

## Intraoperative molekulare Fluoreszenzbildgebung

J. Glatz, V. Ntziachristos

Die optimale chirurgische Resektion von Ovarialkarzinomen im fortgeschrittenen Stadium ist ein wesentlicher Faktor für die Patientenprognose. Fluoreszenzfarbstoffe können intraoperativ zur Visualisierung molekularer Marker verwendet werden, um die Abgrenzung malignen Gewebes zu erleichtern. In einer Pilotstudie wurde der von Ovarialkarzinomen verstärkt exprimierte Folsäure- $\alpha$  Rezeptor markiert und während der Chirurgie mit einem Kamerasystem gemessen. Der Einsatz tumor-spezifischer, optischer Bildgebung könnte operative Eingriffe in Zukunft entscheidend verbessern.

### Einleitung

Der chirurgische Eingriff ist, neben der Chemotherapie, eine der wichtigsten Behandlungsmethoden für das Ovarialkarzinom, das besonders häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird (Ozols, et al., 2000). Studien haben gezeigt, dass eine optimale Zytoreduktion mit Restläsionen kleiner als 1 cm die Prognose für die Patientin entscheidend verbessert (Winter III, et al., 2008). In der Praxis ist diese jedoch aufgrund des geringen Kontrastes zwischen erkranktem und gesundem Gewebe nur schwer zu erzielen. Seit ihren Anfängen beruht die Chirurgie hauptsächlich auf visuellen und taktilen Informationen, die, vor allem im Frühstadium des Ovarialkarzinoms, nur eine geringe Spezifität und Sensitivität in Bezug auf die Identifizierung von Tumorherden haben.

Nichtinvasive radiologische Bildgebungsverfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT) oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET) finden in der Tumordiagnose und OP-Planung Anwendung. Für die intraoperative Kontrolle konnten sich diese Modalitäten aufgrund der Größe und des Kostenumfanges der Geräte, der Strahlen- oder Magnetfeldbelas-

tung oder mangelnder Auflösung bislang nicht etablieren.

### Fluoreszenzbildgebung

Die Fluoreszenzbildgebung ist eine optische Methode, bei der Moleküle mittels Laserlicht angeregt werden, um deren emittiertes Leuchten zu detektieren. Fluorescein und Indocyanin Grün (ICG) sind zwei fluoreszierende Kontrastmittel, die bereits in der klinischen Praxis eingesetzt werden (Yannuzzi, et al., 1992) (Kabuto, et al., 1997). Beide Stoffe verfügen allerdings nicht über molekulare Spezifität, sie werden systemisch injiziert, um das vaskuläre System oder pathologische Veränderungen mit erhöhter Perfusion und Gefäßpermeabilität anzuzeigen.

Eine vielversprechende Verbesserung stellt der Einsatz tumorspezifischer Fluoreszenzfarbstoffe dar (Tsien, 2005) (Weissleder & Pittet, 2008). Sie

akkumulieren gezielt an bestimmten Rezeptoren, Oberflächenstrukturen oder Molekülen und können so krankhaft verändertes Gewebe mit hoher Präzision markieren, was sie zu einem optimalen Instrument für optische intraoperative Bildgebung macht.

In einer kürzlich abgeschlossenen Pilotstudie mit am Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen an der Universitätsklinik Groningen konnten wir erstmals solche gezielt wirkenden Kontrastmittel während eines chirurgischen Eingriffs darstellen (van Dam, et al., 2011). Der Folsäure- $\alpha$  (FR- $\alpha$ ) Rezeptor wurde als geeigneter Biomarker identifiziert, da er in gesundem Gewebe nicht auftritt, aber von über 90 % der Ovarialkarzinome erhöht exprimiert wird (Kalli, et al., 2008) (Crane, et al., 2012). Durch die Konjugation der Folsäure an den fluoreszierenden

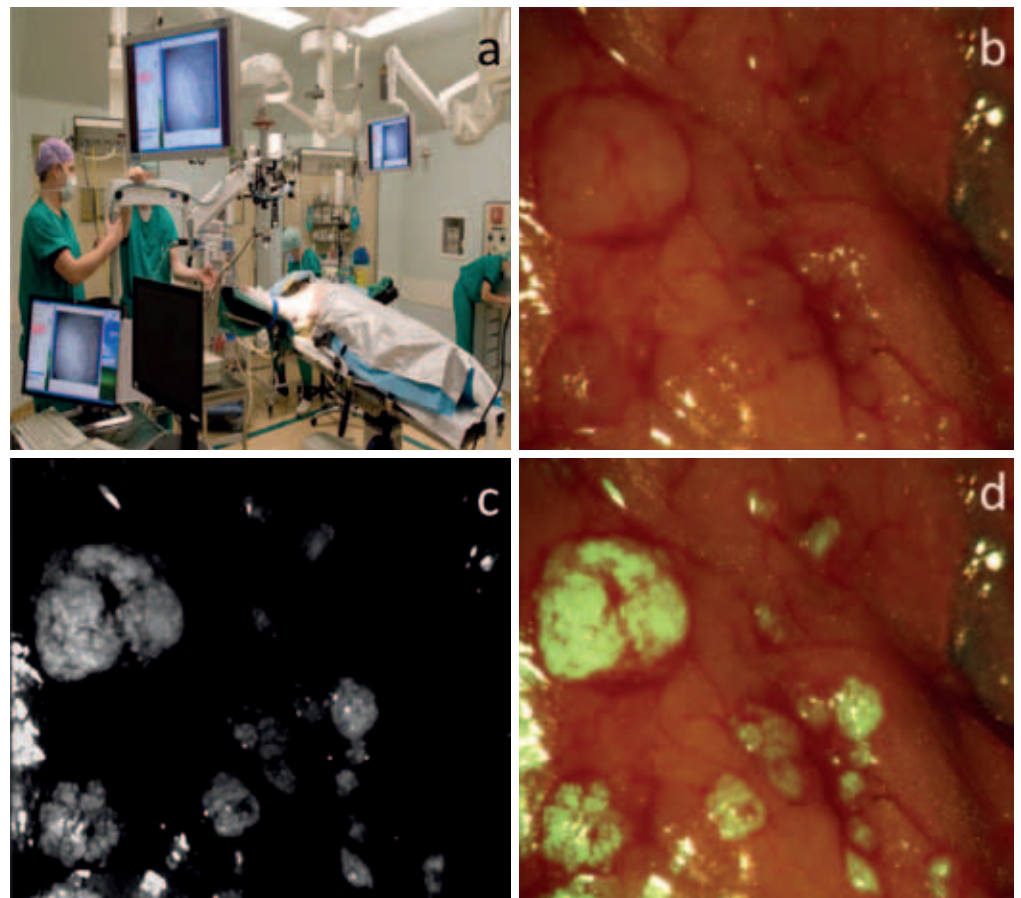


Abb. 1:

- Kamerasystem im OP-Saal vor der Abdeckung mit steriler Einweghülle.
- Intra-operativ aufgenommenes Farbbild eines Areals mit Ovarialkarzinom.
- Korrespondierendes Fluoreszenzbild.
- Überlagerung von Farb- und Fluoreszenzinformation zu einem Falschfarbenbild, in dem der Tumor grün angezeigt wird. Bilder aus (van Dam, et al., 2011).

© Natur Publishing Group

Tabelle 1: 10 Patienten; ++: stark, +: moderat, 0: schwach, -: nicht vorhanden; FIGO-Klassifikation gemäß der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique; IHC FR- $\alpha$ : Immunhistochemie für Folsäure- $\alpha$  Rezeptor; FM FITC: Fluoreszenzmikroskopie für Folsäure-FITC; n.a.: nicht anwendbar

Patient	Alter	Histopathologie	FIGO Stadium	In vivo Fluoreszenz	IHC FR- $\alpha$ Expression	FM FITC
<b>Maligne Tumore</b>						
1	72	Seröses Ovarialkarzinom	III	++	++	++
7	76	Seröses Ovarialkarzinom	III	+	+	+
9	64	Undifferenziertes Karzinom	III	-	-	-
10	61	Muzinöses Ovarialkarzinom	III	+	+	+
<b>Borderline Tumore</b>						
5	48	Seröses Borderline-Karzinom	I	0	+	0/+
<b>Benigne Tumore</b>						
2	59	Fibrothekom	n.a.	-	-	-
3	74	Fibrothekom	n.a.	-	-	-
4	53	Reifes zystisches Teratom	n.a.	-	-	-
6	64	Multizystisches Ovar	n.a.	-	-	-
8	41	Fibrom	n.a.	-	-	-

Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konnte ein hochspezifischer optischer Marker für das Ovarialkarzinom gewonnen werden.

Der Marker wurde zehn Patienten vor einer explorativen Laparotomie i.v. verabreicht. Tab. 1 zeigt eine Übersicht der Diagnosen von vier malignen, einem Borderline und fünf als gutartig klassifizierten Tumoren. Die FR- $\alpha$  Expression wurde mittels Immunhistochemie verifiziert und zeigte eine klare Korrelation mit der gemessenen Fluoreszenz, sowohl ex vivo mittels Fluoreszenzmikroskopie als auch intraoperativ. Die histopathologische Untersuchung entnommener Gewebeproben zeigte, dass es sich bei sämtlichen fluoreszierenden Proben um Tumor handelte.

Die intraoperativen Aufnahmen wurden mit einem speziell entwickelten Kamerasystem gemacht. Dabei messen zwei Kameras gleichzeitig sowohl ein trichromatisches Farbbild als auch ein Bild der Fluoreszenz an der entsprechenden Emissionswellenlänge. Aus den beiden Aufnahmen wird ein Falschfarben-Bild erzeugt, in dem das Farbbild anatomische Orientierung bietet, während die FITC Verteilung molekulare Informationen über das dargestellte Gewebe liefert.

Abb. 1 zeigt die Integration des Kamerasystems in den Operationsablauf sowie einige der aufgenommenen Bilder. Dabei ist in Abb. 1d) deutlich der verbesserte molekulare Kontrast zwischen erkranktem und gesundem Gewebe zu erkennen. Eine postope-

rativ Evaluierung der Bilder durch fünf erfahrene Chirurgen zeigte, dass mittels Fluoreszenzbildgebung fünfmal so viele Tumorherde identifiziert werden konnten als anhand der Farbbilder alleine. Diese Studie demonstrierte die erstmalige Translation gezielt wirkender Fluoreszenzfarbstoffe in die klinische Praxis. Dabei erwies sich Folsäure-FITC als ein potenter Marker zur spezifischen Markierung des Ovarialkarzinoms.

Die zukünftige Entwicklung der intraoperativen Fluoreszenzbildgebung konzentriert sich auf drei Schwerpunkte. Erstens stellt die Entwicklung geeigneter Kontrastmittel weiterhin eine der wesentlichsten Hürden dar. Neue Strategien, die auf der Verwendung klinisch zugelassener Tumormedikamente in sehr geringen, pharmakologisch nicht mehr wirksamen Dosierungen (sogenannten Microdosing (Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Department of Health and Human Services, 2006)) basieren, bieten dabei einen vielversprechenden Ansatzpunkt (Scheuer, et al., 2012). Eine Multi-Center-Studie zur verbesserten Erkennung von Brustkrebs mit einem Kontrastmittel, bestehend aus Bevacizumab (Avastin®, Roche) in Verbindung mit IRDye 800CW (LI-COR Biosciences) als fluoreszierendem Part, hat vor kurzem begonnen.

Zweitens müssen wichtige Einflussfaktoren auf das Fluoreszenzsignal wie optische Gewebeeigenschaften, Autofluoreszenz und Eindringtiefe berücksichtigt werden (Valdés, et al.,

2011) (Ntziachristos, 2010). Neue theoretische Modelle sowie multispektrale Bildgebung können dazu beitragen, diese Einflüsse zu korrigieren und so eine verbesserte Quantifizierung und Vergleichbarkeit der Messungen zu erreichen.

Schließlich erlaubt die Konstruktion des intraoperativen Kamerasystems eine einfache Adaption an minimal-invasive klinische Eingriffe wie Endoskopie und Laparoskopie. Dazu können Glasfaser-basierte Endoskope sowie starre Laparoskope mit Linsen an das System angeschlossen werden. Dadurch kann die molekulare Bildgebung mit Fluoreszenzfarbstoffen auch für endoskopische Eingriffe, zum Beispiel in der Darmkrebsdiagnostik eingesetzt werden.

Fluoreszierende Kontrastmittel können zahlreiche tumorspezifische Marker visualisieren (Hilderbrand & Weissleder, 2010) und so auch zur Lokalisation von Wächterlymphknoten eingesetzt werden (Crane, et al., 2010). Die Integration optischer Bildgebungstechnologie mit molekularer Spezifität kann die unzureichende visuelle Beurteilung von Gewebe im Rahmen chirurgischer und endoskopischer Eingriffe in Zukunft entscheidend verbessern, hin zu einer Biomarker-basierten Detektion (Ntziachristos, et al., 2010).

Literatur beim Verfasser

Anschrift der Verfasser:  
Dipl.-Ing. Jürgen Glatz, Vasilis Ntziachristos  
Lehrstuhl für Biologische Bildgebung,  
Technische Universität München  
Trogerstraße 9, 81675 München