

Ein Vergleich ex vivo konfokaler Laserendomikroskopie und konventioneller diagnostischer Methoden in der Neuropathologie

Johann Gerd Bierlein

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

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfende der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 29.01.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 08.05.2024 angenommen.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	2
2	Verzeichnis der Abkürzungen.....	5
3	Einleitung	6
3.1	Problemstellung	6
3.2	Gliome.....	7
3.3	Meningeome	9
3.4	Metastasen	10
3.5	Konventionelle intraoperative Schnellschnittdiagnostik.....	11
3.6	Konfokale Laserendomikroskopie.....	12
3.7	Zielsetzung.....	13
4	Material und Gerät.....	14
4.1	Gewebe.....	14
4.2	Natriumfluorescein	14
4.3	Konfokales Laserendomikroskop.....	15
5	Methoden	16
5.1	Sammlung von Patientengewebe und Patientendaten	16
5.2	Ablauf der Gewebegewinnung und -verarbeitung.....	17
5.3	Bildbearbeitung	18
5.4	Statistische Analyse	18
6	Resultate.....	18
6.1	Bilddaten und -analyse.....	19

6.1.1	Gliome.....	20
6.1.2	Metastasen	29
6.1.3	Meningeome	34
6.1.4	Sonstige Entitäten	37
6.2	Bildqualität	44
6.3	Verdachtsdiagnose HE-gefärbter Gefrierschnitt	50
6.4	Verdachtsdiagnose Methylenblauquetschpräparat	51
6.5	Verdachtsdiagnose ex vivo CLE.....	53
7	Diskussion.....	54
7.1	Histomorphologie durch CLE – alles bereits bekannt?	55
7.2	Gemeinsamkeiten zu den konventionellen Methoden und Neuheiten des klinischen Einsatzes der CLE	59
7.3	Welche intraoperative Verdachtsdiagnostik soll es sein?.....	62
8	Zusammenfassung und Ausblick.....	66
9	Danksagung.....	67
10	Abbildungsverzeichnis	68
11	Tabellenverzeichnis	73
12	Literaturverzeichnis.....	74

Für meine Eltern

2 Verzeichnis der Abkürzungen

CLE	Konfokale Laserendomikroskopie
GS	Gefrierschnitt
HE-Gefrierschnitt	Hämatoxylin-Eosin-Färbung-Gefrierschnitt
HGG	High-Grade-Gliome
LGG	Low-Grade-Gliome
MQP	Methylenblauquetschpräparat
MRT	Magnetresonanztomographie
NPW	Negativer Prädikationswert
PPW	Positiver Prädikationswert
ZNS WHO	Zentralnervöses System World Health Organization

3 Einleitung

3.1 Problemstellung

In der heutigen Zeit ist es selbstverständlich, dass die alleinige histomorphologische Beurteilung von Gewebeproben in der Neuropathologie längst nicht mehr ausreicht, um die Gänge der Tumorentität bzw. -biologie zu erfassen (Louis et al. 2021). Dabei wird die Methodik für den integralen diagnostischen Ansatz immer ausgefeilter und schneller. Der Status eines Methylierungsprofils, eine Copy Number-Analyse oder Identifikation einer Punktmutation konnte bisher nur in aufwändiger Weise, mit hohen Kosten verbunden und speziellem Personal innerhalb von einigen Tagen bis zu zwei Wochen reichend bestimmt werden (Sahm et al. 2016, Sahm et al. 2017). Neue personalarme und kostengünstige technische Möglichkeiten, wie sie z.B. die Nanopore-Sequenziermethode bietet, könnten ein verlässliches Resultat am selben Tag innerhalb von Stunden erzielen und daher die Diagnostik entscheidend beeinflussen (Euskirchen et al. 2017).

Dieser immense zeitliche Fortschritt könnte auch die Anforderungen an die intraoperative Diagnostik verändern, wo seit Dekaden der HE-Gefrierschnitt und das Methylenblauquetschpräparat die konventionellen Mittel der Wahl für den Neuropathologen sind. Der Gefrierschnitt benötigt für eine Gewebeprobe eine Bearbeitungszeit von circa 30-45 Minuten und erlaubt eine Aussage zur Beschaffenheit der Gewebsarchitektur und der Zellkerne. Das Methylenblau-Quetsch-Präparat hingegen ist schneller anzufertigen und gibt Aufschlüsse bezüglich der Zytologie und der extrazellulären Matrix. Beide Prozeduren sind durch die Verarbeitung mit Artefakten behaftet und die Evaluation von der subjektiven Einschätzung des diensthabenden Neuropathologen abhängig. Es stellt sich die Frage, ob in naher Zukunft für die Entscheidung zur korrekten personalisierten Therapie nicht mehr auf die molekulare Analytik, sondern auf die histomorphologische Evaluation gewartet wird und inwiefern die limitierten Aussagen zur Behandlung beitragen. Warum sich auf gewohnte und seit Jahrzehnten etablierte Methoden stützen, wenn es welche gibt, die ein höheres Potential in Bezug auf Zeit, digitale Möglichkeiten und Mehrinformation versprechen?

Ein neuer alternativer Ansatz für die intraoperative Schnellschnittdiagnostik ist die Konfokale Laserendomikroskopie (CLE). Die CLE in Kombination mit der intravenösen Applikation von Natriumfluorescein erlaubt eine in situ Beurteilung des vitalen Gewebes auf zellulärer und subzellulärer Ebene. Sie eröffnet die Möglichkeiten der mehrfachen „optischen Biopsie“ in einer in Echtzeit ablaufenden Untersuchung am Patienten und einer Aufzeichnung von Tumorgrenzen im vorliegenden Situs für den chirurgischen Behandler - was durch die aktuelle Vorgehensweise technisch nicht durchführbar ist. Hierbei stellt sich zuallererst die Frage, was durch die

CLE sichtbar gemacht werden kann und ob dadurch der Neuropathologe verschiedene Pathologien und Tumorarten mit ihrem Spektrum an Strukturen klassifizieren kann. Bestehen Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede im Ablauf der Diagnostik und in Hinblick auf die Vitalität der Gewebeprobe im Vergleich zu den gängigen Prozessuren? Kann durch die CLE eine Verdachtsdiagnose gestellt werden und bietet sie sich dadurch als eine künftige intraoperative Biopsiemethode im klinischen Alltag an? In der nun folgenden Arbeit zu der Pilotstudie gilt es die Fragen aufzugreifen und Anhand einzelner Fälle an Gliomen, Metastasen, Meningeomen und weiteren Entitäten mitzubeantworten.

3.2 Gliome

Die Klassifikation nach ZNS WHO-Graden der einzelnen Tumortypen seit 2021 erlaubt eine Einteilung der klinischen und biologischen Präsentation von Tumoren des zentralen Nervensystems. Aktuell wird die Graduierung in eins bis vier ZNS WHO-Grade unter kombinierter Berücksichtigung der histopathologischen Muster, klinischem Erscheinungsbild und der molekularen Analyse vergeben (Louis et al. 2021).

Einen großen Anteil an dem Vorkommen von malignen primären Hirntumoren, an denen das männliche Geschlecht häufiger erkrankt, haben Gliome. Sie entstehen aus Glia- oder Vorläuferzellen und werden dementsprechend in der histologischen Diagnostik traditionell der Gruppe der diffusen Gliome, die die Astrozytome, Oligodendrogliome und Glioblastome beinhalten, oder Ependymome, gemischter neuronal-glialer Tumore und anderer Gliome zugeordnet (Zong et al. 2012, Perry et al. 2016). Sie machen bis zu 80,9% aller bösartigen intrakraniellen Neoplasien aus, wobei die Diagnose Glioblastom im medianen Alter von 65 Jahren bei einer Inzidenz von 3,23 pro 100000 Einwohner in den USA in mehr als der Hälfte der malignen Fälle gestellt wird (Ostrom et al. 2021).

Diffuse Gliome zeichnen sich typischerweise durch eine zellindividuelle oder gruppenweise Infiltration ins Hirnparenchym, einer perineuronale Satellitose und der Ausbildung eines kommunizierenden Netzwerks im Neuropil aus (Osswald et al. 2015). Es können sich zudem multiple Foci mit erhöhter Tumorzellanzahl, mikrovaskuläre Proliferation und nekrotische Areale darstellen (Perry et al. 2016). Solche sekundären Strukturen nach Scherer sind nahezu pathognomisch für diffuse infiltrative intrakranielle Neoplasien (Peiffer et al. 1999). Bei Oligodendrogliomen und Astrozytomen unterscheidet man hinsichtlich der Histologie anhand der Form der Nuclei, die uniform und rund beziehungsweise nukleäre Irregularitäten und Hyperchromasie aufweisen (Miller et al. 2006, Ichimura et al. 2015). Starke mitotische Aktivität, klassischerweise girlandenförmige Gefäßproliferationen und/oder nekrotische Areal mitunter mit einer palisadenähnlicher Umrandung durch Tumorzellen sind diagnostische Kriterien bei der Beurteilung von ZNS WHO Grad 4 Tumoren, den Glioblastomen (Miller et al. 2007, Aldape et al.

2015). Ependymome zeigen in HE-gefärbten Schnitten teils perivaskuläre Pseudo- sowie echte ependymale Zellrosetten. Wie bei diffusen Gliomen sind nukleäre Atypien, mikrovaskuläre Proliferationen, eine hohe Anzahl von Mitosefiguren, Nekrosen und eine hohe Zelldichte Hinweise für eine höhergradige Malignität im Sinne einer anaplastischen Neoplasie (Prayson 1999). Neben dem histomorphologischen Pfeiler in der Diagnostik wird in den aktuellen Leitlinien für primäre intrakranielle Neoplasien zusätzlich verstärkt auf eine integrierte molekulare Beurteilung gesetzt, die eine weitere Stratifizierung und Unterteilung von Subgruppen mit daraus resultierenden variierenden Behandlungsstrategien erlaubt (Louis et al. 2021).

Generell ist der chirurgische Ansatz so viel Tumormasse wie möglich - bis hin zur kompletten Resektion - durch Mikrochirurgie, Hilfe von Navigationssystemen oder Fluoreszenzmarkern ohne Kompromittierung neurologischer Funktionen zu entfernen (Stummer et al. 2006, Weller et al. 2021). Die Tumorgrenze kann zusätzlich mittels eines Mappings und einer Elektromyographie im Rahmen einer Wachoperation in lokaler Anästhesie oder einer intra-/postoperativen Bildgebung durch ein MRT weiter eruiert werden (De Witt Hamer et al. 2012, Bette et al. 2016). Dabei erfolgt der Eingriff in therapeutischer sowie zugleich in diagnostischer Intention, um Gewebe zu gewinnen. Patienten, die durch einen eingeschränkten klinischen Zustand oder ungünstige Lokalisation der Läsion als inoperabel eingestuft werden, kann eine stereotaktische Biopsie für eine pathologische Beurteilung angeboten werden. Eine weniger radikale Resektion von allen diffusen Gliomen und deren Subtypen ist ein negativer prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben (Grabowski et al. 2014). Deswegen erhält das richtige Beurteilen des intraoperativen Gefrierschnitts für die laufende Prozedur einen hohen Stellenwert. Die unkomplizierte Methode des Quetschpräparats zum Teil in Kombination mit einem Gefrierschnitt erzielte eine durchschnittliche Übereinstimmung von 89,8% mit der finalen Diagnose (Roessler et al. 2002). Die Sensitivität mittels alleinigem HE-gefärbten Schnellschnitt fällt bei Low-Grade-Gliomen geringer als bei High-Grade-Gliomen aus (64.4% vs. 79.1%), während die Spezifität >95% beträgt (Tofte et al. 2014). Dies liegt unter anderem an der variierenden histologischen Evaluation der Low-Grade-Gliome unter den Neuropathologen selbst und einer zum Teil fehlenden verlässlichen Reproduzierbarkeit pathologischer Strukturen (van den Bent 2010).

Neben dem operativen Vorgehen sind die Strahlenbehandlung und die Verabreichung von Chemotherapeutika weitere Therapieoptionen. Das postoperative Bestrahlen zur lokalen Kontrolle des Tumorbetts erhöht das Gesamtüberleben je nach Entität um einige Monate (Walker et al. 1980, Keime-Guibert et al. 2007). Mit dem Alkylanz Temozolomid, das die Blut-Hirn-Schranke in ausreichender Dosis penetrieren kann, gelang ein Durchbruch in der Therapie von Glioblastomen bezüglich eines verlängerten Überleben von wenigen Monaten bei passendem Methylierungsstatus von MGMT. Selbst bei optimaler Therapie betragen für diese Tumortart das 5-Jahre progressionsfreie Überleben 4,1% und das mediane Überleben nach

Progress ein knappes halbes Jahr (Stupp et al. 2009). Im Vergleich zu Fortschritten in der Behandlung anderer Tumorentitäten bleibt das Glioblastom seit Dekaden zurück und stellt somit immer noch eine infauste Prognose dar (Carlsson et al. 2014).

3.3 Meningeome

Meningeome sind mit 39% die häufigsten primären und zugleich benignen Hirntumoren und haben eine Inzidenz von 9,12 pro 100000 Einwohnern. Das weibliche Geschlecht ist bezüglich der Häufigkeit schwerer betroffen und die Inzidenz nimmt mit steigendem Alter zu. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben beträgt 88,2 % (Ostrom et al. 2021). Sie entstehen aus den Deckzellen der Hirnhäute und zeichnen sich durch eine reguläre Kern-Plasma-Relation, eine geringe Mitoserate und ein langsames Wachstum aus. Allerdings gibt es in bis zu 10% der Fälle entartete Meningeome, die den ZNS WHO-Grad 2 und 3 zugeordnet (Louis et al. 2021). Bei diesen findet sich ein erhöhter Mitoserateindex und infiltratives, schnelleres und verdrängendes Wachstum.

In histopathologischen Untersuchungen von allen Meningeomen lassen sich zumeist die zwiebelschalartigen Psammonkörper, fibröse Zellverbindungen, übermäßige Mikrovaskularisation und eine Infiltration in die Dura mater – seltener in das Hirngewebe selbst – darstellen (Backer-Grondahl et al. 2012). Die WHO-Klassifikation unterscheidet aufgrund ihrer Morphologie, des vorherrschenden Zelltyps und ihres molekularen Profils 15 Subentitäten. Zu den etablierten Behandlungsoptionen des Meningeoms gehören abwartendes Verhalten, chirurgische Resektion und die Strahlentherapie, die bei nicht-operablen, risikobehafteten oder ergänzend bei höhergradigen Tumoren angewendet wird (Buerki et al. 2018). Die Resektion stellt dabei den Goldstandard dar, wobei dem intraoperativen Schnellschnitt mittels HE-Gefrierschnitt eine wichtige Rolle zukommt. Hierbei konnte in einer qualitätsüberprüfenden Studie, die den Schnellschnitt der finalen Diagnose gegenüberstellte, eine 94,6%ige Sensitivität und 99,8%ige Spezifität für die korrekte Stellung einer Verdachtsdiagnose gezeigt werden (Tofte et al. 2014). Bei diesem Prozedere ist die genaue Einteilung in Subtypen vorerst von geringerer Priorität, während das Unterscheiden zwischen benignen und malignen infiltrativen Charakter von Bedeutung für das operative Vorgehen ist. Neben der pathologischen Klassifikation ist die Radikalität der Operation ein wichtiger Aussagefaktor für das Auftreten von Rezidiven. Nachdem die Mehrheit der Meningeome eine gutartige Tendenz (90%) und eine operable Lokalisation zeigen, kann bei diesen durch das Standardvorgehen eine nahezu 100%ige lokale Tumorkontrolle erreicht werden.

3.4 Metastasen

Den größten Anteil intrakranieller Neoplasien stellen Metastasen dar, wobei sie bis zu 10-mal häufiger auftreten als primäre Hirntumoren (Ostrom et al. 2018). Mit dem demographischen Wandel und den medizinischen Fortschritten, insbesondere verbesserter extrakranieller Tumorkontrolle durch systemische Therapien und bildgebender Abläufe, kommen sie verstärkt vor allem bei fortgeschrittenen onkologischen Erkrankungen zu Tage und zeigen eine geschätzte jährliche Inzidenz von 70.000 bis 400.000 Fällen in den USA mit steigender Tendenz (Lamba et al. 2021). Primärtumoren, die des Öfteren eine intrakranielle Metastasierung durch hämatogen Streuung vorweisen, sind in absteigender Reihenfolge Lungenkarzinome, Hautmelanome, Mammakarzinome und Nierenzellkarzinome. Seltener handelt es sich um Geschwulste gastrointestinaler oder urothelialer Genese (Barnholtz-Sloan et al. 2004).

Der Verdacht auf eine Absiedelung kann sich somit bei systemischen Tumorleiden oder als Nebenbefund im Rahmen einer radiologischen Untersuchung des Kraniums oder einer entsprechenden klinischen Symptomatik ergeben. Hierdurch kann sich bei bekanntem Primarius die initiale Therapieplanung und die Prognose erheblich ändern. Da systemische Therapeutika die Blut-Hirn-Schranke oftmals unzureichend durchdringen können, stellen die Strahlenbehandlung und die operative Resektion die gängigen Strategien dar (Muldoon et al. 2007). Während Patienten mit multiplen Foci und einem schlechten Allgemeinzustand durch die alleinige Bestrahlung profitieren können, hat die Operation bei symptomatischen Patienten mit singulären Metastasen, zugänglicher Lokalisation und gutem Karnofsky-Index (>70) in Kombination mit adjuvanter Bestrahlung in Hinsicht auf das Gesamtüberleben einen höheren Stellenwert (Moravan et al. 2020).

Die Resektion bietet des Weiteren den Vorteil einer intraoperativen Gewebeprobe und damit die Möglichkeit zur definitiven Identifikation der Entität. Der vorerst erste Schritt in der Beurteilung des Schnellschnitts in dieser Konstellation ist die Unterscheidung zwischen einem primären Hirntumor und einer Absiedelung eines extrakraniellen Primären. Histopathologisch ähneln Metastasen bei guter Differenzierung ihrem Primärtumor – ist diese allerdings schlecht kann trotz bekanntem Primarius in bis zu 11% der Fälle ebenso ein malignes Gliom vorliegen (Patchell et al. 1990). Tendenziell ist die Läsion mikroskopisch scharf begrenzt mit gelockerterem, zellarmen und ödematösem umgebendem Gewebe. Bei größeren Metastasen treten nekrotische Zentren in Erscheinung und je nach Ursprungsgewebe finden sich, vor allem bei metastasiertem Melanom und klarzelligem Nierenzellkarzinom, vermehrt Hämorrhagien. Es können sich zudem Ableger mit drüsenartiger Struktur oder zystischen Veränderungen finden (Pekmezci et al. 2013, Takei et al. 2016). Die Sensitivität und Spezifität zur Stellung einer Verdachtsdiagnose betragen in einem Vergleich von HE-Gefrierschnitt und finalem Resultat

bezüglich metastatischer intrakranieller Neoplasien 78.9% and 99.7% (Tofte et al. 2014). Zum Zeitpunkt der Diagnose einer Absiedelung kann das mediane Überleben in Abhängigkeit vom Primarius zwischen sechs und zwölf Monaten betragen (Cagney et al. 2017). Bei Älteren (>65 Jahre) ist die Prognose mit einem medianen Überleben von unter vier Monaten – egal welcher Genese mit Ausnahme von Metastasen ovariellen Ursprungs – noch geringer (Lamba et al. 2021).

3.5 Konventionelle intraoperative Schnellschnittdiagnostik

Seit knapp einem Jahrhundert werden durch Pioniere in der Medizin wie H. Cushing und L. Eisenhardt Methoden zur schnellen histomorphologischen Diagnostik unter dem Lichtmikroskop an den zuvor beschriebenen Läsionen angewandt (Eisenhardt et al. 1930). Die daraus entwickelten und geläufigsten Verfahrensweisen sind der HE-gefärbte Gefrierschnitt sowie das Methylenblauquetschpräparat. Letzteres kann sowohl als alleiniges diagnostisches Mittel herangezogen werden oder die primäre Methode sekundär mit zytologischen Informationen ergänzen (Reyes et al. 1991). Es besteht aus dem Verschmieren und Färben des Gewebes mit Methylenblau und eignet sich vor allem bei sehr kleinen Proben, die nicht mehr in einem Gefrierschnitt bearbeitet werden können, wie etwa bei stereotaktischen Biopsien. So werden Quetschpräparate in manchen Fällen neben diagnostischen Beweggründen auch wegen der einfacheren, schnelleren und kostengünstigen Herstellung im Vergleich zum HE-Gefrierschnitt zur Bestimmung der Tumorgrenze hinzugezogen und im Operationssaal angefertigt (Roessler et al. 2002). Die Präzision in der Diagnostik stimmt im Vergleich zum finalen paraffineingebetteten HE-gefärbten Schnitt von 83.7 bis zu 97.6% überein (Hamasaki et al. 2018).

Die bevorzugte intraoperative Schnellschnittdiagnostik findet allerdings mittels HE-gefärbten Gefrierschnitt statt, da hier durch die Kryofixierung und das Zuschneiden durch das Mikrotom die Konsistenz bzw. Beschaffenheit der Gewebeprobe eine untergeordnete Rolle spielen und die Gewebearchitektur größtenteils erhalten bleibt (Reyes et al. 1991). Er bietet zudem eine geringere Rate an Fehldiagnosen von 12% bis 1%. Fehleinschätzungen können durch Tumörübergraduierung bei artifizieller Überlagerung, in der Unterscheidung von reaktiver Gliose und neoplastischen Vorgängen, in der Einteilung von Low-Grade und High-Grade Gliomen und weiterer seltenerer Entitäten, eine Fehlbiopsie oder Fehlbearbeitung zustande kommen (Martinez et al. 1988, Reyes et al. 1991, Plesec et al. 2007, Tofte et al. 2014).

Beide Methoden werden normalerweise im Zuschnitt des jeweiligen pathologischen Instituts angewandt, wodurch der gesamte Prozess zeitlich den Transport dorthin, die Anfertigung und die Evaluation durch den diensthabenden Neuropathologen umfasst. So kann es bis zu über einer halben Stunde dauern, bis der Operateur eine Verdachtsdiagnose erhält und seine Behandlungsstrategie anpassen kann (Novis et al. 1997).

3.6 Konfokale Laserendomikroskopie

Das konfokale Laserendomikroskop stellt einen potenziellen Fortschritt für das Vorgehen in der intraoperativen Diagnostik der Neuropathologie dar (Sanai et al. 2011). Es handelt es sich um eine neue Herangehensweise, bei der durch intravenöse Applikation eines fluoreszierenden Agens Gewebe auf zellulärer und subzellulärer Ebene sichtbar gemacht werden kann. Die CLE wurde anfangs in Europa in klinischer Umgebung erprobt, um die Möglichkeit der Detektion einer Barrett-Metaplasie zu untersuchen (Kiesslich et al. 2006). Mittlerweile wurden zu Untersuchungstechniken des Ösophagus weitere Bemühungen unternommen und man konnte eine mehr als 85%ige Spezifität in der Diagnostik von niedriggradigen Dysplasien der ösophagealen Schleimhaut mittels CLE im Vergleich zum Goldstandard erreichen. Statt randomisiert entnommener Biopsien und eines zusätzlichen endoskopischen Eingriffs zur Ablation der suspekten Areale, kann nun die Option der Echtzeitbeurteilung der Mukosa und einer Ablation ohne Zeitverzögerung im selben Eingriff bestehen (Schneider et al. 2017).

Neben dem Fachbereich der Gastroenterologie finden sich mehrere klinische Studien in der Urologie. Diese untersuchten zunächst erfolgreich in einer Pilotstudie, ob durch die endoureteroskopischen „optischen Biopsien“ der CLE gesundes von pathologischem Gewebe eines Urothelkarzinoms im oberen Harntrakt (UTUC) unterschieden werden kann (Bui et al. 2015). Freund und Kollegen vertieften diesen Ansatz, indem sie ein Scoring-System für die CLE entwickelten, das die Kriterien Gewebsarchitektur, Zellmorphologie und Zellzusammenhalt beinhaltet und das den Grad des UTUC im Vergleich zum gängigen uropathologischen Vorgehen bestimmen soll (Freund et al. 2019). Ebenso ist die Methode Gegenstand der Forschung in der Gynäkologie (De Palma et al. 2015), Pneumologie (Wijmans et al. 2019), Transplantologie (Coron et al. 2014) und Weiteren.

In den neuroonkologischen Fachbereichen gibt es ebenso bereits im geringen Umfang ex und in vivo Forschungsansätze im animalischen sowie auch humanen Modellen (Foersch et al. 2012, Hohne et al. 2021). Mit ex und in vivo ist die Anwendung der CLE außerhalb des Situs an einer resezierten Probe bzw. am Situs selbst definiert, wobei das künftige Ziel der in vivo Einsatz im klinisch-operativen Setting sein soll. Viele Projekte konzentrieren sich dabei in einem ersten Schritt auf die Machbarkeit und die histomorphologische Darstellung verschiedener Entitäten (Charalampaki et al. 2015, Pavlov et al. 2016).

Einen Schritt weiter wurde die diagnostische Präzision in unterschiedlichen Rahmenbedingungen untersucht. So konnte in einem Pilotprojekt – ohne intravenös appliziertes fluoreszierendes Agens, sondern mittels Rotlicht-CLE – mit einem verblindeten ex vivo Studiendesign über 90%ige Werte für die Sensitivität und Spezifität mit Ausnahme in der Diagnostik von Hirnmetastasen gezeigt werden (Breuskin et al. 2017). Mit Implementierung in den Operationssaal

zeigten Martirosyan und Kollegen in einer prospektiven Studie eine 91%ige und 94%ige Sensitivität und Spezifität für die Richtigkeit einer intraoperativen Verdachtsdiagnose bei High-Grade Gliomen (Martirosyan et al. 2016). In Kombination mit Natriumfluorescein und dem in unserer Arbeit genutzten System konnte man mit in einem prospektiven Design, in dem der Neuropathologe die CLE-Bilder vor dem Gefrierschnitt begutachtete, für Glioblastome ähnliche Resultate beobachten (Acerbi et al. 2020). Für einen alltäglichen klinischen Einsatz und neue Forschungsansätze zur Behandlung in der Neuroonkologie scheint die Methode geeignet, aber bei geringen Fallzahlen und zum Teil unklaren Grades der Verblindung des Neuropathologen noch unzureichend untersucht zu sein.

3.7 Zielsetzung

Eine zeitsparende, aufwandsärmere und möglicherweise vorteilhaftere Alternative zu den konventionellen Methoden der intraoperativen Schnellschnittdiagnostik in der Neuropathologie stellt die CLE dar. Der gesamte Vorgang ist nun in das neurochirurgisch-operative Setting implementierbar und kann in nahezu Echtzeit im Operationssaal durchgeführt werden. Die Anwendbarkeit und diagnostische Präzision der CLE prospektiv in diesem Design mit zum originalen Schnellschnitt verblindeten Neuropathologen und im Vergleich zu den konventionellen Methoden der intraoperativen Diagnostik zu überprüfen ist ein Novum.

1. Ein Ziel der Arbeit ist es herauszufinden, welche Erscheinungsweise der Gewebsarchitektur beziehungsweise Zellmorphologie einzelner Tumorentitäten sich durch die ex vivo CLE in Kombination mit der gewichtsadaptierten intravenösen Applikation von Natriumfluorescein ergibt und diese die Anwendung bekannter diagnostischer Kriterien zulassen.
2. Es gilt herauszuarbeiten welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede sich zwischen den konventionellen Methoden und der ex vivo CLE sich im Ablauf des diagnostischen Vorgangs im klinischen Setting sowie in der Verarbeitung der Gewebeprobe darstellen.
3. Des Weiteren gilt es darzustellen, ob mittels der darstellbaren pathologischen Merkmale in den ex vivo CLE-Aufnahmen eine Verdachtsdiagnose ähnlich zur aktuell üblichen intraoperativen Gefrierschnitt- bzw. Methylenblauquetschdiagnostik getroffen werden kann.

4 Material und Gerät

4.1 Gewebe

Sämtliche Untersuchungen erfolgten an humanem Gewebe, das nach Zustimmung des jeweiligen Patienten zur Teilnahme an der Pilotstudie neurochirurgisch reseziert wurde. Die Zustimmung zur Durchführung der erstellten Pilotstudie erfolgte durch das Ethikvotum der technischen Universität München (EudraCT: 2019-004512-58; Studientitel: Comparison of Fluorescein-INtra-Vital-microscopy Versus conventional frozen section for IntraOperative histopathological evaluation). Die Proben wurden entsprechend der Leitlinien zur Gewebeaufbewahrung der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München unter Zustimmung der Patienten aus den Kliniken rechts der Isar verwahrt.

4.2 Natriumfluorescein

Bei Natriumfluorescein handelt es sich um ein organisches Salz mit einer vielfältigen Anwendung, wie zum Beispiel in der Färbindustrie, der Seenotrettung und der Medizin. Eine seit Jahrzehnten etablierte Untersuchung ist bei intravenöser Applikation die Darstellung der Vaskularisation des Augenfundus, bei der somit Gefäßschädigungen und Leckagen dargestellt werden (Hayreh 1974, Jones et al. 2017). Bereits 1948 fand es seinen Einzug in die Neurochirurgie, bei dem Moore und Kollegen es als Mittel zur Auffindung suspekter Läsionen benutzen (Moore et al. 1948).

Grundlegend ist der Effekt, dass Natriumfluorescein die gestörte Blut-Hirn-Schranke durchdringen und sich in diesen Arealen anreichern kann. In aktuellen klinischen Untersuchungen ist die Anwendung zur Ausweitung der Resektion diffuser Gliome in mikrochirurgischer Technik mittels spezieller Filter im Operationsmikroskop gegeben. Dabei wurde es intravenös in einer Dosierung von 5ml/kg eine 10%ige Injektionslösung im Anschluss zur trachealen Intubation verabreicht. Frühzeitige postoperative MRT eines kleinen Patientenkollektivs zeigten eine 80%ige Rate an kompletten Resektionen der Geschwulste (Acerbi et al. 2014). Zudem ist das Mittel aufgrund seiner geringen Komplikationsrate Gegenstand der Forschung in explorativen klinischen Studien, die sich mit der CLE in der Neuroonkologie befassen (Kornblau et al. 2019, Acerbi et al. 2020, Hohne et al. 2021). Dabei wird der Effekt der Fluoreszenz genutzt, der durch eine einfallende Lichtquelle mit bestimmter Wellenlänge entsteht. Bei einer anregenden Wellenlänge von ~490nm emittiert Natriumfluorescein ein grünes Licht, das mittels entsprechender Filter und Sensoren detektiert werden kann. Fluorescein ALCON® als 10%ige Injektionslösung eignet sich somit für diese Arbeit als unterstützendes fluoreszierendes Agens, um eine suspekte Läsion mittels des CLE-Systems „CONVIVO“ digital darzustellen.

4.3 Konfokales Laserendomikroskop

Bei dem in den Versuchen verwendetem Mikroskop handelt es sich um ein konfokales Laserendomikroskop der zweiten Generation (Gen2). Das Gerät wurde unter dem Namen „CON-VIVO“ von der Zeiss Meditec AG zur Verfügung gestellt. Es besteht aus einem Gerätewagen und einer Scannereinheit. Während der Gerätewagen den PC, Zubehör, die Laserquelle und den Detektor beherbergt, besteht die Scannereinheit aus einem Kabel, einer Sonde und einer sterilen Kunststoffschutzhülle, die mitunter Teil des optischen Strahlengangs ist. Zusätzlich ist auf dem Wagen ein Full-HD-Touch-Display angebracht, das dem Anwender eine beliebige Modifikation von Einstellungen sowie eine Darstellung der erstellten Bilder erlaubt.

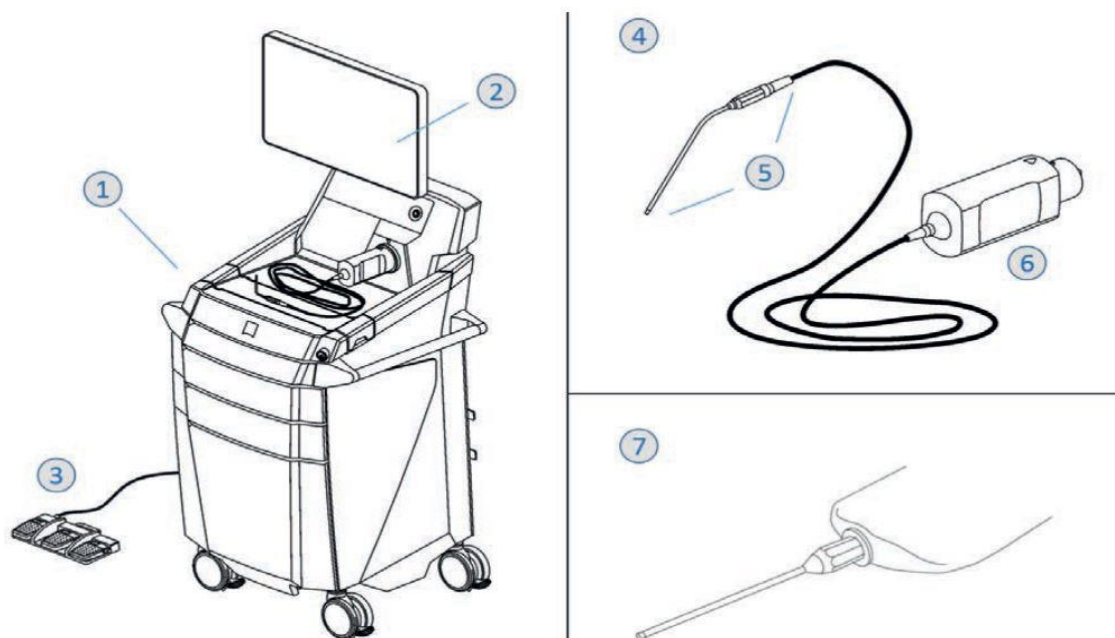


Abbildung 1: Konfokales Laserendomikroskop (1), Full-HD-Touch Display (2), Fußpedal (3), Scannereinheit (4), Scannersonde (5), Leitungskabel (6), Sterile Hülle (7) (Leierseder 2018)

Bezüglich der Funktionsweise der CLE wird der Laser mit einer definierten Wellenlänge über einen Lichtleiter der Scannersonde zugeführt. Das Ende des Lichtleiters wird im Kopf der Sonde schnell in einem rasterförmigen Muster durch Elektromagneten bewegt. Mit Fokussierung des Lasers durch ein Linsensystem in einer einstellbaren parallelen Ebene zur Scannersonde kann der dem Gewebe verabreichte Fluoreszenzfarbstoff zur Aussendung von Signalen angeregt werden. Diese wiederum werden durch das Linsensystem gesammelt und über ein optisches Filterrad einem Detektor zugeführt. Der Detektor kann durch Registrierung der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten und dadurch, dass jederzeit die XY-Positionierung bei Bewegung des Lichtleiters bekannt ist, ein digitales Muster erstellen, welches in ein

Graustufenbild umgewandelt wird. Dabei wird die fokussierte Ebene erfasst, während andere mittels des sich als konfokale Lochblende verhaltenden Lichtleiters ausgeblendet werden.

Das „CONVIVO“-System kann mit einem Laser der Wellenlänge von $\sim 488\text{nm}$ eine Sichtfläche von $475 \times 267\mu\text{m}^2$ erfassen und die Fokustiefe in einem Rahmen von $\sim 0\text{-}200\mu\text{m}$ variiert werden. Das Gen2-System erlaubt zudem neben den Einzelaufnahmen, Bildserien, Live-Bild auch einen Z-Stapel, bei dem eine Reihenaufnahme mit fortführender Fokustiefe erstellt wird (Leierseder 2018). Einstellungen wie Laserstärke, Helligkeit, Kontrast, Steigerung, Schnelligkeit des Lichtleiters sowie Zoomoptionen sind in einem gewissen Umfang während der Anwendung über das Bedienpanel beeinflussbar.

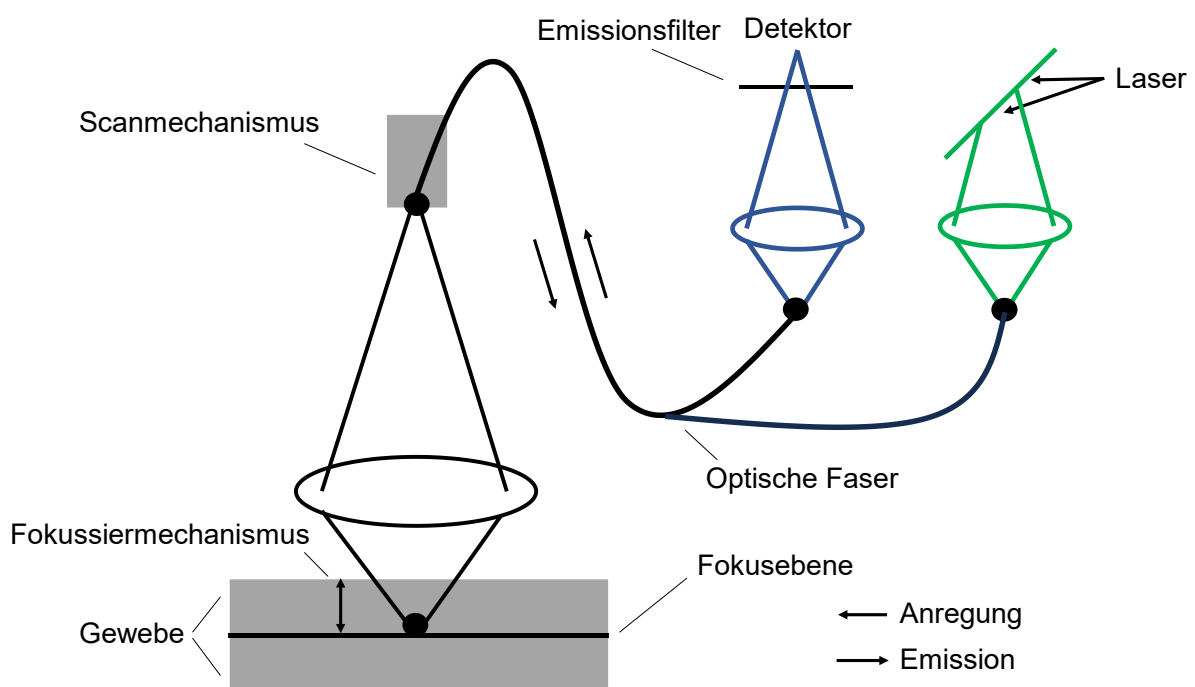


Abbildung 2: Schematische Darstellung konfokale Laserendomikroskopie

5 Methoden

5.1 Sammlung von Patientengewebe und Patientendaten

In dem Zeitraum März 2018 bis Ende Mai 2018 wurden von 40 Patienten der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar Gewebeproben reseziert und von zwei Neuropathologen (Prof. Dr. Jürgen Schlegel und PD Dr. Friederike Liesche-Starnecker) des Instituts für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München beurteilt. Zur Standardisierung des Ablaufes wurde ein Patientenprotokoll erstellt. Hier wurden persönliche Daten, klinische Angaben der Neurochirurgischen und -radiologischen Abteilungen, Vorbehandlungen, Zeit der Injektion und der Dosierung des

fluoreszierenden Medikaments, Entnahme der Gewebeprobe und weitere Anmerkungen des Durchführenden notiert.

5.2 Ablauf der Gewebeerzeugung und -verarbeitung

Die Patienten wurden präoperativ auf der Krankenstation über den Studieninhalt aufgeklärt. Nach dem Vorlegen einer Patienteneinverständniserklärung und der OP-Vorbereitung des Probanden wurde das CLE-Gerät im Operationssaal installiert. Dies beinhaltete das Ausfüllen des Protokolls, Hochfahren des CLE-Gerätes, Anbringen der Sonde und Einspannen in einer Halterung, die es ermöglicht ex vivo Aufnahmen ohne jegliche Bewegungsartefakte seitens des Benutzers zu erstellen. Um einen standardisierten Ablauf beizubehalten, wurde das fluoreszierende Agens, Natriumfluorescein, bei operativer Eröffnung der Dura mater dem Studienteilnehmenden in einer gewichtsadaptierten Dosis intravenös (5ml/kg Körpergewicht) appliziert. Nachdem die neurochirurgischen Operateure die Präparation des suspekten Areals beendet hatten, wurde zunächst eine Gewebeprobe für den experimentellen Schnellschnitt mittels CLE reseziert und anschließend – soweit es medizinisch indiziert war - eine weitere Gewebeprobe für den regelhaften intraoperativen Schnellschnitt entnommen.

Erstere Probe wurde somit unmittelbar im Operationssaal in Nahezu-Echtzeit außerhalb des Operationssitus (ex vivo) untersucht. Die auf einem Medium gespeicherten CLE-Bilder als auch das untersuchte Gewebe wurden daraufhin per Rohrpost an das pathologische Institut versandt. Dort prüfte der diensthabende Neuropathologe (L-SF oder SJ) die CLE-Bilder zunächst auf vorliegende pathologische und neoplastische Kriterien und stellte anhand dieser eine Verdachtsdiagnose. Währenddessen wurde das mitversandte Gewebe der ersten Probe einem intraoperativen Schnellschnitt gleichbehandelt und zusätzlich eine finale paraffinfixierte HE-Färbung angefertigt. Diese Proben wurden anschließend ebenfalls auf die vorherig genannten Kriterien untersucht und sofern möglich eine Verdachtsdiagnose bzw. endgültige Diagnose gestellt. Dieser Vorgang wurde einmalig und unabhängig vom jeweils anderen Neuropathologen durchgeführt. Zusammenfassend wurde somit eine ex-vivo-CLE-Bildreihe, ein intraoperativer HE-Gefrierschnitt und im Rahmen der endgültigen Diagnostik ein zusätzliches Methylenblau-Quetschpräparat angefertigt.

Die finale Tumordiagnose erfolgte lichtmikroskopisch anhand von paraffineingebetteten Hämatoxylin-Eosin-Färbungen sowie immunhistochemischen Färbungen, wobei hinsichtlich der Gliome, Meningeome und Metastasen mittels Vimentin, Her2, IDH1, aber auch saures Gliafaserprotein (GFAP), Ki67 (Proliferationsmarker), epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, epidermal growth factor) und weitere nach Goldstandard verwendet worden sind. Ergänzende molekulare Untersuchungen wie der Methylierungsstatus der MGMT mittels 850k-Array, Detektion

von 1p/19q-Deletion, Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-Gens und anderer Aberrationen fanden ebenso im Rahmen der finalen Routinediagnostik statt.

5.3 *Bildbearbeitung*

Für die Skalierung, Markierung und Messungen wurde die Software FIJJ (ImageJ 1.53c), Powerpoint (Microsoft 365 MSO, Version 2307) und PathoZoom herangezogen.

5.4 *Statistische Analyse*

Für die statistische Untersuchung der diagnostischen Präzision der jeweiligen Methoden wurde das Programm Excel (Microsoft 365 MSO, Version 2307) und die Software SPSS (IBM Inc., Armonk, NY, USA) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Um eine statistische Signifikanz in den Kontingenztafeln aufzuzeigen, wurde der Pearsons-Chi²-Test mit Kontinuitätskorrektur sowie der exakte Test nach Fisher, sobald die erwarteten Häufigkeiten kleiner gleich fünf in einer Zelle ergeben haben, angewandt. Die Stärke des Zusammenhangs wurde mit dem Phi-Koeffizienten getestet. Alle angewandten Tests sind zweiseitig. Zur Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positiver prädikativer Wert (PPW), negativer prädikativer Wert (NPW) wurden Kontingenztafeln verwendet.

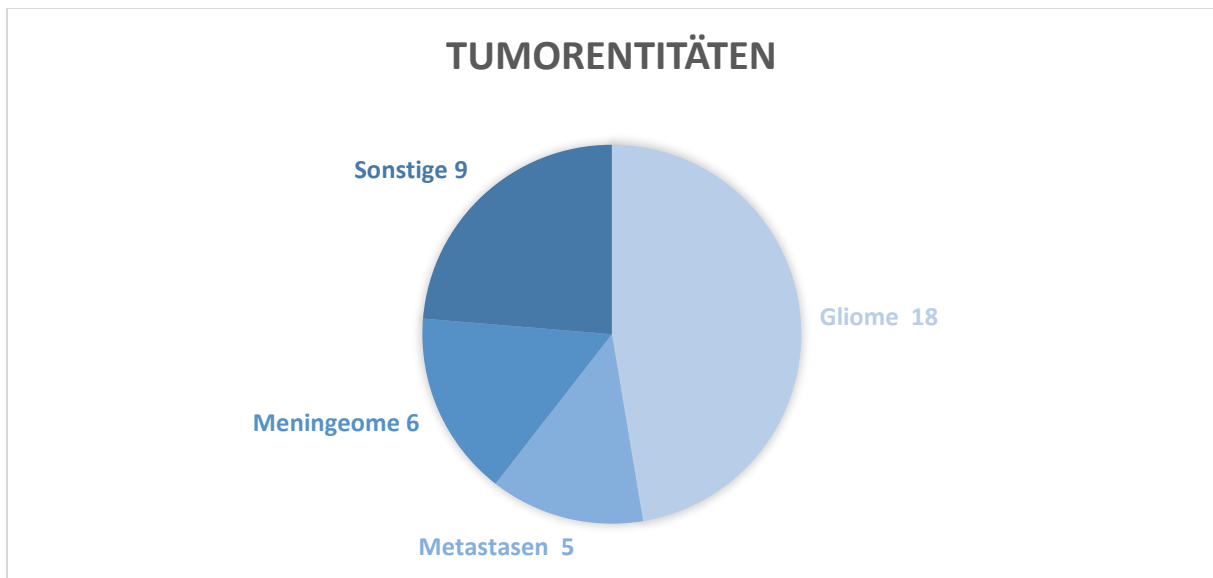
Methode	finale Diagnose	
	aktuelle Diagnose	andere Diagnose
aktuelle Diagnose (z.B. Gliom)	A	B
	richtig positiv	falsch positiv
andere Diagnose	C	D
	falsch negativ	richtig negativ

Abbildung 3: Kontingenztafel zur Gegenüberstellung von intraoperativer Schnellschnittdiagnose und finaler Diagnose

6 **Resultate**

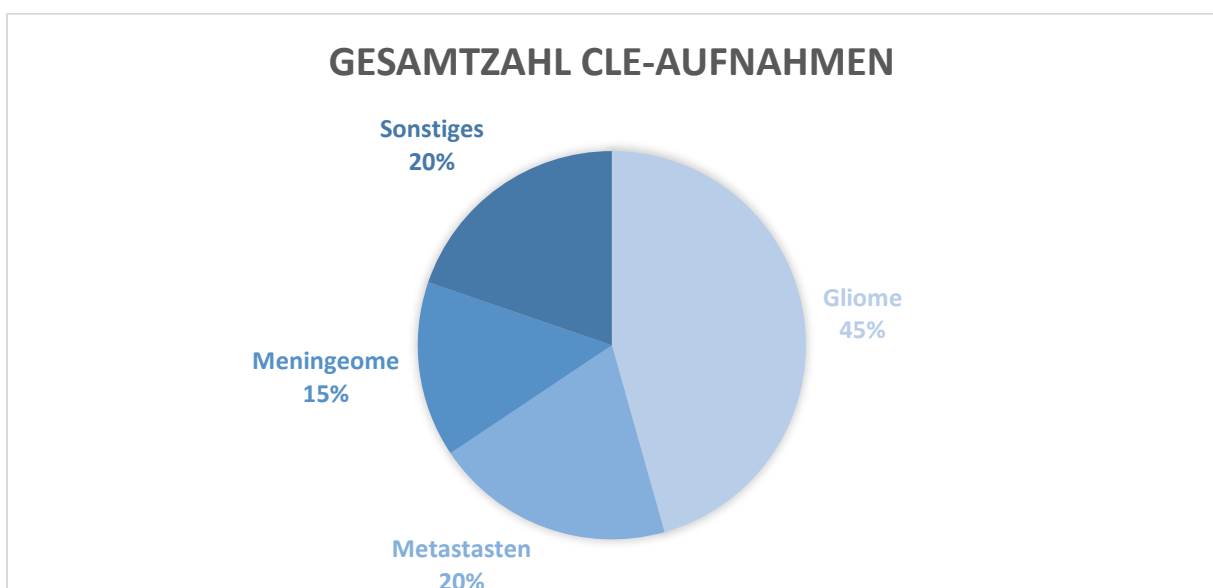
In dem Zeitraum von März 2018 bis Ende Mai 2018 wurden während des operativen Eingriffes Aufnahmen von 40 Patienten ex vivo mit dem in den Klinikalltag implementierten CLE-System erstellt. Zwei Patienten (5%) konnten aufgrund hoher bestehender Infektiosität und mangelnder Bildqualität nicht in die diagnostische Auswertung mit-eingeschlossen werden. Das mittlere Alter der 38 Patienten beträgt 54 Jahre, wobei eine Altersspanne von 26 bis 82 Jahren gegeben ist.

Die Klassifizierung der intraoperativ untersuchten Gewebeproben erfolgte nach ZNS WHO-Vorgaben in die Gruppen Gliome, Metastasen, Meningeome und Sonstige. Zu den sonstigen Tumorentitäten gehören ein Pineozytom ZNS WHO-Grad 1, zwei Hypophysenadenome, ein Schwannom ZNS WHO-Grad 1, einmalig avitales Gewebe, ein Hämangioblastom ZNS WHO-Grad 1, ein Plasmozytom, ein Plexuspapillom und eine reaktive Entzündung eines strahlentherapierten Glioblastoms.

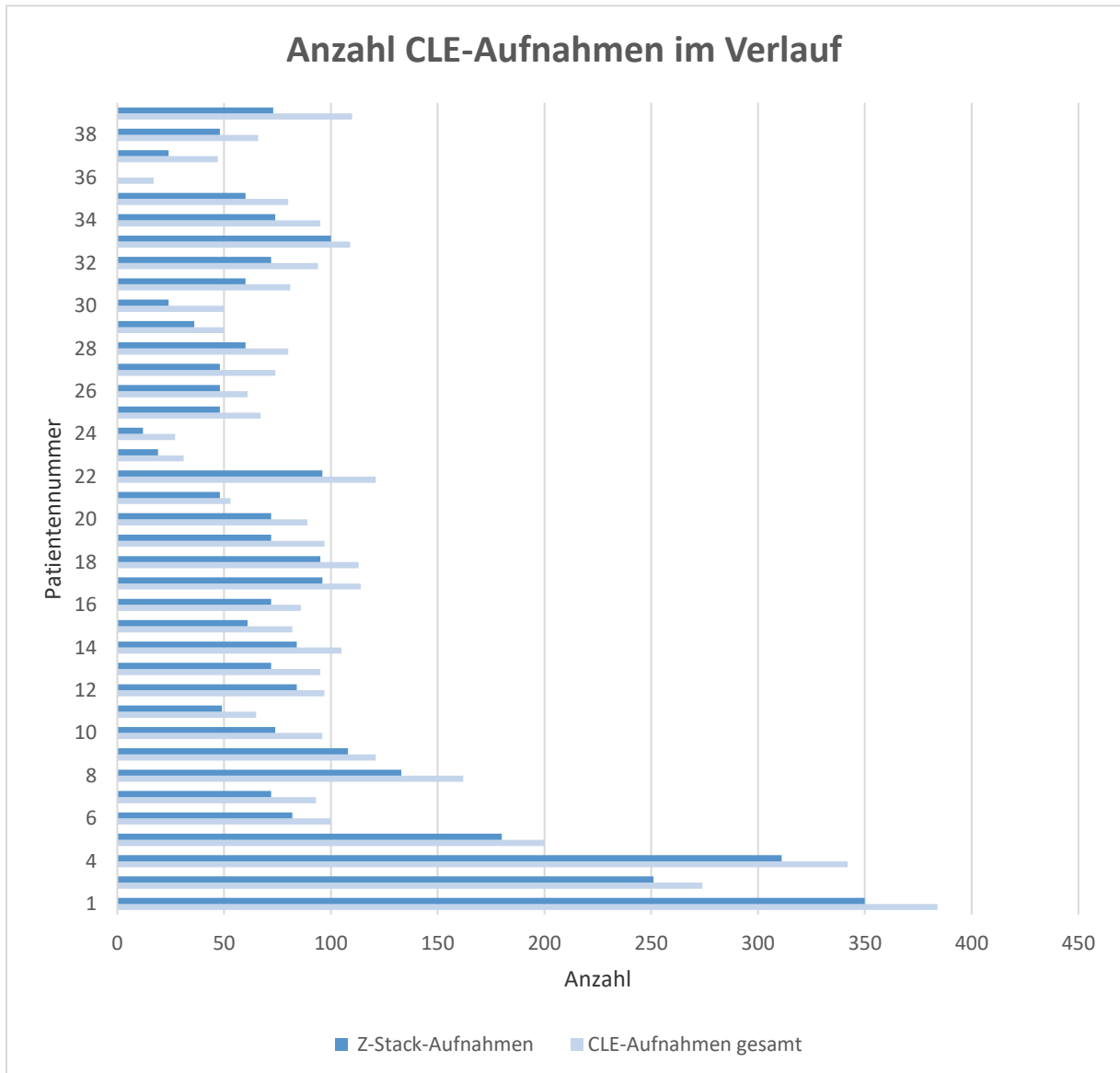


6.1 Bilddaten und -analyse

Insgesamt wurden 4028 Aufnahmen bei 38/40 verwertbaren Gewebeproben erstellt. Im Durchschnitt 24 Minuten nach der venösen Applikation von Natriumfluorescein begann die Beurteilung mittels CLE, wobei die Spanne von Verabreichung bis Resektion und anschließender Untersuchung von 4 bis 95 Minuten reicht.



Bei 106 Bildern pro Einsatz gibt es einen Anteil von 81,1% (3268/4028), bei dem eine Aufnahme-
 merihe mit Tiefenfokus als Z-Stapel erstellt wurde.



6.1.1 Gliome

Die in der Pilotstudie untersuchten Gliome unterteilen sich in zehn Glioblastome, von denen wiederum vier ein Rezidiv darstellen, und in fünf weitere High-Grade Gliome (anaplastische Oligodendrogliome, Astrozytome, Ependymome). Die restlichen Drei stellen mit einem diffusen Astrozytom und zwei Oligodendrogliomen, ZNS WHO-Grad 2, Low-Grade Gliome dar. Insgesamt wurden CLE-Bilder anfangs in hoher Anzahl (Patientennr. 1: 384) erstellt, bis sie sich in abnehmender Tendenz auf ein annähernd gleichbleibendes Niveau um die 100 eingestellt hat.

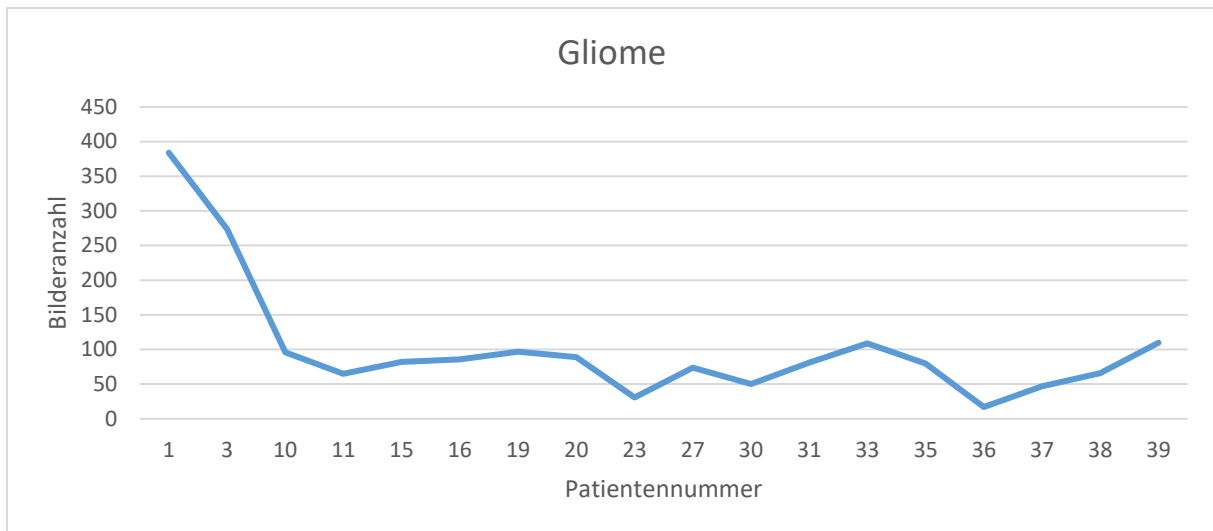


Abbildung 4: Anzahl CLE-Aufnahmen von Gliomen im chronologischen Verlauf

Die folgenden Aufnahmen zeigen zuerst einen Ausschnitt des HE-Gefrierschnitts, CLE-Bilder und zum Teil eine Vergrößerung des Methylenblauquetschpräparats, die alle in der genannten Reihenfolge von derselben Gewebeprobe bzw. demselben Patienten angefertigt wurden. Der Fokus liegt auf der Darstellung klassischer diagnostischer Parameter von infiltrativen Gliomen, wie nukleäre Atypien, Pleomorphismus, hohe Zellularität, hohe Anzahl an Mitosefiguren, Nekrosen und Mikrovaskularisationen.

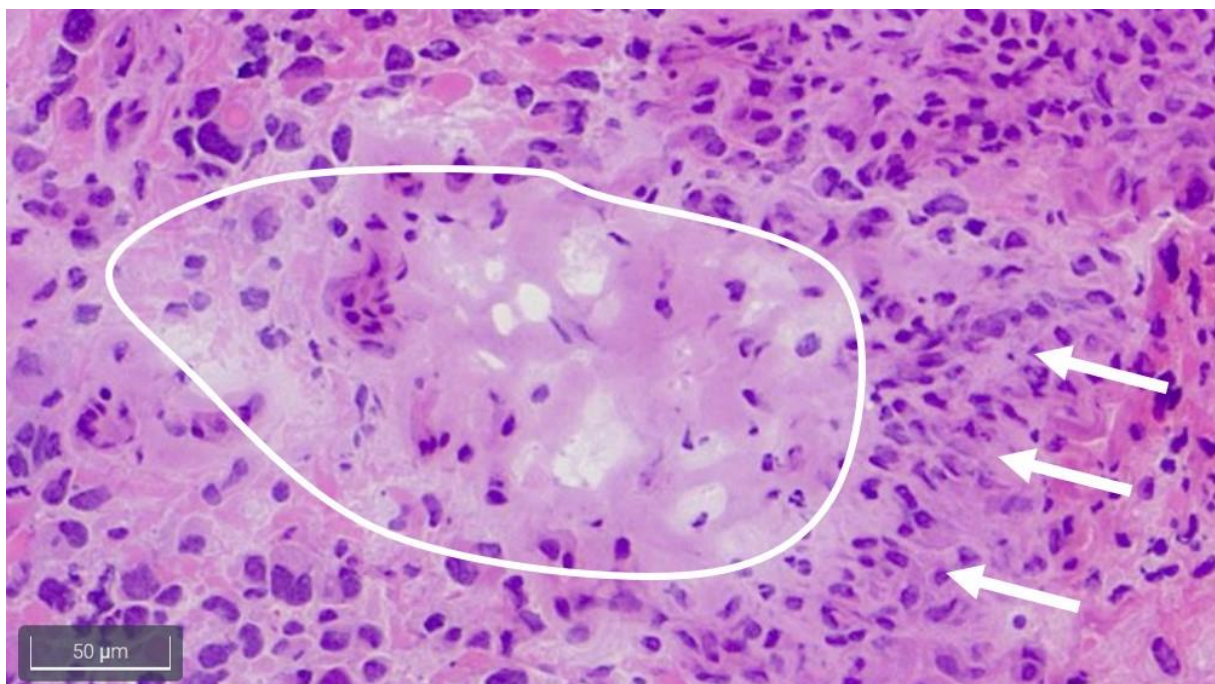


Abbildung 5: Nekrotisches Areal (weiß umrandet), Palisadenstellung (weiße Pfeile), diffuse Verteilung pleomorpher Zellen, HE-Präparat, Patientennr. 1: Glioblastom – Tumorzentrum, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

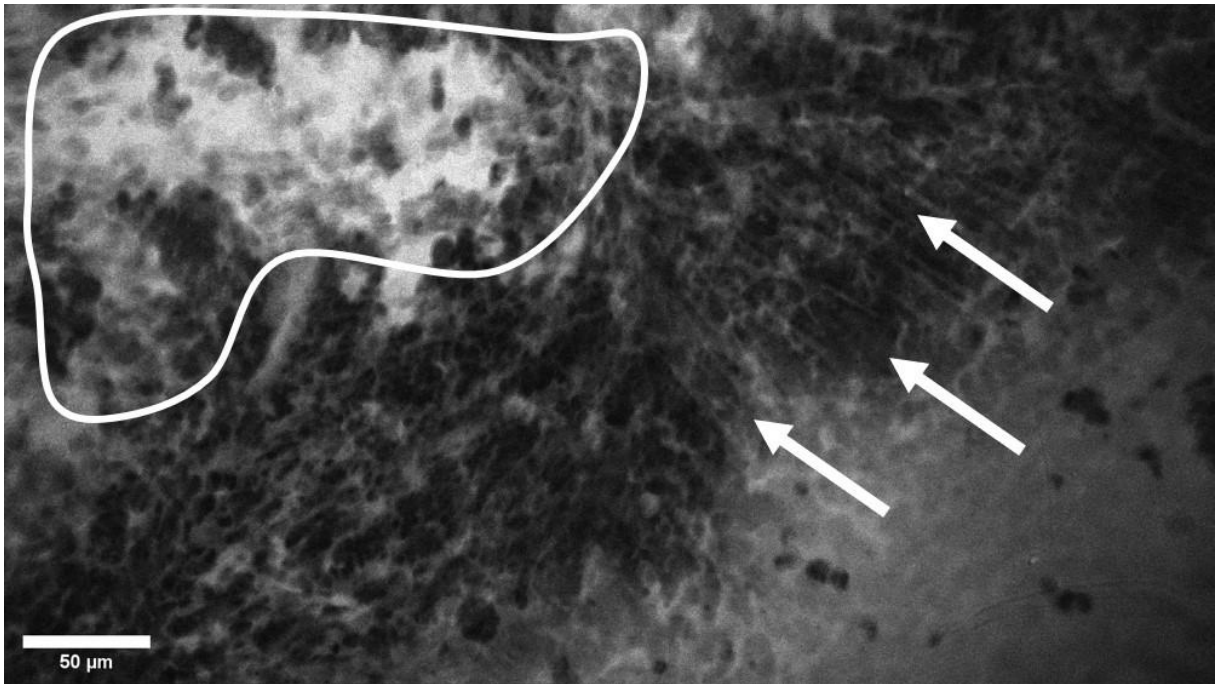


Abbildung 6: Nekrotisches Areal (weiß umrandet), Palisadenstellung (weiße Pfeile), diffuse Verteilung pleomorpher Zellen, Patientennr. 1: Glioblastom – Tumorzentrum, CLE ex vivo 475 x 267µm²

Bei Patient 1 wurden Proben an insgesamt drei verschiedenen Lokalisationen reseziert, welche vom Operateur makroskopisch als Tumorzentrum, Tumorrand und als Übergang in gesundes Gewebe definiert wurden. Während die ersten beiden Bilder Ausschnitte aus der Tumormitte zeigen, folgen zunächst die Aufnahmen des Tumorrandes und im Anschluss des Übergangs.

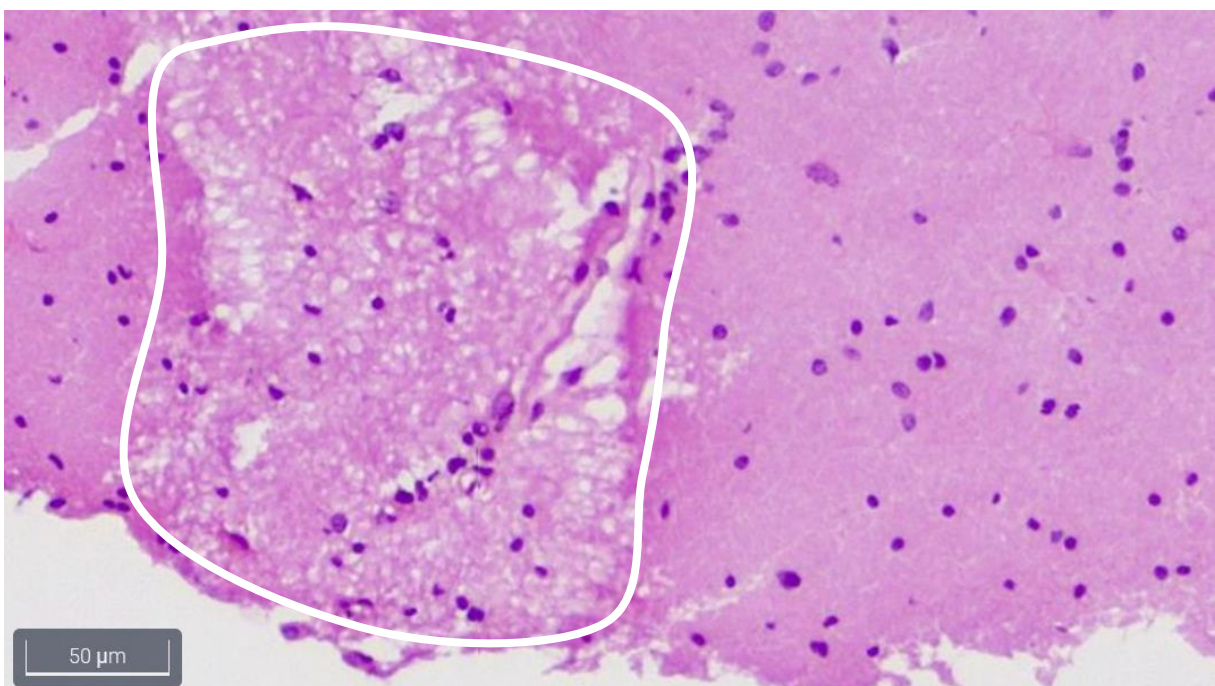


Abbildung 7: Nekrotisches Areal (weiß umrandet), pleomorphe Zellen, Patientennr. 1: Glioblastom - Tumorrand, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

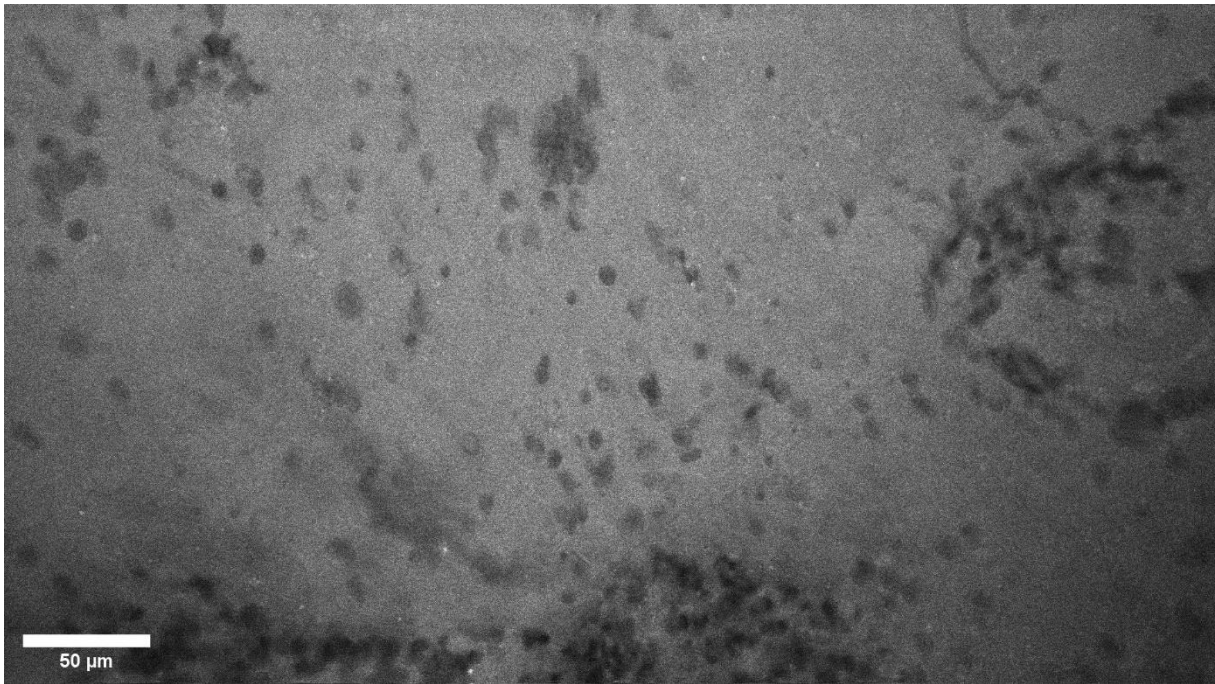


Abbildung 8: Pleomorphe Zellen, Patientennr. 1: Glioblastom - Tumorrand, CLE ex vivo 475 x 267μm²

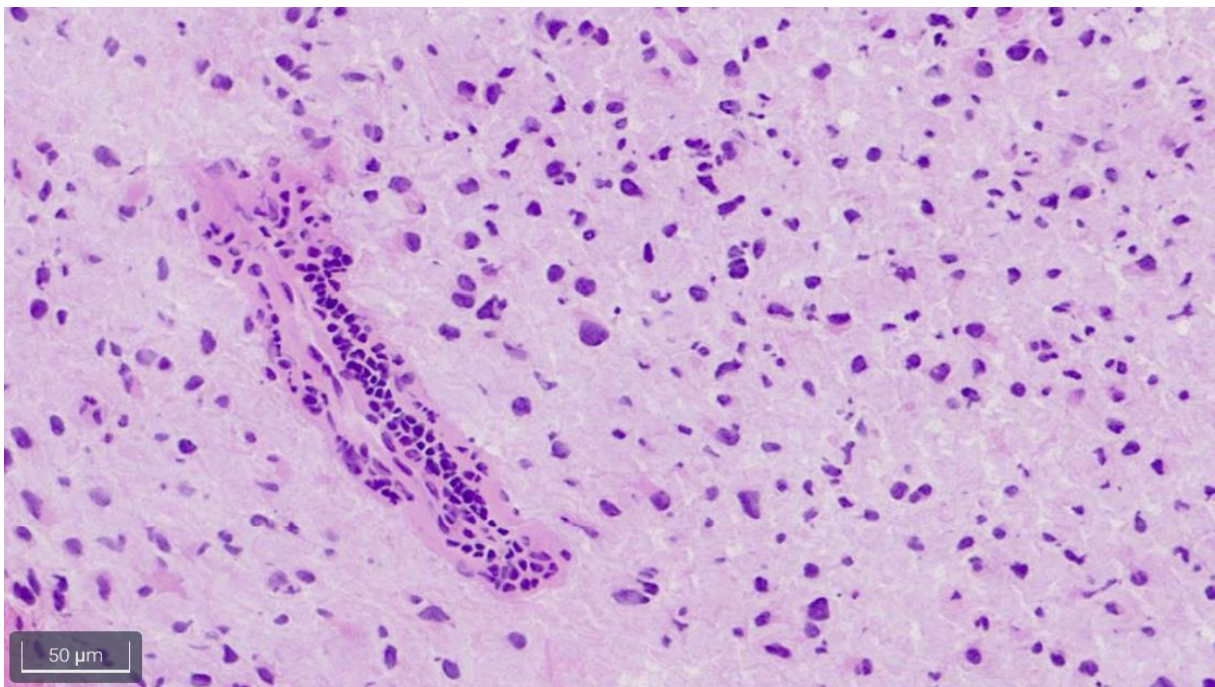


Abbildung 9: Perivaskuläre Satellitose, diffuse Verteilung pleomorpher Zellen, Patientennr. 1: Glioblastom - Zone des Übergangs, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

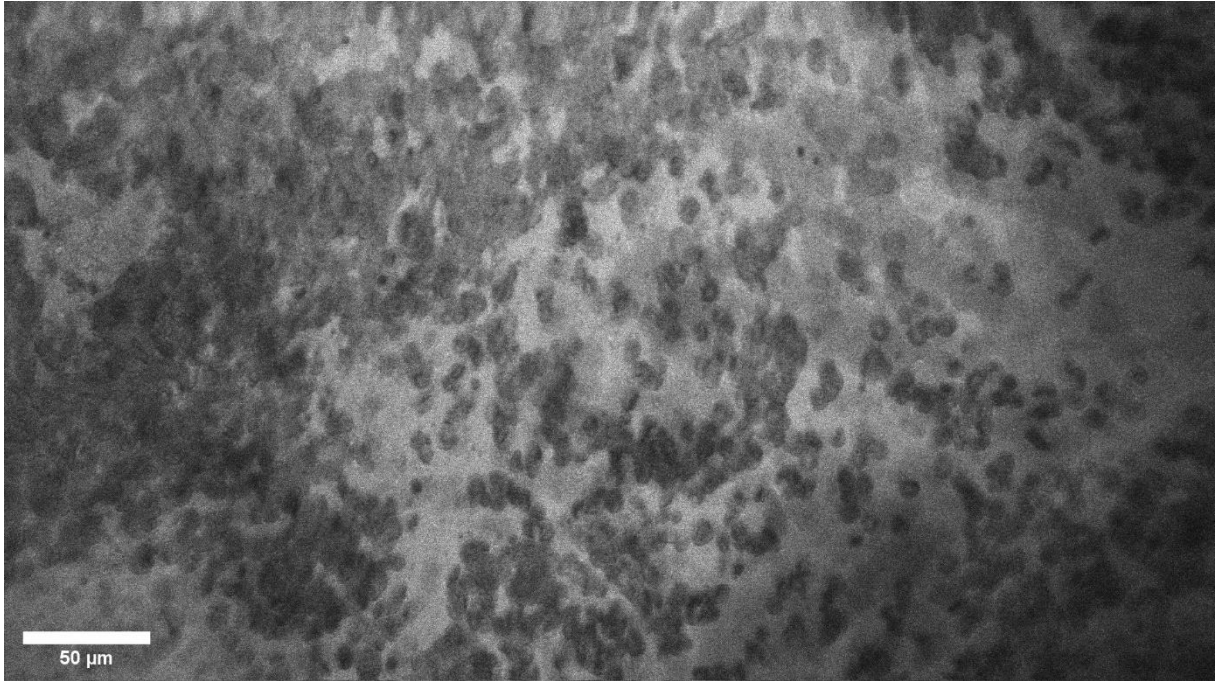


Abbildung 10: Pleomorphe Tumorzellen, Patientennr. 1: Glioblastom - Zone des Übergangs, CLE ex vivo 475 x 267μm²

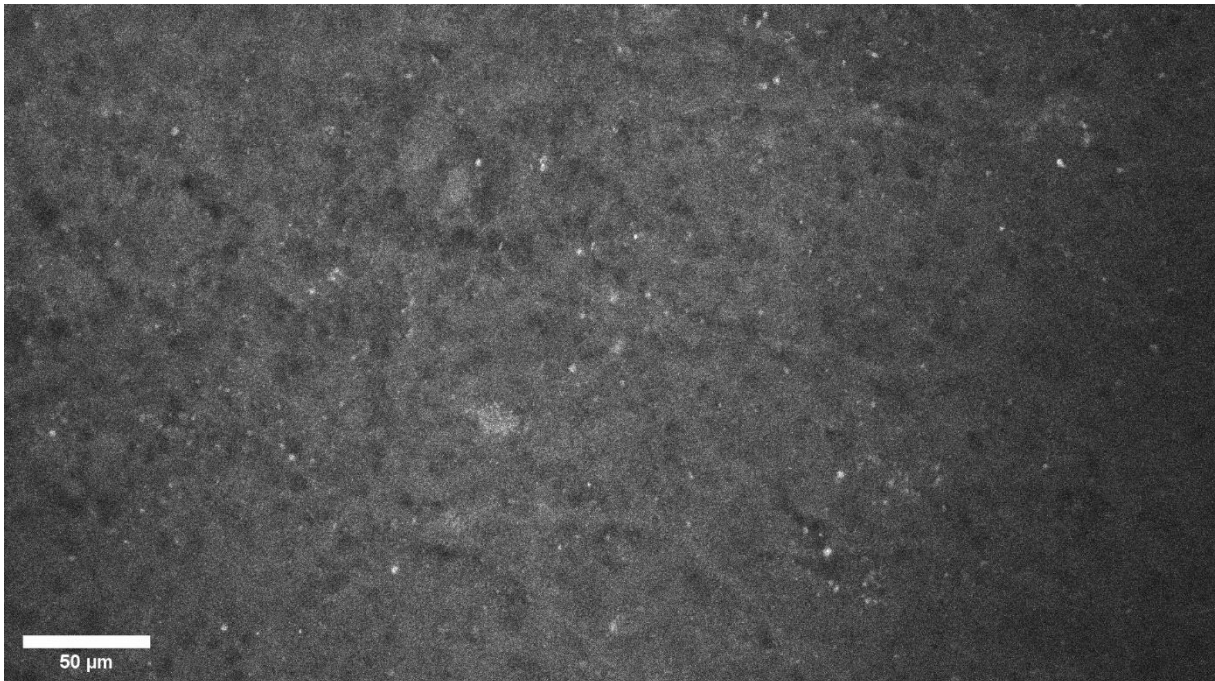


Abbildung 11: Geringe Natriumfluoresceinanreicherung, diffuse Verteilung von Autofluoreszenz; Patientennr. 1: Glioblastom - Zone des Übergangs, CLE ex vivo 475 x 267μm²

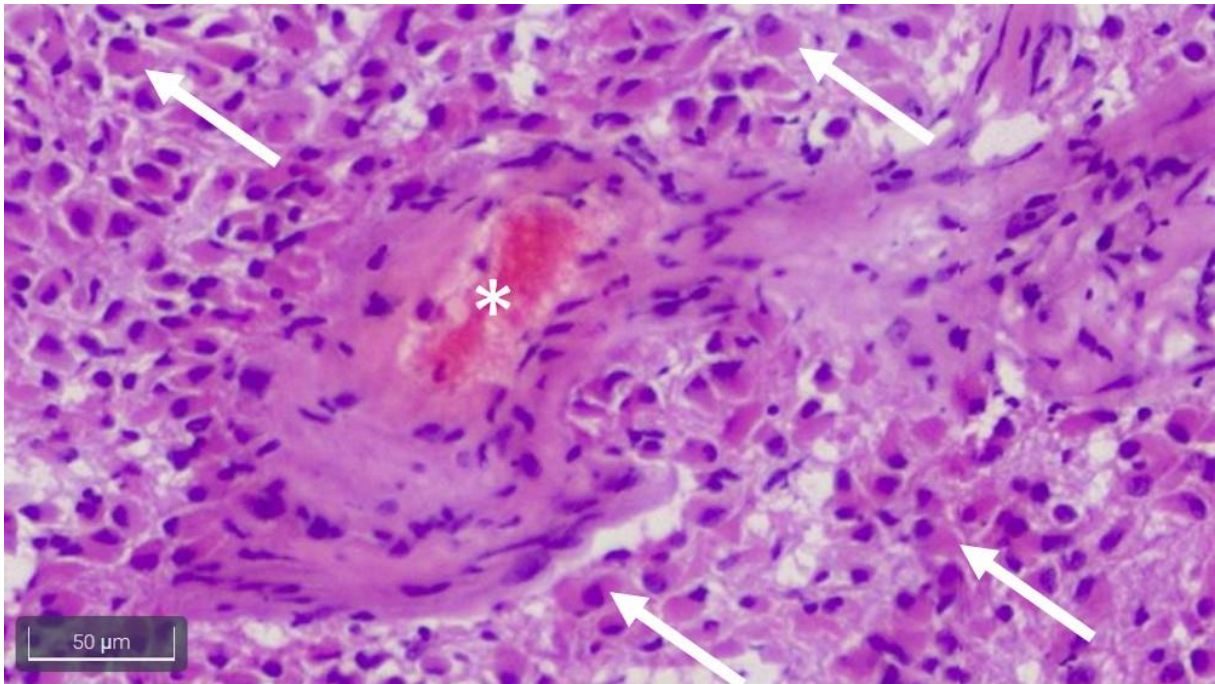


Abbildung 12: Diffus verteilte, pleomorphe, großzellige Tumorzellen (weiße Pfeile); Hyperproliferiertes/-trophiertes Endothel (um weißen Stern); Patientennr. 33: Großzelliges Glioblastom, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

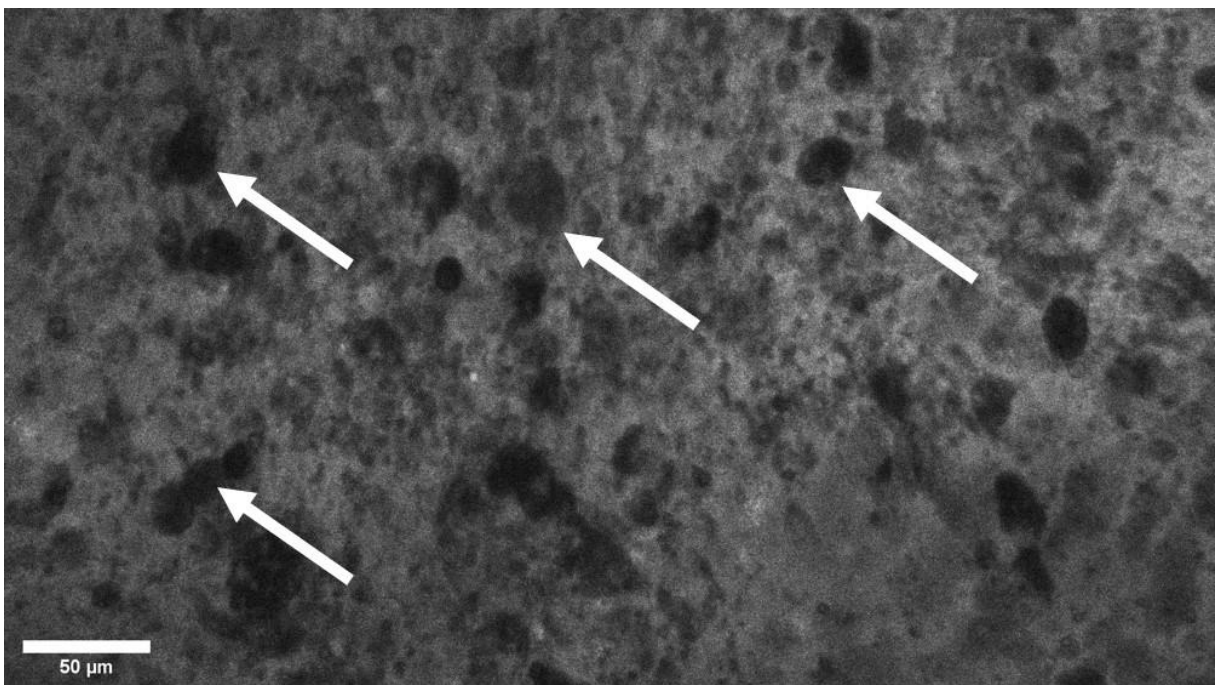


Abbildung 13: Diffus verteilte, pleomorphe, großzellige Tumorzellen (weiße Pfeile); Patientennr. 33: Großzelliges Glioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm²

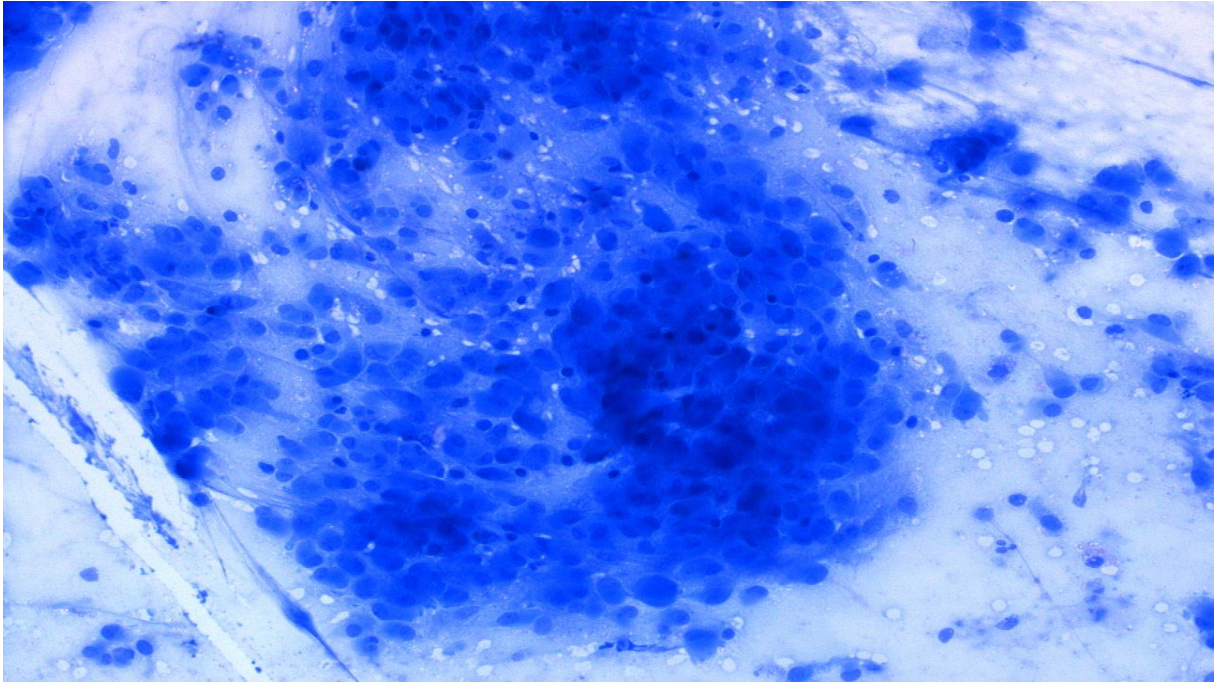


Abbildung 14: Diffus verteilte, pleomorphe, großzellige Tumorzellen; Patientennr. 33: Großzelliges Glioblastom, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung

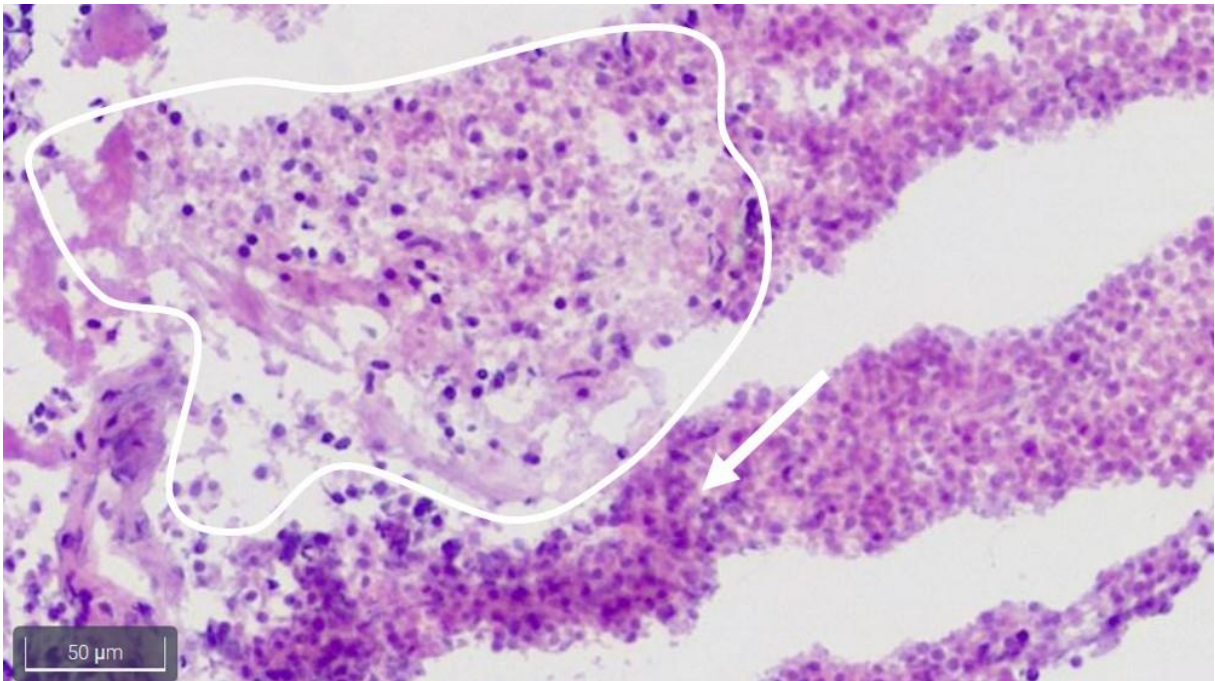


Abbildung 15 : Nekrotisches Areal (weiß umrandet), massenhaft pleomorphe Tumorzellen (Pfeil), Patientennr. 15: Spinales Ependymom, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

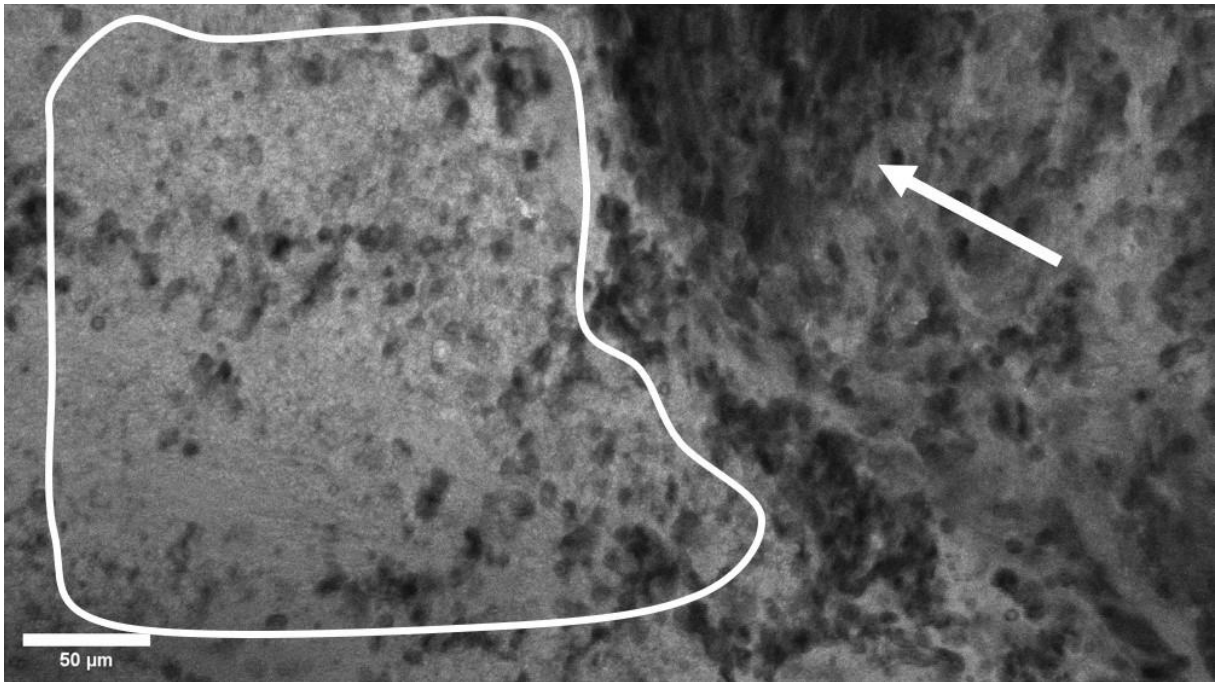


Abbildung 16: Nekrotisches Areal (weiß umrandet), massenhaft pleomorphe Tumorzellen (Pfeil), Patientennr. 15: Spinales Ependymom, ZNS WHO-Grad 3, CLE ex vivo 475 x 267μm²

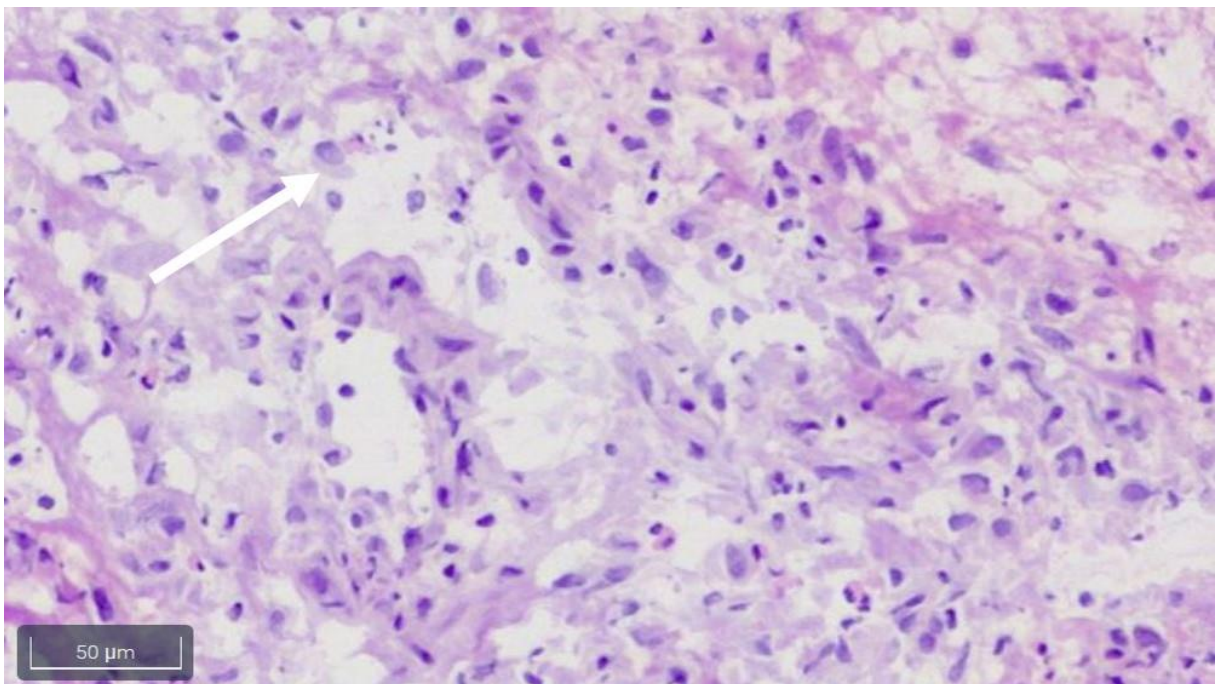


Abbildung 17: Massenhaft pleomorphe Zellen, Kern-Plasma-Relation: 7,3μm Kern – 17μm Plasma (Pfeil), Patientennr. 15: Spinales Ependymom, ZNS WHO-Grad 3, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

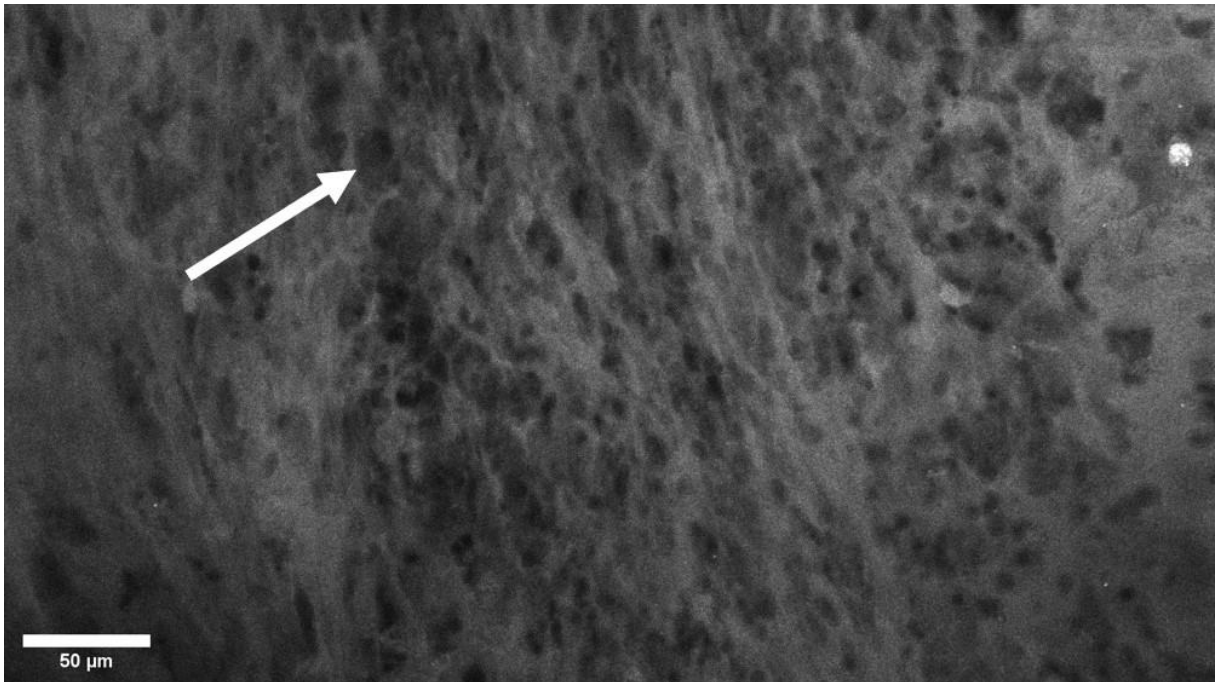


Abbildung 18: Massenhaft Pleomorphe Zellen, Kern-Plasma-Relation: 14,1 μ m Kern – 24,3 μ m Plasma (Pfeil), Autofluoreszenz am rechten Bildrand, Patientennr. 15: Spinales Ependymom, ZNS WHO-Grad 3, CLE ex vivo 475 x 267 μ m²

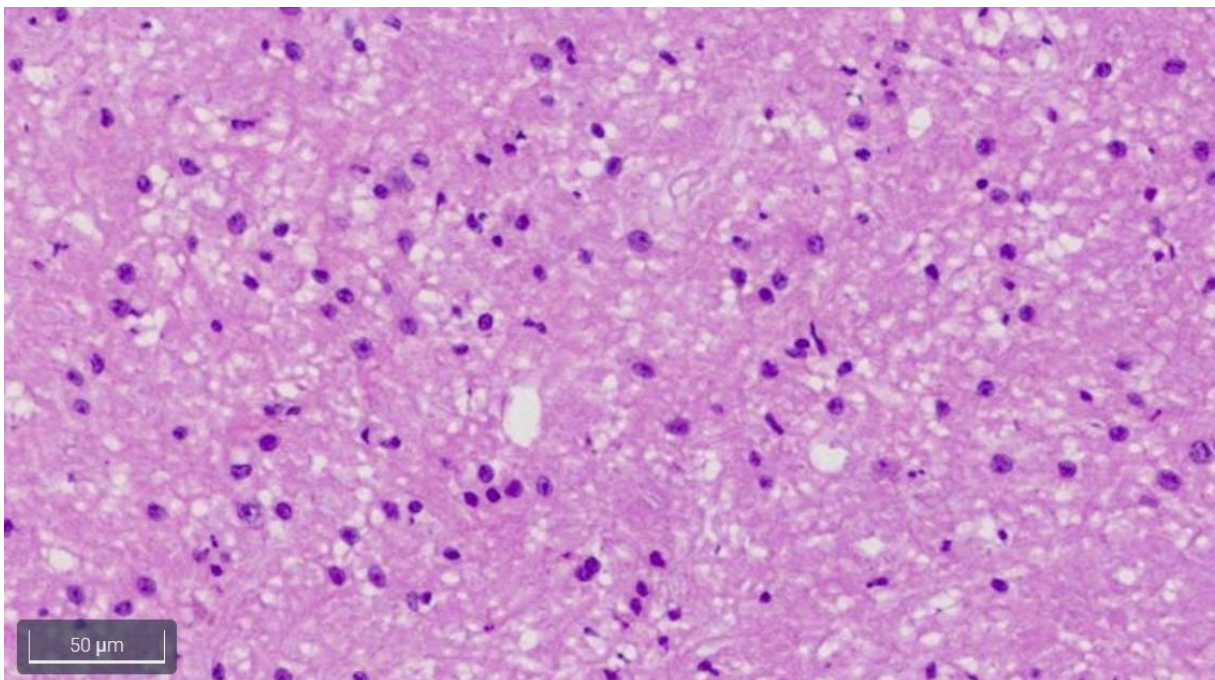


Abbildung 19: uniform rundliche Tumorzellen, geringe Tumorzelllast; Patientennr. 19: Oligodendrogliom, ZNS WHO-Grad 2, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

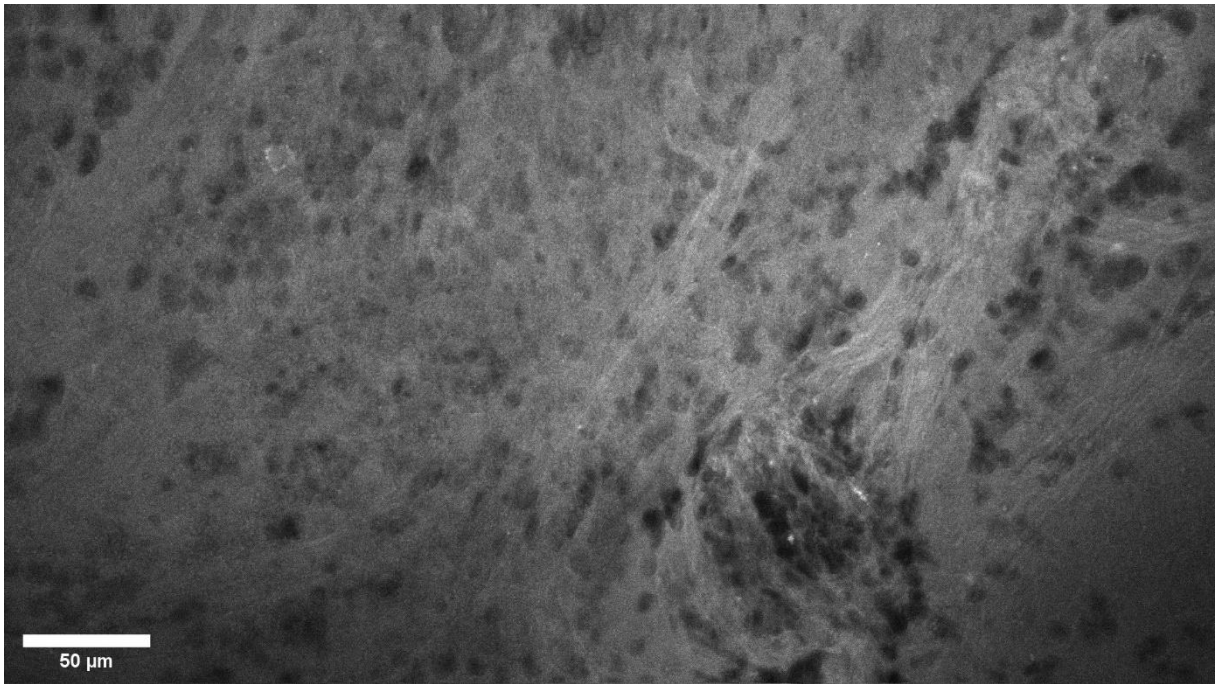


Abbildung 20: uniform rundliche Tumorzellen, erhöhte Kontrastierung von Strängen in der extrazellulären Matrix; Patientennr. 19: Oligodendrogliom, ZNS WHO-Grad 2, CLE ex vivo 475 x 267μm²

6.1.2 Metastasen

Beim ersten Einsatz von CLE in der intraoperativen Diagnosestellung einer Metastase wurden 342 Bilder geschossen, wobei in den darauffolgenden Anwendungen sich die Anzahl auf knapp 100 reduzierte.

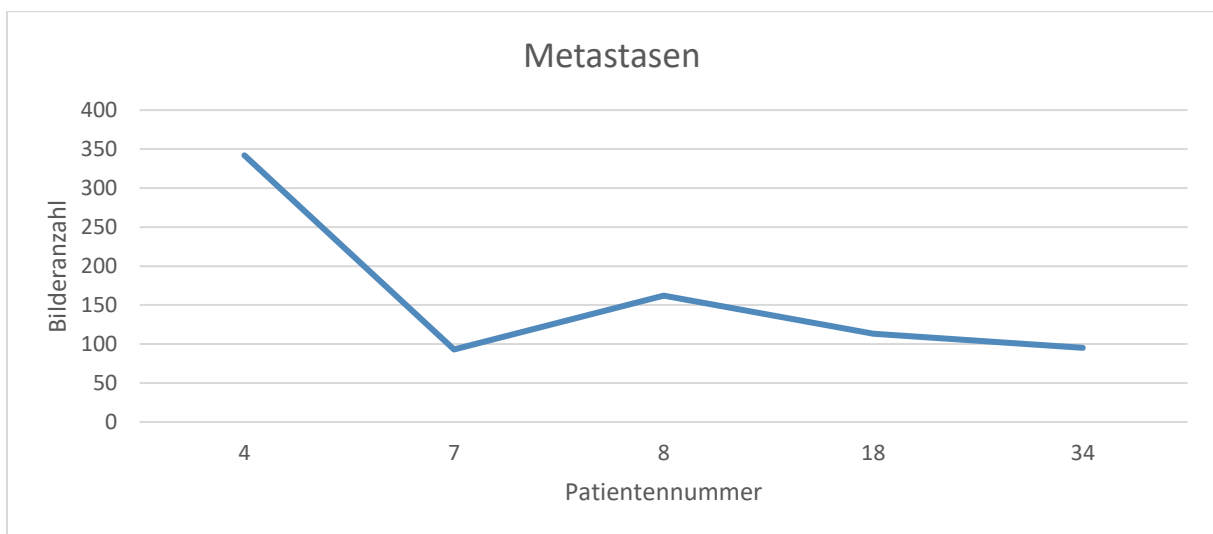


Abbildung 21: Anzahl CLE-Aufnahmen von Metastasen im chronologischen Verlauf

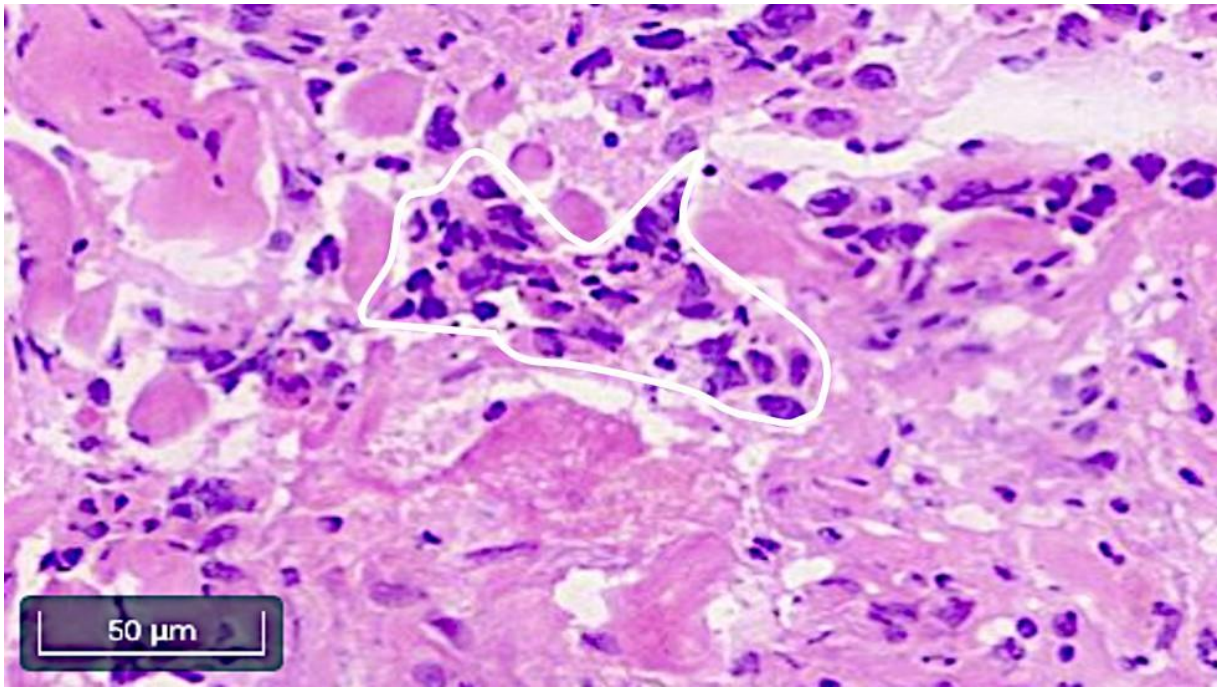


Abbildung 22: Pleomorphe Zellen (weiß umrandet), Patientennr. 18: Urothelkarzinom-Metastase, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

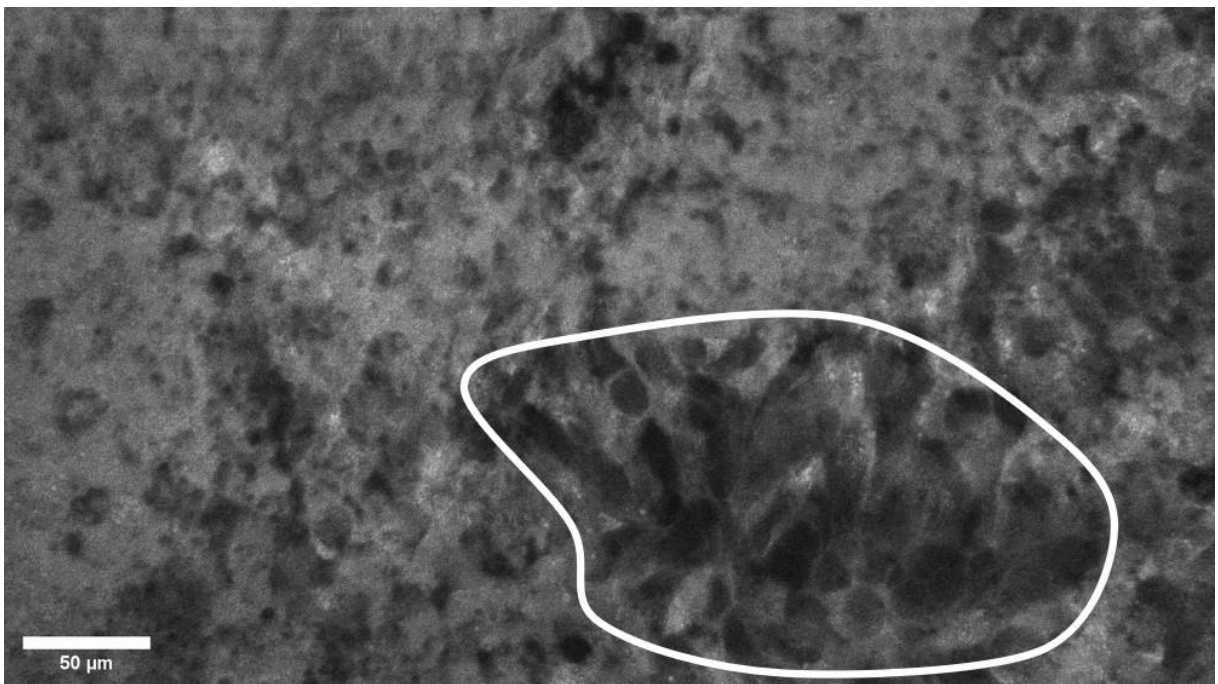


Abbildung 23: Pleomorphe Zellen (weiß umrandet), Patientennr. 18: Urothelkarzinom-Metastase, CLE ex vivo 475 x 267µm²

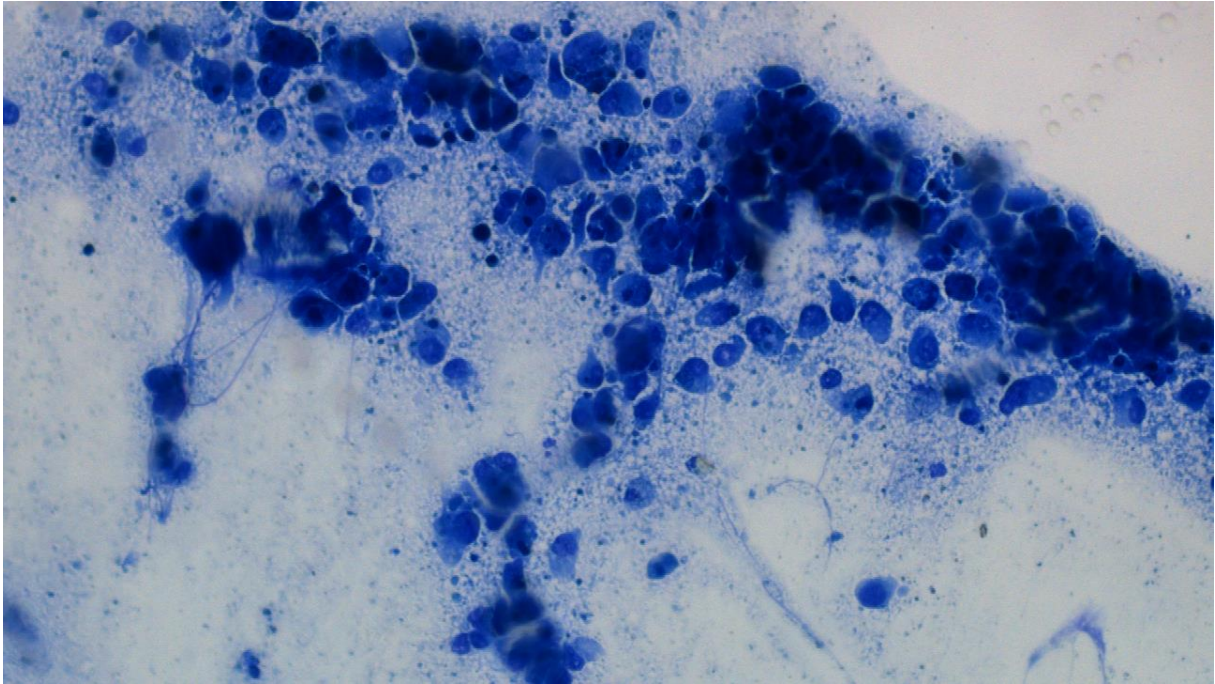


Abbildung 24: Pleomorphe Zellen, 40fache Vergrößerung; Patientennr. 18: Urothelkarzinom-Metastase, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung

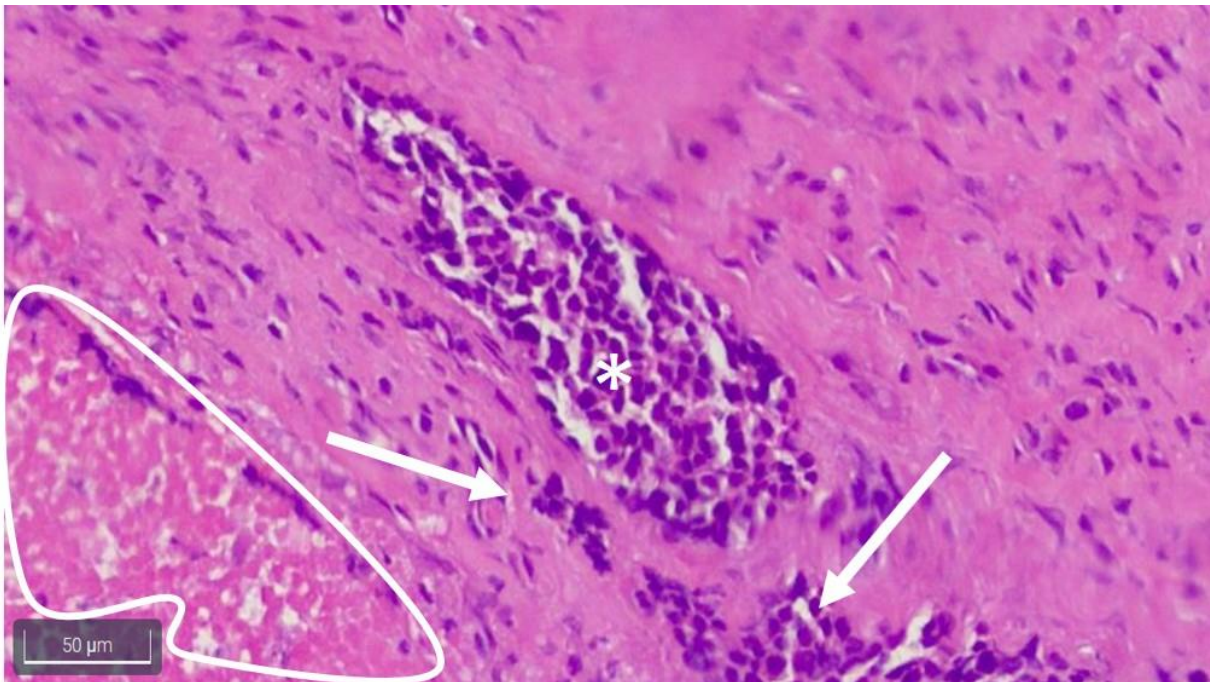


Abbildung 25: pleomorphe Zellen (Pfeile), nekrotische Einblutung (weiß umrandet), Mikrovaskularisation (Stern), umgebendes Metastasenstroma, Patientennr. 4: Mammakarzinom-Metastase, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

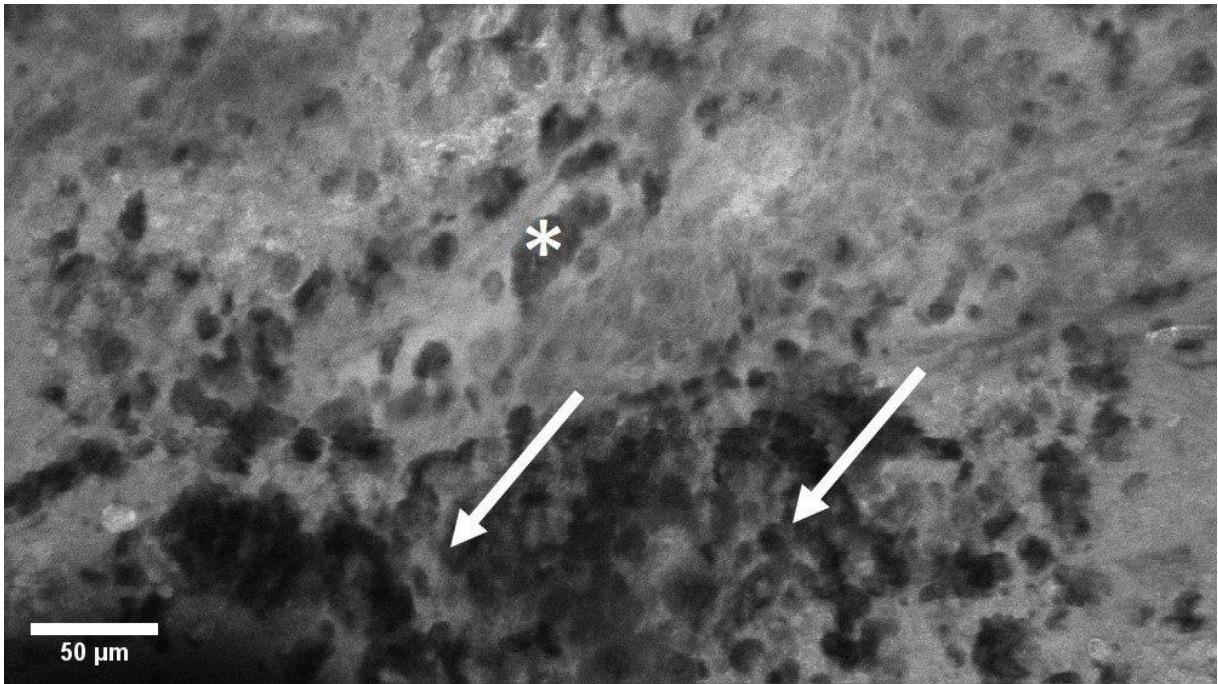


Abbildung 26: Pleomorphe Zellen (Pfeile), Mikrovaskularisation (Stern), Metastasenstroma, Patientennr. 4: Mammakarzinom-Metastase, CLE ex vivo 475 x 267µm²

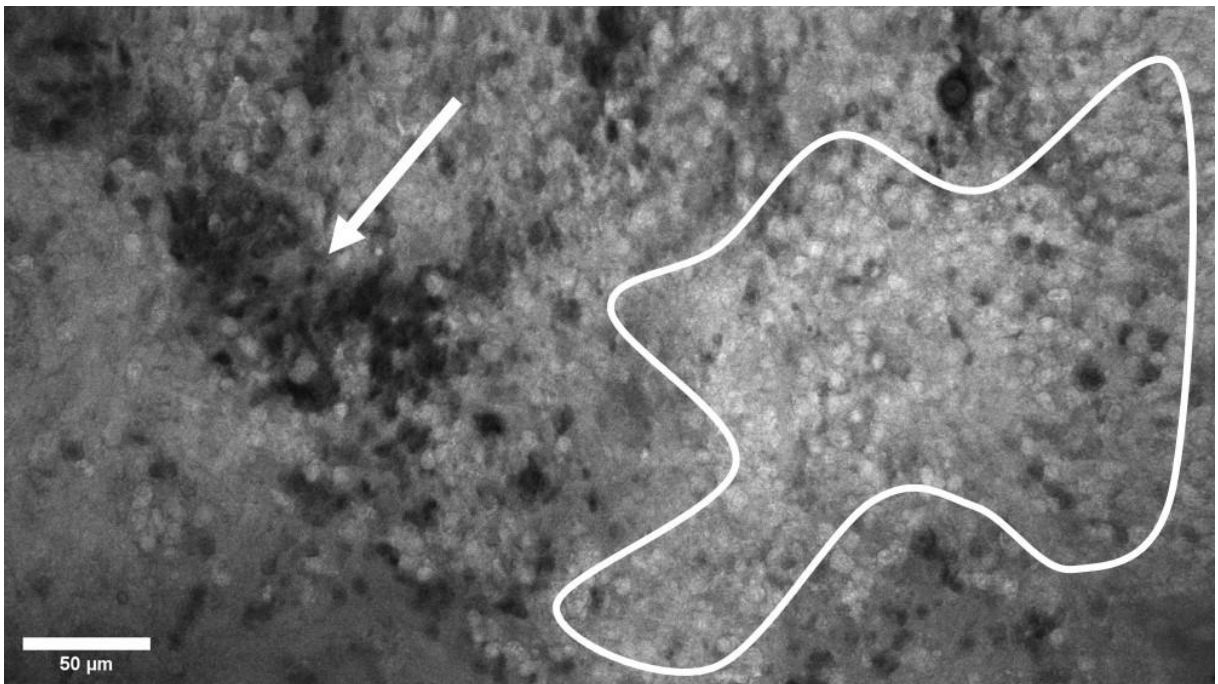


Abbildung 27: Pleomorphe Zellen (Pfeil), nekrotische Einblutung (weiß umrandet), Patientennr. 4: Mammakarzinom-Metastase, CLE ex vivo 475 x 267µm²

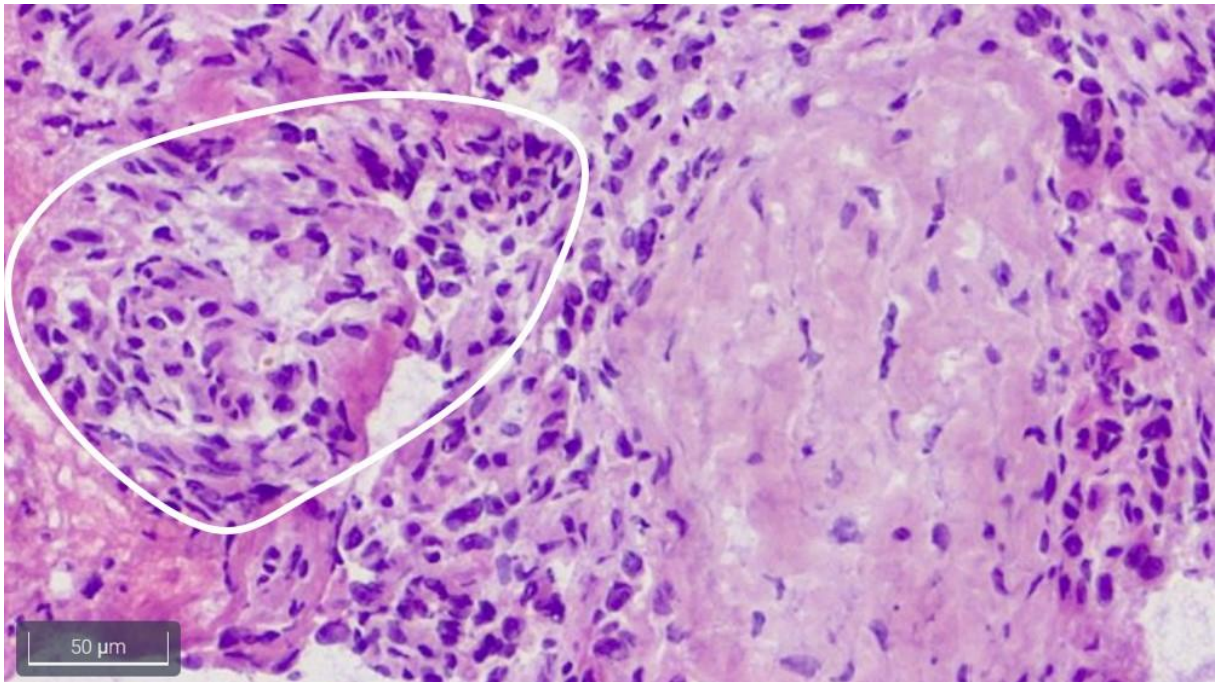


Abbildung 28: Pleomorphe Zellen (weiß umrandet), Metastasenstroma, Patientennr. 7: Hepatozelluläre Karzinom-Metastase, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

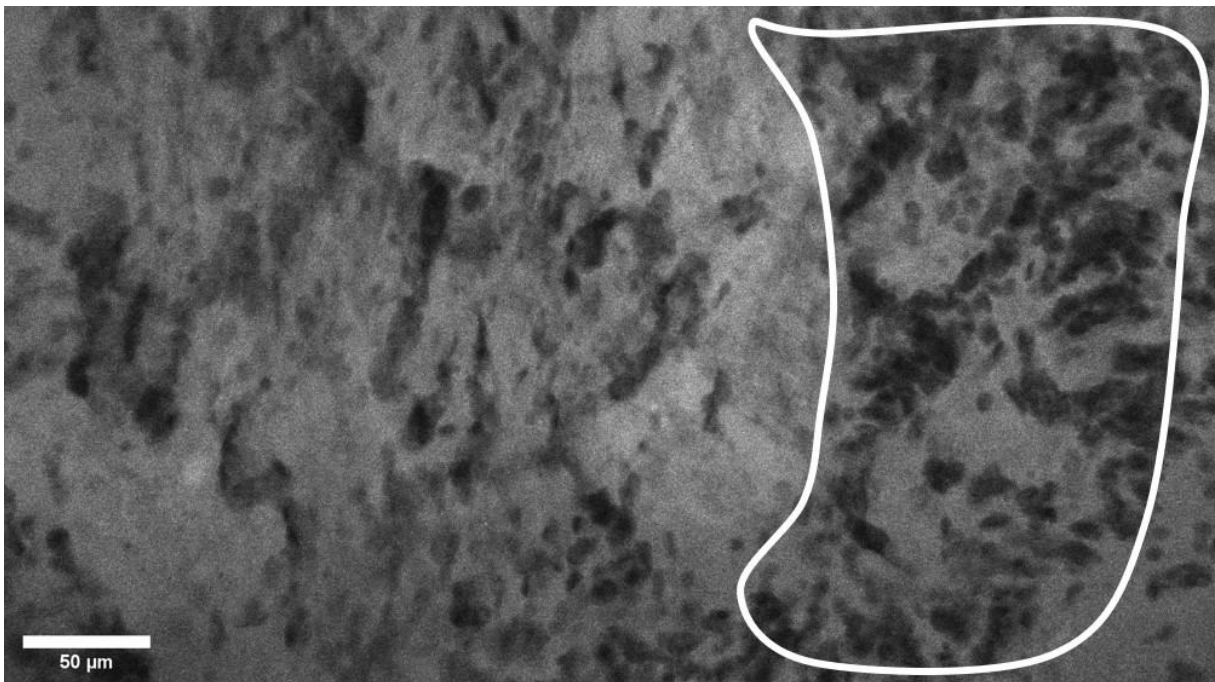


Abbildung 29: Pleomorphe Zellen (weiß umrandet), Metastasenstroma, Patientennr. 7: Hepatozelluläre Karzinom-Metastase, CLE ex vivo 475 x 267μm²

Der ausgeprägte Pleomorphismus und die lokale Hyperzellularität mit vermehrtem Kontakt metastatischer Tumorzellen, was auf einen epitheloiden oder glandulären Charakter schließen

lässt, konnte anhand jeder angewandten Methode dargestellt werden. Mikrovaskularisationen und nekrotische Areale sind durch den HE-Gefrierschnitt und die CLE zu erkennen.

6.1.3 Meningeome

Ebenso ist die Tendenz der aufgenommenen Bildermenge bei den Hirntumoren duralen Ursprungs abnehmend.

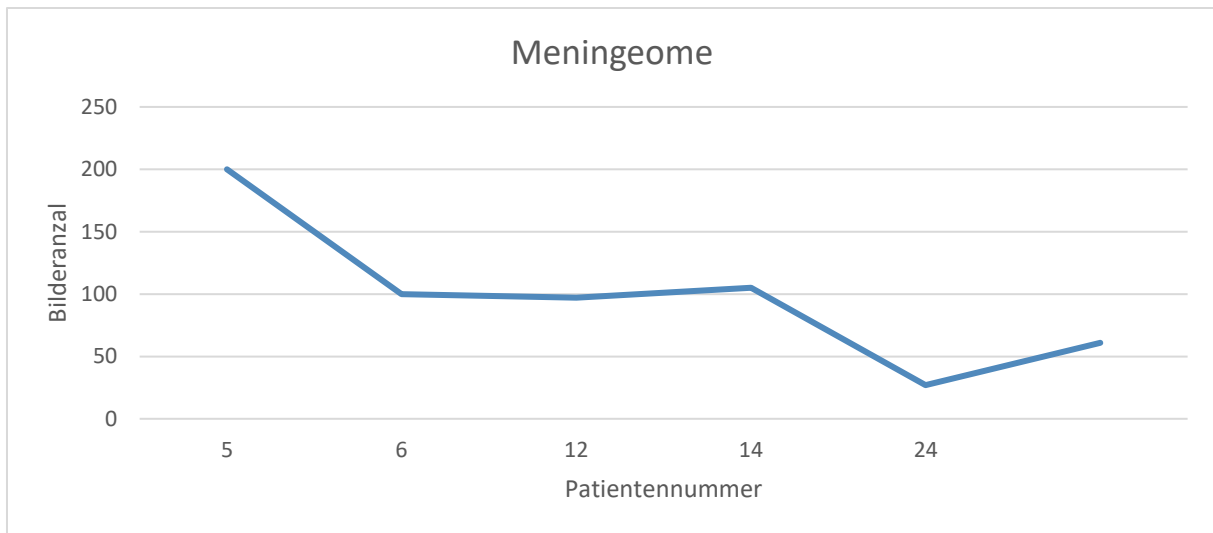


Abbildung 30: Anzahl CLE-Aufnahmen von Meningeomen im chronologischen Verlauf

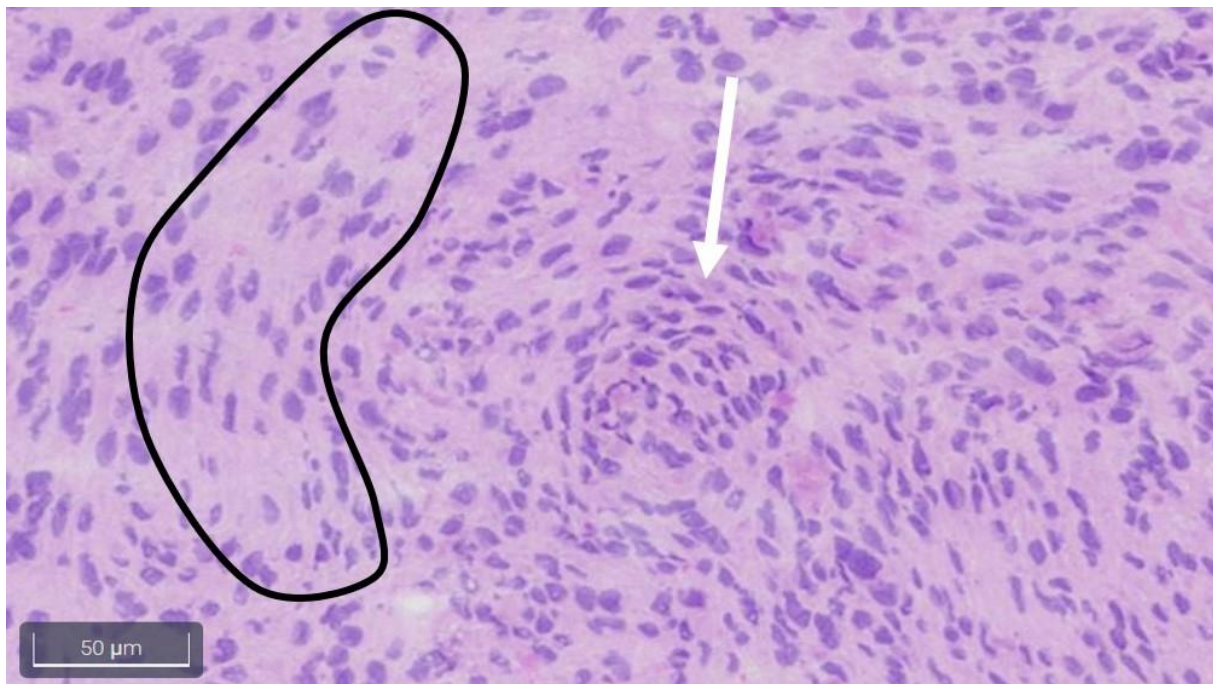


Abbildung 31: Psammonkörper (Pfeil), fibröser Zellverband (schwarz umrandet), HE-Präparat, Patientennr. 6: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO-Grad 1, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

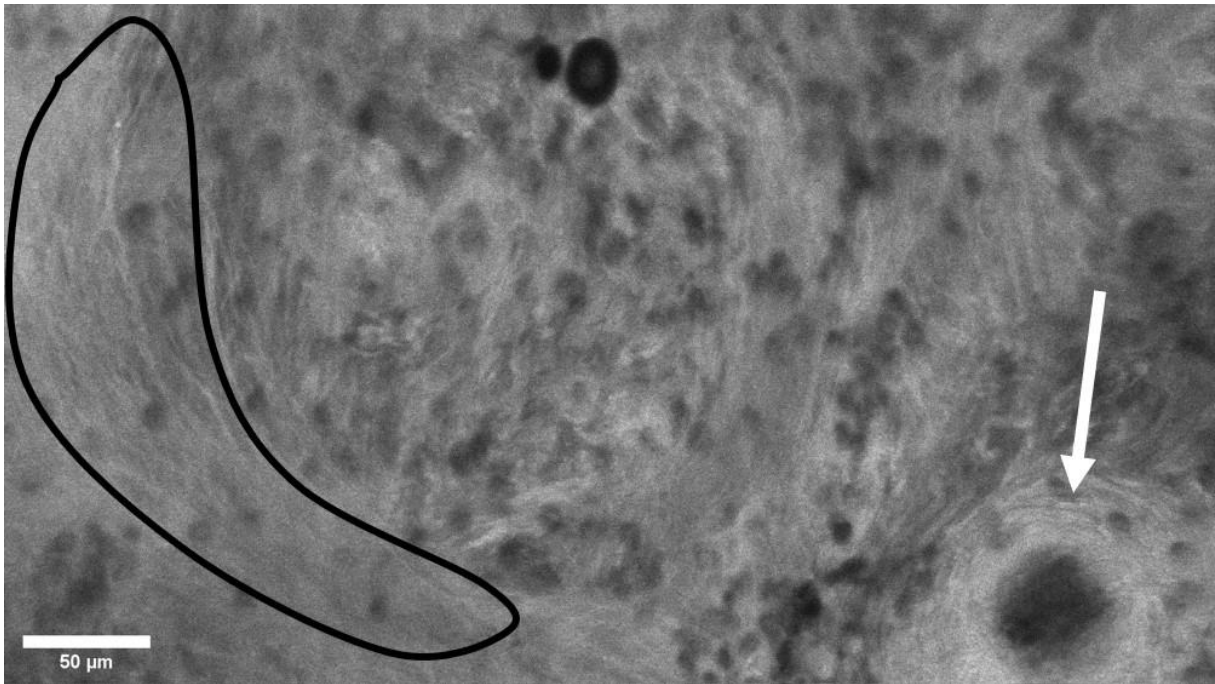


Abbildung 32: Psammokörper (Pfeil), fibröser Zellverband (schwarz umrandet), Patientennr. 6: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO-Grad 1, CLE ex vivo 475 x 267μm²

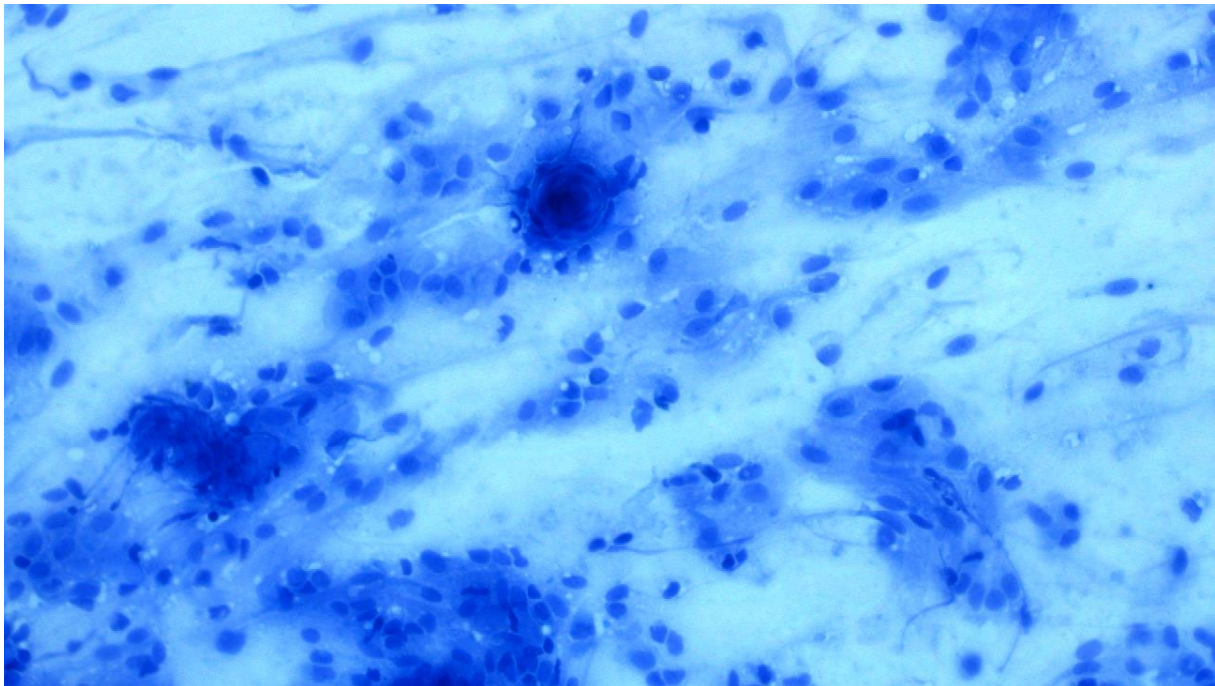


Abbildung 33: fibröse Faserung, Psammokörper, 40fache Vergrößerung; Patientennr. 6: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO-Grad 1, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung

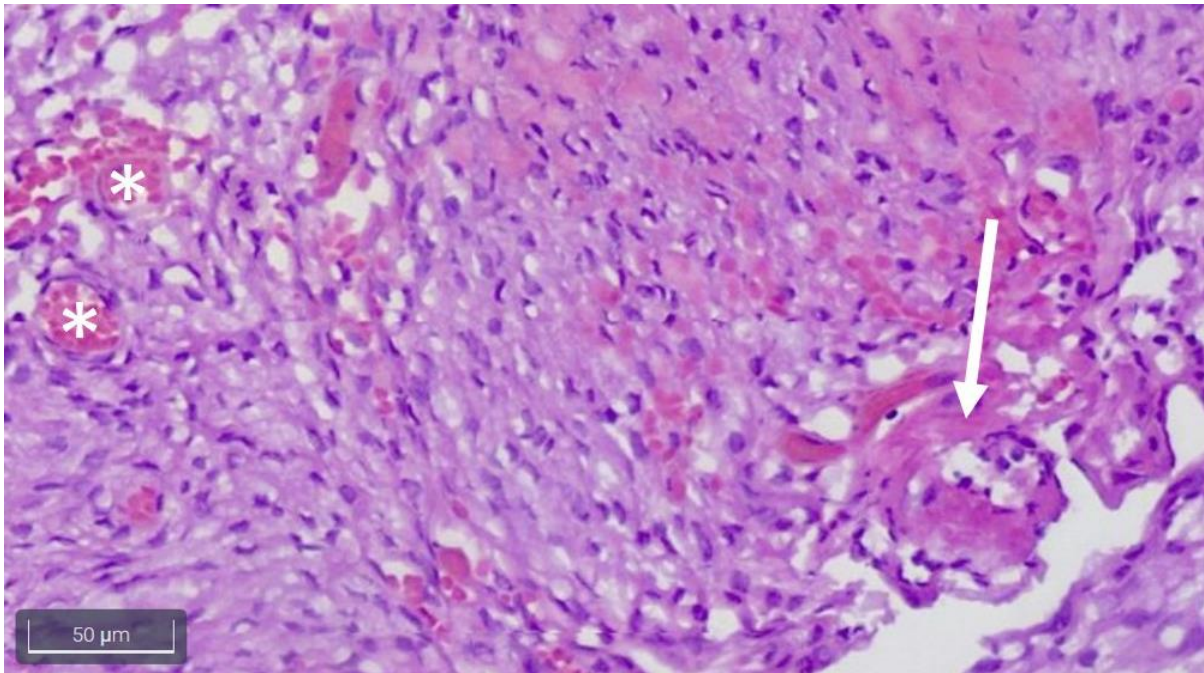


Abbildung 34: Psammonkörper (Pfeil), Mikrovaskularisation (Sterne), HE-Präparat, Patientennr. 26: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO-Grad 2, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

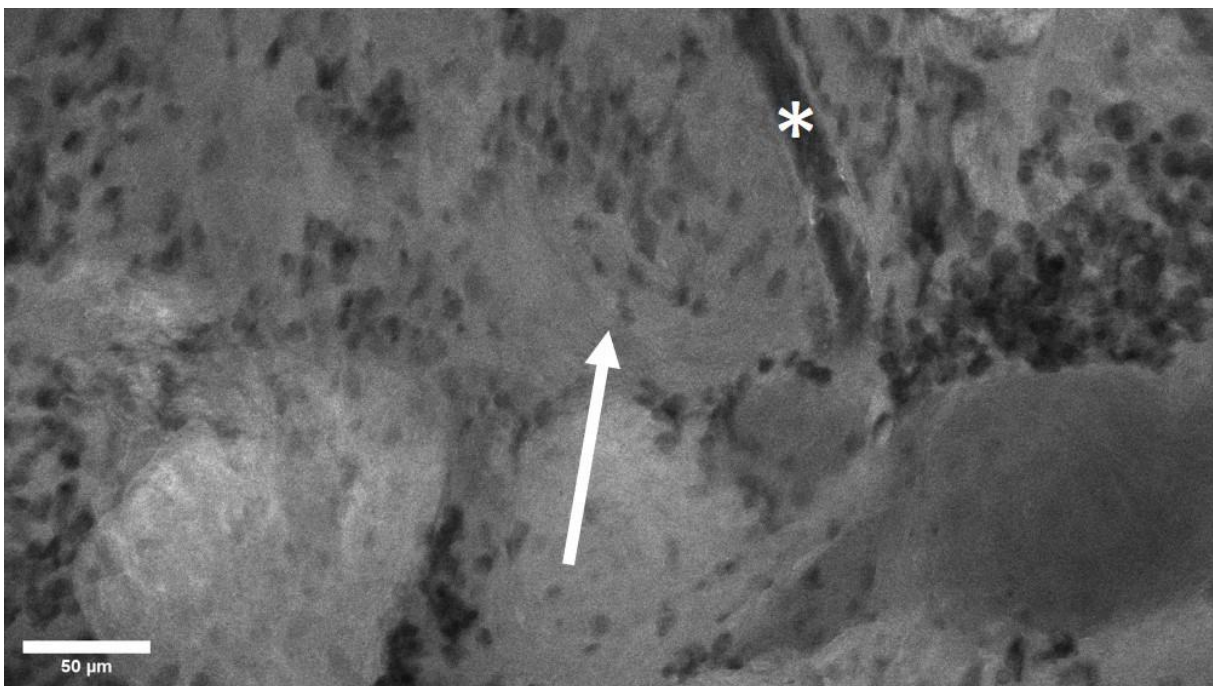


Abbildung 35: Psammonkörper (Pfeil), Mikrovaskularisation (Stern), Patientennr. 26: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO-Grad 2, CLE ex vivo 475 x 267μm²

Die für Meningeome pathognomischen Psammonkörper und fibrösen Zellverbände zeigen sich in allen diagnostischen Herangehensweisen und die Zellularität kann anhand dieser eingeschätzt werden. Mikrovaskularisationen sind in HE- und CLE-Bildern darstellbar.

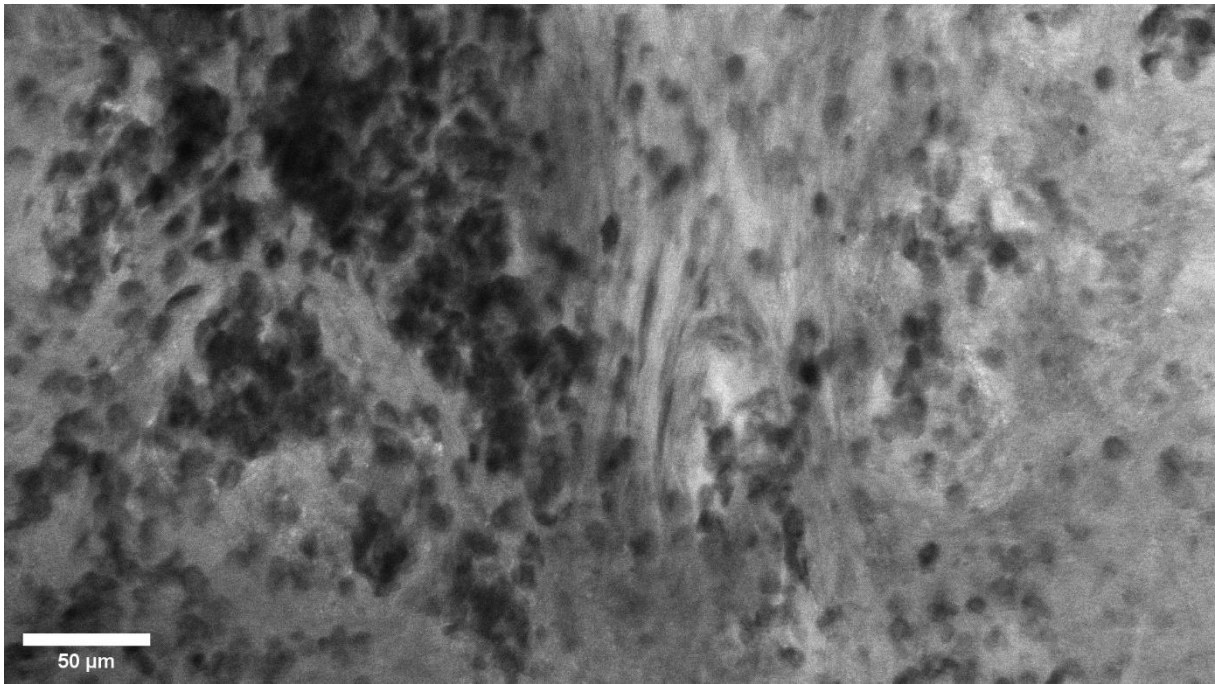


Abbildung 36: Hyperzellularität, fibröse Zellverbände; Patientennr. 24: Meningeom, ZNS WHO-Grad 2, CLE ex vivo 475 x 267µm²

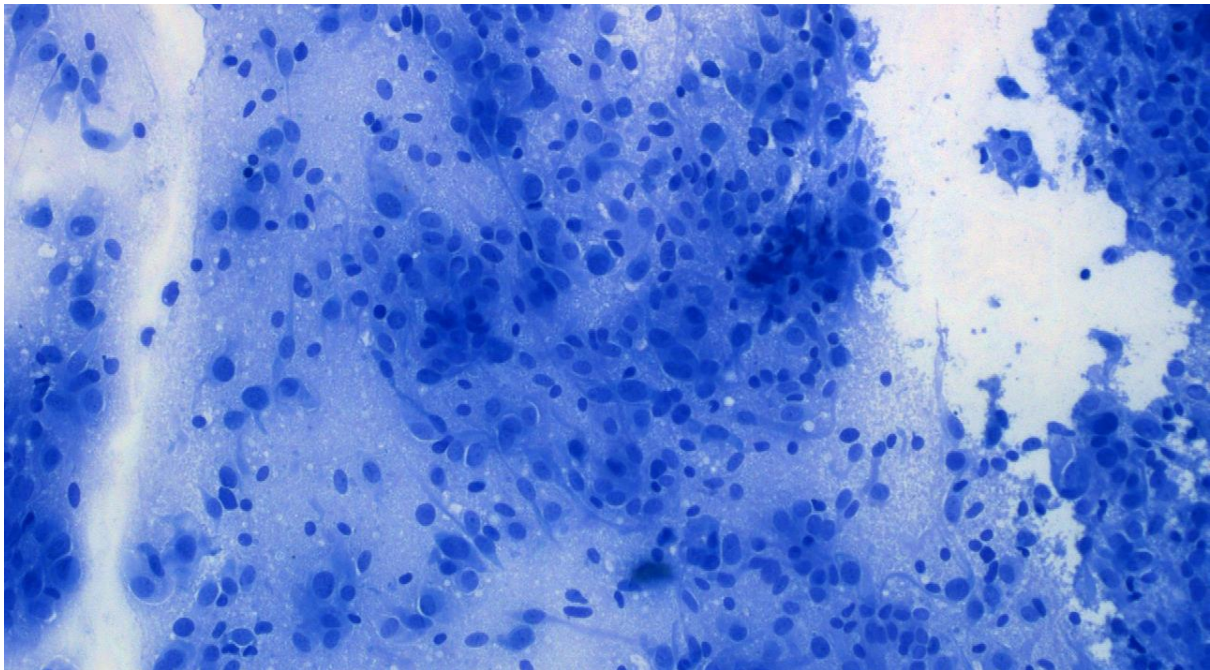


Abbildung 37: Hyperzellularität, fibröse Zellverbände; Patientennr. 24: Meningeom, ZNS WHO-Grad 2, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung

6.1.4 Sonstige Entitäten

Zu den restlichen zentralnervösen Neoplasien gehören wie oben bereits genannt ein Pineozytom ZNS WHO-Grad 1, zwei Hypophysenadenome, ein Schwannom ZNS WHO-Grad 1,

einmalig zellarmer Zysteninhalte, ein Hämangioblastom ZNS WHO-Grad 1, ein Plasmozytom, ein Plexuspapillom und eine reaktive Entzündung eines strahlentherapierten Glioblastoms.

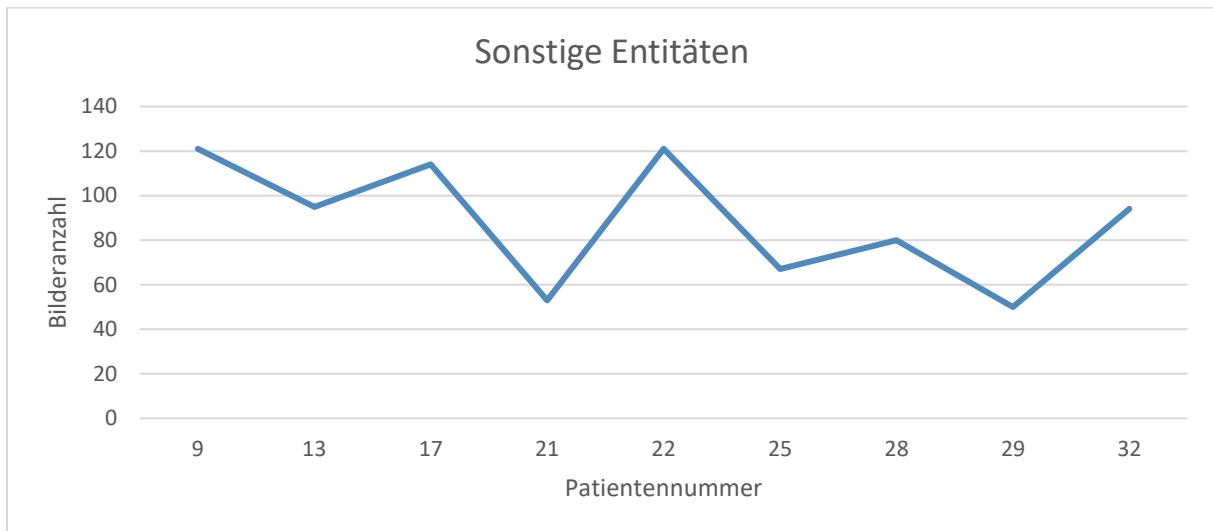


Abbildung 38: Anzahl CLE-Aufnahmen von sonstigen Tumorentitäten im chronologischen Verlauf

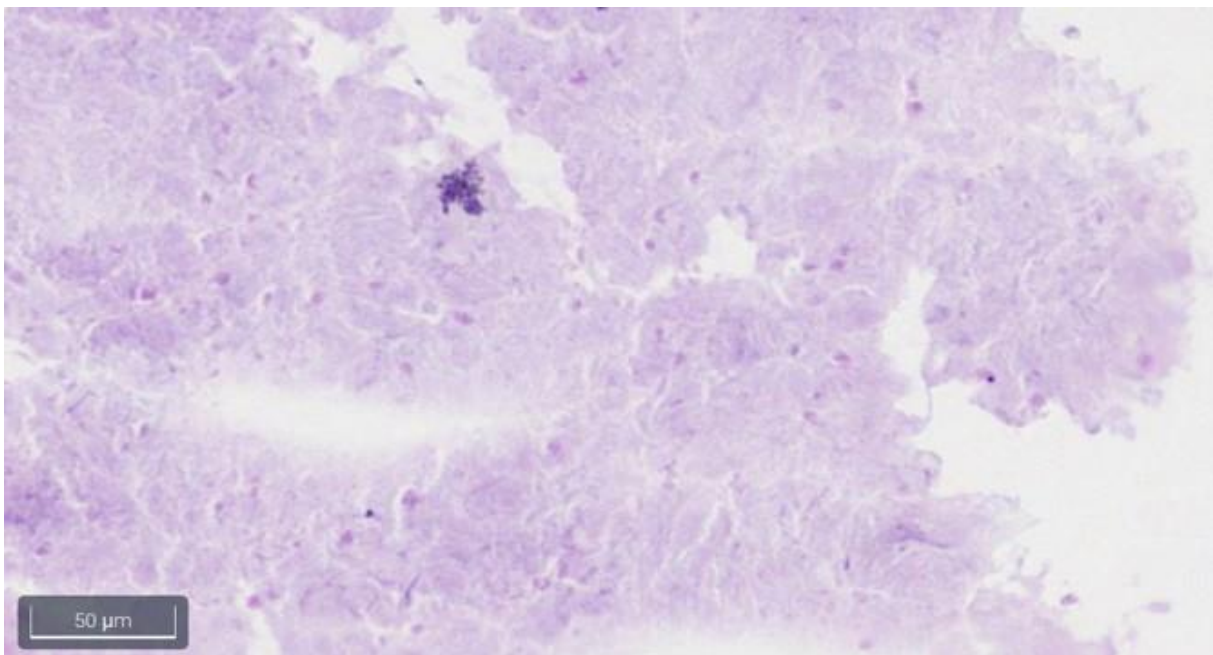


Abbildung 39: zellarmes muköses Gewebe, keine Gewebsarchitektur erkennbar, Patientennr. 21: Hypophysäre Zyste, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

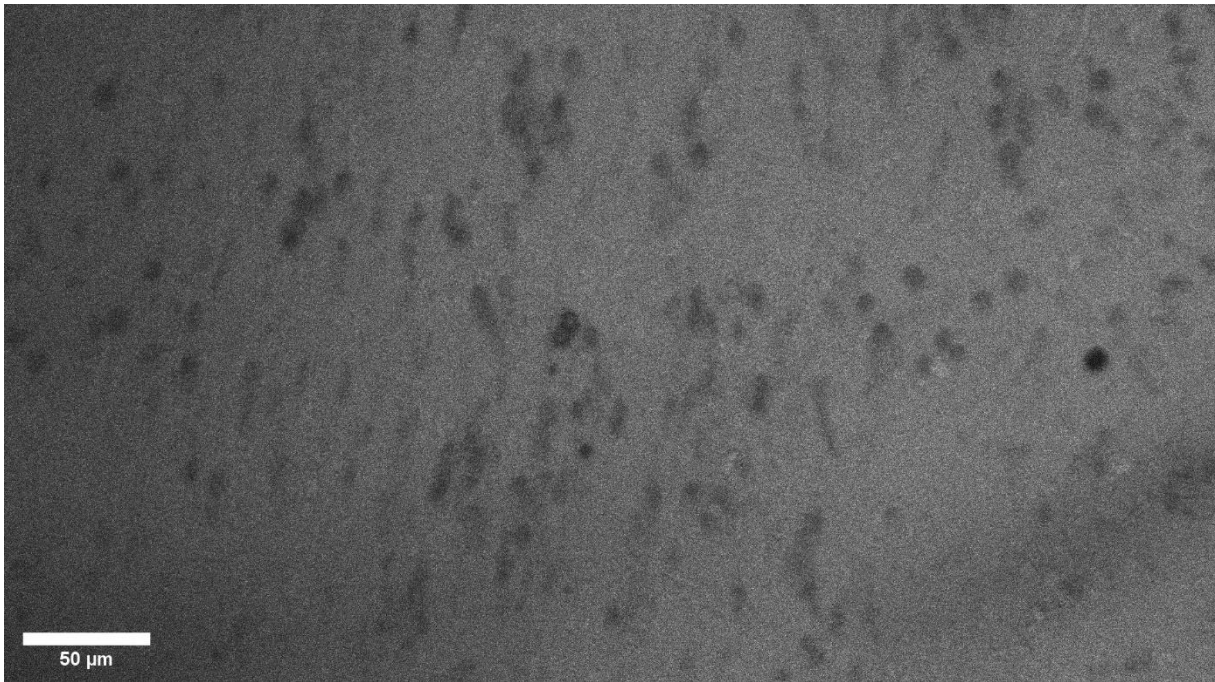


Abbildung 40: keine Gewebsarchitektur erkennbar, keine eindeutige Fluoreszenzanreicherung, zellarmes Gewebe; Patientennr. 21: Hypophysäre Zyste, CLE ex vivo 475 x 267 μ m²



Abbildung 41: zellarmes Gewebe; Patientennr. 21: Hypophysäre Zyste, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung

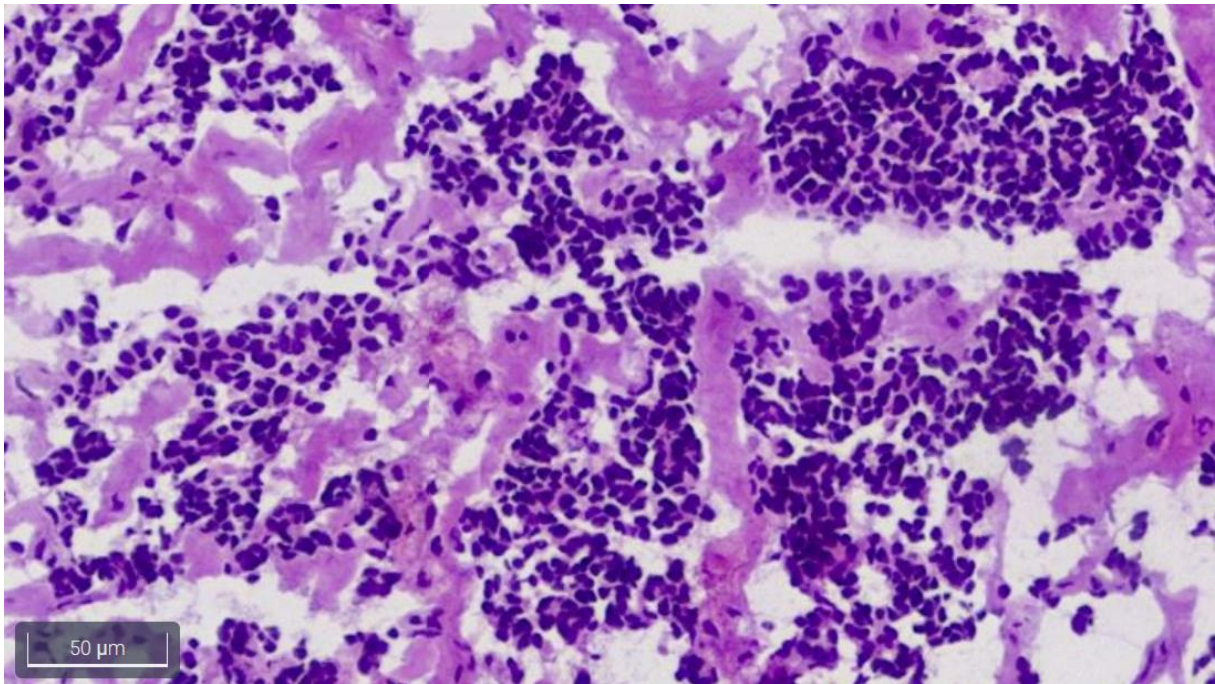


Abbildung 42: Hyperzellularität von uniform runden und basophilen Zellen, fibröse Durchsetzung mit Mikrovaskularisation; Patientennr. 22: Rezidiertes Hypophysenadenom, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

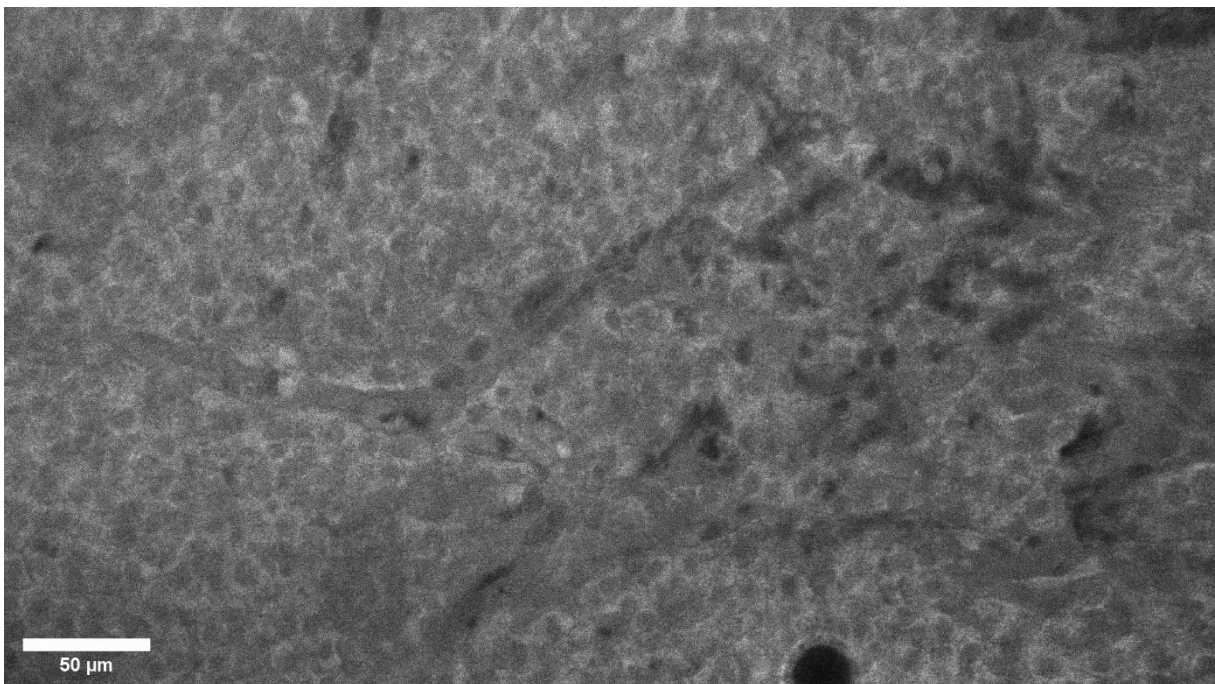


Abbildung 43: Hyperzellularität von uniform runden Zellen, fibröse Durchsetzung mit Mikrovaskularisation; Patientennr. 22: Rezidiertes Hypophysenadenom, CLE ex vivo 475 x 267µm²

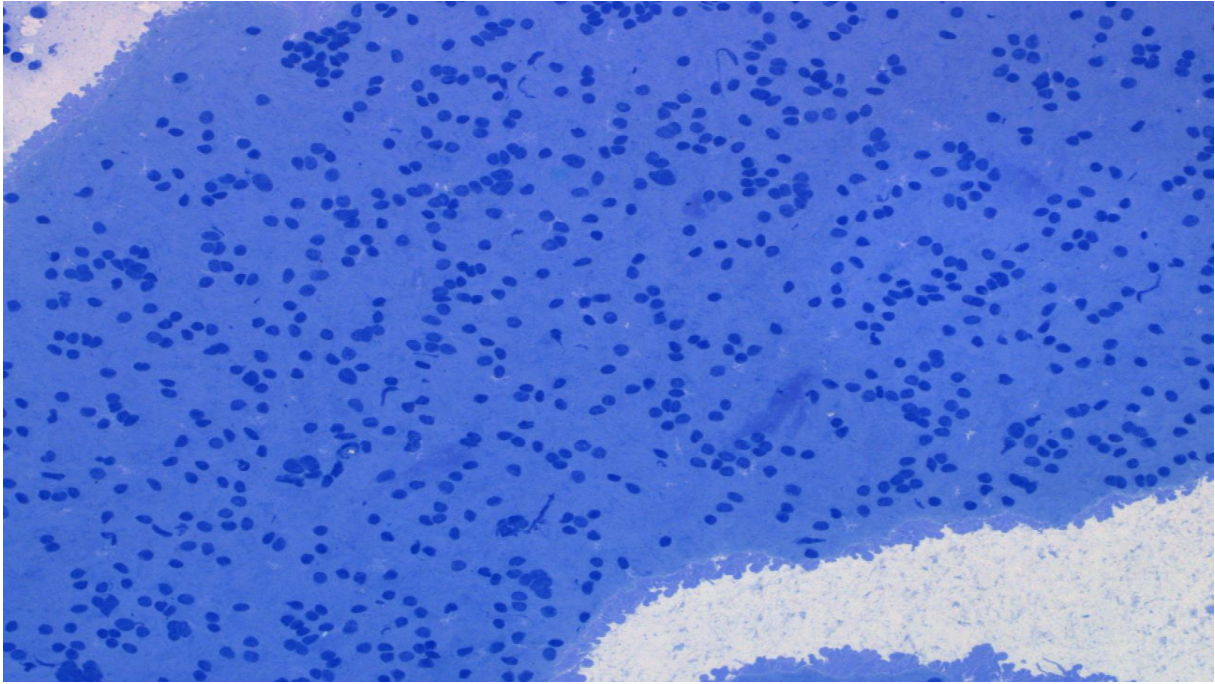


Abbildung 44: Hyperzellularität von uniform runden Zellen, Patientennr. 22: Rezidiertes Hypophysenadenom, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung

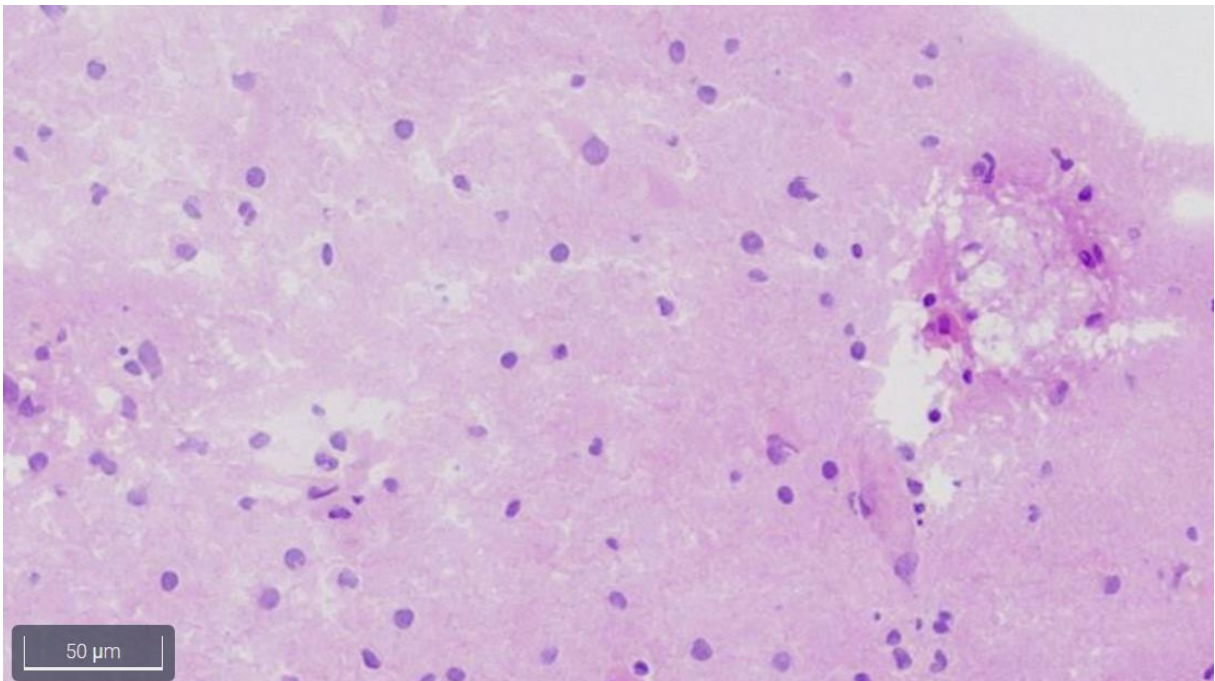


Abbildung 45: partielle Nekrose, entzündlich gelockerte Architektur; Patientennr. 32: reaktive Entzündung nach Radiatio bei Metastase, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

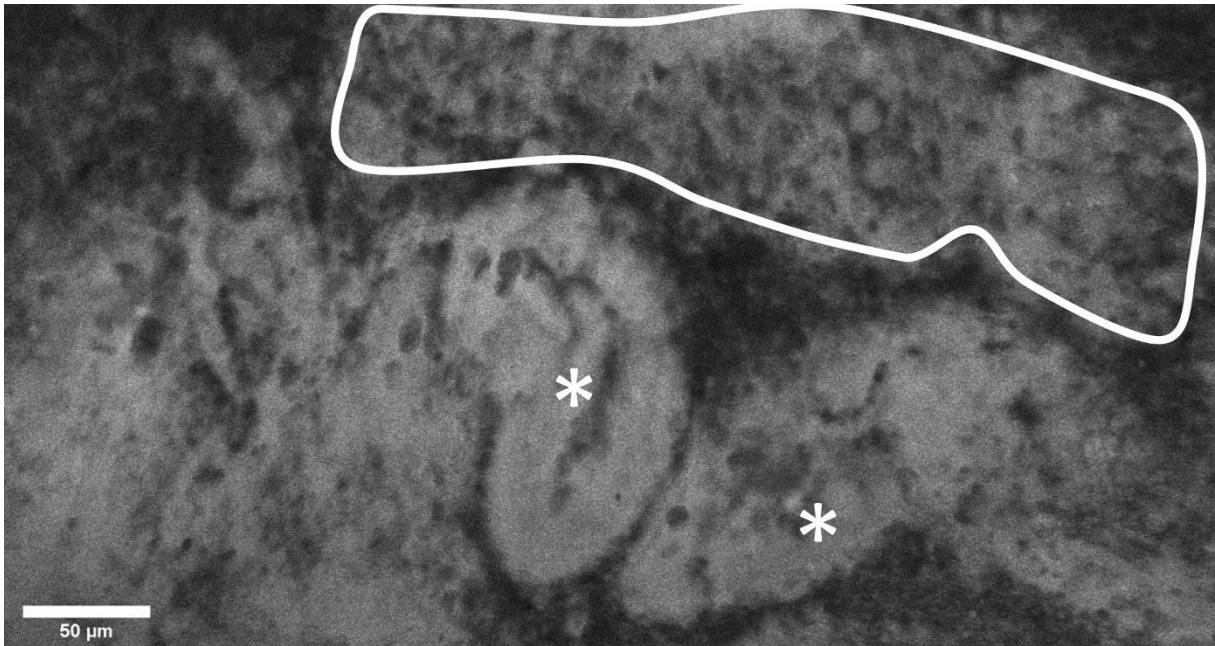


Abbildung 46: partielle Nekrose (weiß eingerahmt), Gefäßduplikation (weiße Sterne), Fokustiefe 28μm; Patientennr. 32: Reaktive Entzündung nach Radiatio einer Metastase, CLE ex vivo 475 x 267μm²

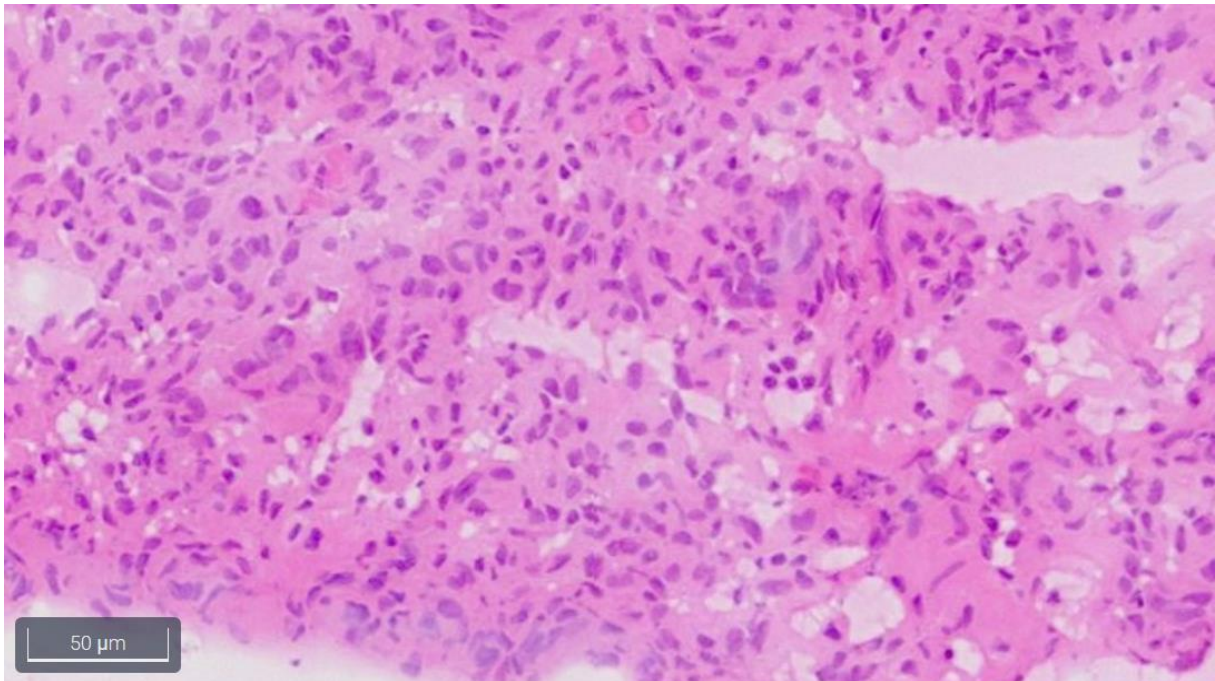


Abbildung 47: pleomorphe Tumorzellen, Inseln extrazellulärer Matrix; Patientennr. 25: Hämangioblastom, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

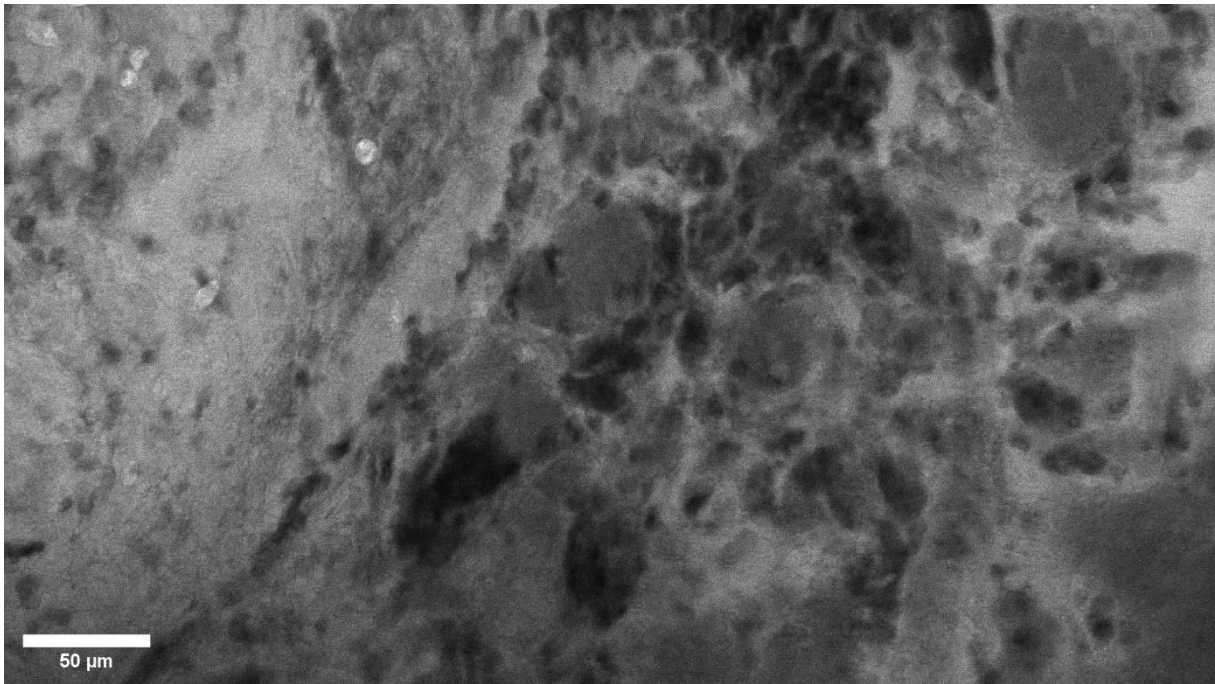


Abbildung 48: pleomorphe Tumorzellen, Inseln extrazellulärer Matrix; Patientennr. 25: Hämangioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm²

In weiteren Aufnahmen der CLE konnte zudem eine erhöhte Anzahl an Gefäßen und ihrem angereichertem Natriumfluoreszein beobachtet werden.

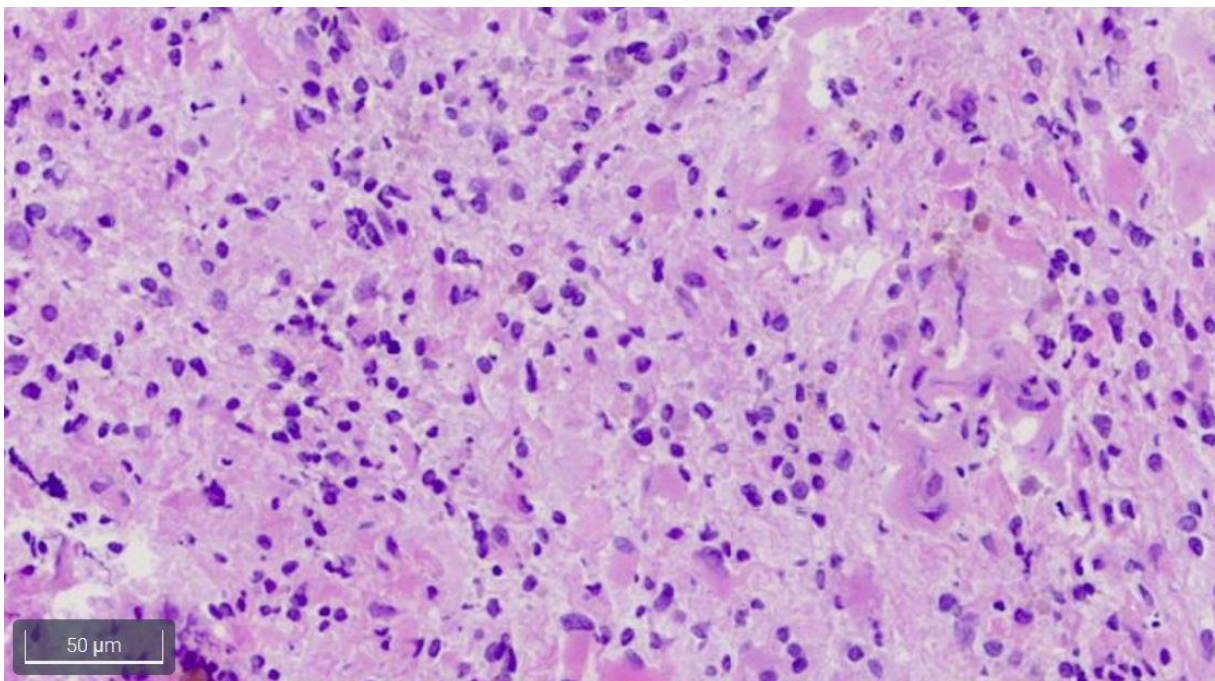


Abbildung 49: runde eosinophile Zellen und Nuclei, Gliazellen; Patientennr. 9: Pineozytom, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung

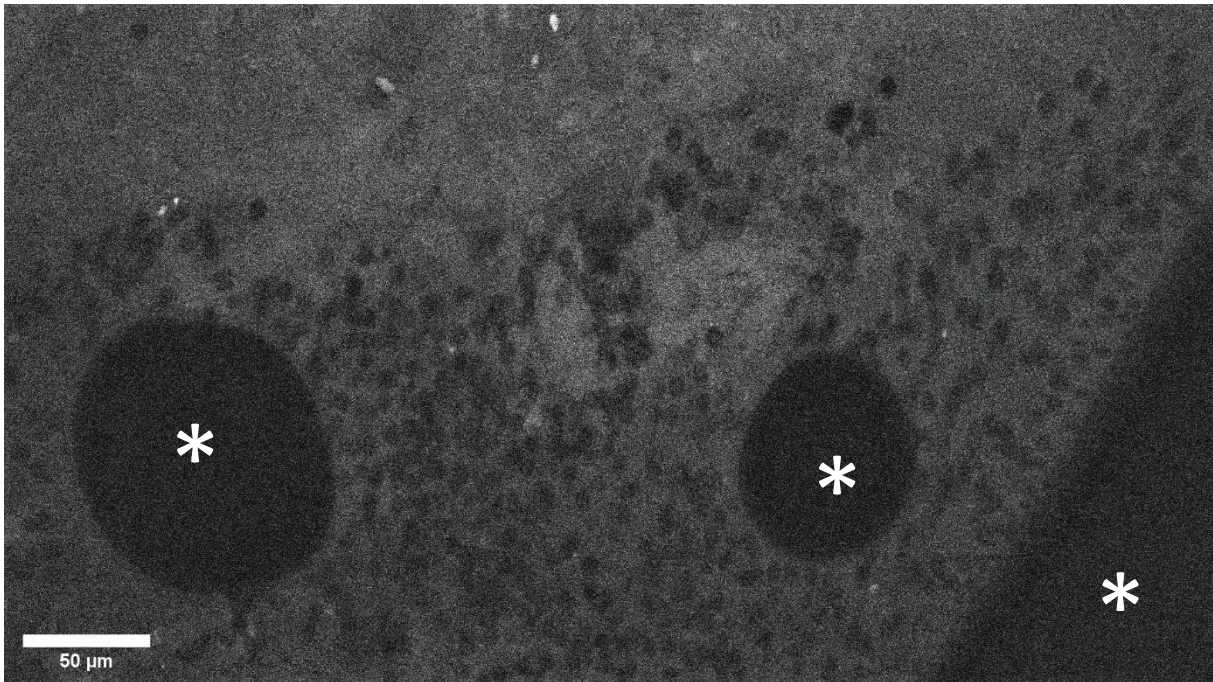


Abbildung 50: rundliche Zellen mit ausfüllenden Nuclei, Luftblasen (weißer Stern); Patientennr. 9: Pineozytom, CLE ex vivo 475 x 267μm²

Bei den restlichen Entitäten konnten wir für das Schwannom mittels CLE und HE-gefärbten Gefrierschnitt elongierte Zellen mit unscharf definierbaren Nuclei ausmachen. Zudem fanden sich Areale mit zellreichen gegenüber Arealen mit fibrinösen Anteilen. Das Plexuspapillom stellte sich im GS mit papillären Strukturen, die sich zum Teil um ein Sekret formierten. Durch CLE ist die papilläre Architektur wahrnehmbar und zusätzlich zeigten sich Plexusgefäße. Zellatypien, Nekrosen und Mitosefiguren waren nicht auszumachen. Das Plasmozytom hingegen stellte sich in jeder eingesetzten Methode mit einer hohen Zelldichte an pleomorphen Plasmazellen dar. Nukleäre Atypien waren ebenfalls durch die CLE zu finden.

6.2 Bildqualität

Wie bei der konventionellen Bearbeitung von intraoperativen Schnellschnitten können bei Anwendung von CLE ebenfalls Veränderungen in der Aufnahme entstehen, die korrekterweise als diagnostisch nicht valide identifiziert werden sollten. Diese kann man während der Anwendung im Strahlengang oder im Material sichtbar entdecken. Dazu zählt zum einen das Auftreten von Luftblasen zwischen Sondenoberfläche und dem zu untersuchendem Gewebe. Diese können je nach gewählter Fokustiefe ein marginal unterschiedliches Erscheinungsbild aufzeigen und wirken dadurch sphärisch.

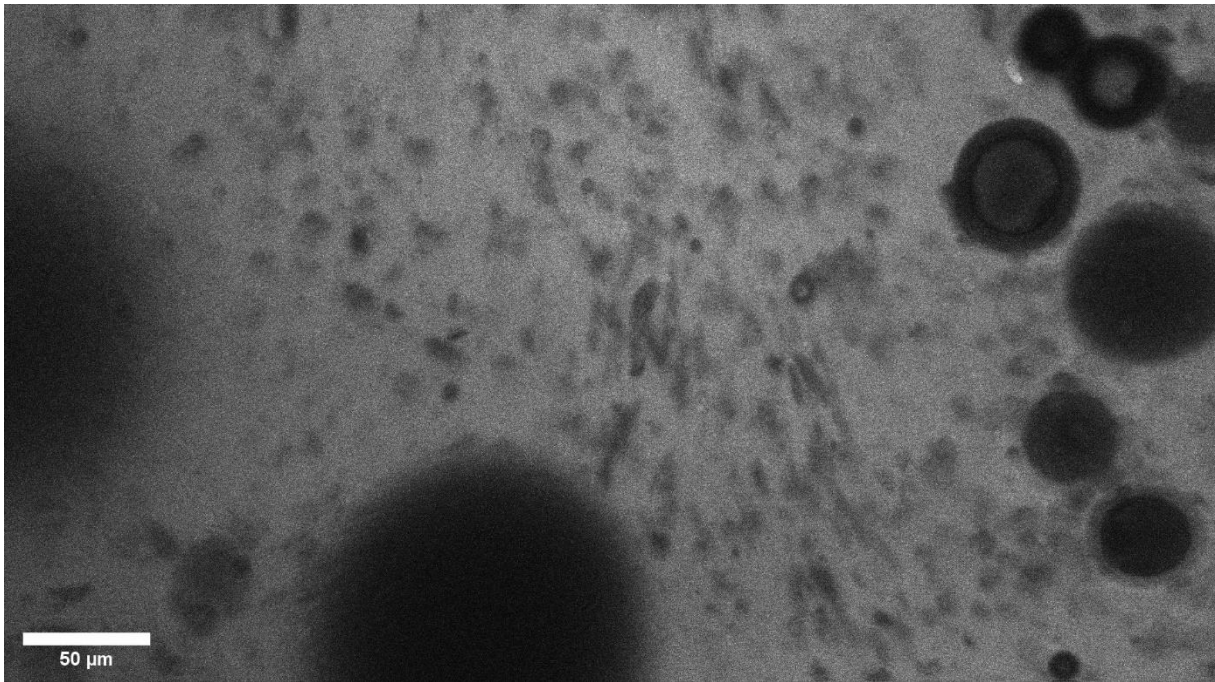


Abbildung 51: Luftblasen zwischen Sonde und Probenmaterial, Patientennr. 21: Hypophysäre Zyste, CLE ex vivo 475 x 267µm²

Neben der unterschiedlichen Weise, wie sich eine Luftblase bei tiefergehendem Fokus verhält, sind die beiden folgenden Bilder ebenso beispielhaft für die Überlagerung der Ebenen im Z-Vektor. Dadurch kann die Qualität stark abnehmen bis ab einer gewissen Tiefe trotz optimaler Einstellungen und Zeitpunkt der Gabe von Natriumfluorescein keine valide Aussagekraft mehr vorhanden ist.

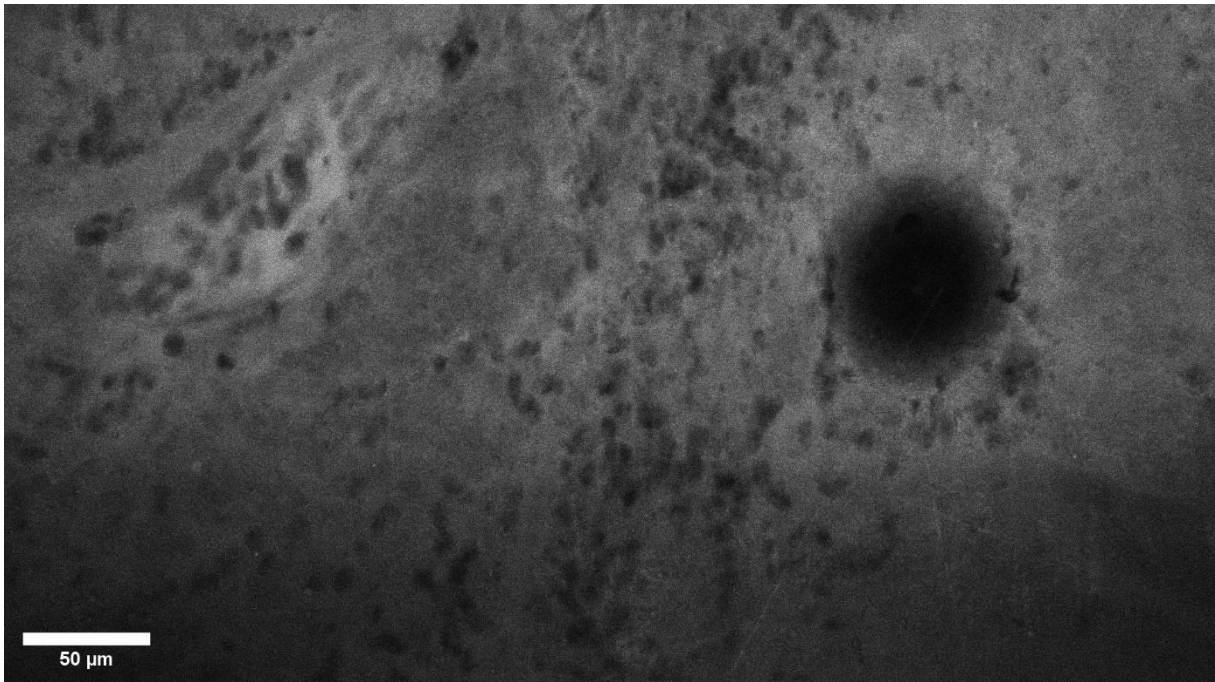


Abbildung 52: Luftblase, Fokusebene 9µm, Patientennr. 23: Rezidiertes Glioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm²

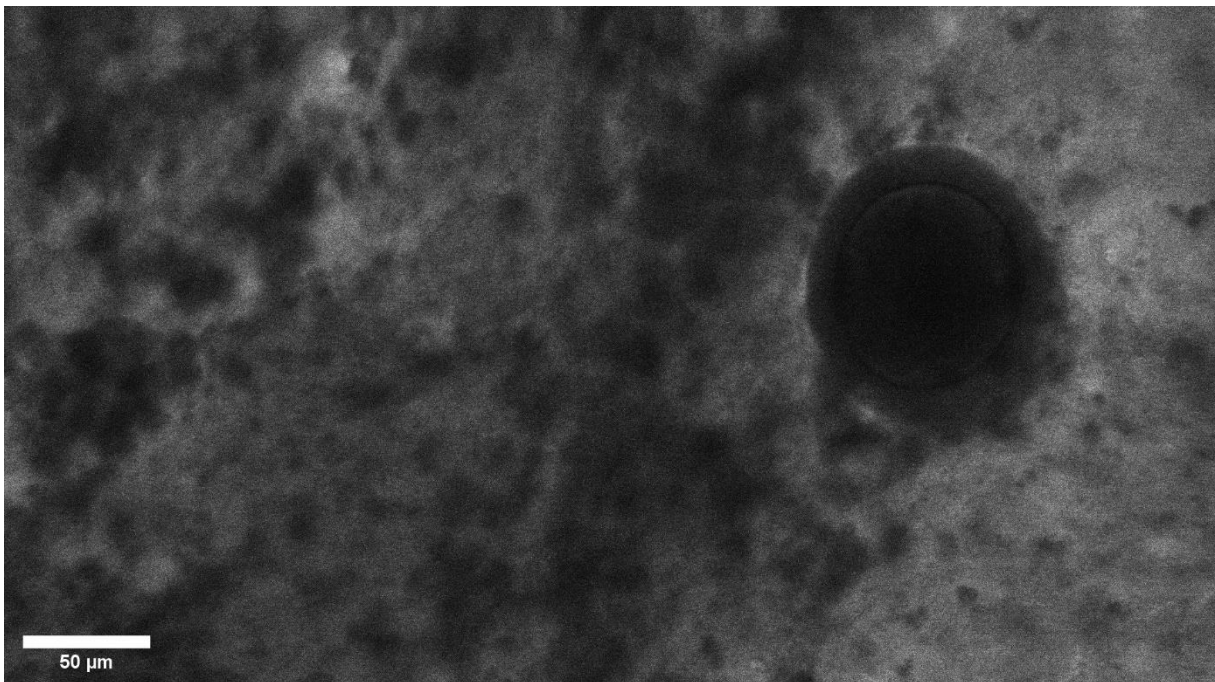


Abbildung 53: Luftblase, Fokusebene 40µm, Patientennr. 23: Rezidiertes Glioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm²

Auf der Sonde kann ebenfalls ein adhäsiver Blutfilm auftreten, der sich im Bild durch massenhaft bikonkave Erythrozyten darstellt. Diesen kann man durch mechanisches Säubern mittels einer Kompresse entfernen.

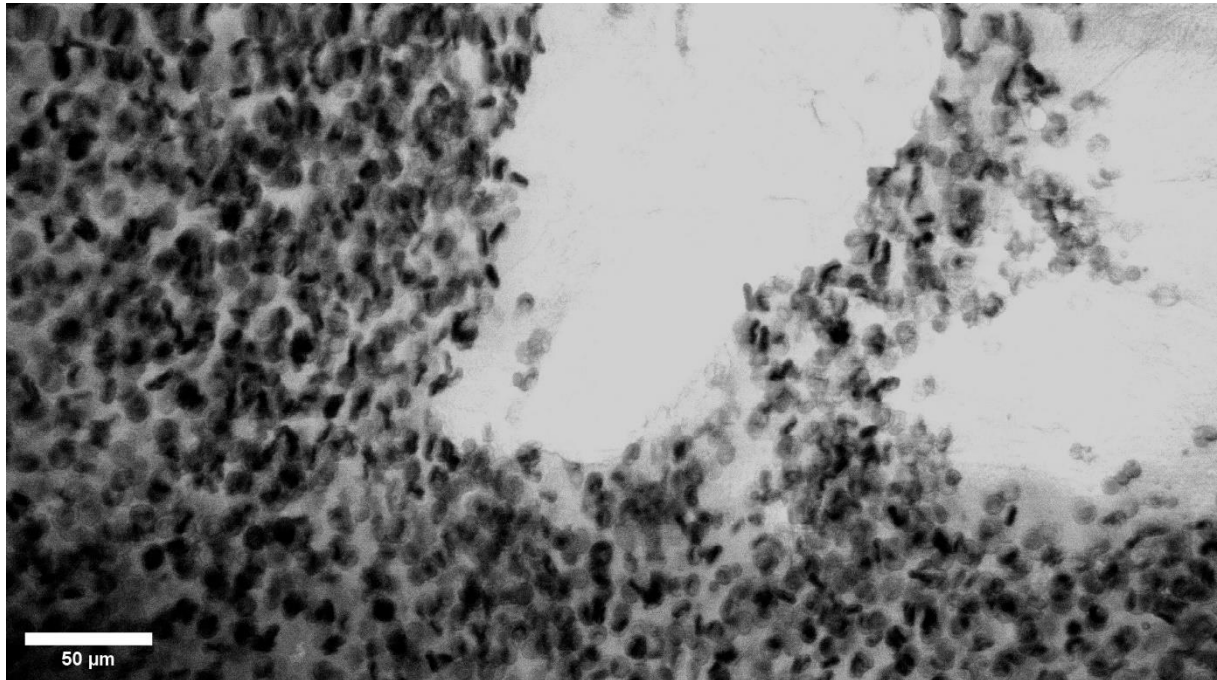


Abbildung 54: Adhäsiver Blutfilm, Patientennr. 4: Metastase eines Mammakarzinoms, CLE ex vivo 475 x 267μm²

Baumwollfäden einer gängigen Operationskompresse, die einen Durchmesser von 30-40μm besitzen, können wiederum in den Strahlengang geraten. Sie sind jedoch durch ihre Glätte im Übergang zum Gewebe und der Faserung unschwer zu erkennen.

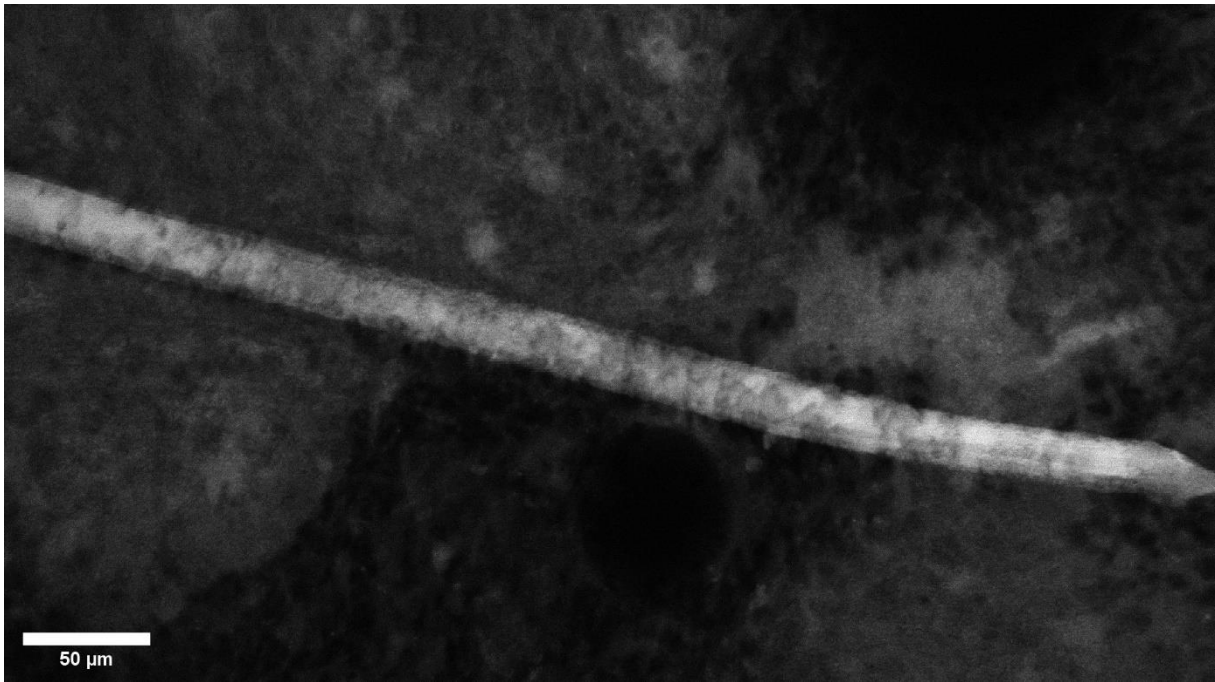


Abbildung 55: Fremdmaterial (Kompressenfaden $\varnothing 35\mu\text{m}$), Patientennr. 11: Rezidiertes Glioblastom, CLE ex vivo $475 \times 267\mu\text{m}^2$

In einigen Fällen konnte zudem ohne Assoziation zu bestimmten Ereignissen oder Einstellungen ein Fokusartefakt dargestellt werden.

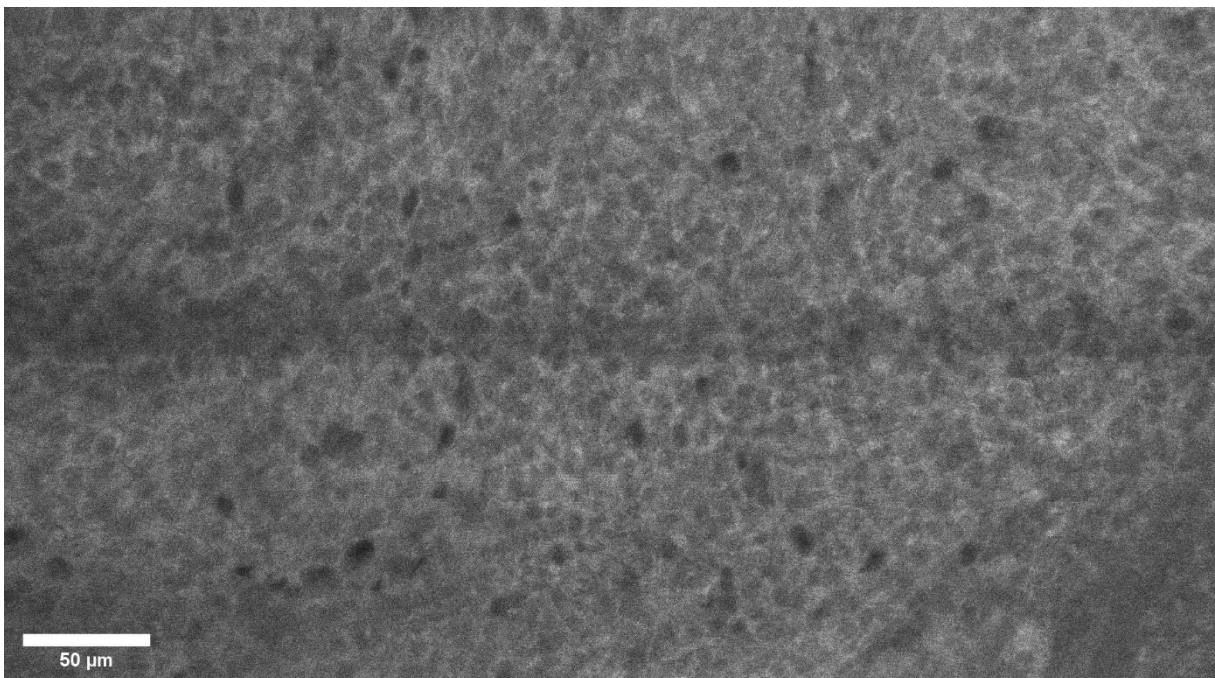


Abbildung 56: zentriertes Fokusartefakt; Patientennr. 22: Rezidiertes Hypophysenadenom, CLE ex vivo $475 \times 267\mu\text{m}^2$

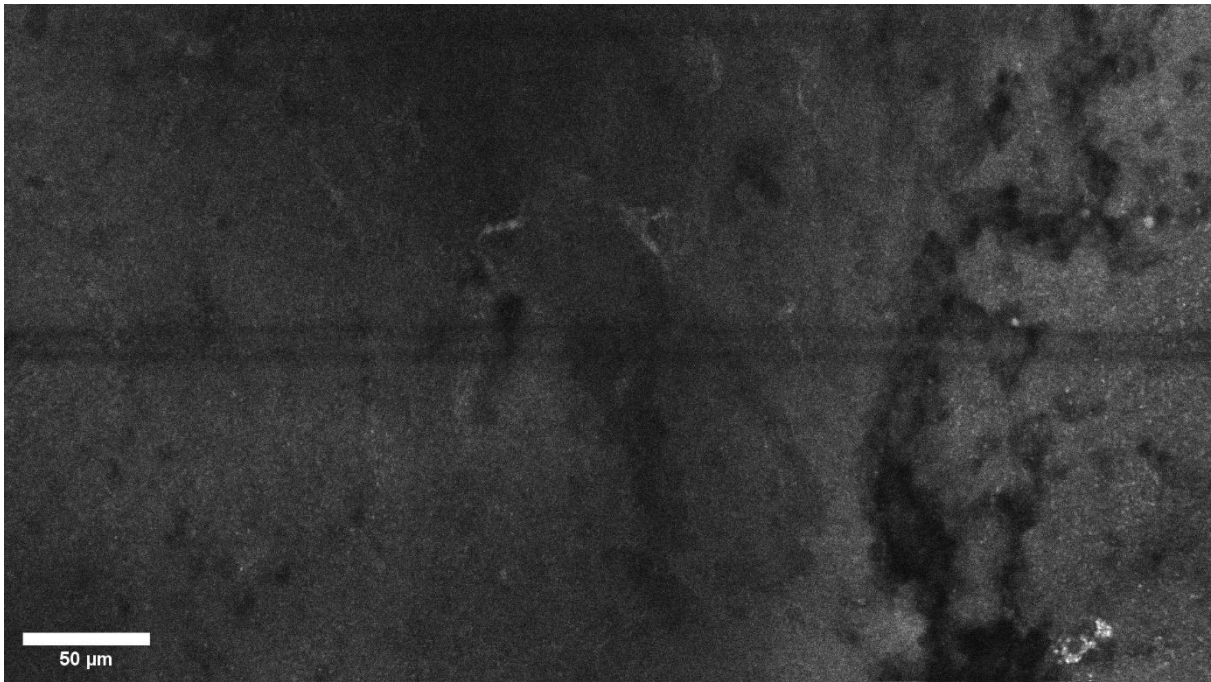


Abbildung 57: zentriertes Fokusartefakt; Patientennr. 35: Oligodendrogliom, ZNS WHO-Grad 3, CLE ex vivo 475 x 267µm²

Trotz der Vorrichtung, bei der die Sonde eingeklemmt ist, um ungewollte Bewegungen zu vermeiden, wurden einzelne Aufnahmen durch Erschütterungen verzerrt.

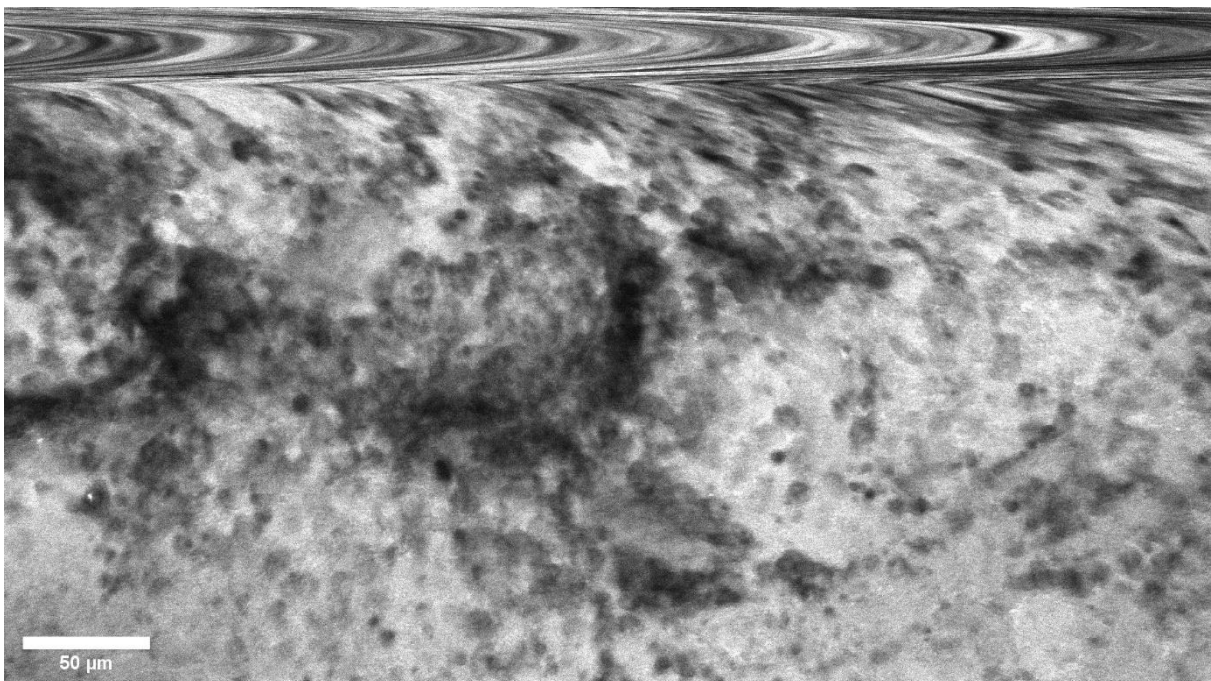


Abbildung 58: Verzerrung der Aufnahme im oberen Bildrand; Patientennr. 30: Riesenzell-Glioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm²

6.3 Verdachtsdiagnose HE-gefärbter Gefrierschnitt

Die intraoperativen Verdachtsdiagnosen mittels GS, MQP und CLE wurden vom diensthabenden Neuropathologen, Prof. Dr. Jürgen Schlegel (SJ) oder PD Dr. Friederike Liesche-Starnecker (L-SF) gestellt. Dabei erfolgte die Untersuchung in 36 von 40 (90%) der Fälle von L-SF und in 4 von 40 Fällen von SJ. Die Stufen der Übereinstimmung zwischen der jeweiligen Methode zur intraoperativen Schnellschnittdiagnostik und der endgültigen Diagnostik wurden zunächst dichotom in vollkommene (Gruppe A) und keine Übereinstimmung (Gruppe C) festgelegt. Des Weiteren wurde aus klinisch praktischer Sicht eine partielle Übereinkunft (Gruppe B) und das Kollektiv, bei dem aufgrund mangelhafter Aussagekraft keine Klassifizierung vorgenommen werden konnte (Gruppe D), hinzugefügt. Gruppe B zugehörig sind somit Ergebnisse, die für eine exakte Übereinstimmung zu weit gefasst sind, wie beispielsweise ein malignes Gliom, das sich als Astrozytom, ZNS WHO-Grad 4 herausstellt. Ebenso für Neoplasien, die weit gefasst demselben Ursprungsgewebe entspringen und keinen Unterschied in der WHO-Graduierung aufweisen (Oligodendrogliom, ZNS WHO-Grad 2 vs. Astrozytom ZNS WHO-Grad 2), wurde eine teilweise Übereinstimmung akzeptiert.

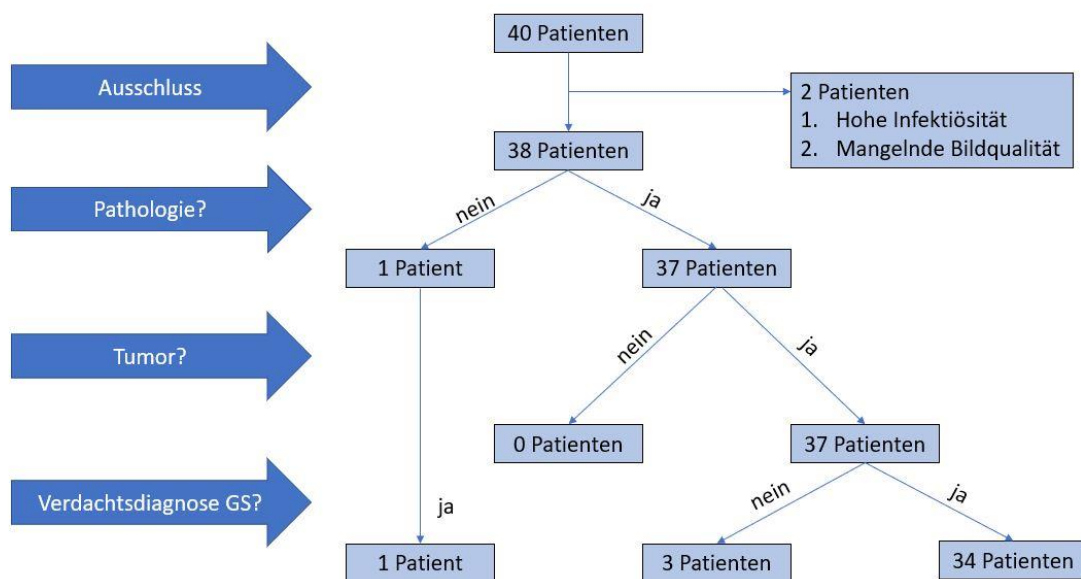


Abbildung 59: Flussdiagramm Patientenselektion und diagnostisches Procedere HE-gefärbter Gefrierschnitt

Mittels der gefriereschnittenen HE-Präparate konnte bei gestellter Verdachtsdiagnose eine Übereinstimmung zum finalen HE-Präparat in 34 von 35 (97,1%) Beurteilungen festgestellt werden. In einem Fall (2,9%) handelt es sich statt einer Pinealiszyste um ein Pineozytom. Insgesamt konnte anhand dreier Biopsien (7,9%) aufgrund mangelnder Aussagekraft der Probe keinerlei Diagnostik vorgenommen werden. Dabei handelt es sich um ein spinales

Ependyom ZNS WHO-Grad 3, ein Hämangioblastom ZNS WHO-Grad 1 sowie ein rezidiertes Glioblastom.

GS	A	B	C	D	Gesamt
Gliom	3 16.7%	13 72.2%	0 0.0%	2 11.1%	18 100.0%
Metastase	5 100.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	5 100.0%
Meningeom	6 100.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	6 100.0%
Sonstige	6 66.7%	1 11.1%	1 11.1%	1 11.1%	9 100.0%
Gesamt	20 52.6%	14 36.8%	1 2.6%	3 7.9%	38 100.0%

Tabelle 1: Übereinstimmung HE-gefärbter Gefrierschnitt mit finaler Diagnose Gruppe A: komplette Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe B: teilweise Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe C: keine Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe D: nicht klassifizierbar

Anhand von Vierfeldertafeln konnte die diagnostische Genauigkeit in Hinsicht auf die finale Diagnose ermittelt werden. Für Gliome (chi² und fish: p<0,01; phi: 1 – p<0,01), Metastasen (fish: p<0,01; phi: 1 – p<0,01) und Meningeome (fish: p<0,01; phi: 1 – p<0,01) ergaben sich eine Sensitivität und Spezifität von 100% als auch einen 100%igen PP- und NP-Wert. Für die restlichen Entitäten ergaben Werte einer Spezifität von 96,3%, eines PPW von 87,5% sowie einer Sensitivität und eines NPW von 100% (fish: p<0,01; phi: 0,92 – p<0,01).

Sowohl bei intraoperativer Anwendung von CLE als auch dem HE-Gefrierschnitt war es nicht möglich ein rezidiertes Glioblastom, ein anaplastisches Ependyom und ein Hämangioblastom anhand der Probe zu klassifizieren. In einem Fall stellte sich die Verdachtsdiagnose einer Pinealiszyste im endgültigen Befund als erstgradiges Pineozytom heraus.

6.4 Verdachtsdiagnose Methylenblauquetschpräparat

Begleitend zum HE-gefärbten Gefrierschnitt wurde ein MQP von der ex vivo CLE untersuchten Gewebeprobe angefertigt. Hier war es in drei zusätzlichen Fällen technisch nicht möglich aus dem verbliebenen Material ein diagnostisch verwertbares Präparat anzufertigen. In drei weiteren Untersuchungen war es ebenso nicht realisierbar eine Aussage zum Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein von neoplastischen Vorgängen zu treffen.

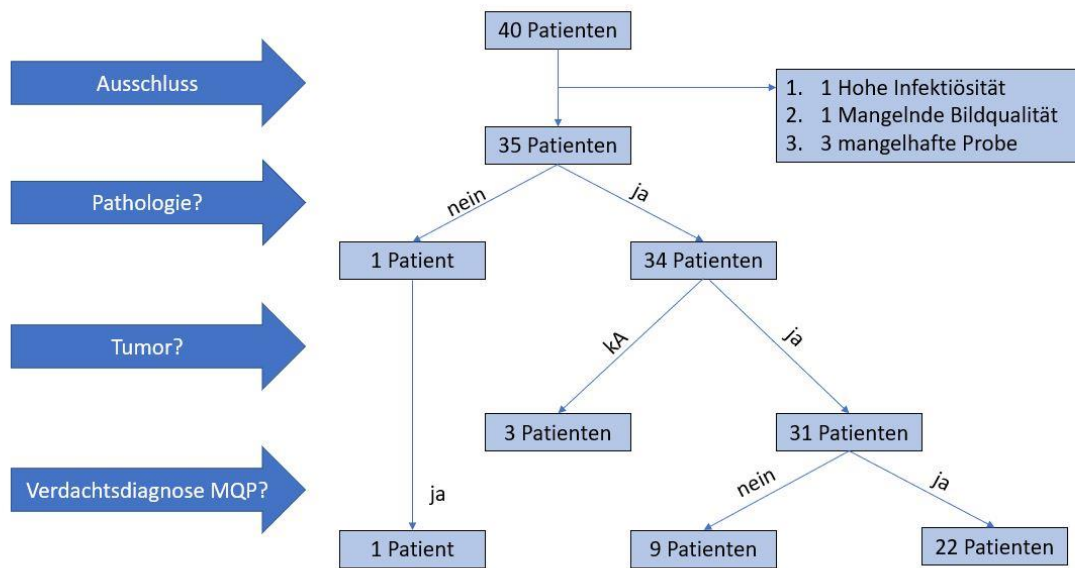


Abbildung 60: Flussdiagramm Patientenselektion und diagnostisches Procedere Methylenblauquetschpräparat; kA=keine Angabe

MQP	A	B	C	D	Gesamt
Gliom	0	13	0	5	18
	0.0%	72.2%	0.0%	27.8%	100.0%
Metastase	1	0	0	3	4
	25.0%	0.0%	0.0%	75.0%	100.0%
Meningeom	4	0	0	1	5
	80.0%	0.0%	0.0%	20.0%	100.0%
Sonstige	4	1	0	4	9
	44.4%	11.1%	0.0%	44.4%	100.0%
Gesamt	9	14	0	12	35
	25.7%	40.0%	0.0%	34.3%	100.0%

Tabelle 2: Übereinstimmung HE-gefärbter Gefrierschnitt mit finaler Diagnose Gruppe A: komplette Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe B: teilweise Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe C: keine Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe D: nicht klassifizierbar

Bei 23 Patienten war es möglich eine intraoperative Verdachtsdiagnose über ein MQP zu stellen, wobei in allen Fällen eine teilweise bzw. exakte Übereinstimmung erzielt wurde. Ein Drittel aller Präparate (12/35), wobei jede der tabellarisch aufgeführten Entität betroffen ist, konnte aufgrund mangelnder Qualität der Probe oder der angewandten Methode keine Aussage zur Tumorentität getroffen werden.

Somit ergibt sich eine 100%ige Sensitivität, Spezifität, negativer und positiver Vorhersagewert (fish: $p < 0,01$; phi: $1 - p < 0,01$) für alle in der Arbeit vorkommenden Hirntumorarten für die ein MQP angefertigt und eine Verdachtsdiagnose getroffen worden ist.

6.5 Verdachtsdiagnose ex vivo CLE

Eine Übereinstimmung zwischen CLE und finalem HE-Schnitt bei gestellter Verdachtsdiagnose konnte in 28 von 30 (93,3%) erreicht werden. In zwei Fällen (6,7%) konnte keine übereinstimmende Aussage getroffen werden. Dabei wurden eine hepatozelluläre Karzinommetastase fälschlicherweise als Adenom, sowie ein Oligodendrogliom ZNS WHO Grad 3 als Metastase klassifiziert. Bei acht weiteren Gewebeproben (21,1%) konnte keine intraoperative Diagnosestellung mittels CLE erfolgen. In drei dieser nicht klassifizierbaren Proben war ebenso keine Verdachtsdiagnose über den Gefrierschnitt zu stellen.

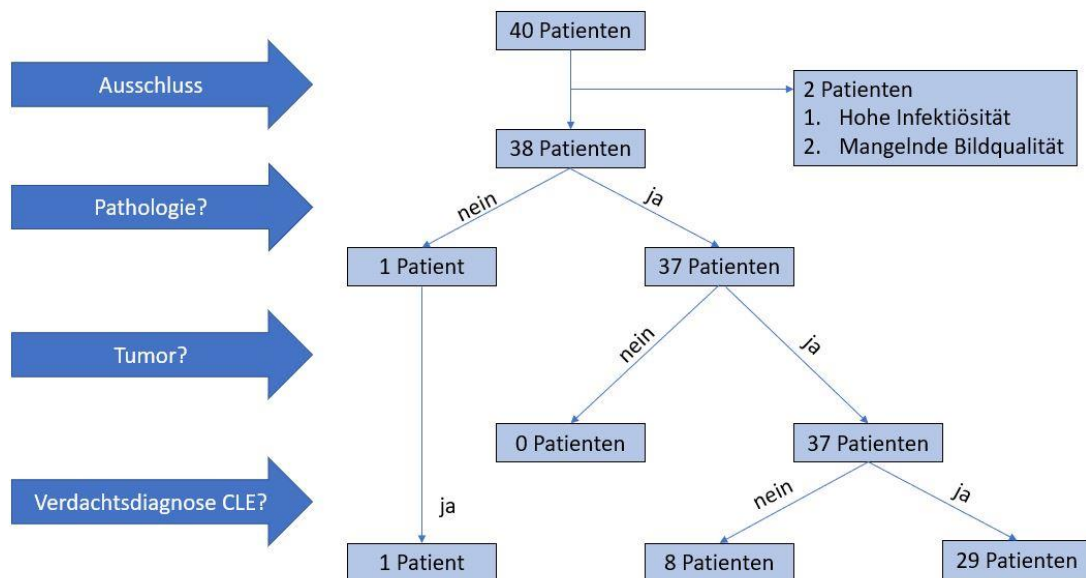


Abbildung 61: Flussdiagramm Patientenselektion und diagnostisches Procedere Konfokale Laserendomikroskopie

CLE	A	B	C	D	Gesamt
Gliom	2 11.1%	12 66.7%	1 5.6%	3 16.7%	18 100.0%
Metastase	4 80.0%	0 0.0%	1 20.0%	0 0.0%	5 100.0%
Meningeom	6 100.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	6 100.0%

Sonstige	4	0	0	5	9
	44.4%	0.0%	0.0%	55.6%	100.0%
Gesamt	16	12	2	8	38
	42.1%	31.6%	5.3%	21.1%	100.0%

Tabelle 3: Übereinstimmung CLE mit finaler Diagnose Gruppe A: komplette Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe B: teilweise Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe C: keine Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe D: nicht klassifizierbar

Somit ergibt sich bei Anwendung von Vierfeldertafeln bezüglich der Akkuratesses von CLE eine Sensitivität von 93,3% und eine Spezifität von 100% für die Untersuchung von Gliomen. Der dazugehörige PPW ist 100%, während der NPW 93,8% beträgt (chi und fish: $p < 0,01$; phi: 0,935 – $p < 0,01$).

Für Metastasen betragen die Werte: Sensitivität 80%, Spezifität 96%, PPW 80% und NPW 96% (fish: $p < 0,01$; phi: 0,76 – $p < 0,01$). Bei Meningeomen sowie den sonstigen Proben wurde bei intraoperativer CLE-Diagnostik jeweils eine Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW von 100% erreicht (fish: $p < 0,01$; phi: 1 – $p < 0,01$). Zu den korrekt formulierten Verdachtsdiagnosen der sonstigen Entitäten zählen zwei Hypophysenadenome, ein Schwannom und der hypophysär gelegene Zysteninhalt.

Bei den nicht klassifizierbaren Fällen handelt es sich um drei Gliome (Glioblastom (IDH-mut), rezidiertes Glioblastom, spinales Ependymom ZNS WHO Grad 3) und fünf sonstigen Tumor-entitäten. Diese stellen sich aus einem Pineozytom, einem Hämangioblastom, einem Plasmazytom, einem Plexuspapillom und einer reaktiven Entzündung bei zuvor strahlentherapiertem Glioblastom zusammen.

7 Diskussion

Mit der CLE scheint die histomorphologische Evaluation hinsichtlich des zeitlichen Aufwands mit den Fortschritten in der molekularen Diagnostik von zentralnervösen Neoplasien mindestens gleichziehen zu können. Die vorliegende Arbeit unterstützt und erfüllt die Prämissen für eine weiterführende Implementierung in den klinischen Alltag. Die histomorphologische Evaluation zeigt weitreichende Überschneidungen im Vergleich zu den konventionellen Methoden der Neuropathologie. Konsequenterweise lässt sich dies anhand der diagnostischen Präzision belegen, die eine Gleichwertigkeit gegenüber den üblichen Methoden zeigt. Insgesamt ist dadurch die Praktikabilität hinsichtlich der intraoperativen Anwendung und der Diagnostik für die ex vivo CLE nachgewiesen. Der gesamte diagnostische Prozess kann sich dadurch erheblich verkürzen und Behandlungsstrategien der Patienten schnellstmöglich – zum Teil in Echtzeit – angepasst werden. Dazu ist es in einem ersten Schritt, wie einige Arbeitsgruppen

bereits demonstrieren konnten, vonnöten die Darstellungsweise und die pathologischen Merkmale möglichst vieler Entitäten zu beschreiben. Zusätzlich gilt es in einem Vergleich Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zu den konventionellen Methoden in der Neuropathologie, die in der Prozessierung der Herstellung und der Diagnostik des Gewebes entstehen, herauszuarbeiten. Die Implementierung der CLE in das klinisch-operative Umfeld ist hierfür eine wesentliche Erneuerung. In einem neuen Schritt ist die Präzision für sämtliche gängige intraoperative diagnostische Herangehensweisen im Vergleich zur CLE anhand derselben Gewebeprobe zu überprüfen. Zwar bietet die CLE dem Anschein nach einige Vorteile gegenüber dem HE-gefärbten Gefrierschnitt und dem Methylenblauquetschpräparat, aber eine Unterlegenheit in der Diagnostik würde den klinischen Nutzen deutlich einschränken.

7.1 Histomorphologie durch CLE – alles bereits bekannt?

Von allen Punkten, die für die Anwendbarkeit der CLE in der Neuroonkologie sprechen, gilt die histomorphologische Darstellungsweise verschiedener Entitäten als am besten untersucht. Allerdings variieren innerhalb dieser Untersuchungen einzelne Parameter, wie das genutzte System, fluoreszierende Agenten, Art der Applikation, in bzw. ex vivo Anwendung, untersuchte Hirntumorgruppen und gesetzte Studienziele, erheblich.

Die erste Studie in diese Richtung wurde 2011 veröffentlicht. Dabei wurde erstmals ein CLE-Verfahren in vivo mit Natriumfluorescein als intravenös applizierter Kontrastverstärker an Gliomen, Meningeomen und Strahlennekrosen verwendet (Sanai et al. 2011). Im Jahr darauf fuhr die Arbeitsgruppe mit einer höheren Kontrastdosis und Anzahl an Probanden mit demselben Modell (Optiscan 5.1) ihre Untersuchungen fort (Eschbacher et al. 2012). Die größte Fallzahl mit 150 Proben wurde in der Arbeit um Charalampaki und Kollegen generiert. Hier wurde mit einem Gerät der ersten Generation, das ursprünglich für den gastroenterologischen Fachbereich angefertigt wurde, und mit der topischen Anwendung von Acriflavine gearbeitet (Charalampaki et al. 2015). Zum einen führt dies zu einer verminderten Bildqualität und zum anderen zwar zu einer besseren Kontrastierung durch ein Mittel, das allerdings toxisch für den menschlichen Organismus ist. Eine künftige in vivo Anwendung in diesem Design, das zuvor bereits in einem kleineren Rahmen mit 15 Fällen untersucht worden ist, wäre nicht weiter realisierbar (Foersch et al. 2012). Eine weitere Arbeitsgruppe um Martirosyan und Kollegen befasste sich zuerst mit einer kombinierten in und ex vivo CLE-Anwendung an 74 Probanden. Dabei wurde wie in dieser Pilotstudie Natriumfluorescein als Kontrastmittel – allerdings für ein anderes System – verwendet (Martirosyan et al. 2016). In einer Folgearbeit mit einer ähnlich hohen Fallzahl (106) tasteten sie sich mit der topischen Anwendung von Acriflavine, Acridinorange und Kresylviolett mit einem Benchtop-CLE-System an die Herausarbeitung von strukturellen Merkmalen von zentralnervösen Neoplasien heran (Martirosyan et al. 2018). Eine

Gruppe, die auch mit dem „CONVIVO“-Gerät in Kombination mit einer intravenösen Verabreichung von Natriumfluorescein arbeitet, konnte in zwei Untersuchungen sehr deskriptiv auf acht verschiedene Tumorguppen bzw. rein auf Hypophysenadenome eingehen (Belykh et al. 2020, Belykh et al. 2020). Weiterführend gingen Acerbi und Kollegen unter der Rücksichtnahme der infiltrativen und heterogenen Aspekte spezifisch auf die ex vivo Darstellung von Tumormitte und -rand von High-Grade Gliomen ein (Acerbi et al. 2020).

Wie in den oben aufgeführten Studien gezeigt wurde, konnten wir ebenso die für die einzelnen Läsionen typischen Merkmale in unseren Untersuchungen mittels CLE und den konventionellen neuropathologischen Methoden finden. Besonderes Augenmerk liegt dafür auf den Arbeitsgruppen, die Methoden und Materialien, wie die kombinierte Anwendung des „CONVIVO“-Gerät und Natriumfluorescein, in einem ähnlichen Design verwendet haben.

So fanden sich bei diffusen Gliomen in CLE-Aufnahmen und ihren HE-gefärbten Gefrierschnitten Nekrosen, Mikrovaskularisationen und in den in dieser Arbeit angefertigten korrespondierenden MQ-Präparaten Hyperzellularität, nukleäre Atypien, mitotische Figuren und Zellpleomorphismus (Sanai et al. 2011, Belykh et al. 2020). Je nach Graduierung des Tumors waren bestimmte Eigenschaften weniger oder sehr ausgeprägt nachweisbar. Beispielhaft ist die Zellularität in Low-Grade gegenüber High-Grade Gliomen stark verringert und mittels CLE gut einzuschätzen. Innerhalb LGG berichteten Eschbacher et al von einem Unterschied in der Zellform zwischen Oligodendrogliomen und Astrozytomen. Dabei waren in Letzteren eher ein Pleomorphismus als elongierte Zelle gegenüber eher rundlichen und zum Teil vollständig vom Nucleus ausgefüllten Zellkörper der Oligodendrogliome auszumachen (Eschbacher et al. 2012). Der rundliche Zellcharakter war in unseren entsprechenden GS-/MQ-Präparaten und in den CLE-Aufnahmen für diesen Tumortyp nachweisbar. Das diffuse Astrozytom aus dieser Arbeit hingegen ist in dieser Hinsicht unzureichend und damit vorsichtig auf klaren Zellpleomorphismus zur Abgrenzung zu betrachten. Für anaplastische Oligodendrogliome und Astrozytome war dieser wiederum in Kombination mit dem gehäuften Vorkommen von Mikrovaskularisationen deutlich in dieser und weiteren Arbeiten zu erkennen (Eschbacher et al. 2012). Bei den höchstgraduierten Glioblastomen stellten sich neben Hyperzellularität, Nekrosen und neoplastischen Mikrovaskularisationen zusätzlich in unserer Pilotstudie pseudopallidäre Formierungen sowie in einem Fall eindrucksvoll die Größe der Tumorzellen bei einem großzelligen Glioblastom dar.

Die klassische Struktur einer echten oder Pseudorosette mit einem fluoreszenzangereicherten zentralen Gefäß bei Ependyomen konnte in unserer Untersuchung nicht bestätigt werden (Eschbacher et al. 2012). Allerdings handelt es in unserem Fall um ein spinale Ependyom ZNS WHO-Grad 3, was durch eine hohe Zellularität, Nekrosen, nukleäre Atypien und

Pleomorphismus jeweils im Gefrierschnitt und im CLE-Bild nachgewiesen werden konnte. Beispielhaft konnte hier zudem die Bestimmung der Kern-Plasma Relation durch die CLE an einzelnen Zellen demonstriert werden, was eine weitere Bestärkung in der Anwendung von gängigen diagnostischen Kriterien auf die neuartige Methodik ist.

Bei sekundären intrakraniellen Läsionen konnte in dieser Arbeit und in anderen die lokale Ballung von runden bis fusiformen Tumorzellen und in Abhängigkeit zum Primarius ein epithelialer oder glandulärer Charakter bestätigt werden (Charalampaki et al. 2015, Belykh et al. 2020). Das umgebende Metastasenstroma im Sinne von fibrösen zellarmen Strängen wurde ebenso dargestellt (Martirosyan et al. 2018). Zuzüglich war es hier möglich bei einer Mammakarzinom-Metastase eine nekrotische Einblutung mittels CLE und im korrespondierenden HE-gefärbten Schnellschnitt darzustellen.

Bei der häufigsten intrakraniellen Raumforderung, dem Meningeom, sind die Psammkörper nahezu pathognomonisch und konnten bereits vielfach ebenso wie fibröse Bündel beschrieben werden. Eine Einteilung in den Subtyp und den ZNS WHO-Grad ist zum Teil möglich, allerdings konnte dies in unserer Arbeit sowie eine Infiltration in die Dura Mater nicht demonstriert werden (Martirosyan et al. 2016, Belykh et al. 2020).

Die Berichte zur starken Vaskularisation und guten Darstellbarkeit des Zytoplasmas und der Nuclei des Hämangioblastoms decken sich mit unseren Nachforschungen (Eschbacher et al. 2012). Elongierte Zellen mit unscharf definierbaren Nuclei und zudem Areale mit zellreichen gegenüber Arealen mit fibrinösen Anteilen eines Schwannoms überschneiden sich ebenso mit der deskriptiven Analyse um Eschbacher et al. Eine Korrelation zu Antonin A und B Arealen ist denkbar, aber wäre anhand eines Falles ein zu früh gezogener definitiver Rückschluss (Eschbacher et al. 2012). Für das Plexuspapillom wurden für die CLE gleichartige Strukturen wie in der konventionellen Diagnostik beschrieben. Im GS zeigt sich eine papilläre und pseudostratifizierte Architektur. Leider konnten wir nicht mit absoluter Sicherheit dieselben Muster in den CLE-Aufnahmen beobachten. Allerdings konnten Zellverformungen, nukleäre Atypien und Nekrosen auch bei uns ausgeschlossen werden (Charalampaki et al. 2015). In zwei Proben konnte der diensthabende Neuropathologe die Diagnose für ein Adenom der Hirnanhangsdrüse stellen. Es fanden sich eine Hyperzellularität von uniform runden und in HE-gefärbten Präparaten basophilen Zellen und eine fibröse Durchsetzung mit Mikrovaskularisationen. Diese Erkenntnisse decken sich mit der bisherigen Forschung der CLE zu hypophysären Adenomen (Belykh et al. 2020). Auffällig ist zudem die intrazytoplasmatische Anreicherung des Kontrastmittels in den perivaskuläre gelegenen Zellen. Deskriptive Analytik zu Plasmozytomen oder Pineozytomen, die mittels CLE in Kombination mit dem Kontrastmittel Natriumfluoreszein entstanden ist, sind unserer Kenntnis nach ein Novum. Beschreibungen aus der

konventionellen Diagnostik lassen sich in beiden Fällen ebenso in den CLE-Aufnahmen finden. Beim Pineozytom trifft dies für die runden Zellkörper und rundovalen Nuclei zu (Jouvet et al. 2000).

Des Weiteren sind die artifiziellen Veränderungen zu nennen, die in der Anwendung der CLE an vitalen Gewebe im intraoperativen Setting auftreten. Neben den bereits beschriebenen Bewegungsartefakten und adhäsiven Blutfilm auf der Sondenoberfläche (Martirosyan et al. 2016), konnte eingehender auf die variierende Erscheinungsweise von Luftblasen in einer Z-Aufnahmereihe eingegangen werden. Zudem wurde ein Fremdkörper, der sich als Baumwollfaden einer Operationskompressen herausstellte, identifiziert. Das Fokusartefakt, das bisher nicht von anderen Arbeitsgruppen, die dasselbe CLE-System heranziehen, beschrieben wurde, wirft weitere Fragen auf. Als mögliche Erklärungen hierfür kommen ein Software- bzw. mechanischer Defekt oder eine besondere Beschaffenheit an dem jeweiligen Einsatz in Frage. Da es sich um einzelne Aufnahmereihen über die gesamte Pilotstudie verteilt handelt, scheint letzteres als Antwort eher in Betracht zu kommen und Bedarf weiterer Abklärung.

Für die weitere klinische Verwendung von CLE im neuroonkologischen Bereich ist es mit der Klassifizierung von pathologischen bzw. tumorösen Gewebe von mindestens genauso hoher Relevanz wie gesunde oder nichtneoplastische Strukturen erkennen zu können. Beispielhaft für eine nichtneoplastische Pathologie, die zunächst von der Neuroradiologie als kontrastmittelaufnehmende Raumforderung an der Hypophyse mit dem hochgradigen Verdacht auf ein Adenom beschrieben wurde, ist in dieser Pilotstudie die hypophysäre Zyste. Makroskopisch stellt sie sich als geleeartiger Pfropf dar und in allen weiterführenden Untersuchungen (CLE, HE-gefärbter GS, MQP) konnte der Verdacht auf eine zystische Struktur mit stark zellarmen Arealen umgelenkt werden. Als eine weitere Besonderheit ist die reaktive Entzündung auf die Radiation einer Metastase zu nennen. Während in den konventionellen Herangehensweisen inflammatorisch veränderte, zellarme und gelockerte Areale auszumachen sind, finden sich in der CLE-Aufnahme teilweise Nekrosen und eine Gefäßduplikatur. Die scheinbare erhöhte Ballung von Zellen in der gezeigten Abbildung Nr. 47 ist durch die Überlagerung der Ebenen in der gewählten Fokustiefe von 28µm zu erklären. Trotzdem ist es nicht möglich eindeutige Entzündungszellen in diesem Fall durch die CLE zu identifizieren.

Hohe Erwartungen werden an die Darstellungsweise der CLE für die Übergangszone von tumorbelasteten bis hin zu gesundem Hirngewebe insbesondere bei infiltrativ wachsenden intrakraniellen Neoplasien gestellt. Wie bereits genannt, werden durch Mapping und erweiterte bildgebende Maßnahmen fortlaufend ausgedehntere Resektionsmöglichkeiten bestimmt (De Witt Hamer et al. 2012, Bette et al. 2016). Auch mittels dieser Methoden wird trotz starker Bemühungen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit kein gänzlich mikroskopisch

freier Resektionsrand ohne einen neurologischen Funktionsverlust erreicht werden. Wobei allerdings bei einem Großteil aller infiltrativen Hirntumoren eine weniger radikale Vorgehensweise einen negativen prognostischen Faktor darstellt (Grabowski et al. 2014). In der vorliegenden Pilotstudie untersuchten wir hierfür anhand eines Glioblastoms drei Gewebeproben, die von dem Operateur als Tumormitte, Tumorrand und Übergangszone in gesundes Gewebe bezeichnet wurden. Ersteres und zweiteres konnte ähnlich zu Acerbi und Kollegen als klare maligne gliale Läsion bzw. als zellarme Infiltration von Tumorzellen in allen diagnostischen Herangehensweisen mit zusätzlich nekrotischen Anteilen im HE-Gefrierschnitt gezeigt werden (Acerbi et al. 2020).

Die von neurochirurgischer Seite als Übergangszone in gesundes Gewebe makroskopisch definierte Probe sollte allerdings aus einem anderen Blickwinkel betrachtet werden. Im HE-gefärbten Gefrierschnitt sowie zunächst in den CLE-Aufnahmen zeigt sich eine vorhandene Tumormasse, die der Aussage des Operateurs widerspricht. In einer weiteren CLE-Aufnahme an anderer Stelle des resezierten Gewebes ergibt sich eine kontrastmittelarme Darstellung mit diffuser Verteilung von Autofluoreszenz. Dies wurde bereits von zwei verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichen Geräten beschrieben und lässt Rückschlüsse zu, dass es sich dabei um gesundes Hirngewebe handelt. Die geringere Kontrastierung durch Natriumfluoreszein bei intakter Blut-Hirn-Schranke und die Autofluoreszenz durch intrazelluläre Lipofuszingranula sind eine plausible Annahme für dieses Verhalten (Pavlov et al. 2016, Belykh et al. 2020). Die Darstellung der gesamten Ausdehnung eines infiltrativen Tumors – inklusive Infiltrationszone und dem folgendem gesundem Gewebe – scheint somit mittels CLE möglich zu sein.

Insgesamt kann mit dieser Arbeit das Potential der CLE in Hinblick auf die morphologische Darstellungsweise auf zellulärer und subzellulärer Ebene unterstrichen werden. Die essenzielle Basis für eine intraoperative Diagnostik, nämlich die Unterscheidung von gesund vs. pathologisch und tumorös vs. anderweitig pathologisch ist durch das „CONVIVO“-System mit intravenöser Applikation von Natriumfluoreszein in unseren Nachforschungen gesetzt. Bisherige Untersuchungen demonstrierten dies bereits sehr gut, wobei das Verhalten einzelner Entitäten und Subtypen zum Teil durch uns ergänzt wurde.

7.2 Gemeinsamkeiten zu den konventionellen Methoden und Neuheiten des klinischen Einsatzes der CLE

Um der Neuroonkologie eine Umstellung auf ein CLE-System zu intraoperativen Diagnostik näherzubringen ist es wichtig neben den histomorphologischen Evaluationsmöglichkeiten auf die Neuerungen und Gemeinsamkeiten im Vergleich zu den gängigen Herangehensweisen aufmerksam zu machen. Offensichtliche Überschneidungen in der Nutzung eines CLE-

Systems und den konventionellen Methoden (GS und MQP) sind die Darstellung des Gewebes auf zellulärer und subzellulärer Ebene und die Anwendbarkeit klassischer Diagnosekriterien. Dazu gehören die Einschätzung der Zellularität und des Mitoseindex und das Erfassen von nukleären Atypien, Hämorrhagien, Nekrosen, Mikrovaskularisationen und Pleomorphismus. Eine exakte Bestimmung der Kern-Plasma Relation ist ebenso möglich. Für manche Entitäten speziellere Strukturen und Muster, wie einer Pallisadenstellung bei Glioblastomen, Psammokörpern bei Meningeomen oder eine lokale Hyperzellularität epithelialen Charakters bei Metastasen, können mittels CLE und GS gut und zum Teil über das MQP präsentiert werden. Dadurch scheint sich die CLE für das Stellen einer Verdachtsdiagnose in der Neuropathologie eine Alternative abzugeben, wobei die Evaluation der Gewebeprobe bei jeglicher Methode noch der Subjektivität der Diensthabenden unterliegt.

Größere Abweichungen finden sich somit nicht in der diagnostischen Herangehensweise an das Präparat, sondern in der Art und Weise der Herstellung, der Anfertigungszeit und den erweiterten technischen Möglichkeiten des CLE. GS und MQP werden nach der Resektion in das pathologische Institut transportiert. Die Gewebeproben unterliegen dort zunächst einer mechanischen Beanspruchung durch die Kryofixierung und dem Mikrotom bzw. dem Verschmieren und Quetschen. Im Anschluss erfolgt eine Färbung, die je nach vorliegender Entität wechselnde Färbeeigenschaften aufweisen kann. In all diesen Schritten können sich Vorgänge abspielen, die sich später in der Untersuchung unter dem Mikroskop als Artefakte widerspiegeln.

So kann bereits durch eine zu starke Manipulation, wie Kauterisieren oder mechanischen Druck einer scharfen Pinzette, das Resektat eine andere Erscheinungsweise aufweisen. Eine unsachgemäße Handhabung oder ein zu langer Transport kann zur Trocknung führen, die sich nach Präparation als Schwellung der Nuclei präsentiert. Im Falle des GS lässt das Frieren Eiskristalle innerhalb des Gewebes entstehen, die beim Schneiden mit dem Mikrotom, Einrisse verursachen können. Ödematös veränderte Proben sind dabei besonders anfällig und verlieren ihre Gewebsarchitektur. Diese ist durch das Verschmieren und Quetschen beim MQP ebenso nicht mehr vorhanden. Je nach Zustand und Handhabung des Mikrotoms beim GS kann es zudem zu Auffaltungen, Quetschungen und Einrissen im Präparat kommen. Im folgenden Schritt, dem Färben, können eine unangemessene Menge an dem jeweiligen Mittel verwendet werden und sich Lufteinschlüsse nach dem Aufsetzen des Deckglases zeigen (Chatterjee 2014). Je mehr Einzelschritte vorhanden sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Veränderungen, die einen potenziellen Einfluss auf die Diagnosestellung haben können.

Unser CLE-Gerät der zweiten Generation konnten wir im Operationssaal und im operativen Prozess einbauen, wodurch ein Transport des Resektats wegfällt. Zudem fallen die Schritte der Kryofixierung, Bearbeitung durch Mikrotom oder Skalpell und Färbung weg. Die einzig mögliche mechanische Beeinflussung des Gewebes besteht in unserer Arbeit nur durch die Hand des Neurochirurgen. Neu ist die intravenöse Applikation des Natriumfluoreszeins. Die Verteilung und Anreicherung des Kontrastmittels, die im entfernten Sinne als Färbung zu verstehen sind, findet als bei den konventionellen Methoden im Organismus statt und kann durch die Metabolisierung anderweitige Erscheinungsweisen zeigen. Die erhaltene Vitalität in diesem Prozess verspricht ein künftig tieferes Verständnis für die Tumorbilogie und erfordert weiterführende Untersuchungen.

Generell führt diese Reduktion auf wenige Arbeitsschritte beim Einsatz eines CLE-Systems, um zum Endergebnis einer Verdachtsdiagnose zu kommen, sich direkt auf die insgesamte Dauer des Prozesses aus. Allein die Herstellung und die Evaluation – ohne die Transportdauer ins Institut - eines GS-Präparats beläuft sich auf mindestens 20 Minuten (Novis et al. 1997). Das MQP ist mit bis zu zehn Minuten schneller prozessiert, wobei, wie bereits genannt, die histomorphologische Informationsmenge verringert ist (Roessler et al. 2002). Ähnlich zu etablierten Sequencing-Methoden in der molekularen Diagnostik sind diese Vorgänge zeitaufwändig, personalbindend und verursachen laufende Kosten, wie z.B. durch die platzverbrauchende Archivierung. Mit der CLE hingegen wird in unserem oder in einem in vivo Design die Option, Aussagen in Nahezu- bzw. in Echtzeit treffen zu können, mit einer simultanen digitalen Archivierung aufgeboten. Der Prozess ist damit auf ein zeitliches und personaltechnisches Minimum, nämlich der iv-Applikation des Kontrastmittels, der Anwendung der CLE durch den Neurochirurgen und die Evaluation durch den Neuropathologen, reduziert (Fotteler et al. 2021) und in dieser Hinsicht als ähnlich vielversprechend wie Nanopore-Sequencing für die integrierte Diagnose von ZNS-Tumoren wahrzunehmen. Allerdings ist zu erwarten, dass zunächst in einer Anlernphase der Workload für den Neurochirurgen und die Operationszeit zunehmen. Währenddessen ist gegenüberliegend für den Neuropathologen der Arbeitsaufwand verringert und bei einer digitalen Übertragung mit simultaner Telekommunikation eine Remote-Diagnostik denkbar (Eschbacher et al. 2012).

Zu weiteren technischen Erweiterungen in der Diagnostik durch das „CONVIVO“ zählen die Aufnahme von Z-Stapeln und die Möglichkeit eine Live-View abzuhalten. In unserer Arbeit haben wir mehr als 250mal Z-Stapel aufgenommen, was deutlich zeigt wie bedeutsam dieser Modus ist. Es war dadurch sehr gut möglich gezielt verdächtige Strukturen in die Tiefe zu verfolgen und einen räumlichen Eindruck des betreffenden Gewebeabschnitts zu erhalten. Tatsächlich ist es schon eine Möglichkeit aus der Betrachtung aufeinander folgender Ebenen ein dreidimensionales digitales Gebilde zu erstellen (Belykh et al. 2018). Limitierend sind dabei

allerdings Überlagerungen, die bereits nach etwa 25µm verstärkt auftreten können, und die zum Teil unzureichende – womöglich entitätenabhängige - Verteilung des Kontrastmittels. Beides führt zu einer schlechten Bildqualität und zu einer verringerten Aussagekraft. Die Live-View wiederum ist die maximale Reduktion des Prozesses auf eine Echtzeit-Evaluation, aber anfällig für Bewegungsartefakte und durch die erhöhte Aufnahmezeit mit einem Bildrauschen durchsetzt. Durch diese Modi kann somit eine hohe Anzahl an Bildern entstehen, die keinen diagnostischen Nutzen zeigen. Um diese Flut an Informationen einzudämmen ist eine Abhilfe durch einen Deep-Learning Mechanismus, der diese Aufnahmen für die Evaluation durch den Neuropathologen in diagnostisch/nicht-diagnostisch und tumorös/pathologisch/gesund vorselektiert, denkbar (Izadyyazdanabadi et al. 2018). Ähnlich zu den Kollegen um Freund in der Urologie könnte zudem ein Score zur Graduierung der Läsion entwickelt und implementiert werden (Freund et al. 2019).

Ein weiteres Argument für eine automatisierte Vorselektion, ist die Möglichkeit der mehrfachen optischen Biopsie. Dadurch können mehrere Lokalisationen, was gleichzeitig mehr Bildinformation bedeutet, im Gegensatz zu üblicherweise einem Resektat atraumatisch evaluiert werden. Dies könnte Fehlbiopsien verhindern und zudem weitere Aufschlüsse und Mehrinformation bezüglich des Verhaltens der intratumoralen Heterogenität von Gliomen geben (Plessec et al. 2007, Sottoriva et al. 2013). Um allerdings den vorteilhaften Unterschieden und Möglichkeiten der CLE gegenüber den konventionellen Methoden der intraoperativen Schnellschnittdiagnostik in der Neuroonkologie gerecht zu werden ist zunächst eine objektive Beurteilung der diagnostischen Verlässlichkeit der CLE nötig.

7.3 Welche intraoperative Verdachtsdiagnostik soll es sein?

Für die Vergleichbarkeit der Methoden haben wir insgesamt drei Methoden an demselben Resektat angewandt. Es ergeben sich dadurch ebenso viele Berechnungen zur diagnostischen Präzision der jeweiligen Methode für die einzelnen von uns definierten Tumorgruppen.

Für die Sensibilität, Spezifität, PPW und NPW bei Anwendung des GS an Gliomen, Meningeomen und Metastasen ergaben sich unter Einschluss der partiellen Übereinstimmung 100%ige Werte. Dies deckt sich fast mit Ergebnissen zu Meningeomen und Metastasen (94,6%/99,8%/98,9%/99% und 78,9%/99,7%/98,6%/96,2%) eines viel größeren Kollektivs (>500), bei dem die Übereinstimmung des Kryoschnitts zum finalen paraffineingebetteten HE-gefärbten Präparats untersucht wurde (Tofte et al. 2014). Bei Gliomen konnte in unserer Arbeit eine weitere direkte Einteilung in High-Grad, Low-Grade oder genaue Subtypen nur geringfügig an zwei Glioblastomen und einem Oligodendrogliom demonstriert werden. Dadurch, dass Tofte und Kollegen genau dies unterscheiden und von 26 Fehlinterpretationen 18 die Über- bzw. Untergraduierung von Gliomen betreffen, fallen die Resultate der diagnostischen

Präzision für die Subgruppen des GS wesentlich kleiner aus. Ohne Berücksichtigung dieser Einteilung stimmen ebenfalls unter Einschluss der partiell übereinstimmenden Fällen 256/264 Verdachtsdiagnosen in dieser Studie überein und decken sich somit annähernd mit unseren Ergebnissen (18/18) (Tofte et al. 2014). Somit würde sich bei unserer geringen Anzahl von 15 HGG und drei LGG eine solche Unterteilung nicht anbieten. Für die sonstigen Entitäten berechneten wir zur Vergleichbarkeit zwischen unseren angewandten Methoden bei insgesamt einer nicht übereinstimmenden Probe eine Spezifität von 96,3% und eines PPW von 87,5%. Damit liegt in der vorliegenden Pilotstudie die Diskrepanz zwischen GS und finaler Diagnose bei 2,9% und gleicht entsprechenden Nachforschungen aus der Vergangenheit (Pleseć et al. 2007). Der entsprechende Fall, ein Pineozytom, wird zudem zu den seltenen primären intrakraniellen Neoplasien gezählt und dadurch leichter fehlinterpretiert. Zwei von drei Resektaten, für die keine Aussage zur Diagnose getroffen werden konnte, sind ebenso als spinales Ependymom ZNS WHO-Grad 3 und Hämangioblastom zu den Raritäten zu zählen (Ostrom et al. 2021). Das rezidierte Glioblastom ist durch die erschwerte Einschätzung aufgrund der Vorbehandlungen schwerer zu erkennen und biopsieren und deswegen als nicht klassifizierbar eingestuft. Insgesamt bilden somit die von uns mittels GS untersuchten Proben ein repräsentatives, aber kleines Kollektiv ab.

Was gilt nun für die konventionelle Methode des Methylenblauquetschpräparats? Roessler und Kollegen demonstrierten eine Übereinkunft zwischen Quetschpräparaten und finaler Diagnose von 97,9% für Meningeome, 96,3% für Metastasen und 95,7% für Glioblastome. Sie verwendeten dafür die May-Grünwald-Färbung und unterschieden ähnlich zu Tofte et al einzelne Subgruppen bei den Gliomen, wodurch sich eine vollständige Vergleichbarkeit zu unserer Einteilung nicht ergibt (Roessler et al. 2002). Eben in dieser Klassifizierung und Graduierung von LGG findet sich eine starke Fehlerquelle, die sich auf die diagnostische Präzision auswirkt (Hamasaki et al. 2018). Wir konnten für 23 von 35 möglichen Fällen eine Verdachtsdiagnose mittels MQP stellen und für alle eine teilweise bis vollständige Übereinkunft erzielen. Dies entspricht unter Berücksichtigung der geringen Fallzahl den Resultaten der vorherig genannten Studie. Keine Korrelation wurde in 10,2% der Fälle und besonders bei Low-Grade Gliome, Plexuspapillome und selteneren Entitäten beobachtet, was in dieser Pilotuntersuchung mitunter aufgrund der niedrigen Anzahl an Präparaten nicht bestätigt werden konnte (Roessler et al. 2002). Für drei Proben war es aufgrund der Beschaffenheit des Gewebes nicht möglich ein MQP anzufertigen, was sich mit Berichten zur selben Problematik in der Anfertigung eines Quetschpräparats deckt, 7,9% vs. 5,7% (Roessler et al. 2002). Drei weitere Fälle wiesen zusätzlich eine geringe Aussagekraft auf, wobei sich noch pathologische Eigenschaften zeigten. Das Vorliegen von neun Proben, die positiv auf Pathologien und Tumorzellen untersucht und als nicht weiter klassifizierbar eingestuft wurden, stellt einen großen Anteil dar. Dies lässt sich am ehesten auf die starke Abhängigkeit der Methode von der Qualität des

Gewebes und auf die geringen Erfahrungswerte unserer Anwender mit der Handhabung bzw. Herstellung des Präparats zurückführen. Für das Erkennen von gesundem Gewebe sowie Pathologien und Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Tumor ist das MQP somit in dieser Arbeit als eine rasch anwendbare und effektive Methode zu interpretieren. Sie ist allerdings nicht vollends repräsentabel für die Einteilung in spezifischere Entitäten oder Subtypen.

Während der GS und das MQP bereits seit Jahrzehnten etabliert und ausreichend Studien mit großer Fallzahl die Funktionalität belegen, ist für die CLE genau das Gegenteil der Fall. Einschließlich unserer Pilotstudie gibt es bis zu diesem Zeitpunkt wenige Arbeitsgruppen, die sich in einer in bzw. ex vivo Anwendung mit Natriumfluoreszein als Kontrastmittel an die Frage der diagnostischen Präzision herangetastet haben. Bei Eschbacher et al konnte ein Neuropathologe in einem ersten Versuch für 26 von 28 Fällen, von denen nur 15 neoplastische Läsionen stellten, einen korrekten Verdacht formulieren. Dabei wurden allerdings die 28 Bilder vorselektiert, es war eine Liste aller möglichen 28 Diagnosen verfügbar und es lagen Informationen zur Tumorlokalisierung und radiologischen Erscheinungsbild vor (Eschbacher et al. 2012). Eine vollständige Verblindung des Neuropathologen war dementsprechend nicht gegeben. Darauf aufbauend berichteten sie in einer Folgestudie bei 21 Gliomen und 30 Meningeomen eine retrospektiv untersuchte Sensitivität und Spezifität von 94% und 91% bzw. 93% und 97%. Hier ist der Grad der Verblindung und das evaluierende Personal (Neuropathologe oder Neurochirurg) vollständig ungeklärt. Zudem wurde dabei nicht explizit zwischen ex und in vivo Anwendung der CLE unterschieden (Martirosyan et al. 2016).

Die einzige Arbeit, die beim klinisch implementierten Einsatz eines CLE-Systems mit einer vollständigen Verblindung des neuropathologischen Personals arbeitete, berichtet neben einer Vielzahl histomorphologischer Merkmale detailliert von der diagnostischen Präzision für Pathologien bzw. Tumoren. Für die folgenden Parameter berücksichtige die Arbeitsgruppe die Prävalenz von Tumorzellen in den untersuchten Resektaten, weswegen sich dies bei der geringen Fallzahl auf Sensibilität und NPW auswirkt (Belykh et al. 2021). Die Gruppe der Gliome (n=34) weist eine Sensibilität, Spezifität, PPW und NPW von 66%/94%/98%/37% auf. In unserer Arbeit (Gliome: n=18) berechneten wir 93,3%/100%/100% und 93,8% unter der Prämisse, dass nur Fälle inkludiert wurden, für die eine Verdachtsdiagnose gestellt werden konnte. Meningeome konnten wir in jedem Fall korrekt verdachtsdiagnostizieren, während Belykh et al Werte von 63%/94%/83%/84% berichteten. In der Gegenüberstellung von Metastasen zeigt sich eine hohe Ähnlichkeit von 83%/94%/93%/89% zu 80%/96%/80%/96% in unserer Pilotstudie. Für die beiden zuletzt genannten Entitäten ist die Fallzahl in beiden Untersuchungen allerdings unter zehn. Insgesamt wird eine Übereinkunft zwischen CLE und finaler Diagnose von 75% bei Belykh und Kollegen und von 93,3% in den vorliegenden Nachforschungen erzielt (Belykh et al. 2020). Die Diskrepanz lässt sich durch die Inklusion der

Prävalenz in deren Berechnungen und die in unserer alleinigen Betrachtung von Fällen, in denen einen Verdachtsdiagnose gestellt werden konnte, erklären. Bezüglich der sonstigen Präparate konnte eine korrekte Diagnose von Hypophysenadenomen und einem Schwannom durch die CLE ebenso bereits in anderen Arbeiten demonstriert werden (Belykh et al. 2020, Belykh et al. 2020). Weitere Berechnungen zur Präzision bei vereinzelt vorkommenden Entitäten ergeben keinen Sinn. Zwei Fehlinterpretationen von Gewebeproben - einer Karzinommetastase fälschlicherweise als Adenom und ein anaplastisches Oligodendrogliom als Metastase – lassen vorerst keine Rückschlüsse auf falsche Muster ziehen.

Es verbleiben acht Fälle, die mittels CLE als nicht klassifizierbar eingestuft wurden. Ist dies dem Zufall geschuldet oder bildet es eine strukturelle Schwäche der neuartigen Methode ab? In drei Vorfällen kann letzteres ausgeschlossen werden. Für ein spinales Ependymom ZNS WHO-Grad 3, ein Hämangioblastom ZNS WHO-Grad 1 sowie ein rezidiertes Glioblastom war es ebenso nicht möglich mittels intraoperativen Goldstandards eine Diagnose zu formulieren, obwohl alle Präparate positiv auf Tumorzellen untersucht wurden. Die übrigen Fünf fallen in unsere Kategorie Sonstige. Die einzelnen Entitäten sind ein Pineozytom, ein Hämangioblastom, ein Plasmozytom, ein Plexuspapillom und eine reaktive Entzündung. Das Pineozytom, das Plexuspapillom und das Hämangioblastom werden in einer Gruppe von primären intrakraniellen Neoplasien zusammengefasst, die weniger als 5,7% der Fälle pro Jahr in den USA ausmachen (Ostrom et al. 2021). Die Erstdiagnose eines solitären intrakraniellen Plasmozytoms durch die Neuropathologie ist ebenso als ein selteneres Ereignis einzuordnen (Gagliardi et al. 2013). Für alle – einschließlich der reaktiven Entzündung – gilt, dass es in unserem Institut noch zu geringe Erfahrungswerte für die Verdachtsdiagnose durch CLE von diesen selteneren Fällen gibt und dadurch die mögliche Aussagekraft limitiert ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die meisten bisherigen ex und in vivo Studien bezüglich der Anwendbarkeit von CLE in der Neuroonkologie das Potenzial der Technik meist retrospektiv untersuchen und nicht im klinischen Alltag als Echt-Zeit intraoperative Schnellschnittdiagnostik implementieren. Zudem wurde in den meisten Untersuchungen kein CLE-Mikroskop, das speziell für den neurochirurgischen Gebrauch, wie das „CONVIVO“-System, hergestellt wurde, verwendet (Restelli et al. 2021). Im weiteren Vergleich zu vorherig entstandenen Arbeiten sind bei unserer Arbeit somit das prospektive Design mit standardisiertem Protokoll und eine vollständige Verblindung des neuropathologischen Diensthabenden zu den klinischen Angaben des Patienten hervorzuheben. Zum Standardprotokoll gehört weiterhin die zeitpunktgleiche und intravenöse Applikation des Kontrastmittels und die Evaluation der Gewebeprobe in Nahezu-Echtzeit genannt.

Vergleicht man nun die Methoden miteinander bilden alle unter Berücksichtigung der Fallzahlen ein kleines, aber realistisches, Kollektiv dar. Durch den HE-gefärbten GS als Goldstandard konnte nach Ausschluss infektiöser Proben, Einsätze mit mangelnder Bildqualität und der Fehlbiopsien in jedem Fall eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Dies traf ebenso mit dem Ausschluss weiterer Proben aufgrund mangelhafter Herstellung und konsekutiver geringem Informationsgehalt für das MQP zu. Mit der CLE war es wiederum möglich an mehr Resektaten eine Aussage zur Entität treffen zu können als mit dem MQP. Fehlinterpretationen ergaben sich nur einmal in einem Präparat des GS und zweimalig aus den Aufnahmen der CLE. Hinsichtlich der Anzahl der gestellten Verdachtsdiagnosen und der diagnostischen Präzision zeigt in unserer Arbeit der kryofixierte und HE-gefärbte Schnitt eine Überlegenheit. Dadurch ist mitnichten der Nutzen von MQP und CLE diskreditiert. Vielmehr ist unter klinisch-realistischen Bedingungen gezeigt worden, dass das MQP ein effektives aber anfangs in der Herstellung anfälliges diagnostisches Werkzeug ist. Die CLE im neuro-operativen Setting hingegen stellt sich als benutzerfreundlich dar und scheint eine Gleichwertigkeit zu den konventionellen Methoden bezüglich der Präzision in der Diagnostik zu erzielen. Um eine definitive Aussagekraft in dieser Hinsicht treffen zu können, liegt in unserer Arbeit eine zu geringe Fallzahl vor.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Vergleich zur molekularen Diagnostik machen der mangelhafte, zum Teil ausgeschöpfte Fortschritt und der digitale Wandel in der intraoperativen Diagnostik und in Behandlung von infiltrativ wachsenden intrakraniellen Neoplasien, wie Glioblastomen, ein Umdenken in der Neuroonkologie notwendig (Carlsson et al. 2014). Unsere Nachforschungen zur CLE als Alternative zu den konventionellen Methoden der intraoperativen Schnellschnittdiagnostik in der Neuropathologie unterstreichen und ergänzen bisherige Bemühungen dieser Art. Die Darstellung pathologischer, tumoröser und pathognomonischer Strukturen war mittels jeder Methode, die in dieser Arbeit angewandt wurde, möglich und lässt keine Zweifel an dem Potenzial der CLE zur histomorphologischen Evaluation aufkommen. Neben dieser Gemeinsamkeit bietet die CLE einige Neuerungen, die den Weg des digitalen Wandels ebnen, sowie Zeit- und Personalsparnis versprechen. Der aber wichtigste Aspekt ist der Benefit des Patienten. Eine Echt-Zeit Diagnose kann das Vorgehen des Operateurs sowie die gesamte Therapiestrategie neu und wesentlich schneller definieren als die übliche Vorgehensweise. Zudem ist allein der Ausblick das Resektionsmaß auf zellulärem Niveau bestimmen und ausweiten zu können eine vielversprechende Neuerung in der Neurochirurgie (Eschbacher et al. 2012). Grundlegend für die Ausschöpfung dieses Potenzials ist aber zunächst die diagnostische Präzision der CLE implementiert in das klinische Setting und im Vergleich zu den konventionellen Methoden zu untersuchen. Diesbezüglich ist die vorliegende Arbeit als Pilotstudie mit kleiner Fallzahl und

Hinweisen auf eine diagnostische Gleichwertigkeit (und womöglicher zukünftiger Überlegenheit) zu verstehen.

Zukünftig ist es neben dem Anlegen eines Atlanten bzw. einer Datenbank zu Darstellungsweise verschiedener Entitäten mittels CLE nötig weitere Nachforschungen zur Reliabilität mit größeren Fallzahlen in einem prospektiv, randomisiert und verblindeten Design anzugehen. Dabei sollte die Methode *in vivo*, im klinischen Workflow angewandt und verstärkt auf die Herausarbeitung von Merkmalen zur Unterscheidung von HGG und LGG eingegangen werden. Hinsichtlich dieser ist die Untersuchung zur Identifikation der mikroskopischen Tumorgrenze auf weitere infiltrative Neoplasien und Subtypen auszuweiten und ebenso mit höheren Fallzahlen zu unterstreichen, um den vollen neurochirurgisch-operativen Nutzen erzielen zu können. Da die CLE abhängig von dem genutzten Kontrastmittel ist, ist es zusätzlich von Interesse auf das Anreicherungsverhalten und die Distribution von Natriumfluoreszein bei intrakraniellen Läsionen einzugehen. Die Nutzung anderweitiger fluoreszierender Agenten, die für den menschlichen Organismus verträglich sind, ist zu erwägen.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich zum Teil unermüdlich unterstützt haben mein Promotionsvorhaben umzusetzen. Dazu gehört an besonderer Stelle meine Eltern, Hedwig & Ernst, und Brüder, Ernst-Benedikt & Georg, sowie die gesamte Familie zu nennen.

Durch meine Betreuerin PD Dr. Friederike Liesche-Starnecker habe ich gelernt, wie wertvoll eine außerordentlich gute Betreuung dafür ist. Danke für dein allzeit offenes Ohr und die Zeit, die du immer für deine Promotionsstudenten gefunden hast.

Prof. Dr. Jürgen Schlegel durfte ich als überfachlich kompetenten Wissenschaftler und Menschen kennenlernen. Danke Jürgen für die stetige Motivation, Begleitung während der Promotionszeit und Begeisterung für Forschung, die du selbst jeden Tag aufs Neue weitergibst.

Zuletzt möchte ich Franziska Ganster nennen – Danke Moggele.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konfokales Laserendomikroskop (1), Full-HD-Touch Display (2), Fußpedal (3), Scannereinheit (4), Scannersonde (5), Leitungskabel (6), Sterile Hülle (7) (Leierseder 2018)	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung konfokale Laserendomikroskopie	16
Abbildung 3: Kontingenztafel zur Gegenüberstellung von intraoperativer Schnellschnittdiagnose und finaler Diagnose	18
Abbildung 4: Anzahl CLE-Aufnahmen von Gliomen im chronologischen Verlauf	21
Abbildung 5: Nekrotisches Areal (weiß umrandet), Palisadenstellung (weiße Pfeile), diffuse Verteilung pleomorpher Zellen, HE-Präparat, Patientennr. 1: Glioblastom – Tumorzentrum, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	21
Abbildung 6: Nekrotisches Areal (weiß umrandet), Palisadenstellung (weiße Pfeile), diffuse Verteilung pleomorpher Zellen, Patientennr. 1: Glioblastom – Tumorzentrum, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	22
Abbildung 7: Nekrotisches Areal (weiß umrandet), pleomorphe Zellen, Patientennr. 1: Glioblastom - Tumorrand, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	22
Abbildung 8: Pleomorphe Zellen, Patientennr. 1: Glioblastom - Tumorrand, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	23
Abbildung 9: Perivaskuläre Satellitose, diffuse Verteilung pleomorpher Zellen, Patientennr. 1: Glioblastom - Zone des Übergangs, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	23
Abbildung 10: Pleomorphe Tumorzellen, Patientennr. 1: Glioblastom - Zone des Übergangs, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	24
Abbildung 11: Geringe Natriumfluoresceinanreicherung, diffuse Verteilung von Autofluoreszenz; Patientennr. 1: Glioblastom - Zone des Übergangs, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	24
Abbildung 12: Diffus verteilte, pleomorphe, großzellige Tumorzellen (weiße Pfeile); Hyperproliferiertes/-trophiertes Endothel (um weißen Stern); Patientennr. 33: Großzelliges Glioblastom, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	25

Abbildung 13: Diffus verteilte, pleomorphe, großzellige Tumorzellen (weiße Pfeile); Patientennr. 33: Großzelliges Glioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	25
Abbildung 14: Diffus verteilte, pleomorphe, großzellige Tumorzellen; Patientennr. 33: Großzelliges Glioblastom, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung.....	26
Abbildung 15 : Nekrotisches Areal (weiß umrandet), massenhaft pleomorphe Tumorzellen (Pfeil), Patientennr. 15: Spinales Ependymom, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung ..	26
Abbildung 16: Nekrotisches Areal (weiß umrandet), massenhaft pleomorphe Tumorzellen (Pfeil), Patientennr. 15: Spinales Ependymom, ZNS WHO-Grad 3, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	27
Abbildung 17: Massenhaft pleomorphe Zellen, Kern-Plasma-Relation: 7,3µm Kern – 17µm Plasma (Pfeil), Patientennr. 15: Spinales Ependymom, ZNS WHO-Grad 3, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	27
Abbildung 18: Massenhaft Pleomorphe Zellen, Kern-Plasma-Relation: 14,1µm Kern – 24,3µm Plasma (Pfeil), Autofluoreszenz am rechten Bildrand, Patientennr. 15: Spinales Ependymom, ZNS WHO-Grad 3, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	28
Abbildung 19: uniform rundliche Tumorzellen, geringe Tumorzelllast; Patientennr. 19: Oligodendrogliom, ZNS WHO-Grad 2, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	28
Abbildung 20: uniform rundliche Tumorzellen, erhöhte Kontrastierung von Strängen in der extrazellulären Matrix; Patientennr. 19: Oligodendrogliom, ZNS WHO-Grad 2, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	29
Abbildung 21: Anzahl CLE-Aufnahmen von Metastasen im chronologischen Verlauf	29
Abbildung 22: Pleomorphe Zellen (weiß umrandet), Patientennr. 18: Urothelkarzinom- Metastase, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	30
Abbildung 23: Pleomorphe Zellen (weiß umrandet), Patientennr. 18: Urothelkarzinom- Metastase, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	30
Abbildung 24: Pleomorphe Zellen, 40fache Vergrößerung; Patientennr. 18: Urothelkarzinom- Metastase, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung.....	31

Abbildung 25: pleomorphe Zellen (Pfeile), nekrotische Einblutung (weiß umrandet), Mikrovaskularisation (Stern), umgebendes Metastasenstroma, Patientennr. 4: Mammakarzinom-Metastase, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	31
Abbildung 26: Pleomorphe Zellen (Pfeile), Mikrovaskularisation (Stern), Metastasenstroma, Patientennr. 4: Mammakarzinom-Metastase, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	32
Abbildung 27: Pleomorphe Zellen (Pfeil), nekrotische Einblutung (weiß umrandet), Patientennr. 4: Mammakarzinom-Metastase, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	32
Abbildung 28: Pleomorphe Zellen (weiß umrandet), Metastasenstroma, Patientennr. 7: Hepatozelluläre Karzinom-Metastase, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung.....	33
Abbildung 29: Pleomorphe Zellen (weiß umrandet), Metastasenstroma, Patientennr. 7: Hepatozelluläre Karzinom-Metastase, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	33
Abbildung 30: Anzahl CLE-Aufnahmen von Meningeomen im chronologischen Verlauf	34
Abbildung 31: Psammonkörper (Pfeil), fibröser Zellverband (schwarz umrandet), HE-Präparat, Patientennr. 6: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO-Grad 1, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	34
Abbildung 32: Psammonkörper (Pfeil), fibröser Zellverband (schwarz umrandet), Patientennr. 6: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO-Grad 1, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	35
Abbildung 33: fibröse Faserung, Psammonkörper, 40fache Vergrößerung; Patientennr. 6: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO-Grad 1, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung	35
Abbildung 34: Psammonkörper (Pfeil), Mikrovaskularisation (Sterne), HE-Präparat, Patientennr. 26: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO-Grad 2, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	36
Abbildung 35: Psammonkörper (Pfeil), Mikrovaskularisation (Stern), Patientennr. 26: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO-Grad 2, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	36
Abbildung 36: Hyperzellularität, fibröse Zellverbände; Patientennr. 24: Meningeom, ZNS WHO-Grad 2, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	37
Abbildung 37: Hyperzellularität, fibröse Zellverbände; Patientennr. 24: Meningeom, ZNS WHO-Grad 2, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung	37

Abbildung 38: Anzahl CLE-Aufnahmen von sonstigen Tumorentitäten im chronologischen Verlauf.....	38
Abbildung 39: zellarmes muköses Gewebe, keine Gewebsarchitektur erkennbar, Patientennr. 21: Hypophysäre Zyste, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	38
Abbildung 40: keine Gewebsarchitektur erkennbar, keine eindeutige Fluoreszenzanreicherung, zellarmes Gewebe; Patientennr. 21: Hypophysäre Zyste, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	39
Abbildung 41: zellarmes Gewebe; Patientennr. 21: Hypophysäre Zyste, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung.....	39
Abbildung 42: Hyperzellularität von uniform runden und basophilen Zellen, fibröse Durchsetzung mit Mikrovaskularisation; Patientennr. 22: Rezidiertes Hypophysenadenom, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	40
Abbildung 43: Hyperzellularität von uniform runden Zellen, fibröse Durchsetzung mit Mikrovaskularisation; Patientennr. 22: Rezidiertes Hypophysenadenom, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	40
Abbildung 44: Hyperzellularität von uniform runden Zellen, Patientennr. 22: Rezidiertes Hypophysenadenom, Methylenblauquetschpräparat, 40-fache Vergrößerung.....	41
Abbildung 45: partielle Nekrose, entzündlich gelockerte Architektur; Patientennr. 32: reaktive Entzündung nach Radiatio bei Metastase, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	41
Abbildung 46: partielle Nekrose (weiß eingerahmt), Gefäßduplikation (weiße Sterne), Fokustiefe 28µm; Patientennr. 32: Reaktive Entzündung nach Radiatio einer Metastase, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	42
Abbildung 47: pleomorphe Tumorzellen, Inseln extrazellulärer Matrix; Patientennr. 25: Hämangioblastom, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	42
Abbildung 48: pleomorphe Tumorzellen, Inseln extrazellulärer Matrix; Patientennr. 25: Hämangioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm ²	43
Abbildung 49: rundliche eosinophile Zellen und Nuclei, Gliazellen; Patientennr. 9: Pineozytom, HE-Gefrierschnitt, 40-fache Vergrößerung	43

Abbildung 50: rundliche Zellen mit ausfüllenden Nuclei, Luftblasen (weißer Stern); Patientennr. 9: Pineozytom, CLE ex vivo 475 x 267µm²	44
Abbildung 51: Luftblasen zwischen Sonde und Probenmaterial, Patientennr. 21: Hypophysäre Zyste, CLE ex vivo 475 x 267µm²	45
Abbildung 52: Luftblase, Fokusebene 9µm, Patientennr. 23: Rezidiertes Glioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm²	46
Abbildung 53: Luftblase, Fokusebene 40µm, Patientennr. 23: Rezidiertes Glioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm²	46
Abbildung 54: Adhäsiver Blutfilm, Patientennr. 4: Metastase eines Mammakarzinoms, CLE ex vivo 475 x 267µm²	47
Abbildung 55: Fremdmaterial (Kompressenfaden Ø35µm), Patientennr. 11: Rezidiertes Glioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm²	48
Abbildung 56: zentriertes Fokusartefakt; Patientennr. 22: Rezidiertes Hypophysenadenom, CLE ex vivo 475 x 267µm²	48
Abbildung 57: zentriertes Fokusartefakt; Patientennr. 35: Oligodendrogliom, ZNS WHO-Grad 3, CLE ex vivo 475 x 267µm²	49
Abbildung 58: Verzerrung der Aufnahme im oberen Bildrand; Patientennr. 30: Riesenzell-Glioblastom, CLE ex vivo 475 x 267µm²	49
Abbildung 59: Flussdiagramm Patientenselektion und diagnostisches Procedere HE-gefärbter Gefrierschnitt	50
Abbildung 60: Flussdiagramm Patientenselektion und diagnostisches Procedere Methylenblauquetschpräparat; kA=keine Angabe	52
Abbildung 61: Flussdiagramm Patientenselektion und diagnostisches Procedere Konfokale Laserendomikroskopie	53

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übereinstimmung HE-gefärbter Gefrierschnitt mit finaler Diagnose Gruppe A: komplette Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe B: teilweise Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe C: keine Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe D: nicht klassifizierbar51

Tabelle 2: Übereinstimmung HE-gefärbter Gefrierschnitt mit finaler Diagnose Gruppe A: komplette Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe B: teilweise Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe C: keine Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe D: nicht klassifizierbar52

Tabelle 3: Übereinstimmung CLE mit finaler Diagnose Gruppe A: komplette Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe B: teilweise Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe C: keine Übereinstimmung mit finaler Diagnose; Gruppe D: nicht klassifizierbar54

12 Literaturverzeichnis

- Acerbi, F., M. Broggi, M. Eoli, E. Anghileri, C. Cavallo, C. Boffano, R. Cordella, L. Cuppini, B. Pollo, M. Schiariti, S. Visintini, C. Orsi, E. La Corte, G. Broggi and P. Ferroli (2014). "Is fluorescein-guided technique able to help in resection of high-grade gliomas?" Neurosurg Focus **36**(2): E5.
- Acerbi, F., B. Pollo, C. De Laurentis, F. Restelli, J. Falco, I. G. Vetrano, M. Broggi, M. Schiariti, I. Tramacere, P. Ferroli and F. DiMeco (2020). "Ex Vivo Fluorescein-Assisted Confocal Laser Endomicroscopy (CONVIVO(R) System) in Patients With Glioblastoma: Results From a Prospective Study." Front Oncol **10**: 606574.
- Aldape, K., G. Zadeh, S. Mansouri, G. Reifenberger and A. von Deimling (2015). "Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers." Acta Neuropathol **129**(6): 829-848.
- Backer-Grondahl, T., B. H. Moen and S. H. Torp (2012). "The histopathological spectrum of human meningiomas." Int J Clin Exp Pathol **5**(3): 231-242.
- Barnholtz-Sloan, J. S., A. E. Sloan, F. G. Davis, F. D. Vigneau, P. Lai and R. E. Sawaya (2004). "Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System." J Clin Oncol **22**(14): 2865-2872.
- Belykh, E., B. Ngo, D. S. Farhadi, X. Zhao, M. A. Mooney, W. L. White, J. K. Daniels, A. S. Little, J. M. Eschbacher and M. C. Preul (2020). "Confocal Laser Endomicroscopy Assessment of Pituitary Tumor Microstructure: A Feasibility Study." J Clin Med **9**(10).
- Belykh, E., A. A. Patel, E. J. Miller, B. Bozkurt, K. Yagmurlu, E. C. Woolf, A. C. Scheck, J. M. Eschbacher, P. Nakaji and M. C. Preul (2018). "Probe-based three-dimensional confocal laser endomicroscopy of brain tumors: technical note." Cancer Manag Res **10**: 3109-3123.
- Belykh, E., X. Zhao, B. Ngo, D. S. Farhadi, V. A. Byvaltsev, J. M. Eschbacher, P. Nakaji and M. C. Preul (2020). "Intraoperative Confocal Laser Endomicroscopy Ex Vivo Examination of Tissue Microstructure During Fluorescence-Guided Brain Tumor Surgery." Front Oncol **10**: 599250.
- Belykh, E., X. Zhao, B. Ngo, D. S. Farhadi, A. Kindelin, S. Ahmad, N. L. Martirosyan, M. T. Lawton and M. C. Preul (2021). "Visualization of brain microvasculature and blood flow in vivo: Feasibility study using confocal laser endomicroscopy." Microcirculation **28**(3): e12678.
- Bette, S., J. Gempt, T. Huber, T. Boeckh-Behrens, F. Ringel, B. Meyer, C. Zimmer and J. S. Kirschke (2016). "Patterns and Time Dependence of Unspecific Enhancement in Postoperative Magnetic Resonance Imaging After Glioblastoma Resection." World Neurosurg **90**: 440-447.
- Breuskin, D., J. Szczygielski, S. Urbschat, Y. J. Kim and J. Oertel (2017). "Confocal Laser Endomicroscopy in Neurosurgery-An Alternative to Instantaneous Sections?" World Neurosurg **100**: 180-185.
- Buerki, R. A., C. M. Horbinski, T. Kruser, P. M. Horowitz, C. D. James and R. V. Lukas (2018). "An overview of meningiomas." Future Oncol **14**(21): 2161-2177.
- Bui, D., K. E. Mach, D. V. Zlatev, R. V. Rouse, J. T. Leppert and J. C. Liao (2015). "A Pilot Study of In Vivo Confocal Laser Endomicroscopy of Upper Tract Urothelial Carcinoma." J Endourol **29**(12): 1418-1423.
- Cagney, D. N., A. M. Martin, P. J. Catalano, A. J. Redig, N. U. Lin, E. Q. Lee, P. Y. Wen, I. F. Dunn, W. L. Bi, S. E. Weiss, D. A. Haas-Kogan, B. M. Alexander and A. A. Aizer (2017). "Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: a population-based study." Neuro Oncol **19**(11): 1511-1521.
- Carlsson, S. K., S. P. Brothers and C. Wahlestedt (2014). "Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme." EMBO Mol Med **6**(11): 1359-1370.

Charalampaki, P., M. Javed, S. Daali, H. J. Heiroth, A. Igressa and F. Weber (2015). "Confocal Laser Endomicroscopy for Real-time Histomorphological Diagnosis: Our Clinical Experience With 150 Brain and Spinal Tumor Cases." Neurosurgery **62 Suppl 1**: 171-176.

Chatterjee, S. (2014). "Artefacts in histopathology." J Oral Maxillofac Pathol **18**(Suppl 1): S111-116.

Coron, E., V. Laurent, F. Malard, M. Le Rhun, P. Chevallier, T. Guillaume, J. F. Mosnier, J. P. Galmiche and M. Mohty (2014). "Early detection of acute graft-versus-host disease by wireless capsule endoscopy and probe-based confocal laser endomicroscopy: results of a pilot study." United European Gastroenterol J **2**(3): 206-215.

De Palma, G. D., D. Esposito, G. Luglio, G. Limite, A. Accurso, V. Sollazzo, F. Maione, G. Cassese, S. Siciliano, N. Gennarelli, G. Ilardi, M. Paternoster, M. C. Giglio and P. Forestieri (2015). "Confocal laser endomicroscopy in breast surgery: a pilot study." BMC Cancer **15**: 252.

De Witt Hamer, P. C., S. G. Robles, A. H. Zwinderman, H. Duffau and M. S. Berger (2012). "Impact of intraoperative stimulation brain mapping on glioma surgery outcome: a meta-analysis." J Clin Oncol **30**(20): 2559-2565.

Eisenhardt, L. and H. Cushing (1930). "Diagnosis of Intracranial Tumors by Supravital Technique." Am J Pathol **6**(5): 541-552 547.

Eschbacher, J., N. L. Martirosyan, P. Nakaji, N. Sanai, M. C. Preul, K. A. Smith, S. W. Coons and R. F. Spetzler (2012). "In vivo intraoperative confocal microscopy for real-time histopathological imaging of brain tumors." J Neurosurg **116**(4): 854-860.

Euskirchen, P., F. Bielle, K. Labreche, W. P. Kloosterman, S. Rosenberg, M. Daniau, C. Schmitt, J. Masliah-Planchon, F. Bourdeaut, C. Dehais, Y. Marie, J. Y. Delattre and A. Idbaih (2017). "Same-day genomic and epigenomic diagnosis of brain tumors using real-time nanopore sequencing." Acta Neuropathol **134**(5): 691-703.

Foersch, S., A. Heimann, A. Ayyad, G. A. Spoden, L. Florin, K. Mpoukouvalas, R. Kiesslich, O. Kempfski, M. Goetz and P. Charalampaki (2012). "Confocal laser endomicroscopy for diagnosis and histomorphologic imaging of brain tumors in vivo." PLoS One **7**(7): e41760.

Fotteler, M. L., F. Liesche-Starnecker, M. C. Brielmaier, J. Schobel, J. Gempt, J. Schlegel and W. Swoboda (2021). "Socio-Organizational Impact of Confocal Laser Endomicroscopy in Neurosurgery and Neuropathology: Results from a Process Analysis and Expert Survey." Diagnostics (Basel) **11**(11).

Freund, J. E., E. Liem, C. D. Savci-Heijink, J. Baard, G. M. Kamphuis, J. de la Rosette and D. M. de Bruin (2019). "Confocal laser endomicroscopy for upper tract urothelial carcinoma: validation of the proposed criteria and proposal of a scoring system for real-time tumor grading." World J Urol **37**(10): 2155-2164.

Gagliardi, F., M. Losa, N. Boari, A. Spina, M. Reni, M. R. Terreni and P. Mortini (2013). "Solitary clival plasmocytomas: Misleading clinical and radiological features of a rare pathology with a specific biological behaviour." Acta Neurochir (Wien) **155**(10): 1849-1856.

Grabowski, M. M., P. F. Recinos, A. S. Nowacki, J. L. Schroeder, L. Angelov, G. H. Barnett and M. A. Vogelbaum (2014). "Residual tumor volume versus extent of resection: predictors of survival after surgery for glioblastoma." J Neurosurg **121**(5): 1115-1123.

Hamasaki, M., K. H. F. Chang, K. Nabeshima and P. S. Tauchi-Nishi (2018). "Intraoperative Squash and Touch Preparation Cytology of Brain Lesions Stained with H+E and Diff-Quik: A 20-Year Retrospective Analysis and Comparative Literature Review." Acta Cytol **62**(1): 44-53.

Hayreh, S. S. (1974). "Recent advances in fluorescein fundus angiography." Br J Ophthalmol **58**(4): 391-412.

Hohne, J., K. M. Schebesch, S. Zoubaa, M. Proescholdt, M. J. Riemenschneider and N. O. Schmidt (2021). "Intraoperative imaging of brain tumors with fluorescein: confocal laser endomicroscopy in neurosurgery. Clinical and user experience." Neurosurg Focus **50**(1): E19.

Ichimura, K., Y. Narita and C. E. Hawkins (2015). "Diffusely infiltrating astrocytomas: pathology, molecular mechanisms and markers." Acta Neuropathol **129**(6): 789-808.

Izadyyazdanabadi, M., E. Belykh, M. A. Mooney, J. M. Eschbacher, P. Nakaji, Y. Yang and M. C. Preul (2018). "Prospects for Theranostics in Neurosurgical Imaging: Empowering Confocal Laser Endomicroscopy Diagnostics via Deep Learning." Front Oncol **8**: 240.

Jones, N. P., A. Sala-Puigdollers and P. E. Stanga (2017). "Ultra-widefield fundus fluorescein angiography in the diagnosis and management of retinal vasculitis." Eye (Lond) **31**(11): 1546-1549.

Jouvet, A., G. Saint-Pierre, F. Fauchon, K. Privat, E. Bouffet, M. M. Ruchoux, L. Chauveinc and M. Fevre-Montange (2000). "Pineal parenchymal tumors: a correlation of histological features with prognosis in 66 cases." Brain Pathol **10**(1): 49-60.

Keime-Guibert, F., O. Chinot, L. Taillandier, S. Cartalat-Carel, M. Frenay, G. Kantor, J. S. Guillamo, E. Jadaud, P. Colin, P. Y. Bondiau, P. Menei, H. Loiseau, V. Bernier, J. Honnorat, M. Barrie, K. Mokhtari, J. J. Mazon, A. Bissery, J. Y. Delattre and N.-O. Association of French-Speaking (2007). "Radiotherapy for glioblastoma in the elderly." N Engl J Med **356**(15): 1527-1535.

Kiesslich, R., L. Gossner, M. Goetz, A. Dahlmann, M. Vieth, M. Stolte, A. Hoffman, M. Jung, B. Nafe, P. R. Galle and M. F. Neurath (2006). "In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy." Clin Gastroenterol Hepatol **4**(8): 979-987.

Kornblau, I. S. and J. F. El-Annan (2019). "Adverse reactions to fluorescein angiography: A comprehensive review of the literature." Surv Ophthalmol **64**(5): 679-693.

Lamba, N., R. B. Kearney, P. J. Catalano, M. J. Hassett, P. Y. Wen, D. A. Haas-Kogan and A. A. Aizer (2021). "Population-based estimates of survival among elderly patients with brain metastases." Neuro Oncol **23**(4): 661-676.

Lamba, N., P. Y. Wen and A. A. Aizer (2021). "Epidemiology of brain metastases and leptomeningeal disease." Neuro Oncol **23**(9): 1447-1456.

Leierseder, S. (2018). "Konfokale Endomikroskopie bei Hirnoperationen." Photonik.

Louis, D. N., A. Perry, P. Wesseling, D. J. Brat, I. A. Cree, D. Figarella-Branger, C. Hawkins, H. K. Ng, S. M. Pfister, G. Reifenberger, R. Soffiatti, A. von Deimling and D. W. Ellison (2021). "The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." Neuro Oncol **23**(8): 1231-1251.

Martinez, A. J., I. Pollack, W. A. Hall and L. D. Lunsford (1988). "Touch preparations in the rapid intraoperative diagnosis of central nervous system lesions. A comparison with frozen sections and paraffin-embedded sections." Mod Pathol **1**(5): 378-384.

Martirosyan, N. L., J. M. Eschbacher, M. Y. Kalani, J. D. Turner, E. Belykh, R. F. Spetzler, P. Nakaji and M. C. Preul (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.

Martirosyan, N. L., J. Georges, J. M. Eschbacher, E. Belykh, A. Carotenuto, R. F. Spetzler, P. Nakaji and M. C. Preul (2018). "Confocal scanning microscopy provides rapid, detailed intraoperative histological assessment of brain neoplasms: Experience with 106 cases." Clin Neurol Neurosurg **169**: 21-28.

Miller, C. R., C. P. Dunham, B. W. Scheithauer and A. Perry (2006). "Significance of necrosis in grading of oligodendroglial neoplasms: a clinicopathologic and genetic study of newly diagnosed high-grade gliomas." J Clin Oncol **24**(34): 5419-5426.

Miller, C. R. and A. Perry (2007). "Glioblastoma." Arch Pathol Lab Med **131**(3): 397-406.

Moore, G. E., W. T. Peyton and et al. (1948). "The clinical use of fluorescein in neurosurgery; the localization of brain tumors." J Neurosurg **5**(4): 392-398.

Moravan, M. J., P. E. Fecci, C. K. Anders, J. M. Clarke, A. K. S. Salama, J. D. Adamson, S. R. Floyd, J. A. Torok, J. K. Salama, J. H. Sampson, P. W. Sperduto and J. P. Kirkpatrick (2020). "Current multidisciplinary management of brain metastases." Cancer **126**(7): 1390-1406.

Muldoon, L. L., C. Soussain, K. Jahnke, C. Johanson, T. Siegal, Q. R. Smith, W. A. Hall, K. Hynynen, P. D. Senter, D. M. Peereboom and E. A. Neuwelt (2007). "Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check." J Clin Oncol **25**(16): 2295-2305.

Novis, D. A. and R. J. Zarbo (1997). "Interinstitutional comparison of frozen section turnaround time. A College of American Pathologists Q-Probes study of 32868 frozen sections in 700 hospitals." Arch Pathol Lab Med **121**(6): 559-567.

Osswald, M., E. Jung, F. Sahm, G. Solecki, V. Venkataramani, J. Blaes, S. Weil, H. Horstmann, B. Wiestler, M. Syed, L. Huang, M. Ratliff, K. Karimian Jazi, F. T. Kurz, T. Schmenger, D. Lemke, M. Gommel, M. Pauli, Y. Liao, P. Haring, S. Pusch, V. Herl, C. Steinhauser, D. Krunic, M. Jarahian, H. Miletic, A. S. Berghoff, O. Griesbeck, G. Kalamakis, O. Garaschuk, M. Preusser, S. Weiss, H. Liu, S. Heiland, M. Platten, P. E. Huber, T. Kuner, A. von Deimling, W. Wick and F. Winkler (2015). "Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network." Nature **528**(7580): 93-98.

Ostrom, Q. T., G. Cioffi, K. Waite, C. Kruchko and J. S. Barnholtz-Sloan (2021). "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018." Neuro Oncol **23**(12 Suppl 2): iii1-iii105.

Ostrom, Q. T., C. H. Wright and J. S. Barnholtz-Sloan (2018). "Brain metastases: epidemiology." Handb Clin Neurol **149**: 27-42.

Patchell, R. A., P. A. Tibbs, J. W. Walsh, R. J. Dempsey, Y. Maruyama, R. J. Kryscio, W. R. Markesbery, J. S. Macdonald and B. Young (1990). "A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain." N Engl J Med **322**(8): 494-500.

Pavlov, V., D. Meyronet, V. Meyer-Bisch, X. Armoiry, B. Pikul, C. Dumot, P. A. Beuriat, F. Signorelli and J. Guyotat (2016). "Intraoperative Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy in Surgery and Stereotactic Biopsy of Low-Grade and High-Grade Gliomas: A Feasibility Study in Humans." Neurosurgery **79**(4): 604-612.

Peiffer, J. and P. Kleihues (1999). "Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research." Brain Pathol **9**(2): 241-245.

Pekmezci, M. and A. Perry (2013). "Neuropathology of brain metastases." Surg Neurol Int **4**(Suppl 4): S245-255.

Perry, A. and P. Wesseling (2016). "Histologic classification of gliomas." Handb Clin Neurol **134**: 71-95.

Plesec, T. P. and R. A. Prayson (2007). "Frozen section discrepancy in the evaluation of central nervous system tumors." Arch Pathol Lab Med **131**(10): 1532-1540.

Prayson, R. A. (1999). "Clinicopathologic study of 61 patients with ependymoma including MIB-1 immunohistochemistry." Ann Diagn Pathol **3**(1): 11-18.

Restelli, F., B. Pollo, I. G. Vetrano, S. Cabras, M. Broggi, M. Schiariti, J. Falco, C. de Laurentis, G. Raccuia, P. Ferroli and F. Acerbi (2021). "Confocal Laser Microscopy in Neurosurgery: State of the Art of Actual Clinical Applications." J Clin Med **10**(9).

Reyes, M. G., M. F. Homsí, L. W. McDonald and R. P. Glick (1991). "Imprints, smears, and frozen sections of brain tumors." Neurosurgery **29**(4): 575-579.

Roessler, K., W. Dietrich and K. Kitz (2002). "High diagnostic accuracy of cytologic smears of central nervous system tumors. A 15-year experience based on 4,172 patients." Acta Cytol **46**(4): 667-674.

Sahm, F., D. Schrimpf, D. T. Jones, J. Meyer, A. Kratz, D. Reuss, D. Capper, C. Koelsche, A. Korshunov, B. Wiestler, I. Buchhalter, T. Milde, F. Selt, D. Sturm, M. Kool, M. Hummel, M. Bewerunge-Hudler, C. Mawrin, U. Schuller, C. Jungk, A. Wick, O. Witt, M. Platten, C. Herold-Mende, A. Unterberg, S. M. Pfister, W. Wick and A. von Deimling (2016). "Next-generation sequencing in routine brain tumor diagnostics enables an integrated diagnosis and identifies actionable targets." Acta Neuropathol **131**(6): 903-910.

Sahm, F., D. Schrimpf, D. Stichel, D. T. W. Jones, T. Hielscher, S. Schefzyk, K. Okonechnikov, C. Koelsche, D. E. Reuss, D. Capper, D. Sturm, H. G. Wirsching, A. S. Berghoff, P. Baumgarten, A. Kratz, K. Huang, A. K. Wefers, V. Hovestadt, M. Sill, H. P. Ellis, K. M. Kurian, A. F. Okuducu, C. Jungk, K. Drieschler, M. Schick, M. Bewerunge-Hudler, C. Mawrin, M. Seiz-Rosenhagen, R. Ketter, M. Simon, M. Westphal, K. Lamszus, A. Becker, A. Koch, J. Schittenhelm, E. J. Rushing, V. P. Collins, S. Brehmer, L. Chavez, M. Platten, D. Hanggi, A. Unterberg, W. Paulus, W. Wick, S. M. Pfister, M. Mittelbronn, M. Preusser, C. Herold-Mende, M. Weller and A. von Deimling (2017). "DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis." Lancet Oncol **18**(5): 682-694.

Sanai, N., J. Eschbacher, G. Hattendorf, S. W. Coons, M. C. Preul, K. A. Smith, P. Nakaji and R. F. Spetzler (2011). "Intraoperative confocal microscopy for brain tumors: a feasibility analysis in humans." Neurosurgery **68**(2 Suppl Operative): 282-290; discussion 290.

Schneider, C., S. P. Johnson, K. Gurusamy, R. J. Cook, A. E. Desjardins, D. J. Hawkes, B. R. Davidson and S. Walker-Samuel (2017). "Identification of liver metastases with probe-based confocal laser endomicroscopy at two excitation wavelengths." Lasers Surg Med **49**(3): 280-292.

Sottoriva, A., I. Spiteri, S. G. Piccirillo, A. Touloumis, V. P. Collins, J. C. Marioni, C. Curtis, C. Watts and S. Tavaré (2013). "Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(10): 4009-4014.

Stummer, W., U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, H. J. Reulen and A. L.-G. S. Group (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.

Stupp, R., M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross, R. O. Mirimanoff, R. European Organisation for, T. Treatment of Cancer Brain, G. Radiation Oncology and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." Lancet Oncol **10**(5): 459-466.

Takei, H., E. Rouah and Y. Ishida (2016). "Brain metastasis: clinical characteristics, pathological findings and molecular subtyping for therapeutic implications." Brain Tumor Pathol **33**(1): 1-12.

Tofte, K., C. Berger, S. H. Torp and O. Solheim (2014). "The diagnostic properties of frozen sections in suspected intracranial tumors: A study of 578 consecutive cases." Surg Neurol Int **5**: 170.

van den Bent, M. J. (2010). "Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective." Acta Neuropathol **120**(3): 297-304.

Walker, M. D., S. B. Green, D. P. Byar, E. Alexander, Jr., U. Batzdorf, W. H. Brooks, W. E. Hunt, C. S. MacCarty, M. S. Mahaley, Jr., J. Mealey, Jr., G. Owens, J. Ransohoff, 2nd, J. T. Robertson, W. R. Shapiro, K. R. Smith, Jr., C. B. Wilson and T. A. Strike (1980). "Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery." N Engl J Med **303**(23): 1323-1329.

Weller, M., M. van den Bent, M. Preusser, E. Le Rhun, J. C. Tonn, G. Minniti, M. Bendszus, C. Balana, O. Chinot, L. Dirven, P. French, M. E. Hegi, A. S. Jakola, M. Platten, P. Roth, R. Ruda, S. Short, M. Smits, M. J. B. Taphoorn, A. von Deimling, M. Westphal, R. Soffietti, G. Reifenberger and W. Wick (2021). "EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood." Nat Rev Clin Oncol **18**(3): 170-186.

Wijmans, L., P. I. Bonta, R. Rocha-Pinto, D. M. de Bruin, P. Brinkman, R. E. Jonkers, J. Roelofs, V. Poletti, J. Hetzel and J. T. Annema (2019). "Confocal Laser Endomicroscopy as a Guidance Tool for Transbronchial Lung Cryobiopsies in Interstitial Lung Disorder." Respiration **97**(3): 259-263.

Zong, H., R. G. Verhaak and P. Canoll (2012). "The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements." Expert Rev Mol Diagn **12**(4): 383-394.