

Aus Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Multiphotonenmikroskopie: Etablierung einer neuen diagnostischen Methode zur  
intraoperativen Evaluierung von Tumoren im Kindesalter

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Peter Schreiber  
aus Worms

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
1. Hintergrund und Zielsetzung der Dissertation .....	1
1.1 Onkologische Erkrankungen im Kindesalter.....	1
1.2. Multiphotonenmikroskopie .....	2
1.3 Zielsetzung .....	3
2. Literaturdiskussion .....	4
2.1 Tumoren im Kindesalter.....	4
2.1.1 Neuroblastom.....	4
2.1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	4
2.1.1.2 Klinik.....	7
2.1.2.3 Neuroblastom-Screening.....	8
2.1.2.4 Diagnostik.....	8
2.1.2.5 Therapie .....	11
2.1.3 Rhabdomyosarkom.....	16
2.1.3.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	16
2.1.3.2 Klinik.....	17
2.1.3.3 Diagnostik.....	17
2.1.3.4 Therapie .....	18
2.2 Intraoperative Schnellschnittdiagnostik .....	22
2.3 Multiphotonenmikroskopie .....	25
2.3.1 Grundlagen .....	25
2.3.2 Second Harmonic Generation.....	28
2.3.3 Anwendungen .....	29
2.3.3.1 Niere, ableitende Harnwege und Prostata .....	29
2.3.3.2 Lunge.....	30
2.3.3.3 Weibliche Brust.....	31
2.3.3.4 Haut und Hautanhangsgebilde .....	31
2.3.3.5 Magen-Darm-Trakt .....	32
3. Material und Methoden.....	34
3.1 Ethikantrag, Patientenschutz und Registrierung .....	34
3.2 Gewebeschnitte .....	34
3.3 Multiphotonenmikroskop.....	34
3.4 Lichtmikroskop.....	36
3.5 Studie.....	36

3.5.1 Stichprobe .....	36
3.5.2 Software .....	37
3.5.3 Design und Ablauf der Studie .....	37
3.5.4 Statistische Auswertung .....	40
4. Ergebnisse .....	42
4.1 Ergebnisse der Aufnahmen .....	42
4.2 Internationale Studie .....	53
4.2.1 Teilnehmer .....	53
4.2.2 Ergebnisse der Umfrage .....	54
4.2.2.1 Ergebnisse der Single-Choice-Auswahl .....	54
Gesunde Organe .....	54
Solide Tumoren des Neugeborenen und Kleinkindes .....	55
4.2.2.2 Ergebnisse der Gewebecharakteristika .....	57
Gesunde Organe .....	57
Solide Tumoren des Neugeborenen und Kleinkindes .....	61
5. Diskussion .....	63
5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse .....	63
5.2 Diskussion der Methoden .....	63
5.2.1 Multiphotonenmikroskopie .....	63
5.2.2 Lichtmikroskopie .....	64
5.2.3 Studie .....	65
5.3 Diskussion der Ergebnisse .....	65
5.3.1 Teilnehmer .....	65
5.3.2 Single Choice Auswahl .....	66
5.3.3 Gewebecharakteristika .....	67
5.4 Limitationen der Studie .....	71
5.5 Ausblick und klinische Anwendbarkeit .....	71
6. Zusammenfassung .....	73
7. Literaturverzeichnis .....	75
8. Danksagung .....	84
9. Lebenslauf .....	85

## Abkürzungsverzeichnis

ARMS	Alveoläres Rhabdomyosarkom
ASCT	Autologe Stammzelltransplantation
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
COG	Children's Oncology Group
DGP	Deutsche Gesellschaft für Pathologie
ERMS	Embryonales Rhabdomyosarkom
GPOH	Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICCC	International Classification of Childhood Tumor
IGF1	Insulin-like-growth-factor 2
INPC	International Neuroblastoma Pathology Committee
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IRS	Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies
LM	Lichtmikroskop
MIBG	Metaiodobenzylguanidin
MPM	Multiphotonenmikroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
NB	Neuroblastom
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PNCT	peripheral nerves cell tumor (Peripherer Nervenzelltumor)
RMS	Rhabdomyosarkom
SHG	second harmonic generation
THG	third harmonic generation
TNM	Pathologische Klassifikation von Tumoren der UICC (2) <i>T= Größe und Ausbreitung des Primärtumors</i> <i>N= Lymphknotenmetastasen</i> <i>M= Fernmetastasen</i>
UICC	Union internationale contre le cancer
VAC	Vincristin - Actinomycin D - Cyclophosphamid

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Altersverteilung der Krebsneuerkrankungen in Deutschland.....	1
Abb. 2: Prozentuelle Verteilung der Krebsdiagnosen. ....	2
Abb. 3: Durchschnittsalter bei Tumordiagnose. ....	5
Abb. 4: International Neuroblastoma Pathology Classification .....	9
Abb. 5: A Method for the Rapid Preparation of Fresh Tissues for the Microscope ...	23
Abb. 6: Jablonski Diagramm .....	26
Abb. 7: Schematischer Aufbau eines Multiphotonenmikroskops. ....	27
Abb. 8: Multiphotonen-Aufnahme von Nierengewebe eines Kleinkindes.....	28
Abb. 9: Second Harmonic Generation-Signal. Hodengewebe des Kleinkindes.....	29
Abb. 10: MPM-Arbeitsplatz.....	36
Abb. 11: Beispielfrage zum Hodengewebe .....	39
Abb. 12: Multiphotonen-Aufnahme von Herzmuskelgewebe .....	43
Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahme von Herzmuskelgewebe.....	43
Abb. 14: Multiphotonen-Aufnahme von Nierengewebe.....	44
Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahme von Nierengewebe. ....	44
Abb. 16: Multiphotonen-Aufnahme von Lungengewebe. ....	45
Abb. 17: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lungengewebe.....	45
Abb. 18: Multiphotonen-Aufnahme von Lebergewebe. ....	46
Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahme von Lebergewebe .....	46
Abb. 20: Multiphotonen-Aufnahme von Hodengewebe.....	47
Abb. 21: Lichtmikroskopische Aufnahme von Hodengewebe. ....	47
Abb. 22: Multiphotonen-Aufnahme von Nebennierengewebe.....	48
Abb. 23: Lichtmikroskopische Aufnahme von Nebennierengewebe. ....	48
Abb. 24: Multiphotonen-Aufnahmen von Nebennierengewebe mit diagnostiziertem Neuroblastom .....	49
Abb. 25: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Nebennierengewebe mit diagnostiziertem Neuroblastom .....	50
Abb. 26: Multiphotonen-Aufnahmen von Harnblasengewebe mit diagnostiziertem Rhabdomyosarkom. ....	51
Abb. 27: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Harnblasengewebe mit diagnostiziertem Rhabdomyosarkom .....	52
Abb. 28: Verteilung der Studienteilnehmer .....	53
Abb. 29: Skala zur Bewertung der Organ- und Tumorcharakteristika.....	57

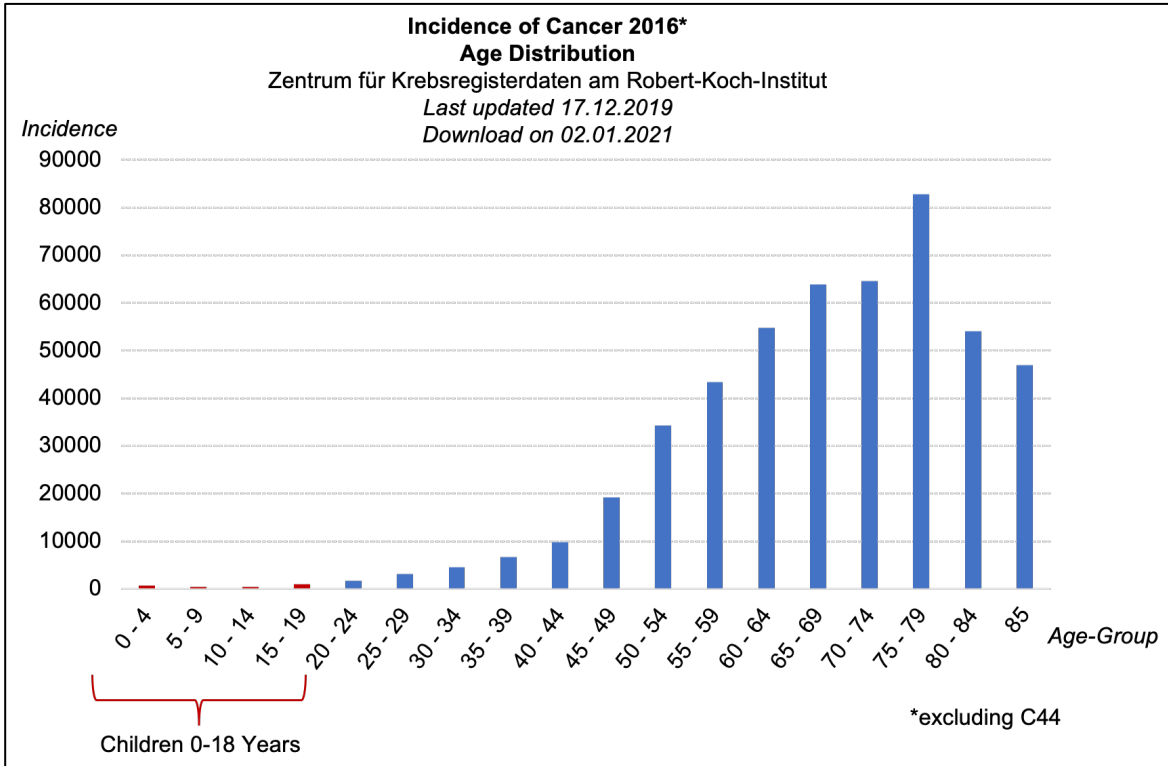
## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: International Classification of Childhood Cancer – third Edition .....	5
Tab. 2: INSS und INRGSS im Vergleich .....	10
Tab. 3: Prognoseabschätzung beim Rhabdomyosarkom .....	18
Tab. 4: IRS Clinical Group Classification .....	19
Tab. 5: TNM Pre-Treatment Classification .....	19
Tab. 6: COG-STS Risk Stratification .....	20
Tab. 7: Auswahlmöglichkeiten der single Choice Fragen .....	38
Tab. 8: Erkennungsraten der Organe.....	54
Tab. 9: Erkennungsraten der Tumoren .....	56
Tab. 10: Ergebnisse der Organdetails (Lebergewebe) .....	57
Tab. 11: Ergebnisse der Organdetails (Lungengewebe) .....	58
Tab. 12: Ergebnisse der Organdetails (Herzmuskelgewebe).....	58
Tab. 13: Ergebnisse der Organdetails (Nierengewebe).....	59
Tab. 14: Ergebnisse der Organdetails (Nebennierengewebe).....	59
Tab. 15: Ergebnisse der Organdetails (Hodengewebe).....	60
Tab. 16: Ergebnisse der Tumordetails (Neuroblastom der Nebenniere) .....	61
Tab. 17: Ergebnisse der Tumordetails (Rhabdomyosarkom der Harnblase).....	62
Tab. 18: Organübergreifende Trends: Zellkerne .....	68
Tab. 19: Items mit guter Bewertung im MPM .....	69

# 1. Hintergrund und Zielsetzung der Dissertation

## 1.1 Onkologische Erkrankungen im Kindesalter

Krebserkrankungen bei Kindern sind relativ selten, aber umso belastender für die betroffene Familie und deren Umfeld.

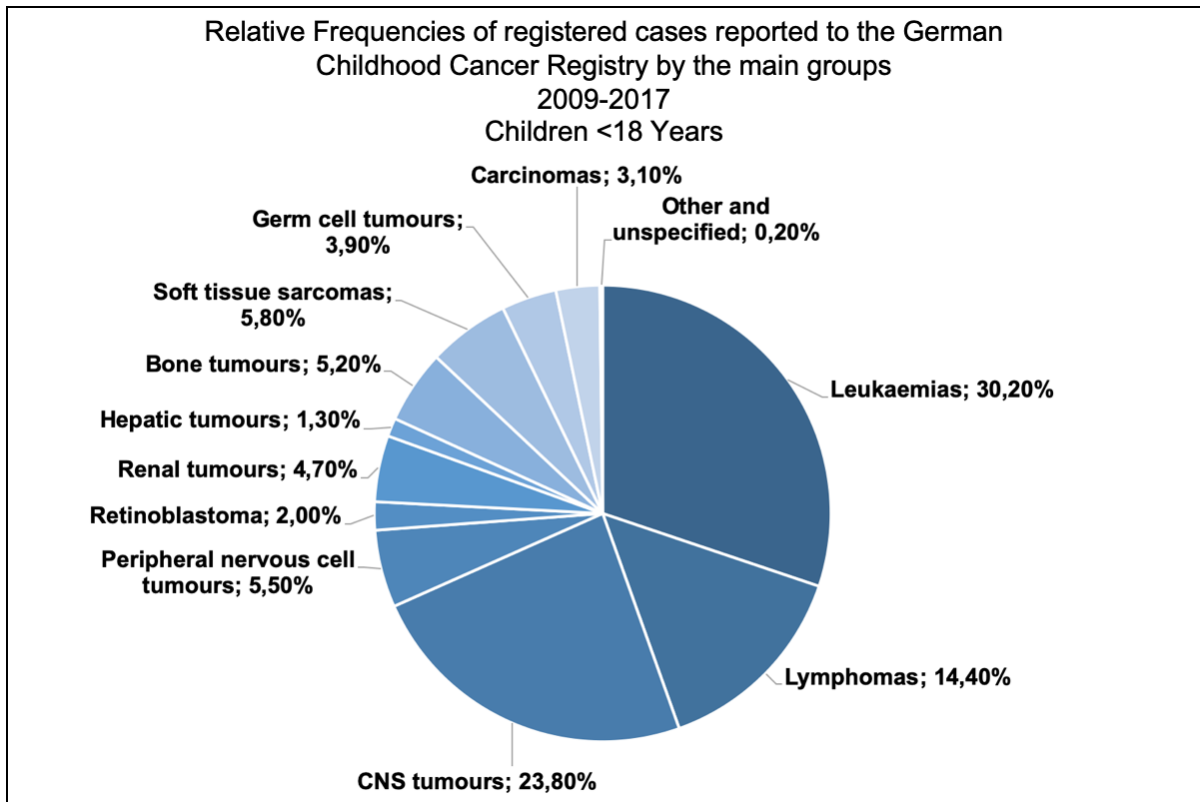


**Abb. 1:** Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten (3).

Abbildung 1 zeigt, dass Krebs im Kindesalter mit ca. 0,5% einen sehr geringen Anteil an allen Krebsdiagnosen einnimmt. Einer Besonderheit ergibt sich jedoch auch bei der Verteilung der unterschiedlichen Tumorentitäten im Kindesalter, die Abbildung 2 zeigt: Stehen bei den Kindern Leukämien, Lymphome und ZNS-Tumoren an erster Stelle, so sind es bei den Erwachsenen das Mamma-, Prostata-, Lungen- und Kolonkarzinom (4). Die typische Verteilung der Tumorarten im Kindesalter hängt dabei eng mit dem hohen Anteil an embryonalen Tumoren zusammen (5).

Aber nicht nur epidemiologisch unterscheidet sich Krebs im Kindesalter vom Krebs beim Erwachsenen – auch in der Früherkennung und in der Therapieentscheidung ergeben sich große Unterschiede, die Kinder zu einer besonderen Patientengruppe machen.





**Abb. 2:** Prozentuelle Verteilung der Krebsdiagnosen im Zeitraum von 2009-2016. Dargestellt wird die Inzidenz für die Altersgruppe der unter 18-Jährigen. Daten aus Kaatsch P et al. (2019) (6)

Für die chirurgischen Fächer sind onkologische Operationen im Kindesalter mit einigen Besonderheiten verbunden, ist doch das Ziel, unter Erhaltung von möglichst viel gesundem Gewebe einen Tumor in den meisten Fällen weitestgehend restlos zu entfernen. Zur Verifizierung der Resektionsgrenzen verwendet man in den meisten Fällen den intraoperativen Schnellschnitt mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE), der seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts verwendet wird. Präparation und Färbung dauern in der Regel 20 Minuten (7).

## 1.2. Multiphotonenmikroskopie

In vielen Laboren und Kliniken wird an der Multiphotonenmikroskopie (MPM) geforscht - einer Technik, die es ermöglicht unfixiertes und ungefärbtes Gewebe mikroskopisch zu analysieren. Sogar vitales Gewebe und die damit verbundenen Stoffwechsellvorgänge können mit dieser Methode in Echtzeit beobachtet werden (8). Es liegen zwar Daten und Studien zur Diagnostik von Tumoren mittels Multiphotonenmikroskopie vor, systematisch-vergleichende Bewertung von MPM-Aufnahmen und entsprechenden lichtmikroskopischen Aufnahmen HE-gefärbter

Präparate von kindlichen Geweben und Tumoren wurden jedoch bislang noch nicht durchgeführt.

### **1.3 Zielsetzung**

In der vorliegenden Dissertation wird untersucht, ob die Multiphotonenmikroskopie ein geeignetes Instrument darstellt, um eine intraoperative Gewebsdiagnostik an kindlichen Geweben und soliden Tumoren durchzuführen, welche letztendlich zum Ziel hat, die Operations- und Narkosezeit durch eine Mikroskopie in Echtzeit zu verkürzen. Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, wurden Aufnahmen von Organschnitten des Kindes mittels MPM und Lichtmikroskop angefertigt und in einer Studie durch Kinderpathologen\* weltweit auf Gleichwertigkeit begutachtet.

Das Ziel dieser Studie ist daher eine Beurteilung, ob die Aussagekraft von MPM-Aufnahmen von ungefärbten Gewebeschnitten vergleichbar ist mit derjenigen von lichtmikroskopischen Schnitten identischer HE-gefärbter Präparate.

*\* Ausschließlich zum Zweck der besseren Lesbarkeit wird auf die geschlechtsspezifische Schreibweise verzichtet. Alle personenbezogenen Bezeichnungen in dieser Dissertation sind selbstverständlich geschlechtsneutral zu verstehen.*

## **2. Literaturdiskussion**

### **2.1 Tumoren im Kindesalter**

Im Folgenden wird auf die beiden soliden Tumoren des Kindesalters eingegangen, die mittels Multiphotonenmikroskopie genauer untersucht wurden: Das Neuroblastom und das Rhabdomyosarkom.

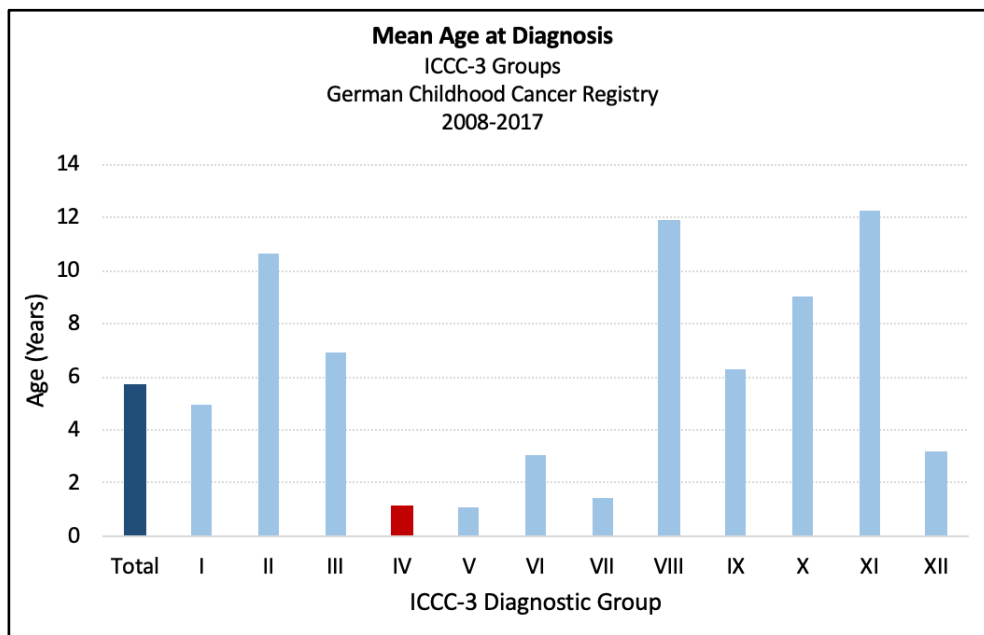
#### **2.1.1 Neuroblastom**

##### ***2.1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie***

„Betroffen ist eines von 6000 Kindern unter 15, Jungen erkranken etwa 40% häufiger als Mädchen.“ (5) – so beschreibt der Bericht des Kinderkrebsregisters 2019 die Epidemiologie der Neuroblastome.

Sie stellen mit 6-8 Prozent die häufigsten extrakraniellen soliden Tumoren in der Altersgruppe der 0-14-Jährigen dar. Im Patientenkollektiv der unter 1-Jährigen belegen die peripheren Tumoren des Nervensystems (peripheral nerves cell tumors - PNCT) mit einer relativen Häufigkeit von 29,2% den ersten Platz unter allen Tumorentitäten (6,9).

Betrachtet man die Epidemiologie der Neuroblastome genauer, so fällt eine starke Differenz zwischen den altersbezogenen Inzidenzen auf: Die sehr heterogene Gruppe der Tumoren im Kindesalter weist ein mittleres Patientenalter bei Diagnose von 5 Jahren und 9 Monaten auf. Mit einem durchschnittlichen Alter von 14 Monaten bei Diagnose zählen der Neuroblastome mit zu den jüngsten Patienten im Kinderkrebsregister (6,10).



**Abb. 3:** Durchschnittsalter bei Tumordiagnose. Daten aus Kaatsch, P et al. (2019) (6).

ICCC-3 Group	
I	Leukaemias, myeloproliferative and myelodysplastic diseases
II	Lymphomas and reticuloendothelial neoplasms
III	CNS and miscellaneous intracranial and intraspinal neoplasms
IV	Neuroblastom and other peripheral nervous cell tumors
V	Retinoblastoma
VI	Renal Tumours
VII	Hepatic tumours
VIII	Malignant bone tumours
IX	Soft tissue and other extraosseous sarcomas
X	Germ cell tumours, trophoblastic tumours and neoplasms of gonads
XI	Other malignant epithelial neoplasms and malignant melanomas
XII	Other und unspecified neoplasms

**Tab. 1:** International Classification of Childhood Cancer - third Edition. Nach Steliarova-Foucher et al. (2005) (11)

Die Überlebenschancen für Kinder, die an Neuroblastomen erkrankt sind, müssen differenziert betrachtet werden. Maßgeblich für eine Prognose sind hierbei:

- Genetik und Laborparameter: Hier spielen vor allem eine MYCN-Amplifikation, 1p- und 11q-Deletion, Laktatdehydrogenase und der Ferritinspiegel eine Rolle. Betrachtet man beispielsweise die Prognose mit und ohne MYCN Amplifikation, differieren die 5-Jahres-Überlebensraten stark: 41% bei MYCN-Amplifikation vs. 82% ohne MYCN-Amplifikation (12).

- Alter bei Diagnose: Ältere Kinder haben eine schlechtere Prognose (13). Teilt man Kinder im INSS Stadium 4s in die Gruppen „unter“ vs. „über“ 18 Monate auf, so lag 2004 das 5-Jahres-Überleben bei 85% (<18 Monate) vs. 47% (>18 Monate). Die Prognose erfährt somit eine deutliche Änderung nach dem 12. bis 18. Lebensmonat (12).
- Tumorstadium: Je nach INSS Tumorstadium unterscheidet sich die Prognose. Lag beispielsweise 2004 die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für die Stadien 1 bis 3 bei 91%, so lag die für das Stadium 4 bei 38%.

Ergänzend lässt sich feststellen, dass die Überlebensraten bei Neuroblastomen für alle Stadien in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen sind. Selbst in der prognostisch schlechtesten Konstellation (INSS 4s + Alter > 18 Monate) stieg das 10-Jahres-Überleben von 2% im Jahr 1979 auf 38% im Jahr 2004 (12).

Das Neuroblastom, ein embryonaler Tumor, entsteht durch einen Fehler in der Reifung der Neuralleiste, wodurch Neuroblasten in einem unreifen Stadium verweilen. Es kann daher potentiell an allen Punkten des sympathischen Nervensystems entstehen, wobei sich über 40% der Fälle im Nebennierenmark präsentieren (14). Weitere Manifestationsorte sind typischerweise paraspinale Ganglien und der sympathische Grenzstrang (10). Metastasen hingegen befallen in ca. 80% der Fälle das Knochenmark, aber auch Lymphknoten, Leber, Haut und Knochen können betroffen sein (9).

Bei bis zu 98% der Neuroblastome handelt es sich um den sogenannten sporadischen Typ, welcher strikt vom hereditären Neuroblastom abzugrenzen ist. Zahlreiche Reviews betrachten für sporadische Neuroblastoma potentielle Risikofaktoren, die mit einem erhöhten Risiko zur Tumorbildung einherzugehen scheinen. Heck et al. (2009) benennt vor allem Alkoholkonsum in der Schwangerschaft, berufliche Exposition mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und Holzstäuben, Diuretika und Schmerzmittel in der Schwangerschaft und ein niedriges Geburtsgewicht als assoziierte Faktoren (14). Des Weiteren wird der Konsum illegaler Drogen – insbesondere Marihuana – während der Schwangerschaft als besonders cancerogen beschrieben (15). Protektiv nicht nur gegen Neuralrohrdefekten erscheint eine Substitution von Vitaminen und Folsäure während der Schwangerschaft. Das Vorhandensein von Allergien und/ oder Asthma scheint ebenfalls protektiv. Bei

anderen Faktoren, die Gegenstand der Diskussion sind, gestaltet es sich schwierig, da z.B. die Auswirkungen von Hormonpräparaten aufgrund der geringen Datenmengen nicht abschließend bewertet werden können. Auf der anderen Seite gibt es zudem mögliche Faktoren wie das Alter der Mutter oder die Auswirkungen von Röntgenstrahlen, die schlichtweg keine kausale Verbindung zur Entstehung von Neuroblastomen zulassen (14).

Eine Sonderform der Neuroblastome stellen die hereditären Neuroblastome dar. Diese machen zwar mit 1-2% einen sehr geringen Anteil aller Neuroblastome aus, sind jedoch gut untersucht. Im letzten Jahrzehnt konnten mit Mutationen im Anaplastic-Lymphoma-Kinase-Gen und dem Transkriptionsfaktor PHOX2B zwei Mutationen entdeckt werden, die beide labordiagnostisch bzw. genetisch in dieser seltenen Form des Neuroblastoms nachweisbar sind (16,17). Eine Untersuchung auf diese Gendefekte kann im Rahmen einer familiären Häufung erwogen werden. Die PHOX2B Mutation findet sich dabei nicht nur bei Neuroblastompatienten, sondern auch bei einigen Patienten mit Erkrankungen des enterischen Nervensystems wie dem Morbus Hirschsprung (18).

#### **2.1.1.2 Klinik**

So sehr sich die histologischen Eigenschaften von Neuroblastomen unterscheiden können, so vielfältig kann auch die Klinik sein. Der Großteil der Symptome lässt sich in zwei Gruppen einteilen: Beschwerde- und schmerzfreie Raumforderungen bzw. Veränderungen, die oftmals als Zufallsbefunde imponieren und auf der anderen Seite Veränderungen, die durch Schmerzen oder neurologische Ausfälle auffallen und dann abgeklärt werden. Raumforderungen betreffen hierbei besonders das Abdomen, bzw. das Retroperitoneum, da der Großteil der Neuroblastome im Nebennierenmark sitzt (19). Begleitend zu der unter Umständen schmerzfreien Raumforderung können Probleme beim Wasser- und Stuhlassen auftreten. Eine Kompression des Spinalkanals mit einhergehenden neurologischen Ausfällen ist ebenfalls möglich. Wird der Grenzstrang geschädigt, ist die Entstehung eines Horner-Syndroms (Miosis, Ptosis und Enophthalmus) möglich. Selten, aber sehr typisch für das Neuroblastom, ist das Auftreten von Brillenhämatomen, welche auch als *raccoon eyes* (engl. Waschbäraugen) bezeichnet werden. Ebenfalls können im Rahmen einer Kontrolluntersuchung anämische Kinder oder Kinder mit ausgeprägter Blutungsneigung auffällig werden. Nach der Abklärung anderer Ursachen wie

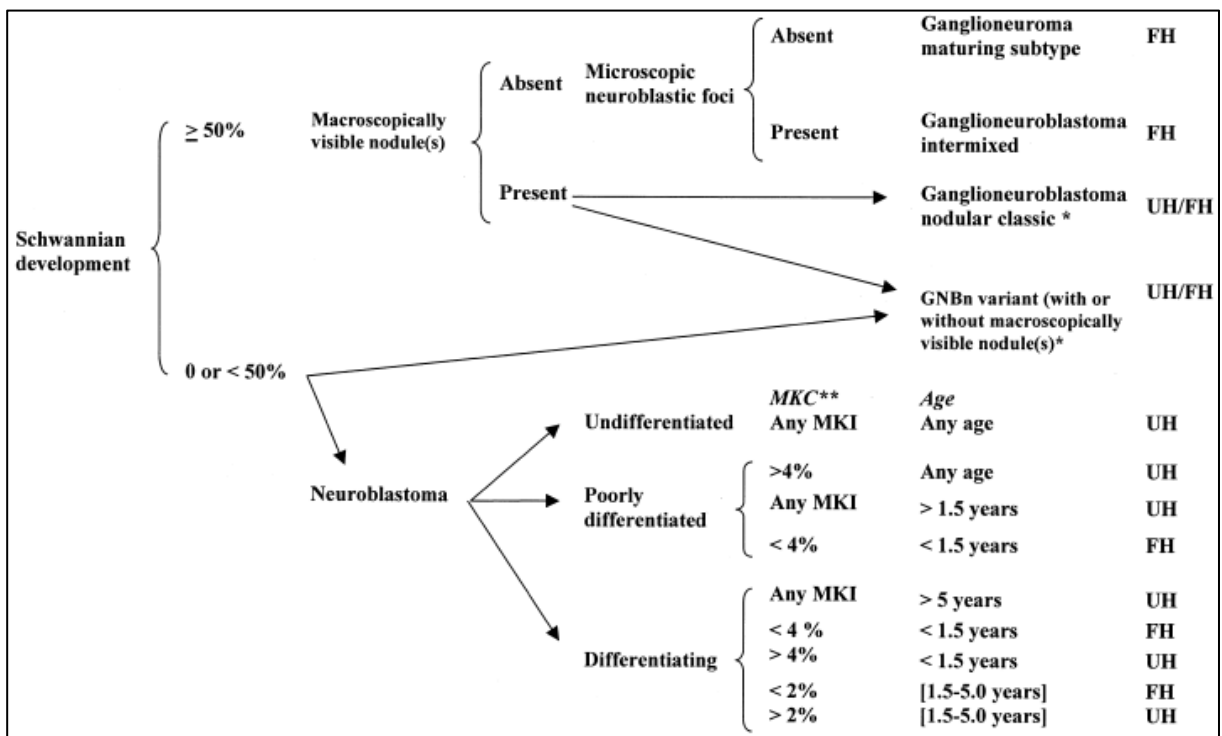
Mangelernährung, kann dies jedoch auch ein Hinweis auf einen Metastasierungsprozesses im Knochenmark sein (9, 10, 20).

### **2.1.2.3 Neuroblastom-Screening**

Um potentiell schwere Verläufe einer Neuroblastomerkrankung früher zu erkennen, wurde in den Jahren 1995 bis 2000 in Baden-Württemberg, Bremen, Hamburg, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen und Schleswig-Holstein ein Pilotprojekt zur Früherkennung durchgeführt. Es handelte sich dabei um die erste Früherkennung für Krebs im Kindesalter (21). Dabei wurden insgesamt 1.475.773 Kinder im Alter von 9 bis 18 Monaten untersucht. Da Urin einfach zu gewinnen ist, dienten Vanillinmandel- und Homovanillinsäure als Risikomarker im Urin (20). In Folge der Studie kam es zu einem Anstieg der Neuroblastomdiagnosen um 7%. High risk Neuroblastome wurden jedoch im Schnitt nicht vorzeitig diagnostiziert, ebenso wenig konnte ein Abfall der Sterblichkeit der Hoch-Risiko-Neuroblastome verzeichnet werden (12). Da damit die Zielsetzung der Studie nicht erfüllt werden konnte, wurde das Projekt eingestellt.

### **2.1.2.4 Diagnostik**

In der Tumordiagnostik neuroblastischer Tumoren spielt die histopathologische Bewertung prognostisch eine maßgebliche Rolle. Dies geschieht mit Hilfe der International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) - eine Klassifikation, bei der neben dem Alter des Patienten auch Mitoserate, Kern-Plasma-Relation und der Grad der Differenzierung erfasst werden (14,22). Eine revidierte Form der INPC, welche die Entscheidungsfindung erleichtern soll, zeigt Abb. 4. In Deutschland ist neben der INPC Klassifikation auch das Grading nach Hughes et al. üblich (23).



**Abb. 4:** International Neuroblastoma Pathology Classification. FH: Prognostisch günstige Histologie; UH: Prognostisch ungünstige Histologie; GNBn: Noduläres Ganglioneuroblastom, MKC: Mitotische und karyorrhektische Zellen; MKI: Mitose-karyorrhexis Index; \*: Für die Prognose des GNBn siehe Text und die Publikation von Umehara et al.; \*\*: MKC: 2%, 100 von 5000 Zellen, 4%, 200 von 5000 Zellen. Aus Peuchmaur et al. (2003) (24).

Die histologische Beurteilung fließt mit den Ergebnissen aus klinischer Untersuchung, Bildgebung (Röntgen, PET-CT, MRT, Szintigraphie und Sonographie), genetischer, hämatologischer und labormedizinischer Untersuchung zusammen. Letztendlich wird ein individuelles Risikoprofil für jeden Patienten bestimmt, um eine bestmögliche Therapie zu ermöglichen und somit sowohl die Unterbehandlung von high risk Neuroblastomen als auch die Überbehandlung von low risk Tumoren zu verhindern (25).

Die Planung der chirurgischen Eingriffe hängt maßgeblich vom Staging anhand des International Neuroblastoma Staging System (INSS) ab. Diese beschreibt die Ausdehnung des Tumors und kann erst während oder nach der ersten OP festgestellt werden. Ein alternatives Konzept ist das Staging Systems der International Neuroblastoma Risk Group (INRGSS) (26), das präoperativ anhand der Bildgebung eine Einschätzung des Tumors ermöglicht. Einen Vergleich der beiden Staging Systeme zeigt Tab. 2.



International Neuroblastoma Staging System (INSS)		International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS)	
Stage 1	Localized tumor with complete gross excision, with or without microscopic residual disease; representative ipsilateral lymph nodes negative for tumor microscopically (i.e., nodes attached to and removed with the primary tumor may be positive).	L1	Localized tumor not involving vital structures as defined by the list of image-defined risk factors and confined to one body compartment
Stage 2A	Localized tumor with incomplete gross excision; representative ipsilateral nonadherent lymph nodes negative for tumor microscopically.	L2	Locoregional tumor with presence of one or more image-defined risk factors
Stage 2B	Localized tumor with or without complete gross excision, with ipsilateral nonadherent lymph nodes positive for tumor. Enlarged contralateral lymph nodes must be negative microscopically		
Stage 3	Unresectable unilateral tumor infiltrating across the midline, with or without regional lymph node involvement; or localized unilateral tumor with contralateral regional lymph node involvement; or midline tumor with bilateral extension by infiltration (unresectable) or by lymph node involvement. The midline is defined as the vertebral column. Tumors originating on one side and crossing the midline must infiltrate to or beyond the opposite side of the vertebral column.		
Stage 4	Any primary tumor with dissemination to distant lymph nodes, bone, bone marrow, liver, skin, and/or other organs, except as defined for stage 4S.	M	Distant metastatic disease (except stage MS)
Stage 4S	Localized primary tumor, as defined for stage 1, 2A, or 2B, with dissemination limited to skin, liver, and/or bone marrow (by definition limited to infants younger than 12 months). Marrow involvement should be minimal (i.e., <10% of total nucleated cells identified as malignant by bone biopsy or by bone marrow aspirate). More extensive bone marrow involvement would be considered stage 4 disease. The results of the MIBG scan, if performed, should be negative for disease in the bone marrow.	MS	Metastatic disease in children younger than 18 months with metastasis confined to skin, liver and/or bone marrow

**Tab. 2:** INSS und INRGSS im Vergleich. Stage 1 entspricht L1, 2A entspricht L2, 4 entspricht M und 4S ist mit MS gleichzusetzen. Nach Monclair et al. (2009) (26) und Simon et al. (2017) (25)

In die Stratifizierung fließen des Weiteren Alter und molekulare Marker wie MYCN-Amplifikation oder eine 1p-Deletion ein, sodass die Patienten und Tumoren in Risikogruppen von low risk bis high risk eingruppiert werden können. Die histologische

Probenentnahme stellt damit zurzeit den ersten offen-chirurgischen Eingriff dar, da Stanzbiopsien in Fachkreisen immer noch stark diskutiert werden (27,28).

Eine Ausnahme von dieser Vorgehensweise können asymptomatische Kinder in der Säuglingsperiode bilden, bei denen ein Neuroblastom als Zufallsbefund oder im Rahmen eines Screenings imponiert. Aufgrund einer nicht unerheblichen Rate an Spontanregressionen und der damit verbundenen hohen Überlebensrate, reicht eine bildgebende Kontrolle mittels Sonographie oder MRT in der Regel aus - eine verzögerte Biopsie kann dann im weiteren Verlauf erfolgen (25,29)

### **2.1.2.5 Therapie**

Wie oben bereits erwähnt, hängt die Therapie von der vorausgegangenen Risikostratifizierung ab. Der Erfolg der jeweiligen Therapie wird wiederum anhand der Neuroblastoma response criteria festgemacht (30). Insbesondere die radiologische und nuklearmedizinische Diagnostik mit bspw. MIBG und PET-CT gewinnt dabei immer mehr an Bedeutung (31).

Die Therapiemöglichkeiten reichen – wie bei soliden Tumoren generell üblich – von einer rein chirurgischen Therapie über Strahlen- und Immuntherapie bis hin zur Chemo- und Stammzelltherapie. Am häufigsten, vor allem in komplexen Tumorerkrankungen, ist eine Kombination zweier oder mehrerer Möglichkeiten (25). Im Folgenden werden die gängigsten Risikostratifizierungen und Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH), der Children's Oncology Group (COG) und der International Neuroblastoma Risk Group Pretreatment Classification verglichen.

#### Low Risk Tumoren

Als *low risk* werden laut der GPOH-Leitlinie definiert (25):

- Keine MYCN Amplifikation und
  - INSS 1 oder
  - INSS 2 + keine 1p-Deletion oder
  - INSS 3 + Alter <2 Jahre + keine 1p-Deletion oder
  - INSS 4S oder
  - INRG MS

Die Children's Oncology Group definiert *low risk* als (10):

- INSS 1
- INSS 2 + keine MYCN Amplifikation
- INSS 4S + Alter <1 Jahr + keine MYCN Amplifikation + DNA Index <1 + prognostisch günstige Histologie

Als *low risk* wird von der International Neuroblastoma Risk Group definiert (26):

- INRG L1 + histologisch gereiftes Ganglioneuroblastom
- INRG L1 + keine MYCN Amplifikation
- INRG L2 + histologisch gereiftes Ganglioneuroblastom
- INRG L2 + Alter <18 Monate + keine 11q-Abberation + keine MYCN Amplifikation
- INRG L2 + Alter >18 Monate + keine 11q-Abberation + keine MYCN Amplifikation + histologisch nodulares Ganglioneuroblastom
- INRG M + Alter <18 Monate + keine MYCN Amplifikation + DNA hyperdiploid
- INRG MS + Alter < 18 Monate + 11q-Abberation + keine MYCN Amplifikation

So unterschiedlich die Eingruppierungen der Fachgesellschaften erscheinen mögen, haben doch fast alle *low risk* Tumoren folgendes gemeinsam: Nur sehr selten liegt eine MYCN Amplifikation vor. Oftmals handelt es sich um einen lokalen Tumor oder ein prognostisch günstiges Ganglioneuroblastom. Falls im ersten Jahr Metastasen vorhanden sind, dann nur in Haut, Leber und Knochenmark.

*Low risk* Tumoren werden unterschiedlich behandelt. Derzeitiger Standard ist die Komplettresektion des Tumors, mit dem bei Kindern in Stadium 4S und 1 ein 5-Jahres-Überleben von 99% erreicht werden kann (32). Eine Chemotherapie ist bei lebensbedrohlichen Verläufen im Stadium 4S angezeigt (33). Ebenso kann dies bei rezidivierenden Tumoren erfolgen. Bei asymptomatischen *low risk* Neuroblastomen im Neugeborenenalter kann abwartendes Beobachten in Betracht gezogen werden (34).

### Intermediate Risk Tumoren

Als *intermediate risk* werden laut der GPOH-Leitlinie definiert (25):

- Keine MYCN Amplifikation und
  - INSS 2 + 1p-Deletion oder
  - INSS 3 + 1p-Deletion oder

- INSS 3 + Alter >2 Jahre oder
- INSS 4 + Alter <18 Monate oder
- INRG M + Alter <18 Monate

Die Children's Oncology Group definiert *intermediate risk* als (10):

- INSS 2 (symptomatisch) + keine MYCN Amplifikation
- INSS 3 + Alter <18 Monate + keine MYCN Amplifikation
- INSS 3 + Alter >18 Monate + prognostisch günstige Histologie + keine MYCN Amplifikation
- INSS 4 + Alter <12 Monate + keine MYCN Amplifikation
- INSS 4 + Alter 12-18 Monate + DNA Index >1 + prognostisch günstige Histologie
- INSS 4S + Alter <12 Monate + DNA Index = 1 + keine MYCN Amplifikation
- INSS 4S + Alter <12 Monate + prognostisch ungünstige Histologie + keine MYCN Amplifikation

Als *intermediate risk* wird von der International Neuroblastoma Risk Group definiert (26):

- INRG L2 + Alter <18 Monate + keine MYCN Amplifikation + 11q Abberation
- INRG L2 + Alter >18 Monate + histologisch nodulares Ganglioneuroblastom (differenziert) + keine MYCN Amplifikation + 11q Abberation
- INRG L2 + Alter > 18 Monate + histologisch nodulares Ganglioneuroblastom (wenig bis kaum differenziert) + keine MYCN Amplifikation + keine 11q Abberation
- INRG M + Alter <18 Monate + keine MYCN Amplifikation

Intermediate risk Neuroblastome haben trotz des gehäuftten Auftretens von Risikofaktoren wie einer 1p-Deletion eine gute Prognose (10). Ebenfalls werden viele Kinder mit einem erhöhten Alter (>18 Monate) dieser Risikogruppe zugeordnet. Wie bei den low risk Tumoren finden sich hier kaum MYCN Amplifikationen. Im Allgemeinen zeigt sich im Vergleich zu den *low risk* Neuroblastomen eine komplexere Risikostratifizierung, welche sich auch in einer differenzierteren Therapie widerspiegelt.

Als Therapieoptionen kommen Chemotherapie, chirurgische Intervention und eine Bestrahlung infrage. Chirurgie stellt bisher bei relativ einfach zu entfernenden Tumoren den Standard dar. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine aggressive chirurgische Therapie mit schweren Schäden an Nieren und dem Abdomen im Allgemeinen einhergehen kann (10). Würde die Totalexzision des Tumors mit der Gefahr größerer Schäden einhergehen, kann ergänzend zur dann unvollständigen Entfernung eine Bestrahlung stattfinden (25). Zur Verkleinerung der Tumormasse kann die Indikation zur Chemotherapie gestellt werden. Deutsche Leitlinien empfehlen zurzeit je drei Zyklen N5C (Carboplatin + Etoposid) und N6 (Vincristine + Dacarbazine + Doxorubicin) abwechselnd gefolgt von vier Zyklen N7 (Cyclophosphamid) (25). Den Stellenwert der Chemotherapie legt eine aktuelle Studie nahe. In dieser wird beschrieben, dass die Gruppen Chemotherapie vs. Chemotherapie und Chirurgie keine signifikanten Unterschiede in den Überlebensraten aufweisen (10). Beendet wird die Therapie standardmäßig mit der Gabe von Retinsäure.

### High Risk Tumoren

Als *high risk* Tumoren werden laut der GPOH-Leitlinie definiert (25):

- INSS 1 + MYCN Amplifikation
- INSS 2 + MYCN Amplifikation
- INSS 3 + MYCN Amplifikation
- INSS 4S + MYCN Amplifikation
- INSS 4 + Alter >18 Monate
- INSS 4 + Alter <18 Monate + MYCN Amplifikation
- INRG M + Alter >18 Monate
- INRG M + Alter <18 Monate + MYCN Amplifikation

Die Children's Oncology Group definiert *high risk* Tumoren als (10):

- INSS 2 + MYCN Amplifikation
- INSS 3 + Alter >18 Monate + prognostisch ungünstige Histologie
- INSS 3 + MYCN Amplifikation
- INSS 4 + Alter <12 Monate + MYCN Amplifikation
- INSS 4 + Alter 12-18 Monate + DNA Index = 1
- INSS 4 + Alter 12-18 Monate + prognostisch ungünstige Histologie
- INSS 4 + Alter 12-18 Monate + MYCN Amplifikation

- INSS 4 + Alter >18 Monate
- INSS 4S + Alter <12 Monate + MYCN Amplifikation

Als *high risk* Tumoren werden von der International Neuroblastoma Risk Group definiert (26):

- INRG L1 + MYCN Amplifikation + histologisch kein gereiftes Ganglioneuroblastom
- INRG L2 + MYCN Amplifikation
- INRG M + Alter <18 Monate + MYCN Amplifikation
- INRG M + Alter >18 Monate
- INRG MS + Alter <18 Monate + MYCN Amplifikation
- INRG MS + Alter >18 Monate

Wie auch bei den *intermediate risk* NB ergeben sich therapiebetreffend ähnliche Fragen und Möglichkeiten. Eine chirurgische Entfernung des Tumors sollte, falls möglich, angestrebt werden. Gewebe- und Organschäden sollen durch eine gute Nutzen-Risiko-Abwägung in Grenzen gehalten werden. Der medikamentösen Tumorbehandlung kommt in der high risk Gruppe eine größere Bedeutung zu. Zunehmend Gegenstand in Forschung und Anwendung sind Immuntherapeutika wie monoklonale Antikörper gegen GD-2 auf der Oberfläche der Neuroblasten (10). Aber auch Therapieschemata für klassische Chemotherapeutika wurden weiterentwickelt. Hierbei unterscheiden sich die Schemata der Fachgesellschaften: Die GPOH empfiehlt aufbauend auf die Resektion des Tumors sechs Zyklen Chemotherapie: In Zyklus 1,3 und 5 werden Cisplatin, Etoposid und Vindesine verwendet. Im 2.,4. und 6. Vincristine, Dacabacine und Doxorubicin. Eine chirurgische Intervention ist nach Tumorverkleinerung zwischen den Zyklen möglich. Es schließt sich oftmals eine Behandlung mit radioaktivem Methyljodbenzylguanidin (MIBG) an. Letztendlich erhalten die meisten Patienten eine autologe Stammzelltransplantation (ASCT) (25). Auch hier bildet Retinsäure den Abschluss der Behandlung.

Die Leitlinien der Children's Oncology Group weichen hiervon in einigen Punkten ab: Die ersten beiden Zyklen werden Topotecan und Cyclophosphamid verwendet, in Zyklus 3 und 5 Cisplatin und Etoposid und Doxorubicin, Cyclophosphamid und Vincristine in den verbleibenden beiden. Die autologe Stammzelltransplantation kommt auch hier zur Anwendung (10).

## **2.1.3 Rhabdomyosarkom**

### **2.1.3.1 Epidemiologie und Ätiologie**

Weichteiltumoren haben mit 4 - 6% einen nicht unerheblichen Anteil an den Krebserkrankungen im Kindesalter. Bei Rhabdomyosarkomen (RMS) handelt es sich wiederum um die häufigsten Weichteiltumoren des Kindesalters (6,10,35). Im Erwachsenenalter hingegen macht das RMS nur ca. 1% aller soliden Tumoren aus. Diese geringe Inzidenz ist wiederum einer der Faktoren, die dazu führen, dass das RMS des Erwachsenen mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden ist (36). Der Jahresbericht des Kinderkrebsregisters aus dem Jahr 2017 erfasst 996 Neuerkrankungen an Weichteiltumoren, davon sind 511 Rhabdomyosarkome, also 51,31% (10). Das Durchschnittsalter bei Diagnose liegt zurzeit bei 6 Jahren und 3 Monaten. Einen guten Vergleich zur Altersverteilung anderen Tumorentitäten zeigen Abb.3 und Tab. 1.

Histologisch werden zwei Hauptformen des Rhabdomyosarkoms unterschieden: Das embryonale RMS (ERMS) und das alveolare RMS (ARMS). Weitere, deutlich seltenere Formen sind das pleomorphe RMS, das Spindelzell-RMS und Mischformen (37). Die Aufteilung in die beiden Hauptformen ist deshalb wichtig, da sich die Inzidenz des RMS altersabhängig stark unterscheidet. Trotz des oben erwähnten Durchschnittsalters bei Erkrankung, stellt die Inzidenz eine zweigipflige Kurve dar, die einige Autoren mit den Unterformen des Tumors in Verbindung bringen (35). Die Inzidenz des ARMS bleibt bei Kindern aller Altersgruppen minimal ansteigend. Bei der ERMS hingegen betrachtet man zwei Gipfel – einmal im Alter von zwei bis sechs und einmal um das 18. Lebensjahr herum (35,37,38). In Studien und bei der Risikostratifizierung wird daher beim Rhabdomyosarkom oftmals das 10. Lebensjahr als Grenze zwischen guter und schlechter Prognose angesetzt (39,40). Einen Unterschied zwischen den histologischen Typen findet sich auch in den Überlebensraten. Für alle Rhabdomyosarkome gemittelt überleben 60-70% die ersten 5-Jahre nach Diagnose. Embryologische RMS haben dabei die höchste Überlebensrate und alveoläre RSM die niedrigste (37).

Ätiologisch sind die meisten Rhabdomyosarkome im Kindesalter Folge einer Spontanmutation. Es findet sich jedoch auch ein gewisser Anteil an Patienten mit ähnlichen genetischen Mustern wie Neurofibromatose Typ 1, Beckwith-Wiedemann Syndrom, Costello-Syndrom oder Li-Fraumeni-Syndrom (41-44). Äußere Einflüsse wie

die häufige Anwendung von Röntgenstrahlen stehen ebenfalls im Verdacht, das Risiko zu erhöhen.

### **2.1.3.2 Klinik**

Beide Hauptformen des RMS zeigen typische Prädilektionsstellen. Während das ARMS eher in Thorax, Abdomen und Extremitäten auftritt, finden sich ein Großteil der ERMS im Kopf-Hals-Bereich und dem Urogenitaltrakt (43). Unabhängig von der Histologie treten ein Großteil der Rhabdomyosarkome ähnlich in Erscheinung: Als asymptomatische Raumforderung. Diese kann dann symptomatisch werden, wenn Gefäße oder Leitungsbahnen verlegt oder verschoben werden oder wenn Metastasen des RMS weitere Strukturen befallen (35,45). Im Urogenitaltrakt zum Beispiel können RMS durch Hämaturie, Bauchschmerzen oder Harnverhalt auffällig werden (39) an anderen Stellen kann der Tumor als Schwellung infolge einer kleinen muskuloskeletalen Verletzung fehlinterpretiert werden (45).

### **2.1.3.3 Diagnostik**

Mit nur mehreren hundert Fällen pro Land bleibt das Rhabdomyosarkom eine Rarität der Kinderonkologie und Chirurgie – deshalb wird von Seiten der Fachgesellschaften betont, dass Kinder zur weiteren Diagnostik in ein Kinderkrankenhaus mit der dementsprechenden Expertise verlegt werden sollten, um die Diagnose und vor allem die Therapie zu planen (39,46).

Oftmals bringt nur die richtige Bildgebung Licht ins Dunkel – dadurch gelingt die grobe Abgrenzung einer harmlosen Schwellung zu einem infiltrierenden Malignom. Bei Kindern bietet sich, nicht zuletzt wegen der guten Darstellung des Bindegewebes, die Magnetresonanztomographie an, eine alleinige Sonographie reicht nicht aus. Alternativ kann die Bildgebung auch im (low-dose) Computertomogramm erfolgen (33, 39,45)

Um das Rhabdomyosarkom als solches sicher zu diagnostizieren, ist es im weiteren Verlauf unabdingbar, eine Biopsie zur histologischen Diagnostik zu nehmen. Die Leitlinien erwähnen hier die MRT-gesteuerte Biopsie und die Inzisionsbiopsie (39). Diese sollte durch Labor mit der Expertise der RMS-Diagnostik beurteilt werden. Zur weiteren Diagnostik gehören die Suche nach weiteren Läsionen mittels PET-Scan oder Skelettszintigraphie. Eine Knochenmarkbiopsie wird abhängig vom Tumorstadium - die deutsche Leitlinie nennt hier den Differenzierungsgrad G3 – durchgeführt. Andere Paper verweisen hierbei auch auf die Möglichkeiten der oben



genannten PET-CT bzw. PET-MRT-Technik, die einer Knochenmarkbiospie vorausgehen könnten (46). Zunehmend Bedeutung gewinnt die genetische Diagnostik. So lassen sich beim alveolären RMS bei ca. 2/3 der Patienten eine Translokation (Pax3-FOX01 oder Pax7-FOX01) nachgewiesen werden kann (47). Dies hat wiederum großen Einfluss auf die Therapieplanung (46).

### 2.1.3.4 Therapie

Wie beim Neuroblastom erfolgt die Therapieplanung interdisziplinär zwischen Pädiatrie, Kinderchirurgie, Radiologie, Strahlentherapie und weiteren Fachdisziplinen. Das Ziel ist eine Verkleinerung bzw. Entfernung des Tumors unter Schonung des umliegenden Gewebes. Um möglichst standardisiert vorzugehen, werden Kinder mit Rhabdomyosarkomen in verschiedene Risikogruppen eingeteilt. Ein Großteil der Risikogruppen kann jedoch erst postoperativ bestimmt werden, da sich die Eingruppierung unter anderem auf die Ergebnisse der Pathologie und das Resektionsmaß der Operation stützt. Einen kurzen Überblick gibt hier die S1 Leitlinie Weichteilsarkome der AWMF (39)

	<b>Günstige Prognose</b>	<b>Ungünstige Prognose</b>
<b>Präoperativer TN-Status</b>	T1 N0	T2 N1
<b>Postoperativer TN-Status</b>	pT1 pT2 pT3a pN0	pT3b pT3c pN1
<b>Lokalisation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kopf und Hals <u>nicht</u> parameningeal</li> <li>• Urogenital, <u>nicht</u> Blase, <u>nicht</u> Prostata</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kopf und Hals, parameningeal</li> <li>• Blase, Prostata</li> <li>• Extremitäten</li> <li>• Andere Lokalisation</li> </ul>
<b>Alter des Patienten</b>	<10 Jahre	>10 Jahre
<b>Tumorgröße</b>	<5cm	>5cm
<b>Histologie</b>	Embryonales RMS	Alveoläres RMS, andere Formen des RMS

**Tab. 3:** Prognoseabschätzung beim Rhabdomyosarkom laut S1 Leitlinie Weichteilsarkome (2017). T: Tumordinfiltration ins Gewebe, N: Lymphknotenbeteiligung (39).

Eine präzisere Prognoseabschätzung unter Einbeziehung vorheriger Studienergebnisse bieten die Kriterien der Childrens Oncology Group (48).

IRS Clinical Group Classification	
Group	Definition
<b>I</b>	Localized disease, completely resected
<b>II</b>	Total gross resection with evidence of regional spread
<b>A</b>	Grossly resected tumor with microscopic residual disease
	Involved regional nodes completely resected with no microscopic residual disease
	Involved regional nodes grossly resected with evidence of microscopic residual disease
<b>III</b>	Biopsy only or incomplete resection with gross residual disease
<b>IV</b>	Distant metastatic disease (excludes regional nodes and adjacent organ infiltration)

**Tab. 4:** IRS Clinical Group Classification zur anatomischen Beurteilung des Tumors unter Einbeziehung der vorausgegangenen therapeutischen oder diagnostischen Interventionen. Modifiziert nach Malempati et al. (2012) (48).

TNM Pre-Treatment Classification					
Stage	Sites	T	Size	Nodes	Metastases
<b>1</b>	Orbit, head and neck (non-PM), GU (non-B/P), biliary tract	T1 or T2	a or b	N0 or N1 or Nx	M0
<b>2</b>	B/P, extremity, PM, other (includes trunk, retroperitoneum, etc.)		a	N0 or Nx	
<b>3</b>			a	N1	
<b>4</b>	Any		b	N0 or N1 or Nx	M1

- PM: parameningeal; B/P: bladder/prostate
- T1: confined to anatomic site of origin; T2: extension and/or fixative to surrounding tissue
- Size: a ≤5cm in diameter; b ≥5cm in diameter
- Nodes: N0 – regional nodes not involved; N1 – regional nodes involved; Nx – regional nodes status unknown
- Metastases: M0 – no distant metastases; M1 – metastases present (incl. pos. cytology in CSF, pleural or peritoneal fluid)

**Tab. 5:** TNM Pre-Treatment Classification zur Beurteilung der Tumorf infiltration, der Lymphknotenbeteiligung und des Vorhandenseins von Metastasen. Modifiziert nach Malempati et al. (2012) (48).

Current COG-STS Risk Stratification				
Risk	5 year FFS*	Stage	Group	Histology
<b>Low, subset 1</b>	90%	1 or 2	I or II	EMB
		1	III orbit	
<b>Low subset 2</b>	87%	1	III nonorbit	
		3	I or II	
<b>Intermediate</b>	65-73%	2 or 3	III	
		1, 2 or 3	I, II or III	
<b>High</b>	<30%	4	IV	EMB or ALV
EMB: Embryonal; ALV: Alveolar; *Data from IRS-III and IRS-IV				

**Tab. 6:** COG-STS Risk Stratification. Risikoabschätzung unter Zusammenführung der TNM-Klassifikation (gelb), der klinischen Eingruppierung (grün) und der Tumorphistologie. Modifiziert nach Malempati et al. (2012) (48).

Bei der COG-Klassifikation (Tab. 6) fließen die Ergebnisse der klinischen Klassifikation (Tab. 4 – hier grün dargestellt) mit der TNM-Klassifikation des Rhabdomyosarkoms (Tab. 5 – hier gelb dargestellt) zusammen. Daraus resultiert die Risikostratifizierung. Abhängig von den genannten Faktoren und der weiteren Diagnostik muss nun die Therapie geplant werden.

Folgende Möglichkeiten stehen zur Verfügung (49):

- Chirurgische Therapie
- Strahlentherapie
- Chemotherapie
- Immuntherapeutika

Als älteste Technik hat die chirurgische Kontrolle des Tumors nach wie vor einen festen Stellenwert in der Therapie (50). Das Paradigma der chirurgischen Therapie hat sich jedoch die letzten Jahrzehnte von einer Totalexzision des Tumors hin zu einem gewebeerhaltenden Eingriff gewandelt (48,51). Dies ist gerade bei Kindern von eminenter Bedeutung, da im Falle einer Komplettresektion des Tumors ein Sicherheitsabstand an gesundem Gewebe mitentfernt werden sollte (35).

Je nach Stadium der Erkrankung kommt der chirurgischen Versorgung ein mehr oder weniger großer Stellenwert zugute. Fakt bleibt jedoch, dass der Erfolg einer primären

Resektion großen Einfluss auf die Prognose und Therapieplanung des Patienten hat (35,48).

In Verbindung mit anderen Verfahren findet auch die Strahlentherapie Anwendung in der Therapie des RMS. Mit ca. 20% machen die RMS im Urogenitaltrakt einen großen Anteil an allen Rhabdomyosarkome aus (52). Die Therapieplanung bringt hier die Ärzte in ein Dilemma: Einerseits zeigt die Bestrahlung gute lokale Ergebnisse, andererseits können hohe Strahlendosen und wiederkehrende Therapien im Unterleib das Leben der behandelten Kinder massiv verändern. Bestrahlung ist daher (wie auch die chirurgische Therapie) immer eine Abwägung zwischen Nutzen und Schaden (53). In anderen Körperregionen findet Bestrahlung in vielen Behandlungsprotokollen Anwendung, insbesondere als neoadjuvante Bestrahlung, wenn der Tumor nicht ohne Sicherheitsabstand reseziert werden konnte (46,54). Die Protokolle sind jedoch sehr unterschiedlich und müssen an den Patienten und das behandelnde Zentrum angepasst werden. Ergänzend sei noch die lokale Bestrahlung mittels Brachytherapie zu nennen, die in speziellen Situationen eingesetzt werden kann (45).

Den Hauptpfeiler der Tumorthherapie bildet die medikamentöse Behandlung. Klassischerweise sind damit Chemotherapeutika verbunden, in den letzten Jahren dringen jedoch auch Immuntherapeutika als sog. Checkpoint-Inhibitoren auf den Markt.

Die Childrens Oncology Group listet die Dreifachkombination aus Vincristine, Actinomycin D und Cyclophosphamid als Standard-Chemotherapie auf (VAC-Schema). In der Therapie der low risk Tumoren kann unter Umständen auch eine Therapie ohne Cyclophosphamid durchgeführt werden (45). Einzelne Bestandteile des VAC-Schemas wurden in Studien gegen Etoposid und Ifosamid ausgetauscht, eine Verbesserung im Outcome konnte jedoch nicht betrachtet werden (54).

In den letzten Jahren wurden immer mehr neue medikamentöse Ansätze der Tumorthherapie auf den Markt gebracht (36). Den Großteil machen dabei die Immuntherapeutika aus. Sind diese in vielen Therapien des Erwachsenen Bestandteil vieler Behandlungsprotokolle, so findet diese Medikamentengruppe erst langsam Einzug in die Therapie des Kindes. 2019 wurde in *Cancer* eine Studie zur Verwendung von Cituximab, einem monoklonalen Antikörper am IGF1-Rezeptor veröffentlicht:

Patienten mit metastasiertem RMS erhielten eine Chemotherapie – Eine Gruppe erhielt zudem Cituximab, eine andere Temozolomid. Die Ergebnisse zeigten dabei keine großen Unterschiede im Outcome verglichen mit der Standard-Chemotherapie. Positiv hervorgehoben wurde jedoch, dass der Einsatz von Cituximab sicher ist und es zu keinem Anstieg der Nebenwirkungen kam (55).

## **2.2 Intraoperative Schnellschnittdiagnostik**

Obwohl die Therapie der oben genannten Tumore interdisziplinär präzise geplant wird, bleibt während eines chirurgischen Eingriffes oftmals die Frage, ob ein Tumor restlos entfernt wurde und ob der Sicherheitsabstand im Gewebe eingehalten werden kann (56).

Heute ist eine zeitnahe Diagnose in vielen chirurgischen Disziplinen oftmals von großer Bedeutung - sowohl für den Patienten als auch für den Operateur. So kann eine Verzögerung und die daraus resultierende Verlängerung der Operation zu einem höheren Infektionsrisiko und stärkeren anästhesiologischen Nebenwirkungen führen (56, 57). Den Standard bildet hier der intraoperative Schnellschnitt (engl. *fresh frozen section*), welcher zum derzeitigen Zeitpunkt durch kein anderes Verfahren ersetzt werden konnte. Selbstverständlich bleibt weiterhin die Möglichkeit eine Gewebeprobe zur genauen histopathologischen Begutachtung zu entnehmen – nicht jede Erkrankung und erst recht nicht jeder Patient lassen mehrere Folgeeingriffe aufgrund verzögerter Diagnostik zu.

Historisch prägend für den Schnellschnitt war Louis B. Wilson, der bereits 1905 forderte, dass Chirurgie und Pathologie gemeinsam im Operationssaal zusammenarbeiten (1). Sein damaliger Klinikdirektor äußerte „*I wish you pathologists could tell us if a tissue is cancer or not while the patient is on the table*“ (58).

## A METHOD FOR THE RAPID PREPARATION OF FRESH TISSUES FOR THE MICROSCOPE.

LOUIS B. WILSON, M.D.  
Pathologist St. Mary's Hospital.  
ROCHESTER, MINN.

While engaged in general pathologic work I shared the common distrust of frozen sections of fresh tissues for microscopic diagnosis. On taking charge recently of the laboratories of the Drs. Mayo, surgeons, I carefully tested the various methods hitherto published and found them either too slow for results while the patient waits under the anesthetic or else giving poorly differentiated cell detail. After considerable experimentation the following technic was discovered, and for the last six months it has given uniformly excellent preparations:

1. Bits of fresh tissue not more than 2x10x10 mm. are frozen in dextrin solution and cut in sections of from 10 to 15 microns thick.
2. The sections are removed from the knife with the tip of the finger and allowed to thaw thereon.
3. The sections are unrolled with camel's-hair brushes in 1 per cent. NaCl solution.
4. The sections are stained from 10 to 20 seconds in neutral Unna's polychrome methylene blue.
5. They are washed out in 1 per cent. NaCl solution.
6. They are mounted in Brun's glucose medium.

The microtome which I use is the Spencer automatic with a CO<sub>2</sub> attachment in which vulcanite is substituted for brass in the wall of the freezing chamber, thus insulating the freezing plate. Thawing the section on the finger prevents to a great extent the formation of bubbles. The well-made camel's-hair brushes used by artists are much more useful for handling tissues than those usually furnished by laboratory supply houses. A heavy, shallow watch glass over a black surface is the best receptacle in which to unroll sections. Sections are best handled in the stain folded over a lifter made of a small glass rod drawn out and bent at convenient angle. The section is kept constantly moving while it is in the stain. The stain is contained in a minute cup to facilitate the rapid recovery of the section should it slip from the lifter. Washing out is done in several ounces of salt solution in a white porcelain dish and is continued only while the stain comes away freely. Brun's glucose medium (which is made by mixing distilled water 140 c.c., glucose 40 c.c., and glycerin 10 c.c., then adding camphorated spirit 10 c.c. and filtering), is held in an oval dish of porcelain (an "undecorated match safe") of such a size that a three-inch slide will rest in a slanting position, with one end in the bottom of the dish and the other on its edge. The section is spread out on the slide while it is in this position. The slide is then carefully withdrawn from the dish, the excess fluid removed, a cover-slip dropped over the section and the specimen is ready for the microscope.

The whole process can be gone through in one and a half minutes from the time the tissue is placed on the freezing plate of the microtome until the stained specimen is on the stage of the microscope. The resulting coloring is uniformly good with the tissue elements sharply contrasted in red, purple and dark blue.

A diagnosis may be made from such preparations in a large percentage of surgical cases in which a diagnosis is possible by a study of sections of the same thickness cut from fixed tissues and stained with hematoxylin and eosin.

**Abb. 5:** Louis B. Wilsons Artikel im Journal of the American Medical Association 1905 mit einer Anleitung zur Anfertigung eines Schnellschnittes. Aus Wilson (1905) (1)

Soll ein Schnellschnitt angefertigt werden, so wird eine Gewebeprobe intraoperativ entnommen und umgehend in die Pathologie gebracht. Die daraufhin folgende Präparation des Schnittes dauert in der Regel fünf bis zehn Minuten (59,60).

Zusätzliche Zeit entfällt auf die Beurteilung des Schnittes bis die Fragestellung (z.B. R0-Resektion) beantwortet werden kann. Die gesamte Diagnostik dauert je nach Gewebearbeit, Vorinformationen und Erfahrung des untersuchenden Pathologen ca. 20 Minuten (7,61). Hierbei ist zu beachten, dass für den Transport der Probe in die Pathologie weitere Zeit hinzugerechnet werden muss, wodurch sich die Zeitspanne um weitere 10 bis 20 Minuten vergrößert. Wie bei den meisten Erwachsenen entfallen auch bei pädiatrischen Patienten 75% der Schnellschnitte auf Tumoroperationen. Eine weitere häufige Anwendung ist die Schnelldiagnostik des Morbus Hirschsprung (62).

Die Technik hat sich seit der Entwicklung nicht wesentlich geändert: Eine Gewebeprobe wird schockgefroren und dann mit einem Mikrotom in wenige Mikrometer dicke Präparate geschnitten. Wilson verwendete in seinem JAMA-Artikel 10-15µm dicke Schnitte (1). Anschließend wird dieser mit bspw. Hämatoxylin-Eosin angefärbt und kann unter dem Mikroskop betrachtet werden (58).

Intraoperative pathologische Diagnostik findet regelmäßig in Kliniken fast jeder Größe statt (59). Bei Erwachsenen erstreckt sie sich von der Gynäkologie bis hin zu Eingriffen im Gehirn – bei den meisten Fällen handelt es sich um Tumoren. In der Kinderchirurgie ist die Anfertigung von Schnellschnitten ebenfalls üblich. Schwierig gestalten sich jedoch die Schnellschnittdiagnostik von Geweben des zentralen Nervensystems und die der Knochentumoren (56).

Betrachtet man die Qualität der Schnellschnittdiagnostik, kommt es laut einer Auswertung in 3,9% der Fälle zu geringfügigen Fehlbewertungen, schwerwiegende diagnostische Fehler unterlaufen bei 0,2% der Schnellschnitte (63). Eine aktuelle Studie vergleicht die Genauigkeit von Schnellschnitten bei Nierentumoren mit der endgültigen pathologischen Diagnostik. In 81% der Fälle erfolgte die richtige Identifizierung des Tumors. Mit 17 von 19 Willms-Tumoren konnten 90% richtig erkannt werden. Die durchschnittliche Zeit für die Diagnose lag wieder bei 20 Minuten (64). Eine große interinstitutionelle Studie zur Erfassung der intraoperativen pathologischen Konsultationen ermittelte eine positive Übereinstimmung zwischen Schnellschnitt und endgültigem pathologischen Befund in 970 von 1042 Fällen (93%). In 48 Fällen (4,6%) kam es zu Abweichungen, von denen 6 mit einer „minor clinical significance“ bewertet wurden. Die restlichen 42 wurden als nicht bzw. wenig relevant

eingestuft. Hervorzuheben sei noch, dass bei den 48 Fehlern in 26 Fällen Prozessfehler registriert wurden (z.B. bei der Probenentnahme). Die restlichen 22 Fehler waren auf eine falsche Interpretation zurück zu führen (65).

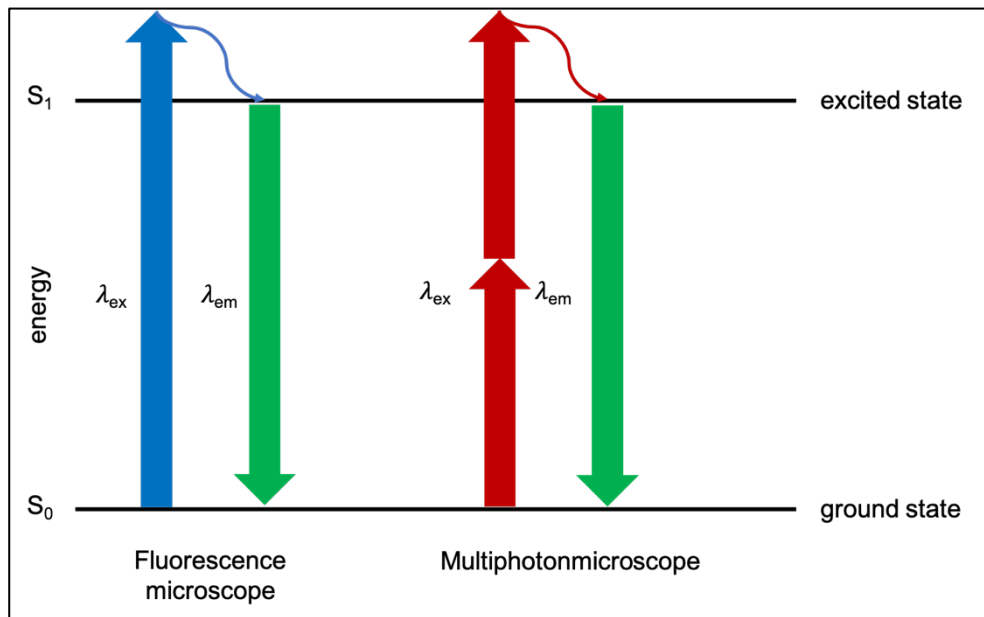
Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass es sich bei der intraoperativen Schnellschnittdiagnostik um ein weitverbreitetes valides Verfahren handelt. Es konnte sich bisher kein anderes pathologisches oder technisches Verfahren gegenüber dem Schnellschnitt durchsetzen.

## **2.3 Multiphotonenmikroskopie**

### **2.3.1 Grundlagen**

Um die Technik der Multiphotonenmikroskopie verstehen zu können, ist es notwendig, zunächst einen Blick auf die Fluoreszenzmikroskopie zu werfen, welche als Vorgängertechnik einzuordnen ist. Bei Molekülen mit einer Fluoreszenz wird durch ein Photon ein Molekül im Gewebe angeregt. Fällt es vom angeregten Zustand in seinen Normalzustand zurück, so wird ein Photon emittiert (66). Da der Vorgang der Anregung mit einem Energieverbrauch einhergeht, ist zum Anregen eine höhere Energie notwendig als das emittierte Photon aussendet – oder bildlicher gesprochen: Die Wellenlänge des anregenden Lichtes ist niedriger als die des emittierten Lichtes (67). Dies wird auch als Stokes Verschiebung bezeichnet. Durch Filter und spezielle Spiegel lässt sich das Anregungslicht herausfiltern, so dass nur das emittierte Licht des angestrahlten Objektes sichtbar bleibt. Da eine kleinere Wellenlänge stets mit einer höheren Energie einhergeht, erklärt sich darüber auch einer der Nachteile der Fluoreszenz-Mikroskopie: Gewebe mit fluoreszierenden Molekülen verlieren bei großer Energie auf Dauer ihre Eigenfluoreszenz – sie bleichen aus (67).



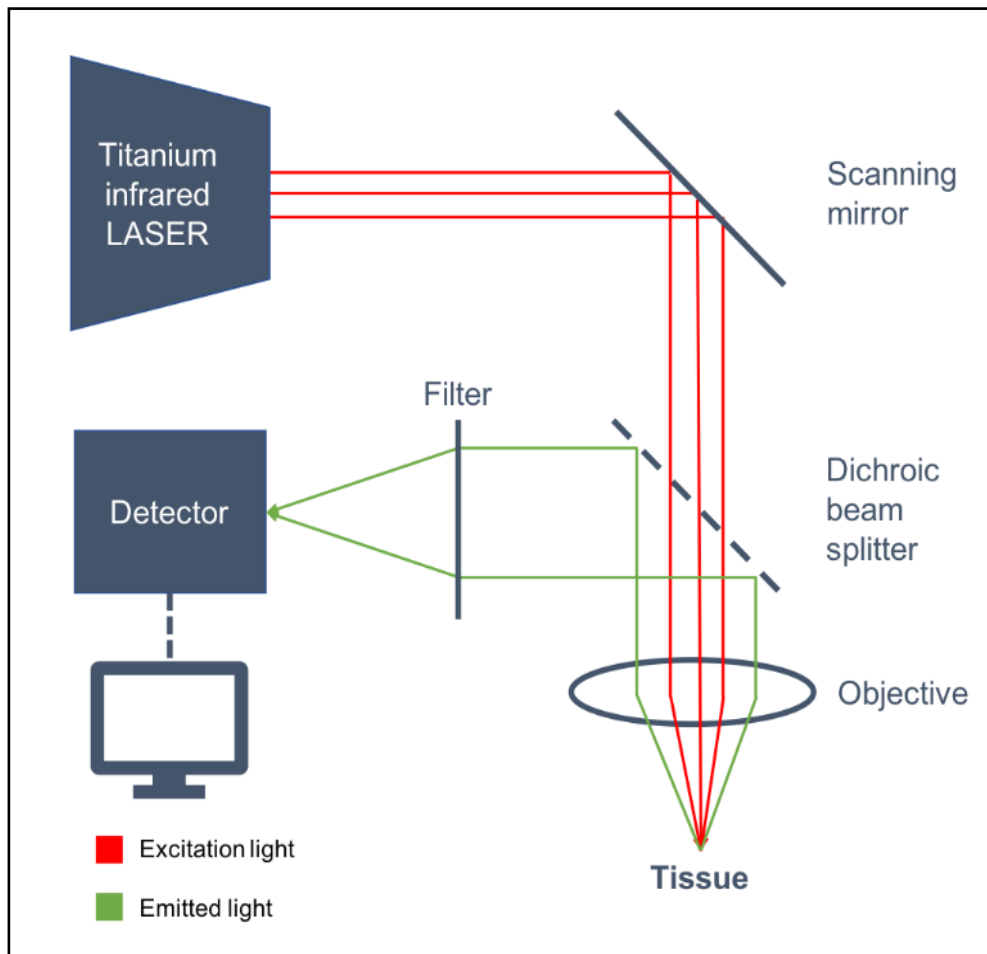


**Abb. 6:** Jablonski Diagramm: Vergleich der Anregungswellenlängen von MPM und regulärer Fluoreszenzmikroskopie.  $S_1$ : Angeregter Zustand,  $S_0$ : Grundzustand,  $\lambda_{ex}$ : Anregungswellenlänge,  $\lambda_{em}$ : Wellenlänge des emittierten Lichtes. Eigene Darstellung nach So et al. (2000) (66).

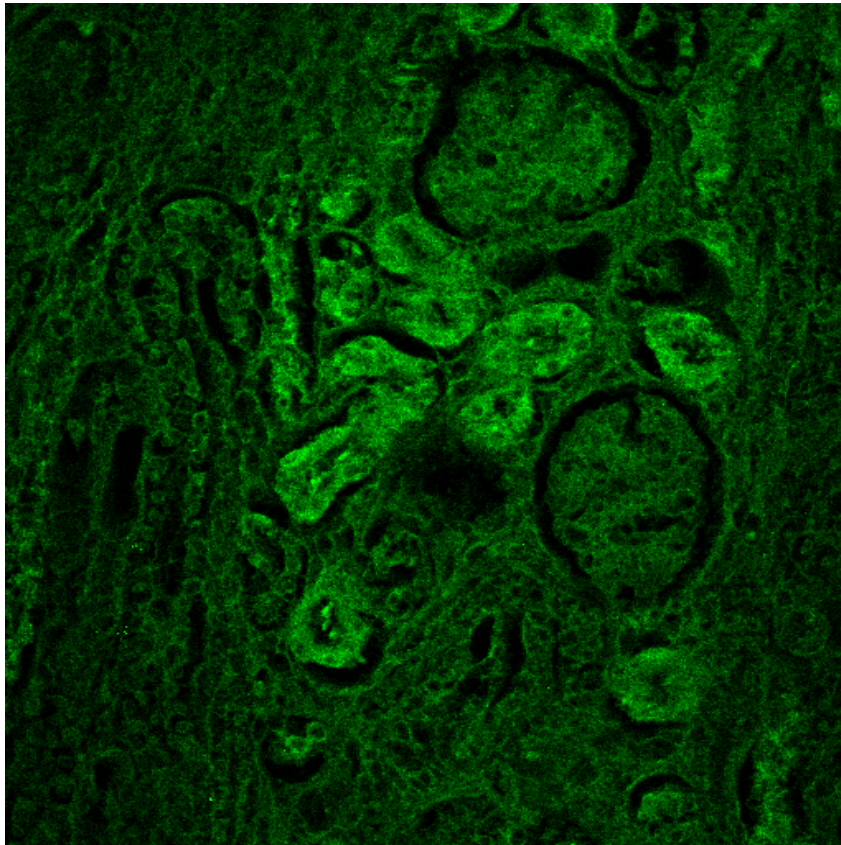
Die Multiphotonenmikroskopie basiert auf der Wirkung mehrerer Photonen in genau einem Punkt. Dabei macht man sich zu Nutze, dass mehrere - meistens zwei - Photonen zur gleichen Zeit auf ein Molekül treffen und dieses anregen. Die These, dass zwei Photonen mit doppelter Wellenlänge die Emission eines Photons der halben Wellenlänge bewirken können, wurde bereits 1931 von Maria Göppert-Mayer propagiert (68). Nachgewiesen konnte dies jedoch erst durch die Entwicklung von speziellen Lasern die präzise mit einer Frequenz von 100 MHz und einer Dauer von 10-13 Femtosekunden Energie abgeben. Da sich die Energie der beiden Photonen im zu erregenden Molekül nahezu addiert, können deutlich energieärmere Strahlen zur Anregung verwendet werden. Um beispielsweise ein Molekül mit einer Wellenlänge von 500 nm anzuregen, bräuchte man in der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie eine Quelle mit einer Wellenlänge von ca. 470 nm. Verwendet man ein Multiphotonenmikroskop, so erzeugen zwei Photonen à 940 nm die gleiche Fluoreszenz des Moleküls. Die Energie, welche auf das Gewebe wirkt, ist dabei jedoch nur halb so groß wie der Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops. Die Veränderung von zwei hochwelligen Photonen zu einem niederwelligeren wird als inverse Stokes shift bezeichnet. Da die Fluoreszenz erst durch das Eintreffen der beiden Photonen im Molekül entsteht, werden auf dem Weg der beiden langwelligen Photonen durchs Gewebe kaum Moleküle angeregt. Dadurch kann das MPM tiefer ins Gewebe

eindringen als bisherige Lasermikroskope. Je nach Literatur werden dabei Eindringtiefen zwischen 100  $\mu\text{m}$  und 200  $\mu\text{m}$  beschrieben (67,69).

Wie bei regulären Fluoreszenzmikroskopen gelangen die emittierten Photonen durch einen dikroten Spiegel. Dieser spezielle Spiegel verhindert ein Empfangen der ausgesendeten Strahlen. Eine Lochblende ist im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie nicht notwendig.



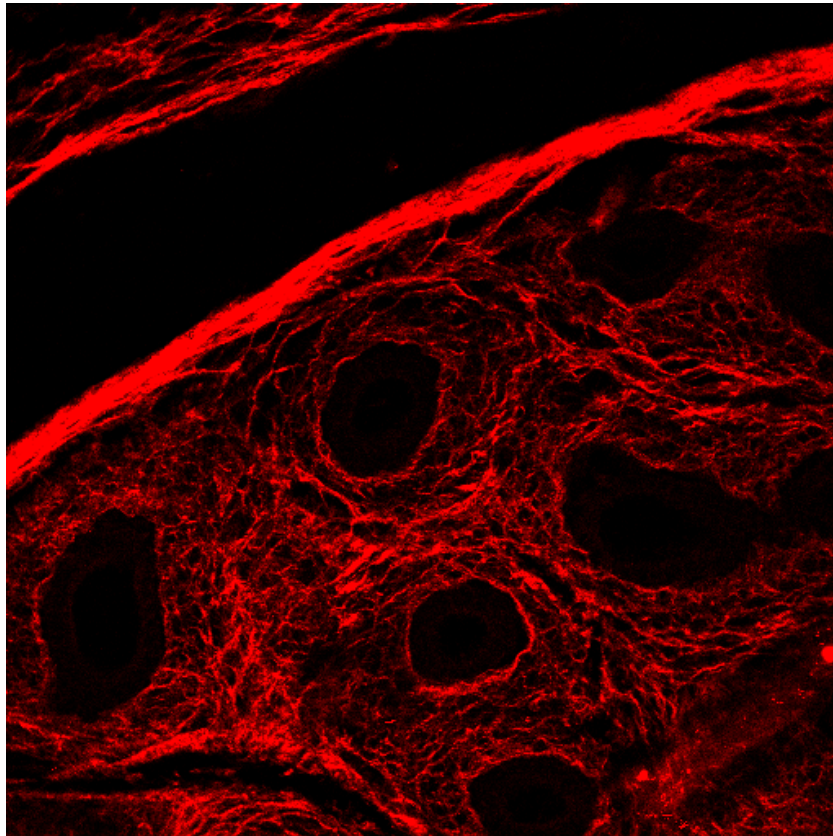
**Abb. 7:** Schematischer Aufbau eines Multiphotonenmikroskops mit dargelegtem Strahlengang. Vereinfachte eigene Darstellung nach Cannell et al. (2006) (70).



**Abb. 8:** Multiphotonen-Aufnahme von Nierengewebe eines Kleinkindes. Nachbearbeitung mittels des Programms Fiji-Image J.

### 2.3.2 Second Harmonic Generation

Neben der Multiphotonen-Fluoreszenz ist es notwendig, auf den Begriff der sog. second harmonic generation (SHG) einzugehen, da ein Großteil der Multiphotonenmikroskope in der Lage ist, die SHG in einem separaten Farbkanal darzustellen. Die second harmonic generation (*dt.* zweite Harmonische) ist ein physikalischer Effekt, welcher unter ähnlichen Bedingungen entstehen kann wie die Fluoreszenz beim MPM. Dabei werden nichtlineare Moleküle mit einem Laser bestrahlt. Es entsteht ein Signal mit einer halben Wellenlänge, also der doppelten Frequenz des Lasers (71). In biologischen Geweben ist dies vor allem zur Beurteilung von Kollagen und Myosin von Interesse, da diese nicht linear angeordnet sind (72). Legt man nun die MPM und SHG Bilder mittels Bildbearbeitungsprogrammen wie Fiji-Image J übereinander, so erhält man deutlich mehr Informationen über die Architektur und die Pathologie des Gewebes. Abbildung 9 zeigt Hodengewebe des Kleinkindes im SHG-Kanal. Einen tieferen Einblick über die Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Fluoreszenz- und SHG-Signal gibt *Cell Imaging Techniques*, von Cox und Kable .



**Abb. 9:** *Second harmonic generation-Signal. Hodengewebe des Kleinkindes. Nachbearbeitung mittels des Programms Fiji Image J.*

### **2.3.3 Anwendungen**

Weltweit arbeiten Forscher mit der Multiphotonenmikroskopie. Allein für das Jahr 2020 werden in PubMed für das Schlagwort „Multiphoton microscopy“ 290 Artikel gelistet (73).

Folgend werden die aktuellen Forschungs- und Anwendungsfelder der Multiphotonenmikroskopie dargestellt.

#### **2.3.3.1 Niere, ableitende Harnwege und Prostata**

Im Bereich der Niere und den ableitenden Harnwegen wird mit der Technik der Multiphotonenmikroskopie gearbeitet und geforscht.

Vorteilhaft erscheint hierbei, abgesehen von der bereits beschriebenen geringeren Ausbleichung und der hohen Eindringtiefe in das Gewebe, die intravitale Darstellung von Stoffwechselprozessen der Nieren. Bei Nieren der Ratte konnte beispielsweise mittels markiertem Dextran die Funktion der Glomeruli der Niere beobachtet werden (8). Potentiell könnten damit Erkrankungen der Niere früh erkannt werden (74). Jaim et al. zeigten in einer anderen Studie zur Diagnostik von Tumoren der Niere, dass die Pathologie mittels MPM in der Lage ist, Normalgewebe von Neoplasien zu

unterscheiden – bei deutlich geringerem Zeitaufwand (75). Auch im Bereich der ableitenden Harnwege wurden erste Anwendungen beschrieben. Diese konzentrieren sich auf die Detektion und Diagnostik des Carcinoma in situ der Blase. In einer Studie wurden erneut MPM-Aufnahmen mit lichtmikroskopischen Aufnahmen von HE-gefärbten Gewebeschnitten verglichen: 99% der Präparate wurden richtig erkannt. Da es sich bei der Studie noch nicht um intravitales, sondern um fixiertes Gewebe handelte, sehen die Autoren aufgrund der guten Erkennungsraten ein großes Potential für die intravitale Anwendung des MPM – insbesondere in Form eines MPM-Endoskops (76). Tiwari et. al. konnten bereits erfolgreich MPM als Tool zur Differenzierung von Hoch- zu Niedrigrisikotumoren der Prostata testen (77). Bemerkenswert ist der Einsatz von HISTOINDEX, einem algorithmusbasierten PC-Programm, welches anhand von 19 Kollagen Parametern die Entscheidung zwischen hohem und niedrigem Risiko treffen konnte. Die „Bewertung“ des Kollagens erfolgte anhand der SHG im MPM. Die erste in vivo Darstellung im lebenden Tier konnten Durand et. al. zeigen: Bei betäubten Ratten konnte mittels der MPM-Technologie der Verlauf der periprostatischen Nerven vor und nach Operation erfolgreich dargestellt werden (78).

### **2.3.3.2 Lunge**

Auch die Lunge kann mit der Möglichkeit einer MPM-Bronchoskopie ein Ansatzpunkt für eine nicht-invasive Diagnostik sein. Der Gebrauch von lokalen und systemischen Kontrastmitteln könnte durch diese Technik ebenfalls überflüssig werden. Verschiedene Forschergruppen verglichen in Studien die Diagnostik mittels MPM im Vergleich zur klassischen LM. Über 90% der Adenokarzinome wurden korrekt erkannt, die Plattenepithelkarzinome wurden in über 50% der Fälle erkannt. In dieser ersten Pilotstudie wurde erneut kein vitales Gewebe betrachtet, sondern fixiertes Gewebe, da noch keine MPM-Sonden auf dem Markt verfügbar sind (79). Intravitale Betrachtung der Lungenphysiologie beschreiben Fiore et al.: Dabei wurden die Lungen und deren Prozesse bei Mäusen erfolgreich beobachtet und die weitere Invasivität der Tierversuche deutlich reduziert (80). In anderen Versuchen konnte die Aktivität des Mycobacterium tuberculosis in Lungen der Maus dargestellt werden (81).

Somit zeigen sich auch bei den Atmungsorganen potentielle Ansatzpunkte für eine Diagnostik – die aufgeführten Beispiele zeigen jedoch, dass geeignete MPM-Sonden und Endoskope zurzeit noch nicht auf dem Markt verfügbar sind. Die Notwendigkeit größer angelegter Studien mit vitalem Gewebe ist gegeben.

### **2.3.3.3 Weibliche Brust**

Wie bereits bei den vorherigen Themen konzentriert sich auch beim Mamma-CA der Großteil der Forschung auf Laborversuche mit Mäusen oder der Untersuchung von Biopsaten. MPM ermöglicht eine gewebeschonende Betrachtung von Prozessen der Tumorgenese und Progression in Echtzeit (82). Anhand von Gewebeproben wurden bei anderen Versuchen untersucht, ob normales Brustgewebe von Fibroadenomen und der zystischen Mastopathie unterschieden werden kann. Die Darstellung von Normal- und pathologischem Gewebe unterscheidet sich sowohl im regulären Zwei-Photonen-Kanal als auch in der SHG so deutlich, dass MPM vor allem zur Ersteinschätzung von Brustgewebe nutzbar wäre (83). Andere Autoren verglichen gesundes Gewebe mit benignen und malignen Prozessen und konnten dabei typische Charakteristika des Brustkrebses im MPM darstellen (84). Den Vergleich von MPM, Fluoreszenzmikroskopie und LM führten amerikanische Forscher durch. Die Bilder aus MPM und Fluoreszenzmikroskopie wurden in digitale HE-Äquivalente (gleiches Aussehen wie HE-gefärbt) umgerechnet. Insgesamt kam man zu dem Ergebnis, dass – insbesondere unter Berücksichtigung der Kosten – das reguläre Fluoreszenzmikroskop dem MPM in nichts nachsteht (85).

### **2.3.3.4 Haut und Hautanhangsgebilde**

Die Dermatologie ist die erste Disziplin die bereits MPM direkt am bzw. im Patienten nutzt (86). Als Zwischenschritt zwischen Inspektion mittels Dermatoskop und der Biopsie des verdächtigen Hautbefundes konnte ein kompaktes MPM-basiertes Gerät bereits eingesetzt werden. In einer kleinen Kohorte an Patienten wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (87). Die hohe Eindringtiefe ermöglicht die Betrachtung und Beurteilung nahezu aller Hautschichten. Des Weiteren sind die Anregungswellenlängen der wichtigsten Hautmoleküle bekannt, sodass nach speziellen Vorgängen der Haut explizit gesucht werden kann. Dadurch ergeben sich Möglichkeiten, weitere Hauterkrankungen zu erforschen und minimalinvasiv zu diagnostizieren (69). Hier seien beispielsweise der Pemphigus vulgaris, Sjörgen Syndrom, Prozesse der Hautalterung und die Heilung von Wunden zu nennen. Von Interesse ist auch die transdermale Untersuchung der Mitochondrien, da diese sehr sensibel auf Hypoxie reagieren (88). Von der Anwendung als Standarddiagnostik ist das MPM noch weit entfernt. Dies dürfte vor allem an den hohen Anschaffungskosten liegen.

### **2.3.3.5 Magen-Darm-Trakt**

Aktuelle Forschungsansätze sind hier die Früherkennung von Dysplasien des Magens, des Kolons und der Diagnostik des Morbus Hirschsprung.

Mehrere Studien zeigen die gute Unterscheidbarkeit von Dysplasie zu Normalgewebe des Magen mit einer Sensitivität und Spezifität von über 75%. Hierbei wurden Biopsate untersucht, wobei die Idee der endoskopischen Mikroskopie erneut erwähnt wird (89, 90). Zur weiteren Therapieplanung wurde auch die Nutzung des MPM für das Staging von Adenokarzinomen des Magens untersucht. Ein Teil dieses Staging, welches nach der TNM-Klassifikation durchgeführt wird, ist die Ausdehnung des Tumors (T). Der direkte Vergleich mit HE-Präparaten zeigte eine vergleichbare Genauigkeit bei deutlich geringerem Zeitaufwand (91).

Für die Differenzierung von Dysplasien im Bereich des Kolons konnten ähnlich gute Ergebnisse wie im Magen erzielt werden. Die Unterscheidung in Normalgewebe, Polyp, Adenom und Adenokarzinom erfolgte zum Großteil korrekt mit Sensitivitäten zwischen 78% und 98%. Im Bereich des Kolons konnte – auch wenngleich bisher ausschließlich im Tiermodell – ein Endomikroskop mit MPM-Technik eingesetzt werden. Bisher handelt es sich um das Einzige seiner Art. Das Gerät generiert präzise Bilder und könnte schon bald auch menschliches Gewebe darstellen (92). Abgesehen von der Krebsdiagnostik findet sich die MPM-Technologie auch in der Forschung des Morbus Hirschsprung Verwendung: Pilotstudien konnten dabei die für die Operationsplanung wichtigen Ganglienzellen erfolgreich darstellen (93).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die medizinische Forschung sich drei zentrale Vorteile des MPM zunutze macht:

1. Intravitale Bildgebung ermöglicht das Beobachten von Stoffwechselforgängen im lebenden Organismus, vorwiegend im Tiermodell und zum Teil bereits im Menschen.
2. Die Eindringtiefe des Mikroskops ist mit 200 µm zurzeit schon sehr hoch. In den nächsten Jahren wird sich die Eindringtiefe noch vergrößern. Insbesondere zur Suche, Früherkennung und Verlaufsbeobachtung von Tumoren kann bzw. könnte die Technik des MPM in Zukunft eingesetzt werden. Sollten dann entsprechende Sonden auf dem Markt sein, können damit alle Stellen des Körpers untersucht werden, die mit einer Sonde erreichbar sind. Von Interesse

sind dabei vor allem Orte, die wenig invasiv erreichbar sind (Haut, Harnwege, Magen-Darm-Trakt, Lunge).

3. Eine Färbung des Gewebes ist aufgrund der Autofluoreszenzdarstellung nicht notwendig. Dies könnte pathologische Arbeitsschritte deutlich beschleunigen.



## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Ethikantrag, Patientenschutz und Registrierung**

Vor Beginn der Projektreihe zum Multiphotonenmikroskop wurde ein Ethikantrag gestellt, welcher vom Ethikkomitee der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz ein positives Votum erhielt (Nr. 837.274.15 (10.042)).

Vor Beginn der Arbeiten lag für die von uns untersuchten Gewebeproben dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz das Einverständnis der Eltern bzw. Sorgeberechtigten vor. Der Projektgruppe der Klinik- und Poliklinik für Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Mainz wurden anonymisierte Obduktionsberichte des Instituts für Pathologie zur Verfügung gestellt.

Die Studie wurde entsprechend den Empfehlungen der Deklaration von Helsinki von 1964 und nachfolgenden Ergänzungen registriert (94). Sie ist auf [www.researchregistry.com](http://www.researchregistry.com) unter der Registrierungsnummer *researchregistry2967* einsehbar.

### **3.2 Gewebeschnitte**

Für unser Projekt wurde eine HE-Gewebefärbung verwendet. Da es sich um Standard-Prozeduren handelt, erfolgt hier eine kurze Beschreibung.

Zur Untersuchung mittels MPM wurden ungefärbte Organschnitte verwendet. Die Gewebe wurden nach der Entnahme in Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms erfolgte letztendlich die Anfertigung von 3 µm dicken Schnitte. Die fertigen Schnitte wurden uns freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt.

Als Referenzmethode wurden uns Schnitte in Hämatoxylin-Eosin-Färbung, welche nach dem Standardprotokoll der Universitätsmedizin gefärbt waren, vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt. Die Dicke der Schnitte betrug ebenfalls 3 µm.

### **3.3 Multiphotonenmikroskop**

Für unsere Aufnahmen wurde ein Zwei-Photonen Laser Scanning Mikroskop vom Typ Leica TCS MP5 (Leica Microsystems, Wetzlar) verwendet, wobei ein HCX IRAPO L

25x/0,95 W Objektiv (Leica Microsystems, Wetzlar) verwendet wurde. Die ungefärbten Gewebeschnitte wurden mit einem gepulsten Titansaphir-Femtosekundenlaser (Chameleon Ultra, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA) mit einer Wellenlänge von 1000 nm angeregt.

Folgende MPM Laser-Einstellungen wurden für die jeweiligen Aufnahmen gewählt, wobei diese oftmals, je nach Gewebeschnitt, angeglichen werden mussten: Transmission: 35%, Gain: 66%, Offset: 55%. Die Steuerung erfolgte durch die Leica LAS-AF Software (Leica Application Suite, Leica Microsystems, Wetzlar).

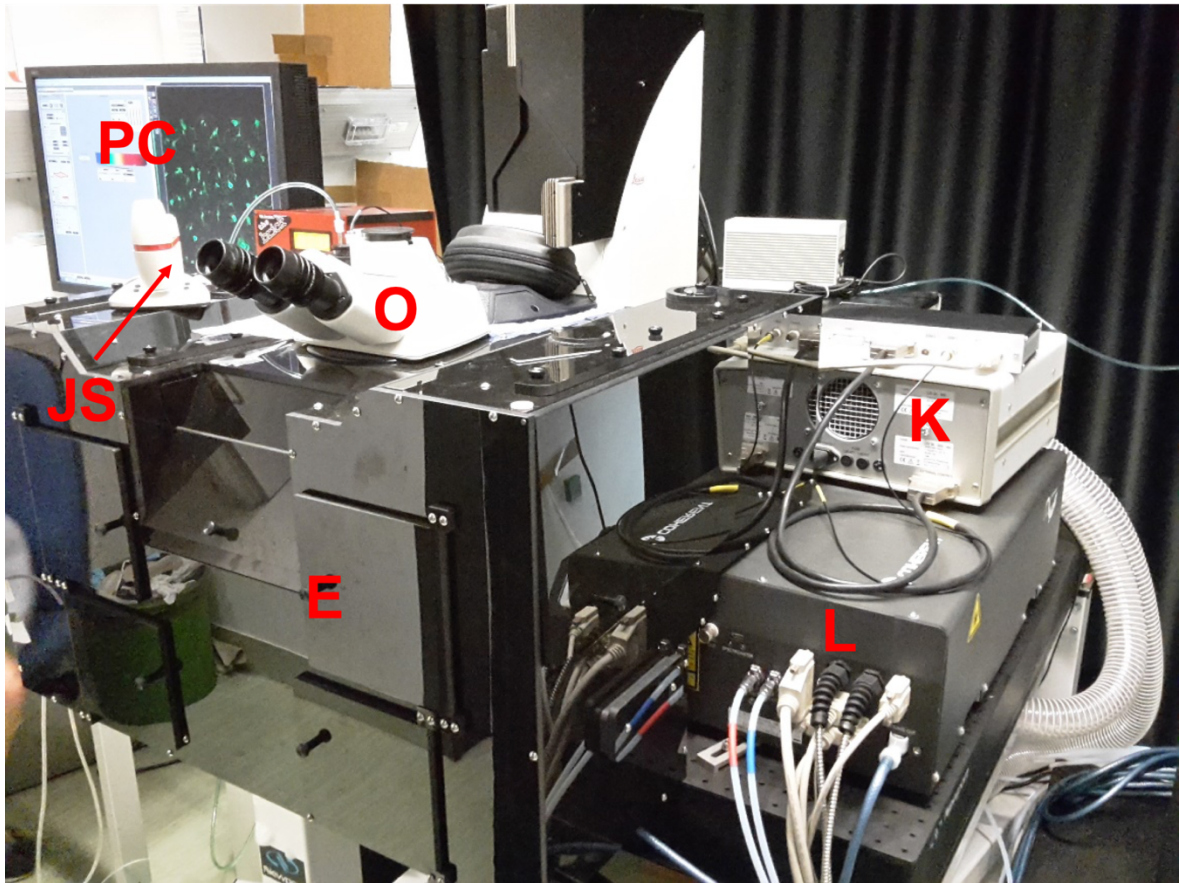
Mittels des verwendeten Filterblocks, welcher die beiden Emissionsfilter CFP BP 483/32 (cyan) und YFP BP 535/30 (yellow) beinhaltet, konnten letztendlich zwei unterschiedliche Graustufenbilder, die dem Autofluoreszenzsignal (CFP BP 483) und der SHG (YFP BP 535) entsprechen, generiert werden.

Die Falschfarbuzuordnung erfolgte wie folgt: dem Autofluoreszenzsignal wurde mittels der verwendeten Software die Farbe grün, dem SHG-Signal die Farbe rot zugewiesen.

Die beiden Farbbilder wurden anschließend mit dem Programm ImageJ (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) bezüglich Ihrer Intensität angeglichen und zur Deckung gebracht, so dass ein zweifarbiges Bild entstand.

Bei einigen Geweben wie der Nebenniere wurden mehrere Bilder am Computer mittels Microsoft PowerPoint aus vielen einzelnen Farbbildern zusammengesetzt. Dies ermöglichte aufgrund der Darstellung einer größeren Gewebefläche eine bessere Begutachtung des Gewebes.

Das maximale Sichtfeld des Mikroskops betrug  $620 \mu\text{m} \times 620 \mu\text{m}$ , wobei je nach Gewebe verschiedene Zoom-Stufen verwendet wurden. Dies gelang durch die Anpassung der Z-Ebene im Mikroskop.



**Abb. 10:** MPM-Arbeitsplatz: JS: Joystick zur dreidimensionalen Steuerung, E: Einschub für Präparate, L: Lasergenerator, K: Kühlung, PC: Computer, O: Okular. Mit freundlicher Genehmigung von Jérôme Birkenstock, Forschungszentrum für Translationale Neurowissenschaften, Universitätsmedizin Mainz.

### 3.4 Lichtmikroskop

Für die Aufnahme der HE-Schnitte wurde das Lichtmikroskop Axioplan der Firma Zeiss (Carl-Zeiss Microcopy, Jena) verwendet. Je nach Präparat wurden Objektive mit 10x, 20x oder 40x Vergrößerung gewählt. Da zu den MPM-Bildern passende Gewebeabschnitte aufgenommen werden mussten, unterschied sich der Zoom von Bild zu Bild. Die Aufnahme erfolgte über eine Olympus XC30 Kamera (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg) und wurde mittels cellSens Dimension (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg) gesteuert. Zuschnitt und Nachbearbeitung der Bilder erfolgte mittels Fiji Image J (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) und Microsoft PowerPoint (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)

### 3.5 Studie

#### 3.5.1 Stichprobe

Insgesamt nahmen 122 Pathologen an der Studie teil. Von diesen beendeten 38 Teilnehmer die Studie. Eine genaue Beschreibung der Teilnehmer findet sich im

Ergebnisteil der Dissertation. Alle Teilnehmer wurden über die anonymisierte Verarbeitung der Daten informiert. Zudem konnte die Studie entsprechend der Deklaration von Helsinki jederzeit und ohne Angabe von Gründen beendet werden (94). Nur vollständig bearbeitete Fragebögen wurden in der Auswertung berücksichtigt. Gründe für einen Abbruch wurden nicht aktiv erfasst. Einzelne Teilnehmer informierten uns über technische Probleme im Ablauf der Studie (Absturz der Studie).

### **3.5.2 Software**

Die Bewertung der Gewebeproben erfolgte online über einen Einladungslink. Als Anbieter verwendeten wir das webbasierte Umfrageprogramm QuestionPro (QuestionPro, 548 Market St #62790 San Francisco, CA 94104-5401).

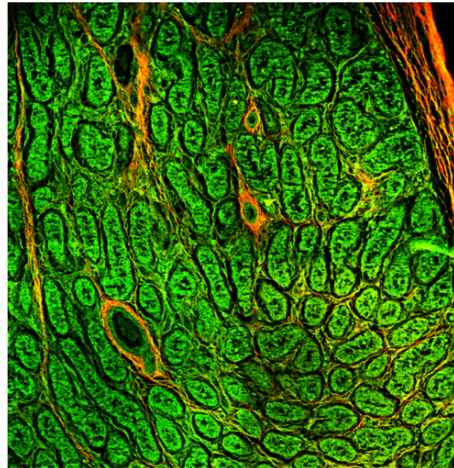
### **3.5.3 Design und Ablauf der Studie**

Die Studie war im Dreischrittverfahren konzipiert, wobei ein Wechseln zwischen den Fragen nicht möglich war (siehe Abb. 11). Hierbei wurden die Fragen allen Teilnehmern in der gleichen Reihenfolge präsentiert: Dem MPM-Bild folgte stets das korrespondierende HE-Bild. Nach den Single Choice-Fragen zu MPM-Aufnahmen und lichtmikroskopischen HE-Bildern wurde die korrekte Lösung angezeigt. Die Auswahl der Organe und Tumoren zeigt Tab. 7. Anschließend mussten die Teilnehmer in einem dritten Schritt organspezifische Strukturen bewerten. Die Legende (Abb. 29) war immer eingeblendet. Im tumorspezifischen Teil der Umfrage wurden im dritten Schritt die Histopathologie bewertet. Am Ende hatten die Teilnehmer noch die Möglichkeit ihre Nationalität und das aktuelle Tätigkeitsfeld anzugeben. Eine Zeitlimitation war nicht vorgegeben.

Question	Possible Answers
1	Kidney
	Pancreas
	Urinary bladder
	Testis
	Adrenal gland
	Liver
2	Small intestine
	Lung
	Larynx
	Adrenal gland
	Trachea
	Liver
3	Kidney
	Skeletal muscle
	Adrenal gland
	Tendon
	Heart muscle
	Bone
4	Kidney
	Prostata
	Seminal vesicle
	Liver
	Heart
	Ovary

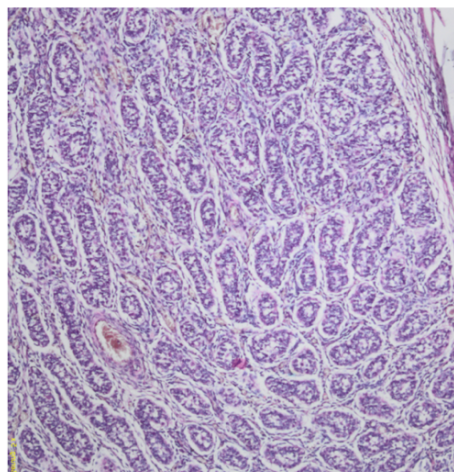
Question	Possible Answers
5	Kidney
	Prostate
	Adrenal gland
	Liver
	Heart
	Ovary
6	Prostate
	Kidney
	Adrenal gland
	Liver
	Testicle
	Ovary
7	Hepatoblastoma (liver)
	Nephroblastoma (kidney)
	Rhabdomyosarcoma (urinary bladder)
	Neuroblastoma (adrenal gland)
	Ewing's sarcoma (sacrum)
	Soft-tissue sarcoma (forearm)
8	Hepatoblastoma (liver)
	Nephroblastoma (kidney)
	Rhabdomyosarcoma (urinary bladder)
	Neuroblastoma (adrenal gland)
	Ewing's sarcoma (sacrum)
	Soft-tissue sarcoma (forearm)

**Tab. 7:** Auswahlmöglichkeiten für die Single Choice Fragen im ersten und zweiten Teil der Umfrage: Die grün markierte Auswahl stellte die gesuchte Antwort dar.



Step 1: Single Choice  
MPM

1. Prostata
2. Kidney
3. Adrenal gland
4. Liver
5. Testicle
6. Ovary

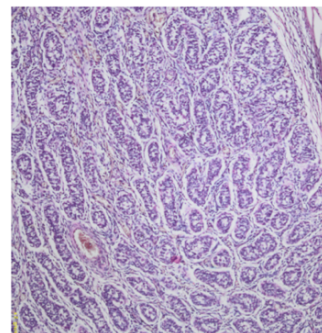
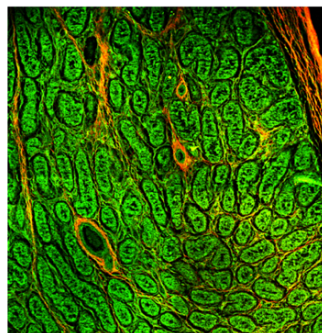


Step 2: Single Choice  
HE

1. Prostata
2. Kidney
3. Adrenal gland
4. Liver
5. Testicle
6. Ovary

Resolution

Step 3: Organ details MPM vs. HE



- Tunica albuginea testis
- Tubuli seminiferi contortiti
- Septum testis
- Lamina limitans
- Blood vessels
- Cell nuclei

**Abb. 11:** Beispielfrage zum Hodengewebe: Schritt 1: Single Choice aus 6 Antwortmöglichkeiten. Schritt 2: Single Choice HE aus 6 Möglichkeiten. Schritt drei (beide Bilder nebeneinander): Vergleich von organ- und tumorspezifischen Strukturen. Die Bewertungsskala zeigt Abb. 29.

### 3.5.4 Statistische Auswertung

Auswertung und Anpassung der Rohdaten von 38 Teilnehmern erfolgte mittels SPSS 23 V5 (IBM Deutschland GmbH, IBM-Allee 1,71139 Ehningen) und wurde im Rahmen einer Vorveröffentlichung der Ergebnisse durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universitätsmedizin Mainz (IMBEI) betreut (95). Alle Teilnehmerdaten wurden anonymisiert ausgewertet. Das Signifikanzniveau der angewandten Tests wurde bei  $\alpha = 0,05$  festgesetzt.

Als Teil der deskriptiven Statistik wurden Häufigkeiten, Mittelwerte und deren 95%-Konfidenzintervalle für folgende Fragestellungen bestimmt:

- Erkennungsraten der gesunden Gewebepräparate
- Erkennungsraten der soliden Tumoren
- Bewertung der Organdetails (vgl. Abb. 29)
- Bewertung der Tumordetails (vgl. Abb. 29)

Zudem wurden freiwillige Angaben zu Nationalität und Tätigkeitsfeld der Pathologen erfasst und deskriptiv ausgewertet.

Zusätzlich zur deskriptiven Statistik wurde für die Erkennungsraten der dichotomen Ausprägung (Organ/Tumor richtig erkannt vs. nicht erkannt) der McNemar-Test für verbundene Stichproben angewandt. Diese statistische Überprüfung wurde zur Interpretation der deskriptiven Unterschiede vorgenommen.

Hierfür wurden folgende Hypothesen postuliert:

- Nullhypothese ( $H_0$ ): Die Trefferraten der Pathologen unterscheiden sich bei den beiden untersuchten Methoden (MPM vs. HE) nicht
- Alternativhypothese ( $H_1$ ): Die Trefferraten der Pathologen unterscheiden sich bei den beiden untersuchten Methoden (MPM vs. HE)

Aufgrund der ordinalskalierten Ausprägung von organ- bzw. tumorspezifischen Items (vgl. Abb. 29) wurde der Wilcoxon-Rangfolgetest verwendet. Diese statistische Überprüfung wurde zur Interpretation der deskriptiven Unterschiede vorgenommen.

Hierfür wurden folgende Hypothesen postuliert:

- Nullhypothese ( $H_0$ ): Die Bewertung der Items durch die Pathologen unterscheiden sich bei den beiden untersuchten Methoden (MPM vs. HE) nicht

- Alternativhypothese ( $H_1$ ): Die Bewertung der Items durch die Pathologen unterscheiden sich bei den beiden untersuchten Methoden (MPM vs. HE)



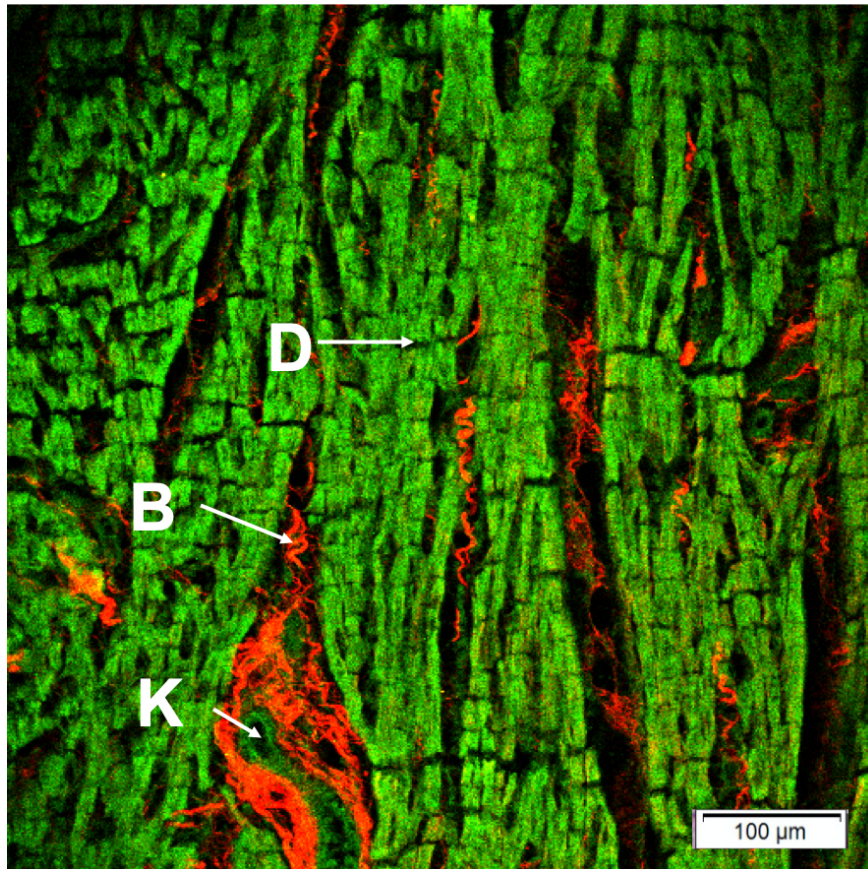
## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse der Aufnahmen**

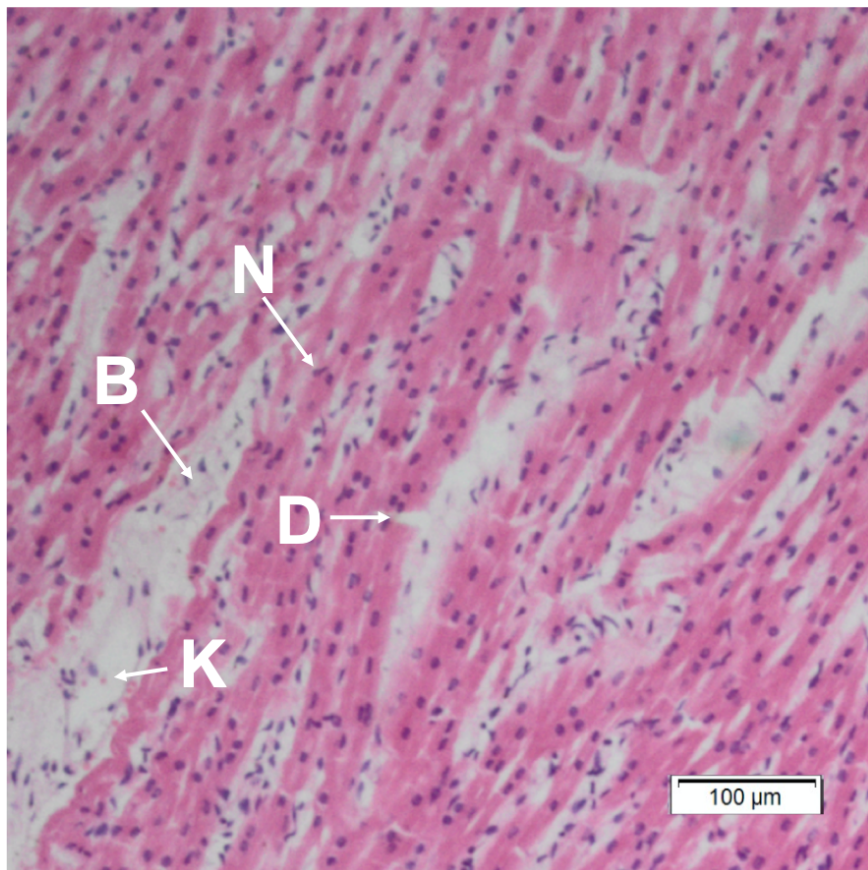
Ab Mai 2017 wurden von uns Bilder mit dem Multiphotonenmikroskop angefertigt. Als Vergleichstechnik wurden identische bzw. ähnliche Gewebeareale in den HE-Schnitten im Lichtmikroskop fotografiert.

Folgende Normal und Tumorgewebe wurden untersucht:

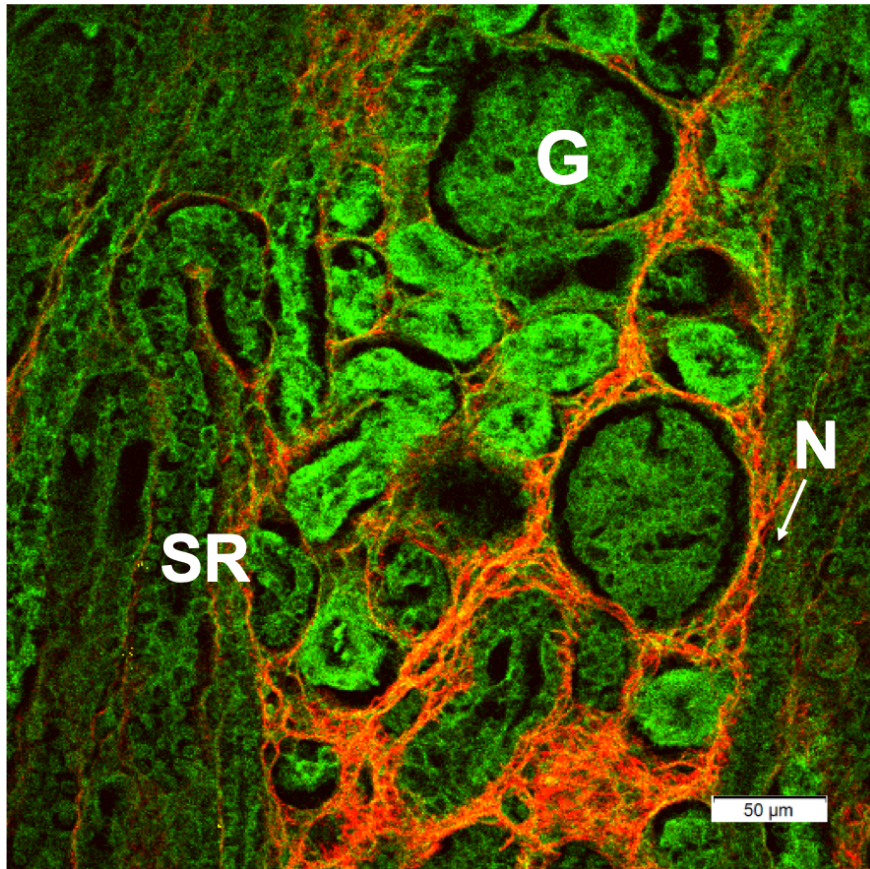
- MPM-Testobjektträger mit pflanzlichem Gewebe der Firma Leica
- Herzmuskel
- Niere
- Lunge
- Leber
- Hoden
- Nebenniere
- Neuroblastom des Nebennierenmarks
- Rhabdomyosarkom der Harnblase



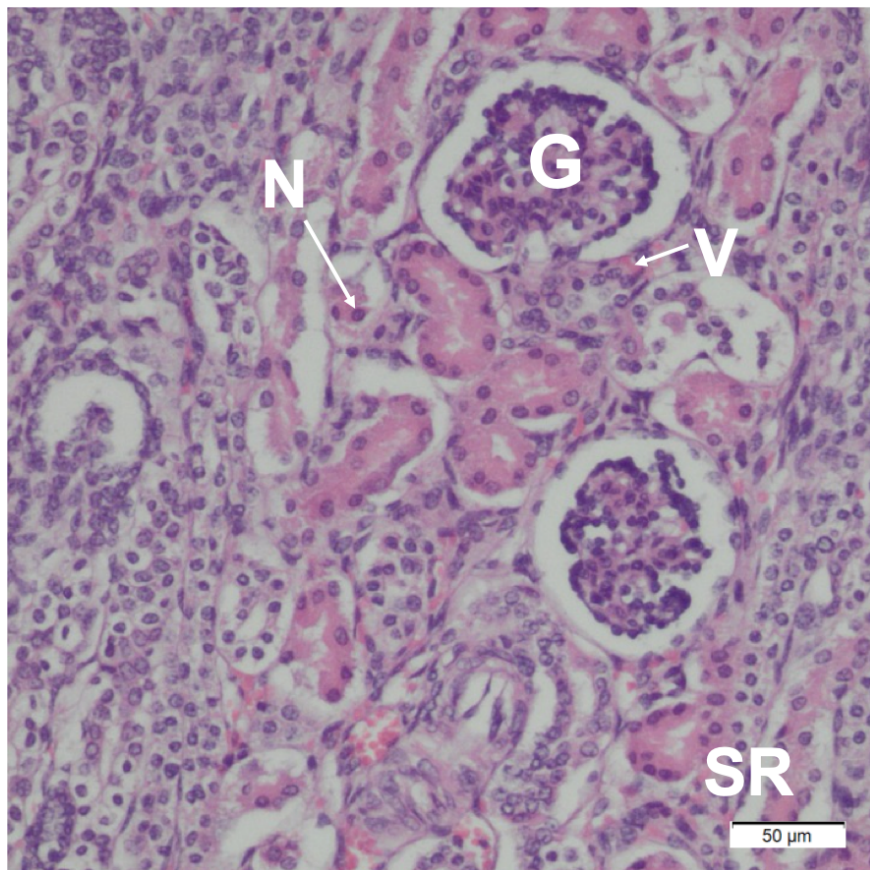
**Abb. 12:** Multiphotonen-Aufnahme von Herzmuskelgewebe. D: *Disci Intercalares*, B: *Bindegewebe*, K: *Kapillargefäße*. In grün ist die Multiphotonen-Fluoreszenz dargestellt, rot ist die Darstellung der *second harmonic generation*.



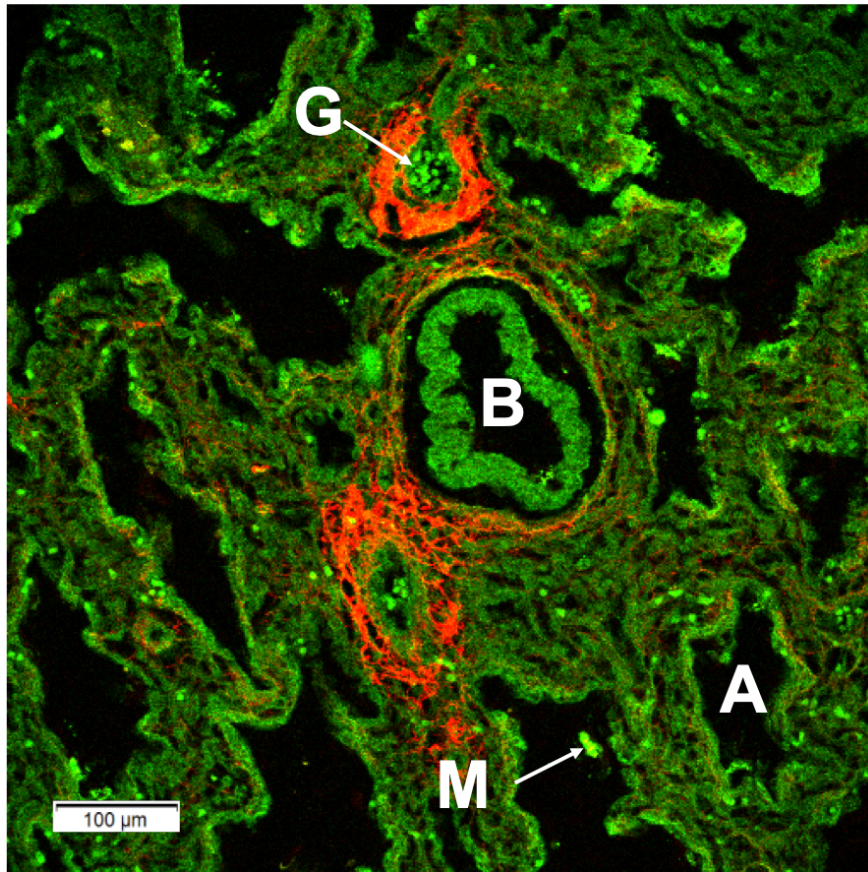
**Abb. 13:** Aufnahme von HE-gefärbtem Herzmuskelgewebe mittels Lichtmikroskopie. D: *Disci Intercalares*, B: *Bindegewebe*, K: *Kapillargefäße*, N: *Nucleus (Zellkern)*.



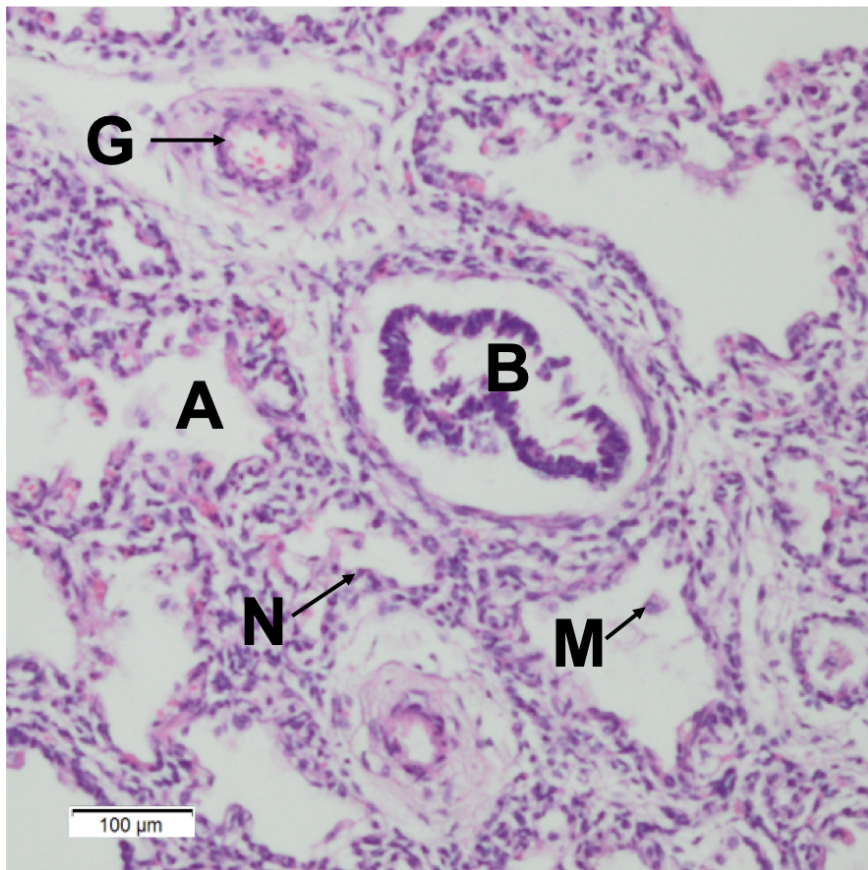
**Abb. 14:** Multiphotonen-Aufnahme von Nierengewebe. G: Glomerulus, N: Nucleus (Zellkern), SR: Sammelrohr. In grün ist die Multiphotonen-Fluoreszenz dargestellt, rot ist die Darstellung der second harmonic generation.



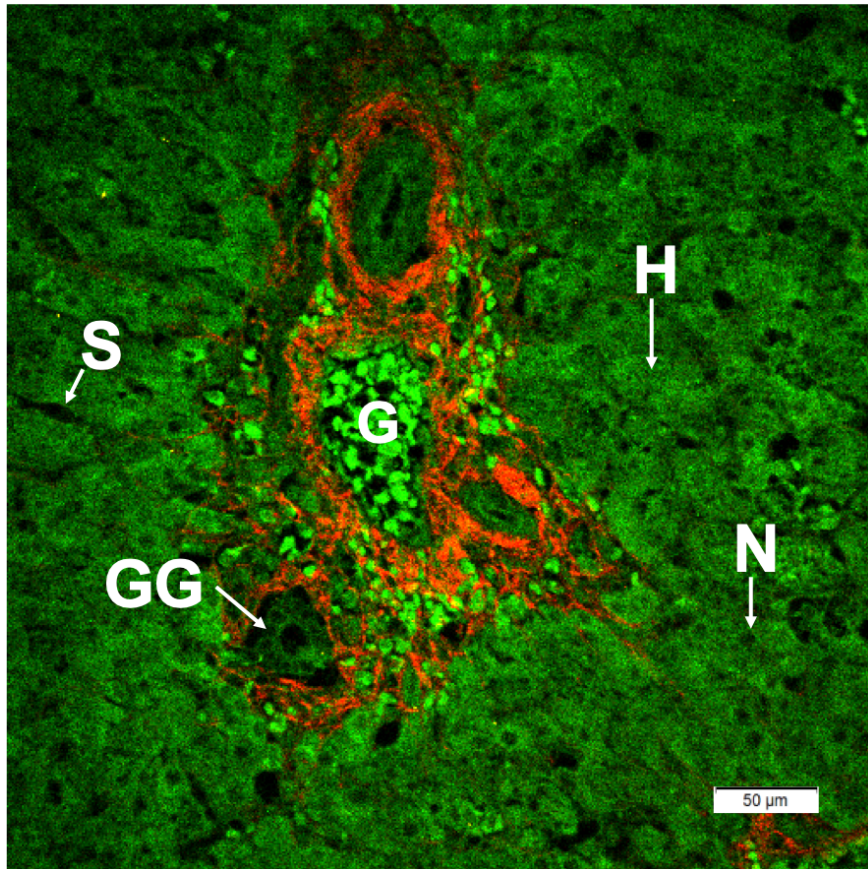
**Abb. 15:** Aufnahme von HE-gefärbtem Nierengewebe mittels Lichtmikroskop. G: Glomerulus, N: Nucleus (Zellkern), SR: Sammelrohr, V: Vas afferens/efferens.



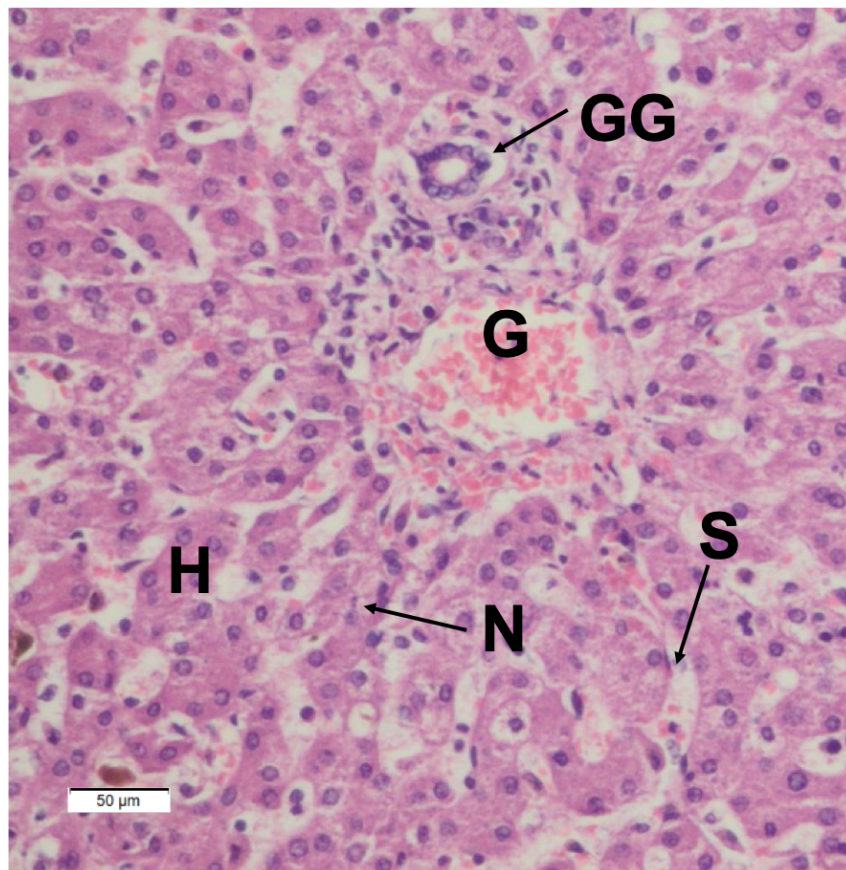
**Abb. 16:** Multiphotonenaufnahme von Lungengewebe. B: Bronchiolus, M: Alveolarmakrophage, G: Gefäße, A: Alveole. In grün ist die Multiphotonen-Fluoreszenz dargestellt, rot ist die Darstellung der second harmonic generation.



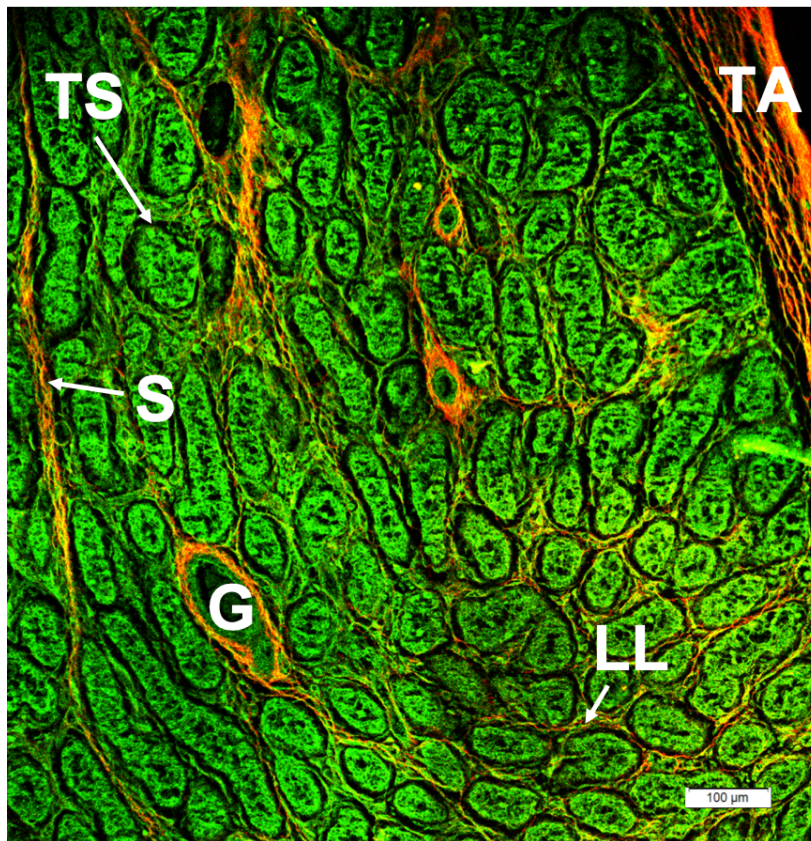
**Abb. 17:** Aufnahme von HE-gefärbtem Lungengewebe mittels Lichtmikroskop. B: Bronchiolus, M: Alveolarmakrophage, G: Gefäße, A: Alveole, N: Nucleus (Zellkern).



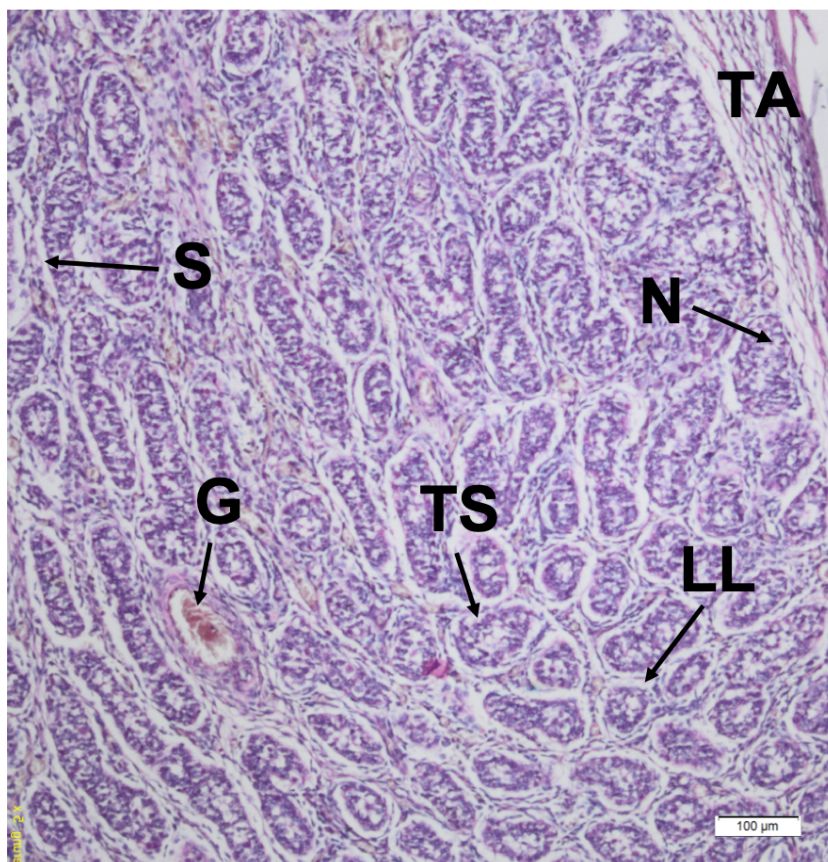
**Abb. 18:** Multiphotonenaufnahme von Lebergewebe. G: Glisson-Trias, N: Nucleus (Zellkern), GG: Gallengang, H: Hepatozyt, S: Sinusoid. In grün ist die Multiphotonen-Fluoreszenz dargestellt, rot ist die Darstellung der second harmonic generation.



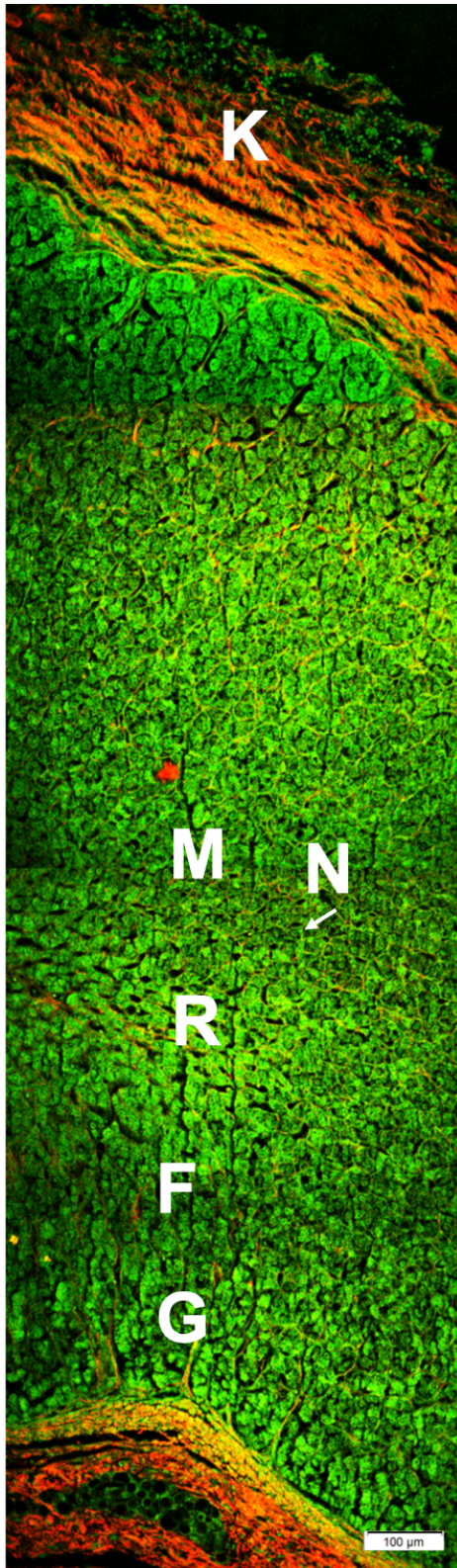
**Abb. 19:** Aufnahme von HE-gefärbtem Lebergewebe mittels Lichtmikroskop. G: Glisson-Trias, N: Nucleus (Zellkern), GG: Gallengang, H: Hepatozyt, S: Sinusoid.



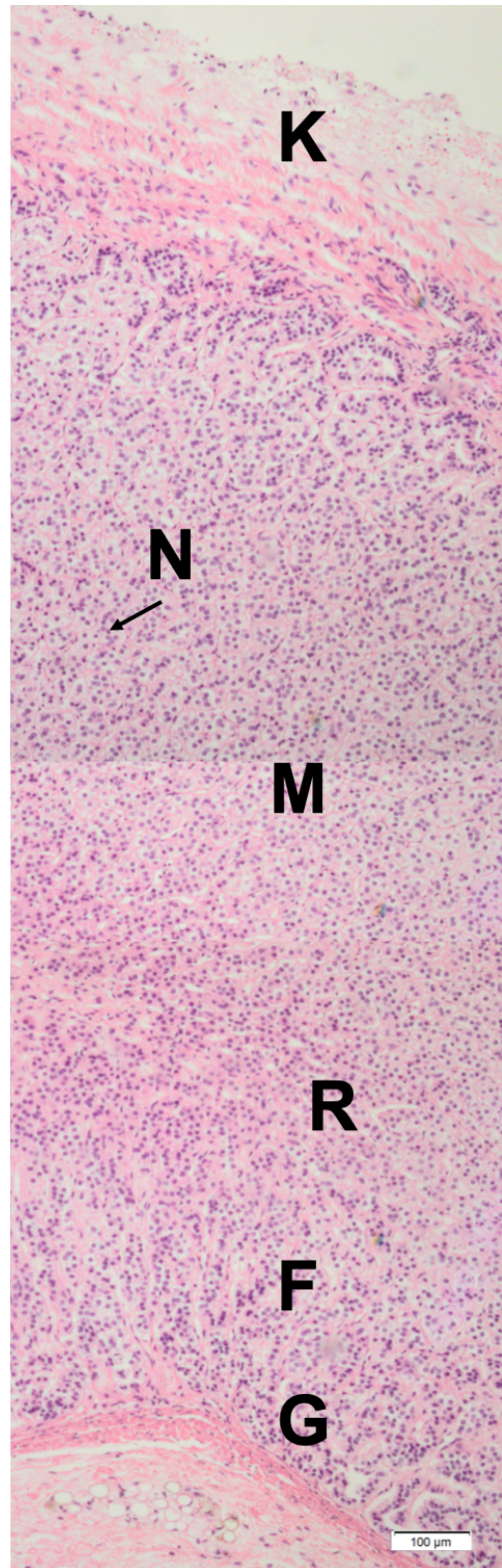
**Abb. 20:** Multiphotonenaufnahme von Hodengewebe. TA: Tunica albuginea testis, LL: Lamina limitans, G: Gefäß, S: Septum testis, TS: Tubuli seminiferi contorti. In grün ist die Multiphotonen-Fluoreszenz dargestellt, rot ist die Darstellung der second harmonic generation.



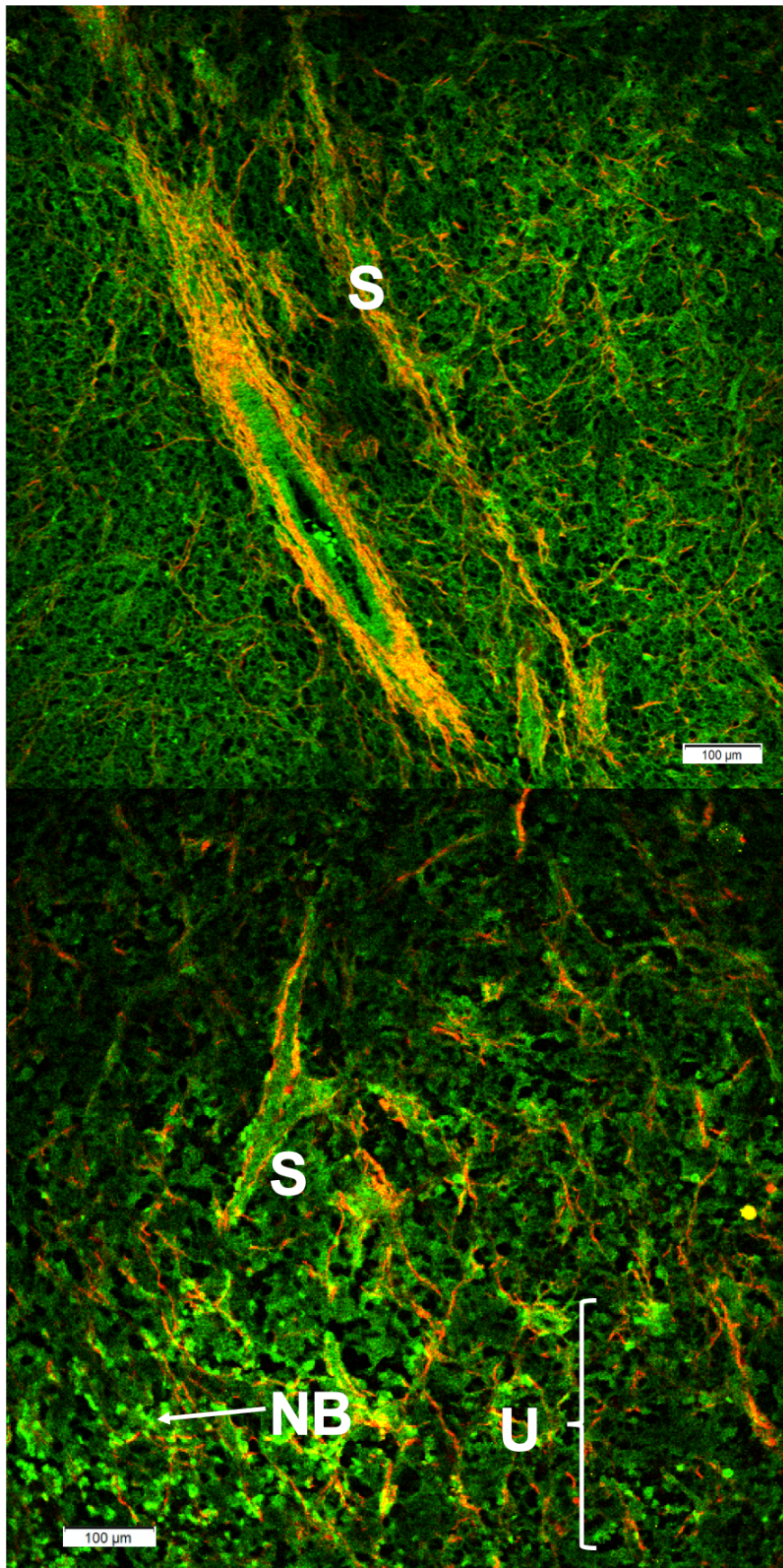
**Abb. 21:** Aufnahme von HE-gefärbtem Hodengewebe mittels Lichtmikroskop. TA: Tunica albuginea testis, LL: Lamina limitans, G: Gefäß, S: Septum testis, TS: Tubuli seminiferi contorti, N: Nucleus (Zellkern).



**Abb. 22:** Multiphotonenaufnahme von Nebennierengewebe. K: Kapsel, G: Zona glomerulosa, F: Zona fasciculata, R: Zona reticularis, M: Nebennierenmark, N: Nucleus (Zellkern). In Grün ist der MPM-Kanal dargestellt, rot ist die Darstellung der second harmonic generation.

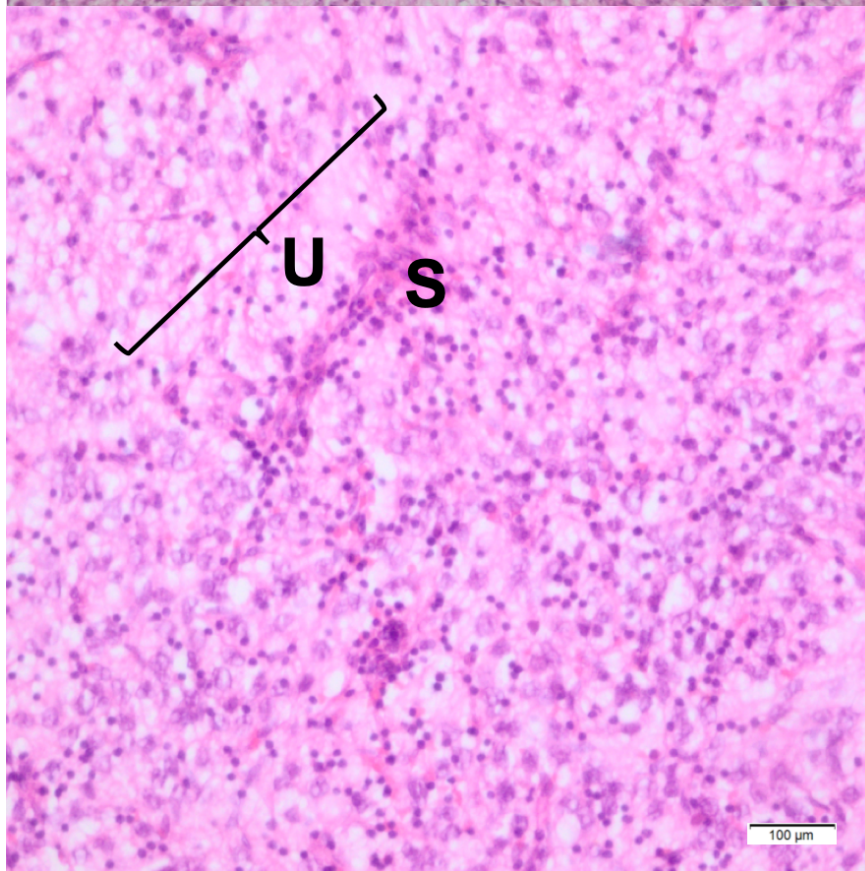
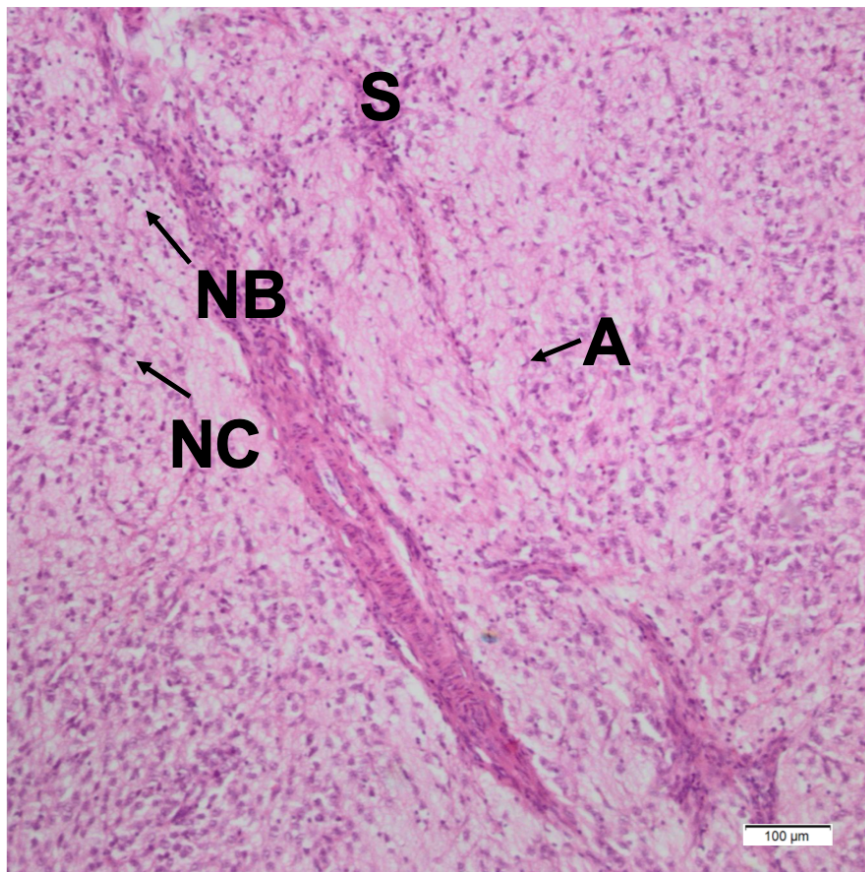


**Abb. 23:** Aufnahme von HE-gefärbtem Nebennierengewebe mittels Lichtmikroskopie. K: Kapsel, G: Zona glomerulosa, F: Zona fasciculata, R: Zona reticularis, M: Nebennierenmark, N: Nucleus (Zellkern).

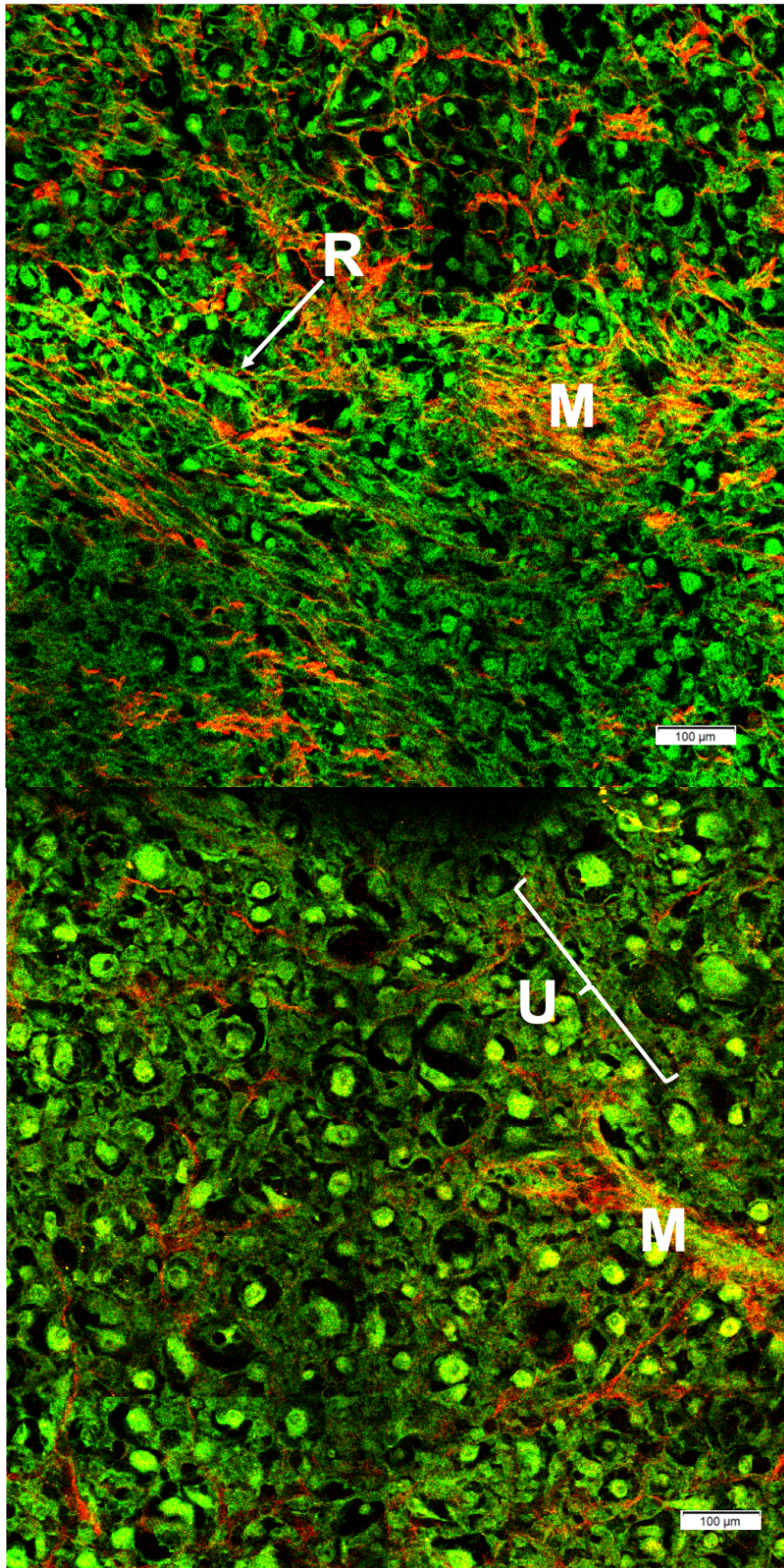


**Abb. 24:** Multiphotonen-Aufnahmen von Nebennierengewebe mit diagnostiziertem Neuroblastom. S: Stroma mit Tumorgefäßen, U: Unscharfe Zellbegrenzungen, NB: Neuroblasten. In grün ist der MPM-Kanal dargestellt, rot ist die Darstellung der second harmonic generation.

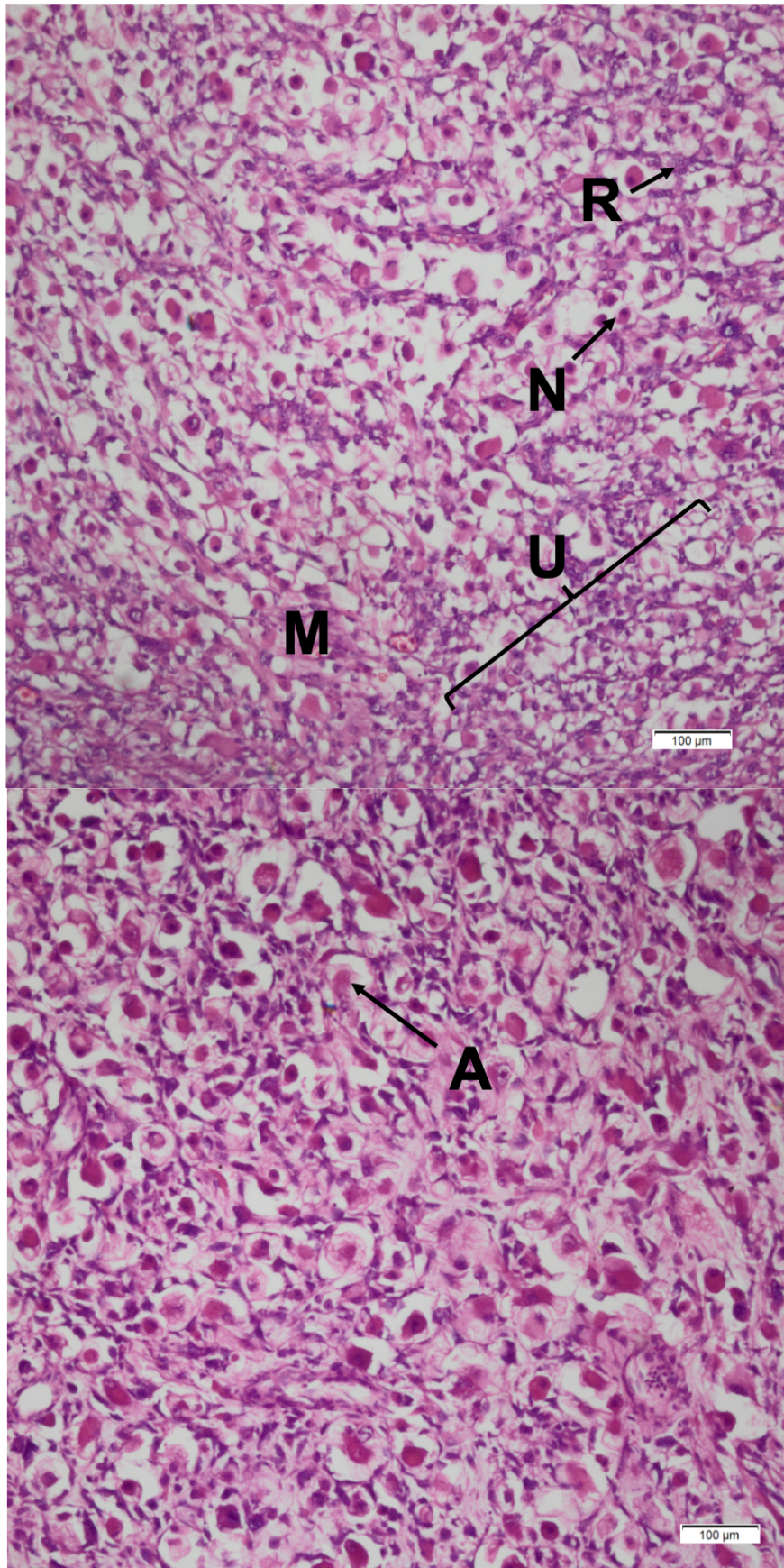




**Abb. 25:** Aufnahme von HE-gefärbtem Neuroblastomgewebe der Nebenniere. S: Stroma mit Tumorgefäßen, U: Unscharfe Zellbegrenzungen, NB: Neuroblasten, NC: Nuclei mit punktiertem Chromatin, A: Atypische Zellen.



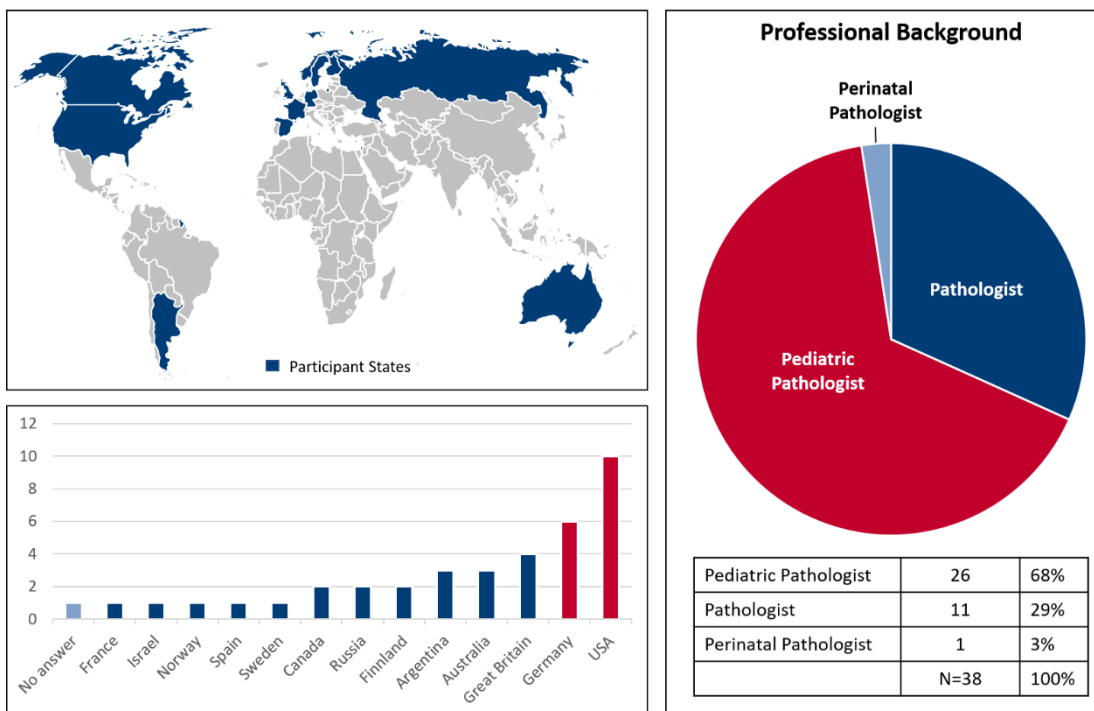
**Abb. 26:** Multiphotonen-Aufnahme von Harnblasengewebe bei diagnostiziertem Rhabdomyosarkom. R: Rhabdomyoblast, M: Myxoides Stroma, U: Unscharfe Zellbegrenzungen. In grün ist der MPM-Kanal dargestellt, rot ist die Darstellung der second harmonic generation.



**Abb. 27:** Aufnahme von HE-gefärbtem Rhabdomyosarkomgewebe der Harnblase. R: Rhabdomyoblast, M: Myxoides Stroma, U: Unscharfe Zellbegrenzungen, A: Atypische Zellen, N: Nucleus (Zellkern).

## 4.2 Internationale Studie

### 4.2.1 Teilnehmer



**Abb. 28:** Verteilung der Studienteilnehmer. Links derzeitiges Aufenthaltsland der Teilnehmer. Rechts: Qualifikation der Teilnehmer. Folgende Auswahlmöglichkeiten gab es: Pathologist, Pediatric Pathologist, Pediatric Surgeron, Pediatrician und Other. Unter Other konnte dann eine Freitextantwort getätigt werden.

Um die Technik der Multiphotonenmikroskopie zu evaluieren, war es notwendig, möglichst viele Experten auf dem Gebiet der Pathologie und Kinderpathologie zu Rate zu ziehen. Aufgrund der geringen Anzahl von Kinderpathologen im deutschsprachigen Raum entschlossen wir uns Kinderpathologen weltweit zu kontaktieren. Im Herbst 2017 wurden 252 (Kinder-)Pathologen aus 30 Ländern via E-Mail gebeten, an unserer englischsprachigen Umfrage teilzunehmen. Des Weiteren wurden Informationen zu unserer Umfrage in einem Online-Forum der Pediatric Pathology Society, der Society for Pediatric Pathology, der Australian & New Zealand Pediatric Pathology Group und der Sociedad Latinoamericana de Pathologia Pediatrica geteilt. Die Teilnahme erfolgte freiwillig und wurde nicht vergütet. Zum Ende des Umfragezeitraumes im Dezember 2017 hatten 122 Teilnehmer die Umfrage geöffnet, von denen 38 die Umfrage vollständig beantworteten. Die Rückmeldequote bezogen auf die kontaktierten Pathologen betrug 15,07%. Die durchschnittliche Bearbeitungsdauer der Umfrage

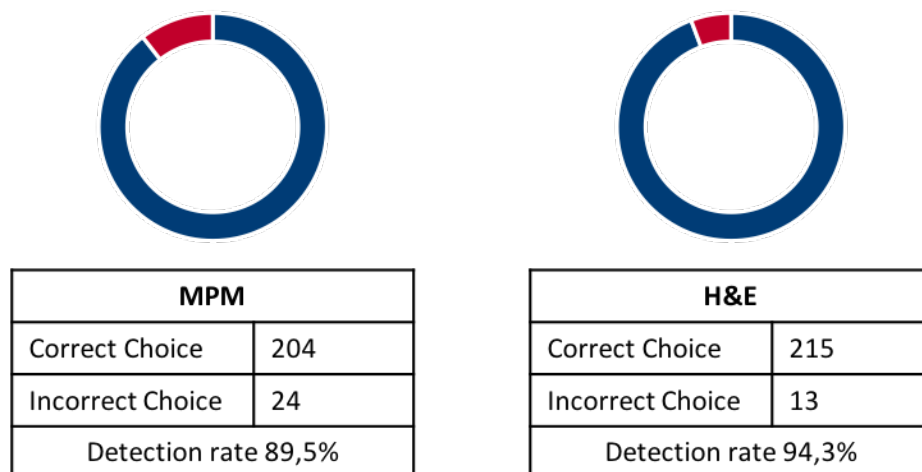
betrug 25,35 Minuten (95% CI 19,75 – 30,95 Minuten). Eine Verteilung der Teilnehmer zeigt Abb. 28.

## 4.2.2 Ergebnisse der Umfrage

### 4.2.2.1 Ergebnisse der Single-Choice-Auswahl

#### Gesunde Organe

Gesunde Organe des Neugeborenen bzw. Kleinkindes wurden im Schnitt sowohl in der Multiphotonen- als auch in der lichtmikroskopischen Aufnahme von konventionellen HE gefärbten Schnitten annähernd gleich gut erkannt. Rechnerisch wurden in der MPM Methode im Schnitt 5,37 von 6 Organen richtig erkannt (95% CI 5,16-5,58). In der H&E-Färbung 5,66 von 6 (95% CI 5,48-5,83). Der McNemar-Test für alle 6 Organe zusammengefasst zeigt einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Erkennungsraten ( $p < 0,05$ ). Eine Zusammenfassung für alle gesunden Organe zeigt Tab. 8.



**Tab. 8:** Zusammengefasste Erkennungsrate aller gesunder Organe. Für jede der beiden Techniken gaben die 38 Teilnehmer bei jedem der 6 Organe ihre Stimme ab. Pro Technik ergeben sich 228 Stimmen. Blau entspricht den richtigen und rot den falschen Antworten.

#### Leber

Das von uns verwendete Bild eines Lebergewebeschnittes des Neugeborenen wurde anhand der Multiphotonen-Aufnahmen von 37 Teilnehmern erkannt (Erkennungsrate 97,4%). Einer der Teilnehmer wählte das Pankreas aus. Anhand der lichtmikroskopischen HE-Aufnahmen wählten alle Teilnehmer die Leber. Im McNemar-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied.

### Lunge

Die Lunge wurde sowohl in der Multiphotonen-Aufnahme als auch in der H&E-Darstellung gleich gut erkannt mit einer Erkennungsrate von jeweils 100%. Im McNemar-Test zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

### Herzmuskel

Die Organdiagnose Herzmuskel mit den vorgegebenen Bildern gestaltete sich für viele Teilnehmer schwieriger. Anhand der Multiphotonen-Aufnahme wählten mehr Teilnehmer den Skelettmuskel als vermeintlich richtige Auswahl. Nur 44,7% wählten Herzmuskel, 55,4% wählten Skelettmuskel. In der H&E-Darstellung wählten 71,1% Herzmuskel und 28,9% Skelettmuskel. Der P-Wert im McNemar-Test beträgt  $<0,05$ , was einen signifikanten Unterschied darstellt.

### Niere

36 Teilnehmer erkannten das MPM-Bild richtig, je ein Teilnehmer wählt Samenblase und Prostata. In der H&E-Darstellung wählten 37 Teilnehmer Niere, ein Teilnehmer wählte Prostata. Die Erkennungsrate betrug beim MPM 94,7%, in H&E 97,4%. Im McNemar-Test zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

### Nebenniere

Die Organdiagnose scheint wiederum vielen Teilnehmer einfacher zu fallen und so werteten in beiden Methoden alle Teilnehmer die vorgegebenen Schnitte als Nebenniere. Erkennungsrate 100%. Im McNemar-Test zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

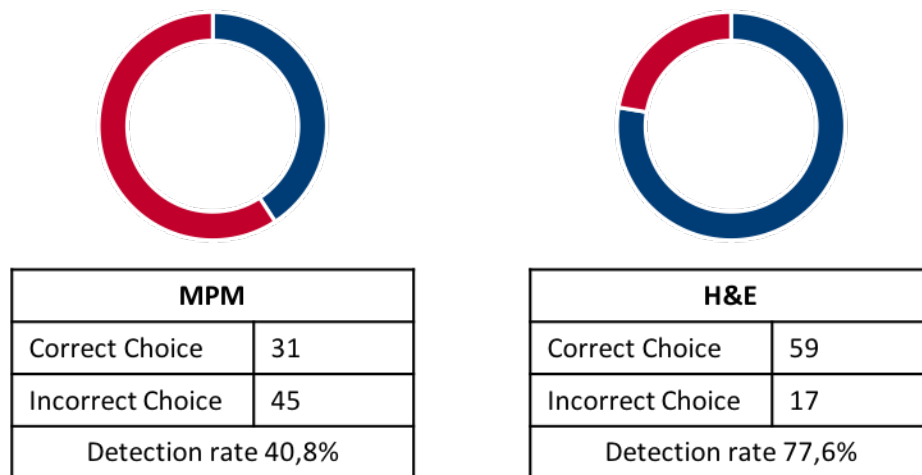
### Hoden

Im MPM zeigt sich eine Erkennungsrate von 100%. In der H&E-Darstellung wählte ein Teilnehmer Prostata aus (Erkennungsrate 97,4%). Auch hier zeigt sich im McNemar-Test kein signifikanter Unterschied.

## **Solide Tumoren des Neugeborenen und Kleinkindes**

Bei den Tumoren zeigt sich insgesamt eine geringere Erkennungsrate. Des Weiteren ist auffällig, dass im Gegensatz zu den gesunden Organen die Bandbreite der gewählten Antworten zunimmt. Eine Übersicht bietet Tab. 9. Die Unterschiede sind bei

einer Beurteilung mittels des McNemar-Tests auf dem 95% Konfidenzniveau als signifikant einzuschätzen.



**Tab. 9:** Zusammengefasste Erkennungsrate der beiden Tumoren. Für jede der beiden Techniken gaben die 38 Teilnehmer bei jedem der 2 Tumoren ihre Stimme ab. Pro Technik ergeben sich 76 Stimmen. Blau entspricht den richtigen und rot den falschen Antworten.

#### Neuroblastom des Nebennierenmarks

Nur 34,2% der Teilnehmer wählten in der MPM-Darstellung das Neuroblastom als richtige Antwort aus. 47,7% und damit mehr Teilnehmer wählen das Hepatoblastom. Vier Teilnehmer entscheiden sich für das Rhabdomyosarkom. Mit einer Rate von 73,7% lagen bei der H&E Methode deutlich mehr Teilnehmer richtig. Jedoch auch hier entschieden sich mehrere Teilnehmer für andere Tumoren (5x Hepatoblastom, 2x Nephroblastom und 2x Rhabdomyosarkom). Es besteht ein signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$ .

#### Rhabdomyosarkom der Harnblase

Beim Rhabdomyosarkom stieg die Erkennungsrate in der MPM-Darstellung auf 47,7%. Je 7 Teilnehmer wählten das Nephro- bzw. Hepatoblastom aus (jeweils 18,4%). Beim vorgelegten H&E-Bild ist die Erkennungsrate erneut höher als die im MPM-Bild: 81,6%. Lediglich 3 Teilnehmer entschieden sich für das Hepatoblastom. Im McNemar-Test zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$ .

#### 4.2.1.2 Ergebnisse der Gewebecharakteristika

Auf die Single-Choice-Fragen zu einem Organ bzw. Tumor in der MPM und H&E-Darstellung sollten die Teilnehmer nun organ- und tumorspezifische Charakteristika anhand einer vorgegebenen Skala bewerten.

**Legend:** The specific structure is:  
0: Not visible  
1: Suggested without details  
2: Recognizable without further details  
3: Recognizable including all details

**Abb. 29:** Skala zur Bewertung der Organ- und Tumorcharakteristika, welche zu jeder Frage automatisch eingeblendet wurde. Für jedes Item konnte nur jeweils ein Wert ausgewählt werden.

Die Daten wurden überwiegend deskriptiv ausgewertet. Als Ergänzung wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet, um die Signifikanz auf dem 95%-Konfidenzniveau festzustellen.

### Gesunde Organe

#### Leber

	MPM Mean	MPM 95% CI	H&E Mean	H&E 95% CI	P-Value
Sinusoid	1,5	1,25-1,75	2,84	2,72 - 2,96	<0,001
Hepatocytes	1,68	1,45-1,91	2,89	2,79-3,00	<0,001
Biliary Tract	1,87	1,65-2,09	2,79	2,65-2,92	<0,001
Glisson's triad	2,29	2,04-2,54	2,82	2,69-2,95	<0,001
Cell Nuclei	0,97	0,73-1,22	2,87	2,76-2,98	<0,001

**Tab. 10:** Details der Leber. Berechnet wurden Mittelwerte, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte auf dem 95%-Konfidenzniveau. Es wurde auf zwei Nachkommastellen gerundet. Berechnung mit SPSS 23.

Bei der Leber zeigten sich in der HE-Färbung durchgehend höhere Bewertungen als in der MPM-Darstellung. Auffallend ist ebenfalls die geringere Spannbreite des 95%-Konfidenzintervalls in der H&E-Darstellung. Beim MPM-Bild stechen zwei Gewebecharakteristika heraus: Die vergleichsweise gute Bewertung der *Glisson's triad* und die schlechte Bewertung der Zellkerne.



## Lunge

	MPM Mean	MPM 95% CI	H&E Mean	H&E 95% CI	P-Value
Bronchiolus	2,34	2,12-2,56	2,71	2,54-2,88	0,001
Vessel branch of the pulmonal artery	2,10	1,87-2,34	2,76	2,60-2,92	<0,001
Alveoli	2,18	1,94-2,42	2,79	2,60-2,98	<0,001
Alveolar macrophages	1,03	0,70-1,34	1,92	1,62-2,22	<0,001
Cell Nuclei	0,76	0,56-0,97	2,42	2,21-2,63	<0,001

**Tab. 11:** Details der Lunge. Berechnet wurden Mittelwerte, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte auf dem 95%-Konfidenzniveau. Es wurde auf zwei Nachkommastellen gerundet. Berechnung mit SPSS 23.

Die Bewertungen für MPM und H&E nähern sich beim Präparat der Lunge weiter an als beim Leberschnitt. Bindegewebige Strukturen werden gut bewertet, feine Zelldetails wie Zellkerne und Alveolarmakrophagen schneiden erneut schlecht ab. Die Bewertung der Zellkerne bleibt unter Einbeziehung des 95%-Konfidenzintervalls unter einem Wert von 1, was laut der Legende zwischen „Not visible“ und „Suggested without details“ einzuordnen ist.

## Herz

	MPM Mean	MPM 95% CI	H&E Mean	H&E 95% CI	P-Value
Connective Tissue	2,42	2,18-2,66	2,26	2,02-2,50	0,4
Disci intercalares	2,55	2,33-2,78	1,45	1,17-1,73	<0,001
Capillary vessels	1,47	1,16-1,79	1,79	1,46-2,12	0,06
Cell Nuclei	0,68	0,45-0,91	2,71	2,54-2,88	<0,001

**Tab. 12:** Details des Herzens. Berechnet wurden Mittelwerte, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte auf dem 95%-Konfidenzniveau. Es wurde auf zwei Nachkommastellen gerundet. Berechnung mit SPSS 23.

Bei der Single-Choice-Auswahl weichen die Ergebnisse für das Präparat des Herzens stark voneinander ab. Anders gestaltet sich dies für die Gewebecharakteristika: Für das Bindegewebe des Herzens und die Kapillargefäße lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden feststellen. Die Disci intercalares werden im MPM signifikant besser bewertet als in der H&E-Darstellung. Dies bedeutet, dass für diese Strukturen die Ergebnisse von MPM und der H&E-Färbung in Verbindung mit konventioneller Lichtmikroskopie als gleich gut einzuordnen sind. Die Zellkerne hingegen werden im H&E-Bild deutlich besser bewertet.

## Niere

	MPM Mean	MPM 95% CI	H&E Mean	H&E 95% CI	P-Value
Glomerulus	2,08	1,82-2,34	2,82	2,67-2,97	<0,001
Afferent / Efferent vessel	1,34	1,03-1,65	1,90	1,58-2,21	0,002
Cell Nuclei	1,05	0,81-1,29	2,73	2,59-2,88	<0,001
Collection tubuli	1,97	1,70-2,24	2,82	2,69-2,94	<0,001

**Tab. 13:** Details der Niere. Berechnet wurden Mittelwerte, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte auf dem 95%-Konfidenzniveau. Es wurde auf zwei Nachkommastellen gerundet. Berechnung mit SPSS 23.

Im Nierenpräparat werden in der H&E-Färbung erneut alle Gewebecharakteristika signifikant besser bewertet als im Multiphotonenmikroskop. Glomeruli und Sammelrohre erzielen bei der Multiphotonenmikroskopie die höchsten Werte.

## Nebenniere

	MPM Mean	MPM 95% CI	H&E Mean	H&E 95% CI	P-Value
Capsule	2,79	2,63-2,95	2,76	2,60 2,92	1,0
Zona Glomerulosa	2,11	1,80-2,41	2,58	2,40-2,76	<0,001
Zona fasciculata	1,95	1,63-2,26	2,47	2,28-2,67	<0,001
Zona reticularis	1,7895	1,48-2,10	2,34	2,07-2,61	<0,001
Adrenal medulla	1,18	0,86-1,51	1,79	1,39-2,19	<0,001
Cell Nuclei	0,84	0,65-1,04	2,53	2,31-2,74	<0,001

**Tab. 14:** Details der Nebenniere. Berechnet wurden Mittelwerte, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte auf dem 95%-Konfidenzniveau. Es wurde auf zwei Nachkommastellen gerundet. Berechnung mit SPSS 23.

Die Items der Nebenniere werden im HE-Bild im Schnitt deutlich besser bewertet. Nichtsdestotrotz erzielen die MPM-Bilder z.T. hohe Werte. Als einziges Item wird die Kapsel bei MPM und HE gleich gut bewertet.

Wie bei fast allen Präparaten werden Zellkerne schlecht erkannt bzw. bewertet.

## Hoden

	MPM Mean	MPM 95% CI	H&E Mean	H&E 95% CI	P-Value
Tunica albuginea testis	2,76	2,57-2,96	2,79	2,63-2,95	1
Tubuli seminiferi contorti	2,45	2,21-2,69	2,63	2,40-2,87	0,065
Septum testis	2,34	2,07-2,61	1,76	1,43-2,10	0,001
Lamina limitans	2,08	1,81-2,35	1,84	1,55-2,13	0,151
Blood vessels	2,42	2,17-2,67	2,29	2,06-2,52	0,428
Cell Nuclei	0,95	0,70-1,19	2,30	2,14-2,65	<0,001

**Tab. 15:** Details des Hodens. Berechnet wurden Mittelwerte, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte auf dem 95%-Konfidenzniveau. Es wurde auf zwei Nachkommastellen gerundet. Berechnung mit SPSS 23.

Im Hoden werden die Zellkerne im H&E-Bild signifikant besser erkannt als im MPM-Bild. Abgesehen davon schneiden bei im MPM fast alle Strukturen gleich gut ab wie in der H&E-Färbung. Hervorzuheben sind das Septum testis und die Blutgefäße, die beide im MPM signifikant besser abschneiden als im H&E-Bild.

## Solide Tumoren des Neugeborenen und Kleinkindes

Zusammenfassend lässt sich für die beiden soliden Tumoren des Neugeborenen und Kleinkindes festhalten, dass fast alle histopathologischen Tumorcharakteristika in der HE-Färbung deutlich besser bewertet werden. Hier sei auch auf die Diskussion weiter unten verwiesen.

### Neuroblastom der Nebenniere

	MPM Mean	MPM 95% CI	H&E Mean	H&E 95% CI	P-Value
Neuroblasts with small round nuclei	0,79	0,56-1,01	2,42	2,21-2,63	<0,001
Nuclei with stippled chromatin	0,45	0,21-0,69	1,87	1,56-2,18	<0,001
Indistinct cell borders	0,79	0,52-1,06	1,97	1,68-2,26	<0,001
Ganglion cells prominent nucleoli	0,53	0,25-0,80	1,74	1,37-2,11	<0,001
Stroma with tumor vessels	1,68	1,34-2,03	2,05	1,78-2,33	0,079
Atypical cells	0,47	0,25-0,70	2,05	1,79-2,32	<0,001

**Tab. 16:** Details des Neuroblastoms der Nebenniere. Berechnet wurden Mittelwerte, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte auf dem 95%-Konfidenzniveau. Es wurde auf zwei Nachkommastellen gerundet. Berechnung mit SPSS 23.

Wie oben genannt liegen die meisten MPM Bewertungen unterhalb oder um den Wert 1 der Skala, also zwischen „Not visible“ und „Suggested without details“. Interessant ist die Bewertung des Stroma, bei der im MPM als bindegewebige Struktur kein signifikanter Unterschied zur H&E-Färbung festzustellen ist. Einzelne Zellen bzw. Zellbestandteile wie Neuroblasten, Nuclei und atypische Zellen schneiden im MPM erneut signifikant schlechter ab.

### Rhabdomyosarkom der Harnblase

	MPM Mean	MPM 95% CI	H&E Mean	H&E 95% CI	P-Value
Rhabdomyoblasts	1,50	1,22-1,78	2,79	2,65-2,93	<0,001
Indistinct cell borders	1,16	0,86-1,46	2,16	1,83-2,49	<0,001
Atypical cells	1,29	0,94-1,64	2,53	2,23-2,82	<0,001
Myxoid stroma with vessels	0,92	0,62-1,22	1,97	1,65-2,29	<0,001
Cell Nuclei	0,74	0,47-1,01	2,40	2,19-2,61	<0,001

**Tab. 17:** Details des Rhabdomyosarkoms der Harnblase. Berechnet wurden Mittelwerte, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte auf dem 95%-Konfidenzniveau. Es wurde auf zwei Nachkommastellen gerundet. Berechnung mit SPSS 23.

Im zweiten soliden Tumor zeigt sich ein ähnliches Bild wie beim Neuroblastom. Hervorstechend ist die vergleichsweise schlechte Bewertung des myxoiden Stromas des Tumors im MPM. Dies steht im klaren Gegensatz zu der sonst vergleichsweise guten Erkennbarkeit bindegewebiger Stromata.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse**

Im Rahmen meiner Dissertation wurde untersucht, inwieweit die MPM zur Bewertung kindlicher Normalgewebe und verschiedener Tumoren verwendet werden kann. Diesbezüglich wurden multiphotonenmikroskopische Gewebeaufnahmen durch Kinderpathologen weltweit bewertet. Es handelt sich hierbei um die erste Studie, die die Anwendbarkeit des MPM hinsichtlich der Darstellung von Geweben und Tumoren des Kindes von Spezialisten weltweit begutachten lässt und es mit der klassischen Hämatoxylin-Eosin-Färbung vergleicht.

Dazu wurden mittels MPM Bilder von Leber, Lunge, Niere, Nebenniere, Hoden und Herz angefertigt. Im Bereich der Tumoren wurden Bilder des Rhabdomyosarkoms der Harnblase und des Neuroblastoms der Nebenniere angefertigt.

Zu den MPM Bildern wurden passende mit HE gefärbte Schnitte aufgenommen. Beide Techniken wurden mit spezifischen Fragen in ein webbasiertes Online-Umfragetool eingepflegt und an über 250 Kinderpathologen weltweit versendet. 38 Teilnehmer aus 13 Nationen beendeten den Fragebogen in einer Durchschnittszeit von 25 Minuten.

Der erste Schritt der Umfrage war die korrekte Zuordnung eines MPM-Organbildes zur Auswahl aus möglichen Organen (Single-Choice). Anschließend musste ein HE-Bild als Pendant ebenfalls zugeordnet werden. Bei den 6 gesunden Organen gelang dies beim MPM in 89,5% der Fälle, in der Referenzmethode HE in 94,3% der Fälle. Bei den beiden Tumoren lagen die Erkennungsraten bei 40,8% (MPM) und 77,6% (HE). Anschließend wurden beide Bilder des gleichen Organs nebeneinander eingeblendet, und der Teilnehmer musste organspezifische Strukturen anhand einer Skala bewerten. Hier wurden Strukturen in den HE-Bildern mehrheitlich besser bewertet. Einige Strukturen in den MPM-Bildern schnitten jedoch gleichwertig oder sogar besser ab.

### **5.2 Diskussion der Methoden**

#### **5.2.1 Multiphotonenmikroskopie**

Mittels eines Multiphotonenmikroskops wurden Aufnahmen von gesunden Organen und Tumoren des Kleinkindes bzw. Neugeborenen angefertigt.

Bei der Anfertigung der Bilder konnten wir die Erfahrungswerte der vorherigen und laufenden MPM-Projekte aus der Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Mainz nutzen (96). Gleichwohl dauerte es mehrere Wochen bis wir Bilder von ausreichend guter Qualität generieren konnten, da zunächst die optimalen Lasereinstellungen insbesondere in Bezug auf die Darstellung des SHG Signals ausgetestet werden mussten. Anspruchsvoll gestaltete sich auch, dass wir Areale in den Gewebeschnitten finden mussten, die einwandfrei einem Organ zuzuordnen waren. Wegen der im Vergleich zur HE-Färbung unterschiedlichen Darstellung von Gewebedetails im MPM konnte nur begrenzt auf histologisches Grundwissen vertraut werden. Große Übersichtsaufnahmen zur besseren Begutachtung wurden von uns bei Nebenniere, Hoden, Rhabdomyosarkom und Neuroblastom angefertigt – retrospektiv wäre dies für alle Organe sinnvoll gewesen. Die jeweiligen Bilder wurden von formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe-Schnitten angefertigt. Ein Ziel zukünftiger Studien sollte sein, unfixiertes (natives) Gewebe zu untersuchen, um letztendlich sicher beurteilen zu können, ob die Multiphotonenmikroskopie als intraoperatives Tool verwendet werden kann. Natives Gewebe wurde in anderen Studien bereits untersucht, jedoch nicht in Vergleichsstudien (87, 92).

Ein weiterer sinnvoller Schritt hin zur klinischen Anwendung des MPM wäre sicherlich eine Studie mit einem MPM am vitalen menschlichen Gewebe – eventuell auch intraoperativ. Ein solches Gerät wurde von Duan et al. an Mäusen bereits verwendet (92). Es ist wenige Zentimeter groß und kann durchaus als Prototyp eines endoskopischen MPM angesehen werden.

### **5.2.2 Lichtmikroskopie**

Als Referenzmethode für die Studie wurden uns äquivalente HE-gefärbte Schnitte der gleichen Organe zur Verfügung gestellt, welche mittels MPM dargestellt wurden. Die Betrachtung der gesunden Organe gestaltete sich in aller Regel problemlos, die Aufnahme der Tumoren war hingegen deutlich anspruchsvoller. Für die Vergleichbarkeit der beiden Techniken wurden im HE-Präparat gleiche bzw. ähnliche Gewebeareale wie im ungefärbten MPM-Präparat aufgenommen. Wie auch bei den MPM-Präparaten arbeiteten wir mit fixiertem Gewebe, welches anschließend HE gefärbt wurde. Es wurde hierzu jeweils eine Schnittserie von dem zu untersuchenden Gewebe angefertigt. Ein Schnitt dieser Serie wurde HE gefärbt, alle anderen blieben für die MPM-Analyse ungefärbt. Des Weiteren wurden die Schnitte regulär mit HE

gefärbt, was nicht automatisch mit der verkürzten Schnell-HE-Färbung bei der Schnellschnittdiagnostik gleichzusetzen ist (1, 56, 58). Es wäre somit im Rahmen weiterer Studien sinnvoll, sowohl unfixiertes Nativgewebe für die MPM-Bilder als auch HE-Schnitte, welche in einem realistischen Zeitrahmen angefertigt wurden, zu verwenden.

### **5.2.3 Studie**

Die Studie, welche an Kinderpathologen weltweit versendet wurde, wurde mit dem Online Umfragetool QuestionPro® angefertigt. Da nach jeder Single-Choice Frage die richtige Lösung angezeigt wurde, stellten wir mit dem Programm sicher, dass ein nachträgliches Korrigieren der vorherigen Antworten nicht möglich war. Kritisch zu betrachten ist die Anordnung der Fragen: Die Teilnehmer sahen erst das MPM-Bild und wählten eine Antwort aus. Dann sahen sie die gleiche Struktur im HE-Bild und wählten erneut aus den gleichen Antwortmöglichkeiten wie beim MPM-Bild. Diesen Bias muss man bei der Betrachtung der Ergebnisse der Single-Choice Auswahl auf jeden Fall miteinfließen lassen. Erleichternd für die bewertenden Pathologen wäre außerdem das Einblenden einer Übersichtsaufnahme des Organs gewesen, welche dann von der detaillierteren Aufnahme, die wir verwendeten, gefolgt wäre. Ebenfalls kritisch – aber letztendlich nicht anderweitig lösbar – ist die Abfrage von Gewebe- und Tumorcharakteristika im dritten Schritt der Umfrage. Die Charakteristika orientieren sich fest am Standard der Histopathologie und das ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung. MPM-Studien an Malignomen konnten bereits tumorspezifische Gewebeeigenschaften sammeln, eine standardisierte „Übersetzung“ von Details im HE-Bild auf die MPM-Technik findet bisher kaum Anklang (84).

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 Teilnehmer**

Unsere Studie war die erste Studie, die unter internationaler Einbindung von Kinderpathologen untersuchte, ob die Multiphotonenmikroskopie als Tool in der intraoperativen Diagnostik solider Tumoren verwendet werden kann.

Die großangelegte Rekrutierung von Kinderpathologen erfolgte per E-Mail, über Internetforen der Fachgesellschaften und über zwei Briefe an die AG Kinder- und Fetalpathologie der DGP und die Sektion Kinderpathologie der Universitätsklinik Kiel. Letztendlich wurden via E-Mail 252 Pathologen angeschrieben. Als Resultat starteten



122 Teilnehmer die Umfrage, wovon letztendlich 38 diese beendeten. Dies führen wir neben den regulären Studienabbrechern auf die technischen Probleme des Umfrageanbieters zurück. 38 Teilnehmer sind nur von begrenzter Aussagekraft – jedoch sei hier zu berücksichtigen, dass es sich bei den Teilnehmer um Spezialisten der Kinderpathologie handelt. Mit 13 Teilnehmerstaaten war außerdem ein aussagekräftiger Querschnitt der weltweiten Kinderpathologie gegeben.

### **5.3.2 Single Choice Auswahl**

In den ersten beiden Schritten sollten die Teilnehmer Bilder der Multiphotonenmikroskopie und in der konventionellen Hämatoxylin-Eosin-Färbung einem Gewebe bzw. Tumor zuordnen.

Die Ergebnisse zeigen organübergreifend gute Erkennungsraten sowohl für MPM-Bilder als auch für HE-Bilder. Leber, Lunge, Niere, Nebenniere und Hoden werden in beiden Verfahren von über 95% der Kinderpathologen richtig erkannt. Hodengewebe erzielt im MPM-Bild bessere Erkennungswerte als im HE-Bild. Anhand dieser Ergebnisse ist ersichtlich, dass gesundes Gewebe des Kleinkindes und des Neugeborenen im Multiphotonenmikroskop gut erkannt werden kann. Es ist besonders hervorzuheben, dass es kaum klinisch tätige Pathologen gibt, die mit der Multiphotonenmikroskopie arbeiten, ganz im Gegensatz zum täglich verwendeten HE-Schnitt (97). Gewichtet man nun den im Teil „Studie“ genannten Bias, gewinnt das MPM als potenzielles Tool deutlich an Gewicht.

Der Herzmuskel nimmt als einziges Gewebe eine Sonderstellung in der Organerkennung ein. Die Organdiagnose Herzmuskel mit den vorgegebenen Bildern scheint sich für viele Teilnehmer schwierig zu gestalten. 44,7% wählten im MPM den Herzmuskel aus – in der HE-Darstellung sind es 71,1%. Mit 55,4% wählen im MPM mehr Teilnehmer den Skelettmuskel aus. Die niedrige Erkennungsrate lässt sich auf der einen Seite mit der histologischen Ähnlichkeit der beiden Gewebe erklären. Dies zeigt sich auch an der niedrigen Erkennungsrate in der täglich genutzten HE-Färbung. Auf der anderen Seite fehlt im MPM durch die fehlende Darstellung der Zellkerne ein wichtiger Anhaltspunkt zur Differenzierung von Skelett- zu Herzmuskel. Eine andere Arbeit an Mäusen konnte in der third harmonic generation (THG) Zellkerne in quergestreifter Muskulatur darstellen – in der second harmonic generation gelang die

Darstellung der Zellkerne sowohl in unserer als auch in anderen Arbeiten zum Muskelgewebe nicht (97).

Die beiden betrachteten soliden Tumoren wurden im MPM von weniger als 50% der Pathologen richtig zugeordnet. Das Neuroblastom des Nebennierenmarkes wurde im MPM von 34,2% der Pathologen richtig zugeordnet, das Rhabdomyosarkom der Harnblase von 47,4%. Die HE-Bilder erzielten Erkennungsraten von 73,7% (Neuroblastom) und 81,6% (Rhabdomyosarkom). Es zeigt sich wieder der gleiche Trend wie beim Herzmuskel. Das fehlende Training der Kinderpathologen scheint hier erneut eine große Rolle zu spielen. Studien an Konfokalmikroskopen zeigen jedoch, dass Pathologen beim Training mit neuen Geräten und Techniken schnell eine gute Lernkurve erreichen können (98). Für die Multiphotonenmikroskopie liegen solche Arbeiten noch nicht vor, es liegt aber nahe, dass auch hier in kurzer Zeit diese neue Technik erlernt werden kann. Interessant wäre es, wie lange dann die Begutachtungszeit für ein Gewebe dauert und ob man die Vorgaben der Fachgesellschaften unterbieten könnte (7).

Wie bei den gesunden Organen bereits erwähnt, fehlen auch bei der Betrachtung der Tumoren im MPM klare Kriterien zur Beurteilung. Somit bleiben bei der Beurteilung der Tumorcharakteristika drei mögliche Thesen, die in zukünftigen Thesen untersucht werden sollten:

1. Es gibt Tumorcharakteristika, die sowohl in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung als auch im Multiphotonenmikroskop gut erkennbar sind.
2. Es gibt Tumorcharakteristika, die in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sichtbar sind, in den Bildern der Multiphotonenmikroskopie aber entweder gar nicht oder nur deutlich verändert.
3. Es könnte Tumorcharakteristika geben, die in den MPM-Bildern sichtbar sind, jedoch nicht in dieser Form im HE-Bild.

### **5.3.3 Gewebecharakteristika**

Die Bewertungen der Gewebe- und Organcharakteristika verdeutlichen die Unterschiede der beiden Techniken.

Besonders hervorheben möchte ich hier die Bewertung der Zellkerne, da diese über alle Gewebe und Tumoren hinweg in der Multiphotonenmikroskopie schlecht bewertet wurden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellkerne zeigt Tab. 18.

Organ	Item	MPM Mean	MPM 95% CI	H&E Mean	H&E 95% CI	P-Value
Liver	Cell Nuclei	0,97	0,73-1,22	2,87	2,76-2,98	<0,001
Lung	Cell Nuclei	0,76	0,56-0,97	2,42	2,21-2,63	<0,001
Heart	Cell Nuclei	0,68	0,45-0,92	2,71	2,54-2,88	<0,001
Kidney	Cell Nuclei	1,05	0,81-1,29	2,74	2,59-2,88	<0,001
Adrenal Gland	Cell Nuclei	0,84	0,65-1,04	2,53	2,31-2,74	<0,001
Testicle	Cell Nuclei	0,95	0,71-1,19	2,30	2,14-2,65	<0,001

Tumor	Item	MPM Mean	MPM 95% CI	H&E Mean	H&E 95% CI	P-Value
Neuroblastoma	Nuclei with stippled chromatin	0,45	0,21-0,69	1,87	1,56-2,18	<0,001
Rhabdomyosarcoma	Cell Nuclei	0,74	0,47-1,01	2,40	2,19-2,61	<0,001

**Tab. 18:** Zusammenfassung der Bewertung der Zellkerne von 6 Organen und 2 Tumoren. Berechnet wurden Mittelwerte, 95%-Konfidenzintervalle und Signifikanzwerte auf dem 95%-Konfidenzniveau. *p*-Werte <0,05 wurden als signifikant gewertet. Es wurde auf zwei Nachkommastellen gerundet. Berechnung mit SPSS 23.

Lediglich die Zellkerne der Niere erzielten im MPM einen Wert >1, was in unserer Skala der Wertung „Structure suggested without details“ entspricht. Die restlichen Organe liegen <1. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung liegen nur die Zellkerne des Neuroblastoms <2, alle anderen liegen darüber.

Das schlechte Erkennen der Zellkerne im MPM lässt sich am ehesten durch mehrere Effekte erklären: Eine der Stärken des MPM ist die Darstellung von proteinreichen Strukturen (99). Feine zelluläre Bestandteile wie die Zellkerne enthalten wahrscheinlich – im Vergleich zur extrazellulären Matrix – verhältnismäßig wenige Proteine, um im MPM oder SHG hervorgehoben zu werden. Dies zeigt sich am Beispiel des proteinreichen Kollagens, welches in MPM und SHG gut darzustellen ist (69, 100). Dieses wird letztendlich erst extrazellulär quervernetzt und wird auch dann erst richtig darstellbar. Die Erkennung der Zellkerne wird zusätzlich durch Artefakte im MPM erschwert, da diese oftmals als grelle grüne Punkte die Unterscheidung weiter erschweren. Letztendlich führt auch die gute Sichtbarkeit der Kerne in der HE-Färbung indirekt auch zu einer schlechteren Bewertung der Kerne im MPM-Bild.

Des Weiteren fallen in den Bewertungen der MPM einige Organ- und Tumordetails auf, die verhältnismäßig gut bewertet werden. Einige Items werden in den MPM-Bildern sogar besser bewertet als in den HE-Bildern. Strukturen, welche in den MPM-Bildern mit durchschnittlich mindestens 2 Punkten bewertet wurden, werden in Tab. 19 aufgelistet.

Organ	Item	P-Value	
Liver	Glisson's triad	<0,001*	S
Lung	Bronchiolus	0,001*	S
	Vessel branch of the pulmonal atery	<0,001*	S
	Alveoli	<0,001*	S
Heart	Connective tissue	0,4	NS
	Disci intercalares	<0,001#	S
Kidney	Glomerulus	<0,001*	S
Adrenal Gland	Capsule	1	NS
	Zona glomerulosa	<0,001*	S
Testicle	Tunica albuginea testis	1	NS
	Tubuli seminiferi contorti	0,065	NS
	Septum testis	0,001#	S
	Blood vessels	0,428	NS
	Lamina limitans	0,151	NS

**Tab. 19:** Organstrukturen die in den MPM-Bildern mit durchschnittlich zwei oder mehr Punkten bewertet wurden. S: Signifikant, NS: Nicht signifikant. \*: HE-besser, #: MPM besser.

Betrachtet man die oben genannten Ergebnisse in Verbindung mit den MPM- und HE-Bildern, so lassen sich verschiedene Gründe für die gute Bewertung der Strukturen finden. Ein maßgeblicher Grund für die gute Erkennbarkeit scheint der Proteingehalt der oben genannten Strukturen zu sein.

Zudem wird mit der second harmonic generation des Multiphotonenmikroskopes u.a. Kollagen in einem separaten Kanal sichtbar (72). Legt man nun diesen Kanal mit dem regulären Multiphotonenkanal zusammen, entsteht ein hoher Kontrast zwischen Kollagen und dem restlichen Gewebe.

Daher ist es nicht verwunderlich, dass stark bindegewebs- bzw. kollagenhaltige Strukturen im MPM deutlich besser erkannt und bewertet werden. Ergebnisse aus der MPM-Diagnostik der weiblichen Brust verdeutlichen dies (83). Diese gute Erkennbarkeit macht man sich noch anderweitig zunutze: Kistenev et al. starteten erste Versuche, um mithilfe von künstlicher Intelligenz den Kollagenanteil im Multiphotonenmikroskop zu erfassen und zu verarbeiten. Dies könnte in Zukunft von großem Interesse für die klinische Anwendung sein (101).

In Rhabdomyosarkom und Neuroblastom werden Tumorcharakteristika schlechter bewertet als im HE-Schnitt. Dazu muss einerseits die Thematik der „Übersetzung“ der Tumorcharakteristika von HE in MPM angesprochen werden, die erklären könnte, warum alle Items der beiden Tumoren eine schlechte Bewertung haben. Dies zeigen auch die Ergebnisse anderer Arbeiten. Paoli et al. konnten mittels MPM klassische Tumorcharakteristika bei einigen Unterformen des Basalioms nachweisen – bei anderen Unterformen gelang dies jedoch nicht (102). Erwähnenswert ist hierbei noch, dass lediglich MPM und nicht die SHG verwendet wurden, wodurch zwar der Gesamtinformationsgehalt des Bildes sinkt, einige Details jedoch besser dargestellt werden können.

Auf der anderen Seite scheint bislang auch die fehlende Anwendung des MPM in der Praxis eine große Rolle zu spielen. Nimmt man die Neuanwendung anderer Techniken als Beispiel, so ist jedoch auch beim MPM mit einer guten Lernkurve zu rechnen (98).

Es bleibt aber die Frage, warum stark kollagenhaltige Strukturen wie das Tumorstroma schlecht bewertet werden, zeigen doch die Ergebnisse der gesunden Organe, dass Strukturen mit einem höheren Bindegewebsanteil im MPM vorteilhaft dargestellt werden. Diskutabel wäre hier eine zu große Informationsmenge im Bild. Durch das Übereinanderlegen von MPM und SHG wird der Informationsgehalt des Bildes nahezu verdoppelt. Verändert sich nun die Gewebearchitektur aufgrund der Entartung der Zellen und des oftmals unkontrollierten Wachstumes, nimmt auch der Kollagengehalt zu. Diese Kombination führt in MPM und SHG zu einer Überladung des Bildes, was dann im Endeffekt zu einer geringeren Erkennbarkeit führt.

## **5.4 Limitationen der Studie**

Trotz zahlreicher Aufrufe über verschiedene Kanäle, gelang es lediglich 38 Studienteilnehmer zu finden, die den Fragebogen komplett ausgefüllten. Ursprünglich hatten jedoch über 120 Teilnehmer die Umfrage geöffnet. Wir führen diese niedrige Quote an Abschlüssen unter anderem auf rezidivierende Abstürze der Umfragesoftware zurück. Mit einer geringen Teilnehmerzahl besteht stets die Gefahr sowohl extreme als auch nicht aussagekräftige Daten zu generieren.

Des Weiteren lassen sich auch die Teilnehmer bezüglich ihres Bias diskutieren: Dieser kann sowohl zugunsten des MPM als auch zur konventionellen Histopathologie vorliegen. So könnten auf der einen Seite vermehrt Pathologen teilgenommen haben, die bereits am MPM arbeiten und/oder ein größeres Interesse an neuen Methoden haben. Auf der anderen Seite könnte Pathologen eine Befangenheit gegenüber neuen Techniken unterstellt werden, arbeiten sie doch schon seit Jahrzehnten erfolgreich mit der HE-Färbung. Diese Erfahrungen könnten die Bewertungen zugunsten der HE-Färbung verstärkt haben.

Im Aufbau der Studie ergeben sich retrospektiv ebenfalls Kritikpunkte: Die strikte Abfolge der Single Choice Fragen ist als Bias zugunsten der HE-Bilder zu werten, da jedem Organ in HE dasselbe Organ in MPM vorausging. Der Teilnehmer hatte somit indirekt Hilfe bei der Auswahl des Organs in HE. Darüber hinaus wäre es sinnvoll in weiteren Studien die Fragestellung „gesundes Organ oder solider Tumor“ in einer Frage zu stellen – in unserer Studie waren die Fragen nach gesunden Organen und Tumoren getrennt. Die Fragestellung „Tumor oder kein Tumor“ könnte die Auswertbarkeit von Sensitivität und Spezifität besser ermöglichen.

## **5.5 Ausblick und klinische Anwendbarkeit**

Mit unseren Forschungen am Multiphotonenmikroskop und der durchgeführten internationalen Studie konnten wir zeigen, dass typische Organschnitte des Kleinkindes und des Neugeborenen dargestellt und von Pathologen gut erkannt werden können.

Für die soliden Tumoren im Kindesalter ist ein Handlungsbedarf zu erkennen: Es muss zwingend die Histologie der Tumorcharakteristika im MPM ermittelt und angepasst werden. Mit einem geringen Lernaufwand könnte die intraoperative Anwendung der

Multiphotonenmikroskopie dann weiter validiert werden, idealerweise in größeren Studien.

Der Ausblick auf die zukünftige Anwendung bleibt aber positiv:

1. Multiphotonenmikroskopie erfreut sich wissenschaftlich großem Interesse und durch eine intensivierete Forschung ist zukünftig auch mit kostengünstigeren Geräten zu rechnen.
2. Erste Versuche am Tier wurden bereits mit einem Prototyp eines MPM-Endoskops durchgeführt (92).
3. Fachgebiete wie die Dermatologie arbeiten schon mit MPM-basierten Geräten in der Praxis (86, 87).

Jeder Punkt für sich stellt schon einen deutlichen Fortschritt dar – sollte die Möglichkeit bestehen, die genannten Punkte in der Zukunft zu kombinieren, so kann die intraoperative Diagnostik solider Tumoren im Kindesalter bei ähnlichen Ergebnissen deutlich beschleunigt werden.

## 6. Zusammenfassung

Bei der Operation solider Tumoren im Kindesalter bedient man sich zur Dignitätsbeurteilung häufig der intraoperativen Schnellschnittdiagnostik, bei welcher Gewebe entnommen, histologisch gefärbt und letztendlich durch einen erfahrenen Pathologen lichtmikroskopisch begutachtet wird. Die Anfertigung eines solchen Schnellschnitts dauert ca. 20 Minuten. Mittels der Multiphotonenmikroskopie lassen sich im Gegensatz zur lichtmikroskopischen Darstellung Autofluoreszenzbilder von ungefärbtem, unfixiertem Gewebe in Echtzeit darstellen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Anwendbarkeit der Multiphotonenmikroskopie als zeitsparendes Alternativverfahren zur Schnellschnittdiagnostik.

Als Untersuchungsmaterial dienten formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von Organen des Kindes (Lunge, Niere, Leber, Herz, Nebenniere, Hoden) und Tumorschnitte (Neuroblastom und Rhabdomyosarkom), welche mittels MPM analysiert wurden. Als vergleichende Referenzmethode wurden jeweils HE-gefärbte Gewebeschnitte derselben Präparate lichtmikroskopisch untersucht. Die Bilder wurden in einer internationalen online basierten Umfrage durch Kinderpathologen bewertet.

Von insgesamt 122 Teilnehmern beendeten 38 Kinderpathologen die Umfrage. Die MPM-Bilder der Organschnitte wurden von 89,4% der Pathologen richtig erkannt, die HE-Bilder von 94,3% ( $p < 0,05$ ). Die beiden Tumoren wurden im MPM von 44,8% der Pathologen erkannt – im HE-Bild von 77,6% ( $P < 0,05$ ). Gewebe- und Tumordetails wurden sehr unterschiedlich bewertet. Im Schnitt wurden bestimmte Details der HE-Bilder besser bewertet (z.B. Zellkerne) – es zeigen sich jedoch auch positive Trends in den MPM-Aufnahmen, insbesondere in bindegewebsreichen Strukturen, welche eine bessere Bewertung im Vergleich zur HE-Färbung erhielten. Insbesondere diese bindegewebsreichen Strukturen könnten für die weitere Forschung mittels MPM von großem Interesse sein.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass in der Multiphotonenmikroskopie großes Potential hinsichtlich der Gewebebegutachtung steckt. Ein zukünftiges Forschungs- und Anwendungsfeld könnte diesbezüglich die nicht-invasive MPM-Endoskopie von



Gewebe und Tumoren sein. Speziell im Hinblick auf die intraoperative Zeitersparnis, der in Zukunft möglicherweise routinemäßig eingesetzten endoskopischen MPM-Diagnostik, ist die Technologie von unschätzbarem Wert.

Stichpunktartig lassen sich meine Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

1. Gewebeschnitte gesunder Organe werden sowohl im MPM als auch in der HE-Färbung in über 85% der Fälle richtig erkannt
2. Solide Tumoren und deren Details werden in der HE-Färbung signifikant besser erkannt als im MPM
3. Zellkerne werden in der HE-Färbung deutlich besser erkannt
4. Bindegewebsreiche Strukturen werden im MPM deutlich besser bewertet als andere Gewebe. Einige dieser Strukturen erzielen dabei bessere Bewertungen als die HE-Färbung

## 7. Literaturverzeichnis

1. Wilson LB. A method for the rapid preparation of fresh tissue for the microscope. *JAMA*. 1905;XLV(23):1737.
2. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours, 8th Edition [E-Book]. Oxford: John Wiley & Sons; 2017: 3.
3. Institut für Krebsregisterdaten am Robert Koch-Institut. Datenbankabfrage: Altersbezogene Inzidenz von Krebserkrankungen in Deutschland im Jahr 2014 [Internet] [zitiert am 01.04.2021] URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage\\_stufe2\\_form.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe2_form.html).
4. Robert Koch-Institut (Hrsg.), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (Hrsg.). Krebs in Deutschland 2015/2016. 2019. doi: 10.25646/5977.2
5. Marshall GM, Carter DR, Cheung BB, Liu T, Mateos MK, Meyerowitz JG, Weiss WA. The prenatal origins of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2014 03/06/online;14:277-289. doi:10.1038/nrc3679.
6. Kaatsch P, Grabow D, Spix C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2018 (1980-2017). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz; 2019.
7. Royal College of Physicians of Ireland, Faculty of Pathology. Guidelines for the Implementation of a National Quality Improvement Programme in Histopathology [Internet]. Version 6.11. 04/2018 [Zitiert am 02.03.2021]. URL: <https://rcpi-live-cdn.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2018/04/Histo-QI-Guidelines-Draft-6.11-FINAL-.pdf>.
8. Dunn KW, Sandoval RM, Kelly KJ, Dagher PC, Tanner GA, Atkinson SJ, Bacallao RL, Molitoris BA. Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002: 283: C905–C916. doi: 10.1152/ajpcell.00159.2002.
9. Fuchs J. Solide Tumoren im Kindesalter: Grundlagen - Diagnostik - Therapie; mit 72 Tabellen; inkl. DVD mit Tumoroperationen. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2012: 77-109.
10. Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. Expert review of anticancer therapy. 2017; Vol. 17, No. 4, 369–386. doi: 10.1080/14737140.2017.1285230
11. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. International Classification of Childhood Cancer, Third Edition. *Cancer*. 2005; Vol. 103, No. 7: 1457-1467. doi: 10.1002/cncr.20910.
12. Berthold F, Spix C, Kaatsch P, Lampert F. Incidence, Survival, and Treatment of Localized and Metastatic Neuroblastoma in Germany 1979-2015. *Pediatr Drugs* (2017) 19:577–593. doi: 10.1007/s40272-017-0251-3.

13. Sokol E, Desai AV. The Evolution of Risk Classification for Neuroblastoma. *Children*. 2019;6(2). doi:10.3390/children6020027.
14. Heck JE, Ritz B, Hung RJ, Hashibe M, Boffetta P. The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*. 2009;23(2):125-143. doi: 10.1111/j.1365-3016.2008.00983.x.
15. Müller-Schulte E, Kurlemann G, Harder A. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2018; 103: F467–F473. doi:10.1136/archdischild-2017-313615.
16. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, Laquaglia MJ, Sennett R, Lynch JE, Perri P, Laureys G, Speleman F, Kim C, Hou C, Hakonarson H, Torkamani A, Schork NJ, Brodeur GM, Tonini GP, Rappaport E, Devoto M, Maris JM. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008/08/24/; Vol 455: 930-936. doi: 10.1038/nature07261.
17. Ritenour LE, Randall MP, Bosse KR, Diskin SJ. Genetic susceptibility to neuroblastoma: current knowledge and future directions. *Cell and Tissue Research*. 2018/05/01; 372(2): 287-307. doi: 10.1007/s00441-018-2820-3.
18. Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Translational Research*. 2013/07/01/;162(1):1-15. doi: 10.1016/j.trsl.2013.03.001.
19. Nakagawara A, Li Y, Izumi H, Muramori K, Inada H, Nishi M. Neuroblastoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2018, 48(3): 214–241. doi: 10.1093/jjco/hyx176
20. Maris JM. Recent Advances in Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2010/06/10;362(23):2202-2211.
21. Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Klein G, Sander J, Treuner J. Neuroblastom-Früherkennung: Krebsfrüherkennung im Kindesalter. *Dtsch Arztebl International*. 1998;95: 29-32.
22. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J-i, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999;86(2):364-72.
23. Hughes M, Marsden HB, Palmer MK. Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer*. 1974; 1706-1711.
24. Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, Hata J, Roald B, Dehner LP, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*. 2003 Nov 15; 98(10):2274-81. doi: 10.1002/cncr.11773.
25. Simon T, Hero B, Schulte JH, Deubzer H, Hundsdoerfer P, von Schweinitz D, Fuchs J, Schmidt M, Prasad V, Krug B, Timmermann B, Leuschner I, Fischer M, Langer T, Astrahantseff K, Berthold F, Lode H, Eggert A. 2017 GPOH Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients with Neuroblastic Tumors. *Klin Padiatr* 2017; 229: 147–167. doi: 10.1055/s-0043-103086.

26. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson ADJ. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(2):298-303. doi: 10.1200/JCO.2008.16.6876.
27. Deeney S, Stewart C, Treece AL, Black JO, Lovell MA, Garrington T, Karrer F, Bruny J. Diagnostic utility of core needle biopsy versus open wedge biopsy for pediatric intraabdominal solid tumors: Results of a prospective clinical study. *Journal of Pediatric Surgery*. 2017/12/01/; 52(12):2042-2046. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.08.032.
28. Hassan SF, Mathur S, Magliaro TJ, Larimer EL, Ferrell LB, Vasudevan SA, Patterson DM, Louis CU, Russell HV, Nuchtern JG, Kima ES. Needle core vs open biopsy for diagnosis of intermediate- and high-risk neuroblastoma in children. *Journal of Pediatric Surgery*. 2012/06/01/; 47(6):1261-1266. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.03.040.
29. Nuchtern JG, London WB, Barnewolt CE, Naranjo A, McGrady PW, Geiger JD, Diller L, Schmidt, ML, Maris JM, Cohn SL, Shamberger RC. A prospective study of expectant observation as primary therapy for neuroblastoma in young infants: a Children's Oncology Group study. *Annals of surgery*. 2012; 256(4):573-80. doi: 10.1097/SLA.0b013e31826cbbbd.
30. Park JR, Bagatell R, Cohn SL, Pearson AD, Villablanca JG, Berthold F, Burchill S, Boubaker A, McHugh K, Nuchtern JG, London WB, Seibel NL, Lindwasser OW, Maris JM, Brock P, Schleiermacher G, Ladenstein R, Matthay KK, Valteau-Couanet D. Revisions to the International Neuroblastoma Response Criteria: A Consensus Statement From the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting. *Journal of Clinical Oncology*. 2017/08/01/;35(22):2580-7. doi: 10.1200/JCO.2016.72.0177.
31. Orr KE, McHugh K. The new international neuroblastoma response criteria. *Pediatric Radiology*. 2019 2019/10/01;49(11):1433-1440. doi: 10.1007/s00247-019-04397-2.
32. Strother DR, London WB, Schmidt ML, Brodeur GM, Shimada H, Thorner P, Collins MH, Tagge E, Adkins S, Reynolds CP, Murray K, Strother DR, Lavey RS, Matthay KK, Castleberry R, Maris JM, Cohn SL. Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(15):1842-1848. doi: 10.1200/JCO.2011.37.9990.
33. Hallett A, Traunecker H. A review and update on neuroblastoma. *Paediatrics and Child Health*. 2012;22(3):103-107.
34. Luo Y-B, Cui X-C, Yang L, Zhang D, Wang J-X. Advances in the Surgical Treatment of Neuroblastoma. *Chinese medical journal*. 2018;131(19):2332-2337. doi: 10.4103/0366-6999.241803.
35. Dasgupta R, Fuchs J, Rodeberg D. Rhabdomyosarcoma. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2016/10/01/;25(5):276-83. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2016.09.011

36. Ruiz-Mesa C, Goldberg JM, Coronado Munoz AJ, Dumont SN, Trent JC. Rhabdomyosarcoma in Adults: New Perspectives on Therapy. *Current Treatment Options in Oncology*. 2015/05/15;16(6):27. doi: 10.1007/s11864-015-0342-8.
37. Ognjanovic S, Linabery AM, Charbonneau B, Ross JA. Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2009;115(18):4218-26. doi: 10.1002/cncr.24465.
38. Li FP, Fraumeni Jr JF. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *Journal of the National Cancer Institute*. 1969; 43(6): 1365-73.
39. Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie. S1 Leitlinie Weichteilsarkome [Internet]. Fassung 03/2017 [zitiert am 08.02.2021]. URL: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/025-007l\\_S1\\_Weichteilsarkome\\_2017-03.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-007l_S1_Weichteilsarkome_2017-03.pdf).
40. Ma X, Huang D, Zhao W, Sun L, Xiong H, Zhang Y, Jin M, Zhang D, Huang C, Wang H, Zhang W, Sun N, He L, Tang J. Clinical characteristics and prognosis of childhood rhabdomyosarcoma: a ten-year retrospective multicenter study. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015; 8(10): 17196-17205.
41. Correa H. Li–Fraumeni syndrome. *Journal of pediatric genetics*. 2016;5(02):084-8. doi: 10.1055/s-0036-1579759.
42. Varan A, Sen H, Aydin B, Yalcin B, Kutluk T, Akyuz C. Neurofibromatosis type 1 and malignancy in childhood. *Clin Genet*. 2016; 89: 341–345. doi: 10.1111/cge.12625.
43. Huh WW, Skapek SX. Childhood Rhabdomyosarcoma: New Insight on Biology and Treatment. *Current Oncology Reports*. 2010/11/01;12(6):402-10. doi: 10.1007/s11912-010-0130-3.
44. Shern JF, Yohe ME, Khan J. Pediatric Rhabdomyosarcoma. *Critical reviews in oncogenesis*. 2015; 20(3-4): 227-243.
45. Egas-Bejar D, Huh WW. Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives. *Adolescent health, medicine and therapeutics*. 2014; 5:115. doi: 10.2147/AHMT.S44582.
46. Borinstein SC, Steppan D, Hayashi M, Loeb DM, Isakoff MS, Binitie O, Brohl AS, Bridge JA, Stavas M, Shinohara ET, Meyer WH, Reed DR, Wagner LM. Consensus and controversies regarding the treatment of rhabdomyosarcoma. *Pediatric blood & cancer*. 2018; 65(2): e26809. doi: 10.1002/pbc.26809.
47. Rudzinski ER, Anderson JR, Chi YY, Gastier-Foster JM, Astbury C, Barr FG, Skapek SX, Hawkins DS, Weigel BJ, Pappo A, Meyer WH, Arnold MA, Teot LA, Parham DM. Histology, fusion status, and outcome in metastatic rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2017; 64: e26645. doi: 10.1002/pbc.26645.
48. Malempati S, Hawkins DS. Rhabdomyosarcoma: review of the Children's Oncology Group (COG) Soft-Tissue Sarcoma Committee experience and rationale for current COG studies. *Pediatric blood & cancer*. 2012; 59(1): 5-10. doi: 10.1002/pbc.24118.

49. Green DM, Kun LE, Matthay KK, Meadows AT, Meyer WH, Meyers PA, Spunt SL, Robison LL, Hudson MM. Relevance of historical therapeutic approaches to the contemporary treatment of pediatric solid tumors. *Pediatric blood & cancer*. 2013; 60(7):1083-1094. doi: 10.1002/pbc.24487.
50. Saltzman AF, Cost NG. Current Treatment of Pediatric Bladder and Prostate Rhabdomyosarcoma. *Current Urology Reports*. 2018/02/22;19(1):11. doi: 10.1007/s11934-018-0761-8.
51. Raney RB, Maurer HM, Anderson JR, Andrassy RJ, Donaldson SS, Qualman SJ, Wharam MD, Wiener ES, Crist WM. The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRSG): Major Lessons From the IRS-I Through IRS-IV Studies as Background for the Current IRS-V Treatment Protocols. *Sarcoma* (2001) 5, 9-15. doi: 10.1080/13577140120048890.
52. Harel M, Ferrer FA, Shapiro LH, Makari JH. Future directions in risk stratification and therapy for advanced pediatric genitourinary rhabdomyosarcoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2016/02/01;34(2):103-15. doi: 10.1016/j.urolonc.2015.09.013.
53. Kieran K, Shnorhavorian M. Current standards of care in bladder and prostate rhabdomyosarcoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2016; 34:93–102. doi: 10.1016/j.urolonc.2015.12.012.
54. Panda SP, Chinnaswamy G, Vora T, Prasad M, Bansal D, Kapoor G, Radhakrishnan V, Agarwala S, Laskar S, Arora B, Kaur T, Rath GK, Bakhshi S. Diagnosis and Management of Rhabdomyosarcoma in Children and Adolescents: ICMR Consensus Document. *The Indian Journal of Pediatrics*. 2017/05/01;84(5):393-402. doi: 10.1007/s12098-017-2315-3.
55. Malempati S, Weigel BJ, Chi YY, Tian J, Anderson JR, Parham DM, Teot LA, Rodeberg DA, Yock TI, Shulkin BL, Spunt SL, Meyer WH, Hawkins DS. The addition of cixutumumab or temozolomide to intensive multiagent chemotherapy is feasible but does not improve outcome for patients with metastatic rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer*. 2019;125:290-297. doi: 10.1002/cncr.31770.
56. Fisher JE, Burger PC, Perlman EJ, Dickman PS, Parham DM, Savell JVH, Hutchinson RE, Paidas CN, Lev ER. Frozen Section Yesterday and Today: Pediatric Solid Tumors - Crucial Issues. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2001/05/01; 4(3):252-66. doi: 10.1007/s100240010177.
57. Cheng H, Chen BP-H, Soleas IM, Ferko NC, Cameron CG, Hinoul P. Prolonged Operative Duration Increases Risk of Surgical Site Infections: A Systematic Review. *Surgical infections*. 2017; 18(6):722-35. doi: 10.1089/sur.2017.089
58. Gal AA, Cagle PT. The 100-Year Anniversary of the Description of the Frozen Section Procedure. *JAMA*. 2005; 294(24):3135-3137.
59. Dey, P. Frozen Section: Principle and Procedure. In: Dey, P. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer Nature. 2018: 51-55. doi: 10.1007/978-981-10-8252-8\_6.
60. Jaafar, H. Intra-operative frozen section consultation: Concepts, applications and limitations. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2006: Vol. 13, No. 1: 4-12.

61. Lester SC (Ed.). *Diagnostic Pathology: Intraoperative Consultation*. 2<sup>nd</sup> Ed [E-Book]. Philadelphia: Elsevier; 2018: 11.
62. Shayan K, Smith C, Langer JC. Reliability of intraoperative frozen sections in the management of Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*. 2004/09/01; 39(9):1345-1348.
63. Coffin CM, Spilker K, Zhou H, Lowichik A, Pysher TJ. Frozen section diagnosis in pediatric surgical pathology: a decade's experience in a children's hospital. *Arch Pathol Lab Med*. 2005; Vol 129: 1619-1625.
64. Carrasco A, Jr., Caldwell BT, Cost CR, Greffe BS, Garrington TP, Bruny JL, Black JO, Cost NG. Reliability of intraoperative frozen section for the diagnosis of renal tumors suspicious for malignancy in children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer*. 2017; 64: e26458. doi: 10.1002/pbc.26458.
65. Sams SB, Wisell JA. Discordance Between Intraoperative Consultation by Frozen Section and Final Diagnosis. *International Journal of Surgical Pathology*. 2017; Vol. 25(1) 41–50. doi: 10.1177/1066896916662152.
66. So PTC, Dong CY, Masters BR, Berland KM. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2000/08/01; 2(1): 399-429.
67. Ustione A, Piston DW. A simple introduction to multiphoton microscopy. *Journal of Microscopy*. 2011; 243(3):221-6. doi: 10.1111/j.1365-2818.2011.03532.x.
68. Göppert-Mayer M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*. 1931; 401(3):273-94.
69. Zieger M, Springer S, Koehler MJ, Kaatz M. Multiphotonentomographie. *Der Hautarzt*. 2015/07/01;66(7):511-21. doi: 10.1007/s00105-015-3626-9.
70. Cannell MB, McMorland A, Soeller C. Practical Tips for Two-Photon Microscopy. In: Pawley JB. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* [E-Book]. 3. Auflage. New York: Springer Science+Business Media, 2006: 900-931.
71. Campagnola P. Second Harmonic Generation Imaging Microscopy: Applications to Diseases Diagnostics. *Analytical Chemistry*. 2011/05/01; 83(9):3224-31. doi: 10.1021/ac1032325.
72. Cox G, Kable E. Second-harmonic imaging of collagen. In: Tatjes DJ, Mossmann BT. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 319: Cell Imaging Techniques: Methods and Protocols [E-Book]. Totowa, NJ: Humana Press; 2006: 15-35.
73. United States National Library of Medicine. PubMed-Suche: "Multiphoton Microscopy", Zeitraum der Einträge 01.01.2020 – 31.12.2020 [Internet] [zitiert am 01.04.2021]. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=multiphoton+microscopy&filter=dates.2020%2F1%2F1-2020%2F12%2F31>.
74. Molitoris BA, Sandoval RM. Intravital multiphoton microscopy of dynamic renal processes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288: F1084–F1089. doi: 10.1152/ajprenal.00473.2004.

75. Jain M, Robinson BD, Aggarwal A, Shevchuk MM, Scherr DS, Mukherjee S. Multiphoton microscopy for rapid histopathological evaluation of kidney tumours. *BJU Int.* 2016; 118: 118–126. doi: 10.1111/bju.13377.
76. Jain M, Robinson BD, Shevchuk MM, Aggarwal A, Salamoon B, Dubin JM, Scherr DS, Mukherjee S. Multiphoton microscopy: a potential intraoperative tool for the detection of carcinoma in situ in human bladder. *Arch Pathol Lab Med.* 2015; Vol 139 (796-804). doi: 10.5858/arpa.2014-0076-OA.
77. Tiwari R, Yu W, Huang H, Tan P, Ho H. Predicting aggressiveness in very low risk asian prostate cancer on biopsy with a novel multiphoton microscopy imaging tool (HISTOINDEX). *Journal of endourology Conference: 34th world congress of endourology.* 2016.
78. Durand M, Jain M, Aggarwal A, Robinson BD, Srivastava A, Smith R, Sooriakumaran P, Loeffler J, Pumill C, Amiel J, Chevallier D, Mukherjee S, Tewari AK. Real-time in vivo periprostatic nerve tracking using multiphoton microscopy in a rat survival surgery model: a promising pre-clinical study for enhanced nerve-sparing surgery. *BJU Int.* 2015; 116: 478–486. doi: 10.1111/bju.12903.
79. Jain M, Narula N, Aggarwal A, Stiles B, Shevchuk MM, Sterling J, Salamoon B, Chandel V, Webb WW, Altorki NK, Mukherjee S. Multiphoton microscopy: a potential "optical biopsy" tool for real-time evaluation of lung tumors without the need for exogenous contrast agents. *Arch Pathol Lab Med.* 2014; Vol 138 (8) 1037-1047. doi: 10.5858/arpa.2013-0122-OA.
80. Fiole D, Tournier JN. Intravital microscopy of the lung: minimizing invasiveness. *J. Biophotonics.* 2016; No. 9, 868–878. doi: 10.1002/jbio.201500246.
81. Barlerin D, Bessiere G, Domingues J, Schuette M, Feuillet C, Peixoto A. Biosafety Level 3 setup for multiphoton microscopy in vivo. *Sci Rep.* 2017; 3;7(1):571. doi: 10.1038/s41598-017-00702-x.
82. Bonapace L, Wyckoff J, Oertner T, Van Rheenen J, Junt T, Bentires-Alj M. If You Don't Look, You Won't See: Intravital Multiphoton Imaging of Primary and Metastatic Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2012; 17:125–129. doi: 10.1007/s10911-012-9250-8.
83. Wu YA-O, Lin Y, Lian Y, Lin P, Wang S, Fu F, Wang C, Chen J. Identifying Two Common Types of Breast Benign Diseases Based on Multiphoton Microscopy. *Scanning.* 2018; Article ID 3697063. doi: 10.1155/2018/3697063.
84. Wu X, Chen G, Lu J, Zhu W, Qiu J, Chen J, Xie S, Zhuo S, Yan J. Label-free detection of breast masses using multiphoton microscopy. *PLoS ONE,* 2013; Vol 8 (6): e65933. doi: 10.1371/journal.pone.0065933.
85. Yoshitake T, Giacomelli MG, Cahill LC, Schmolze DB, Vardeh H, Faulkner-Jones BE, Connolly JL, Fujimoto JG. Direct comparison between confocal and multiphoton microscopy for rapid histopathological evaluation of unfixed human breast tissue. *Journal of Biomedical Optics.* 2016; Vol 21 (12): 126021-1 – 126021-12. doi: 10.1117/1.JBO.21.12.126021.



86. Balu M, Kelly KM, Harris RM, König K, Zachary CB, Tromberg BJ. In vivo multiphoton microscopy of human skin. In: König K (Ed.). *Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging, Applications in Biology and Medicine* [E-Book]. Berlin: De Gruyter: 287-299.
87. Balu M, Zachary CB, Harris RM, Krasieva TB, König K, Tromberg BJ, Kelly KM. In Vivo Multiphoton Microscopy of Basal Cell Carcinoma. *JAMA Dermatology*. 2015; Vol 151 (Nr. 10): 1068-1074. doi: 10.1001/jamadermatol.2015.0453.
88. Pouli D, Balu M, Alonzo CA, Liu Z, Quinn KP, Rius-Diaz F, Harris MH, Kelly KM, Tromberg J, Georgakoudi I. Imaging mitochondrial dynamics in human skin reveals depth-dependent hypoxia and malignant potential for diagnosis. *Science translational medicine*. 2016; 8(367): 367ra169-367ra169. doi:10.1126/scitranslmed.aag2202.
89. Li L, Kang D, Huang Z, Zhan Z, Feng C, Zhou Y, Tu H, Zhuo S, Chen J. Multimodal multiphoton imaging for label-free monitoring of early gastric cancer. *BMC Cancer*. 2019; 19:295. doi: 10.1186/s12885-019-5497-4.
90. Zheng X, Zuo N, Lin H, Zheng L, Ni M, Wu G, Chen J, Zhuo S. Margin diagnosis for endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer using multiphoton microscopy. *Surgical Endoscopy*. 2019. 34(1):408-416. doi: 10.1007/s00464-019-06783-1.
91. He K, Zhao L, Huang X, Ding Y, Liu L, Wang X, et al. Label-free imaging for T staging of gastric carcinoma by multiphoton microscopy. *Lasers in Medical Science*. 2018; 33(4): 871-882. doi: 10.1007/s10103-018-2442-8.
92. Duan X, Li H, Qiu Z, Joshi BP, Pant A, Smith A, et al. MEMS-based multiphoton endomicroscope for repetitive imaging of mouse colon. *Biomedical optics express*. 2015;6(8): 3074-3083. doi: 10.1364/BOE.6.00 3074.
93. Aggarwal A, Jain M, Frykman PK, Xu C, Mukherjee S, Muensterer OJ. Multiphoton microscopy to identify and characterize the transition zone in a mouse model of Hirschsprung disease. *Journal of Pediatric Surgery*. 2013; 48(6): 1288-1293. doi:10.1016/j.jpedsurg.2013.03.025.
94. The World Medical Association. WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [Internet] 1964, letzte Änderung 2013 [zitiert am 25.03.2021]. URL: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>.
95. Goedeke J, Schreiber P, Seidmann L, Li G, Birkenstock J, Simon F, König J, Muensterer OJ. Multiphoton microscopy in the diagnostic assessment of pediatric solid tissue in comparison to conventional histopathology: results of the first international online interobserver trial. *Cancer management and research*. 2019; 11: 3655-3667. doi: 10.2147/CMAR.S195470.
96. Muensterer OJ, Waldron S, Boo YJ, Ries C, Sehls L, Simon F, Seidmann L, Birkenstock J, Goedeke J. Multiphoton microscopy: A novel diagnostic method for solid tumors in a prospective pediatric oncologic cohort, an experimental study. *International Journal of Surgery*. 2017;48: 128-133. doi: 10.1016/j.ijssu.2017.10.038.

97. Rehberg M, Krombach F, Pohl U, Dietzel S. Label-Free 3D Visualization of Cellular and Tissue Structures in Intact Muscle with Second and Third Harmonic Generation Microscopy. *PLoS ONE*. 2011; 6(11): e28237. doi:10.1371/journal.pone.0028237
98. Neumann H, Vieth M, Atreya R, Neurath MF, Mudter J. Prospective evaluation of the learning curve of confocal laser endomicroscopy in patients with IBD. *Histol Histopathol*. 2011; 26: 867-872 2011. doi: 10.14670/HH-26.867.
99. König K, Schenke-Layland K, Riemann I, Stock UA. Multiphoton autofluorescence imaging of intratissue elastic fibers. *Biomaterials*. 2005; 26(5): 495-500. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.059.
100. Wu Z, Rademakers T, Kiessling F, Vogt M, Westein E, Weber C, Megens RTA, van Zandvoort M. Multi-photon microscopy in cardiovascular research. *Methods*. 2017; 130: 79-89. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.04.013.
101. Kistenev YV, Vrazhnov DA, Nikolaev VV, Sandykova EA, Krivova NA. Analysis of Collagen Spatial Structure Using Multiphoton Microscopy and Machine Learning Methods. *Biochemistry*. 2019; 84(1):108-123. doi: 10.1134/S0006297919140074.
102. Paoli J, Smedh M, Wennberg A-M, Ericson MB. Multiphoton Laser Scanning Microscopy on Non-Melanoma Skin Cancer: Morphologic Features for Future Non-Invasive Diagnostics. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008; 128(5): 1248-1255. doi: 10.1038/sj.jid.5701139.

## **8. Danksagung**

## 9. Lebenslauf

