

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuropathologische Untersuchungen an Gewebeproben vor und nach  
intraoperativem MRT bei malignen Gliomen.

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Paul

aus Craiova

Datum der Promotion: 30.05.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Abstrakt/Abstract</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1	Einführung und thematische Zielsetzung	4
2.2	Klassifizierung der Gliome	5
2.2.1	Benigne Gliome	7
2.2.2	Maligne Gliome	8
2.3	Therapie maligner Gliome	8
2.4	Prognose der Gliome	9
2.5	Proliferationsindex MIB-1	10
2.6	Mutation im Isozitatdehydrogenase-1-Gen (IDH-1)	10
2.7	BRAF-Mutation	13
2.8	Neuronavigation	13
2.9	Fluoreszenzgesteuerte Resektionsmaßnahmen	13
2.10	Intraoperative Magnetresonanztomographie bei neurochirurgischen Eingriffen	14
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1	Patientenkollektiv	17
3.2	Statistische Hilfsmittel	17
3.3	Operative Probengewinnung	17
3.4	Intraoperative Magnetresonanztomographie bei neurochirurgischen Eingriffen in der Asklepios Klinik Nord	18
3.5	Immunhistologische Untersuchungen	19

3.5.1	Immunhistologischer Marker IDH-1	21
3.5.2	Immunhistologischer Marker MIB-1/KI-67	21
3.5.3	Immunhistologischer Marker GFAP	22
3.5.4	Immunhistologischer Marker BRAF	22
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
4.1	Zusammensetzung des Patientenkollektives	24
4.2	Histologische Untersuchungsergebnisse	27
4.2.1	Histologische Ergebnisse der Hauptpräparate	27
4.2.2	Histologische Ergebnisse der Nachresektate	29
4.3	Immunhistologische Untersuchungen	34
4.3.1	Immunhistologische Ergebnisse der Hauptpräparate	34
4.3.2	Immunhistologische Ergebnisse der Nachresektate	37
4.4	Ausgewählte Falldarstellungen	49
4.4.1	Fall 1	49
4.4.2	Fall 2	50
4.4.3	Fall 3	52
4.4.4	Fall 4	53
4.4.5	Fall 5	54
4.4.6	Fall 6	55
4.4.7	Fall 7	56
4.4.8	Fall 8	56
4.4.9	Fall 9	57
4.4.10	Fall 10	57

4.4.11 Fall 11	58
4.4.12 Fall 12	59
4.4.13 Fall 13	60
4.4.14 Fall 14	60
<b>5. Diskussion</b>	<b>61</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>89</b>
<b>11. Lebenslauf</b>	<b>90</b>
<b>12. Danksagung</b>	<b>94</b>

## 1. Abstrakt/Abstract

**Einleitung:** In dieser Arbeit untersuchten wir, ob bei neurochirurgischen Eingriffen histologische und immunhistologische Unterschiede zwischen den Hauptpräparaten und dem nach einem intraoperativen MRT resezierten Gewebeproben nachweisbar sind. Das zentrale Tumorgewebe wurde mit dem nachresezierten Gewebe verglichen.

**Methoden:** Die Datenbanken der Pathologie und Neurochirurgie der Asklepios Klinik Nord wurden auf relevante Fälle durchsucht. Es erfolgte anschließend die Untersuchung der aus dem Lager entnommenen Gewebeproben hinsichtlich ihrer Histologie und ihrem Verhalten auf die Marker GFAP, MIB-1, IDH-1 und BRAF.

Durch die Demonstration ausgewählter Fälle wird der klinische Ablauf dargelegt.

**Ergebnisse:** Das Gesamtkollektiv bestand aus 33 Patienten. Vier Patienten wurden aufgrund von Rezidiven zweimal gelistet, sodass die Gesamtzahl 37 Fälle beträgt.

Die Histologie entsprach in 30 Fällen dem Glioblastoma multiforme, viermal dem anaplastischen Astrozytom, zweimal dem anaplastischen Oligoastrozytom und einmal dem anaplastischen Oligodendrogliom.

Das Grading der Nachresektate wies in 15 Proben ein identisches Verhalten auf. In 22 Proben konnten neben dem bekannten Tumorgrad auch niedrigere Grade nachgewiesen werden. Dies entspricht der Vermutung, dass bei durch das MRT sichtbaren suspekten Arealen (Tumorränder) häufig ein niedriger Grad nachweisbar ist.

Hinsichtlich des Markers GFAP sind keine neuen Erkenntnisse gewonnen worden. Mit Ausnahme des anaplastischen Oligodendrogliom, erfolgte in allen Gewebeproben ein positiver Nachweis.

Ebenso wenig Aufschluss ergab die Untersuchung auf BRAF. Nur ein epitheloides Glioblastom zeigte eine deutliche positive Färbung.

Die vergleichende Untersuchung des Proliferationsmarkers MIB-1 ergab kein signifikantes Verhalten. In jeweils 14 Proben konnte ein höherer oder niedrigerer Proliferationsindex nachgewiesen werden. Die verbleibenden 10 Gewebeproben zeigten keine Veränderung. Diese gleichmäßige Verteilung lässt keine Rückschlüsse auf eine Auffälligkeit zu.

Der Marker IDH-1 war primär in 25 Proben negativ und zeigte ein unterschiedlich ausgeprägtes Färbeverhalten in den übrigen 12 Proben. Die Untersuchung der Nachresektate zeigte bei 28

Proben keinen Wandel. In 9 Tumoren wurde eine Veränderung zur positiven Färbung beobachtet.

**Schlussfolgerung:** Entgegen unseren Erwartungen waren in den post-MRT-Präparaten nicht nur niedriggradige Gliomanteile enthalten, sondern häufig auch Höhergradige. Wobei diese sich fluoreszensoptisch nicht als solche intraoperativ darstellten. Mögliche Gründe dafür werden diskutiert. Die Stichprobe war jedoch insgesamt klein, sodass statistisch gesicherte Aussagen nicht möglich sind. Es ist aber damit zu rechnen, dass sich hinsichtlich der molekularen Strukturen noch interessante Ansätze ergeben. In allen Patientenproben, die nach dem intraoperativen MRT entnommen wurden, konnte Tumorgewebe nachgewiesen werden. Demzufolge kann auch mit dieser Arbeit die aktuelle Studienlage bezüglich der intraoperativen Bildgebung bestätigt werden. Sicher ist, dass aufgrund des intraoperativ durchgeführten MRT die Resektionsrate erhöht werden kann und somit die Patienten davon profitieren.

**Introduction:** In this study we investigated whether in neurosurgical interventions histological and immunohistochemical differences between main and resected specimens after an intraoperative MRI guided re-resection are detectable. We compared the central tumor with the re-resected tissue.

**Methods:** We searched for relevant cases in the databases of the pathology and the neurosurgery of the Asklepios Klinik Nord. The samples were examined with regard to their behavior at the marker GFAP, MIB-1, IDH-1, and BRAF.

Through the demonstration of some cases the clinical sequence are demonstrated.

**Results:** The total cohort consisted of 33 patients. 4 patients were listed twice because of recurrent disease, so a total of 37 cases were processed.

The histological examination of the main preparations demonstrated 30 glioblastoma multiforme, 4 anaplastic astrocytomas, 2 anaplastic oligoastrocytomas and one anaplastic oligodendroglioma. Grading of the re-resected specimens was in 15 samples at an identical behavior. In 22 also lower levels were detected. This corresponds to the assumption that a lower Grading is often detected in the suspicious areas noticed by the MRI (tumor margin).

In reference to GFAP no new insights have been gained. All specimens were positive for GFAP, with the exception of the oligodendroglioma.

Poor information could be gained by the investigation on BRAF. Only one glioblastoma showed a significant positive staining.

The comparative study of MIB-1 showed no significant behavior. In a total of 14 samples, a higher index could be detected. In the same number a lower MIB-1 staining is presented. The remaining 9 samples showed no change.

The marker IDH-1 was primarily negative in 25 samples and shows difference in the dyeing behavior in the remaining 12 samples. The investigation of the re-resected samples showed no change in 28 of the samples. In 10 tumors a positive staining was observed.

**Conclusion:** Contrary to our expectations in the post-MRI preparations not only low-grade parts of the glioma but also higher grade were present. They did not show themselves fluoroscopically within surgical procedure. Possible reasons for this are discussed.

The sample was too small to give valid statistical results. It is to be expected that interesting approaches to the molecular structures will be made. In all samples, taken after the intraoperative MRI, tumor tissue could be detected. We could confirm with our results the current studies regarding intraoperative imaging. Certainly, because of intraoperative MRI the resection rate can be increased and thus gaining better results for our patients.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Einführung und thematische Zielsetzung**

Im Sommer 2011 wurde in der Neurochirurgischen Abteilung der Asklepios Klinik Nord in Hamburg ein intraoperativ einsetzbarer Magnetresonanztomograph (MRT) installiert. Seitdem kommt diese Methode regelmäßig bei geeigneten neurochirurgisch therapierbaren Erkrankungen zum Einsatz. In der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Klinik wurden die eingesendeten Präparate untersucht.

Die vorliegende Untersuchung bearbeitet die Fragestellung,

1. ob eine Korrelation zwischen dem intraoperativen MRT und dem neuropathologischen Befund beschrieben werden kann. Es wurden die Gewebeproben von Patienten, die an einem gliösen Tumor erkrankt sind und operativ in der Neurochirurgie der Klinik behandelt wurden, betrachtet. Die Histologie des primär gewonnenen Tumorgewebes wurde mit der Histologie der Präparate verglichen, die nach der Durchführung des intraoperativen MRT entnommen wurden.
2. Ziel der Arbeit war es in Erfahrung zu bringen, ob das nachträglich resezierte Material ein anderes histologisches Muster aufweist als das zentrale Tumorgewebe. So wurde insbesondere auf Unterschiede im Grading der Proben geachtet. Bei den Untersuchungen wurden spezielle Marker verwendet (GFAP, IDH-1, MIB-1 und BRAF) und Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen den Primär- und Sekundärproben dargestellt. Dabei stellte sich die Frage, wie häufig Unterschiede dokumentiert werden konnten und ob diese alle Proben betreffen.

Anhand der gewonnenen pathologischen und neurochirurgischen Daten sollte ein orientierender Überblick zu diesem Thema geschaffen werden. In der Literatur fanden sich bislang keine systematisch durchgeführten Studien zu diesem Thema.



## 2.2 Klassifizierung der Gliome

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Patienten mit einbezogen, die an einem Gliom erkrankt waren. Die Gliome machen mit etwa 40% den größten Anteil der zerebralen Tumoren aus. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Der Erkrankungsgipfel liegt je nach Tumortyp zwischen der 4. und 6. Lebensdekade. Umweltbedingte Entstehungsfaktoren konnten in vielen Studien nicht eindeutig nachgewiesen werden. Eine starke Exposition von ionisierender Strahlung gilt als einziger anerkannter Risikofaktor. Die Häufigkeiten des Auftretens verschiedener Tumortypen sind aus Tabelle 1 zu entnehmen. [1; 2]

Tumortyp	WHO-Grad	Anteil an allen Hirntumoren (%)	Inzidenz (100000/Jahr)
Neuroepitheliale Tumoren	I-IV	34,3	6,46
Pilozytisches Astrozytom	I	1,7	0,33
Diffuses Astrozytom	II	0,5	0,09
Anaplastisches Astrozytom	III	2,1	0,4
Glioblastom	IV	17,1	3,17
Oligodendrogliom	II	1,4	0,27
Anaplastisches Oligodendrogliom	III	0,7	0,12
Mischgliome	II/III	1,0	0,19
Ependymom	II/III	1,4	0,26

**Tabelle 1: Häufigkeiten von Hirntumoren nach Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) [1]**

Die Klassifizierung dieser Tumoren erfolgt mittels der WHO-Einteilung nach der revidierten Fassung von 2007 (siehe Tabelle 2). Demnach gehören Gliome zu den neuroepithelialen Tumoren. Eingestuft werden sie in die Grade I bis IV. Dabei ist ein Grad-I-Tumor durch ein umschriebenes Wachstum, eine geringe Wachstumsrate, einer besseren Resektionsfähigkeit und insgesamt durch eine gute Prognose gekennzeichnet. Grad-II-Tumoren weisen infiltrative Prozesse und eine geringe Proliferationsrate auf. Sie können anaplastisch transformieren. Kennzeichen des III. Grades sind deutliche histologische Malignitätsnachweise. In Grad-IV-Tumoren sind zusätzlich Gefäßproliferationen und/oder Nekrosen belegbar, sowie ein

nachweisbar akuter Progress. Allerdings wird eine zweistufige Einteilung in low- und high-grade-Tumoren auch häufig verwendet (siehe Tabelle 3). Hintergrund ist die Tatsache, dass es keinen großen Unterschied zwischen Grad-II- und Grad-III-Tumoren gibt. Der Grad II wird vom III. Grad durch die Bestimmung des MIB-1-Index unterschieden. Einen signifikanteren Unterschied gibt es jedoch eher zwischen Grad-II- und Grad-IV-Tumoren, beziehungsweise zwischen Grad-III- und Grad-IV-Tumoren. Zu den wichtigen histologischen Kriterien gehören nukleäre Atypien, Differenzierungsgrad, Tumorzelldichte, Mitosen, Endothelproliferationen und Nekrosebildung. Die korrekte Interpretation der Gewebeproben ist stark abhängig von der Erfahrung und subjektiven Meinung des Untersuchers. [1; 3-8]

<b>Astrozytäre Tumoren</b>	
Pilozytisches Astrozytom	WHO Grad I
Astrozytom	WHO Grad II
Anaplastisches Astrozytom	WHO Grad III
Glioblastoma multiforme	WHO Grad IV
<b>Nichtastrozytäre Tumoren</b>	
Oligodendrogliom	WHO Grad II
Anaplastisches Oligodendrogliom	WHO Grad III
Oligoastrozytom (Mischgliom)	WHO Grad II
Anaplastisches Oligoastrozytom	WHO Grad III
Ependymom	WHO Grad II
Anaplastisches Ependymom	WHO Grad III

**Tabelle 2: WHO-Klassifikation ausgewählter Gliome [5]**

Der Stellenwert der TNM-Klassifikation spielt bei den Hirntumoren keine Rolle.

Lymphknoten- und Fernmetastasen treten äußerst selten auf und eine R0-Resektion ist in den meisten Fällen durch das diffus infiltrierende Wachstum nicht sicher möglich. [9]

Eine exakte Diagnose und Graduierung der astrozytären Tumoren ist essentiell für den Patienten, um eine optimale Therapie anbieten zu können. So geht die Tendenz dahin, dass niedriggradige Tumoren erst engmaschig überwacht werden, bevor therapeutisch interveniert wird. Andererseits werden hochgradige Gliome sofort und so ausgedehnt wie möglich operiert um eine pathologische Diagnosesicherung zu erhalten und die Komplikationen zu verringern. [10]

Astrozytom	low-grade	Entspricht dem WHO Grad II und III.
		Zeigt weder eine Kontrastmittelanreicherung, noch eine Endothelproliferation.
	high-grade	Entspricht dem WHO Grad IV.
		Kennzeichnend ist eine Endothelhyperplasie, -proliferation, glomeruloide Kapillarproliferation, Kontrastmittelanreicherung und häufig eine Tumorgewebenekrose.
Oligodendrogliom	low-grade	Entspricht dem WHO Grad II.
		Zeigt weder eine Kontrastmittelanreicherung, noch eine Endothelproliferation.
	high-grade	Entspricht dem WHO Grad III.
		Kennzeichnend ist eine Endothelhyperplasie, -proliferation und eine Kontrastmittelanreicherung.
Oligoastrozytom	low-grade	Entspricht dem WHO Grad II.
		Zeigt weder eine Kontrastmittelanreicherung, noch eine Endothelproliferation.
	high-grade	Entspricht dem WHO Grad III.
		Kennzeichnend ist eine Endothelhyperplasie, -proliferation und eine Kontrastmittelanreicherung.

**Tabelle 3: Vereinfachte Klassifikation der Gliome [6]**

### 2.2.1 Benigne Gliome

Benigne Gliome zeichnen sich durch eine sehr gute Prognose mit langsamen und wenig infiltrativen Wachstum aus. In der Regel kann durch eine chirurgische Intervention der Patient geheilt werden. Zu ihnen zählt das pilozytische Astrozytom. Es entspricht dem WHO Grad I und kommt vorwiegend bei Kindern vor. Sie sind häufig im optischen Trakt lokalisiert. Es wird oft eine zystische Raumforderungen und eine inhomogene Kontrastmittelaufnahme im MRT-Bild deutlich. In sehr seltenen Fällen können bei pilozytischen Astrozytomen Zeichen der Anaplasie auftreten. Um in den WHO Grad III eingestuft zu werden, muss eine erhöhte Mitose- und

Proliferationsrate nachweisbar sein. Molekular wird in etwa 80% dieser Tumoren eine abweichende Aktivität im Protoonkogen BRAF beschrieben. Diese Tatsache ermöglicht die Abgrenzung zu den low-grade-Gliomen. [1; 5; 11; 12]

### **2.2.2 Maligne Gliome**

Klinische Kennzeichen für maligne Gliome sind ein subakutes bis akutes Auftreten mit deutlichen Allgemeinsymptomen und neurologischen Defiziten. Maligne Gliome können in low- und high-grade-Tumoren aufgeteilt werden. Low-grade entspricht einem WHO Grad II oder III. Meistens wachsen sie langsam und zeigen sich gut abgrenzbar. Eine Progression in einen höhergradigen Tumor kann jahrelang ausbleiben. Es werden jedoch auch Fälle beschrieben, bei denen der Progress zügig auftritt und von einer schweren Symptomatik gekennzeichnet ist. Zu den malignen Gliomen zählt unter anderen das anaplastische Oligodendrogliom, das anaplastische Astrozytom und das Glioblastoma multiforme. Hirnabszesse und Enzephalitiden können durch raumfordernde Zeichen und ringförmige Schrankenstörungen ebenso das Bild eines Glioms imitieren. Wobei mögliches Fieber und die Liquordiagnostik einen wichtigen Hinweis für eine entzündliche Genese geben. ZNS-Lymphome sind hingegen durch ihr multifokales Auftreten gekennzeichnet. In der Bildgebung präsentiert sich eine homogene Kontrastmittelanreicherung. Ähnliches gilt für Metastasen. Sie treten ebenfalls häufig multifokal auf und ein primäres Tumorleiden ist oft schon bekannt. Die Gewebsnekrose aufgrund einer Strahlentherapie zeigt neben der Zelleinschmelzung deutliche Verkalkungen, eine Gefäßproliferation und eine reaktive Gliose. Hier erfolgt auch eine Kontrastmittelaufnahme, die Ausdruck einer Schrankenstörung ist. [5; 11; 12-14; 15]

### **2.3 Therapie maligner Gliome**

Nach der NOA-04-Studie werden anaplastische Gliome primär operiert und zusätzlich bestrahlt oder mit einer Chemotherapie behandelt. [16; 17] Die Therapie setzt sich beim Glioblastom aus der Operation zur Diagnosesicherung und Massereduzierung, sowie der Strahlen- und Chemotherapie zusammen. Das Ausmaß der Resektion kann durch die Hilfe der 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik und dem intraoperativen MRT erhöht werden. Der Nutzen dieser Methoden konnte in verschiedenen Studien bestätigt werden. Durch die

Verwendung von Alkylantien bei der Chemotherapie können bei Patienten mit einer O6-Methylguanylmethyltransferase-Promotor-Methylierung (MGMT-Gendefekt) gute Ergebnisse erzielt werden. Diese Erkenntnis wurde in der Studie der European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) und dem National Cancer Institute of Canada von 2005 publiziert. Dort wurde die Therapie der adjuvanten Temozolomid-Gabe zur Strahlentherapie bei Patienten mit MGMT-Methylierung im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie untersucht und eine signifikante Prognoseverbesserung festgestellt. Zusätzlich bestehen Ansätze, die Neovaskularisation und die intrazelluläre Signalübertragung mit Hilfe von Tyrosinkinase-Hemmern zu blockieren. [1; 8; 14; 16-23]

Rezidivtumoren werden nach individueller Abschätzung erneut operiert, erneut bestrahlt und nochmals chemotherapeutisch behandelt. Ungünstige relevante Prognosefaktoren setzen sich aus einem großen Tumolvolumen, geringen Karnofsky-Index und der Invasion in eloquente Areale zusammen. [1; 14; 16]

## **2.4 Prognose der Gliome**

Die Früherkennung, Prävention und Screening-Untersuchung spielen bei der Diagnose eines Glioms keine Rolle. Es fehlen Tumormarker und umweltbedingte Entstehungsfaktoren, mit Ausnahme starker ionisierender Strahlung, sind nicht eindeutig bewiesen. [1; 8]

Die Prognose für den Patienten ist maßgeblich von der histologischen Diagnose und dem Ausmaß der Therapie abhängig. Niedriggradige Gliome haben eine bessere Prognose als hochgradige Tumoren. Kennzeichnend für das Glioblastom ist ein rascher Krankheitsverlauf mit einer Überlebensprognose von nur circa 12-15 Monaten, trotz maximaler Therapie. Bei manchen Gliom-Patienten zeigt sich jedoch über Jahrzehnte kein Progress. Faktoren, die neben der Therapie die Prognose beeinflussen, werden in Studien häufig dargelegt. Damit einem prognostischen oder prädiktiven Faktor Bedeutung zugesprochen werden kann, muss dieser mit dem Langzeit- und/oder krankheitsfreien Überleben korrelieren. Außerdem müssen deutliche Hinweise auf eine suffiziente Therapie gegeben sein. Zu diesen Faktoren gehören das Alter, der neurologische Status, das Vorhandensein von Begleittumoren, die Tumorausdehnung (insbesondere auf eloquente Hirnareale), der Karnofsky-Index, die maximale Tumorsektion bei maximaler Gewebeerhaltung, das Therapieansprechen und die Diagnosesicherheit. Ein hohes Alter gilt als stärkster Faktor für eine schlechte Prognose. Mehrere Studienergebnisse beschreiben eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens aufgrund einer ausgedehnten

chirurgischen Exzision. Die schlechteste Prognose im jeweiligen Tumorgrad haben die Patienten, bei denen nur eine Teilresektion erfolgreich ist. [2; 4; 9; 12; 20; 22; 24-28] Werden postoperativ weitere Tumorreste nachgewiesen, kann von einer frühen Progression des Tumors ausgegangen werden. Die Identifikation solcher Tumorreste ist eine wichtige Größe mit Einfluss auf die weitere Behandlung. [13] Die Prognose von Rezidivtumoren ist dann besonders schlecht und maßgeblich vom Karnofsky-Index, neurologischen Status und der Lokalisation des Herdes abhängig.

## **2.5 Proliferationsindex MIB-1**

Der Proliferationsindex kann immunhistochemisch durch den monoklonalen Antikörper MIB-1 gegen das Antigen Ki-67 bestimmt werden. Diese Untersuchung hat sich zur Unterscheidung des histologischen Verhaltens der Tumoren bewährt. Die Anzahl der MIB-1-positiven Zellen wird prozentual angegeben. Mit der Hilfe der Wachstumsrate wird die Unterscheidung zwischen niedrig- und hochmalignen Tumoren erleichtert. Der Proliferationsindex errechnet sich aus der Fläche der durch MIB-1 positiv markierten Zellkerne, multipliziert mit 100 und dividiert durch die Gesamtkernfläche. Studien haben die Zusammenhänge mit der Überlebenszeit und WHO-Einteilung bestätigt. So spricht ein niedriger Proliferationsindex für eine höhere Lebenserwartung. [29-31]

## **2.6 Mutation im Isozitatdehydrogenase-1-Gen (IDH-1)**

Die Mutation im Isozitatdehydrogenase-1-Gen (IDH-1) ist am häufigsten auf dem Kodon 132 des IDH-1-Gens lokalisiert. IDH hat unter anderem Bedeutung in der Lipidsynthese und in der Abwehr von oxidativen Stress. Die Aminosäure Arginin wird in einer Punktmutation durch Glutamat ersetzt. Das Enzym wird dadurch deaktiviert. Isozitatdehydrogenase dient als Katalysator bei der oxidativen Decarboxylierung von Isozitat zu Alpha-Ketoglutarat. 5 IDH-Gene sind bekannt. Das relevanteste Gen ist IDH-1. Es kommt im Zytosol vor und stellt reduziertes Nikotinsäureamiddinukleotidphosphat (NADPH) bereit. Die Krebsentstehung wird begünstigt durch den onkogenen Metaboliten D2-Hydroxyglutarat (D-2HG). D-2HG entsteht durch die NADPH-abhängige Reduktion von Alpha-Ketoglutarat. Erhöhtes D-2HG kann im Serum bestimmt werden und gibt einen Hinweis auf eine IDH-1-Mutation. Dies hat sich jedoch

in der Routinediagnostik nicht etabliert. IDH-1-Mutationen erhöhen auch die Stabilität des Hypoxie-induzierenden-Faktor 1alpha (HIF-1alpha). HIF-1alpha nimmt dabei unter anderem Einfluss auf die Apoptose und Angiogenese. 2008 wurde durch die NOA-4-Studie bei Gliomen erstmals die Mutation in den IDH-Genen beschrieben. In den Tumoren nach WHO Grad II und III wurde diese molekulare Veränderung bei über 70 % der Patienten nachgewiesen. Die Punktmutation tritt häufiger beim IDH-1-Gen, als beim IDH-2-Gen auf. Nachweisbar sind diese Mutationen bei diffusen astrozytären, oligodendroglialen, oligoastrozytären Tumoren und sekundären Glioblastomen. Insgesamt lässt sich in etwa 7% bis 12% aller Glioblastome ein positiver IDH-1 Status belegen. Dabei gelingt bei jüngeren Patienten der Nachweis der IDH-1-Mutation häufiger als bei älteren Erkrankten. In der genannten Studie wurde auch gezeigt, dass Tumoren nach WHO Grad III mit IDH-1-Mutation eine deutlich bessere Prognose haben als die Grad-III-Tumoren ohne diese Mutation. Die Rangordnung, von guter zu schlechter Prognose geordnet, sieht laut einer Studie wie folgt aus:

1. Anaplastisches Astrozytom mit IDH-1-Mutation
2. Glioblastom mit IDH-1-Mutation
3. Anaplastisches Astrozytom ohne IDH-1-Mutation
4. Glioblastom ohne IDH-1-Mutation

Es wird jedoch ein längeres progressionsfreies Überleben bei low-grade-Tumoren mit IDH-Mutation infrage gestellt. [12; 15-17; 19; 21; 32-41]

In einigen Studien zeigte sich, dass IDH-1 der deutlichste prognostische Faktor ist. Alter, MGMT-Status und die genaue histologische Klassifizierung folgen in ihrer Bedeutung.

Aufgefallen ist auch, dass die MGMT-Methylierung häufig in Kombination mit einer IDH-1-Mutation auftritt. [15; 32; 33; 38]

Das IDH-2-Gen hat keine bedeutende Relevanz erreicht. Es kodiert die mitochondriale IDH. Sporadisch wird die IDH-2-Mutation in allen astrozytären Gliomen nachgewiesen. [32]

Bisher konnten noch keine IDH-Mutationen in pilozytischen Astrozytomen nachgewiesen werden. Diese Tumorentität unterscheidet sich in der Genese, neben den primären

Glioblastomen, von den Tumoren mit IDH-Mutation. [35] In kindlichen Glioblastomen, die fast

immer primär sind, konnten ebenfalls keine IDH-Mutationen nachgewiesen werden. [42] In

diffusen Gliomen korrelieren IDH-Mutationen mit der TP53-Mutation und der 1p/19q-

Kodeletion. Durch verschiedene Analysen konnte gezeigt werden, dass IDH-1- und -2-

Mutationen zeitlich vor anderen Gendefekten auftreten (siehe Abbildung 1). Wegen ihres

häufigen Auftretens ergab sich der Verdacht, dass diese Mutation ein frühes Ereignis in der

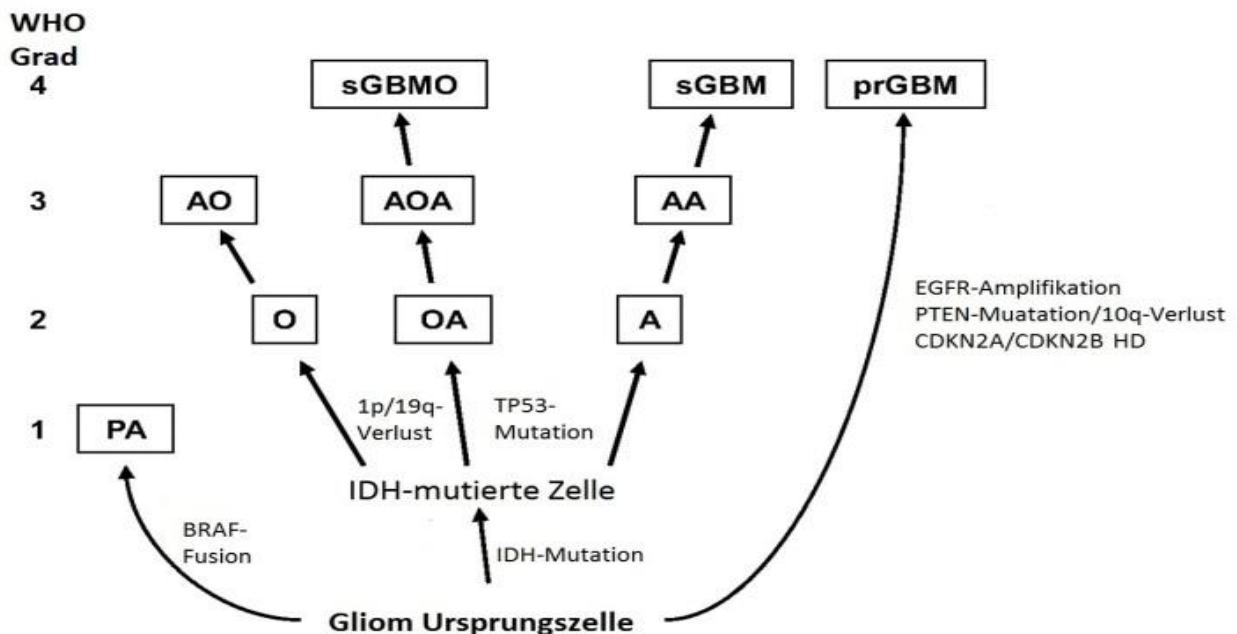
Tumorentstehung ist. Die TP53-Mutation gilt als frühe Veränderung, tritt aber häufig erst nach

der IDH-1-Mutation auf. Die Amplifikation von EGFR und die Mutation von PTEN sind spätere Ereignisse. Es wird daher spekuliert, dass IDH-Mutationen bereits in Stammzellen auftreten.

Denn diese Veränderung kann bei Astrozyten oder Oligodendrozyten nachweisbar sein. In Glioblastomen stehen IDH-Mutationen im Zusammenhang mit TP53-Mutationen, jungem Alter und besserer Überlebenswahrscheinlichkeit. [12; 33; 35; 38-40; 43]

Der Nachweis der IDH-Mutationen erfolgt mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die beispielsweise auf die IDH-1 R132H-Mutation gerichtet sind. [43]

Die IDH-Mutation ist relativ spezifisch für astrozytäre oder oligodendrogliale Tumoren. In anderen Tumoren des zentralen Nervensystems konnte dieser Defekt nicht nachgewiesen werden. Nur in akuten myeloischen Leukämien werden IDH-1-Mutationen ebenfalls nachgewiesen. [37; 38; 44]



**Abbildung 1: Genetische Veränderungen in der Gliomentstehung [38]**

PA: Pilozytisches Astrozytom; O: gut differenziertes Oligodendrogliom; OA: Oligoastrozytom; A: diffuses Astrozytom; AO: Anaplastisches Oligodendrogliom; AOA: Anaplastisches Oligoastrozytom; AA: Anaplastisches Astrozytom; sGBMO: sekundäres Glioblastom mit oligodendroglialen Anteilen; sGBM: sekundäres Glioblastom; prGBM: primäres Glioblastom; *CDKN2A* und *2B*: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A und 2B; *EGFR*: epidermal growth factor receptor; HD: homozygous deletion; *PTEN*: phosphatase and tensin homolog; WHO: World Health Organization. Modifiziert aus [38]



## **2.7 BRAF- Mutation**

Nachdem der Nachweis einer BRAF-Mutation besonders für die Behandlung der malignen Melanome Bedeutung erlangt hat, könnte die Mutation auch bei Gliomen eine Rolle spielen. [45] Der bereits etablierte monoklonale Antikörper V600E (Clone VE 1) wurde bereits ausführlich an primären ZNS Tumoren getestet. [46; 47] Mutationen fanden sich insbesondere beim Gangliogliom, pleomorphen Xanthoastrozytom und pilozytischen Astrozytom, wo sie teilweise prognostische Bedeutung haben könnten. [48] Auch in diffusen Astrozytomen WHO Grad II, epitheloiden Glioblastomen und Riesenzellglioblastomen konnte die Mutation beobachtet werden. [49; 50] Obwohl die Literaturangaben bei Astrozytomen und gewöhnlichen Glioblastomen nicht sehr vielversprechend sind [47], haben wir eine Testung im Rahmen dieser Studie vorgenommen, da vergleichbare Untersuchungen in Hinblick auf unsere Fragestellung bislang nicht vorliegen.

## **2.8 Neuronavigation**

Mit Hilfe der Neuronavigation können Tumorgrenzen besser definiert werden und Bilder auf das Operationsfeld übertragen werden. Dieses Verfahren hat sich seit langem als Routine für die Planung und zur Resektionskontrolle durchgesetzt. Operative Risiken werden minimiert, Operationszeiten verkürzt und der Patient weniger belastet. Intraoperative anatomische Veränderungen können jedoch nicht gut dargestellt werden. Dieses Problem kann durch die Einführung des intraoperativen MRT gelöst werden. [51]

## **2.9 Fluoreszenzgesteuerte Resektionsmaßnahmen**

Vor der Einführung des intraoperativen MRT konnte das Exzisionsausmaß mit Hilfe der fluoreszenzgesteuerten Resektion kontrolliert und ausgeweitet werden. 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) ist nicht fluoreszierend und wird dem Patienten etwa drei Stunden vor der Operation intravenös verabreicht. Es handelt sich um eine Vorstufe des Häms in der Häm-Biosynthese. Intrazellulär wird das fluoreszierende Protoporphyrin IX gebildet und lagert sich im Epithel und Gewebe der malignen Tumoren ab. Um in Häm umgewandelt zu werden, muss in das Protoporphyrin Eisen eingebaut werden. Dafür wird die Ferrochelatase benötigt, deren

Vorkommen in malignem Gewebe reduziert ist. Das Protoporphyrin IX kann durch ein modifiziertes neurochirurgisches Mikroskop, unter violett-blauem Licht mit einer Wellenlänge von 375-440 nm sichtbar gemacht werden und somit den Residualtumor deutlich machen. Es wird zwischen zwei fluoreszierenden Intensitäten unterschieden. Es gibt eine starke Fluoreszenz, mit einem kräftigen Rot-Ton und eine schwache Fluoreszenz, bei der das Gewebe rosa erscheint. Nicht fluoreszierendes Gewebe bleibt blau. [10; 52-57]

Neben den zerebralen Tumoren akkumuliert das Protoporphyrin IX auch in gastro-intestinalen, urogenitalen und pulmonalen Malignomen. [58] Der Vorteil der Fluoreszenztechnik liegt auch bei der intraoperativen Darstellung des Tumorherdes ohne dabei von der Verfälschung der anatomischen Verhältnisse abhängig zu sein. Außerdem ist diese Untersuchung schnell durchführbar und der operative Ablauf wird nicht unterbrochen oder verlängert. [53; 54]

## **2.10 Intraoperative Magnetresonanztomographie bei neurochirurgischen Eingriffen**

Seit Mitte der 90iger Jahre entwickelt sich die intraoperative Nutzung der Magnetresonanztomographie. Da einige Gliome von einem diffus infiltrierenden Wachstum gekennzeichnet und schwierig abgrenzbar sind, ist die Idee entstanden mit Hilfe des intraoperativen MRT zuverlässig die aktuellen intraoperativen Verhältnisse darzustellen. Die Schwierigkeit der korrekten intraoperativen Einschätzung der Tumorgrenzen ohne technische Hilfsmittel wurde schon in älteren klinischen Studien aufgezeigt. In neueren Studien bestätigt sich jedoch, dass der kombinierte Einsatz von intraoperativen MRT, Fluoreszenzmarkierung und Neuronavigation zu einer Erhöhung der Radikalität und somit zu einer Verbesserung der Prognose führt. [59; 60] Schon früher konnte durch Resttumornachweise in der direkten postoperativen MRT-Untersuchung gezeigt werden, dass eine komplette Tumorentfernung trotz subjektiver Radikalität des Operateurs nicht gelang. Dabei wurde auch deutlich, dass Rezidive aus operativ nicht erfassten Tumorteilen bestanden. Grundlegende Fragen sind zum einen, ob die Radikalität der Therapie verbessert werden kann und zum anderen ob durch die chirurgischen Manipulationen am Gewebe, normales Hirngewebe als Resttumor dargestellt wird. Gliome sind durch MRT-Untersuchungen sehr gut darstellbar. Aufgrund der Beeinflussung des Gewebes ändert sich intraoperativ schnell die Anatomie, beispielsweise durch den Liquorabfluss oder die Ödembildung. Dieses Verhalten wird in der Literatur als „brain-shift“ bezeichnet. So sind präoperativ gewonnene Sequenzen für den intraoperativen Operationssitus nicht mehr

anwendbar. Bei der intraoperativen Verwendung des MRT kann das OP-Team demzufolge direkt den Operationserfolg kontrollieren und bei Bedarf sofort die Resektion ausweiten und somit dem Patienten eine frühzeitige Re-Operation ersparen. Angewendet werden bevorzugt Geräte mit einer höheren Feldstärke (1,5-3 Tesla), da so die anatomischen Strukturen sich feiner darstellen lassen. [10; 59; 61-64]

Drei verschiedene Konzepte zur Anwendung haben sich durchgesetzt. Zum einen das in Boston entwickelte Modell, bei dem die Operation direkt in dem Magnetresonanztomographen durchgeführt wird. Der Vorteil dieser Methode ist, dass der Patient nicht umgelagert werden muss und eine kontinuierliche Bildgebung möglich ist. Der Operateur ist jedoch durch seine Position stark in seiner Bewegungsfreiheit eingeschränkt. Das zweite Konzept wurde in Heidelberg entwickelt. Das MRT ist hier räumlich vom Operationssaal getrennt. Der Patient muss zur Untersuchung in einen Nachbarraum transportiert werden. Nachteilig ist, dass etwas mehr Zeit verloren geht und dass bei dem Transport verschiedene Probleme auftreten können. Jedoch hat der Operateur durch seine uneingeschränkte Bewegungsfreiheit eine ideale Operationsposition. Außerdem ist es möglich bei der Operation MR-untaugliche Operationsbestecke und -geräte, wie zum Beispiel die Neuronavigation, zu benutzen. Bei diesem Konzept kann das MRT auch von zwei Operationssälen oder anderweitig benutzt werden. Das dritte Konzept sieht eine Fusion der beiden ersteren Strategien vor. Hierbei befindet sich das MRT-Gerät im Operationssaal und ist durch eine Art Schwenkarm mit dem Operationstisch verbunden. Der Operateur hat die volle Bewegungsfreiheit und der Transport ist durch den Schwenktisch sicher und schnell durchführbar. [59-61; 63]

Bei den Geräten kann zwischen Niederfeld- und Hochfeldscannern unterschieden werden. Der Vorteil der Niederfeldgeräte mit einem 0,2 Tesla starken Magneten liegt im Preis und in der Kompaktheit. Diese können beispielsweise direkt unter dem Operationstisch installiert werden. Durch gut entwickelte Transportsysteme wird jedoch der Einsatz von Hochfeldscannern, die eine hervorragende Bildauflösung bieten und weniger Artefakte aufweisen, bevorzugt. Mit einer Feldstärke von 1,5-3 Tesla können diese Geräte intraoperativ oder auch für anderweitige Diagnostik verwendet werden. [59] Weitere in der Literatur zu findende Studien sind vielversprechend. Vor allem durch die Hochfeld-Bildgebung scheint die totale Resektionsrate zu sehr guten Ergebnissen zu kommen. [10]

Schon seit Mitte der 80iger Jahre wird die intraoperative Verwendung der Computertomographie (CT) und Sonographie genutzt, um unter anderem die Radikalität der Operation zu verbessern. Vor allem der Ultraschall bietet dabei eine kostengünstige Untersuchung, die in Echtzeit durchgeführt werden kann. Dabei hat die Ultraschalltechnik den Vorteil, dass sie mittlerweile

sehr kompakt ist und ein steriles Arbeiten einfacher zu bewerkstelligen ist. Hinzu kommt, dass moderne Geräte auch eine hohe Auflösungsfähigkeit haben. Insbesondere ein perifokales Ödem, Beimengungen von Blutpartikeln oder Luftbläschen werden gut dargestellt. Der intraoperative Ultraschall findet vor allem Verwendung in der spinalen Neurochirurgie. Ein Kritikpunkt ist die nötige Erfahrung in der Bildinterpretation. Die CT-Untersuchung hat sich hingegen nicht durchgesetzt. Neben dem Vorteil der guten Flexibilität für den Operateur, stellte sich die Strahlenbelastung und ungenügende Weichteildarstellung als Nachteil heraus. Die Stärke der computertomographischen Untersuchung zeigt sich in der Darstellung von Blutungen, Verkalkungen und Knocheninfiltrationen. [60; 61; 63-65]

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

#### **3.1 Patientenkollektiv**

Das Patientenkollektiv wurde an der Asklepios Klinik Nord in Hamburg zusammengestellt. In dieser Arbeit wurden Patienten, die an einem Gliom erkrankt sind und neurochirurgisch unter Zuhilfenahme des intraoperativen MRT behandelt wurden, histologisch nachuntersucht. Aufgrund der erstmaligen Einführung der neuen Operationsmethode im Sommer 2011, wurden relevante Fälle ab diesem Datum gesammelt. Als zeitlicher Endpunkt für das gesuchte Patientenprofil wurde der August 2012 festgelegt. Sonstige Ausschlusskriterien gab es nicht. Durch eine selektive Literaturrecherche wurden Informationen zum Thema in den Onlinedatenbanken von Pubmed und der Asklepios Klinik Nord zusammengetragen.

#### **3.2 Statistische Hilfsmittel**

Der Datensatz wurde retrospektiv im Herbst 2012 erfasst und dient als Basis für die weitere Auswertung. Für die Fallvorstellungen wurden, mit Genehmigung der Neurochirurgie der Asklepios Klinik Nord in Hamburg, Operationsberichte und Verlaufsprotokolle gesichtet. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels der Tabellenkalkulation von Microsoft Office Excel 2010. Vorgestellt werden die Ergebnisse durch Tabellen und Diagramme. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Ergebnisse teilweise vergleichend prozentual und numerisch in Kreis- und Säulendiagrammen dargestellt. Es werden Informationen zur genauen Diagnose, über die Rezidivneigung, zum immunhistologischen Verhalten und über eine eventuell notwendige intraoperative Nachresektionen gegeben.

### **3.3 Operative Probengewinnung**

Das Material der untersuchten Schnittpräparate wurde durch einen mikrochirurgischen Eingriff in der Neurochirurgie der Asklepios Klinik Nord in Hamburg gewonnen und in der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Klinik bearbeitet worden. Der operative Ablauf gestaltete sich in der Regel nach einem festgelegten Schema, das individuell auf den Patienten abgestimmt war. Üblicherweise bekam der Patient eine perioperative Antibiose und Dexamethason vor dem Eingriff. Nach einer ausreichenden Eröffnung der Dura mater kann mit Hilfe des Operationsmikroskopes die Präparation des Zielgebietes beginnen. Dabei wird unter Umständen die Neuronavigation zur Hilfe genommen, um die Tumorgrenzen deutlicher darstellen zu können. Der dargestellte Tumor wird dann Schritt für Schritt reseziert und kann schonend mittels Ultraschallskalpell entfernt werden. Makroskopisch sichtbar gebliebenes Material wird sofort nachreseziert. Durch die Anwendung von 5-Aminolävulinsäure wird eine verbesserte Darstellung des Tumors ermöglicht. Dazu wird dem Patienten präoperativ 5-Aminolävulinsäure intravenös injiziert. Durch Blaulicht im Operationsmikroskopfilter wird eine im Tumorgebiet eingelagerte rosa bis rot fluoreszierende Substanz sichtbar. Wenn so kein Resttumor mehr darstellbar ist, wird nach sorgfältiger Blutstillung und Tamponieren der Resektionshöhle mit Watte, der Schädel steril abgedeckt und das Oberteil der Noras-Kopfspule auf dem Patienten fixiert. Über das Lafettensystem wird der Patient dann in den Raum mit dem intraoperativen MRT gefahren. Mit dem dort sofort ausgewerteten Datensatz wird ersichtlich, ob sich noch auffällige Herde im OP-Gebiet befinden. Anschließend wird der Patient wieder in den Operationssaal gefahren und es kann entschieden werden, ob nochmals nachreseziert werden muss, oder die Operation beendet wird. Die entnommenen Präparate werden entweder per Schnellschnitt, postoperativ oder beides in die Pathologie gesandt.

### **3.4 Intraoperative Magnetresonanztomografie bei neurochirurgischen Eingriffen in der Asklepios Klinik Nord**

Seit dem Juli 2011 besitzt die Neurochirurgie der Asklepios Klinik Nord in Hamburg einen Magnetresonanztomographen, der intraoperativ oder auch für Patienten der Poliklinik eingesetzt werden kann. Dies ist durch die Neugestaltung des Operationstraktes möglich geworden. Dabei wurde ein 2-Zimmer-System realisiert. Der Magnetresonanztomograph steht nicht in dem Operationssaal, sondern ist direkt benachbart, also räumlich getrennt. Der Erwerb hat den großen

Vorteil, dass die benignen oder malignen Tumoren besser von dem gesunden Hirngewebe abgegrenzt werden können und somit eine genauere Resektion während des Eingriffes möglich ist. In der Asklepios Klinik Nord wird der Magnetresonanztomograph Philips Achieva 1,5T verwendet. Auch durch die genaue Fixierung des Kopfes können die Tumorgrenzen sehr genau dargestellt werden. Um die intraoperativen mit den präoperativen Bildern besser vergleichen zu können, werden die gleichen Sequenzen benutzt. Bisher konnte der Tomograph über 50-mal intraoperativ verwendet werden. [66]

### **3.5 Immunhistologische Untersuchungen**

Die immunhistologischen Arbeitsschritte basieren auf standardisierte Verfahrensanweisungen der Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord. Diese Arbeit konzentriert sich auf den zusätzlichen Nachweis der Marker GFAP, IDH-1, MIB-1 und BRAF an den gesammelten Gewebeproben. Die Untersuchungen wurden als Ergänzung oder erneut zu den Markern der Routinediagnostik durchgeführt. Für die Darstellung ist die Durchführung von einer Reihe von Arbeitsschritten notwendig. Die Nachweisverfahren basieren auf die spezifischen Bindungen der Antikörper an Zellen, subzellulären Strukturen oder anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Um ein adäquates Färbeergebnis zu erhalten, müssen die Präparate durch spezielle enzymatische und physikalische Maßnahmen vorbehandelt werden. Zuerst wird die in Paraffin fixierte Probe für die Untersuchung vorbereitet. Das zu untersuchende Material darf eine maximale Kantenlänge von 10x10 mm haben. Sollte das Gewebe größer sein, wird auf dem Schnittpräparat eine 10x10 mm große Stelle markiert und dann herausgeschnitten. Der Paraffinblock wird am Schlittenmikrotom mit einer Schnittstärke von 3 µm geschnitten. Die Schnitte werden auf den Objektträger gezogen und über Nacht bei etwa 50 °C in einem Memmert Wärmeofen getrocknet. Es folgt die Entparaffinierung, hier im HE-Färbeautomat Varistain bei Programm 2. Die genauen Schritte sind aus Tabelle 4 zu entnehmen. [67; 68] Nun schließt sich die Antigendemaskierung (Freilegung) an, die durch Kochen im Dampfgerar erfolgt. Dazu werden die Objektträger in einem Ständer gestellt und mit 180 ml destilliertem Wasser und 20 ml DAKO-Targent Retrieval Solution 10x Concentrate (TRS) bei einem pH-Wert von 6,1 für 30 Minuten in einem Dampfgerar, „Multi Gourmet“ der Firma Braun, bei 99 °C inkubiert. Dieser Vorgang wird oft als hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) bezeichnet. Anschließend werden die Objektträger in ihrem Ständer für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgekühlt. Die nächsten Arbeitsschritte erfolgen vollautomatisch mit

Hilfe des Immunfärbers DAKO Autostainer Plus. Die Objektträger werden in den Arbeitsautomaten eingelegt. Die Präparate werden als erstes durch den DAKO Wash Buffer 10x vorgespült. Als nächstes erfolgt die endogene Peroxidase-Hemmung. Dabei wirken 100 µl Wasserstoffperoxid auf das zu untersuchende Material ein. Es folgt eine erneute Spülung mit dem Waschpuffer. Nun werden 100 µl des primären Antikörpers aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. [68-72]

Hierbei handelt es sich entweder um IDH-1 R132H DIA H09 in einer Verdünnung von 1:40, GFAP Z0334 in einer Verdünnung von 1:500, MIB-1 M7240 in einer Verdünnung von 1:500 oder um Mouse Anti-Human BRAF V600 E Monoclonal Antibody (Clone VE1) in einer Verdünnung von 1:100. [73-76]

Es erfolgt eine erneute Spülung mit dem Waschpuffer. Der Primärantikörper wird in den folgenden Schritten mit einem Verstärkungs- und Visualisierungssystem detektiert. Es wird jetzt der biotinylierte Sekundärantikörper K5001 für 15 Minuten dazu gegeben. Es schließt sich eine erneute Spülung mit dem Waschpuffer an. Für 15 Minuten wird das jeweilige Präparat mit 100 µl der Tertiärreagenz inkubiert. Hierbei handelt es sich um einen Komplex aus Streptavidin und Peroxidase (HRP K4001). Es folgt eine erneute Spülung mit dem Waschpuffer. Die chromogene Nachweisreaktion mit einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (DAB+ Chromogen K5001) schließt sich an. Das Gewebe wird mit 200 µl von dieser Reagenz für 10 Minuten behandelt. Als Ergebnis entsteht das braun gefärbte Zielantigen. Die nächste Spülung erfolgt nun mit destilliertem Wasser. Als nächstes geschieht die Kerngegenfärbung für 8 Minuten durch 200 µl Hämatoxylin nach Mayer (DAKO 2020). Zum Schluss wird das Präparat noch einmal in dem Automaten mit dem Waschpuffer gespült. Die Objektträger können nun entnommen, entwässert und mit dem Eukitt eingedeckt werden. Die Entwässerung gleicht der Entparaffinierung, ohne den Waschpuffer, in entgegengesetzter Richtung (s.o.). [72]



Lösung	Dauer in Minuten
Xylol	1
Xylol	1
Xylol	8
Xylol	10
Xylol	10
100%iger Alkohol	5
100%iger Alkohol	5
96%iger Alkohol	1
70%iger Alkohol	1
Tris-Waschpuffer	5
Tris-Waschpuffer	5

**Tabelle 4: Entparaffinierung [67]**

### 3.5.1 Immunhistologischer Marker IDH-1

Zur Bestimmung der IDH-Aktivität wurde bei dieser Arbeit der monoklonale Maus-Antikörper IDH1 R132H DIA H09 der Firma Dianova verwendet. R132H kodiert dabei die Punktmutation des Enzyms. Das darzustellende Antigen ist das humane punktmutierte IDH-1. Laut WHO treten diese Veränderungen hauptsächlich bei Gliomen Grad II und III auf. Dabei sind nahezu 70 % aller Astrozytome und Oligodendrogliome betroffen. Primäre Glioblastome, pilozytische Astrozytome und Ependymome stellen dabei durch ihre schlechte immunhistologische Darstellung eine Negativkontrolle dar. Diese Erkenntnis ist für den Nachweis von Tumorgewebe und auch für ihre Klassifizierung von Nutzen. Die Proben sind vorher in Formalin fixiert und in einem Paraffinblock eingebettet. Sie werden für die Anfärbung deparaffiniert und rehydriert. Die Antigendemaskierung beziehungsweise der Aufschluss erfolgt durch Hitze mittels eines Dampfgarers. Die Detektion der immunhistochemischen Färbung wird hier durch DAKO ChemMate K5001 durchgeführt. Dabei wird der Antikörper bei einer Verdünnung von 1:40 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem Verdünnungsmittel handelt es sich hierbei um die Lösung DAKO S2022. Der monoklonale Antikörper der Ratte (W09) kann dabei als Kontrolle des Antikörperklons der Maus verwendet werden, dadurch wird die Wildtyp-IDH in Glioblastomen detektiert. [71-73; 77-79]

### **3.5.2 Immunhistologischer Marker MIB-1/KI-67**

Der Proliferationsmarker MIB-1/KI-67 ist etabliert für die Darstellung des tumorösen Zellwachstums. Der Antikörper stellt alle sich im Zellzyklus aktiv teilenden Zellen dar, weil er die in der G1-, S-, G2- und Metaphase gebildeten nukleären KI-67-Antigene markiert. Ruhende Zellen in der G0 Phase werden nicht angefärbt. Hier wird das Antigen schnell abgebaut. Bei MIB-1 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper aus der Maus. Der Vorteil von MIB-1 gegenüber KI-67 liegt darin, dass sich MIB-1 auch in mit Paraffin eingebetteten Schnittpräparaten anfärben lässt. Für KI-67 werden gefriergetrocknete Präparate benötigt. Der immunhistologische Ablauf für den Nachweis geschieht ähnlich wie bei dem IDH-1. Das Präparat wird für die Anfärbung deparaffiniert und rehydriert. Die Antigendemaskierung beziehungsweise der Aufschluss erfolgt auch hier durch Hitze mittels eines Dampfgeräts. Die Detektion der immunhistochemischen Färbung wird ebenfalls durch DAKO ChemMate K5001 durchgeführt. Dabei wird der Antikörper bei einer Verdünnung von 1:500 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem Verdünnungsmittel handelt es sich hierbei um die Lösung DAKO S2022. Als Positiv-Kontrolle gelten die Kerne der sich proliferierenden Zellen. Beispielsweise zeigen die Zellen des Dünndarm- oder Dickdarms eine positive Reaktion. Als Negativ-Kontrolle gelten die sich nicht proliferierenden Zellen. Ein Beispiel dafür sind submukosale Bindegewebszellen. Deutlich pathologische Ergebnisse zeigen sich bei Mamma- und Prostatakarzinomen. [71; 72; 74; 79-81]

### **3.5.3 Immunhistologischer Marker GFAP**

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) kann in vielen Gliomen nachgewiesen werden. GFAP ist ein Protein und vor allem in Astrozyten und Ependymzellen ein Bestandteil des Zytoskeletts. Dieser Marker wird also in Tumoren glialen Ursprungs nachgewiesen. Die allgemeine Funktion des GFAP ist noch nicht sicher geklärt. Vermutlich werden Astrozyten in ihrer Formstabilität und Funktion beeinflusst, sowie eine Zellinteraktion hergestellt. Bei der Regeneration von neuronalen Gewebe scheint GFAP ebenfalls beteiligt zu sein. Der immunhistologische Ablauf für den Nachweis geschieht ähnlich wie bei den oben beschriebenen Markern. Auch hier wird das Präparat für die Anfärbung entparaffiniert und rehydriert. Die Antigendemaskierung erfolgt ebenfalls durch Erhitzen mittels eines Dampfgeräts und die Detektion der immunhistochemischen Färbung wird durch den DAKO ChemMate K5001 durchgeführt. Dabei

wird der Antikörper bei einer Verdünnung von 1:500 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem Verdünnungsmittel handelt es sich hierbei um die Lösung DAKO S2022. Als Positiv-Kontrolle gelten Astrozyten und/oder Schwann-Zellen. Für die Negativ-Kontrolle geeignet ist Haut- oder Bindegewebe. [71; 72; 75; 79]

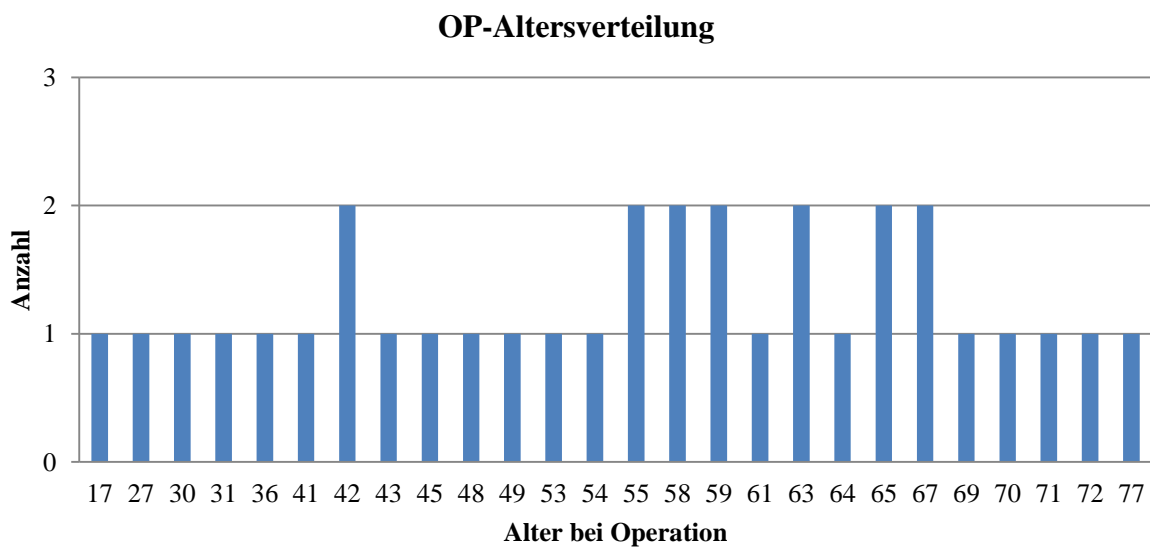
#### **3.5.4 Immunhistologischer Marker BRAF**

BRAF ist eine Serin/Threonin-Kinase. Es wurde der Mouse Anti-Human BRAF V600 E Monoclonal Antibody (Clone VE1) entsprechend der Firmenvorschrift eingesetzt. Nach Austestung an zwei malignen Melanomen, die über eine molekularbiologisch bestätigte BRAF Mutation verfügen, wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Der immunhistologische Nachweis erfolgt ebenfalls wie bei dem Nachweis von IDH-1 oder MIB-1. Die Deparaffinierung und Rehydrierung erfolgt als erster Schritt. Es folgt die Antigendemaskierung durch Hitze mittels eines Dampfgarers. Die Detektion der immunhistochemischen Färbung wird ebenfalls durch den DAKO ChemMate K5001 durchgeführt. Dabei wird der Antikörper bei einer Verdünnung von 1:100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem Verdünnungsmittel handelt es sich hierbei um die Lösung DAKO S2022. Die Mutation von BRAF V600 E konnte beispielsweise in Melanomen, papillären Schilddrüsenkarzinomen, pleomorphen Xanthoastrozytomen, Borderline-Tumoren des Ovars, kolorektalen Tumoren, Gangliogliomen und pilozytischen Astrozytomen nachgewiesen werden. [71; 72; 76; 82]

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Zusammensetzung des Patientenkollektives

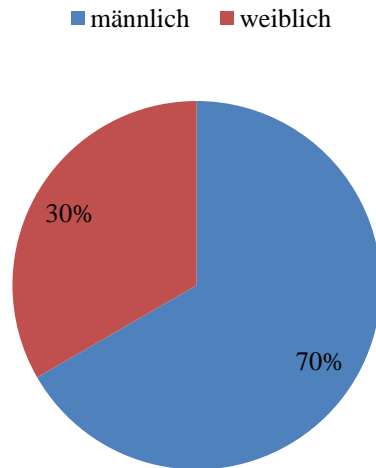
In Zusammenarbeit mit der Neurochirurgie der Asklepios Klinik Nord in Hamburg wurde eine Liste von Patienten erstellt, die an einem Gliom erkrankt waren und bereits unter intraoperativer magnetresonanztomographischer Kontrolle neurochirurgisch behandelt worden sind. Die Gewebeprobe vor und nach dem intraoperativen MRT wurden aus dem Archiv der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie herausgesucht und erneut beurteilt. Die Einordnung erfolgte nach der WHO-Klassifikation von 2007. Insgesamt sind 33 Patienten, die den Voraussetzungen entsprachen, in diese Untersuchung aufgenommen worden. Es handelte sich um 10 Frauen und 23 Männer. Jedoch sind 4 Patienten, 3 Männer und eine Frau, aufgrund eines Rezidivtumors nochmals mit der den Voraussetzungen entsprechender Therapie behandelt worden und wiederholt mit einbezogen worden. So kommt diese Arbeit auf 37 relevante Fälle. Der bei Behandlung jüngste Patient im Kollektiv ist 17 und der älteste 77 Jahre alt. Die meisten Patienten waren in der 4. oder 5. Lebensdekade. Der Mittelwert beträgt 53,8 Jahre. Die Altersverteilung des Kollektivs ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Altersverteilung bei Operation**

Von den 33 Patienten beträgt der Anteil der männlichen Patienten 70 %. Das entspricht einer Anzahl von 23 Patienten. In Abbildung 3 ist die Geschlechterverteilung dargestellt. Die zusätzlich untersuchten Rezidive wurden in dieser Abbildung jedoch nicht berücksichtigt.

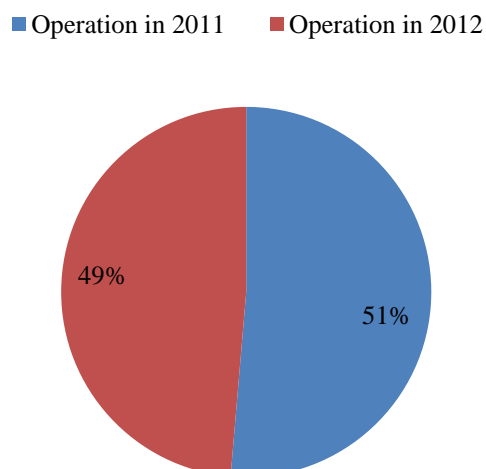
### Geschlechterverteilung



**Abbildung 3: Geschlechtsverteilung: männlich = 23 Personen; weiblich = 10**

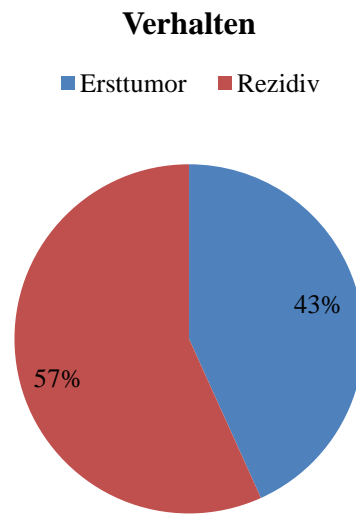
Die intraoperative MRT-Technik wurde erst im Sommer 2011 in der Klinik eingeführt. 19 Operationen wurden bereits 2011 durchgeführt und 18 im Zeitraum von Januar bis einschließlich August 2012 (siehe Abbildung 4).

### Operationsdatum



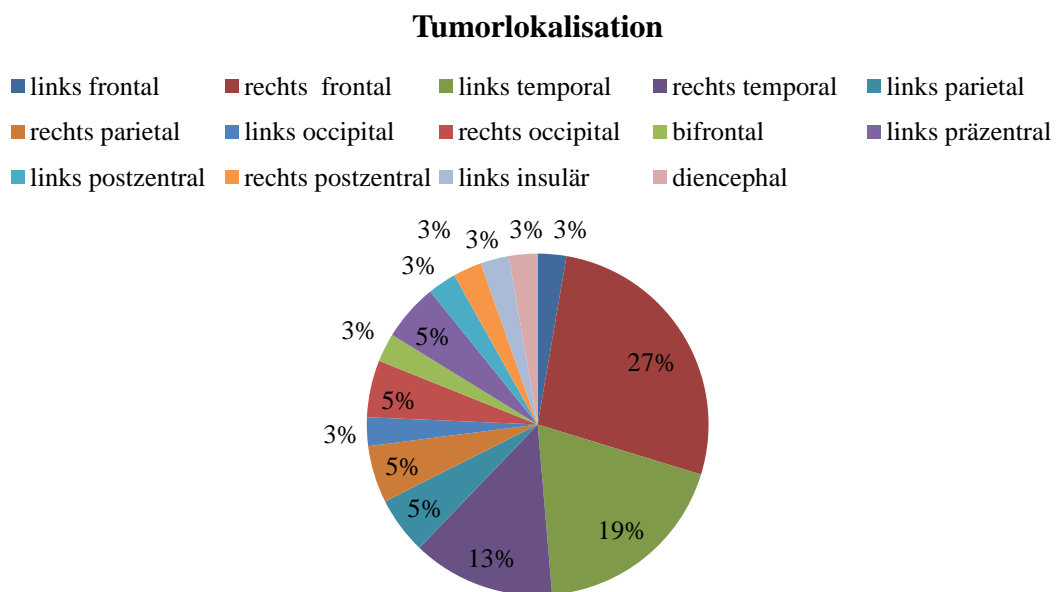
**Abbildung 4: Zeitpunkt der Operation: 19 Operationen in 2011 und 18 in 2012**

In 16 Fällen handelt es sich um die Erstoperation. 21 relevante Rezidive wurden mit in die Untersuchung aufgenommen. Prozentual teilt sich das in 43 % zu 57 % (siehe Abbildung 5).

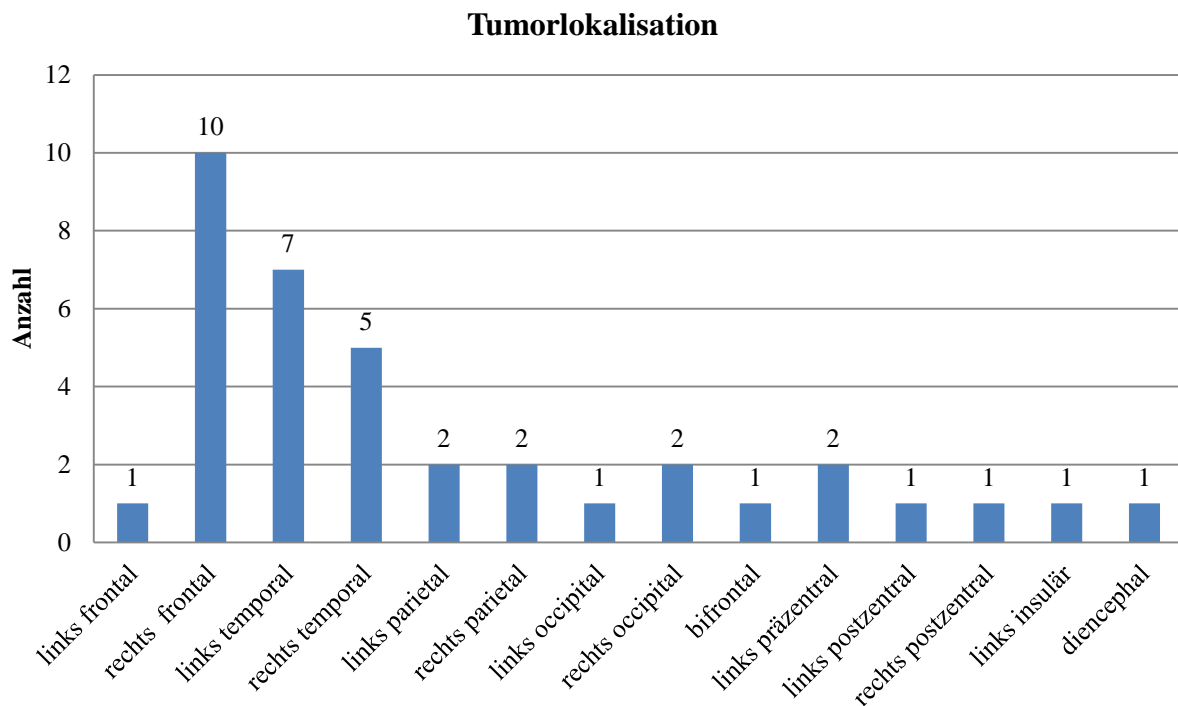


**Abbildung 5: Rezidivrate: In 21 Operationen wurde ein Rezidiv behandelt und in 16 Fällen handelte es sich um einen Ersttumor**

Die genaue Lokalisation und die Häufigkeit der einzelnen Tumoren können aus Abbildung 6 und 7 entnommen werden. Am häufigsten traten die Tumoren temporal oder frontal auf.



**Abbildung 6: Tumorlokalisation des untersuchten Kollektivs (Kreisdiagramm)**



**Abbildung 7: Tumorlokalisation des untersuchten Kollektivs (Säulendiagramm)**

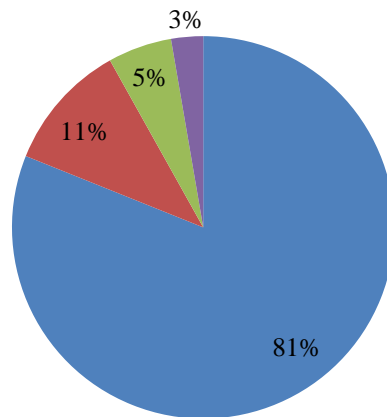
## 4.2 Histologische Untersuchungsergebnisse

### 4.2.1 Histologische Ergebnisse der Hauptpräparate

Die erneute histologische Untersuchung der Hauptpräparate ergab, dass 30 Glioblastome, 4 anaplastische Astrozytome WHO Grad III, 2 anaplastische Oligoastrozytome WHO Grad III und ein anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III in der Untersuchung vertreten waren. Die Verteilung ist in Abbildung 8 und 9 dargestellt.

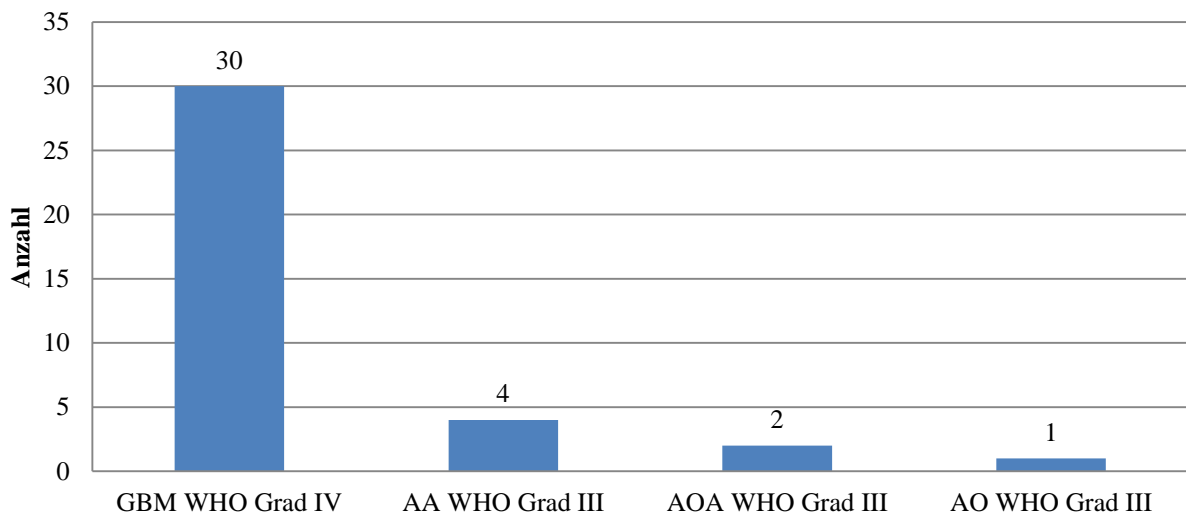
### Histologie der Hauptpräparate

■ GBM WHO Grad IV   ■ AA WHO Grad III   ■ AOA WHO Grad III   ■ AO WHO Grad III



**Abbildung 8: Histologie der Hauptpräparate (Kreisdiagramm)** GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom

### Histologie der Hauptpräparate



**Abbildung 9: Histologie der Hauptpräparate (Säulendiagramm)** GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom



#### **4.2.2 Histologische Ergebnisse der Nachresektate**

In allen durch das intraoperative MRT sichtbar gemachten Nachresektaten konnten maligne Tumorzellen nachgewiesen werden. In 15 Proben wurde, im Vergleich zum Hauptpräparat, ausschließlich derselbe Tumortyp identifiziert. Ebenfalls in 15 der nachresezierten Proben ergaben einen niedrigeren Malignitätsgrad. Weitere 7 Präparate zeigten neben dem primären Malignitätsgrad zusätzlich eine niedriggradigere Komponente (siehe Abbildung 10 und 11). Insgesamt gesehen haben wir in knapp 60% der Fälle (22 von 37) auch niedriggradigere Anteile, davon 7-mal nicht ausschließlich, nachweisen können.

Von den 30 Glioblastomen konnte bei 12 Tumoren kein niedrigerer Tumorgrad festgestellt werden. In 14 dieser Tumoren wurden hauptsächlich Areale mit einer Veränderung von mindestens einer Gradstufe auf den WHO Grad III oder auch II beobachtet. In 4 der Proben des Glioblastoms haben wir Anteile mit niedrigerem und unverändertem Tumorgrad festgestellt. In den primär als WHO Grad III eingestuften anaplastischen Astrozytomen konnten in 2 Fällen Areale mit einer niedrigeren und gleichen Malignität nachgewiesen werden. In den restlichen 2 Proben wurde keine Änderung des Malignitätsgrades im Vergleich zum Hauptpräparat nachgewiesen.

Bei dem Nachresektat des Oligodendrogliomes WHO Grad III konnten neben der unveränderten Dignität auch niedriggradigere Bereiche nachgewiesen werden.

In einem Oligoastrozytom WHO Grad III wurde im Nachresektat ein geringerer Malignitätsgrad nachgewiesen und im zweiten Fall konnte der gleiche Malignitätsgrad nachgewiesen werden. Eine übersichtliche Darstellung findet sich in Abbildung 12 bis 17.

### Allgemeines histologisches Verhalten

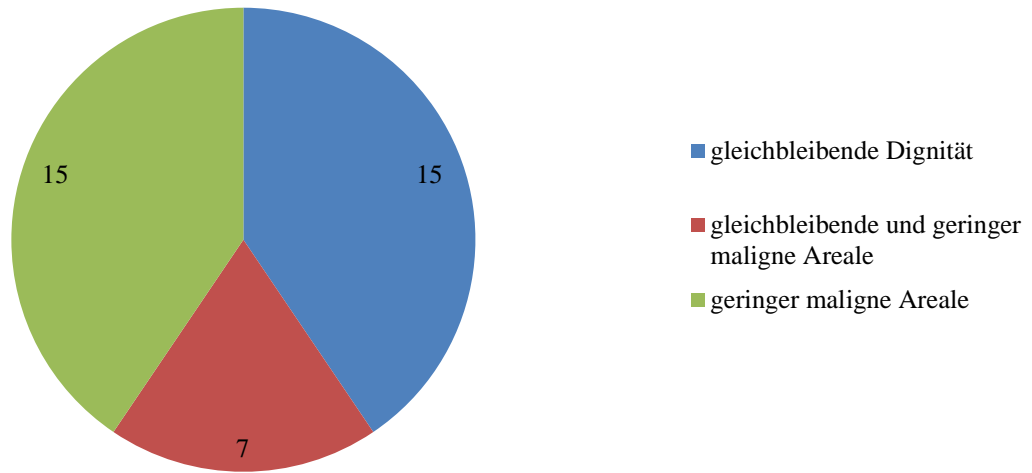


Abbildung 10: Allgemeines histologisches Verhalten (Kreisdiagramm)

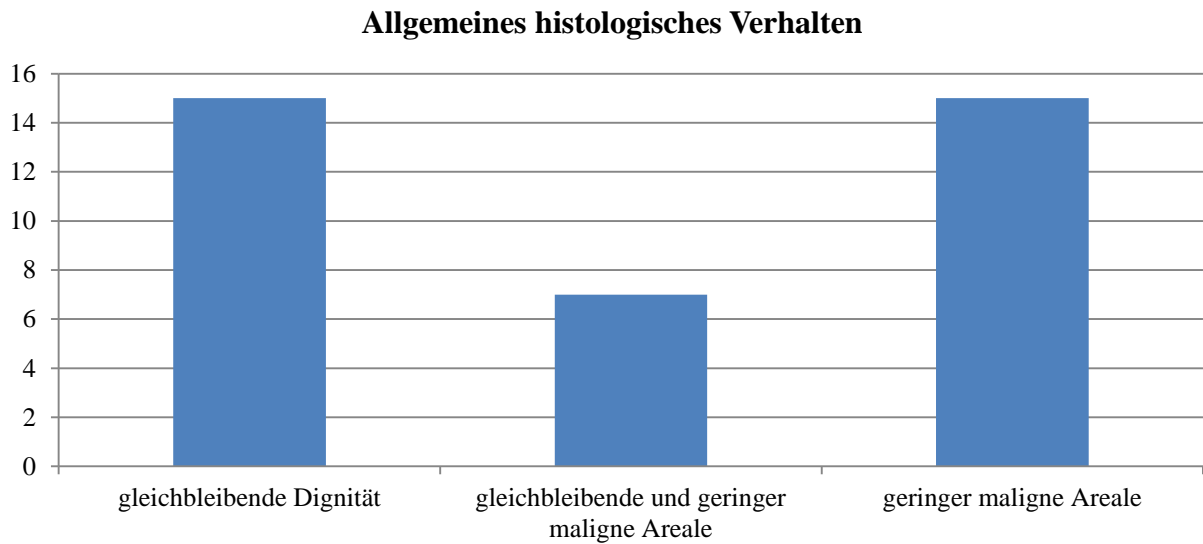
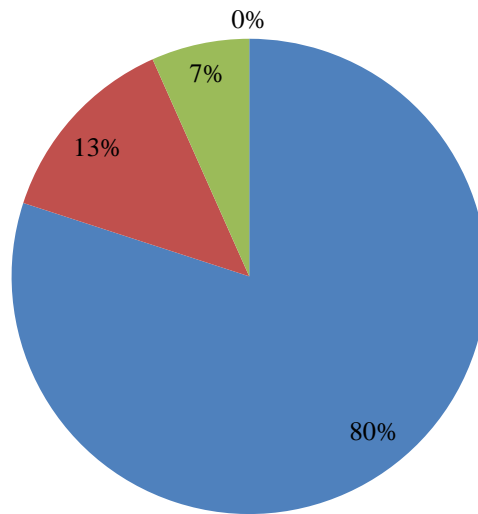


Abbildung 11: Allgemeines histologisches Verhalten (Säulendiagramm)

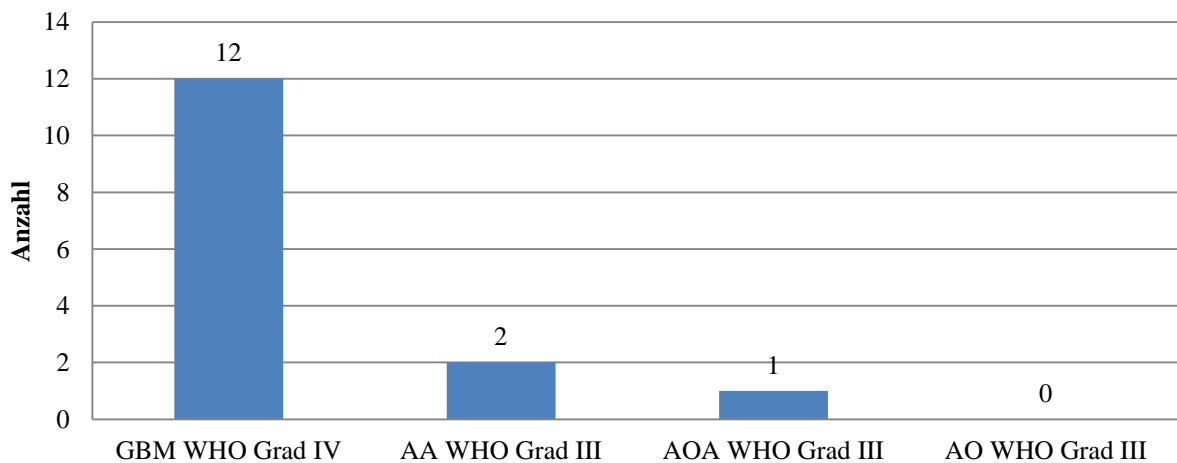
### Identisches Grading

■ GBM WHO Grad IV ■ AA WHO Grad III ■ AOA WHO Grad III ■ AO WHO Grad III



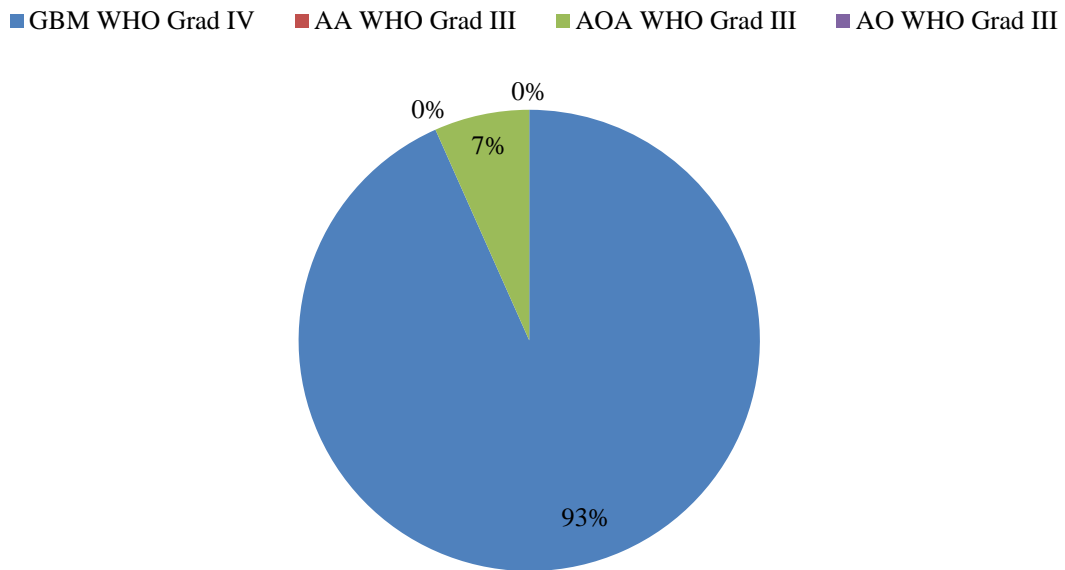
**Abbildung 12: Identisches Grading (Kreisdiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

### Identisches Grading



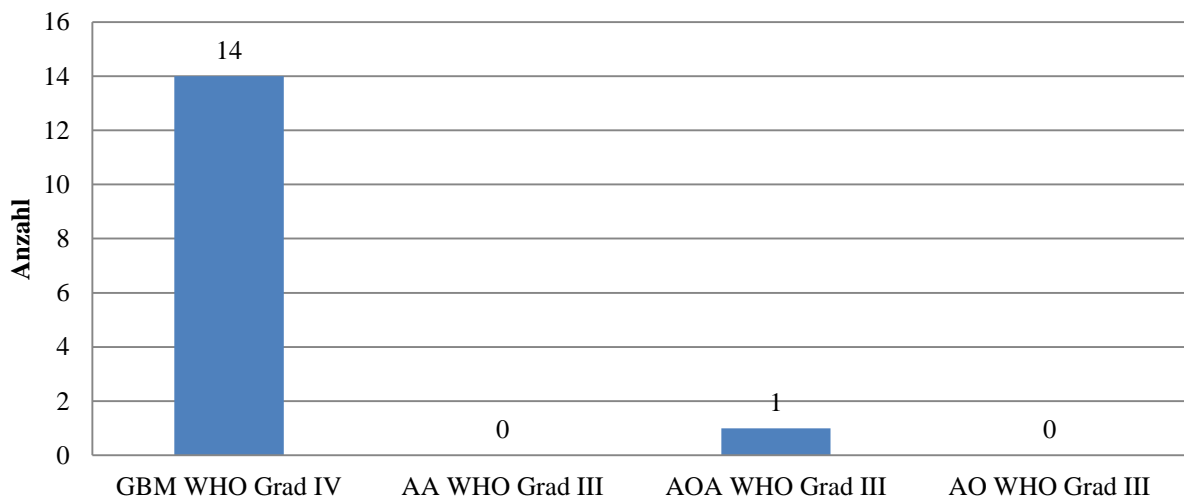
**Abbildung 13: Identisches Grading (Säulendiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

### Anteile mit niedrigerem Grading



**Abbildung 14: Anteile mit niedrigerem Grading (Kreisdiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

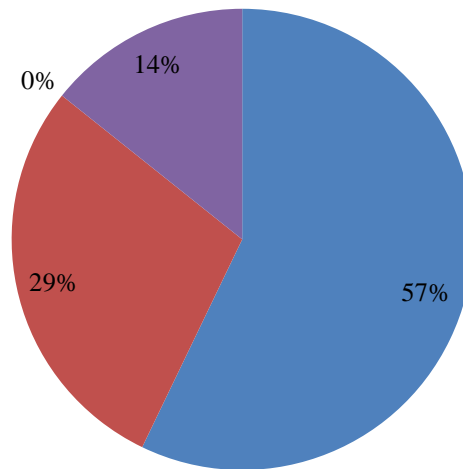
### Anteile mit niedrigerem Grading



**Abbildung 15: Anteile mit niedrigerem Grading (Säulendiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

### Anteile mit niedrigerem und unverändertem Grading

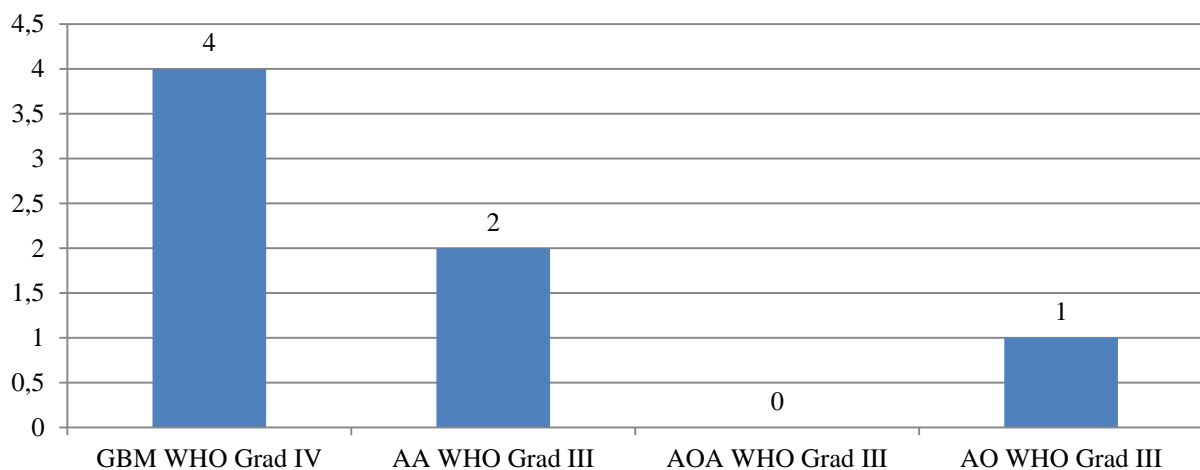
■ GBM WHO Grad IV ■ AA WHO Grad III ■ AOA WHO Grad III ■ AO WHO Grad III



**Abbildung 16: Anteile mit niedrigerem und unverändertem Grading (Kreisdiagramm)**

**GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

### Anteile mit niedrigerem und unverändertem Grading



**Abbildung 17: Anteile mit niedrigerem und unverändertem Grading (Säulendiagramm)**

**GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

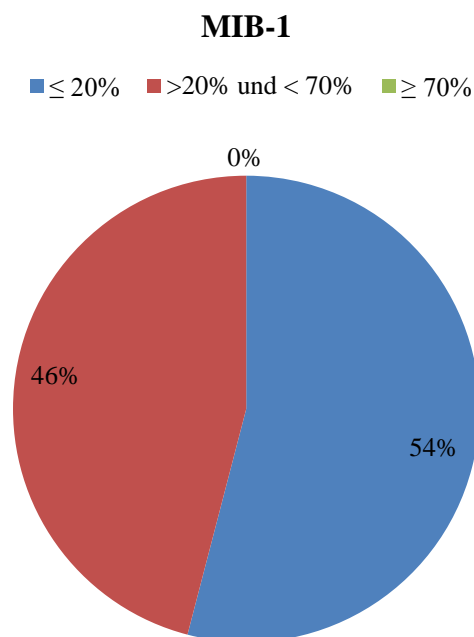
### 4.3 Immunhistologische Untersuchungen

#### 4.3.1 Immunhistologische Ergebnisse der Hauptpräparate

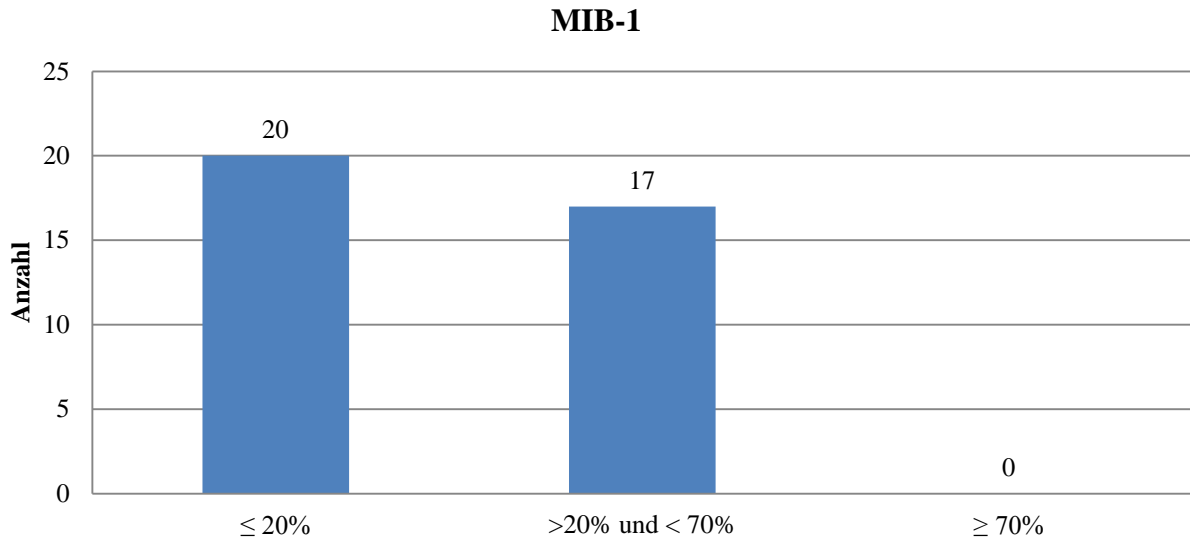
Die entnommenen und asservierten Gewebeproben der nachresezierten Tumoren wurden aus dem Archiv bezogen und mit den immunhistochemischen Markern GFAP, MIB-1, IDH-1 und BRAF erneut untersucht.

In sämtlichen Proben der Gliome, mit Ausnahme der reinen Oligodendrogliome, konnte GFAP nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Abbildungen 18 und 19 sowie den Tabellen 5 und 6 wird das Färbeverhalten der Primärproben gegenüber den MIB-1 Antikörper dargestellt. Auffällig ist dabei, dass in den Hauptpräparaten kein Proliferationsindex über 70 % dargestellt werden konnte. In 46 % der Proben wurde ein Proliferationsindex von  $\leq 20\%$  nachgewiesen. Knapp über die Hälfte des untersuchten Gewebes zeigte Aktivität von  $> 20$  bis  $< 70\%$ .



**Abbildung 18: Verhalten des Proliferationsindex (MIB-1) in den Primärpräparaten (Kreisdiagramm)**



**Abbildung 19: Verhalten des Proliferationsindex (MIB-1) in den Primärpräparaten (Säulendiagramm)**

Tumor	MIB-1-Status			
	0-20%	21-40%	41-60%	61-80%
Glioblastom	14	14	2	0
Anaplastisches Astrozytom III	4	0	0	0
Anaplastisches Oligoastrozytom III	2	0	0	0
Anaplastisches Oligodendrogliom III	0	0	1	0

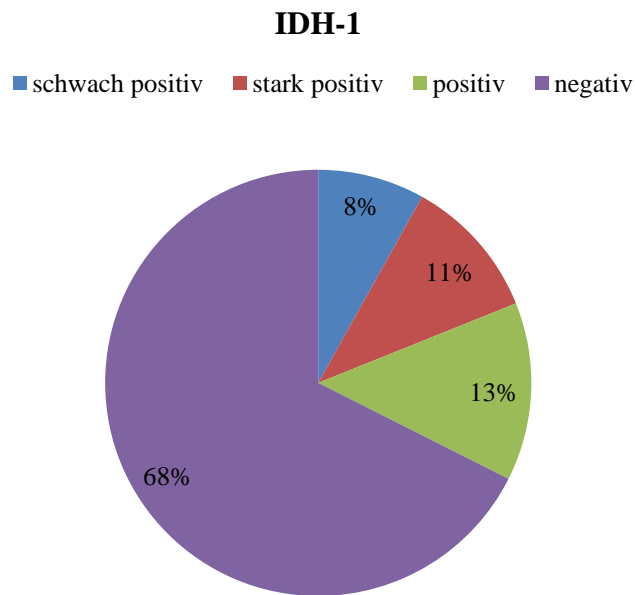
**Tabelle 5: Anzahl der Primärtumoren mit entsprechenden MIB-1-Status**

Tumor	MIB-1-Status			
	0-20%	21-40%	41-60%	61-80%
Glioblastom	37,8%	37,8%	5,4%	0,0%
Anaplastisches Astrozytom III	10,8%	0,0%	0,0%	0,0%
Anaplastisches Oligoastrozytom III	5,4%	0,0%	0,0%	0,0%
Anaplastisches Oligodendrogliom III	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%

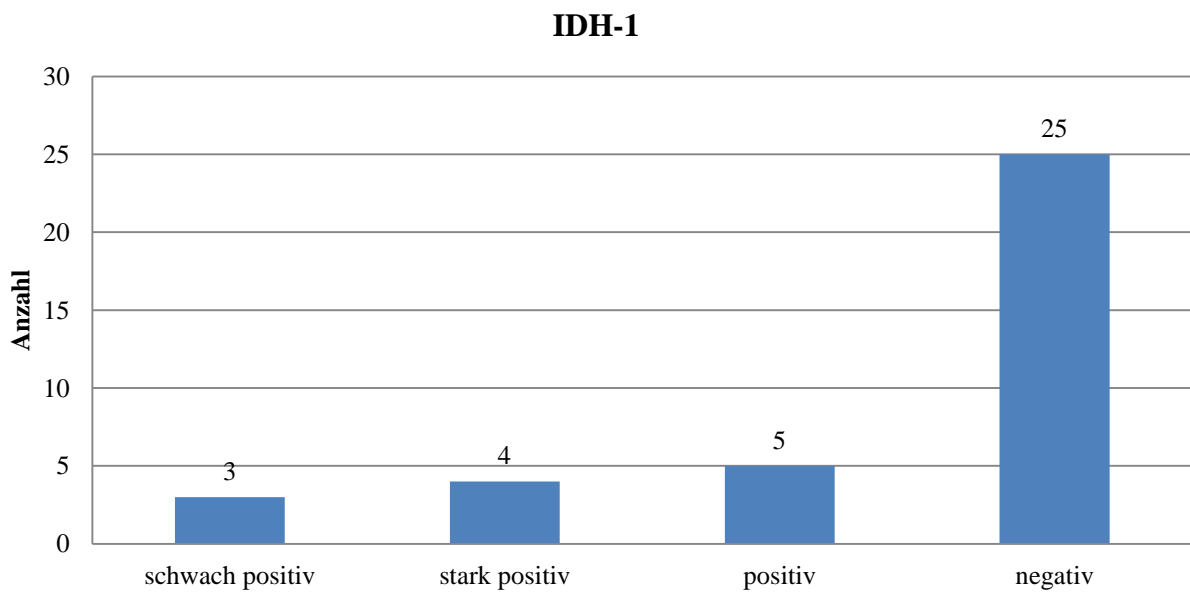
**Tabelle 6: Prozentuale Verteilung der Primärtumoren mit entsprechenden MIB-1-Status**

Der Anteil an IDH-1-negativen Proben ist mit 68 % am größten. Darunter befinden sich 23 Glioblastome, ein anaplastisches Astrozytom WHO Grad III und ein anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III. In 12 Gewebeproben ließ sich eine positive IDH-1-Reaktion

nachweisen. Die genaue Unterteilung kann aus den Abbildungen 20 und 21 sowie den Tabellen 7 und 8 entnommen werden.



**Abbildung 20: Verhalten des IDH-1 Nachweises in den Primärpräparaten (Kreisdiagramm)**



**Abbildung 21: Verhalten des IDH-1 Nachweises in den Primärpräparaten (Säulendiagramm)**



Tumor	IDH-1-Status			
	negativ	schwach positiv	positiv	stark positiv
Glioblastom	23	3	3	1
Anaplastisches Astrozytom III	1	0	1	2
Anaplastisches Oligoastrozytom III	1	0	0	1
Anaplastisches Oligodendrogliom III	0	0	1	0

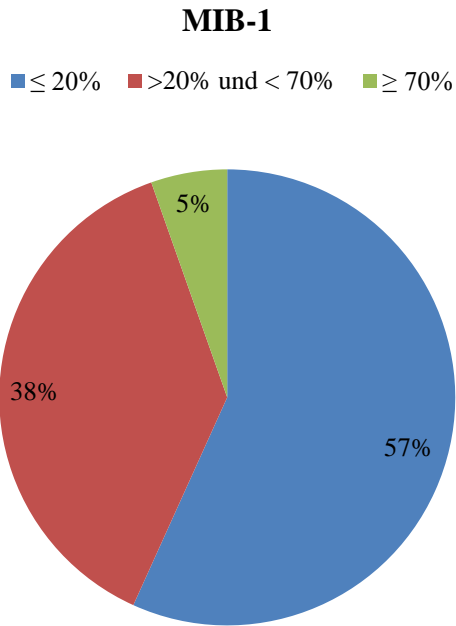
**Tabelle 7: Anzahl der Primärtumoren mit entsprechenden IDH-1-Status**

Tumor	IDH-1-Status			
	negativ	schwach positiv	positiv	stark positiv
Glioblastom	62,2%	8,1%	8,1%	2,7%
Anaplastisches Astrozytom III	2,7%	0,0%	2,7%	5,4%
Anaplastisches Oligoastrozytom III	2,7%	0,0%	0,0%	2,7%
Anaplastisches Oligodendrogliom III	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%

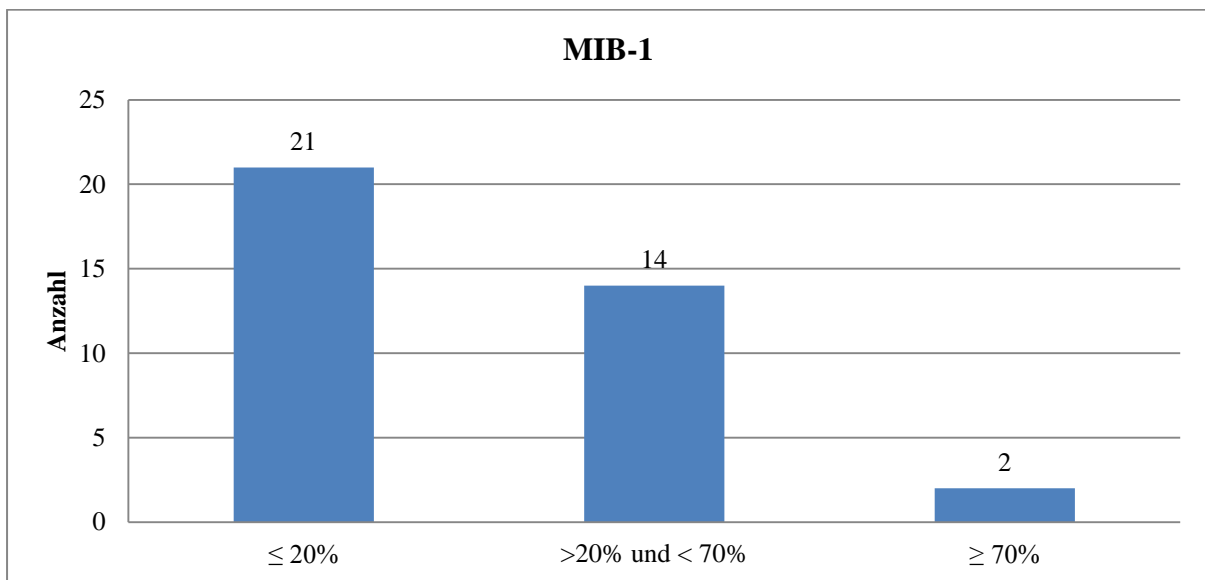
**Tabelle 8: Prozentuale Verteilung der Primärtumoren mit entsprechenden IDH-1-Status**

#### 4.3.2 Immunhistologische Ergebnisse der Nachresektate

MIB-1 wurde in einer Intensität von 5-80% nachgewiesen. In 21 Proben wurde ein Proliferationsindex von  $\leq 20\%$  nachgewiesen. Einen Proliferationsindex von 20-70% wiesen 14 Präparate auf. In 2 Schnitten konnte ein Wachstumsindex von über 70% nachgewiesen werden. Die genaue Verteilung ist aus den Abbildungen 22 und 23 zu entnehmen. Bei den anaplastischen Astrozytomen/Oligodendrogliomen WHO Grad III zeigt sich ein geringer Proliferationsindex. Die Glioblastome weisen höhere Werte auf, wobei in der Mehrzahl der untersuchten Tumoren herdförmig auch ein geringerer Proliferationswert dargestellt werden konnte. In Tabelle 9 und 10 ist die genaue Verteilung der histologischen Diagnose mit dem entsprechenden MIB-1-Status dargestellt.



**Abbildung 22: Verhalten des Proliferationsindex (MIB-1) der Nachresektate (Kreisdiagramm)**



**Abbildung 23: Verhalten des Proliferationsindex (MIB-1) der Nachresektate (Säulendiagramm)**

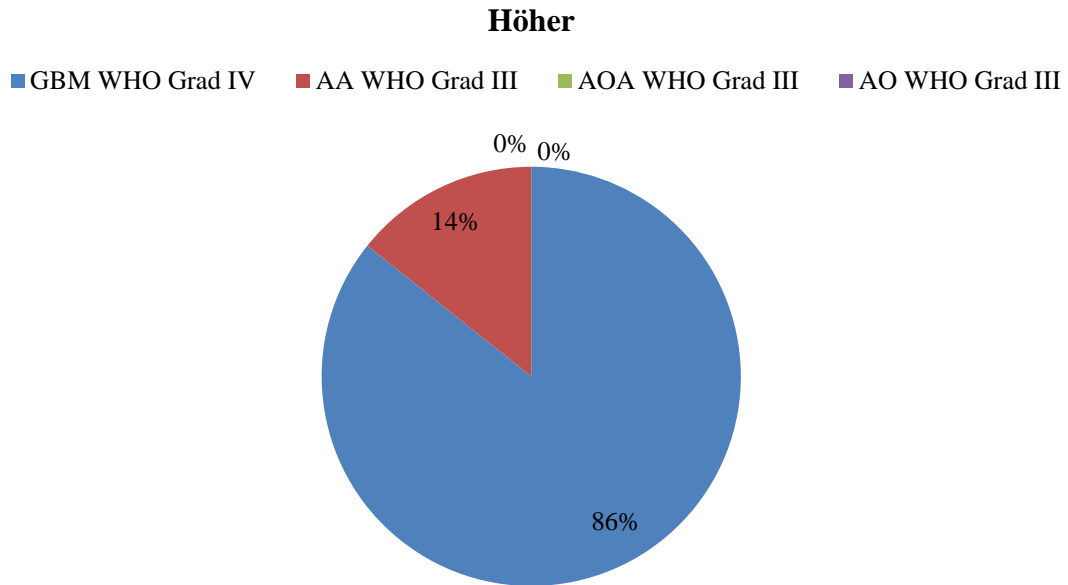
Tumor	MIB-1-Status			
	0-20%	21-40%	41-60%	61-80%
Glioblastom	15	10	3	2
Anaplastisches Astrozytom III	4	0	0	0
Anaplastisches Oligoastrozytom III	1	1	0	0
Anaplastisches Oligodendrogliom III	1	0	0	0

**Tabelle 9: Anzahl der Nachresektate mit entsprechenden MIB-1-Status**

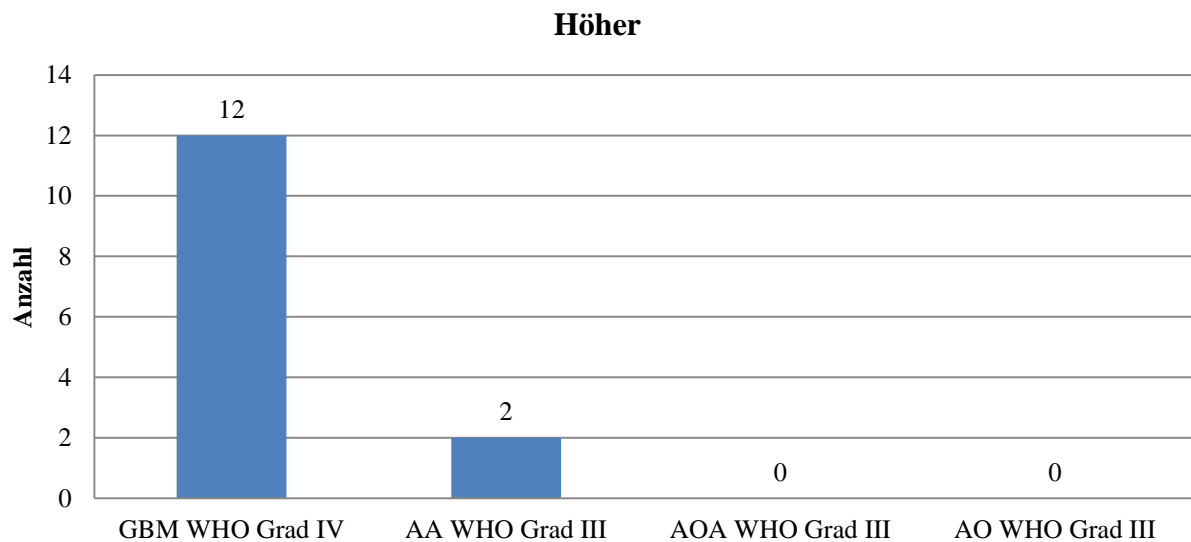
Tumor	MIB-1-Status			
	0-20%	21-40%	41-60%	61-80%
Glioblastom	40,5%	27,0%	8,1%	5,4%
Anaplastisches Astrozytom III	10,8%	0,0%	0,0%	0,0%
Anaplastisches Oligoastrozytom III	2,7%	2,7%	0,0%	0,0%
Anaplastisches Oligodendrogliom III	2,7%	0,0%	0,0%	0,0%

**Tabelle 10: Prozentuale Verteilung der Nachresektate mit entsprechenden MIB-1-Status**

In insgesamt 9 der untersuchten Proben zeigte sich keine Veränderung des Proliferationsindex. Ein höherer MIB-1-Index wurde bei 14 Nachresektaten dargestellt und in ebenfalls 14 untersuchten Gewebeproben wurde ein niedrigerer Proliferationsindex dargestellt. Bei den Glioblastomen zeigten 12 der nachresezierten Gewebeproben einen höheren Proliferationsindex als bei den entsprechenden Primärpräparaten. Zwei der insgesamt vier anaplastischen Astrozytomen verhielten sich dementsprechend. Bei den anaplastischen Oligoastrozytomen und Oligodendrogliom konnte in den Nachresektaten kein höherer Proliferationsindex nachgewiesen werden (siehe Abbildung 24 und 25). Bei 10 der nachresezierten Glioblastomen konnte ein niedrigerer Proliferationsindex nachgewiesen werden. Eine geringere Rate zeigte sich auch bei jeweils einem anaplastischen Astrozytom und dem einen anaplastischen Oligodendrogliom. Zwei der anaplastischen Oligoastrozytome zeigten ebenfalls einen niedrigeren Proliferationsindex (siehe Abbildung 26 und 27).



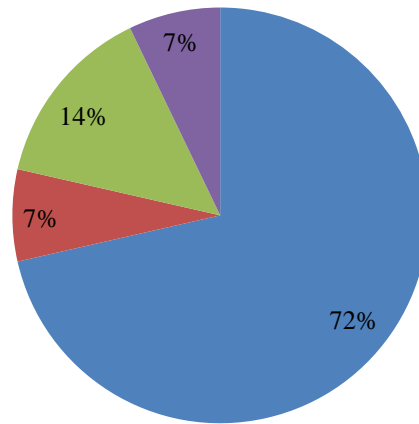
**Abbildung 24: Veränderung des Proliferationsindexes in einen höheren Bereich (Kreisdiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**



**Abbildung 25: Veränderung des Proliferationsindexes in einen höheren Bereich (Säulendiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

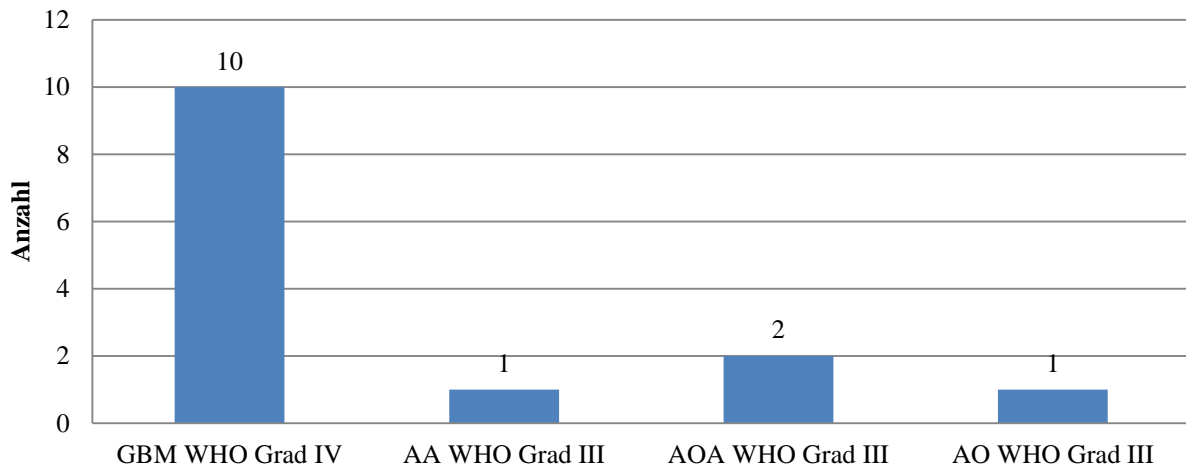
### Niedriger

■ GBM WHO Grad IV   ■ AA WHO Grad III   ■ AOA WHO Grad III   ■ AO WHO Grad III



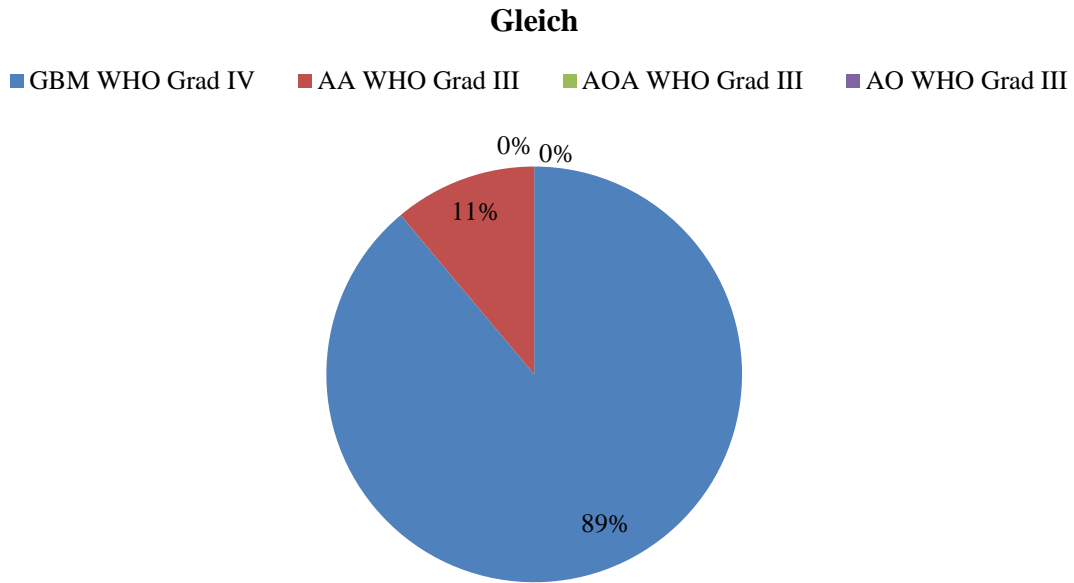
**Abbildung 26: Veränderung des Proliferationsindexes in einen niedrigeren Bereich (Kreisdiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

### Niedriger

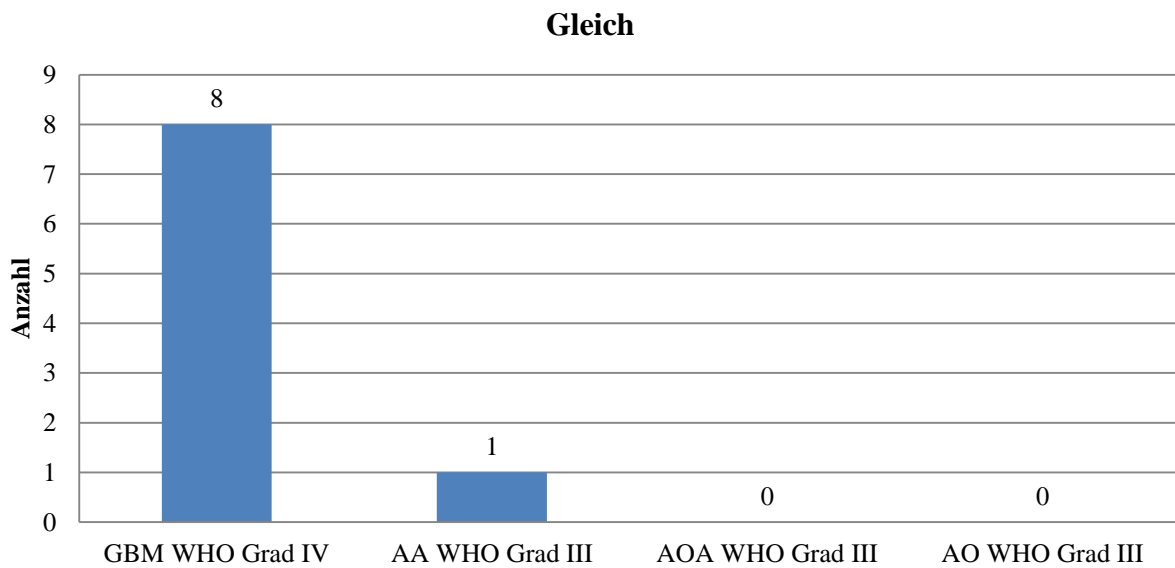


**Abbildung 27: Veränderung des Proliferationsindexes in einen niedrigeren Bereich (Kreisdiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

Gleichgeblieben ist der Proliferationsindex bei 8 Glioblastomen und einem anaplastischen Astrozytom (siehe Abbildung 28 und 29).



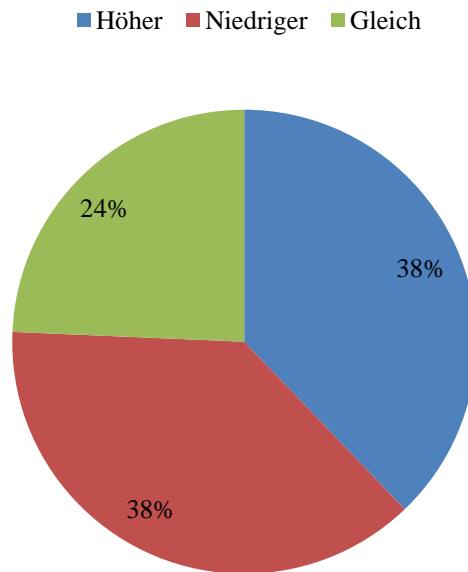
**Abbildung 28: Unveränderter Proliferationsindex (Kreisdiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**



**Abbildung 29: Unveränderter Proliferationsindex (Säulendiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

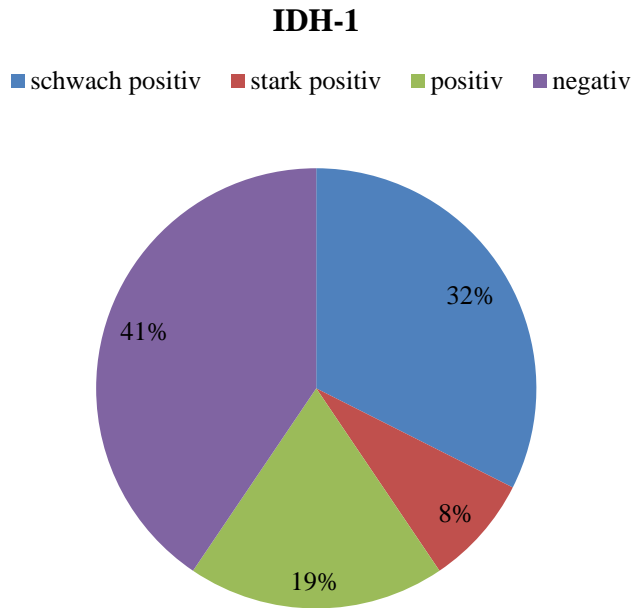
Insgesamt haben wir eine von der Histologie unabhängigen Veränderung des Proliferationsindex in 14 Fällen zu einer höheren sowie auch in 14 Fällen zur niedrigeren Rate feststellen können. Bei 9 der nachuntersuchten Gewebeproben zeigte sich keine Veränderung. In Abbildung 30 ist die prozentuale Aufteilung grafisch dargestellt.

### Veränderung des Proliferationsindex (unabhängig vom histologischen Typ)

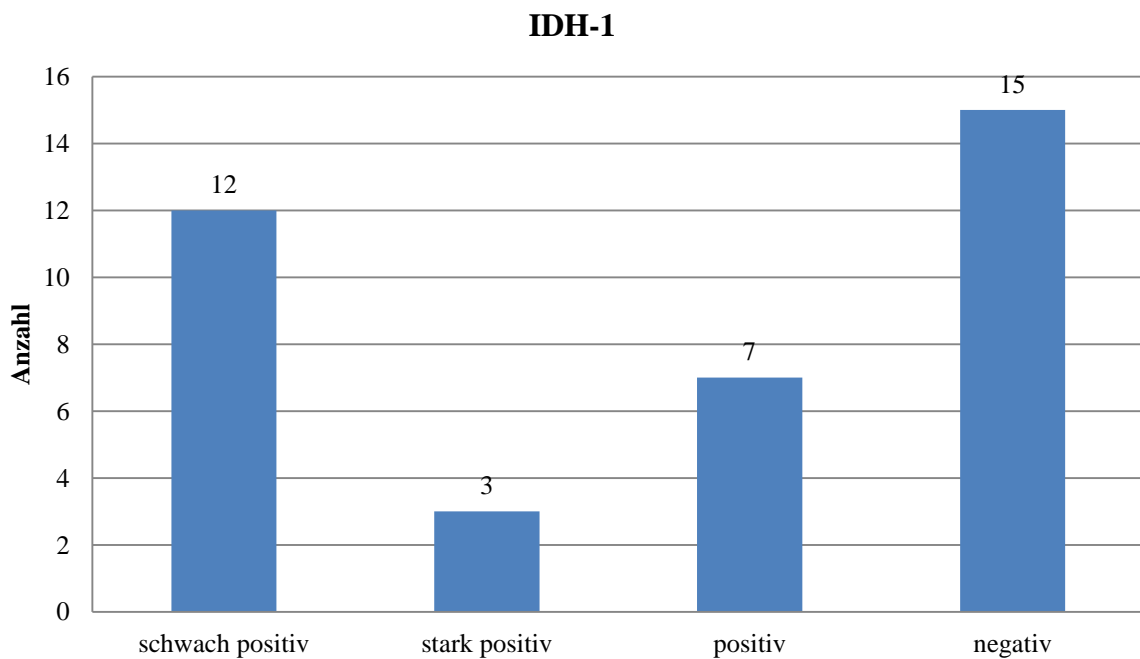


**Abbildung 30: Veränderung des Proliferationsindex (unabhängig vom histologischen Typ)**

Der Marker IDH-1 konnte in 15 Präparaten nicht nachgewiesen werden. In 7 Proben zeigte sich ein normal positives Bild. Schwach positiv konnten 12 Schnitte bewertet werden und ein stark positives Verhalten zeigten 3 Proben (siehe Abbildung 31 und 32).



**Abbildung 31: Verteilung des IDH-1-Nachweises (Kreisdiagramm)**



**Abbildung 32: Verteilung des IDH-1-Nachweises (Säulendiagramm)**



Die Histologie von 14 der 15 negativen Proben entsprach die eines Glioblastoma multiforme WHO Grad IV. Ein anaplastisches Astrozytom WHO Grad III war ebenfalls IDH-1-negativ. Einen stark positiven Nachweis zeigte sich bei 2 anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III und einem anaplastischen Oligoastrozytom WHO Grad III. Bei den 12 Präparaten mit einem wenig positiven Färbeverhalten handelt es sich ausschließlich um Glioblastome. Das genaue Verhalten ist in Tabelle 11 und 12 abgebildet.

Tumor	IDH-1-Status			
	negativ	wenig positiv	positiv	stark positiv
Glioblastom	14	12	4	0
Anaplastisches Astrozytom III	1	0	1	2
Anaplastisches Oligoastrozytom III	0	0	1	1
Anaplastisches Oligodendrogliom III	0	0	1	0

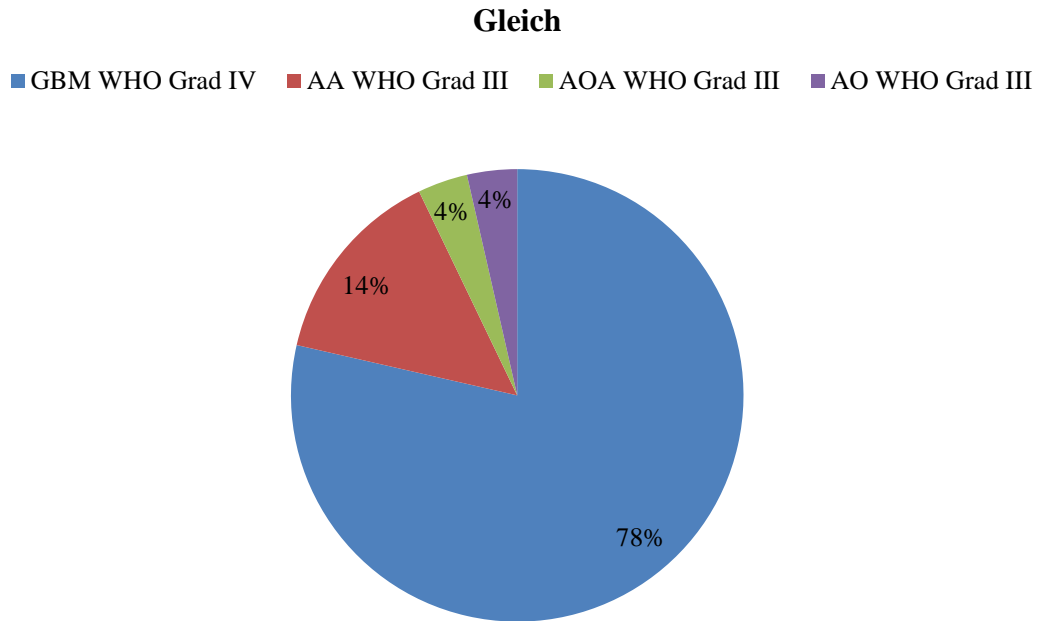
**Tabelle 11: Anzahl der Tumoren mit entsprechenden IDH-1-Status**

Tumor	IDH-1-Status			
	negativ	wenig positiv	positiv	stark positiv
Glioblastom	37,8%	32,4%	10,8%	0,0%
Anaplastisches Astrozytom III	2,7%	0,0%	2,7%	5,4%
Anaplastisches Oligoastrozytom III	0,0%	0,0%	2,7%	2,7%
Anaplastisches Oligodendrogliom III	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%

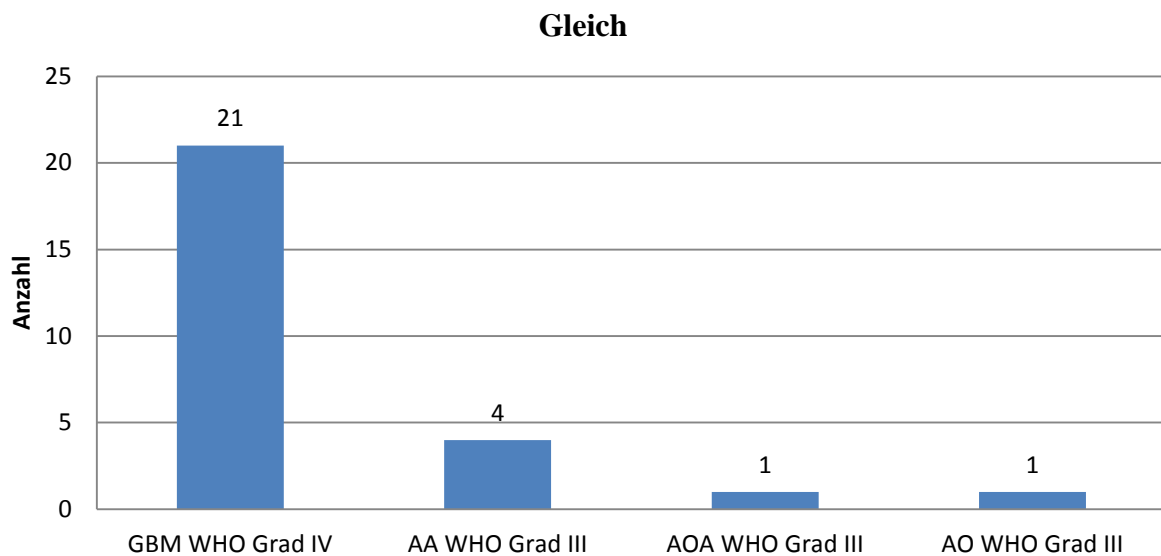
**Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der Tumoren mit entsprechenden IDH-1-Status**

Alle auf den IDH-1-Marker stark positiv reagierenden Tumoren haben einen geringen Proliferationsindex von  $\leq 10\%$ . Die 4 Tumoren mit einer Wachstumsrate von über 60% sind IDH-1-negativ und zeigen Anteile eines Glioblastoma multiforme.

Der IDH-1-Nachweis änderte sich in 28 Fällen nicht. Davon betroffen sind 22 Glioblastome, sämtliche anaplastische Astrozytome WHO Grad III sowie ein anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III und das anaplastische Oligodendrogliom WHO Grad III (siehe Abbildung 33 und 34).

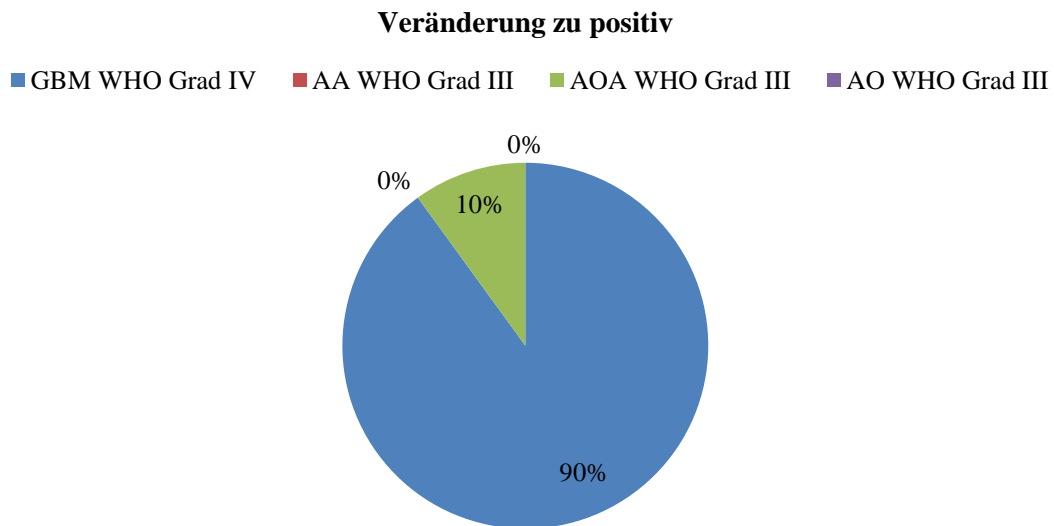


**Abbildung 33: Gleichbleibender IDH-1-Nachweis (Kreisdiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

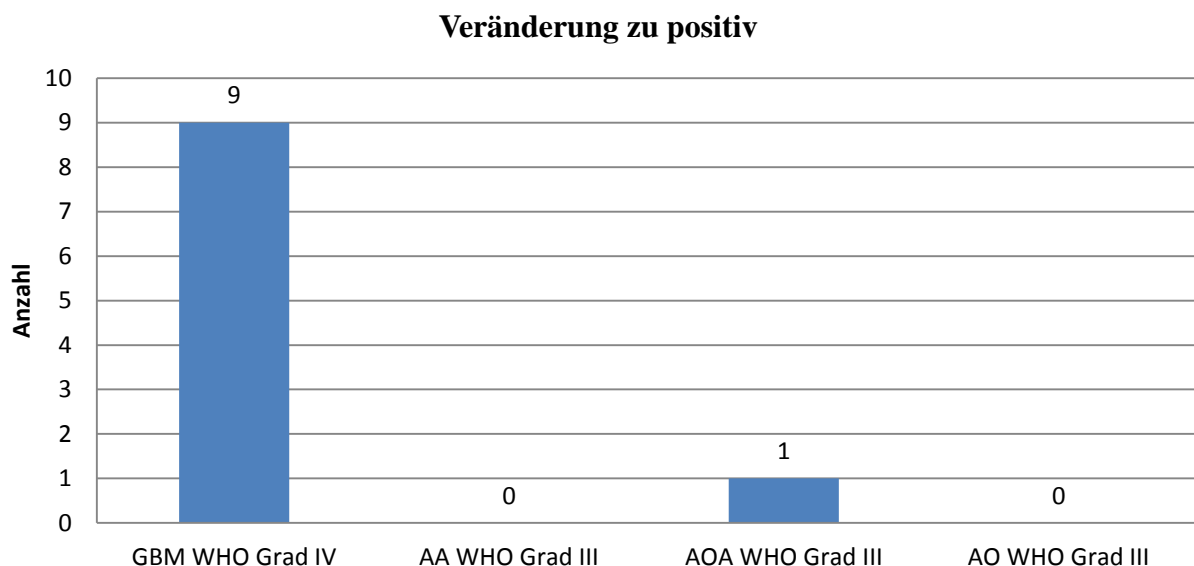


**Abbildung 34: Gleichbleibender IDH-1-Nachweis (Säulendiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

In insgesamt 10 Nachresektaten konnte eine positive IDH-1-Färbung im Vergleich zum negativen Hauptpräparat nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um 8 Glioblastome und einem anaplastischen Oligoastrozytom WHO Grad III (siehe Abbildung 35 und 36).



**Abbildung 35: Veränderung hin zum positiven IDH-1-Nachweis (Kreisdiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

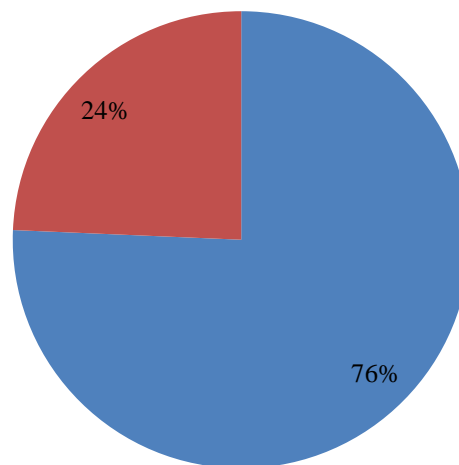


**Abbildung 36: Veränderung hin zum positiven IDH-1-Nachweis (Säulendiagramm) GBM = Glioblastoma multiforme, AA = Anaplastisches Astrozytom, AOA = Anaplastisches Oligoastrozytom, AO = Anaplastisches Oligodendrogliom**

Wenn von dem histologischen Typ abgesehen wird, haben wir bei 28 der nachuntersuchten Gewebeproben keine Änderung nachweisen können. Es konnte jedoch in 10 Proben eine Veränderung hin zum positiven IDH-1-Nachweis dargestellt werden. In Abbildung 37 wird dies nochmals grafisch dargestellt.

### Veränderung des IDH-1-Nachweises (unabhängig vom histologischen Typ)

■ Keine Veränderung ■ Veränderung zu positiv



**Abbildung 37: Veränderung des IDH-1-Nachweises (unabhängig vom histologischen Typ)**

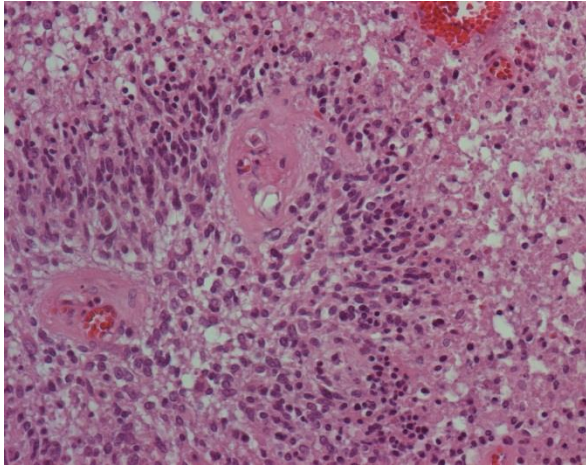
Die Auswertung der Gliompräparate auf BRAF verlief enttäuschend. Lediglich ein epitheloides Glioblastom zeigte eine deutliche Immunreaktion, während die übrigen Fälle keine oder nur eine schwache Färbung erkennen ließen, die nicht auswertbar war, da diese nicht von Artefakten abzugrenzen war. Unsere Kontrollpräparate (2 maligne Melanome der Nasenschleimhaut) wiesen hingegen eine kräftige Färbung auf.

## **4.4 Ausgewählte Falldarstellungen**

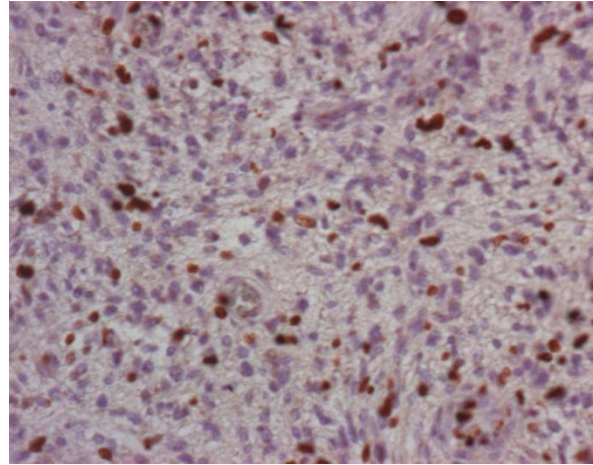
In dem folgenden Abschnitt werden einige dokumentierte Fallberichte beschrieben. Anhand dieser wird das Verhalten der Tumoren dargestellt.

### **4.4.1 Fall 1**

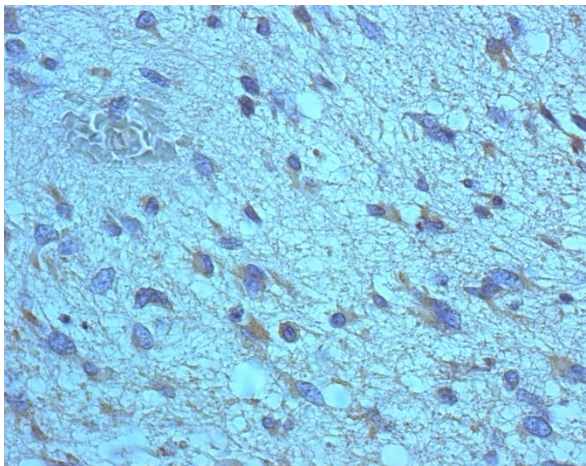
Es handelt um einen 72-jährigen Patienten bei dem 2011 erstmals ein Glioblastom diagnostiziert wurde. Seine Symptomatik zeigte sich über eine Woche und war gekennzeichnet durch Gedächtnisstörungen und Unsicherheiten bei Bewegungen der linken Körperhälfte. Die Aufnahmeuntersuchung zeigte eine dysmetrische Störung des linken Armes und Beines. Das Gangbild war unsicher und geprägt von einer Gleichgewichtsstörung und einer Gangataxie. Im Arm- und Beinvorhalteversuch wurde eine linksseitige Absinktendenz deutlich. Insgesamt ergab sich der Eindruck einer latenten Hemiparese der linken Körperhälfte. Der Patient hatte keine relevanten Vorerkrankungen. Im MRT-Bild zeigte sich rechts frontal eine 6x7x5 cm messende Raumforderung mit kontrastmittelaufnehmenden Randsaum und zentraler Nekrose. Die Symptomatik verschlechterte sich im stationären Aufenthalt deutlich, sodass eine Operationsindikation gestellt wurde. Es erfolgte die Tumorexstirpation unter Zuhilfenahme der Neuronavigation, der 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik und dem intraoperativem MRT. Die intraoperative Fluoreszenzfärbung zeigte eine deutliche Rotmarkierung des Tumorgewebes mit verbläulichem Randsaum. Eine Resektion des Tumors mit Darstellung der gesunden Gewebegrenzen wurde durchgeführt. Makroskopisch und unter Fluoreszenztechnik konnte kein Tumor mehr erfasst werden. Im intraoperativem MRT-Bild zeigte sich eine sehr gute Tumorsektion mit stecknadelkopfgroßem kontrastmittelaufnehmendem Anteil im Bereich des Daches des III. Ventrikels, woraufhin einer Nachresektion erfolgte. Die Operation verlief ohne Komplikationen und in der postoperativen Kontrolle wurde ein regelrechter Befund dargestellt. Die Symptomatik besserte sich deutlich, sodass der Patient ohne Verzögerung entlassen werden konnte. In der histologischen Auswertung zeigte sich das Bild eines klassischen Glioblastoma multiforme WHO Grad IV (Abbildung 38). Der Proliferationsindex MIB-1 lag bei 20% (Abbildung 39). Eine IDH-1-Mutation konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 40).



**Abbildung 38: Klassisches Glioblastoma multiforme WHO Grad IV in HE-Färbung**



**Abbildung 39: Klassisches Glioblastoma multiforme WHO Grad IV mit einem MIB-1-Index von 20%**

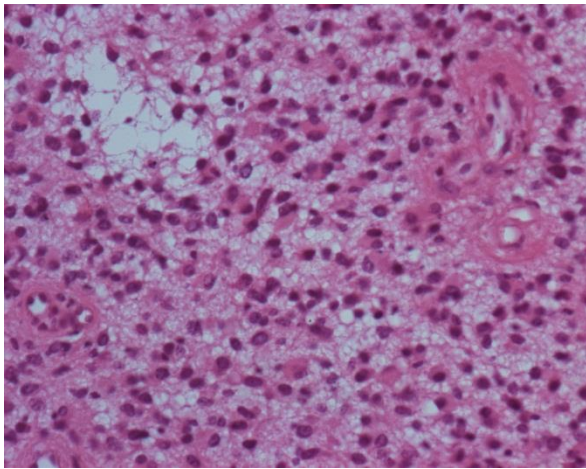


**Abbildung 40: Klassisches Glioblastoma multiforme WHO Grad IV mit negativen IDH-1-Status**

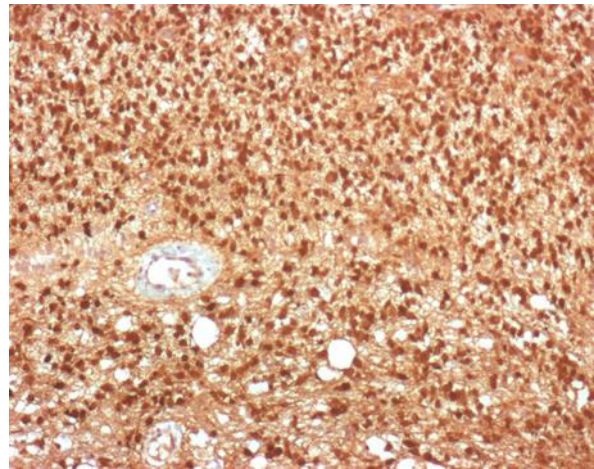
#### **4.4.2 Zweiter Fall**

Bei einer 31-jährigen Patientin wurde 2011 ein anaplastisches Astrozytom entsprechend dem WHO Grad III diagnostiziert. In einer primären Operation konnten lediglich 10% der Tumormasse entfernt werden. Das Erstsymptom war eine unklare Bewusstlosigkeit. Die aktuelle klinische Untersuchung zeigte keine Auffälligkeiten. Lediglich ein homonymer

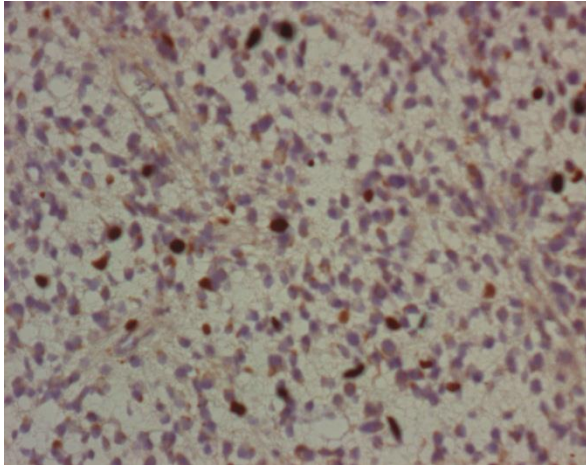
Gesichtsfeldausfall konnte nachgewiesen werden. Ein etwa 7x7 cm großer Tumor rechts temporal, der bis an das Hinterhorn heranreichte, konnte in der bildgebenden Untersuchung nachgewiesen werden. Schließlich wurde eine Tumorexstirpation mit Zuhilfenahme der Neuronavigation und dem intraoperativem MRT durchgeführt. Im intraoperativem MRT-Bild präsentierte sich nach technischen Schwierigkeiten, eine unklare Struktur rechts temporal. Nach chirurgischer Darstellung zeigte sich eine temporale Einblutung, die inklusive weiteren suspekten Gewebe entfernt wurde. Postoperativ erholte sich die Patientin rasch. Aufgrund von Liquoraustritt aus dem Bereich der Wunde musste ein Kompressionsverband für einige Tage angelegt werden. Die Patientin konnte symptomlos entlassen werden. Histologisch wurde die Diagnose des anaplastischen Astrozytoms WHO Grad III gestellt (Abbildung 41). Die untersuchten Proben der Tumorränder zeigten in 3 Fällen das Bild eines anaplastischen Astrozytomes WHO Grad III. In einem Präparat wurden noch Anteile von normalem Hirngewebe und ein Astrozytom WHO Grad II nachgewiesen. Der Tumor zeigt eine positive IDH-1-Färbung (Abbildung 42). Der Proliferationsindex MIB-1 betrug 7% (Abbildung 43).



**Abbildung 41: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III in HE-Färbung**



**Abbildung 42: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit positiver IDH-1-Färbung**

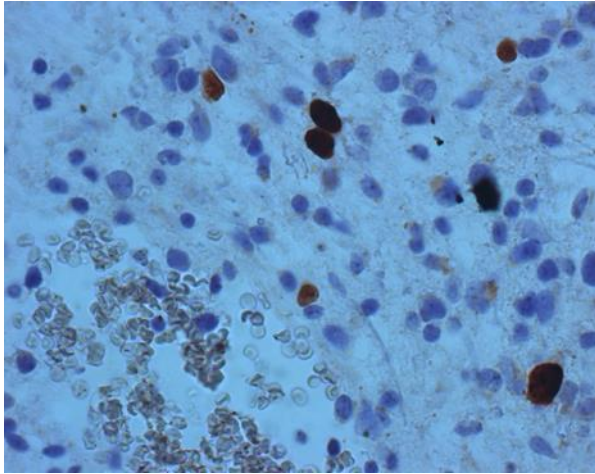


**Abbildung 43: Anaplastisches Astrozytom  
WHO Grad III mit einem MIB-1-Index  
von 7%**

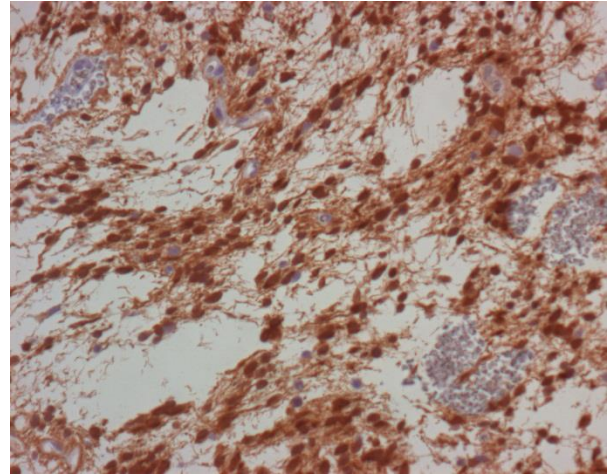
#### **4.4.3 Dritter Fall**

Eine 36-jährige Patientin stellte sich mit progredienten Kopfschmerzen vor. In der klinischen Untersuchung zeigten sich Stauungspapillen. Im präoperativem MRT-Bild konnte ein großer rechts frontal gelegener Tumor dargestellt werden. Eine Kontrastmittelanreicherung des Herdes fehlte. Nachdem die Operationsindikation gestellt wurde, erfolgte eine Tumorexstirpation mit Hilfe der Neuronavigation und dem intraoperativem MRT im Jahre 2012. Der Tumor konnte im Operationsmikroskop und unter Verwendung der Neuronavigation gut abgegrenzt und subjektiv komplett abgetragen werden. Im intraoperativem MRT-Bild zeigte sich noch Tumorgewebe im frontolateralen Bereich. Eine weitere Resektion des 1,5x3 cm großen Residualtumors wurde mikrochirurgisch durchgeführt. Postoperativ besserte sich die Symptomatik und es traten keine Komplikationen auf. Die histologische Untersuchung ergab das Bild eines anaplastischen Astrozytoms WHO Grad III. In den Resektaten nach dem intraoperativem MRT wurden auch Areale mit einem Astrozytom WHO Grad II sichtbar. Der Proliferationsindex MIB-1 betrug 8% (Abbildung 44). Der Tumor zeigte eine stark positive IDH-1-Färbung (Abbildung 45).





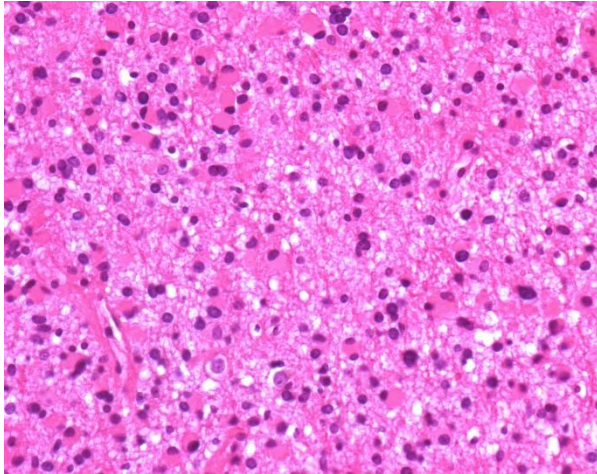
**Abbildung 44: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit einem MIB-1-Index von 8%**



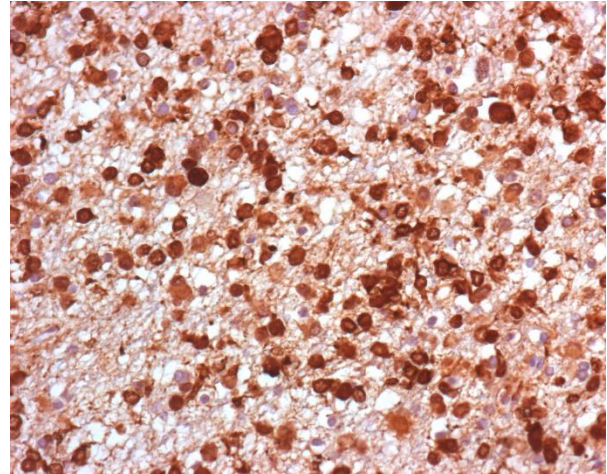
**Abbildung 45: Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit stark positiver IDH-1-Färbung**

#### **4.4.4 Vierter Fall**

Eine 53-jährige Frau stellte sich 2012 nach einem wiederholten Bewusstseinsverlust bei unklarer Genese vor. Die Patientin klagte auch über zunehmende rechtseitige Kopf- und Nackenschmerzen. Im präoperativen MRT zeigte sich eine tumorsuspekte Läsion im linken Frontallappen mit kleinen kontrastmittelaufnehmenden Arealen, die bis an den Balken und dem linken Vorderhorn heranreichten. Nach der Indikationsstellung folgte die Tumorexstirpation unter Verwendung der Neuronavigation, der 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik und dem intraoperativem MRT. Makroskopisch und mit Hilfe der Fluoreszenzdarstellung konnte der Tumor subjektiv vollständig entfernt werden. Das Ergebnis wurde durch die intraoperative MRT-Untersuchung kontrolliert. Es zeigte sich eine fast vollständige Tumorresektion ohne pathologisches Enhancement. Eine Nachresektion konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die histologische Begutachtung zeigte das typische Bild eines anaplastischen Oligoastrozytom WHO Grad III (Abbildung 46). In dem Präparat, das nach dem intraoperativem MRT gewonnen wurde, konnte das Oligoastrozytom mit dem WHO Grad III nachgewiesen werden. Die IDH-1-Färbung war stark positiv (Abbildung 47), während der Wachstumsfaktor MIB-1 8% betrug.



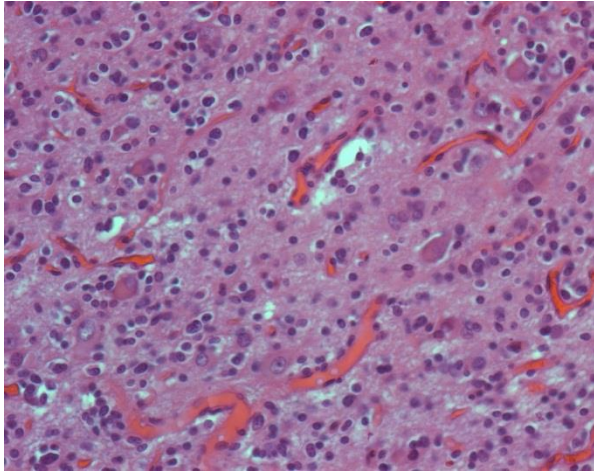
**Abbildung 46: Anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III in HE-Färbung**



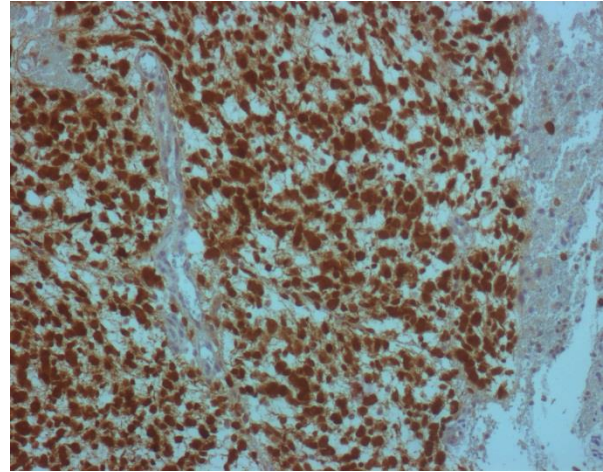
**Abbildung 47: Anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III mit stark positiver IDH-1-Färbung**

#### **4.4.5 Fünfter Fall**

Es handelt sich um einen 43-jährigen Patienten mit einem anaplastischen Oligodendrogliom WHO Grad III im rechten Frontallappen. 2012 erfolgte auch hier eine operative Tumorexstirpation mit Hilfe der Neuronavigation, der 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenzdarstellung und dem intraoperativem MRT. Nach der makroskopischen Tumorresektion zeigte die intraoperative MRT-Aufnahme noch geringe Tumorareale. Eine chirurgische Nachresektion konnte erfolgreich durchgeführt werden. In der postoperativen Bildgebung präsentierte sich eine erfolgreiche Tumorresektion ohne pathologisches Enhancement. Histologisch wurde ein anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III diagnostiziert (Abbildung 48). In dem Nachresektat zeigen sich Anteile eines anaplastischen Oligodendroglioms WHO Grad II und III, sowie ausgedehnte Verkalkungen. Die IDH-1-Färbung war stark positiv (Abbildung 49) und der Proliferationsindex MIB-1 lag bei 5%.



**Abbildung 48: Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III in HE-Färbung mit deutlichen Verkalkungen**



**Abbildung 49: Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III mit stark positiver IDH-1-Färbung**

#### **4.4.6 Sechster Fall**

Hier wird der Fall eines 53-jährigen Patienten dargestellt. Es handelt sich um ein Glioblastomrezidiv im linken Okzipitallappen. Die Voroperation wurde vor einem Jahr durchgeführt. Die klinische Symptomatik war jedoch nicht sehr stark ausgeprägt. Die Tumorexstirpation mit Neuronavigation, 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik und intraoperativem MRT wurde 2012 durchgeführt. Nachdem der Tumor mikrochirurgisch entfernt werden konnte, zeigten sich noch vereinzelt fluoreszierende Areale, die ebenfalls reseziert wurden. Im intraoperativem MRT-Bild wurde ein kleiner Residualtumor am Boden der Resektionshöhle sichtbar, der auch erfolgreich entfernt werden konnte. Anhand der Gewebeprobe konnte die Diagnose eines Glioblastoma multiforme WHO Grad IV gestellt werden. In den Präparaten der Nachresektionen wurde jedoch ein niedrigerer Tumorgrad nachgewiesen. Es wurden dort nur Bestandteile eines Astrozytoms WHO Grad II und III nachgewiesen. Die immunhistochemische IDH-1-Färbung war schwach positiv gewesen und der Proliferationsindex lag bei 12%.

#### **4.4.7 Siebter Fall**

Es handelt sich um einen 17-jährigen Patienten bei dem vor einem halben Jahr bereits ein Glioblastom mit Anteilen eines anaplastischen Astrozytoms entfernt wurde. Der Patient litt unter einer beinbetonten rechtseitigen Hemiparese und symptomatischen epileptischen Anfällen. Der Rezidivtumor befand sich links postzentral. Es wurde bei diesem Patient eine erneute Tumorexstirpation mit Neuronavigation, 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik und intraoperativem MRT 2012 durchgeführt. Nachdem das Operationsteam eine subjektive komplette Tumorresektion erreicht hatte, wurde das intraoperativ MRT-Bild erstellt. Hier zeigte sich eine weitere tumorsuspekte Ödemzone im Gyrus präzentralis. Es erfolgte eine nochmalige Nachresektion am Vorderrand der Resektionshöhle. Das primäre Präparat zeigte das Bild eines kleinzelligen Glioblastoma multiforme mit einer negativen IDH-1-Färbung und einer hohen Wachstumsrate (MIB-1) von 80%. In den Nachresektaten, die erst nach dem MRT entnommen wurden und aus den Randgebieten entstammen, ist ein WHO Grad II dargestellt. Hier zeigte sich die IDH-1-Färbung schwach positiv und der Proliferationsindex lag bei 4%.

#### **4.4.8 Achter Fall**

Bei einer 48-jährigen Patientin kam es zu plötzlichen Orientierungsstörungen. In der Aufnahmeuntersuchung konnten jedoch keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Zur Ursachenabklärung wurde ein MRT durchgeführt. In der Aufnahme ist eine inhomogene Raumforderung im Hypothalamus mit der Verlegung des Foramen monroi und konsekutiven Hydrocephalus sichtbar geworden. Die Hirnbasisgefäße waren umwachsen und das Chiasma opticum war nur schwer abgrenzbar. Unter stationärer Beobachtung verschlechterte sich der Zustand der Patientin zunehmend. Es zeigten sich ausgeprägte Orientierungsstörungen, Übelkeit und Kopfschmerzen. Der Tumor wurde unter Verwendung der Neuronavigation und dem intraoperativem MRT 2011 reseziert. Aufgrund der ausgedehnten Tumorfläche, mit Ummauerung wichtiger Gefäße, konnte die mikrochirurgische Resektion nur schwer durchgeführt werden. Nachdem das Operationsteam subjektiv den Tumor entfernt hatte, wurde im intraoperativen MRT-Bild weiteres suspektes Gewebe vor den arteriellen Gefäßen sichtbar. Eine weitere Ausweitung der Resektion war erfolgreich. Lediglich um die Gefäße herum musste etwas Tumorgewebe stehen gelassen werden. In der postoperativen bildgebenden Kontrolle war kein eindeutiges Tumorgewebe mehr sichtbar. Im histologischen Bild wurde die Diagnose eines

kleinzelligen Glioblastoma multiforme WHO Grad IV gestellt. Die immunhistochemische Untersuchung ergab eine negative IDH-1-Färbung sowie einen Proliferationsindex (MIB-1) von 20%. Die Resektate nach intraoperativer MRT-Kontrolle zeigten ebenfalls das Bild eines kleinzelligen Glioblastomes.

#### **4.4.9 Neunter Fall**

Ein Rezidiv eines vor etwa einem Jahr operierten rechts frontal gelegenen Glioblastoms wurde bei einem 45-jährigen Patienten festgestellt. Es handelte sich nun um einen Rezidivtumor im Vorderhorn des rechten Seitenventrikels, im Bereich des Septum pellucidum und zusätzlich um einen weiteren Tumorherd rechts präzentral. Der Patient zeigte präoperativ keine auffällige Symptomatik. Eine mikrochirurgische Tumorexstirpation unter Zuhilfenahme der Neuronavigation, der 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik und dem intraoperativem MRT wurde 2012 durchgeführt. In der intraoperativen MRT-Aufnahme erkannte man kontrastmittelanreichernde Tumorreste am vorderen Seitenventrikel und im Bereich des Septum pellucidum. Eine großzügige Nachresektion der durch Fluoreszenz- und Kontrastmittelanreicherung sichtbar gewordenen Tumorreste wurde durchgeführt. Postoperativ präsentierte sich noch eine bandförmige Kontrastmittelanreicherung am Unterrand des Balkens im Septum interventriculare. Die intraoperativ nachgewiesenen kontrastmittelanreichernden Herde am vorderen Seitenventrikel und an der Cella media des Seitenventrikels wurden komplett entfernt. Das primäre Präparat entsprach dem histologischen Bild nach einem klassischen Glioblastoma multiforme WHO Grad IV. In den nachresezierten Präparaten zeigte sich in einem Fall kein Tumorgewebe, in dem restlichen Material konnte Tumor vom WHO Grad II und III nachgewiesen werden. Der IDH-1-Marker zeigte eine positive Anfärbung und der Proliferationsindex lag bei 6%.

#### **4.4.10 Zehnter Fall**

Ein 66-jähriger Patient stellte sich nach einem erstmaligen generalisierten epileptischen Anfall zur Abklärung vor. In einer MRT-Aufnahme konnte im rechten Temporallappen ein 1x1 cm großer Tumor mit kontrastmittelaufnehmendem Randsaum, zentraler Nekrose und perifokaler Ödemzone identifiziert werden. Aufgrund einer Pneumonie des Patienten musste die Operation

um einige Wochen verschoben werden. Innerhalb von 4 Wochen zeigte sich eine deutliche Progredienz des Tumors, dessen Volumen sich fast verdoppelt hat. Außerdem markierten sich im Zentrum deutlich nekrotische Anteile und das Ödem wurde ausgeprägter dargestellt. Unter Zuhilfenahme der Neuronavigation, der 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik, sowie dem intraoperativen MRT wurde der Tumor 2011 reseziert. Nach Abtragung der makroskopisch sichtbaren und fluoreszierenden Tumorteile wurde ein intraoperatives MRT-Bild angefertigt. In dieser Aufnahme konnten noch partiell knotige Kontrastmittelanreicherungen an der oberen und unteren Zirkumferenz des Resektionsrandes dargestellt werden. Anschließend wurden die auch noch fade fluoreszierenden Areale reseziert. In den postoperativen Kontrollen wurde die komplette Resektion der mit Kontrastmittel dargestellten Herde bestätigt. Die histologische Untersuchung ergab die Diagnose eines Glioblastoma multiforme WHO Grad IV. In den nachresezierten Präparaten wurden jedoch nur Tumoren entsprechend dem WHO Grad II und III dargestellt. Das Gewebe zeigte eine positive IDH-1-Färbung und der Proliferationsindex betrug etwa 35%.

#### **4.4.11 Elfter Fall**

Nach mehrfachen unklaren generalisierten epileptischen Anfällen wird ein 30-jähriger Patient zur Abklärung eingeliefert. Postiktal bestand noch eine Desorientiertheit bei sonst unauffälligen körperlichem Befund. In einer initialen computertomographischen Aufnahme wurde eine rechts frontale Raumforderung dargestellt. Im Kernspin zeigte sich ein großer, wenig Kontrastmittel aufnehmender Tumor rechts frontal, der den Balken durchdrang und den linken Frontallappen infiltriert hatte. Nachdem die Operationsindikation gestellt wurde, wurde 2011 der Tumor mikrochirurgisch mit Hilfe der Neuronavigation und dem intraoperativem MRT entfernt. Der rechts frontal gelegene Tumoranteil konnte gut freipräpariert und sukzessive abgetragen werden. Der Balken zeigte sich massiv aufgetrieben und eine Präparation des links frontalen Tumorgewebes schien nicht durchführbar. Nachdem der Herd im rechten Frontallappen entfernt werden konnte, wurde der Patient für die intraoperative Kontrolle in den Kernspintomographen gefahren. Bei der Bilderauswertung zeigte sich noch ein residualer Tumorrest am Hinterrand der Resektionshöhle, sowie der nicht entfernte Tumor in der linken Hirnhälfte. Rechts frontal konnte eine Nachresektion erfolgen. Die Infiltration über den Balken in den linken Frontallappen wurde belassen. Postoperativ war in der Bildgebung im rechten Areal kein Residualtumor mehr nachweisbar. Histopathologisch wurde die Diagnose anaplastisches Astrozytom WHO Grad III

gestellt. In dem Nachresektat des auffälligen Areals von der hinteren Resektionshöhle konnten neben dem Primärtyp auch vereinzelt Areale mit einem diffusen Astrozytom WHO Grad II nachgewiesen werden. Immunhistochemisch war ein negativer IDH-1-Status sowie eine 10%ige Wachstumsproliferationsrate (MIB-1) nachweisbar.

#### **4.4.12          Zwölfter Fall**

Aufgrund eines Tumorrezidives stellte sich ein 49-jähriger Patient zur erneuten operativen Therapie vor. Die erstmalige Diagnose des Glioblastoms wurde vor einem Jahr gestellt. Der Patient wurde daraufhin neurochirurgisch, sowie mit einer Radiochemotherapie behandelt. Seit kurzem litt der Patient unter links betonten fokalen Krampfanfällen. Im Kontroll-MRT zeigte sich eine Größenzunahme des kontrastmittelaufnehmenden Herdes im Bereich der linken Insel. Die körperliche Untersuchung war soweit unauffällig. Nach der Anfertigung eines 3D-Datensatzes und der Darstellung des Fasciculus arcuatus mittels Fibertracking wurde über die Operationsindikation entschieden. Der Fasciculus arcuatus tangierte den Tumor nicht, sodass die operative Entfernung des Tumors mittels Neuronavigation, 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik und intraoperativem MRT 2012 erfolgte. Das Tumorgewebe konnte mikrochirurgisch dargestellt und reseziert werden. Die Fluoreszenzaktivierung ergab keinen Hinweis auf die Lokalisation des Tumorgewebes. Bei Rezidiven des Glioblastoms ist das eine öfter beobachtete Tatsache. Unter Zuhilfenahme der Neuronavigation wurde der Tumor dann reseziert. Nach dem subjektiven Eindruck, dass man sämtliches Tumorgewebe entfernt hatte, wurde der Patient zum MRT gefahren. In den Aufnahmen sah man weiterhin ein kleines pathologisches Enhancement im Bereich der Insel, am Vorder- und am Hinterrand der Resektionshöhle. Nach nochmaliger Aktivierung der Fluoreszenztechnik konnte eine deutliche rötliche Tumorfluoreszenz detektiert werden. Diese Bereiche wurden nachreseziert bis makroskopisch kein Resttumor mehr sichtbar war. In der postoperativen Verlaufskontrolle waren noch punktförmige Kontrastmittelanreicherungen medial der Resektionshöhle nachweisbar. Die histologische Untersuchung ergab die Diagnose eines epitheloiden Glioblastoma multiforme WHO Grad IV mit Riesenzellkomponente. Die Nachresektate aus dem Randgebiet zeigten dieselbe maligne Formation. Der IDH-1-Status war negativ und die Wachstumsrate MIB-1 lag bei 40 %.

#### **4.4.13 Dreizehnter Fall**

Wegen Wortfindungsstörungen stellte sich 2012 ein 63-jähriger Patient zur Abklärung vor. Die Symptomatik bestand seit circa einer Woche. In der CT-Untersuchung wurde eine intrazerebrale Raumforderung mit Hämorrhagien im linken Temporallappen sichtbar. Die MRT-Untersuchung demonstrierte einen 4x4 cm großen Herd in der Region des linken Gyrus angularis und supramarginalis. Der Tumor zeigte eine zentrale Nekrose und reicherte an den Rändern irregulär Kontrastmittel an. Nachdem mit dem Patienten die Behandlungsoptionen abgeklärt wurden, entschied man sich für eine Tumorexstirpation mit Neuronavigation, 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik und intraoperativem MRT. Das suspekte Gewebe konnte mikrochirurgisch dargestellt und abgetragen werden. Das intraoperative MRT zeigte eine fast vollständige Tumorsektion. Ein kleiner dargestellter Herd konnte nachreseziert werden. Das histologische Bild passte zu einem klassischen Glioblastoma multiforme WHO Grad IV. Das Tumorgewebe war schwach positiv für den IDH-1 Marker und biete eine 40%ige Wachstumsrate MIB-1.

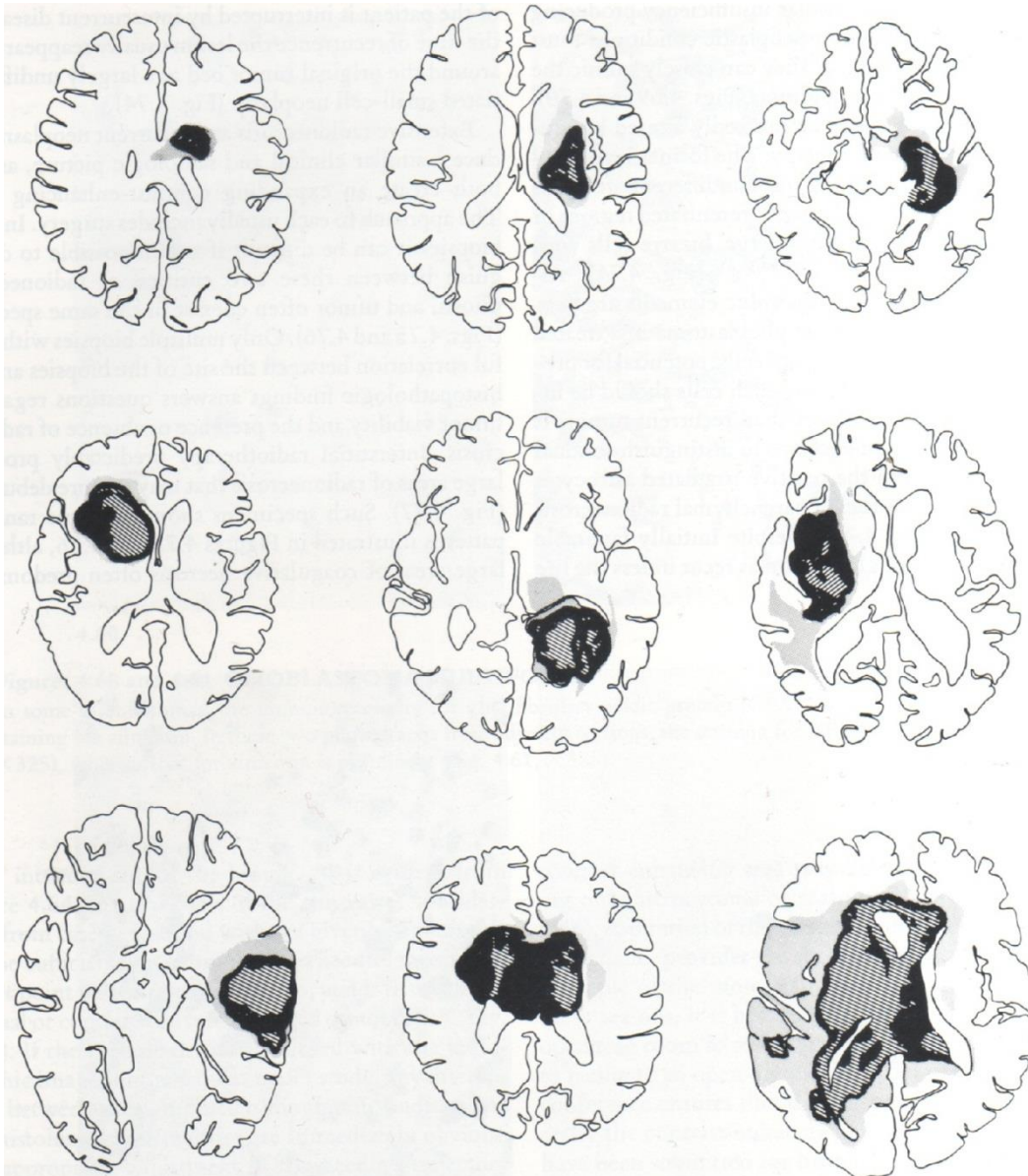
#### **4.4.14 Vierzehnter Fall**

Eine 77-jährige Patientin stellte sich 2011 mit einer rechtsseitig betonten leichten Beinschwäche und über 6 Wochen zunehmende feinmotorischen Störungen in der rechten Hand vor. Eine periphere Nervenschädigung ist ausgeschlossen worden. In einem ambulant durchgeführten MRT-Bild präsentierte sich ein tumorsuspekter Befund im linken Parietallappen mit einer Ausdehnung von 2x2 cm. In der körperlichen Untersuchung zeigte sich eine diskrete rechtseitige Hemiparese. Nach Absprache mit der Patientin wurde eine Tumorexstirpation mit Neuronavigation, 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik und intraoperativem MRT vereinbart. Nachdem durch die mikrochirurgische Resektion eine makroskopische Tumorentfernung erreicht wurde, konnte die Patientin in den Magnetomographen gefahren werden. In der intraoperativen Aufnahme stellten sich noch kleine Herde dar, die weitgehend entfernt wurden. Postoperativ ist lediglich eine Kontrastmittelanreicherung am medialen oberen Resektionsrand übrig geblieben. Das primäre Präparat entsprach der Diagnose eines klassischen Glioblastoma multiforme mit kleinzelligen Anteilen. Die kleinen nachresezierten Herde zeigten neben der für ein Glioblastom entsprechenden Histologie auch Anteile des WHO Grades III. Das Gewebe war in der immunhistologischen Untersuchung schwach positiv auf den IDH-1 Marker angefärbt und zeigte eine starke Proliferationsrate von 70%.



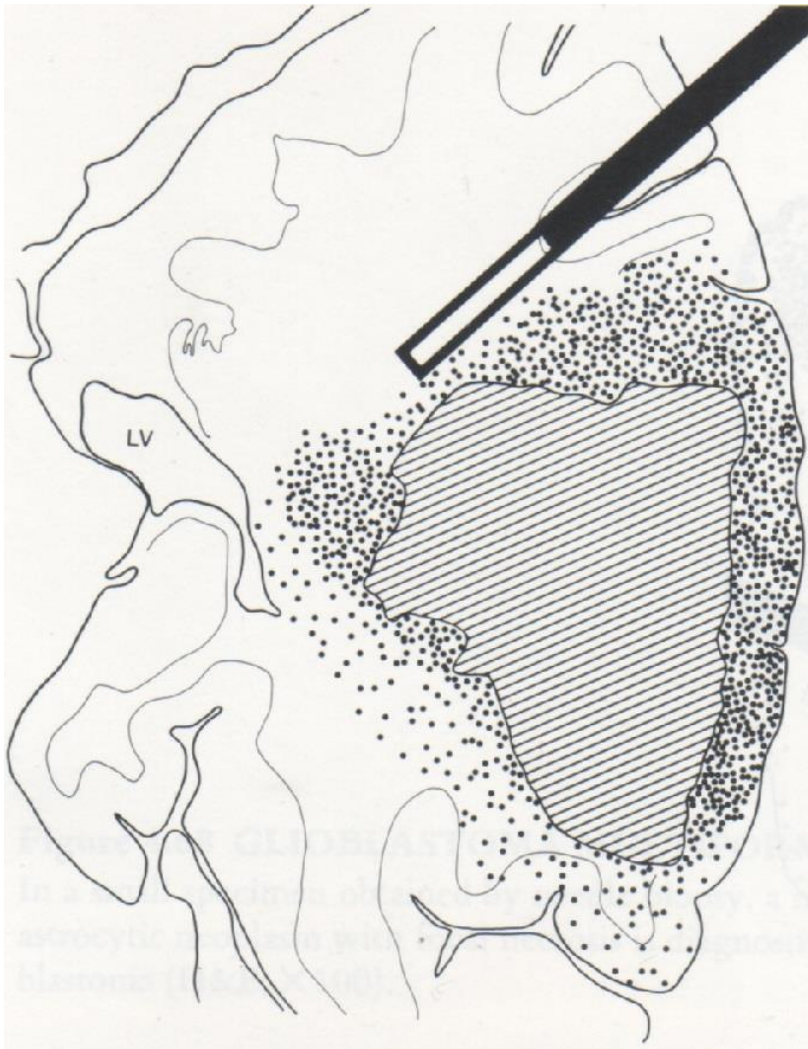
## 5. Diskussion

Da insbesondere maligne Gliome diffus und infiltrativ wachsen, war es ein Ziel dieser Arbeit einen möglichen Zusammenhang im histologischen und immunhistochemischen Verhalten zwischen dem nach intraoperativen MRT reseziertem und dem zentralen Tumorgewebe darzustellen. Anhand des Glioblastoma multiforme soll diese Vorstellung noch einmal verdeutlicht werden. In Abbildung 50 ist das mögliche Wachstum des Glioblastoms illustriert.



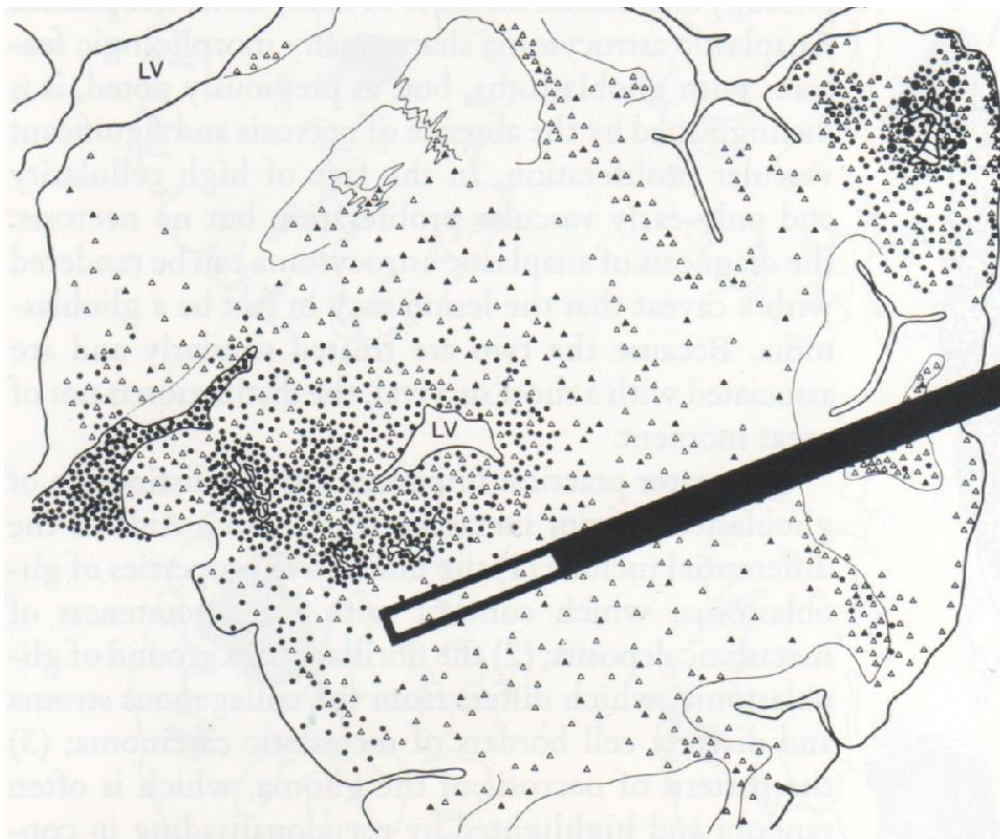
**Abbildung 50: Wachstumsdarstellung von 9 Glioblastoma multiforme [83]**

Zu sehen sind neun Darstellungen unbehandelter Glioblastome, die auf den Ergebnissen einer postmortalen Studie basieren. Die gestreiften Areale sollen die zentrale Nekrosezone verdeutlichen. Umgeben ist diese von einem zellreichen Wall, der besonders durch die Kontrastmittelaufnahme gekennzeichnet ist. Die periphere gräuliche Zone steht für vereinzelt infiltrative Zellen. Dabei fällt auf, dass manchmal diese infiltrativen Zonen nur sehr gering ausgeprägt sind. Es wird wiederum auch deutlich, dass die grauen Zonen sehr weit in das Hirngewebe reichen können. In Abbildung 51 werden die einzelnen infiltrativen Zellen nochmal grafisch dargestellt. Es wird verständlich, dass Biopsien vom Tumorrand häufig an diesen Zellen vorbeigesteuert werden. Die Gefahr einer Fehlinterpretation ist groß und wird durch eine operative Materialgewinnung verringert.



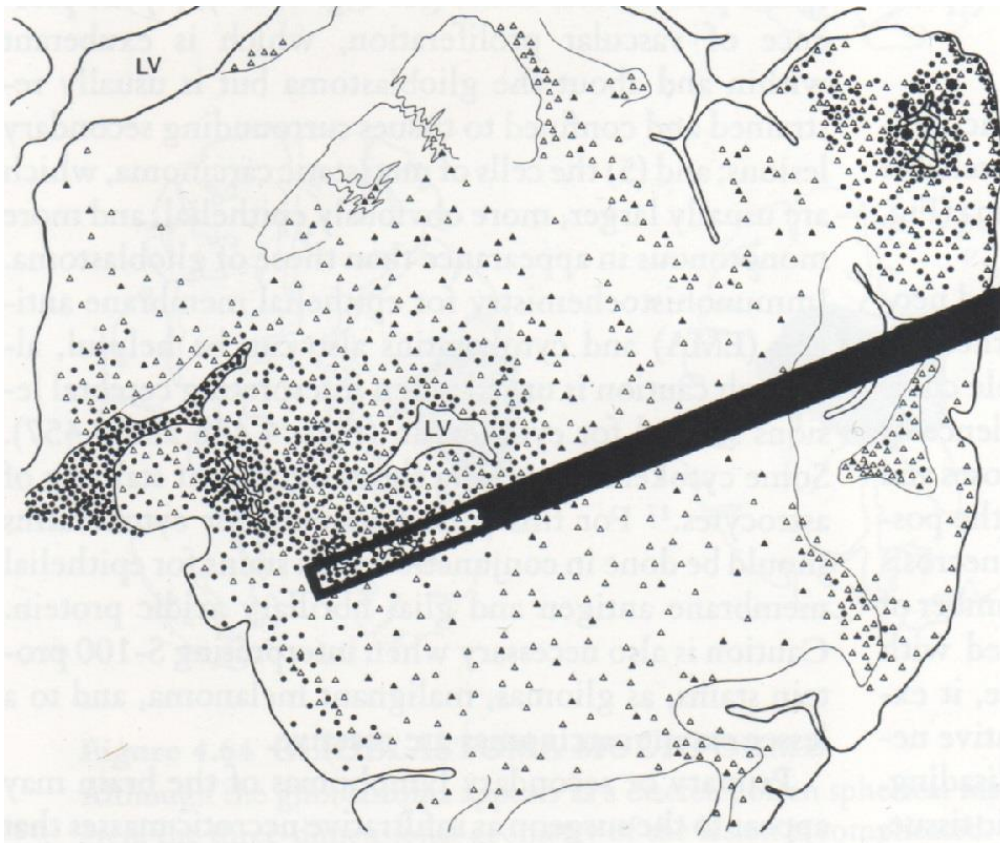
**Abbildung 51: Wachstumsformen eines Glioblastoma multiforme [83]**

In den Abbildungen 52 und 53 werden die unterschiedlich differenzierten Zellbereiche in einem Glioblastoma multiforme dargestellt. So wird deutlich, dass in demselben Tumor unterschiedliche Grade auftreten können. Niedriggradigere und besser differenzierte Anteile sind durch die offenen Dreiecke dargestellt. Die geschlossenen Dreiecke symbolisieren schlecht differenzierte, einem kleinzelligen Glioblastom entsprechende Zellen. In den Darstellungen wird auch noch einmal deutlich, dass eine einfache Biopsie nicht ausreicht, um eine sichere Tumordiagnose zu geben.



**Abbildung 52: Grafische Darstellung der Zellverteilung bei einem Glioblastom mit Biopsie aus dem gut differenzierten Areal [83]**

In Abbildung 52 sitzt die Biopsienadel in einem gut differenzierten Bereich, sodass durch diese alleinige Probe eine Fehldiagnose gestellt werden kann. Die Biopsienadel in Abbildung 53 hat hier den schlecht differenzierten Tumorteil getroffen und gibt einen Hinweis auf die Tumordiagnose.



**Abbildung 53: Grafische Darstellung der Zellverteilung bei einem Glioblastom mit Biopsie aus dem schlecht differenzierten Areal [83]**

In einem MRT werden die infiltrativen Bereiche auch trotz Kontrastmittelverabreichung meist nicht, beziehungsweise nur vage angezeigt. Es ist dadurch schwer möglich schon präoperativ eine erfolgreiche Totalresektion zu planen. Durch intraoperative Darstellungsmöglichkeiten wird das Ausmaß der Resektion oftmals optimiert. Zu diesen erfolgversprechenden Techniken gehören die intraoperative Fluoreszenzdarstellung mit 5-Aminolävulinsäure und auch die intraoperative MRT-Bildgebung. In dieser Arbeit wurde nun ein Hauptaugenmerk auf die Histologie der Präparate gelegt, die nach der intraoperativen MRT-Untersuchung gewonnen wurden. Dabei war es von Interesse, ob das Gewebe einem niedrigeren oder den gleichen Tumorgrad aufweist wie das restliche Tumorgewebe. Die Idee, dass das erst nachträglich detektierte Gewebe eventuell einen niedrigeren WHO-Grad aufweist und deswegen initial nicht eindeutig als Tumorgewebe gedeutet wurde, sollte untermauert werden. Diese Untersuchung ergab, dass häufig das nachträglich resezierte Gewebe eine bessere Differenzierung aufwies und oft um mindestens einen Tumorgrad abgestuft werden konnte. Wie in den Abbildungen weiter oben verdeutlicht wurde, handelt es sich dabei um Gewebe aus der Tumorperipherie. Allerdings zeigen nicht alle Proben eine deutliche Verbesserung im Differenzierungsgrad. Auch diese

Möglichkeit wurde anhand der Abbildungen schon verdeutlicht. Infiltrative Zellen müssen nicht überall den kontrastmittelanreichernden Tumorzellwall umgeben. Die Ursache für die tumorsuspekte Darstellung von diesen Arealen kann in der Gewebemanipulation mit folgender Schädigung der Blut-Hirnschranke liegen. Die durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen zeigten dabei keine signifikanten Auffälligkeiten. Der Nachweis des sauren Gliafaserprotein gab den diagnostischen Hinweis, dass es sich bei den Gewebeproben um Tumoren astrozytären Ursprungs handelt. In der immunhistologischen Untersuchung zeigte die Proliferationsrate und die IDH-1-Untersuchung keine wegweisende Korrelation mit der Histologie der gewonnenen Proben.

Romeike beschrieb, dass oftmals bei diffus wachsenden Gliomen weder radiologisch noch makroskopisch eine deutliche Trennlinie zum gesunden Hirngewebe erkennbar ist. Über den vermuteten Grenzbereich hinaus sind bei dieser Wachstumsform vereinzelt maligne Zellen nachweisbar. Durch die Anwendung der Neuronavigation, 5-Aminolävulinsäure-Fluoreszenztechnik, sowie dem intraoperativ genutztem MRT ist nachweislich eine bessere Radikalität der operativen Therapie gegeben. [9]

Gerade bei Proben aus dem Randbereichen kommt es vor, dass der gesamte Tumor einem zu niedrigem Grad zugeteilt wird. Dies ist auch in Studien über Biopsien maligner Gliome bestätigt worden. So zeigten in einer Studie 63% der Biopsien eine zu niedrige Einstufung des Glioms. Dieses Problem versucht man durch Serienbiopsien zu umgehen. Dabei steigt jedoch die Gefahr von Blutungen und Verletzungen neurologisch wichtiger Areale. [53; 84]

Die intraoperative Fluoreszenztechnik gehört zu den ersten additiven Operationsmethoden, die den Operateuren eine deutliche Hilfe bei der Resektion von malignen intrakraniellen Tumoren verspricht. Die Fluoreszenz gibt in ihrer Intensität einen Hinweis auf die Art des Gewebes. Deutlich rot gefärbte Areale finden sich im tumorösen Gewebe. Rosa können die Ränder imponieren und geben einen Hinweis auf die diffuse Infiltration im Randbereich. Das Zentrum von Glioblastomen zeigt in der Regel aufgrund der ausgeprägten Nekrose keine Fluoreszenz. Die Peripherie, die im MRT-Bild oft nicht suspekt erscheint, zeigt jedoch in einigen Fällen eine leichte pinke Einfärbung. Schlussfolgernd wird festgestellt, dass nur eine starke Färbung ein intraoperativ sicherer Hinweis auf ein Gliom ist. [52; 53]

In einer spanischen Studie wurde die Korrelation des unterschiedlichen Färbeverhaltens, bei unter 5-Aminolävulinsäure-Gabe operierten Glioblastomen, mit der Histologie verschiedener Tumorproben unterschiedlicher Regionen untersucht. Es wurden Proben vom stark rot fluoreszierenden Tumorzentrum, vom pinken Rand und von nicht fluoreszierenden Arealen entnommen, histologisch verglichen und auf ihren Proliferationsindex hin untersucht. Die

Gewebeproben im Zentrum entsprachen alle dem Bild eines Glioblastoms. In über 90% der pink eingefärbten Areale konnte ein maligner Tumor nachgewiesen werden. Die Randzone zeigt aber histopathologische Unterschiede im Vergleich zum Tumorzentrum. Die randständigen Zellen zeigten eher ein weniger atypisches Bild als in der Tumormitte, sodass dort ein niedriggradigeres Gliom diagnostiziert werden konnte. In 33% der Gewebeproben von den nicht fluoreszierenden Arealen konnten ebenfalls vereinzelte atypische Zellen nachgewiesen werden. Nur 31% der Gewebeproben aus den primär unauffälligen Arealen zeigten einen geringen Proliferationsindex. Zentrale Tumorproben wiesen den höchsten Index auf und zum Rand hin wurde dieser immer geringer. Der Untersuchung kann entnommen werden, dass stark rot gefärbte Areale sicher mit der tumorösen Histologie einhergehen und nach Möglichkeit reseziert werden sollten. Im Randbereich sind neben normalen Zellen auch infiltrative Tumorzellen nachweisbar, die für eine optimale Überlebensprognose auch reseziert werden sollten. Da die Zellen in der Peripherie zumeist eine andere Histologie als im Zentrum aufweisen, sollten Überlegungen angestellt werden, ob diese Zellen mit der gleichen Therapie angegriffen werden können oder ob mit einer anderen Therapie die Zellen erfolgreich behandelt werden können. [57]

Die Arbeitsgruppe um Tsugu et al. (2011) zitierte bereits Studien (Claus et al. 2005, Keles et al. 2001, Lacroix et al. 2001, McGirt et al. 2008, Sanai et al. 2008, Smith et al. 2008, Stark et al. 2005 und Ushio et al. 2005) die angaben, dass das Ausmaß Resektion mit dem Erfolg der Therapie korreliert. [86]

Weitere Arbeiten verdeutlichten, dass eine komplette Resektion durch die diffuse Invasion maligner Gliome in weniger als 20% erreicht werden konnte. Durch die 5-Aminolävulinsäure-Gabe wurde das maligne Gewebe sichtbar und eine makroskopisch ausreichende Resektion konnte bei Bedarf erweitert werden. [28; 52; 85; 86]

In einer Studie von Stummer et al. (2006) wurde der Resektionserfolg bei Operationen von malignen Gliomen unter Verwendung der intraoperativen Fluoreszenztechnik mit der herkömmlichen chirurgischen Therapie verglichen und ausgewertet. Signifikante Ergebnisse wurden dabei deutlich. Bei 65% der Tumoren bei den mit 5-Aminolävulinsäure behandelten Patienten konnte eine kontrollierte Kompletresektion durchgeführt werden. In der vergleichbaren Gruppe, in der keine 5-Aminolävulinsäure verwendet wurde, wurde bei nur 36% der Patienten eine komplette Resektion durchgeführt. Verglichen wurde auch das 6-monatige progressionsfreie Überleben. Dabei zeigte sich in der Gruppe mit der 5-Aminolävulinsäure-Behandlung ein signifikanter Überlebensvorteil. Folglich konnte durch die Untersuchung deutlich gemacht werden, dass durch die Verwendung von 5-Aminolävulinsäure häufiger eine Kompletresektion erreicht werden kann und außerdem das progressionsfreie Überleben deutlich

verbessert wird. Der postoperative Zustand der Patienten, inklusive des neurologischen Zustandes, und der toxische Effekt waren bei beiden Patientengruppen gleich, sodass durch die Gabe von 5-Aminolävulinsäure kein Nachteil deutlich wurde. [52]

Allerdings ist es erwiesen, dass das fluoreszierende Protoporphyrin zytotoxisch ist. Häufig wird eine Ödembildung nach 5-Aminolävulinsäure-Gabe beschrieben, die jedoch gut mit Kortison behandelbar ist. Da es jedoch in malignem Gewebe akkumuliert, wird auch so über einen therapeutischen Effekt diskutiert. Die Hoffnung besteht, dass der zytotoxische Effekt auf die nicht resezierbaren, infiltrativen Zellen ausgeweitet werden kann. Denn Rezidivtumoren entstehen bekanntlich aus residuellen Tumorzellen am Resektionsrand, die entweder nicht detektiert wurden oder nicht resektabel waren. [10; 87]

Es gibt jedoch auch Grenzen bei dieser Methode. Das blaue Licht des modifizierten Mikroskops dringt nicht sehr tief in das Gewebe hinein, sodass das Malignom nur oberflächlich detektiert wird und leicht von Blut überdeckt werden kann. Außerdem bleicht der Effekt nach einer Weile unter normaler Lichtexposition aus, weswegen man versucht in möglichst dunkler Umgebung zu arbeiten. [10; 56; 87]

Perinekrotisches Gewebe, Strahlennekrose und neurodegenerative Erkrankungen können auch positiv fluoreszieren. Daraus ergibt sich ein differentialdiagnostisches Problem und die Gefahr, dass nicht-neoplastisches Gewebe entfernt wird. Außerdem kann es zu Akkumulation in anderen Geweben kommen, bei denen die Blut-Hirnschranke defekt ist. [58]

Die Arbeitsgruppe um Tsugu et al. (2011) beschrieb in deren Untersuchung, dass einige low-grade Gliomen und Tumorsatelliten nicht oder wenig fluoreszieren. [86] Dann ist es von Vorteil, eine Aufnahme mit Hilfe des intraoperativem MRT zu erstellen. Hierbei werden häufig nicht leuchtende suspekte Areale, beziehungsweise auch Tumorsatelliten dargestellt. In einer japanischen Untersuchung wurde deutlich, dass fluoreszenz-negative Gliome radikaler durch die Anwendung des intraoperativen MRT operiert werden konnten. Es wurde auch eine Korrelation zwischen den fluoreszierenden Arealen bei der 5-Aminolävulinsäure-Gabe und den kontrastmittelanreichernden Gebieten bei der intraoperativen MRT-Untersuchung sichtbar. Der Grund dafür ist die beschädigte Blut-Hirn-Schranke im tumorösen Gewebe. Um eine ausgeprägte Resektion fraglicher Randgebiete zu erreichen, wird der kombinierte Einsatz empfohlen. [86]

Im Vergleich zum intraoperativen MRT hat die 5-Aminolävulinsäure-Technik den Vorteil der kostengünstigen Anschaffung. Bei beiden Methoden steht das Ziel einer erweiterten Tumorresektion und dadurch die erhoffte prognostische Verbesserung für den Patienten im Vordergrund. In einigen Artikeln wird über eine Verbesserung der durchschnittlichen

Resektionsrate und ein Ansteigen der totalen Resektion durch die Anwendung des intraoperativen MRT berichtet. [64]

Zu Beginn der Entwicklung des intraoperativen MRT wurden zwei sich in ihrer Leistung unterscheidende Tomographen verwendet. Die Niedrigfeldscanner mit einer Leistung von 0,2 Tesla und die Hochfeldscanner mit einer Leistung von 1,5-3 Tesla wurden erprobt. Zum jeweiligen System wurden Studien in der Neurochirurgie des Universitätsklinikums Ulm durchgeführt. Bei dem Niedrigfeldscanner zeigt sich, dass in 63,4% der Fälle eine weitere signifikante Tumorverkleinerung möglich war. Die Hochfeldscanner zeigen bei 67,1% der Patienten mit primären ZNS-Tumoren, dass eine Resektion fortgesetzt werden konnte. Bei 32,2% konnte sogar eine komplette Resektion erreicht werden. In der Analyse der medianen Überlebenszeit der Glioblastompatienten konnte dabei eine Verlängerung um 2 Monate nachgewiesen werden. [59]

Weitere in der Literatur zu findende Studien sind vielversprechend. Vor allem von der leistungsstärkeren Bildgebung profitiert die totale Resektionsrate sehr gut. [10]

In einer Untersuchung der Neurochirurgischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg unter Nimsky et al. (2000) wurde Anfang 2000 anhand von Niedrigfeldgeräten gezeigt, dass keine negativen Folgen durch die intraoperative Bildgebung verursacht werden. Außerdem wurde bewiesen, dass durch die Kombination mit der schon etablierten Neuronavigation die Radikalität verbessert werden konnte, ohne dabei die Morbidität zu steigern. Der nötige Transport des Patienten bei dem 2-Zimmer-System machte keine Probleme und bedeutete lediglich eine Verlängerung um wenige Minuten. Bei 60% der Gliompatienten zeigte sich intraoperativ noch ein Resttumor und im Speziellen bei 83% der Glioblastompatienten. Jedoch konnte nicht bei allen Tumoren die Resektion aufgrund einer möglichen neurologischen

Zustandsverschlechterung durchgeführt werden. So mussten eloquente Hirnareale geschont werden. Nach dem sogenannten „Second-look“ mittels der intraoperativen MRT-Untersuchung konnte bei den Glioblastomen die Resektionsrate von 17 auf 21% gesteigert werden. Bei den anaplastischen Astrozytomen beschrieben Nimsky et al. einen Anstieg der Resektionsrate von 33 auf 53%. Somit lässt sich eine relativ zuverlässige Aussage über die Resektion während des Eingriffes tätigen. [60]

Intraoperative Fluoreszenztechnik und MRT-Bildgebung haben zu einer Verbesserung der Resektionsrate geführt und erleichtern dem behandelnden Chirurgen die Arbeit. Die Morbidität und Mortalität wird im Idealfall, neben der Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, verringert. In den Studien wurde eine Verlängerung der Überlebenszeit von bis zu 6 Monaten beschrieben. [10; 55]



Ein Problem der intraoperativen MRT-Untersuchung stellt die Artefaktbildung dar. Vor allem in Kombination mit der Kontrastmittelgabe, bei Geräteabrieb oder bei Blutungen, durch Manipulation und Schädigung der Blut-Hirn-Schranke entstehen Bilder, die fehlinterpretiert werden können. Dann ist es häufig problematisch einen Resttumor eindeutig zu identifizieren. Der Unterschied zwischen einer Strahlennekrose und einem malignen Tumor ist häufig nicht einfach anhand der MRT-Bilder nachzuweisen. In der T1-Wichtung sind außerdem niedriggradige Tumoren schwer vom normalen Hirngewebe abzugrenzen. Es kann jedoch auch hier davon ausgegangen werden, dass durch die radikalere Resektion bei niedriger Morbidität eine höhere Überlebensrate erreicht wird. Durch die häufige Beobachtung von einer erhöhten Überlebensrate bei Patienten mit einem jüngeren Alter und einen besseren Karnofsky-Index, werden diese Faktoren, neben der radikalen Therapie als prognostisch relevant anerkannt. Außerdem gehören zu diesen Prognosefaktoren die Tumorgröße und die Tumorlokalisierung in Betracht auf eloquente Areale, wie beispielsweise die motorischen oder sensiblen Bahnen. So zeigt sich eine schlechtere Prognose bei Tumoren, die in wichtige funktionelle Bereiche infiltrieren. Es ist essentiell, dass eloquente Hirnareale identifiziert und während der Operation geschont werden. In der Regel verbessert sich die Prognose bei niedrig-malignen Tumoren deutlicher als bei dem Glioblastom, weil diese häufiger diffus in nicht resezierbare Hirnareale infiltrieren. Es wird häufig beschrieben, dass vor allem bei niedriggradigen Tumoren die Prognose vom Umfang der Radikalität abhängt. Dies wird in verschiedenen Studien dargestellt. Jedoch fehlen noch aussagekräftige Langzeituntersuchungen. In einer weiteren Untersuchung konnte die Abnahme der Liegezeit bei Patienten, die eine Operation mit Hilfe des intraoperativen MRT hatten, gezeigt werden. Der große und limitierende Nachteil für die intraoperative MRT-Untersuchung bleibt die Kostenintensivität. Um dieses System auch finanziell attraktiver zu machen, werden die MRT-Geräte räumlich getrennt von den Operationssälen eingerichtet, damit im Leerlauf das Gerät beispielsweise interdisziplinär oder für die allgemeine Diagnostik eingesetzt werden kann. [60; 61; 63; 64; 88-90]

Unter anderem in der NOA-04-Studie wurden drei molekulare Marker publiziert, die neben den günstigen Verlauf bei oligodendroglialen Anteilen des Tumorgewebes, eine Prognoseverbesserung für hochgradige Gliome versprechen. Durch die 1p/19q-Kodeletion (LOH), O6-Methylguanylmethyltransferase-Promotor-Methylierung (MGMT) und Mutation im Isozitatdehydrogenase-1-Gen (IDH-1) gelingt der Nachweis von prognoserelevanten Veränderungen. IDH-1 wird in der oben genannten Studie erstmalig als prognostischer Faktor untersucht. Die 1p/19q-Kodeletion steht im Zusammenhang mit einer oligodendroglialen Histologie. Diese Kodeletion kann in etwa 80% der Oligodendrogliomen nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den drei erwähnten Markern wird die Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) mit für die molekulare Klassifikation verwendet. Bei der EGFR-Amplifikation kommt es zu einer vermehrten Proliferation und Apoptoseresistenz, die vor allem für primäre Glioblastome kennzeichnend ist. Bei den anaplastischen Gliomen hat diese Methylierung jedoch nur eine prognostisch günstigere Aussicht und spricht nicht für eine bessere Wirksamkeit der Chemotherapie. [12; 17-21; 41; 91 ]

Durch die Anwendung des intraoperativen MRT kann oftmals eine sofortige Nachresektion durchgeführt werden. Es werden durch die Bildgebung suspekte Areale sichtbar, die vom Operationsteam nicht auf Anhieb makroskopisch identifiziert werden können. Oftmals werden so auch versteckte Tumorherde, die auch präoperativ nicht dargestellt werden konnten reseziert. Dies bedeutet für den Patienten, dass auf eine frühzeitige Nachresektion verzichtet werden kann. In den Untersuchungen werden häufig im Randbereich besser differenzierte Areale nachgewiesen, die auch zum Teil mittels des intraoperativen MRT detektiert werden. Allerdings zeigt die vorliegende Untersuchung auch bei knapp der Hälfte der Proben, dass der Tumor auch am Resektionsrand, beziehungsweise im nachresezierten Gewebe, fast ausschließlich denselben Differenzierungsgrad aufweist. Trotz der geringen Anzahl der Fälle wird auch in dieser Arbeit deutlich, dass das intraoperative MRT zuverlässige Hinweise für tumoröses Gewebe gibt. Eine Korrelation zwischen dem histologischen Befund und dem intraoperativen MRT kann nicht sicher bewiesen werden. Dafür ist die Anzahl der relevanten Patienten zu gering. Überraschend war jedoch, dass in relativ vielen Fällen im Nachresektat kein niedrigerer Tumorgrad nachgewiesen werden konnte. Weiterführende Untersuchungen wären notwendig. Die Untersuchung hinsichtlich des Markers IDH-1 kam zu dem Ergebnis, dass in 9 der nachresezierten Gewebeproben der Glioblastome ein positiver Nachweis trotz primären negativen Verhaltens nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich dabei auch um Proben, bei denen niedriggradigere Tumoranteile in den Nachresektaten dargestellt werden konnten. Hinsichtlich des Proliferationsindex MIB-1 konnten die Ergebnisse der Arbeit keinen eindeutigen Trend bestätigen. Es wurde in 14 Sekundärproben ein höherer Proliferationsindex nachgewiesen, in ebenso vielen Proben konnte ein niedrigerer MIB-1-Index nachgewiesen werden und in 9 Untersuchungsproben wurde keine Veränderung detektiert im Vergleich zur Hauptprobe.

Zusammenfassend lässt sich als Kernaussage auch unabhängig von der Fallzahlgröße feststellen, dass es keinen Automatismus in der Korrelation zwischen prä- und post-MRT-Proben und histologischem WHO-Grad gibt. Die initial durchaus plausible Vorstellung, dass es sich bei den post-MRT-Tumorproben mehrheitlich um niedriggradige Anteile des Tumors handelt, hat sich so

nicht bestätigt. Auch die immunhistochemischen Zusatzuntersuchungen mit MIB-1, IDH-1, GFAP und BRAF an diesen Proben haben keine wirklich relevanten Unterschiede erbracht. Offensichtlich sind die Stoffwechselforgänge, die als Grundlage sowohl der bildgebenden Verfahren als auch der Fluoreszenztechnik dienen, bei den Tumorzellen des wachstumsaktiven Randbereichs unabhängig vom Anaplasiegrad relativ identisch, sodass sich keine signifikanten Unterschiede ergeben. Sie verhalten sich wahrscheinlich auch gegenüber therapeutischen Einflüssen anders, als die Tumorzellen des Zentrums. Hierzu wären vergleichende molekularbiologische Studien interessant. Möglicherweise könnten Differenzen in der Genexpression und der Tumorgenetik dieser Zellen Ansätze für unterschiedliche therapeutische Strategien der einzelnen Tumorabschnitte liefern. Dies wäre auch in der Behandlung von Rezidivtumoren von Bedeutung. Ein weiterer Aspekt besteht in der Geschwindigkeit der Tumorprogression. Man könnte sich vorstellen, dass die erst nach intraoperativer MRT-Kontrolle entdeckten, höhergradigen Tumoranteile schneller zum klinisch relevanten Rezidiv führen als die niedriggradigen Areale. Ob hier auch Unterschiede in der molekularen Kaskade bestehen oder erst sich ausbilden müssen, sollte Gegenstand weiterer Analysen sein.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

°C:	Grad Celsius
5-ALA:	5-Aminolävulinsäure
µl:	Mikroliter ( $10^{-6}$ l)
µm:	Mikrometer ( $10^{-6}$ m)
A:	Astrozytom
AA:	Anaplastisches Astrozytom
AO:	Anaplastisches Oligodendrogliom
AOA:	Anaplastisches Oligoastrozytom
BRAF:	Protoonkogen B-Typ rapidly growing fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma
CBTRUS:	Central Brain Tumor Registry of the United States
CDKN:	Cyclin-dependent kinase inhibitor
cm:	Zentimeter ( $10^{-2}$ m)
D-2HG:	D-2-Hydroxyglutarate
DAB:	2,4-Diaminobutyric acid
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
EORTC:	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
GBM:	Glioblastoma multiforme
GFAP:	Glial fibrillary acidic protein
IDH:	Isocitrate dehydrogenase
HD:	Homozygous deletion
HIER:	Heat-induced epitope retrieval
HIF:	Hypoxia-inducible-factor
HRP:	Horseradish peroxidase
l:	Liter
LOH:	Loss of heterozygosity
mg:	Milligramm ( $10^{-3}$ g)
MGMT:	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MIB:	Molekulare Immunologie Borstel
min.:	Minute
ml:	Milliliter ( $10^{-3}$ l)
mm:	Millimeter ( $10^{-3}$ m)

MRT:	Magnetresonanztomographie
NADPH:	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NCI:	National Cancer Institute
NOA:	Neuro-Onkologische Arbeitsgemeinschaft
O:	Oligodendrogliom
OA:	Oligoastrozytom
OP:	Operation
PA:	Pilozytisches Astrozytom
prGBM:	Primäres Glioblastoma multiforme
PTEN:	Phosphatase and tensin homolog
sGBM:	Sekundäres Glioblastoma multiforme
sGBMO:	Sekundäres Glioblastoma multiforme mit oligodendroglialen Anteilen
s:	Sekunde
s.o.:	Siehe oben
TP53:	Tumorprotein 53
TRIS:	Tris-hydroxymethyl-I-aminoethan
TRS:	Target Retrieval Solution
WHO:	World Health Organization
z.B.:	Zum Beispiel

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Genetische Veränderungen in der Gliomentstehung [38]	12
Abbildung 2	Altersverteilung bei Operation	24
Abbildung 3	Geschlechtsverteilung	25
Abbildung 4	Zeitpunkt der Operation	25
Abbildung 5	Rezidivrate	26
Abbildung 6	Tumorlokalisierung des untersuchten Kollektivs (Kreisdiagramm)	26
Abbildung 7	Tumorlokalisierung des untersuchten Kollektivs (Säulendiagramm)	27
Abbildung 8	Histologie der Hauptpräparate (Kreisdiagramm)	28
Abbildung 9	Histologie der Hauptpräparate (Säulendiagramm)	28
Abbildung 10	Allgemeines histologisches Verhalten (Kreisdiagramm)	30
Abbildung 11	Allgemeines histologisches Verhalten (Säulendiagramm)	30
Abbildung 12	Identisches Grading (Kreisdiagramm)	31
Abbildung 13	Identisches Grading (Säulendiagramm)	31
Abbildung 14	Anteile mit niedrigerem Grading (Kreisdiagramm)	32
Abbildung 15	Anteile mit niedrigerem Grading (Säulendiagramm)	32
Abbildung 16	Anteile mit niedrigerem und unverändertem Grading (Kreisdiagramm)	33
Abbildung 17	Anteile mit niedrigerem und unverändertem Grading (Säulendiagramm)	33
Abbildung 18	Verhalten des Proliferationsindex (MIB-1) in den Primärpräparaten (Kreisdiagramm)	34
Abbildung 19	Verhalten des Proliferationsindex (MIB-1) in den Primärpräparaten (Säulendiagramm)	35
Abbildung 20	Verhalten des IDH-1 Nachweises in den Primärpräparaten (Kreisdiagramm)	36
Abbildung 21	Verhalten des IDH-1 Nachweises in den Primärpräparaten (Säulendiagramm).	36
Abbildung 22	Verhalten des Proliferationsindex (MIB-1) der Nachresektate (Kreisdiagramm)	38

Abbildung 23	Verhalten des Proliferationsindex (MIB-1) der Nachresektate (Säulendiagramm)	38
Abbildung 24	Veränderung des Proliferationsindex in einen höheren Bereich (Kreisdiagramm)	40
Abbildung 25	Veränderung des Proliferationsindex in einen höheren Bereich (Säulendiagramm)	40
Abbildung 26	Veränderung des Proliferationsindex in einen niedrigeren Bereich (Kreisdiagramm)	41
Abbildung 27	Veränderung des Proliferationsindex in einen niedrigeren Bereich (Säulendiagramm)	41
Abbildung 28	Unveränderter Proliferationsindex (Kreisdiagramm)	42
Abbildung 29	Unveränderter Proliferationsindex (Säulendiagramm)	42
Abbildung 30	Veränderung des Proliferationsindex (unabhängig vom histologischen Typ)	43
Abbildung 31	Verteilung des IDH-1-Nachweises (Kreisdiagramm)	44
Abbildung 32	Verteilung des IDH-1-Nachweises (Säulendiagramm)	44
Abbildung 33	Gleichbleibender IDH-1-Nachweis (Kreisdiagramm)	46
Abbildung 34	Gleichbleibender IDH-1-Nachweis (Säulendiagramm)	46
Abbildung 35	Veränderung hin zum positiven IDH-1-Nachweis (Kreisdiagramm)	47
Abbildung 36	Veränderung hin zum positiven IDH-1-Nachweis (Säulendiagramm)	47
Abbildung 37	Veränderung des IDH-1-Nachweises (unabhängig vom histologischen Typ)	48
Abbildung 38	Klassisches Glioblastoma multiforme WHO Grad IV in HE-Färbung	50
Abbildung 39	Klassisches Glioblastoma multiforme WHO Grad IV mit einen MIB-1-Index von 20%	50
Abbildung 40	Klassisches Glioblastoma multiforme WHO Grad IV mit negativen IDH-1-Status	50
Abbildung 41	Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III in HE-Färbung	51
Abbildung 42	Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit positiver IDH-1-Färbung	51

Abbildung 43	Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit einem MIB-1-Index von 7%	52
Abbildung 44	Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit einem MIB-1-Index von 8%	53
Abbildung 45	Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III mit stark positiver IDH-1-Färbung	53
Abbildung 46	Anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III in HE-Färbung	54
Abbildung 47	Anaplastisches Oligoastrozytom WHO Grad III mit stark positiver IDH-1-Färbung	54
Abbildung 48	Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III in HE-Färbung mit deutlichen Verkalkungen	55
Abbildung 49	Anaplastisches Oligodendrogliom WHO Grad III mit stark positiver IDH-1-Färbung	55
Abbildung 50	Wachstumsdarstellung von 9 Glioblastoma multiforme [83]	61
Abbildung 51	Wachstumsformen eines Glioblastoma multiforme [83]	62
Abbildung 52	Grafische Darstellung der Zellverteilung bei einem Glioblastom mit Biopsie aus dem gut differenzierten Areal [83]	63
Abbildung 53	Grafische Darstellung der Zellverteilung bei einem Glioblastom mit Biopsie aus dem schlecht differenzierten Areal [83]	64



## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Häufigkeiten von Hirntumoren nach Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) [1]	5
Tabelle 2	WHO-Klassifikation ausgewählter Gliome [5]	6
Tabelle 3	Vereinfachte Klassifikation der Gliome [6]	7
Tabelle 4	Entparaffinierung [67]	21
Tabelle 5	Anzahl der Primärtumoren mit entsprechenden MIB-1-Status	35
Tabelle 6:	Prozentuale Verteilung der Primärtumoren mit entsprechenden MIB-1-Status	35
Tabelle 7	Anzahl der Primärtumoren mit entsprechenden IDH-1-Status	37
Tabelle 8	Prozentuale Verteilung der Primärtumoren mit entsprechenden IDH-1-Status	37
Tabelle 9	Anzahl der Nachresektate mit entsprechenden MIB-1-Status	39
Tabelle 10	Prozentuale Verteilung der Nachresektate mit entsprechenden MIB-1-Status	39
Tabelle 11	Anzahl der Tumoren mit entsprechenden IDH-1-Status	45
Tabelle 12	Prozentuale Verteilung der Tumoren mit entsprechenden IDH-1-Status	45

## 9. Literaturverzeichnis

1. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. *Deutsches Aerzteblatt International* 2010; 107(45): 799–807.
2. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathologica* 2005; 109(1): 93-108.
3. Feiden S, Feiden W. WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren. *Der Pathologe* 2008; 29(6): 411-421.
4. Niedermayer I, Kolles H, Feiden W. Klassifikation und Grading von Gliomen und Meningeomen. *Der Radiologe* 1998; 38(11): 888-897.
5. Wiestler OD, Schmidt MC. Neuropathologie maligner Gliome. *Der Onkologe* 1998; 4(7): 580-588.
6. Kolles H, Niedermayer I, Feiden W. Grading von Astrozytomen und Oligodendrogliomen. *Der Pathologe* 1998; 19(4): 259-268.
7. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* 2007; 114(2): 97-109.
8. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie – Gliome. Stand 25.09.2011 ([http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-099l\\_S2k\\_Gliome\\_2011-09\\_01.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome_2011-09_01.pdf) aufgerufen am 18.11.2013)
9. Romeike BFM. Klassifikation und Dokumentation diffuser Gliome. *Der Radiologe* 2007; 47(6): 530-535.

10. Sherman J, Hoes K, Marcus J, Komotar RJ, Brennan CW, Gutin PH. Neurosurgery for brain tumors: update on recent technical advances. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2011; 11(3): 313-319.
11. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier A, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. *The Lancet* 2003; 361(9354): 323-331.
12. Riemenschneider MJ, Jeuken JWM, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathologica* 2010; 120(5): 567-584.
13. Groden C, Koch C, Zeumer H. Maligne Gliome: Bildgebung und Differentialdiagnose. *Der Onkologe* 1998; 4(7): 589-594.
14. Weller M, Tonn JC, Ernemann U. Diagnostik und Therapie des Glioblastoms. *Der Onkologe* 2006; 12(6): 500-507.
15. Juratli TA, Kirsch M, Robel K, Soucek S, Geiger K, von Kummer R, Schackert G, Krex D. IDH mutations as an early and consistent marker in low-grade astrocytomas WHO grade II and their consecutive secondary high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 2012; 108(3): 403-410.
16. Schlegel U. Aktuelle Prinzipien der Behandlung maligner Gliome. *Der Onkologe* 2011; 17(3): 255-263.
17. Kowoll A, Ahle G, Schlegel U. Neue Entwicklungen in der Gliomtherapie. *Aktuelle Neurologie* 2010; 37(4): 163-169.
18. Weller M, Tonn JC, Ernemann U, Wiestler OD, Bamberg M. Glioblastome. best practice *Onkologie* 2009; 4(2): 4-11.
19. Wick W, Roth P, Wick A, Weller M. Was gibt es Neues in der Neuroonkologie. *Aktuelle Neurologie* 2010; 37(9): 454-460.

20. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JD, Mirimanoff RO. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology* 2009; 10(5): 459-466.
21. Wick W, Weller M. Anaplastische Gliome. *Der Nervenarzt* 2010; 81(8): 928-935.
22. Mineo JF, Bordron A, Baroncini M, Ramirez C, Maurage CA, Blond S, Dam-Hieu P. Prognosis factors of survival time in patients with glioblastoma multiforme: a multivariate analysis of 340 patients. *Acta Neurochirurgica* 2007; 149(3): 245-253.
23. Kocher M, Frommolt P, Borberg SK, Rühl U, Steingraber M, Niewald M, Staar S, Stuschke M, Becker G, Fishedick AR, Herfarth K, Grauthoff H, Müller RP. Randomized Study of Postoperative Radiotherapy and Simultaneous Temozolomide without Adjuvant Chemotherapy for Glioblastoma. *Strahlentherapie und Onkologie* 2008; 184(11): 572-579.
24. Kostron H, Rössler K. Neurochirurgische Therapie maligner Gliome. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 2006; 156(11): 338-341.
25. Kraus JA, Wenghoefer M, Schmidt MC, von Deimling A, Berweiler U, Roggendorf W, Dietsch S, Dietzmann K, Müller B, Heuser K, Reifenberger G, Schlegel U. Long-term survival of glioblastoma multiforme: importance of histopathological reevaluation. *Journal of Neurology* 2000; 247(6): 455-460.
26. Hulshof M, Koot RW, Schimmel E, Dekker F, Bosch DA, González DG. Prognostic factors in Glioblastoma multiforme 10 years experience of a single institution. *Strahlentherapie und Onkologie* 2001; 177(6): 283-290.
27. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology* 2007; 170(5): 1445-1453.

28. Vecht CJ. Neuro-oncology: clinical and molecular predictive factors. *The Lancet Neurology* 2009; 8(1): 17-19.
29. Schiffer D, Cavalla P, Chiò A, Richiardi P, Giordana MT. Proliferative activity and prognosis of low-grade astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology* 1997; 34(1): 31-35.
30. Uematsu M, Ohsawa I, Aokage T, Nishimaki K, Matsumoto K, Takahashi H, Asoh S, Teramoto A, Ohta S. Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index. *Journal of Neuro-Oncology* 2005; 72(3): 231-238.
31. Schneider W, Kellermann S, Nenning H, Thal DR, Schober R. Zytophotometrische Untersuchungen an Rezidivgliomen Korrelation der DNA-Parameter mit dem WHO-Grad, dem Proliferationsindex und der Länge der rezidivfreien Intervalle. *Der Pathologe* 1999; 20(6): 321-329.
32. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schacjert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Loeffler M, von Deimling A. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathologica* 2010; 120(6): 707-718.
33. Mellai M, Piazzini A, Caldera V, Monzeglio O, Cassoni P, Valente G, Schiffer D. IDH1 and IDH2 mutations, immunohistochemistry and associations in a series of brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology* 2011; 105(2): 345-357.
34. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JWM, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathologica* 2009; 118(4): 469-474.

35. Yan H, Parsons D, Jin G, McLendon R, Rasheed A, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndorn J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Binger DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *New England Journal of Medicine* 2009; 360(8): 765-773.
36. DeAngelis LM. Neuro-oncology: new hope for patients with gliomas. *The Lancet Neurology* 2010; 9(1): 17-18.
37. Borodovsky A, Seltzer MJ, Riggins G. Altered cancer cell metabolism in gliomas with mutant IDH1 or IDH2. *Current Opinion in Oncology* 2012; 24(1): 83-89.
38. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *Journal of the National Cancer Institute* 2010; 102(13): 932-941.
39. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica* 2008; 116(6): 597-602.
40. Ahmadi R, Stockhammer F, Becker N, Hohlen K, Misch M, Christians A, Dictus C, Herold-Mende C, Capper D, Unterberg A, von Deimling A, Wick W, Hartmann C. No prognostic value of IDH1 mutations in a series of 100 WHO grade II astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology* 2012; 109(1): 15-22.
41. Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *The Lancet Neurology* 2010; 9(7): 717-726.
42. Antonelli M, Buttarelli FR, Arcella A, Nobusawa S, Donofrio V, Ohgaki H, Giangaspero F. Prognostic significance of histological grading, p53 status, YKL-40 expression, and IDH1 mutations in pediatric high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 2010; 99(2): 209-215.
43. Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathologica* 2009; 118(5): 599-601.

44. Watanabe T, Vital A, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. Selective acquisition of IDH1 R132C mutations in astrocytomas associated with Li-Fraumeni syndrome. *Acta Neuropathologica* 2009; 117(6): 653-656.
45. Chapman P, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AMM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. Improved survival with Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine* 2011; 364(26): 2507-2516.
46. Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, Pusch S, Mechtersheimer G, Zentgraf H, von Deimling A. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathologica* 2011; 122(1): 11-19.
47. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, Schmieder K, Wesseling P, Mawrin C, Hasselblatt M, Louis DN, Korshunov A, Pfister S, Paulus W, Reifenberg G, von Deimling A. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathologica* 2011; 121(3): 397-405.
48. Dahiya S, Haydon D, Alvarado D, Gurnett CA, Gutmann DH, Leonard JR. BRAF V600E mutation is a negative prognosticator in pediatric ganglioglioma. *Acta Neuropathologica* 2013; 125(6): 901-910.
49. Jones D, Mulholland S, Pearson D, Malley DS, Openshaw SW, Lambert SR, Liu L, Bäcklund LM, Ichimura K, Collins VP. Adult grade II diffuse astrocytomas are genetically distinct from and more aggressive than their paediatric counterparts. *Acta Neuropathologica* 2011; 121(6): 753-761.
50. Kleinschmidt-DeMasters B, Aisner D, Birks D, Foreman NK. Epithelioid GBMs show a high percentage of BRAF V600E mutation. *American Journal of Surgical Pathology* 2013; 37(5): 685-698.

51. Wirtz CR, Kunze S. Neuronavigation: Computerassistierte Neurochirurgie. *Deutsches Ärzteblatt* 1998; 95: 2384–2390.
52. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology* 2006; 7(5): 392-401.
53. Widhalm G, Minchev G, Woehrer A, Preusser M, Kiesel B, Furtner J, Mert A, Di Ieva A, Tomanek B, Prayer D, Marosi C, Hainfellner JA, Knosp E, Wolfsberger S. Strong 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence is a novel intraoperative marker for representative tissue samples in stereotactic brain tumor biopsies. *Neurosurgical Review* 2012; 35(3): 381-391.
54. Stummer W, Stepp H, Möller G, Ehrhardt A, Leonard M, Reulen HJ. Technical principles for protoporphyrin-IX-fluorescence guided microsurgical resection of malignant glioma tissue. *Acta Neurochirurgica* 1998; 140(10): 995-1000.
55. Stummer W, Meinel T, Reulen HJ. Fluoreszenzgestützte Resektion maligner Gliome. *Deutsches Ärzteblatt* 2001; 98(7): 407.
56. Duffner F, Ritz R, Freudenstein D, Weller M, Dietz K, Wessels J. Specific intensity imaging for glioblastoma and neural cell cultures with 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Journal of Neuro-Oncology* 2005; 71(2): 107-111.
57. Díez Valle R, Tejada Solis S, Idoate Gastearena MA, García de Eulate R, Domínguez Echávarri P, Aristu Mendiroz J. Surgery guided by 5-aminolevulinic fluorescence in glioblastoma: volumetric analysis of extent of resection in single-center experience. *Journal of Neuro-Oncology* 2011; 102(1): 105-113.
58. Miyatake SI, Kuroiwa T, Kajimoto Y, Miyashita M, Tanaka H, Tsuji M. Fluorescence of non-neoplastic, magnetic resonance imaging-enhancing tissue by 5-aminolevulinic acid: Case report. *Neurosurgery* 2007; 61(5): 1101-1104.
59. Hlavac M, König R, Halatsch M, Wirtz CR. Intraoperative Magnetresonanztomographie. *Der Unfallchirurg* 2012; 115(2): 121-124.



60. Nimsky C, Ganslandt O, Buchfelder M, Fahlbusch R. Intraoperative Magnetresonanztomographie Erfahrungen beim Einsatz in der Neurochirurgie. *Der Nervenarzt* 2000; 71(12): 987-994.
61. Knauth M, Wirtz CR, Tronnier VM, Staubert A, Kunze S, Sartor K. Intraoperative MRI to control the extent of brain tumor surgery. *Der Radiologe* 1998; 38(3): 218-224.
62. Tronnier VM, Wirtz CR, Knauth M, Lenz, G, Pasty O, Bonsanto MM, Albert FK, Kuth R, Staubert A, Schlegel W, Sartor K, Kunze S. Intraoperative diagnostic and interventional magnetic resonance imaging in neurosurgery. *Neurosurgery* 1997; 40(5): 891-902.
63. Martin AJ, Hall WA, Liu H, Pozza CH, Michel E, Casey SO, Maxwell RE, Truwit CL. Brain tumor resection: intraoperative monitoring with high-field-strength MR imaging-initial results. *Radiology* 2000; 215(1): 221-228.
64. Iseki H, Muragaki Y, Nakamura R, Ozawa N, Taniguchi H, Hori T, Takakura K. Intelligent operating theater using intraoperative open-MRI. *Magnetic resonance in medical sciences : MRMS : an official journal of Japan Society of Magnetic Resonance in Medicine* 2005; 4(3): 129-136.
65. Regelsberger J, Langer N, Fritzsche E, Westphal M. Wertigkeit des intraoperativen Ultraschalls bei intra- und extramedullären Tumoren. *Ultraschall in der Medizin* 2003; 24(6): 399-403.
66. Philips Healthcare. Intra-operative MR enables superb resection in Hamburg. *Field Strength* 2012; 46(2): 6-9.
67. Gottschalk J. Arbeitsanweisung der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord für die Herstellung und Entparaffinierung von Schnittpräparaten für die Immunhistologie. Zuletzt geändert 29.09.2008.

68. Gottschalk J. Verfahrensanweisung der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord bei der Vorbereitung in der Immunhistologie. Zuletzt geändert 29.09.2008.
69. Gottschalk J. Verfahrensanweisung der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord für die Durchführung der Immunhistologie. Zuletzt geändert 26.09.2008.
70. Gottschalk J. Statusprotokoll der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord für die Antigen-Demaskierung mittels Dampfgeräts. Zuletzt geändert 13.10.2008.
71. Gottschalk J. Arbeitsanweisung der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord für die Demaskierung von Antigenen. Zuletzt geändert 06.11.2009.
72. Gottschalk J. Arbeitsanweisung der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord bei der Detektion mit dem Dako ChemMate Kit bei der Verwendung des Autostainer Plus Immunfärbeautomaten. Zuletzt geändert 13.10.2008.
73. Gottschalk J. Arbeitsanweisung der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord für die immunhistologische Anwendung des Antikörpers IDH-1. Zuletzt geändert 02.10.2008.
74. Gottschalk J. Arbeitsanweisung der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord für die immunhistologische Anwendung des Antikörpers MIB-1 (KI67). Zuletzt geändert 02.10.2008.
75. Gottschalk J. Arbeitsanweisung der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord für die immunhistologische Anwendung des Antikörpers GFAP. Zuletzt geändert 02.10.2008.
76. Gottschalk J. Arbeitsanweisung der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord für die immunhistologische Anwendung des Antikörpers BRAF. Zuletzt geändert 02.10.2008.

77. Dianova GmbH, Hamburg. Technical note: Anti-human IDH1 R132H astrocytoma, oligodendroglioma tumor cell marker mouse monoclonal antibody clone H09
78. Dianova GmbH, Hamburg. Infobroschüre: Anti-Human IDH1 R132H Antikörper Klon H09.
79. Dianova GmbH, Hamburg. Neuropathology diagnostics. Glioma Immunohistochemistry. Anti-IDH1 R132H, Anti-Ki67, Anti-p53, Anti-GFAP.
80. DAKO Denmark A/S, Glostrup. Technical note: Monoclonal mouse anti-human Ki-67 Antigen Clone MIB-1, 2011: 1-4.
81. DAKO Denmark A/S, Glostrup. Ki-67 Antigen Clone MIB-1.  
([www.dako.com/de/ar38/p104960/prod\\_products.htm?setCountry=true&purl=ar38/p104960/prod\\_products.htm?undefined&submit=Accept country](http://www.dako.com/de/ar38/p104960/prod_products.htm?setCountry=true&purl=ar38/p104960/prod_products.htm?undefined&submit=Accept%20country), aufgerufen am 18.11.2013)
82. Spring Bioscience, Pleasanton. Mouse Anti-human BRAF V600E monoclonal antibody (Clone VE1).
83. Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS. Surgical pathology of the nervous system and its coverings (3rd Edition). Churchill Livingstone, 1991: 228-230.
84. Jackson RJ, Fuller GN, Abi-Said D, Lang FF, Gokaslan ZL, Shi WM, Wildrick DM, Sawaya R. Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas. *Neuro-Oncology* 2001; 3(3): 193-200.
85. Van den Bent MJ, Stupp R, Mason W. Impact of the extent of resection on overall survival in newly diagnosed glioblastoma after chemo-irradiation with temozolamide: further analysis of EORTC study 26981. *European Journal Cancer Supplements* 2005; 3: 134.
86. Tsugu A, Ishizaka H, Mizokami Y, Osada T, Baba T, Yoshiyama M, Nishiyama J, Matsumae M. Impact of the combination of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence with

intraoperative magnetic resonance imaging–guided surgery for glioma. *World Neurosurgery* 2011; 76(1): 120-127.

87. Ito S, Rachinger W, Stepp H, Reulen HJ, Stummer W. Oedema formation in experimental photo-irradiation therapy of brain tumours using 5-ALA. *Acta Neurochirurgica* 2005; 147(1): 57-65.

88. Schulder M, Carmel PW. Intraoperative magnetic resonance imaging: impact on brain tumor surgery. *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center* 2003; 10(2): 115-124.

89. Barker FG, Chang SM. Improving resection of malignant glioma. *The Lancet Oncology* 2006; 7(5): 359-360.

90. Nimsky C, Ganslandt O, Fahlbusch R. Intraoperative anatomische und funktionelle Hochfeld-MR-Bildgebung in der Neurochirurgie. *Deutsches Ärzteblatt* 2006; 103(27): 1899–1905.

91. Tabatabai G, Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME, Tonn JC, Wick W, Weller M. Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. *Acta Neuropathologica* 2010; 120(5): 585-592.

## 10. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sebastian Paul, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neuropathologische Untersuchungen an Gewebeproben vor und nach intraoperativem MRT bei malignen Gliomen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **11. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht









## **12. Danksagung**

Die vorliegende Dissertation ist durch die unterstützende Hilfe zahlreicher Personen entstanden. An dieser Stelle möchte ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und hilfreichen Ratschläge bedanken.

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Gottschalk für die Stellung des Themas der vorliegenden Dissertation, sowie für die sehr gute und ständige fachliche Betreuung bedanken.

Dazu gilt mein Dank den Mitarbeitern der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der Asklepios Klinik Nord für die Unterstützung und Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Paul Kremer, als Leiter der neurochirurgischen Abteilung der Asklepios Klinik Nord, sowie seinen Mitarbeitern für Bereitstellung der Patientendaten.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Ingolf Sulk für die Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern für deren Unterstützung bedanken.