optische moleculaire beeldvormingsstrategie nauwkeurigere tumordetectie mogelijk zal maken, waardoor de chirurgische precisie wordt verbeterd in de behandeling van hoofd-hals tumoren. In de preoperatieve fase zal dit bijdragen aan een betere selectie van patiënten die een operatie ondergaan, terwijl dit in de intra-operatieve fase de oncologische resultaten en dus prognose zal verbeteren. Uiteindelijk zal dit resulteren in hoofd-hals chirurgie met verbeterde oncologische uitkomsten en minder morbiditeit.

LIST OF PUBLICATIONS

Jasper Vonk, Kim A. Smit, Jan L.N. Roodenburg et al. Effect of adjuvant radiotherapy on the local recurrence of oral squamous cell carcinoma with perineural invasion: A systematic review.

Clinical Otolaryngology. 2019.

Steven de Jongh, Jolien J.J. Tjalma, Marjory Koller, Matthijs D. Linssen, **Jasper Vonk** et al. Back-Table Fluorescence-Guided Imaging for Circumferential Resection Margin Evaluation Using Bevacizumab-800CW in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer.

The Journal of Nuclear Medicine. 2020.

Jasper Vonk, Jaron G. de Wit, Floris J. Voskuil, Max J.H. Witjes. Improving oral cavity cancer diagnosis and treatment with fluorescence molecular imaging.

Oral Diseases. 2020.

Jasper Vonk, Floris J. Voskuil, Bert van der Vegt et al. Intraoperative imaging in pathology-assisted surgery.

Nature Biomedical Engineering. 2021.

Jasper Vonk, Jaron G. de Wit, Floris J. Voskuil et al. Epidermal growth factor receptor targeted fluorescence molecular imaging for postoperative lymph node assessment in patients with oral cancer.

The Journal of Nuclear Medicine. 2021.

Jasper Vonk, Floris J. Voskuil, Jaron G. de Wit et al. Fluorescence grid analysis for the evaluation of piecemeal surgery in sinonasal inverted papilloma: a proof-of-concept study.

European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2021.

Jasper Vonk, Pieter J. Steinkamp, Lydian A. Huisman et al. VEGF-targeted multispectral optoacoustic tomography and fluorescence molecular imaging in human carotid atherosclerotic plaques.

Diagnostics. 2021.

Jasper Vonk, Wido T. Heeman, Vasilis Ntziachristos et al. A guideline for clinicians performing clinical studies with fluorescence imaging.

The Journal of Nuclear Medicine. 2022.

Jasper Vonk, Jan Kukačka, Pieter J. Steinkamp et al. Multispectral optoacoustic tomography for *in vivo* detection of lymph node metastases in oral cancer patients using an EGFR-targeted contrast agent and intrinsic tissue contrast: A proof-of-concept study.

Photoacoustics. 2022.

Jasper Vonk, Jaron G. de Wit, Floris J. Voskuil et al. Fluorescence molecular imaging using cetuximab-800CW in cutaneous squamous cell carcinoma surgery: a proof-of-concept study. *British Journal of Dermatology*. 2022.

Jasper Vonk, Rosanne J.M. Ader, Marijn C. Visschedijk et al. A Rare Case of Protein-Losing Enteropathy, Alopecia, Hyperpigmentation and Dystrophy of the Nails: A Case Report. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2022.

Jaron de Wit, Jeroen E. van Schaik, Floris J. Voskuil, **Jasper Vonk** et al. Comparison of narrow band and fluorescence molecular imaging for the intraoperative tumour margin assessment in oral cancer surgery. *Oral Oncology*. 2022

Milou E. Noltjes, Maximilian Bader, Madelon J.H. Metman, **Jasper Vonk** et al. Towards in vivo characterization of thyroid nodules suspicious for malignancy using multispectral optoacoustic tomography. *Under review*

Jasper Vonk, Jaron G. de Wit, Floris J. Voskuil et al. Fluorescence molecular imaging for intraoperative margin assessment in oral cancer patients using cetuximab-800CW: a prospective, single-centre, phase II imaging trial. *Under review*

ABOUT THE AUTHOR

Jasper Vonk was born on July 7th, 1995, in Enschede and grew up in Eibergen, the eastern part of the Netherlands. In 2013, he graduated from grammar school (gymnasium) at the Assink Lyceum in Haaksbergen to start studying Medicine at the University of Groningen. In the following years, Jasper became active in various extracurricular activities, such as student boards and committees. His scientific interest arose in his second year, when he joined a research project in oral cancer at the Department of Oral and Maxillofacial Surgery, supervised by prof. M.J.H. Witjes. In 2016 he transferred to the Optical Molecular Imaging Groningen research group, where he started a research clerkship on fluorescence molecular imaging. This escalated into an MD/PhD track, which was granted in 2017. During his PhD, Jasper coordinated many multi-disciplinary clinical studies in the field of optical molecular imaging. He presented several posters and had oral presentations at large international conferences such as the European Molecular Imaging Meeting and European Congress on Head and Neck Oncology. He graduated as a medical doctor in March 2022 and currently works as a resident not in training at the Department of Gastroenterology and Hepatology in the Isala Hospital, Zwolle. In July 2023 he will start the Radiology residency program in the University Medical Center Groningen.

ACKNOWLEDGEMENTS | DANKWOORD

Met veel plezier heb ik de afgelopen jaren mogen werken aan de verschillende onderzoeken en publicaties beschreven in dit proefschrift. Hoewel gebundeld ter verkrijging van de doctorstitel, is dit alles behalve een persoonlijke prestatie. Wetenschappelijk onderzoek doen is namelijk teamwork, of beter gezegd team topsport. Het succes van dit proefschrift berust op een multidisciplinaire aanpak, waar mensen van vele disciplines uren aan hebben gewerkt en over hebben nagedacht. Bovendien had dit werk niet kunnen worden verricht zonder alle fijne collega's, vrienden en familie om mij heen. Een aantal van deze mensen wil graag in het bijzonder bedanken.

Professor dr. M.J.H. Witjes, beste Max, als Bachelor student kwam ik met jou in contact om wetenschappelijk onderzoek te kunnen doen, wat snel de basis vormde voor een MD/PhD-traject. Dit bleek een goede match. We blijken op dezelfde manier te denken – we zijn beiden visuele denkers – maar we zijn het lang niet altijd eens. Ik heb dan ook ontzettend genoten van de wetenschappelijke discussies die we hebben gevoerd. Ik bewonder de innerlijke rust die je uitstraalt en de 'helicopter view' die je wist te behouden wanneer ik weer eens je kamer binnenstormde, dan wel euforisch dan wel in mineur. Je hebt me alle ruimte gegeven mij te ontwikkelen op professioneel en persoonlijk vlak, waarbij je grote interesse had voor mijn privéleven.

Prof. dr. G.M. van Dam, beste Go, jouw aanstekelijke enthousiasme, energie en grote ervaring in de optische beeldvorming hebben mij veel gebracht tijdens mijn promotieonderzoek. Onze gesprekken over mijn proefschrift, fluorescentie en met name willekeurige artikelen die net gepubliceerd waren, wakkerden mijn enthousiasme voor de wetenschap aan. Ik heb ontzettend veel waardering voor de interesse die je hebt getoond in mijn professionele ontwikkeling en de adviezen die je mij hebt gegeven daaromtrent. Bovendien zal ik nooit vergeten wat één van de belangrijkste adviezen is om te promoveren bij Go van Dam, mij al snel aangeleerd in Glasgow.

Dr. F.J. Voskuil, beste Floris, met veel plezier heb ik in de beginjaren van mijn proefschrift met je samengewerkt, met als hoogtepunt het review voor Nature Biomedical Engineering. Als een geoliede machine wisten we dit project te volbrengen, en gelukkig wist jij mijn slordigheden keer op keer uit te wissen. Inmiddels ben je mijn promotor, en ben je ook in deze rol weer zeer bekwaam. Gelukkig was er naast werken ook ruimte voor wielrennen – inmiddels zit ik gelukkig niet meer kwijlend in je wiel – en de heerlijke etentjes bij jou thuis samen met Hedi, en inmiddels Naud.

Veel dank aan de leden van de beoordelingscommissie, **prof. dr. A.W.J.M. Glaudemans**, **prof. dr. Gietema** en **prof. dr. S. Manohar**, voor het lezen van mijn proefschrift.

Alle betrokkenen bij de afdeling Mondziekten, Kaak- & Aangezichts chirurgie, onder leiding van **prof. dr. Spijkervet**. Graag wil ik via deze weg de gehele afdeling bedanken voor de ontzettend prettige werksfeer, in het bijzonder de sectie oncologie. **Kees-Pieter Schepman** en **Sebastiaan de Visscher**, dank voor jullie hulp bij alle studieprocedures en betrokkenheid bij de ICON studie. **Rachel, Karien** en **Hilde**, zonder jullie flexibiliteit in de planning was het onmogelijk om alle studieprocedures te plannen. De medewerkers van het operatiecentrum, in het bijzonder **Monique** en **Ewa**, dank voor jullie oeverloos geduld bij het uitvoeren van alle studieprocedures.

Zonder de vele extra inspanningen van de afdeling Pathologie was het niet mogelijk om tot deze studieresultaten te komen. In het bijzonder dank ik **Maaike, Erik** en **Lilo** voor alle hulp, bereidheid extra inspanningen te verrichten en gezellige uitsnijdssessies op het lab. Hoofdhals pathologen, **Bert van der Vegt** en **Jan Doff**, dank voor jullie hulp en bereidheid extra werk te verrichten voor het wetenschappelijk onderzoek.

Geen fluorescente tracer, geen signaal, geen studie. Dank aan de medewerkers van de apotheek, waaronder **Hendrikus, Annelies, Matthijs** en **Wouter** voor het mogelijk maken van alle studies.

Zoals hierboven beschreven is dit proefschrift multidisciplinair. Graag wil ik **Pieter van der Zaag, Wiktor Szymanski, Riemer Slart** en **Rudi Dierckx** bedanken voor de samenwerking en waardevolle input vanuit andere perspectieven.

I would like to thank our German collaborators from Technical University Munich/Helmholtz Zentrum München. **Dominik Jüstel, Jan Kukačka, Christoph Dehner** and **Maximilian Bader**, I really enjoyed setting up the collaboration between the UMCG and Technical University München. Thank you for your critical thinking and exploring new methods to reveal the detailed information that is present in the data. I hope we keep in touch and see each other at the next European Molecular Imaging Meeting.

Misschien wel de belangrijkste groep mensen om mij heen gedurende mijn promotieonderzoek, zijn mijn collega-onderzoekers van de onderzoeksgroep "Optical Molecular Imaging Groningen" (OMIG), waaronder **Steven, Pascal, Madelon, Pieter, Floris, Wido, Jaron, Matthijs, Wouter, Boudewijn, Ruben, Jouke, Anne, Iris, Andrea, Bianca, Pia, Marinav, Eline, Yester, Femke, Thom** en **Bas**. Dank voor de dagelijkse gezelligheid met versgemalen koffie, de gezamenlijke procedures, de wekelijkse adviezen bij de OMIG-meetings en alle borrels binnen en buiten Nederland.

Professor. dr. S. Kruijff, beste Schelto, ondanks dat je geen promotor bent op dit proefschrift ben je bij meerdere van mijn projecten betrokken geweest. Jouw onuitputtelijke enthousiasme, je vermogen zaken altijd van een ander gezichtspunt te bekijken en je talent om mensen te verbinden, maken het ontzettend leuk om met je samen te werken. Dank voor alle persoonlijke/professionele adviezen die je mij hebt gegeven om samen met Milou mijn verdere leven in te richten.

Professor. dr. W.B. Nagengast, beste Wouter, dank voor je interesse en zeer waardevolle feedback tijdens de OMIG-meetings waar je vrijwel altijd aanwezig was. Dank voor al je inspanningen om de OMIG draaiende te houden: het organiseren van de tracerproductie, het binnenhalen van nieuwe apparatuur en het opzetten van nieuwe samenwerkingsverbanden.

Pieter, faka neef, dank dat jij door alle diepe dalen bent gegaan om de MSOT klinisch bruikbaar te maken. Ik denk met veel plezier terug aan de professionele tripjes naar München en Montreal waar we ons op wetenschappelijk gebied sterk ontwikkeld hebben. Bijna net zo mooi als de Tour for Life, waar we met zijn drieën hebben laten zien dat alles mogelijk is met wilskracht en een positieve instelling!

Jaron, wat was het een feest dat ik in mijn laatste onderzoeksjaar naast jou heb mogen zitten. Dank voor alle gewenste en met name ongewenste humor. Je bijna briljante vermogen om met woorden te spelen. Je koffie, maar toch liever bier. Het was geweldig samenwerken bij alle klinische studies en experimenten, met name de momenten in het donkere spectroscopiehoek zal ik nooit vergeten.

Wido, eigenlijk heeft onze samenwerking met name op de fiets plaatsgevonden. Vele uren hebben we “vergaderd” in met name Noord-Groningen, maar ook tussen Italië en Nederland. Uiteindelijk hebben we zelfs nog een paper geschreven die ook nog eens als “State of the Art” is bestempeld. We hebben altijd prachtige gesprekken, soms over onderzoek, vaak over fietsen en meestal onderbroken door vele bulderlachen. Ik kan nog altijd genießen van jouw aanstekelijke enthousiasme over werkelijk alles, en zie het volgende tripje snel tegemoet komen.

Beste collega’s van de **afdeling Maag-, Darm-, en Leverziekten** in het **Isala Ziekenhuis**, bedankt voor de ontzettend fijne en veilige werkomgeving die jullie mij hebben geboden. Met veel plezier heb ik bij jullie mijn eerste stappen gezet als dokter.

Lieve vrienden en vriendinnen van ‘**Canes Odores**’, ‘**Triplenipple**’ en ‘**Tankopikoeplaat**’ **Ramon, Remco** en **Martijn** (hebben wij een naam?), dank voor de geweldige tijd die ik met jullie hebben mogen beleven in de avonduren, de nachten en de weekenden. Excuses voor de keren dat ik een borrel heb afgezegd (en vooral vroegtijdig heb verlaten) voor onderzoek-gerelateerde zaken. Dit proefschrift is daarvan het resultaat; waarschijnlijk hebben jullie het al van kaft tot kaft gelezen.

Mijn paranimfen **Jaron de Wit** en **Wido Heeman**, hier nogmaals genoemd. Fijn dat jullie deze taak op jullie willen nemen tijdens deze bruiloft met mezelf. Dank voor alle hulp bij het organiseren van deze dag, en ik hoop dat jullie me zullen behoeden iets belangrijks te vergeten. Ik ben ervan overtuigd dat jullie mij bijstaan tijdens het verdedigen van mijn proefschrift, en mij tegen zullen werken bij de borrel nadien!

Lieve (bijna) schoonfamilie, **Rob, Jacqueline, Bernard, Hans** en **Marie**, bedankt voor de altijd gezellige etentjes, weekendjes weg en vakanties. Jullie oprechte interesse en adviezen waardeer ik ten zeerste. Het is ontzettend fijn om er een tweede thuis bij te hebben.

Lieve **papa** en **mama**, ik kan niet in enkele woorden beschrijven wat jullie voor mij betekenen. Dank jullie wel voor de veilige thuishaven die jullie hebben weten te creëren. Jullie onvoorwaardelijke steun en altijd eerlijke advies zijn sinds jongs af aan al ontzettend waardevol voor mij. Lieve **Maartje**, dank je wel voor je openheid naar iedereen, je grenzeloze vriendelijkheid en de avonturen die je met je blije kop met ons deelt. Lieve **Oma**, ik geniet nog steeds van onze bijna wekelijkse telefoongesprekken en ik vind het fijn dat je zo trots aan iedereen vertelt dat ik huisarts ben!

En dan **Milou**, al sinds de middelbare school ben jij de liefde van mijn leven. Ik kan niet in woorden beschrijven hoe dankbaar ik ben voor de zorgzaamheid, onvoorwaardelijke liefde en steun die je mij elke dag geeft. Ik kijk uit naar onze toekomst samen. Hoe en waar deze ook mag zijn, het gaat ongetwijfeld geweldig worden met jou aan mijn zij, altijd vrolijk en met een heerlijke lach.