



Technische Universität München
TUM School of Medicine and Health

Konfokale Laser Endomikroskopie: Farbstoffverteilung des Natriumfluorescein im Tumorgewebe

Franziska Elisabeth Ganster

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health
der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Marcus Makowski

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jürgen Schlegel
2. Priv.-Doz. Dr. Friederike Liesche-Starnecker

Die Dissertation wurde am 13.09.2023 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 07.02.2024
angenommen.

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	2
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
2	PROBLEMSTELLUNG	4
3	EINLEITUNG	5
3.1	WHO-KLASSIFIKATION VON HIRNTUMOREN	5
3.2	AKTUELLE DIAGNOSTIK UND THERAPIE DER HIRNTUMOREN.....	5
3.3	DER AKTUELLE GOLDSTANDARD DER INTRAOPERATIVEN DIAGNOSTIK.....	6
3.4	RESEKTIONSANDBESTIMMUNG	6
3.5	DIE KONFOKALE LASER ENDOMIKROSKOPIE	7
3.6	UNTERSUCHUNGSFORMEN.....	11
3.7	DER FLUORESCENZFARBSTOFF NATRIUMFLUORESCEIN	12
3.7.1	<i>GEBRAUCH IN DER AUGENHEILKUNDE</i>	12
3.7.2	<i>BISHERIGER GEBRAUCH IN DER NEUROCHIRURGIE</i>	13
3.8	DIE FARBSTOFFVERTEILUNG IM ORGANISMUS	13
3.8.1	<i>DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE</i>	13
3.8.2	<i>TUMORINTERNE KOMMUNIKATIONSNETZWERKE</i>	14
3.9	AUTOFLUORESCENZEN	15
4	ZIELSETZUNG	16
5	METHODIK	17
5.1	PATIENTENGeweBE UND DATEN	17
5.2	DAS KONFOKALE LASER ENDOMIKROSKOP	19
5.2.1	<i>HANDHABUNG DES GERÄTS</i>	19
5.3	APPLIKATION NATRIUMFLUORESCEIN.....	20
5.3.1	<i>KONTROLLVERSUCHE TOPISCHES FÄRBen</i>	20
5.3.2	<i>INTRAVENÖSE APPLIKATIONSFORM - ARBEITSPROTOKOLL NEUROCHIRURGIE</i>	21
5.4	DIAGNOSTIK ANHAND DER CLE	23
5.5	BILDVERGLEICH FLUORESCENZMIKROSKOP	24
6	ERGEBNISSE	25
6.1	DIAGNOSTIK.....	25
6.2	ANWENDUNGSANALYSE.....	27
6.2.1	<i>PRÄPARATIONSMETHODE DES GEWEBES</i>	27
6.2.2	<i>TOPISCHE VERSUS INTRAVENÖSE FARBSTOFFAPPLIKATION</i>	29
6.2.3	<i>APPLIKATIONSZEITPUNKT NATRIUMFLUORESCEIN</i>	30
6.2.4	<i>TUMORENTITÄTSSPEZIFISCHE FARBSTOFFAFFINITÄT IM ZEITLICHEN VERLAUF</i>	35
6.2.5	<i>ZUSAMMENFASSUNG ANWENDUNGSANALYSE</i>	44
6.3	BILDANALYSE	45
6.3.1	<i>ANALYSE GEWEBSGÄNGIGKEIT</i>	45
6.3.2	<i>ZUSAMMENFASSUNG GEWEBSGÄNGIGKEITSANALYSE</i>	49
6.3.3	<i>ANALYSE FARBSTOFFVERTEILUNG IM TUMORGEWEBE</i>	51
7	DISKUSSION	63
8	ZUSAMMENFASSUNG	67
9	DANKSAGUNG	68
10	LITERATURVERZEICHNIS	69
11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	77
12	TABELLENVERZEICHNIS	79

Abkürzungsverzeichnis

CLE	Konfokale Laser Endomikroskopie
GBM	Glioblastom
HE	Hämatoxylin-Eosin
IDH	Isocitratdehydrogenase
MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MRT	Magnetresonanztomographie
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PC	Personal Calculator
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

2 Problemstellung

Die operative Resektion von ZNS Tumoren ist neben der adjuvanten Chemo-, und Strahlentherapie wichtiger Bestandteil der Behandlung von malignen Prozessen des Gehirns und entscheidend für das Überleben betroffener PatientInnen. Mittels bildgebender Verfahren und intraoperativer Schnellschnittdiagnostik wird eine möglichst präzise Tumorsektion ermöglicht, welche eine Vielzahl an Arbeitsschritten umfasst. Die Konfokale Laserendomikroskopie, eine sich neu etablierende Methode der intraoperativen in situ Beurteilung von Tumorgewebe im ZNS, verspricht eine Optimierung der intraoperativen Diagnostik. Erstmals kann das native Tumorgewebe ohne Fixierung und Präparation in vivo beurteilt und mögliche Artefakte vorgebeugt werden. Durch intravenöse Fluoreszenzfarbstoffapplikation wird das Tumorgewebe für das Laserendomikroskop in situ erkennbar und digitale Bilder entstehen. Es ist bis dato jedoch nicht untersucht, was im Tumorgewebe von den genutzten Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt wird. Wie die entstandenen Bilder zu interpretieren sind und ob lediglich Tumor oder auch umliegendes Gewebe sichtbar wird, ist ebenfalls unklar. Des Weiteren muss untersucht werden, über welchen Mechanismus die Farbstoffe im Gewebe verteilt werden und ob hier spezielle Netzwerke beteiligt sind. Künftig könnte man die Methode im ersten Schritt als Ergänzung zum aktuellen Goldstandard der Schnellschnittdiagnostik nutzen und ferner Resektionsränder genauer bestimmen. Dies könnte das Überleben Betroffener verbessern.

3 Einleitung

Die Konfokale Laser Endomikroskopie (CLE) etabliert sich als Optimierungshilfe der Tumordiagnostik und Behandlung von Patienten mit malignen Raumforderungen im zentralen Nervensystem. Bevor im Detail auf die neue Methode der Tumorbeurteilung auf zellulärer Ebene eingegangen wird, zunächst eine kurze Einführung in die Klassifikation und das aktuelle Prozedere der Hirntumor Diagnostik.

3.1 WHO-Klassifikation von Hirntumoren

Laut der neuesten WHO-Klassifikation werden Hirntumoren seit 2021 mit Hilfe einer integrierten Diagnose klassifiziert. So beurteilt man neben der histologischen Darstellung und immunhistochemischen Färbungen auch molekulargenetische Untersuchungen. Vormalig wurden ZNS Tumoren Tumorübergreifend nach Differenzierungsgrad der Zellen in Grade eingeteilt. So entsprach Grad 1 benignen Tumoren mit einem verhältnismäßig langen Überleben von über 5 Jahren versus Grad 4 Tumoren, die hochmaligne und mit kurzem Überleben vergesellschaftet waren. Dies weicht in der neuen Klassifikation, ähnlich der NICHT-ZNS Tumoren, den Differenzierungsgraden innerhalb eines Tumortyps. Hier spielen die Aggressivität und Gesamtüberleben weiterhin eine Rolle. Des Weiteren gibt es in der neuen Klassifikation eine Änderung der Nomenklatur. Die ursprünglich römischen Zahlen werden durch Arabische ersetzt, Tumorentitäten werden nun als Typen bezeichnet und die neue Klassifikation wird um weitere Typen ergänzt. (Louis et al., 2021)

3.2 Aktuelle Diagnostik und Therapie der Hirntumoren

Wie bereits erwähnt werden anders als bei NICHT-ZNS Tumoren, Gehirntumoren anhand einer integrierten Diagnose aus Histologie und molekularer Pathologie klassifiziert. (Louis et al., 2021)

Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer malignen Raumforderung im Gehirn durchlaufen einen mehrstufigen Prozess bis zur endgültigen Diagnose und Festlegung des Therapieschemas. Zunächst wird die Läsion mittels bildgebender Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) lokalisiert (Abd-Ellah et al., 2019; Fink et al., 2015; Langen & Galldiks, 2022). Optional durchgeführte Biopsien ermöglichen nach

histologischer Untersuchung das Stellen einer ersten Verdachtsdiagnose (Hall, 1998). Im Anschluss erfolgt die operative Entfernung des Tumors und die histologische Aufarbeitung des Resektats. Die Untersuchung durch den Neuropathologen gibt Aufschluss über die Entität der Entartung. So wird durch die Hämatoxylin Färbung (Chan, 2014; Feldman & Wolfe, 2014; Haybaeck et al., 2012), immunohistochemische Verfahren (Evilsizor et al., 2015) und molekulargenetische Untersuchungen eine exakte Diagnostik des Tumors auf zellulärer Ebene ermöglicht und der Grundstein der weiteren Therapieentscheidung gelegt. Im Anschluss werden genetische und epigenetische Veränderungen im Tumor untersucht (van den Bent et al., 2017).

Die Bestimmung des Methylierungsgrades des Promotors des O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT) Gens im Tumor ist ebenfalls von prädiktiver Bedeutung. So profitieren beispielsweise Patienten mit methylierter Promotorregion von einer zusätzlichen Chemotherapie mit Temozolomid zur, als Standardtherapie durchgeführten, Bestrahlung (Stupp et al., 2005).

3.3 Der aktuelle Goldstandard der intraoperativen Diagnostik

Zur Bestätigung der initialen Verdachtsdiagnose wird intraoperativ eine Biopsie entnommen und als Schnellschnitt in die Neuropathologie versandt. Das Gewebe wird gefroren, geschnitten und per Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Innerhalb von 20 Minuten kann eine Aussage über Malignität und gegebenenfalls auch Tumortyp getroffen werden. Sie dient als Orientierungshilfe des operativen Prozederes. (Haybaeck et al., 2012)

3.4 Resektionsrandbestimmung

Die exakte Resektionsrandbestimmung ist nicht nur für die Prognose, sondern auch das Verhindern von neurologischen Ausfällen von Bedeutung (Buckner, 2003; McGirt et al., 2008). Da sich das umliegende gesunde Gewebe, durch den malignen Prozess verändert und sich makroskopisch kaum vom Tumor unterscheidet, bedarf es präziser Hilfsmittel zur Identifikation des zu entfernenden Gewebes. Standardgemäß behelfen sich Neurochirurgen bildgebender Verfahren, wie der Magnetresonanztomographie, die ein Kartierung des Gehirns ermöglicht. Besser bekannt ist dies unter dem Begriff „Brainmapping“ (Black et al., 1997). Eine der größten Herausforderungen in der präoperativen Planung anhand dieser Methode stellt die Diskrepanz zwischen den im Vorfeld angefertigten Bildern und dem sich intraoperativ

darbietenden Situs dar (Hu et al., 2018). Durch neurophysiologische Verfahren, wie die transkraniale magnetische Stimulation, wird der funktionelle Kortex demarkiert, um die Entfernung dessen zu verhindern (Ottenhausen et al., 2015). Des Weiteren finden zahlreiche Farbstoffe Anwendung in der Kontrastverstärkung des malignen Gewebes in der intraoperativen Resektionsrandbestimmung. Einer der geläufigsten ist 5-Aminolevulinsäure, die fluoreszierende Porphyrine im Tumorgewebe anreichert, welche mit Hilfe des Operationsmikroskops sichtbar gemacht werden können, (Mlky et al., 1995; Stummer et al., 2006).

Bis dato ist es jedoch nicht möglich, eine intraoperative Resektionsrandbestimmung auf zellulärer Ebene in Echtzeit durchzuführen. Aktuell behilft man sich der Schnellschnitt Diagnostik, die eine Differenzierung von Tumor und Infiltrationszone ermöglicht (Amraei et al., 2017). Der Einsatz von fluoreszenzfarbstoffgestützten Methoden, wie der Konfokalen Laser Endomikroskopie, könnte diese Differenzierung erleichtern und sich in Zukunft als Ergänzung herkömmlicher Verfahren etablieren (Acerbi et al., 2014; Fotteler et al., 2019; Martirosyan et al., 2014).

3.5 Die Konfokale Laser Endomikroskopie

Die Konfokale Laser Endomikroskopie (CLE) ist eine sich neu etablierende Methode in der Beurteilung des Tumorgewebes auf zellulärer Ebene. Sie wird sowohl in der Resektionsrandbestimmung als auch im Stellen einer ersten Verdachtsdiagnose genutzt. (Acerbi et al., 2020; Belykh et al., 2020; Höhne et al., 2021; Restelli et al., 2022)

Durch Detektion von Fluoreszenzsignalen ermöglicht das Verfahren die Anfertigung eines mikroskopischen Bildes des Tumors in Echtzeit. Das digitale Schnittbild, das einem histologischen Schnitt ähnelt, wird von einer Lasersonde generiert, die auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht wird. Um ein Signal für den Laser zu erhalten, wird vor Untersuchung ein Fluoreszenzfarbstoff appliziert. Die verursachten Lichtemissionen werden verarbeitet und in Bilder konvertiert (Fotteler et al., 2019). Als Farbstoffe finden unter anderem Indocyaningrün (ICG) und das in dieser Arbeit verwendete Natriumfluorescein Einsatz (Charalampaki et al., 2019).

Das CLE Gerät CONVIVO von der ZEISS Meditec AG, das für die Studie genutzt wird, verfügt über eine flexible Lasersonde, die nach Aufstülpen eines sterilen Aufsatzes eine künftige in vivo Nutzung ermöglicht.

Des Weiteren besteht es aus einem Monitor, einem Gerätewagen, der neben einem PC, einem Konfokal-Prozessor und einem Isolationswächter (Gerätevariante) enthält (Abbildung 1).



Abbildung 1: Das CLE Gerät CONVIVO - Die Bilder zeigen die flexible Lasersonde mit Gewebeprobe (eingekreist), sowie das CLE-Mikroskop im operativen Setting, bestehend aus Monitor (Pfeil) und Gerätewagen (Stern).

Wie in Abbildung 2 dargestellt, werden Lichtstrahlen aus einer Laserquelle (blauer Pfeil) mit der Wellenlänge von 488 Nanometer über eine optische Faser ausgesendet und gelangen über die Schaftspitze zur Scannereinheit. Von einem Elektromagneten beschleunigt, werden sie anschließend von einem Linsensystem in einer einstellbaren Z-Tiefe der Gewebeprobe fokussiert und gescannt. Das Laserlicht bewirkt die Abgabe von Fluoreszenzsignalen des zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Gewebes, die anschließend durch das Linsensystem gesammelt und auf den Lichtleiter fokussiert werden. Dieser detektiert ausschließlich das Signal aus der im Fokus stehenden Z-Tiefe und blendet sämtliche weiteren Signale aus. Die Fluoreszenzstrahlen werden anschließend von einem Detektor (grüner Pfeil) aufgefasst und umgewandelt, sodass ein digitales Muster entsteht, das als Bild am Monitor angezeigt werden kann (Leierseder, 2018).

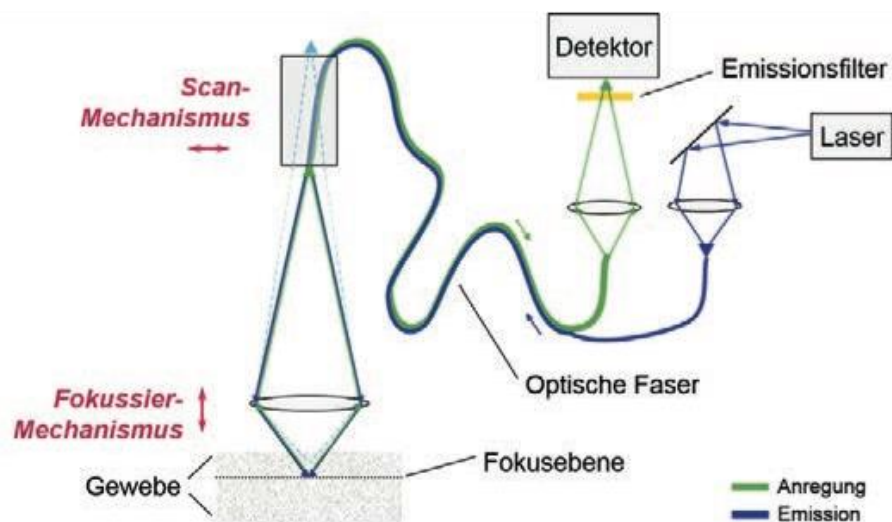


Abbildung 2: Funktionsprinzip der Lasersonde, Konfokale Endomikroskopie bei Hirnoperationen (aus: Leierseder, 2018)

In den Studien zur CLE werden Geräte von verschiedenen Herstellern genutzt (Belykh et al., 2019). Hier zu erwähnen ist unter anderem das Cellvizio® System (Mauna Kea Technologies®, Paris France)

Ein Etablieren der Methode im klinischen Alltag wird in Hinblick auf das Stellen einer ersten Verdachtsdiagnose bereits untersucht und mit dem aktuellen Goldstandard, den Gefrierschnitten und Schmierpräparaten, verglichen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Tumorzellverbände, sowohl im Tumorzentrum als auch im Randbereich, mittels CLE darstellbar sind. Ebenfalls wurden Gefäße mit Hilfe der CLE sichtbar gemacht (E. Belykh, A. A. Patel, et al., 2018; Belykh et al., 2020). Das Bestehen der CLE im klinischen Alltag setzt jedoch das Wissen über die Farbstoffverteilung im Tumor voraus. Um dies zu untersuchen, bedarf es einer Methode, mit der man die durch die CLE entstandenen Bilder vergleicht. Im Fall dieser Studie ist dies die Fluoreszenzmikroskopie.

3.6 Untersuchungsformen

Mittels CLE kann das Gewebe in unterschiedlicher Form untersucht werden. Wie im Graph unten beschrieben, wird vorerst zwischen der in vivo und ex vivo Darstellung unterschieden. Ex vivo kann das Gewebe fixiert oder frisch, topisch gefärbt und im Anschluss durch die Lasersonde dargestellt werden. In vivo gibt es die Möglichkeit der intravenösen Farbstoffinjektion und im Zuge dessen Färbung des Gewebes. Hier wird unterschieden zwischen der ex situ Untersuchung mit Farbstoffinjektion, Probenentnahme und anschließendem Mikroskopieren versus dem in situ Verfahren der Mikroskopie mittels CLE-Sonde im vitalen Gewebe vor Probenentnahme.

ex vivo	in vivo
<u>topisch</u>	intravenös
fixiertes Gewebe	<u>unfixiertes Gewebe</u>
ex situ	in situ

Abbildung 2: Untersuchungsformen der CLE

3.7 Der Fluoreszenzfarbstoff Natriumfluorescein

Die Auswahl eines geeigneten Farbstoffs zur Darstellung des Tumorgewebes per CLE basiert auf der genauen Kenntnis der Art der Untersuchung. In vivo Farbstoffe müssen das Gewebe leicht erreichen können und dürfen für den Patienten nicht schädlich sein. Abhängig von der Belichtungszeit müssen Farbstoffe möglichst lange im Gewebe verbleiben (Sanderson et al., 2014). Der Farbstoff, der für die Untersuchungen dieser Studie genutzt wurde, ist das Natriumfluorescein (Strukturformel $C_{20}H_{10}Na_2O_5$).

3.7.1 Gebrauch in der Augenheilkunde

Die Wahl des Natriumfluoresceins für die Studie basiert auf seinem komplikationsarmen Gebrauch in der Augenheilkunde. Man orientiert sich in Hinblick auf Dosierung und Anwendung an der bereits etablierten Handhabung des Farbstoffs in fluoreszenzangiographischen Untersuchungen des Augenhintergrundes. In diesen wird das Fluorescein oral oder intravenös verabreicht und nach einer Zeit von 15 Minuten bis einer Stunde Bilder generiert (Hara et al., 1998). Die am Auge vorhandene Blut-Retina-Schranke, die aus einer inneren und äußeren Schicht besteht, verhindert ein Übertreten des Farbstoffes in das umliegende Gewebe. Besteht jedoch ein Defekt in der Barriere, gelangt der Farbstoff aus den Gefäßen und kann optisch dargestellt werden (Brancato & Trabucchi, 1998; Herbort, 2009). Beim intraoperativen Gebrauch wird die intravenöse Gabe bevorzugt gewählt. Das Fluorescein bindet an Transportproteinen im Blut und wird zu 80% gebunden (Herbort, 2009). Es wird mit der Dosierung von 5 mg pro Kilogramm Körpergewicht injiziert, verdünnt sich um den Faktor 600 in der Blutbahn und gelangt über den Kreislauf in das Gewebe. In der Augenheilkunde erreicht der Farbstoff 10 bis 15 Sekunden nach Injektion die Retina und wird sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch sichtbar. In der arteriovenösen Übergangsphase, nach etwa 30 Sekunden, erreicht die Fluoreszenz den Maximalkontrast (Tsang & Sharma, 2018). Die Absorption des Farbstoffes liegt bei einer Wellenlänge von 465 Nanometer und einer Emission von 525 Nanometer, die vom Farbfilter der Lasersonde des CL-Mikroskops detektiert wird (Bowden et al., 2018).

Ausgeschieden wird der Farbstoff innerhalb von 24 Stunden sowohl hepatisch als auch renal, wobei die renale Komponente überwiegt (Barry & Behrendt, 1985). Der Urin der Patienten färbt sich neon gelb.

Die Zusammenfassung einiger Studien zu den Nebenwirkungen des Arzneimittels hat ergeben, dass die Rate der allergischen Reaktion zwischen 0,083% und 21,69% liegt und in drei Schweregrade von leicht über mittel bis schwer eingeteilt werden können (Kornblau & El-Annan, 2019). Die häufigste leichte Nebenwirkung des Arzneimittels ist Übelkeit. Urtikaria oder Dyspnoe zählen zu mittelschweren Nebenwirkungen. Schwere Komplikationen sind Anaphylaxie und anschließende Schockreaktion. Die Letalität des Farbstoffgebrauchs liegt bei 1: 220.000 (Kornblau & El-Annan, 2019). Die Datenlage zum Gebrauch des Fluoresceins bei Schwangerschaft ist nicht ausreichend gegeben. Weiters konnte gezeigt werden, dass die Farbstoffdosierung, Injektionsgeschwindigkeit und Temperatur des Fluorescein bei Injektion keinen Einfluss auf die Reaktionen hatten (Kornblau & El-Annan, 2019).

3.7.2 Bisheriger Gebrauch in der Neurochirurgie

Bis dato erfolgten einige Untersuchungen zur Darstellung des Tumorgewebes mittels Natriumfluorescein in der Neurochirurgie. Die Anwendung variiert stark in Dosierung (5mg/kg bis zu 40mg/kg), Anwendungszeitraum (von einigen Minuten bis Stunden) und einmaliger versus zweimaliger Farbstoffapplikation (Abramov et al., 2021). Die CLE wird in den Studien als unterstützendes Werkzeug in der Diagnostik getestet und zeigt erste Erfolge. Bis dato gibt es wenige Daten in Hinblick auf die intraoperative Resektionsrandbestimmung mittels CLE, auch die genaue Verteilung des Farbstoffs im Tumorgewebe (siehe Kapitel 2.6.2) ist bis dato unzureichend untersucht. (Abramov et al., 2021; E. Belykh, C. Cavallo, et al., 2018; Restelli et al., 2021)

3.8 Die Farbstoffverteilung im Organismus

Die Farbstoffverteilung des Natriumfluoresceins wurde bisher noch nicht im menschlichen Hirn untersucht. Daher ist es wichtig zu ermitteln, ob ein mögliches Passage Hindernis durch die Blut-Hirn-Schranke entstehen könnte.

3.8.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) verhindert ein unkontrolliertes Übertreten der sich im Blut befindenden Stoffe ins Gehirn. Die über Tight junctions verbundenen Endothelzellen der Gefäße sind durch eine Vielzahl von Transportern, Ionenpumpen und Regulationsmechanismen kontrolliert. Zudem bilden Astrozyten mit ihren Fortsätzen einen weiteren Bestandteil der Blut-

Hirn-Schranke. Neurotoxischen Substanzen und Pathogenen diffundieren somit ebenso wie Medikamente nicht oder in reduzierter Konzentration in das Gehirn. Ebenso verhalten sich Chemotherapeutika, was eine adäquate medikamentöse Behandlung der Hirntumoren erschwert. Man kann davon ausgehen, dass Natriumfluorescein bei einem Defekt die BHS passiert und sich im Tumorgewebe anreichert. (Sweeney et al., 2019)

3.8.2 Tumorinterne Kommunikationsnetzwerke

Zum Zeitpunkt der Arbeit wurde das Potential einer Farbstoffverteilung über in glialen Tumoren existierende Netzwerke aus Filamenten untersucht. Diese erlauben den Tumorzellen zu kommunizieren, Wachstumssignale zu senden und die Proliferation voranzutreiben. Bestandteil dieser Netzwerke könnten sogenannte Mikrotubes (MTs) sein. Die Komposition dieser Filamente ist einzigartig und besteht aus einer Vielzahl an Proteinen. Vorerst wurde das Netzwerk nur im Rahmen von Tiermodellen in Gehirnen von Mäusen mit Xenotransplantation humaner Tumorzellen untersucht (Osswald et al., 2015). An den Enden der Tumorfilamente konnte man eine Verzweigung ähnlich dem Dendritenbaum der Nervenzellen feststellen. Die MTs enthalten auch Mitochondrien und somit eine eigene Produktion von Adenosintriphosphat (ATP). Verfolgt man Anfang und Endpunkt eines dieser Filamente konnte gezeigt werden, dass sie sich von einer Astrozytenzelle zur nächsten erstrecken. Eine weitere Beobachtung in oben erwähnter Studie war, dass die Filamente in Astrozytomen existieren, nicht aber in Oligodendroglomen. Neuere Studien zeigen auch ein Vorkommen von Filamenten im GBM-Stammzellen (Jomaa, 2018; Weil et al., 2017). Die Fortsätze sind über Gapjunctions miteinander verbunden, über welche sie kommunizieren. Dies wurde über das intrazelluläre Messen von Calciumleveln ermittelt. Um einen Einfluss der MT auf die Kommunikation der Zellen während der Therapie zu untersuchen, hat man die Wirkung von Radiotherapie bei Zellen, die über ein Netzwerk verbunden sind mit solchen ohne Verbindung verglichen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Zellen im Tumorverband bei Untergang einer Tumorzelle deren ehemalige Stelle verdichten und innerhalb weniger Tage ein neuer Zellnucleus entsteht (Osswald et al., 2015). Durch die Verknüpfung der Zellen untereinander über Connexin 43 in den Gapjunctions können Calciumlevel in den Zellen stabil gehalten werden und eine erhöhte Resistenz gegen Therapie ermöglichen. Nun stellt sich die Frage, inwieweit das Netzwerk einen Einfluss auf die Farbstoffverteilung im Gewebe des Tumors hat. Eine Möglichkeit der Distribution wäre der Transport des Farbstoffes ähnlich dem Calcium über Connexin 43 in den Gapjunctions.

3.9 Autofluoreszenzen

Vor dem Gebrauch der CLE muss erwähnt werden, dass Bestandteile des gesunden Hirngewebes auch ohne additive Färbung fluoreszieren. So kann durch das Vorkommen von endogenen Fluorophoren, wie Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Flavin, ein Autofluoreszenzsignal im gesunden Gehirngewebe detektiert werden. Sowohl intra- als auch extrazelluläre Strukturen emittieren Fluoreszenzsignale, wobei diese in der extrazellulären Matrix verstärkt vorzufinden sind. Dies wird durch den hohen Anteil an Fluorophoren in Kollagen und Elastin, die im gesunden Gehirn nur in Gefäßen und Hirnhäuten vorzufinden sind, erklärt. Intrazellulär fluoreszieren insbesondere Mitochondrien und Lysosomen. Weitere Fluorophore sind aromatische Aminosäuren und Lipopigmente. Die Verteilung und Aktivität der Fluorophore wird durch maligne Umbauprozesse gesteigert (Monici, 2005).

4 Zielsetzung

Das Bestehen der Konfokalen Laser Endomikroskopie als sich neu etablierende diagnostische Methode setzt eine genaue Kenntnis des Verhaltens des applizierten Farbstoffs Natriumfluorescein im Tumorgewebe voraus. Ziel der Arbeit ist

1. Die Farbstoffverteilung im Tumorgewebe zu untersuchen.
2. Eine optimale Applikationsform des Farbstoffes zu etablieren
3. Die Möglichkeit der Resektionsrandbestimmung mittels CLE zu untersuchen

Um eine sichere Unterscheidung von Zytoplasma und Zellkern, Gefäßen, Nekrose und anderen charakteristischen Merkmalen für Tumoren des ZNS stellen zu können, werden die Bilder der CLE mit der, in der Tumordiagnostik bereits etablierten Fluoreszenzmikroskopie, verglichen und somit die Verteilung des Farbstoffs im Tumorgewebe untersucht.

Inwiefern die Applikationsart und Zeitpunkt Einfluss auf die Bildqualität nehmen und eine Diagnosestellung erleichtern wird in Punkt 2 untersucht.

Zur Feststellung der Eignung der Methode zur Resektionsrandbestimmung werden die Färbungen des Tumorinneren vom Tumorrand und Infiltrationszone gegenübergestellt.

Nach dem Erlangen dieser Kenntnis bedarf es einer Abwägung, ob und inwiefern die neue Methode den aktuellen Goldstandard der Schnellschnittdiagnostik, in Kapitel 2.3 beschrieben, in Hinblick auf eine beschleunigte Diagnostik und präzisere Tumorsektion ersetzen, beziehungsweise ergänzen, kann.

5 Methodik

Alle Experimente wurden am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie in der Abteilung für Neuropathologie der Technischen Universität München im Labor der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Jürgen Schlegel und in der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Professor Bernhard Meyer im Zeitraum zwischen Februar 2018 und Oktober 2018 durchgeführt.

5.1 Patientengewebe und Daten

Das humane Gewebematerial von insgesamt 38 Patienten, in Tabelle 2 nach ihren Tumortypen geordnet, wurde an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Klinikums rechts der Isar resiziert. Alle Patienten hatten zuvor der Archivierung und Verwendung des Gewebes für Forschungszwecke zugestimmt. Die Studie ist vom lokalen Ethikkomitee genehmigt worden. Anschließend wurde das Gewebe durch zwei Neuropathologen (Prof. Dr. med. Jürgen Schlegel und PD Dr. med. Friederike Liesche-Starnecker) am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie im Fachbereich Neuropathologie untersucht.

Tumortyp	Anzahl
Gliale Tumoren	
Glioblastom, WHO ZNS Grad 4 (Davon Rezidive)	11 (3)
Oligodendrogliom, WHO ZNS Grad 3	6
Astrozytom, WHO ZNS Grad 3	2
Anaplastisches Ependymom, WHO ZNS Grad 3	1
Nicht gliale Tumoren	
Meningeom, WHO ZNS Grad 1	6
Diverse Metastasen	5
Hypophysenadenom WHO ZNS Grad 1	2
Pineozytom WHO ZNS Grad 1	1
Schwannom, WHO ZNS Grad 1	1
Hämangioblastom WHO ZNS Grad 1	1
Plasmozytom	1
Plexuspapillom WHO ZNS Grad 1	1

Tabelle 1: Das Patientenkollektiv

5.2 Das Konfokale Laser Endomikroskop

Für die Studie wurde das Konfokale Laser Endomikroskop CONVIVO von der Carl ZEISS Meditec AG angewandt.

5.2.1 Handhabung des Geräts

Der Bildschirm mit einer Auflösung von 1920 x 1080 Pixel und Touchfunktion fungiert als Bedienungstool des Gerätes und ermöglicht die Einstellung der Hauptfunktionen des Mikroskops. Um eine optimale Bildqualität zu erhalten, können Parameter wie Fokustiefe und Laserstärke optimiert werden. Je tiefer man in das Gewebe eindringt desto mehr streut die Fluoreszenz und dementsprechend müssen neben dem Fokus auch Laserstärke und Helligkeit adjustiert werden. Der Laser kann mit einer Stärke zwischen 5 und 100% arbeiten. Ist die Laserleistung hoch, wird viel Fluoreszenz aus dem Gewebe frei und das Bild erscheint hell. Das abgebildete Gewebe kann in zwei Modalitäten festgehalten werden. Eine einzelne Aufnahme zeigt den Bereich des Gewebes, auf dem die Sonde ruht. Z Stapel sind eine Reihenfolge von Aufnahmen, die in einer zuvor eingestellten Fokustiefe starten und dann tiefer in das Gewebe eindringen und somit ein genaueres Verständnis für die Dreidimensionalität des Tumors ermöglichen (E. Belykh, A. A. Patel, et al., 2018). Um eine optimale Bildqualität zu ermöglichen, verfügt das Gerät über vier Filterfunktionen. Neben einem Graufilter, der Floreszenzen ausblenden kann, wird, um den Kontrast zwischen den einzelnen Floreszenzen zu erhöhen, ein grüner Bandpassfilter verwendet, der mit dem applizierten Farbstoff Natriumfluorescein interagiert. Schwächere Signale können von einem Langpassfilter, der im Bereich von 515 nm arbeitet, erfasst werden. Bei der Nutzung alternativer Farbstoffe wird der Einsatz eines Rotfilters von Bedeutung (Carl Zeiss Meditec AG 2018).

5.3 Applikation Natriumfluorescein

5.3.1 Kontrollversuche topisches Färben

Als Kontrollgruppe wurde topisch 7 mg des Natriumfluoresceins direkt auf zwei fixierte und eine unfixierte Gewebeproben humanen Tumorgewebes aufgetragen. Nach einer Einwirkungszeit von einer Minute wurde das gefärbte Material mit destilliertem Wasser gespült und mit dem CLE-Mikroskop untersucht.

5.3.2 Intravenöse Applikationsform - Arbeitsprotokoll Neurochirurgie

Um im Hinblick auf Applikationszeit und anschließender Untersuchung vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde für den intravenösen Gebrauch ein festes Arbeitsprotokoll ausgearbeitet. Die Dosierung des Farbstoffs wurde auf 5 mg pro Kilo Körpergewicht festgelegt. Wie in Abbildung 3 gezeigt, wurde der Farbstoff bei Eröffnung der Dura Mater appliziert, flutete nach einigen Sekunden im Operationssitus an und präsentierte sich makroskopisch als hell leuchtend (Abbildung 4). Nach der Präparation des Tumors, erfolgte die Probenexzision undes wurden ex vivo mit dem Laser des CONVIVO Geräts Bilder generiert. Anschließend schickte man die Probe an das Pathologische Institut, wo sie fixiert, geschnitten und gefärbt wurde. Die durch die CLE entstandenen Bilder wurden mit den vom selben Gewebe angefertigten Schnitten unter dem Fluoreszenzmikroskop Imager Z 2 der Firma ZEISS zuerst ohne Filter dann mit Filter dem Fluoreszenzfilter (PINK IISS und GREEN IISS) untersucht. Dafür wurde das Gewebe nicht zusätzlich gefärbt.

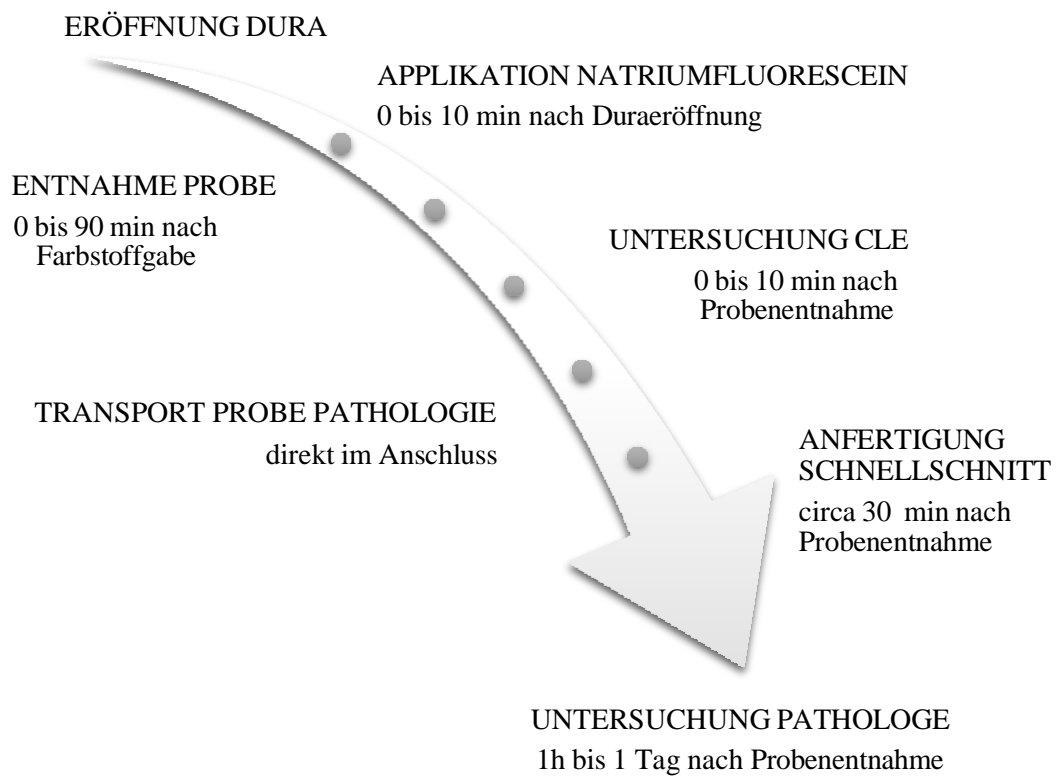


Abbildung 3: Die Abbildung zeigt die wichtigsten Schritte des intravenösen Arbeitsprotokolls.

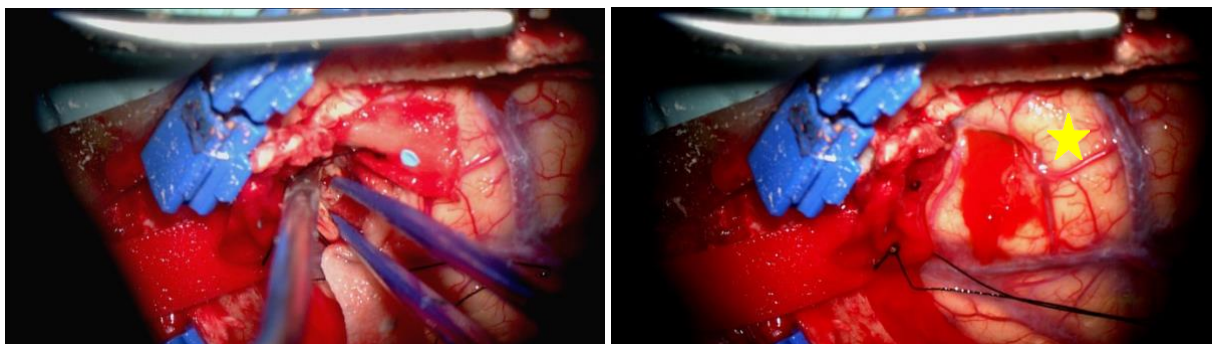


Abbildung 4: Die Bilder zeigen den makroskopischen intraoperativen Situs, links ohne Natriumfluorescein. Im Bild rechts zeigt sich dieser nach Fluoresceingabe hell leuchtend (mit Stern markiert).

5.4 Diagnostik anhand der CLE

Neben der Farbstoffverteilung im Tumorgewebe wurde in Rahmen der Studie auch eine potenzielle Diagnostik mittels CLE untersucht. Die Ergebnisse dieser parallelen Studie findet man in einer separaten Arbeit.

Die Zuordnung erfolgte nach dem in Abbildung 5 aufgezeigtem Prinzip. Vor Beurteilung der CLE-Bilder erhielt der diensthabende Pathologe Angaben zur Verdachtsdiagnose, die mittels Bildgebung, klinischem Erscheinungsbild und dem sich intraoperativ darbietendem Situs vermutet wurde. Im ersten Schritt stellte man die Frage, ob sich das Gewebe pathologisch präsentierte. Wenn ja, erweiterte man die Fragestellung darauf, ob es sich um neoplastisches Gewebe handelte und wenn ja, welche Entität vorlag?

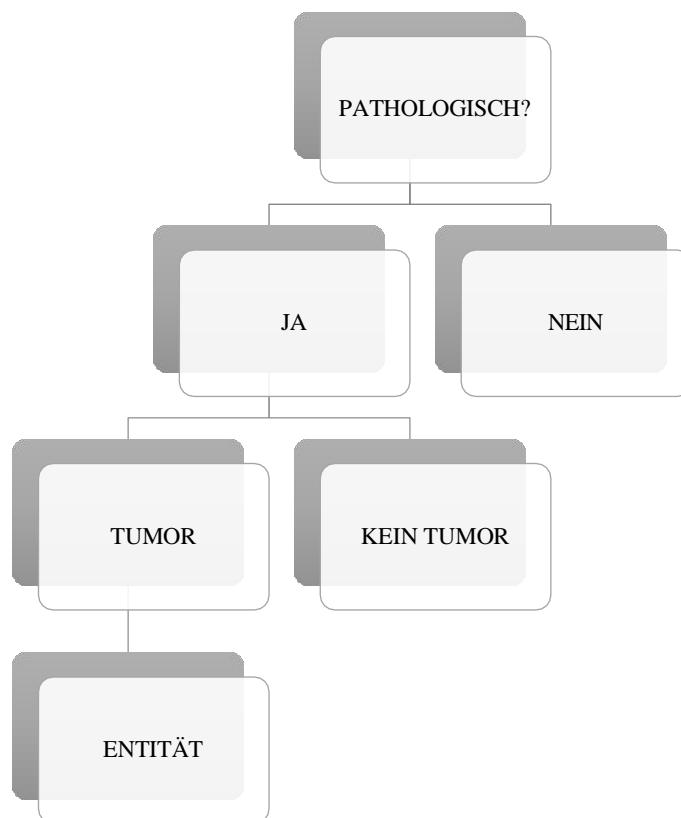


Abbildung 5: Die Fragestellung des Pathologen bei Diagnostik mittels CLE Bilder

5.5 Bildvergleich Fluoreszenzmikroskop

Alle 38 untersuchten Patienten erhielten zusätzlich zum Standardverfahren der intraoperativen Schnellschnittdiagnostik mit anschließender histologischer Untersuchung, immunhistochemischer Färbung und molekularer Untersuchung zum Stellen der endgültigen Diagnose, die Untersuchung mittels CLE. Zum Verständnis der Farbstoffverteilung in den Tumorzellen wurden 13 der insgesamt 38 Patientenproben im Anschluss im Fluoreszenzmikroskop Imager Z2 der Firma ZEISS begutachtet. Die Schnitte zeigten ohne Fluoreszenzfilter tumorspezifische Strukturen, die durch Anwendung der beiden Filter PINK IISS und GREEN IISS den Vergleich des Bildmaterials ermöglichten.

6 Ergebnisse

Intraoperativ konnte nach intravenöser Natriumfluorescein-Applikation *ex vivo* Bildmaterial von 38 Patienten mit 15 unterschiedlichen Tumortypen anhand der CLE angefertigt und ausgewertet werden. Insgesamt entstanden hierbei über 5000 Bilder.

Zusätzlich wurden als Kontrollversuch zwei fixierte und eine unfixierte humane Tumorseite topisch mit Natriumfluorescein angefärbt.

Die Studie inkludiert zudem Proben von 4 Patienten mit Gewebe aus der Infiltrationszone und eine Probe, die sich makroskopisch nicht pathologisch darstellte.

6.1 Diagnostik

In 26 der 38 Patientenfälle konnte anhand der *ex vivo* CLE Bilder intraoperativ eine erste Verdachtsdiagnose gestellt werden. In 69% der Fälle stimmte diese mit der Diagnose nach histologischer Untersuchung nach Goldstandard überein. Entitätsspezifisch wurden 100 % der Meningeome (6/6) und Metastasen (5/5) als solche durch die CLE identifiziert. Beim GBM waren es 22 %, bei 44 % der GBM Proben wurde die vorläufige Diagnose eines malignen Glioms gestellt.

In 7 der insgesamt 38 Fällen (18,42%) war es dem Pathologen möglich, anhand der *ex vivo* Bilder das Gewebe als pathologisch verändert zu identifizieren, eine genauere Diagnosestellung gelang jedoch nicht. In 5 Fällen konnte die Pathologie des Gewebes im CLE Bild nicht beurteilt werden.

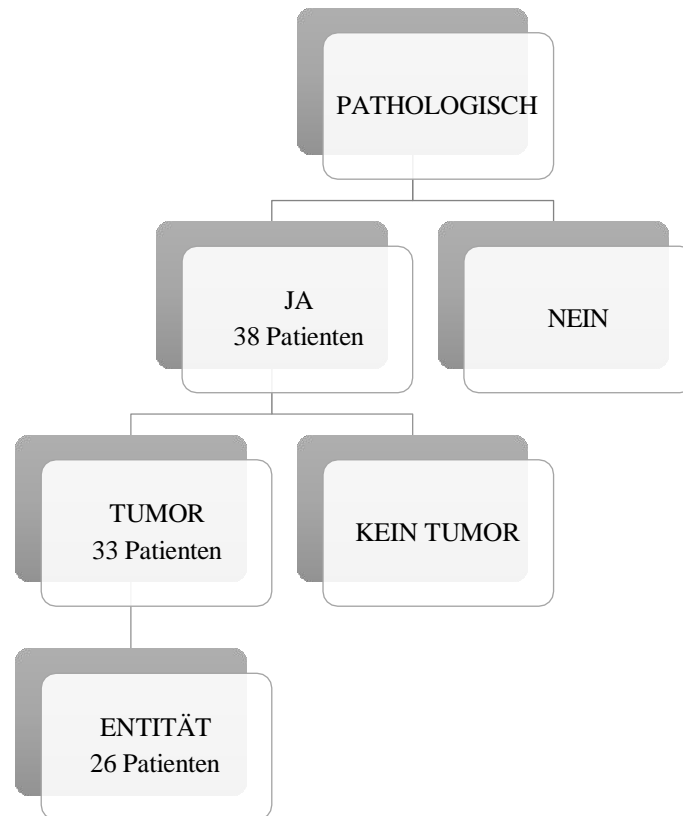


Abbildung 6: Diagramm zur Beurteilbarkeit der Proben. 38 Gewebeproben erkannte der Pathologe als pathologisch verändert. 33 dieser 38 Proben (86,84%) wurden als Tumor beurteilt und in 26 dieser 33 Patientenproben (78,78%) konnte die Entität bestimmt werden.

6.2 Anwendungsanalyse

6.2.1 Präparationsmethode des Gewebes

In Bezug auf die optimale Applikationsform wurde untersucht, ob die Art der Präparation des Gewebes Einfluss auf die Bilddarstellung nimmt. Hier zeigte nicht fixiertes Gewebe einen Vorteil gegenüber der fixierten Proben nach topischer Natriumfluoresceinfärbung. Die folgenden Vergleichsbilder veranschaulichen dies.

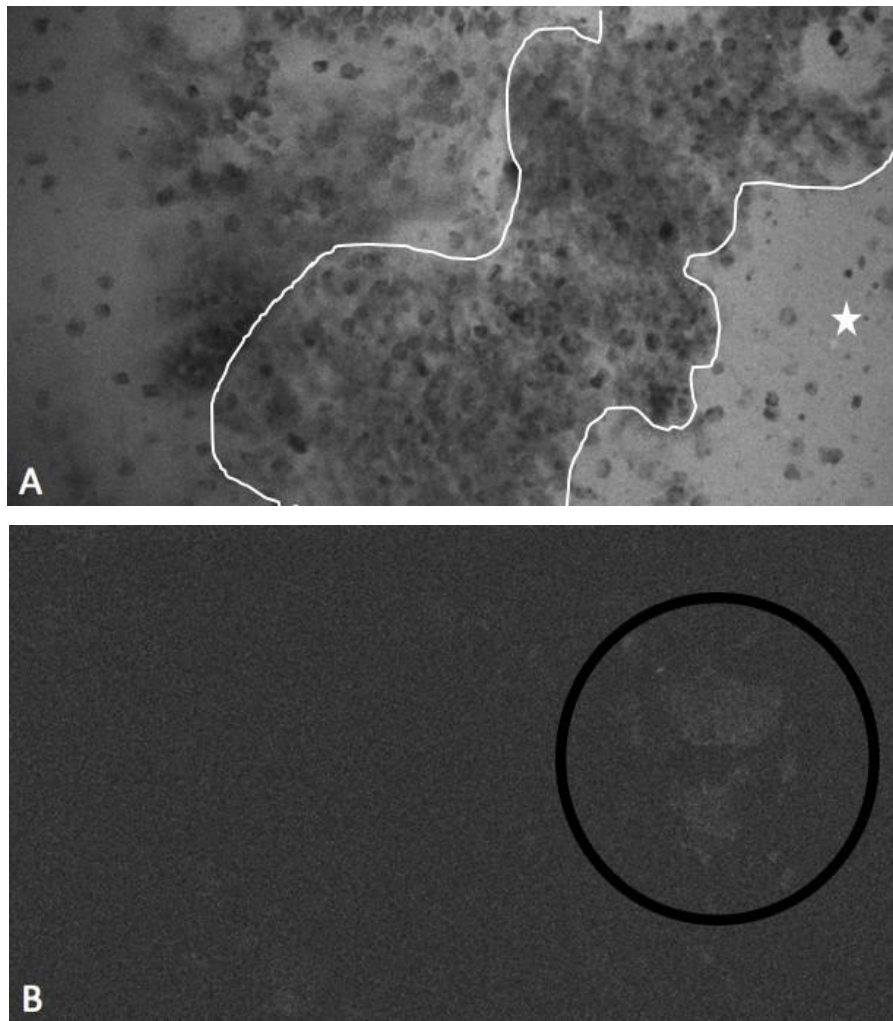


Abbildung 7: *Ex vivo* CLE-Bilder topisch gefärbter humaner Tumorgewebes. A zeigt eine unfixierte Probe mit Tumorzellverbänden (weiße Markierung) und umliegendem Gewebe(weißer Stern). In B wird fixiertes, topisch gefärbtes Gewebe gezeigt, das Tumorgewebe ist mittels CLE kaum darstellbar. Bei den hellen Flecken (schwarzer Kreis) handelt es sich um Artefakte.

6.2.2 Topische versus intravenöse Farbstoffapplikation

Im Vergleich der topischen und intravenösen Applikationsform des Natriumfluorescein in humanen Tumorproben zeigte die topische Anwendung in 2 von 3 untersuchten Fällen (67%) einen Nachteil in der Darstellbarkeit durch die CLE. Das Fluoreszenzsignal bei topischer Applikation erforderte die Anpassung der Helligkeit am Bildschirm auf 100%. Der Kontrast in den generierten Bildern wurde ebenfalls im Bereich von 90 bis 100 % verstärkt.

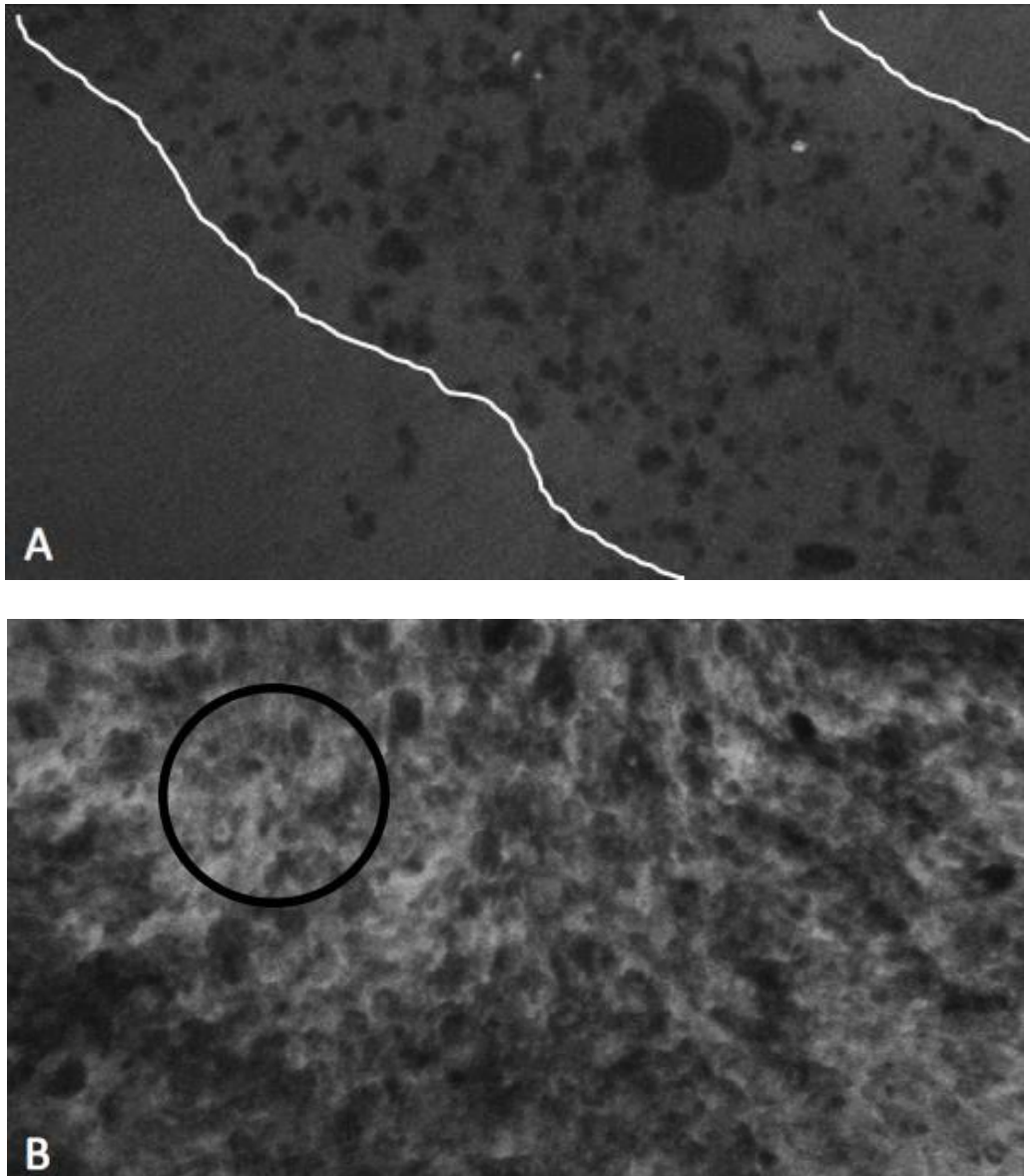


Abbildung 8: CLE Bilder von einem Glioblastom WHO ZNS Grad 4. A zeigt ein topisch gefärbtes Präparat. Das Bild ist dunkel, vereinzelte Tumorzellen sind darstellbar (weiße Markierung). B zeigt eine intravenös gefärbte humane Gewebsprobe, hier erkennt man dichte Infiltrate kleinzelliger Tumorzellen (schwarzer Kreis).

6.2.3 Applikationszeitpunkt Natriumfluorescein

Hier wurde untersucht welchen Einfluss der Zeitpunkt der Probenentnahme nach Farbstoffgabe auf die Intensität der Färbung des Tumorgewebes nimmt. Die insgesamt 38 intravenösen Proben wurden in drei Gruppen unterteilt, die in den Tabellen 6-10 aufgelistet sind. Im Mittel wurden die Proben 24 Minuten nach Farbstoffapplikation entnommen (Range 2 bis 95 Minuten). Grund für die starke Schwankung ist die im Arbeitsprotokoll festgelegte Applikation bei Duraeröffnung, die den Zeitpunkt der Probenentnahme je nach Operationsweise offenlässt.

Zur Objektivierung der Beurteilbarkeit der Bilder für den Neuropathologen wurde der in der Tabelle aufgeschlüsselte Score eingeführt. Er setzt sich aus der Signalstärke der Bilder und der Beurteilbarkeit der Bilder zusammen.

Mit dem Score 3 versehen wurden jene Bilder mit starkem Fluoreszenzsignal und als pathologisch erkannt.

Score 2 jene als pathologisch verändert erkennbares Gewebe und Bilder mit schwachem Fluoreszenzsignal.

Mit dem Score 1 und somit als nicht ausreichend werden jene Proben versehen die nicht als pathologisch erkannt wurden und eine schwache Signalstärke aufwiesen.

Die Tabelle gibt einen Überblick über den Score mit zugehörigen Beispielbildern.

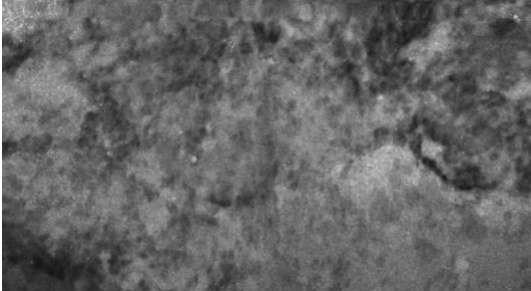
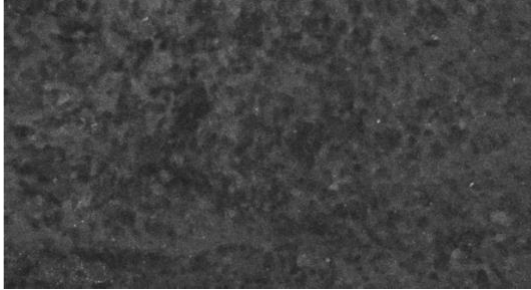
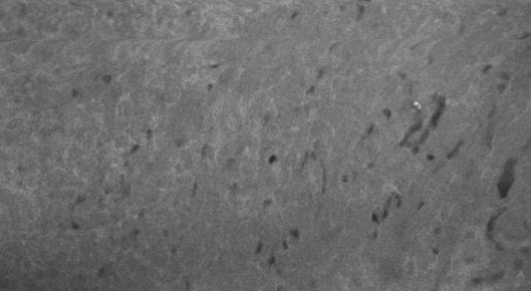
SCORE	BEURTEILBARKEIT	BEISPIELBILD
3	SEHR GUT	
2	AUSREICHEND	
1	NICHT AUSREICHEND	

Tabelle 2: Score zur Beurteilbarkeit der CLE Bilder

6.2.3.1 0 bis 30 Minuten

Die erste Gruppe mit Probenentnahme bis spätestens 30 Minuten nach intravenöser Fluoresceingabe inkludierte 28 Patienten. Da hier der Großteil der Proben entnommen wurden, unterteilten wir sie in drei Untergruppen (null bis 10 Minuten mit 13 Patienten, 11 bis 20 Minuten mit sieben Patienten und 21 bis 30 Minuten mit acht Patienten). Die Tabellen 3 bis 5 zeigen, neben der Zeit zwischen Applikation und Probenentnahme, die Entität des jeweils entnommenen Gewebes mit zugehöriger Patientenummer, die Signalstärke des Farbstoffes im jeweiligen Fall inklusive Score. Das Fluoreszenzsignal in dieser Gruppe war bei 21 Patienten stark. 16 der Proben erhielten den Score 3, 6 wurden mit Score 2 beurteilt und 6 den Score 1. Dies entspricht einer guten bis ausreichenden pathologischen Beurteilbarkeit (Score 3 und 2) von 78%.

Minuten	Entität	Patientennummer	Fluoreszenzsignal	Score
2	Glioblastom	55	stark	3
3	Metastase	56	stark	3
4	Riesenzell Glioblastom	52	stark	3
4	anaplastisches Ependymom (spinal)	37	stark	1
5	Oligodendrogliom	25	schwach	2
5	Metastase	26	stark	3
5	Oligodendrogliom	41	schwach	2
5	Plasmozytom	50	stark	1
6	Metastase	30	stark	3
8	Metastase	40	stark	3
8	Oligodendrogliom	57	schwach	2
9	IDH mutiertes Gliom Rezidiv	59	stark	3
10	GBM Rezidiv	33	schwach	1

Tabelle 3: 0-10 min, 13 Patienten

Minuten	Entität	Patientennummer	Fluoreszenzsignal	Score
14	GBM	38	stark	3
16	Atypisches Meningeom	46	stark	3
17	GBM Rezidiv	45	schwach	2
17	Meningeom	34	stark	3
17	GBM	53	stark	3
19	GBM	60	stark	3
20	Astrozytom	61	stark	3

Tabelle 4: 11-20 min, 7 Patienten

Minuten	Entität	Patientennummer	Fluoreszenzsignal	Score
22	avitales Gewebe (Zyste)	43	schwach	2
22	Ependymom	47	stark	1
23	Meningeom	27	stark	3
23	GBM	23	stark	3
25	Meningeom	28	stark	3
25	Astrozytom	49	schwach	2
27	Meningeom	36	stark	1
28	Hypophysenadenom Rezidiv	44	stark	1

Tabelle 5: 21-30 min, 8 Patienten

6.2.3.2 31 bis 60 Minuten

In der zweiten Gruppe wurde der Zeitraum zwischen Applikation und Probenentnahme auf 31 bis 60 Minuten erweitert. In diesem Zeitintervall wurden 8 Patienten mit Tumoren 7 unterschiedlicher Entitäten untersucht. Das Augenmerk wurde auch in diesem Fall auf die Signalstärke des Farbstoffes gelegt, wie in Tabelle 6 veranschaulicht. Die Signalstärke der Oligodendrogliome, GBM Rezidive und der reaktiven Entzündung waren schwach. Starkes Signal emittierten das Schwannom, Plexuspapillom, Meningeom und Hypophysenadenom. 3 der Proben wurden mit dem Score 1 beurteilt, 3 mit Score 2 und 2 mit Score 3. Somit waren 6 von 8 Proben (75%) pathologisch beurteilbar.

Minuten	Entität	Patientennummer	Fluoreszenzsignal	Score
32	Reaktive Entzündung	54	schwach	2
34	Anaplastisches Oligodendrogliom	58	schwach	2
34	GBM Rezidiv	32	schwach	3
38	Schwannom	39	stark	1
40	Plexuspapillom	51	stark	1
44	Meningeom	48	stark	3
45	Hypophysenadenom	35	stark	1
58	Oligodendrogliom	42	schwach	2

Tabelle 6: 31 bis 60 min, 8 Patienten

6.2.3.3 60 bis 90 Minuten

In der dritten und letzten Gruppe wurde zwei Patienten untersucht. Beide Probenentnahmen waren nach über 60 Minuten nach Farbstoffverabreichung, das Fluoreszenzsignal zeigte sich in beiden Fällen schwach. Beide Proben konnten mit dem Score 2 beurteilt werden und waren somit pathologisch beurteilbar.

Minuten	Entität	Patientennummer	Fluoreszenzsignal	Score
87	Metastase	29	schwach	2
95	Pineozytom	31	schwach	2

Tabelle 7: 61 bis 90 min, 2 Patienten

6.2.4 Tumorentitätsspezifische Farbstoffaffinität im zeitlichen Verlauf

Hier wurde die Affinität der Tumorentitäten gegenüber dem Natriumfluorescein im zeitlichen Verlauf untersucht. Zur Objektivierung orientierten wir uns an den Bildeinstellungen von Kontrast und Helligkeit. Bilder von Gewebe mit wenig bis keinem Bedarf für Anpassung reagierten demnach affiner auf Natriumfluorescein als solches mit einem ausgeprägten Anpassungsbedarf. In den folgenden CLE Bildern finden sich die in dieser Studie am häufigsten untersuchten Tumortypen im Zeitstrahl aufgeführt: GBM, Meningeom, Metastase und Oligodendrogliom.

6.2.4.1 Zeitstrahl Glioblastom WHO ZNS Grad 4

Es wurden 8 GBM und 3 Rezidive untersucht. Die vier exemplarischen von Natriumfluorescein gefärbten GBM im Zeitstrahl zeigen zu 100 % beurteilbare Bilder. In der Studie wurden die Bilder aller GBM und Rezidive zwischen 0 und 60 Minuten nach Farbstoffgabe generiert. Die kräftige Anreicherung des Fluoresceins im Gewebe erforderte die Verstärkung der Helligkeit am Gerät auf 30-40 %, der Kontrast wurde nicht adaptiert. Die Bildqualität wird, wie man anhand der Beispiele im Zeitstrahl nach 2, 14 und 23 Minuten erkennt, nicht beeinflusst. Ein Rezidivtumor, 34 Minuten nach Farbstoffgabe war aufgrund der deutlich erkennbaren Tumorzellinfiltrate und der intensiven Signalstärke beurteilbar. Sowohl Kontrast als auch Helligkeit wurden hier um 50 bis 60% verstärkt.

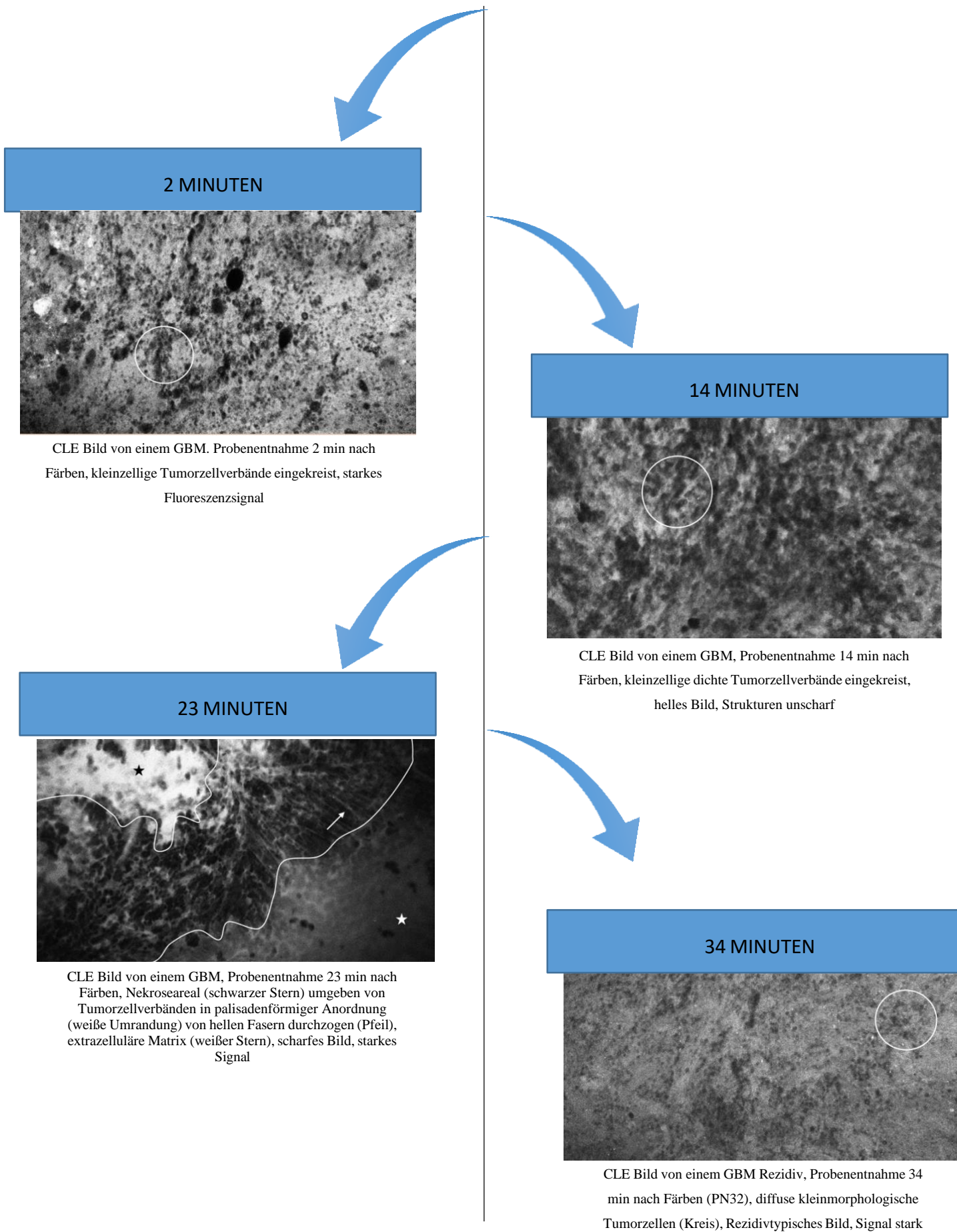
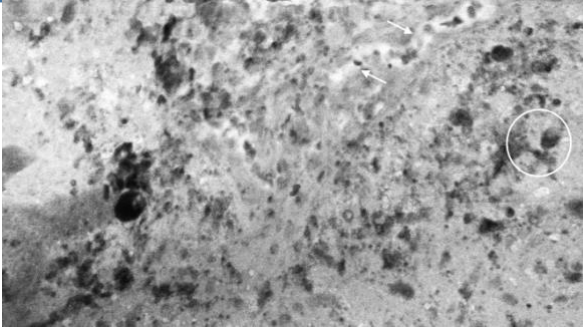


Abbildung 9: Zeitstrahl GBM WHO ZNS Grad 4

6.2.4.2 Zeitstrahl Metastase

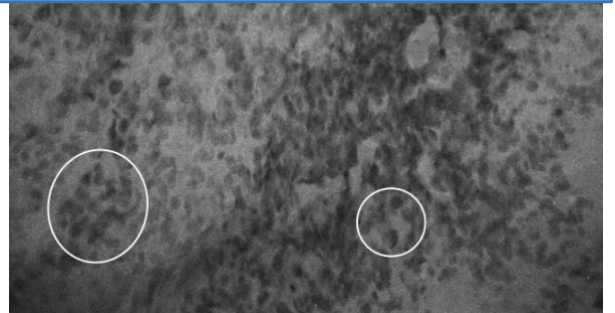
Die Studie schloss 5 Metastasen unterschiedlichen Ursprungs ein. 4 der 5 Metastasen wurden zwischen 0 und 60 Minuten vor Probenentnahme gefärbt, eine 87 Minuten vor Entnahme. Der folgende Zeitstrahl zeigt exemplarisch Metastasen im CLE Bild nach 3 und 87 Minuten. Die Helligkeit wurde bei dem Bild nach 3 Minuten auf 40% verstärkt, der Kontrast nicht angepasst. 87 Minuten nach Farbstoffapplikation wurde die Helligkeit auf 80% der Kontrast auf 70% angepasst.

3 MINUTEN



CLE Bild von einer Metastase, Probenentnahme 3 min nach Färben, eingekreist Tumorzelle mit großem runden Zellkern, breites Zytoplasma, Tumorgefäß mit Blutzellen (Pfeile), helles Bild, starkes Signal

87 MINUTEN



CLE Bild von einer Metastase, Probenentnahme 87 min nach Färben, enganeinander liegende Tumorzellverbände (eingekreist), große Kerne, breites Zytoplasma, dunkles Bild, Strukturen unscharf dargestellt

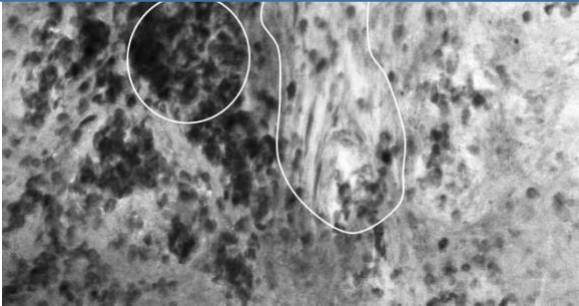
Abbildung 10: Zeitstrahl Metastase

6.2.4.3 Zeitstrahl Meningeom, WHO ZNS Grad 1

6 Meningeome welche zwischen 0 und 60 Minuten vor Probenexzision gefärbt wurden, wurden untersucht. Der Zeitstrahl vergleicht exemplarisch die CLE Bilder im Meningeom 16, 27 und 44 Minuten nach intravenöser Fluoreszeingabe.

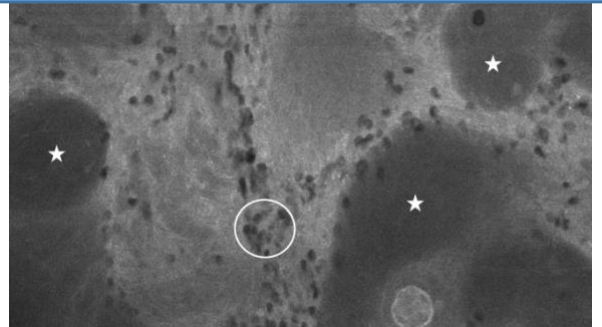
Die Zellverbände mit nicht angefärbten Zellkernen und die umliegende extrazelluläre Matrix können in 100 % dargestellt werden. Es entstanden stark fluoreszierende Bilder. Kontrast wurde nicht, die Helligkeit auf 20-30% verstärkt.

16 MINUTEN



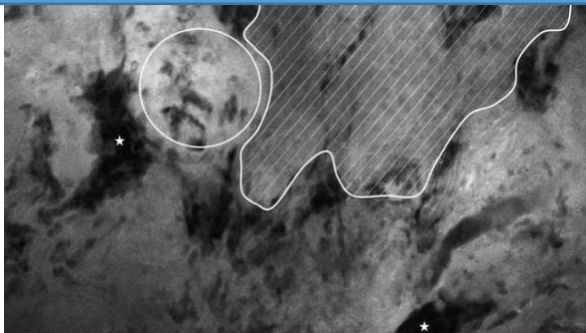
CLE Bild von einem Meningeom, Probenentnahme 16 min nach Färben, zweibelschalenartige Zellanordnungen (weiß markiert), nebenstehend ein Bereich mit hoher Tumorzellichte (Kreis), Signalstarkes Bild

27 MINUTEN



CLE Bild von einem Meningeom, Probenentnahme 27 min nach Färben, Psammomkörper (Sterne) ungefärbt, vereinzelte Tumorzellen (eingekreist), starkes Fluoreszenzsignal

44 MINUTEN



CLE Bild von einem Meningeom, Probenentnahme 44 min nach Färben, zweibelschalenartige Zellen (eingekreist), Nekrose mit starkem Fluoreszenzsignal (schaffierte Fläche), umgeben von Bereichen mit hoher Zelldichte (Sterne), scharfes Bild, starkes Signal

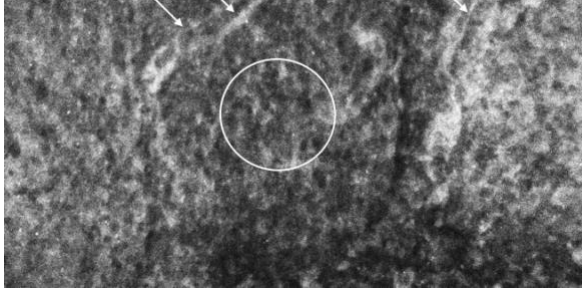
Abbildung 11: Zeitstrahl Meningeom WHO ZNS Grad 1

6.2.4.4 Zeitstrahl Oligodendrogliom WHO ZNS Grad 3

Die folgenden drei exemplarischen Abbildungen zeigen Oligodendrogliome in der zeitlichen Abfolge der Probenentnahme von 5, 34 und 58 Minuten nach Färben, insgesamt wurden 6 Oligodendrogliome WHO ZNS Grad 3 zwischen 0 und 60 Minuten untersucht.

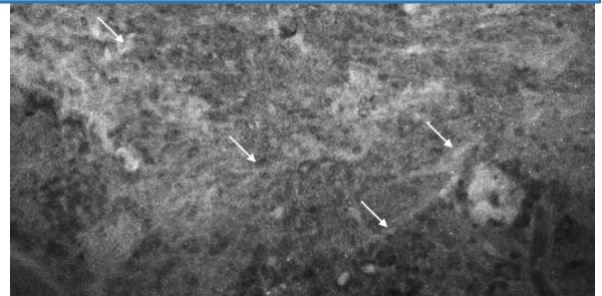
In der Bilddarstellung aller Oligodendrogliome wurde die Helligkeit auf 90 bis 100%, der Kontrast auf 80% verstärkt.

5 MINUTEN



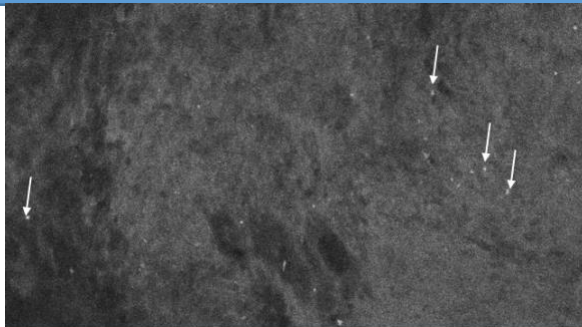
CLE Bild von einem Oligodendrogliom, Probenentnahme
5 min nach Färben, unscharf darstellbare
Tumorzellverbände diffus verteilt (Kreis), faserreiche
weiße Fortsätze (Pfeile), helles, jedoch undeutliches Bild

34 MINUTEN



CLE Bild von einem Oligodendrogliom, Probenentnahme
34 min nach Färben, weiße faserreiche Fortsätze (Pfeile),
unscharfe Tumorzellverbände, schwer beurteilbare
Morphologie der einzelnen Zellen

58 MINUTEN



CLE Bild von einem Oligodendrogliom, Probenentnahme
58 min nach Färben, unscharfes Bild mit deutlichen
Autofluoreszenzen (Pfeile), Tumorzellverbände nicht
ausreichend beurteilbar

Abbildung 12: Zeitstrahl Oligodendrogliom WHO ZNS Grad 3

6.2.4.5 Zusammenfassung Tumorspezifische Farbstoffaffinität

Zusammenfassend gibt die Tabelle einen Überblick über die Bildeinstellungen der Entitäten zwischen 0 und 60 Minuten. Die kleinste Anpassung der Helligkeit musste im Meningeom vorgenommen werden, gefolgt von GBM, Metastase, GBM Rezidiv und Oligodendrogliom. Die Kontrasteinstellung wurde in aufsteigender Reihenfolge am GBM, Meningeom, Metastase, GBM Rezidiv und Oligodendrogliom vorgenommen.

ENTITÄT	KONTRAST	HELLIGKEIT
GBM WHO ZNS Grad 4	0%	30-40%
GBM WHO ZNS Grad 4 Rezidiv	50-60%	50-60%
Meningeom WHO ZNS Grad 1	0%	20-30%
Metastase	0%	40%
Oligodendrogliom WHO ZNS Grad 3	80%	90-100%

Tabelle 8: Bildeinstellungen Tumorspezifische Farbstoffaffinität

Die Bildeinstellung nach mehr als 60 Minuten wurde lediglich in Metastasen untersucht. Hier musste Helligkeit auf 80%, Kontrast auf 70% verstärkt werden.

6.2.5 Zusammenfassung Anwendungsanalyse

Das folgende Diagramm gibt zusammenfassend einen Überblick über die Anwendung des Natriumfluorescein zum Erhalt eines optimalen CLE Bildes. Das optimale *ex vivo* CLE Bild entsteht bei unfixierten, im Zeitraum von 30 bis 60 Minuten nach intravenöser Farbstoffapplikation entnommenen Proben.

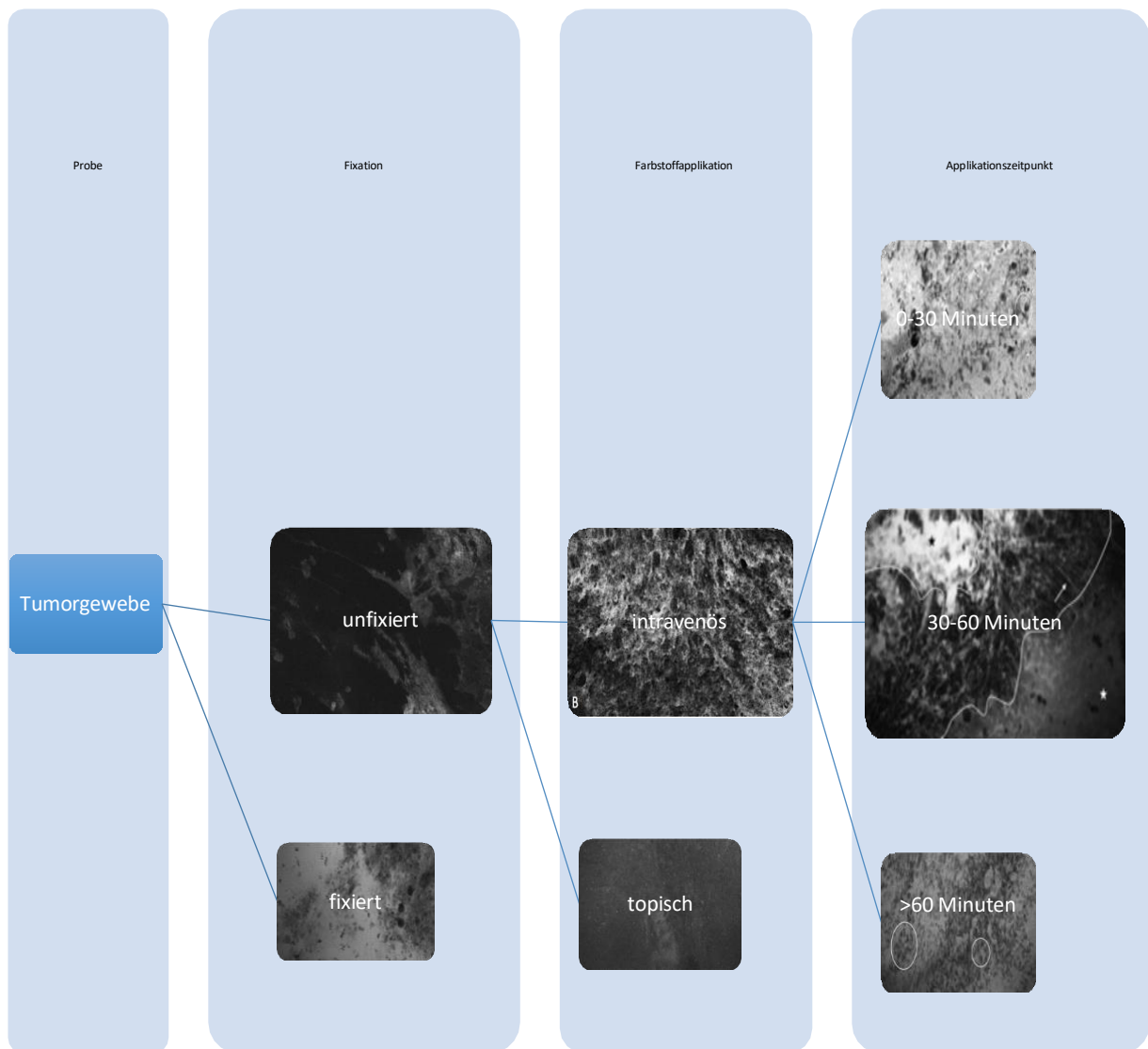


Abbildung 13: Optimale Anwendung Natriumfluorescein

6.3 Bildanalyse

6.3.1 Analyse Gewebegängigkeit

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Natriumfluorescein in der CLE gestützten Resektionsrandbestimmung humaner Hirntumoren wurde im nächsten Schritt die Gewebegängigkeit des Farbstoffs in das Tumorzentrum, dessen Randbereich und Infiltrationszone sowie das umliegende Gewebe untersucht.

6.3.1.1 Tumorzentrum

Das Gewebe aus dem Tumorzentrum war nach intravenöser Natriumfluoresceinapplikation in der CLE darstellbar. In 20 der glialen Tumoren (100%) und 90% der nicht glialen Tumoren konnte dies gezeigt werden.

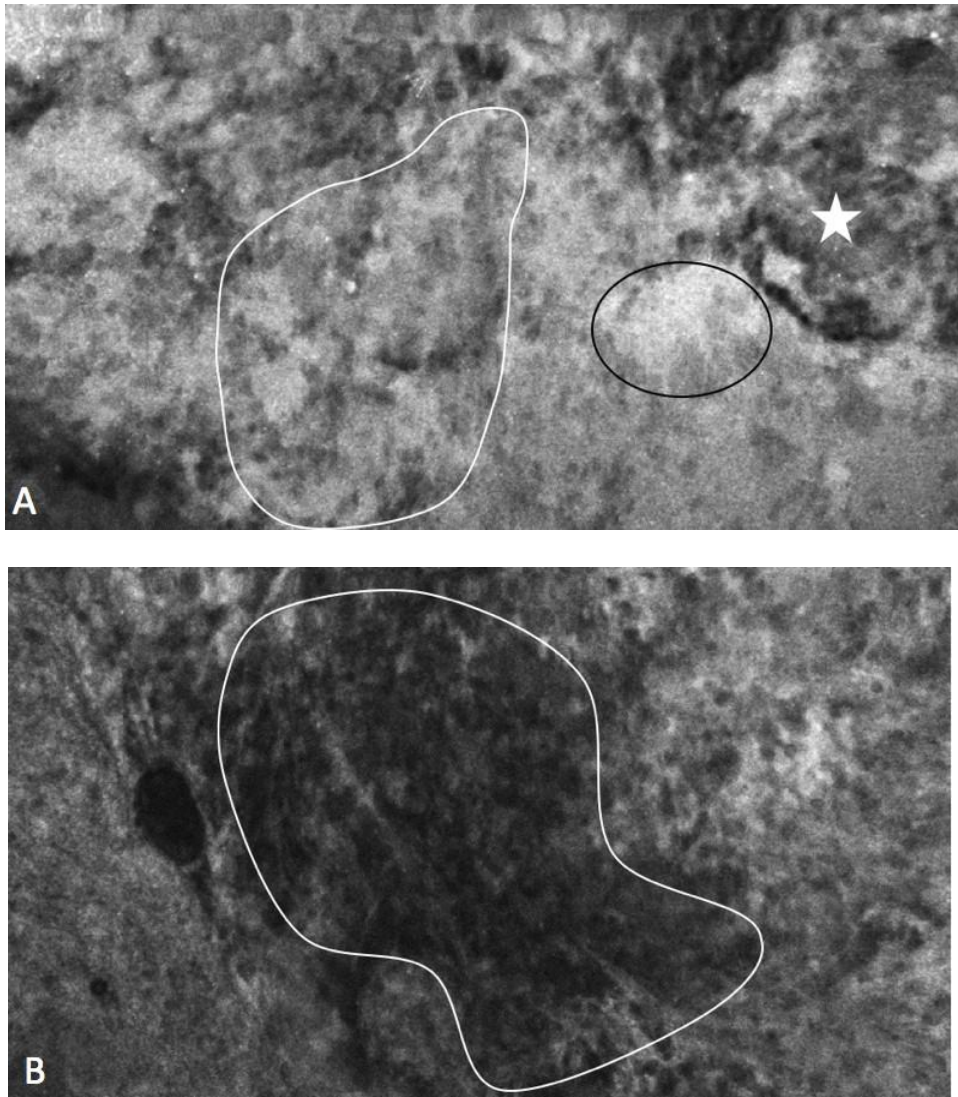


Abbildung 14: CLE Bilder von Tumorgewebe aus einem GBM, WHO ZNS Grad 4 mit starkem Fluoreszenzsignal und scharf darstellbaren Strukturen. Weiß markiert in A und B: Tumorzellverbände, dicht aneinander liegend. Der schwarze Kreis in A markiert eine besonders helle Nekrosezone, an die Tumorzellen in Pallisadenstellung grenzen (Stern).

6.3.1.2 Infiltrationszone

Als Infiltrationszone bestimmten wir den Bereich des Tumors der durch das infiltrative Wachstumsverhalten an das gesunde Gehirn angrenzt. Die Probenentnahme erfolgte unmittelbar zu Beginn der Tumorresektion.

In den CLE Untersuchungen der 4 Patienten konnte in 100 % eine Reaktivität des Gehirns erkannt werden. Strukturen, wie Tumorzellen mit schwach erkennbaren Kernen und dem Zytoplasma, waren darstellbar. Der Neuropathologe konnte in diesem Bereich einen Prozess beschreiben, der sich mit dem der Infiltrationszone eines glialen Tumors vereinbaren ließ. Das Fluoreszenzsignal in diesem Bereich war in allen 4 Fällen schwach. Es konnten besonders hell leuchtende Autofloreszenzen erkannt werden.

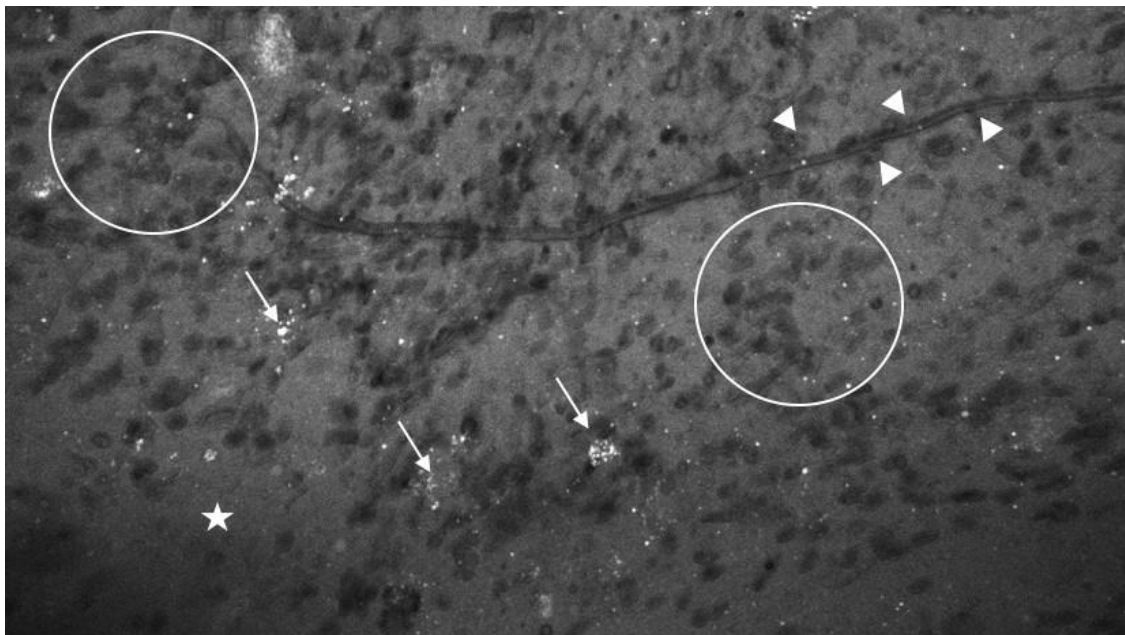


Abbildung 15: CLE Bild von der Infiltrationszone mit Autofluoreszenzen (weiße Pfeile) und reaktivem Gewebe mit vereinzelten Tumorzellen (weiß umrahmt), einer dunklen Faser (weiße Dreiecke) und extrazellulärer Matrix (weißer Stern).

6.3.1.3 Umliegendes Gehirn

Eine Probe, die durch den Chirurgen als makroskopisch fraglich pathologische Läsion identifiziert wurde und sich nach HE Färbung als nicht pathologisch verändertes Hirngewebe herausstellte, wurde untersucht.

In der CLE imponierten die Bilder der Probe als schwarze Flächen mit vereinzelt erkennbaren Autofluoreszenzen, die sich als weiße Punkte darstellten. (Abbildung 10). Es waren keine dichten Zellinfiltrate und umliegendes Gewebe darstellbar.

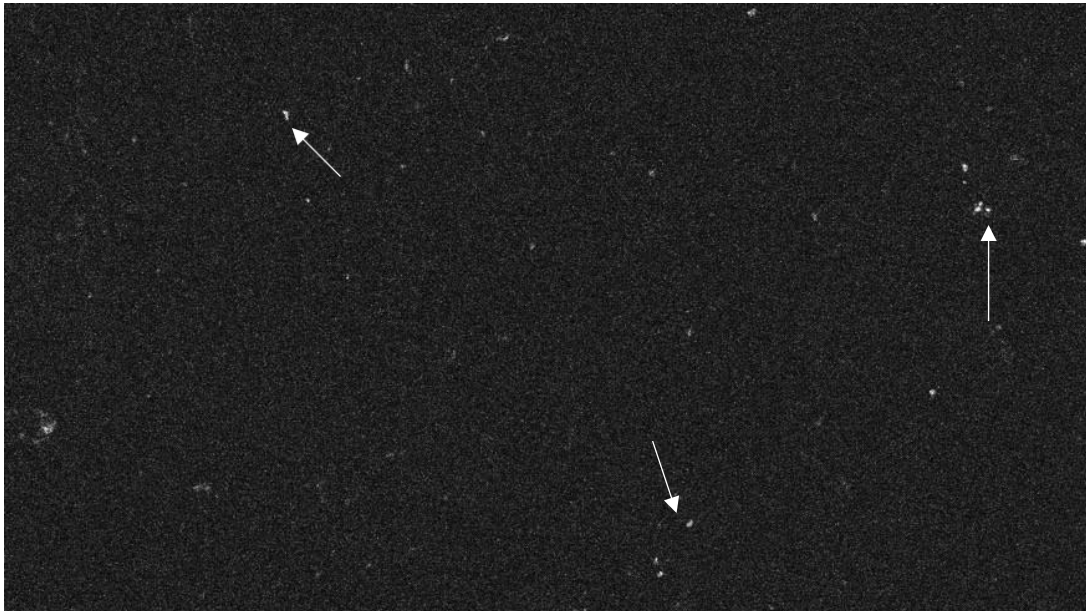


Abbildung 16: CLE Bild von einem nicht pathologisch veränderten, vom Natriumfluoreszein nicht gefärbten, Gehirn mit Autofluoreszenzen (Pfeile)

6.3.2 Zusammenfassung Gewebsgängigkeitsanalyse

Das Bild zeigt deutlich den Übergangsbereich von Tumorzentrum über Randbereich bis in die Infiltrationszone. Die drei Bereiche sind mithilfe der CLE darstellbar. Die Tumorzellverbände im Tumorzentrum, werden im Randbereich weniger. Das Fluoreszenzsignal ist in beiden Bereichen stark, das Bild scharf.

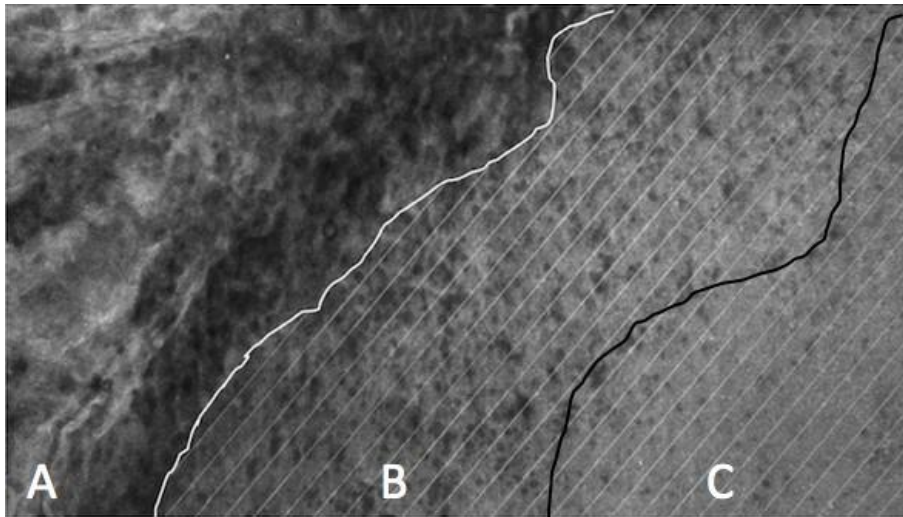


Abbildung 17: CLE Bild vom Tumorzentrum (A) mit Übergang in den Tumorrand (B) und die Infiltrationszone (C) eines Glioblastoms WHO ZNS Grad 4. In der schraffierten Infiltrationszone sind nur einzelne Tumorzellen erkennbar. Im Tumorzentrum Zellen, Blutgefäße und extrazelluläre Matrix.

Die Tabelle fasst die Unterschiede in der Farbstoffanreicherung der drei untersuchten Bereiche zusammen. Im Tumorzentrum und der Infiltrationszone reichert sich in 100% der Proben das Natriumfluorescein an. Das Fluoreszenzsignal ist vorhanden, darstellbare Strukturen sind Tumorzellverbände und extrazelluläre Matrix. Im umliegenden Gewebe können bis auf Autofluoreszenzen keine Zellen dargestellt werden.

Parameter	Tumorzentrum	Infiltrationszone	Umliedendes Gewebe
Fluoreszenzsignal	vorhanden	vorhanden	nicht vorhanden
Strukturen	Tumorzellverbände extrazelluläre Matrix	Vereinzelte Zellen, reaktives Gewebe	Autofluoreszenzen

Tabelle 9: Vergleich Farbstoff Tumorzentrum, Infiltrationszone und umliedendes Gewebe

6.3.3 Analyse Farbstoffverteilung im Tumorgewebe

Neben der Beurteilbarkeit der Bilder und der Farbstoffanreicherung in den drei Bereichen des Tumors wurde untersucht, welche Strukturen von Natriumfluorescein angefärbt werden. Hier wurden jeweils CLE Bilder eines Tumors und HE-Schnitte derselben Probe angefertigt, im Fluoreszenzmikroskop untersucht und miteinander verglichen. Für 11 von 13 Patienten (84,62 %) konnte bei Gegenüberstellung eine Übereinstimmung der Tumorstrukturen in der Fluoreszenzmikroskopie gefunden werden. In zwei Proben war ein Vergleich der Bilder nicht möglich.

6.3.3.1 Farbverteilung intrazellulär

Das Gewebe war ohne zusätzliche Fluoreszenzfärbung der HE-Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop in allen 13 Fällen darstellbar. Die in den CLE Bildern als Tumorzellen vermuteten Strukturen mit dunkler Mitte und hellem Rand, wurden in der Fluoreszenzmikroskopie anhand wiedererkennbarer Muster als solche identifiziert. Natriumfluorescein färbt das Zytoplasma der pathologisch veränderten Zellen an, der Großteil ihrer Zellkerne wird jedoch ausgespart. In Abbildung 13 ist dies veranschaulicht. 30 Zellkerne blieben vom Natriumfluorescein ausgespart, 8 Zellkerne wurden leicht (mit Pfeil in Abbildung 17 markiert) gefärbt und ein Zellkern stark (mit Stern in Abbildung 17 markiert).

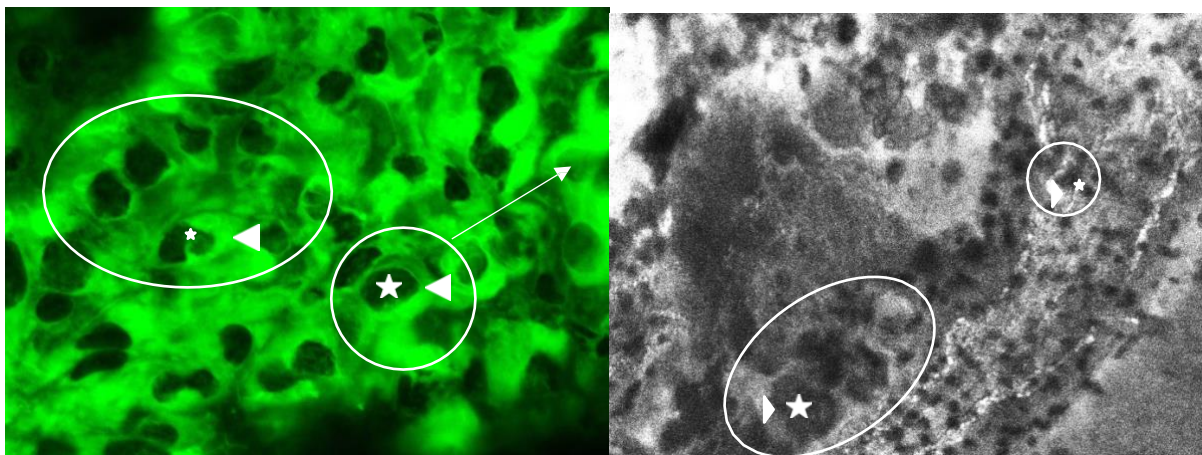


Abbildung 18: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischem Bild von einem Plexuspapillom: eingekreist sind Zellverbände mit großen, dicht gereihten

Zellgruppen. Die Zellkerne (dunkel, Stern) umgeben von schmalen Zytoplasma (leuchtend, Pfeilspitze). Der Pfeil demonstriert einen schwach angefärbten Zellkern.

Die folgenden vergleichenden CLE und HE-Bilder vom GBM, Meningeom, Oligodendrogliom, Metastase, Plasmozytom und Plexuspapillom veranschaulichen das Verhältnis von angefärbtem Zytoplasma und ausgespartem Zellkern in allen Tumorentitäten. Für die übrigen Entitäten wurden aufgrund zu geringer Probengrößen kein Schnitt angefertigt.

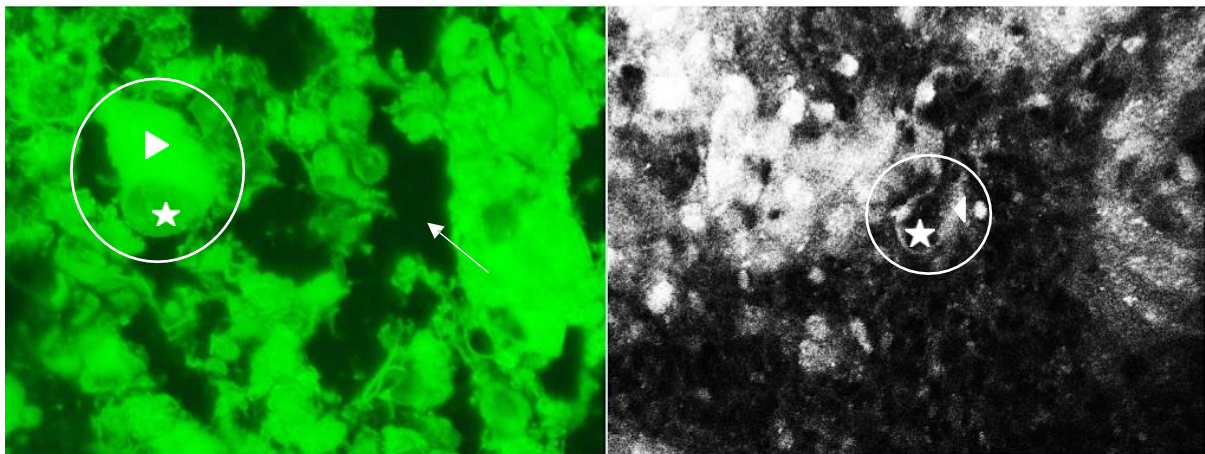


Abbildung 19: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischem Bild von einem Glioblastom, WHO ZNS Grad 4. Eingezeichnet ist eine Tumorzelle (Dreieck markiert das Zytoplasma, Stern den Zellkern). Im Fluoreszenzbild ist zu erkennen, dass der Zellkern im Vergleich zu den nicht gefärbten Arealen (Pfeil), leicht fluoresziert. Ein möglicher Hinweis für eine zugrunde gehende Tumorzelle.

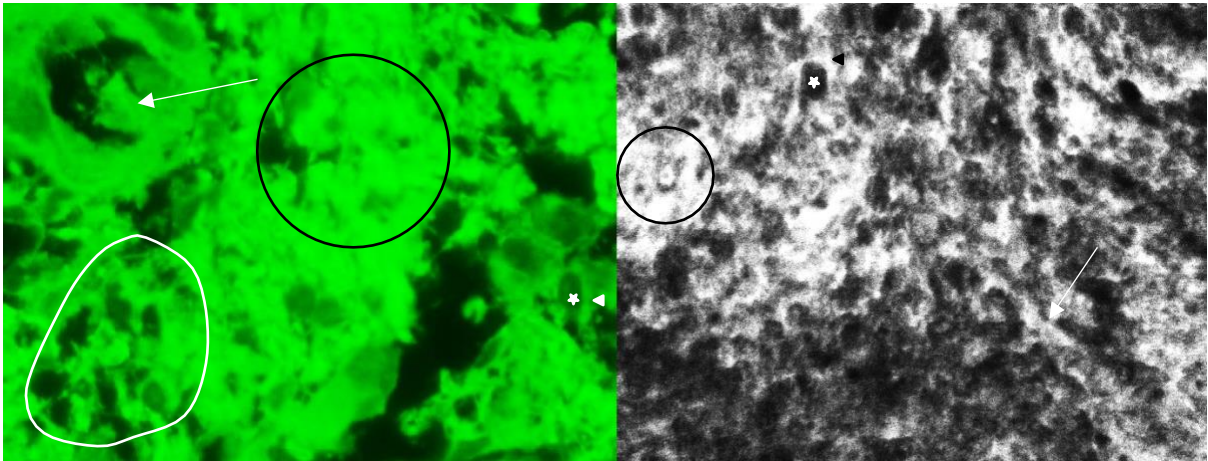


Abbildung 20: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischem Bild von einem Glioblastom mit fokal sehr hoher Zelldichte (weiß markiert) mit dunklem Kern (Stern) und hellem Zytoplasma (Dreieck). Zusätzlich findet man nekrotische Areale (schwarzer Kreis) und Gefäßproliferate (weißer Pfeil).

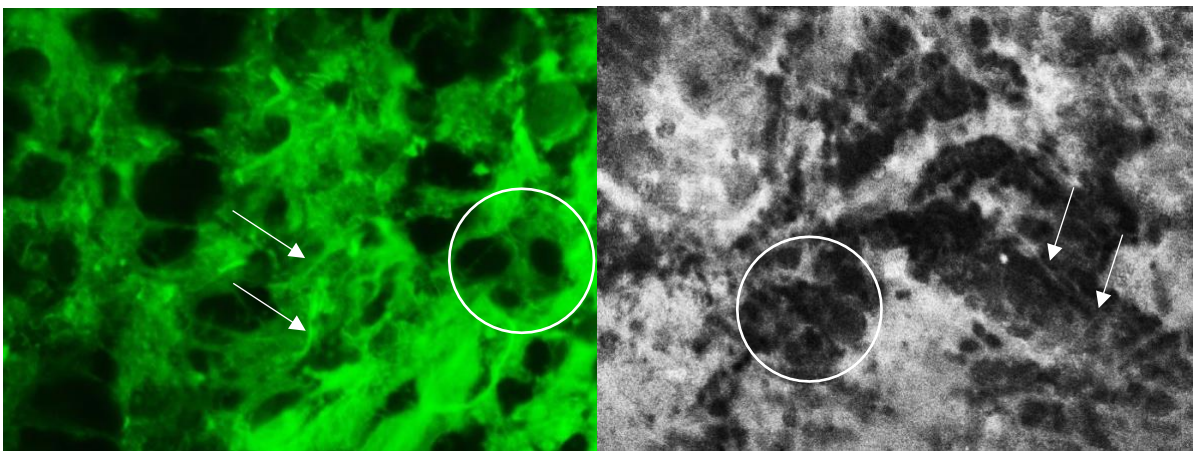


Abbildung 21: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischem Bild von einem Oligodendrogliom, WHO ZNS Grad 3 mit vereinzelt Tumorzellverbände (weiß eingekreist) und gliale Fasern (Pfeile).

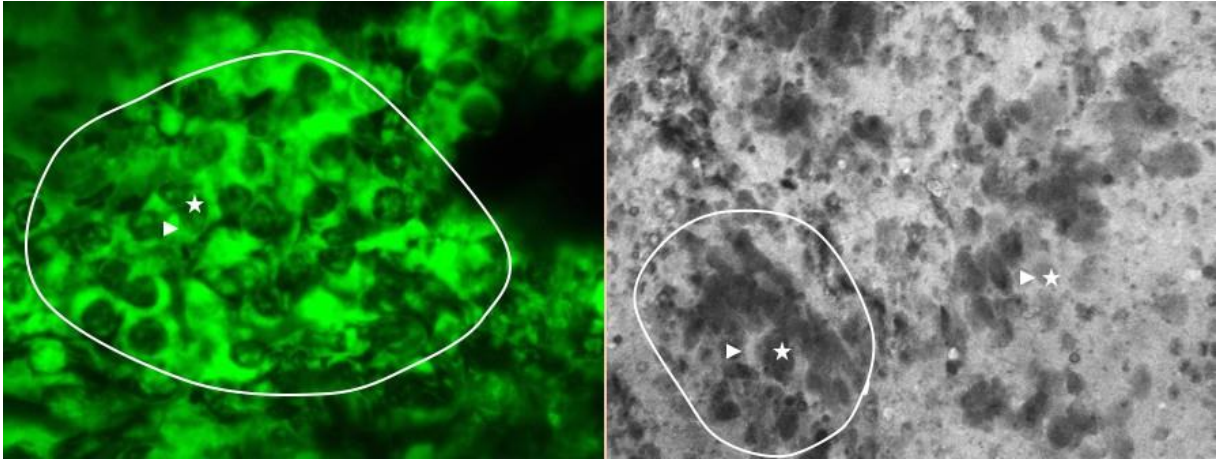


Abbildung 22: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischem Bild von einer Metastase eines Karzinoms des gastroösophagealen Übergangs. Die Tumorzellen sind dicht gruppiert mit großen dunklen Nuclei (Stern) und hellem Zytoplasma (Dreieck).

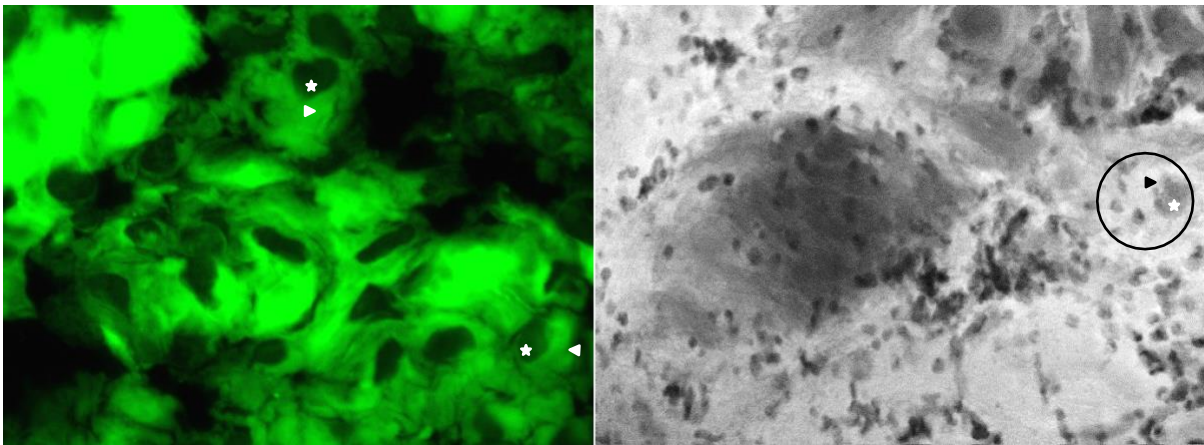


Abbildung 23: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischem Bild von einem Meningotheliomatösen Meningeom, WHO ZNS Grad 1. Große Tumorzellen mit dunklem Kern (Stern) und hellem Zytoplasma (Dreieck).

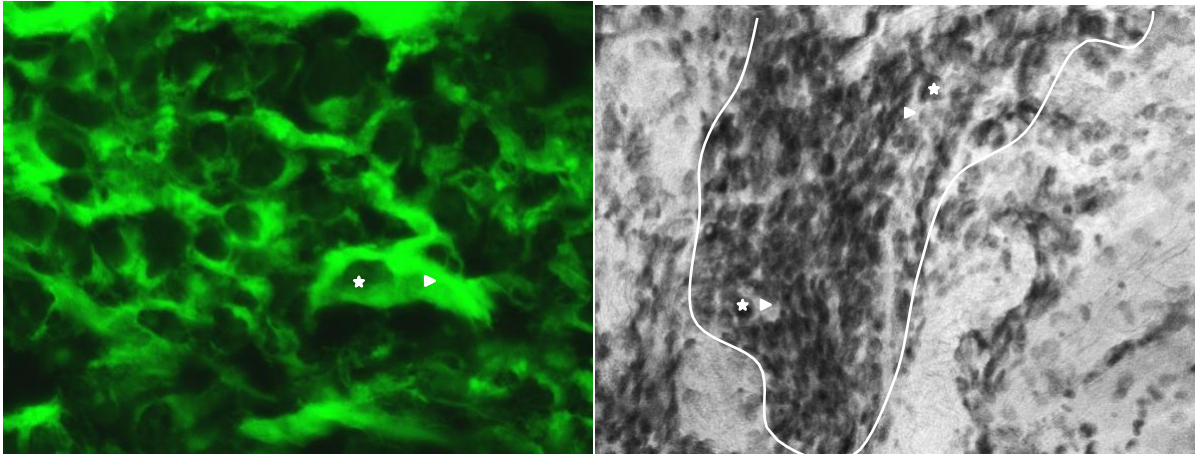


Abbildung 24: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischen Bild von einem Plasmocytom. Zentral dichte Tumorzellverbände (weiß umrandet). Im Fluoreszenzbild große Tumorzelle mit Zellkern (Stern) und ausgeprägt gefärbtem Zytoplasma (Dreieck).

6.3.3.2 Fibrinverteilung Gliafasern

Neben den pathologischen Zellen wurde der hohe Anteil an Gliafasern im Gewebe vom GBM und Oligodendrogliom untersucht. Im *ex vivo* CLE-Bild präsentieren sich diese als gebündelte Komplexe, die hell leuchtend darstellbar sind. Die Fasern lassen sich schwer quantifizieren, es konnten aber in 100% der untersuchten Bilder gleichmäßig im Tumor verteilte Fasern gezeigt werden. Das Pendant in der Fluoreszenzmikroskopie zeigt ebenfalls kräftig fluoreszierende Faserbündel.

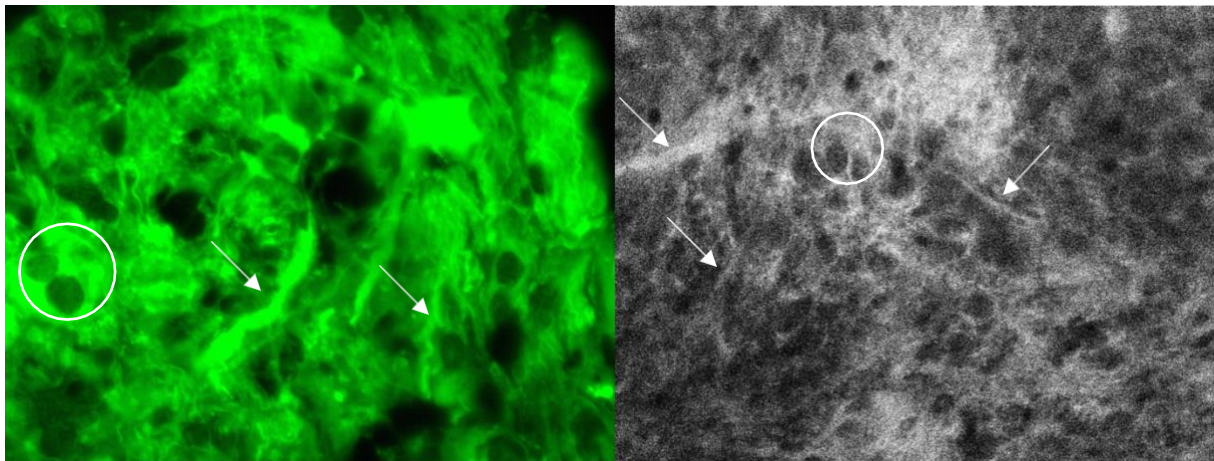


Abbildung 25: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischen Bild von einem Glioblastom, WHO ZNS Grad 4 mit zahlreichen Fasern (Pfeile). Zusätzlich findet man dunkle Zellkerne mit hellem Zytoplasma (eingekreist)

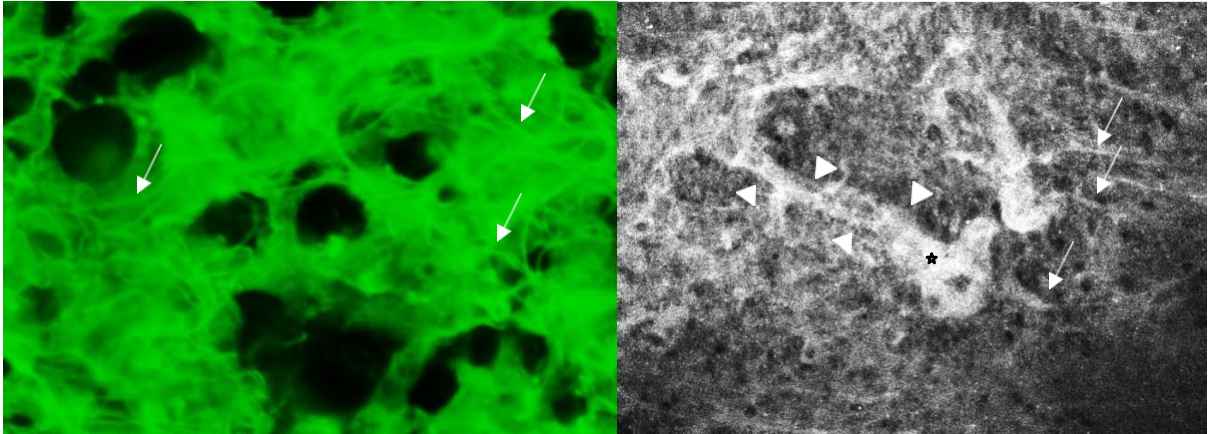


Abbildung 26: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischen Bild von einem Oligodendrogliom mit Gliafaserbündeln (Pfeile) und einer zentralen großen Tumorzelle mit breitem Zytoplasma (Stern) und ortsständige reaktive Astrozyten (Dreiecke).

6.3.3.4 Farbstoffverteilung Astrozytäre Fortsätze

In der Untersuchung des Astrozytoms fallen zwischen den einzelnen Tumorzellen vom Zytoplasma ausgehende Fortsätze auf, die vom Natriumfluorescein deutlich angefärbt werden und somit ein helles Fluoreszenzsignal aussenden. Sie verliehen den Anschein die Zellen untereinander zu verbinden. Die Fortsätze lassen sich im Fluoreszenzmikroskop wiederfinden. Es lässt darauf schließen, dass es sich bei den Fortsätzen um Bestandteile des in der Einleitung erwähnten Kommunikationsnetzwerks der Tumorzellen handelt.

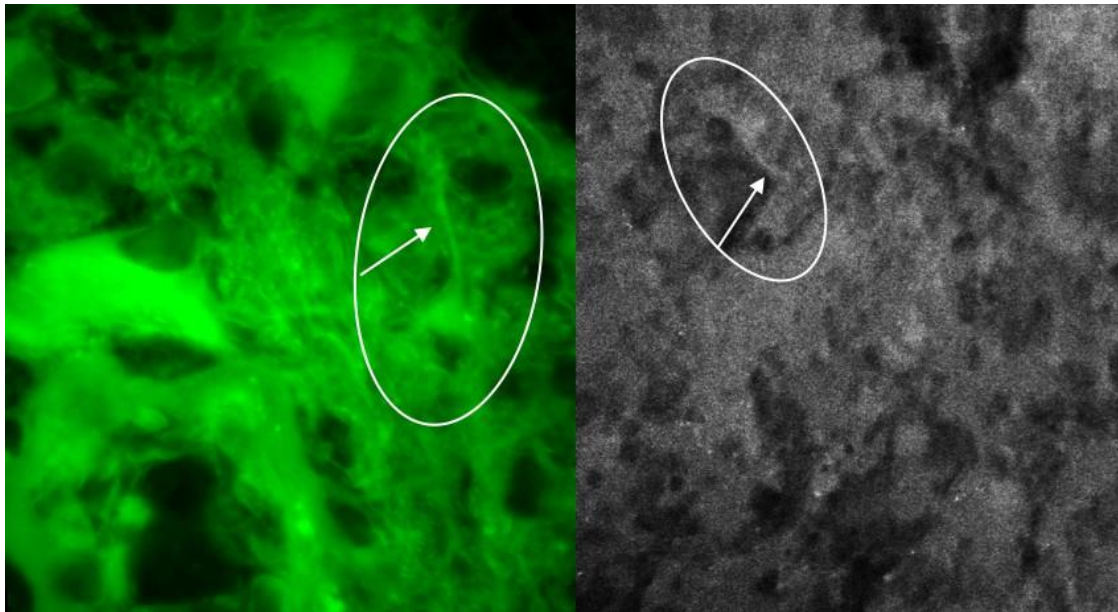


Abbildung 27: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischen Bild von einem Astrozytom WHO Grad 3 mit Fortsätzen (Pfeil) zwischen zwei Tumorzellen

6.3.3.5 Farbstoffverteilung Kollagenfasern

Das besonders in Meningeomen und hirnbildenden Randstrukturen vorzufindende Kollagen kann sowohl in der CLE als auch im Fluoreszenzmikroskop als stark fluoreszierende Strukturen in 100% der Bilder dargestellt werden, eine gleichmäßige Verteilung in den gesamten untersuchten Proben wurde gezeigt.

Das Kollagen ist, bestehend aus Aminosäuren und endogenen Fluorophoren, Bestandteil der extrazellulären Matrix, die zur Autofluoreszenz des Tumorgewebes beiträgt (Monici, 2005).

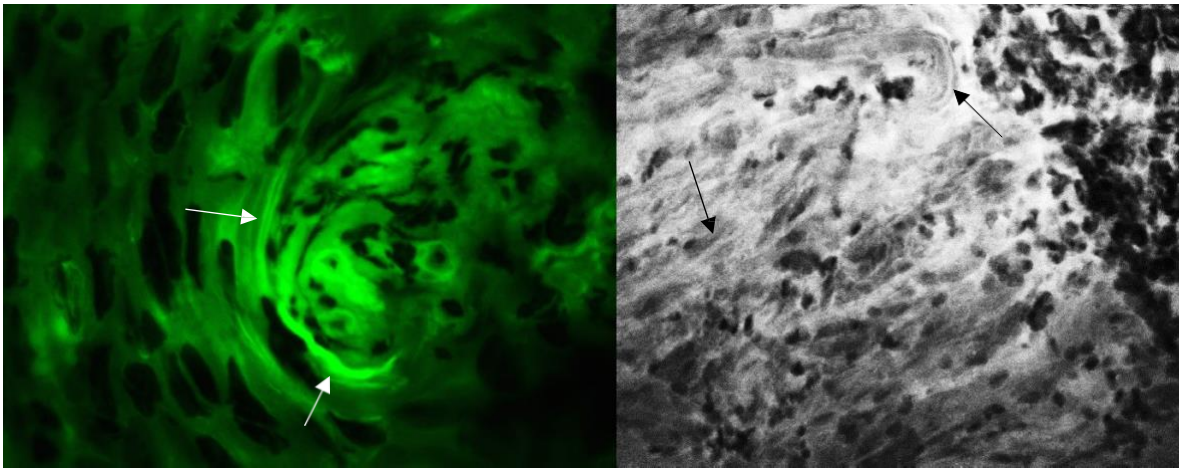


Abbildung 28: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischen Bild von einem Meningeom mit zwiebelschalenartigen Zellverbänden und hohem Kollagenanteil (Pfeile)

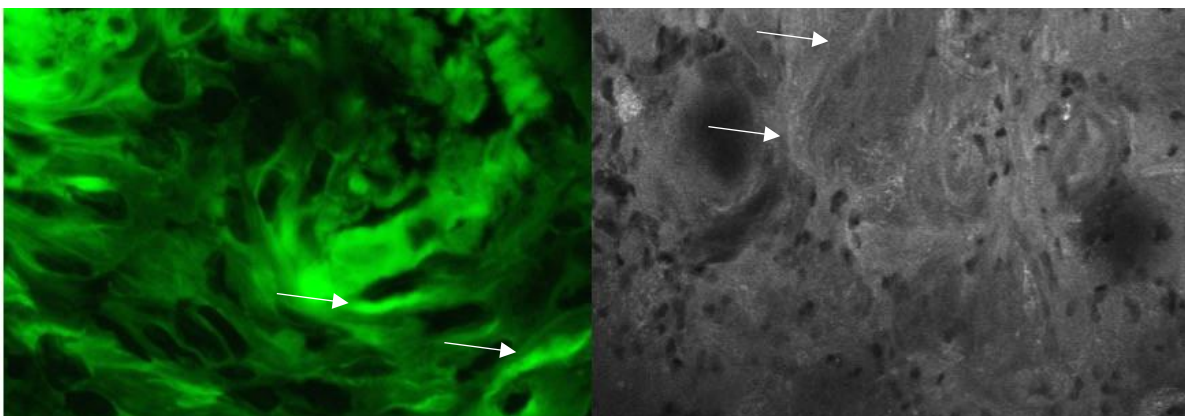


Abbildung 29: CLE Bild (rechts) mit zugehöriger fluoreszenzmikroskopischen Bild von einem Meningeom mit hell fluoreszierendem Kollagen (Pfeile).

6.3.3.6 Farbstoffverteilung Gefäße und Blutzellen

Nach intravenöser Applikation des Natriumfluoresceins ließen sich in zwei untersuchten Proben die tumorversorgenden Gefäße besonders deutlich darstellen. In der Untersuchung der entsprechenden Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop war es jedoch nicht möglich, die Blutgefäße vom restlichen Gewebe zu differenzieren. Beim Betrachten der CLE Bilder fällt auf, dass sich dunkle Zellen in Bahnen durch das Gewebe ziehen. Die dunklen Zellen befinden sich dicht aneinandergereiht und folgen dem Verlauf der hell fluoreszierenden Gefäße. In Z- Stapel Aufnahmen konnte beobachtet werden, dass die dunklen Zellen über und nebeneinander angelagert sind. Da die Zellen in den untersuchten Proben nur in den Bahnen vorzufinden sind, lässt dies auf sich in Gefäßen befindlichen Blutzellen schließen.

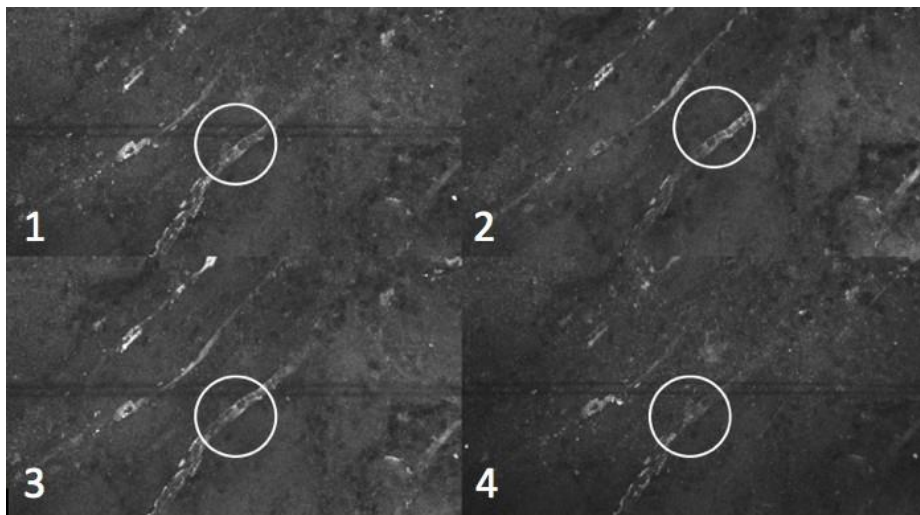


Abbildung 30: CLE Bild Z-Stapel in der Reihenfolge 1 bis 4, von tumorversorgenden Blutgefäßen, in den Gefäßen befinden sich ungefärbte, schwarze Blutzellen

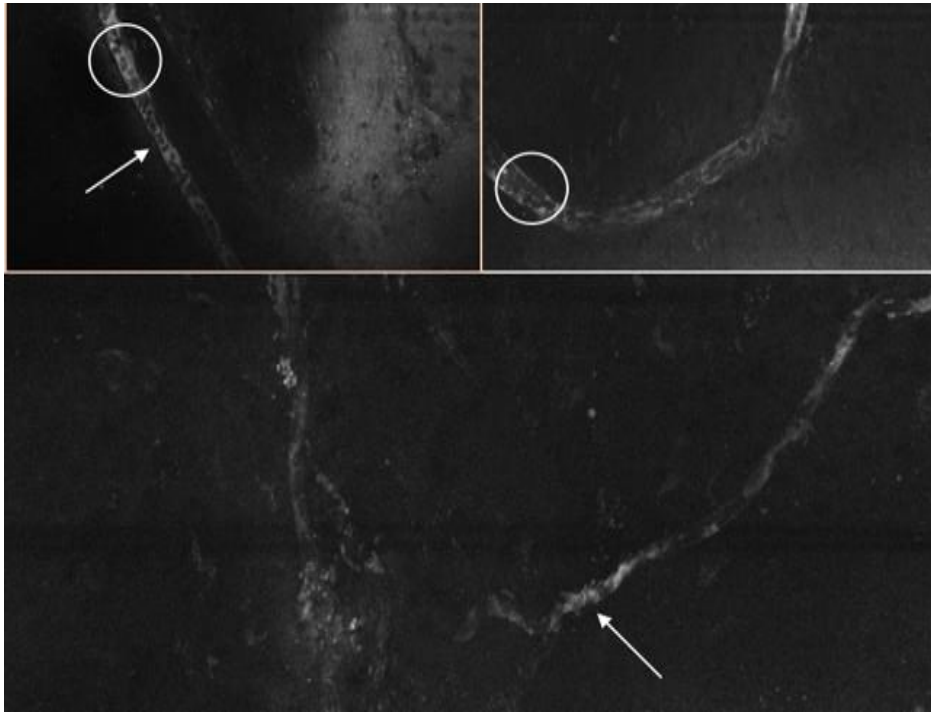


Abbildung 31: CLE Bilder von Fluoreszein transportierenden Blutgefäßen (Pfeil) mit vom Farbstoff ausgesparten Zellen (Kreis)

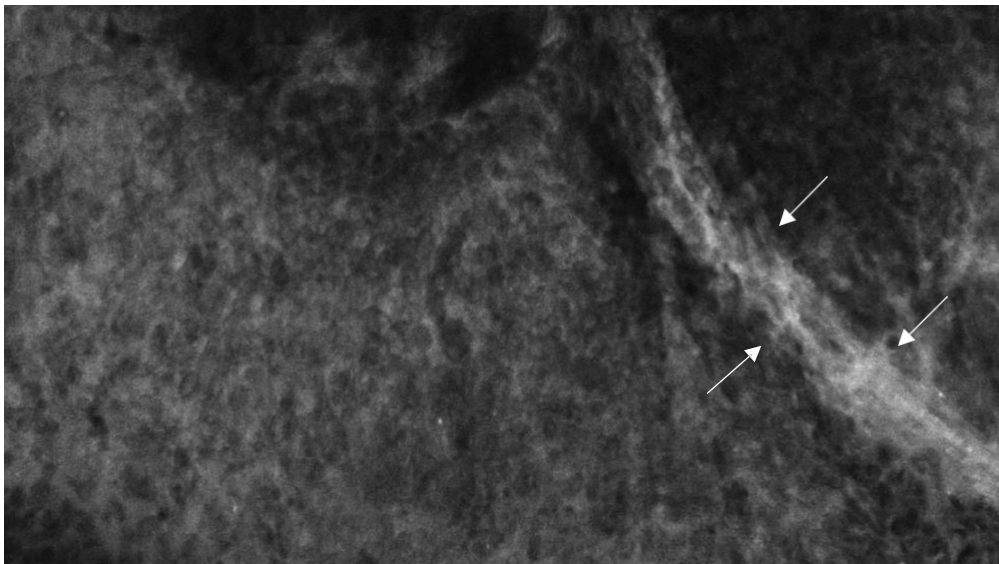


Abbildung 32: CLE Bild von einem Glioblastom, WHO ZNS Grad 4 mit fluoreszierendem Blutgefäß (Pfeile) und dicht angeordneten Tumorzellverbänden.

6.3.3.7 Farbstoffverteilung Nekrose

Zwei Proben mit Nekrose konnten untersucht werden. Nekrotische Areale nehmen Natriumfluorescein verstärkt auf. In 7 der zugrunde gehenden Tumorzellen in Abbildung 29 wurde zudem auch der Nucleus angefärbt. Im CLE Bild präsentierten sich diese Bereiche als breite, weiße Areale. Dies ließ sich auch im Vergleich mit den im Fluoreszenzmikroskop Bildern bestätigen.

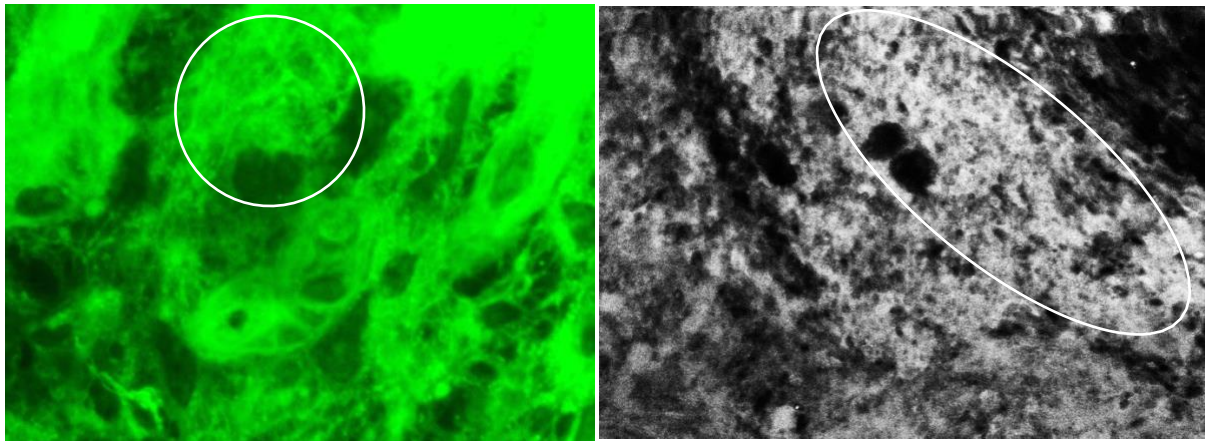


Abbildung 33: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischen Bild von einem Glioblastom, WHO ZNS Grad 4 mit Nekrosebereiche hell gefärbt (eingekreist)

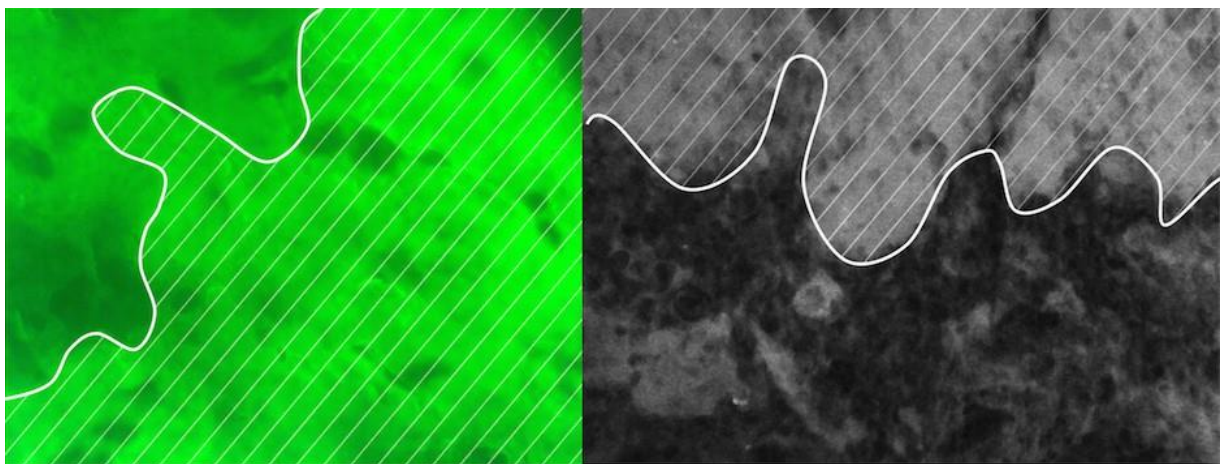


Abbildung 34: CLE Bild (rechts) mit zugehörigem fluoreszenzmikroskopischen Bild von einem Glioblastom, WHO ZNS Grad 4. Die schaffierte Fläche zeigt ein Nekroseareal mit starkem Fluoreszenzsignal

7 Diskussion

Die intraoperative Echtzeitbeurteilung des Tumorgewebes des ZNS stellt in der operativen Therapie bis heute eine Herausforderung dar. Daher werden Methoden zur Optimierung der diagnostischen Prozesse etabliert. Eine dieser neuen Verfahren stellt die CLE dar, die durch intravenöse Färbung und in situ Beurteilung des Gewebe Artefakte vorbeugt und ein Echtzeit Beurteilung des Tumorgewebes ermöglicht. Hier ist jedoch bis dato kaum untersucht, was im Tumor durch die Fluoreszenzfarbstoffe, die für die Methode benötigt werden, gefärbt wird und wie die digital entstandenen Bilder zu interpretieren sind. Im Zuge dieser Studie wird versucht, hier Klarheit zu schaffen.

In einer von uns durchgeführten parallelen Studie wurde als erster Schritt untersucht, ob die mittels CLE generierten Bilder mit den herkömmlichen Methoden vergleichbar sind. Dies erfolgte auch in wenigen anderen Studien (Belykh et al., 2020; Martirosyan et al., 2016).

Ziel dieser Arbeit war es die optimalen Voraussetzungen für die Entstehung diagnostisch verwertbarer CLE Bilder zu schaffen. Somit wurde vorerst die Notwendigkeit eines vitalen Kreislaufs für die Färbung des Tumors untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass auch topisch appliziertes Fluorescein durch unfixiertes Gewebe und auch avitales Gewebe diffundiert und in der CLE dargestellt werden kann.

Des Weiteren musste festgestellt werden, ob ausschließlich der Tumor oder auch umliegendes Gewebe im ZNS vom Natriumfluorescein gefärbt wird. Die Untersuchungen dieser Studie zeigten wie auch schon in anderen Studien (Bergmann et al., 2018) , dass Natriumfluorescein über eine gesunde Blut-Hirn-Schranke nicht in das ZNS dringen kann. Als hydrophile niedermolekulare Verbindung passiert es die Blut-Hirn-Schranke aufgrund fehlender Rezeptoren nicht (Bowden et al., 2018; Mi et al., 2020). So ist das Gewebe um den Tumor mittels CLE nicht darstellbar. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff im Kreislauf ausbreitet und über einen Defekt in der Blut-Hirn-Schranke ins Tumorgewebe des ZNS gelangt. In der Infiltrationszone des Tumors sammelt sich Natriumfluorescein an und ist somit mittels CLE darstellbar. Es sind nur wenige Tumorzellen vorhanden, erfahrene Pathologen können jedoch reaktives Gewebe erkennen. Dieser Bereich des Tumors ist vor allem für eine präzise Tumorsektion von Interesse, da hier auf zellulärer Ebene zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe unterschieden und somit intraoperativ der Umfang einer Resektion neu definiert werden könnte.

Wie die Untersuchung der Zeitspanne des sich im Kreislauf befindenden Farbstoffes gezeigt haben, ist der zeitliche Aspekt weniger ausschlaggebend als ursprünglich erwartet. In den ersten 30 bis 60 Minuten nach Farbstoffgabe besteht kein wesentlicher Einfluss auf die Signalstärke des Natriumfluorescein. Bilder, die direkt nach verabreichen des Farbstoffes entstehen sind sehr hell und können jedoch mit Hilfe der Kontrast und Helligkeitseinstellungen am Gerät modifiziert werden. Es empfiehlt sich nach Gabe des Farbstoffes einige Minuten zu warten, um das erste Anfluten des Natriumfluorescein abzuwarten. In der ersten Stunde nach Farbstoffgabe ändert sich an der Qualität der Bilder nichts Signifikantes. Ist der Farbstoff jedoch länger als eine Stunde im vitalen Kreislauf wird das Fluoreszenzsignal schwächer. Die Untersuchungen der Patientenproben nach 87 und 95 Minuten haben dies bestätigt. Andere Studien wiederum zeigen, dass eine zweite Färbung direkt vor Probenexzision die Bildqualität optimiert. (Abramov et al., 2021). Im Mittel befand sich der Farbstoff 24 Minuten im System bevor eine Probe entnommen wurde, dies ist zu empfehlen, um den chirurgischen Ablauf nicht zum Nachteil des Patienten zu verlängern. Als grobe Orientierung wurde die Farbstoffgabe bei Eröffnung der Dura festgelegt, dies ist ein im klinischen Alltag praktikabler Ansatz.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass ein optimal beurteilbares CLE Bild 30 bis 60 Minuten nach Probenentnahme eines intravenös gefärbten und unfixierten Tumorgewebes entsteht.

In Hinblick auf die Farbstoffaffinität der häufigen Tumorentitäten des ZNS gegenüber des Natriumfluoresceins konnten Unterschiede gezeigt werden. In dieser Studie nahmen Metastasen und Meningeome das Natriumfluorescein besonders gut auf. Es entstehen scharfe Bilder, die die Zytomorphologie gut darstellen. Auch Plexuspapillome und Schwannome senden ein starkes Fluoreszenzsignal aus. Untersucht man die entstandenen CLE Bilder von GBM WHO ZNS Grad 4 fällt ein diffuses Erscheinungsbild auf. Es existieren Bereiche unterschiedlicher Färbeintensität. Dies könnte durch die im Tumor vorhandene Heterogenität erklärt werden (Jung et al., 1999). Auch das GBM WHO ZNS Grad 4 Rezidiv lässt sich mittels CLE beurteilen. Die Untersuchungen haben weiter ergeben, dass Oligodendrogliome WHO ZNS Grad 3 den Farbstoff weniger stark aufnehmen als die restlichen Tumorentitäten. Hier würde eine Dosissteigerung des Farbstoffes einen Vorteil bringen. Im Vergleich schlagen andere Studien eine Dosierung von bis zu 40 mg pro Kilo vor (Belykh et al., 2019).

Als nächster Schritt wurde untersucht welche Strukturen im Tumorgewebe von Natriumfluorescein gefärbt werden, um die diagnostische Beurteilbarkeit der Bilder zu objektivieren. Wie bereits andere Studien gezeigt haben, färbt der Farbstoff die Tumorzellkerne nicht (Belykh et al., 2019; Evgenii Belykh et al., 2018). Das Zytoplasma und extrazelluläre Matrix jedoch emittieren ein starkes Fluoreszenzsignal. Blutgefäße sind mittels CLE gut darstellbar, die in den Gefäßen vorhandene Blutzellen, bleiben vom Farbstoff ausgespart. Dies würde die Theorie der intravenösen Farbstoffverteilung und Färbung des Gewebes bei einem Defekt der Blut-Hirn-Schranke erhärten. Viel Farbstoff nehmen außerdem nekrotische Bereiche im Tumor auf. In diesen Bereichen des Tumors konnte man auch zum Teil angefärbte Kerne erkennen. Dies lässt die Frage offen welche Mechanismen in nekrotischen Zellen für die Farbstoffanreicherung im Zellkern sorgen. Das Zytoplasma emittierte das stärkste Fluoreszenzsignal. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der Anteil an Mitochondrien und Lysosomen, die darin enthalten sind, sein. Gliafasern und astrozytäre Fortsätze im Tumor konnten in den Bildern dargestellt werden. Sowohl in den CLE Bildern als auch im Vergleich im Fluoreszenzmikroskop zeigte sich, dass die astrozytären Fortsätze Zellen miteinander verbinden. Untersuchungen vermuten hinter diesen Fortsätzen ein neuronales Netzwerk über das die Tumorzellen miteinander kommunizieren können (Osswald et al., 2015). Interessant wäre es zu untersuchen, ob sich auch der Farbstoff auf diesem Weg im Tumorgewebe verteilt oder er nur durch das Gewebe diffundiert.

Neben dem von uns genutzten Farbstoff Natriumfluorescein, besteht die Frage der Nutzung weiterer Fluoreszenzfarbstoffe in der CLE. So wird Acriflavin Hydrochlorid in anderen Studien zur *ex vivo* Färbung humaner Epithelzellen genutzt. Weitere herkömmliche Fluoreszenzfarbstoffe sind 5-Aminolevulin Säure und Indocyaningrün. Es werden jedoch auch andere Farbstoffe zur CLE-Färbung genutzt. Welche der Farbstoffe am Ende der effizienteste ist, gilt zu untersuchen. Auch ob eine Färbung des Gewebes notwendig ist oder label-free Ansätze verfolgt werden könnten steht offen. (Belykh et al., 2016; El Hallani et al., 2013)

Um die CLE als diagnostisches Hilfsmittel im klinischen Alltag zu etablieren, bedarf es neben der optimalen Farbstoffanwendung ein Verständnis für das auf den Bildern dargestellte Gewebe. Anfangs kann das schwarz-weiße Bild der CLE leicht zu Verwirrung und Verwechslungen in der Diagnostik führen. Blutzellen beispielsweise, die auf einigen der entnommenen Proben noch vorhanden sind vermitteln oft das Bild eines kleinzelligen Tumors mit sehr hoher Zelldichte. Bereiche, die viel Fluoreszenz aussenden, können sowohl als

Nekrose als auch als extrazelluläre Matrix interpretiert werden. Dies macht eine Diagnosestellung allein durch die CLE schwer. In Hinblick auf den Vergleich der Bilder mit der Fluoreszenzmikroskopie bleibt zu klären ob die Schnitte durch fixieren und färben tatsächlich unverändert und somit vergleichbar sind (Feldman & Wolfe, 2014).

Die CLE soll in Zukunft die intraoperative Diagnostik beschleunigen und Kosten sparen (Martirosyan et al., 2018). Die Bilder, die direkt im Operationssaal entstehen, könnten künftig digital an die Pathologie übermittelt und eine sofortige Diagnosestellung eingeleitet werden. Um möglichst aussagekräftige Bilder zu generieren ist es jedoch essentiell ein genaues Arbeitsprotokoll zu definieren und dieses einzuhalten. Basierend auf dem Wissen, dass gesundes Gehirn vom Farbstoff nicht angefärbt wird, könnte der Resektionsrand auf zellulärer Ebene bestimmt werden. Dieser Aspekt verschafft der Methode in Hinblick auf das Beschleunigen der Diagnostik den größten Vorteil.

Die Untersuchungen wurden an *ex vivo* Gewebeproben durchgeführt. Die Proben konnten auf die Lasersonde gelegt und die Position mit einer Pinzette verändert werden, um diese möglichst umfangreich zu veranschaulichen und scharfe Bilder zu erhalten. In künftigen *in vivo* Versuchen gilt es zu untersuchen, inwiefern die Handhabung der Sonde in Bezug auf eine scharfe Abbildung angepasst werden muss. Faktoren, die eine Rolle spielen sollten sind das Halten der Sonde durch den Neurochirurgen oder eventuelle Vorrichtungen, sowie das pulsierende menschliche Gehirn. Beides könnte das Generieren diagnostisch verwertbarer, scharfer Bilder beeinträchtigen.

Bevor jedoch die neue Methode den aktuellen Goldstandard ergänzen kann, bedarf es neben dem intensiven Training der Chirurgen in der Handhabung die Schulung der Pathologen. Hilfreich wäre es einen ausführlichen Atlas mit vergleichbaren Bildern herkömmlicher Methoden zu erstellen und so das Auge auf das Färbeverhalten der neuen Methode zu schulen.

8 Zusammenfassung

Die Konfokale Laser Endomikroskopie ist eine sich neu etablierende Methode in der intraoperativen Echtzeitdarstellung maligner Entartungen des ZNS. Durch sie könnten gegebenenfalls Artefakte in der histologischen Untersuchung, die durch Fixation und Färbung entstehen, minimiert und die Diagnostik optimiert werden. Hierzu werden intravenös applizierbare Fluoreszenzfarbstoffe, wie in dieser Studie das Natriumfluorescein, benötigt. Für die Eignung der Methode im klinischen Alltag, gilt es, das Farbstoffverhalten im Tumorgewebe vorerst *ex vivo* zu untersuchen. Unsere Studie zeigt, dass *ex vivo* die Probenentnahme 30 bis 60 Minuten nach intravenöser Färbung optimal beurteilbare CLE Bilder entstehen lässt. Des Weiteren färben sich unterschiedliche Tumortypen mit variierender Intensität. Besonders schöne CLE Bilder entstehen bei GBM WHO ZNS Grad 4, Meningeomen und Metastasen. Oligodendrogliome WHO ZNS Grad 3 nehmen den Farbstoff vermindert auf. Das Tumorzentrum, hier insbesondere das Zytoplasma der Tumorzellen, wird vom Natriumfluorescein gefärbt, umliegendes Gehirn jedoch ausgespart. In der Infiltrationszone akkumuliert der Farbstoff und lässt den Pathologen einen malignen Umbauprozess erkennen. Die CLE könnte in Zukunft als unterstützende Methode in der Resektionsrandbestimmung und Diagnostik etabliert werden. Jedoch setzt dies weitere Untersuchungen der Farbstoffverteilung in *in vivo* Bildern, sowie intensives Training in der Handhabung der Lasersonde und Bildbeurteilung voraus.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Betreuer Herrn Prof. Jürgen Schlegel, der mir stets mit konstruktiven Ratschlägen zur Seite stand und mir viele einmalige Einblicke in die Welt der Wissenschaft und Lehre geboten hat.

Des Weiteren gebührt meine Dankbarkeit meiner Mentorin PD Dr. med. Friederike Liesche-Starnecker, die mich sowohl menschlich als auch fachlich in jeder Lebenslage abgeholt, unterstützt und durch den Prozess der Arbeit getragen hat. Ohne deine Unterstützung wäre vieles nicht möglich gewesen und ich möchte mich von ganzem Herzen bei dir bedanken!

Ein besonderer Dank gilt allen PatientInnen, die der Untersuchung zugestimmt haben und somit einen Beitrag in der Entwicklung von neuen Behandlungsansätzen geleistet haben.

Ebenfalls herzlichen Dank an Herrn Prof. Bernhard Meyer und Dr. Jens Gempt für die Geduld im Umgang mit uns Studenten und die Gastfreundschaft im OP.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Zu guter Letzt geht mein Dank an meinen Laborzwilling und Weggefährten Johann Gerd Bierlein. Du warst in vielen Situationen eine große Stütze. Durch die Zusammenarbeit habe ich gelernt im Team zu arbeiten, sich Aufgaben zu teilen und trotzdem den Überblick zu behalten. Danke!

10 Literaturverzeichnis

- Abd-Ellah, M. K., Awad, A. I., Khalaf, A. A. M., & Hamed, H. F. A. (2019). A review on brain tumor diagnosis from MRI images: Practical implications, key achievements, and lessons learned. *Magn Reson Imaging*, *61*, 300-318.
<https://doi.org/10.1016/j.mri.2019.05.028>
- Abramov, I., Dru, A. B., Belykh, E., Park, M. T., Bardanova, L., & Preul, M. C. (2021). Redosing of Fluorescein Sodium Improves Image Interpretation During Intraoperative Ex Vivo Confocal Laser Endomicroscopy of Brain Tumors. *Front Oncol*, *11*, 668661. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.668661>
- Acerbi, F., Broggi, M., Eoli, M., Anghileri, E., Cavallo, C., Boffano, C., Cordella, R., Cuppini, L., Pollo, B., Schiariti, M., Visintini, S., Orsi, C., La Corte, E., Broggi, G., & Ferroli, P. (2014). Is fluorescein-guided technique able to help in resection of high-grade gliomas? *Neurosurg Focus*, *36*(2), E5.
<https://doi.org/10.3171/2013.11.Focus13487>
- Acerbi, F., Pollo, B., De Laurentis, C., Restelli, F., Falco, J., Vetrano, I. G., Broggi, M., Schiariti, M., Tramacere, I., Ferroli, P., & DiMeco, F. (2020). Ex Vivo Fluorescein-Assisted Confocal Laser Endomicroscopy (CONVIVO® System) in Patients With Glioblastoma: Results From a Prospective Study. *Front Oncol*, *10*, 606574. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.606574>
- Amraei, R., Moradi, A., Zham, H., Ahadi, M., Baikpour, M., & Rakhshan, A. (2017). A Comparison between the Diagnostic Accuracy of Frozen Section and Permanent Section Analyses in Central Nervous System. *Asian Pac J Cancer Prev*, *18*(3), 659-666. <https://doi.org/10.22034/apjcp.2017.18.3.659>
- Barry, R. E., & Behrendt, W. A. (1985). Studies on the pharmacokinetics of fluorescein and its dilaurate ester under the conditions of the fluorescein dilaurate test. *Arzneimittelforschung*, *35*(3), 644-648.
- Belykh, E., Cavallo, C., Gandhi, S., Zhao, X., Veljanoski, D., Izady Yazdanabadi, M., Martirosyan, N. L., Byvaltsev, V. A., Eschbacher, J., Preul, M. C., & Nakaji, P. (2018). Utilization of intraoperative confocal laser endomicroscopy in brain tumor surgery. *J Neurosurg Sci*, *62*(6), 704-717.
<https://doi.org/10.23736/s0390-5616.18.04553-8>

- Belykh, E., Martirosyan, N. L., Yagmurlu, K., Miller, E. J., Eschbacher, J. M., Izadyyazdanabadi, M., Bardanova, L. A., Byvaltsev, V. A., Nakaji, P., & Preul, M. C. (2016). Intraoperative Fluorescence Imaging for Personalized Brain Tumor Resection: Current State and Future Directions. *Front Surg*, 3, 55. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00055>
- Belykh, E., Miller, E. J., Carotenuto, A., Patel, A. A., Cavallo, C., Martirosyan, N. L., Healey, D. R., Byvaltsev, V. A., Scheck, A. C., Lawton, M. T., Eschbacher, J. M., Nakaji, P., & Preul, M. C. (2019). Progress in Confocal Laser Endomicroscopy for Neurosurgery and Technical Nuances for Brain Tumor Imaging With Fluorescein. *Front Oncol*, 9, 554. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00554>
- Belykh, E., Patel, A. A., Miller, E. J., Bozkurt, B., Yagmurlu, K., Woolf, E. C., Scheck, A. C., Eschbacher, J. M., Nakaji, P., & Preul, M. C. (2018). Probe-based three-dimensional confocal laser endomicroscopy of brain tumors: technical note. *Cancer Manag Res*, 10, 3109-3123. <https://doi.org/10.2147/cmar.S165980>
- Belykh, E., Patel, A. A., Miller, E. J., Bozkurt, B., Yağmurlu, K., Woolf, E. C., Scheck, A. C., Eschbacher, J. M., Nakaji, P., & Preul, M. C. (2018). Probe-based three-dimensional confocal laser endomicroscopy of brain tumors: technical note. *Cancer management and research*, 10, 3109-3123. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S165980>
- Belykh, E., Zhao, X., Ngo, B., Farhadi, D. S., Byvaltsev, V. A., Eschbacher, J. M., Nakaji, P., & Preul, M. C. (2020). Intraoperative Confocal Laser Endomicroscopy Ex Vivo Examination of Tissue Microstructure During Fluorescence-Guided Brain Tumor Surgery. *Front Oncol*, 10, 599250. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.599250>
- Bergmann, S., Lawler, S. E., Qu, Y., Fadzen, C. M., Wolfe, J. M., Regan, M. S., Pentelute, B. L., Agar, N. Y. R., & Cho, C. F. (2018). Blood-brain-barrier organoids for investigating the permeability of CNS therapeutics. *Nat Protoc*, 13(12), 2827-2843. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0066-x>
- Black, P. M., Moriarty, T., Alexander, E., 3rd, Stieg, P., Woodard, E. J., Gleason, P. L., Martin, C. H., Kikinis, R., Schwartz, R. B., &

- Jolesz, F. A. (1997). Development and implementation of intraoperative magnetic resonance imaging and its neurosurgical applications. *Neurosurgery*, 41(4), 831-842; discussion 842-835. <https://doi.org/10.1097/00006123-199710000-00013>
- Bowden, S. G., Neira, J. A., Gill, B. J. A., Ung, T. H., Englander, Z. K., Zanazzi, G., Chang, P. D., Samanamud, J., Grinband, J., Sheth, S. A., McKhann, G. M., 2nd, Sisti, M. B., Canoll, P., D'Amico, R. S., & Bruce, J. N. (2018). Sodium Fluorescein Facilitates Guided Sampling of Diagnostic Tumor Tissue in Nonenhancing Gliomas. *Neurosurgery*, 82(5), 719-727. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyx271>
- Brancato, R., & Trabucchi, G. (1998). Fluorescein and Indocyanine Green Angiography in Vascular Chorioretinal Diseases. *Seminars in Ophthalmology*, 13(4), 189-198. <https://doi.org/10.3109/08820539809056052>
- Buckner, J. C. (2003). Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Seminars in Oncology*, 30, 10-14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2003.11.031>
- Chan, J. K. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol*, 22(1), 12-32. <https://doi.org/10.1177/1066896913517939>
- Charalampaki, P., Nakamura, M., Athanasopoulos, D., & Heimann, A. (2019). Confocal-Assisted Multispectral Fluorescent Microscopy for Brain Tumor Surgery. *Front Oncol*, 9, 583. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00583>
- El Hallani, S., Poh, C. F., Macaulay, C. E., Follen, M., Guillaud, M., & Lane, P. (2013). Ex vivo confocal imaging with contrast agents for the detection of oral potentially malignant lesions. *Oral Oncol*, 49(6), 582-590. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.01.009>
- Evilsizor, M. N., Ray-Jones, H. F., Lifshitz, J., & Ziebell, J. (2015). Primer for immunohistochemistry on cryosectioned rat brain tissue: example staining for microglia and neurons. *J Vis Exp*(99), e52293. <https://doi.org/10.3791/52293>
- Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol*, 1180, 31-43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3

- Fink, J. R., Muzi, M., Peck, M., & Krohn, K. A. (2015). Multimodality Brain Tumor Imaging: MR Imaging, PET, and PET/MR Imaging. *J Nucl Med*, 56(10), 1554-1561. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.131516>
- Fotteler, M., Heninger, L., Holl, F., Schlegel, J., & Swoboda, W. (2019). Confocal Laser Endomicroscopy for Intraoperative Tumor Assessment: Development of a Conceptual Model for an Evaluation Study. *Stud Health Technol Inform*, 262, 376-379. <https://doi.org/10.3233/shti190097>
- Hall, W. A. (1998). The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions. *Cancer*, 82(9), 1749-1755. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19980501\)82:9<1756::aid-cnrcr23>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19980501)82:9<1756::aid-cnrcr23>3.0.co;2-2)
- Hara, T., Inami, M., & Hara, T. (1998). Efficacy and safety of fluorescein angiography with orally administered sodium fluorescein. *Am J Ophthalmol*, 126(4), 560-564. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(98\)00112-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(98)00112-3)
- Haybaeck, J., von Campe, G., & Hainfellner, J. A. (2012). [Rapid frozen sections in neuropathology]. *Pathologe*, 33(5), 379-388. <https://doi.org/10.1007/s00292-012-1604-x> (Der Schnellschnitt in der Neuropathologie.)
- Herbort, C. P. (2009). Fluorescein and indocyanine green angiography for uveitis. *Middle East African journal of ophthalmology*, 16(4), 168-187. <https://doi.org/10.4103/0974-9233.58419>
- Höhne, J., Schebesch, K. M., Zoubaa, S., Proescholdt, M., Riemenschneider, M. J., & Schmidt, N. O. (2021). Intraoperative imaging of brain tumors with fluorescein: confocal laser endomicroscopy in neurosurgery. Clinical and user experience. *Neurosurg Focus*, 50(1), E19. <https://doi.org/10.3171/2020.11.Focus20783>
- Hu, S., Kang, H., Baek, Y., El Fakhri, G., Kuang, A., & Choi, H. S. (2018). Real-Time Imaging of Brain Tumor for Image-Guided Surgery. *Adv Healthc Mater*, 7(16), e1800066. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800066>

- Jung, V., Romeike, B. F., Henn, W., Feiden, W., Moringlane, J. R., Zang, K. D., & Urbschat, S. (1999). Evidence of focal genetic microheterogeneity in glioblastoma multiforme by area-specific CGH on microdissected tumor cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(9), 993-999. <https://doi.org/10.1097/00005072-199909000-00009>
- Kornblau, I. S., & El-Annan, J. F. (2019). Adverse reactions to fluorescein angiography: A comprehensive review of the literature. *Surv Ophthalmol*, 64(5), 679-693. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2019.02.004>
- Langen, K.-J., & Galldiks, N. (2022). Update nuklearmedizinische Bildgebung von Gehirntumoren und -metastasen [Update nuclear medicine imaging of brain tumours and metastases]. *Angewandte Nuklearmedizin*, 45(04), 351-359. <https://doi.org/10.1055/a-1712-6180>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*, 23(8), 1231-1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Martirosyan, N. L., Eschbacher, J. M., Kalani, M. Y., Turner, J. D., Belykh, E., Spetzler, R. F., Nakaji, P., & Preul, M. C. (2016). Prospective evaluation of the utility of intraoperative confocal laser endomicroscopy in patients with brain neoplasms using fluorescein sodium: experience with 74 cases. *Neurosurg Focus*, 40(3), E11. <https://doi.org/10.3171/2016.1.Focus15559>
- Martirosyan, N. L., Georges, J., Eschbacher, J. M., Belykh, E., Carotenuto, A., Spetzler, R. F., Nakaji, P., & Preul, M. C. (2018). Confocal scanning microscopy provides rapid, detailed intraoperative histological assessment of brain neoplasms: Experience with 106 cases. *Clin Neurol Neurosurg*, 169, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2018.03.015>
- Martirosyan, N. L., Georges, J., Eschbacher, J. M., Cavalcanti, D. D., Elhadi, A. M., Abdelwahab, M. G., Scheck, A. C., Nakaji, P., Spetzler, R. F., & Preul, M. C. (2014). Potential application of a handheld confocal endomicroscope imaging system using a variety of fluorophores in experimental gliomas and normal

- brain. *Neurosurg Focus*, 36(2), E16.
<https://doi.org/10.3171/2013.11.FOCUS13486>
- McGirt, M. J., Chaichana, K. L., Attenello, F. J., Weingart, J. D., Than, K., Burger, P. C., Olivi, A., Brem, H., & Quinoñes-Hinojosa, A. (2008). Extent of surgical resection is independently associated with survival in patients with hemispheric infiltrating low-grade gliomas. *Neurosurgery*, 63(4), 700-707; author reply 707-708.
<https://doi.org/10.1227/01.Neu.0000325729.41085.73>
- Mi, Y., Mao, Y., Cheng, H., Ke, G., Liu, M., Fang, C., & Wang, Q. (2020). Studies of blood-brain barrier permeability of gastrodigenin in vitro and in vivo. *Fitoterapia*, 140, 104447.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104447>
- Ml'kvy, P., Messmann, H., Regula, J., Conio, M., Pauer, M., Millson, C. E., MacRobert, A. J., & Bown, S. G. (1995). Sensitization and photodynamic therapy (PDT) of gastrointestinal tumors with 5-aminolaevulinic acid (ALA) induced protoporphyrin IX (PPIX). A pilot study. *Neoplasma*, 42(3), 109-113.
- Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 11, pp. 227-256). Elsevier.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2)
- Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., Huang, L., Ratliff, M., Karimian Jazi, K., Kurz, F. T., Schmenger, T., Lemke, D., Gommel, M., Pauli, M., Liao, Y., . . . Winkler, F. (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, 528(7580), 93-98.
<https://doi.org/10.1038/nature16071>
- Ottenhausen, M., Krieg, S. M., Meyer, B., & Ringel, F. (2015). Functional preoperative and intraoperative mapping and monitoring: increasing safety and efficacy in glioma surgery. *Neurosurg Focus*, 38(1), E3.
<https://doi.org/10.3171/2014.10.Focus14611>
- Restelli, F., Mathis, A. M., Höhne, J., Mazzapicchi, E., Acerbi, F., Pollo, B., & Quint, K. (2022). Confocal laser imaging in neurosurgery: A comprehensive review of sodium fluorescein-

- based CONVIVO preclinical and clinical applications. *Front Oncol*, 12, 998384. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.998384>
- Restelli, F., Pollo, B., Vetrano, I. G., Cabras, S., Broggi, M., Schiariti, M., Falco, J., de Laurentis, C., Raccuia, G., Ferroli, P., & Acerbi, F. (2021). Confocal Laser Microscopy in Neurosurgery: State of the Art of Actual Clinical Applications. *J Clin Med*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/jcm10092035>
- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., & Bootman, M. D. (2014). Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor protocols*, 2014(10), pdb.top071795-pdb.top071795. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., & Reulen, H. J. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, 7(5), 392-401. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(06)70665-9)
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*, 99(1), 21-78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>
- Tsang, S. H., & Sharma, T. (2018). Fluorescein Angiography. In S. H. Tsang & T. Sharma (Eds.), *Atlas of Inherited Retinal Diseases* (pp. 7-10). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95046-4_2
- van den Bent, M. J., Weller, M., Wen, P. Y., Kros, J. M., Aldape, K., & Chang, S. (2017). A clinical perspective on the 2016 WHO brain tumor classification and routine molecular diagnostics. *Neuro Oncol*, 19(5), 614-624. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now277>

Weil, S., Osswald, M., Solecki, G., Grosch, J., Jung, E., Lemke, D., Ratliff, M., Hänggi, D., Wick, W., & Winkler, F. (2017). Tumor microtubules convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas. *Neuro Oncol*, *19*(10), 1316-1326.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/nox070>

11 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DAS CLE GERÄT CONVIVO - DIE BILDER ZEIGEN DIE FLEXIBLE LASERSONDE MIT GEWEBEPROBE (EINGEKREIST), SOWIE DAS CLE-MIKROSKOP IM OPERATIVEN SETTING, BESTEHEND AUS MONITOR (PFEIL) UND GERÄTEWAGEN (STERN).....	8
ABBILDUNG 2: FUNKTIONSPRINZIP DER LASERSONDE, KONFOKALE ENDOMIKROSKOPIE BEI HIRNOPERATIONEN (AUS: LEIERSEDER, 2018).....	9
ABBILDUNG 3: DIE ABBILDUNG ZEIGT DIE WICHTIGSTEN SCHRITTE DES INTRAVENÖSEN ARBEITSPROTOKOLLS	22
ABBILDUNG 4: DIE BILDER ZEIGEN DEN MAKROSKOPISCHEN INTRAOPERATIVEN SITUS, LINKS OHNE NATRIUMFLUORESCHEIN. IM BILD RECHTS ZEIGT SICH DIESER NACH FLUORESCHEINGABE HELL LEUCHTEND.	22
ABBILDUNG 5: DIE FRAGESTELLUNG DES PATHOLOGEN BEI DIAGNOSTIK MITTELS CLE BILDER	23
ABBILDUNG 6: DIAGRAMM ZUR BEURTEILBARKEIT DER PROBEN. 38 GEWEBEPROBEN ERKANNTEN DER PATHOLOGE ALS PATHOLOGISCH VERÄNDERT. 33 DIESER 38 PROBEN (86,84%) WURDEN ALS TUMOR BEURTEILT UND IN 26 DIESER 33 PATIENTENPROBEN (78,78%) KONNTE DIE ENTITÄT BESTIMMT WERDEN.....	26
ABBILDUNG 7: <i>EX VIVO</i> CLE-BILDER TOPISCH GEFÄRBTES HUMANER TUMORGEWEBES. A ZEIGT EINE UNFIXIERTE PROBE MIT TUMORZELLVERBÄNDEN (WEIßE MARKIERUNG) UND UMLIEGENDEM GEWEBE(WEIßER STERN). IN B WIRD FIXIERTES, TOPISCH GEFÄRBTES GEWEBE GEZEIGT, DAS TUMORGEWEBE IST MITTELS CLE KAUM DARSTELLBAR. BEI DEN HELLEN FLECKEN (SCHWARZER KREIS) HANDELT ES SICH UM ARTEFAKTE	28
ABBILDUNG 8: CLE BILDER VON EINEM GLIOBLASTOM WHO ZNS GRAD 4. A ZEIGT EIN TOPISCH GEFÄRBTES PRÄPARAT. DAS BILD IST DUNKEL, VEREINZELTE TUMORZELLEN SIND DARSTELLBAR (WEIßE MARKIERUNG). B ZEIGT EINE INTRAVENÖS GEFÄRBTEN HUMANEN GEWEBESPROBE, HIER ERKENNT MAN DICHTEN INFILTRATE KLEINZELLIGER TUMORZELLEN (SCHWARZER KREIS).....	29
ABBILDUNG 9: ZEITSTRAHL GBM WHO ZNS GRAD 4.....	36
ABBILDUNG 10: ZEITSTRAHL METASTASE.....	38
ABBILDUNG 11: ZEITSTRAHL MENINGEOM WHO ZNS GRAD 1	40
ABBILDUNG 12: ZEITSTRAHL OLIGODENDROGLIOM WHO ZNS GRAD 3	42
ABBILDUNG 13: OPTIMALE ANWENDUNG NATRIUMFLUORESCHEIN.....	44
ABBILDUNG 14: CLE BILDER VON TUMORGEWEBE AUS EINEM GBM, WHO ZNS GRAD 4 MIT STARKEM FLUORESCENZSIGNALE UND SCHARF DARSTELLBAREN STRUKTUREN. WEIß MARKIERT IN A UND B: TUMORZELLVERBÄNDE, DICHT ANEINANDER LIEGEND. DER SCHWARZE KREIS IN A MARKIERT EINE BESONDERS HELLE NEKROSEZONE, AN DIE TUMORZELLEN IN PALLISADENSTELLUNG GRENZEN (STERN)	46
ABBILDUNG 15: CLE BILD VON DER INFILTRATIONSZONE MIT AUTOFLUORESCENZEN (WEIßE PFEILE) UND REAKTIVEM GEWEBE MIT VEREINZELTEN TUMORZELLEN (WEIß UMRAHMT), EINER DUNKLEN FASER (WEIßE DREIECKE) UND EXTRAZELLULÄRE MATRIX (WEIßER STERN).....	47
ABBILDUNG 16: CLE BILD VON EINEM NICHT PATHOLOGISCH VERÄNDERTEM, VOM NATRIUMFLUORESCHEIN NICHT GEFÄRBTEN, GEHIRN MIT AUTOFLUORESCENZEN (PFEILE)	48
ABBILDUNG 17: CLE BILD VOM TUMORZENTRUM (A) MIT ÜBERGANG IN DEN TUMORRAND (B) UND DIE INFILTRATIONSZONE (C) EINES GLIOBLASTOMS WHO ZNS GRAD 4. IN DER SCHRAFFIERTEN INFILTRATIONSZONE SIND NUR EINZELNE TUMORZELLEN ERKENNBAR. IM TUMORZENTRUM ZELLEN, BLUTGEFÄßE UND EXTRAZELLULÄRE MATRIX	49
ABBILDUNG 18: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESCENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM PLEXUSPAPILLOM: EINGEKREIST SIND ZELLVERBÄNDE MIT GROßEN, DICHT GEREIHTEN ZELLGRUPPEN. DIE ZELLKERNE (DUNKEL, STERN) UMGEBEN VON SCHMALEM ZYTOPLASMA (LEUCHTEND, PFEILSPITZE). DER PFEILDEMONSTRIERT EINEN SCHWACH ANGEFÄRBTEN ZELLKERN	51
ABBILDUNG 19: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESCENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM GLIOBLASTOM, WHO ZNS GRAD 4. EINGEKREIST IST EINE TUMORZELLE (DREIECK MARKIERT DAS ZYTOPLASMA, STERN DEN ZELLKERN). IM FLUORESCENZBILD IST ZU ERKENNEN, DASS DER ZELLKERN IM VERGLEICH ZU DEN	

NICHT GEFÄRBTEN AREALEN (PFEIL), LEICHT FLUORESZIERT. EIN MÖGLICHER HINWEIS FÜR EINE ZUGRUNDE GEHENDE TUMORZELLE	52
ABBILDUNG 20: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM GLIOBLASTOM MIT FOKAL SEHR HOHER ZELLDICHTE (WEIß MARKIERT) MIT DUNKLEM KERN (STERN) UND HELLEM ZYTOPLASMA (DREIECK). ZUSÄTZLICH FINDET MAN NEKROTISCHE AREALE (SCHWARZER KREIS) UND GEFÄßPROLIFERATE (WEIßER PFEIL).	53
ABBILDUNG 21: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM OLIGODENDROGLIOM, WHO ZNS GRAD 3 MIT VEREINZELTEN TUMORZELLVERBÄNDE (WEIß EINGEKREIST) UND GLIALE FASERN (PFEILE)	53
ABBILDUNG 22: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINER METASTASE EINES KARZINOMS DES GASTROÖSOPHAGEALEN ÜBERGANGS. DIE TUMORZELLEN SIND DICHT GRUPPIERT MIT GROßEN DUNKLEN NUCLEI (STERN) UND HELLEM ZYTOPLASMA (DREIECK).	54
ABBILDUNG 23: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM MENINGOTHELIOMATÖSEN MENINGEOM, WHO ZNS GRAD 1. GROßE TUMORZELLEN MIT DUNKLEM KERN (STERN) UND HELLEM ZYTOPLASMA (DREIECK).....	54
ABBILDUNG 24: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM PLASMOZYTOM. ZENTRAL DICHT TUMORZELLVERBÄNDE (WEIß UMRANDET). IM FLUORESZENZBILD GROßE TUMORZELLE MIT ZELLKERN (STERN) UND AUSGEPRÄGT GEFÄRBTEM ZYTOPLASMA (DREIECK)	55
ABBILDUNG 25: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM GLIOBLASTOM, WHO ZNS GRAD 4 MIT ZAHLREICHEN FASERN (PFEILE). ZUSÄTZLICH FINDET MAN DUNKLE ZELLKERNE MIT HELLEM ZYTOPLASMA (EINGEKREIST)	56
ABBILDUNG 26: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM OLIGODENDROGLIOM MIT GLIAFASERBÜNDELN (PFEILE) UND EINER ZENTRALEN GROßEN TUMORZELLE MIT BREITEM ZYTOPLASMA (STERN) UND ORTSSTÄNDIGE REAKTIVE ASTROZYTEN (DREIECKE).....	57
ABBILDUNG 27: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM ASTROZYTOM WHO GRAD 3 MIT FORTSÄTZEN (PFEIL) ZWISCHEN ZWEI TUMORZELLEN	58
ABBILDUNG 28: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM MENINGEOM MIT ZWIEBELSCHALENARTIGEN ZELLVERBÄNDE UND HOHEM KOLLAGENANTEIL (PFEILE).....	59
ABBILDUNG 29: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGER FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM MENINGEOM MIT HELL FLUORESZIERENDEM KOLLAGEN (PFEILE)	59
ABBILDUNG 30: CLE BILD Z-STAPEL IN DER REIHENFOLGE 1 BIS 4, VON TUMORVERSORGENDEN BLUTGEFÄßEN, IN DEN GEFÄßEN BEFINDEN SICH UNGEFÄRBTE, SCHWARZE BLUTZELLEN	60
ABBILDUNG 31: CLE BILDER VON FLUORESZEIN TRANSPORTIERENDEN BLUTGEFÄßEN (PFEIL) MIT VOM FARBSTOFF AUSGEPARTEN ZELLEN (KREIS)	61
ABBILDUNG 32: CLE BILD VON EINEM GLIOBLASTOM, WHO ZNS GRAD 4 MIT FLUORESZIERENDEM BLUTGEFÄß (PFEILE) UND DICHT ANGEORDNETEN TUMORZELLVERBÄNDE	61
ABBILDUNG 33: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM GLIOBLASTOM, WHO ZNS GRAD 4 MIT NEKROSEBEREICHE HELL GEFÄRBT (EINGEKREIST).....	62
ABBILDUNG 34: CLE BILD (RECHTS) MIT ZUGEHÖRIGEM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEM BILD VON EINEM GLIOBLASTOM, WHO ZNS GRAD 4. DIE SCHAFFIERTE FLÄCHE ZEIGT EIN NEKROSEAREAL MIT STARKEM FLUORESZENZSIGNAL.....	62

12 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: DAS PATIENTENKOLLEKTIV.....	18
TABELLE 2: SCORE ZUR BEURTEILBARKEIT DER CLE BILDER.....	31
TABELLE 3: 0-10 MIN, 13 PATIENTEN.....	32
TABELLE 4: 11-20 MIN, 7 PATIENTEN.....	33
TABELLE 5: 21-30 MIN, 8 PATIENTEN.....	33
TABELLE 6: 31 BIS 60 MIN, 8 PATIENTEN.....	34
TABELLE 7: 61 BIS 90 MIN, 2 PATIENTEN.....	34
TABELLE 8: BILDEINSTELLUNGEN TUMORSPEZIFISCHE FARBSTOFFAFFINITÄT	43
TABELLE 9: VERGLEICH FARBSTOFF TUMORZENTRUM, INFILTRATIONSZONE UND UMLIEGENDES GEWEBE	50