

Aus der Neurochirurgischen Klinik,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med Joachim Oertel

# **Konfokale Laserendomikroskopie in der Neurochirurgie**

## **Erste Erfahrungen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2018

vorgelegt von: David Pierre Henri Breuskin  
geb. am: 04.03.1984 in Esch / Alzette, Luxemburg

Gewidmet....

der Familie,  
Freunden  
und Wegbegleiter

## Abkürzungsverzeichnis

CLE	confocal laserendomicroscopy Konfokale Laserendomikroskopie
WHO	World Health Organization Weltgesundheitsorganisation
MB	Methylenblau
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
GBM	Glioblastom
ICG	Indocyanin Grün
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
SS	Schnellschnitt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2. Einführung</b> .....	3
1. Technische Fortschritte der modernen Neurochirurgie.....	3
2. Aktueller Stand der neuroonkologischen Chirurgie.....	4
3. Konfokale Laserendomikroskopie.....	5
2.3.1. Anwendung von Methylblau.....	7
4. Untersuchte Tumorentitäten.....	8
2.4.1. Astrozytome.....	8
2.4.2. Glioblastome.....	8
2.4.3. Meningeome.....	8
2.4.4. Schwannome.....	9
2.4.5. Oligodendrogliome.....	9
5. Vergleich zur Schnellschnittdiagnostik.....	9
<b>3. Material und Methoden</b> .....	10
3.1. Allgemeines Studiendesign.....	10
3.2. Konfokales Laserendomikroskop.....	10
3.3. Gewebeuntersuchung.....	12
3.3.1. Schweinegehirn.....	12
3.3.2. Untersuchung von humanen Gewebeproben.....	14
3.3.3. Untersuchung von Zellkulturen.....	15
3.4. Vergleich mit dem neuropathologischen Schnellschnitt.....	17
<b>4. Resultate und Ergebnisse</b> .....	18
4.1. Zellkulturen.....	19
4.2. Humane Gewebeproben.....	19
4.2.1. Astrozytom.....	19
4.2.3. Glioblastom.....	20
4.2.4. Meningeom.....	21
4.2.5. Schwannom.....	23
4.2.6. Metastase.....	24
4.2.7. Seltene Entitäten.....	25
4.2.7.1. Oligodendrogliom.....	26

4.2.7.2. Parangliom.....	26
4.2.7.3. Lymphom.....	27
4.3. Vergleich zur Histologie.....	28
4.3.1. Astrozytom.....	28
4.3.2. Glioblastom .....	29
4.3.3. Meningeom.....	29
4.3.4. Schwannom.....	32
4.3.5. Metastasen.....	33
4.3.6. Oligodendrogliom.....	33
4.3.7. Lymphom.....	34
4.4. Vergleich zur Schnellschnittuntersuchung.....	35
4.4.1. High grade Gliom.....	35
4.4.2. Low grade Gliom.....	35
4.4.3. Meningeom.....	35
4.4.4. Schwannom.....	36
4.4.5. Metastase.....	36
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>37</b>
<b>6. Ausblicke.....</b>	<b>44</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>45</b>
<b>8. Publikationen.....</b>	<b>53</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>54</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>55</b>

# 1. Zusammenfassung

Die Behandlung hirneigener Tumore ist ein wesentlicher Behandlungspfeiler der Neurochirurgie. Hierbei gilt es den Patienten so zu behandeln, dass ein maximaler therapeutischer Erfolg mit geringst möglichem operativen Schaden einhergeht. Technische Entwicklungen im Laufe der vergangenen Jahrzehnte haben die Qualität der neurochirurgisch-operativen Therapie stetig vorangebracht, sodass mit minimalinvasiven Techniken eine möglichst hohe Radikalität erbracht werden kann. Aktuell muss das resezierte Gewebe histopathologisch untersucht werden, um eine diagnostische Sicherheit zur Ätiologie des Gewebes zu erlangen. Die konfokale Laserendomikroskopie ermöglicht die Untersuchung von Gewebe auf zellulärer Ebene in situ, was sie bereits zu einer viel versprechenden Untersuchungstechnik in der Gastroenterologie oder Pneumologie gemacht hat. Diese Arbeit hat zum Ziel, diese Technik in der Neurochirurgie zu untersuchen und zu etablieren. Wäre es möglich, das Gewebe bereits in situ auf seine Dignität zu untersuchen, so könne man die operative Qualität und Patientensicherheit erhöhen, da das Gewebe nicht erst reseziert werden müsste um diese Aussagen zu treffen, sondern nur gesichert pathologisches Gewebe entfernt werden könnte.

In dieser Arbeit bedient sich der Autor des EndoMag1 der Karl-Storz GmbH, einem rigiden Endoskop mit einem Hopkins-Stablinsensystem. Mit Hilfe diesen Endoskops wurden zunächst das Gehirn eines frisch geschlachteten Schweines, sowie 83 humaner Tumorproben verschiedener Ätiologien untersucht. Das dargestellt Bildmaterial wurde auf seine Morphologie untersucht und mit der Zusammenarbeit eines Neuropathologen verschiedene Kriterien der Befundung etabliert, sodass eine diagnostische Grundlage geschaffen wurde, nach der im Anschluss 100 humane Proben im Vergleich zum Schnellschnitt untersucht werden konnten. Hierbei konnte die richtige Diagnose mit einer hohen respektiven Sensitivität und Spezifität bei high grade Gliomen (0,81/0,85), low grade Gliomen (0,9/0,93) Schwannomen (0,87/1) und Meningeomen (0,82/0,95) erzielt werden. Metastasen konnten hingegen nur mit einer geringen Sensitivität und Spezifität von 0,07 respektive 0,94 diagnostiziert werden.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass die konfokale Laserendomikroskopie eine vielversprechende Technik darstellt, welche unterstützend die neurochirurgisch-operative Behandlung weiterentwickelt, jedoch noch einen langen Weg der Entwicklung vor sich hat.

## Summary

Surgical treatment of brain tumours is one of the main pillars in neurosurgery. Whilst therapeutic success is a main goal, maximum reduction of surgery related neurological deficits must be a key achievement. Technical evolutions have improved the quality of neurosurgical procedures in a way that they have become ever more minimally invasive while maximizing surgical radicality. Until today, brain tissue needs to be resected first in order to undergo pathological investigation, allowing for a diagnostic certainty of its origin. Confocal laserendomicroscopy however, allows for tissue investigation on a cellular level, already making it a reliable diagnostic tool in gastroenterology as well as pneumology. This study aims at investigating its use in neurosurgery and its potential as a new diagnostic tool in this field. Achieving a histological investigation of the tissue on site would allow for further patient safety and higher surgical quality, since the tissue would be diagnosed as pathological before its resection.

In this study, the author used the EndoMag1 der Karl-Storz GmbH, a rigid Hopkins-rod-lens endoscope. First, the system was used on a fresh pig specimen and 83 human tissue samples. The collected image material was analysed in respect of the morphologic features of the tissue samples, leading to the establishment of different criteria of evaluation that were chosen with the help a neuropathologist. These were then applied to 100 new samples whose diagnostic results were compared to their respective instantaneous section results. This led to our results with high sensitivity and specificity for high grade gliomas (0,81/0,85), low grade gliomas (0,9/0,93) schwannomas (0,87/1) and meningeomas (0,82/0,95). Our results for metastasis however showed only low sensitivity and specificity with results of 0,07 and 0,94 respectively.

In conclusion, the author was able to show that confocal laserendomicroscopy is a promising tool in neurosurgery, that however needs further technical evolution.

## 2. Einführung

### 2.1. Technische Fortschritte der modernen Neurochirurgie

Der Beginn der modernen Neurochirurgie, wie wir sie heute kennen, lässt sich zurück auf das Jahr 1900 datieren als Harvey Cushing seine chirurgische Ausbildung beendete. In den folgenden Jahren etablierte er zunehmend die Charakteristika des Faches, welche bis heute die Neurochirurgische Tätigkeit prägen. Über die Jahre sorgten weitere Pioniere des Faches dafür, dass zunehmend aufwändige und risikobehaftete Eingriffe durchführbar wurden.

Ein ganz wesentliches Gebiet der Neurochirurgie beinhaltet die operative Resektion von Hirntumoren. Die „erste“ Resektion eines hirneigenen Tumors erfolgte 1884 durch Rickman J. Godlee am Hospital for Epilepsy and Paralysis, Regents Park, London, England<sup>1</sup>. Der Patient starb am 28. postoperativen Tag an einer Meningitis, jedoch zeigte die Autopsie eine komplette Entfernung des Tumors. Im weiteren Verlauf ermöglichten es bahnbrechende technische Fortschritte diese Operationen mit zunehmender Präzision und Sicherheit für den Patienten durchzuführen.

Vor allem das Bestreben der Neurochirurgen den operativen Eingriff so sicher und schonend wie möglich für den Patienten zu gestalten, führte zu wesentlichen technischen Weiterentwicklungen und zunehmender Verbreitung minimal-invasiver Techniken. Auch heute noch gilt die Endoskopie als Synonym für minimal invasive Eingriffe. Diese Technik hielt in fast allen invasiv-diagnostischen wie auch operativen Bereichen der Medizin Einzug und gilt heutzutage bei vielen Indikationen als Goldstandard.

Die Ursprünge der Endoskopie sind in das 19. Jahrhundert zurückzudatieren, als Maximilian Nitze ein Endoskop entwickelte, welches zur Zystoskopie in der Urologie benutzt wurde<sup>3, 4, 5, 6, 7</sup>.

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde diese weiter entwickelte Technologie hauptsächlich in der Urologie, Gynäkologie und abdominalen Chirurgie benutzt, bis 1910 der Urologe L'Espinasse und der Neurochirurg Buckner Kanavel einen endoskopischen Eingriff zur Behandlung des Hydrocephalus durchführten<sup>8</sup>. In den darauffolgenden Jahren sammelten Pioniere der Neurochirurgie, unter anderem Walter Edward Dandy ihrerseits ebenfalls Erfahrungen auf dem Gebiet der Neurochirurgie<sup>9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17</sup>. Aufgrund der jedoch zu diesem Zeitpunkt noch fehlenden technischen Qualität der Instrumente konnte sich die Technologie nie vollends durchsetzen. Dies sollte sich ändern als Harold Horaz Hopkins, damals Professor der Physik an der University of Reading, Großbritannien, Anfang der 50er auf einen Arzt traf, welcher die



Einsatzmöglichkeit der kommerziell erwerbbaeren Endoskope bemängelte<sup>18, 19, 20</sup>. Hopkins veröffentlichte den Prototypen seines Endoskops in 1954 im Journal *Nature*<sup>20</sup>. Allerdings fand diese Idee wenig Anklang und es sollte bis 1961 dauern, bis Hopkins ein rigides Endoskop mit 80fach verbesserter Lichttransmission entwickelte, indem er eine Stablinse benutzte<sup>20</sup>. 1964 stellte Hopkins seine Erfindung in Düsseldorf vor, welche auf Interesse von Karl Storz, dem Gründer der Firma Karl-Storz GmbH, Tuttlingen, traf. Die hieraus resultierende Kooperation führte 1967 zur Serienproduktion des Endoskops.

## **2.2. Aktueller Stand der neuroonkologischen Chirurgie**

Die Behandlung von Hirntumoren macht einen ganz wesentlichen Teil der Neurochirurgischen Tätigkeit aus. Jährlich erkranken 5-6/100000 Menschen pro Jahr an einem Gliom, 6-8/100000 pro Jahr an einem Meningeom und ungefähr 8/100000 pro Jahr an intrakraniellen Metastasen von Tumoren anderer Organsysteme. Insbesondere im Falle von hirneigenen Gliomen korreliert die Überlebenszeit mit dem Grad der Differenzierung des Tumors. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) teilt diese Art der Tumore in 4 Grade ein. Zwar sind Gliome niedrigen Grades, sprich WHO I-II, weniger aggressiv wachsend als Tumore Grad III-IV, jedoch ist bekannt, dass viele Tumore niedrigen Grades im Laufe des Lebens in einen Tumor höheren Grades entdifferenzieren können und somit eine deutlich schnellere und aggressivere Wachstumstendenz erlangen.

Die Therapie hirneigener Tumore stützt sich aktuell auf drei wesentliche Behandlungspfeiler, die operative Therapie sowie die postoperative Chemotherapie und/oder Strahlentherapie. Allerdings beträgt auch nach heutigen Standards die mittlere Überlebensdauer mit Ausschöpfung von operativer Resektion und postoperativer Radio-Chemotherapie beim Glioblastom lediglich 14,6 Monate<sup>22</sup>. Ganz wesentlich ist bei diesem Behandlungskonzept das Ausmaß der operativen Resektion. Die verabreichte Dosis bei Strahlentherapie und Chemotherapie lässt aufgrund ihrer Toxizität wenig Behandlungsspielraum. In weiteren Studien hat sich gezeigt, dass die Überlebenszeit positiv mit dem Ausmaß der chirurgischen Resektion korreliert<sup>22, 23, 24, 25, 26</sup>. Besonders bei Gliomen ist es schwierig eine klare Tumorgrenze auszumachen, sodass sich der Neurochirurg häufig vor der Entscheidung findet, das Resektionsareal mit erhöhtem Risiko eines neurologischen Defizits zu erweitern.

Eine Möglichkeit der intraoperativen Resektionskontrolle ist die direkte histopathologische Begutachtung im Rahmen eines Schnellschnittes. Hier werden Gewebeproben aus Randzonen des Tumors direkt aufgearbeitet und können somit zeitnahe Aufschlüsse auf ein

Tumorfiltrat geben. Allerdings verbietet es sich bei vielen Neurochirurgischen Eingriffen mit einem deutlichen Sicherheitsrand zu reseziieren. Zudem zeigen sich aufgrund der mechanischen Manipulation anlässlich der Resektion häufig Fehlinterpretationen bei der histopathologischen Begutachtung, welche zwischen 4,4 und 5,1% liegen<sup>32, 33</sup>.

Stummer et al. entwickelten schließlich eine Technik, welche erstmals intraoperativ eine zuverlässige Tumoranfärbung ermöglichte<sup>27, 28, 29, 30, 31</sup>. Fünf-Amino-Lävulinsäure (5-ALA) ist der erste Baustein in der Porphyrinsynthese. 5-ALA akkumuliert in Zellen mit hohem Metabolismus. Verabreicht man es Patienten mit einem high grade Gliom, so reichert es vermehrt in diesen Zellen an. Wird das Operationsgebiet mit einem blauen Lichtfilter, welcher im Operationsmikroskop integriert ist, angestrahlt, emittieren die 5-ALA anreichernden Zellen rosa fluoreszierendes Licht. Die Anwendung dieser Technik führt intraoperativ zu einer erhöhten Resektionsradikalität, die in einer verlängerten Überlebenszeit der Patienten resultiert<sup>30</sup>.

### **2.3. Konfokale Laserendomikroskopie**

Jegliche Fortschritte im Gebiet der intraoperativen Visualisierung von Tumoren, die hier bislang beschrieben wurden, haben jedoch eine gemeinsame Einschränkung. Das Gewebe lässt sich hiermit nicht mit Sicherheit auf pathologisch veränderte Zellen in situ untersuchen. Schlussendlich ist es immer noch die histopathologische Aufarbeitung des resezierten Gewebes, die die endgültige Diagnose der zugrunde liegenden Pathologien ergibt. Allerdings beinhaltet diese histologische Aufarbeitung eine zuvor erfolgte Resektion von Gewebe. Eine direkte intraoperative Resektionskontrolle in situ ist gegenwärtig nicht möglich. Allerdings würde diese, wenn zuverlässig erreichbar, sowohl die chirurgische Radikalität erhöhen, als auch das Risiko der „Überresektion“ von nicht infiltriertem Gewebe, mit gegebenenfalls nachfolgenden neurologischen Defiziten minimieren. Das Grundbestreben erschließt sich also aus der Überlegung, Gewebe vor seiner Entfernung aus dem Situs bereits auf histopathologischer Ebene zu begutachten, und somit erst zu entfernen, wenn es sich als verändert darstellt.

Eine Technik, welche das Potential besitzt die geforderte Qualität zu erfüllen ist die konfokale Laserendomikroskopie (confocal laserendomicroscopy, CLE). 1957 wurde die Technik erstmalig patentiert. Mit dieser ist es möglich Gewebe auf mikroskopischer Ebene zu untersuchen. Bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie wird das zu untersuchende Gewebe im Verhältnis weitflächig beleuchtet. Bei der CLE jedoch wird zunächst ein Strahl

einer Laserquelle ausgestrahlt, welcher die zugrunde liegende Probe beleuchtet. Das hiervon emittierte Licht wird dann durch eine zwischengeschaltete Fokusöffnung, „pinhole“, reflektiert. Hierdurch wird Streulicht reduziert und das vom Gewebe reflektierte Licht erzeugt klare, scharfe Bilder, welche anschließend von einer Kamera registriert werden. Somit ermöglicht die konfokale Laserendomikroskopie die feingewebliche Untersuchung auf mikroskopischer Ebene, und besonders wertvoll, in Echtzeit.

Erste Veröffentlichungen zu diesem Thema liegen mittlerweile über 10 Jahre zurück. Zheng et al. applizierten 5-ALA auf die Zunge von Patienten mit Zungenkarzinomen und verglichen diese Areale mit der Oberfläche von Zungen gesunder Probanden und beschrieben hiermit die Möglichkeit etwaige morphologische Gewebeveränderungen gut darstellen zu können<sup>34</sup>. Kieslich et al. wendeten die konfokale Laserendomikroskopie erstmalig im Gastrointestinaltrakt an. Sie beschrieben die Möglichkeiten des Helicobacter pylori Nachweises sowie verschiedene Aspekte und Diagnostikmöglichkeiten in der Gastroenterologie<sup>35, 36</sup>.

Auf diesen ersten Versuchen aufbauend folgten weitere Arbeiten, die zum Ziel hatten, diese Technologie in anderen medizinischen Fächern zu etablieren, allen voran nebst der Gastroenterologie, die Pulmonologie<sup>37, 38, 39, 40, 41, 42</sup>.

Insbesondere zeigte sich die Möglichkeit, ein flexibles Endoskop mit der konfokalen Technologie zu kombinieren von Vorteil und es gelang hiermit, eine hohe Korrelation zwischen der histopathologischen Befundung und den konfokalen laserendomikroskopischen Ergebnissen nachzuweisen<sup>43, 44</sup>.

Wenn man sich also die Vorteile der konfokalen Laserendomikroskopie vor Augen hält, nämlich dass es dem Untersucher die Möglichkeit bietet in situ Gewebe zu untersuchen, ohne dass es reseziert werden muss, ist es klar dass es nur eine Frage der Zeit war bis erste Erprobungen in der Neurochirurgie erfolgten.

Erste Ergebnisse über die Anwendung eines konfokalen Laserendomikroskopes am Mäusemodell veröffentlichten Sankar et al. 2010<sup>45</sup>. An einem Glioblastom Xenograft-Mausmodell konnten die Wissenschaftler nachweisen, dass nach Injektion von Fluorescein und topischen Acriflavin nicht nur normale Graue und Weiße Substanz unterschieden werden können, sondern ebenfalls die Grenze zwischen gesundem und tumorös verändertem Gewebe dargestellt werden kann.

Ähnlich diesem Experiment folgten weitere Versuche mittels Indozyanin Grün (ICG)<sup>46, 47</sup>. Auch hiermit konnten am Tiermodell eine Verbesserung der Darstellung von Transitionszonen des Tumors, der Grenzen zwischen erkranktem und gesundem Gewebe, Pleomorphismus der Zellkerne und Hyperzellularität erreicht werden.

Neben diesen Tiermodellen erfolgten aber auch bereits 2010 erste Untersuchungen an menschlichen Proben. Schlosser et. al. untersuchten ex vivo Gewebeproben von Glioblastomen mittels einem „Neurolasermikroskop“ und konnten hier Charakteristika wie zum Beispiel Zelldichte, Pleomorphismus und Nekrosen darstellen<sup>45</sup>. Hierfür benutzen sie Acriflavin Hydrochlorid als topischen Farbstoff.

Allen Modellen liegt jedoch das Bestreben zugrunde die Technik intraoperativ einzusetzen. Sanai et al. veröffentlichten 2011 erste Ergebnisse eines tragbaren Systems, welches in situ angewendet werden kann. In dieser Serie wurden verschiedene Tumorentitäten von 33 Patienten untersucht, denen intraoperativ Fluorescein verabreicht wurde<sup>49</sup>. Die mittels konfokaler Laserendomikroskopie akquirierten Bilder zeigten auch hier viele der Gewebetypischen Aspekte und bestätigten den möglichen Einsatz in der Neurochirurgie. Bestätigt wurden diese Resultate von einer angeschlossenen prospektiven Studie von Eschenbacher et al. deren Aufbau der vorangegangenen gleich war<sup>50</sup>. Jedoch sind hier die konfiokalen Bilder von zwei Neuropathologen verblindet ausgewertet worden und resultierten in einer hohen Übereinstimmung mit den herkömmlichen Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten.

Aktuell werden diverse konfokale Laserendomikroskope angeboten, allesamt mit verschiedenen Eigenschaften. Diese Studie hat zum Ziel, die Anwendung dieses konkreten Gerätes zu etablieren und den Möglichen Nutzen zur feingeweblichen Untersuchung von reseziertem Tumorgewebe zu evaluieren.

### **2.3.1. Anwendung von Methylenblau**

Methylenblau ist ein Vital-Farbstoff und wurde 1885 erstmals von Paul Ehrlich zur Gewebefärbung eingesetzt und hat sich seitdem zur Färbung der grauen Substanz bewährt. Es färbt Zellkerne blau und kann als in vivo Farbstoff benutzt werden. Diese Vorteile haben Methylenblau zu einem in der Gastroenterologisch-endoskopischen Diagnostik häufig angewendeten Farbstoff gemacht. In vorliegenden Versuchsaufbau wurde überprüft, ob eine

Färbung mittels Metyhlenblau neue Aspekte bei der konfokal endomikroskopischen Untersuchung liefern würde.

## **2.4. Untersuchte Tumorentitäten**

### **2.4.1 Astrozytome**

Bei Astrozytomen handelt es sich um gliale Tumore astrozytären Ursprunges. Die Einteilung erfolgt derzeit nach WHO in Grad I-III, wobei man bei Grad I-II von niedriggradigen Gliomen und bei Grad III von hochgradigen Gliomen spricht. Niedriggradige Gliome treten mit einer Inzidenz von 0,9/100000 Einwohnern auf und sind primär nicht als maligne anzusehen. Histopathologisch lassen sich diese Tumore weiterhin in 3 Subtypen, das protoplasmatische Astrozytom, das fibrilläre Astrozytom und das gemistozytäre Astrozytom unterteilen, wobei erstere beiden häufig nicht mehr unterschieden werden.

Hiervon ist das fibrilläre Astrozytom das häufigste vorkommende und ist charakterisiert durch ein sich durchspannendes Netz an glialen Fasern.

### **2.4.2. Glioblastom**

Niedriggradige Astrozytome werden im Laufe der Jahre weiter entdifferenzieren und zu einem höhergradigen Gliom, sprich WHO III oder IV degenerieren, wobei hier Grad IV dem Glioblastom entspricht. Das Glioblastom ist ein Tumor welcher sich durch eine hohe Zelldichte glialer Zellen charakterisiert. Es wird entweder als primäres Glioblastom bei Erstdiagnose diagnostiziert oder entwickelt sich aus einem niedriggradigeren Gliom und wird somit sekundäres Glioblastom genannt.

### **2.4.3. Meningeom**

Anders als die zuvor erwähnten glialen Tumore entspringen die Meningeome von arachnoidalen Zellen und werden in WHO Grad I-III eingeteilt. Diese Tumorentität zeigt meist keine Zeichen der Malignität, wächst langsam und meist nur verdrängend. Sie machen ungefähr 20% aller Hirntumore aus und nur in knappen 2% zeigen sie sich weiter entdifferenziert zu Grad II-III. Ist dies der Fall, zeigt sich jedoch eine hohe Rezidivrate. Histopathologisch bestehen hier verschiedene Typen, nämlich meningeotheliomatöse,

fibromatöse, sekretorische, mikrozytische, psammomatöse, transitionale, und angiomatöse Meningeome, welche insgesamt zu den WHO-Grad I Tumoren gezählt werden

#### **2.4.4. Schwannom**

Schwannome, oder synonym zu gebrauchen Neurinome entstehen aus den Hüll- und Stützzellen von Nerven und sind gutartige Nervenscheidentumore. Sie könne sowohl intra- als auch extrakraniell vorkommen und werden durch ihre raumfordernde Wirkung und die damit verbundenen entstehenden Schmerzen oder Funktionsverluste bemerkbar.

#### **2.4.5. Oligodendrogliom**

Das Oligodendrogliom ist ein Tumor aus der Reihe der diffusen Gliomen und wird nach WHO in Grad II, sowie das anaplastische Oligodendrogliom WHO Grad III eingeteilt. Histopathologisch ist es gekennzeichnet durch eine hohe Zelldichte mit kleineren runden Kernen. Im Falle von Grad III Oligodendrogliomen können diese stärker in Größe und Form variieren und zeigen histopathologische Ähnlichkeiten zum Glioblastom.

### **2.5. Vergleich zur Schnellschnittdiagnostik**

Obwohl der endgültige histopathologische Befund die definitive Diagnose festlegt, so ist für den Chirurgen die intraoperative Beurteilung von eminenter Bedeutung. Sie gibt dem Chirurgen zum einen ein Feedback ob das pathologische Gewebe erfasst wurde und lässt ihn während der OP weitere therapeutische Entscheidungen nehmen. Wichtig für den Neurochirurgen ist dies insbesondere, wenn sich bei intrazerebralen Raumforderungen die Frage stellt, ob die „Komplettresektion“ erstrebt werden soll, wie im Beispiel von hochgradigen, oder noch mehr im Falle von niedriggradigen Gliomen, oder ob die weitere Therapie medikamentös erfolgen soll, wie zum Beispiel bei Lymphomen. Allerdings bedarf die Schnellschnittdiagnostik stets zunächst die Resektion des Gewebes. In der Tumormasse selbst ist dies von geringerer Bedeutung, jedoch hemmt es den Neurochirurgen Proben aus dem Randbereich zu entnehmen um eine eventuelle Infiltration nachzuweisen. Dieser Schritt könnte funktionelles Gewebe verletzen und zu neurologischen Defiziten führen. Hier käme der Vorteil der konfokalen Laserendomikroskopie zu tragen, indem dieses Gewebe gescannt werden könnte bevor es reseziert wird.

Nachdem wir in einem ersten Schritt die Beurteilungskriterien etabliert haben, wendeten wir in einem zweiten Schritt diese Kenntnisse an, um in einer verblindeten Serie die Ergebnisse der Schnellschnittdiagnostik mit denen der konfokalen Laserendomikroskopie direkt zu vergleichen. Mit diesem Schritt soll evaluiert werden, mit welcher Verlässlichkeit eine Diagnose vom Neurochirurgen mittels CLE gestellt werden kann, um den intraoperativen Nutzen der konfokalen Laserendomikroskopie zu bekräftigen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Allgemeines Studiendesign**

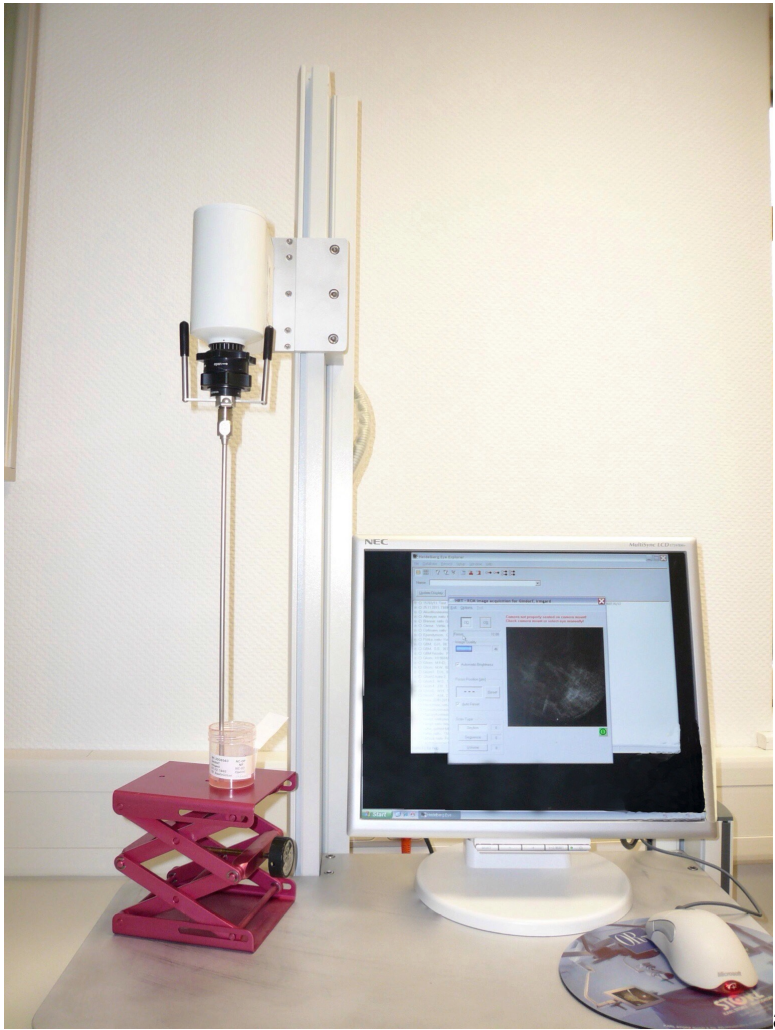
Im Zeitraum von 2011 bis 2013 wurden 83 Gewebeproben von 83 Patienten, welche in der Neurochirurgischen Klinik der Universitätskliniken des Saarlandes einer Hirntumoroperation unterzogen wurden, mittels konfokaler Laserendomikroskopie untersucht. Zu diesen Patienten wurden zudem Zellkulturen angezüchtet, welche ebenfalls mit entsprechender Technik untersucht wurden. Vorab erfolgte die Untersuchung am Schweinehirn, um einen ersten Anhalt für die bildmorphologischen Aspekte normalen Hirngewebes zu erlangen.

Die generierten Bilder wurden abgespeichert und anschließend mit histopathologischen Schnitten verglichen.

#### **3.2. Konfokales Laserendomikroskop**

Das konfokale Laserendomikroskop EndoMag1 der Karl-Storz GmbH, Tuttlingen, Deutschland besteht aus einem rigiden Endoskop mit einem Hopkins-Stablinsensystem, welches fest angebaut und mit einem Rechner verbunden ist. Der Außendurchmesser beträgt 5 mm und die Gesamtlänge des Endoskops 323mm. Das erzeugte Gesichtsfeld beträgt 300x300µm und die maximal erreichbare Auflösung 2µm. Die Wellenlänge des applizierten Laserstrahls befindet sich im roten Spektrum. Die maximale Scantiefe, welche mit diesem Gerät erreicht werden kann, liegt bei 80µm und ermöglicht somit je nach zugrunde liegendem Gewebe eine 3-dimensionelle Untersuchung des Gewebes. Die Bildwiederholungsrate beträgt fast 40 Bilder pro Sekunde und ermöglicht somit eine Untersuchung in Echtzeit. Aufgrund des Aufbaus des Gerätes ist derzeit eine Anwendung am OP-Tisch nicht möglich.





a



b



c

Abb. 1 a-c: konfokales Laserendomikroskop EndoMAG1.

### **3.3. Gewebeuntersuchung**

#### **3.3.1 Schweinegehirn**

In einem ersten Schritt wurde Hirngewebe von einem frisch geschlachteten Schwein untersucht. Im Fokus standen hier als relevante Strukturen weiße sowie graue Substanz des Gehirnes, Arachnoidea und Ventrikelwand. Diese Untersuchungen ließen uns erste morphologische Aspekte des Gewebes darstellen und sollten zu späterem Zeitpunkt mit den humanen Proben verglichen werden. Abbildung 2a zeigt ein Bild der grauen Substanz. Hervorzuheben sind hier insbesondere die Zellkerne (\*) sowie die das Gesamtbild durchziehenden fibrilären Verästelungen (➔), welche axonalen Verbindungen gleichzustellen sind. In Abbildung 2b, der weißen Substanz entsprechend, zeigt sich die zu erwartende geringe Zellkerndichte. Abbildung 2c zeigt die faserigen Züge der Arachnoidea.

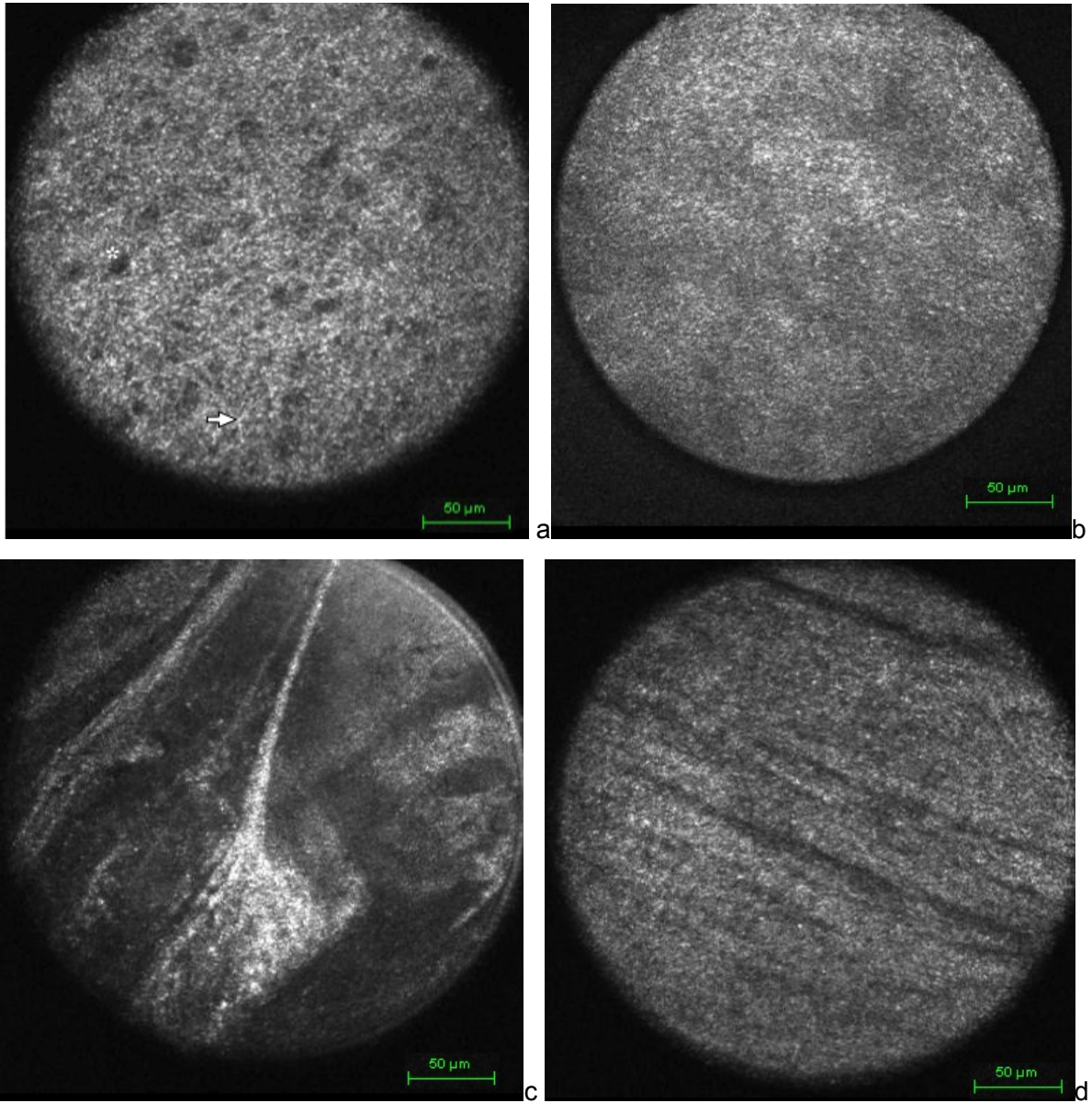


Abb. 2: a: Graue Substanz des Schweines. b: Weiße Substanz des Schweines. c: Arachnoidea des Schweines. d: Ventrikelwand des Schweines.

### 3.3.2. Untersuchung von humanen Gewebeproben

In einem zweiten Schritt wurden Operationsproben untersucht, welche für die histopathologische Auswertung bestimmt waren. Insgesamt untersuchten wir 83 Tumorproben verschiedener Ätiologie, wie sie in Tabelle 1 dargestellt sind.

Glioblastom	25	Kavernom	2
Meningeom	23	Oligodendrogliom	1
Hypophysenadenom	4	Lymphom	2
Metastase	7	Plexuspapillom	1
Paragangliom	1	Neurinom	1
Ependymom	2	ICH	1
Astrozytom	2	Hemangioblastom	1
AVM	1	Astroblastom	1
Gliosarkom	1	Schwannom	5
Kolloid-Zyste	1		
Neuroblastom	1		
Total	83		

Tabelle 1: Untersuchte Pathologien.

In Zusammenarbeit mit dem Neuropathologen wurde ausgearbeitet, welche histomorphologischen Aspekte sowohl beim histologischen Schnitt als auch in unserer Arbeit von Relevanz zur Beurteilung von Gewebe sind. Wir etablierten eine Reihe verschiedener Merkmale auf welche im Folgenden die unterschiedlichen Gewebeproben untersucht wurden. Diese bezogen sich unter anderem auf die Kernmorphologie, das Zytoplasma, das Interstitium, Wachstumsmuster und weitere Besonderheiten der jeweiligen Tumorentität (Tabelle 2). Diese wurden tabellarisch erfasst und für die jeweiligen Tumorentitäten statistisch bewertet.

Nukleus	rund, rund-oval, länglich, Größenvariabilität, polymorph, Präsenz eines Nukleolus
Zytoplasma	Vorhandensein, schmal, breit, scharf begrenzt
Interstitium	diffus, fibröse Bündel, homogen, fibrillär (z.B. gliale Fasern)
Präsenz von Psammom-Körperchen	ja/nein
Diffuses Wachstumsverhalten	ja/nein
Blutgefäße	ja/nein
Zell-Dichte	ja/nein

Tabelle 2: Kriterien zur Evaluation.

Nach erfolgter Gewebeentnahme wurde ein kleiner Teil des Tumorgewebes unter dem konfokalen Endoskop untersucht und anschließend der histopathologischen Untersuchung zugeführt. Die Proben wurden, nachdem sie entnommen wurden, in einem Plastikbehälter an den Arbeitsplatz gebracht. Die Visualisierung erfolgte zunächst im nativen Zustand mit lediglich einer Benetzung mit NaCl zur besseren Kontaktherstellung zwischen Linse und Gewebe. Durch leichten Druckkontakt auf den Tumor wurde die Oberfläche gescannt und mindestens 10 Bilder unterschiedlicher Lokalisierungen gespeichert.

Nach diesem ersten Durchgang wurde das Gewebe mit Methylenblau (MB) benetzt und nach 20-minütiger Einwirkzeit analog zum ersten Durchgang untersucht.

Die Proben wurden im Plastikbehälter mittels Hebebühne an das Endoskop geführt und zur Untersuchung in die Fokusebene gebracht. Nach der Auswertung wurden die Proben wieder zur histopathologischen Untersuchung weitergegeben.

### 3.3.3. Untersuchung von Zellkulturen

Zusätzlich zu den resezierten Gewebeproben wurden Untersuchungen von primären Zellkulturen der jeweiligen Tumore durchgeführt. Zellen der routinemäßig in unserem Forschungslabor angelegten Tumor-Zellkulturen wurden abgebrochen und zunächst in ein steriles Rundröhrchen überführt. Zwei Milliliter Trypsin wurden pro Zellkulturflasche dazugeben und unter optischer Kontrolle unter dem Mikroskop wurde überprüft, ob alle Zellen sich ablösen. Zwei Milliliter Medium wurden pro Zellkulturflasche hinzugegeben und geschwenkt. Der Überstand wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und bei

1200U/min 5 Minuten zentrifugiert. Zwei Milliliter Medium (Biochrome) wurden vorgegeben und schließlich die Zellen mit Pasteur vorsichtig zugegeben und gemischt. Nach zwei Tagen konnten die angewachsenen Zellen in der Petrischale mittels konfokalem Laserendomikroskop untersucht werden. Analog der Gewebeprobeuntersuchung wurden auch hiervon Bilder zur Analyse abgespeichert.

### **3.4. Vergleich mit dem neuropathologischen Schnellschnitt**

In einer zweiten Serie untersuchten wir 100 konsekutive Proben um sie mit den Resultaten des histopathologischen Schnellschnittes zu vergleichen. Hierzu wurden die Proben, bevor sie der histopathologischen Diagnostik zugeführt wurden, mittels CLE in ihrem nativen Zustand untersucht. Zur besseren Visualisierung unter dem Endoskop wurden die Proben lediglich mit wenigen Tropfen isotonischer Kochsalzlösung beträufelt. Unter Anwendung der in der ersten Serie gewonnenen Erkenntnisse und Beurteilungskriterien, wurde eine Diagnose gestellt, welche zu späterem Zeitpunkt mit den Daten des histopathologischen Schnellschnittes und des endgültigen histopathologischen Befundes verglichen wurden. Der Untersucher bekam keine Informationen zur Probe und musste die Diagnose alleine auf Basis der Kriterien stellen.

## 4. Resultate und Ergebnisse

### 4.1. Zellkulturen

Der Nutzen der Zellkultur-Untersuchung fand sich insbesondere in der Größenabschätzung der verschiedenen Zellelemente. Da es sich meist um einen zellulären Monolayer in der Petrischale handelt, war eine dreidimensionale Nachbildung des Tumors nicht möglich. Allerdings zeigte sich, dass die grundsätzliche Zellanordnung bei verschiedenen Zellkulturen unterschiedlich ist.

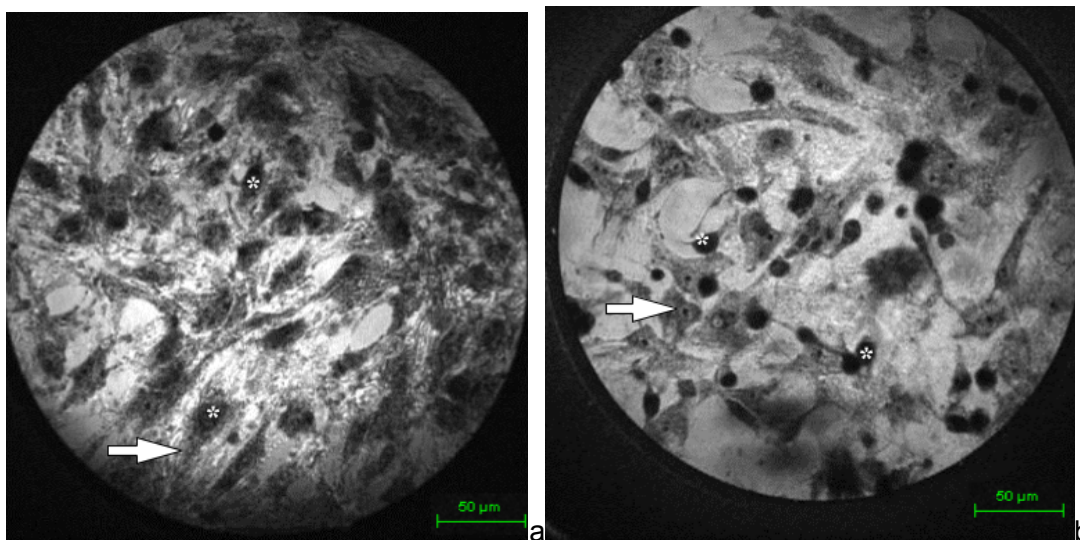


Abb. 3: a: Meningeom Zellkultur. b: Glioblastom Zellkultur.

Gut zu erkennen sind auf den Abbildungen 3 die Unterschiede in der Kernmorphologie (\*) sowie des Zytoplasmas (→) der beiden unterschiedlichen Tumorarten.

## 4.2. Humane Gewebeproben

### 4.2.1. Astrozytom

Das fibriläre Astrozytom ist durch ein gliales Fasernetz charakterisiert. Bei der Evaluation der Gewebeproben unter Anwendung der zuvor festgelegten Kriterien ist diese Eigenschaft in gut darstellbar gewesen.

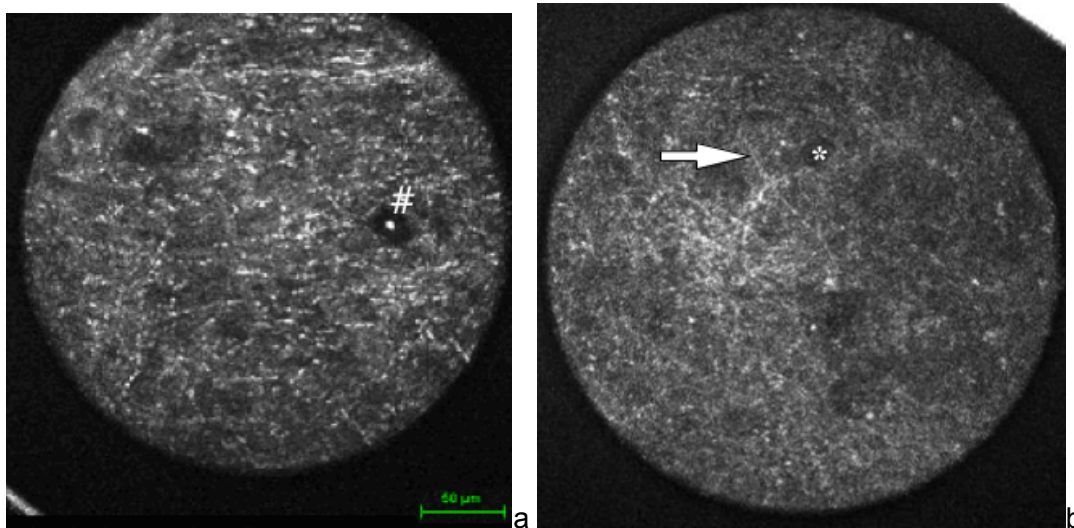


Abb. 4 a+b: Astrozytom.

In Abbildung 4 zeigt sich von der grauen Grundstruktur absetzen glialen Fasern (→) mit dazwischen befindlichen rund-ovalen bis länglichen Zellkernen, die dunkel imponierende Struktur mit hellen Zentren kann auf selten vorkommende Kalkeinlagerungen (#) hinweisen und sind nicht unüblich für niedriggradige Gliome. Diese gliale Fasergrundstruktur schien insbesondere ein Merkmal darzustellen, welches mit zunehmender Entdifferenzierung verloren geht, sodass hier eine Unterscheidung zum hochgradigen Astrozytom WHO III oder sekundären bzw. primären Glioblastom WHO IV möglich war. Bestätigt wurde dies durch den Vergleich niedriggradiger Tumore mit Proben normalen Schweingewebes. Hier ließ sich insbesondere in der grauen Substanz eine höhere Vergleichbarkeit der Zytostuktur darstellen.



Kernmorphologie	rund	rund-oval	länglich	größenvariabel	polymorph
		2/2			
Zytoplasma	existent	schmal	weit	scharfe Zellgrenzen	faserig
	1/2	1/2			2/2
Interstitium	diffus	fibröse Stränge	homogen	fibrillär	
				2/2	
Diffuses Wachstumsmuster	Nicht vorhanden				
Zelldichte	mittel				

Tabelle 3: Auswertung der Kriterien beim niedriggradigen Astrozytom.

### 4.2.3. Glioblastom

Im Gegensatz zu den niedriggradigen Astrozytomen zeigte sich keine vergleichbare gliale Zeichnung. Vielmehr zeigte sich ein wesentlich diffuseres Wachstumsverhalten. Es zeigte sich eine höhere Zelldichte mit in ihrer Morphologie häufig unterschiedlichen Zellkernen (\*). Handfeste Hinweise auf die von Neuropathologen untersuchte Neoangiogenese konnten jedoch mit der konfokalen Laserendomikroskopie nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zellränder waren schwierig abzugrenzen, was am ehesten der höheren Zelldichte zuzuschreiben ist.

Ein weiteres histopathologisches Merkmal, das der Mitoserate, konnte mittels der neuen Technik ebenfalls nicht klar dargestellt werden. Abbildung 5 zeigt die Pleomorphie der Zellkerne (\*) sowie die insgesamt diffusere interstitielle Struktur (→) und Verlust der fibrillären Zeichnung.

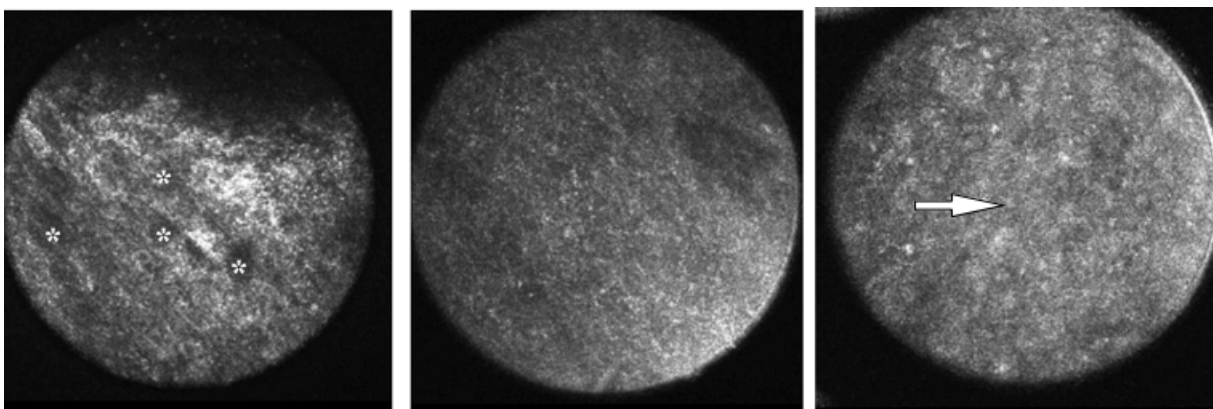


Abb. 5 a-c: Glioblastom von 3 verschiedenen Patienten.

Kernmorphologie	rund	rund-oval	länglich	größenvariabel	polymorph
	18/25	7/25			14/25
Zytoplasma	existent	schmal	weit	scharfe Zellgrenzen	faserig
	16/25	17/25	2/25		5/25
Interstitium	diffus	fibröse Stränge	homogen	fibrillär	
	25/25	2/25		13/25	
Diffuses Wachstumsmuster	23/25				
Zelldichte	hoch				

Tabelle 4: Auswertung der Kriterien beim Glioblastom.

#### 4.2.4. Meningeom

Aufgrund des arachnoidalen Ursprungs bot es sich an Parallelen zu den beim Schwein untersuchten Arachnoidea zu suchen. Was dabei auffiel ist, dass auch der Tumor die fibriläre Grundstruktur der Arachnoidea widerspiegelt. Die Zellen sind hier viel weiter gespannt und besitzen lange Ausläufer, die Kerne sind meist rund-oval mit weniger Polymorphismen. Durch die Möglichkeit des scannens über mehreren Niveaus gewinnt man den Eindruck einer Netzartigen Struktur des Gewebes. Abbildung 6 zeigt diese netzartigen Faserstränge (→) sowie die rund-ovalen Zellkerne (\*).

Der Subtyp des psammomatösen Meningeoms ist charakterisiert durch seinen zwiebelschalenähnlichen Aufbau. Psammomkörperchen entstehen, wenn diese verkalken. Dieses Phänomen ließ sich sehr eindrücklich im konfokalen Laserendomikroskop darstellen wie Abb 6e zeigt (#).

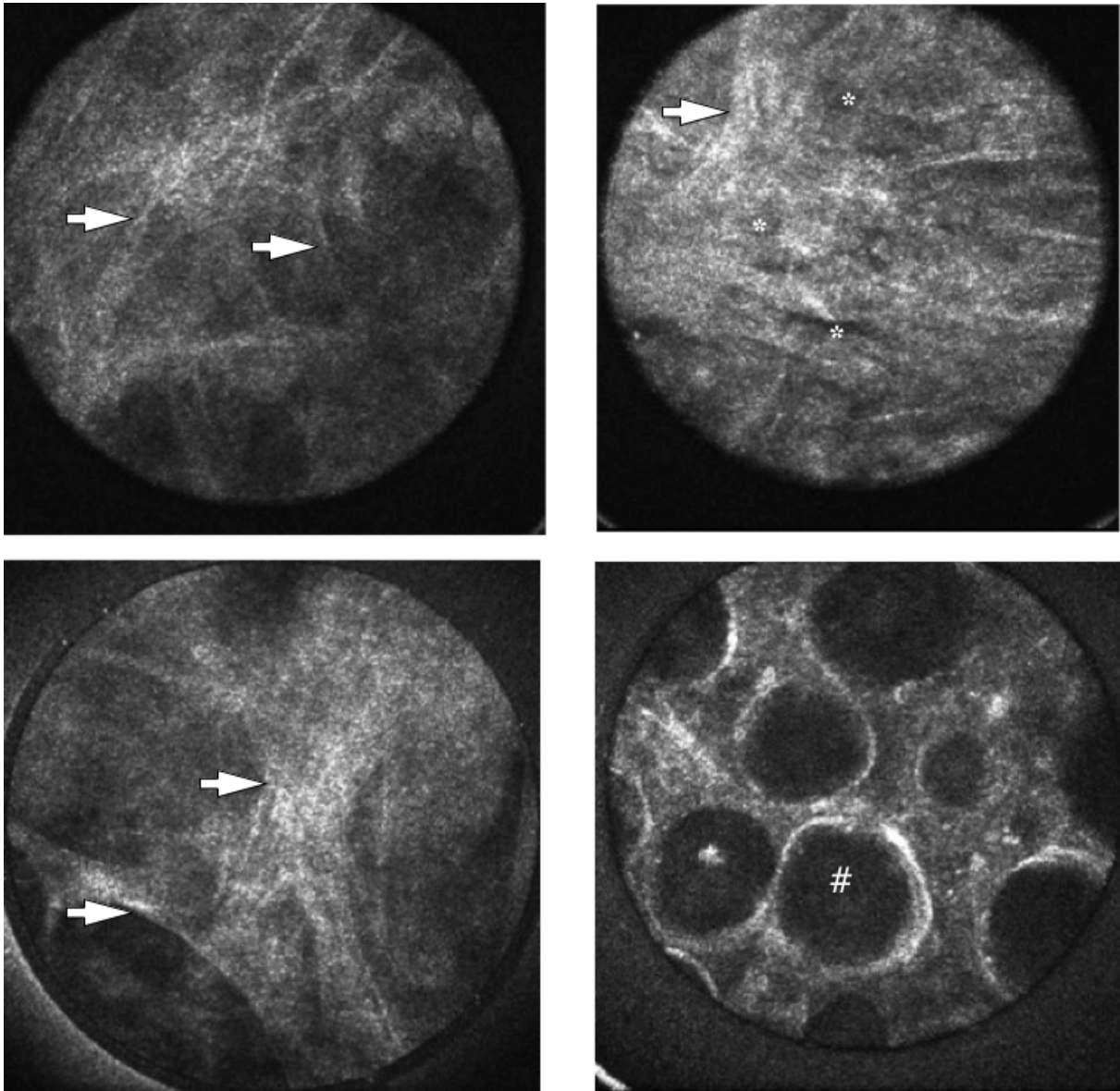


Abb. 6a-e: Meningeom von 4 verschiedenen Patienten.

Kernmorphologie	rund	rund-oval	länglich	größenvariabel	polymorph
	13/23	17/23	4/23	1/23	1/23
Zytoplasma	existent	schmal	weit	scharfe Zellgrenzen	faserig
	21/23	17/23	6/23		16/23
Interstitium	diffus	fibröse Stränge	homogen	fibrillär	
	7/23	22/23		2/23	
Diffuses Wachstumsmuster	5/23				
Zelldichte	mittel				
Psammom-Körper	3/23				

Tabelle 5: Auswertung der Kriterien beim Meningeom.

#### 4.2.5. Schwannom

Unter dem konfokalen Laserendomikroskop zeigen sich auf den ersten Blick Ähnlichkeiten mit den oben beschriebenen Meningeomen. Allerdings ist das Gewebe dichter, das Fasernetzwerk nicht so netzartig aufgespannt. Abbildung 7 zeigt wie die Zellen sich eher als Bündel mit sich langstreckenden zytoplasmatischen Fortsätzen erstrecken (→), sowie die Kerne sich eher länglich und spindelförmig darstellen (\*). Die Bündel kann man als konfokales Analogon zu den Antoni A Fasern in der histopathologischen Aufarbeitung werten.

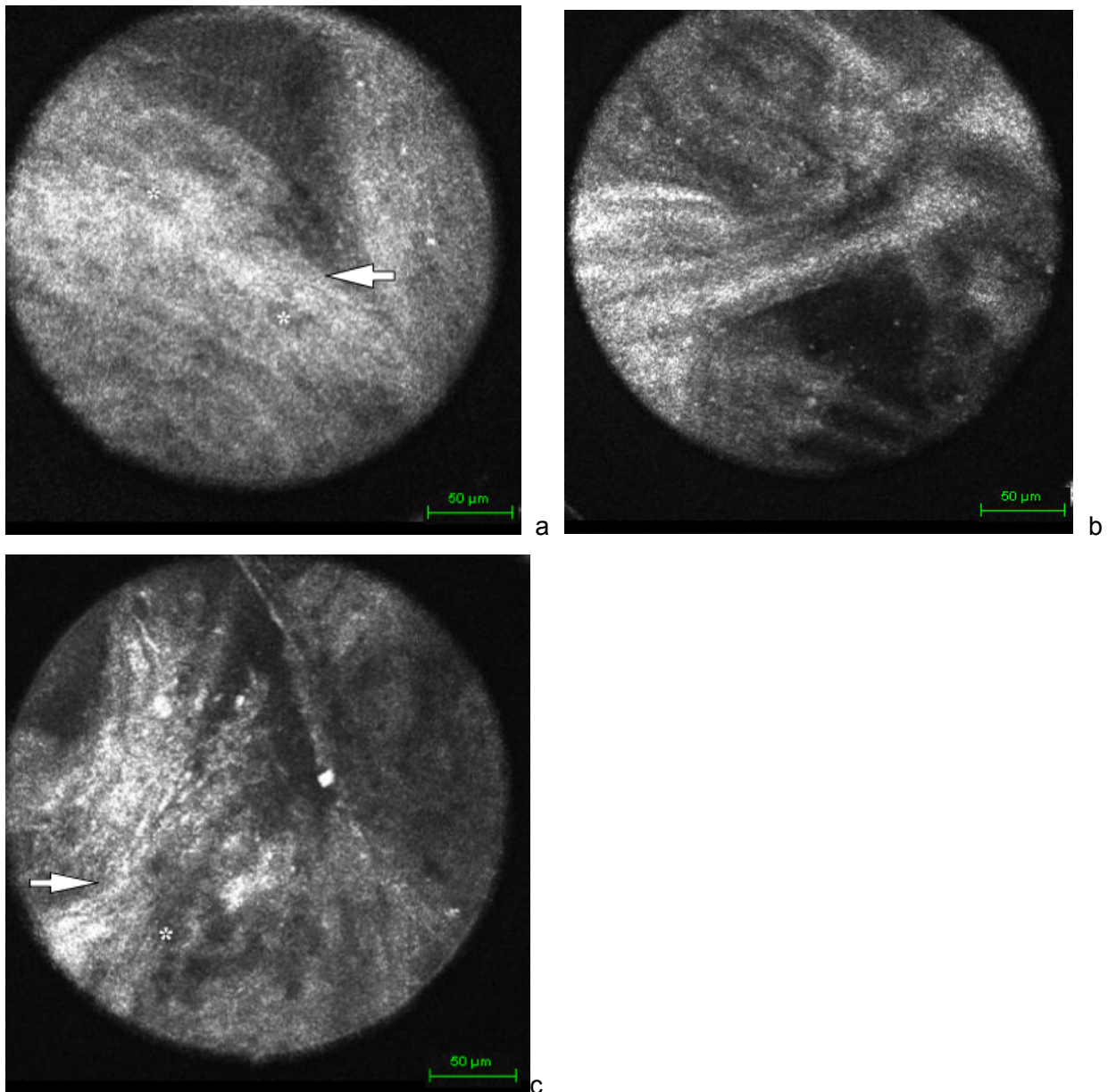


Abb. 7a-c: Schwannom von 3 verschiedenen Patienten.

Kernmorphologie	rund	rund-oval	länglich	größenvariabel	pleomorph
	1/5	4/5			
Zytoplasma	existent	schmal	weit	scharfe Zellgrenzen	faserig
	3/5	2/5	1/5		3/5
Interstitium	diffus	fibröse Stränge	homogen	fibrillär	
	1/5	5/5		1/5	
Diffuses Wachstumsmuster	1/5				
Zelldichte	mittel				

Tabelle 6: Auswertung der Kriterien beim Schwannom.

#### 4.2.6. Metastase

Insbesondere zeigte sich die Untersuchung von Metastasen erschwert. Diese Tumorart wies unter dem konfokalen Laserendomikroskop sowohl Aspekte von Meningeomen aber auch Gliomen auf. Zum Teil ist dies der Natur des Tumors geschuldet, da Metastasen in Abhängigkeit ihrer Herkunft histopathologisch verschieden sind, eine eindeutige einheitliche Erkennungsstruktur aus den Aufnahmen zu erarbeiten gestaltete sich jedoch sehr schwierig. Abbildung 8 zeigt den Kernpolymorphismus (\*) sowie fibröse Strukturen (→), die sich jedoch nicht mehrheitlich in den Präparaten wiederfanden.

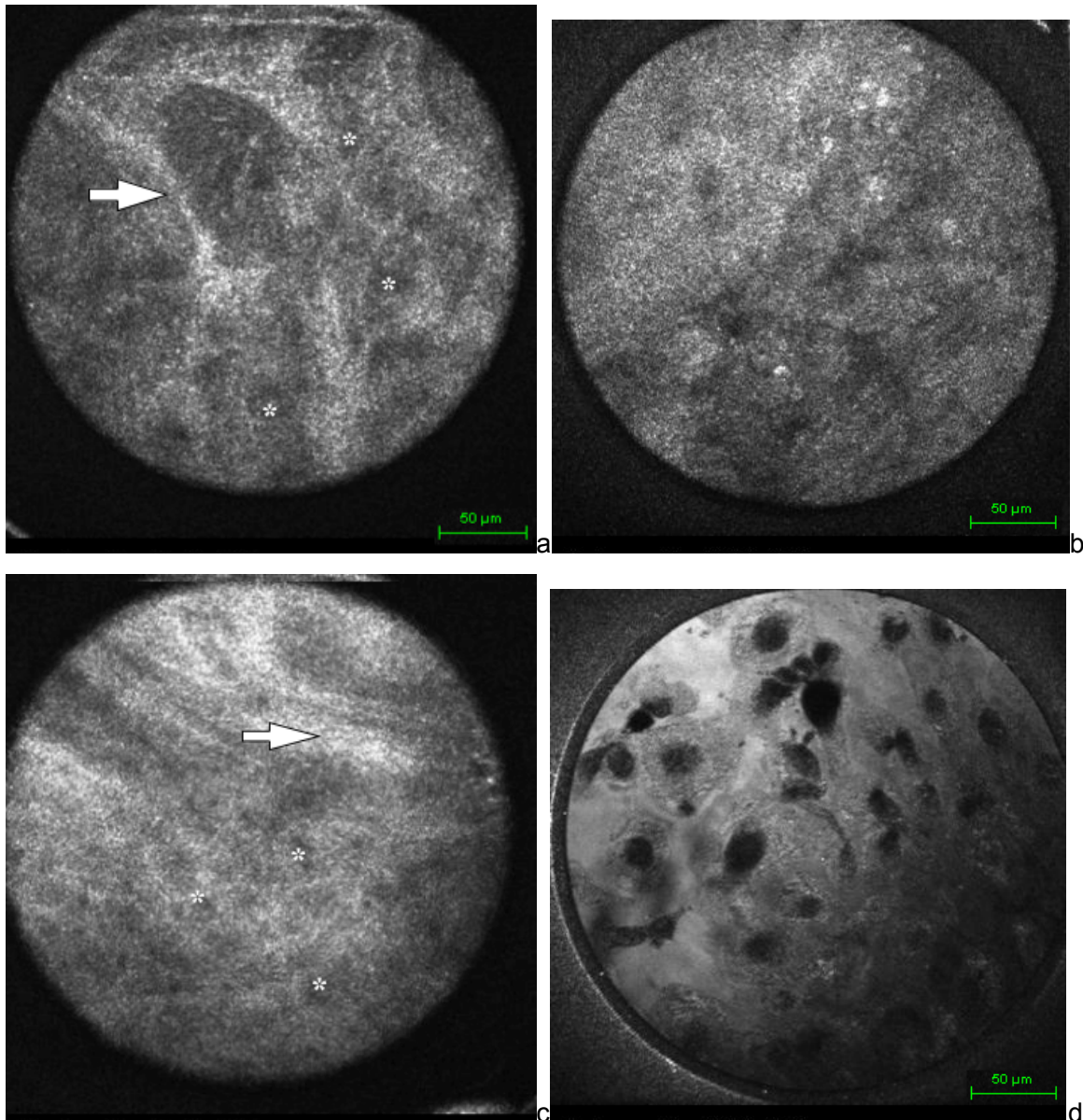


Abb. 8: a-c: Metastase von 3 verschiedenen Patienten. d: Zellkultur einer Metastase.

#### 4.2.7. Seltene Entitäten

Unsere Serie sollte nicht auf die häufigsten Tumore beschränkt bleiben, sondern soll ebenfalls Exemplare beschreiben, deren Inzidenz zwar geringer ist, die Tumore selbst jedoch durchaus charakteristische konfokale Laserendomikroskopische Aspekte aufzeigten. Dementsprechend sind die Beschreibungen Einzelfälle deren Morphologie in Verbindung zur Histopathologie gebracht werden konnte.

#### 4.2.7.1. Oligodendrogliom

Konfokal laserendomikroskopisch zeigte sich ein gutes Korrelat zum histopathologischen Bild mit deutlich erhöhter Zelldichte, wie in Abbildung 9 dargestellt.

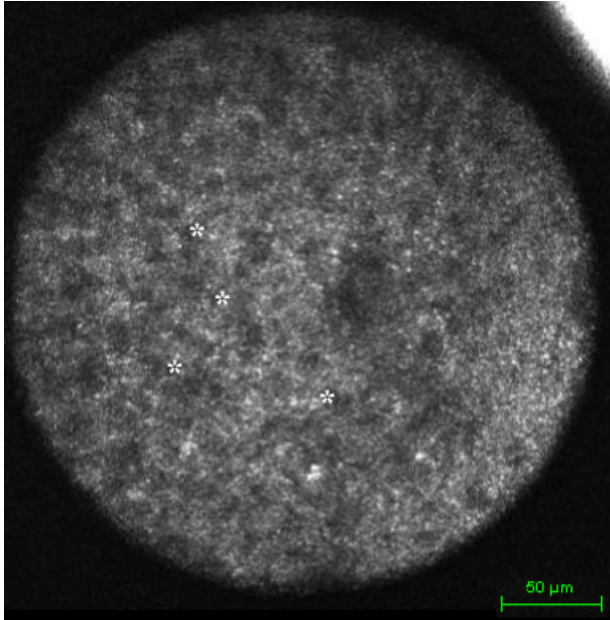


Abb. 9: Oligodendrogliom.

#### 4.2.7.2. Paragangliom

Das Paragangliom ist ein meist benigner Tumor welcher aus einem Paraganglion entstehen kann. Histopathologisch wird er charakterisiert durch Zellballen, welche durch ein feines Kapillarnetzwerk ummauert sind. Abbildung 10 zeigt das konfokal laserendomikroskopische Korrelat (→).

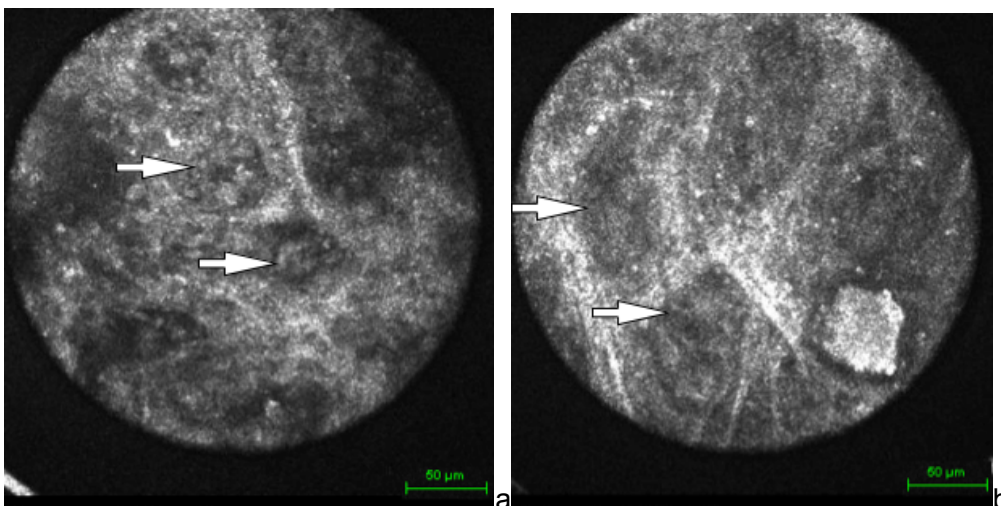


Abb. 10 a+b: Paragangliom.

### 4.2.7.3. Lymphom

Das Lymphom stellte sich mit einer starken Zellinfiltration dar. In Abbildung 11 zeigen sich die Zellen größer und zur umliegenden Matrix gut abgrenzbar (\*).

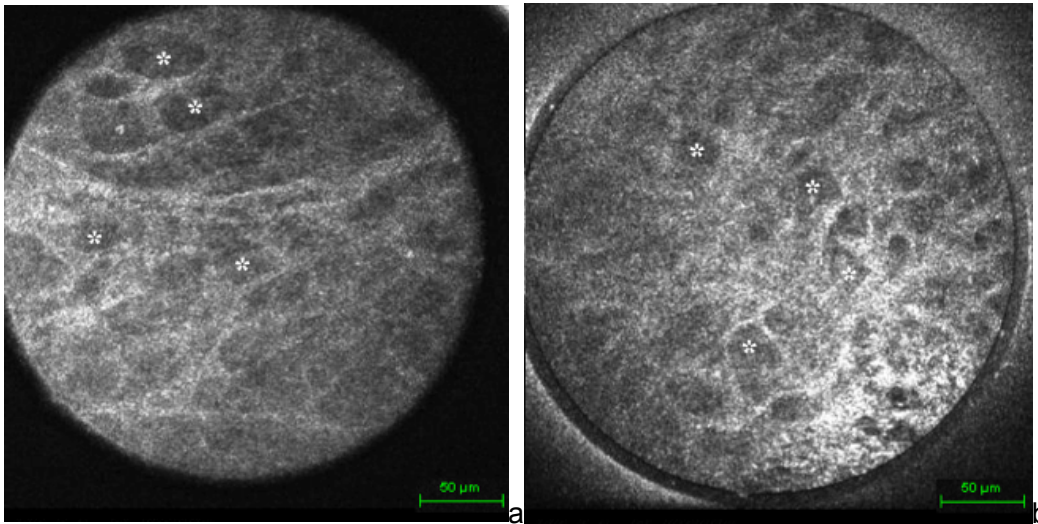


Abb. 11 a+b: Lymphom zwei verschiedener Patienten.



### 4.3. Vergleich zur Histologie

Die histopathologische Diagnostik ist nach wie vor der Goldstandard in der Tumordiagnostik. Im Folgenden soll jedoch nochmal auf die Unterschiede zwischen der Histologie und der konfokalen Laserendomikroskopie eingegangen werden. Verglichen werden dabei konfokal laserendomikroskopische Bilder mit herkömmlichen HE-Schnitten.

#### 4.3.1. Astrozytom

Histologisch sind hier vier Kriterien essenziell zur Beurteilung des Astrozytoms und seiner Einteilung nach WHO-Kriterien, nämlich die Kernatypie, Mitoserate, mikrovaskuläre Proliferation und die eventuell bereits vorliegenden Nekrosen. Die konfokale Laserendomikroskopie konnte zeigen, dass von diesen Kriterien die Evaluation der Kernmorphologie zwar zum Teil möglich war, jedoch die Mitoseraten bei entsprechender Auflösung nicht vergleichbar zur Histologie zu beurteilen war. Ebenso war in diesen Fällen die eindeutige Darstellung etwaiger Neovaskularisationen nicht in jedem Fall darstellbar. Allerdings hat sich ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zu den High grade Gliomen in der Darstellung der fibrillären Struktur der Tumore gezeigt. Die Unterscheidung zwischen fibrillären, protoplasmatischen und gemistozytischen Astrozytomen war hier dennoch nicht möglich. Abbildung 12 zeigt als Hauptüberscheidungsmerkmal die fibrilläre Verästelung des Gewebegrundes (➔).

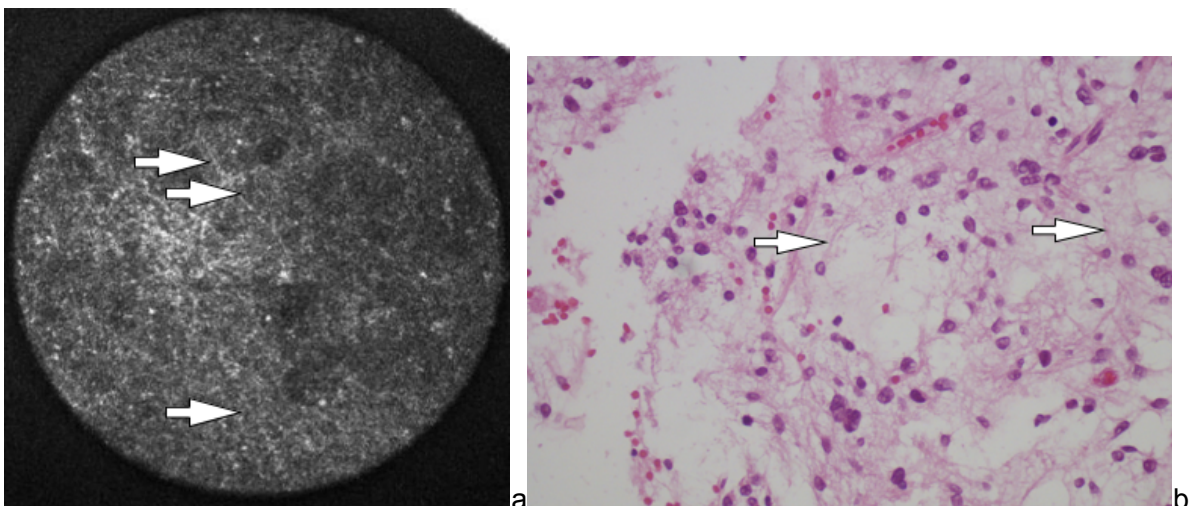


Abb 12: a: Astrozytom WHO Grad II im CLE. b: HE-Färbung 400x Vergrößerung.

### 4.3.2. Glioblastom

Das Glioblastom ist unter anderem durch seine Hyperzellularität und seinem, zumindest im Randbereich diffusen Wachstum charakterisiert, beides Kriterien welche sowohl in der Histologie als auch in der konfokalen Laserendomikroskopie wiederzufinden sind. Allerdings ist es nicht möglich eine Aussage über die Mitoserate, ein wesentliches Kriterium der Graduierung diffuser Gliome, mittels CLE zu stellen. In manchen Aufnahmen lässt sich eine pallisadenförmige Anordnung von Zellkernen vermuten. Im Vergleich zur Histologie waren jedoch keine eindeutigen Nekrosen zu identifizieren. Abbildung 13 zeigt am besten den Vergleich der hohen Zelldichte (\*).

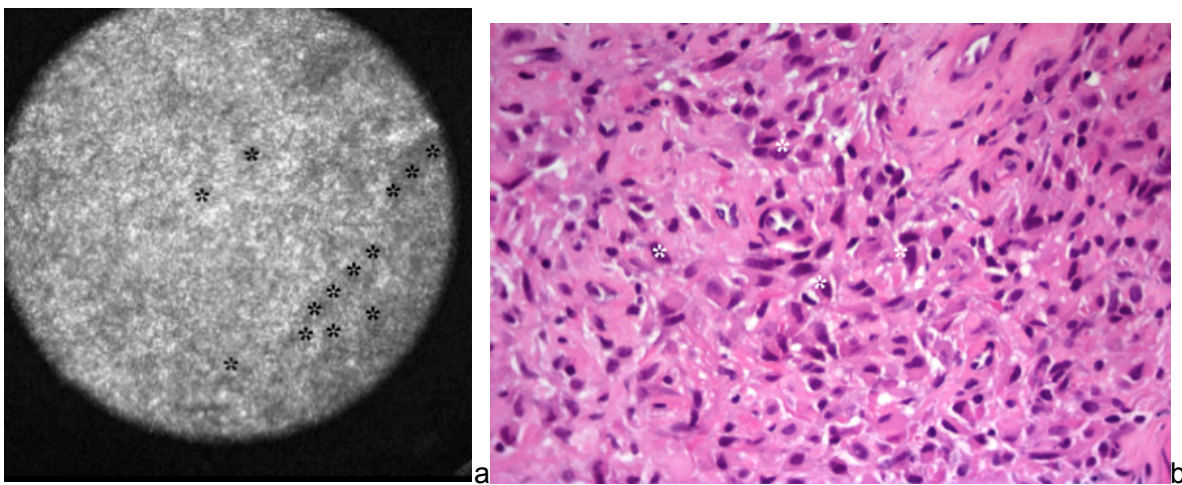


Abb. 13: a: GBM im CLE. b: HE-Färbung 400x Vergrößerung.

### 4.3.3. Meningeom

Die von arachnoidalen Deckzellen ausgehenden Tumore zeigen in der Histologie oft konzentrische Wachstumsmuster in Form sogenannter Zwiebschalenkonfigurationen und werden entsprechend ihrer dominierenden Ausprägungen in verschiedene Subtypen unterteilt (Grad I: meningotheliomatös, fibrös, transitional, psammomatös, angiomatös, sekretorisch, mikrozystisch; Grad II: klarzellig, chordoid; Grad III: anaplastisch, papillär, rhabdoid). Diese weitere histomorphologische Unterteilung konnte aus 2 Gründen nicht ausreichend herausgearbeitet werden: zum einen fehlten auch hier die entsprechende Auflösung und Färbemethoden, zum anderen sind einige dieser Subtypen zu selten und kamen im untersuchten Kollektiv nicht vor. Hauptmerkmale in der CLE waren die faserartigen, trabekulären Ausziehungen welche eine geradezu netzartige Struktur erkennen ließen. Hervorzuheben ist hier jedoch insbesondere die psammomatöse Variante, welche durch ihre

Verkalkungen ein absolutes Wiedererkennungsmerkmal darstellte. Abbildung 14 zeigt in beiden Bildern mikrozystische Veränderungen (\*). Abbildung 15 zeigt das mögliche Korrelat der faserigen Stränge zwischen den ballenartigen Tumorzellformationen in beiden Bildern (→). In Abbildung 16 sind Beispiele für Mikroverkalkungen zu sehen (→).

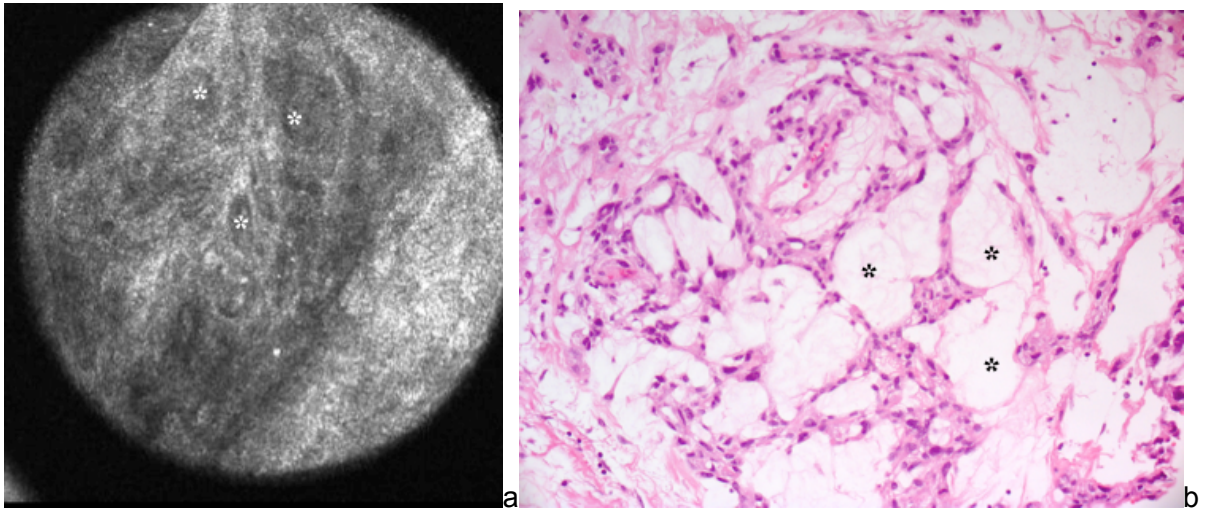


Abb. 14: a: Meningeom im CLE. b: HE Färbung 200x Vergrößerung.

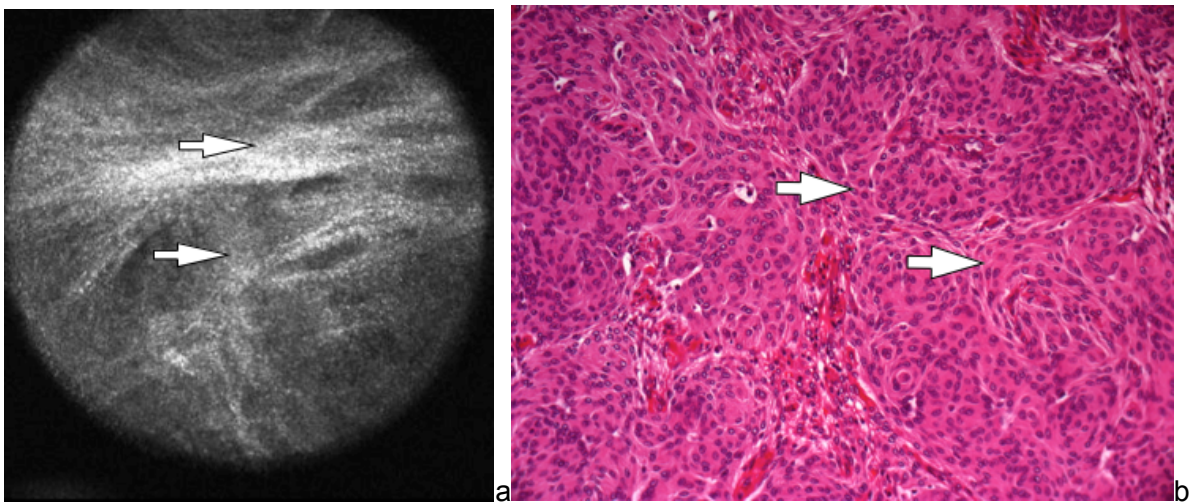


Abb. 15: a: Meningeom im CLE. b: HE Färbung 200x Vergrößerung.

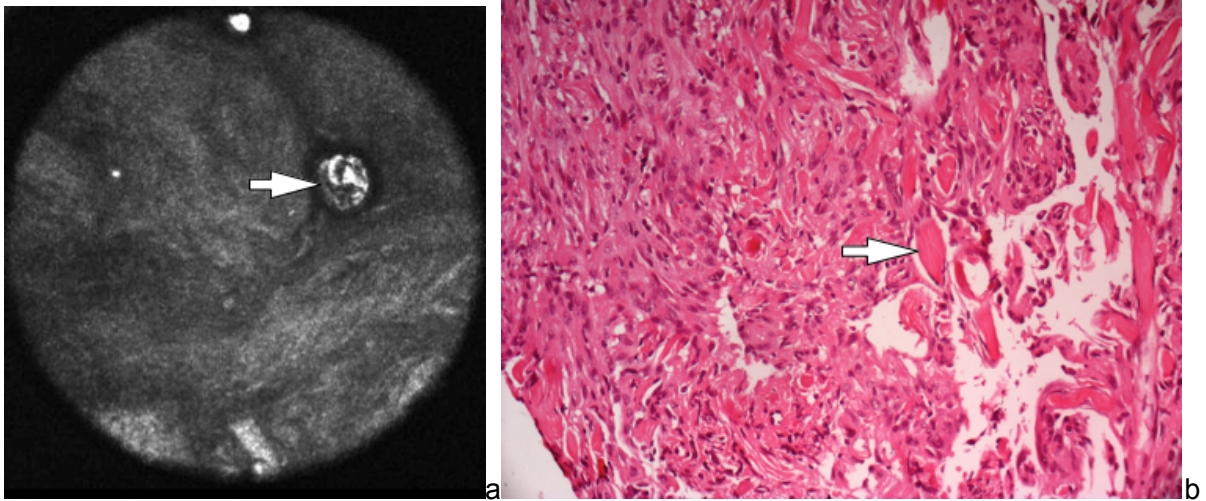


Abb. 16: a: Verkalkungen bei Meningeom im CLE. b: HE Färbung 200x Vergrößerung.

#### 4.3.4. Schwannom

Histopathologisch zeichnen sich Schwannome durch längliche Kerne und ausgezogene Zellfortsätze aus. Zwei wesentliche Muster gestalten das Erscheinungsbild, nämlich länglich angeordnete Antoni-A Muster und eher netzartig aufgelockerte Antoni-B Muster, letzteres mit geringeren, jedoch pleomorpheren Zellkernen. Diese Muster lassen sich am besten bei geringerer Vergrößerung beurteilen, sodass hier ein Nachteil bei der CLE liegt. Abbildung 17 stellt diese Antoni A (\*) und Antoni B (#) Muster dar.

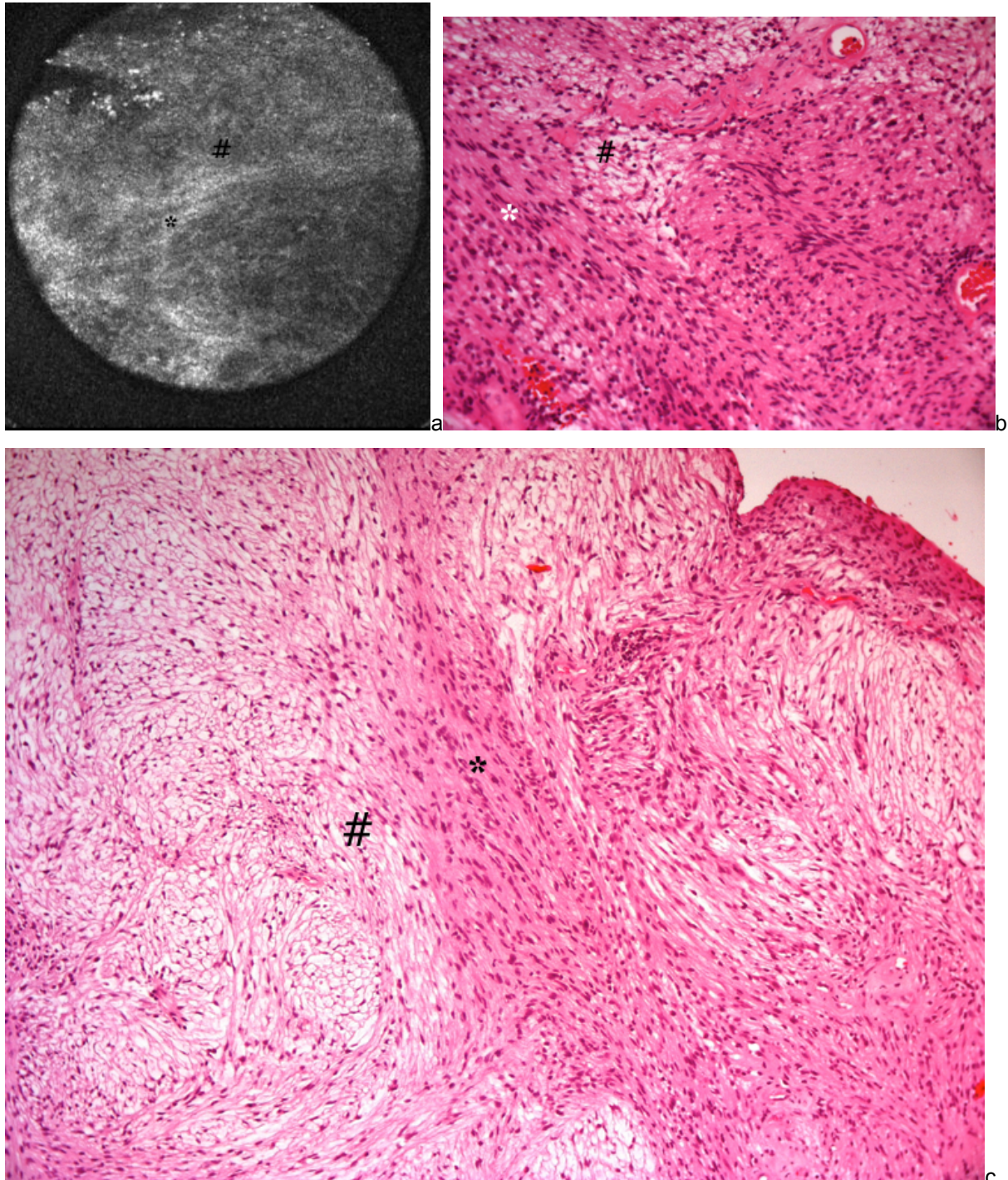


Abb. 17: a: Schwannom im CLE. b: HE-Färbung 200x Vergrößerung. c: Bei 100x Vergrößerung.

#### 4.3.5. Metastasen

Die Untersuchung der Metastasen gestaltete sich sehr schwierig. Dies ist der Natur des Gewebes zuzuschreiben. Die intracerebralen metastatischen Absiedlungen, behalten meist die Grundstruktur des metastasierenden Primärtumors. Daraus resultiert eine Vielfalt an verschiedenen Erscheinungsbildern, welche in ihrer Gänze und Vielfalt in unserer Serie nicht erfasst werden konnten. Allerdings ist hervorzuheben, dass sich diese Metastasen dennoch deutlich von gesundem Hirngewebe differenzieren ließen. Meist konnten diese Tumore mittels CLE nicht sicher klassifiziert werden, jedoch zeigten sich immer Aspekte, wie das solide Wachstum, faserige desmoplastische Züge, Pleomorphie der Kerne, welche eine zumeist zuverlässige Differenzierung zu normalem Hirngewebe ermöglichten.

#### 4.3.6. Oligodendrogliom

Histopathologisch auffällig sind die Hyperzellularität mit kleinen runden Kernen. Zudem zeigt sich häufig ein perinukleärer, optisch leerer Halo als artifizielles Charakteristikum. Diese hohe Zelldichte und die klassische Kernmorphologie konnte mittels CLE ebenfalls beobachtet werden, wobei der charakteristische Hof erwartungsgemäß nicht darzustellen war. Abbildung 18 zeigt die hohe Zellularität (\*).

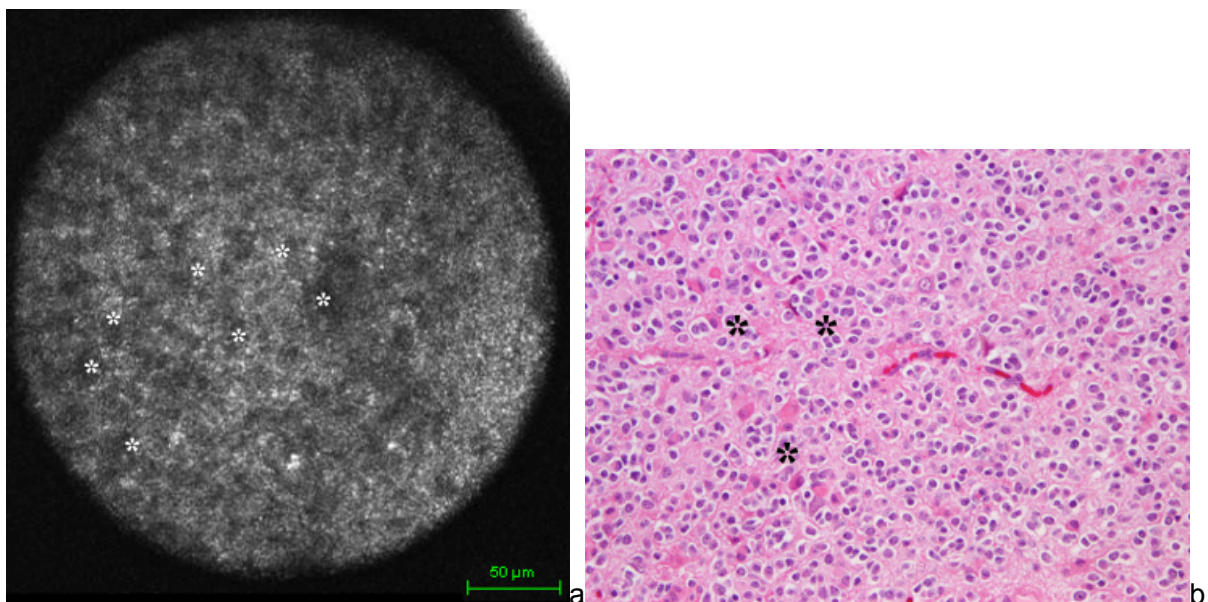


Abb.18 : a: Oligodendrogliom im CLE. b: HE Färbung 200x Vergrößerung.

#### 4.3.7. Lymphom

Lymphome charakterisieren sich durch ihr zellreiches Erscheinungsbild. Die relativ klein- und rundzelligen Elemente zeigen, im Falle von High grade Lymphomen, einen blastären Charakter und präsentieren häufige Mitosen und Apoptosen. Abbildung 19 zeigt in der CLE die blastären Zellen (\*) und spiegelt zudem die hohe Zelldichte wieder.

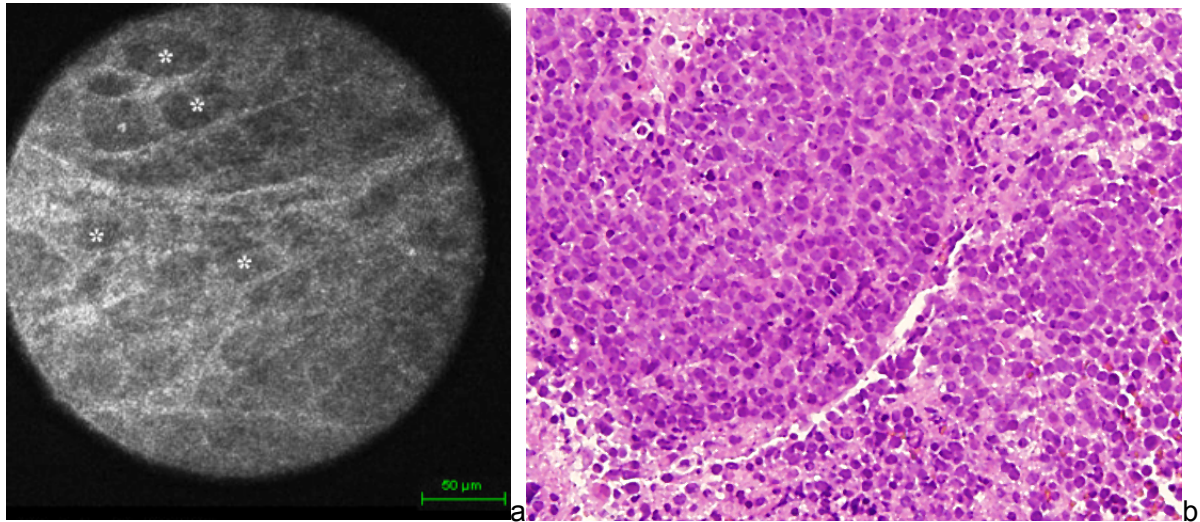


Abb. 19: a: Lymphom im CLE. b: HE Färbung 200x Vergrößerung.

#### 4.4. Vergleich zur Schnellschnittuntersuchung

Im direkten Vergleich mit dem histopathologischen Schnellschnitt wurden 100 Proben mittels CLE untersucht. Tabelle 7 zeigt die Zusammenfassung der Resultate der unterschiedlichen Untersuchungstechnik sowie die jeweilige Sensitivität und Spezifität.

	Endgültiger Befund	Schnellschnitt	CLE	Fehlinterpretation	Sensitivität SS // CLE	Spezifität SS // CLE
high grade Gliom	32	30	26	4 low grade Gliom, 1 Meningeom, 1 Metastase	0,93 // 0,81	1 // 0,85
low grade Gliom	10	10	9	1 als Metastase	1 // 0,9	1 // 0,93
Meningeom	34	34	28	2 low grade, 1 high grade Gliom, 3 Metastase	1 // 0,82	1 // 0,95
Schwannom	8	8	7	1 Meningeom	1 // 0,87	1 // 1
Metastase	16	16	6	9 high grade Gliom 1 Meningeom	1 // 0,07	1 // 0,94

Tabelle 7: Resultate der Schnellschnittserie

##### 4.4.1. High grade Gliom

Mittels CLE wurden 36 Proben als high grade Gliome eingestuft. Hiervon war in Wirklichkeit eins ein Meningeom WHO II und 9 Metastasen. Der intraoperative Schnellschnitt ergab in 30 Fällen ein high grade Gliom. Die endgültige Histologie wies derer 32 mal nach, sodass sich für die CLE eine Sensitivität von 0,81 und eine Spezifität von 0,85. Für den Schnellschnitt ergab dies eine Sensitivität von 0,93 und eine Spezifität von 1.

##### 4.4.2. Low grade Gliom

Unter Anwendung der Kriterien wurde in 15 Fällen die CLE-Diagnose eines low grade Glioms gestellt. Zehn mal wurde diese Entität sowohl im Schnellschnitt als auch in der endgültigen Histologie diagnostiziert, wodurch sich für die CLE eine Sensitivität von 0,9 und eine Spezifität von 0,93 ergab. Die 6 fälschlich als low grade diagnostizierten Tumore stellten sich 4 mal als high grade und 2 mal als Meningeom heraus.

##### 4.4.3. Meningeom

Die Diagnose eines Meningeoms wurde 31 mal mittels CLE gestellt, welche jedoch 34 mal im Schnellschnitt sowie in der endgültigen Histologie diagnostiziert wurden. Die fehlenden 3



wurden einmal als Schwannom, einmal als high grade und einmal als Metastase fehlinterpretiert. Von den 34 effektiven Meningeomen wurden 28 korrekt als solche mittels CLE diagnostiziert, womit Sensitivität von 0,82 und eine Spezifität von 0,95 resultierte.

#### **4.4.4. Schwannom**

Im Falle der Schwannome wurden diese in 7 von 8 Fällen richtig mittels CLE diagnostiziert. Einmal wurde die Fehldiagnose eines Meningeoms gestellt. Hieraus resultiert eine Sensitivität von 0,87 und eine Spezifität von 1.

#### **4.4.5. Metastase**

Eine besondere Herausforderung stellten die Metastasen dar. Lediglich 6 von 16 Proben konnten korrekt als solche mittels CLE diagnostiziert werden. Neun der 10 nicht korrekt diagnostizierten Proben wurden als high grade Gliome verkannt, eins als Meningeom. Die 5 Proben, welche fälschlich als Metastase mittels CLE diagnostiziert wurden, stellten sich einmal als high grade Gliom, einmal als low grade Gliom und 3 mal als Meningeom heraus. Hier ergab sich eine Sensitivität von 0,07 und eine Spezifität von 0,94.

## 5. Diskussion

Die Ansprüche der heutigen Medizin werden immer höher gesteckt. Die Heilung von Krankheiten verbesserte sich über die Jahrhunderte stetig weiter und genauso steigen die Erwartungen sowohl von Therapeuten als auch von Patienten. Auch die Neurochirurgie hat dieses Bestreben verinnerlicht und hat für ihre relativ kurze Bestehenszeit bislang durchgreifende Veränderungen bezüglich operativer als auch apparativer Techniken erfahren. Während vor Jahrzehnten die Resektion eines Konvexitäts-Meningeoms noch mit erheblichen peri- und intraoperativen Risiken einherging, verläuft dieser Eingriff heutzutage mit geringer Komplikationsrate. Vor allem in der Behandlung von bösartigen Hirntumoren wie dem Glioblastom ist es im Laufe der Zeit gelungen, durch multimodale Therapiekonzepte und vor allem operative Techniken und Hilfsmittel wie OP-Mikroskop, Neuronavigation und intraoperativ anwendbare Fluoreszenzstoffe, die Lebenserwartung deutlich zu verlängern<sup>22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31</sup>. Nichts desto trotz gehört dieser Tumor heutzutage dennoch zu den aggressivsten Karzinomen und ist, lege artis behandelt, mit einer mittleren Überlebensdauer von lediglich 14,6 Monaten<sup>22</sup> unheilbar. Es besteht dementsprechend ein großes Bestreben nach Weiterentwicklung und Verbesserung peri- und intraoperativer begleitender Technik. Insbesondere im Falle hochmaligner hirneigener Tumore ist die intraoperative Diskriminierung von gesundem und pathologisch verändertem Gewebe eine besondere Herausforderung. Während zentrale Anteile solcher Tumore aufgrund stattfindenden Zellunterganges und begleitender Nekrose meist gut zu unterscheiden sind, sind es insbesondere die Randzonen, deren Differenzierung zum gesunden Gewebe erschwert ist. Da jedoch die Vulnerabilität aufgrund der neurologischen Funktion dieses Gewebes sehr hoch ist, ist es selbsterklärend, dass hier kein großer Sicherheitsabstand besteht, und dass die Einhaltung eines Resektionsrandes, anders als bei anderen Tumoren, nicht möglich ist.

Entsprechend entwickelten sich in letzten Jahren insbesondere Methoden, welche diese Gewebeunterscheidung unterstützen sollen. Zum einen liegt der Fokus auf Fluoreszenzfarbstoffen, wie zum Beispiel 5-ALA, welches den Tumor im Blaulicht mittels Mikroskop farblich abgesetzt darstellen sollen. Studien haben belegt, dass hiermit eine radikalere Resektion erreicht werden kann<sup>27, 28, 29, 30, 31</sup>. Jedoch bestehen auch hier Einschränkungen bezüglich der Intensität der Fluoreszenz, sodass die Interpretation einer möglichen Gewebeeinfiltration erschwert ist. Eine höher Zelldichte geht zwar mit einer höheren Fluoreszenz einher, jedoch heißt eine geringere Fluoreszenz nicht, dass hier keine Tumoreinfiltration besteht, da die eigentliche Fluoreszenz den Stoffwechsel der Zellen widerspiegelt, diese in Tumorzellen zwar höher, aber in gesunden auch nicht fehlend ist.

Stummer beschreibt entsprechend wiederholt, dass 5-ALA ein gutes Hilfsmittel in einem kompletten Arsenal an Behandlungsoptionen ist, jedoch kein Heilmittel alleine ist<sup>52</sup>.

Das Bestreben scheint, trotz indirektem Nachweis mit ebensolchen Hilfsmitteln wie Fluoreszenz und MRT-Navigation, sich dahingehend zu entwickeln, das veränderte Gewebe auf direkte Weise darzustellen. Entsprechend liegt der Fokus dieses neuen Zweiges auf der zellulären Ebene und damit Nachweis veränderter Zellen in situ.

Seit der Einführung der konfokalen Laserendomikroskopie hat diese Einzug in verschiedene Fachrichtungen genommen. Allen voraus die Fachrichtungen, deren natürliche Diagnostik an die Endoskopie gebunden ist, nämlich die Gastroenterologie und die Pulmonologie aufgrund der Bronchoskopie. Insbesondere in der Gastroenterologie konnten hier hohe Übereinstimmungen mit histopathologischen Diagnosen bezüglich maligner, premaligner und inflammatorischer Veränderungen getroffen werden<sup>52, 53, 54</sup>. Trotz dieser durchaus vielversprechenden Resultate hat die Konfokale Laserendomikroskopie bislang noch keinen einschlägigen Durchbruch im klinischen gastroenterologischen Alltag erlebt. Robles-Medranda bezieht dies auf verschiedene Aspekte: insbesondere die Kostendeckung sowohl der Technik selbst als auch der Rückerstattung durch die Krankenkassen, Bildinterpretation des durchführenden Arztes und Ausbildung dieser in der Technik und nicht zuletzt medico-legale Fragestellungen mit Blick auf den Goldstandard, die histopathologische Diagnose durch einen Facharzt für Pathologie<sup>55</sup>.

Die Neuroendoskopie ist, auch wenn erste Berichte über ihren Einsatz bereits viele Jahre zurückdatiert sind, eine relativ junge Subsparte in der Neurochirurgie. Es sind vor allem die technischen Raffinessen und Leistungen die es ermöglicht haben, dem wahren Anspruch des Neurochirurgen gerecht zu werden, nämlich, auf minimal invasive Art eine bestmögliche Visualisierung in einem hochempfindlichen Organsystem zu erlangen.

Die konfokale Laserendomikroskopie ist noch immer in ihren Anfängen in der Neurochirurgie. Verschieden Systeme wurden bereits ex vivo und sogar in vivo erprobt, allerdings unterscheiden diese sich in ihrer Handhabung, benötigten Setup und Anwendbarkeit am Patienten.

Sankar et al. wendeten ein ähnliches Laserendomikroskop der Firma Optiscan an einem Glioblastommodell der Maus an und konnten erste deskriptive Erkenntnisse zur Gewebe- und Tumordarstellung veröffentlichen<sup>45</sup>. Hierzu benutzten sie Fluorescein i.v. und Acriflavin topisch um die verschiedene Strukturen hervorzuheben. Fluorescein bleibt zwar zunächst im

Gefäßsystem, diffundiert jedoch mit der Zeit in das Hirnparenchym und färbt dieses an, insbesondere im Bereich der am Tumor gestörten Blut-Hirn-Schranke. Im Gegensatz wird Acriflavin in die Zellen aufgenommen und färbt die Zellkerne an. Dies führte jedoch auch dazu, dass das Pooling von Erythrozyten die Differenzierung vom Gewebe erschwert und behindert hat. Ein weiterer Nachteil von Acriflavin ist, dass zur Zeit keine Zulassung für die Anwendung am Menschen vorliegt. Die Anwendung mit dem EndoMag1 war nicht möglich, da das Absorptionsspektrum nicht im Detektionsbereich des Gerätes liegt. Foersch et al benutzten ebenfalls das Optiscan System in Kombination mit den gleichen Farbstoffen, jedoch im Ratten-Gliom Modell und an reseziertem Tumorgewebe von Menschen<sup>46</sup>. Hierzu wurden die Gewebeproben nach Resektion in der entsprechenden Lösung inkubiert. Die Kollegen beschreiben eine ähnlich gute Differenzierung der zu untersuchenden Strukturen, jedoch weisen sie ebenfalls auf die eingeschränkte Anwendbarkeit am Menschen hin. Martirosyan et al. wendeten daher einen bereits etablierten Fluoreszenzfarbstoff an, nämlich Indocyanin Grün (ICG), ebenfalls am Optiscan-System<sup>47</sup>. Die intrazelluläre Diffusion von ICG, aufgrund der geschädigten Blut-Hirn-Schranke, ermöglicht hierbei zuverlässige Aussagen bezüglich der Zell- und Kernmorphologie zu treffen. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass auch nach einer Scan-Zeit von einer Stunde die Fluoreszenz nicht abnahm, sodass sich ICG für die längere Tumorresektion zu bewähren scheint. Eschbacher et al. kamen schließlich während einer in vivo Studie am Menschen zur Erkenntnis, dass die intraoperative Anwendung und Evaluation der konfokalen Technik dem Operateur zwar neue und hilfreiche Informationen zum zugrunde liegenden Gewebe gibt, das Detailreichtum jedoch dem der einfachen HE-Schnitte deutlich unterliegt<sup>50</sup>.

In dieser Arbeit sollte das EndoMag1 der Karl-Storz GmbH und seine Anwendung im Neurochirurgischen OP erarbeitet werden. Das Setup dieses Gerätes hat den folgenden Einsatz vorgegeben. Durch den festen Verbau des Endoskops mit der Kamera und dem Computeraufbau bildet das Gerät eher eine „Workstation“ als ein frei nutzbares Endoskop. Somit ist der Einsatz des Endoskops in situ nicht möglich gewesen. Da es sich hierbei jedoch um einen Prototypen handelt, ist diese Restriktion zu diesem Zeitpunkt nicht maßgeblich zu werten, da hier sicherlich weitere technische Verbesserungen erwartet werden können, die einen mobileren, freieren Einsatz ermöglichen. Vielmehr ging es um erste Bildinterpretationen und Aussagemöglichkeiten bezüglich der Anwendung zur mikroskopischen Begutachtung.

Die Proben mussten dementsprechend zunächst reseziert werden um konfokal Laserendomikroskopisch untersucht werden zu können. Aus dem resezierten Tumor wurde ein, sofern die Größe es erlaubte, 1x1cm großes Stück abgeschnitten, welches anschließend, nach Mitteilung der Schnellschnitt-Beurteilung, untersucht wurde. Somit war bei diesem

Versuchsaufbau bekannt welcher Tumor zum Untersuchungszeitpunkt vorlag. Da zu diesem Zeitpunkt keine Erfahrung in der Bildinterpretation vorlag, gab es keine Möglichkeit einen direkten Vergleich zwischen der konfokalen Laserendomikroskopie und der Histopathologie bezüglich der Übereinstimmung zu treffen. Dies soll jedoch Gegenstand auf dieser Arbeit aufbauender zukünftiger Studien sein.

Da wir zu Beginn keine Vergleichsmöglichkeiten hatten, fiel die Entscheidung parallel zu den jeweiligen Tumorproben zusätzlich primäre Zellkulturen des entsprechenden Tumors zu untersuchen. Dies ermöglichte uns die Form der Zellen in Größe und Wachstumsausrichtung zu beurteilen. Hilfreich war hier vor allem die Einschätzung der Größe verschiedener Zellstrukturen, vor allem der Kerne. Jedoch zeigte sich in den jeweiligen Zellkulturen keine übergeordnete Gewebestruktur, welche mit den eigentlichen Tumoren vergleichbar war. Somit bewies sich die Zellkultur als nützlich, aber nicht wegweisend in der Diagnostik des vorliegenden Tumormaterials.

Wichtig war es uns in dieser Arbeit, einen möglichst einfachen Aufbau beizubehalten, um den geplanten Einstieg der Technik in den Alltag zu erleichtern. Wir legten vor allem den Fokus auf die native Untersuchung, mit einer geringen Menge an Kochsalzlösung um eine bessere Bildqualität aufgrund der Benetzung zu erreichen. Zusätzlich wollten wir untersuchen, ob die Färbung mit einem langjährig bekannten und einfach einsetzbaren Farbstoff einen Unterschied zeigen würde. Methylenblau ist ein Phenothiazin-Derivat und wurde erstmalig im Jahre 1876 von Heinrich Caro hergestellt. Seinen Nutzen fand Methylenblau im Laufe der Jahre in diversen Gebieten, in der Medizin fand es vor allem Anklang aufgrund seiner Eigenschaft als Vitalfarbstoff, welcher am lebenden Organismus angewendet werden kann. Da es sich in der Histologie als möglicher Farbstoff von ZNS-Gewebe bewiesen hat, fiel somit unsere Wahl hierauf. Zu beachten ist jedoch hierbei, dass Methylenblau in gewissen Konzentrationen neurotoxische Wirkungen haben kann, was den Einsatz am ZNS entsprechend erschwert<sup>56</sup>.

Sowohl die Zellkulturen als auch die Gewebeproben wurden nach einer ersten nativen Untersuchung mittels Methylenblau begutachtet. Anders als erhofft konnten hier jedoch keine Zellstrukturen deutlicher hervorgehoben werden, wodurch der Einsatz von MB irrelevant scheint. Hier scheinen andere Farbstoffe wie zum Beispiel Indozyanin Grün (ICG) in dem genutzten Lichtspektrum sinnvoller<sup>46, 47</sup>. ICG konnte bereits als potenter Fluoreszenzstoff in der Gliomchirurgie bestätigt werden, da es insbesondere Transitionszonen zwischen gesundem und pathologischem Gewebe darstellt<sup>57, 58</sup>. Allerdings zeigte sich in Experimenten, dass es bei der Applikation maßgeblich auf den Zeitpunkt der ICG Gabe ankommt. In der

Frühphase zeigt sich ICG in den Blutgefäßen, Kapillaren und extrazellulären Tumormatrix, jedoch diffundiert es in der Spätphase auch in normales Gewebe und erschwert somit die Bildinterpretation. Foersch et al. umgingen dieses Problem in dem sie eine Zelllinie mit eYFP, gelb-fluoreszierendes Protein, implantierten<sup>46</sup>, jedoch fehlt hier der Bezug zur Anwendung am Menschen. Von Vorteil scheint in diesem Fall der Fluoreszenzfarbstoff 5-ALA. Dieser ist anders als ICG ein intrazellulärer Farbstoff und eignet sich somit mehr für die Untersuchung der Kernmorphologie. Allerdings ist seine Excitationschwelle bei 410nm für das hier genutzte konfokale Laserendomikroskop nicht nutzbar.

Die Handhabung des EndoMag1 bewies sich als sehr leicht. Die benötigten Schritte welche getätigt werden müssen um ein Bild zu generieren und zu speichern sind äußerst anwenderfreundlich. Die Herausforderung dieser Technik ist vielmehr die Bildinterpretation selbst. Aufgrund fehlender passender Referenzbilder bezüglich dieses bestimmten konfokalen Endoskops waren jegliche Bilder neue Eindrücke. In diesem ersten Schritt der Erkundung des Gerätes wollten wir explizit herausfinden, ob der ungeübte Neurochirurg, der im Vorfeld keine Berührungen zur histopathologischen Befundung hatte, eine grundlegende Gewebeunterscheidung erarbeiten kann. Entsprechend dieser Fragestellung wurde keine intensiviertere neuropathologische Übung vorausgesetzt. Lediglich grundlegende Aspekte verschiedener Hirntumore und für deren Diagnostik unabdingbare Differenzierungsmerkmale wurden anhand der konfokalen Bilder mit einem Neuropathologen besprochen. So entstanden auch die zuvor beschriebenen Kriterien zur Evaluierung.

Es zeigte sich, dass verschiedene dieser Grundkriterien wiederholt in den gleichen Tumorentitäten bestimmt wurden, und dass sich alles in allem für viele Tumore ein spezifisches Bild darstellte. So hat sich das Meningeom mit seinen streifigen, feinen Zügen und seiner fast schon spinngewebsartigen Struktur deutlich von hirneigenen Gliomen unterschieden. Aber auch binnen einer solchen Tumorentität schien sich das hochgradige Gliom sogar vom niedriggradigen Gliom unterscheiden zu lassen, da niedriggradige Gliome eine deutlich fein gezeichnete axonale Struktur präsentieren. Dies geht auch mit dem histopathologischen Aspekt des high grade Glioms einher welches eine deutlich höhere Zelldichte beschreibt und somit die feine Differenzierung dieser Zellen und ihrer Zytoarchitektur erschwert. Schwannome, welche ebenfalls eine streifige, eher aus Bündeln bestehende Gewebsstruktur präsentieren, ließen sich von Meningeomen gut unterscheiden.

Manche Tumorentität, wie das Oligoastrozytom, das Paragangliom und das Lymphom sind eher selten auftretende Pathologien, sodass während des Untersuchungszeitraumes hier keine einschlägige Fallzahl generiert werden konnte. Ob die hierfür beschriebenen

Charakteristika wie Zellgröße und Zellanordnung wirklich allgemeingültig sind bleibt noch zu beweisen.

Aktuell müssen Neurochirurgen sich auf die Aussagen des Neuropathologen verlassen, wenn es darum geht, eine intraoperative histologische Gewissheit bezüglich des resezierten Materials zu gewinnen. Regragui et al. fand in einer retrospektiven Studie heraus, dass eine Übereinstimmung bezüglich der Frage, ob tumoröses Gewebe erfasst wurde, zwischen dem intraoperativen Schnellschnitt und dem endgültigen Paraffin-Schnitt in 96,6% zustande kam. In 92,6% der Fälle lag eine Übereinstimmung bezüglich der Dignität des Gewebes vor. Eine exakte Übereinstimmung des Schnellschnittes und der endgültigen Histologie lag in 87,6% der Fälle vor<sup>59</sup>.

Unsere Vergleichsserie mit dem histopathologischen Schnellschnittes ergab für die kurze Erfahrungszeit, für einen Teil der zu untersuchenden Pathologien, sehr zufriedenstellend Resultate. Insbesondere der Vergleich von high grade und low grade Gliomen zeigte, dass die Zukunftsvision der intraoperativen Gewebedifferenzierung und der davon abhängigen Resektionsentscheidung, mittels konfokaler Laserendomikroskopie greifbar ist. Es ist anzunehmen, dass bei der Anwendung in situ der Übergang von diffus verändertem high grade Gliomgewebe zum geordneteren, differenzierteren Normalgewebe in den Tumorrundzonen dargestellt werden kann.

Die Relevanz der intraoperativen Diagnosestellung eines Meningeoms kann durchaus hinterfragt werden. Meist lassen sich diese Tumore gut von dem umliegenden Gewebe präparieren und in toto resezieren. Die Differenzierung zum Meningeom WHO Grad II oder III war anhand der untersuchten Proben nicht möglich, da es sich hier bei allen Fällen um Grad I handelte. Ob die Entscheidung hin zu einem Resektionsende und postoperativer Bestrahlung bei einem höhergradig veränderten Meningeoms, zum Beispiel aufgrund seines infiltrativen Wachstums, durch die intraoperative Histologie getriggert wird, ist sicherlich immer eine Einzelfallentscheidung.

Unbefriedigender zeigten sich die Resultate bei den Metastasen. Wie schon in der ersten Serie festzustellen war, gestaltete es sich schwierig eine sich konsequent wiederholende Charakteristik bei diesen Proben zu erkennen. Dies kann man sicherlich durch die Heterogenität des Ursprungsgewebes erklären. Aufgrund der fehlenden anamnestischen Informationen, war somit eine adäquate Zuteilung nicht möglich. Positiv hervorzuheben ist jedoch, dass das Gewebe als pathologisch verändert erkannt wurde. Dies alleine ist durchaus eine Erkenntnis, welche dem Neurochirurgen bestätigt, dass die Pathologie erfasst wurde und, dass ein Erreichen eines sauberen Resektionsrandes nachgewiesen werden könnte.

Insgesamt bleibt jedoch am stärksten zu bemängeln, dass das Gerät in seiner jetzigen Form nicht für den grundlegenden Gedanken der konfokalen Laserendomikroskopie geeignet ist. Diese soll nämlich die Brücke zwischen der präoperativen Diagnostik und der histopathologischen Begutachtung schlagen. Erstrebenswert bleibt, dass der Neurochirurg mit hoher Sicherheit pathologisches Gewebe reseziert, ohne dabei gesundes Gewebe zu opfern und trotzdem ein Maximum an Resektion erreichen kann.

Bleibt also die Überlegung in welche Richtung sich dieses Gerät entwickeln muss. Zum einen ist es absolut prioritär das Gerät in eine tragbare Form zu bringen. Der Einsatz am OP-Tisch ist die einzige Möglichkeit der konfokalen Laserendomikroskopie in der Neurochirurgie einen wahren Stellenwert zu sichern.

Bis dahin darf der aktuelle Kenntnisstand jedoch nicht stagnieren. Jedoch ist hier festzuhalten, dass die konfokale Laserendomikroskopie in diesem diagnostischen Arsenal aktuell keinen Anspruch erhebt die Histopathologie zu ersetzen. Diese hat sich als der Goldstandard der Diagnostik durchgesetzt und wird aufgrund der sich anbietenden diagnostischen Möglichkeit bezüglich Gewebeaufbereitung und weiterer immunhistochemischer Analysen sicher nicht so leicht überholen lassen.

Diese diagnostische Vielfältigkeit kann aber auch in Zukunft als Beispiel für die konfokale Technik dienen. Die Evaluierung verschiedener Farbstoffe und gegebenenfalls Entwicklung spezifischer Farbstoffe sollte die Möglichkeit weiterer Innovationen bieten. Hiervon liegt zunächst die Untersuchung von Indozyanin Grün aufgrund seiner oben bereits erwähnten Eigenschaften am nächsten.

Den Einstieg in eine wirkliche alltägliche diagnostische intraoperative Option setzt aber auch voraus, dass die Technik nicht nur von einzelnen angewendet wird, sondern dass man hier eine Weiterbildung für Neurochirurgen anbietet. Diese könnten mittels der vorliegenden Daten in der Interpretation des Bildmaterials ausgebildet werden, um so einen echten Einzug in den OP-Saal zu ermöglichen und die konfokale Laserendomikroskopie zu einem begleitenden diagnostischen Tool zu entwickeln.



## 6. Ausblicke

Abschließend bleibt unsererseits zu schlussfolgern, dass die konfokale Laserendomikroskopie in der Neurochirurgie ein spannendes und vielversprechendes Tätigkeitsfeld darstellt. Aktuell befindet sich die Technik sicherlich noch in einer Frühphase, aber mit dem EndoMag1 bietet sich ein valides Gerät weitere Innovationen in diesem Gebiet zu erarbeiten. Unsere Vergleichsserie zeigt weiterhin, dass auch nach kurzer Einarbeitung Diagnosen mittels konfokaler Laserendomikroskopie in hoher Übereinstimmung mit der Histopathologie zu stellen sind. Einen Ersatz zum Schnellschnitt darzustellen, beansprucht die Technik hierbei jedoch nicht die Detailschärfe und Färbemöglichkeiten sind zur Zeit deutlich eingeschränkter, sodass die CLE als zusätzliches Hilfsmittel angesehen werden muss. Die Resultate zeigen jedoch, dass durch Weiterentwicklung der Technik und dem eventuellen Einsatz in situ eine zukunftssträchtige Technologie dahinter steckt, und zu dem Zeitpunkt eine Revolution der chirurgischen Resektion ermöglicht. Sicherlich sind hier noch ausreichende Stolpersteine zu überwinden, aber in einem wachsenden Netzwerk verschiedener Arbeitsgruppen soll hier über einen Wissensaustausch der Weg gebahnt sein, diese neue Technik zu einem Nutzen für Patient und Neurochirurg weiterzuentwickeln.

## 7. Literatur

1. Kirkpatrick DB. The first primary brain-tumor operation. *J Neurosurg.* 1984 Nov;61(5):809-13. PubMed PMID: 6387062.
2. J. Shah, "Endoscopy through the ages," *BJU International*, vol. 89, no. 7, pp. 645–652, 2002.
3. D. Schultheiss and F. Moll, *Die Geschichte Der Urologie in Dresden*, Springer, Berlin, Germany, 2009.
4. B. Verger-Kuhnke, M. A. Reuter, and M. L. Beccar'ia, "The biography of Maximilian Nitze (1848-1906) and its contribution to the urology," *Actas Urologicas Espanolas*, vol. 31, no. 7, pp. 697–704, 2007.
5. Netzhat, "The era Nitze chapter chapter 11(b) History of Endoscopy," 2005, <http://laparoscopy.blogs.com/endoscopy- history/chapter 11/>.
6. M. Nitze, *Lehrbuch Der Kystoskopie. Technik Und Klinische Bedeutung*, Von Bergmann, Wiesbaden, Germany, 1889.
7. Northwestern university Feinberg School of medicine. Department of history, <http://www.feinberg.northwestern.edu/neuro- surgery/residency/history>.
8. W. Hsu, K. W. Li, M. Bookland, and G. I. Jallo, "Keyhole to the brain: Walter Dandy and neuroendoscopy. Historical vignette," *Journal of Neurosurgery*, vol. 3, no. 5, pp. 439–442, 2009.

9. W. E. Dandy and K. D. Blackfan, "An experimental and clinical study on internal hydrocephalus," *JAMA*, vol. 61, pp. 2216–2217, 1913.
10. W. E. Dandy and K. D. Blackfan, "Internal hydrocephalus. An experimental clinical and pathological study," *The American Journal of Diseases of Children*, vol. 8, pp. 406–482, 1914.
11. W. E. Dandy, *Practice of Surgery*, chapter 1, WF Prior Company, Hagerstown, Md, USA, 1932.
12. T. Fay and F. C. Grant, "Ventriculoscopy and intraventricular photography in internal hydrocephalus," *JAMA*, vol. 80, pp. 461–463, 1923.
13. W. J. Mixer, "Ventriculoscopy and puncture of the floor of the third ventricle," *Boston Medical and Surgical Journal*, vol. 188, pp. 277–278, 1923.
14. J. E. Scarff, "Endoscopic treatment of hydrocephalus: description of the ventriculoscope and primary report of cases," *Archives of Neurology and Psychiatry*, vol. 35, pp. 853–861, 1936.
15. J. E. Scarff and B. Stookey, "Treatment of obstructive hydrocephalus by third ventriculostomy. Report of two cases," *Archives of Neurology*, vol. 36, pp. 1400–1411, 1936.

16. J. E. Scarff, "Treatment of obstructive hydrocephalus by puncture of the lamina terminalis and floor of the third ventricle," *Journal of neurosurgery*, vol. 8, no. 2, pp. 204–213, 1951.
17. H. H. Hopkins and H. J. Tiziani, "A theoretical and experimental study of lens centring errors and their influence on optical image quality," *British Journal of Applied Physics*, vol. 17, no. 1, article no. 303, pp. 33–54, 1966.
18. H. H. Hopkins, *Wave Theory of Aberrations*, Oxford university press, 1950.
19. C. W. Mc Combie and J. Smith, "Harold Horaz Hopkins. 6. December 1918-22. October 1994," *Biographical Memories Fellows of the Royal Society*, vol. 44, pp. 239–252, 1998
20. H. H. Hopkins and N. S. Kapany, "A flexible fibrescope, using static scanning," *Nature*, vol. 173, no. 4392, pp. 39–41, 1954.
21. Grunert P. From the idea to its realization: the evolution of minimallyinvasive techniques in neurosurgery. *Minim Invasive Surg.* 2013;2013:171369. doi: 10.1155/2013/171369. Epub 2013 Dec 17.
22. Stummer W, van den Bent MJ, Westphal M. Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011 Jun;153(6):1211-8. doi: 10.1007/s00701-011-1001-x. Epub 2011 Apr 9.
23. Lacroix M, Abi-Said D et al., „A multivariate analysis of 416 with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection and survival“. 2001 *J Neurosurg* 95(2): 190-198.

- 24 McGirt MJ, Chaichana KL et al., „Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma“. 2009 J Neurosurg 119(1): 156-162
- 25 Knauth M, Wirtz CR, Tronnier VM, Aras N, Kunze S, Sartor K. Intraoperative MR imaging increases the extent of tumor resection in patients with high-grade gliomas. AJNR Am J Neuroradiol. 1999 Oct;20(9):1642-6. PubMed PMID: 10543634.
- 26 Sanai N, Berger MS, „Operative techniques for gliomas and the value of extent of resection“. 2009 Neurotherapeutics 6: 478-86
- 27 Stummer W, Tonn JC et al., „ Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study“. 2010 J Neurosurg
- 28 Stummer W, Tonn JC, Goetz C, Ullrich W, Stepp H, Bink A, Pietsch T, Pichlmeier U. 5-Aminolevulinic Acid-derived Tumor Fluorescence: The Diagnostic Accuracy of Visible Fluorescence Qualities as Corroborated by Spectrometry and Histology and Postoperative Imaging. Neurosurgery. 2014;74(3): 310-20
- 29 Stummer W, Nestler U, Stockhammer F, Krex D, Kern BC, Mehdorn HM, Vince GH, Pichlmeier U. Favorable outcome in the elderly cohort treated by concomitant temozolomide radiochemotherapy in a multicentric phase II safety study of 5-ALA. J Neurooncol. 2011 Jun;103(2):361-70
- 30 Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C, Goetz AE, Kiefmann R, Reulen HJ. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. Neurosurgery. 1998 Mar;42(3):518-25
- 31 Stepp H, Beck T, Pongratz T, Meinel T, Kreth FW, Tonn JCh, Stummer W. ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2007;26(2):157-64
- 32 Tilgner J, Herr M, Ostertag C, Volk B. „Validation of intraoperative smear preparations from stereotactic brain biopsies: intraoperative versus final diagnosis - influence of clinical factors“. Neurosurgery 2005

- 33 Uematsu Y, Owai Y, Okita R, Tanaka Y, Itakura T. „The usefulness and problem of intraoperative rapid diagnosis in surgical neuropathology“. *Brain Tumor Pathology* 2007
- 34 Zheng W, Harris M, Kho KW, Thong PS, Hibbs A, Olivo M, Soo KC. Confocal endomicroscopic imaging of normal and neoplastic human tongue tissue using ALA-induced-PPIX fluorescence: a preliminary study. *Oncol Rep.* 2004 Aug;12(2):397-401. PubMed PMID: 15254708.
- 35 Kiesslich R, Goetz M, Burg J, Stolte M, Siegel E, Maeurer MJ, Thomas S, Strand D, Galle PR, Neurath MF. Diagnosing *Helicobacter pylori* in vivo by confocal laser endoscopy. *Gastroenterology.* 2005 Jun;128(7):2119-23. PubMed PMID: 15940642
- 36 Kiesslich R, Goetz M, Vieth M, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2005 Oct;15(4):715-31. Review. PubMed PMID: 16278135
- 37 Yeung TM, Mortensen NJ. Advances in endoscopic visualization of colorectal polyps. *Colorectal Dis.* 2011 Apr;13(4):352-9. doi: 10.1111/j.1463-1318.2009.02142.x.
- 38 Thiberville L, Salaün M Bronchoscopic advances: on the way to the cells. *Respiration.* 2010;79(6):441-9. doi: 10.1159/000313495. Epub 2010 May 12.
- 39 Gheonea DI, Saftoiu A, Ciurea T, Popescu C, Georgescu CV, Malos A. Confocal laser endomicroscopy of the colon. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2010 Jun;19(2):207-11.
- 40 Dunbar KB, Okolo P 3rd, Montgomery E, Canto MI. Confocal laser endomicroscopy in Barrett's esophagus and endoscopically inapparent Barrett's neoplasia: a prospective, randomized, double-blind, controlled, crossover trial. *Gastrointest Endosc.* 2009; 70:645–654
- 41 Goetz M, Hoffman A, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. Confocal laser endoscopy: new approach to the early diagnosis of tumors of the esophagus and stomach. *Future Oncol.* 2006; 2:469–476

- 42 Sharma P, Meining AR, Coron E, Lightdale CJ, Wolfsen HC, Bansal A, Bajbouj M, Galmiche JP, Abrams JA, Rastogi A, Gupta N, Michalek JE, Lauwers GY, Wallace MB. „Real-time increased detection of neoplastic tissue in Barrett’s esophagus with probe-based confocal laser endomicroscopy: final results of an international multicenter, prospective, randomized, controlled trial“. *Gastrointestinal Endoscopy* 2011 Sep; 74(3):465-72.
- 43 Choi KS, Jung HY. Confocal laser endomicroscopy and molecular imaging in barrett esophagus and stomach. *Clin Endosc.* 2014 Jan;47(1):23-30. doi: 10.5946/ce.2014.47.1.23. Epub 2014 Jan 24. Review. PubMed PMID: 24570880; PubMed Central PMCID: PMC3928487
- 44 Wang KK, Carr-Locke DL, Singh SK, Neumann H, Bertani H, Galmiche JP, Arsenescu RI, Caillol F, Chang KJ, Chaussade S, Coron E, Costamagna G, Dlugosz A, Ian Gan S, Giovannini M, Gress FG, Haluszka O, Ho KY, Kahaleh M, Konda VJ, Prat F, Shah RJ, Sharma P, Slivka A, Wolfsen HC, Zfass A. Use of probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) in gastrointestinal applications. A consensus report based on clinical evidence. *United European Gastroenterol J.* 2015 Jun;3(3):230-54. doi: 10.1177/2050640614566066. Review. Erratum in: *United European Gastroenterol J.* 2015 Aug;3(4):404. PubMed PMID: 26137298; PubMed Central PMCID: PMC4480534.
- 45 Sankar T, Delaney PM, Ryan RW, Eschbacher J, Abdelwahab M, Nakaji P, Coons SW, Scheck AC, Smith KA, Spetzler RF, Preul MC. Miniaturized handheld confocal microscopy for neurosurgery: results in an experimental glioblastoma model. *Neurosurgery.* 2010 Feb;66(2):410-7; discussion 417-8. doi: 10.1227/01.NEU.0000365772.66324.6F
- 46 Foersch S, Heimann A, Ayyad A, Spoden GA, Florin L, Mpoukouvalas K, Kiesslich R, Kempfski O, Goetz M, Charalampaki P. Confocal laser endomicroscopy for diagnosis and histomorphologic imaging of brain tumors in vivo. *PLoS One.* 2012;7(7):e41760. doi: 10.1371/journal.pone.0041760. Epub 2012 Jul 24
- 47 Martirosyan NL, Cavalcanti DD, Eschbacher JM, Delaney PM, Scheck AC, Abdelwahab MG, Nakaji P, Spetzler RF, Preul MC. Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green to detect the boundary of infiltrative tumor. *J Neurosurg.* 2011 Dec;115(6):1131-8. doi: 10.3171/2011.8.JNS11559. Epub 2011 Sep 16. PubMed PMID: 21923240.

- 48 Schlosser HG, Suess O, Vajkoczy P, van Landeghem FK, Zeitz M, Bojarski C. Confocal neurolasermicroscopy in human brain - perspectives for neurosurgery on a cellular level (including additional comments to this article). *Cent Eur Neurosurg*. 2010 Feb;71(1):13-9. doi: 10.1055/s-0029-1237735. Epub 2009 Sep 28.
- 49 Sanai N, Eschbacher J, Hattendorf G, Coons SW, Preul MC, Smith KA, Nakaji P, Spetzler RF. Intraoperative confocal microscopy for brain tumors: a feasibility analysis in humans. *Neurosurgery*. 2011 Jun;68(2 Suppl Operative):282-90; discussion 290.
- 50 Eschbacher J, Martirosyan NL, Nakaji P, Sanai N, Preul MC, Smith KA, Coons SW, Spetzler RF. In vivo intraoperative confocal microscopy for real-time histopathological imaging of brain tumors. *J Neurosurg*. 2012 Apr;116(4):854-60.
- 51 Stummer W. The fear of 5-ALA--is it warranted? *World Neurosurg*. 2014 May-Jun;81(5-6):e30-1. doi: 10.1016/j.wneu.2013.09.048. Epub 2013 Sep 29
- 52 Kitabatake S, Niwa Y, Miyahara R, Ohashi A, Matsuura T, Iguchi Y, Shimoyama Y, Nagasaka T, Maeda O, Ando T, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Confocal endomicroscopy for the diagnosis of gastric cancer in vivo. *Endoscopy*. 2006 Nov;38(11):1110-4.
- 53 Lim LG, Yeoh KG, Srivastava S, Chan YH, Teh M, Ho KY. Comparison of probe-based confocal endomicroscopy with virtual chromoendoscopy and white-light endoscopy for diagnosis of gastric intestinal metaplasia. *Surg Endosc*. 2013 Dec;27(12):4649-55
- 54 Shahid MW, Buchner AM, Heckman MG, Krishna M, Raimondo M, Woodward T, Wallace MB. Diagnostic accuracy of probe-based confocal laser endomicroscopy and narrow band imaging for small colorectal polyps: a feasibility study. *Am J Gastroenterol*. 2012 Feb;107(2):231-9
- 55 Robles-Medranda C. Confocal endomicroscopy: Is it time to move on? *World J Gastrointest Endosc*. 2016 Jan 10;8(1):1-3
- 56 Sweet G, Standiford SB. Methylene-blue-associated encephalopathy. *J Am Coll Surg*.



2007 Mar;204(3):454-8

- 57 Haglund MM, Hochman DW, Spence AM, Berger MS. Enhanced optical imaging of rat gliomas and tumor margins. *Neurosurgery*. 1994 Nov;35(5):930-40
- 58 Hansen DA, Spence AM, Carski T, Berger MS. Indocyanine green (ICG) staining and demarcation of tumor margins in a rat glioma model. *Surg Neurol*. 1993 Dec;40(6):451-6
- 59 Regragui A, Amarti Riffi A, Maher M, El Khamlichi A, Saidi A. Accuracy of intraoperative diagnosis in central nervous system tumors: report of 1315 cases. *Neurochirurgie*. 2003 May;49(2-3 Pt 1):67-72

## 8. Publikationen

### **Confocal laser endomicroscopy in neurosurgery: a new technique with much potential.**

Breuskin D, Divincenzo J, Kim YJ, Urbschat S, Oertel J. Minim Invasive Surg.

2013;2013:851819. doi: 10.1155/2013/851819. Epub 2013 Jul 28. PubMed PMID: 23984062;

PubMed Central PMCID: PMC3745972

### **Confocal Laser Endomicroscopy in Neurosurgery-An Alternative to Instantaneous**

**Sections?** Breuskin D, Szczygielski J, Urbschat S, Kim YJ, Oertel J. World Neurosurg. 2017

Apr;100:180-185. doi: 10.1016/j.wneu.2016.12.128. Epub 2017 Jan 6. PubMed PMID:

28069420

### **Confocal laser endomicroscopy – a novel technique of diagnostics in neurosurgery?**

#### **Konfokale Laser Endomikroskopie – eine neue diagnostische Technik in der Neurochirurgie?**

David Breuskin<sup>1</sup>, Jana DiVincenzo<sup>1</sup>, Yoo-Jin Kim<sup>2</sup>, Steffi Urbschat<sup>1</sup>, Joachim Oertel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Neurochirurgie, <sup>2</sup>Institut für Pathologie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar.

64th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery  
Joint Meeting with the Polish Society of Neurosurgeons Monday, May 27, 2013

### **Comparing confocal laser endomicroscopy to instantaneous section**

David Breuskin<sup>1</sup>, Jana DiVincenzo<sup>1</sup>, Yoo-Jin Kim<sup>2</sup>, Steffi Urbschat<sup>1</sup>, Joachim Oertel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Neurochirurgie, <sup>2</sup>Institut für Pathologie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar.

64th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery  
Joint Meeting with the Polish Society of Neurosurgeons Monday, May 27, 2013

### **Intraoperative diagnostics of low grade vs high grade gliomas using confocal laserendomicroscopy .**

David Breuskin, Joachim Oertel, Klinik für Neurochirurgie Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar.

68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC)

## 9. Danksagung

Wem gebührt der erste Dank am meisten, wenn nicht dem, der es ermöglicht hat diese Arbeit zu verfassen. Prof. Oertel, vielen Dank für Ihre Unterstützung über diese mittlerweile vielen Jahre die ich unter Ihrer Aufsicht habe lernen und mich entwickeln dürfen. Man kann sich schwer vorstellen wie das Leben einem gespielt hätte, hätten Sie nicht den Weg in das beschauliche Homburg gefunden. Danke Chef, dass Sie mich zum dran bleiben motivieren und selbst den Lauf nicht abreißen lassen.

Danke aber auch an Prof. Urbschat, die mit geduldiger und ruhiger Art das Pendant liefert. Danke für die Unterstützung bei dieser Arbeit, sowie die Erinnerungswerten Momente abseits der Klinik. Auf das uns noch auf so manchen Journal Club ein ausgelassener Tanzabend folgt.

Danke an Prof. Yoo-Jin Kim, den ich bereits im Studium als Dozenten kennenlernen durfte und der mir beratend von neuropathologischer Seite her Unterstützung bot. Auch wenn man sich jetzt nicht mehr so häufig sieht, würde ich mich freuen wenn unsere Wege sich erneut kreuzen. Nach dem Motto: Yoo, Mi, Jin?

Der letzte Dank gebührt denen, die nichts mit dieser Arbeit zu tun haben und dabei nicht wissen, wie wichtig sie deswegen für diese Arbeit sind. Voran die Eltern und die Schwester, die längsten Wegbegleiter, Zuhörer und Unterstützer. Danke, dass auch noch eure kleinsten Tugenden und Macken mich dahin geführt haben, wo ich heute bin.

Und dann sind ja da noch die Freunde. So mancher Frust lasst ihr verschwinden, ohne es zu wissen, weil ihr genau wisst, was ihr mir gutes tun könnt, ohne es aussprechen zu müssen.