

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

Quantifizierung des 5-ALA basierten Fluoreszenzsignals  
von infiltrierter Dura bei Meningeomen

Dissertation

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

vorgelegt von  
Johannes Knipps  
2018

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Jan F. Cornelius

Zweitgutachter: PD Dr. Rüdiger Sorg

# Widmung

Die Zukunft soll man nicht voraussehen wollen, sondern möglich machen.

*Antoine de Saint-Exupéry*

Diese Arbeit widme ich LMN.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

*Title:* **Knipps, J.**, et al., Fluorescence Behavior and Dural Infiltration of Meningioma Analyzed by 5-Aminolevulinic Acid-Based luorescence: Operating Microscope Versus Mini-Spectrometer. *World Neurosurg*, 2017. **108**: p. 118-127.

# Zusammenfassung

Die neurochirurgische Exstirpation gilt heute als leitlinien-gerechte Therapie des Meningeoms. Problematisch sind die im Verlauf auftretenden Rezidive dieser in der Mehrheit benignen (> 90%) Raumforderungen. Diese Rezidive bilden sich nach aktueller Lehrmeinung am ehesten aus nicht resezierten, *in situ* verbliebenen Meningeomzellen. Eine direkte Wechselbeziehung zeigte sich zwischen der Radikalität der durchgeführten Tumorexstirpation, die nach der Simpson-Klassifikation eingeteilt wird, und dem rezidivfreien Überleben des Patienten. Aus diesem Grund sollte grundsätzlich eine möglichst radikale operative Tumorexstirpation angestrebt werden. Zur Sicherstellung dieser Radikalität und zeitgleicher sicherer und risikobewusster Resektion wurde das Verfahren der Fluoreszenzgestützten Resektion (FGS), welches in der operativen Therapie maligner Gliome bereits erfolgreich etabliert ist, in mehreren Studien auch bei Meningeomresektionen erfolgreich eingesetzt. Die FGS wird mit Hilfe eines speziellen Operationsmikroskops *in vivo* durchgeführt. Dabei wird dem Patienten präoperativ 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) verabreicht, ein körpereigenes Porphyrinderivat, welches insbesondere in Tumorzellen akkumuliert und dort zu fluoreszierendem Protoporphyrin IX (PPIX) metabolisiert wird. Aktuell erfolgt die Bewertung der Fluoreszenzintensität mit Hilfe eines Operations-Mikroskops semiquantitativ und rein subjektiv durch den Chirurgen. Diese Methode erreicht insbesondere im Randbereich eines Meningeoms ihre Grenzen, wo sich regelmäßig eine Tumordinfiltration in der zirkulär umgebenden Dura mater vorfinden lässt. Durch die Entwicklung von spektrometrischen Methoden konnte sowohl die Sensitivität erhöht als auch eine quantitative und objektive Beurteilung erreicht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Verwendung dieser spektrometrischen Methode in der problematischen Randzone von zerebralen Meningeomen differenzierter untersucht werden. Zunächst sollte die tumorbedingte Fluoreszenz durch ein Operations-Mikroskop (FGS) beurteilt und anschließend durch ein Spektrometer mit Fiberoptik gemessen werden. Diese beiden optischen Methoden wurden durch eine histopathologische Untersuchung der entsprechenden Gewebereiche ergänzt.

Im Gegensatz zur FGS mit einer Sensitivität von 53 %, zeigte sich eine deutliche Überlegenheit bei der Messung der Fluoreszenzintensität mittels Spektrometer (Sensitivität 93%). Überdies war es möglich, eine Korrelation zwischen dem Grad der Tumordinfiltration der Dura mater und der gemessenen Fluoreszenzintensität abzubilden.

Schlussendlich ist das zusätzliche Heranziehen der Spektrometer-Fiberoptik-Einheit zur Tumordetektion als sehr positiv zu bewerten. Mittels reiner FGS, der *herkömmlichen Methode*, wurde mehr als die Hälfte der analysierten Tumorproben, die von Tumorzellen infiltriert waren, als falsch-negativ beurteilt. Dies ist im Hinblick auf mögliche Rezidivraten als höchst problematisch zu beurteilen. Mit dem Ziel den Grad der Resektion zu steigern, lässt sich daraus die Idee ableiten, zukünftig auch intraoperativ eine solche spektrometrische Fiberoptik-Einheit zu verwenden. Dies würde eine unkomplizierte, sichere und auch schnelle *in-vivo*-Analyse des Gewebes ermöglichen. Des Weiteren besteht hierdurch möglicherweise die Chance die Rezidivraten durch gezieltere Resektionen zu senken.

## Summary

For now neurosurgical extirpation is the chosen guideline-based treatment of meningiomas. The recurrence rate of these predominantly benign (> 90%) lesions is particularly problematical. According to current doctrine, these recurrences are most likely to be formed from unresected, in situ remaining meningioma cells. A direct correlation was found between the thoroughness of tumor extirpation, as graded by Simpson, and the recurrence-free survival of the patient. This is why the most rigorous possible surgical tumor extirpation is recommended. A fluorescence-guided resection method (FGS) which has already been successfully established in the surgical treatment of malignant gliomas and has also been favorably applied in meningioma resections in several studies, ensures a rigorous but also safe and risk-aware resection. The FGS is performed *in vivo* using a special surgical microscope. Preoperatively the patient is given 5-aminolevulinic acid (5-ALA), an endogenous porphyrin derivative which accumulates in tumor cells and is metabolized to fluorescent protoporphyrin IX (PPIX). Currently, the evaluation of the fluorescence intensity when using a surgical microscope is carried out by the surgeon and is semi quantitative and purely subjective. This method has its limits, especially in the periphery of a meningioma where tumor infiltration in the circularly surrounding dura mater is frequently found. The development of spectrometric methods has increased sensitivity and achieved quantitative and objective assessments.

In the context of this paper, use of the spectrometric method in this problematic peripheral zone of cerebral meningiomas should be investigated in a more differentiated manner. First tumor-induced fluorescence should be examined under a surgical microscope (FGS) and then measured by a fiber optic spectrometer. These two optical methods should be supplemented by a histopathological examination of the corresponding tissue areas.

Measurement of the fluorescence intensity by means of a spectrometer (sensitivity 93%) was shown to be clearly superior to the FGS with 53% sensitivity. It was also possible to establish a correlation between the degree of tumor infiltration of dura mater and measured fluorescence intensity.

In conclusion, the additional use of the fiber optic spectrometer tumor detection unit can be rated as very positive. By using the conventional FGS method more than half of the analyzed tumor samples infiltrated by tumor cells were assessed as false-negative. In view of the possible recurrence rates this must be considered extremely problematical. It is possible to envisage that in future the fiber optic spectrometric unit will also be used intraoperatively with aim of increasing the resection degree. This would facilitate a swift, safe and uncomplicated *in vivo* analysis of the tissue. Furthermore, it could possibly reduce the chances of recurrence through more targeted resections.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ABCB6</b>	<i>ATP binding cassette subfamily B member 6</i>
<b>ALA/ 5-ALA</b>	5-Aminolävulinsäure
<b>ASA</b>	<i>American Society of Anesthesiologists</i>
<b>a.u.</b>	<i>arbitrary units</i>
<b>AUC</b>	<i>area under the curve</i>
<b>CBRTUS</b>	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>EMA</b>	Epitheliales Membran-Antigen
<b>Fe</b>	Eisen
<b>FGS</b>	<i>Fluorescence guided surgery</i>
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>Mg</b>	Magnesium
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>ms</b>	Millisekunde
<b>NF-2</b>	Neurofibromatose Typ 2
<b>nm</b>	Nanometer
<b>PBG</b>	Porphobilinogen
<b>PBG-D</b>	Porphobilinogen-Desaminase
<b>PDD</b>	Photodynamische Diagnostik
<b>PDT</b>	Photodynamische Therapie
<b>PPIX</b>	Protoporphyrin IX
<b>ROC</b>	<i>Receiver operating characteristic</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organisation</i>
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Meningeome	1
1.1.1	Zusammenfassung	1
1.1.2	Ätiologie und Epidemiologie	1
1.1.3	Diagnostik	2
1.1.4	Symptome	3
1.1.5	Histologie	4
1.1.6	Therapie	5
1.1.7	Prognose	6
1.2	5-ALA	7
1.2.1	5-ALA Eigenschaften	7
1.2.2	Häm-Biosynthese in physiologischen Zellen	7
1.2.3	Häm-Synthese in pathologischen Zellen (Tumorzellen)	8
1.2.4	5-ALA als Photosensibilisator	9
1.3	Ziel der Arbeit	11
<b>2</b>	<b>Publizierte Originalarbeit</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>22</b>
3.1	Kalibration des Spektrometers	22
3.2	Perioperative Tumorkartierung	22
3.3	<i>In vivo</i> - versus <i>ex vivo</i> -Fluoreszenz-Messung	23
3.4	Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von infiltrierter Dura Mater	26
3.5	Störfaktoren der Fluoreszenzintensitätsmessung	27
3.6	Limitation	30
3.7	Zukunftsperspektiven	31
3.8	Schlussfolgerungen	32
<b>4</b>	<b>Verzeichnisse</b>	<b>33</b>
4.1	Literatur- und Quellenverzeichnis	33
4.2	Abbildungsverzeichnis	37
4.3	Tabellenverzeichnis	37
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>38</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Meningeome

### 1.1.1 Zusammenfassung

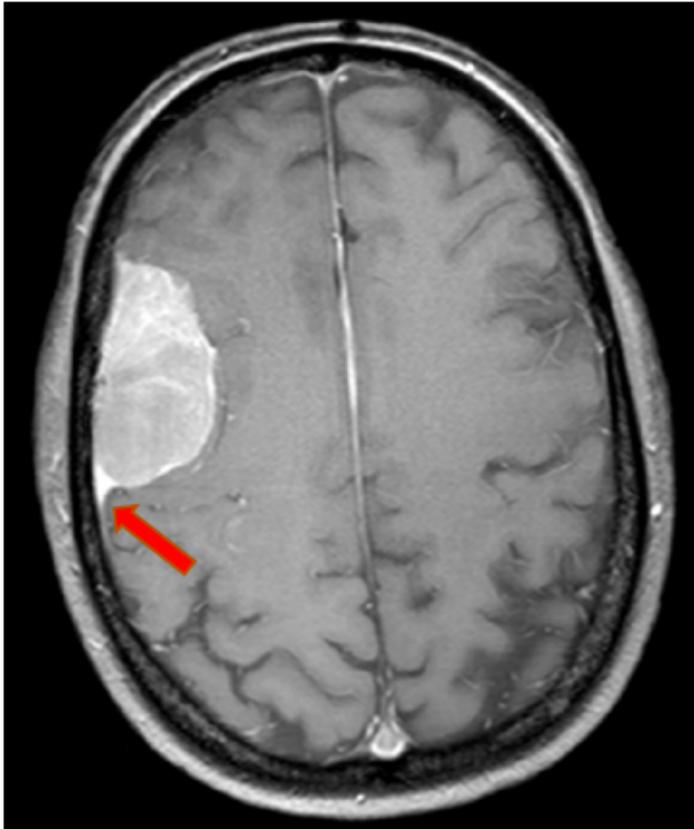
Etwa 20 bis 25 % aller primären Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) sind Meningeome [1]. Sehr oft wachsen diese Tumore langsam, sind zu über 90 % benigne und entwickeln sich aus entarteten Deckzellen der Arachnoidea [1, 2]. Durch Infiltration zerebraler Strukturen oder durch einen durch das Größenwachstum resultierenden Verdrängungsprozess kann ein neurologisches Defizit auftreten. Wegen der lokalisationsabhängigen Symptome können allerdings keine spezifischen Meningeom-Symptome definiert werden. Bei benignen, R0-resezierten Meningeomen ist die Chance auf Heilung für den Patienten sehr hoch, wohingegen subtotal resezierte bzw. vom Malignitätsgrad höher klassifizierte Meningeome häufig zu Rezidiven neigen [1-5].

### 1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Daten aus der *Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS)* geben Auskunft darüber, dass das Risiko, an einem Meningeom zu erkranken, für Frauen etwa zwei Mal höher ist als für Männer. Die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung und Diagnosestellung eines Meningeoms erhöht sich mit dem Alter, ein Häufigkeitsgipfel wird im Alter von 45 Jahren beobachtet [1, 2, 6]. Einige Studien weisen immer wieder auf diverse Risikofaktoren wie zerebrale Traumata, ionisierende Strahlung und weibliche Sexualhormone hin [1, 7]. Weitere Studien, die einen möglichen Zusammenhang zwischen Handynutzung und Inzidenz von Meningeomen untersuchten, zeigten bisher keinen statistisch signifikanten Zusammenhang oder gar eine Kausalität [8, 9]. In verschiedenen Studien wurde aufgezeigt, dass Patienten mit bekannter Neurofibromatose 2 (NF-2) ein gehäuftes Auftreten von Meningeomen zeigen [10].

### 1.1.3 Diagnostik

Die Magnetresonanztomographie (MRT) hat sich noch vor der Computertomographie (CT) als bildgebendes Diagnostikum der Wahl bei Meningeomen herausgestellt [3]. Zudem wurde in der Vergangenheit oft die Angiographie eingesetzt, die heutzutage allerdings nur noch sehr selten, insbesondere bei speziellen Fragestellungen zur Tumervaskularisation, angewendet wird [11, 12]. Aufgrund der hohen Auflösung, Verzicht von ionisierender Strahlung und der exzellenten Darstellung von Weichteilstrukturen hat sich die MRT als Standard der Meningeomdiagnostik etabliert. Eine nicht zu unterschätzende Funktion hat die CT jedoch noch immer durch die genauere Darstellung von Hartgewebe wie Knochen und Kalk. Dies ist aufgrund der möglichen Knocheninfiltration und Bildung von Hyperostosen beziehungsweise Psammomkörpern (Verkalkungen) oft von Vorteil und als ergänzendes Diagnostikum – insbesondere zur präoperativen Planung – sinnvoll [3, 4, 13, 14]. Aufgrund der extraaxialen Lage und der dadurch nicht vorhandenen Blut-Hirn-Schranke zeigen die Tumore, die in der Bildgebung scharf begrenzt sind und rund bis flächig erscheinen, eine ausgeprägte Kontrastmittelanreicherung. In der nativen CT bildet sich ein hyperdenser Tumor mit häufig ausgeprägten Verkalkungen ab. Im nativen MRT hingegen ist der Tumor in der T1-Gewichtung durch sein hypo- bis isointenses Aussehen charakterisiert (Abb. 1), in der T2-Gewichtung durch sein iso- bis hyperintenses Erscheinungsbild [4, 13]. Ein weiteres Charakteristikum, welches in der Bildgebung des Meningeoms häufig auftritt, ist das sogenannte „*dural-tail-sign*“ (Abb. 1). Dieses beschreibt die Ausläufer des Meningeoms entlang der Dura mater, die in der Bildgebung typischerweise verdickt erscheinen und in die Peripherie hineinreichen [15].



**Abb. 1: MRT (T1-Gewichtung) eines Falx-Meningeoms**  
Markierung: *dural-tail-sign*

#### 1.1.4 Symptome

Wegen der unterschiedlichen Tumorlokalisationen unterscheiden sich die Symptome von Meningeompatienten oft sehr stark. Meningeome wachsen in der Regel langsam, weshalb Symptome meist erst bei fortgeschrittenen Meningeomen durch Verdrängungsprozesse auftreten [14]. Aus diesem Grund werden Meningeome in regelmäßigen Abständen im Rahmen zerebraler Bildgebungen mit anderer Indikationsstellung inzidentell erfasst und resultieren nicht zwangsweise in einer chirurgischen Intervention [16, 17]. Typische Symptome für Meningeome mit Größenprogredienz, die durch ihren raumverdrängenden Prozess gekennzeichnet sind, sind die Zeichen eines erhöhten intrakraniellen Drucks, wie diffuse Cephalgien, Übelkeit und Vigilanzminderung. Durch die lokale Raumforderung treten je nach Tumorlokalisation allerdings auch lokal betonte Cephalgien durch Reizung oder Kompression der Dura mater oder auch fokale-neurologische Defizite, wie Hirnnervenausfälle oder Paresen, auf. Ein Beispiel stellt die Tumorlokalisation am Os sphenoidale dar, aus der eine Visusstörung bis hin zum vollständigen

Visusverlust resultieren kann. Auch im Kleinhirnbrückenwinkel können Meningeome auftreten, wobei dies zu Ausfällen der dort durchziehenden Hirnnerven (N. trigeminus, N. facialis, N. vestibulocochlearis) führen und den Symptomen eines Vestibularisschwannoms gleichen kann [14]. Auch von fokalen und generalisierten Krampfanfällen im Zusammenhang mit Meningeomen, insbesondere der Temporal- und Zentralregion, wurde berichtet [18].

### 1.1.5 Histologie

Die Tumorzellen bilden sich aus den mesenchymalen Deckzellen der Arachnoidea. Gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation werden zum jetzigen Zeitpunkt 15 unterschiedliche Subtypen klassifiziert [19]. Zu den histopathologischen Erkennungsmerkmalen von Meningeomen gehören lamellenförmige, radiäre Tumorverkalkungen, sogenannte Psammomkörperchen, sowie die zwiebelschalenartige Struktur des Tumors (Tabelle 1). Die unterschiedlichen Typen von Meningeomen werden mithilfe der WHO-Klassifikation in drei verschiedene Klassen graduiert (WHO °1-3). Diese Gradierung wird basierend auf dem histologischen Subtyp, Mitoseindex, Gewebeeinfiltration und weiteren histopathologischen Kriterien durchgeführt [19].

	WHO°1	WHO°2	WHO°3
Häufigkeit	>90%	5-7%	<3%
Subtypen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meningotheliomatös*</li> <li>• Fibroblastisch</li> <li>• Transitoral</li> <li>• Psammomatös</li> <li>• Angiomatös</li> <li>• Mikrozystisch</li> <li>• Sekretorisch</li> <li>• Lymphoplasmazellreich</li> <li>• Metaplastisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atypisch*</li> <li>• Chordoid</li> <li>• Klarzellig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anaplastisch*</li> <li>• Papillär</li> <li>• Rhabdoid</li> </ul>
Mitoseindex	<4 Mitosen/ 10 Gesichtsfelder	≥4 bis ≤19 Mitosen/ 10 Gesichtsfelder**	≥20 Mitosen/ 10 Gesichtsfelder
Gewebeinfiltration	Keine Gewebeeinfiltration	Gewebeeinfiltration vorhanden	Massive Gewebeeinfiltration
Rezidivrate	7-20%	30-40%	50-80%

**Tabelle 1: Klassifikation der Meningeome**

Modifiziert nach aktueller WHO Klassifikation [30]

\*Der jeweils häufigste histologische Subtyp

\*\*Neben dem Mitoseindex können atypische Meningeome auch durch mindestens 3 der folgenden 5 histopathologischen Kriterien definiert werden: Spontanekrose, veränderte Zellstruktur, ausgeprägter Nukleolus, gesteigerte Zellularität und/oder kleine Zellen.

## 1.1.6 Therapie

Als Standardtherapie von Meningeomen bei symptomatischen Patienten gilt die operative Exstirpation [3, 4]. Bei asymptomatischen Patienten oder bei ungünstiger Risiko-Nutzen-Konstellation kann auch ein *wait-and-scan*-Strategie verfolgt werden. Nach Simpson wird das erreichte Resektionsausmaß in fünf verschiedene Grade unterteilt, die gleichzeitig mit der Rezidivrate des Patienten korreliert (Tabelle 2) [20]. Bei einer Simpson-Klassifikation °I wird eine makroskopisch vollständige Tumorentfernung erreicht, bei der gleichzeitig die angrenzenden duralen beziehungsweise ossären Strukturen entfernt werden. Hier zeigen sich die größte Überlebenswahrscheinlichkeit sowie die geringste Fünf-Jahres-Rezidivrate von 9 %. Bei erreichtem Resektionsgrad V kommt es lediglich zu einer makroskopischen Tumordekompression beziehungsweise Biopsie. Erstreckt sich das Intervall der Fünf-Jahres-Rezidivraten auf einen Beobachtungszeitraum von 15 Jahren, ergeben sich bei den makroskopisch vollständig entfernten Tumoren (Simpson °I bis °III) deutlich geringere Rezidivraten als bei solchen, die nicht vollständig makroskopisch reseziert wurden (Simpson °IV). Da bei Simpson °V der Tumor nur dekomprimiert wird, also *in situ* verbleibt, wird das zurückbleibende Gewebe nicht als Rezidiv, sondern als Residuum bezeichnet. Somit ist eine sinnvolle Beschreibung der Rezidivrate nicht möglich [5, 20-22].

Simpson Grad	Merkmale	5-Jahres-Rezidivrate	15-Jahres-Rezidivrate
°1	makroskopisch vollständige Tumorexstirpation, zusätzliche Entfernung aller angrenzenden Strukturen (Dura, Ossäre Strukturen, ggf. Sinus)	9%	32%
°2	makroskopisch vollständige Tumorexstirpation, angrenzende <i>in situ</i> verbleibende Dura Mater wird vollständig thermisch koaguliert	19%	
°3	makroskopisch vollständige Tumorexstirpation keine Entfernung oder Koagulation der angrenzenden Strukturen	29%	
°4	partielle Tumorexstirpation, tumorinfiltrierte Dura mater bleibt <i>in situ</i>	44%	91%
°5	Dekompression, ggf. mit Biopsie	-	-

**Tabelle 2: Simpson-Klassifikation der Meningeome**  
 Modifiziert nach Simpson, Mirimanoff et al. [20-22]

Für asymptomatische Patienten, operativ schwer zugängliche Meningeome und/oder Patienten mit vielen Komorbiditäten und limitierter Operationsfähigkeit, kann sich ein konservatives Therapiekonzept anbieten. Dieses sollte allerdings mit kontinuierlichen und engmaschigen bildmorphologischen und klinisch-neurologischen Verlaufskontrollen einhergehen. Bei primär inoperablen Patienten, bei denen etwa wegen der Tumorlokalisierung oder nach einer ASA-Risikoklassifikation keine Operation indiziert ist, kann aber aufgrund bis dato mangelnder interventioneller Alternativen eine Radiotherapie durchgeführt werden. Dabei kommen Verfahren wie das *Gammaknife* oder der Linearbeschleuniger zum Einsatz, die sich bereits etabliert haben [3, 23]. Laut der *WHO*-Klassifikation zeigen sich nach Choi et al. [24] signifikante Überlebensvorteile bei adjuvanter Radiotherapie von höhergradigen Meningeomen (*WHO* °II/III). Zwar konnten in der Vergangenheit mehrere Studien diesen Vorteil nicht bestätigen, dennoch wird in der Europäischen Leitlinie von 2016 eine adjuvante fraktionierte Radiotherapie empfohlen, die bei allen höhergradigen sowie nicht vollständig resezierten benignen Meningeomen eingesetzt wird [25]. Da die Bestrahlung von *WHO*°1-klassifizierten, vollständig exstirpierten Meningeomen keinen Überlebensvorteil oder zusätzlichen Nutzen ergab, wird diese aktuell in den Leitlinien auch nicht empfohlen [3, 26]. Diverse adjuvante Therapien mit Chemotherapeutika und Hormonpräparaten wurden hingegen in klinischen Studien ausgiebig untersucht und zeigten bisher keine signifikanten Überlebensvorteile bzw. gesteigerte Remissionsraten [3].

### 1.1.7 Prognose

Abhängig von unterschiedlichen Einflussfaktoren kann eine Prognose des Meningeoms erfolgen. Hierfür sind vor allem das Ausmaß der Resektion nach Simpson sowie die Klassifikation nach dem *WHO*-Grad von Bedeutung. Ersteres ist abhängig von der Lokalisation des Tumors sowie dem Allgemeinzustand des Patienten. Bei über 80 % der Patienten ist bei einer Simpson °I-Resektion bei benignen Meningeomen eine Heilungschance (das bedeutet kein erneutes Rezidivauftreten) zu erkennen [20]. Bei Meningeomen *WHO* °II/III konnten wegen der massiven Infiltration und der damit oft einhergehenden unvollständigen Tumorexstirpation Rezidivraten von bis zu 80 % festgestellt

werden. Da insgesamt über 90 % der Meningeome als benigne (*WHO* °1) gelten, ist die Prognose insgesamt als positiv zu werten [19, 21, 27].

## 1.2 5-ALA

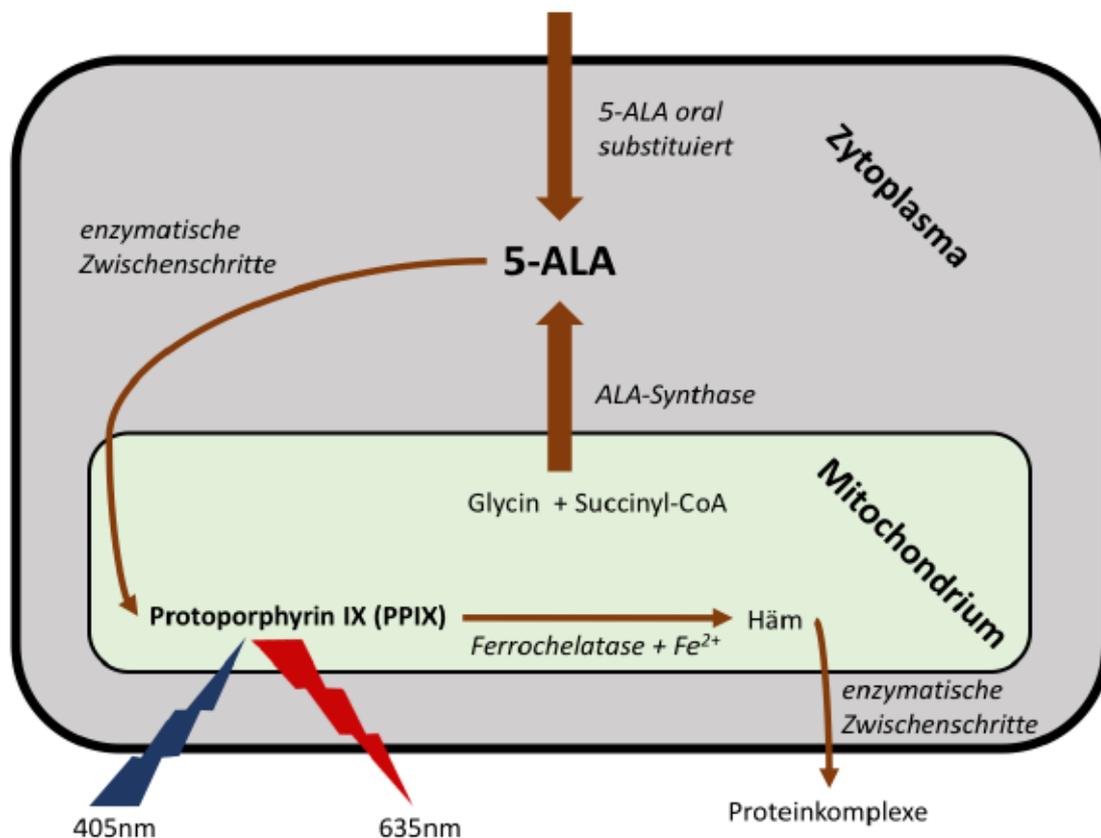
### 1.2.1 5-ALA Eigenschaften

5-Aminolävulinsäure  $C_5H_9NO_3$  (5-ALA) zählt zu den Ketocarbonsäuren und stellt eine im Menschen physiologisch vorkommende Aminosäure dar. Diese Aminosäure gilt als Zwischenschritt der intrazellulär ablaufenden Häm-Biosynthese. Bereits 1997 wurde die in Wasser lösliche Säure in experimentellen Studien als Photosensibilisator verwendet [28, 29]. Inzwischen wird 5-ALA als zugelassenes Pharmazeutikum Gliolan (medac GmbH, Wedel, Deutschland) in der Gliomchirurgie als Photosensibilisator und zur Behandlung von aktinischen Keratosen als Gel oder Pflaster angeboten [30, 31]. Des Weiteren wird 5-ALA als Düngemittel in der Landwirtschaft eingesetzt [32].

### 1.2.2 Häm-Biosynthese in physiologischen Zellen

Bei der Häm-Biosynthese handelt es sich um einen ubiquitären Vorgang in menschlichen Zellen, der einen elementaren Bestandteil der Atmungskette darstellt. Im Mitochondrium und Zytoplasma wird über verschiedene intrazelluläre Zwischenschritte das Häm gebildet. Dieser Vorgang beginnt im Mitochondrium, wo mithilfe der ALA-Synthase aus Glycin und Succinyl-CoA 5-ALA synthetisiert wird. Über die Mitochondrienmembran kann das 5-ALA nun ins Zytoplasma diffundieren, wo mittels der ALA-Dehydratase das Porphobilinogen (PBG) synthetisiert wird. Dieses wird wiederum durch die PBG-Desaminase (PBG-D) in Hydroxymethylbilan umgewandelt. Der darauffolgende Schritt wird durch die sogenannte Uroporphyrinogen-III-Synthase getriggert, wodurch das gleichnamige Protein Uroporphyrinogen III erzeugt wird. Das Uroporphyrinogen III wird anschließend durch die Uroporphyrinogen-Decarboxylase in Coproporphyrinogen III verstoffwechselt. Mithilfe des *ABCB6*-Transporters kann das synthetisierte Coproporphyrinogen III zurück in das Mitochondrium transportiert werden, wo mittels zweier Oxidasen (Coproporphyrinogen III-, Protoporphyrin-oxidase) das Protein zum Protoporphyrin IX (PPIX) metabolisiert wird. In einem

weiteren Schritt wird durch die Ferrochelatase, die ein zusätzliches Eisen-Ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) zur enzymatischen Aktivität benötigt, das fertige Häm im Mitochondrium synthetisiert. Dieses kann anschließend in unterschiedliche Proteinkomplexe eingebaut werden oder dient Enzymen als prosthetische Gruppe. So kann zum Beispiel mit dem Protein Globin zusammen der rote Blutfarbstoff Hämoglobin gebildet werden (Abb. 2) [29].



**Abb. 2: Vereinfachter 5-ALA Metabolismus**  
Angelehnt an Ishikawa et al. [41]

### 1.2.3 Häm-Synthese in pathologischen Zellen (Tumorzellen)

In klinischen Studien konnte bewiesen werden, dass die Enzymaktivität, die sich in physiologischen Zellen selbst regulieren kann, in Tumorzellen verändert vorliegt. Insbesondere ein Mangel der mitochondrialen Ferrochelatase führt zu einer Akkumulation von PPIX, das in physiologischen Zellen im Normalzustand in die Komplexverbindung Häm modifiziert wird, um dann über die Mitochondrienmembran das Zytosol zu erreichen. Außerdem wurde gezeigt,

dass sowohl die ALA-Synthase als auch die PBG-D in den Tumorzellen mit gesteigerter Aktivität vorhanden sind. Auch dies resultiert in einer Steigerung des PPIX in den Mitochondrien [28, 33-35].

#### 1.2.4 5-ALA als Photosensibilisator

In der Neurochirurgie hat sich bereits die Verwendung von 5-ALA als intraoperatives Diagnostikum (Photodynamische Diagnostik, PDD) zur Fluoreszenz gestützten Resektion (FGS) und zur Detektierung von Tumorzellen in der Gliomchirurgie etabliert [30, 36, 37]. Hier wird dem Patienten eine gewichtsadaptierte Lösung (20mg 5-ALA HCL pro kg Körpergewicht) etwa drei Stunden (empfohlenes Zeitfenster: 2 – 4 Stunden) vor einer Operation oral verabreicht. Wie schon beschrieben, führt dies aufgrund der veränderten Enzymaktivität in Tumorzellen zur Akkumulation von PPIX [38]. Durch seine biochemischen Eigenschaften hat PPIX das Potential zur Fluoreszenz mit einem Absorptionsmaximum von 405nm (blauer Spektralbereich) und einem Emissionsmaximum von 635nm (roter Spektralbereich) [38]. Die speziellen Operationsmikroskope arbeiten mit verschiedenen Lichtfiltern. Der Anregungsfilter lässt so ausschließlich Licht im blauen Spektralbereich mit der Wellenlänge von 405nm passieren und beleuchtet das mikroskopisch tumorverdächtige Gewebe. Das von den Tumorzellen daraufhin emittierte rote Licht im Spektralbereich von 635nm kann so schließlich vom menschlichen Auge wahrgenommen werden. Dies ermöglicht dem Operateur, physiologisches Hirngewebe von Tumorgewebe besser unterscheiden zu können [30]. Dieses Verfahren wurde analog auf Meningeome übertragen [37, 39-48]. So kann ein gesteigerter Resektionsgrad bei gleichzeitiger Schonung gesunder Strukturen erreicht werden. Technische Probleme, die bei der intraoperativen Nutzung von 5-ALA auftreten können, sind ein variabler Abstand zwischen Lichtquelle und Tumor, eine variable Strahlungsintensität der Lichtquelle, Blutauflagerungen auf dem Gewebe, das analysiert werden soll, da das Hämoglobin im ähnlichen Spektralbereich wie PPIX Licht absorbiert, sowie die subjektive Beurteilung einer möglichen Fluoreszenz durch den Operateur [39-41]. Aus diesem Grund erscheint eine Weiterentwicklung zur Objektivierung der fluoreszenzbasierten Tumoranalyse sinnvoll und notwendig. Dazu wurden bereits erste Studien mit

einem Minispektrometer mit angeschlossener Faseroptik von Kim et al. implementiert und an Gliomen durchgeführt [13]. Dieses Verfahren wurde kontinuierlich weiterentwickelt und in ersten Studien auch bei Meningeomen angewendet (Abb. 3) [37, 39-48].

Eine weitere ähnliche Einsatzmöglichkeit des 5-ALA als Photosensibilisator ist die Photodynamische Therapie (PDT). Anders als bei der PDD wird der Tumor hierbei nicht nur für den Operateur sichtbar gemacht, sondern mithilfe einer phototoxischen Reaktion auch zur Apoptose gebracht [49, 50]. Aufgrund der Bestrahlung des Tumors mit monochromatischem Laserlicht im Spektralbereich von 635nm wird PPIX zur Induktion von Sauerstoffradikalen (ROS) angeregt, sodass die Apoptose der Tumorzellen induziert wird [51, 52].



**Abb. 3: Mini-Spektrometer mit angeschlossener Faseroptik installiert in einer Dunkelkammer**

## 1.3 Ziel der Arbeit

Für die Durchführung dieser Arbeit wurde ein positives Ethikvotum (4266) der Heinrich-Heine Universität eingeholt.

Ziel dieser Arbeit war es bei zerebralen Meningeomen eine experimentelle Quantifizierung des 5-ALA-Signals von infiltrierter Dura mater durchzuführen und diese Ergebnisse mit histopathologischen Daten zu korrelieren. Hierfür wurde ein Mini-Spektrometer, das bereits in mehreren Studien verwendet worden ist, mit angeschlossener Fiberoptik *ex vivo* verwendet [37, 53]. Diese Spektrometer-Fiberoptik-Einheit wurde zunächst mittels mehrerer Verdünnungsreihen kalibriert, um eine anschließende Quantifizierung der Fluoreszenz gewährleisten zu können. Außerdem sollten die Ergebnisse dem bereits etablierten operativen Verfahren der Fluoreszenz-gestützten-Operation (FGS) mit dem Operations-Mikroskop vergleichend gegenübergestellt werden. Der objektive Nachweis über das tatsächliche Vorhandensein von Tumorzellen wurde histopathologisch geführt.

Folgende Fragestellungen sollten in dieser Arbeit im Einzelnen analysiert werden:

- 1.) Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Tumorproben, die während einer Operation gewonnen wurden: Beobachtung unter den Kautelen einer FGS und spektrometrische Messung mit einer kalibrierten Spektrometer-Fiberoptik-Einheit,
- 2.) histopathologische Analyse der Tumordinfiltration und Korrelation mit den beiden unter 1.) genannten optischen Verfahren

## 2 Publierte Originalarbeit

ORIGINAL ARTICLE



### Fluorescence Behavior and Dural Infiltration of Meningioma Analyzed by 5-Aminolevulinic Acid–Based Fluorescence: Operating Microscope Versus Mini-Spectrometer

Johannes Knipps<sup>1</sup>, Kerim Beseoglu<sup>1</sup>, Marcel Kamp<sup>1</sup>, Igor Fischer<sup>1,2</sup>, Joerg Felsberg<sup>3</sup>, Lisa M. Neumann<sup>1</sup>, Hans-Jakob Steiger<sup>1</sup>, Jan F. Cornelius<sup>1</sup>

■ **OBJECTIVE:** To compare fluorescence intensity of tumor specimens, as measured by a fluorescence-guided surgery microscope and a spectrometer, to evaluate tumor infiltration of dura mater around meningiomas with help of these 2 different 5-aminolevulinic acid (5-ALA)-based fluorescence tools, and to correlate fluorescence intensity with histopathologic data.

■ **MATERIAL AND METHODS:** In a clinical series, meningiomas were resected by 5-ALA fluorescence-guided surgery. Fluorescence intensity was semiquantitatively rated by the surgeon at predefined points. Biopsies were harvested and fluorescence intensity measured by a spectrometer and histopathologically analyzed. Sampling was realized at the level of the dura in a centrifugal direction.

■ **RESULTS:** A total of 104 biopsies ( $n = 13$  tumors) were analyzed. Specificity and sensitivity of the microscope were 0.96 and 0.53 and of the spectrometer 0.95 and 0.93, respectively. Fluorescence intensity as measured by the spectrometer was correlated to histologically confirmed tumor burden. In a centrifugal direction, tumor burden and fluorescence intensity continuously decreased (along the dural tail). Below a threshold value of 639 arbitrary units no tumor was histologically detectable.

■ **CONCLUSIONS:** At the level of the dura the spectrometer was highly sensitive for detection of meningioma cells. The surgical microscope showed false negative

results and missed residual tumor cells in more than one half of the cases. The complementary use of both fluorescence tools may improve resection quality.

#### INTRODUCTION

Approximately 30% of all tumors of the central nervous system are meningiomas, and more than 90% of them are classified as benign.<sup>1,2</sup> Standard therapy is neurosurgical resection.<sup>3</sup> Overall recurrence rate is approximately 20% at long-term follow-up.<sup>4</sup> This recurrence rate largely depends on degree of resection, as defined by the Simpson grading system.<sup>5</sup> It is hypothesized that recurrent tumor most often develops from residual tumor cells at the resection margins.<sup>6</sup> Although in some instances residual tumor has to be left for the sake of neurologic integrity, most recurrences develop from intraoperatively overlooked tumor.

Hence, a refinement of intraoperative tumor detection methods, especially at the end of surgery, is needed. This would improve quality of resection and reduce risk of recurrence.

5-aminolevulinic acid (5-ALA)-based fluorescence-guided surgery (FGS) has been established as standard in glioma surgery.<sup>7,8</sup> Clinical evidence is accumulating that FGS also may be promising for meningioma resection.<sup>9-13</sup> Although a FGS microscope is easy to use, many confounding factors may affect the quality of detection and resection, e.g., subjective assessments, distance

#### Key words

- 5-ALA
- Fluorescence-guided surgery
- Meningioma
- Microscope
- Spectrometer

#### Abbreviations and Acronyms

5-ALA: 5-Aminolevulinic acid  
AU: Arbitrary units  
FGS: Fluorescence-guided surgery  
H&E: Hematoxylin and eosin  
PpIX: Protoporphyrin IX disodium salt  
ROC: Receiver operating curve

#### WHO: World Health Organization

From the <sup>1</sup>Department of Neurosurgery, <sup>2</sup>Department of IT and Statistics, and <sup>3</sup>Institute of Neuropathology, University Clinic Düsseldorf, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

To whom correspondence should be addressed: Jan F. Cornelius, M.D.

E-mail: [cornelius@med.uni-duesseldorf.de](mailto:cornelius@med.uni-duesseldorf.de)

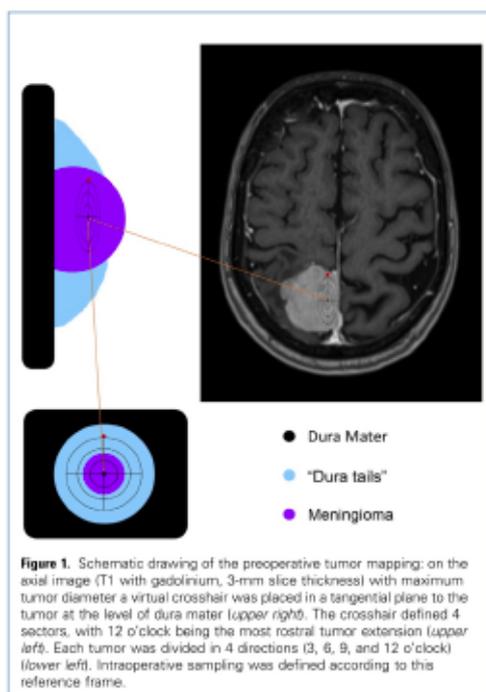
Citation: *World Neurosurg.* (2017) 108:118-127.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2017.08.140>

Journal homepage: [www.WORLDNEUROSURGERY.org](http://www.WORLDNEUROSURGERY.org)

Available online: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

1878-8750/\$ - see front matter © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.



between tumor and light source, light absorption, and scattering properties of biological tissue.<sup>14</sup> To overcome these shortcomings and to improve fluorescence detection, dedicated spectrometers have been developed.<sup>11,14,15</sup> In a preliminary study, we recently examined the usefulness of a "mini-spectrometer" for clinical use.<sup>21</sup> We think that a combination of an FGS microscope and such a mini-spectrometer may be additive tools in meningioma surgery.

The objectives of the present study were as follows: 1) to compare fluorescence intensity of tumor specimens as measured by a FGS microscope and a spectrometer, 2) to evaluate tumor infiltration of dura mater around meningiomas (along the so-called dural-tail) with help of these 2 different 5-ALA-based fluorescence tools, and 3) to correlate fluorescence intensity with histopathologic data.

#### MATERIAL AND METHODS

Tumor specimens were harvested from patients with meningioma who were operated in the Department of Neurosurgery of Heinrich Heine University Duesseldorf in the period from March 2015 to March 2017. As part of the department's tumor program, every patient with a primary or secondary brain tumor routinely is offered 5-ALA-based FGS. The resected tumor material was

divided in specimens for routine histopathologic diagnosis and specimens for fluorescence intensity quantification.

The study was approved by the local ethics committee (number of registration: 4266). Only fully informed patients who wished to participate in the study and who had signed an informed consent preoperatively were included. Exclusion criteria were as follows: Patients who were taking phototoxic drugs such as sulfonamides, tetracyclines, or fluoroquinolones; patients who had liver damage and/or elevated liver enzymes (glutamic oxaloacetic transaminase, glutamate-pyruvate transaminase, gamma-GT, alkaline phosphatase, cholinesterase or bilirubin); and patients with cardiovascular diseases such as coronary heart disease, previous myocardial infarction, heart failure or active myocarditis, or cardiomyopathy.

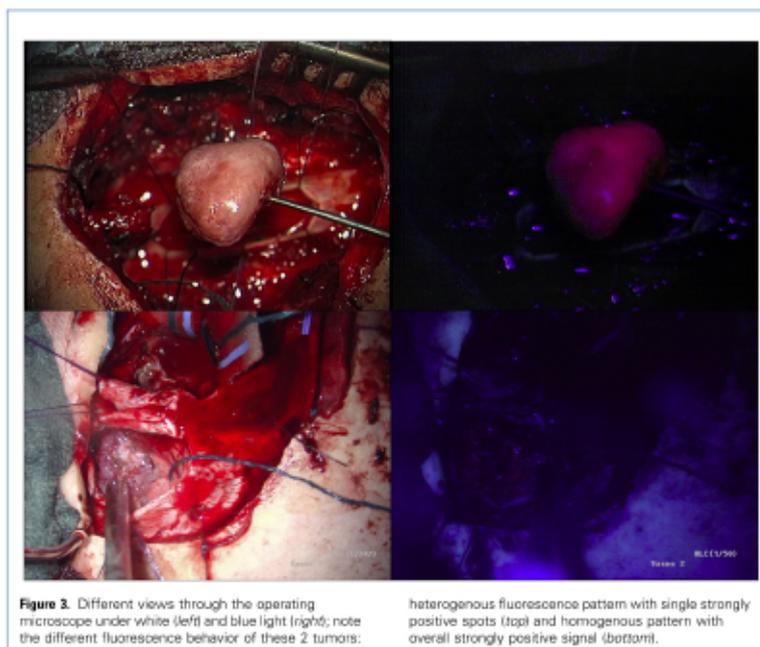
#### Preoperative Tumor Mapping and Coordinates of Biopsies

Planning was performed for each patient on a preoperative magnetic resonance imaging study. On the axial image (T1 with gadolinium, 3-mm slice thickness) with maximum tumor diameter, a virtual crosshair was placed in a tangential plane to the tumor at the level of dura mater. The crosshair defined 4 sectors, with 12 o'clock being the most rostral tumor extension. Each tumor was divided in 4 directions (3, 6, 9, and 12 o'clock). Concentric circles with increasing radius (5-mm intervals) were centered on the tumor center. The location of each intraoperative tumor biopsy was defined according to this coordinate system (Figure 1). Planning was performed on an IBM PC with special imaging software (Sectra Workstation IDS7, version: 18.1, Sectra AB; Linköping, Sweden).

#### Patient Preparation

Before the operation, all patients received 5-ALA according to a standardized clinical protocol.<sup>8</sup> In brief, patients received 5-ALA





**Figure 3.** Different views through the operating microscope under white (left) and blue light (right); note the different fluorescence behavior of these 2 tumors:

heterogenous fluorescence pattern with single strongly positive spots (top) and homogenous pattern with overall strongly positive signal (bottom).

preoperatively weight-adjusted (20 mg per kilogram body weight; Pharmacy University Hospital Duesseldorf). The solution was dissolved in 50 mL of drinking water or orange juice and administered orally to the patient 3 hours before induction of anesthesia.

#### Intraoperative Tumor Biopsy

Timing of tumor sampling was performed in an early phase of surgery. The sample's coordinates were defined as described previously. The volume of each specimen was at least 5 mm<sup>3</sup>. The biopsies were resected at the level of the dura. First, an intraoperative *in vivo* fluorescence determination with a surgical microscope was performed. Second, the samples were measured by a spectrometer with a handheld probe *ex vivo* (Figure 2) by a second observer (J.K.) as described in detail elsewhere.<sup>13</sup> Time interval between sample extirpation and *ex vivo* measurement had to be less than 60 seconds; otherwise, the sample was discarded.

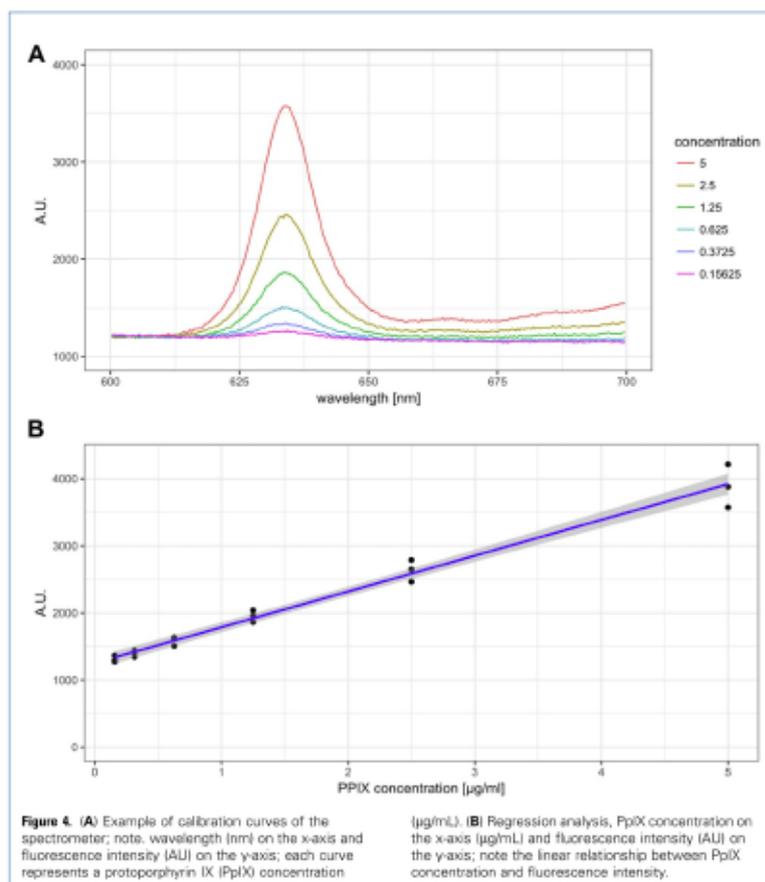
#### FGS Microscope

Tumors were operated by standard microsurgical techniques. A surgical microscope with 5-ALA fluorescence technology (Zeiss Pentero 800 + BLUE400; Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) was used routinely.<sup>13-15</sup> For documentation purposes, the microscope was connected to a computer server (Brainlab BUZZ Digital O.R., Brainlab AG, Germany). During microsurgery, the operating

room remained dark. Detailed photos were taken under white light and fluorescence light (excitation: 400–410 nm, display: 620–710 nm) of each tumor sample, respectively (Figure 3). In addition, a photo showing an overview of the entire tumor under white light was taken. Intraoperatively, the fluorescence intensity of each tumor sample was observed through the operating-microscope and rated as strongly positive (+++), medium positive (++), weakly positive (+), or absent (–) by the senior surgeon (J.F.C.).<sup>15</sup>

#### Mini-Spectrometer with Handheld Probe

We used a spectrometer connected by optic fibers to a handheld probe. All was custom-made and similar to that first described by Kim et al.<sup>14</sup> In brief, the unit consisted of 4 main modules: 1) a multi-channel light-emitting diode source, which emits monochromatic blue light at a wavelength of 405 nm; 2) a handheld probe with fiber optics (Ocean Optics, Dunedin, Florida, USA); 3) a spectrometer (USB 2000+; Ocean Optics); and 4) a standard computer (Mobile Intel Pentium 4-M CPU 1.80 GHz, Microsoft Windows XP, IBM, Armonk, New York, USA). The required software was programmed in our department ("Igor's Spectrometer," PHP [<https://en.wikipedia.org/wiki/PHP>]). It offered the possibility to set 3 standardized illumination parameters: 1) integration time 20 milliseconds, 2) lag time 50 milliseconds, and 3) number of flashes: 50. For the sake of simplicity, we refer to the whole apparatus as the "mini-spectrometer."



#### Calibration of the Mini-Spectrometer

The mini-spectrometer was calibrated with a series of dilutions containing different concentrations of protoporphyrin IX disodium salt (PpIX) as described in detail previously.<sup>11</sup> In brief, PpIX (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) diluted in dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) with concentrations ranging from 0.16 µg/mL to 5 µg/mL was used. Calibration curves were generated based on these measurements (Figure 4).

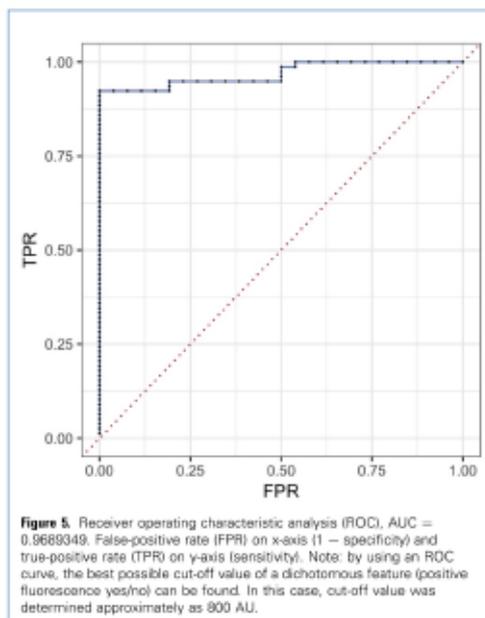
#### Ex Vivo Fluorescence Intensity Measurement with the Mini-Spectrometer

Fluorescence intensity was measured immediately after extirpation (time between sample extirpation and measurement was <60 seconds). As recently described, the measuring tip was placed

directly on the tumor ("touch technique") to acquire the highest possible fluorescence values.<sup>11</sup> The entire setting took place in a dark chamber (Figure 2). The software displayed fluorescence values in arbitrary units (AU) and was converted to.csv Excel file format for further analysis.

#### Histopathologic Examination

For routine analysis, all tumor samples were classified according to the latest World Health Organization (WHO) classification.<sup>10</sup> For the present study, samples were embedded in paraffin and cut. Then, all tumor samples were dyed and stained with hematoxylin and eosin (H&E). All cuts were examined by the same senior neuropathologist (J.F.). Overlaying or infiltrating meningioma tumor burden was determined as solid tumor (2.0), tumor cell nests (1.0), or tumor-free (0.0). If tumor cells could



not be clearly identified by H&E staining, an additional immunohistochemical study of epithelial membrane antigen, being highly specific for meningiomas, was performed. Immunohistochemical processing allows for better detection of meningioma tissue than H&E staining.<sup>17-19</sup>

#### Statistical Methods

Statistics and graphs performed with R, version 3.4.0 (R Core Team) and SPSS Statistics 22 (IBM Corp., Armonk, New York, USA) on a personal computer (Mobile Intel Pentium 4- M CPU 1.80 GHz; IBM). Linear regression analysis was used to evaluate dilution series. Receiver operating curve (ROC) analysis was used to determine a cut-off value for positive fluorescence. To analyze sensitivity, specificity, negative, or positive predictive value of mini-spectrometer or surgical microscope a contingency table was used. The interrater agreement was quantified with the Cohen kappa statistics. The significance level was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

#### Tumor Tissue

A total of 13 patients with a cranial meningioma and a total of 104 tumor samples were included. On average, 8 biopsies per tumor were obtained. There were 10 WHO grade I and 3 WHO grade II meningiomas.

#### Calibration of Spectrometer

To calibrate the mini-spectrometer, 3 dilution series were performed (Figure 4A). A linear correlation was shown between fluorescence intensity and PpIX concentration by regression analysis,  $R^2: 0.9791$ ,  $P$  value:  $7.255e^{-35}$  (Figure 4B).

The fluorescence intensity showed a positive linear correlation with the PpIX concentration. To determine a cut-off value for positive fluorescence, an ROC analysis was performed. As a cut-off value, we determined fluorescence as a positive signal for all subsequent calculations equal or greater than 800T AU by using ROC analysis (area under the curve = 0.9689349) (Figure 5).

In analogy to the quadripartite classification of fluorescence intensity as observed through the operating microscope, we defined 4 categories of fluorescence intensity as measured by the spectrometer: absent (<800T AU), weakly positive (1800–800T AU), medium positive (2800–1800T AU), or strongly positive (>2800T AU).

#### Fluorescence Intensity: Microscope and Spectrometer

Overall, we analyzed fluorescence intensity of 104 biopsies using a FGS microscope and a minispectrometer; 78 of these 104 analyzed samples contained tumor cells (tumor cell nests up to solid tumor) confirmed by histopathologic analysis. When we used the operating microscope, these 78 samples showed no fluorescence in 47%, weakly positive fluorescence in 18%, medium fluorescence in 15%, and strong fluorescence in 13% (Figure 6). By using the mini-spectrometer, these 78 samples showed no fluorescence in 5%, weakly positive fluorescence in 56%, medium fluorescence in 19%, and strong fluorescence in 19% (Figure 6).

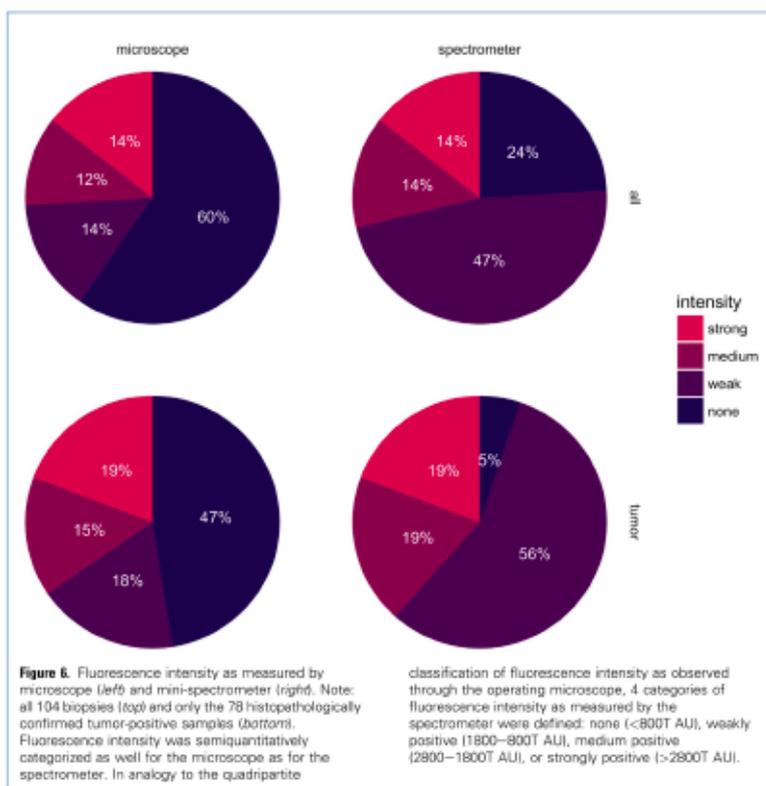
#### Sensitivity and Specificity: Microscope and Spectrometer

A sensitivity of 0.93 was obtained with the mini-spectrometer as compared with 0.53 with the microscope (Tables 1 and 2). Differences were statistically highly significant ( $P < 0.01$ ), especially for tumor samples with a fluorescence intensity of less than 1000T AU as measured by the mini-spectrometer, and no visible fluorescence could be observed under the operating microscope ( $n = 18$ , sensitivity: 0.00). The negative predictive value of the mini-spectrometer was 0.84 as compared with 0.40 of the microscope. For both examination methods, specificity and positive predictive value were greater than 0.9, respectively. The fluorescence ratings obtained via the surgical microscope and mini-spectrometer showed a high agreement rate (Cohen square-weighted Kappa = 0.697).

#### Fluorescence Intensity and Tumor Burden from the Center to the Periphery: Spectrometer

Fluorescence intensity decreased continually from the center of the tumor to its periphery (Figure 7A). Histopathologic analysis also showed a decreasing tumor burden from the center to the periphery (Figure 7B). Correlation analysis of spectrometer data and tumor burden showed a close correlation (Figure 8). Illustrative histopathologic examinations of biopsies taken at different areas from the center of the tumor to its periphery are shown in Figure 9.

The interrater agreement between mini-spectrometer and histopathologic analysis was considerably greater than between



surgical microscope and histopathologic analysis (Cohen kappa: 0.766 vs. 0.333).

**DISCUSSION**

**Summary of Main Results**

Both the microscope and the mini-spectrometer were highly specific. In fact, specificity >0.95 was measured for both. However, compared with the operating microscope, the mini-spectrometer was much more sensitive in detecting fluorescence and thus tumor cells (0.93 vs. 0.53). Furthermore, it was found that fluorescence intensity as measured by the mini-spectrometer was directly correlated to the histopathologically confirmed tumor burden. From center to periphery both, the tumor burden and fluorescence intensity were continuously decreasing. At levels <639T AU, no tumor was histopathologically detectable in our experiments.

**False-Negative Fluorescence Intensity and Sensitivity.** In the present study, there was a high rate of false-negative results with the

microscope as compared with the spectrometer. Or in different terms, the spectrometer was much more sensitive. One possible explanation is the long distance between light source-tumor-microscope. In contrast, the handheld probe was directly applied on the tumor and excitation light was directly delivered

n = 104 Specimens	Histopathologic Positive	Histopathologic Negative	
Fluorescence positive	74	5	PPV: 0.94
Fluorescence negative	4	21	NPV: 0.84
	Sensitivity 0.93	Specificity 0.95	
PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.			

<b>n = 104 Specimens</b>	<b>Histopathologic Positive</b>	<b>Histopathologic Negative</b>	
Fluorescence positive	41	1	PPV: 0.98
Fluorescence negative	37	25	NPV: 0.40
	Sensitivity 0.53	Specificity 0.96	

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

into the tumor. Furthermore, even weak emission signals (e.g., due to low tumor cell density or scattering) may be detected by the directly applied detection probe. Another reason may be the background illumination of an operating room, which is brighter as compared with a dark chamber, where the spectrometric measurements were performed.

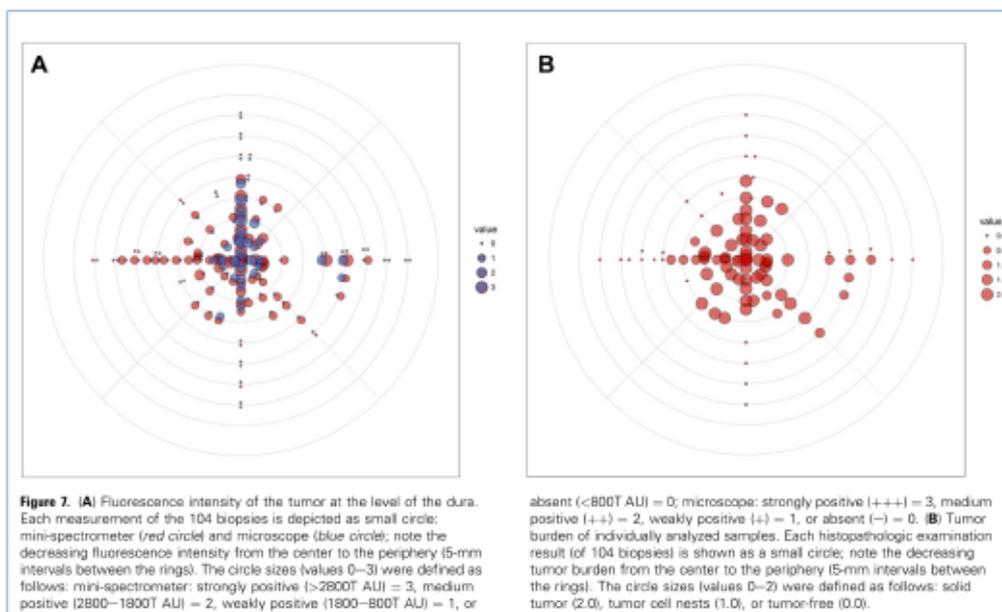
A situation in which both tools showed false-negative results was when there was a bloody field. In fact, hemoglobin absorbs light at the same narrow wavelength range as PpIX. These blood deposits limit fluorescence measurements, but could easily be solved by rinsing the operation field.

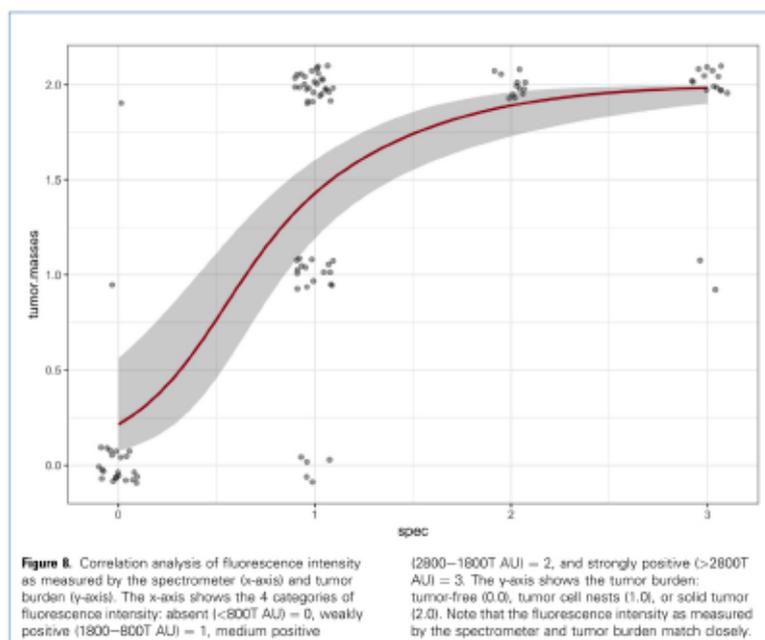
**Specificity and Histopathologic Correlation.** In the present study, both fluorescence tools yielded high specificity (>0.95), high positive predictive values (microscope: 0.98, spectrometer: 0.94),

and high correlation with histopathologic data. This is in line with previously published data. Kajimoto et al.<sup>20</sup> were the first to observe 5-ALA fluorescence of dura mater in meningioma patients (n = 8) with an operating microscope and to analyze tumor infiltration. They had only a single specimen in which fluorescence was positive, but no tumor cells were found. The authors concluded that dura showing fluorescence under the microscope should be considered as infiltrated and dura without fluorescence as tumor free.<sup>20</sup> Subsequently, Valdes et al.<sup>23-24</sup> were the first to perform spectrometric fluorescence analysis in meningioma. They performed 2 studies and found a specificity of 81% and 93%, respectively. They stated that their quantitative fluorescence approach allowed increasing specificity at the cost of decreasing sensitivity.<sup>23</sup> In any case, a quantitative approach resulted in a greater diagnostic detection of tumor as compared with a qualitative assessment of visible fluorescence.<sup>23</sup>

#### Fluorescence-Guided Resection of Meningiomas: State of the Art and Future Research Avenues

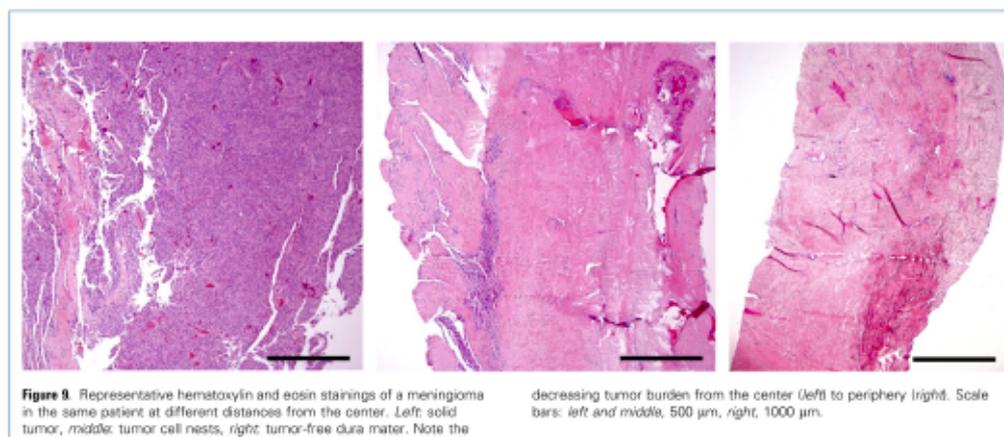
Although no well-designed prospective controlled trial has been performed so far, several authors reported about the usefulness of 5-ALA fluorescence for meningioma surgery. Two recent reviews analyzed FGS of meningiomas during the last decade.<sup>21,22</sup> Foster and Eljamel's<sup>21</sup> meta-analysis included 206 patients operated for an intracranial meningioma by 5-ALA FGS. The authors reported a specificity of 5-ALA of 95% and a sensitivity ranging from 91.8% to 97.7%.<sup>21</sup> It is important to note that in all included studies





sensitivity was only based on the observation if a tumor as a whole was 5-ALA positive or not. In contrast, the present study offered a much more detailed analysis of areas of different fluorescence intensity within the same tumor and correlating it to histologic sampling. Therefore, specificity and sensitivity of the present study have a different meaning and may only be cautiously

compared with the existing literature. The other review of 11 studies with 5-ALA-resected meningiomas (n = 126 patients) found similar results to the meta-analysis described previously.<sup>22</sup> However, it also reported the 2 aforementioned studies including 6 and 15 patients, respectively, with spectrometric measurements that found a specificity of 5-ALA in meningiomas



of 81%–93% and a sensitivity of 94%–100%.<sup>23,24</sup> These results are better comparable to the present study and are in line with our observed results (present study: spectrometer specificity 95% and sensitivity 93%). The present study adds more data to the existing sparse body of literature and corroborates the reported results.

For future studies, it is important to consider that a refined spatial and spectrometer-based fluorescence analysis of each meningioma and potential invasion zones should be the goal. Through operating microscopes, it already has been observed that meningiomas generally have heterogeneous fluorescence patterns.<sup>25</sup> In addition, the present study could clearly demonstrate that based on spectrometry there exist different signal intensities along the dural tail corresponding to different tumor burden within the dura. In future studies, spectrometric measurements of other infiltration zones such as bone, brain parenchyma, and neurovascular structures should be considered. Other important issues and research axes are recurrent tumors and/or previously irradiated lesions.

#### Limitations of the Present Study

We are aware that the study design had some limitations. The number of examined tumors ( $n = 13$ ) was small; however, the total number of examined biopsies was considerable ( $n = 104$ ). Nevertheless, specificity and sensitivity of a diagnostic test may vary depending on the distribution of the underlying biological trait relative to the diagnostic cut point in the study population.<sup>26</sup> Therefore, comparison of specificity and sensitivity with other populations has to take into consideration possibly different distributions of the trait.<sup>26</sup>

Another shortcoming was that the spectrometer used had no CE (<https://en.wikipedia.org/wiki/CE>) approval, so that an in vivo use was not feasible. However, the timing between biopsy resection and ex vivo measuring was less than 60 seconds. This allowed preventing photo-bleaching and other processes that might alter fluorescence intensity measurements. Once the probe certified for intra-human use, it may even be directly applied on the site of interest like a pointer of neuronavigation and results will immediately be displayed.

#### Outlook

By spectrometric measurements in the operating room, it may become possible to detect tumor tissue more precisely than by a microscope. Particularly in meningiomas, in which recurrences are hypothesized to occur from residual tumor cells left at resection margins or in deep and microscopically badly visualized regions, a tool with a greater sensitivity may be very useful. The handling of the hand-held fiberoptic probe connected to the spectrometer was simple and not much interfering with the

surgical workflow. An approval of its intraoperative use by the competent authorities should be sought after. It would allow a fast and reliable analysis at the end of resection. The advantages are numerous: more sensitive than a FGS microscope, nearly as specific as a histopathologic analysis, and real-time analysis of a continuum of points as opposed to a time-consuming and punctual analysis by frozen sections.

The experience of the last decade has shown that 5-ALA FGS of meningiomas holds the potential of a more radical tumor resection.<sup>9,10,12,20</sup> When adding a spectrometer to the armamentarium, this might further increase radicality and reduce the risk of recurrence. In a retrospective analysis of meningiomas operated with a 5-ALA microscope an improved degree of resection was found in about 20% of benign and 75% of higher-grade meningiomas.<sup>9</sup> However, because this information is not encoded by the Simpson grading, a more radical resection with 5-ALA was not translated into a better Simpson grade in the analyzed series. For future clinical trials, it will be very important to assess this information by additionally grading the 5-ALA resection status at the end of surgery and the modality, e.g., positive/negative 5-ALA fluorescence with microscope/spectrometer, respectively. This will require to extend Simpson's classification, as mentioned previously.<sup>27</sup>

#### CONCLUSIONS

The mini-spectrometer was a highly sensitive tool for detection of meningioma cells based on 5-ALA. At the level of the dura, fluorescence measurements with a FGS surgical microscope showed false-negative results and missed residual tumor cells in more than one-half of the cases. The complementary use of a spectrometer would refine their detection. This would improve the degree of resection or allow alternatives, if a more radical resection is impossible, e.g., photodynamic therapy. This has to be further analyzed in prospective clinical trials. Ultimately, it has to be awaited if a more sensitive resection tool will lower the rate of recurrence and improve patient's outcomes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mrs. Brigitte Senger from the laboratory of experimental neuro-oncology for her support and help with the practical realization of the experimental setting. We also thank Prof. Dr. G. Reifenberger from the Department of Neuropathology, Heinrich Heine University, Duesseldorf for his neuropathological advices. We are grateful for the magnetic resonance imaging scan, which was provided by the Department of Neuroradiology, Heinrich Heine University, Duesseldorf.

#### REFERENCES

1. Wieners J, Wrensch M, Claus EB. Epidemiology and etiology of meningioma. *J Neurooncol*. 2010;99:397-314.
2. Sadetski S, Modas B, Chetrit A, Freedman L. An iatrogenic epidemic of benign meningioma. *Am J Epidemiol*. 2000;151:266-272.
3. Bi WL, Zhang M, Wu WW, Mei Y, Dunn IF. Meningioma genomics: diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. *Front Surg*. 2016;3:40.
4. Bumrungrachpakdee P, Pruphetkiew N, Phukanon N, Pheunpathom N. Recurrence of intracranial meningioma after surgery: analysis of influencing factors and outcome. *J Med Assoc Thai*. 2014;97:399-406.
5. Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20:22-39.
6. Valery CA, Faillet M, Lamprouglou I, Golmard JL, Jenny C, Peyre M, et al. Grade II meningiomas and Gamma Knife radiosurgery: analysis of success and failure to improve treatment paradigm. *J Neurosurg*. 2016;125[suppl. 1]:89-96.

7. Senders JT, Muskens JS, Schuur R, Karhade AV, Cote DJ, Smith TR, et al. Agents for fluorescence-guided glioma surgery: a systematic review of preclinical and clinical results. *Acta Neurochir (Wien)*. 2017;159:151-167.
8. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*. 2006;7:392-401.
9. Cornelius IF, Sloty PJ, Kamp MA, Schneiderhan TM, Steiger HJ, El-Khatib M. Impact of 5-aminolevulinic acid fluorescence-guided surgery on the extent of resection of meningiomas—with special regard to high-grade tumours. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014;11:481-490.
10. Colaccia D, Fandino J, Fujioka M, Cordov S, Muroi C, Landolt H. Intraoperative 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 2010;152:1711-1719.
11. Cornelius IF, Flöcke JM, Knipps J, Fischer I, Kamp M, Steiger HJ. Minispectrometer with handheld probe for 5-ALA based fluorescence-guided surgery of brain tumors: preliminary study for clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;17:147-153.
12. Wilbers E, Hargus G, Weller J, Stummer W. Usefulness of 5-ALA (Gliolan®)-derived PpIX fluorescence for demonstrating the extent of infiltration in atypical meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014;156:1853-1854.
13. Kamp MA, Krause Malle Z, Munoz-Bendis C, Rapp M, Sabel M, Steiger HJ, et al. Various shades of red—a systematic analysis of qualitative estimation of ALA-derived fluorescence in neurosurgery [E-pub ahead of print]. *Neurosurg Rev*. <http://dx.doi.org/10.1007/s10143-016-0745-4>, accessed September 16, 2017.
14. Kim A, Khurana M, Moriyama Y, Wilson BC. Quantification of in vivo fluorescence decoupled from the effects of tissue optical properties using fiber-optic spectroscopy measurements. *J Biomed Opt*. 2010;15:072006.
15. Stummer W, Tomi JC, Goetz C, Ulrich W, Stepp H, Bink A, et al. 5-Aminolevulinic acid-derived tumor fluorescence: the diagnostic accuracy of visible fluorescence qualities as corroborated by spectrometry and histology and postoperative imaging. *Neurosurg*. 2014;74:310-319 [discussion: 319-320].
16. Louis DN, Reut DJ, Ohgaki H, Stupp R, Sivà ML, Biemar W, et al. Glioblastoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds. WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. Revised 4th edition. Lyon: IARC; 2016.
17. Nambirajan A, Sharma MC, Rajeshwari M, Kakkar A, Sati V, Sarkar C. A comparative immunohistochemical study of epithelial membrane antigen and NHERF1/EBP50 in the diagnosis of ependymomas [E-pub ahead of print]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. <http://dx.doi.org/10.1097/PAL.0000000000000984>, accessed September 16, 2017.
18. Hasselblatt M, Paulus W. Sensitivity and specificity of epithelial membrane antigen staining patterns in ependymomas. *Acta Neuropathol*. 2003; 106:385-388.
19. Schnitt SJ, Vogel H. Meningiomas. Diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. *Am J Surg Pathol*. 1986;10: 640-649.
20. Kajimoto Y, Kuroiwa T, Miyatake S, Ichioka T, Miyashita M, Tanaka H, et al. Use of 5-aminolevulinic acid in fluorescence-guided resection of meningioma with high risk of recurrence. Case report. *J Neurosurg*. 2007;106:1070-1074.
21. Foster N, Eljamel S. ALA-induced fluorescence image guided surgery of meningiomas: a meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;15:73-78.
22. Motekallefi A, Jeltama HJ, Metzemaekers JD, van Dam GM, Crane LM, Groen KJ. The current status of 5-ALA fluorescence-guided resection of intracranial meningiomas—a critical review. *Neurosurg Rev*. 2015;38:659-668.
23. Valdes PA, Bekelis K, Harris BT, Wilson BC, Leblond F, Kim A, et al. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in meningioma: qualitative and quantitative measurements in vivo. *Neurosurg*. 2014;10(suppl. 1):74-82 [discussion: 82-83].
24. Valdes PA, Leblond F, Kim A, Harris BT, Wilson BC, Fan X, et al. Quantitative fluorescence in intracranial tumor: implications for ALA-induced PpIX as an intraoperative biomarker. *J Neurosurg*. 2011;115:11-17.
25. Hefti M. Comment concerning: intraoperative 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in meningiomas. *Acta Neurochir DOI 10.1007/s00701-010-0708-4*. Intratumoral heterogeneity and fluorescence intensity in meningioma after 5-ALA pretreatment. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011;153: 959-960.
26. Bretner H, Gefeller O. Variation of sensitivity, specificity, likelihood ratios and predictive values with disease prevalence. *Stat Med*. 1997;16:981-991.
27. Cornelius IF, Sloty PJ. Meningioma surgery in the era of 5-aminolevulinic acid fluorescence-guided surgery. *J Neurosurg*. 2014;121:766.

**Conflict of interest statement:** The authors declare that the article content was composed in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Parts of the results have been presented at the 67th National Congress of the German Society of Neurosurgery (DGNC), 2016, Frankfurt, Deutschland.

Received 7 June 2017; accepted 23 August 2017

Citation: *World Neurosurg*. (2017) 108:118-127.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2017.08.140>

Journal homepage: [www.WORLDNEUROSURGERY.org](http://www.WORLDNEUROSURGERY.org)

Available online: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

1878-8750/\$ - see front matter © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 3 Diskussion

### 3.1 Kalibration des Spektrometers

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe erfolgte die Kalibrierung des Spektrometers. Jenes Verfahren wurde zuvor schon in zwei Arbeiten aus dem neurochirurgischen Labor der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt, weiterentwickelt [1, 37, 46] und in ähnlicher Art durch Kim et al. [53] etabliert. Wie Cornelius et al. in seiner Arbeit schon zeigte, wurden die Messungen mit geschwärzten *96-Well*-Platten vorgenommen, die sowohl dem Problem der Verunreinigung durch inadäquate Reinigung des mehrfach benutzten Probenröhrchens sowie einer Messwertverfälschung durch Streulicht aus benachbarten Wells entgegenwirken konnten [37]. Anders als in den vorangegangenen Arbeiten wurde die Herstellung der Lösung bereits unter maximal möglichem Lichtausschluss hergestellt, um so den *Photobleaching*-Effekt (s.u.) möglichst gering zu halten. Dies beinhaltete insbesondere auch die Abdunkelung des Raumes und ausschließliches Verwenden von lichtundurchlässigen Gefäßen und Pipettenspitzen. So konnten mit den aktuellen Verdünnungsreihen die Ergebnisse der vorangegangenen Studien reproduziert und dadurch eine Vergleichbarkeit zu diesen Studien gewährleistet werden.

### 3.2 Perioperative Tumorkartierung

Um die Fragestellung einer potenziellen Abnahme der Fluoreszenzintensität vom Tumorzentrum in Richtung Peripherie eingehend zu analysieren, wurde in der durchgeführten Studie der Entnahmeort der zu untersuchenden Gewebeprobe kartiert. Nachdem Kim et al. in seiner Arbeit bereits zeigen konnte, dass im Tiermodell die Intensität der Fluoreszenz im direkten Bereich der Gliom-Tumorinjektion im Vergleich zur gegenseitigen Hirnhemisphäre deutlich erhöht ist, konnten weitere Studien dies auch für Meningeome bestätigen [53, 54]. In der Arbeit von Valdes et al. konnte mittels Spektrometer gezeigt werden, dass Meningeome unterschiedlich stark fluoreszieren [54]. Die Autoren haben 15 Meningeom-Patienten in ihre Studie eingeschlossen und Tumorbiopsien aus unterschiedlichen Bereichen analysiert. Die erste Probe haben die Autoren

jeweils aus einem stark fluoreszierenden Gebiet, eine weitere aus einem makroskopisch nicht fluoreszierenden Gebiet analysiert. Die Analyse fand intraoperativ – semiquantitativ - mittels *FGS* und zusätzlich *in vitro* mittels Spektrometer statt [54]. Anders als die Autoren haben wir die zu untersuchenden Gewebeproben nicht *ad libitum* semi-quantitativ analysiert, sondern sind nach einem für unsere Studie etablierten 2-dimensionalen Kartierungsverfahren vorgegangen. Damit ließ sich der in gleichmäßigen Abständen gewählte Entnahmeort vom Zentrum des Tumors bis in die Peripherie (mit makroskopisch nicht mehr sicher als Tumor zu identifizierbarem Gewebe) hineinreichend exakt beschreiben (s. Anhang).

Dennoch könnte das Kartierungsverfahren mithilfe eines Algorithmus perspektivisch zusätzlich automatisiert werden, um so die *Interrater*-Reliabilität zu steigern. Eine zusätzliche dreidimensionale Darstellung zur Analyse der infiltrierten Dura mater scheint nicht als zusätzlich gewinnbringend, da aufgrund des typischen Infiltrationsmusters der Meningeome eher von einem flächigen Wachstum auszugehen ist.

### 3.3 *In vivo*- versus *ex vivo*-Fluoreszenz-Messung

In dieser Arbeit wurden zum einen die Fluoreszenzbeurteilung durch den Operateur mithilfe des Verfahrens der *FGS in vivo* und zum anderen die quantitative Fluoreszenzmessung mittels Mini-Spektrometer und angeschlossener Fiberoptik *ex vivo* untersucht. Diese beiden Analysen wurden miteinander verglichen und im Anschluss mit histopathologischen Ergebnissen korreliert.

Eine wichtige Grundlage für diese Arbeit leistete Valdez et al. mit seiner vergleichenden Fluoreszenzanalyse an Glioblastomen. Nachdem dort die Patienten nach standardisiertem Protokoll eine 5-ALA-Lösung präoperativ peroral eingenommen haben [30], wurde die Fluoreszenzintensität von Glioblastomgewebe semi-quantitativ mittels *FGS* durch den Operateur bewertet. Die Bewertung bestand aus vier absteigenden Kategorien der Fluoreszenz-intensität. Diese Kategorisierung konnte wiederum erfolgreich durch ein kalibriertes, in anderen Studien bereits erfolgreiches angewendetes, Spektrometer adäquat eingesetzt werden [55]. Angelehnt an diese Arbeit wurde dasselbe Prinzip von

Cornelius et al. erfolgreich auf Meningeome übertragen [39]. Auch diese Autoren konnten mittels intraoperativer, semi-quantitativer Fluoreszenzanalyse durch den Operateur bereits den Nutzen dieser Methode bei der Meningeomextirpation aufzeigen. Schließlich wurde von Valdez et al. mittels Spektrometer-Fiberoptik-Einheit diese semi-quantitative Fluoreszenzanalyse von Meningeomen zu einer quantitativen Analyse weiterentwickelt [54].

In einer weiteren Arbeit von Cornelius et al. wurde postuliert, dass ein Zeitfenster von drei Stunden zwischen der Einnahme der Lösung und der Operationseinleitung eingehalten werden sollte, um Messwertverfälschungen durch bereits metabolisierte Komponenten zu vermeiden [37].

Wie Hadjipanayis et al. postulierten, erscheinen die Zeitdauer zwischen Resektion der Tumorprobe und deren Analyse sowie der lichtundurchlässige Probentransport aufgrund des sogenannten *Photobleaching*-Effektes von elementarer Wichtigkeit. Hadjipanayis et al. konnten zeigen, dass nach 25 Minuten unter Licht mit einem anteiligen blauen Spektralbereich bereits eine Reduktion der Fluoreszenz von 36% im Vergleich zur unmittelbaren Resektionssituation messbar ist [56]. In der von Cornelius et al. durchgeführten Studie zeigte sich eine durchschnittliche Zeit zwischen Tumorexstirpation und Analyse von 15.88 Minuten [37]. Um diesen potentiellen Störfaktor zu minimieren, beschleunigten wir diesen Prozess durch Platzierung des Spektrometers in unmittelbarer Lage am Operationssaal. Schließlich ließ sich so eine durchschnittliche Zeitdifferenz zwischen Probenextirpation und erstmaliger Fluoreszenzmessung von durchschnittlich weniger als 60 Sekunden erreichen. Um selbst bei diesem kurzen Transport die vorbeschriebenen *Confounder* durch den *Photobleaching*-Effekt zu minimieren wurden die Tumorproben zum Schutz vor Fluoreszenzverlust zusätzlich noch in einem lichtundurchlässigen Behältnis transportiert [37, 56].

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine quadratische Abnahme der Fluoreszenzintensität zum sich erhöhenden Messabstand besteht, sodass bei unseren Analysen auf einen möglichst direkten, aber nicht komprimierenden Kontakt zwischen Messsonde und Tumorprobe geachtet wurde [37].

So konnte insgesamt die Intensität zwischen dem *in vivo*-Verfahren (FGS) und dem *ex vivo*-Verfahren (Spektrometer) besser miteinander verglichen werden.

Wie auch Valdes et al. [55] schon untersuchten, konnte eine eindeutig bessere Messung der Fluoreszenzintensität und somit eine zuverlässigere Tumordetektion mittels Mini-Spektrometer im Vergleich zur FGS nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der von uns durchgeführten Studie entsprechen den in anderen Studien beobachteten: Sensitivität: Mini-Spektrometer 93% vs. 53% FGS vs. Valdes et al: Spektrometer: 76-94% (je nach Versuchsaufbau) vs. FGS 61%, [54, 57]. Ein Erklärungsansatz für die Diskrepanz beider Verfahren wurde zuvor schon in mehreren Studien geäußert: Der Abstand zwischen Lichtquelle und Tumorprobe, die untersucht werden soll, ist elementar [37]. Wie zuvor beschrieben, wurde bei der *ex vivo*-Messung mit dem Mini-Spektrometer die Messsonde direkt auf die Probe, die es zu analysieren galt, positioniert. Unter den Kautelen einer FGS ist dies unmöglich, da schon allein der Mindestabstand zwischen dem Mikroskop und der Probe aus bautechnischen Gründen immer mehr als 50cm betrug (sog. Arbeitsabstand). Dieser Abstand führt weiterhin zu Lichtzerstreuungseffekten, welche zusätzlich einen negativen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität haben [37]. Allerdings zeigt auch die FGS-Methode Vorteile, die es im operativen Setting zu diskutieren gilt:

- 1) Eine gleichzeitige Beleuchtung zur Fluoreszenzanregung kann bei andauernder Operation mithilfe der FGS stattfinden [30].
- 2) Der simultane Einsatz verbessert zudem die Operationszeit, indem keine Zeit durch zeit- und personalaufwendige Instrumente verloren geht.
- 3) Außerdem stellt der Verzicht auf Einbringen von zusätzlichem Fremdmaterial in den Situs einen wichtigen Aspekt dar [58].

Wird die Spektrometer-Fiberoptik-Einheit genutzt, so muss eine Messsonde in den Situs eingebracht werden. Dies kann zum einen wegen der engen zerebralen anatomischen Verhältnisse zu mechanischen Gewebeverletzungen führen, zum anderen aber auch zu Fehlmessungen bei Falschanwendung. Aufgrund der vielen chirurgischen Geräte und Instrumente, die zum Einsatz kommen, erhöht sich die Gefahr von Infektionen im perioperativen Umfeld [58]. Wird die FGS-Methode eingesetzt, kann prinzipiell die gesamte Tumorausdehnung schnell und großflächig überblickt werden. Bei Nutzung der Spektrometer-Fiberoptik-Einheit ist hingegen nur eine punktuelle, dafür aber quantitative Gewebeanalyse möglich. Werden die individuellen Vor- und Nachteile gegenübergestellt, so zeigt sich, dass es gewinnbringend erscheint, beide Verfahren komplementär zu

nutzen. Mittels *FGS* kann schnell ein erster Überblick generiert werden, durch den der Tumor sicher dargestellt und reseziert werden kann. Im weiteren Operationsverlauf ist es möglich, mithilfe des Spektrometers fragliche Tumordinfiltrationen, beispielsweise der Dura mater, zu erkennen, was eine sichere Resektion in Tumorrandgebieten unter maximaler Duraschonung ermöglichen kann. So kann der bestmögliche Kompromiss zwischen optimaler Tumorresektion und maximaler Schonung der Dura erreicht werden.

### 3.4 Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von infiltrierter Dura Mater

Für die vorliegende Arbeit war insbesondere die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der Tumordinfiltration ausgehend vom Meningeom in die umliegende Dura mater wichtig. Es lagen zwar schon erfolgsversprechende Arbeiten vor, welche einen Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und der Tumordinfiltration thematisierten [37, 39, 54, 57], eine Studie zur direkten Quantifizierung der Fluoreszenzintensität entlang der Dura mater war und ist bis dato allerdings nicht durchgeführt worden. In Bezug auf den Entnahmeort der einzelnen Gewebeproben konnte ein abfallender Grad der Tumordinfiltration vom Tumorzentrum in Richtung Peripherie nachgewiesen werden, welcher mit der Fluoreszenzintensität korrelierte [59]. Die *Interrater*-Reliabilität stellt die Basis der Berechnung des Cohens-Kappa-Koeffizienten dar. Wurde die *Interrater*-Reliabilität zwischen der histopathologischen Auswertung der Tumordinfiltration mit der gemessenen beziehungsweise bestimmten Fluoreszenzintensität mit dem Mini-Spektrometer verglichen, zeigte sich eine signifikant bessere Reliabilität als jene, die mithilfe der *FGS* bestimmt wurde (76 % zu 33 %).

Die Bestimmung eines *cut-off*-Wertes des als positiv einzuschätzenden Fluoreszenz-Signals für eine Tumordinfiltration erfolgte mittels einer *Receiver-Operating-Characteristic-Analyse* (*ROC*-Analyse), bei der ein Wert größer als  $800 \cdot 10^3$  a.u. als tumorpositives Signal herausgearbeitet werden konnte (*AUC*: 0,9689349) [60, 61]. Derzeit wird die Angabe und Berechnung der Fluoreszenzintensität noch in arbiträren Einheiten (*arbitrary units, a. u.*) angezeigt. Kim et al. konnte in seiner Arbeit bereits mithilfe eines technisch sehr aufwendigen *ex vivo*-Mausmodell die Ermittlung von absoluten PPIX-Konzentrationen vorantreiben

[53]. Auch Valdes et al. konnte in seiner Studie mittels Spektrometer und einer Attenuationskorrektur bereits zeigen, dass es möglich ist, quantitative PPIX-Konzentrationen ( $\mu\text{g/ml}$ ) der zu untersuchenden Gewebeprobe zu bestimmen [54]. In einer Studie von Cornelius et al. konnte mithilfe einer Vereinfachung der ursprünglich von Kim et al. implementierten Methode eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von absoluten PPIX-Konzentrationen geschaffen werden [37]. Diese können allerdings aufgrund der fehlenden Einbeziehung von diversen *Confoundern*, wie zum Beispiel dem noch nicht definierten und quantifizierten Einfluss von Hämoglobin, nur als Annäherung betrachtet werden.

Es wird nun angestrebt, in Zukunft eine einfache und exakte mathematisch-statistische Berechnung in die von uns verwendete Spektrometer-Software zu implementieren, um die aktuell von uns verwendeten a.u. in reale PPIX-Konzentrationen in der Einheit  $\mu\text{g/ml}$  zu überführen. Dies würde zukünftig ermöglichen, den *cut-off*-Wert für als positiv zu wertende Tumordinfiltrationen im Rahmen fest quantifizierbarer SI-Einheiten noch exakter zu bestimmen und interinstitutionell zu quantifizieren.

Zusammengefasst zeigten unsere Untersuchungen, dass eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von infiltrierter Dura mater möglich ist und dass diese mit der histopathologisch nachgewiesenen Tumordinfiltration korreliert. In Zukunft soll dies intraoperative Anwendungen unterstützen.

### 3.5 Störfaktoren der Fluoreszenzintensitätsmessung

Ein anderer Aspekt, der diskutiert werden sollte, ist der Einfluss von verschiedenen Störfaktoren auf die Fluoreszenzintensität. Ein bereits mehrfach in der Literatur beschriebenes Problem ist der Einfluss von Blut und dem enthaltenen Hämoglobin auf die Fluoreszenzintensität. Die durch Hämoglobin induzierte Absorption des Exzitationslichtes wird in der Literatur thematisiert [53]. Diese Annahme konnte im Rahmen der Messungen reproduziert werden, da die Fluoreszenzintensität bei Gewebeproben, die durch Blut verunreinigt waren, deutlich reduziert war [53].

Der Operationssitus wird zur optimierten Darstellung der Strukturen oft mit Kochsalzlösung gespült. Dadurch wird zwar die Oberfläche der Gewebeproben,

die untersucht werden sollen, von Frischblut befreit, dies beeinflusst allerdings die oberflächlichen Gefäße und die dort enthaltenen, mit Hämoglobin angereicherten Erythrozyten nicht. Deshalb war die Analyse von an Gefäßen angrenzenden Geweben erheblich erschwert. Es verhielt sich zudem so, dass auch koaguliertes Blut auf der Gewebeoberfläche nicht immer vollständig durch oberflächliche Reinigung mit Kochsalzlösung eliminiert werden konnte. Obwohl die Oberfläche, die analysiert wurde, vor der Fluoreszenzmessung durch FGS mit Kochsalzlösung gespült wurde, war es nicht möglich, ein standardisiertes Verfahren für die "Gewebeoberflächenreinigung" festzulegen, ohne dass dadurch die Gefahr einer mechanischen Gewebeschädigung ganz ausgeschlossen werden konnte. Somit konnte die störende Wirkung von Hämoglobin während der Analyse der Fluoreszenzintensität nicht komplett eliminiert werden. Bei der Analyse durch das Spektrometer konnte die Gewebeprobe weiteren Reinigungen mit Kochsalz unterzogen werden – zusätzlich zu der bereits unternommenen oberflächlichen *in vivo*-Reinigung. Durch dieses Verfahren konnte dieser Störfaktor weiter minimiert werden.

Wie viele Tumore des zentralen Nervensystems sind auch Meningeome durch ein nicht physiologisches Wachstumsmuster charakterisiert [1, 3]. Insbesondere die gesteigerte Angiogenese zeigt sich als potenzieller Störfaktor bei der Fluoreszenzanalyse (angiomatöse Form). Das Hämoglobin, welches in diesen zahlreichen oberflächlich gelegenen Gefäßen enthalten ist, absorbiert durch den oben beschriebenen Mechanismus Fluoreszenzlicht. Weitere Charakteristika dieses pathologischen Wachstumsmusters sind unter anderem eine unregelmäßige Oberflächenbeschaffenheit aufgrund abnormaler Dichte und Konfiguration der einzelnen Tumorzellen. Insbesondere der im Verhältnis zur Tumorzelle häufig vergrößerte Zellkern kann die Mitochondrien, in denen ein Teil des PPIX gespeichert wird, deutlich komprimieren [1]. Zusätzlich konnte Masubuchi et al. aber auch zeigen, dass PPIX wahrscheinlich durch Tumorzell-Apoptose sowie aktiver Diffusion extrazellulär vorkommen kann [62]. Dies kann ein Erklärungsansatz für die positive Fluoreszenzintensität einer Tumornekrose darstellen. Das Auftreten dieser nekrotischen Areale wird häufig in höhergradigen Meningeomen beobachtet [1, 3]. Durch diese Zellvariabilität ist eine Vergleichbarkeit der Fluoreszenzanalyse teilweise erschwert und stellt einen

Diskussionsansatz für Messvariabilitäten an Messorten, die sich in unmittelbarer Nähe befinden, dar.

Die Eindringtiefe des emittierten Lichtes liegt bei unter 1mm. Dadurch sind insbesondere fibromatöse Meningeome, also Tumore die sich durch einen ausgeprägten derben Bindegewebsanteil auszeichnen, prädestiniert für eine falsch-negative Klassifikation, sodass insbesondere bei diesem Subtypen von einer erniedrigten Sensitivität der fiberoptischen Messung auszugehen sein muss [63]. Des Weiteren muss auch der Einfluss von thermisch koagulierte Gewebe auf die Fluoreszenzintensität bedacht werden. Dieses Gewebe, dem neben einer thermischen zugleich auch eine mechanische Schädigung zugeführt wurde, zeigte keine Fluoreszenz. Dieser Effekt ließ sich jedoch aufgrund der zugrunde liegenden Pathophysiologie und Zerstörung von vitalem Gewebe – und damit auch dem Nachweis von PPIX – erwarten. Aus diesem Grund wurden die Gewebeprobe – soweit es operativ möglich war - mithilfe von mikrochirurgischen Instrumentarien ohne Koagulation entfernt, um diesen *Confounder* zu minimieren [64].

In der durchgeführten Studie konnte die lokale Hitzewirkung auf benachbartes vitales, das heißt nicht koaguliertes, Gewebe nicht sicher bewertet werden. Dies ist ein Faktor, dem sich in künftigen Studien besonders gewidmet werden sollte. Als externer Störfaktor der Fluoreszenzanalyse offenbart sich der nicht vollständig abgedunkelte Messbereich, der sich sowohl intraoperativ als auch bei der anschließenden Messung unter Laborbedingungen nicht vollständig realisieren lässt. Durch Streulicht aus anderen Lichtquellen kann die empfindliche Wellenlängenanalyse überstrahlt werden und so ein falsches Messergebnis generieren [53, 55].

Weitere Störfaktoren der Fluoreszenzintensität sind Gegenstand aktueller klinischer Forschung. Insbesondere der Einfluss von Steroiden, Antikonvulsiva und der Zustand nach Chemotherapie und/oder Strahlentherapie werden hier untersucht [63].

## 3.6 Limitation

Die Anzahl von 13 Patienten war vergleichsweise gering. Um die Aussagekraft der Studie zu erhöhen, wurden jedoch von jedem Patienten durchschnittlich acht Gewebeproben entnommen, so dass insgesamt 104 Biopsien untersucht wurden. Insgesamt konnten nach statistischer Berechnung mittels Cohen's Kappa-Analyse alle Ergebnisse als in sich konsistent bewertet werden. Die Anzahl der Proben war ausreichend, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen ( $p < 0.05$ ). Das Zeitfenster zwischen der Verabreichung des 5-ALA und der Operationseinleitung wurde in jedem Einzelfall genau bestimmt (durchschnittliche Zeitdauer: 03h32min, Min.: 02h30min, Max.: 07h12min).

Der Vergleich zwischen der Analyse der Fluoreszenzintensität durch *FGS* und der Spektrometer-Fiberoptik-Einheit ergab einige Limitationen: Das größte Problem stellte in dieser Studie der auffällig variable Abstand zwischen der Gewebeprobe und der Lichtquelle im Operationsmikroskop im Vergleich zu der Spektrometer-Fiberoptik-Einheit dar. Außerdem unterscheidet sich der abgedunkelte Operationssaal deutlich von einer Dunkelkammer, da ein gewisses Maß an Restlicht im Operationssaal durch medizinische Apparaturen (Monitore, Perfusoren etc.) nicht komplett vermeidbar ist. Es ist aber grundsätzlich zu hinterfragen, ob eine völlige Abdunkelung des gesamten Operationssaales auch tatsächlich vonnöten ist, da vermutlich die Installation einer einem Schutzschirm ähnlichen Manschette an der Messsonde bei direktem oberflächlichen Gewebekontakt ausreichen würde, um diesen *Confounder* auszuschalten. Dies sollte Thema weiterer Untersuchungen in neuen klinischen Studien werden. Die durch *FGS* analysierte Fluoreszenzintensität konnte außerdem nicht punktuell, sondern nur großflächig analysiert werden, was die semi-quantitative Kategorisierung während der *FGS* erschwerte.

Wegen der beschriebenen Limitationen der *FGS* scheint eine zusätzliche intraoperative Anwendung eines Spektrometers mit Fiberoptik der nächste logische Schritt zu sein. Die Einschränkungen, die sich hierdurch ergeben und gerade diskutiert wurden, sollten die intraoperative Anwendung grundsätzlich nicht negativ beeinflussen. Auch können diese durch kleine bauliche Änderungen optimiert werden.

### 3.7 Zukunftsperspektiven

Das übergeordnete Anliegen dieser Arbeit war es, eine intraoperativ nutzbare spektrometrische Messeinheit für den Einsatz bei Meningeomen zu testen. Diese Messeinheit kann nahezu in Echtzeit (Messdauer: 20ms) das Tumorgewebe, welches makroskopisch nicht sicher identifiziert werden kann, erkennen und analysieren. Im Rahmen der Analyse sollte durch die quantitative Fluoreszenzintensitätsmessung und die gezeigte Korrelation zum Infiltrationsgrad eine erste Auswertung bezüglich des Ausmaßes der Tumordinfiltration erfolgen können. Der routinierte Operationsablauf sollte keine Beeinträchtigung durch das kleine, leichte und bewegliche Handstück erfahren, welches sowohl die Lichtquelle als auch die Glasfaserleitung beinhaltet, die das Handstück mit dem Spektrometer verbindet. Durch den Gesamtdurchmesser der Messsonde (ca. 1mm) kann eine punktuelle und genaue Gewebeanalyse erfolgen. Im Gegensatz dazu liegen die Stärken der FGS in der flächigen und grob orientierenden Fluoreszenzmessung, die einem taschenlampenartigen Lichtkegel ähnelt und große Tumorareale orientierend abbilden kann. Eine komplementäre Anwendung beider Verfahren scheint ausgesprochen erfolgversprechend. So könnten auch tieferliegende Strukturen ohne Streulichtverluste – wie bei der FGS-Methode – durch den direkten Kontakt zwischen Messeinheit und Gewebe einfach vermessen werden. Da das rezidivfreie Überleben maßgeblich von der Radikalität der Operation abhängt, sollte das Potential einer intraoperativen Gewebeanalyse genutzt werden, welches das Risiko für den Patienten minimiert und das Resektionsergebnis verbessern könnte.

Deshalb wäre dringend zu empfehlen, die Marktzulassung und Zertifizierung der Spektrometer-Fiberoptik-Einheit als Medizinprodukt voranzutreiben, um eine intraoperative *in vivo*-Nutzung zu ermöglichen.

### 3.8 Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Versuche zeigten zusammengefasst, dass die Spektrometer-Fiberoptik-Einheit im Rahmen der Fluoreszenzintensitätsanalyse der *FGS* überlegen ist. Insbesondere im Übergangsbereich vom Meningeom in die Dura mater genügt die semi-quantitative Analyse durch einen Chirurgen mithilfe eines Operationsmikroskopes häufig nicht. Die *FGS*-Methode, wie oben besprochen, bringt aber auch einige Vorteile, sodass ein gleichzeitiger Einsatz beider Verfahren wünschenswert wäre.

Durch die Spektrometer-Fiberoptik-Einheit ist die Tumordinfiltration der Dura mater quantitativ zu bestimmen. Dies kann den Operateur dabei unterstützen, die genaue Tumorausdehnung radiär um das bestehende Meningeom zu identifizieren, um so zielgerichteter und gleichzeitig Dura-schonend zu resektieren. Durch die alleinige Nutzung der *FGS* war die Analyse von infiltrierter Dura mater bislang nicht sicher möglich.

Abschließend lassen unsere durchgeführten Experimente die Schlussfolgerung zu, dass die Spektrometer-Fiberoptik-Einheit neben der *FGS* einen weiteren erfolgsversprechenden Ansatz der Fluoreszenz-basierten Hilfsmittel bei der Tumordetektion darstellt. Mittels der intraoperativen Nutzung könnte die gezielte Radikalität der Meningeomexstirpation gesteigert und so das Rezidivrisiko gesenkt werden. Auf diese Weise könnte das rezidivfreie Überleben der Patienten verlängert und gesichert werden.

## 4 Verzeichnisse

### 4.1 Literatur- und Quellenverzeichnis

(Zusätzliche Literatur der Originalarbeit: Literaturquellen 65-70)

1. Wiemels, J., M. Wrensch, and E.B. Claus, *Epidemiology and etiology of meningioma. J Neurooncol*, 2010. **99**(3): p. 307-14.
2. Sadetzki, S., et al., *An iatrogenic epidemic of benign meningioma. Am J Epidemiol*, 2000. **151**(3): p. 266-72.
3. Goldbrunner, R., et al., *EANO guidelines for the diagnosis and treatment of meningiomas. Lancet Oncol*, 2016. **17**(9): p. e383-91.
4. Bi, W.L., et al., *Meningioma Genomics: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. Front Surg*, 2016. **3**: p. 40.
5. Valery, C.A., et al., *Grade II meningiomas and Gamma Knife radiosurgery: analysis of success and failure to improve treatment paradigm. J Neurosurg*, 2016. **125**(Suppl 1): p. 89-96.
6. Kshetry, V.R., et al., *Descriptive epidemiology of World Health Organization grades II and III intracranial meningiomas in the United States. Neuro Oncol*, 2015. **17**(8): p. 1166-73.
7. Ron, E., et al., *Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. N Engl J Med*, 1988. **319**(16): p. 1033-9.
8. Group, I.S., *Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. Int J Epidemiol*, 2010. **39**(3): p. 675-94.
9. Momoli, F., et al., *Probabilistic Multiple-Bias Modeling Applied to the Canadian Data From the Interphone Study of Mobile Phone Use and Risk of Glioma, Meningioma, Acoustic Neuroma, and Parotid Gland Tumors. Am J Epidemiol*, 2017. **186**(7): p. 885-893.
10. Lamszus, K., et al., *Allelic losses in neurofibromatosis 2-associated meningiomas. J Neuropathol Exp Neurol*, 2000. **59**(6): p. 504-12.
11. Nebbal, M. and M. Sindou, *[Imaging for the management of cavernous sinus meningiomas]. Neurochirurgie*, 2008. **54**(6): p. 739-49.
12. Dowd, C.F., V.V. Halbach, and R.T. Higashida, *Meningiomas: the role of preoperative angiography and embolization. Neurosurg Focus*, 2003. **15**(1): p. E10.
13. Zhang, H., et al., *Preoperative subtyping of meningiomas by perfusion MR imaging. Neuroradiology*, 2008. **50**(10): p. 835-40.
14. Rockhill, J., M. Mrugala, and M.C. Chamberlain, *Intracranial meningiomas: an overview of diagnosis and treatment. Neurosurg Focus*, 2007. **23**(4): p. E1.
15. Takeguchi, T., et al., *The dural tail of intracranial meningiomas on fluid-attenuated inversion-recovery images. Neuroradiology*, 2004. **46**(2): p. 130-5.
16. Ikawa, F., et al., *Review of Current Evidence Regarding Surgery in Elderly Patients with Meningioma. Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2017. **57**(10): p. 521-533.
17. Kuratsu, J., M. Kochi, and Y. Ushio, *Incidence and clinical features of asymptomatic meningiomas. J Neurosurg*, 2000. **92**(5): p. 766-70.

18. Lieu, A.S. and S.L. Howng, Intracranial meningiomas and epilepsy: incidence, prognosis and influencing factors. *Epilepsy Res*, 2000. **38**(1): p. 45-52.
19. Louis, D.N., et al., The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 2016. **131**(6): p. 803-20.
20. Simpson, D., The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1957. **20**(1): p. 22-39.
21. Bumrungrachpukdee, P., et al., Recurrence of intracranial meningioma after surgery: analysis of influencing factors and outcome. *J Med Assoc Thai*, 2014. **97**(4): p. 399-406.
22. Mirimanoff, R.O., et al., Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg*, 1985. **62**(1): p. 18-24.
23. Kaul, D., et al., Linac-based stereotactic radiotherapy and radiosurgery in patients with meningioma. *Radiat Oncol*, 2014. **9**: p. 78.
24. Choi, Y., et al., Efficacy of postoperative radiotherapy for high grade meningiomas. *J Neurooncol*, 2014. **119**(2): p. 405-12.
25. Hardesty, D.A., et al., The impact of adjuvant stereotactic radiosurgery on atypical meningioma recurrence following aggressive microsurgical resection. *J Neurosurg*, 2013. **119**(2): p. 475-81.
26. Soyuer, S., et al., Radiotherapy after surgery for benign cerebral meningioma. *Radiother Oncol*, 2004. **71**(1): p. 85-90.
27. Pasquier, D., et al., 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*, 2008. **71**(5): p. 1388-93.
28. Peng, Q., et al., 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer*, 1997. **79**(12): p. 2282-308.
29. Peng, Q., et al., 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem Photobiol*, 1997. **65**(2): p. 235-51.
30. Stummer, W., et al., Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, 2006. **7**(5): p. 392-401.
31. Paragh, G. and N.C. Zeitouni, Two-Step Irradiance Treatment Can Achieve Excellent Pain Control During Red Light 5-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy for Actinic Keratoses. *Photomed Laser Surg*, 2017.
32. Kang, Z., et al., Recent advances in production of 5-aminolevulinic acid using biological strategies. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017. **33**(11): p. 200.
33. Bedwell, J., et al., Fluorescence distribution and photodynamic effect of ALA-induced PP IX in the DMH rat colonic tumour model. *Br J Cancer*, 1992. **65**(6): p. 818-24.
34. Hefti, M., et al., Susceptibility to 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in WHO I meningioma cells corresponds to ferrochelatase activity. *Photochem Photobiol*, 2011. **87**(1): p. 235-41.

35. Kennedy, J.C. and R.H. Pottier, Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful Photosensibilisator for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 1992. **14**(4): p. 275-92.
36. Della Puppa, A., et al., 5-Aminolevulinic acid fluorescence in high grade glioma surgery: surgical outcome, intraoperative findings, and fluorescence patterns. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 232561.
37. Cornelius, J.F., et al., Minispectrometer with handheld probe for 5-ALA based fluorescence-guided surgery of brain tumors: preliminary study for clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2016.
38. Colditz, M.J., K. Leyen, and R.L. Jeffree, Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 2: theoretical, biochemical and practical aspects. *J Clin Neurosci*, 2012. **19**(12): p. 1611-6.
39. Cornelius, J.F., et al., 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*, 2014. **11**(4): p. 481-90.
40. Coluccia, D., et al., Intraoperative 5-aminolevulinic-acid-induced fluorescence in meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)*, 2010. **152**(10): p. 1711-9.
41. Kajimoto, Y., et al., Use of 5-aminolevulinic acid in fluorescence-guided resection of meningioma with high risk of recurrence. Case report. *J Neurosurg*, 2007. **106**(6): p. 1070-4.
42. Cornelius, J.F. and P.J. Slotty, Meningioma surgery in the era of 5-aminolevulinic acid fluorescence-guided surgery. *J Neurosurg*, 2014. **121**(3): p. 766.
43. Senders, J.T., et al., Agents for fluorescence-guided glioma surgery: a systematic review of preclinical and clinical results. *Acta Neurochir (Wien)*, 2017. **159**(1): p. 151-167.
44. Kamp, M.A., et al., Various shades of red-a systematic analysis of qualitative estimation of ALA-derived fluorescence in neurosurgery. *Neurosurg Rev*, 2016.
45. Wilbers, E., et al., Usefulness of 5-ALA (Gliolan(R))-derived PPX fluorescence for demonstrating the extent of infiltration in atypical meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)*, 2014. **156**(10): p. 1853-4.
46. Cornelius, J.F., et al., Enhancing the effect of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in human meningioma cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2014. **11**(1): p. 1-6.
47. Foster, N. and S. Eljamel, ALA-induced fluorescence image guided surgery of meningiomas: A meta-analyses. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2016. **15**: p. 73-8.
48. Motekallemi, A., et al., The current status of 5-ALA fluorescence-guided resection of intracranial meningiomas-a critical review. *Neurosurg Rev*, 2015. **38**(4): p. 619-28.
49. Kennedy, J.C., R.H. Pottier, and D.C. Pross, Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B*, 1990. **6**(1-2): p. 143-8.
50. Perria, C., et al., Fast attempts at the photodynamic treatment of human gliomas. *J Neurosurg Sci*, 1980. **24**(3-4): p. 119-29.

51. Buytaert, E., M. Dewaele, and P. Agostinis, *Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1776**(1): p. 86-107.
52. Oleinick, N.L., R.L. Morris, and I. Belichenko, *The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how*. *Photochem Photobiol Sci*, 2002. **1**(1): p. 1-21.
53. Kim, A., et al., *Quantification of in vivo fluorescence decoupled from the effects of tissue optical properties using fiber-optic spectroscopy measurements*. *J Biomed Opt*, 2010. **15**(6): p. 067006.
54. Valdes, P.A., et al., *5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in meningioma: qualitative and quantitative measurements in vivo*. *Neurosurgery*, 2014. **10 Suppl 1**: p. 74-82; discussion 82-3.
55. Valdes, P.A., et al., *Combined fluorescence and reflectance spectroscopy for in vivo quantification of cancer biomarkers in low- and high-grade glioma surgery*. *J Biomed Opt*, 2011. **16**(11): p. 116007.
56. Hadjipanayis, C.G., G. Widhalm, and W. Stummer, *What is the Surgical Benefit of Utilizing 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Surgery of Malignant Gliomas?* *Neurosurgery*, 2015. **77**(5): p. 663-73.
57. Valdes, P.A., et al., *Quantitative fluorescence in intracranial tumor: implications for ALA-induced PpIX as an intraoperative biomarker*. *J Neurosurg*, 2011. **115**(1): p. 11-7.
58. Dancer, S.J., et al., *Surgical site infections linked to contaminated surgical instruments*. *J Hosp Infect*, 2012. **81**(4): p. 231-8.
59. Knipps, J., et al., *Fluorescence Behavior and Dural Infiltration of Meningioma Analyzed by 5-Aminolevulinic Acid-Based Fluorescence: Operating Microscope Versus Mini-Spectrometer*. *World Neurosurg*, 2017. **108**: p. 118-127.
60. Greiner, M., D. Pfeiffer, and R.D. Smith, *Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests*. *Prev Vet Med*, 2000. **45**(1-2): p. 23-41.
61. Zou, K.H., A.J. O'Malley, and L. Mauri, *Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models*. *Circulation*, 2007. **115**(5): p. 654-7.
62. Masubuchi, T., et al., *Experimental study to understand nonspecific protoporphyrin IX fluorescence in brain tissues near tumors after 5-aminolevulinic acid administration*. *Photomed Laser Surg*, 2013. **31**(9): p. 428-33.
63. Hefti, M., et al., *5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence in high-grade glioma surgery: a one-year experience at a single institution*. *Swiss Med Wkly*, 2008. **138**(11-12): p. 180-5.
64. Yaroslavsky, A.N., et al., *Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range*. *Phys Med Biol*, 2002. **47**(12): p. 2059-73.
65. Stummer, W., et al., *5-Aminolevulinic acid-derived tumor fluorescence: the diagnostic accuracy of visible fluorescence qualities as corroborated by spectrometry and histology and postoperative imaging*. *Neurosurgery*, 2014. **74**(3): p. 310-9; discussion 319-20.
66. Nambirajan, A., et al., *A Comparative Immunohistochemical Study of Epithelial Membrane Antigen and NHERF1/EBP50 in the Diagnosis of*

- Ependymomas. Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2018. **26**(1): p. 71-78.
67. Hasselblatt, M. and W. Paulus, *Sensitivity and specificity of epithelial membrane antigen staining patterns in ependymomas. Acta Neuropathol*, 2003. **106**(4): p. 385-8.
68. Schnitt, S.J. and H. Vogel, *Meningiomas. Diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. Am J Surg Pathol*, 1986. **10**(9): p. 640-9.
69. Hefti, M., *Comment concerning: Intraoperative 5-aminolevulinic-acid-induced fluorescence in meningiomas, Acta Neurochir DOI 10.1007/s00701-010-0708-4, Intratumoral heterogeneity and fluorescence intensity in meningioma after 5-ALA pretreatment. Acta Neurochir (Wien)*, 2011. **153**(4): p. 959-60.
70. Brenner, H. and O. Gefeller, *Variation of sensitivity, specificity, likelihood ratios and predictive values with disease prevalence. Stat Med*, 1997. **16**(9): p. 981-91.

## 4.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: MRT (T1-Gewichtung) eines Falx-Meningeoms	3
Abb. 2: Vereinfachter 5-ALA Metabolismus	8
Abb. 3: Mini-Spektrometer mit angeschlossener Fiberoptik installiert in einer Dunkelkammer	10

## 4.3 Tabellenverzeichnis

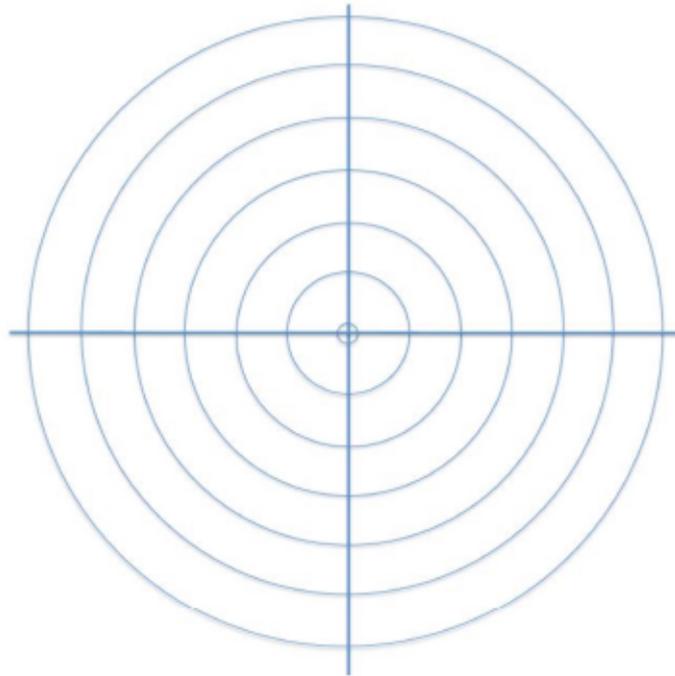
Tabelle 1: Klassifikation der Meningeome	4
Tabelle 2: Simpson-Klassifikation der Meningeome	5

# 5 Anhang

Kartierungsschema zur Beschreibung der exakten Lokalisation der Tumorproben

## Lokalisation der Gewebeproben

Pat.-ID:  
Datum:  
Nummer:



Probe	Lokalisation	Makro. ALA	Fiberoptik ALA	Wert (635nm)	Lokalisation	Patho.-Analyse
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						

# Danksagung

Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen (M.C. Cicero).

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med J.F. Cornelius bedanken. Er hat mich ausgezeichnet betreut, unterstützt und stand mir jederzeit als Ansprechpartner zur Seite. Danken möchte ich auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Steiger für die Möglichkeit und Schaffung der Rahmenbedingungen in seiner neurochirurgischen Klinik promovieren zu dürfen. Ich danke herzlich der MTA des neurochirurgischen Forschungslabor Frau Brigitte Senger für die Einführung in grundlegende Arbeitsweisen eines Forschungslabors. Weiter hat mich Frau Senger während jedweder experimenteller Forschungsabläufe unterstützt und stand mit wertvollen Tipps stets parat. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin und Kollegin Lisa M. Neumann. Sie hat mich während des gesamten Promotionsvorhabens unermüdlich unterstützt, motiviert und war in jeder Lebenslage der passende Ansprechpartner. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med J. Felsberg aus dem neuropathologischen Institut für die fachliche Beratung und Unterstützung bei der histopathologischen Analyse der Tumorschnitte bedanken. Ich danke Herrn Dr. I. Fischer aus der hiesigen Klinik für Neurochirurgie für die erstklassige, kompetente Beratung bei der statistischen Aufarbeitung sowie der Einführung in seine eigens für diese Studienreihe programmierte Spektrometersoftware. Zusätzlich möchte ich mich bei allen Operateuren für die Bereitstellung von Tumorgewebe bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt allen Patienten, die sich bereit erklärt haben, an dieser Studie teilzunehmen und so die wissenschaftliche Forschung erst ermöglichen. Besonderer Dank gilt auch meinem Vater für den Bau einer Dunkelkammer sowie meinem Schwiegervater in spe für die technische Unterstützung. Abschließend möchte ich mich bei meiner gesamten Familie für die grenzenlose Unterstützung und den Zuspruch während des gesamten Studiums bedanken.

Danke!