

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Jakob Steiger

Experimentelle Untersuchungen zur Quantifizierung von δ -Aminolävulinsäure-
Fluoreszenzsignalen bei Meningeomen und Glioblastomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jan-Malte Placke

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referent: Herr Priv.-Doz. Jan Frederick Cornelius

Korreferent: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

Cornelius, J.F., Placke, J.M., Knipps, J., Fischer, I., Kamp, M., Steiger, H.J., 2016.
Minispectrometer with handheld probe for 5-ALA based fluorescence-guided surgery
of brain tumors: preliminary study for clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn.
Ther.* doi:10.1016/j.pdpdt.2016.12.007

Zusammenfassung

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass das rezidivfreie Überleben von Patienten mit Glioblastomen oder Meningeomen stark von der Radikalität der Tumorresektion abhängt (Simpson, 1957; McGirt et al., 2009; Nanda et al., 2015). In den letzten Jahren hat insbesondere bei der Resektion von Glioblastomen der Einsatz von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) bei fluoreszenzgestützter Tumorresektion zur Verlängerung des rezidivfreien Überlebens der Patienten geführt (Stummer et al., 2006). Die Fluoreszenz wird bei diesem Verfahren mit Hilfe eines speziellen Operationsmikroskops rein subjektiv durch den Operateur eingeschätzt.

Ziel dieser Arbeit war es, laborexperimentell an Glioblastomen und Meningeomen ein objektives Verfahren zur Fluoreszenzquantifizierung zu untersuchen.

Hierfür wurde der Prototyp eines Fiberoptikspektrometers mit kleiner Handsonde (*Oceanoptics*) getestet, welches potenziell im OP eingesetzt werden könnte und die Ergebnisse mit einem kommerziellen Spektrometer, dem *Microplatereader Safire (Tecan)*, verglichen. Im ersten Schritt wurden Verdünnungsreihen mit bekannten Protoporphyrin IX (PPIX)-Konzentrationen mit beiden Spektrometern vermessen (Kalibrierung). PPIX ist ein Stoffwechselprodukt der 5-ALA und für die in Tumorzellen beobachtete Fluoreszenz verantwortlich. In einem zweiten Schritt wurden sieben Glioblastom- und zehn Meningeomproben von Patienten mit dem Fiberoptikspektrometer vermessen. Dabei wurden Fluoreszenzmessungen mit unterschiedlichen Abständen zwischen Fibersonde und Tumorprobe durchgeführt (0 bis 2 Millimeter in 0.5 Millimeter-Intervallen). Weiterhin wurden die Proben im Safire-Spektrometer vermessen.

Ein linearer Zusammenhang konnte für die Verdünnungsreihen durch die Fluoreszenzvermessung mit beiden Spektrometern gezeigt werden (Fiberoptikspektrometer: $R^2=93.5\%$; $F=492.114$; $p<0.001$; Safire: $R^2=99.1\%$; $F=5015.284$; $p<0.001$). Bei der Tumorfluoreszenzvermessung zeigten Glioblastome bei jedem Abstand zwischen Fibersonde und Tumor eine signifikant höhere Fluoreszenz als Meningeome. Der Zusammenhang zwischen Distanz von Fibersonde zu Tumorgewebe und Fluoreszenzintensität erwies sich als quadratisch abnehmend (Glioblastome: $R^2=0.226$; $F=4.683$; $p<0.5$; Meningeome: $R^2=0.255$;

F=8.042; $p < 0.01$). Um das unterschiedliche Fluoreszenzverhalten der Tumore weiter abzuklären, wurde immunhistologisch die Ferrochelataseaktivität (FECH) bestimmt, welche als Schrittmacher im Protoporphyrin IX-Metabolismus gilt (Hefti et al., 2011).

Das getestete Fiberoptikspektrometer erwies sich gegenüber dem Safirespektrometer als weitgehend gleichwertiges Instrument zur Messung der PPIX-Fluoreszenz. Gegenüber dem Safirespektrometer hat es den großen Vorteil, dass nicht nur eine Lösung bzw. Suspension sondern auch natives Tumorgewebe direkt vermessen werden kann. Weiterhin konnte das Fiberoptikspektrometer ein unterschiedliches Fluoreszenzverhalten zwischen Glioblastomen und Meningeomen nachweisen. Dies war durch eine rein subjektive Betrachtung nicht möglich. Insgesamt denken wir, dass das Verfahren leicht in den klinischen Alltag integriert werden kann und dort z.B. durch ein „Scannen“ der Tumorgrenzen nach Tumorexstirpation eine residuelle Tumordinfiltration anzeigen kann. Dies würde eine radikalere Tumorresektion ermöglichen. In weiteren Studien wird aktuell geprüft, wie sich das Fluoreszenzverhalten von Tumoren im Übergangsbereich zu normalem Gewebe verhält.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALA/ 5-ALA	5-Aminolävulinsäure
cm	Centimeter
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Flair	<i>Fluid Attenuated Inversion Recovery</i>
Gy	<i>Gray</i>
IT	Informationstechnik
kg	Kilogramm
KM	Kontrastmittel
LED	Licht emittierende Diode
MCLS	<i>Multi channel light source</i>
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
nm	Nanometer
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDT	Photodynamische Therapie
PPIX	Protoporphyrin IX
SL	Stammlösung
Vs.	Versus
WHO	World Health Organisation
ZL	Zwischenlösung
µg	Mikrogramm

μ l

Mikroliter

$^{\circ}$ C

Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER 5-AMINOLÄVULINSÄURE	2
1.2 VERÄNDERUNG DES HÄMBIOSYNTHESEWEGS IN NEOPLASTISCHEN ZELLEN	3
1.3 MEDIZINISCHE EINSATZMÖGLICHKEITEN DER 5-AMINOLÄVULINSÄURE –UND BEDEUTUNG SEINES STOFFWECHSELPRODUKT PPIX	3
1.4 DAS GLIOBLASTOM	3
1.4.1 Präoperative Diagnostik	4
1.4.2 Histologische und molekulargenetische Diagnostik	5
1.4.3 Therapie	6
1.5 DAS MENINGEOM.....	6
1.5.1 Präoperative Diagnostik	7
1.5.2 Postoperative Diagnostik - pathomorphologische Meningeomtypen	8
1.5.3 Therapie	9
1.5.4 Experimentelle Therapieansätze	9
1.6 MÖGLICHKEITEN ZUR QUANTIFIZIERUNG DER 5-ALA FLUORESZENZSIGNALE IM TUMOR.....	10
1.7 PROBLEMSTELLUNG.....	11
1.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	12
2 PATIENTEN UND METHODEN	13
2.1 AUFBAU DER MESSAPPARATUREN	13
2.1.1 Chemikalien und Geräte.....	13
2.1.2 Aufbau des Spektrometers mit Fibersonde.....	14
2.1.3 Aufbau Safire	16
2.2 VERDÜNNUNGSREIHEN VON IN LÖSUNG GEBRACHTEM PROTOPORPHYRIN IX	17
2.2.1 Herstellung der Verdünnungsreihen des PPIX	17
2.2.2 Fluoreszenzmessung der Verdünnungsreihen mittels Fiberoptik	18
2.2.3 Fluoreszenzmessung der Verdünnungsreihen mittels Safire	20
2.3 FLUORESZENZVERMESSUNG DER TUMORPROBEN	20
2.3.1 Einschlusskriterien der Patienten.....	21

2.3.2	Durchführung der Fluoreszenzmessung der unbehandelten Tumorproben ex vivo mit dem Fiberoptikspektrometer	21
2.3.3	Quantifizierung des perifokalen Ödems.....	23
2.3.4	Durchführung der Fluoreszenzmessung der lysierten Tumore	24
2.4	SPEZIALFÄRBUNG DER TUMORPROBEN MIT FERROCHELATASE-ANTIKÖRPERN	25
2.5	STATISTISCHE METHODEN	25
3	ERGEBNISSE	26
3.1	STUDIENPOPULATION	26
3.2	VALIDIERUNG DES SPEKTROMETERS DURCH VERDÜNNUNGSREIHEN	27
3.3	FLUORESZENZVERMESSUNG DER VERDÜNNUNGSREIHEN MITTELS SAFIRE.....	29
3.4	VERMESSUNG DER FLUORESEZENZSIGNALSTÄRKEN DER TUMORSTÜCKE MIT DEM FIBEROPTIKSPEKTROMETER - EX VIVO.....	31
3.4.1	Unterschiede im Fluoreszenzverhalten der Glioblastome und Meningeome bei 0 mm..	31
3.4.2	Unterschiede des Fluoreszenzverhaltens bei Glioblastomen und Meningeomen bei zunehmendem Abstand – 0.5; 1; 1.5 und 2 mm	32
3.4.3	Zusammenhang Perifokales Ödem mit Fluoreszenzsignalstärke	38
3.5	VERMESSUNG DER LYSIERTEN TUMORE - ÜBERLEGUNG ZUR ERSTEN ANNÄHERUNG AN ABSOLUTE WERTE ..	39
3.5.1	Spektrometrische Vermessung der lysierten Glioblastome	41
3.5.2	Spektrometrische Vermessung der lysierten Meningeome.....	45
3.5.3	Vergleich der berechneten absoluten PPIX Konzentrationen Glioblastom- und Meningeomproben.....	48
3.5.4	Vergleich der Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Messinstrumente	50
3.6	POSTOPERATIV ANDERS KLASSIFIZIERTE TUMORPROBEN.....	52
3.7	FEINGEWEBLICHE UNTERSUCHUNG MIT SPEZIELLEM FERROCHELATASEANTIKÖRPER	55
4	DISKUSSION	57
4.1	VERDÜNNUNGSREIHEN	57
4.2	FLUORESZENZVERMESSUNG DER TUMORSTÜCKE	58
4.3	VERMESSUNG DER LYSIERTEN TUMORE – EIN MODELL ZUR ERMITTLUNG VON ABSOLUTEN PPIX-KONZENTRATION	60
4.4	VERMESSUNG DER POSTOPERATIV ANDERS KLASSIFIZIERTEN TUMORPROBEN	61
4.5	HISTOPATHOLOGISCHE AUSWERTUNG DER FERROCHELATASEANTIKÖRPER FÄRBUNG	63
4.6	LIMITATIONEN DER STUDIE	64
4.7	AUSBLICK	65
5	VERZEICHNISSE	67

5.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	67
5.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	70
5.3	LITERATURVERZEICHNIS.....	71

1 Einleitung

In der neurochirurgischen Therapie der Glioblastome zeigte sich durch die Einführung der fluoreszenzgestützten Tumorsektion eine signifikante Überlebenszeitverlängerung der Patienten (Stummer et al., 2006). Zur fluoreszenzgestützten Resektion wird die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) verwendet. Diese wird in höherem Maße von Tumorzellen als vom physiologischen Gehirngewebe aufgenommen und zu Protoporphyrin IX (PPIX) verstoffwechselt (Peng et al., 1997). Durch die Eigenschaft des PPIX unter Blaulicht rot zu fluoreszieren, ist es dem Operateur möglich, das rot fluoreszierende Tumorgewebe von dem nicht fluoreszierenden Hirngewebe besser zu unterscheiden und somit geringste Tumorreste, die mittels konventioneller Operationsmethode nicht erkennbar wären, zu entfernen.

Die fluoreszenzgestützte Tumorsektion wird in experimentellen Studien heute auch bei Meningeomen getestet und zeigt bei diesen Vorteile für den Patienten. Auch wenn Meningeome im Allgemeinen als gutartig und gut therapierbar gelten, zeigen sich insbesondere bei höhergradigen Meningeomen (WHO Grad II und III) häufiger Rezidive. Vor allem bei Patienten mit WHO Grad II und III Meningeomen zeigte sich ein Benefit durch die fluoreszenzgestützte Resektion (Cornelius et al., 2014).

Die fluoreszenzgestützte Resektion erfolgt heute durch Operationsmikroskope mit speziellen Lichtfiltern. Die Einschätzung der Fluoreszenzsignalstärke wird subjektiv vom Operateur getroffen und ist damit stark von der Expertise des Operateurs abhängig. Dabei erschweren u.a. ein unterschiedlicher Betrachtungsabstand und Betrachtungswinkel die Einschätzung der Fluoreszenzstärke. Insbesondere in Resektionshöhlen ist es schwierig, die Fluoreszenz richtig einzuschätzen (Kim et al., 2010 ; Rapp et al., 2014). Um Fluoreszenz objektiv zu messen, entwickelten *Kim et al.(2010)* eine Methode, die auf einem kleinen Spektrometer und einer fiberoptischen Sonde basiert, welche direkt dem Tumorgewebe aufgelegt werden kann und es ermöglicht, Fluoreszenzsignale quantitativ zu erfassen (Kim et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wird die Übertragbarkeit dieser Methode sowie die klinische Anwendbarkeit im Rahmen der Gliom- und Meningeomchirurgie in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf eingehend untersucht.

1.1 Biochemische Eigenschaften der 5-Aminolävulinsäure

Bei der 5-ALA handelt es sich um eine Aminosäure, welche physiologisch im Organismus von Säugetieren gebildet wird und eine Vorstufe des Häms darstellt. Wie bei Peng *et al.*(1997) dargestellt, umfasst die Hämbiosynthese 8 enzymatische Reaktionen, welche teilweise im Mitochondrium und teilweise im Zytosol stattfinden: Im ersten Schritt wird aus einem *Succinyl-CoA* und einem *Glycin* durch die *ALA-Synthase* im Mitochondrium 5-ALA gebildet. Dieses gelangt ins Zytosol. Hier wird es über drei enzymatische Reaktionen zu *Coproporphyrinogen III* weiter verstoffwechselt und gelangt anschließend wieder ins Mitochondrium. Die *Protoporphyrinoxidase* wandelt *Coproporphyrin III* in *Protoporphyrin IX* (PPIX) um. In einem letzten Schritt wird durch die *Ferrochelatase* aus dem PPIX und einem Eisen-Ion das Häm synthetisiert (Peng *et al.*, 1997). Der oben beschriebene Stoffwechselweg ist in Abbildung 1 dargestellt.

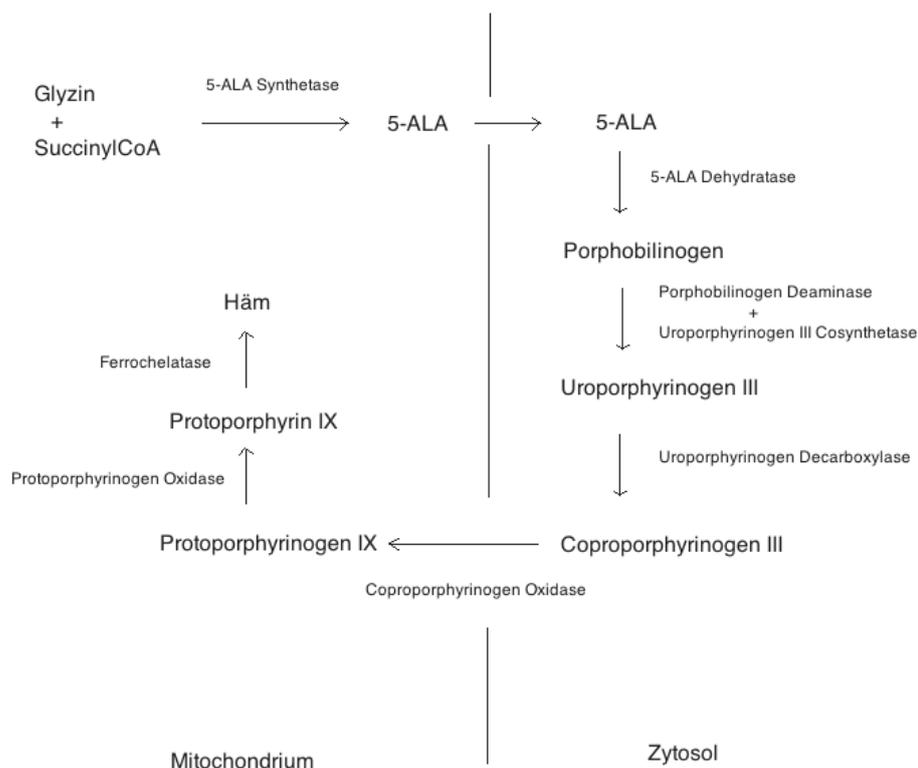


Abbildung 1 Vereinfachte Schemazeichnung der Hämbiosynthese, orientiert an Peng *et al.*, 1997

1.2 Veränderung des Hämbiosynthesewegs in neoplastischen Zellen

Für einige Tumore konnte gezeigt werden, dass ihre neoplastischen Zellen eine andere Zusammensetzung und Aktivität der Enzyme des Hämbiosynthesewegs besitzen. So war häufig die Aktivität der *ALA-Synthase* und der *Porphybilinogen-Desaminase* erhöht, wohingegen die Aktivität der *Ferrochelatase* verringert war. Diese Kombination führt zu einer Akkumulierung des PPIX in neoplastischen Zellen, in welchen grundsätzlich ein höherer Stoffwechsel herrscht (Bedwell et al., 1992; Hefti et al., 2011).

1.3 Medizinische Einsatzmöglichkeiten der 5-Aminolävulinsäure – und Bedeutung seines Stoffwechselprodukt PPIX

Zwei Eigenschaften machen das PPIX für den medizinischen Einsatz interessant. Zum einen lässt sich PPIX unter Bestrahlung mit einem blauen Exzitationslicht zu roter Fluoreszenz anregen. Daraus entsteht die Möglichkeit der photodynamischen Diagnostik (PDD), bei der zwischen neoplastischen Zellen mit hoher PPIX-Konzentration gegenüber normalen Zellen mit niedrigen PPIX Spiegeln differenziert werden kann (Colditz et al., 2012). Zum anderen besitzt PPIX in hohen Konzentrationen die Eigenschaft, auf Zellen photosensibilisierend zu wirken. Diese Eigenschaft macht man sich bei der photodynamischen Therapie (PDT) zu Nutze, indem durch eine Bestrahlung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 635 nm eine vermehrte Radikalbildung und der Zelltod induziert werden (Juzeniene et al., 2007). PDT und PDD werden in vielen verschiedenen medizinischen Bereichen angewandt (Kennedy et al., 1990; Juzeniene et al., 2007). In der Neurochirurgie hat sich vor allem die PDD bei Glioblastomen in Form der ALA-gestützte Tumorsektion klinisch etabliert und zu einer Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten geführt (Stummer et al., 2006).

1.4 Das Glioblastom

Die Glioblastome gehören in die Gruppe der Gliome und stellen mit einer Inzidenz von 0.59 bis 3.69 pro 100.000 Personen den häufigsten Subtyp der astrozytären Tumore beim Erwachsenen dar, wobei Männer im Verhältnis von drei zu zwei häufiger betroffen sind als Frauen. Es zeigt sich eine Häufung der Erkrankung im sechsten Lebensjahrzehnt (Ostrom et al., 2014). Sie werden nach der WHO Klassifikation den Grad IV Gehirntumoren zugeordnet und entstehen entweder aus Astrozytomen eines niedrigeren WHO Grades wie z.B. aus

einem anaplastischen Astrozytom (WHO III) oder *de novo*. Glioblastome gehen von den astrozytischen Gliazellen aus, zeigen ein infiltratives Wachstum und gehen mit einer äußerst schlechten Fünfjahresüberlebensrate von unter fünf Prozent einher. Das mediane Überleben nach Diagnosestellung liegt heute auch unter optimaler Therapie meistens bei nur 12 bis 15 Monaten (Sant et al., 2012). Es gibt positive prognostische Faktoren, welche die Überlebenszeit der Patienten verlängern können. Zu diesen gehören ein hoher Karnofsky Index, ein vorzugsweise junges Patientenalter und in besonderem Maße die Radikalität der Resektion des Tumors (Grabowski et al., 2014; Stupp et al., 2005; Bloch et al., 2012).

Die Symptome eines Glioblastoms können sich beim Patienten anfangs sehr heterogen manifestieren. Es zeigen sich häufig Symptome eines erhöhten Hirndruckes. Jüngere Patienten fallen dabei häufig mit fokalen oder seltener generalisierten epileptischen Anfällen auf, wobei ältere Patienten häufiger durch Symptome einer kognitiven Verwirrung auffällig werden (Posti et al., 2014).

1.4.1 Präoperative Diagnostik

Eine entscheidende Rolle in der präoperativen Diagnostik und Klassifikation der Glioblastome spielt die Bildgebung. Durch diese können Aussagen zu Lokalisation, Operabilität und Aggressivität des Tumors gemacht werden. Dabei hat die kontrastmittelgestützte Magnetresonanztomografie (MRT) die Computertomografie (CT) in den meisten Neurochirurgischen Kliniken weitestgehend verdrängt. Diese wird standardmäßig mit gadoliniumhaltigen Kontrastmittel durchgeführt (Treister et al., 2014). In der MRT zeigen Glioblastome gegenüber niedriggradigeren Astrozytomen häufig eine stärkere Kontrastmittelaufnahme, die charakteristischerweise girlanden- oder ringförmig ist. Es zeigen sich häufig ausgedehnte Nekrosen und ein ausgeprägtes perifokales Ödem. Das Ausmaß der Kontrastmittelaufnahme, die Größe der Nekrose und die Größe des perifokalen Ödems sind invers mit der Überlebenszeit des Patienten korreliert (Lacroix et al., 2001).

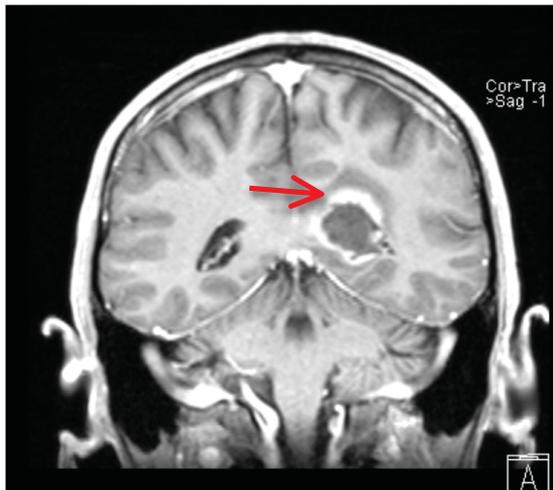


Abbildung 2 Frontalschnitt eines Schädel MRTs in T1 mit Kontrastmittel (KM) eines Glioblastompatienten aus unserer Studie (Pfeilmarkierung Tumor)

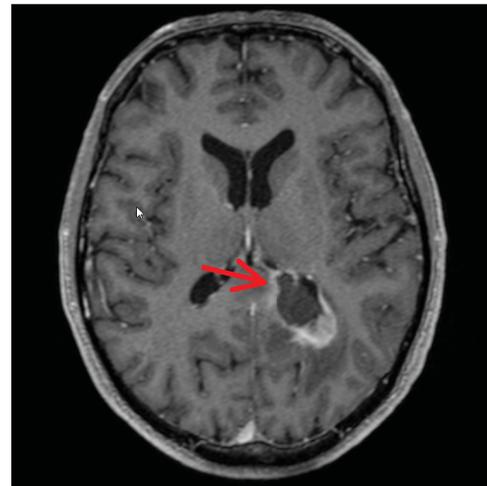


Abbildung 3 Horizontalschnitt des Schädel MRTs in T1 Sequenz mit KM eines Glioblastompatienten aus unserer Studie (Pfeilmarkierung Tumor)

1.4.2 Histologische und molekulargenetische Diagnostik

Postoperativ wird eine histologische Differenzierung durchgeführt und die Diagnose des Glioblastoms gesichert. Das Glioblastom wird der großen Gruppe der neuroepithelialen Tumoren zugeordnet und zeigt ein histologisches Bild mit hoher Zelldichte, welche starke Zell- und Kernpolymorphien aufweisen. Des Weiteren zeigen sich häufig ausgeprägte Nekrosen, die teils strichförmig imponieren und teils palisadenartig von Tumorzellen umrandet sind (Klöppel et al., 2012). Zur Bestimmung der Aggressivität des Tumors wird der MIB1/Ki67 Index bestimmt, der bei hoher Aktivität auf eine schlechte Prognose des Patienten hinweist – positive Korrelation des MIB1/Ki67 Index zu Aggressivität (Johannessen and Torp, 2006). Eine weitere Säule der postoperativen Diagnostik ist die molekulargenetische Untersuchung des Tumorgewebes. Hier wird die Aktivität der Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) untersucht, indem überprüft wird, ob die Promotorregion der MGMT methyliert ist. Durch Methylierung der MGMT-Promotorregion wird dieses Enzym inaktiviert, wodurch alkylierende Substanzen (z.B. Temozolomid) eine stärkere zytotoxische Wirkung an dem Gewebe entfalten können (Weller et al., 2010; Weller et al., 2015; Tanboon et al., 2015).

1.4.3 Therapie

Bei Glioblastomen wird heute möglichst eine Dreifachtherapie angewandt bestehend aus einer möglichst radikalen Resektion, einer adjuvanten partiellen Bestrahlung des Schädels im Bereich des Resttumors und eine Chemotherapie mit Temozolomid (Mirimanoff et al., 2006; Stummer et al., 2006; Eljamel, 2015; Della Puppa et al., 2014a; Julka et al., 2013). Die Operation wird im Allgemeinen mit Hilfe eines speziellen Operationsmikroskops in Form einer 5-ALA fluoreszenzgestützten Resektion durchgeführt (Coburger et al., 2015; Stummer et al., 2006). Das Operationsmikroskop besitzt zwei Lichtquellen. Zum einen eine Lichtquelle, die weißes Licht aussendet und bei jedem konventionellen Operationsmikroskop eingesetzt wird. Zum anderen besitzt das Operationsmikroskop zur fluoreszenzgestützten Resektion eine Blaulichtquelle (405 nm), welche die vom Tumor selektiv aufgenommene 5-ALA zur roten Fluoreszenz anregt. Durch dieses Verfahren ist es dem Neurochirurgen möglich, eine radikalere Exstirpation des malignen Gewebes durchzuführen und gleichzeitig das gesunde Gewebe zu schonen, wodurch eine Überlebenszeitverlängerung der Patienten erreicht werden kann (Stummer et al., 2006).

Die Bestrahlung der Patienten erfolgt als adjuvante partielle Schädelbestrahlung. Durch ein postoperatives, magnetresonanztomographisches oder computertomographisches Bild wird das Bestrahlungsfeld mit dem Resttumor bzw. dem Resektionsrand ausgewählt und fraktioniert in mehreren Sitzungen mit einer Gesamtdosis von 60 Gy bestrahlt (Fiveash and Spencer, 2003; Sultanem et al., 2004).

Bei dem als Chemotherapeutikum mittlerweile standardmäßig eingesetzten Temozolomid handelt es sich um ein oral eingesetztes Alkylanz, welches die DNA-Replikation über Methylierungen hemmt und das Wachstum der Glioblastomzellen verlangsamt (Stupp et al., 2001; Mirimanoff et al., 2006).

1.5 Das Meningeom

Die Gruppe der Meningeome macht ca. 30 Prozent aller Gehirntumore aus. Meningeome kommen in einem Verhältnis von zwei zu eins häufiger bei Frauen als bei Männern vor, mit einem Altersgipfel im sechsten Lebensjahrzehnt (Wiemels et al., 2010). Für die Entstehung der Meningeome werden als sehr wahrscheinliche Risikofaktoren eine Schädelbestrahlung in der Kindheit und die Neurofibromatose Typ 2 verantwortlich gemacht (Ron et al., 1988; Lamszus et al., 2000). Die Meningeome werden je nach Infiltrations- und

Wachstumsverhalten nach WHO in die Grade I bis III eingeteilt. Über 90 Prozent werden dem gutartigen WHO Grad I zugeordnet, fünf bis sieben Prozent dem atypischen Meningeom WHO Grad II und ein bis drei Prozent dem bösartigen Meningeom WHO Grad III (Pasquier et al., 2008). Meningeome können sowohl intrakraniell als auch intraspinal vorkommen. Intrakraniell sind die häufigsten Lokalisationsorte parasagittal, an der Falx cerebri, an der Konvexität der Großhirnhemisphären, am Keilbeinflügel und an der Olfaktoriusrinne (Moskopp et al., 2005).

Die Symptome, mit denen sich die Patienten vorstellen, sind sehr heterogen und abhängig von Größe und Lokalisation des Tumors. Bei großen Tumoren können sich Symptome eines gesteigerten Hirndrucks mit Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen zeigen. Bei kleineren Tumoren spielt die Lokalisation die entscheidende Rolle hinsichtlich des fokalen neurologischen Defizites. Eine weitere häufige Manifestation sind epileptische Anfälle. Nicht selten handelt es sich bei Meningeomen um inzidentelle Funde bei bildmorphologischen Aufnahmen des Kopfes im Rahmen anderer Ereignisse (Lumenta, 2010).

1.5.1 Präoperative Diagnostik

Bei Verdacht auf ein Meningeom sollte analog zu anderen Hirntumoren eine kontrastmittelgestützte computertomografische oder magnetresonanztomografische Bildgebung erfolgen. Diese gibt erste Hinweise bezüglich Ätiologie der Raumforderung und ist zur präoperativen Planung unerlässlich. Bei niedriggradigen Meningeomen (WHO Grad I) findet sich eine homogene kontrastmittelaufnehmende Raumforderung mit Kontakt zu den Hirnhäuten. Eine inhomogene Kontrastmittelaufnahme mit Kontakt zu den Hirnhäuten lässt an ein höhergradiges Meningeom (WHO Grad II oder Grad III) denken (Moskopp et al., 2005).

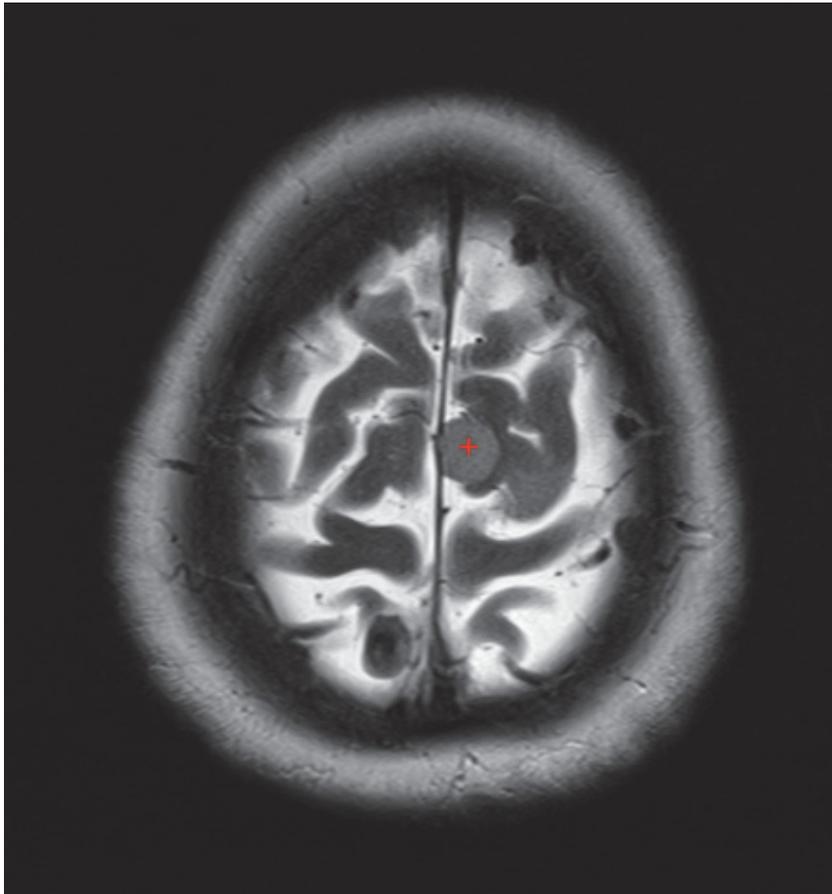


Abbildung 4: MRT Bild mit Meningeomen (WHO I) von einem Patienten aus unserer Studie (Tumor durch rotes Kreuz markiert)

1.5.2 Postoperative Diagnostik - pathomorphologische Meningeomtypen

Zur Klassifizierung des Gewebes erfolgt postoperativ eine histologische Untersuchung. Unter den verschiedenen benignen Meningeomen (WHO I) werden verschiedene Subtypen unterschieden, von denen das meningeotheliomatöse Meningeom der häufigste Subtyp ist. Im histologischen Bild zeigen sich zahlreiche Zwiebschalenformationen und Psammonkörper. Es zeigt sich bei allen benignen Meningeomen kein Anhalt für infiltratives Wachstum und kein erhöhter Mitoseindex. Zur Gruppe der Meningeome WHO Grad II gehören das atypische, klarzellige und das chordoide Meningeom. Das atypische Meningeom, das häufigste Meningeom WHO Grad II, zeigt eine gesteigerte Mitoserate von über vier Mitosen pro 10 Gesichtsfeldern und eine Hirngewebsinfiltration. Die äußerst malignen Meningeome WHO Grad III werden unterteilt in rhabdoides, papilläres und das in dieser Gruppe am häufigsten vorkommende anaplastische Meningeom, welches eine maligne Zellarchitektur mit stark invasivem Charakter zeigt. Des Weiteren findet sich eine Mitoserate von über 20 Mitosen pro 10 Gesichtsfeldern (Klöppel et al., 2012).

1.5.3 Therapie

Die Therapie erfolgt entweder konservativ oder operativ. Ein konservatives Vorgehen wird bei multimorbiden Patienten mit hohem Operationsrisiko angestrebt. Des Weiteren können Patienten mit inzidentellen, kleinen und asymptomatischen Meningeomen zunächst konservativ behandelt werden, wobei bei diesen jährlich eine Reevaluation in Bezug auf Klinik, Tumorgröße und Tumorprogredienz durchgeführt werden sollte (Yano et al., 2006).

Bei symptomatischen Patienten, Patienten mit schneller Tumorprogression oder bildmorphologischen Hinweisen auf ein nicht gutartiges Tumorgeschehen sollte eine mikrochirurgische Exstirpation erfolgen. Dabei ist die Vollständigkeit der Resektion ein entscheidender Faktor für die Überlebenszeit des Patienten und wird nach Simpson (1957) in fünf Grade eingeteilt. Der Simpson-Grad eins entspricht einer totalen Tumorentfernung. Der Grad zwei entspricht einer vollständigen Tumorentfernung mit Koagulation des Tumoransatzes an der Dura, Grad drei einer vollständigen Tumorentfernung ohne Koagulation des Ansatzes an der Dura, Grad vier einer unvollständigen Entfernung des Tumors und Grad fünf einer Dekompression mit oder ohne Biopsie (Simpson, 1957).

Bei einer subtotalen Meningeomresektion (Simpson Grad >2) ist eine postoperative Bestrahlung bei Meningeomen WHO Grad I in den meisten Fällen nicht indiziert, da sich für den Patienten keinen Überlebensvorteil bietet (Soyuer et al., 2004). Bei höhergradigen Meningeomen WHO Grad II und III besteht noch Unklarheit über den Nutzen der postoperativen Schädelbestrahlung bei inkompletter Tumorresektion (Alexiou et al., 2010). Mair et al. (2011) sagen in ihrer Studie, dass Patienten mit subtotaler Tumorresektion eines atypischen Meningeoms durchaus länger progressionsfrei überleben (Mair et al., 2011), wohingegen Hardesty et al. keinen Vorteil bei den Patienten durch eine postoperative stereotaktische Bestrahlung sehen (Hardesty et al., 2013). In einer weiteren großen klinischen Studie aus dem Jahr 2014 sprechen sich Choi et al. (2014) für eine postoperative Schädelbestrahlung höhergradiger Meningeome Grad II und III aus, wobei ebenfalls eine Korrelation zwischen Höhe des Mitoseindex und Strahlenresistenz vermutet wird, wonach anaplastische Meningeome weniger strahlensensibel seien. (Choi et al., 2014)

1.5.4 Experimentelle Therapieansätze

Im Gegensatz zu der Therapie der malignen Gehirntumore findet bei der Standardtherapie der Meningeome die 5-ALA fluoreszenzgestützte Tumorresektion heute noch keine Anwendung. Die Vorbehandlung mit 5-ALA und die fluoreszenzgestützte Resektion werden

in Studien analog zu der bereits etablierten Therapie bei den Glioblastomen durchgeführt (Della Puppa et al., 2014a; Coluccia et al., 2010; Cornelius et al., 2014). Die Ratio hierfür ist eine Studie aus dem Jahre 2010, in der erstmalig in einer größeren Serie gezeigt wurde, dass auch Meningeome die Eigenschaft zur Rotfluoreszenz nach Gabe von 5-ALA besitzen. Eine positive Korrelation zwischen Malignitätsgrad und Fluoreszenz konnte in dieser Studie aber nicht festgestellt werden (Coluccia et al., 2010). Eine weitere Studie zeigte hingegen eine positive Korrelation zwischen der vom Operateur beobachteten Stärke der Fluoreszenz und dem WHO Grade des Meningeoms. Des Weiteren wurde in der Studie eine Verbesserung des Ausmaßes der Resektion, insbesondere bei höhergradigen Meningeomen beobachtet (Cornelius et al., 2014). Eine Studie aus dem Jahre 2014 beschäftigt sich mit der 5-ALA fluoreszenzgestützten Resektion im Hinblick auf die oft schwer resezierbaren, den Knochen infiltrierenden Meningeome und benennt die 5-ALA fluoreszenzgestützte Resektion als ein in der Zukunft sinnvolles Werkzeug in Bezug auf die Knocheninfiltration (Della Puppa et al., 2014b).

1.6 Möglichkeiten zur Quantifizierung der 5-ALA Fluoreszenzsignale im Tumor

Das aus 5-ALA entstandene PPIX besitzt die Eigenschaft zur Fluoreszenz. Bei einer Fluoreszenz werden die durch das Licht eintreffenden Photonen von Molekülen absorbiert. Die übertragene Energie wird dabei zum Teil zu Hitze und zum anderen Teil zu emittierendem Licht mit geringerer Energie umgewandelt. Dabei besitzen unterschiedliche Moleküle unterschiedliche Absorptionsspektren (Hamblin and Huang, 2014). PPIX besitzt sein höchstes Absorptionsspektrum bei 405 nm und sein Emissionslicht hat eine Fluoreszenz im Rotlichtbereich um 635 nm. Wenn man ein PPIX gesättigtes Gewebe mit Blaulicht (405 nm) bestrahlt, kommt es zur Abgabe eines energieärmeren Lichts in Form von Rotlicht (635 nm) (Colditz et al., 2012), dieses kann mit einem Spektrometer in Bezug auf Intensität quantifiziert werden. Die Intensität ist dabei nicht nur abhängig von der Konzentration des fluoreszierenden Stoffes (z.B. PPIX) und der Stärke des einfallenden Lichtes. Die Intensität der Fluoreszenz wird auch durch andere im Gewebe vorkommende absorbierende Stoffe bestimmt. Für die Intensität der Fluoreszenz des PPIX spielt das Hämoglobin die größte Rolle, da es auch im Bereich unter 500nm eine große absorbierende Eigenschaft hat (Kim et al., 2010). *Kim et al. (2010)* zeigten eine Möglichkeit über ein Photon-Migrationsmodell von der

in relativen Einheiten gemessenen Stärke der Fluoreszenz auf die absolute PPIX-Konzentration in Mikrogramm pro Milliliter ($\mu\text{g}/\text{ml}$) zurückzuschliessen, indem sie die im Gewebe vorkommenden absorbierenden Moleküle einbezogen (Kim et al., 2010). In einer Studie aus dem Jahre 2014 konnte einerseits gezeigt werden, dass die in-situ-Spektrophotoskopie eine hohe Sensitivität hinsichtlich der Anwesenheit von Tumorzellen im umliegenden Gewebe bei Glioblastomen besitzt, andererseits korrelierte in der Studie eine hohe gemessene Fluoreszenz auch mit einer hohen Zelldichte der Glioblastomzellen (Stummer et al., 2014).

1.7 Problemstellung

Trotz der Fortschritte, die sich durch Einführung der 5-ALA gestützten Tumorresektion als Standardverfahren für Glioblastome ergeben haben (Stummer et al., 2006), und trotz der positiven ersten Ergebnisse aus Studien, die den Einsatz von 5-ALA in Bezug auf Meningeome diskutieren (Cornelius et al., 2014), hat sich ein durchschlagender Erfolg für den Patienten noch nicht eingestellt. Deshalb ist die Forschung bezüglich Einsatz- und Optimierungsmöglichkeiten der 5-ALA fluoreszenzgestützten Resektion aktueller denn je. Ein Problem dabei ist die hohe Subjektivität der momentanen 5-ALA fluoreszenzgestützten Resektion und die damit verbundene hohe Anforderung an die Expertise des Operateurs. Dabei erschweren von Tumor zu Tumor unterschiedliche Gewebeeigenschaften, Oberflächeneigenschaften, Lichteinfall, unterschiedliche Distanz von der Lichtquelle zum Tumor und viele weitere Faktoren die Einschätzung der Fluoreszenz (Valdés et al., 2011; Kim et al., 2010). Ein erster Schritt in Richtung objektiver Messung wurde durch die Entwicklung einer fiberoptischen Sonde gekoppelt an ein Spektrometer getan (Kim et al., 2010). Trotz erster klinischer Anwendungsversuche ist unklar, in welchem Ausmaß sich diese Methode in die moderne Gliom- und Meningeomchirurgie implementieren lässt (Valdes et al., 2014)

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel ein vom Operateur unabhängiges und objektives Verfahren zu untersuchen, welches es ermöglicht, die 5-ALA Fluoreszenz bei Gehirntumoren *ex vivo* zu quantifizieren und somit die oben genannten Störfaktoren (siehe Kapitel 1.7) bestmöglich zu reduzieren. Es sollte einfach in der Bedienung, sicher gegenüber möglichen Störfaktoren sowie potenziell in der klinischen Routine einsetzbar sein. Es wurde ein bereits von *Kim et. al (2010)* beschriebenes Faseroptikspektrometer (Kim et al., 2010) untersucht. Dieses wurde zur *ex-vivo*-Quantifizierung von 5-ALA Fluoreszenzsignalen bei Meningeomen und Glioblastomen eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Fluoreszenzquantifizierung wurden mit einem weiteren, schon seit langem zur Fluoreszenzmessung in vielen Bereichen eingesetzten, kommerziellem Laborspektrometer (Safire®) verglichen, welches sich allerdings aufgrund von Größe und Messmethode nicht für den Operationsaal nutzen lässt.

Insbesondere sollte auf folgende Fragestellungen eingegangen werden:

- Liefert das von uns eingesetzte Faseroptikspektrometer reproduzierbare und valide Fluoreszenzerggebnisse bei der Messung von standardisierten PPIX- Lösungen?
- Ist es mit dem Verfahren möglich, die Fluoreszenz bei Tumorgewebe von Glioblastomen und Meningeomen *ex vivo* zur quantifizieren?
 - Zeigen sich Unterschiede im Fluoreszenzverhalten zwischen Meningeomen und Glioblastomen?
- Spielen Faktoren auf zellulärer Ebene, wie z.B. das perifokale Ödem eine Rolle in Bezug auf die Fluoreszenzintensität von Tumoren?
- Gibt es auf molekularer Ebene einen Zusammenhang zwischen der gemessenen Fluoreszenzsignalstärke und der Ferrochelataseaktivität in den Tumorzellen?

2 Patienten und Methoden

Im folgenden Abschnitt wird die Methodik zur Fluoreszenzmessung vorgestellt, welche in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde. Zunächst wird der allgemeine Aufbau der Messapparaturen und im Anschluss die Methodik zur Vermessung der PPIX-Lösungen und Tumorproben beschrieben.

2.1 Aufbau der Messapparaturen

Für die Vermessung der Fluoreszenzsignale wurden zwei verschiedene Apparaturen verwendet. Zum einen die relativ neuartige Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale über eine Faseroptik, welche mit einem Spektrometer verbunden ist. Diese Methode wurde erstmals von Kim et al. (2010) aus Toronto vorgestellt (Kim et al., 2010). Zum anderen das *Microplatereader* Spektrometer *Safire (Tecan)*, mit dem es möglich ist, Fluoreszenzen von Flüssigkeiten in 96-Wellplatten zu messen (Hermlle et al., 2010; Schwengberg et al., 2005).

2.1.1 Chemikalien und Geräte

Für die Versuche wurden verschiedene Chemikalien und Geräte verwendet, welche im Folgenden aufgelistet sind:

Geräte:

Produktname:

Hersteller:

Multi-Channel LED Light Source
Aufhänge-Apparatur
USB 2000+ Spektrometer
SafireSpektrometer
Analysenwaage ACJ 220-4M

Messbereich:
Min.:10mg; Max.: 220mg
Ablesbarkeit:0.1mg;
Eichwert: 1mg

Ocean Optics
Technik Uni Düsseldorf
Ocean Optics
Tecan
Kern und Sohn

Heiz Magnetplatte RET basic
Multipette M3
Pipette Research plus 10ml
Pipette Research plus 1000µl
Pipette Research plus 100µl
Pipette Research plus 10µl

IKA
Eppendorf
Eppendorf
Eppendorf
Eppendorf
Eppendorf

Micotube brown	Sigma Aldrich
Reagenzschüttler Reax 2000	Heidolph
MICROPLATE, 96 WELL, BLACK	Greiner Bio-One
Operationsmikroskop	Carl Zeiss
Pinzette	
Spatel	
Falcon 50ml brown	Greiner Bio-One
Laptop / Windows XP	IBM

Chemikalien:

Produktname:	Hersteller:	CAS-Nummer:
Protoporphyrin IX (PPIX)	Santa Cruz	15442-64-5
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	67-68-5
<i>Solvable</i>	Perkin Elmer	70592-80-2
		68131-40
		1310-73-2
		7732-18-5
Formaldehyd		50-00-0
Ferrochelatase Antikörper	Sigma Aldrich	

2.1.2 Aufbau des Spektrometers mit Fibersonde

Der Aufbau für die Fluoreszenzvermessung sollte es ermöglichen, Fluoreszenzsignale von PPIX in Lösungen und Gewebeproben zu erzeugen und zu quantifizieren. Für die Versuche wurde ein *custom-made* Faseroptikspektrometer in Anlehnung an die Beschreibung von Kim et al. 2010 von der Firma Oceanoptics hergestellt (Kim et al., 2010). Zur Erzeugung der Fluoreszenzsignale dient eine Multikanallichtquelle, sogenannte *Multi-Channel LED Light Source (MCLS, Ocean Optics)*. In der *MCLS* befanden sich drei Licht emittierende Dioden (*LEDs*) zur Erzeugung von Lichtsignalen. Zwei dieser *LEDs* erzeugten Weißlicht und eine Blaulicht. An jede *LED* war jeweils ein isoliertes Glasfaserkabel angeschlossen. Die Glasfaserkabel bündelten sich in einer Fibersonde. Neben den drei Glasfaserkabeln, die mit den *LEDs* verbunden waren, befand sich ein weiteres Glasfaserkabel in der Faseroptik, welches als Detektionsfaser mit einem Spektrometer (USB 2000+) verbunden war. Durch die Blaulicht-LED, wurde das PPIX zur Fluoreszenz angeregt und diese danach mit dem Spektrometer vermessen. Die Weisslicht-*LEDs* dienten zur Erfassung der Lichtabsorptionseigenschaften des Gewebes.

Dabei waren die Glasfaserkabel in der Fiberoptik mit einem Abstand von $260\mu\text{m}$ wie auf Abbildung 4 gezeigt angeordnet: ganz links befand sich die Blaulicht *LED*-Faser, es folgte die Messfaser die zum Spektrometer führt. Auf der rechten Seite waren die erste und die zweite Weißlicht-Faser. Der Außendurchmesser der Sonde betrug 1.1 Millimeter (Abb.5)

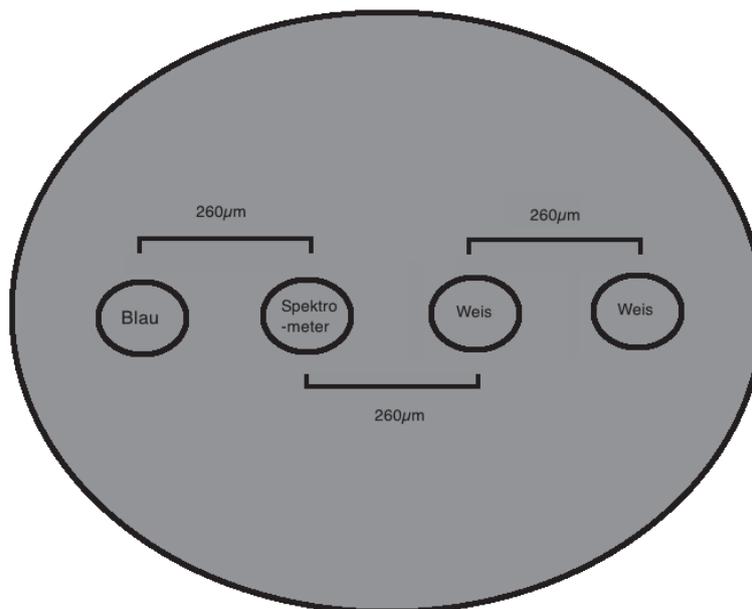


Abbildung 5 Querschnitt durch die Fibersonde

Die *MLCS* und das Spektrometer waren jeweils über ein USB-Kabel mit einem Laptop (Mobile Intel(R) Pentium(R) 4- M CPU 1.80 GHz, Microsoft Windos XP, IBM) verbunden. Die Steuerung des MCLS erfolgte durch eine eigens dafür von der IT-Abteilung der Neurochirurgischen Klinik der Uniklinik Düsseldorf programmierten Messsoftware (Igor's Spektrometer). Diese erlaubte es dem Benutzer einerseits Messparameter wie zum einen das Zeitintervall des Exzitationslichtes für die *MLCS* einzustellen. Zum anderen stellte die Software die durch das Spektrometer aufgezeichneten Fluoreszenzsignale in Form von relativen Einheiten als Exeltabelle dar. Außerdem wurde durch die Technikabteilung des

Instituts für Lasermedizin der Heinrich-Heine-Universität eine Aufhängeapparatur gefertigt, die es ermöglichte mittels Feintrieb die Sonde standardisiert mit gleichem Abstand an ein zu vermessendes Gewebestück oder in das zu vermessende Reagenz zu bringen (Abb.6 und Abb.7).

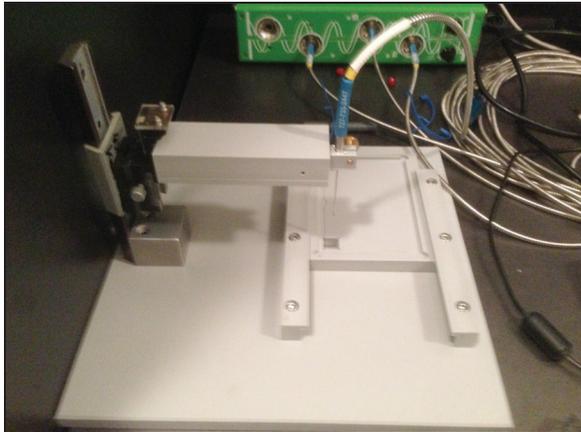


Abbildung 6 Übersicht über Versuchsaufbau der Fibersondenmessapparatur.

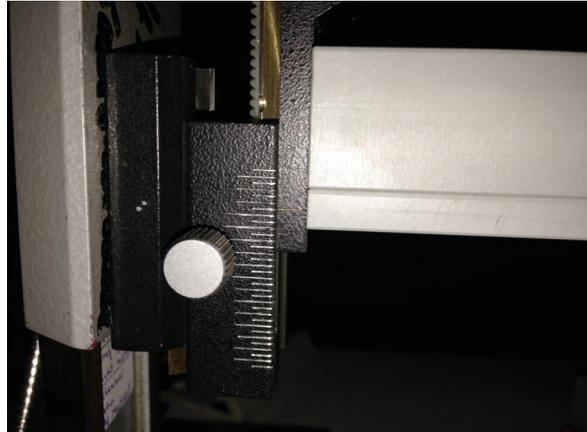


Abbildung 7 Feintrieb der der Aufhänge Apparatur zur Einstellung der Fibersonde in vertikaler Richtung

2.1.3 Aufbau Safire

Bei dem Safire der Firma Tecan handelt es sich um ein kommerzielles Mikroplattenlesegerät. Mit dem Gerät ist es möglich, monochromatisches Licht in den Wellenlängen von 230 nm bis 850 nm auf die zu vermessende Lösung zu strahlen. Eine durch dieses Exzitationslicht erzeugte Fluoreszenz wurde durch ein im Safire vorhandenes Spektrometer in Wellenlängenbereichen von 280 nm bis 850 nm aufgezeichnet. Der Safire war mit einem PC verbunden und die Messparameter konnten über das Programm X-Fluor, welches auf dem Programm Excel (Microsoft) basiert, eingestellt werden. Der Safire vermisst die Fluoreszenzsignalstärke in relativen Werten. Die Durchführung der Fluoreszenzmessung mit dem Safire wurde im Neuropathologischen Labors des Univesitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

2.2 Verdünnungsreihen von in Lösung gebrachtem Protoporphyrin

IX

Da sowohl das Faseroptikspektrometer als auch der Safire die Fluoreszenz in relativen Werten ausgeben, wurde zunächst die Fluoreszenz von Verdünnungsreihen mit vorher definierten PPIX-Konzentrationen vermessen. Dafür wurden die Verdünnungsreihen in Form von Halbierungsreihen angefertigt und anschließend mittels Faseroptik- bzw. Safirespektrometer vermessen.

2.2.1 Herstellung der Verdünnungsreihen des PPIX

Die Herstellung der Verdünnungsreihen erfolgte im Neurochirurgischen Labor des Universitätsklinikum Düsseldorf. Da PPIX bei längerer Wärme- und Lichtexposition zerfällt, wurde es im Tiefkühlschrank bei (-20°C) gelagert und die Arbeiten mit der Substanz unter Ausschluss von Licht durchgeführt.

Dafür wurde in einem ersten Schritt ein kleines Becherglas (200 ml) mit Alufolie eingewickelt, sodass die Lichtexposition möglichst gering gehalten wurde. Das Becherglas wurde nun auf die Analysewaage gestellt und das Taragewicht ermittelt. Anschließend wurden exakt 50 mg des aus dem Tiefkühlschrank entnommenen PPIX abgewogen. Nun gaben wurden zu dem Becherglas 10ml Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben, um eine Flüssigkeit mit einer Konzentration von 5mg pro ml zu erhalten. Um die Homogenität der Lösung zu gewährleisten, wurde ein Rührfisch mit in das Glas gegeben und alles zusammen auf einer Heiz-Magnetplatte für 15 Minuten gemischt. Nach 15 Minuten wurde sich durch leichtes schwenken vergewissert, dass das PPIX komplett in Lösung gegangen war. Für den nächsten Schritt wurden acht braune *Mikrotubes* in einem Mikrotubeständer nebeneinander angeordnet und mit den gewünschten Lösungskonzentrationen des PPIX beschriftet (Abb.9). Das erste *Mikrotube* bekam die Beschriftung „SL“ für Stammlösung. Die Stammlösung entsprach dabei der Flüssigkeit, die sich in dem Becherglas befand. Das zweite *Mikrotube* bekam die Beschriftung „ZL“ für Zwischenlösung. Dann folgten die verschiedenen Konzentrationen PPIX in Halbierungsschritten: 5 µg; 2,5 µg; 1.25 µg; 0.625 µg; 0.3125 µg und 0.15625 µg. Das Becherglas mit der Stammlösung wurde von der Heizmagnetplatte genommen und 1000 µl in das Mikrotube für die Stammlösung pipettiert. Von der Stammlösung (Konzentration: 5 mg PPIX/ml) wurden 100 µl in das Mikrotube für die Zwischenlösung (ZL) pipettiert und 900 µl des organischen Lösungsmittels DMSO

hinzugegeben. Anschließend wurden die beiden Komponenten im Mikrotube für zehn Sekunden mit dem Reagenzschüttler Reax 2000 vermischt. Die Stammlösung (5 mg/ml) wurde dadurch 1 zu 10 verdünnt. Die neu entstandene Zwischenlösung hatte somit eine PPIX-Konzentration von 500 µg/ml. Von dieser wurden 10 µl in das mit 5 µg beschriftete Mikrotube pipettiert und anschließend 990 µl *Solvable* hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde wieder für ca. 10 Sekunden mittels Reax 2000 gemischt. In diesem Schritt wurde die Zwischenlösung (500 µg PPIX/ml) 1 zu 100 verdünnt, sodass eine Flüssigkeit mit der Konzentration von 5 µg PPIX/ml entstand. Von diesem Mikrotube (Inhalt 1000 µl) wurden 500 µl in das 2,5 µg Mikrotube gefüllt und mit 500 µl *Solvable* ergänzt und anschließend mit dem Reagenzschüttler Reax 2000 für ca. 10 Sekunden gemischt. Die 5 µg PPIX/ml-Lösung wurde 1 zu 2 verdünnt, sodass die neu entstandene Lösung eine Konzentration von 2,5 µg PPIX/ml hatte. Diese Art der Halbierung wurden vier weitere Male durchgeführt, sodass die weiteren Verdünnungen von 1.25 µg PPIX/ml, 0.625 µg PPIX/ml, 0.3125 µg PPIX/ml und 0.15625 µg PPIX/ml entstanden sind.

2.2.2 Fluoreszenzmessung der Verdünnungsreihen mittels Fiberoptik

Für die Vermessung der unterschiedlichen PPIX-Konzentrationen wurden aus den sechs Mikrotubes mit unterschiedlichen PPIX-Konzentrationen jeweils 100 µl der Flüssigkeit in ein *Well* einer schwarzen *Microplate 96-Well* pipettiert. Somit ergab sich in *Well* A4 die Konzentration 5 µg PPIX/ml, in *Well* A5 die Konzentration 2,5 µg PPIX/ml, in *Well* A6 die Konzentration 1,25 µg PPIX/ml, in *Well* A7 die Konzentration 0,625 µg PPIX/ml, in *Well* A8 die Konzentration 0,3125 µg PPIX/ml und in *Well* A9 die Konzentration 0,15625 µg PPIX/ml (Abb. 8 und 9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625			
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abbildung 8 96-Wellplatte mit der Konzentrationen der PPIX Verdünnungsreihen in A4-A9 in $\mu\text{g/ml}$.

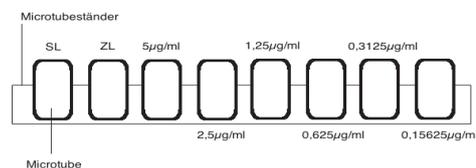


Abbildung 9 Übersicht Verdünnungsreihe in Microtubes

Anschließend wurde die Verdünnungsreihe mittels Fiberoptik vermessen. Dafür wurden zunächst die Parameter für die Fluoreszenzmessung eingestellt. Dabei wurde für die *Integration time* 20 ms, für die *Lag time* 50 ms und *Number of flashes* 50 ausgewählt. Diese Parameter entscheiden wie lange bestrahlt wird (*Integration time*), wie häufig bestrahlt wird (*Number of flashes*) und wie lange zwischen den Bestrahlungen pausiert wird (*Lag time*). Um Verunreinigungen vorzubeugen, wurde die Verdünnungsreihe beginnend mit der niedrigsten Konzentration (0.15625 $\mu\text{g/ml}$) vermessen, indem die Sonde bis zum Anschlag des

Feintriebes in das Well geschoben wurde, ohne den Boden des Wells zu berühren. Dadurch wurde die Fluoreszenzmessung immer in der gleichen Eintauchtiefe durchgeführt.

2.2.3 Fluoreszenzmessung der Verdünnungsreihen mittels Safire

Die Verdünnungsreihen für die Fluoreszenzmessung mittels Safire wurden nach der gleichen Prozedur vorbereitet wie die Verdünnungsreihen zur Vermessung mittels Faseroptik (Siehe Kapitel 2.2.1 und Kapitel 2.2.2). Die Platte wurde anschließend in den Safire eingeführt. Dabei wurden die Messparameter ausgewählt. Zu Beginn wurde das Programm X-Fluor geöffnet und der zu vermessende Bereich eingestellt, in diesem Fall der Bereich A3 bis A9 (Abb.4). Im Anschluss daran wurde bei dem Auswahlfeld „*Measurement mode*“ die Auswahl „*Fluorescence Top*“ und im Bereich „*Wavelength scan type*“ gewählt. Der „*Excitation wavelength start*“ wurde bei 405 nm gewählt, der „*Emission wavelength start*“ bei 250nm und „*Emission wavelength end*“ bei 850 nm eingestellt. Für den „*Emission wavelength step size*“ wurde 5nm ausgewählt, daraus ergab sich automatisch die „*Emission Scan number*“ von 121. Der „*Delay before next wavelength*“ betrug 10 ms, die „*Excitation bandwidth*“ und „*Emission bandwidth*“ 12 nm. Das „*Gain*“ wurde bei 50, die „*Number of flashes*“ bei eins, die „*Integration time*“ bei 20 μ s und die „*Z-Position*“ bei 4700 festgelegt. Für die Vergleichbarkeit der Werte wurden die Einstellungen für den Safire bei jeder Fluoreszenzmessung der einzelnen Verdünnungsreihen gleich gelassen.

2.3 Fluoreszenzvermessung der Tumorproben

Für die Fluoreszenzvermessung der entnommenen Tumorproben lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität mit der Studiennummer **4266** vor. Des Weiteren wurde jeder Patient vor Einschluss in die Studie über diese selbst, sowie über mögliche Nebenwirkungen der Aminolävulinsäure, wie z.B. Übelkeit und Erbrechen, transiente Leberwerterhöhung und postoperative Fotosensibilität aufgeklärt.

2.3.1 Einschlusskriterien der Patienten

Es wurden in dieser prospektiven Studie volljährige Patienten mit Raumforderungen im Gehirn untersucht, die in der präoperativen Diagnostik (CT oder MRT) nahelegten, dass es sich bei den Befunden entweder um ein Glioblastom oder um ein Meningiom handelte. Patienten mit Lebererkrankungen, erhöhten Leberwerten (GOT > 100 und/oder GPT > 100U/l), Porphyrinen, bekannter Photosensibilität, Allergiker, und Schwangere wurden ausgeschlossen.

2.3.2 Durchführung der Fluoreszenzmessung der unbehandelten Tumorproben ex vivo mit dem Fiberoptikspektrometer

Das Hauptziel der Arbeit war die Fluoreszenzmessung von Glioblastom- und Meningeomproben *ex vivo* mittels Fiberoptikspektrometer. Dabei sollte näher untersucht werden, ob sich ein Informationsgewinn durch die spektroskopische Vermessung gegenüber herkömmlicher Fluoreszenzeinschätzung allein durch den Operateur ergibt. Eine Vermessung der unbehandelten Tumorstücke mit dem Safirespektrometer wurde nicht durchgeführt, da mit diesem nur Lösungen vermessen werden können. Mindestens vier Stunden vor der Operation bekamen die Patienten das ALA angepasst an ihr Körpergewicht (20 mg ALA/kg KG, nach dem Standardprotokoll für Glioblastompatienten) in 50ml Wasser aufgelöst zu trinken. Im Operationssaal wurde eine fluoreszenzgestützte Tumorresektion mit einem Operationsmikroskop durch einen Facharzt für Neurochirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Nachdem die Tumorprobe für den Schnellschnitt abgegeben wurde, wurden ein bis vier Tumorstücke für die Studie in ein lichtundurchlässiges *Falcon-Röhrchen* getan. Insgesamt wurden 18 Proben von 14 Patienten entnommen. Eine weitere Probe wurde zusätzlich für die späteren Spezialfärbungen, z.B. Ferrochelatase-Antikörper, durch das Neuropathologische Institut des Universitätsklinikums, in Formalin gelegt. Die Zeit der Probenentnahme wurde notiert und die Probe unbehandelt umgehend in das Neuroonkologische Labor des Universitätsklinikums Düsseldorf gebracht und zunächst direkt vermessen. Die Fluoreszenzmessung fand in einer Dunkelkammer statt. Das Tumorstück wurde mit einer Pinzette vorsichtig aus dem *Falcon* geholt und auf einen Objektträger gelegt. Dieser hat die Eigenschaft, dass er schwarz ist und innen zwei runde durchsichtige Bereiche hat. Der schwarze Anteil sollte in unserem Experiment dazu dienen, die von unten eintreffende Reststrahlung zu reduzieren. Der Objektträger wurde auf zwei kleinen

schwarzen Quadern positioniert, die für das Experiment durch die Technikabteilung des Universitätsklinikums Düsseldorf gefertigt wurden. Dann wurde die Sonde der Fiberoptik mittels Feintrieb bis an den Tumor herangefahren, sodass direkter Kontakt zwischen Fibersonde und Tumorprobe bestand (Abb. 10).



Abbildung 10 Fibersondenspitze direkt an der Tumorprobe (hier für das Foto mit Umgebungslicht)

Es wurde die Integrationszeit bei 20 ms gewählt und *Lag-time* sowie *Number of flashes bei 50*. Die Tumorprobe wurde fünffach bei diesen Parametereinstellungen vermessen, dieses erfolgte zunächst mit der Fibersonde direkt am Tumorgewebe und anschließend in den Abständen 0.5 mm; 1 mm; 1.5 mm und 2 mm (Abb. 11-15).

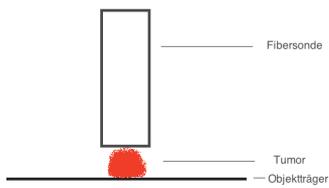


Abbildung 11 Schemazeichnung Fibersonde direkt an der Tumorseite

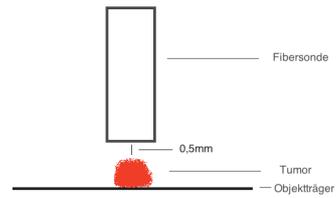


Abbildung 12 Schemazeichnung der Fibersonde mit einem Abstand von 0.5 mm zur Tumorseite

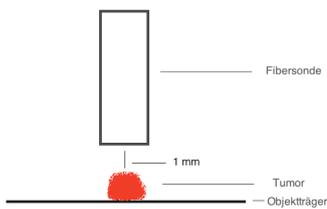


Abbildung 13 Schemazeichnung der Fibersonde mit einem Abstand von 1 mm zur Tumorseite

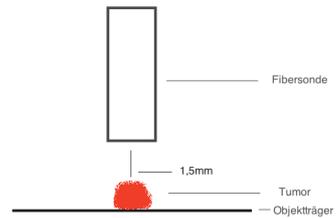


Abbildung 14 Schemazeichnung der Fibersonde mit einem Abstand von 1.5 mm zur Tumorseite

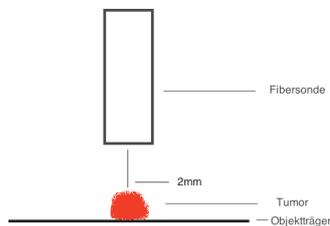


Abbildung 15 Schemazeichnung der Fibersonde mit einem Abstand von 2 mm zur Tumorseite

2.3.3 Quantifizierung des perifokalen Ödems

Glioblastome und Meningeome zeigen in unterschiedlichem Maße ein perifokales Ödem. Im Anschluss an die Tumorfluoreszenzvermessung wurde die Größe des perifokalen Ödems bestimmt und untersucht, ob sich ein Zusammenhang zwischen Größe des perifokalen Ödems und Stärke des Fluoreszenzsignals ergibt. Dafür wurden die T2 Sequenzen der präoperativen MRT Bilder betrachtet. Zunächst wurde eine Tangente an den Rand des Tumors angelegt. Zu dieser wurde im rechten Winkel der größtmögliche Ödemabstand

gemessen. Die Einschätzung des perifokalen Ödems orientierte sich an einer Arbeit von *Schoenegger et al.* (2009) (Schoenegger et al., 2009).

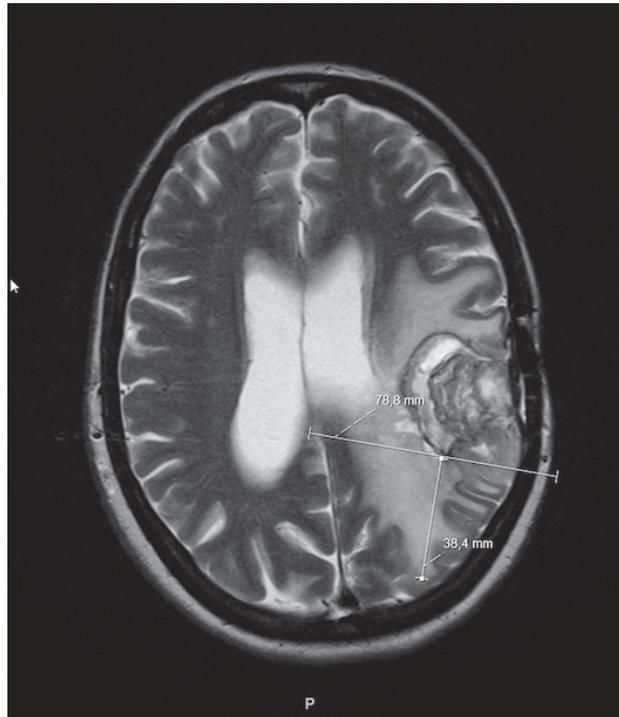


Abbildung 16 Beispiel Messung perifokales Ödem an MRT von Glioblastompatienten aus der Studie

2.3.4 Durchführung der Fluoreszenzmessung der lysierten Tumore

Nach der Fluoreszenzvermessung *in toto* wurden die Tumorstücke abgewogen und lysiert. Für das Abwiegen wurde zunächst das *Tube* (Percellys Keramik Kit 1.4 mm) abgewogen und die Waage genullt, dann wurde der Tumor in das *Tube* eingefüllt und erneut gewogen. Im Anschluss wurde das *Tube* mit 1000 μ l des Lösungsmittels *Solvable* befüllt und das Lösungsmittel-Tumorgemisch in einem Homogenisator Percellys bei dem Programm zwei mechanisch lysiert. Von dem Lysat wurden dann jeweils 100 μ l mittels *Multipette* in die *Wells* A4 bis A6 einer schwarzen *Microplate* 96-Well pipettiert. Die Platte wurde danach mittels *Safire* und Fiberspektrometer vermessen. Dafür wurden die gleichen Einstellungen gewählt wie bei den zuvor angefertigten Verdünnungsreihen. Dadurch sollte ein Vergleich zwischen Tumorlysat und Verdünnungsreihen mit bekannten PPIX-Konzentrationen möglich gemacht werden.

2.4 Spezialfärbung der Tumorproben mit Ferrochelatase-Antikörpern

Eine separat aus dem Tumor entnommene Probe wurde durch das Neuropathologische Institut des Universitätsklinikums Düsseldorf mit einem polyklonalen IgG Ferrochelatase Antikörper (Hase) der Firma Sigma Aldrich (Produktnummer: HPA044100) in einer Verdünnung von 1:20 gefärbt. Als Kontrolle für eine Positivprobe wurde Nierengewebe eingesetzt.

2.5 Statistische Methoden

Die Tabellenkalkulation und Statistische Auswertung wurde mit Microsoft Excel und SPSS Statistics 22 (IBM) durchgeführt. Für die statistische Auswertung der Verdünnungsreihen wurden lineare Regressionen durchgeführt. Der Vergleich der verschiedenen Fluoreszenzsignalstärken zwischen Glioblastomproben und Meningeomproben wurde bei fehlender Standardnormalverteilung mithilfe des nichtparametrischen Wilcoxontests durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für $p < 0.05$ festgelegt. Es erfolgte eine statistische Beratung durch einen Statistiker der Firma Statistikberatung „.05 Düsseldorf“.

3 Ergebnisse

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Fluoreszenzvermessung der Verdünnungsreihen, der Tumorfluoreszenzvermessung und der feingeweblichen Zusatzdiagnostik dargestellt.

3.1 Studienpopulation

In der Studie wurden Tumorproben von insgesamt 14 Patienten entnommen, bei denen präoperativ der hochgradige Verdacht auf ein Meningeom oder Glioblastom bestand. Von diesen 14 Patienten konnte histologisch bei elf Patienten die Diagnose eines Glioblastoms oder Meningeoms gestellt werden. Bei den übrigen drei Patienten zeigte sich histologisch jeweils einmal eine Bronchialkarzinometastase, einmal ein anaplastisches Astrozytom und einmal eine Strahlennekrose. Die Strahlennekrose stammte dabei von einem Patienten, der aufgrund seines Glioblastoms bestrahlt wurde. Die deskriptiven Daten zu den Patienten, deren Tumorart, Tumorlokalisation und Tumoraggressivität sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Ergebnisse der übrigen drei Patienten wurden separat im Anschluss behandelt.

Zahl der Patienten:	11
<hr/>	
Geschlecht	
m:	5
w:	6
Größe in cm :	172 (158-187)
Gewicht in kg:	78.6 (60-112)
Karnofskyindex präoperativ	90% (60%-100%)
Tumorart	
Meningeome:	5
Glioblastome:	6
<hr/>	
Lokalisation des Tumors	
occipital:	3
frontal:	3
frontotemporooccipital:	1
parietooccipital:	1
frontoparietal:	1
Meningeomatose beidseits frontoparietal+ 1 Herd	
infratentoriell	1
Kleinhirnbrückenwinkel	1
<hr/>	
Ki67	
Meningeome	<5%
Glioblastome	12,5% (<5->20)

Tabelle 1 deskriptive Daten zu Patienten der Studie

3.2 Validierung des Spektrometers durch Verdünnungsreihen

Vor Untersuchung der Patientenproben wurden die Fiberoptik und das Spektrometer hinsichtlich ihrer Funktionalität überprüft. Dafür wurden fünf Verdünnungsreihen in Form von Halbierungsreihen angelegt und vermessen. Abbildung 17 stellt exemplarisch die durch das Spektrometer gemessene Fluoreszenz einer Verdünnungsreihe dar, dabei werden die sechs PPIX-Konzentrationen für eine Verdünnungsreihe dargestellt. Es ist eine Verringerung der gemessenen Rotfluoreszenz (Maximum bei ca. 635 nm) bei Abnahme der PPIX-Konzentration zu sehen. In Abbildung 18 sieht man ein Punktdiagramm mit den Spitzenwerten der gemessenen Rotfluoreszenz. Auch zeigt sich die steigende Fluoreszenz bei steigenden PPIX-Konzentrationen.

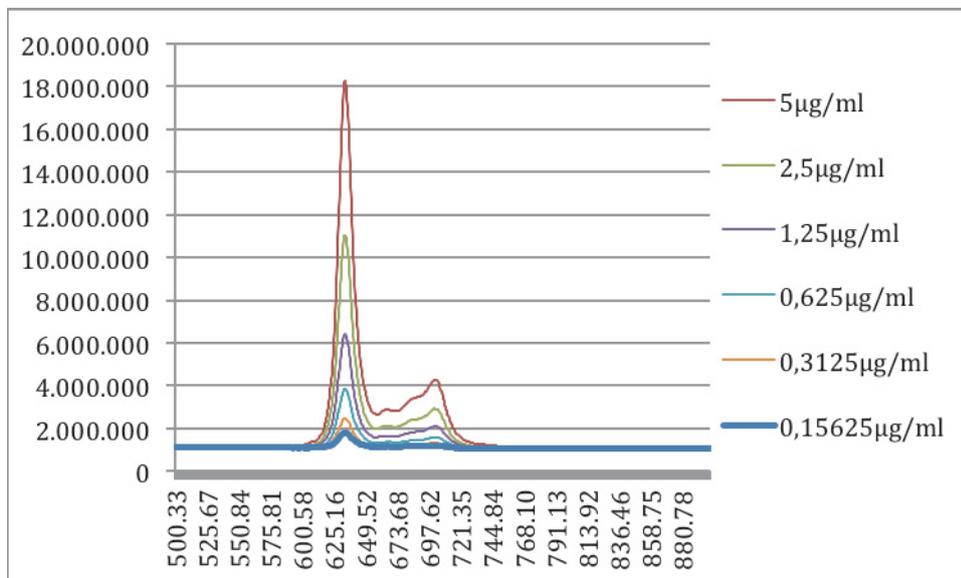


Abbildung 17 Beispiel einer Verdünnungsreihe, die mittels Fiberoptik vermessen wurde

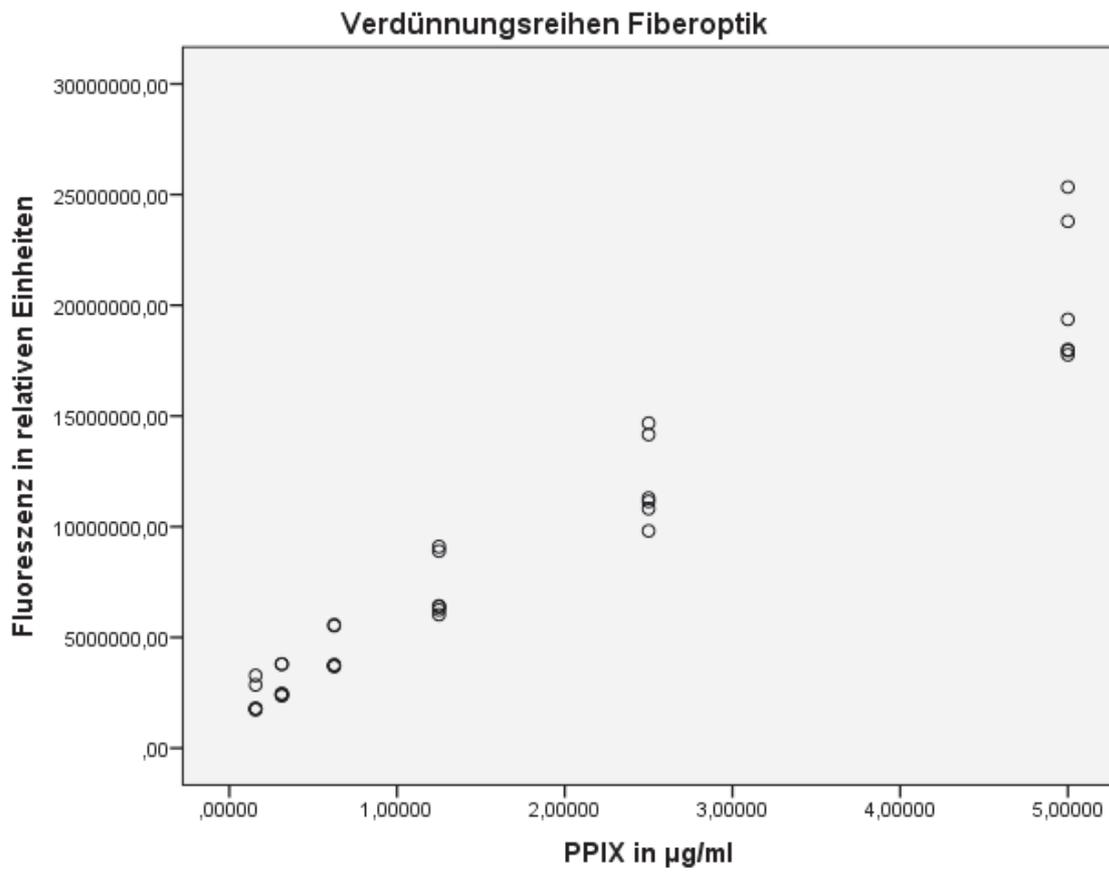


Abbildung 18 Ergebnisse der mittels Fiberoptik vermessenen Fluoreszenz in relativen Einheiten von 5 Verdünnungsreihen

In einer linearen Regression konnte ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen PPIX-Konzentration und Fluoreszenzsignalstärke gezeigt werden; $\beta=0.967$, $p<0.001$. Es zeigte sich eine Varianzaufklärung von 93.5%; $F=492.114$, $p<0.001$.

3.3 Fluoreszenzvermessung der Verdünnungsreihen mittels Safire

Insgesamt wurden zusätzlich sieben Verdünnungsreihen mit einem Safire Spektrometer vermessen. Für das Safirespektrometer ist eine Verdünnungsreihe in Abbildung 19 beispielhaft gezeigt. Abbildung 20 zeigt die Werte der Fluoreszenzspitzenwert bei 635 nm für die sieben Verdünnungsreihen des Safire.

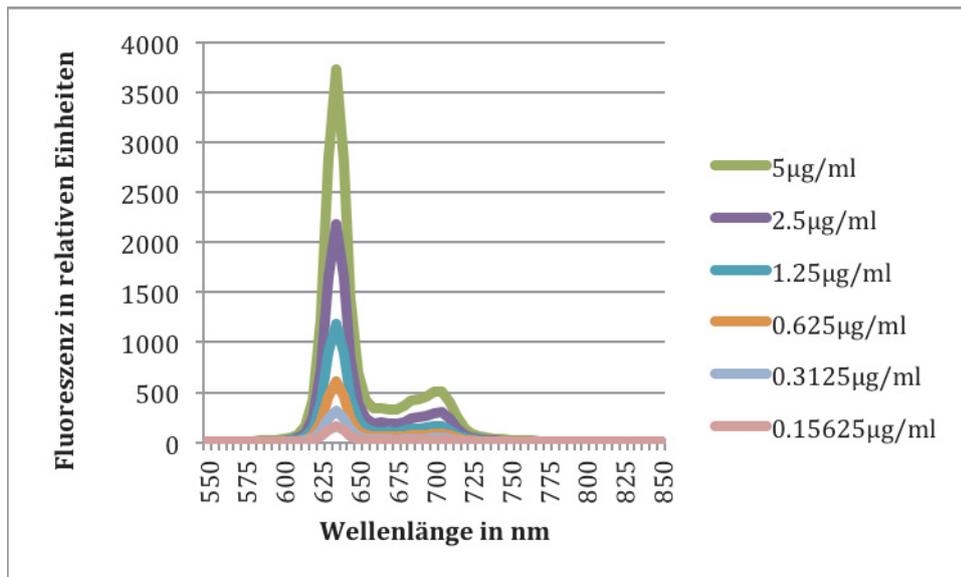


Abbildung 19 Beispiel Verdünnungsreihe Safire

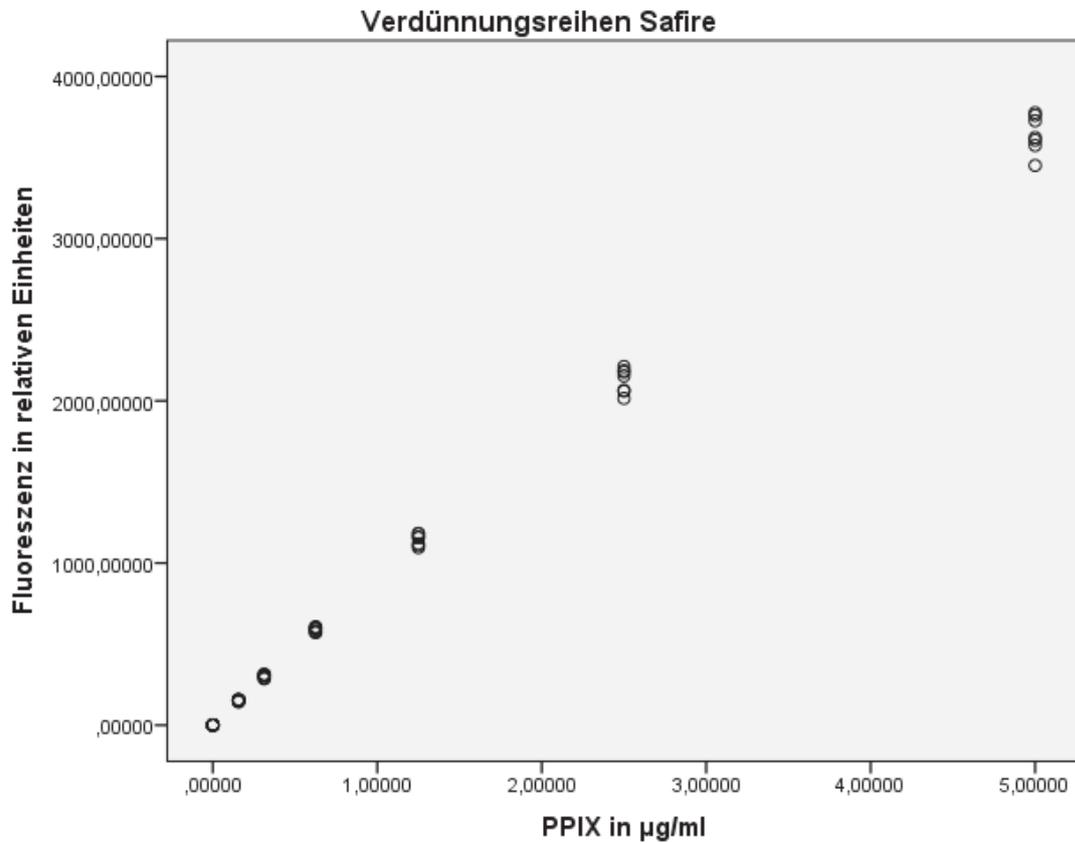


Abbildung 20 Ergebnisse der mittels Safire vermessenen Fluoreszenz in relativen Einheiten von 7 Verdünnungsreihen

In einer linearen Regression konnte ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen PPIX-Konzentration und Fluoreszenzsignalstärke gezeigt werden; $\beta=0.995$, $p<0.001$. Es zeigte sich eine Varianzaufklärung von 99.1%; $F=5015.284$, $p<0.001$.

3.4 Vermessung der Fluoreszenzsignalstärken der Tumorstücke mit dem Faseroptikspektrometer - ex vivo

Es wurden insgesamt sieben Glioblastom- und zehn Meningeomproben aus intraoperativ stark rot fluoreszierenden Tumorarealen durch den Neurochirurgen entnommen und anschließend mittels Faseroptik und Spektrometer nach durchschnittlich 15,88 Minuten (9 bis 38 Minuten) nach Entnahme aus dem Körper des Patienten in den Abständen 0 mm, 0.5 mm, 1 mm, 1.5 mm, 2 mm spektrophotometrisch vermessen. Die Ergebnisse der gemessenen Fluoreszenz wurden mittels Kolmogorow Smirnow Test auf Standardnormalverteilung getestet. Es lag keine Normalverteilung der Werte vor ($p < 0.001$), sodass zum Vergleich der Fluoreszenzsignalstärken zwischen Glioblastomen und Meningeomen der nicht parametrische Wilcoxon-Test durchgeführt wurde.

3.4.1 Unterschiede im Fluoreszenzverhalten der Glioblastome und Meningeome bei 0 mm

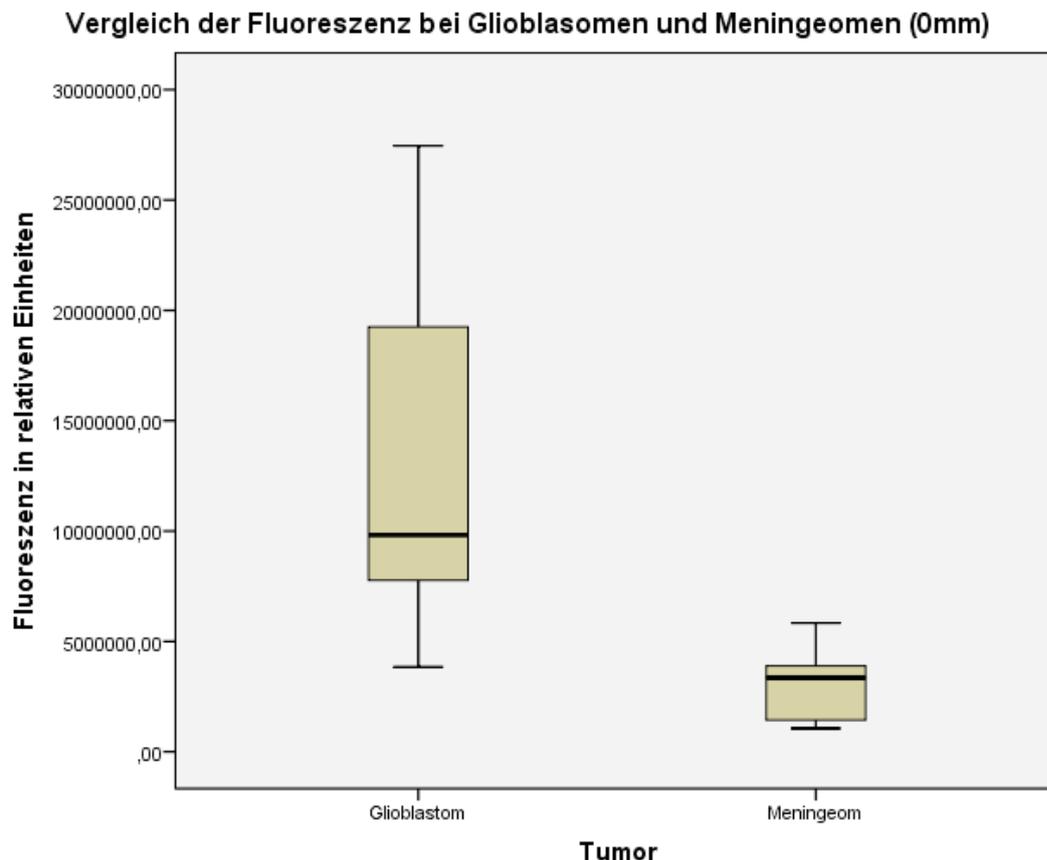


Abbildung 21 Vergleich der Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen (0mm)

Der Wilcoxonstest zeigt einen signifikanten Unterschied in der Fluoreszenzsignalstärke zwischen Glioblastomen und Meningeomen der untersuchten Kohorte bei 0 mm Abstand zwischen Fibersonde und Tumorstück; $U=3$, $Z=-3.123$, $p=0.001$.

Der Mittelwert der Fluoreszenz der Glioblastomproben war ca. 4,5 mal so hoch wie die mittlere Fluoreszenz der Meningeomproben. Die Glioblastome zeigten eine größere Ergebnisstreuung um den Mittelwert als die Meningeomproben.

3.4.2 Unterschiede des Fluoreszenzverhaltens bei Glioblastomen und Meningeomen bei zunehmendem Abstand – 0.5; 1; 1.5 und 2 mm

Im folgenden Abschnitt werden die weiteren Ergebnisse der Tumorfluoreszenzvermessung gezeigt. Die Meningeome und Glioblastome wurden mit zunehmendem Abstand zwischen Lichtquelle mit Detektionsfaser und Tumorstück vermessen. Der Abstand wurde bei 0.5 mm ; 1 mm ; 1.5 mm und 2 mm gewählt.

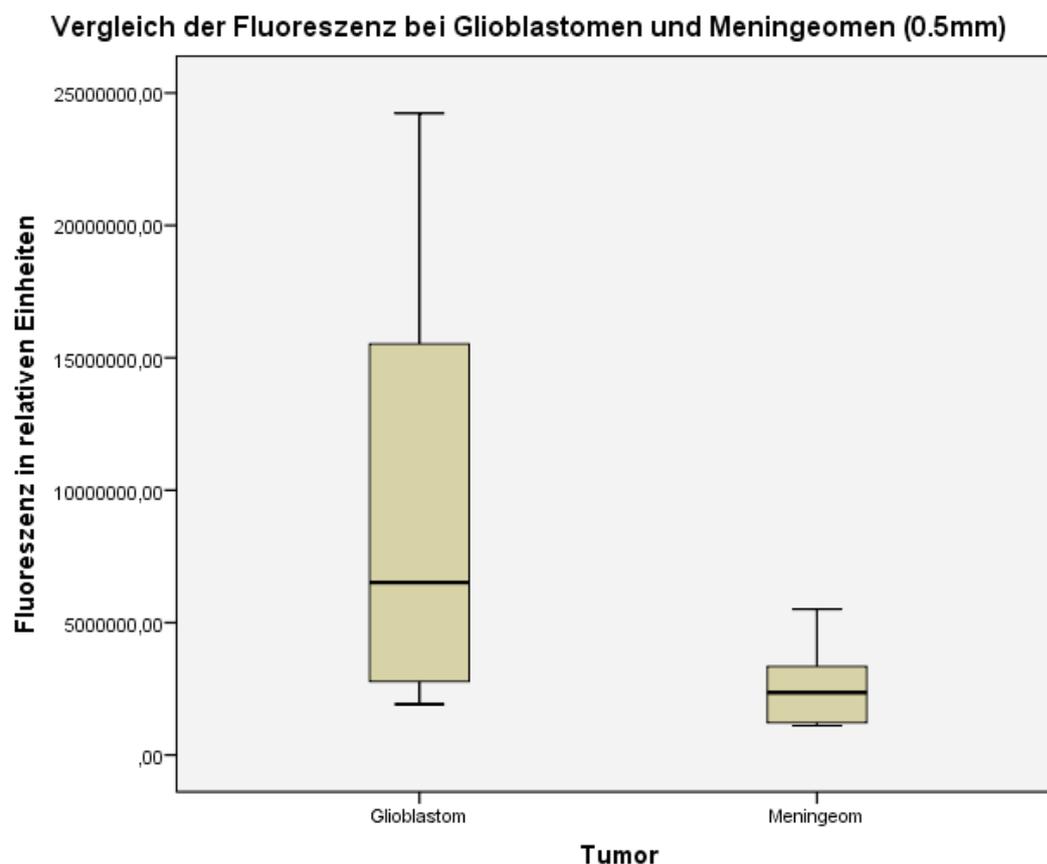


Abbildung 22 Vergleich der Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen (0.5mm)

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzsignalstärke zwischen Glioblastomen und Meningeomen der untersuchten Kohorte bei 0.5 mm Abstand zwischen Fibersonde und Tumorstück; $U=14$, $Z=-2.049$, $p<0.05$

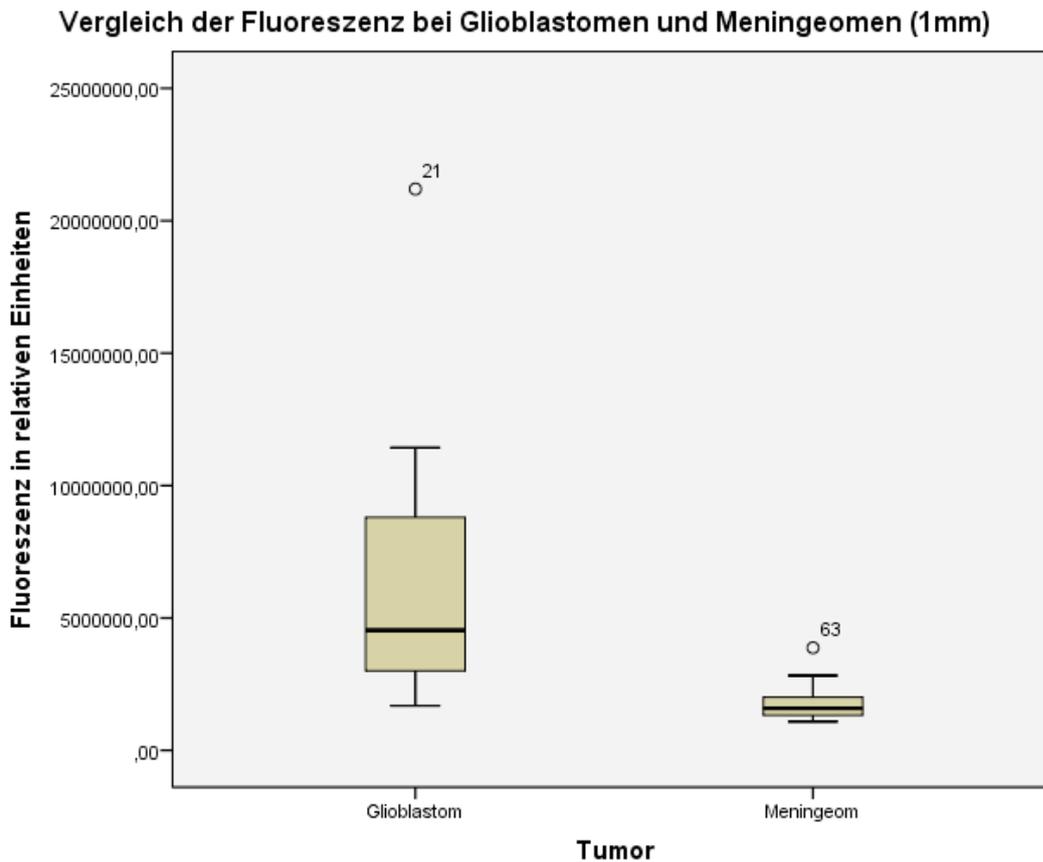


Abbildung 23 Vergleich der Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen (1mm)

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzsignalstärke zwischen Glioblastomen und Meningeomen der untersuchten Kohorte bei 1 mm Abstand zwischen Fibersonde und Tumorstück; $U=7$, $Z=-2.733$, $p=0.005$.

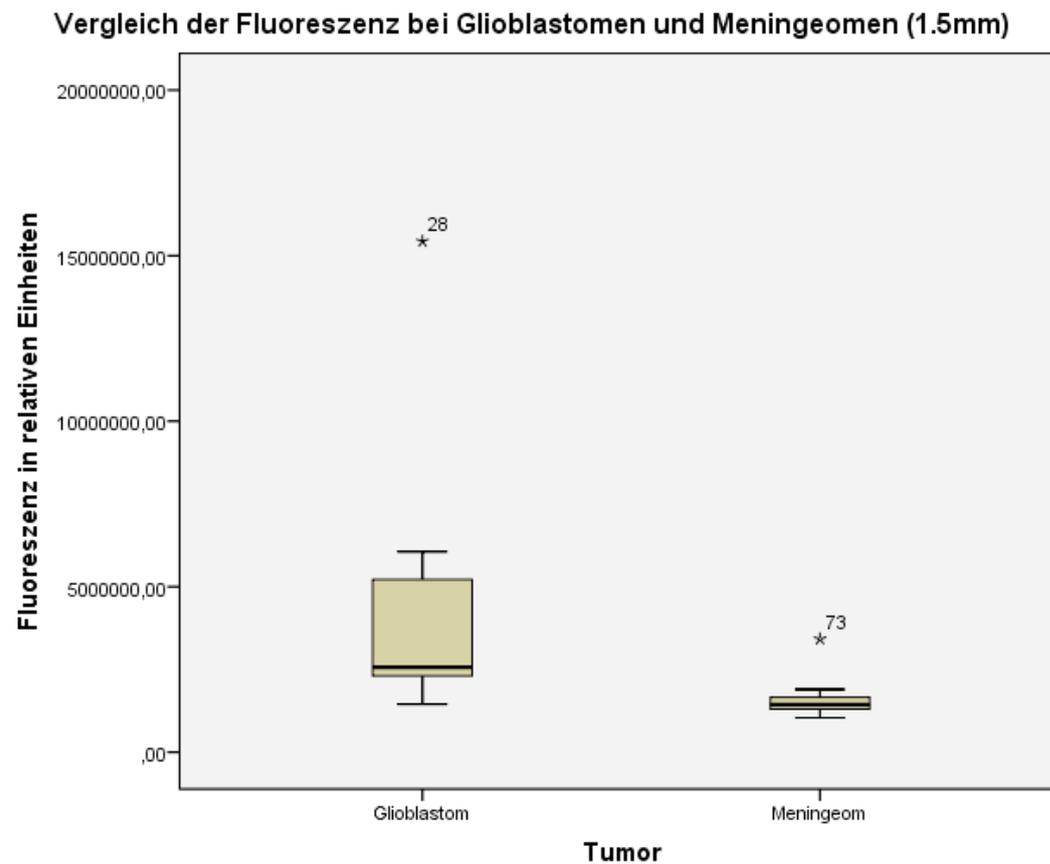


Abbildung 24 Vergleich der Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen (1mm)

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzsignalstärke zwischen Glioblastomen und Meningeomen der untersuchten Kohorte bei 1.5 mm Abstand zwischen Fibersonde und Tumorstück; $U=8$, $Z=-2.635$, $p<0.01$.

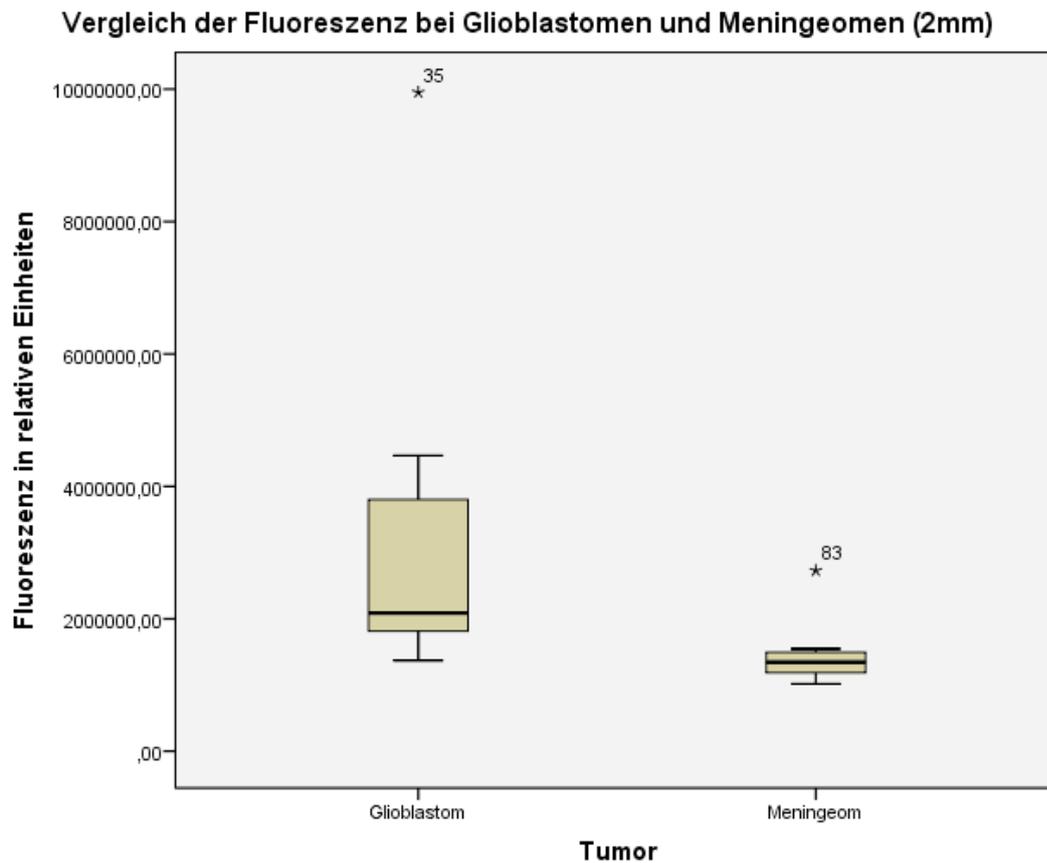


Abbildung 25 Vergleich der Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen bei einem Abstand von 2mm zwischen Fibersonde und Tumor

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzsignalstärke zwischen Glioblastomen und Meningeomen der untersuchten Kohorte bei 2 mm Abstand zwischen Fibersonde und Tumorstück; $U=8$, $Z=-2.635$, $p<0.01$.

3.4.2.1 Ergebnisse der Fluoreszenz bei unterschiedlichem Abstand

Erwartungsgemäß findet man bei zunehmendem Messabstand zwischen Fibersonde und Tumorstück sowohl bei den Glioblastomproben als auch bei den Meningeomproben eine Abnahme der gemessenen Fluoreszenz (siehe auch Kapitel 3.4.3). Die Glioblastome hatten bei jedem Abstand eine größere Tendenz zur Streuung der gemessenen Fluoreszenzsignalstärken als die Meningeome. Mit Zunahme des Abstandes näherten sich die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen an. Trotz Annäherung der Fluoreszenzwerte konnte durch den Wilcoxon Test bei jedem Abstand ein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenz zwischen Glioblastomproben und Meningeomproben gezeigt werden. Für die Glioblastomproben konnte in einer quadratischen Regression 22.6 Prozent der gemessenen Fluoreszenzvarianz durch die unterschiedliche Distanz zwischen Detektionsfiber/Bestrahlungsfiber mit dem Tumorstück aufgeklärt werden; $F=4.683$; $p<0,05$.

Analog dazu zeigt Abbildung 24 das Fluoreszenzverhalten der Meningeome bei unterschiedlichem Abstand von Fibersonde zu Tumorstück.

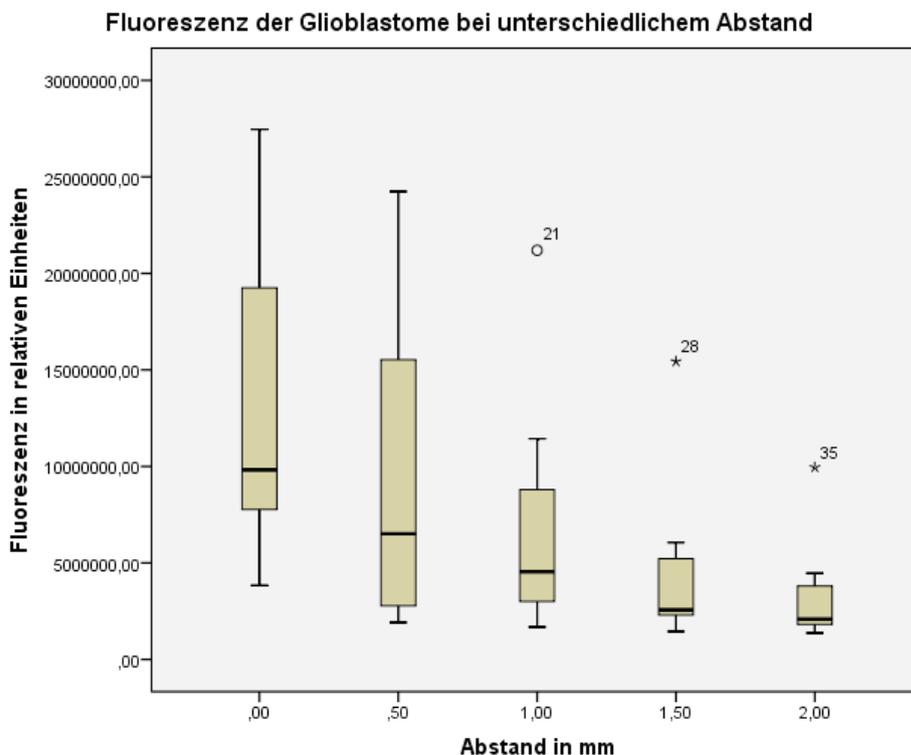


Abbildung 26 Fluoreszenzverhalten der Glioblastomproben bei zunehmendem Abstand zwischen Fibersonde und Tumorprobe

Bei den Meningeomproben zeigte sich durch die quadratischen Regression eine Fluoreszenzvarianzaufklärung von 25.5 Prozent durch die unterschiedliche Distanz; $F=8.042$; $p=0.001$.

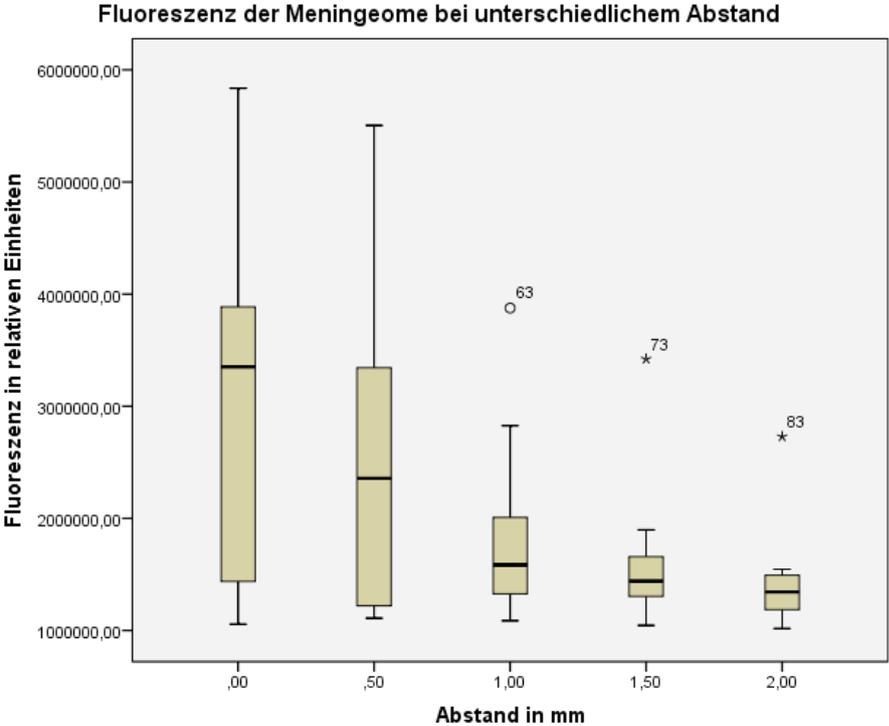


Abbildung 27 Fluoreszenzverhalten der Glioblastomproben bei zunehmendem Abstand zwischen Fibersonde und Tumorprobe

3.4.3 Zusammenhang Perifokales Ödem mit Fluoreszenzsignalstärke

Bei den Glioblastompatienten zeigte sich im Mittelwert der maximalen Ausdehnung des perifokalen Ödems eine Strecke von 34mm (20,4 – 80,2mm) in den betrachteten MRT Bildern. Bei keinem der vier Meningeompatienten konnte ein radiologisch sichtbares perifokales Ödem sicher identifiziert werden. Abbildung 28 zeigt deshalb nur die Messergebnisse der Fluoreszenz in Beziehung zum im MRT gefundenen perifokalen Ödem der Glioblastome.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des perifokalen Ödems und der Fluoreszenzsignalstärke bei den Glioblastomen festgestellt werden.

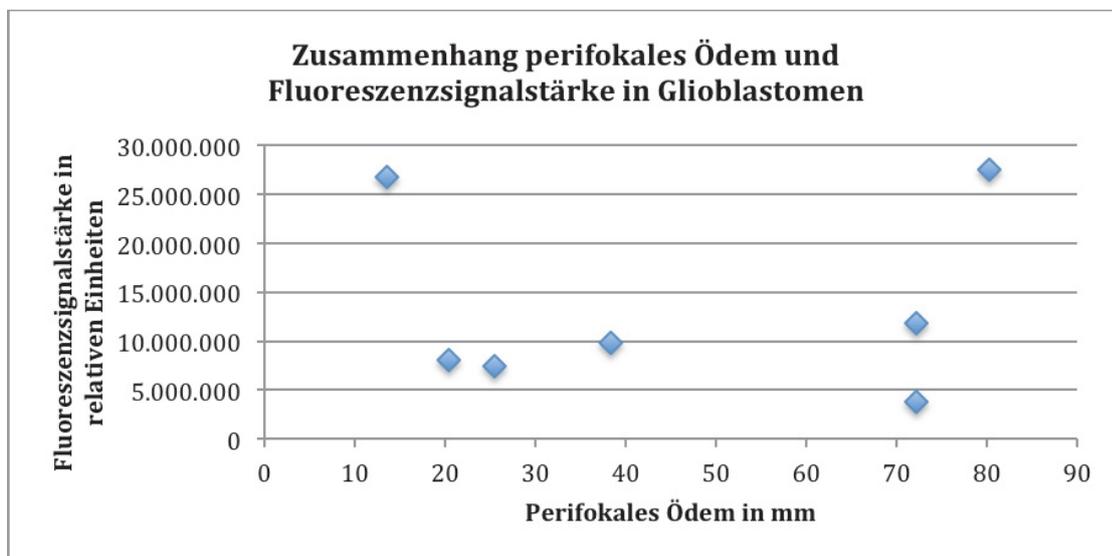


Abbildung 28 Fluoreszenzsignalstärken in Abhängigkeit des perifokalen Ödems bei den Glioblastompatienten

3.5 Vermessung der lysierten Tumore - Überlegung zur ersten Annäherung an absolute Werte

Die Tumorstücke wurden nach der direkten Vermessung mit dem Spektrometer lysiert und anschließend mittels Safire und Faseroptik die Fluoreszenz der Lösung vermessen (siehe Kapitel 2.4.2). Auf Grundlage der linearen Regression aus den Kapiteln 3.2 und 3.3 wurde versucht mittels der mit Safire und Faseroptikspektrometer analysierten Verdünnungsreihen eine erste Annäherung an absolute PPIX-Konzentrationen in Mikrogramm PPIX pro Gramm Tumor zu erreichen.

Im ersten Schritt wurde die lineare Regression der sieben Verdünnungsreihen des *Safire* und der fünf Verdünnungsreihen der Faseroptik analog zu den Kapiteln 3.2 und 3.3 durchgeführt und anhand der Mittelwerte eine Geradengleichung nach dem Vorbild $f(x) = mx + b$ generiert. Dabei wurden bei den *Safire* Verdünnungsreihen nur die PPIX-Konzentrationen von 0 µg/ml bis 1,25 µg/ml berücksichtigt, da höhere PPIX-Konzentrationen für die Berechnung der absoluten Werte keine Rolle spielten. Die lineare Regression der Verdünnungsreihen bei der Faseroptik wurde aus den PPIX-Konzentrationen von 0,1562 µg/ml bis 1,25 µg/ml gebildet.

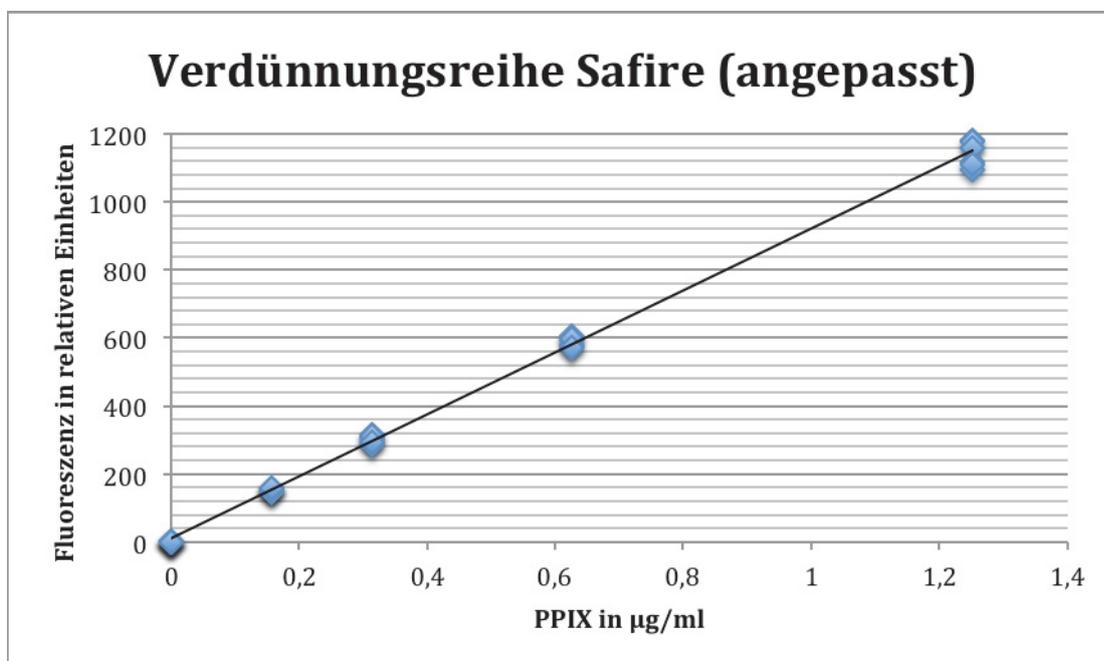


Abbildung 29 Lineare Regression Verdünnungsreihe Safire

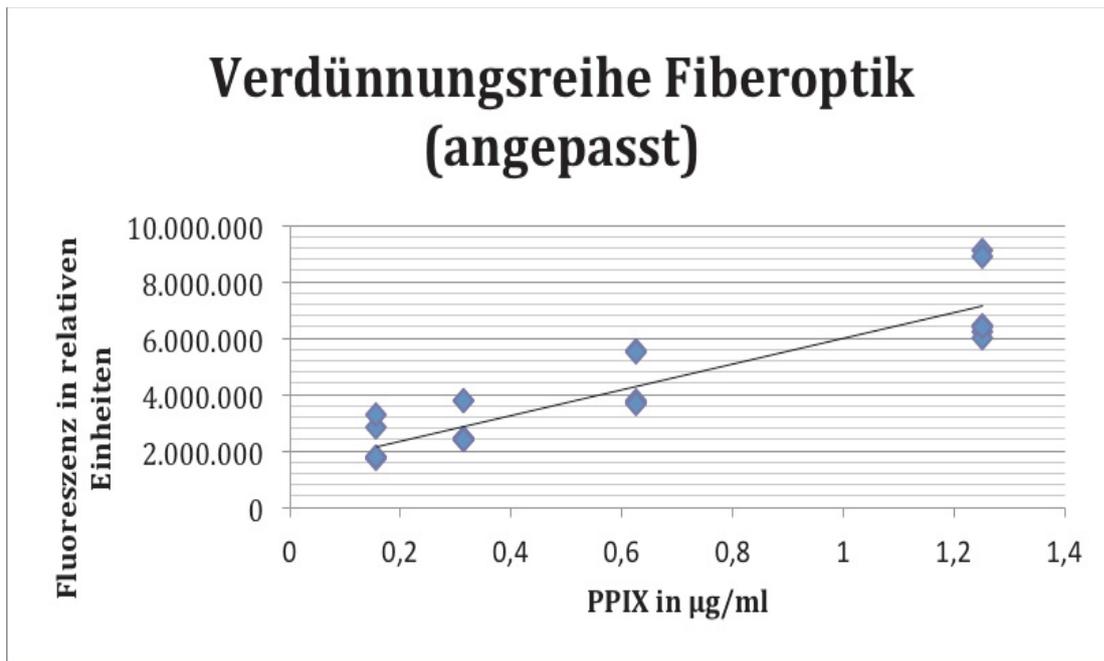


Abbildung 30 Lineare Regression der Verdünnungsreihen (Fiberoptik)

Die Regressionsgrade der Safire Verdünnungsreihen hatte folgende Gleichung:

Formel 1a:

$$f(x) = 911.45x + 10.013$$

Die Regressionsgrade der Verdünnungsreihen der Fiberoptik war folgende:

Formel 1b:

$$f(x) = 5000000x + 1000000$$

Die Fluoreszenz wurde in relativen Einheiten wurde durch $f(x)$ wiedergegeben.

Für die Regression der Safire Verdünnungsreihen ergab sich ein Y-Achsenabschnitt von 10.013 und eine Steigung von 911.45, für die Verdünnungsreihen des Fiberoptikspektrometers ergaben sich ein Y-Achsenabschnitt von 1000000 und eine Steigung von 5000000. (Die Fluoreszenz der lysierten Glioblastome und Meningeome konnte für $f(x)$ eingesetzt und zu x aufgelöst werden. Nachdem das Gewicht der einzelnen Tumorstücke berücksichtigt worden ist, konnten die annäherungsweise absoluten PPIX-Konzentrationen berechnet werden).

3.5.1 Spektrometrische Vermessung der lysierten Glioblastome

Jede Glioblastomprobe wurde gewogen und in 1000 µl *Solvable* lysiert, anschließend wurden jeweils 100 µl der Lösung in drei Wells pipettiert und mittels Safire und Fiberoptik vermessen (siehe auch Kapitel 2.3.4). Im Folgenden sind die Gewichte der unterschiedlichen Tumorproben und ihre Fluoreszenz in relativen Einheiten jeweils für Safire und Fiberoptikspektrometer angegeben:

Safire

Tumorprobe	Gewicht in g	Fluoreszenz Well 1	Fluoreszenz Well 2	Fluoreszenz Well 3
1	0,0062	42	42	43
2	0,0312	115	112	114
3	0,0141	56	57	55
4	0,2195	276	280	280
5	0,0564	112	106	111
6	0,015	34	34	35
7	0,0134	34	34	33

Tabelle 2 Fluoreszenzsignalstärken lysierte Glioblastome (Safire)

Fiberoptik

Tumorprobe	Gewicht in g	Fluoreszenz Well 1	Fluoreszenz Well 2	Fluoreszenz Well 3
1	0,0062	1.228.454	1.234.305	1.232.901
2	0,0312	1.426.088	1.409.237	1.393.274
3	0,0141	1.321.466	1.332.373	1.316.739
4	0,2195	1.327.973	1.382.835	1.437.370
5	0,0564	1.244.182	1.271.707	1.298.576
6	0,015	1.160.859	1.210.104	1.205.844
7	0,0134	1.221.806	1.256.540	1.208.840

Tabelle 3 Fluoreszenzsignalstärken lysierte Glioblastome (Fiber)

Aus den Fluoreszenzwerten von Well eins bis drei wurde jeweils der Mittelwert gebildet:

Safire

Tumorprobe	Fluoreszenz
1	42
2	114
3	56
4	279
5	110
6	34
7	34

Tabelle 4 Mittelwerte Glioblastome (Safire)

Fiberoptik

Tumorprobe	Fluoreszenz
1	1.233.603
2	1.401.256
3	1.324.556
4	1.410.103
5	1.285.142
6	1.207.974
7	1.232.690

Tabelle 5 Mittelwerte Glioblastome (Fiber)

Die gemessene Fluoreszenz in Form des Mittelwertes entspricht in unserem Model dem $f(x)$ in Formel 1 in Kapitel 3.5. Um zu erfahren, wie viel PPIX sich in den entsprechenden Proben befindet, wurde die Formel 1 zu x umgestellt. Daraus ergab sich für den Safire folgende Formel:

Formel 2a:

$$X = (f(x) - 10.013) / 911.45$$

Für das Fiberoptikspektrometer ergab sich nach der Umstellung zu X :

Formel 2b:

$$X = (f(x) - 1000000) / 5000000$$

In Formel 2 a und b wurden die Mittelwerte aus den Tabellen 4 und 5 eingesetzt:

Safire		Fiber	
Tumorprobe	$\mu\text{g PPIX/ml Solvable}$	Tumorprobe	$\mu\text{g PPIX/ml Solvable}$
1	0,0354603	1	0,046377333
2	0,1137239	2	0,0819066
3	0,0504548	3	0,0647052
4	0,2947541	4	0,0765452
5	0,1093353	5	0,054297667
6	0,0266831	6	0,0384538
7	0,0259517	7	0,0458124

Tabelle 6 $\mu\text{g PPIX / ml Solvable (Lysat) - Safire}$

Tabelle 7 $\mu\text{g PPIX / ml Solvable (Lysat) - Fiber}$

Aus den Tabellen 6 und 7 kann entnommen werden, wieviel PPIX in einem Milliliter (ml) des jeweiligen Lysats enthalten waren. Hier fallen deutlich unterschiedliche Messergebnisse hinsichtlich PPIX-Konzentration im Lysat zwischen Faseroptikspektrometer und Safire auf. Anschließend wurde das Tumorgewicht und die Dichte (zur Vereinfachung Dichte=1) mit eingerechnet durch folgende Formel:

Formel 3

$$\begin{aligned}
 & (\text{Tumorgewicht (Tg)} \times \text{Dichte (D)} \times \text{Errechnete PPIX-Konzentration (PK)}) + \text{Errechnete PPIX-Konzentration (PK)} \\
 & = \\
 & (\text{Tg} \times 1 \times \text{PK}) + \text{PK}
 \end{aligned}$$

Durch Einsetzen aus Tabelle 6 und 7 in Formel 3 ergibt sich die PPIX-Konzentration in Mikrogramm (µg) pro Tumorstück:

Safire		Fiber	
Tumorprobe	µg PPIX/Stk Tumor	Tumorprobe	µg PPIX/Stk Tumor
1	0,035680201	1	0,046664873
2	0,117272106	2	0,084462086
3	0,051166182	3	0,065617543
4	0,359452681	4	0,093346871
5	0,11550182	5	0,057360055
6	0,027083371	6	0,039030607
7	0,026299441	7	0,046426286

Tabelle 8 µg PPIX / Tumorstück (Safire)

Tabelle 9 µg PPIX / Tumorstück (Fiber)

In einem letzten Schritt wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Werte die PPIX-Konzentration pro Gramm Tumorgewicht angegeben werden, indem folgende Formel aufgestellt wurde:

Formel 4

$$1g / \text{Tumorgewicht} \times \text{PPIX-Konzentration pro Tumorstück}$$

Durch einsetzen in Formel 4 ergaben sich folgende Werte:

Safire		Fiber	
Tumorprobe	µg PPIX/ g Tumor	Tumorprobe	µg PPIX/ g Tumor
1	5,754871164	1	7,526592387
2	3,758721348	2	2,707118138
3	3,628807243	3	4,653726477
4	1,637597638	4	0,425270485
5	2,047904603	5	1,017022253
6	1,805558055	6	2,602040467
7	1,962644875	7	3,464648221

Tabelle 10 µg PPIX/ Gramm Glioblastom (Safire)

Tabelle 11 µg PPIX/ Gramm Glioblastom (Fiber)

3.5.2 Spektrometrische Vermessung der lysierten Meningeome

Analog zu 3.5.1 wurden die PPIX-Konzentration für die lysierten Meningeome berechnet:

Safire

Tumorprobe	Gewicht in g	Fluoreszenz Well 1	Fluoreszenz Well 2	Fluoreszenz Well 3
1	0,2913	15	16	17
2	0,1846	122	124	122
3	0,022	166	164	164
4	0,0203	157	155	160
5	0,01	7	5	6
6	0,085	fehlt	fehlt	fehlt
7	0,0931	364	365	357
8	0,0684	107	109	105
9	0,0231	35	34	35
10	0,0319	19	17	16

Tabelle 12 Fluoreszenzsignale der lysierten Meningeome (Safire)

Fiberoptik

Tumorprobe	Gewicht in g	Fluoreszenz Well 1	Fluoreszenz Well 2	Fluoreszenz Well 3
1	0,2913	1.049.122	1.049.824	1.037.981
2	0,1846	1.374.597	1.421.033	1.402.028
3	0,022	1.128.466	1.105.716	1.157.254
4	0,0203	1.199.197	1.195.124	1.207.904
5	0,01	1.062.510	1.085.260	1.060.075
6	0,085	1.331.484	1.343.233	1.397.721
7	0,0931	1.888.204	1.949.760	2.013.422
8	0,0684	1.466.673	1.475.099	1.490.874
9	0,0231	1.098.694	1.106.980	1.121.397
10	0,0319	1.085.868	1.093.124	1.018.788

Tabelle 13 Fluoreszenzsignale der lysierten Meningeome (Fiber)

Berechnung der Mittelwerte für Safire und Fiberoptik Messung:

Safire	
Tumorprobe	Mittelwert Fluoreszenz
1	16
2	123
3	165
4	157
5	6
6	fehlt
7	362
8	107
9	35
10	17

Tabelle 14 Mittelwerte Meningeome (Safire)

Fiberoptik	
Tumorprobe	Mittelwert Fluoreszenz
1	1.045.642
2	1.399.219
3	1.130.479
4	1.200.742
5	1.069.282
6	1.357.479
7	1.950.462
8	1.477.549
9	1.109.024
10	1.065.927

Tabelle 15 Mittelwerte Meningeome (Fiber)

Einsetzen der Mittelwerte in Formel 2 aus 2.5.1 ergibt die PPIX-Konzentration in μg pro ml Tumorlysate:

Safire	
Tumorprobe	μg PPIX/ml <i>Solvable</i>
1	0,0065687
2	0,1235983
3	0,1696787
4	0,1616329
5	-0,0044029
6	0,3861836
7	0,1064096
8	0,0270488
9	0,0080315
10	0,0065687

Tabelle 16 μg PPIX / ml Solvable (Lysat) - Safire

Fiber	
Tumorprobe	μg PPIX/ml <i>Solvable</i>
1	0,009128467
2	0,079843867
3	0,026095733
4	0,040148333
5	0,013856333
6	0,071495867
7	0,1900924
8	0,095509733
9	0,021804733
10	0,013185333

Tabelle 17 μg PPIX / ml Solvable (Lysat) - Fiber

Einsetzen der Werte aus den Tabellen 17 und 18 in die Formel 3 aus 2.5.1 ergibt PPIX–Konzentration pro Tumorstück:

Safire	
Tumorprobe	µg PPIX/Stk Tumor
1	0,008482103
2	0,146414541
3	0,173411649
4	0,164914078
5	-0,004446903
6	0,422137243
7	0,113687982
8	0,02767367
9	0,008287731
10	0,008482103

Tabelle 18 µg PPIX / Tumorstück (Safire)

Fiber	
Tumorprobe	µg PPIX/Stk Tumor
1	0,011787589
2	0,094583044
3	0,026669839
4	0,040963345
5	0,013994897
6	0,077573015
7	0,207790002
8	0,102042599
9	0,022308423
10	0,013605945

Tabelle 19 µg PPIX / Tumorstück (Fiber)

Durch Einsetzen in Formel 4 wurde in einem letzten Schritt die PPIX–Konzentration pro Gramm Tumorgewebe berechnet:

Safire	
Tumorprobe	µg PPIX/g Tumor
1	0,029118103
2	0,79314486
3	7,882347674
4	8,123846191
5	-0,444690329
6	4,534234614
7	1,662104994
8	1,197994365
9	0,259803464
10	0,029118103

Tabelle 20 µg PPIX/ Gramm Meningeom (Safire)

Fiber	
Tumorprobe	µg PPIX/g Tumor
1	0,040465462
2	0,512367521
3	1,21226543
4	2,017898744
5	1,399489667
6	0,91262371
7	2,231901208
8	1,491850864
9	0,965732583
10	0,426518667

Tabelle 21 µg PPIX/ Gramm Meningeom (Fiber)

3.5.3 Vergleich der berechneten absoluten PPIX Konzentrationen

Glioblastom- und Meningeomproben

Für die Meningeomproben eins, fünf und zehn ergaben sich kleinere Fluoreszenzwerte als der Y-Achsenabschnitt der linearen Regressionsformel (2.5 Formel 1), somit ergaben sich für diese Proben negative PPIX-Konzentrationen. Die PPIX-Konzentration wurde somit für dieses Verfahren als unter der Nachweisgrenze angesehen. Für die mittels Safire Spektrometer ermittelten absoluten Werte ergab der Wilcoxon Test keinen signifikanten Unterschied zwischen den PPIX-Konzentrationen der Meningeome und Glioblastome; $U= 21$, $Z= -1.111$
 $p=0,299$.

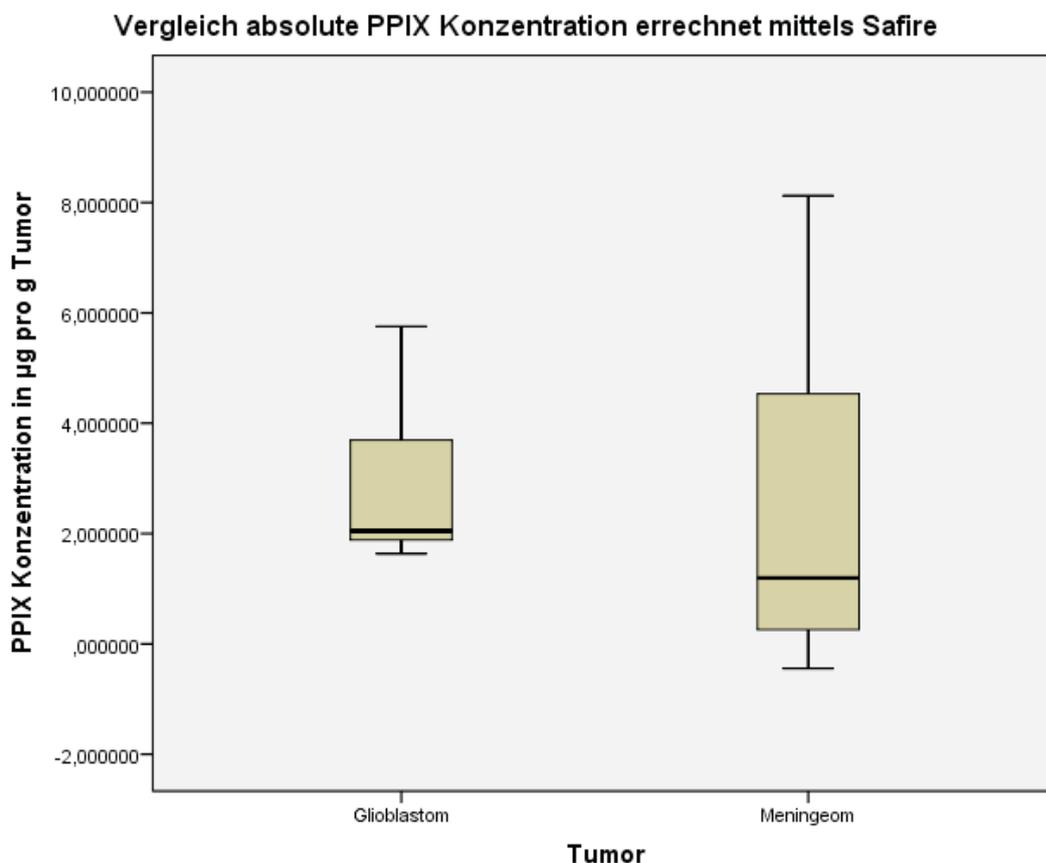


Abbildung 31 Vergleich der mittels Safire Spektrometer errechneten absoluten PPIX-Konzentrationen in µg/g Tumor

Die mittels Fiberoptik ermittelten absoluten Werte zeigten im Wilcoxon Test für die Glioblastome signifikant höhere absolute PPIX-Konzentrationen; $U=14$, $Z=-2.049$, $p<0.05$

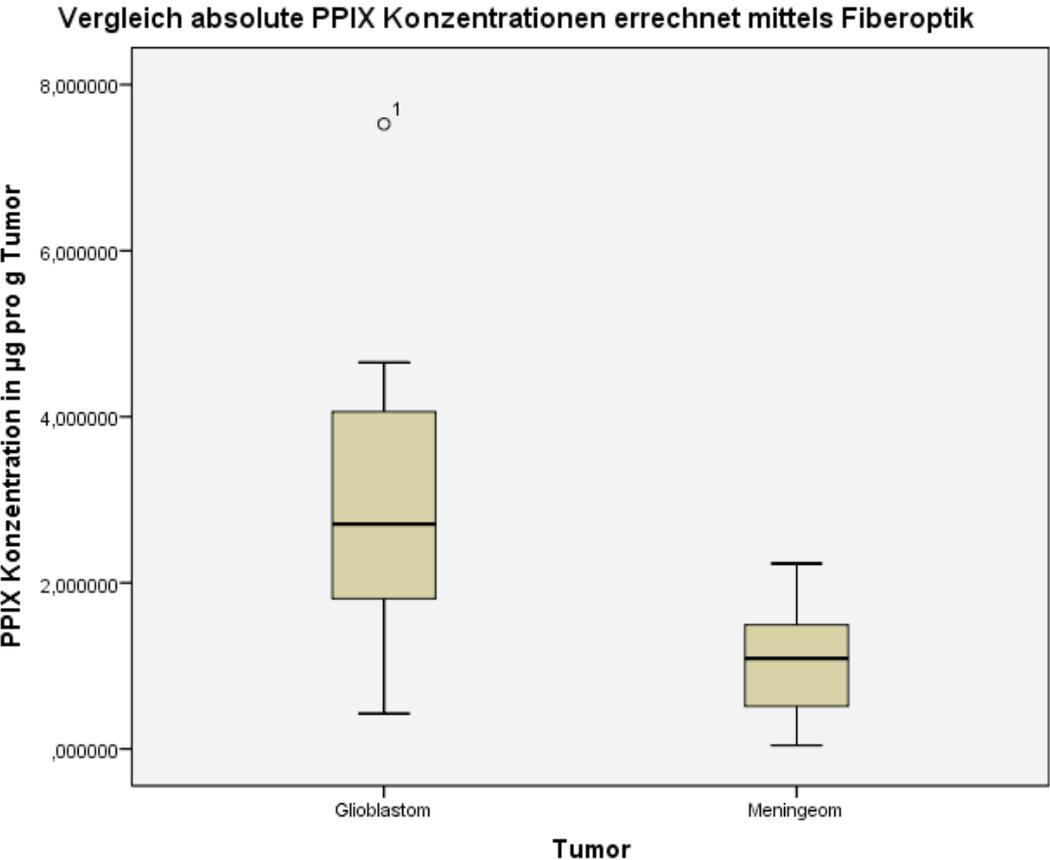


Abbildung 32 Vergleich der mittels Fiber-Spektrometer errechneten absoluten PPIX-Konzentrationen in µg/g Tumor

3.5.4 Vergleich der Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Messinstrumente

In einem letzten Schritt wurden die Messinstrumente untereinander verglichen. Dafür wurden die absoluten PPIX-Konzentrationen, die auf Basis der Fiberoptikmessung für die Glioblastome errechnet wurden, mit denen verglichen, die auf Basis der Safiremessung errechnet wurden. Im Anschluss wurden die Ergebnisse für die Meningeome auf die gleiche Weise verglichen. Es wurde der nicht parametrische Wilcoxon Test angewendet.

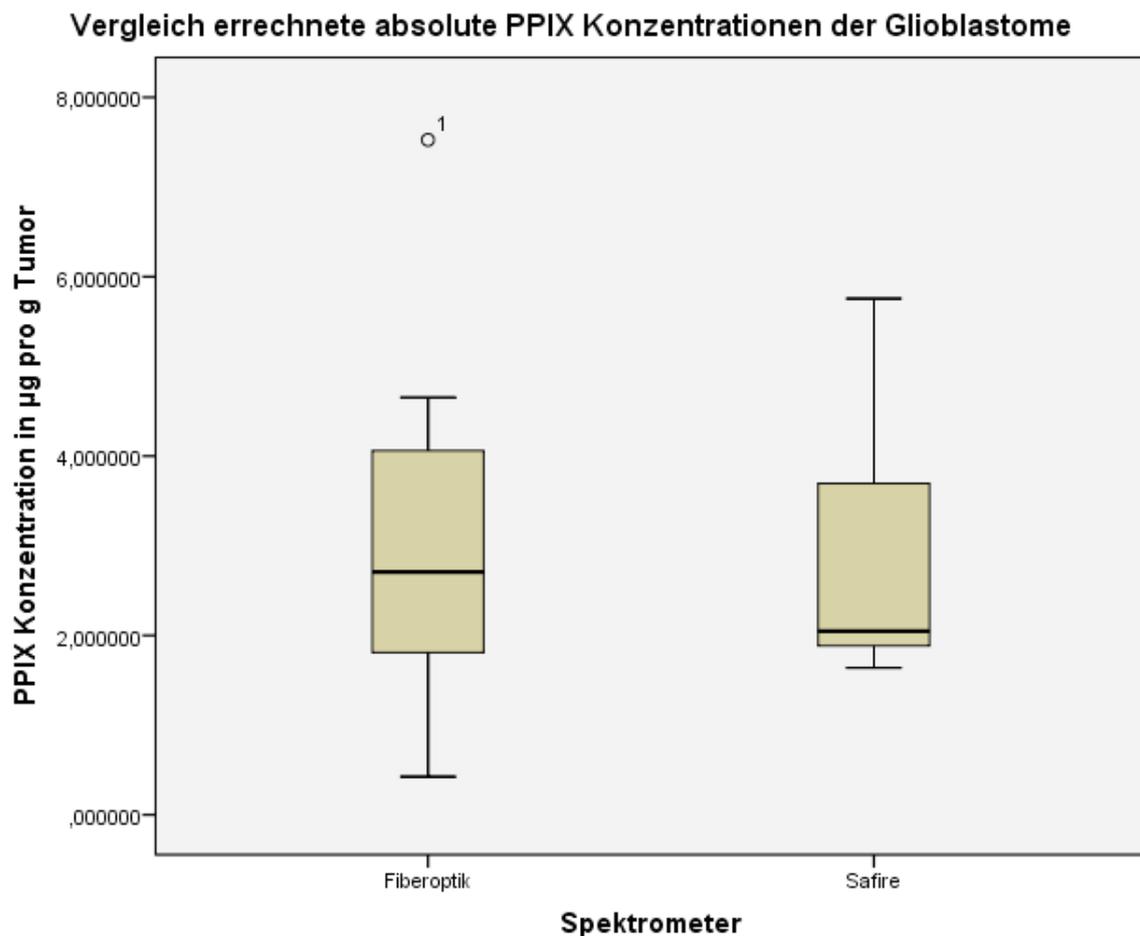


Abbildung 33 Vergleich errechnete absolute PPIX-Konzentrationen der Glioblastome (Fiberoptik vs. Safire)

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mittels Fiberoptik errechneten und mittels Safire errechneten absoluten PPIX-Konzentrationen der Glioblastome; U: 24, Z=-0.64, p=1.00.

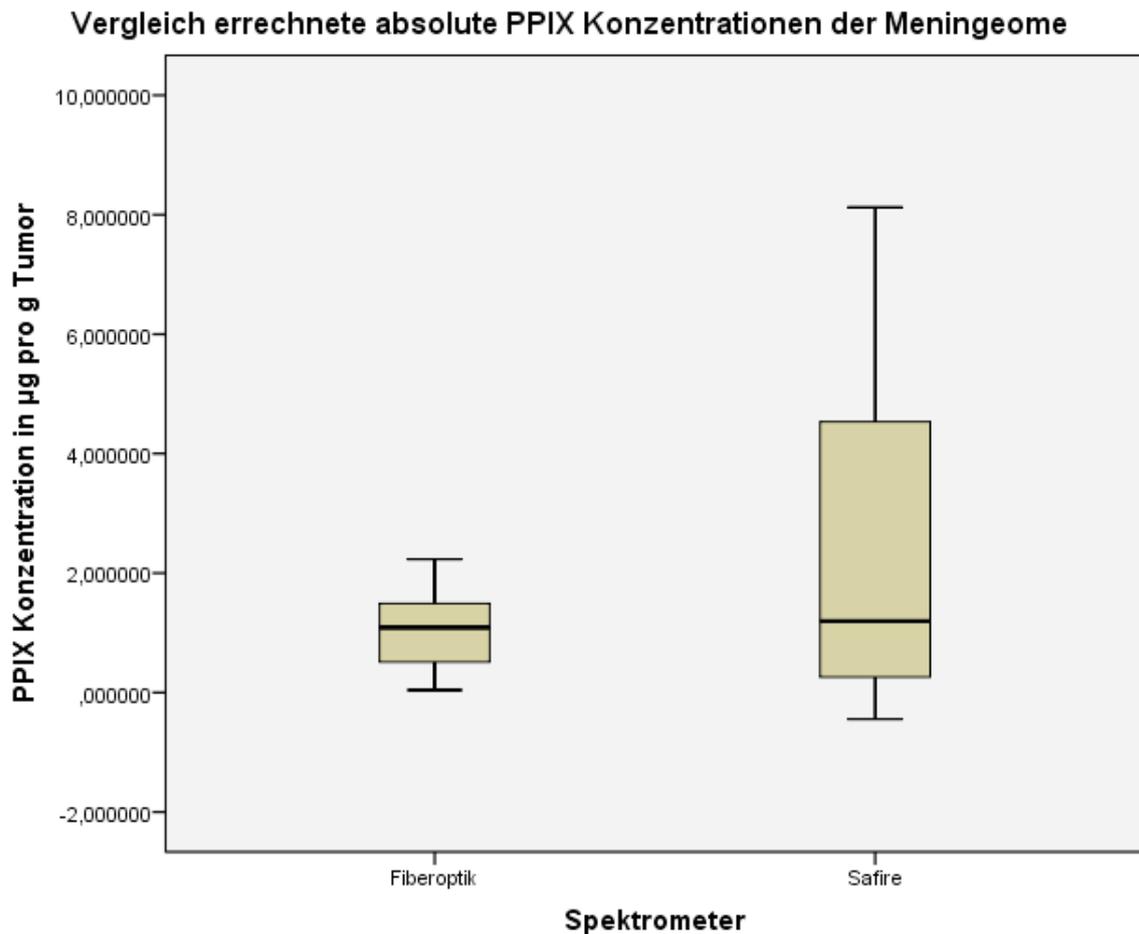


Abbildung 34 Vergleich errechnete absolute PPIX Konzentrationen der Glioblastome (Fiberoptik vs. Safire)

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mittels Fiberoptik errechneten und mittels Safire errechneten absoluten PPIX-Konzentrationen der Meningeome; U: 43, Z=0.163, p=0.9.

3.6 Postoperativ anders klassifizierte Tumorproben

Von den 14 präoperativ als Glioblastom oder Meningeom eingeschätzten Tumoren wurden drei postoperativ histologisch einer anderen Tumorentität zugeordnet. Von den drei Tumoren wurde einer als Strahlennekrose, einer als cerebrale Metastase eines Bronchialkarzinoms und der dritte als anaplastisches Astrozytom klassifiziert. Die Ergebnisse sind im Folgenden in Bezug auf die Ergebnisse der Glioblastome und Meningeome aufgeführt. Von dem anaplastischen Astrozytom und der Strahlennekrose wurden jeweils eine Probe und von der Bronchialkarzinommetastase zwei Proben entnommen und untersucht.

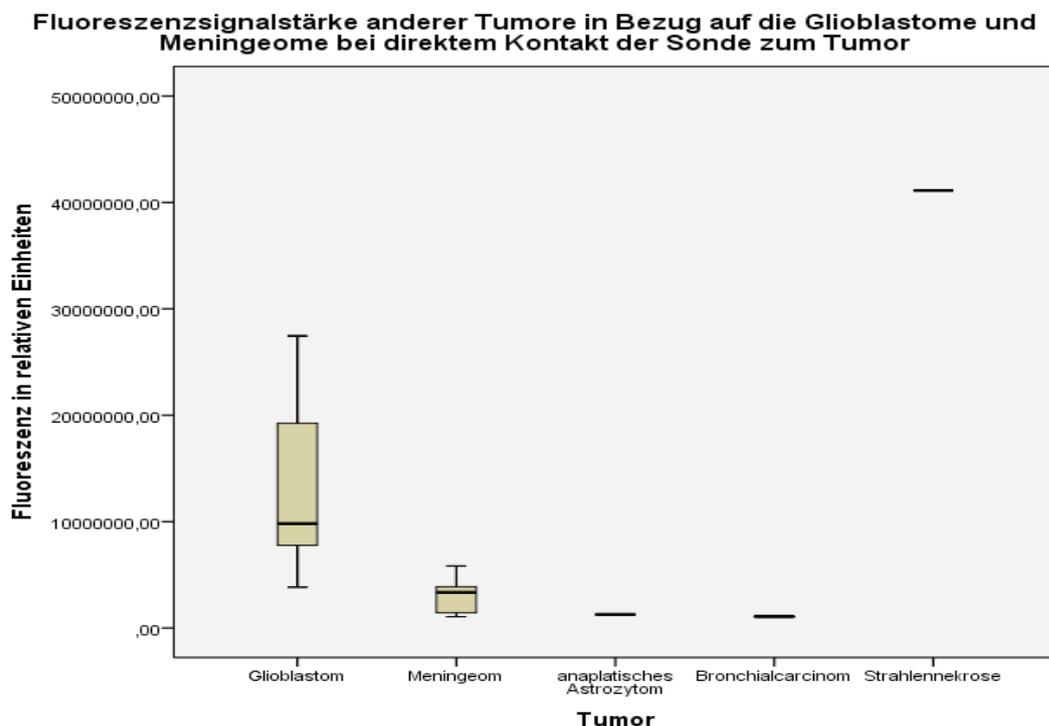


Abbildung 35 die Fluoreszenzsignalstärke der Proben des anaplastischen Astrozytoms, des Bronchialkarzinoms und der Strahlennekrose in Bezug auf die bereits vorher aufgeführten Fluoreszenzsignalstärken der Glioblastom- und Meningeomproben

Bei zunehmendem Abstand von Fibersonde zu Tumorprobe konnte bei der Stahlennekrose eine starke Abnahme der Fluoreszenzsignalstärke beobachtet werden. Bei der Bronchialkarzinommetastase und dem anaplastische Astrozytom zeigte sich bei insgesamt geringeren Fluoreszenzsignalstärken eine geringere Abnahme.

Für das anaplastische Astrozytom zeigte sich die höchste Fluoreszenzsignalstärke bei 0,5mm Abstand von Sonde zu Tumor, bei größeren Abständen wurde diese immer geringer.



Abbildung 36 Fluoreszenzverhalten der Probe des anaplastischen Astrozytoms

Die beiden Tumorproben der Bronchialkarzinommetastase zeigten ein ähnliches Fluoreszenzverhalten wie das anaplastische Astrozytom bei insgesamt der geringsten Fluoreszenzsignalstärke von allen vermessenen Tumoren.

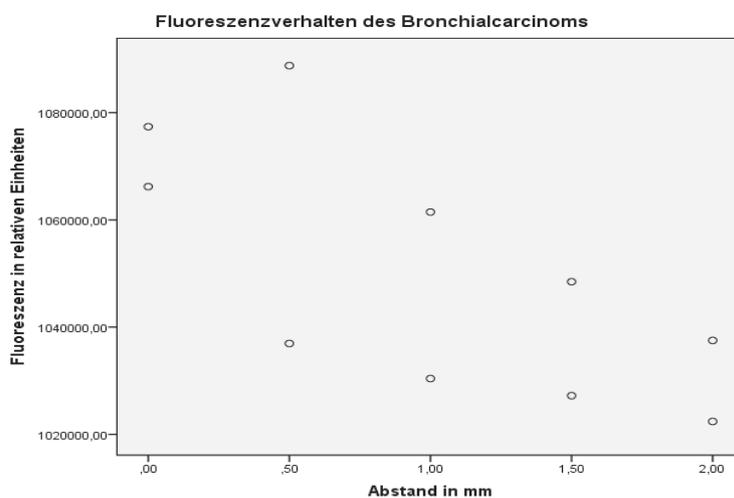


Abbildung 37 Fluoreszenzverhalten der beiden Proben des Bronchialcarinoms

Die postoperativ feingeweblich als Strahlennekrose klassifizierte Tumorprobe zeigte die höchste Fluoreszenzsignalstärke aller Tumore. Keine Glioblastom- oder Meningeomprobe zeigte derart hohe Fluoreszenzwerte.

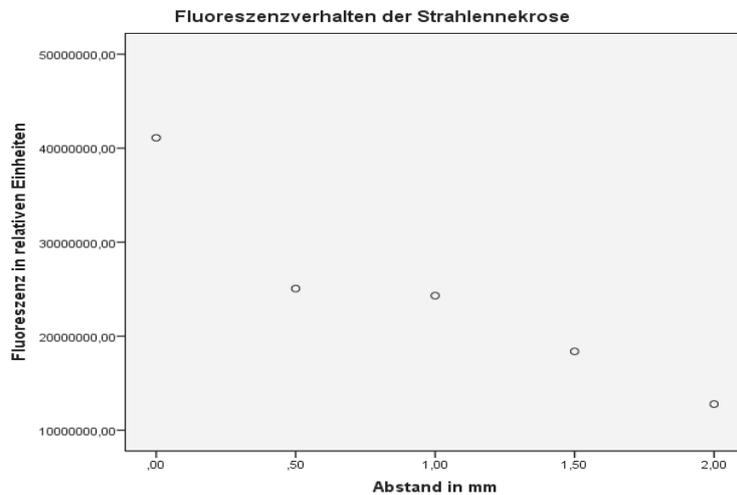


Abbildung 38 Fluoreszenzverhalten der Strahlennekrose.

Analog zu den Kapiteln 3.5 und 3.5.1 wurde eine Annäherung an absolute PPIX-Konzentrationen für das anaplastische Astrozytom, das Bronchialcarcinom und die Strahlennekrose mit dem Faseroptikspektrometer und dem Safire versucht.

Für das anaplastische Astrozytom ergab sich durch die Berechnung aus den Werten des Faseroptikspektrometers $0.32 \mu\text{g/g}$ Tumor und durch den Safire ein Wert von $-1.57 \mu\text{g/g}$ Tumor. Es zeigte sich somit eine bei der Faseroptikmessung geringe PPIX-Konzentration. Bei dem Safire war diese nicht festzustellen und die absolute PPIX-Konzentration lag unter der Nachweisgrenze. Hier zeigt sich eine Schwäche des Verfahrens, worauf in der Diskussion in Kapitel 4.6 genauer eingegangen wird. Die beiden Bronchialkarzinomproben waren bei der Faseroptik beide unter der Nachweisgrenze. Bei dem Safire zeigte sich eine Probe unter der Nachweisgrenze, die andere hatte eine geringe absolute PPIX-Konzentration von $0,32\mu\text{g/g}$ Tumor. Die Strahlennekrose zeigte bei der Safirevermessung einen hohen Wert von $6,64\mu\text{g/g}$ Gewebe und bei der Faseroptikvermessung den mittelhohen Wert von $3.28\mu\text{g/g}$ Gewebe.

3.7 Feingewebliche Untersuchung mit speziellem Ferrochelataaseantikörper

Bei der durch die Neuropathologie durchgeführten Spezialfärbung mit den Ferrochelataaseantikörpern konnte bei keinem Meningeom oder Glioblastom eine positive Färbung festgestellt werden. Die Funktionalität der Antikörper konnte durch die Färbung der Kontrollgewebe sichergestellt werden.

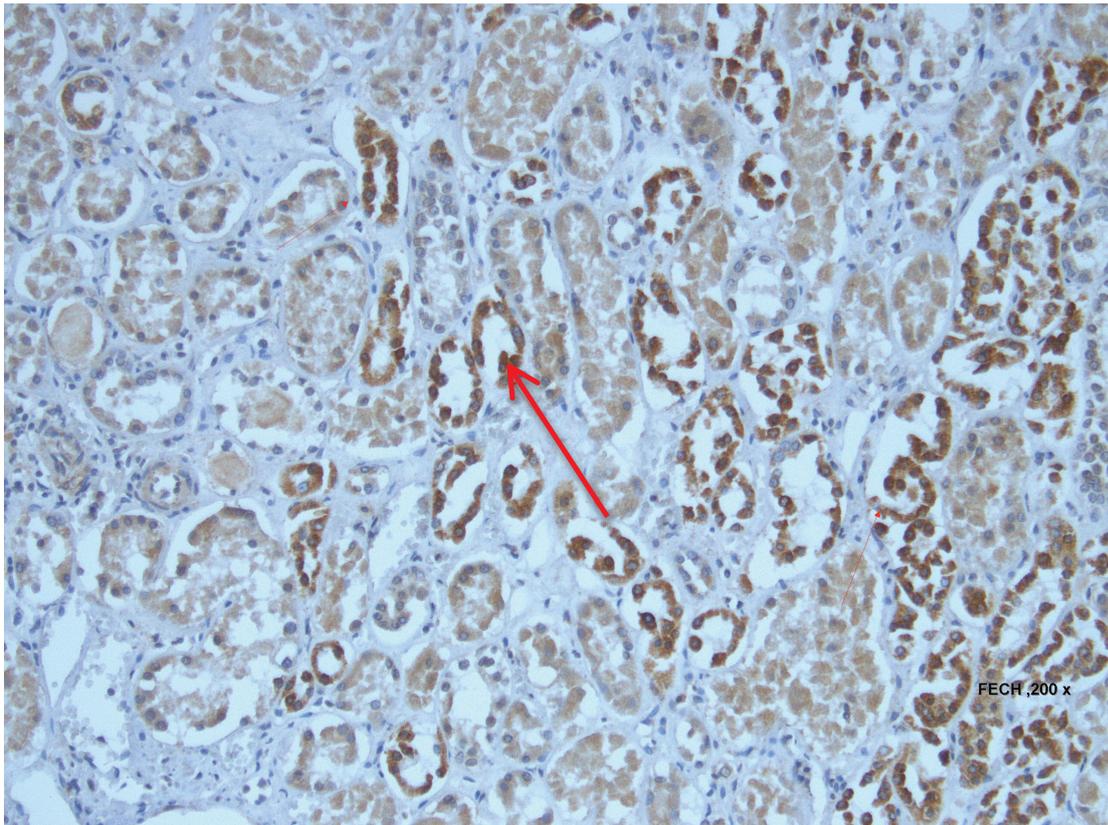


Abbildung 39 Kontrollschnitt von Nierengewebe, das Positivität für Ferrochelataase Antikörperfärbung zeigt (200x)

Die Abbildung 39 zeigt die Funktionalität des verwendeten Antikörpers. Es zeigt sich eine starke braune Färbung der Nierentubuli (roter Pfeil). Für die aus der Studie entnommenen Tumorproben konnte bei keiner Glioblastom- oder Meningeomprobe eine positive Färbung festgestellt werden. Abbildung 40 und 41 zeigen die Ferrochelataasefärbung für ein Meningeom und Glioblastom. Im Vergleich mit der Positivkontrolle des Nierengewebes zeigt sich hier keine Anfärbung durch Ferrochelataase Antikörper.

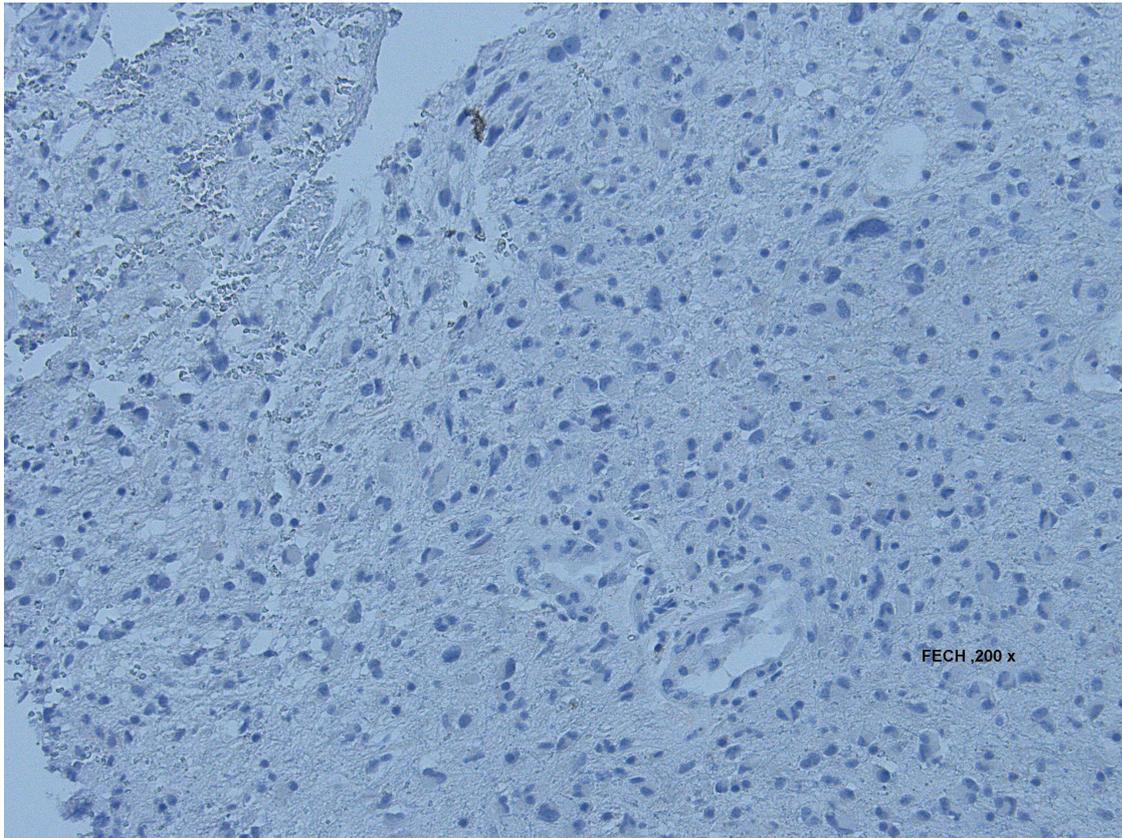


Abbildung 40 Ferrochelatasefärbung eines Glioblastoms aus der Studie; keine Anfärbung durch Ferrochelataseantikörper (200X)

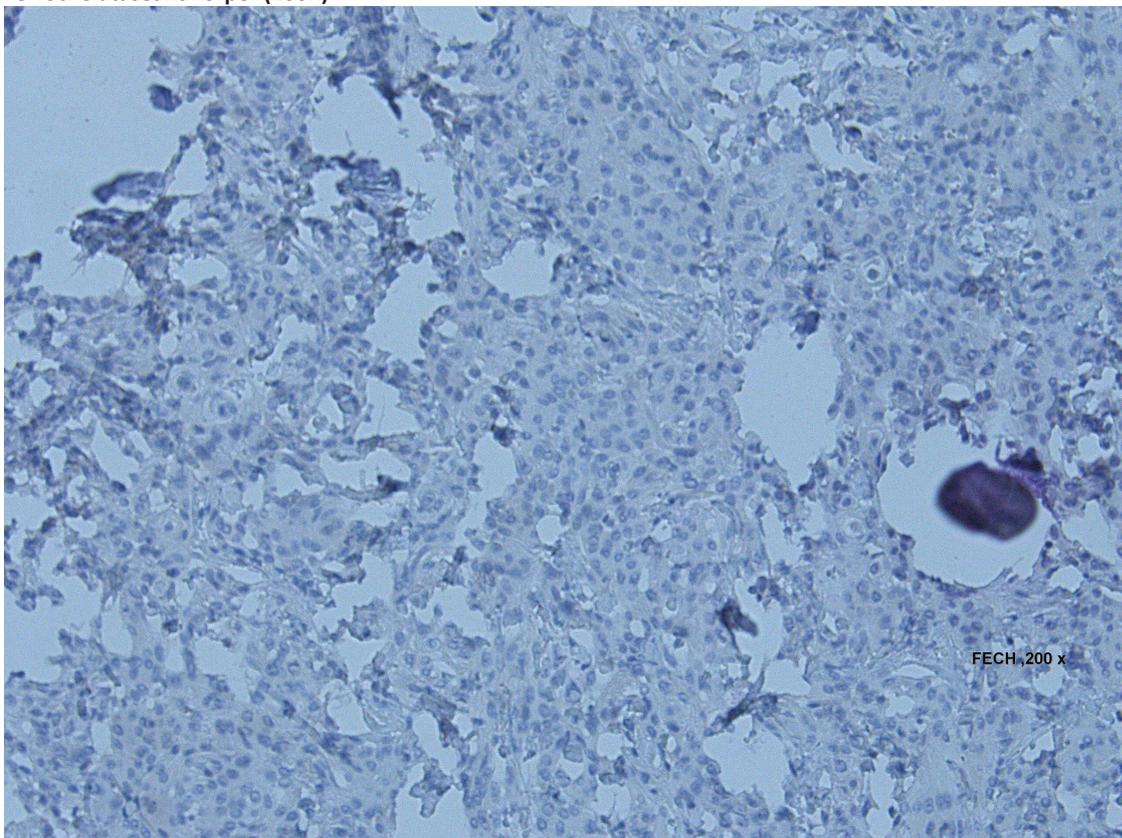


Abbildung 41 Ferrochelatasefärbung eines Meningeoms WHO I aus der Studie; keine Anfärbung durch Ferrochelataseantikörper (200x)

4 Diskussion

In dem folgenden Abschnitt wird auf die einzelnen Aspekte der Experimente näher eingegangen. Des Weiteren wird diskutiert, welche Schritte noch unternommen werden müssten, um die Technik eines Tages im klinischen Alltag suffizient anwenden zu können und welche Vorteile sich für den Patienten daraus ergeben könnten.

4.1 Verdünnungsreihen

Grundlage für die Quantifizierung der von uns angefertigten Verdünnungsreihen mit dem Faseroptik Spektrometer (USB 2000+) war eine Arbeit, die zuvor in dem neurochirurgischen Labor der Universitätsklinik Düsseldorf mit dem Schwerpunkt der photodynamischen Therapie bei Meningeomzellen in einem *in vitro* Modell durchgeführt wurde (A. Giannakis et al., 2014). Die in dieser Arbeit beschriebene Methode zur Quantifizierung der PPIX-Verdünnungsreihen wurde von uns modifiziert. Bei *Giannakis et al. (2014)* wurden die PPIX-Verdünnungsreihen ebenfalls in Form von Halbierungsreihen angefertigt, wobei sie ebenfalls die Konzentrationen 5µg PPIX/ml, 2,5µg PPIX/ml, 1,25µg PPIX/ml, 0,625µg PPIX/ml, 0,3125µg PPIX/ml und 0,15625µg PPIX/ml benutzten und zusätzlich die Konzentrationen 10µg PPIX/ml und 20µg PPIX/ml vermessen hatten. Sie benutzten als Gefäß für die Fluoreszenzvermessung der Verdünnungsreihen Glasküvetten, die nach jeder Vermessung gereinigt werden mussten. Um Verunreinigungen zwischen den einzelnen Messungen vorzubeugen und den Prozess der Fluoreszenzvermessung zu beschleunigen, wurden in dieser Arbeit schwarze *96-Well Microplates*, die den Vorteil boten, dass zwischen den einzelnen Messungen der Fluoreszenzsignalstärke keine Reinigung erfolgen musste. Da es sich um schwarze *96-Well Microplates* handelte, konnte jede Konzentration im *Well* für sich vermessen werden, ohne dass es zu einer Beeinflussung der Fluoreszenz durch Lichteffekte von daneben liegenden *Wells* kam. Des Weiteren nutzten *Giannakis et al. (2014)* als Basischemikalie der Verdünnungsreihen *Phosphat Buffered Saline (PBS)*. Da zu einem späterem Zeitpunkt eine Vermessung von lysiertem Tumorgewebe erfolgen und die Fluoreszenz der lysierten Gehirntumore mit der Fluoreszenz der Verdünnungsreihen verglichen werden sollte, wurde in dieser Studie *Solvable* als Basischemikalie benutzt.

Solvable wurde schon in einer vorherigen Arbeit erfolgreich für die Fluoreszenzvermessung von lysierten Astrozytomen und Glioblastomen eingesetzt, wobei der Lysevorgang in der vorherigen Arbeit durch rein chemische Lyse in einem Wasserbad durchgeführt wurde (Johansson et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurde bei der vorliegenden Arbeit eine mechanische Zerkleinerung und Lysierung des Tumorgewebes gewählt, um den Lysevorgang zu beschleunigen. Im Vergleich zu *Giannakis et al. (2014)* führten wir neben der Fluoreszenzvermessung der Verdünnungsreihen mit der Faseroptik zusätzlich eine Vermessung der Fluoreszenz der Verdünnungsreihen mit einem Safire Spektrometer durch und verglichen die Ergebnisse der Fluoreszenzvermessungsverfahren miteinander. In einer linearen Regressionsanalyse konnten bei der Faseroptik 93.5 Prozent der Fluoreszenzvarianz durch die PPIX-Konzentration aufgeklärt werden ($F=492.114$; $p<0,001$), bei dem Safire konnten 99.1 Prozent der Fluoreszenzvarianz durch die PPIX-Konzentration aufgeklärt werden ($F=5015.284$; $p<0,001$). Es bleibt festzuhalten, dass sich beide Verfahren zur Quantifizierung von PPIX-Verdünnungsreihen eignen. Das Safire Spektrometer zeigt jedoch leichte Vorteile in der Vermessung der Verdünnungslösungen. Damit konnten die Ergebnisse von *Giannakis et al. (2014)* reproduziert werden.

4.2 Fluoreszenzvermessung der Tumorstücke

In der vorliegenden Arbeit wurde das Fluoreszenzverhalten von Glioblastomen und Meningeomen nach Gabe von 5-ALA verglichen. Dafür wurden Tumorstücke aus vom Operateur als stark fluoreszierend eingeschätzten Regionen des Tumors entnommen und mit einer Faseroptik mit USB 2000+ Spektrometer vermessen. Dieses Gerät wurde bereits zuvor bei einer Studie über das Fluoreszenzverhalten von Glioblastomen erfolgreich zur Quantifizierung eingesetzt (Valdes et al., 2014). In der damaligen Studie wurden Proben aus verschiedenen Bereichen der Glioblastome entnommen, deren Fluoreszenz durch den Operateur in vier unterschiedlich starke Fluoreszenzsignalstärken, von stark fluoreszierend bis zu nicht fluoreszierend, eingeteilt worden ist. Damals konnte gezeigt werden, dass die vom Operateur als stark fluoreszierend eingeschätzten Tumorproben auch bei der Vermessung mit dem Spektrometer stärkere Fluoreszenzsignalstärken hatten als die als schwächer fluoreszierend eingeschätzten Bereiche des Tumors (Stummer et al., 2014). In einer Arbeit aus dem Jahr 2014 konnte der Nutzen des Einsatzes der 5-ALA bei Resektion insbesondere von Meningeomen des WHO Grades 2 und 3 für den Patienten gezeigt werden

(Cornelius et al., 2014). Die Einschätzung der Fluoreszenz wurde in der Studie von *Cornelius et al. (2014)* semi-quantitativ durch den Operateur und somit rein subjektiv getroffen. Eine systematische Quantifizierung von Meningeomen mit einem Spektrometer und somit die Objektivierung der Fluoreszenzsignalstärke bei Meningeomen wurde von *Valdes et al. (2014)* im Jahr 2014 durchgeführt. Es wurden 15 Meningeompatienten qualitativ und quantitativ vermessen mit der Schlussfolgerung, dass sich durch spektroskopische Fluoreszenzvermessung Vorteile gegenüber der konventionellen subjektiven Fluoreszenzeinschätzung ergeben – 69 Prozent der als nicht fluoreszierend eingeschätzten Tumorbereiche wiesen signifikant erhöhte PPIX-Konzentrationen auf (Valdes et al., 2014). Eine Studie mit direktem Vergleich der Fluoreszenzsignalstärken zwischen Meningeomen und Glioblastomen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist uns nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die Fluoreszenz von Glioblastomen als auch von Meningeomen mit dem Fiberspektrometer quantifiziert. Die Tumorproben der Glioblastome und der Meningeome stammten alle aus intraoperativ stark fluoreszierenden Bereichen des Tumors. Bei der Fluoreszenzvermessung mit dem Fiberoptikspektrometer konnte durch den nicht parametrischen Wilcoxon-Test ein hoch signifikanter Unterschied in der Signalstärke zwischen Glioblastomen und Meningeomen gezeigt werden ($p < 0.001$), der Median der Fluoreszenzsignalstärke lag bei den Glioblastomen circa 4.5 mal höher als bei den Meningeomen. Eine derartige Einschätzung war durch die alleinige intraoperative Betrachtung der fluoreszierenden Tumore durch den Operateur zuvor nicht möglich.

In vorherigen Arbeiten wurde berichtet, dass Oberflächenunregelmäßigkeiten, Lichtstreuungseffekte und Distanz von der Lichtquelle zum Tumor Einfluss auf die beobachtete Fluoreszenzsignalstärke haben (Valdés et al., 2011; Kim et al., 2010). In der klinischen Routine zeigt sich, dass vor allem der Abstand zwischen Tumor und Lichtquelle bzw. Lichtdetektor einen starken Einfluß auf die Fluoreszenzstärke hat. Deshalb wurde der Zusammenhang von Abstand der Lichtquelle zum Tumor in der vorliegenden Arbeit besonders untersucht. Hierfür wurde im Anschluss an die Vermessung der Fluoreszenz bei direktem Kontakt der Fibersonde zum Tumor auch bei den Abständen 0.5 mm, 1 mm, 1.5 mm und 2 mm eine Fluoreszenzvermessung durchgeführt. Es konnte in einer quadratischen Regressionsanalyse für die Glioblastome ($r^2=0.226$; $F=4.683$; $p < 0.05$) und Meningeome ($r^2=0,24$; $F=15,36$; $p < 0,001$) gezeigt werden, dass ein quadratischer Zusammenhang besteht zwischen Abstand des Tumors zur Lichtquelle und gemessener

Fluoreszenzsignalstärke. Es konnte somit gezeigt werden, dass der Abstand der Lichtquelle zum Tumor einen starken Einfluss auf die Fluoreszenz hat. Dieses unterstreicht die oben beschriebene Annahme von *Valdes et al. (2011)* und *Kim et al. (2010)*. Des Weiteren zeigte sich durch den nicht parametrischen Wilcoxon-Test bei jedem Abstand bei den Glioblastomen eine signifikant höhere Fluoreszenzsignalstärke als bei den Meningeomen (0,5mm= $p<0.05$; 1mm= $p<0.01$; 1,5mm= $p<0.05$; 2mm= $p<0.01$).

4.3 Vermessung der lysierten Tumore – ein Modell zur Ermittlung von absoluten PPIX-Konzentration

In der Arbeit von *Kim et al. (2010)*, die eine Grundlage für die vorliegende Arbeit darstellt, wurde durch komplexe Einbeziehung von Lichtreflexions- und Lichtabsorptionseigenschaften ein Modell entwickelt, welches es ermöglicht hat, in einem ex vivo Mausmodell absolute PPIX-Konzentrationen zu ermitteln (Kim et al., 2010). Als Grundlage des Modells zur Ermittlung absoluter PPIX-Konzentrationen im Tumor wurden in dieser Arbeit die zuvor durch das Faserspektrometer und das Safirespektrometer ermittelten Fluoreszenzsignalstärken (relative Einheiten) bekannter PPIX-Konzentrationen (Verdünnungsreihen) benutzt. Es wurde jeweils eine Regressionsgerade der mittleren Fluoreszenzsignalstärken gebildet. Basierend auf diesen Regressionsanalysen und unter Einbeziehung des Gewichts der Tumorproben wurden absolute PPIX-Konzentrationen in der Einheit Mikrogramm PPIX pro Gramm Tumorgewicht ermittelt (siehe Kapitel 3.5 und Kapitel 3.5.1). Es zeigten sich bei den mittels Safirespektrometer vermessenen Meningeomproben für eine Probe negative Werte. Zur Berechnung der absoluten PPIX-Konzentrationen diente eine lineare Regressionsgerade.

Die Regressionsgerade, die in dieser Arbeit auf Basis der Fluoreszenzmessungen mit dem Safirespektrometer ermittelt wurde hatte bei $X=0$ nicht den Wert $Y=0$ (die X-Werte zeigten in diesem Modell die PPIX-Konzentrationen und die Y-Werte die relativen Einheiten, die mit dem Spektrometer gemessen wurden), was zu erwarten wäre, sondern den Wert $Y=10.013$ (relative Einheiten). Bei der Probe mit negativ berechneter PPIX-Konzentration lag die gemessene Fluoreszenz bei $Y=6$ (relative Einheiten) und somit in dem Modell dieser Arbeit unter $X=0$, dies ist eine Schwäche der in dieser Arbeit benutzten Formel. Extrem

geringe PPIX-Konzentrationen aus Lysaten von beispielsweise Tumoren können nicht angegeben werden.

Insgesamt zeigte sich bei den aus den Safirespektrometer Verdünnungsreihen berechneten absoluten Werten der PPIX-Konzentration in Mikrogramm pro Gramm Tumor kein signifikanter Unterschied zwischen den Glioblastomen und Meningeomen ($p=0,37$). Bei den auf den Faseroptikspektrometerverdünnungsreihen basierenden Rechnungen zeigten die Glioblastome eine signifikant höhere absolute PPIX-Konzentration als die Meningeome ($p<0,05$). Insgesamt muss festgehalten werden, dass es sich bei dem vorgestellten Modell nur um eine Annäherung an die absoluten Werte handelt, da wichtige Faktoren wie der Hämoglobingehalt, Dichte des einzelnen Tumorgewebes sowie viele andere Faktoren, die Absorption und Fluoreszenz beeinflussen im Gegensatz zu dem Modell von *Kim et al (2010)* (Kim et al., 2010) nicht berücksichtigt wurden. Eine Vereinfachung des Modells führte jedoch in dieser Arbeit zu ähnlichen Werten wie sie in der Literatur beschrieben werden. Die in dieser Arbeit in beiden Verfahren ermittelten Werte lagen für die Meningeome und Glioblastome zwischen 0.02 und 8.1 $\mu\text{g PPIX/ml}$ (im Ergebnisteil wurden die absoluten Werte $\mu\text{g PPIX/g}$ angegeben, bei einer angenommenen Dichte von 1 und zur besseren Vergleichbarkeit mit den Werten aus der Literatur wurden die Werte hier in $\mu\text{g PPIX/ml}$ angegeben, siehe auch Kapitel 4.6.) in Tumor. *Valdes et al. (2014)* beschreiben bei Meningeomen und Glioblastomen Werte zwischen 0.1 und 10 $\mu\text{g PPIX/ml}$ (Valdes et al., 2014). *Kim et al. (2010)* beschreiben für unterschiedliche Gewebe (Gehirn, Niere ect.), jedoch nicht explizit für Glioblastome oder Meningeome, Werte zwischen 0 und 1.2 $\mu\text{g/ml}$ gelöstes Tumorgewebe (Kim et al., 2010).

Des Weiteren zeigte sich beim Vergleich der beiden unterschiedlichen Messmethoden (Safire vs. Faseroptikspektrometer) für die Kohorten der Meningeome und der Glioblastome kein signifikanter Unterschied.

4.4 Vermessung der postoperativ anders klassifizierten

Tumorproben

Bei drei der 14 Tumorproben, die präoperativ als Glioblastom oder Meningeom klassifiziert wurden, zeigte sich histologisch eine andere Tumorentität (Bronchialkarzinommetastase, anaplastisches Astrozytom und Strahlennekrose). Die Bronchialkarzinommetastase und das

anaplastisches Astrozytom fielen schon während der Operation durch eine geringe bis fehlende Fluoreszenz auf. Die Strahlennekrose zeigte schon während der Operation eine starke Fluoreszenz. In der Literatur wird beschrieben, dass anaplastische Astrozytome mittelstark und Metastasen gering fluoreszieren, somit werden beide Tumorarten als geringer fluoreszierend beschrieben als Glioblastome (Belloch et al., 2014). In einer Studie von *Kamp et al. (2012)* konnten bei einem Patientenkollektiv von 52 Patienten bei 32 Patienten (62%) eine 5-ALA induzierte Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die übrigen 38 Prozent zeigten wie die von uns untersuchten Metastasenproben keine wahrnehmbare Fluoreszenz (Kamp et al., 2012). Die Probe des anaplastischen Astrozytoms in unserer Studie zeigte eine durch den Operateur und durch das Spektrometer kaum wahrnehmbare und sehr viel geringere Fluoreszenz als alle Meningeome und Glioblastome der Studie. Für die der Auswertung ausgeschlossene Bronchialkarzinometastase zeigte sich eine ähnlich geringe Fluoreszenz wie bei dem zuvor beschriebenen anaplastischen Astrozytom. Im direkten Vergleich zeigte das anaplastische Astrozytom mit 1.277.605 relativen Einheiten eine geringgradig höhere Fluoreszenz als die beiden Proben der Bronchialkarzinometastase mit jeweils 1.077.395 und 1.066.208 relativen Einheiten. In einer weiteren Probe stellte sich postoperativ histologisch eine Strahlennekrose dar. Sie wurde intraoperativ durch den Operateur als stark fluoreszierend eingeschätzt. Es zeigten sich erstaunlicherweise sowohl bei der Fluoreszenzvermessung direkt an der Strahlennekrose als auch in Lösung mit dem Faseroptikspektrometer und Safire hohe Werte der Fluoreszenz. Bei direkter Messung der Fasersonde am Tumor zeigten sich Werte von 41.000.000 relativen Einheiten. Im Vergleich dazu lagen die mittleren Fluoreszenzwerte für die Glioblastome bei 13.000.000 relativen Einheiten und die mittleren Fluoreszenzwerte für die Meningeome bei 3.000.000 relativen Einheiten. Die Strahlennekrose zeigte bei der Safirevermessung einen hohen Wert von 6.64µg PPIX/g Tumorgewebe und bei der Faseroptikvermessung den mittelhohen Wert von 3.28µg PPIX/g Tumorewebe. Im Vergleich dazu lagen die mittleren absolute Werte für die Glioblastome bei Safire- und Faseroptikmessung um 2.9 und 3.2 µg PPIX/g Tumorgewebe. Die mittleren absolute Werte lagen für die Meningeome bei Safire- und Faseroptikmessung zwischen 1.1 und 2.4µg PPIX/g Tumorgewebe (Siehe auch Kapitel 3.5.4).

Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, da man davon ausgehen muss, dass für die gesteigerte Synthese des fluoreszierenden PPIX vitale Tumorzellen mit einer Veränderung in

der Hämoglobinsynthese verantwortlich sind (Peng et al., 1997; Bedwell et al., 1992). Ein Erklärungsversuch könnte sein, dass das PPIX von noch in der Umgebung vorhandenen Tumorzellen gebildet wurde und dann über Diffusion und Transport in die Strahlennekrose gelangt ist. Ein ähnlicher Mechanismus wird bei *Masubuchi et al. (2013)* für Glioblastom- und Meningeomzellen in der Zellkultur beschrieben. Diese zeigten, dass ein großer Anteil des vorhandenen PPIX auch extrazellulär vorkommt (Masubuchi et al., 2013)

4.5 Histopathologische Auswertung der Ferrochelataseantikörper

Färbung

Die Ferrochelatase ist eines der Schrittmacherenzyme der Hämoglobinbiosynthese und führt zu einer Weiterverstoffwechslung des PPIX in das nicht fluoreszierende Häm (Peng et al., 1997). Es wird davon ausgegangen, dass in neoplastischen Zellen, die eine Tendenz zur vermehrten Fluoreszenz nach 5-ALA Gabe zeigen, die Aktivität der Ferrochelatase herunter reguliert ist (Bedwell et al., 1992). Zu Beginn der Arbeit wurde vermutet, dass man einen Zusammenhang zwischen Ferrochelataseaktivität und der mit Spektrometer gemessenen Fluoreszenzintensität finden würde. Daher wurde von allen Tumoren der Studie eine Färbung mit speziellen Ferrochelataseantikörpern vom Neuropathologischen Institut der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei allen Tumorproben jedoch keinerlei Färbung der Tumorproben, sodass eine Korrelation zwischen Fluoreszenzsignalstärke und Aktivität der Ferrochelatase nicht möglich war. Andererseits ist es durchaus möglich, dass die Ferrochelataseaktivität der Tumore derart stark herunterreguliert war, dass immunhistologisch keine Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Hefti et al. untersuchten das Fluoreszenzverhalten von zwei unterschiedlichen Meningeomzellreihen in Bezug auf die Ferrochelataseaktivität. Die eine Zellreihe zeigte hohe PPIX-Konzentrationen mit starker Fluoreszenz und die andere niedrige PPIX-Konzentrationen mit geringer PPIX-Konzentration. Es konnte eine signifikant niedrigere Ferrochelataseaktivität bei der fluoreszierenden Zellreihe nachgewiesen werden (Hefti et al., 2011). Unsere Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zu *Hefti et al. (2011)*. Jedoch ist das von uns angewandte Verfahren nur ein qualitatives bzw. höchstens ein semiquantitatives Verfahren, da der Neuropathologe allein durch die Intensität der Anfärbung des Gewebes entscheidet wie hoch die Ferrochelataseaktivität des Gewebes ist. Geringste Unterschiede

wie sie bei dem aufwendigen Verfahren von *Hefti et al. (2011)* aufgedeckt wurden, konnten durch das von uns angewendete Verfahren nicht gezeigt werden.

4.6 Limitationen der Studie

Im folgenden Abschnitt werden die wesentlichen Einschränkungen der Studie genannt. Zunächst muss angemerkt werden, dass eine Fallzahl von elf Patienten, die ein Glioblastom oder Meningeom hatten, mit insgesamt 17 untersuchten Tumorproben in der vorliegenden Studie gering war. Da die Ergebnisse aber konsistent und ohne größere Varianz behaftet waren, wäre bei einer weiteren Vergrößerung der Stichprobe nicht mit einem erheblichen Erkenntnisgewinn zu rechnen gewesen. Des Weiteren musste bei der nicht standardnormalverteilten Kohorte auf nichtparametrische statistische Tests zurückgegriffen werden. Bei den linearen Regressionen wurden trotz fehlender Standardnormalverteilung lineare Regressionen durchgeführt, da ein gleichwertiges Verfahren als nichtparametrischer Test fehlte. Es wird jedoch in der Literatur beschrieben, dass die lineare Regression bei fehlender Standardnormalverteilung robust statistisch gute Ergebnisse liefert (Li et al., 2012). Drittens wurde der in der Literatur beschriebene Störfaktor „Hämoglobin“, der einen hohen Absorber des Exzitationslichtes darstellt und somit einen Einfluss auf die Fluoreszenzsignalstärke zu haben scheint (Valdés et al., 2011; Kim et al., 2010), nicht in den Versuchen dieser Arbeit berücksichtigt.

Des Weiteren wurden bei der Fluoreszenzvermessung der lysierten Tumoren unterschiedlich große Tumorstücke in 1 ml *Solvable* gelöst, dabei ist jedoch unklar, inwiefern das Verhältnis von Tumorgewebe zu Flüssigkeit eine Rolle für die gemessene Fluoreszenz und somit für die absolute PPIX-Konzentration spielt. In der Literatur konnten keine Werte für die Dichte von Meningeomen und Glioblastomen gefunden werden. In einem Artikel werden jedoch Dichtewerte von 1.04 g/cm³ für Weichteil (Muskelgewebe) (Hsu et al., 2007). Da es sich bei den Glioblastomen und Meningeomen ebenfalls um weiche Gewebe handelt, wurde in dieser Arbeit eine Dichte von 1g/ml für die Berechnung angenommen.

Je nachdem wie viele Tumorproben gleichzeitig von einem Patienten entnommen wurden, gab es unterschiedlich lange Phasen zwischen Probenentnahmen aus dem Tumor und der ersten Vermessung des Gewebes mit dem Fiberoptikspektrometer; daher variierte diese Zeit von neun bis 38 Minuten. Um einen Zerfall des fluoreszierenden PPIX durch den sogenannten „Photobleichungseffekt“ zu verhindern wurde das Gewebe unmittelbar nach

Entnahme bis zur Vermessung unter Lichtausschluss in einem schwarzen Falcon gelagert. Bei „Photobleichungseffekt“ wird davon ausgegangen, dass es durch die Anregung des Fluorophors durch einstrahlendes Licht zu einem Zerfall des Fluorophors kommt (Song et al., 1995).

Des Weiteren wurden nur *low grade* Meningeome untersucht, sodass keine Aussage zu Fluoreszenzunterschieden zwischen Meningeomen WHO Grad I und höhergradigen getroffen werden kann. Da nach der direkten Fluoreszenzvermessung der Tumorstücke diese lysiert wurden, konnte eine histologische Aufarbeitung exakt dieser Proben nicht durchgeführt werden. Deshalb ist es schwierig eine Aussage zu treffen wie viel Tumorgewebe und wie viel Nekrose in dem vermessenen Tumorstück vorhanden war.

Alles in allem sind die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit trotz der eben diskutierten Einschränkungen im Hinblick auf eine mögliche Anwendung im Operationssaal hochinteressant.

4.7 Ausblick

Bei subjektiv vom Operateur als gleich stark fluoreszierend eingeschätzten Tumorgewebeproben konnte durch das Fiberoptikspektrometer *ex vivo* eine unterschiedlich starke Fluoreszenz nachgewiesen werden. Das zurzeit im neurochirurgischen Operationssaal verwendete Operationsmikroskop ist ca. 80 Zentimeter vom Tumor entfernt. Wie in Kapitel 3.4.2.1 dargestellt, kommt es zu einer quadratischen Abnahme der Fluoreszenzsignalstärke bei Zunahme des Abstandes zwischen Messinstrument und Tumor. Die Sonde könnte man, anders als ein Operationsmikroskop, wie oben beschrieben direkt an den Tumor halten, sodass es zu keinem Verlust der Fluoreszenzsignalstärke auf dem Weg zum Messinstrument kommt.

Die quantitative Messung erlaubte sogar Rückschlüsse auf die im Tumorgewebe enthaltene PPIX-Konzentration. Somit konnten Fluoreszenzunterschiede aufgezeigt werden, die einer subjektiven Betrachtung durch den Operateur nicht aufgefallen wären. Des Weiteren war das kleine, mobile Fiberoptikspektrometer dem stationären Safirespektrometer nur sehr geringfügig unterlegen und lieferte ebenfalls sehr zufriedenstellende Ergebnisse. Im Gegensatz zu dem Safirespektrometer, welches nur die Fluoreszenz von Lösungen bzw. Zellsuspensionen in *96-Wellplatten* vermessen kann, handelt es sich bei dem Fiberoptikspektrometer um ein portables Gerät, welches leicht in den intraoperativen Alltag integrierbar wäre. Im neurochirurgischen Operationssaal könnte das Gerät eingesetzt

werden, nachdem durch den Operateur das makroskopisch sichtbar fluoreszierende Tumorgewebe entfernt wurde. Dieser könnte die handliche Fibersonde dazu benutzen die Tumorresektionshöhle und die Tumorränder abzufahren bzw. „abzutasten“. Wie in Kapitel 3.4.2.1 dargestellt, zeigt die Fluoreszenzsignalstärke eine quadratische Abnahme mit zunehmendem Abstand von der Messapparatur zum fluoreszierenden Tumor.

Bevor das Gerät jedoch seinen Eingang in den klinischen Alltag finden kann, ist es notwendig die Grenzzonenkonzentration des PPIX bzw. die Grenzzonenfluoreszenz im Tumorgewebe genauer zu untersuchen. Ein weiterer Schritt dorthin ist eine momentan in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf auf der vorliegenden Arbeit aufbauende wissenschaftliche Arbeit, welche das Fluoreszenzverhalten von Gehirntumoren genauer untersucht, indem Tumorbereiche aus dem Zentrum mit weiter peripher liegenden Tumorbereichen hinsichtlich Fluoreszenz verglichen werden. In dieser momentan laufenden Studie wird die gemessene Fluoreszenz mit histopathologischen Daten verglichen und untersucht wie sich die Fluoreszenz in Bezug auf Vaskularisierung, Mitoseaktivität, Tumormasse und Nekroseausmaß verhält.

Weiterführend könnten auch Tierexperimente interessant sein, bei denen das Fibersondenspektrometer *in vivo* zum Einsatz kommen könnte, analog dazu wie es später im neurochirurgischen Operationssaal eingesetzt werden soll.

Insgesamt geht aus dieser Arbeit hervor, dass es sich bei dem hier vorgestellten Fiberoptikspektrometer um ein vielversprechendes Instrument handelt, welches eines Tages neben dem rein subjektiven fluoreszenzgestütztem Resektionsverfahren (Stummer et al., 2006), dem intraoperativen Monitoring (Zhang et al., 2015), der Chemo- und Radiotherapie (Jelsma and Bucy, 1967; Fiveash and Spencer, 2003; Sultanem et al., 2004) zu einem weiteren Werkzeug in der Therapie bei Glioblastomen und höhergradigen, infiltrierenden Meningeomen werden könnte, indem es hilft, die Radikalität der Resektion zu verbessern.

5 Verzeichnisse

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vereinfachte Schemazeichnung der Hämbiosynthese, orientiert an Peng et al., 1997	2
Abbildung 2 Frontalschnitt eines Schädel MRTs in T1 mit Kontrastmittel (KM) eines Glioblastompatienten aus unserer Studie (Pfeilmarkierung Tumor).....	5
Abbildung 3 Horizontalschnitt des Schädel MRTs in T1 Sequenz mit KM eines Glioblastompatienten aus unserer Studie (Pfeilmarkierung Tumor).....	5
Abbildung 4: MRT Bild mit Meningeomen (WHO I) von einem Patienten aus unserer	8
Abbildung 5 Querschnitt durch die Fibersonde	15
Abbildung 6 Übersicht über Versuchsaufbau der Fibersondenmessapparatur.....	16
Abbildung 7 Feintrieb der der Aufhänge Apparatur zur Einstellung der Fibersonde in vertikaler Richtung.....	16
Abbildung 8 96-Wellplatte mit der Konzentrationen der PPIX Verdünnungsreihen in A4-A9 in $\mu\text{g/ml}$	19
Abbildung 9 Übersicht Verdünnungsreihe in Microtubes	19
Abbildung 10 Fibersondenspitze direkt an der Tumorprobe (hier für das Foto mit Umgebungslicht).....	22
Abbildung 11 Schemazeichnung Fibersonde direkt an der Tumorprobe	23
Abbildung 12 Schemazeichnung der Fibersonde mit einem Abstand von 0.5 mm zur Tumorprobe.....	23
Abbildung 13 Schemazeichnung der Fibersonde mit einem Abstand von 1 mm zur Tumorprobe.....	23
Abbildung 14 Schemazeichnung der Fibersonde mit einem Abstand von 1.5 mm zur Tumorprobe.....	23
Abbildung 15 Schemazeichnung der Fibersonde mit einem Abstand von 2 mm zur Tumorprobe.....	23
Abbildung 16 Beispiel Messung perifokales Ödem an MRT von Glioblastompatienten aus der Studie	24

Abbildung 17 Beispiel einer Verdünnungsreihe, die mittels Fiberoptik vermessen wurde....	27
Abbildung 18 Ergebnisse der mittels Fiberoptik vermessenen Fluoreszenz in relativen Einheiten von 5 Verdünnungsreihen	28
Abbildung 19 Beispiel Verdünnungsreihe Safire.....	29
Abbildung 20 Ergebnisse der mittels Safire vermessenen Fluoreszenz in relativen Einheiten von 7 Verdünnungsreihen	30
Abbildung 21 Vergleich der Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen (0mm)	31
Abbildung 22 Vergleich der Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen (0.5mm)	32
Abbildung 23 Vergleich der Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen (1mm)	33
Abbildung 24 Vergleich der Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen (1.5mm)	34
Abbildung 25 Vergleich der Fluoreszenz zwischen Glioblastomen und Meningeomen bei einem Abstand von 2mm zwischen Fibersonde und Tumor.....	35
Abbildung 26 Fluoreszenzverhalten der Glioblastomproben bei zunehmendem Abstand zwischen Fibersonde und Tumorprobe	36
Abbildung 27 Fluoreszenzverhalten der Glioblastomproben bei zunehmendem Abstand zwischen Fibersonde und Tumorprobe	37
Abbildung 28 Fluoreszenzsignalstärken in Abhängigkeit des perifokalen Ödems bei den Glioblastompatienten	38
Abbildung 29 Lineare Regression Verdünnungsreihe Safire.....	39
Abbildung 30 Lineare Regression der Verdünnungsreihen (Fiberoptik).....	40
Abbildung 31 Vergleich der mittels Safire Spektrometer errechneten absoluten PPIX-Konzentrationen in $\mu\text{g/g}$ Tumor	48
Abbildung 32 Vergleich der mittels Fiber-Spektrometer errechneten absoluten PPIX-Konzentrationen in $\mu\text{g/g}$ Tumor	49
Abbildung 33 Vergleich errechnete absolute PPIX-Konzentrationen der Glioblastome (Fiberoptik vs. Safire)	50
Abbildung 34 Vergleich errechnete absolute PPIX Konzentrationen der Glioblastome (Fiberoptik vs. Safire)	51

Abbildung 35 die Fluoreszenzsignalstärke der Proben des anaplastischen Astrozytoms, des Bronchialkarzinoms und der Strahlennekrose in Bezug auf die bereits vorher aufgeführten Fluoreszenzsignalstärken der Glioblastom- und Meningeomproben.....	52
Abbildung 36 Fluoreszenzverhalten der Probe des anaplastischen Astrozytoms	53
Abbildung 37 Fluoreszenzverhalten der beiden Proben des Bronchialcarinoms	53
Abbildung 38 Fluoreszenzverhalten der Strahlennekrose	54
Abbildung 39 Kontrollschnitt von Nierengewebe, das Positivität für Ferrochelatase Antikörperfärbung zeigt (200x).....	55
Abbildung 40 Ferrochelatasefärbung eines Glioblastoms aus der Studie; keine Anfärbung durch Ferrochelataseantikörper (200X).....	56
Abbildung 41 Ferrochelatasefärbung eines Meningeoms WHO I aus der Studie; keine Anfärbung durch Ferrochelataseantikörper (200x)	56

5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 deskriptive Daten zu Patienten der Studie	26
Tabelle 2 Fluoreszenzsignalstärken lysierte Glioblastome (Safire)	41
Tabelle 3 Fluoreszenzsignalstärken lysierte Glioblastome (Fiber)	41
Tabelle 4 Mittelwerte Glioblastome (Safire).....	41
Tabelle 5 Mittelwerte Glioblastome (Fiber).....	41
Tabelle 6 μg PPIX / ml <i>Solvable</i> (Lysat) - Safire	42
Tabelle 7 μg PPIX / ml <i>Solvable</i> (Lysat) - Fiber	42
Tabelle 8 μg PPIX / Tumorstück (Safire).....	43
Tabelle 9 μg PPIX / Tumorstück (Fiber).....	43
Tabelle 10 μg PPIX/ Gramm Glioblastom (Safire)	44
Tabelle 11 μg PPIX/ Gramm Glioblastom (Fiber)	44
Tabelle 12 Fluoreszenzsignale der lysierten Meningeome (Safire)	45
Tabelle 13 Fluoreszenzsignale der lysierten Meningeome (Fiber)	45
Tabelle 14 Mittelwerte Meningeome (Safire)	46
Tabelle 15 Mittelwerte Meningeome (Fiber)	46
Tabelle 16 μg PPIX / ml <i>Solvable</i> (Lysat) - Safire	46
Tabelle 17 μg PPIX / ml <i>Solvable</i> (Lysat) - Fiber	46
Tabelle 18 μg PPIX / Tumorstück (Safire).....	47
Tabelle 19 μg PPIX / Tumorstück (Fiber).....	47
Tabelle 20 μg PPIX/ Gramm Meningeom (Safire)	47
Tabelle 21 μg PPIX/ Gramm Meningeom (Fiber)	47

5.3 Literaturverzeichnis

- A. Giannakis, J.F. Cornelius, H.J. Steiger, 2014. Experimentelle Untersuchungen zur Photodynamischen Diagnose und Therapie anhand eines humanen anaplastischen Meningeomzellmodells in vitro. Dissertation Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
- Alexiou, G.A., Gogou, P., Markoula, S., Kyritsis, A.P., 2010. Management of meningiomas. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 112, 177–182. doi:10.1016/j.clineuro.2009.12.011
- Bedwell, J., MacRobert, A.J., Phillips, D., Bown, S.G., 1992. Fluorescence distribution and photodynamic effect of ALA-induced PP IX in the DMH rat colonic tumour model. *Br. J. Cancer* 65, 818–824.
- Belloch, J.P., Rovira, V., Llácer, J.L., Riesgo, P.A., Cremades, A., 2014. Fluorescence-guided surgery in high grade gliomas using an exoscope system. *Acta Neurochir. (Wien)* 156, 653–660. doi:10.1007/s00701-013-1976-6
- Bloch, O., Han, S.J., Cha, S., Sun, M.Z., Aghi, M.K., McDermott, M.W., Berger, M.S., Parsa, A.T., 2012. Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: clinical article. *J. Neurosurg.* 117, 1032–1038. doi:10.3171/2012.9.JNS12504
- Choi, Y., Lim, D.H., Jo, K., Nam, D.-H., Seol, H.J., Lee, J.-I., 2014. Efficacy of postoperative radiotherapy for high grade meningiomas. *J. Neurooncol.* 119, 405–412. doi:10.1007/s11060-014-1507-1
- Coburger, J., Hagel, V., Wirtz, C.R., König, R., 2015. Surgery for Glioblastoma: Impact of the Combined Use of 5-Aminolevulinic Acid and Intraoperative MRI on Extent of Resection and Survival. *PloS One* 10, e0131872. doi:10.1371/journal.pone.0131872
- Colditz, M.J., Leyen, K. van, Jeffree, R.L., 2012. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 2: theoretical, biochemical and practical aspects. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 19, 1611–1616. doi:10.1016/j.jocn.2012.03.013
- Coluccia, D., Fandino, J., Fujioka, M., Cordovi, S., Muroi, C., Landolt, H., 2010. Intraoperative 5-aminolevulinic-acid-induced fluorescence in meningiomas. *Acta Neurochir. (Wien)* 152, 1711–1719. doi:10.1007/s00701-010-0708-4
- Cornelius, J.F., Slotty, P.J., Kamp, M.A., Schneiderhan, T.M., Steiger, H.J., El-Khatib, M., 2014. Impact of 5-aminolevulinic acid fluorescence-guided surgery on the extent of resection of meningiomas - With special regard to high-grade tumors. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 11, 481–490. doi:10.1016/j.pdpdt.2014.07.008

- Della Puppa, A., Ciccarino, P., Lombardi, G., Rolma, G., Cecchin, D., Rossetto, M., 2014a. 5-Aminolevulinic acid fluorescence in high grade glioma surgery: surgical outcome, intraoperative findings, and fluorescence patterns. *BioMed Res. Int.* 2014, 232561. doi:10.1155/2014/232561
- Della Puppa, A., Rustemi, O., Giofrè, G., Troncon, I., Lombardi, G., Rolma, G., Sergi, M., Munari, M., Cecchin, D., Gardiman, M.P., Scienza, R., 2014b. Predictive value of intraoperative 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence for detecting bone invasion in meningioma surgery. *J. Neurosurg.* 120, 840–845. doi:10.3171/2013.12.JNS131642
- Eljamel, S., 2015. 5-ALA Fluorescence Image Guided Resection of Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis of the Literature. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 10443–10456. doi:10.3390/ijms160510443
- Fiveash, J.B., Spencer, S.A., 2003. Role of radiation therapy and radiosurgery in glioblastoma multiforme. *Cancer J. Sudbury Mass* 9, 222–229.
- Grabowski, M.M., Recinos, P.F., Nowacki, A.S., Schroeder, J.L., Angelov, L., Barnett, G.H., Vogelbaum, M.A., 2014. Residual tumor volume versus extent of resection: predictors of survival after surgery for glioblastoma. *J. Neurosurg.* 121, 1115–1123. doi:10.3171/2014.7.JNS132449
- Hamblin, M.R., Huang, Y.-Y. (Eds.), 2014. *Handbook of photomedicine*. CRC Press, Boca Raton, FL. Kapitel 25.
- Hardesty, D.A., Wolf, A.B., Brachman, D.G., McBride, H.L., Yousef, E., Nakaji, P., Porter, R.W., Smith, K.A., Spetzler, R.F., Sanai, N., 2013. The impact of adjuvant stereotactic radiosurgery on atypical meningioma recurrence following aggressive microsurgical resection. *J. Neurosurg.* 119, 475–481. doi:10.3171/2012.12.JNS12414
- Hefti, M., Holenstein, F., Albert, I., Looser, H., Luginbuehl, V., 2011. Susceptibility to 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in WHO I meningioma cells corresponds to ferrochelatase activity. *Photochem. Photobiol.* 87, 235–241. doi:10.1111/j.1751-1097.2010.00821.x
- Hermle, J., Anders, M., Heuser, A.-M., Müller, B., 2010. A simple fluorescence based assay for quantification of human immunodeficiency virus particle release. *BMC Biotechnol.* 10, 32. doi:10.1186/1472-6750-10-32
- Hsu, W.-C., Hwang, J.-S., Chang, W.-C., Huang, S.-C., Sheu, B.-C., Torng, P.-L., 2007. Prediction of operation time for laparoscopic myomectomy by ultrasound measurements. *Surg. Endosc.* 21, 1600–1606. doi:10.1007/s00464-006-9189-1
- Jelsma, R., Bucy, P.C., 1967. The treatment of glioblastoma multiforme of the brain. *J. Neurosurg.* 27, 388–400. doi:10.3171/jns.1967.27.5.0388

- Johannessen, A.L., Torp, S.H., 2006. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol. Oncol. Res. POR* 12, 143–147. doi:PAOR.2006.12.3.0143
- Johansson, A., Palte, G., Schnell, O., Tonn, J.-C., Herms, J., Stepp, H., 2010. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors. *Photochem. Photobiol.* 86, 1373–1378. doi:10.1111/j.1751-1097.2010.00799.x
- Julka, P.K., Sharma, D.N., Mallick, S., Gandhi, A.K., Joshi, N., Rath, G.K., 2013. Postoperative treatment of glioblastoma multiforme with radiation therapy plus concomitant and adjuvant temozolomide : A mono-institutional experience of 215 patients. *J. Cancer Res. Ther.* 9, 381–386. doi:10.4103/0973-1482.119310
- Juzeniene, A., Peng, Q., Moan, J., 2007. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 6, 1234–1245. doi:10.1039/b705461k
- Kamp, M.A., Grosser, P., Felsberg, J., Sloty, P.J., Steiger, H.-J., Reifenberger, G., Sabel, M., 2012. 5-aminolevulinic acid (5-ALA)-induced fluorescence in intracerebral metastases: a retrospective study. *Acta Neurochir. (Wien)* 154, 223–228; discussion 228. doi:10.1007/s00701-011-1200-5
- Kennedy, J.C., Pottier, R.H., Pross, D.C., 1990. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol. B* 6, 143–148.
- Kim, A., Khurana, M., Moriyama, Y., Wilson, B.C., 2010. Quantification of in vivo fluorescence decoupled from the effects of tissue optical properties using fiber-optic spectroscopy measurements. *J. Biomed. Opt.* 15, 067006. doi:10.1117/1.3523616
- Klöppel, G., Kreipe, H.H., Remmele, W., Paulus, W., Schröder, J.M., 2012. *Neuropathologie*. Springer, Berlin. Kapitel 18
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D.R., Gokaslan, Z.L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F.F., McCutcheon, I.E., Hassenbusch, S.J., Holland, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D., Sawaya, R., 2001. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J. Neurosurg.* 95, 190–198. doi:10.3171/jns.2001.95.2.0190
- Lamszus, K., Vahldiek, F., Mautner, V.F., Schichor, C., Tonn, J., Stavrou, D., Fillbrandt, R., Westphal, M., Kluwe, L., 2000. Allelic losses in neurofibromatosis 2-associated meningiomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 504–512.
- Li, X., Wong, W., Lamoureux, E.L., Wong, T.Y., 2012. Are linear regression techniques appropriate for analysis when the dependent (outcome) variable is not normally distributed? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 3082–3083. doi:10.1167/iovs.12-9967

- Lumenta, C.B. (Ed.), 2010. Neurosurgery, European manual of medicine. Springer, Heidelberg. Kapitel 3.2.5.2
- Mair, R., Morris, K., Scott, I., Carroll, T.A., 2011. Radiotherapy for atypical meningiomas. *J. Neurosurg.* 115, 811–819. doi:10.3171/2011.5.JNS11112
- Masubuchi, T., Kajimoto, Y., Kawabata, S., Nonoguchi, N., Fujishiro, T., Miyatake, S.-I., Kuroiwa, T., 2013. Experimental study to understand nonspecific protoporphyrin IX fluorescence in brain tissues near tumors after 5-aminolevulinic acid administration. *Photomed. Laser Surg.* 31, 428–433. doi:10.1089/pho.2012.3469
- McGirt, M.J., Chaichana, K.L., Gathinji, M., Attenello, F.J., Than, K., Olivi, A., Weingart, J.D., Brem, H., Quiñones-Hinojosa, A.R., 2009. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. *J. Neurosurg.* 110, 156–162. doi:10.3171/2008.4.17536
- Mirimanoff, R.-O., Gorlia, T., Mason, W., Van den Bent, M.J., Kortmann, R.-D., Fisher, B., Reni, M., Brandes, A.A., Curschmann, J., Villa, S., Cairncross, G., Allgeier, A., Lacombe, D., Stupp, R., 2006. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 2563–2569. doi:10.1200/JCO.2005.04.5963
- Moskopp, D., Moskopp-Wassmann, Wassmann, H., 2005. Neurochirurgie: Handbuch für die Weiterbildung und interdisziplinäres Nachschlagewerk ; mit 206 Tabellen. Schattauer, Stuttgart [u.a.].Kapitel 7.7.
- Nanda, A., Bir, S.C., Konar, S., Maiti, T.K., Bollam, P., 2015. World Health Organization Grade I Convexity Meningiomas: Study on Outcomes, Complications and Recurrence Rates. *World Neurosurg.* doi:10.1016/j.wneu.2015.11.050
- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., Wrensch, M.R., Barnholtz-Sloan, J.S., 2014. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol.* 16, 896–913. doi:10.1093/neuonc/nou087
- Pasquier, D., Bijmolt, S., Veninga, T., Rezvoy, N., Villa, S., Krengli, M., Weber, D.C., Baumert, B.G., Canyilmaz, E., Yalman, D., Szutowicz, E., Tzuk-Shina, T., Mirimanoff, R.O., Rare Cancer Network, 2008. Atypical and malignant meningioma: outcome and prognostic factors in 119 irradiated patients. A multicenter, retrospective study of the Rare Cancer Network. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 71, 1388–1393. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.12.020
- Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Nesland, J.M., 1997. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem. Photobiol.* 65, 235–251.
- Posti, J.P., Bori, M., Kauko, T., Sankinen, M., Nordberg, J., Rahi, M., Frantzén, J., Vuorinen, V., Sipilä, J.O.T., 2014. Presenting symptoms of glioma in adults. *Acta Neurol. Scand.* doi:10.1111/ane.12285

- Rapp, M., Kamp, M., Steiger, H.-J., Sabel, M., 2014. Endoscopic-assisted visualization of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in malignant glioma surgery: a technical note. *World Neurosurg.* 82, e277–279. doi:10.1016/j.wneu.2013.07.002
- Ron, E., Modan, B., Boice, J.D., Alfandary, E., Stovall, M., Chetrit, A., Katz, L., 1988. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N. Engl. J. Med.* 319, 1033–1039. doi:10.1056/NEJM198810203191601
- Sant, M., Minicozzi, P., Lagorio, S., Børge Johannesen, T., Marcos-Gragera, R., Francisci, S., EURO CARE Working Group, 2012. Survival of European patients with central nervous system tumors. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 131, 173–185. doi:10.1002/ijc.26335
- Schoenegger, K., Oberndorfer, S., Wuschitz, B., Struhal, W., Hainfellner, J., Prayer, D., Heinzl, H., Lahrmann, H., Marosi, C., Grisold, W., 2009. Peritumoral edema on MRI at initial diagnosis: an independent prognostic factor for glioblastoma? *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* 16, 874–878. doi:10.1111/j.1468-1331.2009.02613.x
- Schwengberg, S., Bohlen, H., Kleinsasser, N., Kehe, K., Seiss, M., Walther, U.I., Hickel, R., Reichl, F.X., 2005. In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials. *J. Dent.* 33, 49–55. doi:10.1016/j.jdent.2004.08.001
- Simpson, D., 1957. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 22–39.
- Song, L., Hennink, E.J., Young, I.T., Tanke, H.J., 1995. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 68, 2588–2600. doi:10.1016/S0006-3495(95)80442-X
- Soyuer, S., Chang, E.L., Selek, U., Shi, W., Maor, M.H., DeMonte, F., 2004. Radiotherapy after surgery for benign cerebral meningioma. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 71, 85–90. doi:10.1016/j.radonc.2004.01.006
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.-J., ALA-Glioma Study Group, 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 7, 392–401. doi:10.1016/S1470-2045(06)70665-9
- Stummer, W., Tonn, J.-C., Goetz, C., Ullrich, W., Stepp, H., Bink, A., Pietsch, T., Pichlmeier, U., 2014. 5-Aminolevulinic acid-derived tumor fluorescence: the diagnostic accuracy of visible fluorescence qualities as corroborated by spectrometry and histology and postoperative imaging. *Neurosurgery* 74, 310–319; discussion 319–320. doi:10.1227/NEU.0000000000000267
- Stupp, R., Gander, M., Leyvraz, S., Newlands, E., 2001. Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *Lancet Oncol.* 2, 552–560. doi:10.1016/S1470-2045(01)00489-2

- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996. doi:10.1056/NEJMoa043330
- Sultanem, K., Patrocinio, H., Lambert, C., Corns, R., Leblanc, R., Parker, W., Shenouda, G., Souhami, L., 2004. The use of hypofractionated intensity-modulated irradiation in the treatment of glioblastoma multiforme: preliminary results of a prospective trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58, 247–252.
- Tanboon, J., Williams, E.A., Louis, D.N., 2015. The Diagnostic Use of Immunohistochemical Surrogates for Signature Molecular Genetic Alterations in Gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* doi:10.1093/jnen/nlv009
- Treister, D., Kingston, S., Hoque, K.E., Law, M., Shiroishi, M.S., 2014. Multimodal magnetic resonance imaging evaluation of primary brain tumors. *Semin. Oncol.* 41, 478–495. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.06.006
- Valdes, P.A., Bekelis, K., Harris, B.T., Wilson, B.C., Leblond, F., Kim, A., Simmons, N.E., Erkmen, K., Paulsen, K.D., Roberts, D.W., 2014. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in meningioma: qualitative and quantitative measurements in vivo. *Neurosurgery* 10 Suppl 1, 74–82; discussion 82–83. doi:10.1227/NEU.0000000000000117
- Valdés, P.A., Kim, A., Leblond, F., Conde, O.M., Harris, B.T., Paulsen, K.D., Wilson, B.C., Roberts, D.W., 2011. Combined fluorescence and reflectance spectroscopy for in vivo quantification of cancer biomarkers in low- and high-grade glioma surgery. *J. Biomed. Opt.* 16, 116007. doi:10.1117/1.3646916
- Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Brandes, A.A., van den Bent, M.J., Wick, W., Hegi, M.E., 2010. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat. Rev. Neurol.* 6, 39–51. doi:10.1038/nrneurol.2009.197
- Weller, M., Tabatabai, G., Kästner, B., Felsberg, J., Steinbach, J.P., Wick, A., Schnell, O., Hau, P., Herrlinger, U., Sabel, M.C., Wirsching, H.-G., Ketter, R., Bähr, O., Platten, M., Tonn, J.C., Schlegel, U., Marosi, C., Goldbrunner, R., Stupp, R., Homicsko, K., Pichler, J., Nikkhah, G., Meixensberger, J., Vajkoczy, P., Kollias, S., Hüsing, J., Reifenberger, G., Wick, W., DIRECTOR Study Group, 2015. MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 2057–2064. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2737

Wiemels, J., Wrensch, M., Claus, E.B., 2010. Epidemiology and etiology of meningioma. *J. Neurooncol.* 99, 307–314. doi:10.1007/s11060-010-0386-3

Yano, S., Kuratsu, J., Kumamoto Brain Tumor Research Group, 2006. Indications for surgery in patients with asymptomatic meningiomas based on an extensive experience. *J. Neurosurg.* 105, 538–543. doi:10.3171/jns.2006.105.4.538

Zhang, Z.Z., Shields, L.B.E., Sun, D.A., Zhang, Y.P., Hunt, M.A., Shields, C.B., 2015. The Art of Intraoperative Glioma Identification. *Front. Oncol.* 5, 175. doi:10.3389/fonc.2015.00175

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J.F. Cornelius für die Überlassung des Dissertationsthemas und die hervorragende Einarbeitung in die Methodik. Während der gesamten Arbeit war er mein wichtigster Ansprechpartner für die klinischen Aspekte dieser Arbeit und stand mir mit wertvollen Anregungen zur Seite. Seine wissenschaftliche Begeisterung und sein großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit ließen mich das Projekt mit Freude fertig stellen.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Steiger bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Neurochirurgischen Labor, sowie für die konstruktive Kritik zur Umsetzung der Doktorarbeit.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei dem Projekt.

Ein weiterer großer Dank gebührt der MTA des Neurochirurgischen Labors, Frau Brigitte Senger, die mir zu Beginn der Arbeit die Fertigkeiten für ein erfolgreiches Arbeiten im Labor beibrachte und während der gesamten Arbeit stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. G. Reifenberger und dem gesamten Team des Neuropathologischen Instituts des Universitätsklinikums Düsseldorfs für die freundliche Unterstützung bei der histopathologischen Färbung bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Felsberg für die angenehme und zügige Unterstützung bei der histopathologischen Auswertung.

Herrn Dr. Igor Fischer danke ich für die benutzerspezifisch gut programmierte Software und für die schnelle Unterstützung bei Software- oder Hardwareproblemen.

Herrn Münstermann aus der Wertstatt für Lasermedizin danke ich für seine freundliche und zuverlässige Hilfe bei der technischen Umsetzung der Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester bedanken für die grenzenlose und liebevolle Unterstützung von Kindesbeinen an.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

22.05.2016, Jan-Malte Placke

Unterschrift