

Klinik für Neurochirurgie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf,
Deutschland
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Steiger

Klassifizierung der Meningeome in der Neurochirurgie anhand der konfokalen Laserendomikroskopie

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

vorgelegt von
Evgenia Movshovich

Düsseldorf, 2018

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Cleopatra Charalampaki

Zweitgutachter: PD Dr. Philipp Jörg Slotty

Für meine Eltern.

Zusammenfassung

In der Neurochirurgie hängt die Zukunft des Patienten sehr stark von der Genauigkeit der Tumorresektion ab. Je mehr Krebszellen entfernt werden und gleichzeitig je mehr gesundes Hirngewebe verbleibt, desto höher sind die Überlebenschancen und die Lebensqualität des Patienten.

Mit Hilfe der Histologie, Immunhistochemie, Zytogenetik und Molekulargenetik erfolgt die Einteilung des Tumors zu den einzelnen WHO Graden und Untergruppen. Dieses Procedere erfordert ausreichend Zeit. Zusätzlich kann man nicht intraoperativ abhängig von diesen Ergebnissen die Radikalität und die Genauigkeit der Schnittführung ändern. Für das letztere wurde der sogenannte Schnellschnitt entwickelt. Diese Art das Gewebe zu untersuchen liefert zwar schnell vorläufige Diagnosen, ist aber den oben aufgeführten Untersuchungen an Genauigkeit unterlegen. Man sucht somit nach einer Methode, die schnell und zuverlässig während der Operation eine Diagnose erbringt.

Die konfokale Laserendomikroskopie (CLE) ist eine neue Technik, die mit Hilfe einer kleinen Sonde und fluoreszierenden Farbstoffen Gewebe sowohl *in vivo*, als auch *ex vivo* untersuchen kann. Dabei werden *real-time* Videos aufgenommen, so dass man intraoperativ beim Vorhandensein der Beurteilungskriterien entscheiden könnte, welcher Tumor es ist und wo die Tumorgrenzen liegen.

Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Kriterien in der konfokalen Endomikroskopie zu finden und zu erfassen, um daraufhin entweder intraoperativ oder kurz nach Entnahme der Tumorproben anhand der Zellmorphologie die entsprechende Entität noch vor Beendigung der OP zu klassifizieren. So könnten die Diagnose schneller gestellt, der Patient darüber informiert und weitere Therapieoptionen diskutiert, bzw. das operative Vorgehen entsprechend besser auf den individuellen Tumor angepasst werden. Im Einzelnen war hier die Frage zu klären, ob die CLE das Potential hätte, intraoperativ Meningeome, die die häufigste nicht hirneigene Tumorentität darstellen, zu charakterisieren.

Meningeome entstehen aus den Zellen der Arachnoidea, sind meistens benigne und machen einen Anteil von 20% der nicht hirneigenen Tumore aus. Sie werden von der *World Health Organization* (WHO) in drei Grade unterteilt.

Für die zu Grunde liegenden Studie wurden 115 Patienten mit Meningeomen in der Neurochirurgie des Klinikum Köln Merheim von April 2015 bis Juli 2016 operiert. Proben der entnommenen Meningeome wurden im Wissen um ihre o. g. Einteilung mit Hilfe der CLE untersucht. Dabei konnten bei allen vorhandenen Meningeomtypen die gleichen Charakteristika wie in der klassischen neuropathologischen Untersuchung festgestellt werden. Die Zeichen der Malignität konnten erkannt werden und waren eindeutig zuzuordnen. Die Ergebnisse wurden im Einzelnen zusammengetragen und in Form einer Klassifikation dargestellt.

Es kristallisiert sich somit eine neue Möglichkeit, mit Hilfe der CLE-Klassifikation während der Operation den Tumor zu diagnostizieren und den Übergang der gesunden Zellen zu den Tumorzellen genau zu finden. Das ermöglicht eine effektivere Tumorentfernung noch in derselben Operation. Zusätzlich kann man dem Patienten schneller die Diagnose mitteilen und weitere Therapieschritte diskutieren und einleiten.

Summary

Objective: Meningiomas are one of the most often tumours that originate in the brain. Most of the time the tumours are benign, but this is not always the case. It is very important to detect them and find out what type of meningiomas the patients are suffering from, to be able to treat and cure them.

Meningiomas are divided into three grades by the World Health Organization (WHO). The gold standard of classifying the meningiomas is the histological examination, which last several days and is not usable *in vivo* during the operation.

Furthermore, the greatest challenge for the neurosurgery is to eliminate the tumour without harming the brain tissue.

In our study, we use the Confocal Laser Endomicroscopy (CLE) to examine meningiomas to figure out if we can detect the same criteria as in histological examination during real time examination and operation. The next step was to create a classification for meningiomas with the use of Confocal Laser Endomicroscopy in order to build a system that allows a fast histological diagnostic.

Methods: Patients with meningiomas were operated and the probes of the tumour were fixed in formalin. We used the Cellvizio® system (Mauna Kea Technologies, Paris, France) to examine the probes *ex vivo*. We used acriflavine hydrochloride and cresylviolet as fluorescent agents.

Results: We examined tumour biopsies of 115 patients *ex vivo* and saw that most of the histological criteria in our probes are also visible with the CLE technique. Therefore, we could create a classification for the meningeomas.

Discussion: This study shows the possibility of classifying the meningiomas *in vivo*. In the future, we hope to use this technique during the operation to define the boundary of the tumour and to operate most effectively on the cellular level. Additionally, we would have a rapid result to tell the patient and begin the therapy. Furthermore, having an intraoperative rapid diagnosis we could be able to start immediately after surgery with additional therapies if needed.

Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
AF	Acriflavin Hydrochlorid
C	Zelle
CV	Kresylviolett
CLE	Konfokale Laserendomikroskopie
CLSM	Confocal-Laser-Scanning-Mikroskope
DNS	Desoxyribonukleinsäure
G	Gefäß
HPF	High Power Field
HE	Hämatoxylin- Eosin
ICG	Indocyaningrün
M	Mitose
N	Nukleus
P	Psammomkörper
WHO	World Health Organization
Z	Zwiebelschalenformation
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
a. Problematik der operativen Therapie der Hirntumore	1
b. Meningeome: Definition und Einteilung	3
c. Ziel dieser Arbeit	5
2. Material und Methoden	6
a. Konfokale Laserendomikroskopie und ihre physikalischen Grundlagen	6
b. Fluoreszenz Farbstoffe und ihr Einsatz bei der CLE	10
c. Neuropathologische Untersuchung	11
d. Patientenkollektiv	11
e. Studiendesign und Durchführung	13
3. Ergebnisse	15
a. WHO Grad I Meningeome	16
1. Meningotheliomatöse Meningeome	16
2. Fibroblastische (oder fibröse) Meningeome	19
3. Transitionale Meningeome	22
4. Psammomatöse Meningeome	24
5. Angiomatöse Meningeome	27
6. Mikrozystische Meningeome	29
7. Sekretorische Meningeome	31
8. Lymphozytenreiche Meningeome	32
9. Metaplastische Meningeome	33
b. WHO Grad II Meningeome	34
1. Atypische Meningeome	34
2. Chordoide Meningeome	38
3. Klarzellige Meningeome	41
c. WHO Grad III Meningeome	42
1. Anaplastische Meningeome	42
2. Rhabdoide Meningeome	45
3. Papilläre Meningeome	46
d. CLE Kriterien der verschiedenen Meningeomtypen	47
4. Diskussion	49
5. Bemerkungen	53
6. Literaturverzeichnis	54
7. Danksagung	57

1. Einleitung

a. Problematik der operativen Therapie der Hirntumore

Das größte Ziel und gleichzeitig die größte Herausforderung in der Neurochirurgie ist das Entfernen des gesamten Hirntumors mit minimalen Verletzungen des gesunden Hirngewebes.

Für die optimale Therapie der Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) wird eine enge Zusammenarbeit zwischen Neurochirurgen, Neuropathologen, Strahlentherapeuten und Onkologen benötigt. Ein wichtiger Schritt in der Diagnosestellung und der Planung des weiteren Procederes unmittelbar postoperativ ist die histopathologische Untersuchung der entnommenen Probe. Die Operationen des ZNS unterscheiden sich von der Tumorchirurgie der anderen Gebiete. Auf engstem Raum befinden sich Hirnzellen, die für überlebenswichtige Funktionen des Körpers zuständig sind. Von der Genauigkeit der Schnittführung wird die zukünftige Lebensqualität deutlich durch das Schonen des gesunden Hirngewebes beeinflusst.

Ein weiterer Punkt ist, dass, je nach Tumorart, man mit bloßem Auge die Tumorgrenzen nicht sicher festlegen kann und die nach der Operation verbliebenen Tumorzellen die Grundlage für ein zukünftiges Rezidiv bilden. Dieses Rezidiv zieht nicht nur weitere invasive Therapien nach sich, sondern birgt auch die Gefahr der weiteren malignen Entdifferenzierung und mindert somit die Überlebensrate und Lebensqualität des Patienten. Dem gegenüber steht die Möglichkeit durch radikale Entfernung des Tumorgewebes neue neurologische Ausfallssymptome bei dem Patienten hervorzurufen.

Für diese Problematik der bestmöglichen Darstellung der Tumorgrenzen wurden viele neue Techniken und Bildgebungen mit dem Ziel entwickelt, dem Operateur die Möglichkeit zu geben, intraoperativ die Tumorgrenzen besser einzuschätzen und effektiver operieren zu können. Heutzutage werden während einer Operation Röntgen, Magnetresonanztomographien, Computertomographien und Ultraschall benutzt. Zusätzlich erzielt man sehr gute Erfolge mit der intraoperativ angewandter 5-Aminolävulinsäure (5-ALA). Dieser Wirkstoff reichert sich in den Tumorzellen an und kann mit Hilfe der speziellen Operationsmikroskope detektiert werden. 5-ALA reichert sich in stark metabolisch aktiven Zellen an und wird zu Protoporphyrin IX umgewandelt, welches durch seine Fluoreszenz sichtbar gemacht werden kann.^{1,2}

Mittels MRT-Untersuchungen kann man die normale und pathologische Anatomie, Ödeme, Blutungen, Metastasen, Nekrosen und sonstige Veränderungen des ZNS darstellen. Mit Hilfe des Kontrastmittels kann man zwischen verschiedenen Pathologien des Gehirns genauer differenzieren. Die MRT-Untersuchungen sind für die Planung einer Operation und die Nachsorge essentiell. Neuerdings wird in manchen Kliniken diese Technik während des operativen Eingriffs angewandt unter der Hinnahme des höheren Aufwandes sowohl in personeller, als auch monetärer Hinsicht.³

Ultraschall ist eine günstige und schnelle Methode, die auch intraoperativ angewandt wird. Sie ermöglicht jedoch nicht auf zellulärer Ebene die Unterscheidung zwischen tumorösem und gesundem Gewebe.

Die konfokale Laserendomikroskopie (CLE) hingegen ist eine neue Technik, mit derer Hilfe eine Laserscanningsonde in Kombination mit fluoreszierenden Farbstoffen das Gewebe sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf zellulärer Ebene untersuchen kann. Dabei werden Videos mit zwölf Bildern pro Sekunde in *real-time* von dem zu untersuchenden Gewebe aufgenommen und gespeichert. Intraoperativ wäre es dann möglich zu entscheiden, um welchen Tumor es sich handelt und wo die Tumorgrenzen liegen.

Die CLE wurde das erste Mal in der Gastroenterologie eingesetzt⁴ und wird zunehmend immer mehr auch in anderen diagnostisch arbeitenden Fachbereichen praktiziert, wie z. B. in der Urologie⁵, Gynäkologie⁶, Pulmonologie⁷ und Oto-Rhino-Laryngologie⁸. In der Neurochirurgie wurden die meisten Studien, bis auf eine Ausnahme⁹, bisher nur im *ex vivo* Versuch mit Biopsaten oder im Tiermodell durchgeführt.^{10,11,12} Da die Anwendung der CLE in der Neurochirurgie sehr neu ist, ist eine Korrelation zwischen der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und des CLE-Bildes, welche zur Klassifizierung des histologischen Materials führen könnte, mit Hilfe der CLE-Technik bei keiner Tumorart des ZNS bisher erfolgt.

b. Meningeome: Definition und Einteilung

Meningeome sind die häufigsten extraaxialen Tumore, von denen die meisten *benigne* sind. Fast 20% der intrakraniellen *Neoplasien* gehören zu den Meningeomen.¹³ Meningeome entstehen aus den Zellen der Arachnoidea und wachsen meist langsam, wobei sie das umgebende Gewebe verdrängen und somit symptomatisch werden.

Die World Health Organization (WHO) teilt Meningeome in drei Grade ein. Dabei gehören zu den WHO Grad I neun verschiedene Arten, WHO Grad II beinhaltet drei verschiedene Meningeome, genauso wie die WHO Grad III Gruppe (Tab. 1).¹⁴

WHO Grad I	WHO Grad II	WHO Grad III
Meningotheliomatös	Atypisch	Anaplastisch
Fibrös	Chordoid	Rhabdoid
Transitional	Klarzellig	Papillär
Psammomatös		
Angiomatös		
Mikrozystisch		
Sekretorisch		
Lymphozytenreich		
Metaplastisch		

Tab. 1: Einteilung der Meningeome nach WHO anhand der morphologischen Merkmale.

Die WHO Grad I Meningeome gehören zu den gutartigen Tumoren. Wichtig ist dabei, dass die WHO Grad II und III Tumore eine signifikant höhere Rezidivrate und ein aggressiveres Wachstumsverhalten aufweisen. Außerdem können Grad III Meningeome systemisch metastasieren.¹⁵

Manche von den in der Tab. 1 aufgeführten Tumoren sind eher selten. Die Inzidenz aller Meningeomtypen liegt bei 6-8 auf 100.000 Menschen pro Jahr.

Diese Einteilung in die verschiedenen Typen wird nach zahlreichen histologischen, immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen der entnommenen Proben des Tumorgewebes vorgenommen. Eine Beschreibung dieser Untersuchungen ist u.a. in der WHO Klassifikation gegeben und wird daraus entnommen:¹⁴

Immunphänotypisch sind in 94% der Fälle die Meningeome positiv für *epithelial membrane antigen* (EMA).¹⁶ Jedoch weniger bei atypischen und bösartigen Meningomen. Das unspezifische Vimentin wird bei allen Meningeomen expremiert. Zusätzlich sind fast alle Meningeome Somatostatin Rezeptor 2A positiv, genauso wie die neuroendokrinen Neoplasien.¹⁷ Die fibrösen Meningeome weisen das S100 Protein auf. Andere Marker sind das Ki-67 und der Progesteron Rezeptor.

Bei atypischen und anaplastischen Meningeomen sind molekulargenetische Veränderungen häufiger.¹⁸ Die häufigste genetische Aberration bei den Meningeomen ist die Monosomie 22.¹⁹ Weiterhin sind die 1p-Deletion und der Verlust von den Chromosomen 6q, 9p, 10, 14q und 18q bekannt.

In 60% der sporadisch auftretenden Meningeome kann man eine Mutation von NF2-Gen nachweisen.^{20,21} Diese Mutation ist von der namensgebenden Erkrankung, Neurofibromatose Typ 2, bekannt. Bei dieser Erkrankung leiden die Menschen an benignen Neoplasien des Gehirns. In den meisten Fällen handelt es sich um kleine Deletionen, Insertionen oder Nonsens-Mutationen.²²

Solche Vorgehensweisen erfordern nicht nur Zeit und lassen so lange den Patienten in Ungewissheit, sondern ermöglichen auch keine sofortige Möglichkeit der intraoperativen Diagnose und entsprechend lassen sie keine Veränderung des intraoperativen Managements zu. Zusätzlich kommt hinzu, dass es bisher keine Methode der Visualisierung intraoperativ gibt, die die Beurteilung der zellulären Resektionsränder auf Tumorfreiheit erlaubt. Von der Tumorfreiheit auf zellulärer Ebene hängt aber die Rezidivhäufigkeit und somit die Überlebensrate ab.

Die schnellste Möglichkeit sowohl einer Diagnosesicherung als auch der Tumorfreiheit während der Operation ist der sogenannte Schnellschnitt. Dabei werden die Proben parallel zu der Operation gefriergetrocknet, angefärbt und sofort unter dem Mikroskop angeschaut. Leider ist diese Methode dem Paraffinschnitt weit unterlegen, denn die Qualität der so entstandenen Schnitte ist geringer als die der in Paraffin eingebetteten Tumorproben. In einer Studie wurden 578 intrakraniellen Tumorproben verglichen.²³ Alle Proben wurden sowohl als Gefrierschnitt, als auch in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, untersucht. Dabei wurde in 9,7% keine Übereinstimmung der beiden Diagnosen festgestellt.

Wünschenswert ist also eine Methode, die schnell und zuverlässig sogar intraoperativ eine Diagnose liefert. Wäre dieses möglich, so könnte man die operativen Maßnahmen sofort anpassen.

c. Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit widmet sich der Klassifizierung der Meningeome des ZNS mit Hilfe der CLE-Technik *ex vivo* und stellt die Korrelationen der histologischen Merkmale der Meningeome dar, die zwischen der klassischen HE-Färbung und der CLE-Technik zu sehen sind.

Wenn man die Möglichkeit hätte, die Diagnose schneller intraoperativ zu stellen, die OP-Strategie in gleicher Sitzung anzupassen und den Patienten unmittelbar postoperativ ohne Zeitverzögerung über weitere Therapieoptionen zu informieren, wäre dies eine Verbesserung des Arbeitsablaufes der weiteren Behandlungen, die unmittelbar nach der Operation und noch im selben Krankenhausaufenthalt gestartet werden könnten. Und bevor man einen Schnellschnitt entnimmt, könnte man sich mit den Neuropathologen während der Operation beraten, sich gemeinsam CLE-Videos anschauen und gezielt Proben entnehmen.

Hätte man zusätzlich intraoperativ die Möglichkeit, Tumorgrenzen mit Hilfe der CLE festlegen zu können, würde dies helfen, den Tumor auf zellulärer Ebene effektiver und schonender unter noch mehr Protektion des normalen Gewebes zu entfernen. Daraus würde sich die Hoffnung bilden, in der Zukunft eine höhere Rezidivfreiheit und somit eine Steigerung der Überlebenschancen der Patienten zu erlangen. Zusätzlich wäre bei der Erhöhung der Genauigkeit der Resektion während der Operation eine bessere Schonung des gesunden Hirngewebes und somit der Steigerung der Lebensqualität nach einer solchen Operation möglich.

Ziel dieser Arbeit ist nach Korrelationen zwischen klassischer histopathologischer Eigenschaften von Meningeomen und den gelieferten CLE Bildern zu suchen, die das Erstellen einer geeigneten CLE-Klassifikation intraoperativ erlauben würden. Mit dieser Klassifikation könnte man intraoperativ mit Hilfe der CLE-Technik die Meningeomtypen einordnen.

2. Material und Methoden

a. Konfokale Laserendomikroskopie und ihre physikalischen Grundlagen

Die CLE ist eine neue Technik, um Gewebe sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Für diese Studie wurde das Cellvizio® System (Mauna Kea Technologies®, Paris France) (Fig. 1) benutzt. Dieses System beinhaltet ein Confocal-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) und einen daran angeschlossenen Rechner mit einer dafür entwickelten Software. An das CLSM wird eine Minisonde angeschlossen. Für verschiedene zu untersuchende Gewebearten wurden spezielle Sonden entwickelt (Fig. 2) (Gastroflex™, GastroFlex™ UHD, ColoFlex™, ColoFlex™ UHD, CholangioFlex™, UroFlex™, CystoFlex™, AQ-Flex™ 19, CystoFlex™ UHD; Mauna Kea Technologies, Paris, France®), die alle aus 30.000 optischen Fasern bestehen. Diese Fasern sind in der Lage Photonen zu emittieren und zu absorbieren.

Für die Untersuchungen wurde die CystoFlex™ UHD R benutzt, da diese Sonde einen großen Diameter besitzt und bessere Kontraste in der Bilddarstellung ermöglicht. Die Beobachtungstiefe dieser Sonde beträgt 55-65 µm und das maximale Sichtfeld ist 240 µm im Durchmesser (Tab. 2).

Parameter	CystoFlex™ UHD R
Länge	2m
Maximales Sichtfeld	Ø 240 µm
Beobachtungstiefe	55-65 µm
Laterale Auflösung	1 µm

Tab. 2: Technische Daten der konfokalen Minisonde.



Fig. 1: Konfokales Laserendomikroskop Cellvizio®, Mauna Kea Technologies®, Paris, Frankreich.



Fig. 2: Verschiedene Sonden von Cellvizio®, Mauna Kea Technologies®, Paris, Frankreich. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung Mauna Kea Technologies, Paris, Frankreich.

Das physikalische Grundprinzip der CLE beruht auf den Grundlagen der konfokalen Mikroskopie, welches in den 1950er Jahren entdeckt worden ist. Für die Endomikroskopie wurde das Verfahren weiterentwickelt und miniaturisiert.

Bei einem konventionellen Lichtmikroskop wird zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung Licht auf das ganze Präparat projiziert. Im Gegensatz dazu wird bei einem konfokalen Mikroskop zur einer Zeiteinheit ein einzelner Punkt beleuchtet und das gesamte Präparat Punkt für Punkt abgearbeitet. Der Computer fügt die Informationen der einzelnen Punkte zusammen und berechnet das Gesamtbild.

Für die punktförmige Bündelung des Lichtes wird der Lichtquelle eine Lochblende vorgeschaltet. Dieser Lichtpunkt wird in der Fokusebene des Objektivs auf die zu untersuchende Probe abgebildet und regt die Probe an, sodass Fluoreszenzlicht erzeugt wird. Dieses Licht geht durch einen Strahlteiler und wird dadurch zum Detektor umgeleitet und gesammelt. Zusätzlich können spezielle Wellenlängen-bereiche verstärkt werden. Die zu Fluoreszenz-Anregung benutzte Wellenlänge und das Streulicht werden ausgeleitet. Vor dem Detektor wird der Lichtstrahl mit Hilfe einer Lochblende erneut gebündelt.

Der Lichtpunkt auf der Probe und der Lichtpunkt in der Lochblende sind gleichzeitig im Fokus, also *konfokal*.

Somit hängt das resultierende Bild erheblich von der optimal angepassten Größe der Lochblende ab. Wird die Lochblende zu groß gewählt, lässt sie zu viel Streulicht zu, fällt sie zu klein aus, wird das Bild zu dunkel.

Das Cellvizio® System benutzt die häufigere Methode des Laser-Rastermikroskops (CLSM). Der Laser wird mit Hilfe eines beweglichen Spiegelsystems systematisch immer weitergeleitet und rastert die Probe punktweise ab. So entsteht die Gesamtheit des Bildes aus einer Vielzahl von Punkten.

Schließlich wird ein vollständiges Bild Punkt für Punkt und Zeile für Zeile auf dem Bildschirm aufgebaut und kann von dem Untersucher auf dem Monitor betrachtet werden. Mit neuester Technik kann man die Frequenz der Bilder mit einer so hohen Geschwindigkeit so weit steigern, dass unser Auge sie als Video interpretiert.

Die optischen Elemente, die von der Cellvizio© Technologie gebraucht werden, sind alle in einem Gehäuse (Box) untergebracht (Fig. 3).

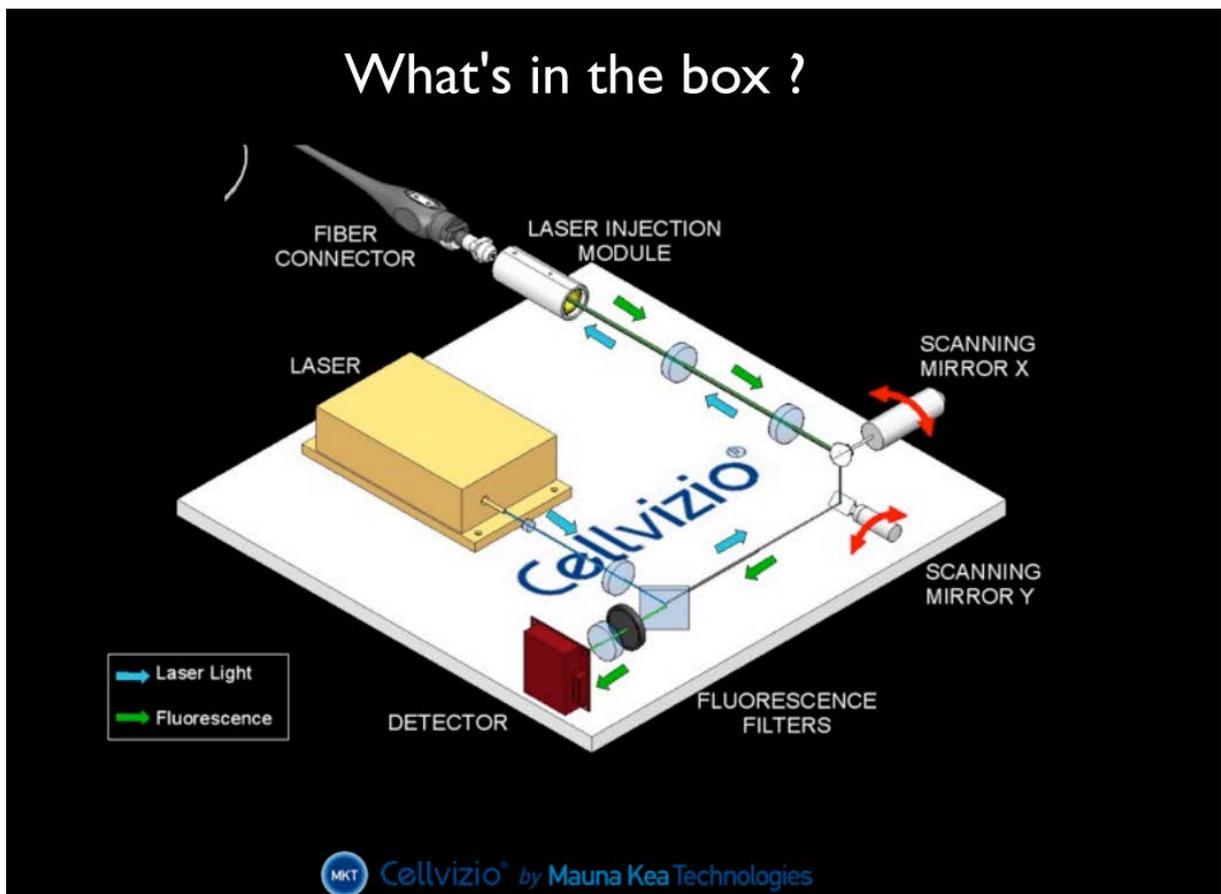


Fig. 3: Der Aufbau des konfokalen Laserendomikroskops. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung Mauna Kea Technologies, Paris, Frankreich.

b. Fluoreszenz Farbstoffe und ihr Einsatz bei der CLE

Fluoreszenz ist die spontane Emission von Licht kurz nach der Anregung eines Materials. Dabei ist das emittierte Licht in der Regel energieärmer als das vorher absorbierte. Manche Zellbestandteile zeigen Autofluoreszenz und ermöglichen so eine Auswertung. In der Studie wurden als Erstes die Proben alle nativ, also ohne zusätzliche Fluorophore, untersucht. Der verwendete Laser besitzt eine Emissionswellenlänge von 488 nm und absorbiert Photone mit einer Wellenlänge zwischen 500 und 650 nm. Die für die Untersuchungen passenden Farbstoffe waren Acriflavin Hydrochlorid (AF) und Kresylviolett (CV).

AF hat ein Maximum seiner Fluoreszenz bei 505 nm und ein weiteres Maximum bei 585 nm. Dabei markiert dieser Farbstoff die Desoxyribonukleinsäure (DNS) und die Zellmembran einer Zelle. Für diese Studie wurde mit Kochsalzlösung verdünntes 0,01 mg/ml AF (Sigma Aldrich®, Melbourne, Australien) verwendet (Tab. 3).

CV hat seine maximalen Emissionen bei 540 und 614 nm. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet an in Zytoplasma gelöste Moleküle. Hierbei wurde CV mit einer Konzentration von 0.02 mg/ml (Sigma Aldrich®, Melbourne, Australien) in Kochsalzlösung eingesetzt (Tab. 3).

Somit gliederte sich die Untersuchung in drei Stufen. Erst wurde jede Probe nativ, dann mit AF und daraufhin mit CV konfokal angeschaut. Als letztes wurden beide fluoreszierende Farbstoffe benutzt.

	AF	CV
Konzentration	0,05 %	0,02 %
Emissionsmaximum 1	505 nm	540 nm
Emissionsmaximum 2	585 nm	614 nm
Lokalisation	DNS, Zellmembran	Zytoplasma

Tab. 3: Fluoreszierende Farbstoffe.

c. Neuropathologische Untersuchung

Alle Meningeome wurden nach den gängigen histologischen Kriterien durch die Neuropathologie des Universitätsklinikums Köln beurteilt. Nachdem die einzelnen Tumorproben in 4% Formalin konserviert wurden, bettete man sie in Paraffin ein und stellte Schnitte her. Um die endgültige Diagnose gemäß der WHO Klassifikation zu stellen, wurden die einzelnen Proben nach den histologischen Kriterien, zytopathologisch, molekulargenetisch und immunologisch untersucht. Für den bildmorphologischen Vergleich mit der CLE-Technik wurden Schnitte, die mit HE angefärbt worden sind, benutzt.

d. Patientenkollektiv

Es wurden Proben von 115 Patienten gesammelt. Davon waren 77 Frauen und 38 Männer, das Alter erstreckte sich von 24 bis 90 Jahren. Alle diese Patienten wurden in der Neurochirurgie, Klinikum Köln Merheim, operiert, nachdem sie über die Operation aufgeklärt worden sind und ihr zugestimmt haben. Die Zusage der zuständigen Ethikkommission (mit der laufenden Nummer 2015028) wurde eingeholt und jeder Patient wurde über die Forschungsziele ausführlich informiert. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Daten wurden anonymisiert ausgewertet.

Dabei wurden 119 WHO Grad I Meningeome gesammelt, 23 WHO Grad II und drei WHO Grad III Meningeome. 85 Proben beinhalteten meningotheiomatöse Tumore, zehn fibröse, zwei transitionale, elf psammomatöse, zehn angiomatöse und ein mikrozystisches WHO Grad I Meningeome.

Von den WHO Grad II Tumoren befanden sich 20 atypische und drei chordoide Meningeome in dem untersuchten Patientenkollektiv.

Das anaplastische Meningeom, welches zu WHO Grad III gehört, war bei drei Tumorproben vorhanden (Tab. 4).

Somit waren 145 verschiedene Meningeome in dem Patientenkollektiv vorhanden. 23 Patienten hatten multiple Meningeome aufzuweisen (Tab. 5).

<u>Meningeomtyp</u>	<u>Anzahl der Proben</u>
WHO Grad I	119
Meningotheliomatös	85
Fibrös	10
Transitional	2
Psammomatös	11
Angiomatös	10
Mikrozystisch	1
Sekretorisch	0
Lymphozytenreich	0
Metaplastisch	0
WHO Grad II	23
Atypisch	20
Chordoid	3
Klarzellig	0
WHO Grad III	3
Anaplastisch	3
Rhabdoid	0
Papillär	0

Tab. 4: Anzahl der verschiedenen Meningeomproben in dem untersuchten Patientenkollektiv.

<u>Meningeomtyp</u>	<u>Anzahl der Patienten</u>
Meningotheliomatös und fibrös	3
Meningotheliomatös und angiomatös	5
Meningotheliomatös und psammomatös	6
Meningotheliomatös und mikrozystisch	1
Meningotheliomatös und transitional und angiomatös	1
Meningotheliomatös und fibrös und psammomatös	2
Meningotheliomatös und angiomatös und fibrös	1
Meningotheliomatös und angiomatös und psammomatös	2
Atypisch und angiomatös	1
Atypisch und fibrös und psammomatös	1

Tab. 5: Anzahl der gemischten Meningeomtypen in dem untersuchten Patientenkollektiv. Dabei sind diese Gruppen disjunkt, das heißt es wurde kein Patient doppelt aufgeführt.

e. Studiendesign und Durchführung

Nachdem die Zusage der Ethikkommission erteilt worden war, wurden die Proben von 115 Patienten gesammelt. Diese Proben wurden in Formaldehydlösung konserviert. Die Untersuchungen der Proben mit der CLE-Technik erfolgten jeweils zeitnah nach der durchgeführten Operation.

Jede einzelne Probe wurde in drei Kleinere unterteilt, um verschiedene Fluorophore benutzen zu können.

Als erstes wurde jede Teilprobe nativ mittels des Cellvizio Systems untersucht und videodokumentiert.

Folgend wurde diese Teilprobe mit einem Tropfen 0,01 mg/ ml AF (Sigma Aldrich®, Melbourne, Australia) angefärbt und nach einer Minute Wartezeit mit Kochsalzlösung ausgewaschen.

Die nächste Tumorteilprobe des gleichen Patienten wurde mit einem Tropfen 0.02 mg/ml CV (Sigma Aldrich®, Melbourne, Australia) angefärbt und wieder nach einer Minute Wartezeit mit Kochsalzlösung gespült.

Die letzte Tumorteilprobe wurde mit beiden Fluorophoren, AF und CV, nach dem oben genannten Prinzip zum Fluoreszieren gebracht. Der Gedanke dahinter war die Anfärbung von Zellkern und Zytoplasma in einem zu begutachten.

Jede Probe wurde im direkten Kontakt rasterförmig mit der Lasersonde abgefahren und als Video aufgenommen. Aus den aufgenommenen Daten wurden die Bilder gespeichert und konnten mit der speziell von Cellvizio ® entwickelten Software bearbeitet werden.

Für die Durchführung der Untersuchung der Proben wurde man zuerst in das Gerät eingewiesen und es erfolgte eine Schulung seitens der Mitarbeiter des Instituts.

Die klassische histologische Diagnose zu allen untersuchten Proben wurde von der Neuropathologie der Uniklinik Köln festgestellt. Dabei wurden Proben sowohl für die histologische, als auch für die CLE Untersuchung aus demselben Tumorbeet entnommen und aufgeteilt.

Nach intensiver Auseinandersetzung mit der histologischen Literatur wurden aufgrund der Vorkenntnisse Analogien zu den jeweiligen histologischen Kriterien in den CLE-Bildern gesucht. Da diese Technik in Verbindung zu Meningeomen das erste Mal verwendet worden ist, wurde die Arbeit ohne Erfahrungswerte durchgeführt. So wurden alle Videos mit dem Wissen der histologischen Diagnose beurteilt und nach immer wiederkehrenden Kriterien durchgemustert und evaluiert. So konnte man eine Klassifikation entsprechend den histologischen Kriterien für die CLE entwickeln.

3. Ergebnisse

Wie schon erwähnt richtet sich die Einteilung der Meningeome nach der WHO Klassifikation.¹⁴ Diese Kriterien sind der heutige Goldstandard und werden in diesem Abschnitt für jeden Meningeomtyp vorgestellt. Als nächstes erfolgt jeweils die typspezifische Vorstellung der Ergebnisse dieser Arbeit. Dabei werden erst die CLE Ergebnisse beschrieben und danach jeweils in figuraler und tabellarischer Form dargestellt. Zuletzt folgt eine Gesamttabelle der Klassifikation aller Meningeomtypen, die in dieser Studie zur Verfügung standen.

Aufgrund der Seltenheit der Meningeomtypen waren einige nicht in dem zur Verfügung stehenden Patientenkollektiv vorhanden. Für diese Meningeomtypen werden deshalb nur die histopathologischen Kriterien zur Einordnung geschildert. Beispielsweise beträgt die Häufigkeit der Meningeomtypen der WHO Klassen II und III, die in dem Patientenkollektiv nicht vorhanden waren (klarzellig, rhabdoid, papillär), unter 2%.²⁴

a. WHO Grad I Meningeome

1. Meningotheliomatöse Meningeome

Für diese Studie wurden 85 meningotheliomatöse Meningeome gesammelt. Alle diese Proben zeigten das gleiche Zellmuster.

Histopathologisch sind die Zellen rund bis oval geformt mit reichlich Zytoplasma und mittelgroß. Diese Zellen bilden Läppchen. Die Zellkerne besitzen mit deutlicher Kernmembran und feinem Chromatin annähernd die gleiche Form. Unter dem Mikroskop hat man den Eindruck ein Synzytium zu sehen, da die Zellen durch viele Desmosomen verbunden sind. Wichtig ist, dass die WHO Grad I Tumore nur sehr wenige pleomorphe Zellen und Mitosen aufweisen. Typisch sind die so genannten „Zwiebelschalenformationen“ und die Psammomkörperchen. Erstere sind einige mehrschichtige Wirbelbildungen aus Zellen, die eine Spindelform besitzen. Psammomkörper sind Kugeln aus Kalk, die häufig von Gefäßwänden ausgehen.

In der CLE konnte man gleichmäßige ovale Zellen sehen, die Zellkern- Plasma Relation war normal und das Bild war ruhig und gleichmäßig.

Bei den meningotheliomatösen Meningeomen fanden sich Zwiebelschalenformationen, vereinzelt Psammomkörperchen und wenige Gefäße.

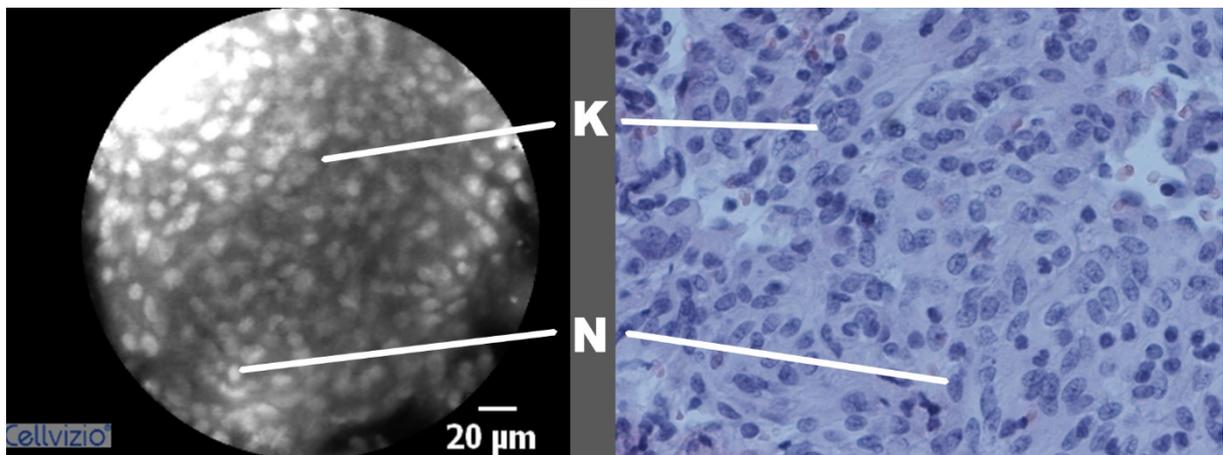


Fig. 4: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines meningotheliomatösen Meningeoms. Beide zeigen gleichmäßig verteilte ovale Zellkerne (N). Man sieht mehrere Zellkonglomerate (K).

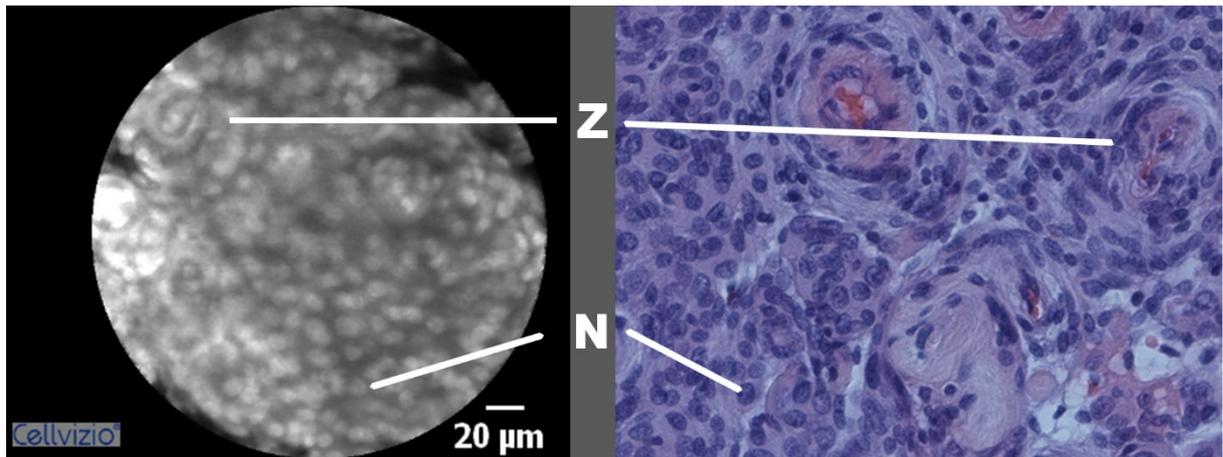


Fig. 5: CLE Bild (links) und das dazugehörige histologische Bild eines meningotheliomatösen Meningeoms, man sieht zahlreiche Zwiebelschalenformationen (Z).

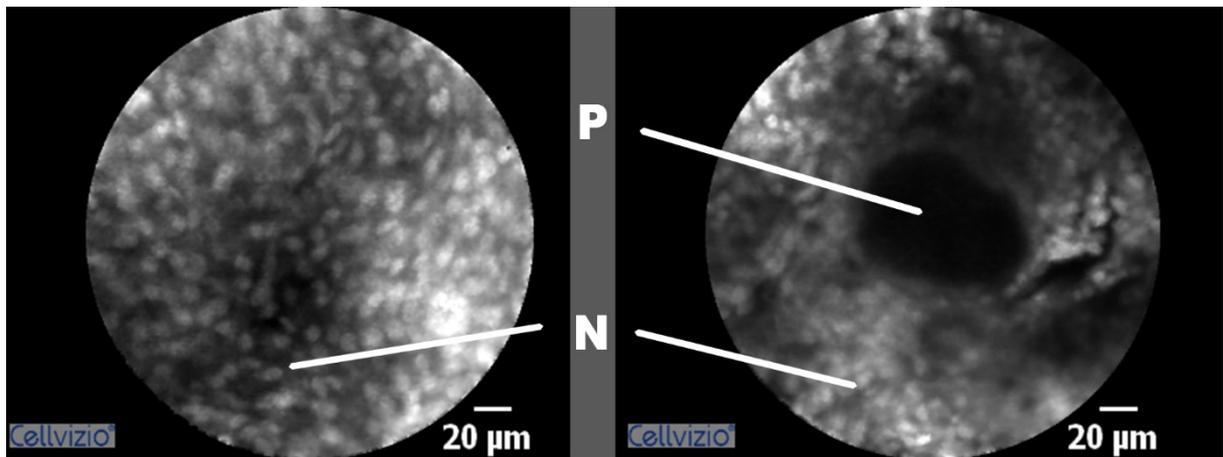


Fig. 6: CLE Bilder einer Probe eines meningotheliomatösen Meningeoms. Neben sehr gleichmäßiger Zellverteilung sieht man auch einzelne Psammomkörperchen (P).

Zellform	Oval
Zellkern	Oval
Zellgröße	Gleich
Zellverteilung im Bild	Uniform
Zelldichte	Normal
Zellanordnung	Gleichmäßig nebeneinander
Zellkern- Plasma- Relation	Normal
Zellgrenzen	Glatt
Zwiebelschalenformationen	Ja
Psammomkörperchen	Ja
Gefäße	Ja
Mitosen	Nur vereinzelt
Besonderheiten	Keine

Tab. 5: CLE Kriterien eines meningotheiomatösen Meningeoms.

2. Fibroblastische (oder fibröse) Meningeome

Die Zellen des fibroblastischen Meningeoms sind histopathologisch spindelförmig mit bipolaren Fortsätzen und bilden parallel angeordnete Zellzüge. Auch hier sind die Zellkerne längsoval. Dieser Tumor ist reich an Reticulin und Kollagen, aber arm an Zellnestern und Psammomkörperchen.

In der Studie wurden zehn fibröse Meningeome untersucht. Alle Proben wiesen das gleiche Bild der parallel angeordneten Zellzüge auf. Die Zellen und die Zellkerne waren gleichmäßig verteilt. Man sah dunkle Zytoplasma- Streifen neben hellen Zellkernen. Aufgrund der so charakteristischen Eigenschaften konnte man alle diese Tumore eindeutig mit Hilfe der CLE-Technik auch ohne das Wissen des histologischen Ergebnisses richtig einordnen.

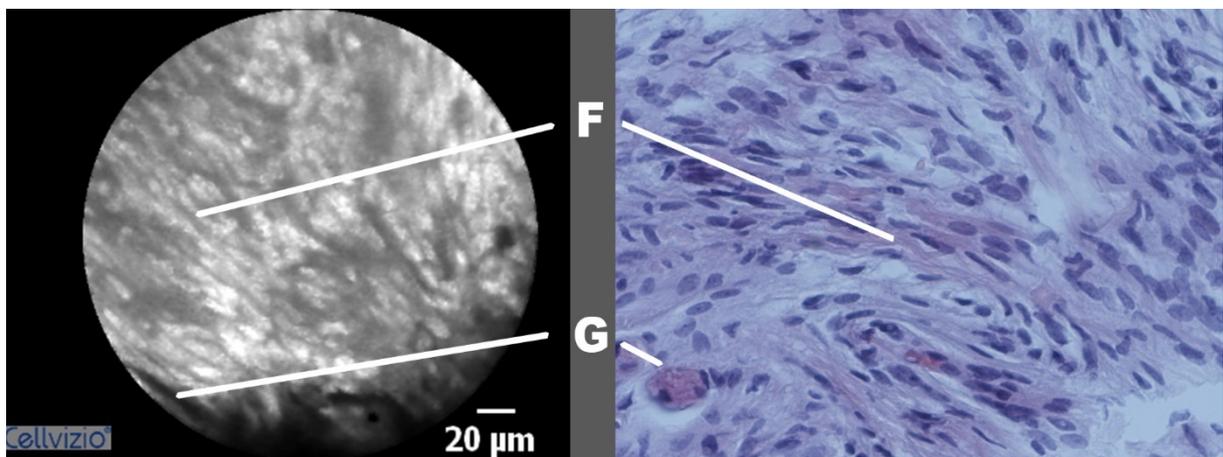


Fig. 7: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines fibrösen Meningeoms. Man sieht die parallel angeordneten Zellstränge (F) und die vereinzelt Gefäße (G).

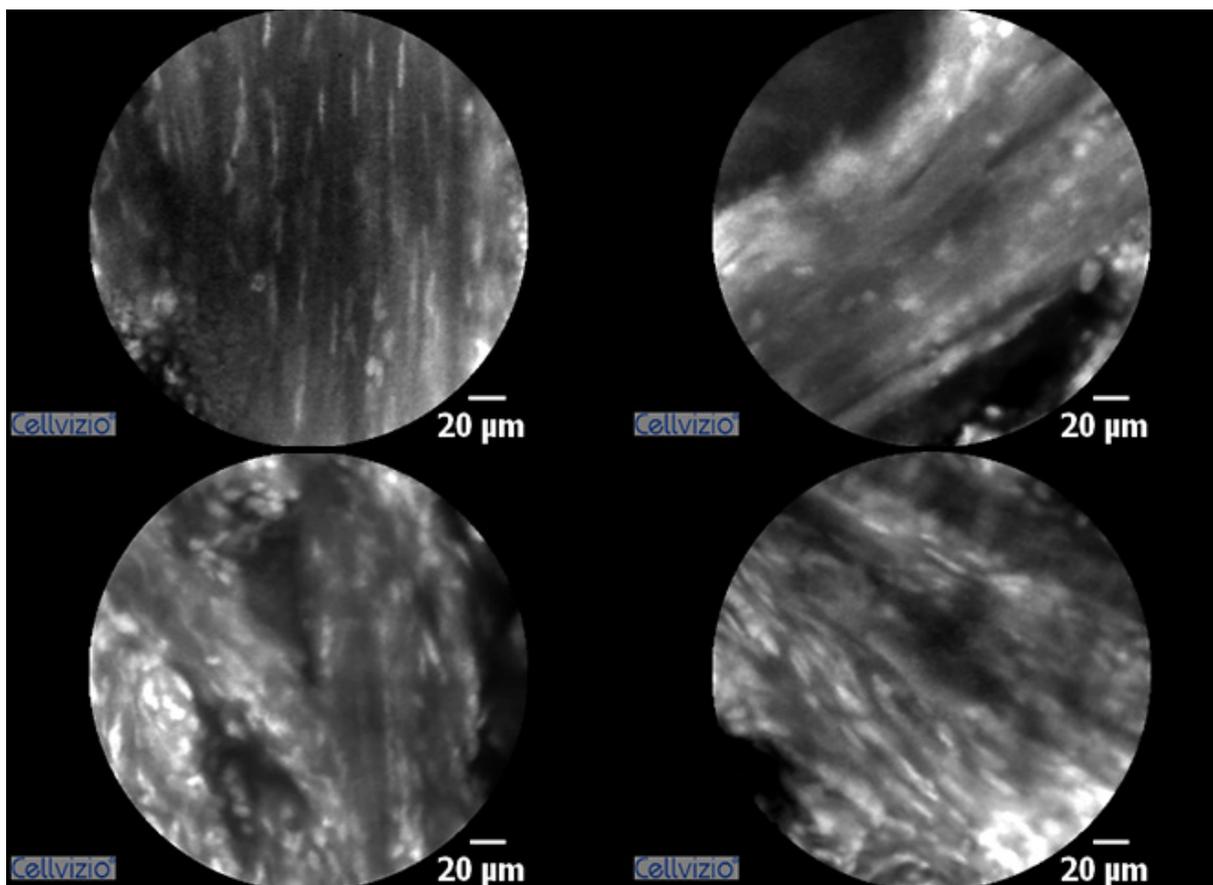


Fig. 8: CLE Bilder des fibrösen Meningeoms. Man beachte die parallel angeordnete gleichmäßige Zellanordnung.

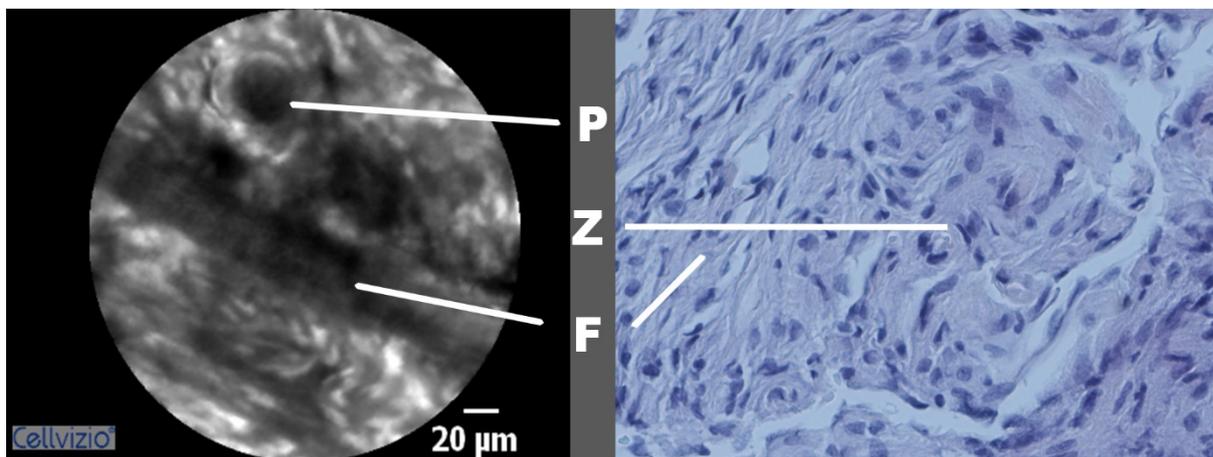


Fig. 9: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines fibrösen Meningeoms. Man sieht neben den parallelen Zellzügen (F) auch einzelne Zwiebelschalenformationen (Z) und Psammomkörperchen (P).

Zellform	Länglich
Zellkern	Oval
Zellgröße	Gleich
Zellverteilung im Bild	Uniform
Zelldichte	Normal
Zellanordnung	Gleichmäßig parallel angeordnete Zellzüge
Zellkern- Plasma- Relation	Normal
Zellgrenzen	Glatt
Zwiebelschalenformationen	Ja
Psammomkörperchen	Ja
Gefäße	Ja
Mitosen	Nur vereinzelt
Besonderheiten	Keine

Tab. 6: CLE Kriterien eines fibrösen Meningeoms.

3. Transitionale Meningeome

Das transitionale Meningeom enthält sowohl das Muster eines meningotheliomatösen, als auch eines fibroblastischen Meningeoms, Es kann einerseits ein Nebeneinander von meningotheliomatösen und fibrösen Anteilen sein oder durchgehend eine intermediäre Differenzierung aufweisen. Somit werden die meisten Meningeome in eine der beiden Gruppen von den bearbeitenden Histopathologen eingestuft, so auch in der Histopathologie der Universität Köln. Bei nur zwei Tumorproben ist die Entscheidung auf ein transitionales Meningeom gefallen.

Genauso wie bei den histologischen Kriterien, fanden sich auch bei der CLE sowohl die Eigenschaften eines meningotheliomatösen als auch eines fibrösen Meningeoms in denselben Tumorproben nebeneinander. Aus diesem und den oben genannten Gründen wurde an dieser Stelle auf das Einfügen der zugehörigen Bilder verzichtet.

Zellform	Teils oval, teils länglich
Zellkern	Oval
Zellgröße	Gleich im jeweiligem Abschnitt
Zellverteilung im Bild	Uniform
Zelldichte	Normal
Zellanordnung	Teils gleichmäßig nebeneinander, teils in parallel angeordnete Zellzügen
Zellkern- Plasma- Relation	Normal
Zellgrenzen	Glatt
Zwiebelschalenformationen	Ja
Psammomkörperchen	Ja
Gefäße	Ja
Mitosen	Nur vereinzelt
Besonderheiten	Keine

Tab. 7: CLE Kriterien eines transitionalen Meningeoms.

Die folgenden WHO Grad I Meningeome weisen bestimmte Strukturen auf. Somit können in einem Tumor Anteile von mehreren Typen vorhanden sein. Je nach Größe des jeweiligen Anteils werden solche Tumore entweder zu den einzelnen Klassen zugeordnet oder man beschreibt die jeweiligen Komponenten. Diese sind das psammomatöse, das angiomatöse, das mikrozystische, das sekretorische, das lymphozytenreiche und das metaplastische Meningeome und sind im Folgenden aufgeführt.

4. Psammomatöse Meningeome

Ein wichtiges histologisches Kriterium dieses Meningeoms sind die so genannten Psammomkörperchen. Bei den psammomatösen Meningeomen überwiegen die Psammomkörperchen die Tumorzellen. Die Psammomkörperchen fließen zusammen und können unregelmäßige Strukturen bilden. Manchmal füllen diese den ganzen Tumor aus und machen das Finden der einzelnen Tumorzellen unmöglich.

Bei der CLE Untersuchung waren es so viele Psammomkörperchen, dass teilweise ganze CLE Gesichtsfelder davon ausgefüllt wurden. Es gab verhältnismäßig mehr Zellen, die Psammomkörperchen bilden, als Zellen zwischen diesen Gebilden. Diese Art der Meningeome konnte man auch ohne Wissen der histologischen Ergebnisse zweifelsfrei mit der CLE richtig einordnen.

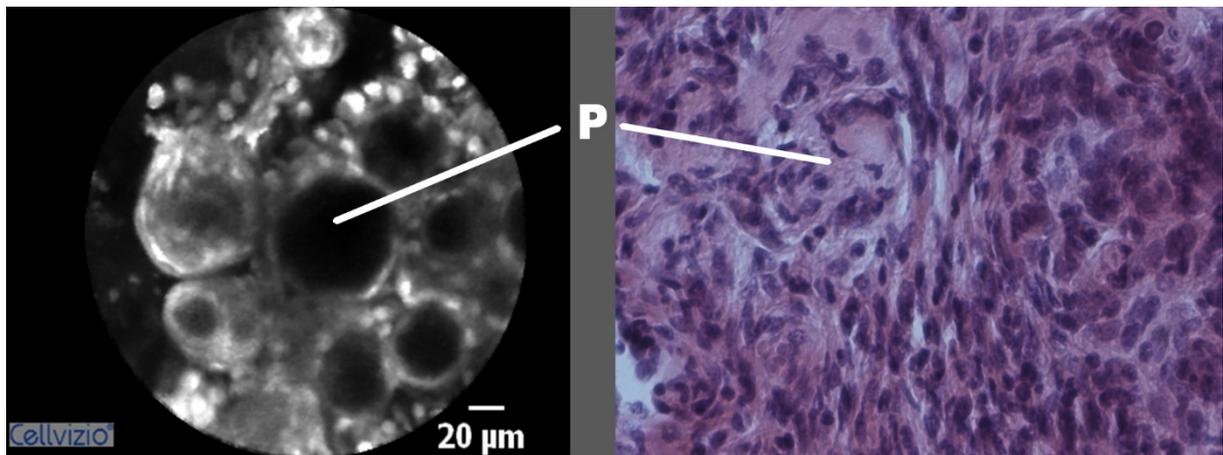


Fig. 10: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines psammomatösen Meningeoms. Fast alle Zellen sind zu Zwiebelschalenformationen oder Psammomkörperchen (P) geformt.

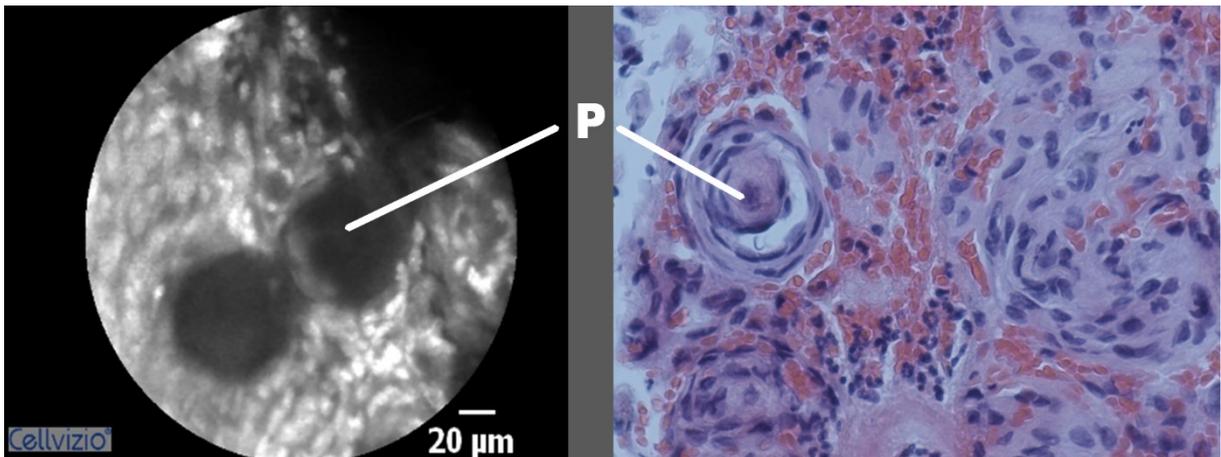


Fig. 11: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines psammomatösen Meningeoms. Die Psammomkörperchen (P) werden als dreidimensionale dunkle Kugeln mit Hilfe der CLE sichtbar.

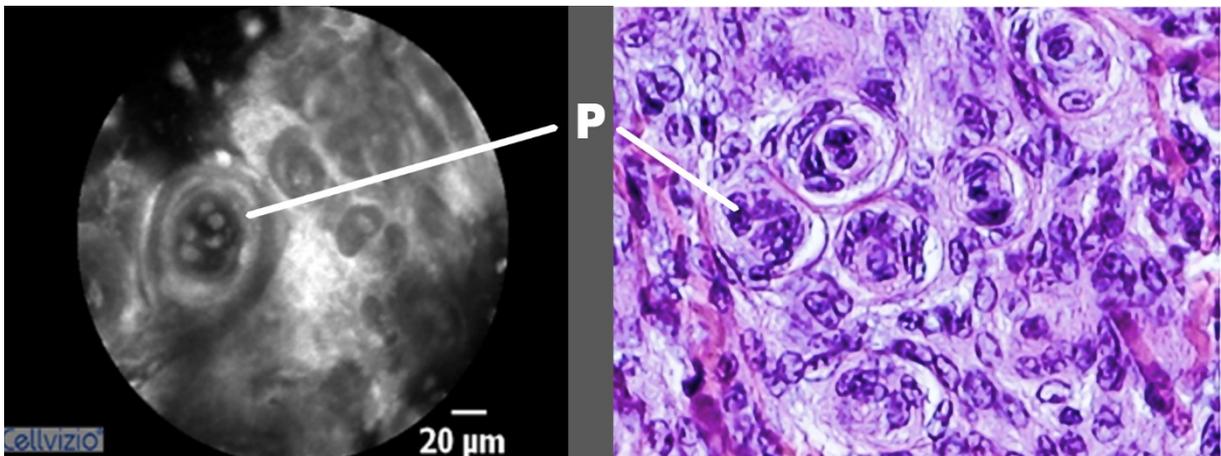


Fig. 12: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines psammomatösen Meningeoms. Man sieht zahlreiche Psammomkörperchen (P).

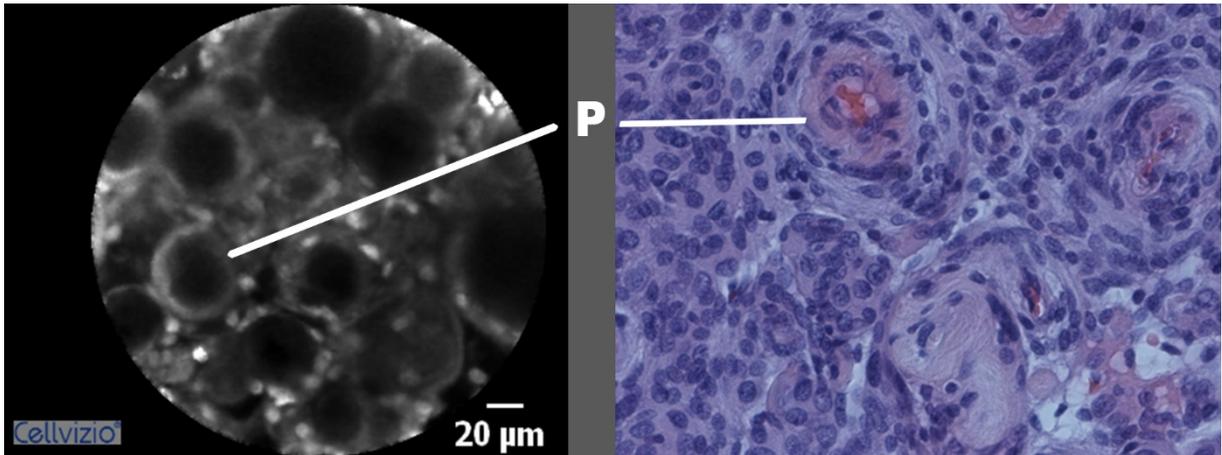


Fig. 13: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines psammomatösen Meningeoms. Das gesamte Bild wird von den Psammomkörperchen (P) ausgefüllt.

Zellform	Oval
Zellkern	Oval
Zellgröße	Gleich
Zellverteilung im Bild	Uniform
Zelldichte	Normal
Zellanordnung	Meist als Psammomkörperchen
Zellkern- Plasma- Relation	Normal
Zellgrenzen	Glatt
Zwiebelschalenformationen	Ja
Psammomkörperchen	Sehr viele
Gefäße	Ja
Mitosen	Nur vereinzelt
Besonderheiten	Keine

Tab. 8: CLE Kriterien eines psammomatösen Meningeoms.

5. Angiomatöse Meningeome

Dieser Tumor ist durch die Vielzahl von kleinen bis mittelgroßen Gefäßen charakterisiert. Die Dicke der Gefäßwände ist variabel, die Gefäße sind weitlumig und dicht beieinander, dazwischen finden sich nur spärlich eingeschaltete Tumorzellen.

Mit Hilfe der CLE konnte man viele Gefäße in diesen Tumorproben sehen. In den gewonnenen Videos sah man die Gefäßlumina als dunkle dreidimensionale Rohre, welche von den hellen Endothelzellen umgeben waren. Das Lumen war dunkel, da die Blutzellen, die fluoresziert hätten, in den *in vitro* Proben nicht mehr vorhanden waren.

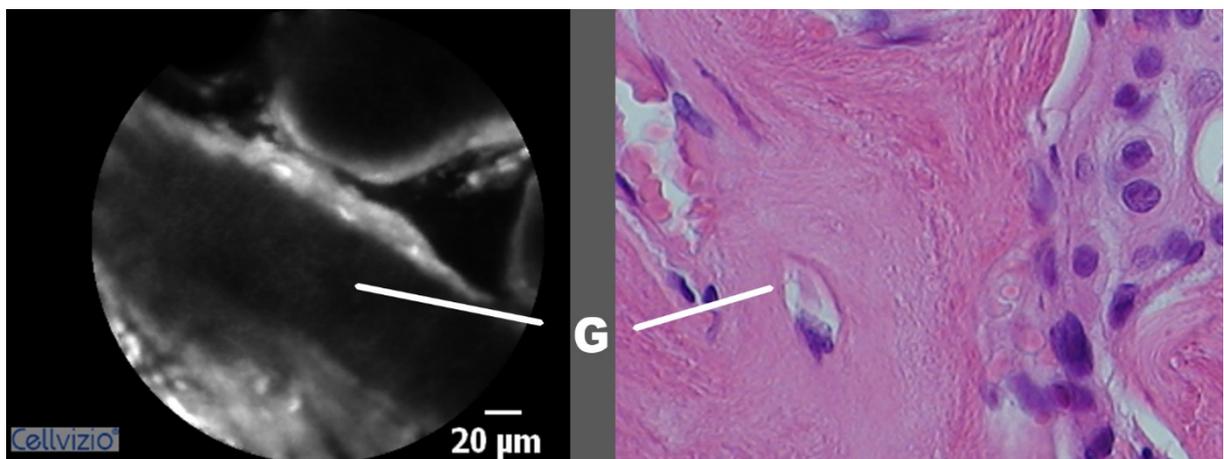


Fig. 14: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines angiomatösen Meningeoms. Man sieht zahlreiche Gefäße (G).

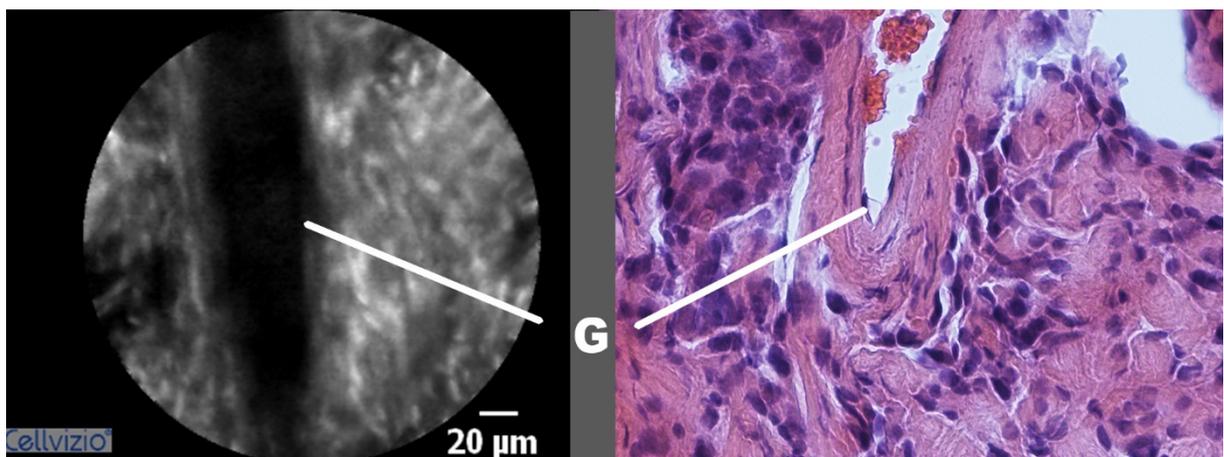


Fig. 15: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines angiomatösen Meningeoms. Das Gefäßlumen (G) ist in der CLE schwarz und man sieht die Endothelzellen dreidimensional um das Lumen.

Zellform	Oval
Zellkern	Oval
Zellgröße	Gleich
Zellverteilung im Bild	Uniform
Zelldichte	Normal
Zellanordnung	Gleichmäßig nebeneinander
Zellkern- Plasma- Relation	Normal
Zellgrenzen	Glatt
Zwiebelschalenformationen	Ja
Psammomkörperchen	Ja
Gefäße	Viele
Mitosen	Nur vereinzelt
Besonderheiten	Keine

Tab. 9: CLE Kriterien eines angiomatösen Meningeoms.

6. Mikrozystische Meningeome

Das mikroskopische Bild dieser Tumorart wird von sternförmigen oder bipolaren Zellen mit langen dünnen Ausläufen geprägt, die ein schwammartiges Netz bilden.

Bei der CLE Darstellung sah man, anders als bei den restlichen WHO Grad I Meningeomen, viele bipolare Zellen, die lange Ausläufer mit dunklen, nicht fluoreszierenden Zwischenräumen hatten. Dies liegt daran, dass diese Tumorart Mucin zwischen den Zellen hat und es somit keine Moleküle gibt, die die verwendeten Fluorophore binden könnten. Die Zellstruktur war nicht kompakt, sondern hatte eine spongiöse Auflockerung.

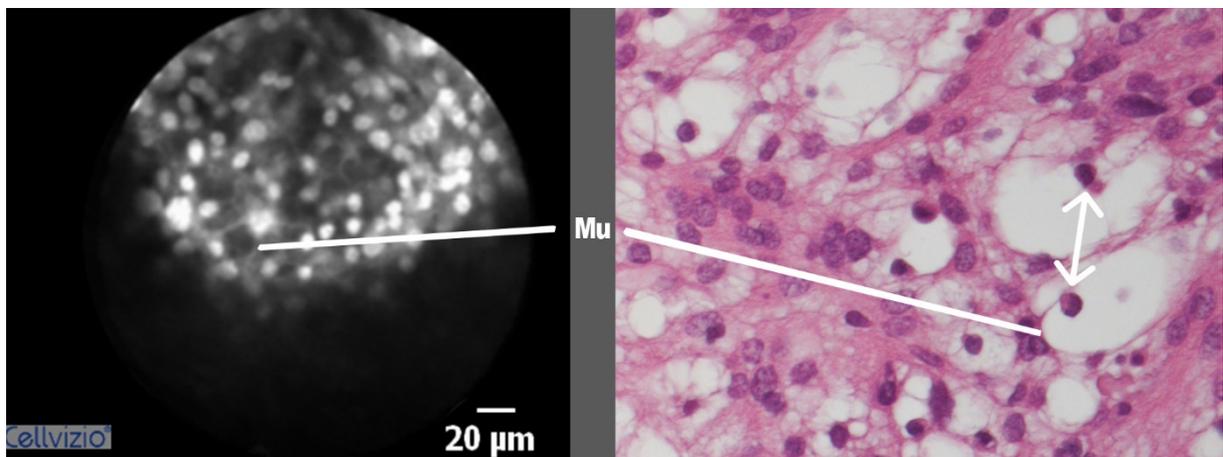


Fig. 16: CLE Bild eines mikrozystischen Meningeoms. Man sieht die langen Zellausläufer und die dunklen, nicht fluoreszierenden mit Mucin gefüllten Zwischenräume (Mu), die insgesamt eine spongiöse Struktur bilden. Man beachte durch das Mucin erzeugten große Zellabstände.

Zellform	Bipolar
Zellkern	Oval
Zellgröße	Größer
Zellverteilung im Bild	Uniform
Zelldichte	Normal
Zellanordnung	Spongiös
Zellkern- Plasma- Relation	Normal
Zellgrenzen	Lange Zellausläufer mit dunklen Zwischenräumen
Zwiebelschalenformationen	Nein
Psammomkörperchen	Nein
Gefäße	Ja
Mitosen	Keine gesehen
Besonderheiten	Dunkle Zellzwischenräume durch Mucin Einlagerung

Tab. 10: CLE Kriterien eines mikrozystischen Meningeoms.

7. Sekretorische Meningeome

Dieser Tumortyp ist durch zahlreiche Pseudopsammomkörperchen charakterisiert. Diese sind eosinophile, PAS- positive, rundlich- homogene oder schollig zerfallende, nicht kalkhaltige Körper, die ultrastrukturell in intra- oder extrazelluläre Lumina gelegen sind, die auch Mikrovilli enthalten. In der Umgebung von diesen Gebilden findet sich eine Hyperplasie der Gefäßwandzellen.

Leider wurde bei keinem Patienten ein solches Meningeom histologisch diagnostiziert, da diese Art der Meningeome extrem selten ist. Es wurde das erste Mal 1986 beschrieben²⁵ und man konnte bis dahin 28 Fälle in der Literatur finden. In den gesammelten Tumorproben wies keines diesen histologischen Meningeomtyp auf und so konnte man keine Korrelation zur CLE-HE-Färbung zeigen.

8. Lymphozytenreiche Meningeome

Das histologische Bild von dieser Tumorart wird von polyklonalen reaktiven Infiltraten dominiert.

Da dieser Meningeomtyp sehr selten ist, konnten man in dem untersuchten Patientenkollektiv keines nachweisen.

9. Metaplastische Meningeome

Dieses Meningeom zeigt eine ausgeprägte mesenchymale Differenzierung und bildet Knochen-, Knorpel-, Fettgewebs- und Myxoidzellen aus. Diese können einzeln oder gemischt vorkommen. Zusätzlich gibt es relativ häufig xanthomatöse Degeneration einzelner Zellen.

Auch an dieser Tumorart ist kein Patient der Studie erkrankt gewesen.

b. WHO Grad II Meningeome

1. Atypische Meningeome

Es existiert eine festgelegte Definition in der Neuropathologie wann ein Meningeom atypisch ist: Dabei liegt eine gesteigerte Mitoserate mit mindestens vier Mitosen pro zehn *high power fields* (HPF) vor oder es sind mindestens drei der folgenden Eigenschaften zu finden: gesteigerte Zelldichte, kleine Zellen mit hohem Kern-Zytoplasma Verhältnis, prominente Nukleolen, unstrukturiertes Wachstum, flächenhafte Nekrosen. Als letztes Kriterium gilt die Hirngewebsinfiltration mit zapfenförmiger Infiltration des umgebenden Hirngewebes durch Tumorzellverbände.

Ein HPF ist ein Gesichtsfeld von 0,16 mm² bei 400facher Vergrößerung.

In dem zur Verfügung gestellten Patientenkollektiv befanden sich 20 Tumore, die die Neuropathologie als atypisch eingestuft hatte. Dabei erfüllten alle diese Tumore das erste Kriterium, indem sie vier oder mehr Mitosen pro zehn HPF aufwiesen.

Nach der Untersuchung der oben genannten Proben mit der CLE konnte man eine zu den Grad I Meningeomen erhöhte Zelldichte feststellen und die Zellverteilung war ungeordneter, die Zellkern- Plasma Relation war höher und der Nukleolus auffälliger. Jedoch waren die atypischen mit den meningotheiomatösen Meningeomen in der CLE ähnlich. Viel spannender war somit die Tatsache, dass man in vielen Bildern Mitosen auch mit Hilfe der CLE finden konnte.

Um die Mitosen zu finden, wurden viele der Filter und Einstellungen von der Systemsoftware ausprobiert. Man konnte die meisten Mitosen mit dem *negate* Filter der Mauna Kea Technologie® Software finden (Fig. 20, 21, 22).

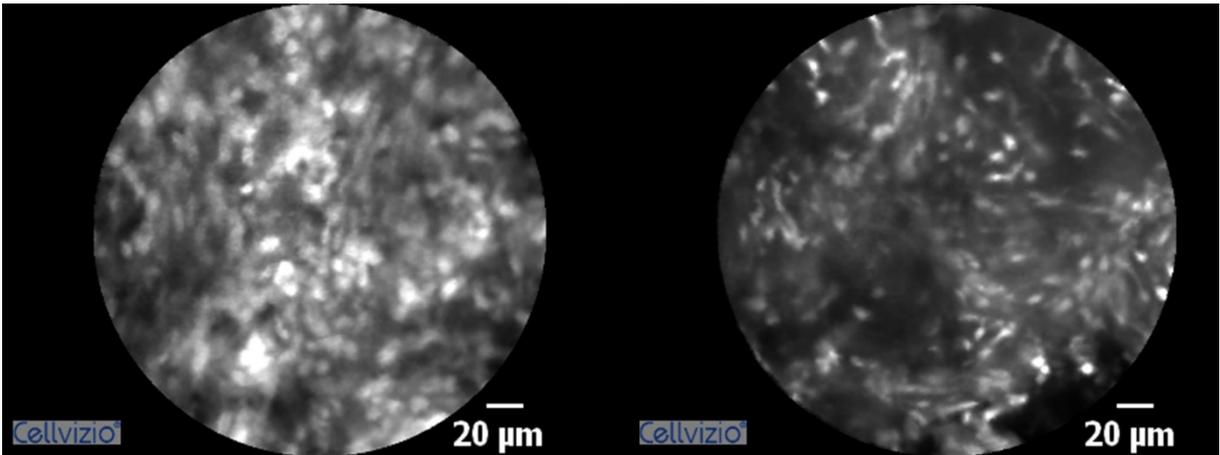


Fig. 17: CLE Bilder eines atypischen Meningeoms. Die Zellanordnung ist weniger gleichmäßig als bei einem meningotheliomatösen Meningeom.

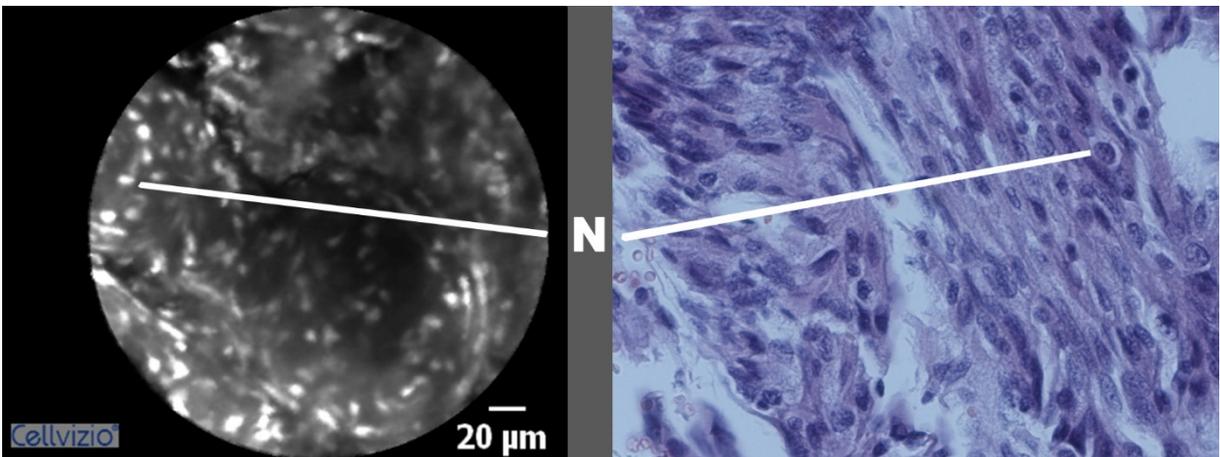


Fig. 18: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines atypischen Meningeoms zum Vergleich. Markiert sind die Zellkerne (N).

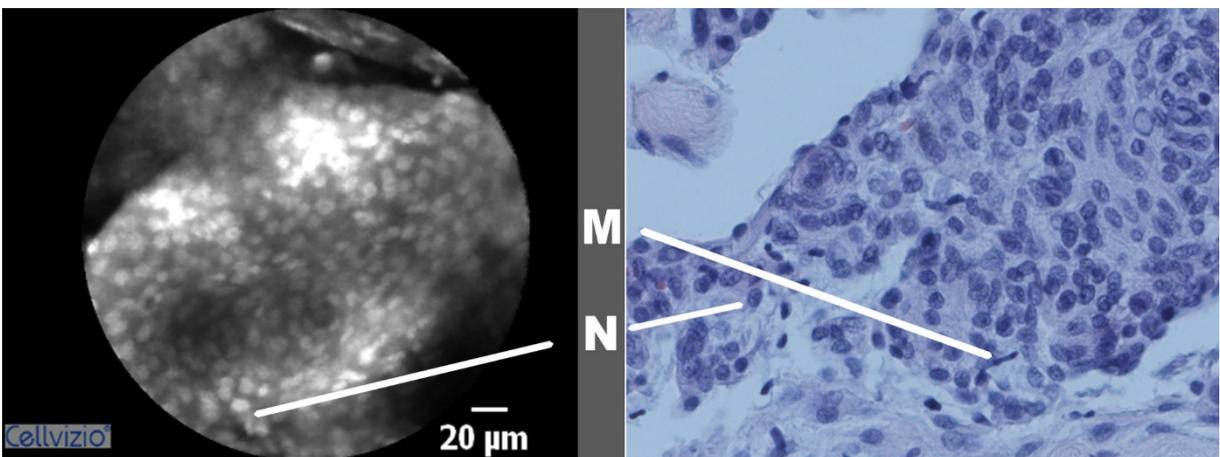


Fig. 19: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines atypischen Meningeoms. Man erkennt bei dem histologischen Bild Mitosen (M).

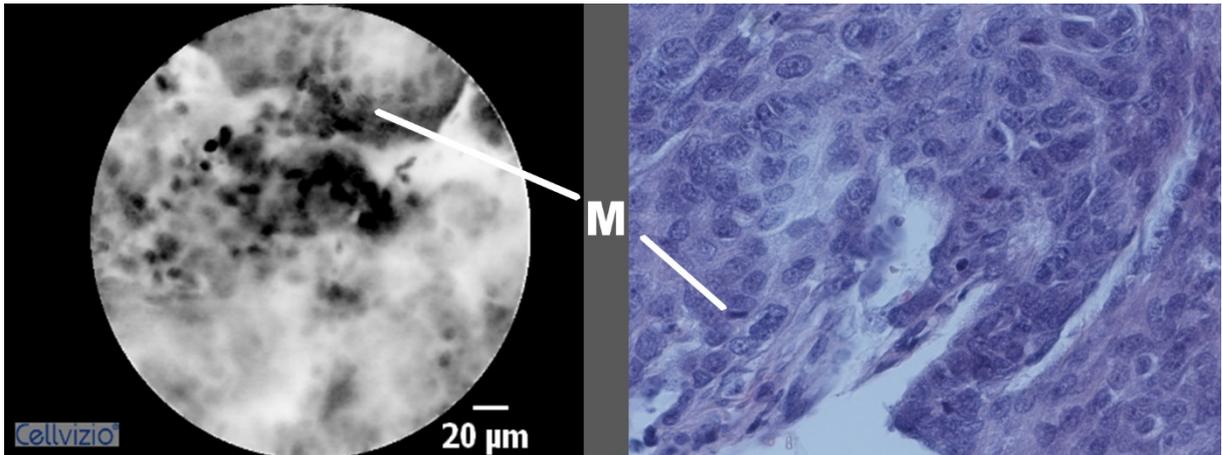


Fig. 20: CLE Bild mit *negate* Filter (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines atypischen Meningeoms. Man kann Mitosen (M) erkennen.

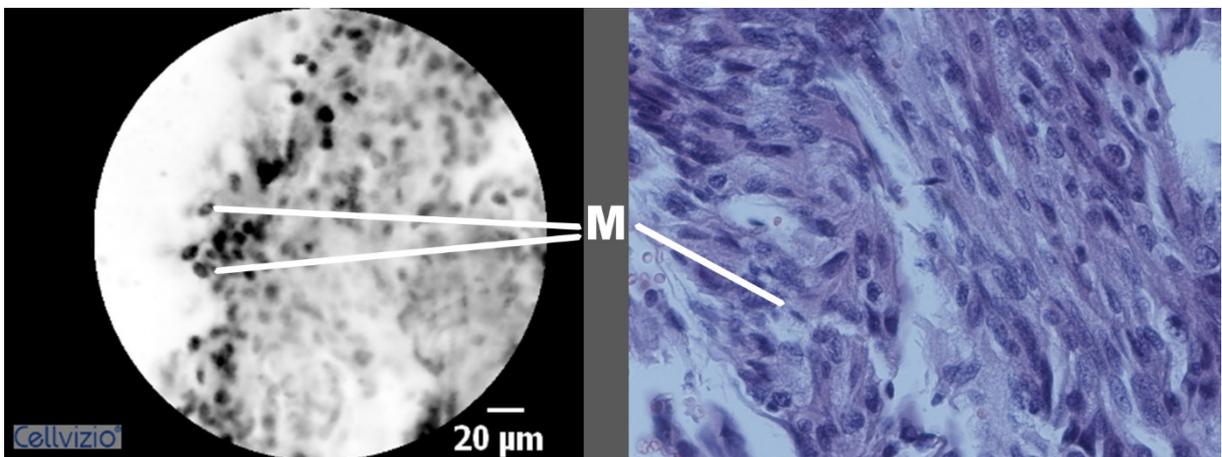


Fig. 21: CLE Bild mit *negate* Filter (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines atypischen Meningeoms. Man kann Mitosen erkennen (M).

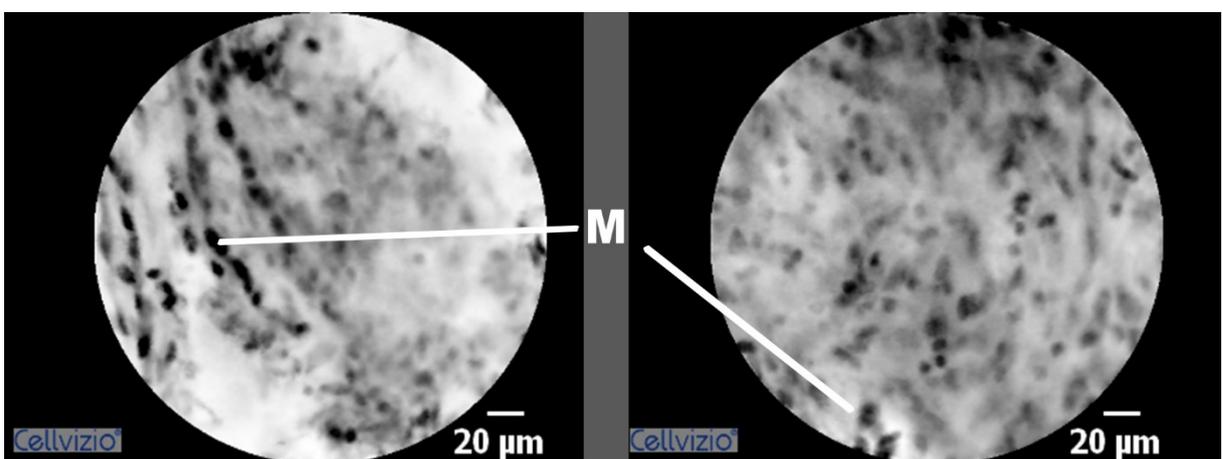


Fig. 22: CLE Bilder mit *negate* Filter eines atypischen Meningeoms. Man kann Mitosen erkennen (M).

Zellform	Oval
Zellkern	Oval
Zellgröße	Leicht unterschiedlich
Zellverteilung im Bild	Gleichmäßig
Zelldichte	Hoch
Zellanordnung	Teils gleichmäßig, teils ohne Struktur
Zellkern- Plasma- Relation	Erhöht
Zellgrenzen	Glatt
Zwiebelschalenformationen	Ja
Psammomkörperchen	Ja
Gefäße	Ja
Mitosen	Ja, viele
Besonderheiten	Keine

Tab. 11: CLE Kriterien eines atypischen Meningeoms.

2. Chordoide Meningeome

Die Namensgebung dieser Tumorart kommt von der histologischen Ähnlichkeit mit Chordomen. Diese werden zu Knochentumoren gezählt, obwohl sie nicht aus Knochengewebe stammen, sondern aus Resten der Chorda dorsalis an den Enden der Wirbelsäule. Das chordoide Meningeom weist zahlreiche Zytoplasmavakuolen, Zellgruppierungen und eine myxoide Struktur, wie beim Chordom auf. Neben massiven lymphoplasmazellulären Infiltraten mit Keimzentren findet man in Lappchen oder Trabekel angeordnete Zellen.

Die chordoiden Meningeome dieser Studie zeigten alle die gleichen Strukturcharakteristika, die man mit dem CLE sehen konnte. Die Zellen dieser Tumorart waren in kleinen Gruppen angeordnet und bildeten so eine myxoide Struktur. Das wichtigste Kriterium dieser Tumorart war das Netz. Dieses resultierte durch das Nebeneinander von großen Zellen mit Zytoplasma Vakuolen und kleinen polygonalen Zellen. Die Zytoplasma Vakuolen waren in der CLE schwarz. Manche Zellen formten Lappchen und Trabekel.

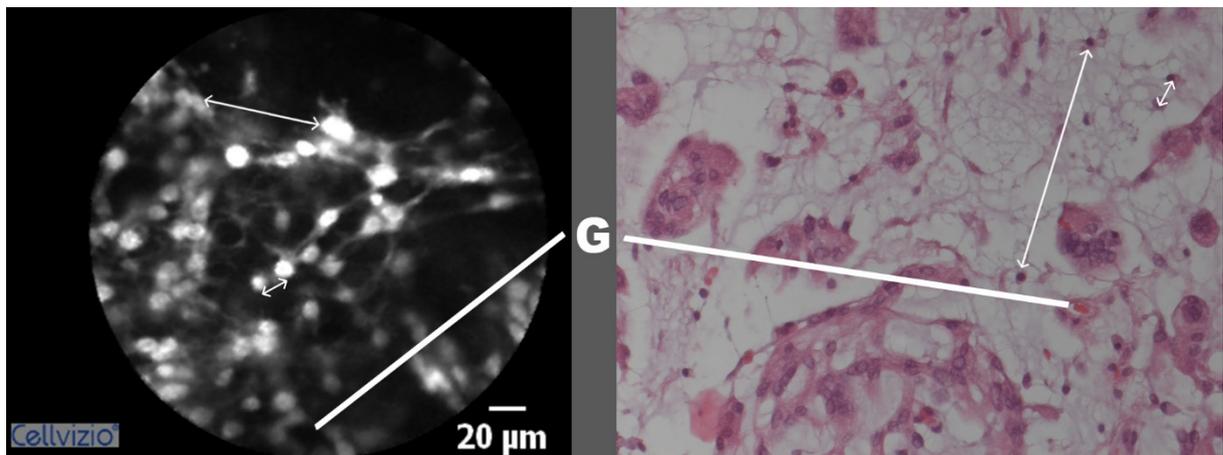


Fig. 23: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines chordoiden Meningeoms. Man beachte die verschiedenen großen Zellabstände (Pfeile). Zusätzlich sieht man vereinzelt Gefäße (G).

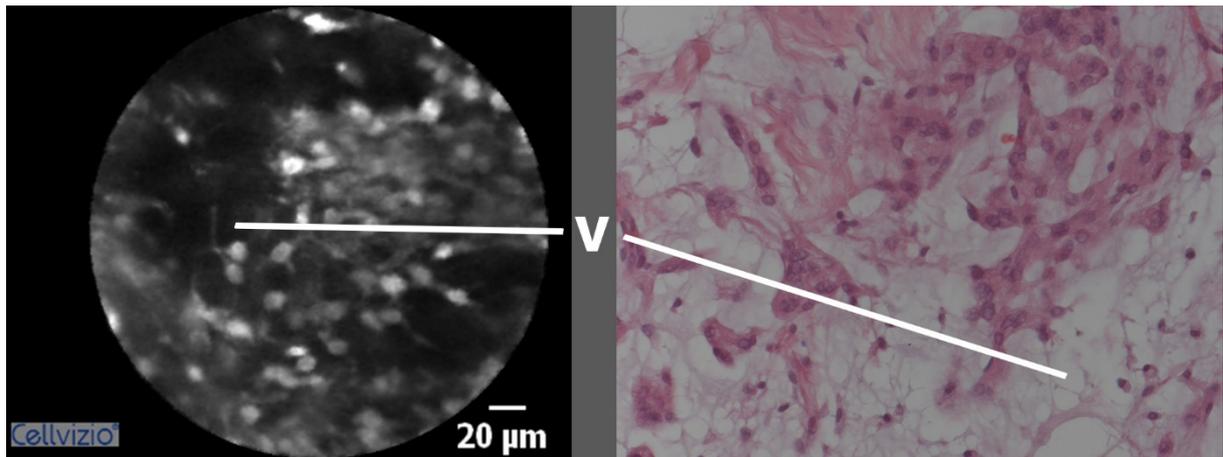


Fig. 24: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines chordoiden Meningeoms. Man sieht die netzförmige Zellanordnung, die durch Vakuolen (V) entsteht. Die Zellen sind in Läppchen und Trabekel angeordnet.

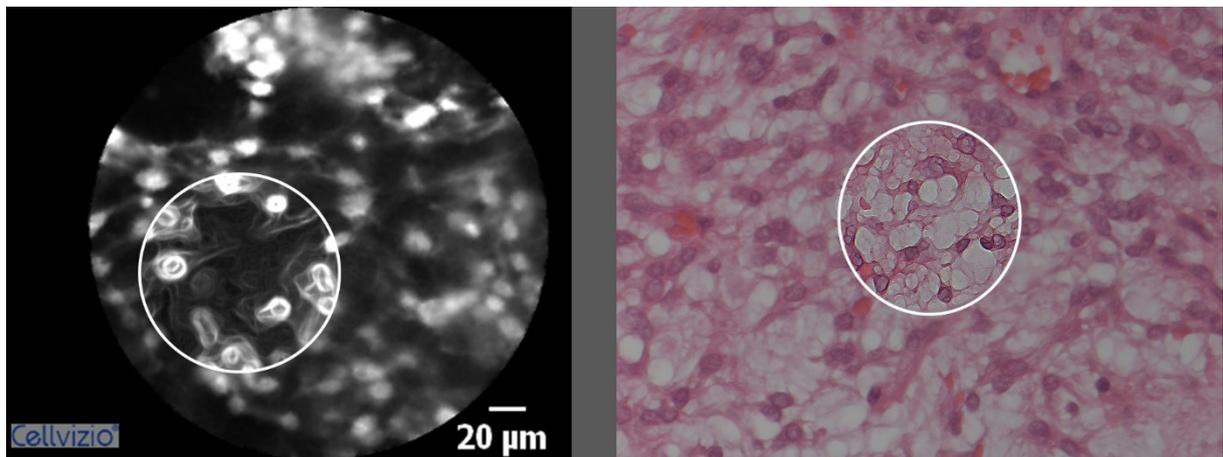


Fig. 25: CLE Bild (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines chordoiden Meningeoms. Zur Verdeutlichung der Netzstruktur wurden hier die Konturen hervorgehoben.

Zellform	Oval
Zellkern	Oval
Zellgröße	Große und kleine Zellen nebeneinander
Zellverteilung im Bild	Ungleichmäßig
Zelldichte	Normal
Zellanordnung	Netzförmig, Lappchen, Trabekel
Zellkern- Plasma- Relation	Erniedrigt
Zellgrenzen	Netzförmig
Zwiebelschalenformationen	Nein
Psammomkörperchen	Nein
Gefäße	Ja
Mitosen	Nein
Besonderheiten	Zytoplasma Vakuolen

Tab. 12: CLE Kriterien eines chordoiden Meningeoms.

3. Klarzellige Meningeome

Die Zellen eines klarzelliges Meningeoms sind polygonal und das Zytoplasma ungefärbt oder schwach eosinophil und glykogenreich. Typisch ist ein unstrukturiertes (*patternless*) Wachstum ohne erkennbares Muster.

Das klarzellige Meningeom kommt sehr selten vor und war daher leider nicht in dem erforschten Patientenkollektiv vorhanden.

c. WHO Grad III Meningeome

1. Anaplastische Meningeome

In der Histologie spricht man von einem anaplastischen Meningeom, wenn eindeutig eine maligne Zytologie, die einem Karzinom, Sarkom oder Melanom entspricht vorzufinden ist oder der Tumor eine sehr stark erhöhte Mitoserate von mindestens 20 Mitosen pro HPF aufweist.

Alle untersuchten Tumorproben des anaplastischen Meningeoms WHO III wiesen in der CLE Technik Bilder auf, die sehr inhomogen und unruhig erschienen. Die Zellen waren größer als bei den Grad I oder Grad II Meningeomen, stellten sich irregulär dar und hatten mehrere Zellkerne. Außerdem wiesen die Tumore eine viel höhere Zelldichte auf. Auch die Zellkernplasma Relation war zugunsten des Zellkerns verschoben, somit waren mehrere Malignitätskriterien erfüllt und in CLE wiederholt sichtbar. Somit konnte man ohne die Mitosen zu zählen anhand der CLE erkennen, dass es ein WHO Grad III Tumor ist.

Um die Mitosen zu finden, wurde erneut der *negate* Filter angewendet und man konnte viel mehr Mitosen als bei dem atypischen Meningeom, der zu WHO Grad II gehört, finden.

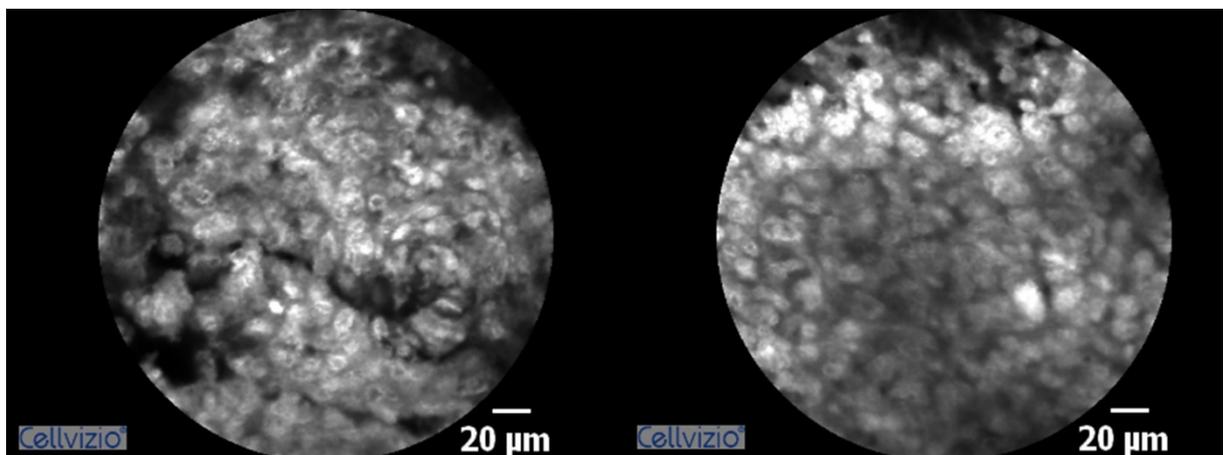


Fig. 24: CLE Bilder eines anaplastischen Meningeoms. Man sieht die viel höhere Zelldichte im Vergleich zu einem meningotheliomatösen Meningeom.

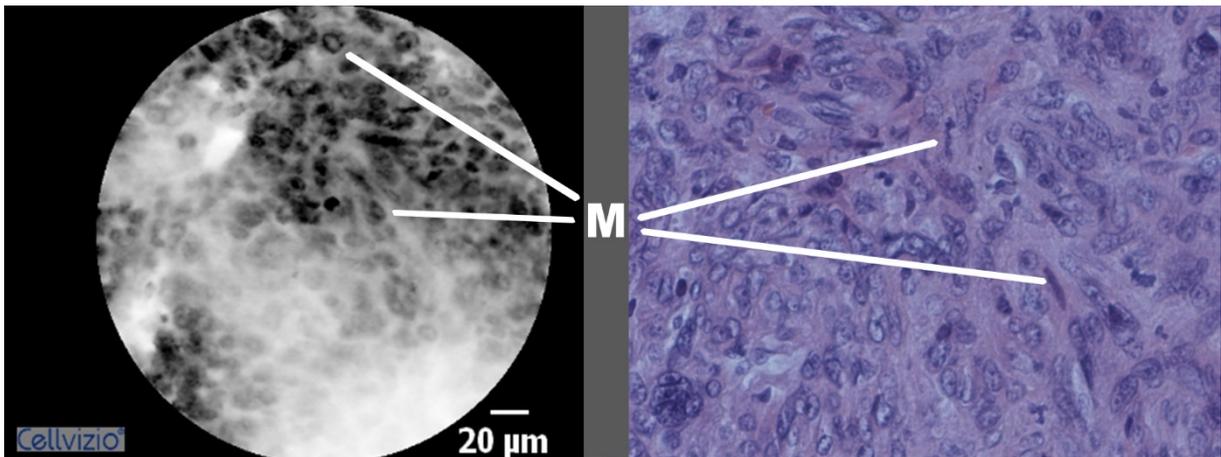


Fig. 25: CLE Bild mit *negate* Filter (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines anaplastischen Meningeoms. Man kann mehrere Mitosen erkennen (M).

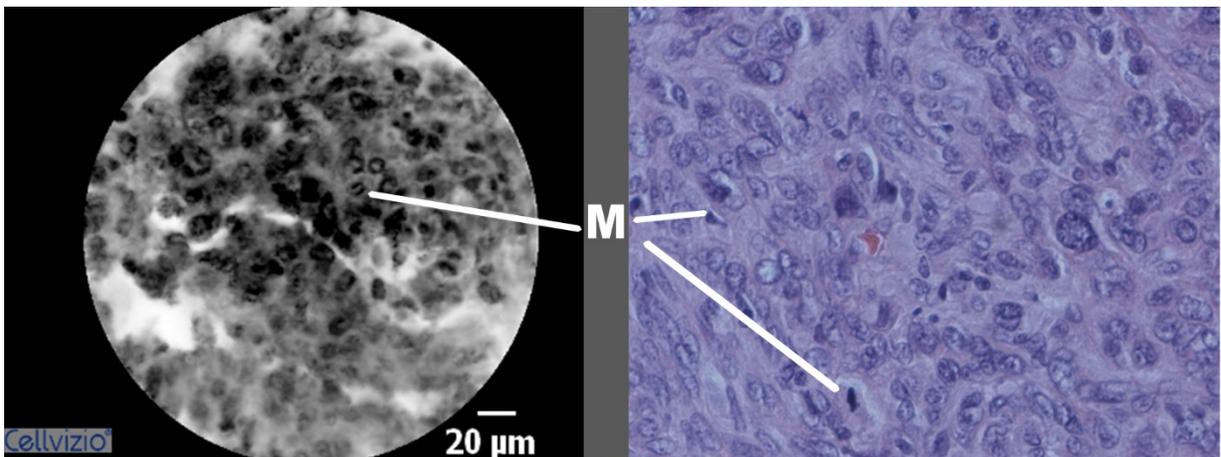


Fig. 26: CLE Bild mit *negate* Filter (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines anaplastischen Meningeoms. Man kann mehrere Mitosen erkennen (M).

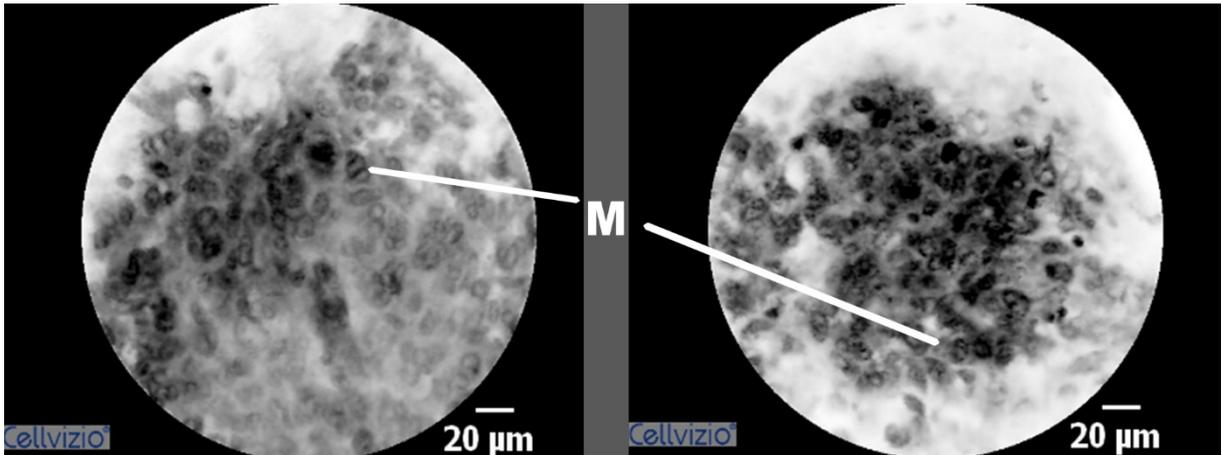


Fig. 27: CLE Bild mit *negate Filter* (links) und das dazu gehörige histologische Bild eines anaplastischen Meningeoms. Man kann mehrere Mitosen erkennen (M).

Zellform	Bizarr geformt, ungleichmäßig
Zellkern	Bizarr geformt, mehrere pro Zelle
Zellgröße	Alle unterschiedlich groß
Zellverteilung im Bild	Ungleichmäßig
Zelldichte	Erhöht
Zellanordnung	Durcheinander
Zellkern- Plasma- Relation	Zu Gunsten des Kerns verschoben
Zellgrenzen	Ungleichmäßig
Zwiebelschalenformationen	Nein
Psammomkörperchen	Nein
Gefäße	Ja
Mitosen	Sehr viele
Besonderheiten	Polynukleäre Zellen

Tab. 13: CLE Kriterien eines anaplastischen Meningeoms.

2. Rhabdoide Meningeome

Diese Art wird aus sogenannten „rhabdoiden“ Zellen gebildet. Diese sind rundliche Tumorzellen mit exzentrischem Kern, prominenten Nukleolen und eosinophilen Einschlüssen aus Intermediärfilamenten. Das rhabdoide Meningeom besitzt einen hohen Proliferationsindex, bildet häufig Anaplasien und Nekrosen.

Unter allen Proben des Patientenkollektivs konnte kein Meningeom dieser Art diagnostiziert werden.

3. Papilläre Meningeome

Dieses Meningeom bildet perivaskuläre pseudopapilläre Strukturen aus und die Zellen besitzen viele Mitosen. Überwiegend Kinder leiden unter dem papillären Meningeom, welches in 75% der Fälle das Gehirn infiltriert und in 20% der Fälle in die Peripherie metastasiert. Über der Hälfte der Patienten versterben an diesem Tumorleiden.

In dem untersuchten Patientenkollektiv litt keiner unter diesem Tumor.

d. CLE Kriterien der verschiedenen Meningeomtypen

	Meningotheliomatös	Fibrös	Transitional	Psammatös	Angiomatös	Mikrozystisch	Atypisch	Chordoid	Anaplastisch
Zellform	Oval	Länglichlich	Teils oval, teils länglich	Oval	Oval	Bipolar	Oval	Oval	Bizarr geformt, ungleichmäßig
Zellkern	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Bizarr geformt, mehrere pro Zelle
Zellgröße	Gleich	Gleich	Gleich im jeweiligen Abschnitt	Gleich	Gleich	Größer	Leicht unterschiedlich	Große und kleine Zellen nebeneinander	Alle unterschiedlich groß
Zellverteilung im Bild	Uniform	Uniform	Uniform	Uniform	Uniform	Uniform	Gleichmäßig	Ungleichmäßig	Ungleichmäßig
Zelldichte	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Hoch	Normal	Erhöht
Zellanordnung	Gleichmäßig nebeneinander	Gleichmäßig parallel angeordnete Zellzüge	Teils gleichmäßig nebeneinander, teils in parallel angeordneten Zellzügen	Meist als Psammomkörperchen	Gleichmäßig nebeneinander	Spongiös	Teils gleichmäßig, teils ohne Struktur	Netzförmig, Läppchen, Trabekel	Durcheinander
Zellkern-Plasma-Relation	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Erhöht	Gesenkt	Zu Gunsten des Kerns verschoben
Zellgrenzen	Glatt	Glatt	Glatt	Glatt	Glatt	Lange Zellausläufer mit dunklen Zwischenräumen	Glatt	Netzförmig	Ungleichmäßig
Zwiebelschalenformationen	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein

Klassifizierung der Meningeome in der Neurochirurgie anhand der konfokalen Laserendomikroskopie

Psammomkörperchen	Ja	Ja	Ja	Sehr viele	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
Gefäße	Ja	Ja	Ja	Ja	Viele	Ja	Ja	Ja	Ja
Mitosen	Nur vereinzelt	Keine gesehen	Ja, viele	Nein	Sehr viele				
Besonderheiten	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Dunkle Zellzwischenräume durch Mucin Einlagerung	Keine	Zytoplasma Vakuolen	Poly-nukleäre Zellen

Tab. 14: CLE Kriterien der verschiedenen Meningeomtypen.

4. Diskussion

In der Neurochirurgie hängt die Zukunft des Patienten, wie in keinem anderen Fach, sehr stark von dem Grad, der Größe und der Lokalisation des Tumors ab. Das Leben nach der Operation wird stark von der Genauigkeit der Entfernung der kranken Zellen, ohne dabei gesundes Hirngewebe zu zerstören, beeinflusst.

Somit ist das Ziel der Forschung in der Neurochirurgie, Verfahren zu entwickeln, welche die Genauigkeit einer Operation am Gehirn immer weiter verbessern.

Um eine möglichst genaue Diagnose während oder spätestens im Anschluss an die Operation zu stellen, werden die Tumorproben an die Neuropathologie geschickt und dort makroskopisch und mikroskopisch untersucht. Zusätzlich werden außerdem zahlreiche immunhistochemische und zytopathologische Verfahren zur besseren Differenzierung der verschiedenen Tumortypen angewendet. Diese Methoden sind ziemlich genau, doch bei einigen Tumoren gelingt die Einordnung zu den einzelnen Meningeomtypen trotz kombinierter histologischer Untersuchungsverfahren sehr schwer.

Um eine möglichst schnelle Diagnose während der Operation zu stellen, wird der Schnellschnitt angewandt. Dieser ist aufgrund der zeitlichen und technischen Limits oft ungenau.²³

Die große Frage ist: Kann man eine neue Methode etablieren, um einen Tumor so weit einzuschätzen, dass man durch sie an eine Diagnose gelangt um den weiteren Operationsablauf noch in derselben Sitzung anpassen zu können?

Wichtig sind dabei selbstverständlich die Reproduzierbarkeit und die praktische Durchführung dieser Methode während der Operation. Außerdem sollen bei jeder neu entwickelten Technik keine Schäden an dem Patienten entstehen.

Solch eine Methode scheint die CLE zu sein.^{26,6,10,12,7,8,4,27}

Bei dieser Arbeit wurde mit Hilfe der CLE an einer Klassifikation gearbeitet für eine der häufigsten Art der nicht hirneigenen Tumore, der Meningeome. Das Ziel dabei war, mit Hilfe dieser Klassifikation während der Operation den gerade operierten Tumor so weit einzuordnen, dass nicht nur die Diagnosefindung erreicht werden kann, sondern auch die Entfernung auf der zellulären Ebene optimiert werden kann.

Nach dem Sammeln der Tumorproben wiesen 115 Patienten Meningeome auf und von den insgesamt 15 existierenden Typen waren neun vorhanden, die auch die häufigsten Vertreter unter den Meningeomen inkludieren.

Die WHO Grad I Tumore wiesen bei der CLE Auswertung die gleichen Charakteristika wie in der klassischen neuropathologischen Untersuchung auf. Nach dem Durchmustern von den Schnittflächen und dem gezielten Suchen von bestimmten Strukturen, konnte man den Tumor sehr einfach einordnen. So konnte man die WHO Grad I Tumore an der gleichmäßigen Zellverteilung und der typischen Zellform erkennen. Man sah keine oder nur sehr wenige Mitosen und pleomorphe Zellen. Genauso wie in der klassischen pathologischen Auswertung waren bei den Grad I Tumoren auch mit der CLE keine Malignitätskriterien zu finden. Dafür sah man Zwiebelschalenformationen und Psammomkörperchen sehr gut auch in der CLE-Technik.

Bei dem psammomatösen Meningeom konnte man so viele Psammomkörperchen finden, dass ganze CLE Bilder davon ausgefüllt waren. Das korrelierte auch mit dem histologischen Bild. Entsprechend dieser Methode waren in einem angiomatösen Meningeom zahlreiche Gefäße zu sehen, auch diese bedeckten mit ihrem Lumen ganze CLE Bilder.

Sehr gut konnte man auch das fibröse Meningeom einordnen, da man in der CLE die parallel angeordneten gleichmäßigen Zellen sehen konnte.

Die Einordnung zu einem transitionalen Meningeom geschah wie in der Histopathologie. Man sah die Komponenten sowohl von einem meningo-theliomatösen als auch von einem fibrösen Meningeomen.

Sehr spezifisch war die Struktur bei einem mikrozystischen Meningeom mit den sternförmigen Zellen zu sehen, die mit ihren langen Ausläufern schwammartige Strukturen bildeten.

Somit waren bei den WHO Grad I Meningeomen die histopathologischen Kriterien auf die CLE Technik übertragbar. Zusätzlich konnte man viele Strukturen, wie die Psammomkörperchen oder Gefäße, in der CLE durch Variation an der Tiefe während der Videoaufnahmen dreidimensional darstellen.

Die größere Herausforderung bestand darin, die atypischen Meningeome einzuordnen. Da in dem Patientenkollektiv alle atypischen Meningeome über die Mitosendichte eingeordnet wurden, musste man das entsprechende Werkzeug in der CLE finden. Mit dem *negate* Filter der Systemsoftware sah man die meisten Mitosen und es waren in allen Tumoren von diesem Typ eine ähnliche Dichte von Mitosefiguren festzustellen. Im Gegensatz dazu waren bei den WHO Grad I Meningeomen mit derselben Methode keine oder nur einzelne Mitosen zu finden. Gleichzeitig lieferten manche der atypischen Meningeome ein unruhigeres Bild, als die meningotheliomatösen Tumore.

Das chordoide Meningeom war wiederum einfacher einzuordnen. Wie auch in den entsprechenden Histologie Bildern waren auch in den Bildern, die mit Hilfe der CLE entstanden sind, verschieden große ungleichmäßige Zellen mit Zytoplasma Vakuolen zu sehen. Sie bildeten ein netzförmiges Muster, Lämpchen und Trabekel.

Auch bei dem anaplastischen Meningeom, das zu WHO Grad III gehört, ging es darum, Mitosefiguren zu finden und deren Häufigkeit einzuordnen. Hier waren viel mehr Mitosen als bei den WHO Grad II Tumoren sichtbar. Genauso wie in der klassischen Pathologie konnte man polynukleäre Zellen sehen, die alle unregelmäßig geformt waren und eine viel höhere Zelldichte aufwiesen. Somit konnte man eindeutige Zeichen der Malignität mit Hilfe der CLE finden.

Erwähnenswert sind auch die Rahmenbedingungen beim Arbeiten mit der CLE. Die Untersuchung der einzelnen Sequenzen und das Aufnehmen der Videos waren einfach durchzuführen und beliebig oft, mit gleichen Ergebnissen, wiederholbar. Die Technik war schnell zu erlernen. Die Hirnzellen bekamen davon keinen Schaden und man benötigte keine zusätzlichen Schnitte oder Zugänge. Diese Apparatur beanspruchte nicht viel Platz und passte auch in die gängigen Operationssäle der Neurochirurgie.

Diese Studie wurde *ex vivo* mit Tumorproben durchgeführt. Im Moment arbeiten wir an einer Klassifikation *in vivo* während einer Operation, um die Ergebnisse mit den späteren Schnellschnitt- und histopathologischen Ergebnissen zu vergleichen, um direkt auf zellulärer Ebene effektiver operieren zu können.

Wir können entsprechend dem Schnellschnitt mit dieser Technik in Zusammenarbeit mit der Neuropathologie eine bessere Diagnosesicherheit intraoperativ erzielen. Dafür

haben wir eine Videoübertragung in Echtzeit in das zugehörige Pathologielabor hergestellt, um sich zeitgleich mit dem Kollegen dort auszutauschen und die Diagnose gemeinsam zu finden. In dem Moment, wo man mit der konfokalen Sonde den intraoperativen Situs abscannen kann und man nicht auf eine subjektiv entnommene Probe des Chirurgen angewiesen ist, ist die Wahrscheinlichkeit, effektiver zu diagnostizieren und gezielter nur Tumor zu entfernen und das gesunde Gehirn zu schonen, viel größer.

Sehr interessant wird dabei auch das Thema der Fluorophore sein. Dabei kristallisieren sich zwei Fragestellungen: Welcher Farbstoff ist für *in vivo* Untersuchungen ideal? Und welcher wäre am besten, um Mitosen zu zählen, um optimal die Meningeome den WHO Graden einzuteilen?

Die in Frage kommenden Farbstoffe, außer AF (Acriflavin Hydrochlorid), sind die sogenannten SYTO und YOYO-1, diese wurden aber noch nicht in Verbindung mit der CLE getestet. Zusätzlich könnte man Farbstoffe benutzen, die Tubulin markieren, wie zum Beispiel Octadecyl Rhodamine B Chloride und Fluorescein. Letzterer wurde schon *in vivo* bei Menschen angewendet⁹, wobei die Ergebnisse nicht so ideal, was die Darstellung der Zytoarchitektur anbelangt, waren. Außerdem wäre der Farbstoff Indocyaningrün (ICG) für *in vivo* Untersuchungen geeignet, da es kaum Nebenwirkungen beim intraoperativen Einsatz beim Menschen zeigt und es auch für die Neurochirurgie zugelassen ist. Die erste klinische Studie zur Untersuchungen der Operabilität der Meningeome mit der CLE-Technik läuft schon in der Neurochirurgie Klinikum Merheim und liefert sehr vielversprechende Ergebnisse.

Zusätzlich wird auch eine Fragestellung bezüglich der Mitoserate entsprechend der WHO Kriterien zu lösen sein. Ab wie viele Mitosen und in welchem Feld wird man von einem WHO Grad II oder Grad III Meningeom in der CLE sprechen können?

Und natürlich wäre es sehr spannend, die seltenen Meningeome, die nicht in dem zur Verfügung stehenden Patientenkollektiv zu finden waren, mit der CLE zu untersuchen und die entsprechenden Eigenschaften zu entdecken um sie in diese Klassifikation einfließen zu lassen.

5. Bemerkungen

Teile dieser Dissertation werden als Manuskript zusammengefasst und in nächster Zeit als Publikation freigegeben werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Widhalm G, Wolfsberger S, Minchev G, Woehrer A, Krssak M, Czech T, Prayer D, Asenbaum S, Hainfellner JA, Knosp E.** 5-Aminolevulinic acid is a promising marker for detection of anaplastic foci in diffusely infiltrating gliomas with nonsignificant contrast enhancement. *Cancer*. 15. März 2010, Bd. 116, 6, S. 1545-1552.
2. **Wirth D, Snuderl M, Sheth S, Kwon CS, Frosch MP, Curry W, Yaroslavsky AN.** Identifying brain neoplasms using dye-enhanced multimodal confocal imaging. *Journal of Biomedical Optics*. Februar 2012, Bd. 17, 2.
3. **Senft C, Seifert V.** Intraoperative Magnetresonanztomografie in der Gliomchirurgie – Wo stehen wir heute? *Neurochirurgie Scan*. 2015, Bd. 3, 1, S. 63-74.
4. **Kiesslich R, Burg J, Vieth M, Gnaendiger J, Enders M, Delaney P, Polglase A, McLaren W, Janell D, Thomas S, Nafe B, Galle PR, Neurath MF.** Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology*. 2004, Bd. 127, 3, S. 706-713.
5. **Wu K, Liu JJ, Adams W, Sonn GA, Mach KE, Pan Y, Beck AH, Jensen KC, Liao JC.** Dynamic Real-time Microscopy of the Urinary Tract Using Confocal Laser Endomicroscopy. *Urology*. Juli 2011, Bd. 78, 1, S. 225-231.
6. **Carlson K, Pavlova I, Collier T, Descour M, Follen M, Richards-Kortum R.** Confocal microscopy: Imaging cervical precancerous lesions. *Gynecologic Oncology*. Dezember 2005, Bd. 99, 3, S. 84-88.
7. **Lane PM, Lam S, McWilliams A, Leriche JC, Anderson MW, Macaulay CE.** Confocal fluorescence microendoscopy of bronchial epithelium. *Journal of Biomedical Optics*. März - April 2009, Bd. 14, 2.
8. **Linxweiler M, Kadah BA, Bozzato A, Bozzato V, Hasenfus A, Kim YJ, Wagner M, Igressa A, Schick B, Charalampaki P.** Noninvasive histological imaging of head and neck squamous cell carcinomas using confocal laser endomicroscopy. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. Dezember 2016, Bd. 273, 12, S. 4473-4483.
9. **Martirosyan NL, Eschbacher JM, Kalani MY, Turner JD, Belykh E, Spetzler RF, Nakaji P, Preul MC.** Prospective evaluation of the utility of intraoperative confocal laser endomicroscopy in patients with brain neoplasms using fluorescein sodium: Experience with 74 cases. *Neurosurgical Focus*. März 2016, Bd. 40, 3.
10. **Charalampaki P, Javed M, Daali S, Heiroth HJ, Igressa A, Weber F.** Confocal Laser Endomicroscopy for Real-time Histomorphological Diagnosis: Our Clinical Experience With 150 Brain and Spinal Tumor Cases. *Neurosurgery*. August 2015, Bd. 62, Beiheft 1, S. 171-176.
11. **Kamen A, Sun S, Wan S, Kluckner S, Chen T, Gigler AM, Simon E, Fleischer M, Javed M, Daali S, Igressa A, Charalampaki P.** Automatic Tissue Differentiation Based on Confocal Endomicroscopic Images for Intraoperative Guidance in Neurosurgery. *BioMed Research International*. 18. Januar 2016, Bd. 2016.

12. **Foersch S, Heimann A, Ayyad A, Spoden GA, Florin L, Mpoukouvalas K, Kiesslich R, Kempfski O, Goetz M, Charalampaki P.** Confocal Laser Endomicroscopy for Diagnosis and Histomorphologic Imaging of Brain Tumors In Vivo. *PLoS One*. 24. Juli 2012, Bd. 7, 7, S. 1-11.
13. **Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, O'Fallon WM, Sunku J, Kurland LT.** The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Annals of Neurology*. Januar 1995, Bd. 37, 1, S. 67-73.
14. **Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A.** *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2016.
15. **Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H.** Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *Journal of Neurosurgery*. Oktober 1992, Bd. 77, 4, S. 616- 623.
16. **Schnitt SJ, Vogel H.** Meningiomas. Diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. *The American Journal of Surgical Pathology*. September 1986, Bd. 10, 9, S. 640-649.
17. **Menke JR, Raleigh DR, Gown AM, Thomas S, Perry A, Tihan T.** Somatostatin receptor 2a is a more sensitive diagnostic marker of meningioma than epithelial membrane antigen. *Acta Neuropathologica*. September 2015, Bd. 130, 3, S. 441-443.
18. **Mawrin C, Perry A.** Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *Journal of Neuro-Oncology*. 2010, Bd. 99, 3, S. 379-391.
19. **Zang KD.** Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 2001, Bd. 93, 3-4, S. 207-220.
20. **Lekanne Deprez RH, Bianchi AB, Groen NA, Seizinger BR, Hagemeyer A, van Drunen E, Bootsma D, Koper JW, Avezaat CJ, Kley N, et al.** Frequent NF2 Gene Transcript Mutations in Sporadic Meningiomas and Vestibular Schwannomas. *The American Journal of Human Genetics*. Juni 1994, Bd. 54, 6, S. 1022-1029.
21. **Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, et al.** Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *The American Journal of Pathology*. April 1995, Bd. 146, 4, S. 827-832.
22. **Louis DN, Ramesh V, Gusella JF.** Neuropathology and Molecular Genetics of Neurofibromatosis 2 and Related Tumors. *Brain Pathology*. April 1995, Bd. 5, 2, S. 163-172.
23. **Tofte K, Berger C, Torp SH und O, Solheim.** The diagnostic properties of frozen sections in suspected intracranial tumors: A study of 578 consecutive cases. *Surgical Neurology International*. 2014, Bd. 5, 170.
24. **Tonn JC, Westphal M, Rutka JT.** *Oncology of CNS Tumors*. Berlin, Springer-Verlag, 2010.

25. **Alguacil-Garcia A, Pettigrew NM, Sima AA.** Secretory Meningioma: A Distinct Subtype of Meningioma. *The American Journal of Surgical Pathology*. Februar 1986, Bd. 10, 2, S. 102-111.

26. **Polglase AL, McLaren WJ, Skinner SA, Kiesslich R, Neurath MF, Delaney PM.** A fluorescence confocal endomicroscope for in vivo microscopy of the upper- and the lower-GI tract. *Gastrointestinal Endoscopy*. November 2005, Bd. 62, 5, S. 686–695.

27. **Katherine Wu, Jen-Jane Liu, Winifred Adams, Geoffrey A. Sonn, Kathleen E. Mach, Ying Pan, Andrew H. Beck, Kristin C. Jensen, and Joseph C. Liao.** Dynamic Real-time Microscopy of the Urinary Tract Using Confocal Laser Endomicroscopy. *Urology*. 23. May 2011, S. 225-231.

7. Danksagung

Diese Doktorarbeit ist nur mit Hilfe toller, zuverlässiger und fleißiger Menschen möglich gewesen. Die experimentellen Arbeiten sind in dem Klinikum Köln Merheim dank zahlreichen Einsätzen der Neurochirurgen, des Operationsteams und der Pathologen erstanden. Mein großer Dank gebührt allen Patienten, die sich zur Verfügung gestellt haben um die Forschung voran zu bringen und so den Patienten in der Zukunft die Hoffnung auf eine noch bessere medizinische Versorgung geben können.

Persönlich gilt mein größter Dank meiner Betreuerin, Prof. Dr. Cleopatra Charalampaki für die fachliche und menschliche Unterstützung. In der Zeit unserer Zusammenarbeit ist etwas so Wunderbares passiert und ich freue mich vom ganzen Herzen für euch. Du bist mein Vorbild, der sowohl persönlich als auch auf der Arbeit so unglaublich viel leisten kann.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jürgen Schlegel, Direktor am Institut für Neuropathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München, für die fachlichen Ideen, Hilfestellungen und die konstruktiven Vorschläge bei der Korrektur dieser Arbeit.

Danke an Dr. Maximilian Linxweiler und Dr. Tobias Blau für die Erstellung der zusätzlich von mir benötigten histopathologischen Bilder.

Danken möchte ich außerdem meinen Kolleginnen aus der Forschungsgruppe, Mehreen Javed und Samira Daali für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Es ist mir eine große Freude endlich die Möglichkeit zu haben, schriftlich allen zu danken, die mich unterstützt haben und ohne deren Hilfe ich niemals so weit gekommen wäre oder so viel Lebensfreude hätte. Es sind die Menschen, die mir die größten Freuden schenken, aber mir auch in schwierigsten Lebenssituationen zur Seite stehen.

Als erstes danke ich meinen Eltern Liudmila und Mikhail Movshovich. Unter anderem dafür, dass sie alles aufgegeben haben um ihren Kindern eine gesicherte Zukunft voller Möglichkeit in einem neuen Land zu schenken.

Danke David Kerkmann für die Liebe, den unerschütterlichen Glauben und die Unterstützung in jeder Situation.

Danke meine lieben Freunde Jenny Gorenstein und Bronislav Zinkovskiy, Verena Bergs, Stefanie Botschen, Anja Stumpf, Swetlana Dorochina, Ilja Kagan, Ira Ottmann, Olga Mavasheva und meine Schwester Vera Peters für das Wissen, dass ich jederzeit bei jedem Problem mich an euch wenden kann.