

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
TUM School of Medicine and Health

Implementation der Konfokalen Laserendomikroskopie
für digitale Biopsien von Hirntumoren

Maria Katharina Idzikowski

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health zur
Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Lutz Renders

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jürgen Schlegel
2. Priv.-Doz. Dr. Friederike Liesche-Starnecker

Die Dissertation wurde am 01.06.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 30.09.2023 angenommen

1. Problemstellung	5
2. Einleitung	6
2.1. Intraoperative Resektionsrandkontrolle von Hirntumoren	6
2.2. Beschreibung der Konfokalen Laserendomikroskopie (CLE)	7
2.3. Fluoreszierende Farbstoffe für die CLE	10
2.4. Evaluation von Implementationen.....	12
3. Zielsetzung	13
4. Material und Methoden	14
4.1. Etablierung von topischen Färbemethoden für die CLE im Labor	14
4.1.1. Herkunft und Zubereitung des Probenmaterials	14
4.1.2. Durchführung der CLE von topisch gefärbten Proben.....	16
4.1.3. Topische Farbstoffadministration mit Natriumfluorescein, Acriflavin und mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate	17
4.1.4. CLE von topisch mit Natriumfluorescein gefärbten Gefrierschnitten	18
4.1.5. Färbung der Zelllinie LN18 mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate	18
4.1.6. Planung der klinischen Pilotstudie im neurochirurgischen OP	20
4.2. Bereiche der Implementationsanalyse	23
5. Ergebnisse	24
5.1. Auswertung der präklinischen Versuche.....	24
5.1.1. Topische Färbungen mit Natriumfluorescein und Untersuchung von Gefrierschnitten	25
5.1.2. Topische Färbungen mit Acriflavin.....	32
5.1.3. Immunhistochemische Färbungen mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate.....	38
5.2. Auswertung der klinischen Pilotstudie	39
5.3. Auswertung von Implementationsprozessen anhand des CFIR	44
5.3.1. Bereich Innovation	57
5.3.2. Bereich externes Umfeld	57
5.3.3. Bereich internes Umfeld.....	58
5.3.4. Bereich Individuen	59
5.3.5. Bereich Implementationsprozess	59
6. Diskussion	60
6.1. Eignung der unterschiedlichen Färbemethoden für die CLE	61
6.1.1. Topische Färbungen mit Natriumfluorescein und Untersuchung von Gefrierschnitten	61
6.1.2. Topische Färbungen mit Acriflavin.....	61

6.1.3. Immunhistochemische Färbungen mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate.....	62
6.2. CLE im Rahmen der klinischen Pilotstudie für intraoperative Diagnostik.....	62
6.3. Analyse der Implementation der CLE in die Klinik anhand des CFIR.....	63
6.3.1. Bereich Innovation.....	63
6.3.2. Bereich externes Umfeld.....	66
6.3.3. Bereich internes Umfeld.....	68
6.3.4. Bereich Individuen.....	69
6.3.5. Bereich Implementationsprozess.....	70
7. Zusammenfassung.....	73
8. Literaturverzeichnis.....	74
9. Abbildungsverzeichnis.....	78
10. Tabellenverzeichnis.....	80
11. Danksagung.....	81

Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
CFIR	Consolidated Framework for Implementation Research
CLE	Confocal Laser Endomicroscopy / konfokale Laserendomikroskopie
CUP	Cancer of Unknown Primary
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
e-Health	Electronic Health
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FKS	Fetales Kalbserum
HD	High Definition
HE	Hämatoxylin-Eosin
IARC	International Agency for Research on Cancer
KI	Künstliche Intelligenz
MRT	Magnetresonanztomographie
MPNST	Maligner Peripherer Nervenscheidentumor
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OP	Operationssaal
PBS	Phosphate buffered saline / phosphatgepufferte Salzlösung
QALY	Quality-adjusted life-year
WHO	World Health Organization

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum für Personenbezeichnungen verwendet. Entsprechende Begriffe gelten grundsätzlich für beide Geschlechter, sofern nicht explizit unterschieden wird.

1. Problemstellung

Die neurochirurgische Resektion von Hirntumoren ist eine Herausforderung, da intrazerebral nicht weit ins umliegende Parenchym operiert werden darf. Hierbei ist es entscheidend, einen Hirntumor möglichst vollständig zu resektieren, ohne tumorfreies zentralnervöses Gewebe zu schädigen. Die Beurteilung des Resektionsrandes zum umliegenden Parenchym ist mit den aktuell verfügbaren Möglichkeiten komplex. Für die intraoperative Definition der Tumorgrenze kann auf makroskopische Verfahren wie Neuronavigation und MRT zurückgegriffen werden. Auf histologischer Ebene stellte bislang die Diagnostik anhand eines intraoperativen HE (Hämatoxylin-Eosin) - gefärbten Schnittes auf Basis eines Gefrierschnittes (sog. Schnellschnittverfahren) den weltweiten Goldstandard dar. Eine Limitation dieses Verfahrens besteht in der langen Zeit bis zum Erhalt der Diagnose, die beispielsweise durchschnittlich 18 Minuten dauern und damit zu einer Verzögerung führen kann (Fotteler et al., 2021). Mit der CLE (Confocal Laser Endomicroscopy / konfokale Laserendomikroskopie) steht eine alternative Methode für die intraoperative Hirntumordiagnostik zur Verfügung. Die CLE war in der Neurochirurgie zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht etabliert. Das schließt insbesondere auch mit ein, dass es kein Protokoll für Färbemethoden und keinen Atlas gab, mit dem Ergebnisse ausgewertet und mit konventionellen histologischen diagnostischen Methoden verglichen werden konnten (Fotteler et al., 2019; Fotteler et al., 2021). Mit der Implementation der CLE in der Neurochirurgie steht nun eine neue Technologie zur Verfügung, die den Anspruch erhebt, intraoperativ die Resektionshöhle untersuchen und eine *in vivo* Histologie von Hirntumoren am Operationstisch ermöglichen zu können.

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse der CLE-Bildgebung in der Neuropathologie beurteilt und im Anschluss diese Technologie in einer klinischen Pilotstudie in die Klinik eingeführt. Der Prozess der Implementation wurde wissenschaftlich begleitet und ausgewertet.

2. Einleitung

2.1. Intraoperative Resektionsrandkontrolle von Hirntumoren

Die Reduktion der Tumorlast steht bei vielen neurochirurgischen Tumoroperationen mehr im Vordergrund als eine vollständige Resektion, da neurologische Funktionen geschützt werden sollen. Am deutlichsten wird dies beim Glioblastom, ZNS WHO Grad 4, dem häufigsten hirneigenen malignen Tumor des Erwachsenen. Zwar infiltriert dieser Tumor diffus ins umgebende Hirnparenchym und kann daher nicht vollständig entfernt werden, jedoch ist auch hier eine gründliche Resektion von Bedeutung: So führte bei diesem Tumor, der ein medianes Überleben von 14,6 Monaten bei Operation und adjuvanter Radiochemotherapie aufweist, eine postoperativ in der MRT (Magnetresonanztomographie) festgestellte vollständige Resektion zu einem längeren Überleben (Stummer et al., 2008) (Stupp et al., 2005). Randomisierte Studien zeigten eine Optimierung der Resektion durch Anwendung der intraoperativen Kernspintomografie und der Fluoreszenzfärbung mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) bei malignen Gliomen (Berkefeld, 2015; Senft et al., 2011; Stummer et al., 2006). Die 5-ALA-gestützte Resektion von malignen Gliomen führte zu einem längeren progressionsfreien Überleben (Stummer et al., 2006). Eine multizentrische Studie zu 280 pädiatrischen Gliompatienten fand, dass die intraoperative MRT die Resektion zusätzlicher Tumormassen ermöglichte (Karsy et al., 2019). Allerdings gab es Limitationen für Resektionen anhand von makroskopischen Befunden aufgrund des infiltrierenden Wachstumsmusters von Gliomen (Berkefeld, 2015). Daher spielt die intraoperative histologische Tumorrandkontrolle eine entscheidende Rolle. Im Rahmen der intraoperativen Gefrierschnittdiagnostik kann neben einer ersten Entitätseinordnung das Ausmaß an verbliebenen Tumorzellen differenziert eingeschätzt werden. Die Entscheidung über eine mögliche Erweiterung einer Resektion wird letztlich durch den Operateur getroffen. Auch wenn hierfür die Gefrierschnittdiagnostik als Orientierungshilfe weltweit etabliert ist, sind intraoperative Verzögerungen ein wesentlicher Nachteil dieser Methode. Desweiteren können im Rahmen der Probenverarbeitung in der Neuropathologie beim Einfrieren und Schneiden des Gewebes Artefakte entstehen, die eine Beurteilung erschweren. Die CLE wurde daher für eine schnellere und artefaktarme Randkontrolle am Operationssitus entwickelt. Hierbei handelt es sich um eine *in vivo* einsetzbare Diagnostik, ohne das Gewebe durch Verarbeitung artifiziell zu verändern. Diese Technologie könnte die Gefrierschnittdiagnostik zusätzlich zur etablierten makroskopischen Herangehensweise mittels intraoperativer Neuronavigation und MRT ergänzen.

2.2. Beschreibung der Konfokalen Laserendomikroskopie (CLE)

Die CLE ermöglicht eine intraoperative Beurteilung von Gewebe auf zellulärer Ebene. Mit Fluoreszenzfarbstoffen wird versucht, ein mit der konventionellen Histologie vergleichbares Bild zu erreichen. Konfokale Laserendomikroskope emittieren durch eine Sonde Laserstrahlen auf eine Gewebeprobe, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbt wurde. Das reflektierte Bild wird von der Sonde aufgenommen, zu einem schwarz-weißen histologischen Bild verarbeitet und auf einem Bildschirm sichtbar, ohne dass ein Blick durch ein konventionelles Mikroskop nötig ist. Dies ermöglicht prinzipiell die Anwendung im OP (Operationssaal). Eigentliches Ziel der CLE in der Neurochirurgie ist die intraoperative sog. *in vivo* Untersuchung des Operationssitus.

In vivo CLE

Im Rahmen der *in vivo* CLE erhält ein Patient intraoperativ eine intravenöse Verabreichung eines Farbstoffes, der sich im Gewebe anreichert. Anschließend wird der Operationssitus mit der Endoskopsonde untersucht (s. Abb. 1). Dies ermöglicht vor Ort eine sofortige digitale Biopsie ohne das Anfertigen eines intraoperativen Gefrierschnitts. *In vivo* Untersuchungen konnten zum Zeitpunkt dieser Arbeit aufgrund einer fehlenden Zulassung der sterilen Hülle (ZEISS Sterile Sheath) des verwendeten CLE Systems nicht durchgeführt werden, sodass die Tumorproben *ex vivo* untersucht werden mussten.



Abb. 1: Schematische Darstellung einer *in vivo* Untersuchung mit dem *Digital Biopsy Tool CONVIVO®* der ZEISS Gruppe

Quelle: <https://www.zeiss.ch/meditec/produkte/neurochirurgie/digitales-biopsietool/convivo.html>,
aufgerufen am 06.06.2022

Ex vivo CLE

Ex vivo CLE bezeichnet die Untersuchung eines Resektates außerhalb des Operationssitus nach intravenöser Verabreichung eines Farbstoffes. In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der klinischen Pilotstudie Exzidate *ex vivo* im OP mikroskopiert.

Topische Farbstoffadministration im Rahmen der CLE

Daneben besteht die Möglichkeit der topischen Färbung, d. h. der Aufbringung eines fluoreszierenden Farbstoffes auf ein frisches oder in Formalin fixiertes Gewebsexzidat. Nach dem Einwirken und Abwaschen des Farbstoffes kann die Probe ohne weitere Prozessierung mit der CLE-Sonde mikroskopiert werden. Als Vorbereitung der klinischen Pilotstudie wurden in dieser Arbeit im Labor unterschiedliche topische Färbungen etabliert und verglichen.

Besonderheit der CLE

Die Einzigartigkeit konfokaler Systeme liegt darin, dass eine Probe dreidimensional untersucht werden kann, was eine Aussage zur Tiefenausdehnung eines Tumors ermöglichen könnte, wohingegen die konventionelle Lichtmikroskopie auf einen zweidimensionalen Gewebsschnitt limitiert ist. Zudem kann mithilfe der CLE der Operationssitus in Echtzeit beurteilt werden, wofür eine Gewebeentnahme nicht notwendig ist (sog. digitale Biopsie). Im Gegensatz zur konventionellen Gefrierschnittdiagnostik kann gefärbtes Frischgewebe mit der CLE ohne weitere Zwischenschritte mikroskopiert werden. Die Proben müssen nicht – wie im Rahmen des intraoperativen Gefrierschnittverfahrens – einen Prozess von Einbettung, Einfrieren, Schneiden und HE-Färbung in der Pathologie durchlaufen, was zur Entstehung von Artefakten führen kann.

Das Digital Biopsy Tool CONVIVO®

Es gibt verschiedene CLE-Systeme, darunter beispielsweise das eigens für die intraoperative Untersuchung von Hirntumoren entwickelte Digital Biopsy Tool CONVIVO® der ZEISS Gruppe, dessen Prototyp in dieser Arbeit verwendet wurde (s. Abb. 2). Dieses Mikroskop kann den Fokus in die Tiefe innerhalb einer Bandbreite von $-50\mu\text{m}$ bis $200\mu\text{m}$ variieren. Es emittiert Laserstrahlen mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und vergrößert eine $475 \times 267\mu\text{m}$ große Fläche. Die Bildauflösung und Bildrate betragen 1.920×1.080 Pixel (Full HD (High Definition)) / 0,75 Bilder pro Sekunde. Ein weiteres CLE-System ist beispielsweise Cellvizio® von Mauna Kea Technologies.



Abb. 2: Konfokales Laserendomikroskop
(Digital Biopsy Tool CONVIVO® der Firma Zeiss)

Quelle:

<https://www.zeiss.ch/meditec/produkte/neurochirurgie/digitales-biopsietool/convivo.html>, aufgerufen am 06.06.2022.

Untersuchungen zur *ex vivo* Beurteilung von Patientenproben kamen zu einer überwiegend guten Korrelation mit der traditionellen Histologie (Acerbi et al., 2020; Charalampaki and Schlegel, 2019). Auch Publikationen zur *in vivo* CLE am Tiermodell von Hirntumoren zeigten vielversprechende Resultate (Belykh et al., 2018; Martirosyan et al., 2011; Peyre et al., 2013).

2.3. Fluoreszierende Farbstoffe für die CLE

Für die CLE muss ein fluoreszierender Farbstoff verwendet werden, dessen Exzitationswellenlänge und Emissionswellenlänge mit dem jeweiligen CLE-System kompatibel ist. Diverse Farbstoffe können hierfür eingesetzt werden - manche können intravenös für eine *in vivo* oder *ex vivo* Beurteilung verabreicht werden, andere können nur für topische Färbungen eingesetzt werden. In konfokalen Aufnahmen erscheinen fluoreszierende Areale heller und nicht angefärbtes Gewebe dunkler.

Natriumfluorescein

In dieser Arbeit wurde der Farbstoff Natriumfluorescein im Labor topisch verwendet und anschließend in einer klinischen Pilotstudie intravenös verabreicht. Natriumfluorescein wird durch eine Wellenlänge von 465 bis 490nm angeregt und emittiert Lichtstrahlen in einem Spektrum von 520 bis 530nm. Diese Substanz färbt das Zytoplasma an und spart Zellkerne aus (s. Abb. 3).

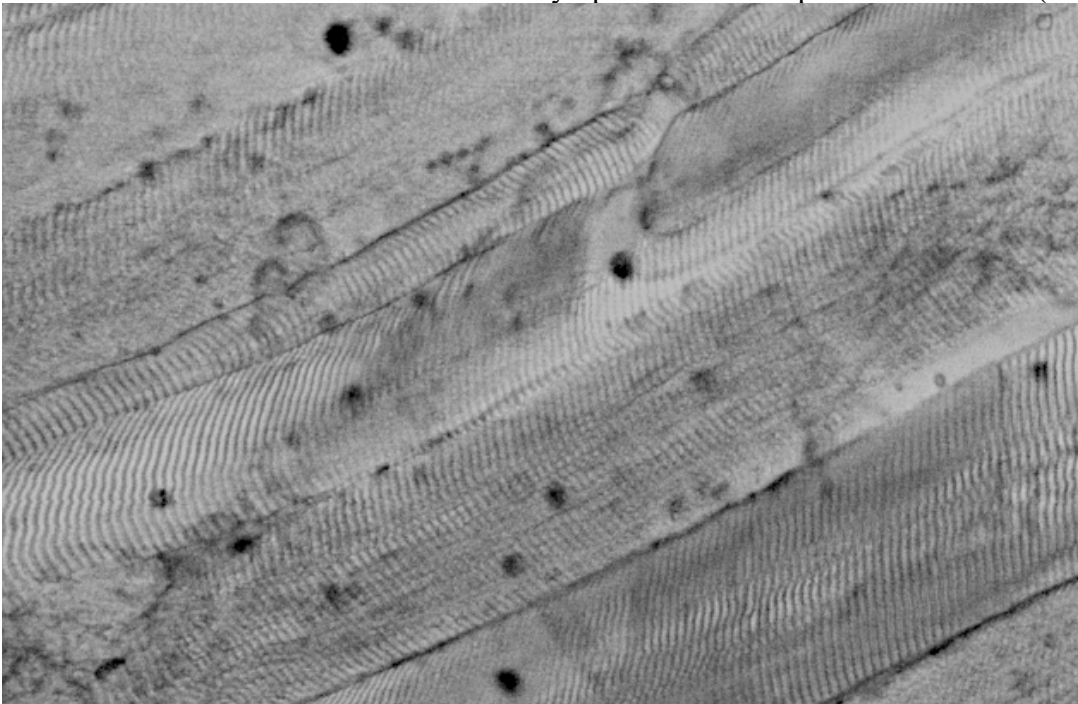


Abb. 3: Topisch mit Natriumfluorescein gefärbte quer gestreifte Muskulatur (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Acriflavinhydrochlorid

Darüber hinaus wurde der Farbstoff Acriflavinhydrochlorid (Acriflavin) für topische Färbungen im Labor eingesetzt. Acriflavin ist eine DNA interkalierende Substanz, die Zellkerne anfärbt, was die Orientierung im Gewebe erleichtert (s. Abb. 4).

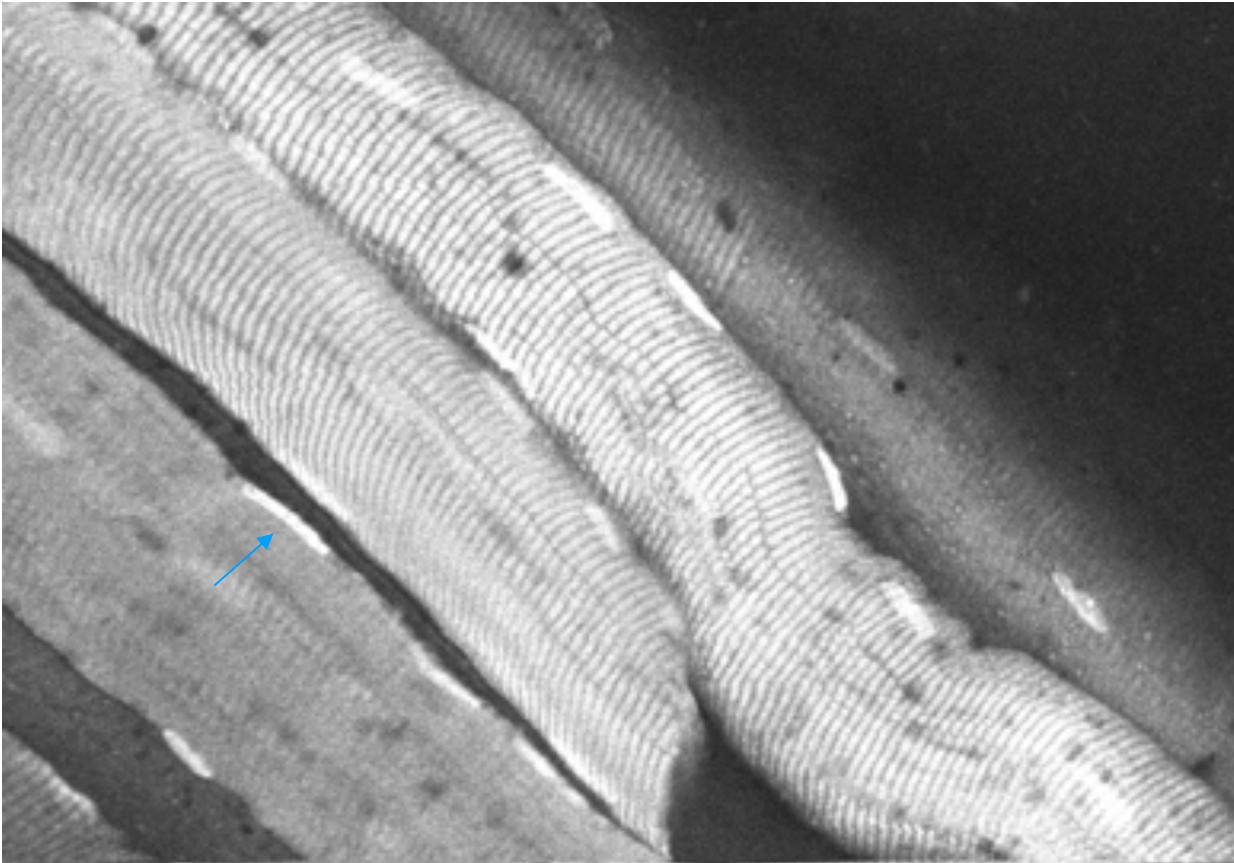


Abb. 4: Topisch mit Acriflavin gefärbte quergestreifte Skelettmuskulatur mit länglichen Zellkernen (blauer Pfeil: Zellkern, exemplarisch) (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Molekulare CLE mit fluoreszierenden Antikörpern

Daneben wurde ein an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelter Antikörper für molekulare, direkte Immunfluoreszenz mit der CLE in einem experimentellen Rahmen erprobt. In dieser Arbeit wurde im Labor der monoklonale IgG Anti-EGFR-Antikörper (neutralizing), clone LA1, Alexa Fluor® 488 conjugate (mouse) für die Untersuchung von Gliomen verwendet. Dieser Antikörper ist an Natriumfluorescein gekoppelt und mit dem Digital Biopsy Tool CONVIVO® detektierbar. Er bindet an den EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor / Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor), der in Glioblastomen, ZNS WHO Grad 4, überexprimiert sein kann.

2.4. Evaluation von Implementationen

Innovative Ideen sind entscheidend für die Weiterentwicklung von Therapien und die konstante Optimierung der Patientenbehandlung (Snowdon et al., 2015). Die gelungene Umsetzung einer Innovation ist jedoch ebenso relevant und muss gut geplant werden, damit eine Innovation erfolgreich in die Praxis umgesetzt werden kann. McKinsey & Company untersuchten die Qualität, mit der verschiedene Länder Innovationen umsetzten, als „future prosperity indicator“ in weltweiten Rankings zwischen OECD Nationen (Organisation for Economic Co-operation and Development) (McKinsey and Canada, 2008; Snowdon et al., 2015). Das Scheitern von Innovationen hängt teilweise mit fehlendem Wissen über organisatorische Prozesse zusammen (Allen et al., 2017; Chaudoir et al., 2013). Implementationsforschung ist ein in den letzten Jahrzehnten wachsendes Forschungsgebiet. Es gibt zahlreiche Modelle, mit denen Implementationen evaluiert werden können: Villalobos Dintrans et al. zeigten 35 verschiedene Modelle auf (Villalobos Dintrans et al., 2019). *Consolidated Framework for Implementation Research* (CFIR) ist ein Leitfaden für Implementationsevaluation auf allen Gebieten, der 2009 von Damschroder et al. veröffentlicht und 2022 aktualisiert wurde und aus verschiedenen Implementationstheorien diejenigen Kategorien auswählte, für die es die besten Datenlage zur Beeinflussung einer Implementation gab (Damschroder et al., 2009; Damschroder et al., 2022; Keith et al., 2017). CFIR fand auch für Innovationen im medizinischen Bereich Anwendung, wie beispielsweise für Implementationen im Bereich von e-Health (electronic health) (Ross et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Kriterien des CFIR eine retrospektive Analyse der Implementation der CLE in die Neurochirurgie durchgeführt.

3. Zielsetzung

Die neurochirurgische Operation ist eine bedeutende Säule in der Behandlung von Hirntumoren. Hierbei ist die Vollständigkeit der Resektion von prognostischer Bedeutung - wie einleitend beschrieben, weisen Studien auf ein verlängertes progressionsfreies Überleben bei makroskopisch möglichst vollständiger Resektion von Gliomen hin (Stummer et al., 2006; Stummer et al., 2008). Ziel einer onkologischen Operation ist die Entfernung von neoplastischem und die Erhaltung von gesundem Gewebe. Da Gliome ein diffuses Infiltrationsmuster aufweisen, und intrazerebral nicht weit ins Gesunde hineinoperiert werden kann, kommt der Beurteilung der Resektionsränder eine überragende Bedeutung zu. Interessanterweise gibt es mit der CLE eine Möglichkeit, die es dem Neurochirurgen in Interaktion mit dem Neuropathologen erleichtern kann, Resektionsränder intraoperativ besser zu beurteilen. Diese Methode ist in der Neurochirurgie noch nicht etabliert, weswegen in der vorliegenden Arbeit die Abläufe zur Einführung der CLE aus dem neuropathologischen Labor in die Neurochirurgie untersucht wurden. Dazu sollten im Einzelnen folgende Schritte durchgeführt werden:

1. Untersuchung verschiedener topischer Färbemethoden, darunter Natriumfluorescein, Acriflavin und des monoklonalen fluoreszierenden IgG Anti-EGFR-Antikörpers Alexa Fluor® 488 conjugate hinsichtlich einer Eignung für die CLE sowie Erstellung einer Datenbank aus topisch gefärbten konfokalen Bildern
2. Vergleich der intraoperativen Gefrierschnittdiagnostik mit der *ex vivo* CLE im Rahmen einer klinischen Pilotstudie nach Administration von Natriumfluorescein sowie Erstellung einer Datenbank aus *ex vivo* entstandenen konfokalen Bildern
3. Analyse der Prozesse zur Einführung der CLE in die klinische Routine anhand der Modellvorstellung des CFIR Leitfadens

4. Material und Methoden

4.1. Etablierung von topischen Färbemethoden für die CLE im Labor

4.1.1. Herkunft und Zubereitung des Probenmaterials

Für die Färbetablierung im Labor wurden in Formalin fixierte Reste von Hirntumorproben untersucht, deren Diagnostik bereits abgeschlossen war, und die sonst vernichtet worden wären. Desweiteren wurden Anteile unfixierter Hirntumorproben, die nicht für die Einbettung und für weitere Diagnostik verwendet werden konnten, mit einem maximalen Durchmesser von 0,3cm untersucht. Von den Patientendaten war lediglich die Diagnose bekannt, alle anderen Daten (wie Alter, Geschlecht oder Name) waren anonymisiert. Die Bilder wurden pseudonymisiert numerisch gespeichert. Nach Färbung und Untersuchung mit der CLE wurden die Proben in Formalin fixiert und konserviert. Im Labor wurde Frischgewebe und mindestens 24 Stunden in Formalin fixiertes Gewebe mit unterschiedlichen Farbstoffen untersucht (s. Tab. 1). Einige Proben wurden geteilt und mit unterschiedlichen Farbstoffen gefärbt. Es wurden 26 Proben mit Natriumfluorescein, 16 Proben mit Acriflavin und 3 Proben mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate gefärbt. Als Kontrollen wurden 9 Proben nicht gefärbt. Daneben wurden 6 Gefrierschnitte mit Natriumfluorescein, 4 FFPE-Schnitte mit dem Anti-EGFR-Antikörper gefärbt und 2 Schnitte als Kontrollproben nicht gefärbt. (vgl. Tab. 1)

Als Negativkontrolle dienten 5 ungefärbte Proben (s. Tabelle 1). Die Ergebnisse der Färbungen wurden miteinander sowie mit der konventionellen Lichtmikroskopie verglichen.

Diagnose	n	Fix.	Unfix.	NaFl.	Acriflavin	EGFR	Ungefärbt
Meningeome							
Transitionelles Meningeom, ZNS WHO Grad 1	6		6	4	1		1
Meningotheliomatöses Meningeom, ZNS WHO Grad 1	2		2		2		
Atypisches Meningeom, ZNS WHO Grad 2	3	2	1	2	1		
Fibroblastisches Meningeom, ZNS WHO Grad 1	2	2		1	1		
Gliome							
Pilozytisches Astrozytom, ZNS WHO Grad 1	1		1		1		
Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3	13	3	10	5	2	1	5
Astrozytom, ZNS WHO Grad 3	1		1	1		1	
Glioblastom, ZNS WHO Grad 4	6	1	5	1		2	3
Ovarialkarzinom, zerebelläre Metastase	1		1	1			
Metastasen							
Zervixkarzinom, spinale Metastase	1		1	1			
Adenokarzinom (CUP), paravertebrale Metastase	1		1	1			
Mammakarzinom, zerebrale Metastase	2	2		1	1		
Weitere Tumore sowie Kontrollproben							
MPNST	1		1	1			
Schwannom, ZNS WHO Grad 1	3	2	1	2	1		
Neurozytom, ZNS WHO Grad 1	2		2	1	1		
Pineozytom, ZNS WHO Grad 1	2		2	1	1		
Frontallappen (A.)	1		1	1			
Temporallappen (A.)	1		1		1		
Okzipitallappen (A.)	1		1		1		
Cerebellum (A.)	2		2	1	1		
Quergestreifte Skelettmuskulatur (M. iliopsoas) (A.)	2		2	1	1		

Tabelle 1: Auflistung der im Labor untersuchten Proben und Färbungen

Erläuterungen zu Tabelle 1:

- n: Anzahl der untersuchten Tumore
- Fix.: in Formalin fixierte untersuchte Anteile einer Gewebeprobe
- NaFl: Natriumfluorescein
- Unfix.: unfixierte (nicht in Formalin fixierte) untersuchte Anteile einer Gewebeprobe
- EGFR: Färbung mit dem monoklonalen fluoreszierenden IgG Anti-EGFR-Antikörper (neutralizing), clone LA1, Alexa Fluor® 488 conjugate (mouse)
- A.: Autopsiematerial von Sektionen, das nicht für die Diagnostik verwendet wurde
- ungefärbt: ungefärbte Negativkontrollen
- MPNST: Maligner Peripherer Nervenscheidentumor
- CUP: CUP (Cancer of Unknown Primary)-Syndrom

4.1.2. Durchführung der CLE von topisch gefärbten Proben

Die in Tabelle 1 aufgelisteten unfixierten bzw. in Formalin fixierten Gewebeproben wurden topisch gefärbt, gewaschen und anschließend ohne weitere Prozessierung mikroskopiert. Die Sonde des Konfokalen Laserendomikroskops wurde im Laborsetting per Hand direkt auf die gefärbte Probe gehalten. Hierdurch entstanden histologische Aufnahmen, die am Bildschirm des Digital Biopsy Tool CONVIVO® sichtbar wurden. Es wurden verschiedene Schichten des Gewebes zwischen einer Tiefe von 20µm bis 80µm untersucht. Durch ein an das Gerät gekoppeltes Fußpedal wurden die Aufnahmen ausgelöst und gespeichert.

4.1.3. Topische Farbstoffadministration mit Natriumfluorescein, Acriflavin und mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate

Administration von Natriumfluorescein

Für die topischen Färbungen mit Natriumfluorescein im Labor wurde eine Lösung der Konzentration von 0,17g/l hergestellt (7mg Natriumfluorescein in 42ml destilliertem Wasser). Die Proben wurden topisch mit 80µl Natriumfluorescein mit einer Einwirkzeit von 1 Minute gefärbt und anschließend mit 500µl PBS (phosphate buffered saline / Phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen.

Es wurden insgesamt 26 Proben mit Natriumfluorescein gefärbt (s. Tab. 1).

Als Kontrollmaterial wurden tumorfremde Proben von Skelettmuskel, Kleinhirn und Frontallappen untersucht (s. Tabelle 1).

Administration von Acriflavin

Für die topischen Färbungen mit Acriflavin im Labor wurde 0,001 g Acriflavinpulver mit 10ml Kochsalzlösung (0,9%) verdünnt. Die Proben wurden mit 400µl dieser Lösung 3 Minuten lang gefärbt und anschließend mit 400µl PBS gewaschen. Es wurden 16 Proben mit Acriflavin gefärbt (s. Tabelle 1).

Administration des monoklonalen fluoreszierenden IgG Anti-EGFR-Antikörpers (neutralizing), clone LA1, Alexa Fluor® 488 conjugate (mouse)

Mit dem fluoreszierenden Anti-EGFR-Antikörper wurden im Labor Proben eines Glioblastoms, ZNS WHO Grad 4, und eines Oligodendroglioms, ZNS WHO Grad 3, sowie zwei Platten der EGFR exprimierenden Glioblastomzelllinie LN18 topisch gefärbt. Bei den Gliomen war im Rahmen der Routinediagnostik eine kräftig positive Reaktion der Tumorzellen in der immunhistochemischen Untersuchung nach Inkubation mit Antikörpern gegen EGFR nachgewiesen worden. Für die konfokale Bildgebung wurde in dieser Arbeit der monoklonale fluoreszierende IgG Anti-EGFR-Antikörper (neutralizing), clone LA1, Alexa Fluor® 488 conjugate (mouse) verwendet. Für die Herstellung der Färbelösung wurden 8µl des Antikörpers in 2000µl PBS gegeben, um eine Verdünnung der Konzentration 2µg/ml zu erhalten. Die Tumorproben wurden bei 4°C Grad in der Antikörperlösung inkubiert. Die Probe des Glioblastoms wurde nach einer einstündigen Inkubation sowie nach einer 24-stündigen Inkubation untersucht. Das Oligodendrogliom war 24 Stunden lang in Formalin fixiert worden und wurde zunächst ohne Färbung als Negativkontrolle, dann 12 Minuten, 60 Minuten, 3 Stunden sowie eine Woche nach der Färbung mit dem Digital Biopsy Tool CONVIVO® untersucht. Daneben wurden Schnitte von Gliomen und Kontrollgewebe zur Untersuchung mittels CLE hergestellt. Es wurden 2 Proben eines Glioblastoms und eine Probe eines Oligodendroglioms mit 4µg/ml der Anti-EGFR-Antikörper-Lösung gefärbt und 24 Stunden lang inkubiert.

4.1.4. CLE von topisch mit Natriumfluorescein gefärbten Gefrierschnitten

Für einen direkten Vergleich der CLE mit der konventionellen Histologie wurden Gefrierschnitte mit dem Digital Biopsy Tool CONVIVO® untersucht. Hierzu wurden im Rahmen des intraoperativen Schnellschnittverfahrens Gefrierschnitte von 4 Proben hergestellt. Die Schnitte wurden mit 30µl Natriumfluorescein angefärbt und nach 10 Sekunden Einwirkzeit mit 120µl PBS abgespült. Gefrierschnitte für das konventionelle Fluoreszenzmikroskop wurden mit einem Tropfen Xylol und einem Deckgläschen eingedeckelt. Ein Gefrierschnitt für das Digital Biopsy Tool CONVIVO® wurde nicht eingedeckelt, hier wurde die CLE-Sonde ohne Deckglas aufgelegt.

Topisch mit Natriumfluorescein gefärbte Gefrierschnitte:

- Transitionelles Meningeom, ZNS WHO Grad 1
- Atypisches Meningeom, ZNS WHO Grad 2
- Glioblastom, ZNS WHO Grad 4
- Metastase eines Mammakarzinoms
- Metastase eines Plattenepithelkarzinoms
- Nasenschleimhaut (tumorfrei)

Tabelle 3: Mit der CLE untersuchte Gefrierschnitte (Färbung mit Natriumfluorescein)

4.1.5. Färbung der Zelllinie LN18 mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate

Daneben wurde ein Pellet der Glioblastomzelllinie LN18 (American Type Culture Collection) mit dem Anti-EGFR-Antikörper (neutralizing), clone LA1, Alexa Fluor® 488 conjugate (mouse) gefärbt und mit der CLE untersucht. Die Zelllinie LN18 wurde in 75 cm² Kulturflaschen in einem CO₂-Inkubator mit Glucose DMEM plus 10% FKS (fetales Kalbserum) bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung des Mediums, Waschen, Formalinfixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit 2µg/ml des Anti-EGFR-Antikörpers 24 Stunden lang inkubiert. Dann wurden die Zellen zentrifugiert und mit dem Digital Biopsy Tool CONVIVO® mikroskopiert.

Für die Färbung wurde das immunzytochemische Protokoll von EMD Millipore Corporation verwendet: Zunächst wurden die Zellen bei 37°C in einem CO₂-Inkubator 24 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde 3.7% Formalin hinzugefügt und die Zellen 20 Minuten bei 21°C stehen gelassen und anschließend zweimal mit PBS fünf Minuten lang gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 0,5% Triton X-100 zwei Minuten lang permeabilisiert und mit PBS zweimal fünf Minuten lang gewaschen. Um die 0,5% Triton X-100 Lösung zu erhalten, wurden 0,05ml Triton in 10ml PBS gegeben. Dann wurden die Zellen mit 2 µg/ml des Anti-EGFR-Antikörpers in PBS über Nacht lichtgeschützt inkubiert. Um diese Konzentration zu erreichen, wurden 64µl des Antikörpers in 16ml PBS gegeben. Danach wurden die Zellen abgekratzt, in eine 50 ml-Tube gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurde die Sonde des Digital Biopsy Tool CONVIVO® in das Gefäß gehalten, um die Probe zu mikroskopieren.

Für Kontrollen wurden Erythrozytenpräparate angefärbt und untersucht. Hierfür wurden 3 Proben mit je 1ml Blut, mit 5µl bzw. 20µl Natriumfluorescein oder Acriflavinhydrochlorid gefärbt, anschließend 10 Minuten auf 2500g zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die Proben wurden dann mit 1 ml PBS aufgefüllt und noch zwei Mal unter derselben Bedingung zentrifugiert. Der Überstand mit überschüssigem Farbstoff wurde abgegossen. Danach wurden die Proben mit dem Digital Biopsy Tool CONVIVO® mikroskopiert.

4.1.6. Planung der klinischen Pilotstudie im neurochirurgischen OP

Zielsetzung und Bedarf einer Pilotstudie mit der CLE in der Neurochirurgie

Zur Verbesserung der Datenlage zur CLE von Hirntumoren sollte mit einer kleinen Fallzahl die *ex vivo* CLE in der Neurochirurgischen Klinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München nach intravenöser Natriumfluoresceingabe erprobt werden. Ziel der klinischen Pilotstudie war, zu untersuchen, ob die CLE grundsätzlich in den Ablauf einer neurochirurgischen Operation integrierbar ist und ob Hirntumore mit der CLE erkennbar sind. Postoperativ sollte die CLE mit der konventionellen Lichtmikroskopie verglichen werden.

Patientenkollektiv, Stichprobenumfang sowie Ein- und Ausschlusskriterien

Es wurden insgesamt 8 Patientinnen und 16 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 54 Jahren in die klinische Pilotstudie eingeschlossen und präoperativ über mögliche Nebenwirkungen im Rahmen der intravenösen Gabe von Natriumfluorescein aufgeklärt.

Insgesamt wurden 15 verschiedene Tumorentitäten untersucht. 20 Teilnehmende erhielten eine intravenöse Administration von Natriumfluorescein (s. Tabelle 2). Eine Gewebeprobe wurde lediglich nach der Resektion topisch mit Natriumfluorescein gefärbt. Eine weitere Gewebeprobe blieb als Negativkontrolle ungefärbt. Aus der Studie ausgeschlossen wurden minderjährige und nicht einwilligungsfähige Patienten.

Intraoperative ex vivo CLE mit 22 Patientenproben im neurochirurgischen OP

<p>Meningeome</p> <p>Transitionelles Meningeom, ZNS WHO Grad 1 2 Psammomatöse Meningeome, ZNS WHO Grad 1 Anaplastisches Meningeom, ZNS WHO Grad 3</p>	<p>Gliome</p> <p>Pilozytisches Astrozytom, ZNS WHO Grad 1 Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3 Astrozytom, ZNS WHO Grad 3 6 Glioblastome, ZNS WHO Grad 4</p>
<p>Metastasen</p> <p>Adenokarzinometastase Metastase eines Ewing-Sarkoms</p>	<p>Gefäßmalformationen</p> <p>Arterio-venöse Gefäßmalformation Kavernöse Gefäßmalformation</p>
<p>Weitere Tumore</p> <p>Gangliogliom, ZNS WHO Grad 1 Neurofibrom, ZNS WHO Grad 1 Ependymom, ZNS WHO Grad 2</p>	

Tabelle 2: Untersuchte Tumorentitäten im Rahmen der klinischen Pilotstudie

Variierende Faktoren

Variierende Faktoren der klinischen Pilotstudie waren die Zeit zwischen intravenöser Gabe von Natriumfluorescein und Tumorentnahme sowie die Durchführung eines intraoperativen Gefrierschnitts. Eine weitere Variable bei Gliomen war die gleichzeitige Verwendung von 5-ALA im Rahmen der Neuronavigation.

Anonymisierung der Daten

Die histologischen Bilder wurden pseudonymisiert numerisch digital gespeichert. Vor jeder neuen Patientenprobe wurden die Einstellungen von Zeit und Datum am Digital Biopsy Tool CONVIVO® verändert, um eine Korrelation mittels Zeitpunkt der Operation zu verhindern.

Farbstoffadministration

Natriumfluorescein wurde intraoperativ bei Eröffnung der Dura Mater intravenös verabreicht. Es wurde das Produkt der Firma Novartis, Fluorescein ALCON® 10% Injektionslösung mit der Dosierung 5 mg/kg Körpergewicht verwendet. Nach der Tumorresektion wurde Gewebe, das nicht für die intraoperative Gefrierschnittdiagnostik verwendet wurde, *ex vivo* im OP mit dem Digital Biopsy Tool CONVIVO® mikroskopiert.

4.2. Bereiche der Implementationsanalyse

Die Implementation der CLE vom neuropathologischen Labor in die Klinik wurde anhand von Bereichen, die im CFIR vorgeschlagen wurden, verfahrenstechnisch evaluiert (s. Abb. 5). Hierfür wurden Kriterien des CFIR ins Deutsche übersetzt und auf die vorliegende Implementation angewendet (Damschroder et al., 2009; Damschroder et al., 2022). Es gibt 5 Kategorien, die sich mit verschiedenen Aspekten der Implementation befassen, darunter die Bereiche Innovation, externes und internes Umfeld, Individuen und Implementationsprozess. (Damschroder et al., 2009; Damschroder et al., 2022).

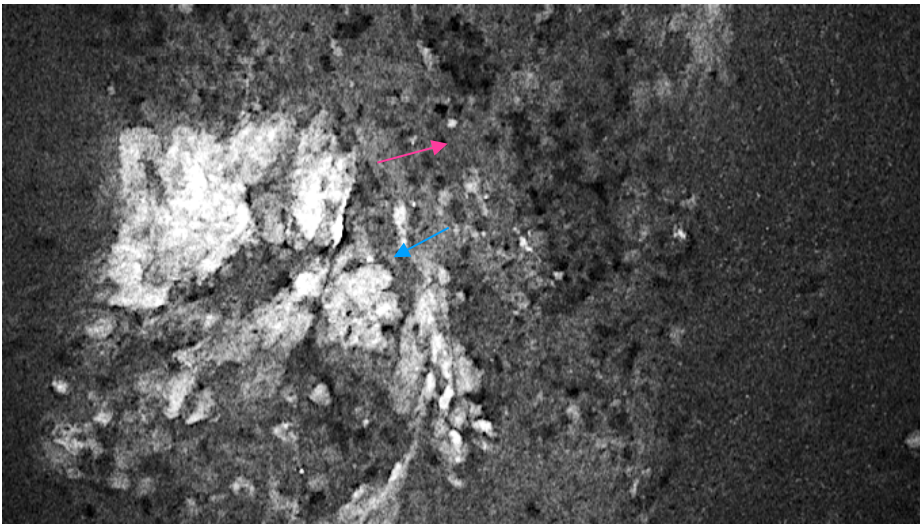
5. Ergebnisse

5.1. Auswertung der präklinischen Versuche

In der präklinischen Testphase im Labor wurden unterschiedliche Färbungen an verschiedenen Tumorentitäten und tumorfreien Proben getestet und hierbei eine Datenbank mit insgesamt 16344 konfokalen Bildern (50,62 GB) erstellt und ausgewertet. Bei auftretenden Artefakten wurde eine Vorauswahl an verwertbaren Bildern getroffen. Aufgrund der Größe der entstandenen Datenbank werden im Folgenden exemplarisch einige Beispiele aus der konfokalen Diagnostik angeführt und z. T. mit der konventionellen Histologie verglichen.

5.1.1. Topische Färbungen mit Natriumfluorescein und Untersuchung von Gefrierschnitten

Metastasen



Bei einer Kleinhirnmetastase eines Ovarialkarzinoms ist in der CLE der Tumorzellverband gut sichtbar (s. blaue Pfeilmarkierung, Abb. 5). Daneben zeigen sich nekrotische Areale (s. rosa Pfeilmarkierung).

Abb. 5: Metastase eines Ovarialkarzinoms im Cerebellum (blaue Pfeilmarkierung: Tumorverband, rosa Pfeilmarkierung: nekrotisches Areal) (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Tumorfrees Kleinhirn stellt sich in der CLE und im HE-gefärbten FFPE-Präparat zellreich dar, vereinbar mit dem Stratum granulosum aus Körnerzellen (s. Abb. 6, jeweils rechtsbetonte Bildseite).

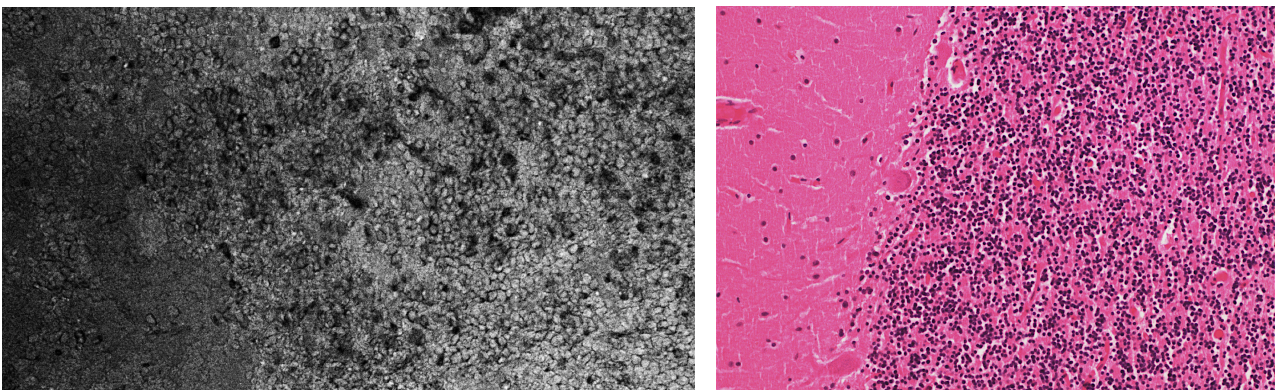


Abb. 6: Tumorfrees Kleinhirn (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und am HE-gefärbten FFPE-Präparat (rechts: HE-Färbung, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahme)

Der in der CLE sichtbare Tumorverband einer Metastase eines Ovarialkarzinoms im Kleinhirn passt zum konventionellen histologischen Bild (s. Abb. 7). Es zeigen sich in beiden Methoden ausgedehnte Infiltrate einer malignen epithelialen Neoplasie mit stark vergrößerten Zellkernen.

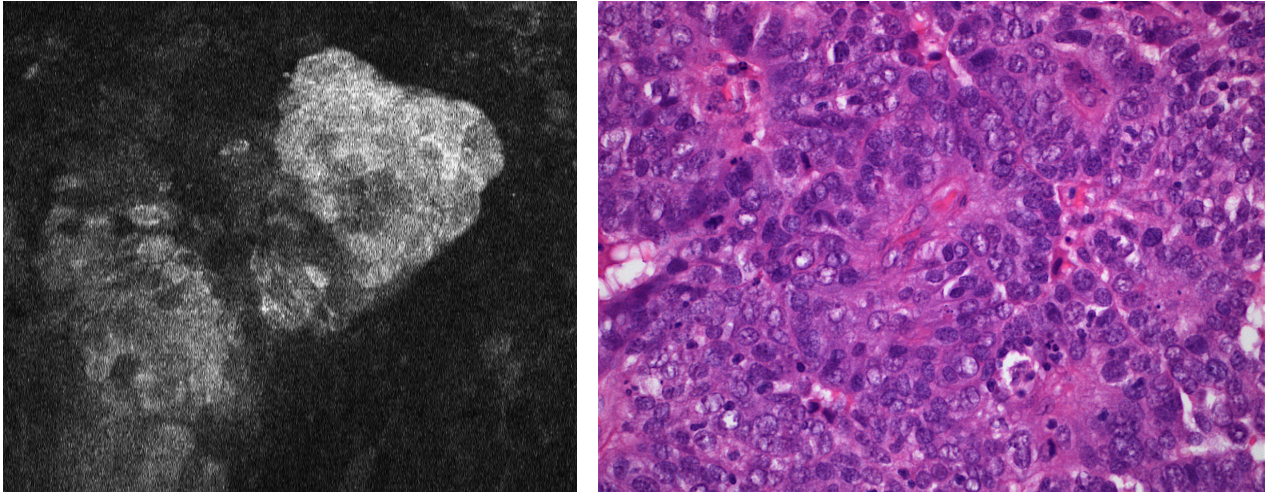


Abb. 7: Metastase eines Ovarialkarzinoms (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und am HE-gefärbten FFPE-Präparat (rechts: HE-Färbung, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahme)

Bei einem hepatoid differenzierten Adenokarzinom mit CUP (Cancer of Unknown Primary)-Syndrom mit unbekanntem Primarius und intramuskulärer paravertebraler Lage sieht man eine maligne epitheliale Neoplasie mit einem flächigen Tumorverband (s. Abb. 8). Bei Kernpleomorphie sind die Zellkerne überwiegend rundlich mit einer sichtbaren vermutlichen Mitose (blaue Pfeilmarkierung). Die Tumorzellen haben teils distinkte Zellgrenzen. Im Gegensatz dazu ist in der tumorfreien Kontrollprobe eines Skelettmuskels die charakteristische Querstreifung der einzelnen Muskelfasern zu erkennen (s. Abb. 8).

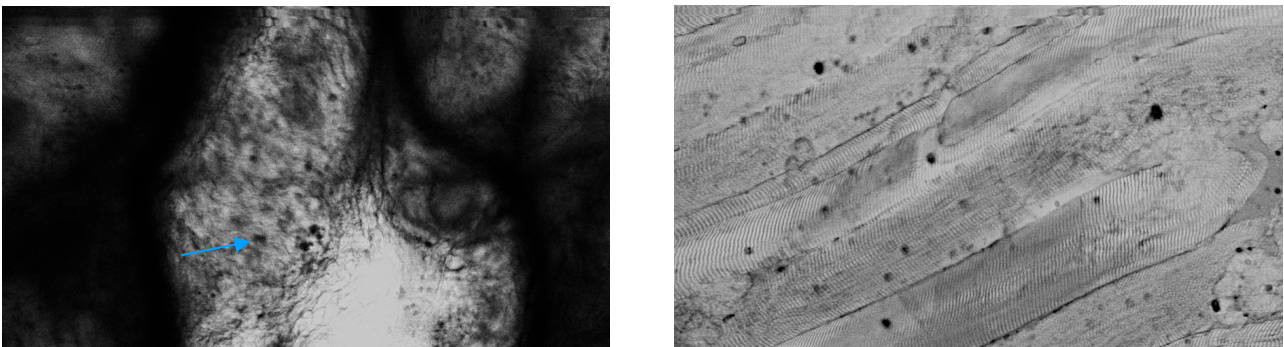


Abb. 8: Intramuskuläre Metastase eines Adenokarzinoms (CUP-Syndrom) (blauer Pfeil: vermutliche Mitose) (links) und tumorfreier Skelettmuskel (M. iliopsoas) (rechts) (topische Färbungen mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Glioblastom, ZNS WHO Grad 4

Ein Glioblastom, ZNS WHO Grad 4, weist in der CLE eine hohe Zelldichte auf (s. Abb. 9). Tumorfreier Cortex aus dem Frontallappen wirkt verglichen mit dem Glioblastom deutlich zellärmer (s. Abb. 9).

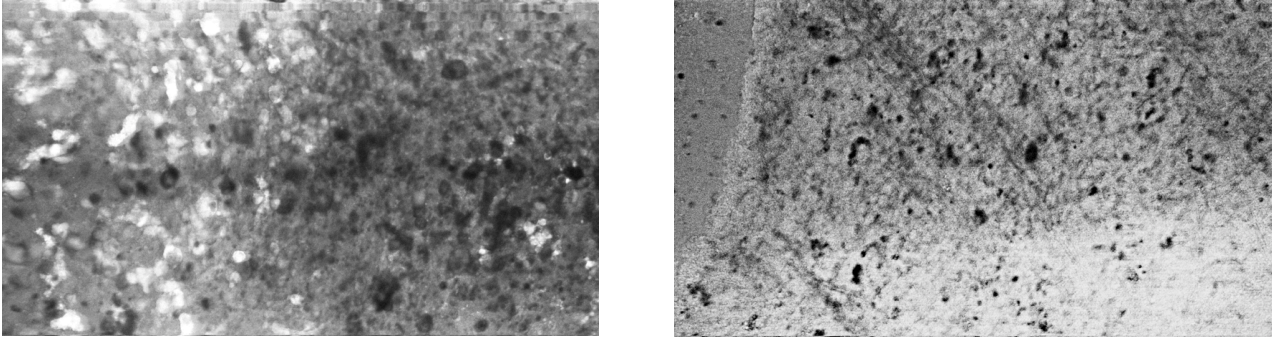


Abb. 9: Glioblastom, ZNS WHO Grad 4 (links) und tumorfreier Cortex (Frontallappen) (rechts) (topische Färbungen mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

In der konfokalen Untersuchung eines Glioblastoms sind - passend zur konventionellen Lichtmikroskopie - Gefäßproliferate sichtbar (s. Abb. 10).

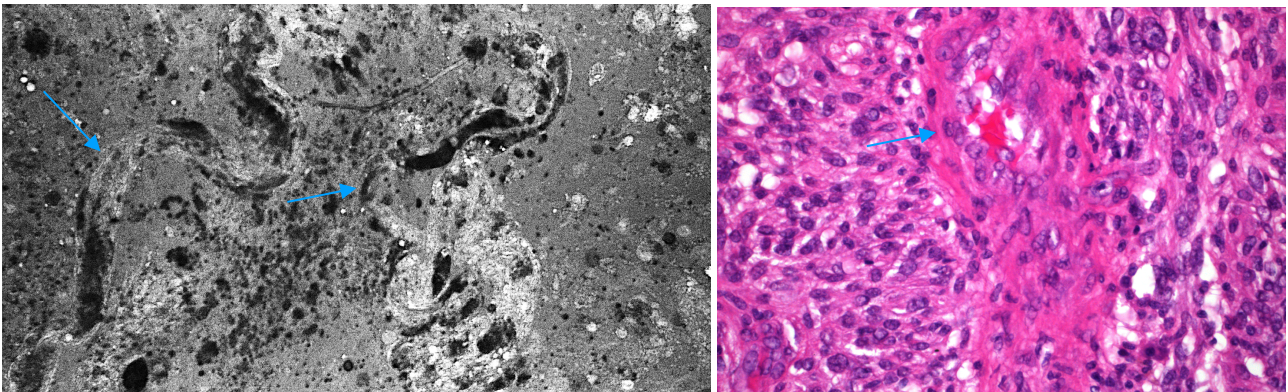


Abb.10: Glioblastom, ZNS WHO Grad 4, mit Gefäßproliferaten (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und am HE-gefärbten FFPE-Schnitt (rechts: HE-Färbung, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahme) (blaue Pfeilmarkierungen: jeweils Gefäßproliferate im Glioblastom)

Es finden sich im Glioblastom, ZNS WHO Grad 4, nekrotische Areale, in deren Randbereich die Tumorzellen teilweise in der sog. Palisadenstellung angeordnet sind (s. Abb. 11, Pfeilmarkierungen):

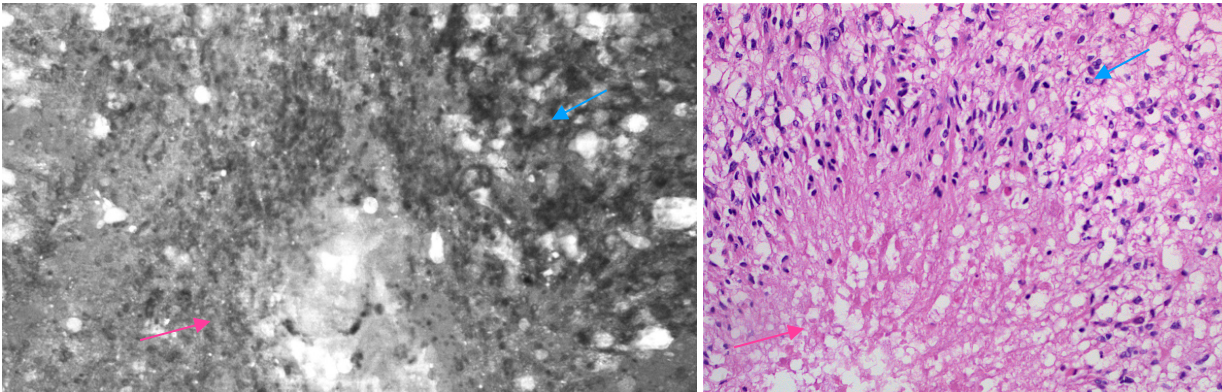


Abb. 11: Glioblastom mit Palisadenstellung und Nekrose (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) sowie am HE-gefärbten FFPE-Schnitt (rechts: HE-Färbung, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahme)
(blaue Pfeilmarkierung: jeweils sog. Palisadenstellung, rosa Pfeilmarkierung: jeweils Nekrose)

(Die rechte Abbildung und ein Teil der linken Abbildung von Abb. 11 ohne die hier eingefügten Pfeilmarkierungen ist für Webzwecke der ZEISS Gruppe auch zu sehen auf <https://www.zeiss.ch/meditec/produkte/neurochirurgie/digitales-biopsietool/convivo.html>, aufgerufen am 21.11.2022)

Transitionelles Meningeom, ZNS WHO Grad 1

Ein Transitionelles Meningeom, ZNS WHO Grad 1, zeigt in der HE-Färbung und in der CLE eine Ausbildung von Wirbelformationen. Die Tumorzellen haben in der HE-Färbung rundliche bis ovaläre Zellkerne, die mit der CLE in diesem Fall nicht eindeutig abgrenzbar sind. (s. Abb. 12)

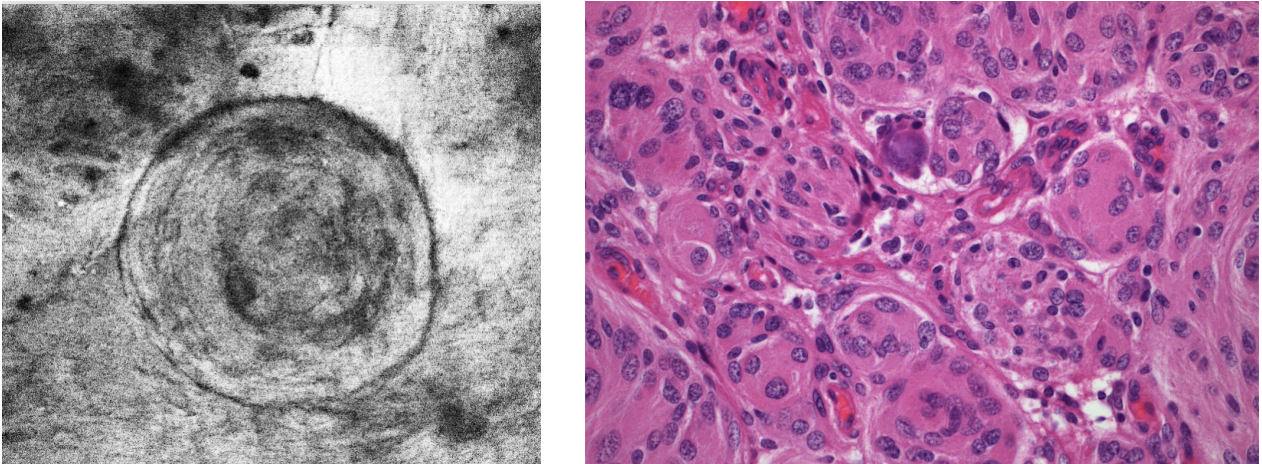


Abb. 12: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO Grad 1, mit wirbelartigem Wachstumsmuster (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und am HE-gefärbten FFPE-Schnitt (rechts: HE-Färbung, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahme)

Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3

Bei einem Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3, sieht man mit der CLE einen mäßig zellreichen glialen Tumor mit rundlichen Zellkernen. Zudem zeigen sich Längsanschnitte von Gefäßproliferaten mit intravasalen Strukturen, die morphologisch und quantitativ gut zu Erythrozyten passen (s. Abb. 13, blaue Pfeilmarkierung).

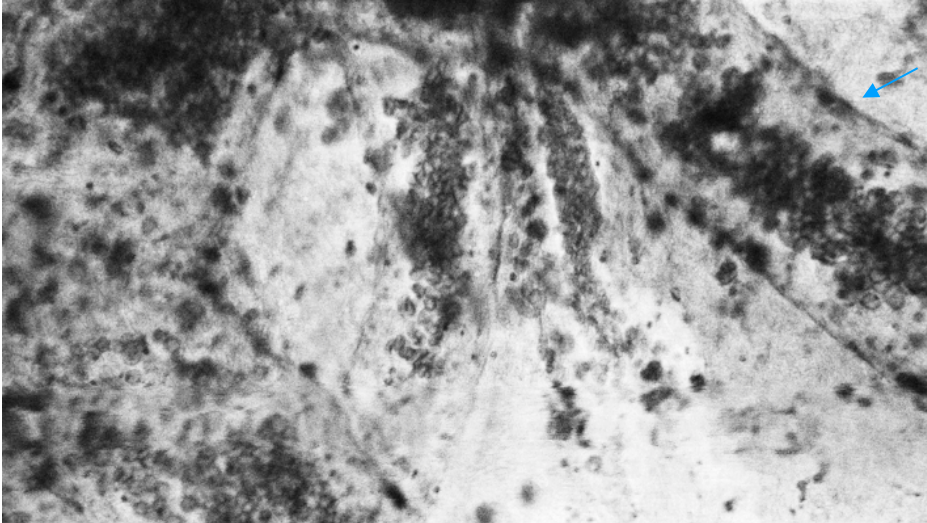


Abb. 13:
Oligodendrogliom,
ZNS WHO Grad 3, mit
Gefäßproliferaten
(blaue
Pfeilmarkierung:
Blutgefäß,
exemplarisch)
(topische Färbung mit
Natriumfluorescein,
CLE-Bildgebung,
eigene Aufnahme)

Schwannom, ZNS WHO Grad 1

Ein Schwannom, ZNS WHO Grad 1 weist in der CLE zellreiche Bereiche auf, in denen die Tumorzellen teilweise in Strömen vorliegen, mit paralleler Palisadenstellung von Zellkernen (sog. Verocay-bodies), passend zu sog. AntoniA-Arealen (s. Abb. 14, blaue Pfeilmarkierung). Daneben zeigen sich regressiv veränderte, aufgelockerte sog. AntoniB-Areale (s. Abb. 14, rosa Pfeilmarkierung).

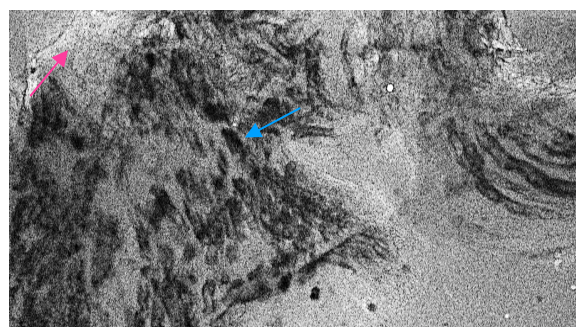
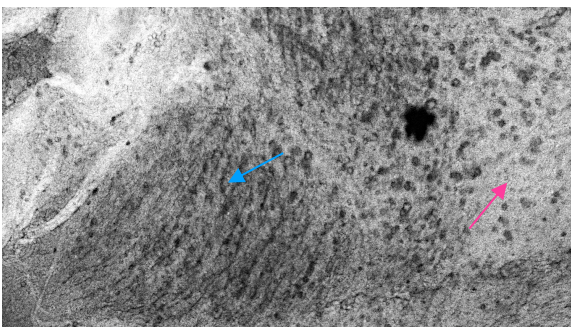


Abb. 14: 2 Schwannomproben, ZNS WHO Grad 1, mit in Strömen angeordneten Tumorzellen in sog. AntoniA-Arealen und aufgelockerten AntoniB-Arealen (blaue Pfeilmarkierung: AntoniA-Areal, blaue Pfeilspitze: sog. Verocay-body, rosa Pfeilmarkierung: AntoniB-Areal) (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Gefrierschnitte

Bei einer Metastase eines Plattenepithelkarzinoms sieht man in der CLE des Gefrierschnitts sowie unter dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop Tumorzellen mit einer deutlich zugunsten der Zellkerne verschobenen Kern-/Plasma-Relation mit unregelmäßigen, pleomorphen, teils entrundeten Zellkernen (s. Abb. 15).

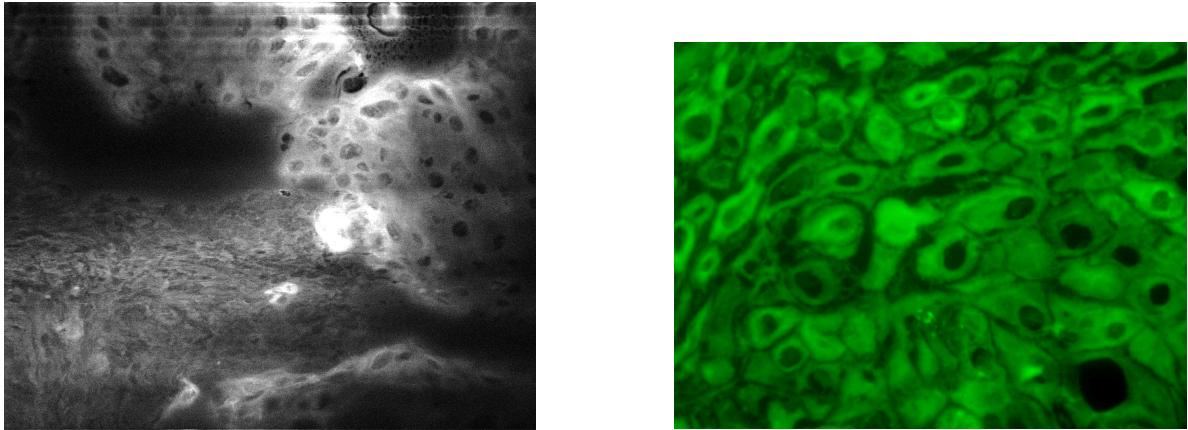


Abb. 15: Metastase eines Plattenepithelkarzinoms im Gefrierschnitt (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und in der Fluoreszenzmikroskopie (rechts: Färbung mit Natriumfluorescein, konventionelle Fluoreszenzmikroskopie, eigene Aufnahme)

Die konfokalen Bilder einer Plattenepithelkarzinomprobe sind im Gefrierschnitt stark durch Artefakte überlagert, jedoch ist ein diffuser Tumorverband erkennbar (s. Abb. 16).

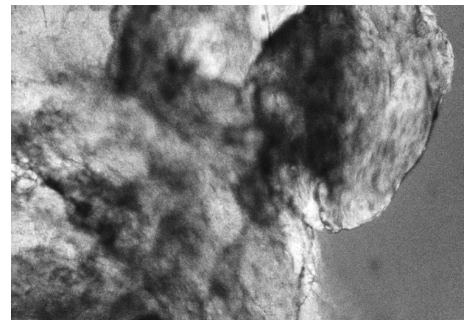
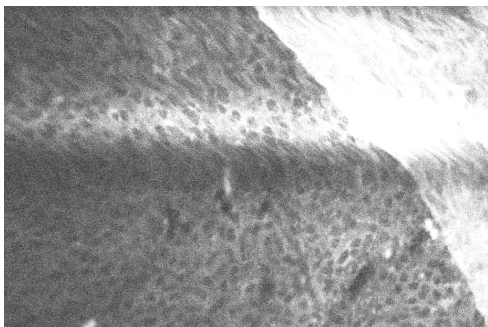


Abb. 16: Metastase eines Plattenepithelkarzinoms im Gefrierschnitt (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)



Im Gefrierschnitt eines atypischen Meningeoms ist eine einzelne Zellschicht gut beurteilbar. Hier zeigt sich ein Tumor von sehr hoher Zelldichte mit einem flächigen Wachstumsmuster und überwiegend runden bis ovalären Zellkernen (s. Abb. 17).

Abb. 17: Gefrierschnitt eines Atypisches Meningeoms (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung eines Gefrierschnitts, eigene Aufnahme)

5.1.2. Topische Färbungen mit Acriflavin

Transitionelles Meningeom, ZNS WHO Grad 1

In der topischen Färbung mit Acriflavin sieht man bei einem Transitionellen Meningeom, ZNS WHO Grad 1, einen zellreichen, meningealen Tumor mit Ausbildung von Wirbeln und zentraler Verkalkung (sog. Psammomkörper) (s. Abb. 18). Die Tumorzellen haben gut abgrenzbare rundliche bis ovaläre, relativ monomorphe Zellkerne ohne Hinweise auf erhöhte Proliferation.

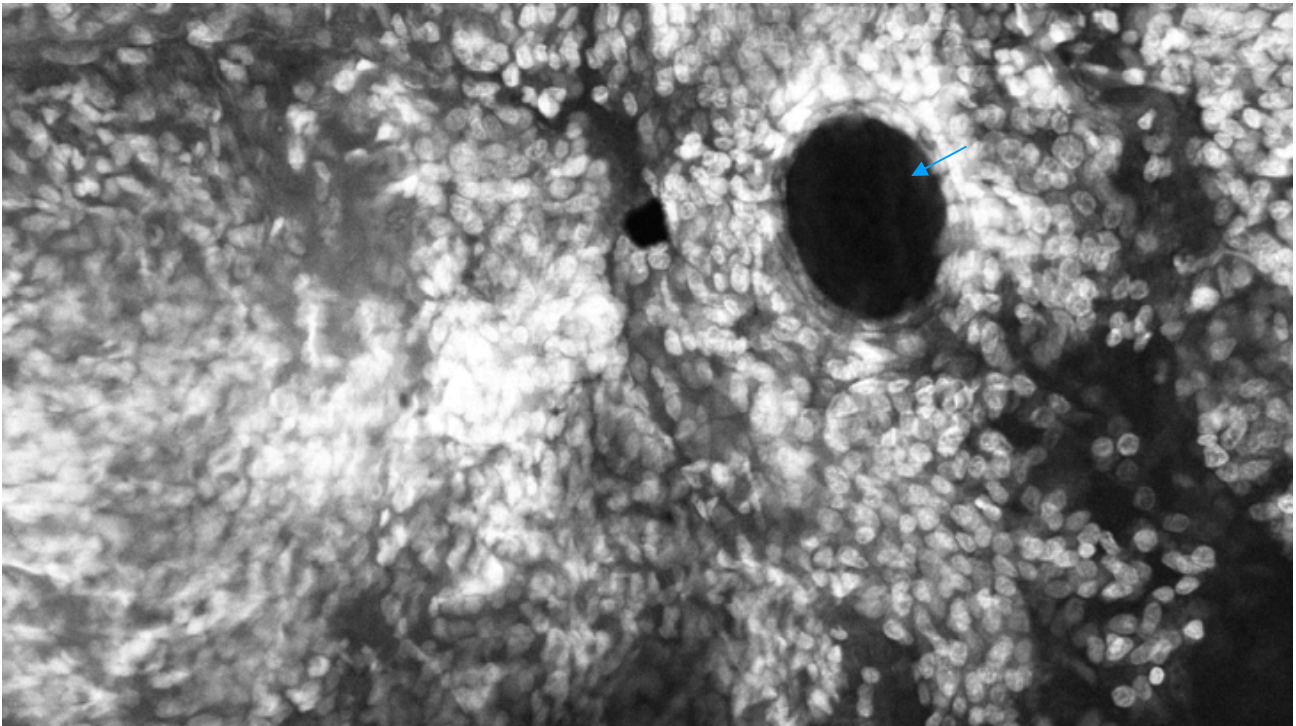


Abb. 18: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO Grad 1 (blaue Pfeilmarkierung: sog. Psammomkörper) (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Das vorliegende Atypische Meningeom, ZNS WHO Grad 2, ist ein zelldichter Tumor mit ovalären Zellkernen und einer Ausbildung von Wirbelformationen (s. Abb. 19).

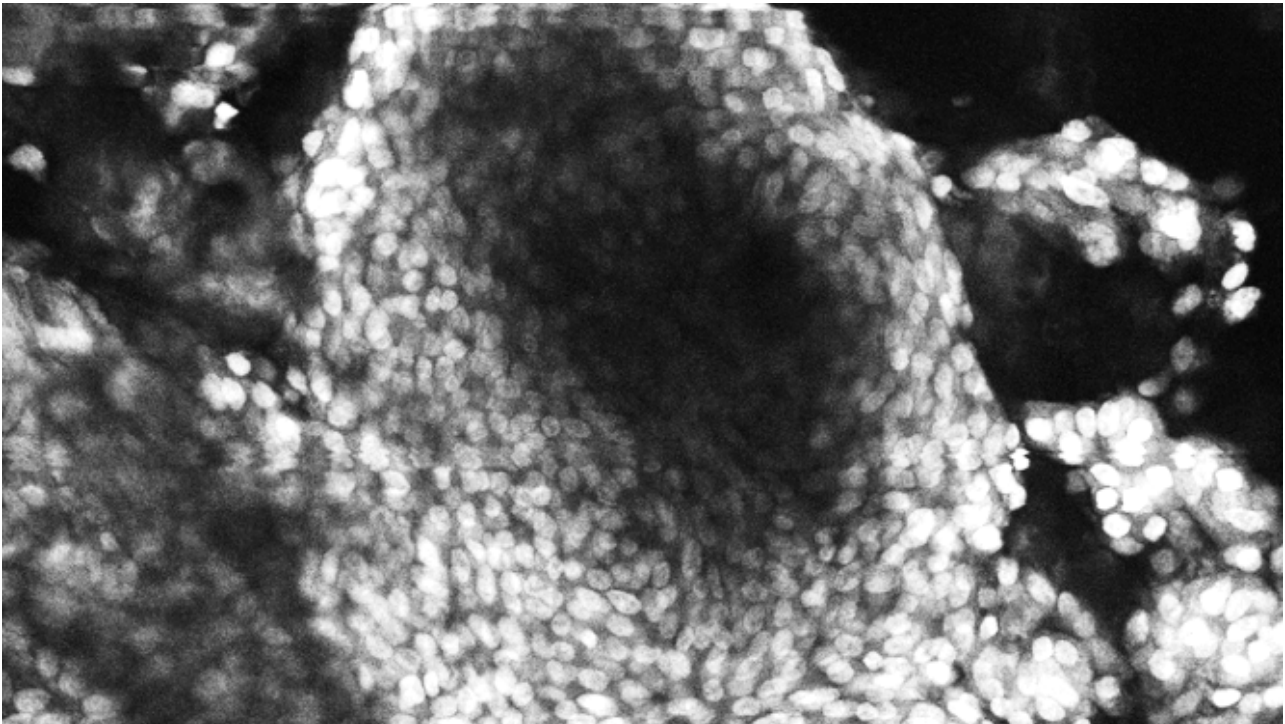


Abb. 19: Atypisches Meningeom, ZNS WHO Grad 2, mit Wirbelformationen (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Ein Meningotheliomatöses Meningeom, ZNS WHO Grad 1, weist zahlreiche wirbelartige Zellverbände sowie ein pseudo-synzitiales Wachstum ohne scharf abgrenzbare Zellgrenzen auf (s. Abb. 20).

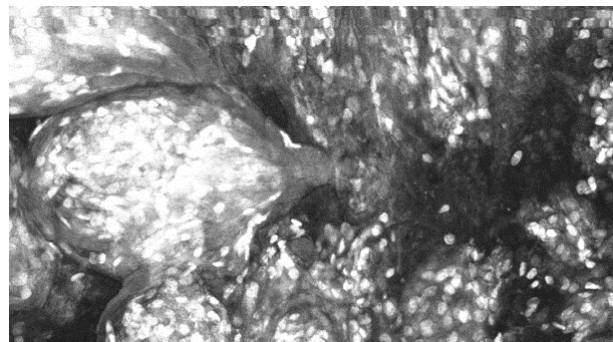
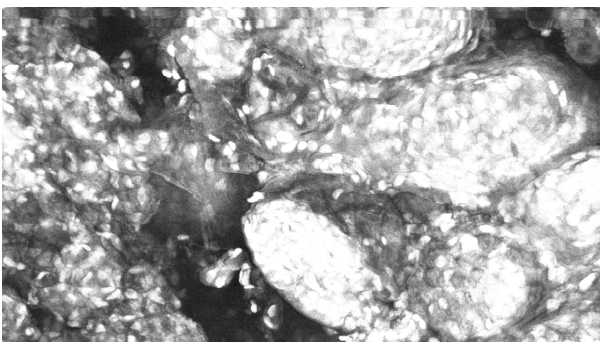


Abb. 20: Meningotheliomatöses Meningeom, ZNS WHO Grad 1 (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Bei einem Fibroblastischen Meningeom, ZNS WHO Grad 1, ist ein mäßig zellreicher Tumor mit einem stromartigen Wachstumsmuster aus spindelförmigen Zellen, eingebettet in ein kollagenfaserreiches Stroma sichtbar (s. Abb. 21). Bei einem weiteren Ausschnitt desselben Tumors

zeigt sich ein quer getroffenes Blutgefäß mit außen anliegenden Zellen, die zu Perizyten passen (s. Abb. 21 rechts, blaue Pfeilmarkierung).

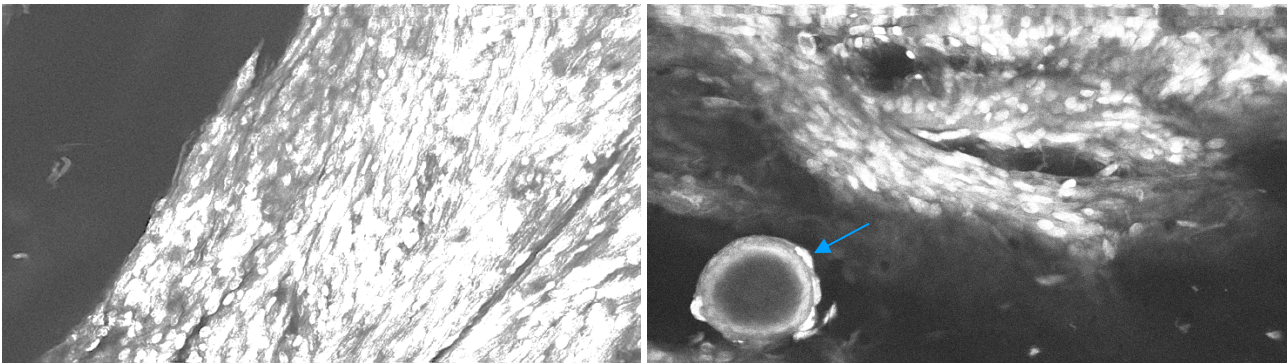


Abb. 21: Fibroblastisches Meningeom, ZNS WHO Grad 1 (blaue Pfeilspitze: Zellkern eines Perizyten eines Blutgefäßes (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Gliome

Bei diesem Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3, ist ein Gefäßproliferat erkennbar (s. Abb. 22).

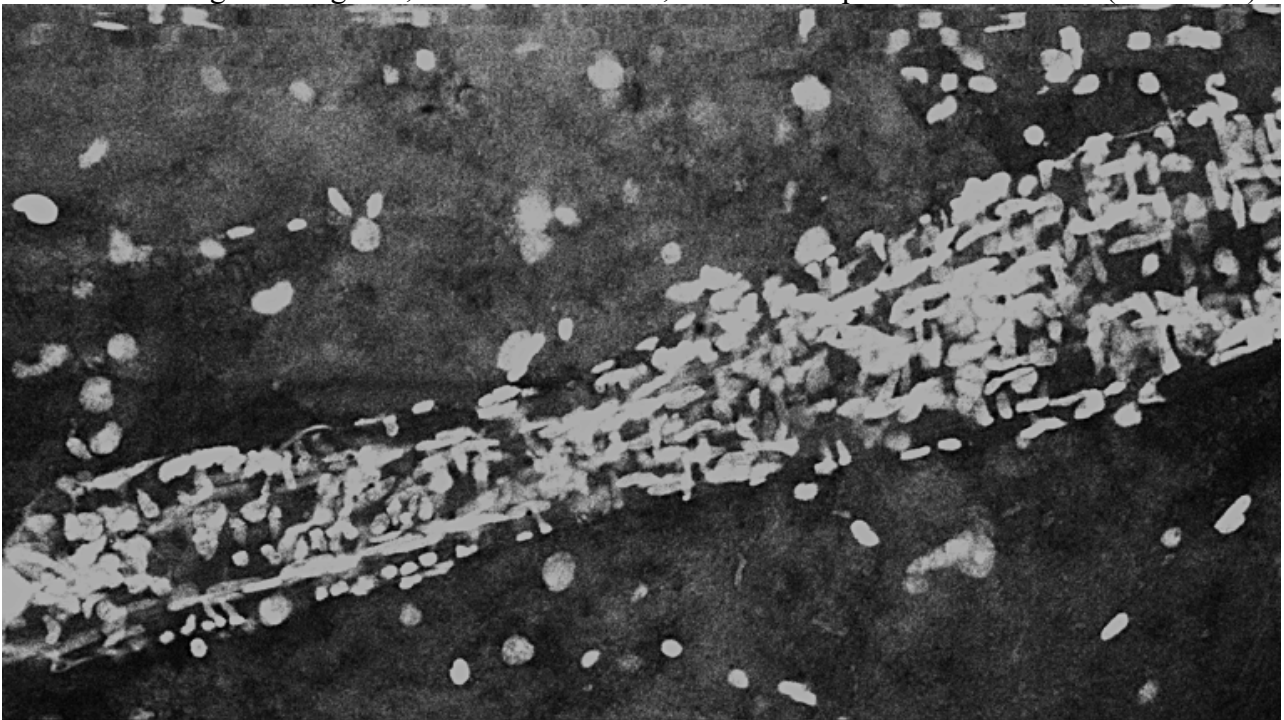
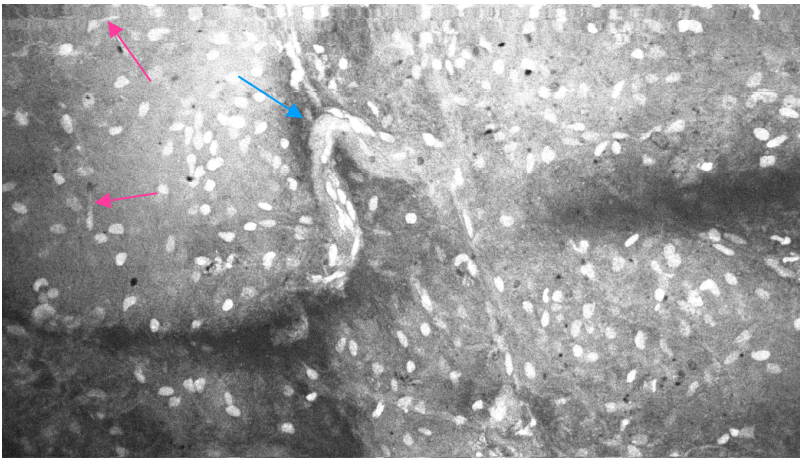


Abb. 22: Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3 (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)



Das vorliegende pilozytische Astrozytom ist ein mäßig zellreicher Tumor mit relativ monomorphen, überwiegend rundlichen Zellkernen mit teils angedeuteten piloiden Zellfortsätzen (rosa Pfeilmarkierungen). Im Tumor ist eine Gefäßstruktur sichtbar (blaue Pfeilmarkierung). (s. Abb. 23).

Abb. 23: Pilozytisches Astrozytom, ZNS WHO Grad 1 (blaue Pfeilmarkierung: Blutgefäß, rosa Pfeilmarkierungen: piloide Zellfortsätze) (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Pineozytom, ZNS WHO Grad 1

Ein Pineozytom, ZNS WHO Grad 1, ist in der Färbung mit Acriflavin mäßig zellreich mit monomorphen, rundlichen bis ovalären Zellkernen (s. Abb. 24, links). Diese Charakteristika sind in der Färbung mit Natriumfluorescein nicht wiedererkennbar (s. Abb. 24, rechts).

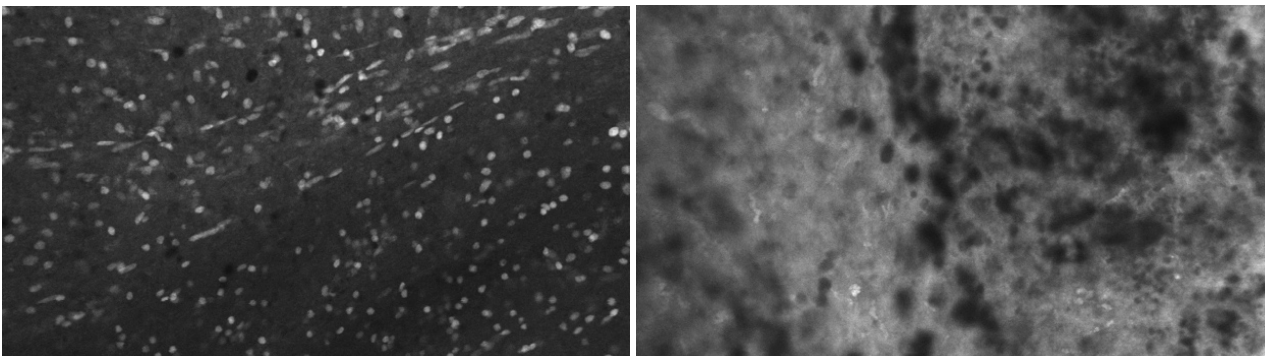
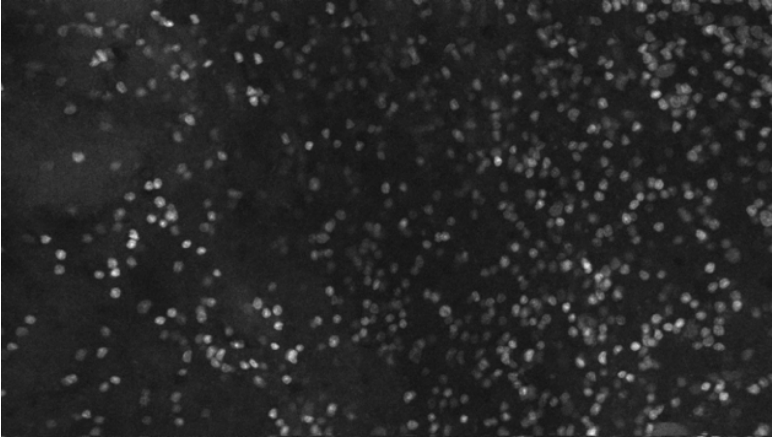


Abb. 24: Pineozytom, ZNS WHO Grad 1, mit Acriflavin (links: topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und Natriumfluorescein (rechts: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bild, eigene Aufnahme)

Tumorfreie Proben

Cerebellum, tumorfrei



Tumorfrees Kleinhirn ist zellreich und hat monomorphe, runde Zellkerne, hier passend zum Stratum granulosum der Kleinhirnrinde (s. Abb. 25).

Abb. 25: Kleinhirn, Färbung mit Acriflavin
(topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Quergestreifte Skelettmuskulatur, tumorfrei

Mit Acriflavin sind einzelne Muskelfasern, die Z-Streifung der Skelettmuskulatur und randständige, ovaläre Zellkerne (s. Abb. 26, blaue Pfeilmarkierung) deutlich erkennbar.

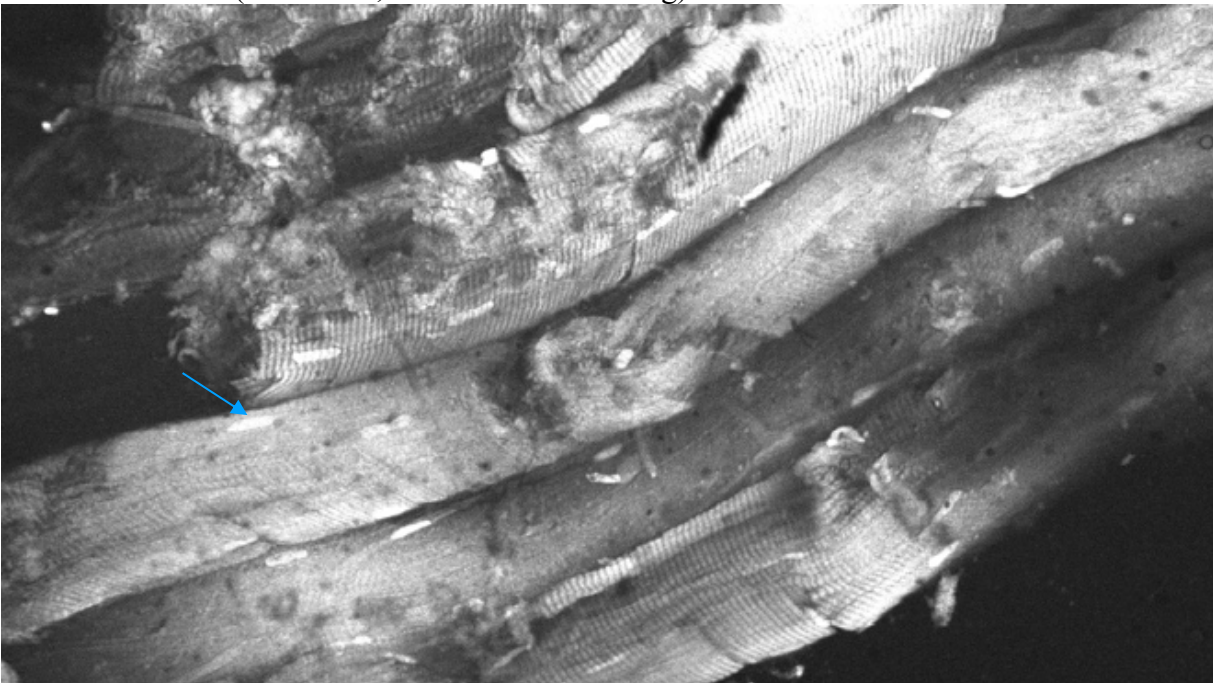


Abb. 26: Quergestreifte Skelettmuskulatur, Färbung mit Acriflavin (blaue Pfeilmarkierung: Zellkern, exemplarisch)
(topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Formalinfixierung

Die konfokalen Bilder von fixierten und von nicht-fixierten Proben unterscheiden sich nicht.

Weitere Untersuchungen

Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3, ungefärbte Negativkontrolle

Ungefärbte Negativkontrollen weisen eine in der CLE detektierbare Autofluoreszenz auf, die aufgrund eines geringen Ausmaßes vernachlässigbar ist. Insbesondere fallen Granula im Zytoplasma bei einem ungefärbten Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3 auf (s. Abb 27).

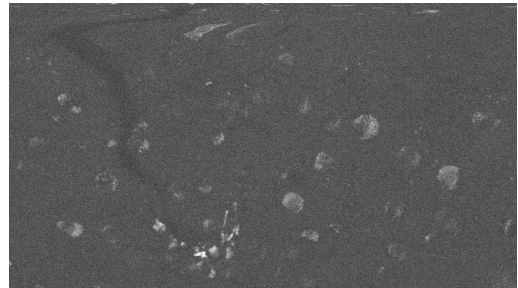
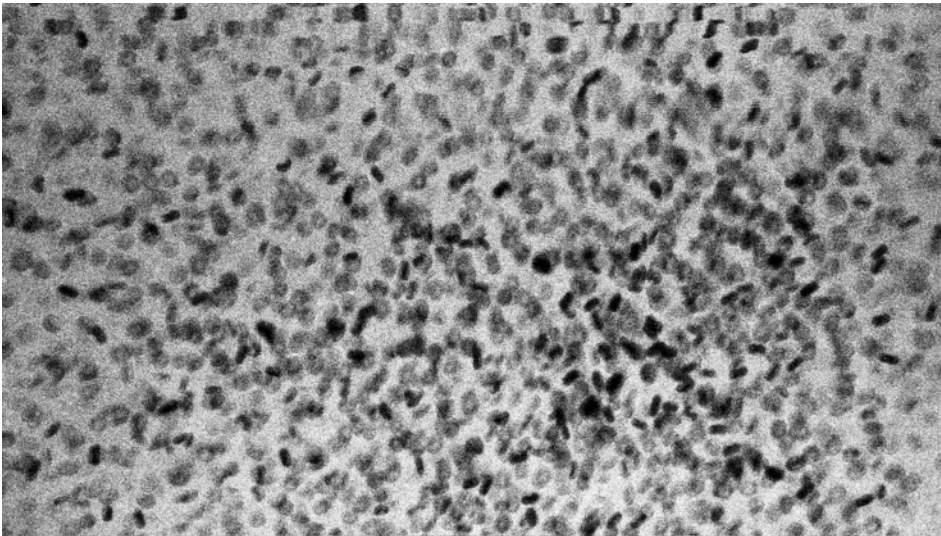


Abb. 27: Ungefärbte Negativkontrolle mit Autofluoreszenz

(Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3) (ungefärbtes Gewebe, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Erythrozyten, Färbung mit Natriumfluorescein



Mit 20µl Natriumfluorescein gefärbte Erythrozyten sind eindeutig als signalärmere Strukturen vor einem helleren Hintergrund sichtbar, der womöglich durch Farbrückstände fluoresziert (s. Abb. 28).

Abb. 28: Erythrozyten vor fluoreszierendem Hintergrund (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

5.1.3. Immunhistochemische Färbungen mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate

Nach Färbung einer Glioblastomprobe mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate sind Strukturen sichtbar, die gut zu Gefäßproliferaten passen (s. Abb. 29).

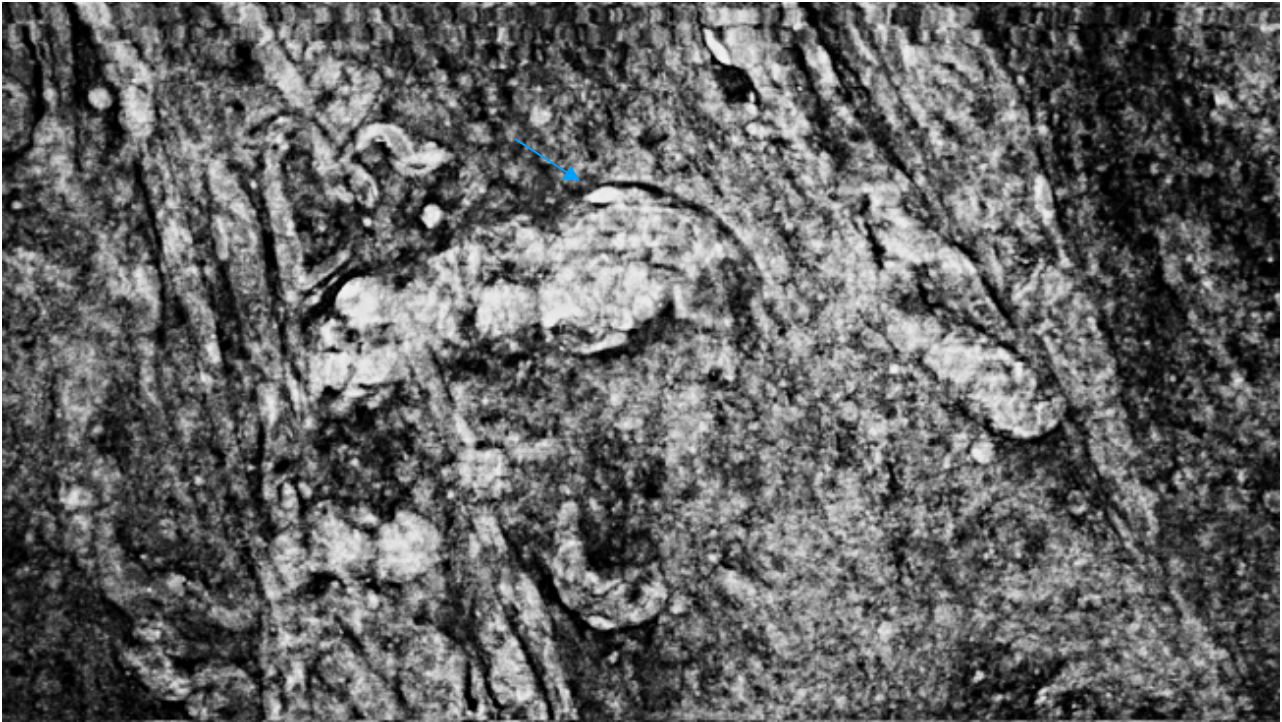


Abb. 29: Gefäßproliferate (blaue Pfeilmarkierung) eines EGFR-überexprimierenden Glioblastoms (immunhistochemische Färbung mit dem an Natriumfluorescein gekoppelten monoklonalen IgG Anti-EGFR-Antikörper (neutralizing), clone LA1, Alexa Fluor® 488 conjugate (mouse), CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Bei der Färbung der Glioblastomzelllinie LN18 und eines Oligodendroglioms mit dem fluoreszierenden Anti-EGFR-Antikörper war kein Signal mit dem Digital Biopsy Tool CONVIVO® registrierbar.

5.2. Auswertung der klinischen Pilotstudie

Zielsetzung der Pilotstudie mit der CLE in der Neurochirurgie

Die CLE wurde z. T. nach intravenöser Gabe von Natriumfluorescein in der Neurochirurgie angewendet. Die CLE war gut in den Ablauf neurochirurgischer Operationen integrierbar. Es wurde eine Datenbank mit insgesamt 4439 histologischen Bildern (12,99 GB) erstellt, die ausgewertet wurden, aus denen im Folgenden exemplarisch konfokale Bilder gezeigt werden. Es traten deutlich weniger Artefakte als bei den topischen Versuchen auf, jedoch wurde auch bei *ex vivo* entstandenen Bildern eine Vorauswahl an verwertbaren Bildern getroffen. Die CLE eignete sich für die intraoperative Diagnostik. Somit wurde das Ziel der klinischen Pilotstudie erreicht. Zudem war eine Differenzierung zwischen Tumorzentrum und Infiltrationszone bei einem Glioblastom möglich (s. Abb. 30).

Beobachtete variierende Faktoren

Es gab drei variierende Faktoren, darunter die Einwirkzeit von Natriumfluorescein, die Durchführung eines intraoperativen Gefrierschnitts und die Anwendung von 5-ALA. Die Einwirkzeit von Natriumfluorescein zwischen intravenöser Injektion bis zur Entnahme der ersten Tumorprobe betrug im Durchschnitt 18 Minuten. Ein weiterer Faktor war die Durchführung eines intraoperativen Gefrierschnitts. Bei 18 Patienten (82% der Patienten) wurde ein intraoperativer Gefrierschnitt durchgeführt. In diesen Fällen entsprach die intraoperative Diagnose anhand des Gefrierschnitts der endgültigen Diagnose am FFPE-Schnitt zu 99,94%. Bei der gleichzeitigen Anwendung von 5-ALA zur Erleichterung der Neuronavigation und Natriumfluorescein für die CLE von hochgradigen Gliomen wurde weder die Neuronavigation noch die Qualität der konfokalen Bilder mit der CLE beeinträchtigt.

Nebenwirkungen bei intravenöser Administration von Natriumfluorescein

Neben einer intraoperativen Gelbfärbung des Urins bei allen Patienten wurden keine weiteren Nebenwirkungen durch die Natriumfluoresceingabe beobachtet.

Ergebnisse der Pilotstudie

Als Vorbereitung für zukünftige Resektionsrandkontrollen wurden Proben der Infiltrationszone mit Proben des Tumorzentrums verglichen. Hierbei imponiert das Tumorzentrum (s. Abb. 30, links) deutlich zellreicher mit sichtbaren Gefäßproliferaten im Gegensatz zur zellärmeren Infiltrationszone (s. Abb. 30, rechts). Zudem ist im Tumorzentrum ein Gefäßproliferat mit intravasalem Natriumfluorescein sichtbar (s. Abb. 30, links, blaue Pfeilmarkierung).

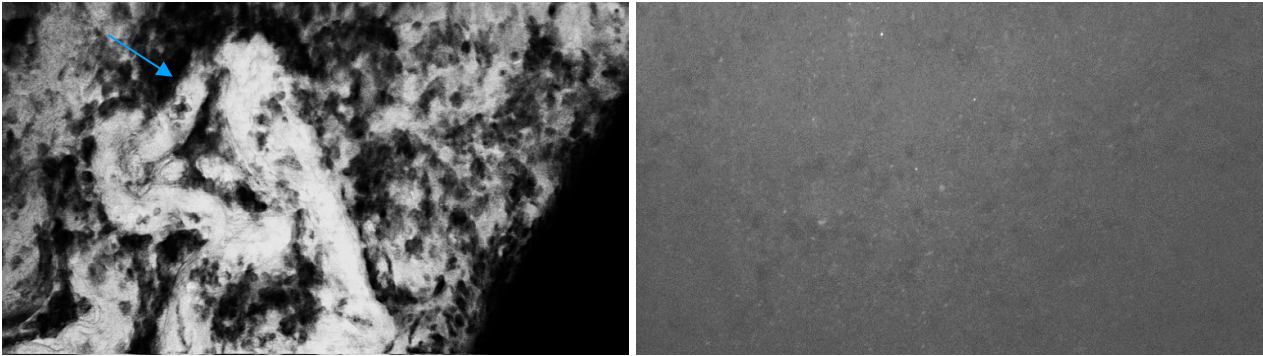


Abb. 30: Vergleich zwischen Tumorzentrum (links) und Infiltrationszone (rechts) eines Glioblastom mit dem Digital Biopsy Tool CONVIVO® (blaue Pfeilmarkierung: Gefäßproliferat im Glioblastom)
(intraoperative intravenöse Administration von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung ex vivo, eigene Aufnahmen)

(linkes Bild: eigene Aufnahme, für Webzwecke der ZEISS Gruppe auch zu sehen auf <https://www.zeiss.ch/meditec/produkte/neurochirurgie/digitales-biopsietool/convivo.html>, aufgerufen am 21.11.2022)

Im postoperativen Vergleich der verschiedenen Mikroskopiermethoden (darunter intraoperativer Gefrierschnitt, endgültige Histologie am HE-gefärbten FFPE-Schnitt und Digital Biopsy Tool CONVIVO®) gibt es Übereinstimmungen der CLE mit den konventionellen lichtmikroskopischen Untersuchungsmöglichkeiten (s. Abb. 31.1-3).

Wie bei der Vorarbeit im Labor wurde aufgrund von Artefakten eine Vorauswahl der Bilder durchgeführt. Bei der intravenösen Gabe von Natriumfluorescein kam es seltener zu Artefakten als bei der topischen Färbung.

Glioblastom, ZNS WHO Grad 4

CLE

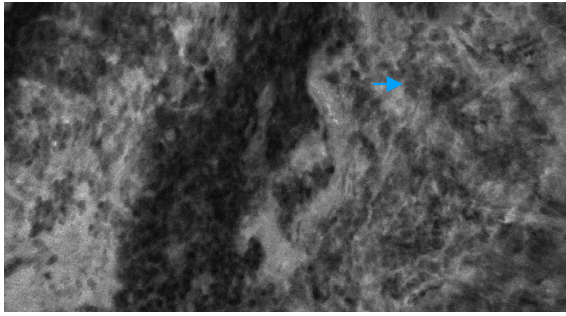
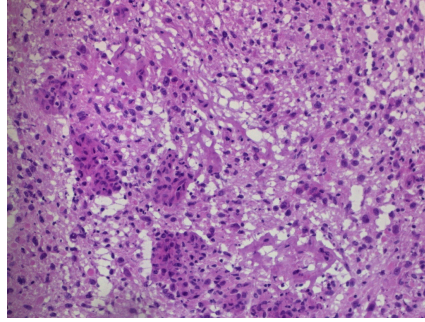
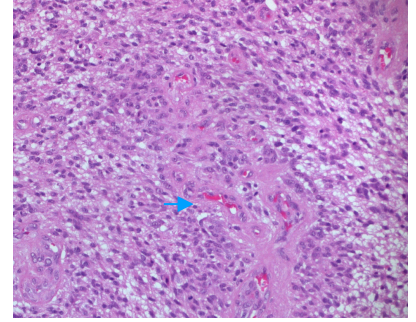


Abb. 31.1

Gefrierschnitt



FFPE-Schnitt



Metastase, Rektumkarzinom

CLE

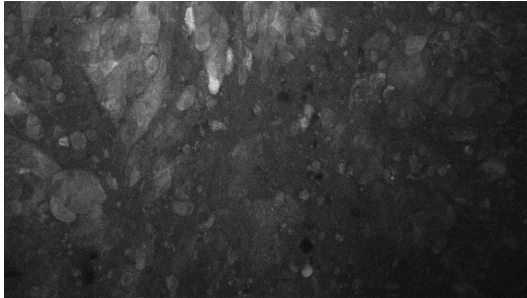
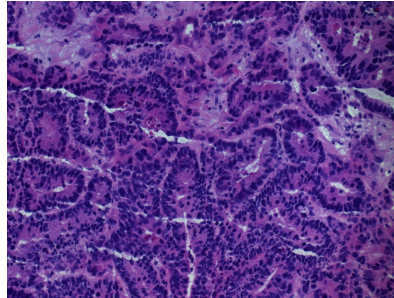
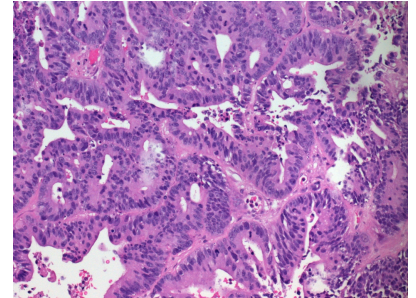


Abb. 31.2

Gefrierschnitt



FFPE-Schnitt



Psammomatöses Meningeom, ZNS WHO Grad 1

CLE

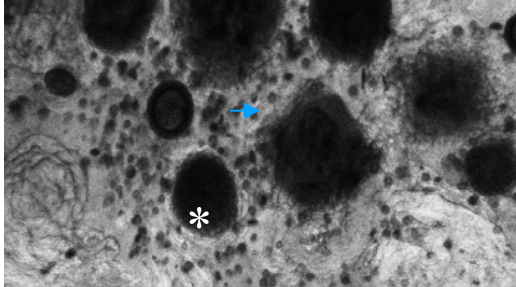
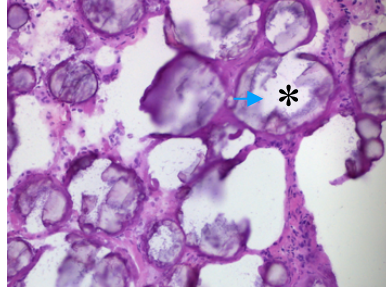


Abb. 31.3

Gefrierschnitt



FFPE-Schnitt

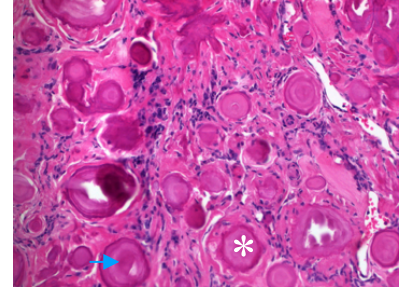


Abb. 31: Vergleich von histomorphologischen Charakteristika in der CLE mit dem HE-gefärbten intraoperativen Gefrierschnitt und dem HE-gefärbten FFPE-Schnitt

(jeweils linke Aufnahmen in Abb. 31.1-31.3: intravenöse intraoperative Farbstoffadministrations von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen; jeweils mittlere und rechte Aufnahmen in Abb. 31.1-31.3: HE-Färbungen, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahmen).

Ein Teil der Abbildung 31.1. ist für Webzwecke der ZEISS Gruppe auch zu sehen auf <https://www.zeiss.ch/meditec/produkte/neurochirurgie/digitales-biopsietool/convivo.html>, aufgerufen am 21.11.2022.

Gefäßproliferate sind bei einem Glioblastom, ZNS WHO Grad 4, durch die direkte Färbung des Intravasalraums nach der intravenösen Natriumfluoresceingabe gut sichtbar (s. Abb. 31.1, linkes Bild, Pfeilmarkierung). Diese Abbildung (Abb. 31.1, linkes Bild) entstand nach einer Einwirkzeit von Natriumfluorescein von 2 Minuten - passend zu einer guten Tumordurchblutung durch eine Neovaskularisation des Glioblastoms.

Bei einer Rektumkarzinommetastase (s. Abb. 31.2, linkes Bild) und einer Caecumkarzinommetastase (s. Abb. 32) ist eine maligne epitheliale Neoplasie mit irregulär geformten, vergrößerten Zellen sichtbar.

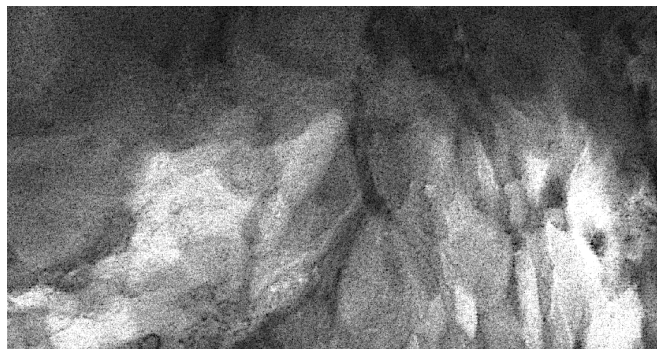
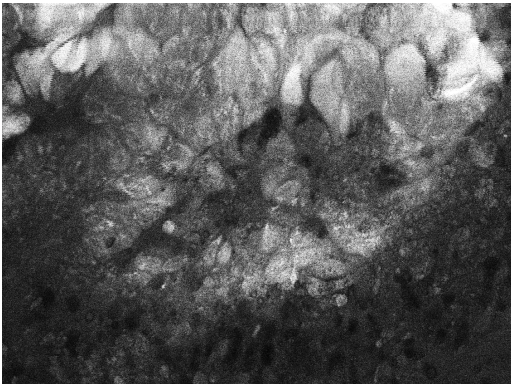
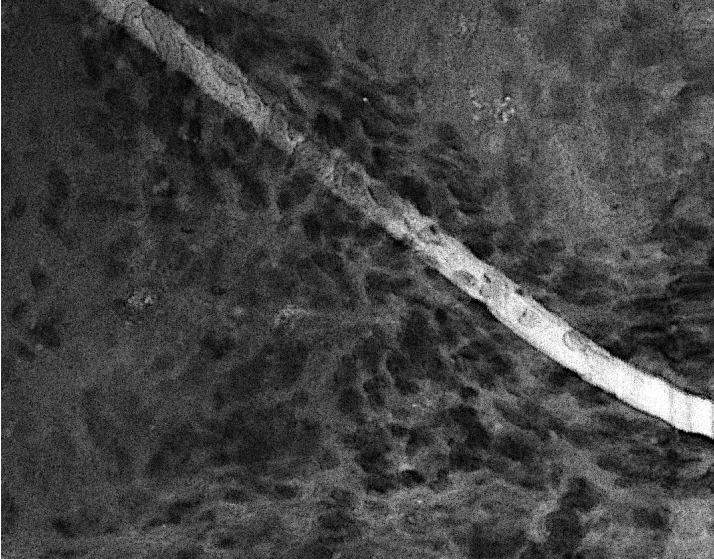


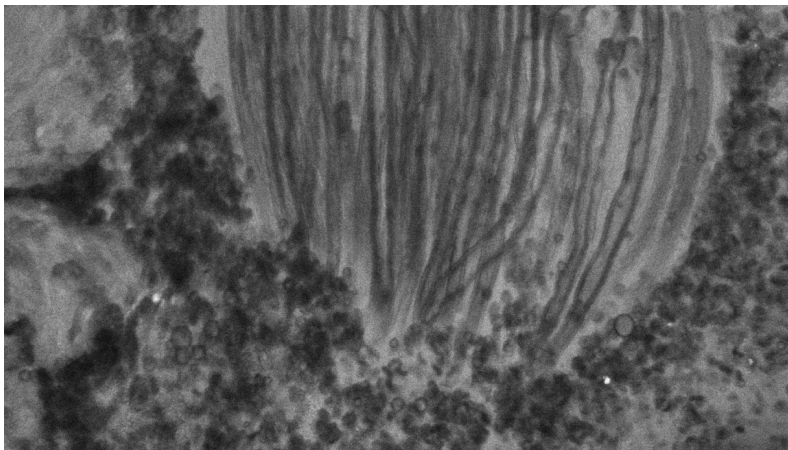
Abb. 32: Metastase eines Caecumkarzinoms (intravenöse intraoperative Farbstoffadministrationen von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Ein psammomatöses Meningeom, ZNS WHO Grad 1, zeigt sich als mäßig zellreicher Tumor mit rundlichen bis ovalären Zellkernen und zahlreichen sog. Psammomkörperchen mit ausreichender Anfärbung bei einer vergleichsweise langen Einwirkzeit von Natriumfluorescein von 45 Minuten (s. Abb. 31.3).



Bei einer arteriovenösen Malformation sind Blutgefäße mit intravasaler Anreicherung von Natriumfluorescein und zellulären Blutbestandteile zu sehen (s. Abb. 33).

Abb. 33: Arteriovenöse Malformation (intravenöse intraoperative Farbstoffadministrationen von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)



Bei einem Neurofibrom, ZNS WHO Grad 1 ist ein mäßig zellreicher Schwannzelltumor mit einem lockeren, von kollagenen Fasern durchzogenem Stroma sichtbar (s. Abb. 34).

Abb. 34: Neurofibrom, ZNS WHO Grad 1 (intravenöse intraoperative Farbstoffadministrationen von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Beim Ewing-Sarkom ist ein klein-rundzelliger Tumor von hoher Zelldichte sichtbar, der in soliden Verbänden vorliegt und in der CLE eine mutmaßliche Mitose aufweist (s. Abb. 35, blaue Pfeilmarkierung).

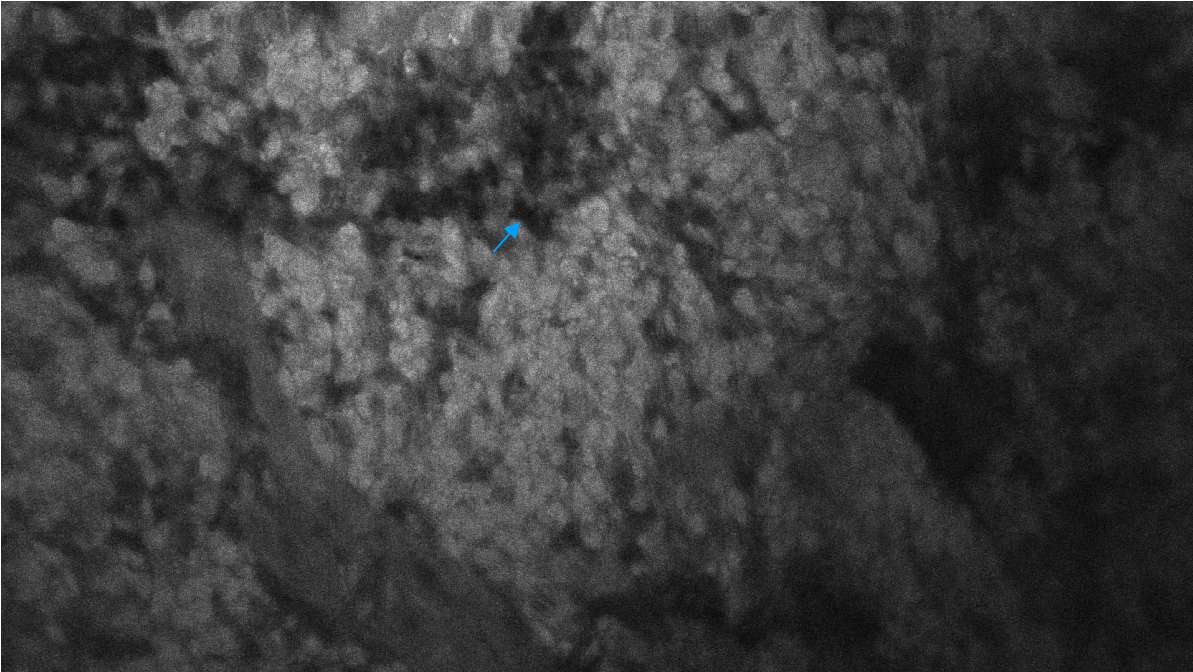


Abb. 35: Ewing-Sarkom (blaue Pfeilmarkierung: mutmaßliche Mitose) (intravenöse intraoperative Farbstoffadministrationen von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

5.3. Auswertung von Implementationsprozessen anhand des CFIR

Die Implementationsprozesse im Rahmen der Einführung der CLE in die Neurochirurgie wurden anhand des CFIR untersucht. Die Bereiche des CFIR aus der Veröffentlichung von Damschroder et al. wurden übersetzt und auf die vorliegende klinische Pilotstudie angewendet (s. Tabelle 4) (Damschroder et al., 2022).

Name des Konstruktes*	Definition des Konstruktes*	Anwendung der Konstrukte auf die Implementation der CLE im Rahmen der klinischen Pilotstudie
I. Bereich Innovation		
A. Innovationsquelle	Die Gruppe, die die Innovation entwickelt und/oder offensichtlich die Anwendung der Innovation gesponsert hat, ist seriös, glaubwürdig und/oder vertrauenswürdig	Entwicklung des Digital Biopsy Tool Convivo® durch die ZEISS Gruppe / Carl Zeiss Meditec AG
B. Evidenzbasierung der Innovation	Es gibt handfeste Evidenz, die die Effektivität der Innovation unterstützt	Publikationen zur Anwendung der ex vivo und in vivo CLE für Hirntumore
C. Relativer Vorteil der Innovation	Die Innovation ist besser als andere verfügbare Innovationen oder als die aktuelle Praxis	Vorteile der CLE gegenüber dem intraoperativen Gefrierschnittverfahren: <ul style="list-style-type: none"> • Schnellere intraoperative Diagnostik • Vermeidung von Gefrierschnittartefakten • Zeitliche und örtliche Unabhängigkeit vom Gefrierschnittlabor
D. Anpassungsfähigkeit der Innovation	Die Innovation kann für den lokalen Kontext oder Bedürfnisse modifiziert, angepasst oder verfeinert werden	Keine Daten
E. Testbarkeit der Innovation	Die Innovation kann im kleinen Rahmen getestet oder gesteuert werden und rückgängig gemacht werden	Präklinische Testphase im neuropathologischen Labor vor der klinischen Pilotstudie
F. Komplexität der Innovation	Die Innovation ist kompliziert, was aus dem Umfang und/oder der Art und Anzahl von Verbindungen und Schritten hervorgehen kann	Erhöhte Komplexität bei Auswertung der konfokalen Bilder Reduktion der Arbeitsschritte im Vergleich mit der Gefrierschnittdiagnostik (Fotteler et al., 2021)
G. Design der Innovation	Die Innovation ist gut entworfen und verpackt, auch	Nicht ausreichend am Prototyp des Digital Biopsy Tool Convivo® beurteilbar

	was Aufbau, Verpackung und Präsentation betrifft	
H. Innovationskosten	Die Kosten von Anschaffung und Inbetriebnahme der Innovation sind bezahlbar	Leihgabe des Digital Biopsy Tool Convivo® der Carl Zeiss Meditec AG der ZEISS Gruppe für den Zeitraum der präklinischen Testphase und der klinischen Pilotstudie

II. Bereich externes Umfeld

A. Entscheidende Ereignisse	Große und/oder unvorhergesehene Ereignisse stören die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation	Verlängerung des Zeitraums bis zur Zulassung des ZEISS Sterile Sheath und Verzögerung einer <i>in vivo</i> Studie
B. Lokale Überzeugungen	Soziokulturelle Werte (z. B. gemeinsame Verantwortung, Empfängern zu helfen) und Überzeugungen (Überzeugungen bezüglich des Werts von Empfängern) ermutigen das externe Umfeld, die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation zu unterstützen	Gemeinsames Ziel der kontinuierlichen Behandlungsoptimierung von Patienten
C. Lokale Bedingungen	Ökonomische, ökologische, politische und/oder technologische Bedingungen ermöglichen dem externen Umfeld, die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation zu unterstützen	<p>Ökonomisch s. I.H.</p> <p>Ökologisch Keine Daten</p> <p>Politisch</p> <ul style="list-style-type: none"> • Annahme des Studienprotokolls und Erlaubnis zur Durchführung einer klinischen Pilotstudie • Fehlende Zulassung des ZEISS Sterile Sheath und Verzögerung einer <i>in vivo</i> Studie
D. Kooperationen	Das interne Umfeld ist mit externen Netzwerken, inklusive Referenznetzwerken und universitären und	Austausch mit Forschungsgruppen anderer Universitäten im Rahmen von ZEISS Anwendertreffen

	professionellen Organisationen verbunden	
E. Rechtliche Rahmenbedingungen	Gesetzgebung, Regulierungen, berufliche Richtlinien und Empfehlungen oder Akkreditierungsstandards unterstützen die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation	Fehlende Zulassungen <ul style="list-style-type: none"> • Off-Label-Use: intravenöse Administration von Natriumfluorescein für die CLE • Keine Zulassung zur Anwendung von Acriflavin am Patiententem • Keine Zulassung des ZEISS Sterile Sheath Ethikantrag Stellen eines Antrags und Erhalt der Genehmigung durch die Ethikkommission zur Durchführung der klinischen Pilotstudie
F. Finanzierung	Externe Finanzierung (z. B. Stipendien, Rückerstattungen) sind für die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation verfügbar und/oder technische Bedingungen ermöglichen die Implementation	s. I.H.
G. Externer Druck	Externer Druck befördert die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation	
1. Sozialer Druck	Massenmediale Kampagnen, Interessensgruppen oder soziale Bewegungen oder Proteste befördern die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation	Nicht relevant
2. Wettbewerbsdruck	Wettbewerb mit/oder Nachahmung von Kollegen befördern die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation	Kein Wettbewerbsdruck mit anderen Anwendern des Digital Biopsy Tool Convivo®

3. Druck durch Leistungserfassung	Qualität oder Eckdatenerfassung oder etablierte Leistungsziele befördern die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation	Keine Daten
III. Bereich internes Umfeld		
A. Strukturelle Eigenschaften	Infrastrukturelle Komponenten unterstützen die funktionstüchtige Leistung des internen Umfelds	Keine Daten
1. Örtliche Infrastruktur	Gestaltung und Struktur des Raumes und von anderen konkreten materiellen Merkmalen unterstützen die funktionstüchtige Leistung des internen Umfelds	Möglichkeit der intraoperativen Verwendung des Digital Biopsy Tool Convivo® im OP
2. Digitale Infrastruktur	Technologische Systeme für Telekommunikation, elektronische Dokumentation, Datenspeicherung, Management, Berichterstattung und Analyse unterstützen die funktionstüchtige Leistung des internen Umfelds	Telekommunikation Keine Möglichkeit zur digitalen Korrelation von konfokalen Bildern und intraoperativem Gefrierschnitt Elektronische Dokumentation und Datenspeicherung Pseudonymisierte Speicherung der konfokalen Bilder
3. Arbeitsinfrastruktur	Organisation von Aufgaben und Verantwortlichkeiten innerhalb und zwischen Individuen und Teams and allgemeiner Personalbestand unterstützen die funktionstüchtige Leistung des internen Umfelds	Abteilung für Neuropathologie Oberärztliche Leitung, Assistenzarzt, Doktorand Abteilung für Neurochirurgie Chefarzt, Leitender Oberarzt, Oberärzte, Assistenzärzte, Operationstechnische Assistenten
B. Kooperationen	Hochqualitative formelle und informelle Beziehungen, Kooperationen und Teams innerhalb und zwischen den Grenzen des internen Umfelds (z. B. strukturell, professionell)	Klinikinterne Kooperationen zwischen der Neurochirurgie und der Neuropathologie

C. Kommunikation	Vorhandensein von hochqualitativen formellen und informellen Vorgehensweisen für das Mitteilen von Informationen innerhalb und zwischen den Grenzen des internen Umfelds (z. B. strukturell, professionell)	Innerhalb der Abteilung für Neuropathologie <ul style="list-style-type: none"> • Persönliche Rücksprachen sowie telefonische Korrelation der konfokalen Bilder mit dem intraoperativen Gefrierschnitt • Fehlen einer Klinik übergreifenden Nachrichtenplattform • Keine digitale Übertragung der konfokalen Bilder aus dem OP in die Neuropathologie Interdisziplinär Persönliche, telefonische und schriftliche Rücksprachen zwischen der Neuropathologie und der Neurochirurgie sowie mit beteiligten Anästhesisten
D. Kultur	Vorhandensein von gemeinsamen Werten, Überzeugungen und Normen innerhalb des internen Umfelds	Keine Daten
1. Fokussierung auf Gleichberechtigung	Vorhandensein von gemeinsamen Werten, Überzeugungen und Normen bezüglich des gleichen innewohnenden Werts aller menschlichen Lebewesen	Keine Daten
2. Fokussierung auf Empfänger	Vorhandensein von gemeinsamen Werten, Überzeugungen und Normen bezüglich des Wohls, der Unterstützung, und der Adressierung von Bedürfnissen der Empfänger	Gemeinsames Ziel der kontinuierlichen Behandlungsoptimierung von Patienten
3. Fokussierung auf Durchführer	Vorhandensein von gemeinsamen Werten, Überzeugungen und Normen bezüglich des Wohls, der Unterstützung, und der	Keine Daten

	Adressierung von Bedürfnissen von Durchführern	
4. Fokussierung auf Lernen	Vorhandensein von gemeinsamen Werten, Überzeugungen und Normen bezüglich der psychologischen Sicherheit, der stetigen Verbesserung und der Verwendung von Daten, um zu informieren	Gemeinsames Ziel der stetigen Optimierung der Behandlung von Hirntumoren
E. Veränderungsbedarf	Die aktuelle Situation ist intolerabel und muss sich ändern	Veränderungsbedarf bei bereits angesprochenen Nachteilen des intraoperativen Gefrierschnittverfahrens
F. Kompatibilität	Die Innovationen ist mit Arbeitsabläufen, Systemen und Prozessen kompatibel	<p>Gute Kompatibilität</p> <ul style="list-style-type: none"> • Keine Beeinflussung des Arbeitsablaufs im OP • Kompatibilität bei gleichzeitiger Verabreichung von 5-ALA und Natriumfluorescein bei ZNS WHO Grad 3 oder 4 Gliomen <p>Schlechte Kompatibilität Bei zukünftigen <i>ex vivo</i> Studien m Fall von sehr kleinen Tumorproben ggf. aus Gründen der diagnostischen Sicherheit keine CLE zusätzlich zur konventionellen Routinediagnostik durchführbar</p>
G. Relative Priorität	Die Implementation und das Durchführen der Implementation ist im Vergleich zu anderen Initiativen wichtig	Keine Daten zum Vergleich mit anderen Studien
H. Anreize	Materielle und/oder nicht materielle Anreize und Belohnungen und/oder Abschreckmittel und Bestrafungen unterstützen die	Interesse an Pionierforschung

	Implementation und/oder die Durchführung der Innovation	
I. Kohärenz des Projekts	Die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation ist kohärent mit der übergreifenden Verpflichtung, dem Zweck oder den Zielen des internen Umfelds	CLE als Technologie für die Optimierung der mikroskopischen Resektionsrandkontrolle in der Neurochirurgie
J. Verfügbare Ressourcen	Ressourcen sind vorhanden, um die Innovation zu implementieren und durchzuführen	
1. Finanzierung	Finanzierung ist vorhanden, um die Innovation zu implementieren und durchzuführen	s. I.H.
2. Platz	Physischer Raum ist vorhanden, um die Innovation zu implementieren und durchzuführen	Präklinische Laborphase Vorhandensein von Laborräumlichkeiten Klinische Pilotstudie Genügend Platz für das Digital Biopsy Tool Convivo® und Lagerungsmöglichkeit im Operationstrakt
3. Material und Ausrüstung	Material ist vorhanden, um die Innovation zu implementieren und durchzuführen	Tumorproben Aufteilung der Proben: <ul style="list-style-type: none"> • Probenanteil für das Konfokale Laser Endomikroskop Convivo® • Probenanteil für den intraoperativen Gefrierschnitt • Probenanteil für endgültige Diagnostik am FFPE-Schnitt Farbstoff Natriumfluorescein Vorrätiges Arzneimittel im Klinikum rechts der Isar
K. Zugriff auf Wissen und Information	Beratung und/oder Training ist vorhanden, um die Innovation zu implementieren und durchzuführen	Neuartigkeit der Technologie und selbstständiges Erarbeiten der konfokalen Morphologie

IV. Bereich Individuen

Unterbereich Rollen		
A. Führungskräfte auf höchster Ebene	Individuen mit einem hohen Maß an Autorität, inklusive Entscheidungsträger, Führungskräfte und Direktoren	Klinik für Neurochirurgie Chefarzt, Leitender Oberarzt, Oberärzte Institut für Pathologie Institutsdirektor Abteilung für Neuropathologie Oberärztliche Leitung
B. Führungskräfte auf mittlerer Ebene	Individuen mit einem mittelhohen Maß an Autorität, inklusive Führungskräfte, die von einer Führungskraft auf höchster Ebene angewiesen werden und selbst auch andere anweisen	Klinik für Neurochirurgie Assistenzärzte Abteilung für Neuropathologie Assistenzarzt
C. Meinungsbildner	Individuen mit informellem Einfluss auf die Einstellungen und das Benehmen anderer	Keine Daten
D. Ermöglicher der Implementation	Individuen mit Fachwissen, die bei der Implementation mithelfen, sie betreuen oder unterstützen	s. IV. A.
E. Leitung der Implementation	Individuen, die die Bemühungen der Implementation der Innovation leiten	s. IV. A.
F. Mitglieder des Implementationsteams	Individuen, die mit der Leitung der Implementation kollaborieren und die Leitung der Implementation unterstützen, um die Innovation zu implementieren, idealerweise inklusive Durchführer und Empfänger der Implementation	Klinik für Neurochirurgie Chefarzt, Leitender Oberarzt, Oberärzte Assistenzärzte Operationstechnische Assistenten Abteilung für Neuropathologie Assistenzarzt Doktorand Klinik für Anästhesiologie Beteiligtes Personal
G. Weitere Unterstützung der Implementation	Individuen, die die Leitung der Implementation und/oder Mitglieder des Implementationsteams in der	/

	Implementierung der Innovation unterstützen	
H. Durchführer der Innovation	Individuen, die direkt oder indirekt die Innovation durchführen	s. IV. I.
I. Empfänger der Innovation	Individuen, die direkt oder indirekt die Innovation erhalten	Rekrutierte Patienten der klinischen Pilotstudie und zukünftige Patienten
Unterbereich Eigenschaften		
A. Bedarf	Individuen haben Defizite bezüglich Überleben, Wohlbefinden, oder persönlicher Erfüllung, mit der sich die Implementation und/oder die Durchführung der Innovation befasst	Verbesserungsbedarf für die mikroskopische Resektionsrandkontrolle von Hirntumoren (s. III.E)
B. Fähigkeit	Individuen haben zwischenmenschliche Kompetenzen, Wissen und Fähigkeiten, um ihrer Rolle gerecht zu werden	<i>Wissen und Fähigkeiten:</i> Klinik für Neurochirurgie Facharztausbildung für Neurochirurgie oder Weiterbildung Abteilung für Neuropathologie Facharztausbildung für Neuropathologie oder Weiterbildung bzw. Medizinstudium
C. Möglichkeit	Individuen haben die Fähigkeit, Möglichkeit und Kraft, um ihrer Rolle gerecht zu werden	Klinik für Neurochirurgie Keine Störung des operativen Ablaufs durch die <i>ex vivo</i> CLE Abteilung für Neuropathologie Einsetzung eines Doktorands für die Durchführung der Studie
D. Motivation	Individuen sind dazu verpflichtet, ihrer Rolle gerecht zu werden	Abteilung für Neuropathologie: Vertragliche Bindung über die TUM Graduate School zur Betreuung der Dissertation

V. Bereich Implementationsprozess

A. Zusammenarbeit	Gemeinsame Treffen, bewusstes Koordinieren und Zusammenarbeiten an gemeinsamen Aufgaben, um die Innovation zu implementieren	Regelmäßige persönliche, telefonische und schriftliche Absprachen zur Planung Koordination der CLE der zwischen der Neurochirurgie und Neuropathologie
B. Erfassung von Bedürfnissen	Informationen sammeln über Prioritäten, Präferenzen und Bedürfnisse von Personen	
1. Durchführer der Innovation	Informationen sammeln über Prioritäten, Präferenzen und Bedürfnisse der Durchführer, um die Implementation und die Durchführung der Innovation anzuleiten	Bereits bekannt
2. Empfänger der Innovation	Informationen sammeln über Prioritäten, Präferenzen und Bedürfnisse der Empfänger, um die Implementation und die Durchführung der Innovation anzuleiten	Bereits bekannt
C. Analyse des Umfelds	Informationen sammeln, um Erschwernisse und unterstützende Faktoren der Implementation und der Durchführung der Innovation zu identifizieren und einzuschätzen	Keine Daten
D. Planung	Rollen und Verantwortungsbereiche identifizieren, spezifische Schritte und Meilensteine umreißen und Ziele und Messmethoden für den Implementationserfolg im Voraus definieren	<p>Rollen und Verantwortungsbereiche <i>Neurochirurgie</i>: Tumorresektion <i>Neuropathologie</i>: Durchführung und Befundung der CLE</p> <p>Schritte <i>ex vivo</i> CLE und Vergleich mit etablierter Diagnostik</p> <p>Ziel</p>

		<p>Untersuchung der Eignung der <i>ex vivo</i> CLE für Hirntumore</p> <p>Messmethoden Vergleich der CLE mit intraoperativer Gefrierschnittdiagnostik und endgültiger Histologie am FFPE-Material</p>
E. Anpassung von Strategien	Implementationsstrategien wählen und operationalisieren, um Hindernisse und erleichternde Einflüsse anzugehen und das Umfeld anzupassen	Kein Bedarf zur Veränderung der Implementationsstrategien
F. Mitbeteiligung	Mitbeteiligung an der Implementation und/oder Innovation attraktiv machen und dazu ermutigen	Keine Daten
1. Durchführer der Innovation	Durchführer anziehen und ermutigen, beim Implementationsteam mitzuwirken und/oder die Innovation durchzuführen	Abteilung für Neuropathologie: Vorstellung der klinischen Pilotstudie im Rahmen von Lehrveranstaltungen der Technischen Universität München und Rekrutierung von Doktoranden für weitere <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> Studien
2. Empfänger der Innovation	Empfänger anziehen und ermutigen, beim Implementationsteam mitzuwirken und/oder an der Innovation teilzunehmen	Klinik für Neurochirurgie: Rekrutierung von Patienten für die klinische Pilotstudie
G. Durchführung	Implementierung in kleinen Schritten, Tests oder wechselnden Abläufen, um schrittweise die Durchführung der Innovation zu optimieren	Präoperative Testphase im neuropathologischen Labor
H. Reflektieren und Evaluieren	Quantitative und qualitative Informationen über den Erfolg der Implementation und/oder der Innovation sammeln und diskutieren	Vorliegende Implementationsevaluation

1. Implementation	Quantitative und qualitative Informationen über den Erfolg der Implementation sammeln und diskutieren	s.V.H.2.
2. Innovation	Quantitative und qualitative Informationen über den Erfolg der Innovation sammeln und diskutieren	<p>Intern in der Neuropathologie Regelmäßige Rückmeldungen zwischen Doktorand, Assistenzarzt und oberärztlicher Leitung</p> <p>Interdisziplinär Zwischen Neuropathologie und Neurochirurgie</p> <p>Mit externen Vertretern Regelmäßige Treffen mit Vertretern der Neurochirurgie, Neuropathologie und der Produktmanager der Carl Zeiss Meditec AG der ZEISS Gruppe</p>
I. Adaption	Die Innovation und/oder das interne Umfeld für eine Optimale Anpassung und Integration in Arbeitsabläufe verändern	Keine Durchführung einer Adaption

Tabelle 4: Übersetzung der Bereiche des CFIR und Anwendung auf die durchgeführte klinische Pilotstudie

* Die gesamte erste Spalte (*Name des Konstruktes*) und die gesamte zweite Spalte (*Definition des Konstruktes*) der Tabelle 4 sind Übersetzungen der Tabelle 3 (*Table 3 Updated CFIR domain and construct definitions*) aus der Publikation *The updated Consolidated Framework for Implementation Research based on user feedback* (Damschroder et al., 2022)

5.3.1. Bereich Innovation

Die in der Publikation *The updated Consolidated Framework for Implementation Research based on user feedback* vorgeschlagenen Konstrukte wurden auf die Implementation der CLE in die Klinik angewendet, wobei im Folgenden auf die wichtigsten Ergebnisse eingegangen wird (Damschroder et al., 2022).

Der erste Bereich des CFIR beleuchtet verschiedene Aspekte der Innovation selbst. Relevant für die vorliegende klinische Pilotstudie waren die *Innovationsquelle (I.A.)* und insbesondere die Untersuchung der auf *Evidenz der Innovation (I.B.)*, bezogen auf vorausgegangene Studien zur CLE. Es fiel auf, dass die Anwendung der CLE zu einem gewissen Grad evidenzbasiert war, da sich Studien zur Anwendung der CLE und auch des Digital Biopsy Tool Convivo® bei Hirntumorpatienten finden (s. Diskussion). Jedoch handelte es sich nicht um eine etablierte Technologie, die standardmäßig in der Neurochirurgie eingesetzt wird.

Ein weiterer bedeutender Punkt für die Implementationsevaluation war der *Relative Vorteil durch die Innovation (I.C.)*, da die CLE gegenüber dem intraoperativen Gefrierschnittverfahren mehrere Vorteile bietet, darunter eine schnellere intraoperative Diagnostik, die Vermeidung von Gefrierschnittartefakten und die zeitliche und örtliche Unabhängigkeit vom Gefrierschnittlabor (s. Diskussion).

Aufgrund der Neuartigkeit der CLE war die *Testbarkeit der Innovation (I.E.)* ein weiterer wichtiger Bereich für die Implementationsanalyse. So konnte der klinischen Pilotstudie eine präklinische Laborphase vorausgehen.

Die *Komplexität der Innovation (I.F.)* bestand in der Auswertung der konfokalen Bilder. Hier konnte auf die erstellte Datenbank aus der präklinischen Testphase zurückgegriffen werden.

5.3.2. Bereich externes Umfeld

Vor der klinischen Pilotstudie Studie war die unvorhergesehene Verzögerung der Zulassung des ZEISS Sterile Sheath bedeutend, was unter die Kategorie *Entscheidende Ereignisse (II.A.)* fällt. Hierdurch musste die eigentlich früher geplante *in vivo* Studie verschoben werden. In der vorliegenden Studie durften aus rechtlichen Gründen nur *ex vivo* Analysen durchgeführt werden.

Lokale Überzeugungen (II.B) bezüglich des offensichtlichen gemeinsamen Ziels der kontinuierlichen Behandlungsoptimierung von Patienten wurden von allen beteiligten Ärzten geteilt.

Hinsichtlich *Kooperationen (II.D)* mit anderen Universitäten bestand im Rahmen eines ZEISS Anwendertreffens die Möglichkeit zum Austausch mit Forschungsgruppen anderer deutscher Universitäten und zum Vergleich von Ergebnissen.

Rechtliche Rahmenbedingungen (II.E) spielten eine große Rolle für die vorliegende Studie: Nicht nur für das *Zeiss Sterile Sheath*, sondern auch für eine intravenöse Anwendung von Natriumfluorescein im Rahmen der CLE fehlten die Zulassung, sodass dieser Farbstoff als Off-Label-Use verwendet wurde (s. Diskussion). Acriflavin, das im Labor durch die Anfärbung des Zellkerns hilfreich für die Orientierung war, durfte aufgrund der fehlenden Zulassung im OP nicht eingesetzt werden.

5.3.3. Bereich internes Umfeld

Der dritte Bereich beleuchtet das interne Umfeld. Für die Implementation der CLE ist die *Digitale Infrastruktur (III.A.2)* von Bedeutung. Da ein Internetanschluss des Digital Biopsy Tool Convivo® und ein WLAN-Signal im OP fehlten, bestand keine Möglichkeit zur digitalen Korrelation des intraoperativen Gefrierschnitts mit den konfokalen Bildern anhand von Screensharing.

Die *Kommunikation (III.C.)* fand innerhalb der Abteilung für Neuropathologie mündlich durch tägliche persönliche ärztliche Rücksprachen statt. Teilweise wurde eine telefonische Rücksprache zum Vergleich der diagnostischen Ergebnisse im Gefrierschnitt mit den konfokalen Bildern während des Mikroskopierens durchgeführt.

Begleitend zur Studie fanden regelmäßig interdisziplinäre Konferenzen mit Vertretern der Neurochirurgie und Neuropathologie sowie der Carl Zeiss Meditec AG der ZEISS Gruppe statt. Hier wurden Zwischenergebnisse vorgestellt und konfokale Bilder mit konventionellen histologischen Methoden (intraoperativer Gefrierschnitt und FFPE-Schnitt) verglichen. Die intraoperative Durchführung der CLE war durch die Einbindung Personal verschiedener Fachgebiete (Neuropathologie, Neurochirurgie und Anästhesie) komplex. Präoperativ wurde Personal aus der Anästhesie über den Ablauf der Studie, mögliche Nebenwirkungen des Farbstoffs Natriumfluorescein und über den Zeitpunkt informiert, zu dem es intravenös gegeben werden sollte. Dies nahm durch wechselndes Personal, das präoperativ in die Prozesse der CLE eingelernt werden musste, zusätzlich Zeit ein.

Die *Fokussierung auf Empfänger (III.D.2.)*, bezog sich in der klinischen Pilotstudie auf die Patienten, deren Behandlung verbessert werden sollte.

Hierbei gibt es einen *Veränderungsbedarf (III.E)* bezüglich der optimalen histologischen Resektionsrandkontrolle von Hirntumoren.

Die CLE war mit den Arbeitsabläufen im OP kompatibel: So gab es keine Beeinflussung der neurochirurgischen Resektion bei den *ex vivo* Versuchen. Es wurde auch keine wechselseitige Beeinflussung bei einer gleichzeitigen Gabe von 5-ALA und Natriumfluorescein beobachtet. Somit wurde die etablierte makroskopische Resektionskontrolle nicht gestört. Im Fall von sehr kleinen Proben wäre die Durchführung der *ex vivo* CLE wahrscheinlich nicht möglich gewesen, da die ganze Probe für den intraoperativen Gefrierschnitt und die endgültige Diagnostik aufbewahrt werden müsste. In dieser Studie stand bei jeder Operation genügend Gewebe für die CLE und die konventionellen Untersuchungen zur Verfügung.

Material und Ausrüstung (III.J.3.) für die Durchführung der Implementation war vorhanden: So wurden die Tumorproben aufgeteilt: Zunächst wurden Proben für die etablierte histologische Diagnostik (intraoperativer Gefrierschnitt und endgültige Histologie am FFPE-Schnitt) in die Pathologie versandt. Weiteres Tumorgewebe, das für die Diagnostik nicht benötigt wurde, wurde für die CLE verwendet.

5.3.4. Bereich Individuen

Der Bereich *Individuen (IV.)* beschäftigt sich mit an der Durchführung der Implementation beteiligten Personen und deren Aufgaben (*Unterbereich Rollen*). Im Kern des Implementationsteams waren sog. *Führungskräfte höchster Ebene* bzw. *Ermöglicher der Implementation*, darunter Chefarzt, leitender Oberarzt und Oberärzte der Neurochirurgie sowie oberärztliche Leitung der Neuropathologie. Weitere wichtige Mitglieder für die Durchführung der Implementation waren Oberärzte und Assistenzärzte der Neurochirurgie und Neuropathologie (sog. *Führungskräfte mittlerer Ebene*) und ein medizinischer Doktorand. Daneben gab es weitere, in einem geringeren Ausmaß mitbeteiligte Mitglieder des Implementationsteams aus der Anästhesie und Operationstechnische Assistenten.

Empfänger der Innovation (IV.I.) waren rekrutierte Patienten der klinischen Pilotstudie. Indirekt zählen hierzu auch zukünftige geeignete neurochirurgische Patienten, die zukünftig von einer Etablierung der CLE profitieren könnten.

Der Unterbereich *Eigenschaften* beleuchtet Aspekte der beteiligten Individuen. Wie einleitend beschrieben, und wie im Bereich *Veränderungsbedarf (III.C.E.)* erläutert, besteht Verbesserungsbedarf in der intraoperativen mikroskopischen Diagnostik von Hirntumorpatienten.

Die *Fähigkeit (IV.B. - Unterbereich Eigenschaften)* der Individuen zur Durchführung der Implementation sind durch die jeweiligen beruflichen Rollen gewährleistet, die für beteiligte Ärzte aus der Neurochirurgie und Neuropathologie ein abgeschlossenes Medizinstudium und eine Facharzt Ausbildung oder eine laufende Facharztweiterbildung voraussetzt. Voraussetzung für den Doktoranden war ein Medizinstudium im klinischen Abschnitt.

Es bestand die *Möglichkeit (IV.C. - Unterbereich Eigenschaften)*, die klinische Pilotstudie parallel zum Arbeitsalltag in der Neurochirurgie durchzuführen, da die *ex vivo* CLE in den Operationsablauf integrierbar war. Seitens der Neuropathologie wurde ein Doktorand für das Mikroskopieren im OP eingeplant, da die intraoperative Routinediagnostik (Einbetten, Einfrieren und Befunden des intraoperativen Gefrierschnitts) in der Pathologie durch die oberärztliche Leitung und den Assistenzarzt erfolgte.

Es gab viele Mitglieder des Implementationsteams (*IV.F. – Unterbereich Rollen*): Beteiligt waren ärztliches und nicht ärztliches Personal aus der Klinik für Neurochirurgie, der Klinik für Anästhesiologie und der Abteilung für Neuropathologie.

5.3.5. Bereich Implementationsprozess

Die *Planung (V.D.)* von Verantwortungsbereichen für die klinische Pilotstudie war vorgegeben, da es sich um eine *ex vivo* Anwendung handelte, und die konfokale Mikroskopie und Diagnostik von der Neuropathologie durchgeführt wurde. Somit gab es keinen Unterschied zur Rollenverteilung in der herkömmlichen histologischen Diagnostik. Die Neurochirurgie führte die Tumorresektion durch und die Neuropathologie befasste sich mit Durchführung und Befundung der CLE.

Die *Durchführung (V.G.)* der Implementation konnte schrittweise erfolgen: So bestand vor der klinischen Pilotstudie die Möglichkeit zur Durchführung einer präoperativen Testphase im neuropathologischen Labor, wobei der Umgang und das Mikroskopieren mit dieser neuartigen

Technologie erlernt wurden und die charakteristische Histomorphologie von verschiedenen Entitäten untersucht wurden. Dies erleichterte die klinische Pilotstudie, da bei verschiedenen Tumoren bereits die spezifische CLE-Morphologie von mit Natriumfluorescein gefärbten Tumoren bekannt war.

Reflektieren und Evaluieren bezüglich der *Innovation (V.H.2.)* wurde wie oben erwähnt nach Durchführung der CLE innerhalb der Abteilung für Neuropathologie durchgeführt. Interdisziplinär gab es persönliche und telefonische Rücksprachen zwischen Neuropathologie und Neurochirurgie sowie regelmäßige gemeinsame Treffen mit Vertretern der Neurochirurgie, Neuropathologie und der Produktmanager der Carl Zeiss Meditec AG der ZEISS Gruppe zur Vorstellung und Diskussion von Zwischenergebnissen sowie zur Erörterung von weiteren Schritten.

6. Diskussion

Hirntumore sind schwierig zu operieren, weil sich durch das angrenzende normale Hirngewebe eine Operation weit im Gesunden verbietet. Daher kommt in der Neurochirurgie der Resektionsgrenzenbestimmung eine große Bedeutung zu, die allerdings, wie einleitend gezeigt wurde, technisch nicht einfach durchzuführen ist. Hinzu kommt, dass die Beurteilung der Tumorgrenze von Glioblastomen, ZNS WHO Grad 4, durch das diffus infiltrierende Wachstumsmuster herausfordernd ist. Die CLE könnte eine Resektionsrandkontrolle in Echtzeit im neurochirurgischen OP ermöglichen, weshalb die Eignung dieser Technologie für die Hirntumordiagnostik in dieser Arbeit untersucht wurde. Es gab keine Arbeiten mit einer systematischen Gegenüberstellung der konfokalen Diagnostik im Vergleich mit der konventionellen Lichtmikroskopie von Hirntumoren (Fotteler et al., 2019; Fotteler et al., 2021). Daher wurde in einer präklinischen Testphase eine Datenbank mit insgesamt 16344 konfokalen Bildern (50,62 GB) erstellt. Im Labor wurden tumorfreie und tumorbefallene Proben untersucht, um für zukünftige *in vivo* Resektionsrandkontrollen die Unterscheidung zwischen infiltrierten und atypiefreien Arealen vorzubereiten. Daneben wurden Färbeprotokolle zur Anwendung der Farbstoffe Natriumfluorescein, Acriflavin und des Anti-EGFR-Antikörpers Alexa Fluor® 488 conjugate etabliert. Anschließend wurde in einer klinischen Pilotstudie die CLE in der Neurochirurgie implementiert, wobei eine Datenbank mit insgesamt 4439 konfokalen Bildern (12,99 GB) generiert wurde. Auf diese Datenbanken kann für die Diagnostik im Rahmen von zukünftigen Studien zur *in vivo* CLE von Hirntumoren zurückgegriffen werden.

6.1. Eignung der unterschiedlichen Färbemethoden für die CLE

6.1.1. Topische Färbungen mit Natriumfluorescein und Untersuchung von Gefrierschnitten

Von den im Labor angewendeten Substanzen ist lediglich Natriumfluorescein für die intravenöse Anwendung am Patienten zugelassen und daher von Bedeutung für intraoperative *ex vivo* und zukünftige *in vivo* Anwendungen. Als Vorbereitung für die klinische Pilotstudie, bei der Natriumfluorescein intravenös verabreicht wurde, wurden im Labor 26 topisch mit Natriumfluorescein gefärbte Proben mit der CLE untersucht. Hierbei wurde tumorfreies Hirnparenchym aus unterschiedlichen Hirnregionen (frontal und zerebellär) mit tumorinfiltrierten Proben verglichen. Es wurden hohe Übereinstimmungen mit der konventionellen Lichtmikroskopie gefunden, insbesondere bei Meningeomen, Metastasen und Glioblastomen. Die gewonnenen Erkenntnisse der konfokalen Morphologie der unterschiedlichen Tumore bildeten die Grundlage für die folgende klinische Pilotstudie. Auch die konfokale Bildgebung von Gefrierschnitten korrelierte gut mit der konventionellen Fluoreszenzlichtmikroskopie. Mit der CLE waren deutliche Unterschiede zwischen tumorbefallenen und tumorfreien Proben vergleichbarer anatomischer Regionen sichtbar, sodass die Natriumfluorescein-gestützte CLE sowohl für die Entitätsdiagnostik im Labor geeignet ist, als auch Potentiale für eine Resektionsrandkontrolle birgt, was sich in der klinischen Pilotstudie bestätigte.

6.1.2. Topische Färbungen mit Acriflavin

Acriflavin wurde in den Laborversuchen verwendet, um das Potential des Digital Biopsy Tool CONVIVO® zu evaluieren. Die Histologie von mit Acriflavin gefärbten Proben korrelierte sehr gut mit der konventionellen Lichtmikroskopie und die Orientierung im Gewebe war durch die Anfärbung der Zellkerne vereinfacht. Teils überwiegte sogar die Bildqualität von mit Acriflavin gefärbten Präparaten die konfokalen Bilder der Proben, die mit Natriumfluorescein gefärbt wurden. So sind bei einem mit Acriflavin gefärbten Pineozytom, ZNS WHO Grad 1, die Zellkerne eindeutig abgrenzbar, wohingegen mit Natriumfluorescein die einzelnen Zellen weniger gut beurteilbar sind (vgl. Abb. 24). Jedoch konnte Acriflavin nicht in der klinischen Pilotstudie weiterverfolgt werden, da diese Substanz für die Anwendung am Patienten nicht zugelassen ist und bei einer limitierten Datenlage zum aktuellen Zeitpunkt keine eindeutige Aussage zur Sicherheit getroffen werden kann (s. Kapitel 2.3.). Daher wurde Acriflavin in dieser Arbeit lediglich für topische Färbungen im Labor verwendet.

Die Formalinfixierung beeinflusste nicht die Bildqualität, sodass für mögliche weitere postoperative CLE-Untersuchungen nicht nur Frischgewebe, sondern auch fixiertes Gewebe herangezogen werden kann. Es fiel durch Zufall bei Negativkontrollen eine Autofluoreszenz von ungefärbtem Gewebe auf, jedoch in so geringem Ausmaß, dass sie die Interpretation der Bilder nicht beeinflusste und vernachlässigt werden kann.

6.1.3. Immunhistochemische Färbungen mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate

Um weitere Möglichkeiten der CLE im Labor zu prüfen, wurden immunhistochemische Untersuchungen mit dem fluoreszierenden gekoppelten monoklonalen IgG Anti-EGFR-Antikörper (neutralizing), clone LA1, Alexa Fluor® 488 conjugate (mouse) durchgeführt. Hierbei waren Gefäßproliferate eines EGFR überexprimierenden Glioblastoms deutlich sichtbar. Intraoperative topische Applikationen in der Tumorsektionshöhle wären mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der intraoperativ nicht einzuhaltenden Inkubationszeit des Antikörpers nicht möglich. Zudem wäre diese Farbstoffadministration auf EGFR exprimierende Tumore limitiert.

Bei der Färbung der Glioblastomzelllinie LN18 mit dem fluoreszierenden Anti-EGFR-Antikörper war in der CLE kein Signal sichtbar, was daran liegen könnte, dass die CLE nicht für das Mikroskopieren in der Zellkultur konstruiert wurde und hier nicht erfolgreich ist. Somit sollte diese Technologie in Zukunft auf das Mikroskopieren von Tumorproben beschränkt werden.

6.2. CLE im Rahmen der klinischen Pilotstudie für intraoperative Diagnostik

Die CLE war in den Ablauf von neurochirurgischen Operationen gut integrierbar. Grundsätzlich erwies sich die CLE für die Entitätsdiagnostik und die Resektionsrandbestimmung von Hirntumoren als geeignet. Somit wurde das Ziel der klinischen Pilotstudie erreicht. Mit der *ex vivo* CLE wurde ein deutlicher Unterschied zwischen Tumorzentrum und Infiltrationszone bei einem Glioblastom gefunden. Somit könnte die CLE bei zukünftigen *in vivo* Studien für die Resektionsrandkontrolle angewendet werden. Die CLE birgt Potentiale für Entitätsdiagnostik im OP und andererseits für eine mikroskopische Resektionsrandkontrolle ohne die Entnahme von gesundem Gewebe (Breuskin et al., 2017). Dies könnte für eine schonende, gleichzeitig möglichst vollständige Tumorentfernung von Vorteil sein. Wünschenswert wären prospektive randomisierte kontrollierte Studien mit großen Fallzahlen zur Untersuchung der Verlängerung des Gesamtüberlebens von Hirntumorpatienten bei intraoperativer Anwendung der CLE zur Resektionsrandkontrolle, verglichen mit dem intraoperativen Gefrierschnitt.

Wie einleitend beschrieben, besteht ein weiterer Vorteil der CLE im möglichen Ersatz des intraoperativen Gefrierschnitts. Hierdurch könnte die Neuropathologie entlastet werden, da die Verarbeitung der Probe in der Pathologie durch Telepathologie ersetzt werden kann (Fotteler et al., 2021). So könnten Proben transport, Einfrieren, Schneiden und Färben von Proben übersprungen werden und die Diagnose bereits im OP getroffen werden (Fotteler et al., 2021).

6.3. Analyse der Implementation der CLE in die Klinik anhand des CFIR

Es wurde eine Implementationanalyse der Einführung der CLE in die Klinik anhand der Veröffentlichung *The updated Consolidated Framework for Implementation Research based on user feedback* durchgeführt, wobei diejenigen Bereiche adressiert wurden, die für die vorliegende Innovation am relevantesten waren (Damschroder et al., 2022).

6.3.1. Bereich Innovation

Innovationsquelle (I.A.)

Das Digital Biopsy Tool Convivo® wurde durch die ZEISS Gruppe entwickelt, die laut eigenen Angaben einen Jahresumsatz von 8,8 Milliarden Euro erzielte und jahrzehntelange Erfahrung in der Entwicklung von optoelektronischen Produkten aufweist (Stand: 30.9.2022; Quelle: <https://www.zeiss.de/corporate/ueber-zeiss/gegenwart/ueber-zeiss.html>, aufgerufen am 01.04.2023). Dieses Gerät wurde auf der Grundlage eines konfokalen Laserendomikroskops aus der Gastroenterologie speziell für Hirntumoren entwickelt (Restelli et al., 2022).

Evidenz der Innovation (I.B.)

Publikationen zur *in vivo* CLE am Tiermodell von Hirntumoren zeigten vielversprechende Resultate (Belykh et al., 2018; Martirosyan et al., 2011; Peyre et al., 2013). Auch Veröffentlichungen zur CLE bei Hirntumorpatienten kamen zu überwiegend guter Korrelation mit der konventionellen Histologie (Acerbi et al., 2020; Charalampaki and Schlegel, 2019). Die *in vivo* CLE von Hirntumorpatienten mit dem konfokalen System Cellvizio® ermöglichte die Unterscheidung zwischen tumorfreien und tumorbefallenen Arealen (Pavlov et al., 2016). Wie in einem Review zusammengefasst, wurden bereits 3 Studien zur *in vivo* Anwendung bei Hirntumoren mit dem Digital Biopsy Tool Convivo® publiziert (Restelli et al., 2022): Eine Studie kam zu einer hohen Übereinstimmung zwischen konfokalen Bildern mit dem intraoperativen Gefrierschnitt und endgültiger Histomorphologie am FFPE-Schnitt (Abramov et al., 2023). Daneben konnte mit dem Digital Biopsy Tool Convivo® die Mikrovaskularisation bei Gliompatienten dargestellt werden (Belykh et al., 2021). Auch Höhne et al. konnten bei Hirntumorpatienten mit dem Digital Biopsy Tool Convivo® Mikrostrukturen identifizieren (Höhne et al., 2021).

Relativer Vorteil der Innovation (I.C.)

Die CLE weist verschiedene Vorteile in der intraoperativen Diagnostik von Hirntumoren auf: Der aktuelle Goldstandard für mikroskopische intraoperative Hirntumordiagnostik ist der intraoperative Gefrierschnitt, der jedoch aufgrund der Verarbeitung im Labor nicht in Echtzeit stattfinden kann und immer diagnostische Verzögerungen nach sich zieht. So kann sich die intraoperative Gefrierschnittdiagnose beispielsweise verzögern, wenn zeitgleich aus mehreren Operationssälen verschiedene Proben in die Pathologie zur intraoperativen Beurteilung eingesandt werden, und es im Labor zu Wartezeiten kommt. Daneben können Gefrierschnittartefakte die Beurteilung erschweren und ggf. sogar verfälschen. Zudem können unvorhergesehene Komplikationen im Gefrierschnittlabor in der Verarbeitung auftreten und zu weiteren Verspätungen führen: So kann, falls der Block nicht tief genug angeschnitten wurde oder der Gefrierschnitt aufgrund von Artefakten eine unzureichende Qualität hat, die Anfertigung einer Schnittstufe nötig sein, was zusätzlich Zeit kostet.

Ein Gefrierschnittersatz durch die CLE würde eine Reduktion der Aufgabenlast in der Neuropathologie bedeuten, jedoch würden zu einem geringeren Anteil zusätzliche Aufgaben für das Personal in der Neurochirurgie anfallen (Fotteler et al., 2021). Ein erheblicher Vorteil der CLE ist die zeitliche Flexibilität: Die intraoperative CLE ist nicht an die Öffnungszeiten des Gefrierschnittlabors gebunden, was eine Diagnostik auch spät nachmittags, abends, nachts, am Wochenende oder Feiertagen ermöglichen würde. Zwar werden Hirntumorresektionen in der Regel elektiv geplant, jedoch können an Werktagen Gefrierschnitte am späten Nachmittag oder frühen Abend je nach Labor nicht immer gewährleistet werden. Hier wäre bei einer telepathologischen CLE die elektronische Evaluation flexibler. Eine Neuropathologie vor Ort wäre nicht zwingend nötig, sondern die konfokalen Bilder könnten an andere Standorte versandt werden und elektronisch validiert werden.

Die CLE birgt Potentiale für die Entitätsdiagnostik im OP und andererseits für eine mikroskopische Resektionsrandkontrolle ohne die Entnahme von gesundem Gewebe (Breuskin et al., 2017). Dies könnte für eine schonende, gleichzeitig möglichst vollständige Tumorentfernung von Vorteil sein. Wünschenswert wären prospektive randomisierte kontrollierte Studien mit großen Fallzahlen zur Untersuchung der Verlängerung des Gesamtüberlebens von Hirntumorpatienten bei intraoperativer Anwendung der CLE zur Resektionsrandkontrolle, verglichen mit dem intraoperativen Gefrierschnitt.

Wie einleitend beschrieben, könnte die *in vivo* CLE möglicherweise langfristig den intraoperativen Gefrierschnitt ersetzen. Hierdurch könnte die Neuropathologie entlastet werden, da die Verarbeitung der Probe in der Pathologie durch Telepathologie ersetzt werden kann (Fotteler et al., 2021). Mit der CLE könnte die Diagnose im OP getroffen werden und damit einige Schritte des Gefrierschnittverfahrens, darunter Versand und Annahme der Probe mit Dokumentation, makroskopische Beschreibung der Probe, Einfrieren, Schneiden, Färben, Diagnostik und telefonische Rückmeldung, insbesondere durch die digitalisierte CLE, vereinfacht werden, was die Komplexität des Arbeitsablaufs in der Neuropathologie verringern würde (Fotteler et al., 2021).

Testbarkeit der Innovation (I.E.)

Wie bereits beschrieben, stand aufgrund der begrenzten Evidenz zur CLE keine systematische Gegenüberstellung von H.E.-gefärbten FFPE-Schnitten aus der Routinediagnostik mit konfokalen Bildern aller oder zumindest häufiger in der WHO-Klassifikation aufgelisteter Hirntumore zur Verfügung. So war die charakteristische Histomorphologie vieler Hirntumore mit der CLE Studie nicht hinreichend bekannt. Durch die Testbarkeit des Digital Biopsy Tool Convivo® im neuropathologischen Labor konnte der Umgang mit der CLE eingeübt werden und die konfokale Morphologie verschiedener Tumorentitäten erlernt und mit der konventionellen HE-Bildgebung verglichen werden. Zudem konnten Potentiale der Technologie evaluiert werden und weitere Farbstoffe getestet werden.

Komplexität der Innovation (I.F.)

Die Auswertung der CLE war komplex, wurde jedoch durch die vorangehende Laborphase maßgeblich erleichtert. Viele der Tumoren aus der klinischen Pilotstudie waren bereits in der präklinischen Testphase untersucht worden (Transitionelles Meningeom, Meningotheliomatöses Meningeom, Schwannom, Pilozytisches Astrozytom, Astrozytom, Oligodendrogliom, Glioblastom sowie verschiedene Metastasen), wodurch auf die vorhandene Datenbank zurückgegriffen werden konnte. Zwar bestanden Unterschiede in der Farbstoffadministration zwischen der präklinischen Laborphase und der klinischen Anwendung (topisch vs. intravenös), sodass sich die Bildgebung nicht unter exakt denselben Bedingungen testen ließ, jedoch gab es hohe Übereinstimmungen der konfokalen Bilder. So war beispielsweise bekannt, dass auch in konfokalen Bildern bei der Untersuchung von Transitionalen Meningeomen Psammomkörper und Wirbelbildung sichtbar sind. Desweiteren war bei Metastasen mit solidem Wachstumsmuster in der CLE der Tumorverband ähnlich gut sichtbar wie in der konventionellen Histologie. Bei hochgradigen Gliomen waren in der CLE Gefäßproliferate zu sehen. Bei Schwannomen war mit der CLE das charakteristische stromartige Wachstumsmuster unter Ausbildung von AntoniA- und AntoniB-Areal in der CLE wiedererkennbar. Beim pilozytischen Astrozytom waren piloide Zellfortsätze erkennbar. Somit war durch die vorausgegangene Laborphase die konfokale Morphologie von vielen Hirntumoren bekannt, was die Diagnostik im OP erleichterte.

Für eine systematische Auswertung wäre die Unterstützung durch KI (Künstliche Intelligenz) möglicherweise von Vorteil. KI weist Potentiale für viele medizinische Gebiete auf, wie Medikation, Kardiologie, Pathologie, Radiologie oder Neuroradiologie (Acs et al., 2020; Duong et al., 2020; Hosny et al., 2018; Romm and Tsigelny, 2020; Watson et al., 2021). Es gibt auch Programme zur Software-gestützten Diagnostik der CLE (Charalampaki and Kakaletri, 2021). Im diagnostischen Bereich kann Software mithilfe von sog. deep learning Modellen automatisierte, benutzerunabhängige Diagnosen vorschlagen – so half ein Computerprogramm bei der CLE-gestützten Diagnostik der Tumorentitäten Glioblastom, Meningeom und Metastase und erzielte hierbei nach Vorauswahl der Bilder eine Genauigkeit von 98.6% (Ziebart et al., 2021). Weitere interessante Bereiche wären die durch Software gestützte Differenzierung zwischen tumorbefallenem und tumorfreiem Gewebe am Resektionsrand und die Eliminierung von Erythrozyten, die womöglich die Bildqualität beeinträchtigen könnten.

6.3.2. Bereich externes Umfeld

Entscheidende Ereignisse (II.A.)

Strikte Rahmenbedingungen und unverhältnismäßig hohe Sicherheitsauflagen beeinträchtigen erwiesenermaßen Implementationen von medizinischen Interventionen (Watson et al., 2018). Die vorliegende klinische Pilotstudie war durch hohe Sicherheitsauflagen eingeschränkt. Obwohl alle technischen Voraussetzungen für eine *in vivo* Anwendung der CLE vorhanden waren, war die klinische Pilotstudie aufgrund der fehlenden Zulassung der Mikroskopierhülle *Zeiss Sterile Sheath* auf die *ex vivo* Anwendung limitiert. Dadurch wurde die Implementation der *in vivo* CLE hinausgezögert, da sie nicht direkt im Anschluss an die Klinische Pilotstudie stattfinden konnte. Somit beschränkte sich die vorliegende Studie auf *ex vivo* Untersuchungen. Dies verzögerte die langfristige Implementaton des Digital Biopsy Tool CONVIVO®, dessen eigentlicher Zweck die *in vivo* CLE ist.

Rechtliche Rahmenbedingungen (II.E.)

Natriumfluorescein

Neben der fehlenden Zulassung des *Zeiss Sterile Sheath* war auch Natriumfluorescein für die Anwendung im Rahmen der CLE nicht zugelassen. Natriumfluorescein wurde für die Studie als Off-Label-Use, d. h. ohne spezifische Zulassung für die Anwendung im Rahmen der CLE angewendet. Jedoch gibt es eine Zulassung für die Fundusangiographie von Erwachsenen mittels Natriumfluorescein in der Ophthalmologie, wofür es routinemäßig eingesetzt wird. Eine multizentrische Studie zur Sicherheit von intravenös verabreichtem Natriumfluorescein für die CLE in der Gastroenterologie mit 2272 Fällen berichtete von keinen schweren Nebenwirkungen, jedoch z. B. von gastrointestinaler Symptomatik bei 1,4% der Patienten, Hypotonie oder Ausschlag (Wallace et al., 2010). Es wurde jedoch am 29.10.2009 von der Firma ALCON® ein Rote-Hand-Brief mit Warnhinweisen zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen nach intravenöser Gabe von Natriumfluorescein insbesondere bei älteren Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil publiziert, darunter auch „Übelkeit“, „Erbrechen“ und „anaphylaktischer Schock“, selten mit tödlichem Ausgang. Anzeichen für ein Auftreten dieser Nebenwirkungen wurden während der klinischen Pilotstudie durch die zuständigen Anästhesisten konstant kontrolliert.

Acriflavin

Acriflavin ist kein zugelassenes Arzneimittel, weshalb es lediglich in der präklinischen Laborphase und nicht in der klinischen Pilotstudie zum Einsatz kam. Zwar wurde es experimentell bereits im Rahmen von Bronchoskopien topisch *in vivo* appliziert (Fuchs et al., 2013). Jedoch ist Acriflavin laut der Produktbeschreibung des Herstellers *Fisher Scientific* eine interkalierende Substanz, deren Karzinogenität für den Menschen unzureichend untersucht ist. In einer Veröffentlichung über die

Karzinogenität von Chemikalien der IARC (International Agency for Research on Cancer) wurde lediglich eine Studie mit Acriflavin am Tiermodell, jedoch keine Studien am Menschen erwähnt, sodass keine Aussage zur Toxizität für Menschen getroffen wurde (1977). Ein Kommentar zu den IARC Monographien findet keine Daten zur Karzinogenität bei Menschen (Marselos and Vainio, 1991). Es finden sich sogar Hinweise auf gesundheitsfördernde Eigenschaften: Aufgrund von antikanzerogenen Eigenschaften *in vitro*, insbesondere bei kolorektalen Tumorzellen, könnte Acriflavin für diagnostische und therapeutische Zwecke vielversprechend sein (Fuchs et al., 2013; Hassan et al., 2011). Auch wenn es diese Beobachtungen gab, war die Sicherheit einer Anwendung von Acriflavin an Tumorpatienten zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht geklärt. Daher kam eine intravenöse Verabreichung nicht in Frage, sodass es in dieser Arbeit ausschließlich im Labor verwendet wurde. Auch eine topische Färbung von Tumorproben mit Acriflavin im OP im Rahmen der klinischen Pilotstudie wäre nicht möglich gewesen, da Hersteller der Substanz erhöhte Sicherheitsvorkehrungen fordern, die in einem OP schwer durchführbar wären. Im Sicherheitsdatenblatt der Firma ThermoFisher (überarbeitet am 16.12.2020) sind für Acriflavinhydrochlorid mehrere Gefahrenhinweise aufgelistet, sowie personenbezogene Vorsichtsmaßnahmen, darunter „*vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstungen*“ und „*ausreichende Belüftung*“ und die Umweltschutzmaßnahme „*nicht in die Kanalisation oder Gewässer einleiten*“.

Finanzierung (II.F.)

Für die Dauer der präklinischen Laborphase und der klinische Pilotstudie stand das Digital Biopsy Tool CONVIVO® als Leihgabe der Carl Zeiss Meditec AG der ZEISS Gruppe zur Verfügung. Bei einem Kauf des Geräts müssten u.a. Anschaffungs- und Wartungskosten des Digital Biopsy Tool CONVIVO®, Kosten für die ZEISS Sterile Sheaths, für Natriumfluorescein, Personalkosten für die Durchführung der Studie sowie für die Vorarbeit im Labor anfallende Kosten miteinbezogen werden (Fotteler et al., 2021). Im Fall der Etablierung von *in vivo* Anwendungen sollten längerfristige Ersparnisse durch mögliche Operationsbeschleunigung miteinberechnet werden, da jede Minute Operationszeit Kosten verursacht (Childers and Maggard-Gibbons, 2018).

Einführungen von Innovationen sind ressourcenintensiv, sodass auch die Rentabilität einer neuen Technologie untersucht werden sollte. Eine solche Analyse wird beispielsweise von Wirtschaftsprüfergesellschaften angeboten. Eine häufig angewandte Methode ist die Erfassung von Kosten für ein sog. "quality-adjusted life-year" (QALY), eine Quantifizierung der Kosteneffektivität pro Gesundheitsverbesserung (Weinstein et al., 2009). Diese Methode wurde kritisiert, da manche Dimensionen einer Innovation verloren gehen. Daher wurde für ein solches Review vorgeschlagen, zunächst "efficacy", die Wirksamkeit, zu evaluieren und dann den Vorteil für Patienten (Angelis et al., 2018). In einem zweiten Schritt folgt die finanzielle Analyse, was Kosten, Wert der Methode, Alternativen und Ausgaben für Marketing beinhaltet (Carniol et al., 2018). Da die CLE auf dem Gebiet der Neurochirurgie noch experimentell ist, wurde eine solche Untersuchung in diesem Fall nicht durchgeführt; sie könnte jedoch insbesondere nach Etablierung der *in vivo* CLE einen Mehrwert für die Planung von zukünftigen Studien liefern.

6.3.3. Bereich internes Umfeld

Digitale Infrastruktur (III.A.2.)

Ein direkter Vergleich der konfokalen Bilder mit dem intraoperativen Gefrierschnitt mittels Telepathologie wäre ein großer Vorteil für zukünftige *ex vivo* und *in vivo* Anwendungen. So könnte für eine optimale Korrelation von beiden Standorten aus (Neuropathologie und OP) auf konfokale Bilder und den Gefrierschnitt zugegriffen werden kann. Screensharing des Digital Biopsy Tool CONVIVO® mit der Neuropathologie wurde bereits durchgeführt (z. B. mit dem System *DICOM Modality Worklist*), war aber für den Prototyp in der vorliegenden klinischen Pilotstudie nicht verfügbar (Fotteler et al., 2021). Auch die Histologie des intraoperativen Gefrierschnitts sollte in den OP geschickt werden - somit könnte der Gefrierschnitt für die Person, die die CLE durchführt, sichtbar werden. Dies würde ein Einscannen des Gefrierschnitts voraussetzen, was sonst nicht routinemäßig durchgeführt wird.

Kommunikation (III.C)

Aufgrund er fehlenden digitalen Infrastruktur war die Kommunikation innerhalb der Abteilung für Neuropathologie bezüglich der Korrelation der konfokalen Bilder mit dem intraoperativen Gefrierschnitt eingeschränkt: Während des Mikroskopierens gab es nur die Möglichkeit einer telefonischen Rücksprache aufgrund des gleichzeitig durchzuführenden Schnellschnitts. Die Kommunikation könnte durch das angesprochene Screensharing und Etablierung eines Nachrichtensystems sicherlich verbessert werden.

Veränderungsbedarf (III.E.)

Das Gefrierschnittverfahren ist für die intraoperative histologische Diagnostik von Hirntumoren weltweit etabliert und funktioniert, wobei zu den bereits angesprochenen Nachteilen eine intraoperative Verzögerung und Gefrierschnittartefakte zählen. Somit wäre eine Innovation wie die CLE, die eine Histologie in Echtzeit bietet, ohne diese beiden Nachteile mit sich zu bringen, ein Gewinn.

Es besteht zudem Verbesserungsbedarf bei der intraoperativen Resektionsrandkontrolle von Hirntumoren. Beispielsweise wurde beim Rezidiv des Glioblastoms, ZNS WHO Grad 4, gezeigt, dass eine komplette Resektion der kontrastmittelaufnehmenden Tumorregion mit einer verbesserten Prognose einhergeht (Suchorska et al., 2016). Hier könnte die CLE an der Schnittstelle zwischen Diagnostik und Therapie eine Verbesserung bewirken, indem sie eine möglichst vollständige Tumorsektion auf mikroskopischer Ebene erlaubt. Andere Tumorentitäten würden womöglich ebenfalls von einer möglichst vollständigen Tumorsektion profitieren, weswegen keine neurochirurgischen Entitäten aus der Studie ausgeschlossen wurden.

Kompatibilität (III.F.)

Die Bedeutung der Kompatibilität einer neuen Arbeitsweise mit vorhandenen Strukturen wurde belegt (Rieckmann et al., 2016). Die *ex vivo* CLE fand parallel zu Operationen statt. Unterschiede im Rahmen des operativen Eingriffs bestanden in der intravenösen Verabreichung von Natriumfluorescein durch den zuständigen Anästhesisten bei Eröffnung der Dura Mater. Daneben wurden diejenigen Exzidate, die nicht für die intraoperative Gefrierschnittdiagnostik verwendet wurden, dem CLE-Team übergeben. Diese beiden Schritte beeinflussten jedoch kaum die etablierten Arbeitsstrukturen der Operationen, sodass die CLE gut in neurochirurgische Eingriffe integrierbar war. Die Etablierung der *in vivo* CLE würde den Operationsablauf mehr beeinflussen, da die CLE nach sterilem Abdecken des Mikroskops am Operationsort parallel zur Tumorsektion durch den Neurochirurgen durchgeführt würde. Seitens der Neurochirurgie müsste die CLE-Sonde auf den Tumor bzw. auf die Resektionshöhle gehalten werden. Dies würde die Operationsroutine ändern und könnte zunächst zu Zeitverzögerungen führen, aber langfristig könnten nach Etablierung die angesprochenen Vorteile der CLE dies aufwiegen.

Material und Ausrüstung (III.J.3.)

Der Anteil der Tumorproben, der nicht für die Gefrierschnitt- oder FFPE-Diagnostik verwendet wurde, wurde für die CLE verwendet. In der Studie stand bei jedem Patienten genügend Material für alle drei diagnostischen Verfahren zur Verfügung. Bis zur endgültigen Etablierung der CLE in die Neurochirurgie sollte aus Gründen der diagnostischen Sicherheit nur dann die *ex vivo* CLE durchgeführt werden, wenn eine Diagnostik trotzdem gewährleistet werden kann.

6.3.4. Bereich Individuen

Unterbereich Rollen

Durch die kleine Größe des Implementationsteams gab es mehrere Überschneidungen im Bereich *Individuen – Unterbereich Rollen*: So fielen die *Führungskräfte höchster Ebene* auch unter die Kategorie *Ermöglicher der Implementation*. Im Fall eines größeren Implementationsteams könnte es weniger Überschneidungen von Rollen geben.

Der Bereich *Individuen – Unterbereich Rollen* ist im CFIR nach der Ranghöhe von Mitbeteiligten aufgebaut, jedoch könnte dieser Bereich alternativ nach Ausmaß der Beteiligung an der Implementation beurteilt werden, da diese für die Umsetzung der Implementation relevanter sein kann (Damschroder et al., 2022).

Mitglieder des Implementationsteams (IV. F.)

An der klinischen Pilotstudie waren verschiedene Abteilungen involviert. Es handelte sich um eine Kollaboration der Neurochirurgischen Klinik am Klinikum rechts der Isar mit der Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Pathologie der Technischen Universität München. Mitbeteiligt waren auch für die jeweiligen Operationen eingeteilte Mitarbeiter der Klinik für Anaesthesiologie. Der Einschluss mehrerer Gruppen kann die Komplexität eines Implementationsprozesses erhöhen. Je mehr Kliniken oder Abteilungen involviert sind, desto wichtiger wird vorausgehende Arbeit (Kochevar and Yano, 2006). Zwar konnte diese Innovation vorher getestet werden, was die Anwendung in der Klinik erleichterte, da das *ex vivo* Mikroskopieren mit der CLE bereits routiniert war. Das Korrelieren der konfokalen Histologie mit der konventionellen Histologie hatte bereits im Labor nach topischen Färbungen stattgefunden. Jedoch lieferte die CLE eine neuartige Bildgebung an der Schnittstelle zwischen Neuropathologie und Neurochirurgie. Medizinisches Personal aus verschiedenen Fachgebieten musste eine noch nicht etablierte Technologie parallel zum Arbeitsalltag im OP testen.

Wenn Mitarbeiter Vorteile einer Innovation erkennen, kann dies die Bereitschaft, eine Implementation durchzuführen, erhöhen (Gustafson et al., 2003). Hierzu lagen für die vorliegende klinische Pilotstudie keine Daten vor. Dieser Punkt wäre für zukünftige Studien interessant zu untersuchen.

6.3.5. Bereich Implementationsprozess

Planung (V.D.)

Wichtig für die Implementation des Digital Biopsy Tool CONVIVO® war die Rollenzuteilung für die Durchführung der CLE: Während sie in der klinischen *ex vivo* Pilotstudie der Neuropathologie zufiel, würde sich bei *in vivo* Anwendungen die Rollenverteilung ändern: So müsste das konfokale Mikroskopieren am Operationssitus dann durch die Neurochirurgie übernommen werden. Die Befundung könnte weiterhin durch die Neuropathologie vor Ort im OP oder telepathologisch erfolgen.

Reflektieren und Evaluieren – Innovation (V.H.2.)

Die Evaluation der Implementation fand parallel zur klinischen Pilotstudie sowohl innerhalb der Neuropathologie, als auch interdisziplinär gemeinsam mit der Neurochirurgie, sowie mit externen Vertretern der Carl Zeiss Meditec AG der ZEISS Gruppe statt. Somit konnten Prozesse während der Studie sofort optimiert werden: Beispielsweise fiel auf, dass für das Erreichen eines ausreichenden Kontrasts keine längere Einwirkzeit von Natriumfluorescein abgewartet werden musste, sondern der Tumor auch bereits nach einer Einwirkzeit von 2 Minuten genügend angefärbt war. Daneben konnten Fragen gemeinsam adressiert werden: So sollte darauf geachtet werden, ob Erythrozyten zu Störartefakten führen, die die Beurteilung mit der CLE stören, was jedoch nicht der Fall war.

Insgesamt standen in der Implementationsanalyse der CLE in die Neurochirurgie in den fünf unterschiedlichen Bereichen verschiedene Themen im Vordergrund. Bezüglich der Innovation (I.)

war dies die Möglichkeit der präklinischen Testung und Vorteile der CLE gegenüber dem etablierten intraoperativen Gefrierschnittverfahren. Das externe Umfeld (II.) war von rechtlichen Rahmenbedingungen geprägt, wie der fehlenden Zulassung des ZEISS Sterile Sheath und von Natriumfluorescein. Im internen Umfeld (III.) bewährte sich die CLE aufgrund ihrer guten Kompatibilität mit Operationsabläufen; allerdings zeigte sich, dass zukünftige CLE-Studien von einer gut ausgebauten digitalen Infrastruktur profitieren könnten. Die Beteiligung von Individuen (IV.) aus verschiedenen Abteilungen erhöhte die Komplexität der Implementation. Der Prozess der Implementation (V.) wurde durch kontinuierliche interdisziplinäre Evaluationen parallel zur klinischen Pilotstudie verbessert. (s. Abb. 36)

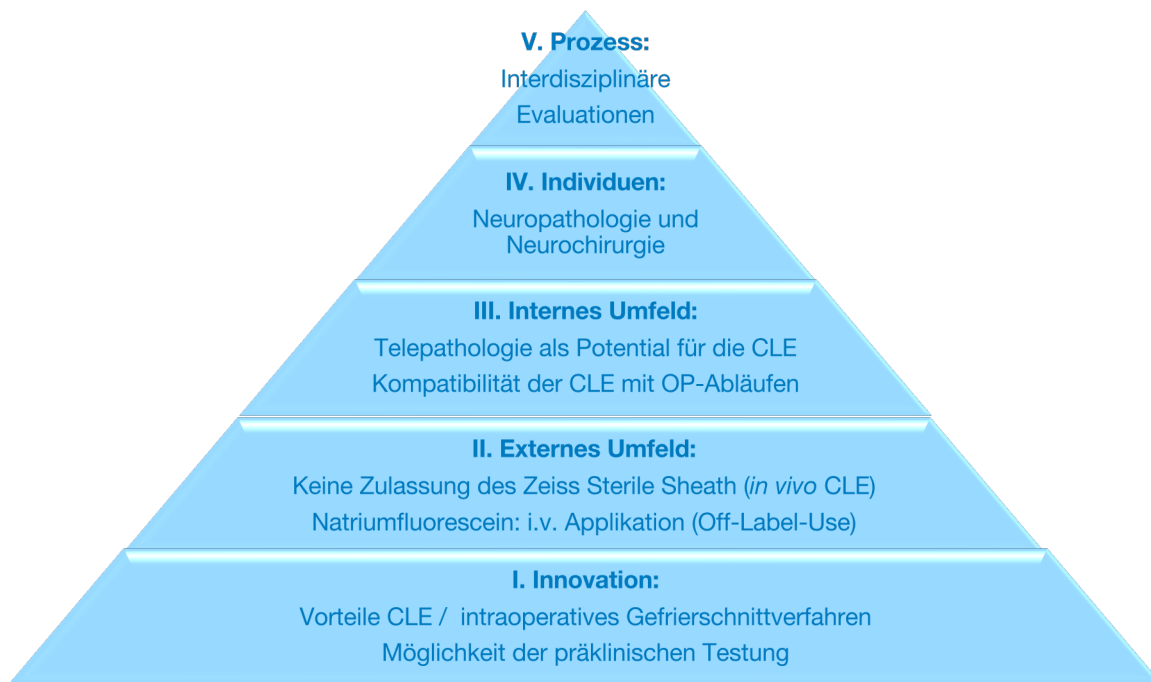


Abb. 36: Implementationsanalyse der Einführung der CLE in die Neurochirurgie (eigene Abbildung, basierend auf Kriterien des CFIR) (Damschroder et al., 2022)

Die im CFIR vorgeschlagenen Bereiche waren hilfreich, um eine Implementationsevaluation durchzuführen. Im vorliegenden Fall wurde die Implementationsevaluation als letzter Schritt nach der präklinischen Testphase und der klinischen Studie durchgeführt (s. Abb. 37). Das CFIR wurde häufig für die retrospektive Evaluation von Implementationen angewendet, wurde aber auch für die prospektive Planung vor neuen Implementationen herangezogen (Saluja et al., 2017). Die Implementation der CLE wurde in diesem Fall rückwirkend untersucht. Zukünftige *in vivo* Studien mit der CLE könnten Bereiche der Implementation vorab anhand von im CFIR vorgeschlagenen Kriterien untersuchen und optimieren. So sollte vorab bezüglich des internen Umfelds (III.) abgeklärt sein, ob die nötige digitale Infrastruktur (III.2.) für eine telepathologische Befundung der konfokalen Bilder vorliegt.

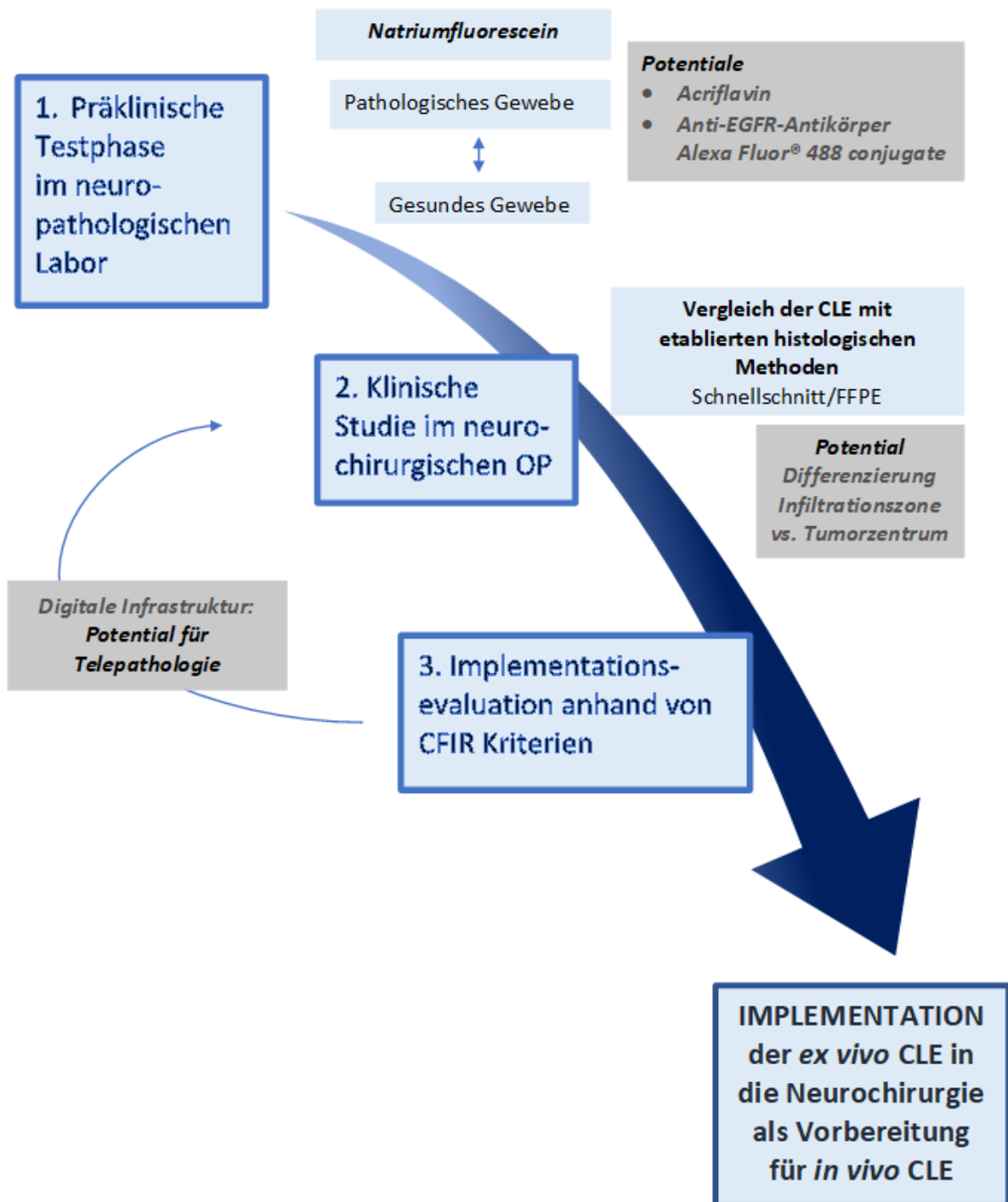


Abb. 37: Prozess der Einführung der ex vivo CLE aus dem neuropathologischen Labor in die Neurochirurgie

7. Zusammenfassung

In der onkologischen Neurochirurgie besteht die Schwierigkeit, dass Tumore nicht mit einem großen Abstand zum gesunden Gewebe entfernt werden können, um neurologische Funktionen zu schützen. Daher ist eine exakte Resektionsrandkontrolle mit dem Ziel einer möglichst vollständigen Tumorsektion unter Schonung der umliegenden Strukturen besonders wichtig. Diese wird auf makroskopischer Ebene durch die teils 5-ALA-gestützte Neuronavigation und auch z. T. durch die intraoperative MRT gewährleistet. Auf histologischer Ebene kommt hierfür der intraoperative Gefrierschnitt zum Einsatz, der jedoch die Nachteile einer z. T. erheblichen intraoperativen Verzögerung sowie des Auftretens von Artefakten haben kann. Durch die Einführung der konfokalen Laserendomikroskopie (CLE) in die Neurochirurgie steht eine neue Methode zur Verfügung, die eine intraoperative histologische Resektionsrandkontrolle in Echtzeit ermöglicht. Hierbei handelt es sich um eine Endoskop-gestützte Mikroskopie am Operationssitus, die in der Lage ist, Fluoreszenzsignale zu detektieren. Hierdurch könnte die Tumorentität und der Resektionsrand beurteilt werden, ohne Gewebesenahme und damit potentiellen Verlust tumorfreien angrenzenden Hirngewebes. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war die CLE für die intraoperative *in vivo* Anwendung am Operationssitus noch nicht zugelassen, weshalb verschiedene Farbstoffe für die CLE präklinisch evaluiert wurden. Als Vorbereitung für die Einführung der Technologie in die Klinik wurden im Labor 26 Proben topisch mit Natriumfluorescein, 16 Proben topisch mit Acriflavin und 3 Proben mit dem Anti-EGFR-Antikörper Alexa Fluor® 488 conjugate gefärbt und mit der CLE untersucht (s. Tab. 1). 9 Proben wurden als Kontrollen nicht gefärbt. Außerdem wurden 6 Gefrierschnitte mit Natriumfluorescein gefärbt. Es wurde eine Datenbank mit insgesamt 16344 histologischen Bildern (50,62 GB) erstellt und ausgewertet. Es gab es eine sehr gute Korrelation von mit Natriumfluorescein sowie mit Acriflavin gefärbten Proben mit der konventionellen Lichtmikroskopie und es wurden deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorentitäten und tumorfreien Proben vergleichbarer anatomischer Lokalisationen gefunden. Bei der immunhistochemischen Färbung mit dem fluoreszierenden Anti-EGFR-Antikörper waren die charakteristischen Gefäßproliferate eines EGFR-überexprimierenden Glioblastoms deutlich erkennbar. Im Anschluss wurde eine klinische Pilotstudie durchgeführt, bei der die Tumorproben von 22 Patienten nach Resektion im Operationssaal *ex vivo* mit der CLE mikroskopiert wurden, von denen 20 Patienten eine intravenöse Verabreichung von Natriumfluorescein erhielten. Im Rahmen dieser Studie entstand eine Datenbank mit insgesamt 4439 konfokalen Bildern (12,99 GB), die ausgewertet wurden. Die Histologie der *ex vivo* entstandenen konfokalen Bilder korrelierte gut mit der konventionellen Lichtmikroskopie. Es wurde sogar ein deutlicher Unterschied zwischen Infiltrationszone und Tumorzentrum gefunden. Abschließend wurde retrospektiv der Prozess des Transfers dieser neuen Technologie aus dem neuropathologischen Labor in den neurochirurgischen OP anhand von Kriterien, die im *Consolidated Framework for Implementation Research (CFIR)* vorgeschlagen wurden, beleuchtet (Damschroder et al., 2009; Damschroder et al., 2022). Insgesamt zeigen die Ergebnisse der klinischen Pilotstudie in Zusammenschau mit den präklinischen Vorarbeiten im Labor, dass die CLE eine mit der konventionellen Lichtmikroskopie vergleichbare Technologie ist, die für die intraoperative Entitätszuordnung und die intraoperative Resektionsrandkontrolle geeignet ist und in zukünftigen *in vivo* Studien weiter untersucht werden sollte. Aus diesen Erkenntnissen heraus kann man jetzt diese Methode weltweit in allen neurochirurgischen Labors einsetzen.

8. Literaturverzeichnis

- (1977) IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some miscellaneous pharmaceutical substances. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man* **13**:1-255.
- Abramov I, Park MT, Belykh E, Dru AB, Xu Y, Gooldy TC, Scherschinski L, Farber SH, Little AS, Porter RW, Smith KA, Lawton MT, Eschbacher JM and Preul MC (2023) Intraoperative confocal laser endomicroscopy: prospective in vivo feasibility study of a clinical-grade system for brain tumors. *J Neurosurg* **138**:587-597.
- Acerbi F, Pollo B, De Laurentis C, Restelli F, Falco J, Vetrano IG, Broggi M, Schiariti M, Tramacere I, Ferroli P and DiMeco F (2020) Ex Vivo Fluorescein-Assisted Confocal Laser Endomicroscopy (CONVIVO® System) in Patients With Glioblastoma: Results From a Prospective Study. *Front Oncol* **10**:606574.
- Acs B, Rantalainen M and Hartman J (2020) Artificial intelligence as the next step towards precision pathology. *J Intern Med* **288**:62-81.
- Allen JD, Towne SD, Jr., Maxwell AE, DiMartino L, Leyva B, Bowen DJ, Linnan L and Weiner BJ (2017) Measures of organizational characteristics associated with adoption and/or implementation of innovations: A systematic review. *BMC Health Serv Res* **17**:591.
- Angelis A, Lange A and Kanavos P (2018) Using health technology assessment to assess the value of new medicines: results of a systematic review and expert consultation across eight European countries. *Eur J Health Econ* **19**:123-152.
- Belykh E, Miller EJ, Patel AA, Yazdanabadi MI, Martirosyan NL, Yagmurlu K, Bozkurt B, Byvaltsev VA, Eschbacher JM, Nakaji P and Preul MC (2018) Diagnostic Accuracy of a Confocal Laser Endomicroscope for In Vivo Differentiation Between Normal Injured And Tumor Tissue During Fluorescein-Guided Glioma Resection: Laboratory Investigation. *World Neurosurg* **115**:e337-e348.
- Belykh E, Zhao X, Ngo B, Farhadi DS, Kindelin A, Ahmad S, Martirosyan NL, Lawton MT and Preul MC (2021) Visualization of brain microvasculature and blood flow in vivo: Feasibility study using confocal laser endomicroscopy. *Microcirculation* **28**:e12678.
- Berkefeld J (2015) Leitlinienarbeit der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie e. V. *Clinical Neuroradiology* **25**:109-110.
- Carniol PJ, Heffelfinger RN and Grunebaum LD (2018) Evaluating New Technology. *Facial Plast Surg Clin North Am* **26**:253-257.
- Charalampaki C and Schlegel J (2019) Confocal-Assisted Fluorescence Resection of Low-Grade Gliomas. *Neurosurgery* **66**.
- Charalampaki P and Kakaletri I (2021) Confocal Laser Endomicroscopy in Oncological Surgery. *Diagnostics (Basel)* **11**.
- Chaudoir SR, Dugan AG and Barr CH (2013) Measuring factors affecting implementation of health innovations: a systematic review of structural, organizational, provider, patient, and innovation level measures. *Implement Sci* **8**:22.
- Childers CP and Maggard-Gibbons M (2018) Understanding Costs of Care in the Operating Room. *JAMA Surgery* **153**:e176233-e176233.

- Damschroder LJ, Aron DC, Keith RE, Kirsh SR, Alexander JA and Lowery JC (2009) Fostering implementation of health services research findings into practice: a consolidated framework for advancing implementation science. *Implementation Science* **4**:50.
- Damschroder LJ, Reardon CM, Widerquist MAO and Lowery J (2022) The updated Consolidated Framework for Implementation Research based on user feedback. *Implement Sci* **17**:75.
- Duong MT, Rauschecker AM and Mohan S (2020) Diverse Applications of Artificial Intelligence in Neuroradiology. *Neuroimaging Clin N Am* **30**:505-516.
- Fotteler M, Heninger L, Holl F, Schlegel J and Swoboda W (2019) Confocal Laser Endomicroscopy for Intraoperative Tumor Assessment: Development of a Conceptual Model for an Evaluation Study. *Studies in health technology and informatics* **262**:376-379.
- Fotteler ML, Liesche-Starnecker F, Brielmaier MC, Schobel J, Gempt J, Schlegel J and Swoboda W (2021) Socio-Organizational Impact of Confocal Laser Endomicroscopy in Neurosurgery and Neuropathology: Results from a Process Analysis and Expert Survey. *Diagnostics (Basel)* **11**.
- Fuchs FS, Zirlik S, Hildner K, Schubert J, Vieth M and Neurath MF (2013) Confocal laser endomicroscopy for diagnosing lung cancer in vivo. *Eur Respir J* **41**:1401-1408.
- Gustafson DH, Sainfort F, Eichler M, Adams L, Bisognano M and Steudel H (2003) Developing and testing a model to predict outcomes of organizational change. *Health Serv Res* **38**:751-776.
- Hassan S, Laryea D, Mahteme H, Felth J, Fryknäs M, Fayad W, Linder S, Rickardson L, Gullbo J, Graf W, Pählman L, Glimelius B, Larsson R and Nygren P (2011) Novel activity of acriflavine against colorectal cancer tumor cells. *Cancer Sci* **102**:2206-2213.
- Höhne J, Schebesch KM, Zoubaa S, Proescholdt M, Riemenschneider MJ and Schmidt NO (2021) Intraoperative imaging of brain tumors with fluorescein: confocal laser endomicroscopy in neurosurgery. Clinical and user experience. *Neurosurg Focus* **50**:E19.
- Hosny A, Parmar C, Quackenbush J, Schwartz LH and Aerts H (2018) Artificial intelligence in radiology. *Nat Rev Cancer* **18**:500-510.
- Karsy M, Akbari SH, Limbrick D, Leuthardt EC, Evans J, Smyth MD, Strahle J, Leonard J, Cheshier S and Brockmeyer DL (2019) Evaluation of pediatric glioma outcomes using intraoperative MRI: a multicenter cohort study. *Journal of neuro-oncology* **143**:271-280.
- Keith RE, Crosson JC, O'Malley AS, Crompton D and Taylor EF (2017) Using the Consolidated Framework for Implementation Research (CFIR) to produce actionable findings: a rapid-cycle evaluation approach to improving implementation. *Implementation Science* **12**:15.
- Kochevar LK and Yano EM (2006) Understanding health care organization needs and context. Beyond performance gaps. *J Gen Intern Med* **21 Suppl 2**:S25-S29.
- Marselos M and Vainio H (1991) Carcinogenic properties of pharmaceutical agents evaluated in the IARC Monographs programme. *Carcinogenesis* **12**:1751-1766.
- Martirosyan NL, Cavalcanti DD, Eschbacher JM, Delaney PM, Scheck AC, Abdelwahab MG, Nakaji P, Spetzler RF and Preul MC (2011) Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green to detect the boundary of infiltrative tumor. *J Neurosurg* **115**:1131-1138.
- McKinsey and Canada C (2008) Breaking away from the pack: Enhancing Canada's global competitiveness, McKinsey and Company Toronto, Canada.
- Pavlov V, Meyronet D, Meyer-Bisch V, Armoiry X, Pikul B, Dumot C, Beuriat P-A, Signorelli F and Guyotat J (2016) Intraoperative Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy in Surgery and Stereotactic Biopsy of Low-Grade and High-Grade Gliomas: A Feasibility Study in Humans. *Neurosurgery* **79**:604-612.

- Peyre M, Clermont-Taranchon E, Stemmer-Rachamimov A and Kalamarides M (2013) Miniaturized handheld confocal microscopy identifies focal brain invasion in a mouse model of aggressive meningioma. *Brain Pathol* **23**:371-377.
- Restelli F, Mathis AM, Höhne J, Mazzapicchi E, Acerbi F, Pollo B and Quint K (2022) Confocal laser imaging in neurosurgery: A comprehensive review of sodium fluorescein-based CONVIVO preclinical and clinical applications. *Front Oncol* **12**:998384.
- Rieckmann TR, Abraham AJ and Bride BE (2016) Implementation of Motivational Interviewing in Substance Use Disorder Treatment: Research Network Participation and Organizational Compatibility. *J Addict Med* **10**:402-407.
- Romm EL and Tsigelny IF (2020) Artificial Intelligence in Drug Treatment. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **60**:353-369.
- Saluja S, Silverstein A, Mukhopadhyay S, Lin Y, Raykar N, Keshavjee S, Samad L and Meara JG (2017) Using the Consolidated Framework for Implementation Research to implement and evaluate national surgical planning. *BMJ Glob Health* **2**:e000269-e000269.
- Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T and Seifert V (2011) Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* **12**:997-1003.
- Snowdon AW, Bassi H, Scarffe AD and Smith AD (2015) Reverse innovation: an opportunity for strengthening health systems. *Global Health* **11**:2-2.
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F and Reulen HJ (2006) Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* **7**:392-401.
- Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Opperl F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K and Pietsch T (2008) Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* **62**:564-576; discussion 564-576.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E and Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**:987-996.
- Suchorska B, Weller M, Tabatabai G, Senft C, Hau P, Sabel MC, Herrlinger U, Ketter R, Schlegel U, Marosi C, Reifenberger G, Wick W, Tonn JC and Wirsching HG (2016) Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma-results from the DIRECTOR trial. *Neuro Oncol* **18**:549-556.
- Villalobos Dintrans P, Bossert TJ, Sherry J and Kruk ME (2019) A synthesis of implementation science frameworks and application to global health gaps. *Glob Health Res Policy* **4**:25-25.
- Wallace MB, Meining A, Canto MI, Fockens P, Miehlke S, Roesch T, Lightdale CJ, Pohl H, Carr-Locke D, Löhr M, Coron E, Filoche B, Giovannini M, Moreau J, Schmidt C and Kiesslich R (2010) The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* **31**:548-552.
- Watson DP, Adams EL, Shue S, Coates H, McGuire A, Chesher J, Jackson J and Omenka OI (2018) Defining the external implementation context: an integrative systematic literature review. *BMC health services research* **18**:209-209.
- Watson X, D'Souza J, Cooper D and Markham R (2021) Artificial Intelligence in Cardiology: Fundamentals and Applications. *Intern Med J*.
- Weinstein MC, Torrance G and McGuire A (2009) QALYs: the basics. *Value Health* **12 Suppl 1**:S5-9.

Ziebart A, Stadniczuk D, Roos V, Ratliff M, von Deimling A, Hänggi D and Enders F (2021) Deep Neural Network for Differentiation of Brain Tumor Tissue Displayed by Confocal Laser Endomicroscopy. *Front Oncol* **11**:668273.

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung einer in vivo Untersuchung mit dem Digital Biopsy Tool CONVIVO® der ZEISS Gruppe, Quelle: <https://www.zeiss.ch/meditec/produkte/neurochirurgie/digitales-biopsietool/convivo.html>, aufgerufen am 06.06.2022

Abb. 2: Das in dieser Arbeit verwendete Konfokale Laserendomikroskop (Digital Biopsy Tool CONVIVO®, Quelle: <https://www.zeiss.ch/meditec/produkte/neurochirurgie/digitales-biopsietool/convivo.html>, aufgerufen am 06.06.2022

Abb. 3: Topisch mit Natriumfluorescein gefärbte quer gestreifte Muskulatur (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 4: Topisch mit Acriflavin gefärbte quergestreifte Skelettmuskulatur mit länglichen Zellkernen (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 5: Metastase eines Ovariakarzinoms im Cerebellum (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 6: Tumorfrees Kleinhirn (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und am HE-gefärbten FFPE-Präparat (rechts: HE-Färbung, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahme)

Abb. 7: Metastase eines Ovariakarzinoms (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und am HE-gefärbten FFPE-Präparat (rechts: HE-Färbung, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahme)

Abb. 8: Intramuskuläre Metastase eines Adenokarzinoms (CUP-Syndrom) (links) und tumorfreier Skelettmuskel (M. iliopsoas) (rechts) (topische Färbungen mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Abb. 9: Glioblastom, ZNS WHO Grad 4 (links) und tumorfreier Cortex (Frontallappen) (rechts) (topische Färbungen mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Abb. 10: Glioblastom, ZNS WHO Grad 4, mit Gefäßproliferaten (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und am HE-gefärbten FFPE-Schnitt (rechts: HE-Färbung, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahme)

Abb. 11: Glioblastom, ZNS WHO Grad 4, mit Palisadenstellung und Nekrose (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) sowie am HE-gefärbten FFPE-Schnitt (rechts: HE-Färbung, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahme)

Abb. 12: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO Grad 1, mit teils wirbelartigem Wachstumsmuster (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und am HE-gefärbten FFPE-Schnitt (rechts: HE-Färbung, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahme)

Abb. 13: Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3, mit Gefäßproliferaten (blaue Pfeilmarkierung: Blutgefäß, exemplarisch) (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 14: 2 Schwannomproben, ZNS WHO Grad 1, mit in Strömen angeordneten Tumorzellen in sog. AntoniA-Arealen und aufgelockerten AntoniB-Arealen (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Abb. 15: Metastase eines Plattenepithelkarzinoms im Gefrierschnitt (links: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und in der Fluoreszenzmikroskopie (rechts: Färbung mit Natriumfluorescein, konventionelle Fluoreszenzmikroskopie, eigene Aufnahme)

Abb. 16: Metastase eines Plattenepithelkarzinoms (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 17: Gefrierschnitt eines Atypisches Meningeoms, ZNS WHO Grad 2 (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung eines Gefrierschnitts, eigene Aufnahme)

Abb. 18: Transitionelles Meningeom, ZNS WHO Grad 1 (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 19: Atypisches Meningeom, ZNS WHO Grad 2, mit Ausbildung von Wirbeln und zentraler Verkalkung (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 20: Meningotheliomatöses Meningeom, ZNS WHO Grad 1 (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Abb. 21: Fibroblastisches Meningeom, ZNS WHO Grad 1 (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Abb. 22: Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3 (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 23: Pilozytisches Astrozytom, ZNS WHO Grad 1 (blaue Pfeilmarkierung: Blutgefäß, rosa Pfeilmarkierungen: piloide Zellfortsätze) (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 24: Pineozytom, ZNS WHO Grad 1, mit Acriflavin (links: topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme) und Natriumfluorescein (rechts: topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bild, eigene Aufnahme)

Abb. 25: Kleinhirn, Färbung mit Acriflavin (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 26: Quergestreifte Skelettmuskulatur, Färbung mit Acriflavin (topische Färbung mit Acriflavin, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 27: Ungefärbte Negativkontrolle mit Autofluoreszenz (Oligodendrogliom, ZNS WHO Grad 3) (ungefärbtes Gewebe, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 28: Erythrozyten vor fluoreszierendem Hintergrund (topische Färbung mit Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 29: Gefäßproliferate eines EGFR-überexprimierenden Glioblastoms, ZNS WHO Grad 4 (immunhistochemische Färbung mit dem an Natriumfluorescein gekoppelten monoklonalen IgG Anti-EGFR-Antikörper (neutralizing), clone LA1, Alexa Fluor® 488 conjugate (mouse), CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 30: Vergleich zwischen Tumorzentrum und Infiltrationszone eines Glioblastoms, ZNS WHO Grad 4, mit dem Digital Biopsy Tool CONVIVO® (intraoperative intravenöse Administration von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung ex vivo, eigene Aufnahmen)

Abb. 31: Vergleich von histomorphologischen Charakteristika in der CLE mit dem HE-gefärbten intraoperativen Gefrierschnitt und dem HE-gefärbten FFPE Schnitt (jeweils linke Aufnahmen in Abb. 31.1 - 31.3: intravenöse intraoperative Farbstoffadministrationen von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen; jeweils mittlere und rechte Aufnahmen in Abb. 31.1-31.3: HE-Färbungen, konventionelle Lichtmikroskopie, eigene Aufnahmen)

Abb. 32: Metastase eines Caecumkarzinoms (intravenöse intraoperative Farbstoffadministrationen von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Abb. 33: Arteriovenöse Malformation (intravenöse intraoperative Farbstoffadministrationen von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Abb. 34: Neurofibrom (intravenöse intraoperative Farbstoffadministrationen von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahme)

Abb. 35: Ewing Sarkom (blaue Pfeilmarkierung: mutmaßliche Mitose) (intravenöse intraoperative Farbstoffadministrationen von Natriumfluorescein, CLE-Bildgebung, eigene Aufnahmen)

Abb. 36: Implementationsanalyse der Einführung der CLE in die Neurochirurgie (eigene Abbildung, basierend auf Kriterien des CFIR) (Damschroder et al., 2022)

Abb. 37: Prozess der Einführung der ex vivo CLE aus dem neuropathologischen Labor in die Neurochirurgie

Folgende der in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen wurden für Webzwecke der ZEISS Gruppe verwendet und sind auch unter folgender Webadresse zu sehen: <https://www.zeiss.ch/meditec/produkte/neurochirurgie/digitales-biopsietool/convivo.html>, aufgerufen am 21.11.2022): Die rechte Abbildung und ein Teil der linken Abbildung (ohne die hier eingefügten Pfeilmarkierungen) in Abb. 12, das linke Bild von Abbildung 31 sowie ein Teil der Abbildung 32.1.

10. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Auflistung der im Labor untersuchten Proben und Färbungen
- Tabelle 2: Untersuchte Tumorentitäten im Rahmen der klinischen Pilotstudie
- Tabelle 3: Mit der CLE untersuchte Gefrierschnitte (Färbung mit Natriumfluorescein)
- Tabelle 4: Übersetzung der Bereiche des CFIR und Anwendung auf die durchgeführte klinische Pilotstudie

* Die erste Spalte (*Name des Konstruktes*) und die zweite Spalte (*Definition des Konstruktes*) der Tabelle 4 sind Übersetzungen der Tabelle 3 (*Table 3 Updated CFIR domain and construct definitions*) aus der Publikation *The updated Consolidated Framework for Implementation Research based on user feedback* (Damschroder et al., 2022)

11. Danksagung

A.M.D.G.