

Aus der
Universitäts-Hautklinik Tübingen

**Direktuntersuchungen mit der konfokalen Laser
Scanning Mikroskopie (CLSM) im Vergleich zu
HE-gefärbten Paraffinschnitten von Biopsien bei
entzündlichen Erkrankungen und Tumoren der
Haut, sowie im Rahmen der mikrographisch
kontrollierten Chirurgie von Hauttumoren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Ogrzewalla, Hanna Elisabeth

2024

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Möhrle
2. Berichterstatter:	Professorin Dr. A. E. Staebler
Tag der Disputation:	25.02.2022

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern.

Meinem Vater Benjamin Ogrzewalla, der mir in den ersten 21 Jahren meines Lebens bei allen Problemen zur Seite stand und mit dem es immer etwas zu entdecken gab. Der die Welt so umarmt und in sich aufgesogen hat, das Leben mit Freuden und Freunden in vollsten Zügen genossen hat und diese Welt dann mit einem Paukenschlag wieder verlassen hat.

Und ich widme diese Arbeit meiner Mutter, Hedwig Ogrzewalla, deren Kraft und Stärke ich nur bewundern kann, deren mitreißendes, herzliches Lachen ihr nie verloren gegangen ist und die mir für immer ein Vorbild und Anker im Leben sein wird. Ich danke euch für alles.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	8
1.1 Übersicht Hauttumore	8
1.1.1 Maligne Melanome	8
1.1.2 Non Melanoma Skin Cancer (NMSC)	9
1.2 Behandlung von Hauttumoren	10
1.2.1 Operative Verfahren zur Entfernung von Hauttumoren.....	11
1.2.2 Aufbereitung des Exzidats.....	12
1.2.3 Beurteilung der Schnittränder.....	14
1.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	14
1.4 Fragestellung	18
1.4.1 Diagnostische Genauigkeit der CLSM bei der Untersuchung von BZKs	18
1.4.2 Diagnostische Genauigkeit der CLSM bei der Untersuchung von melanozytären Tumoren	18
1.4.3 Diagnostische Genauigkeit der CLSM bei der Untersuchung von Präparaten der Allgemeindermatologie.....	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Scannen der Proben	25
2.2 Beurteilung der Proben sowie der digitalen Scans	31
2.3 Statistische Auswertung.....	32
3. Ergebnisse	34
3.1 Darstellung des gescannten Gewebes in der CLSM	34
3.1.1 CLSM von Basalzellkarzinomen.....	34
3.1.2 CLSM von melanozytären Läsionen	36
3.1.3 CLSM von Präparaten der allgemeinen Dermatologie.....	38
3.1.4 Darstellung weiterer Hautstrukturen im CLSM-Scan.....	43
3.1.4.1 Gefäße	43
3.1.4.2 Nerven.....	44
3.1.4.3 Muskelgewebe	45
3.1.4.4 Elastischer Knorpel	46
3.1.4.5 Ekkrine Schweißdrüsen.....	47
3.1.4.6 Haarfollikel.....	49
3.1.4.7 Talgdrüsen	50

3.2 Statistische Auswertung.....	51
3.2.1 Basalzellkarzinome	51
3.2.2 Melanozytäre Läsionen	58
3.2.3 Allgemeine Dermatologie	63
3.2.4 Übersicht statistische Auswertung	69
4. Diskussion	70
4.1 Technische Probleme allgemein.....	70
4.1.1 Positionierung der Proben für den Scanvorgang	70
4.1.2 Färbung der Präparate	70
4.1.3 Aufbereitung der Präparate für die H&E-Färbung	72
4.1.4 Einarbeitung	73
4.2 Basalzellkarzinome	73
4.3 Melanozytäre Läsionen.....	76
4.4 Allgemeine Dermatologie.....	79
4.5 Schlussfolgerung	82
5. Zusammenfassung	83
Abbildungsverzeichnis.....	85
Tabellenverzeichnis.....	89
Literaturverzeichnis	90
Erklärung zum Eigenanteil.....	97
Danksagung	98

Abkürzungsverzeichnis

BZK: Basalzellkarzinom

CLSM: konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Fa.: Firma

Ggf.: Gegebenenfalls

H&E: Hämatoxylin und Eosin

KI: Konfidenzintervall

LMM: Lentigo maligna Melanom

M.: Morbus

ml: Milliliter

MMS: Mohs mikrographisch kontrollierte Chirurgie

MS: Mikrographisch kontrollierte Chirurgie

n = Anzahl

NaCl: Natrium-Chlorid

NMM: noduläres malignes Melanom

NMSC: non melanoma skin cancer

o.Ä.: oder Ähnliches

PEK: kutanes Plattenepithelkarzinom

SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Typ 2

SSM: superfiziell-spreitendes Melanom

Std.: Standard

s.o.: siehe oben

V.: Verruca

z.B.: zum Beispiel

Anmerkung: Zur besseren Lesbarkeit dieser Arbeit wurde die männliche Form gewählt. Es sind jedoch stets beide Geschlechter gleichermaßen gemeint.

1. Einleitung

Basalzellkarzinome (BZK) und Plattenepithelkarzinome (PEK) gehören zu den häufigsten Tumoren weltweit [1]. Die Inzidenz (= Fälle pro 100.000 Einwohner) maligner Melanome ist ebenfalls steigend. Für das Jahr 2020 werden bis zu 100.000 neue Fälle von Melanomen in den USA prognostiziert [2]. In Deutschland gehen Prognosen von bis zu 40.000 Fällen von Melanomen für das 2030 aus [3]. Damit gehört Deutschland zu den Ländern mit der höchsten Melanom-Inzidenz weltweit [4]. Genaue Angaben für die Inzidenz des malignen Melanoms in Deutschland sind nicht möglich, da kein bundesweites Krebsregister zur Verfügung steht [5]. Jedoch lassen sich aus den verfügbaren Zahlen stetig steigende Inzidenzen für Deutschland ablesen. Von 1970 bis 2012 stieg die Inzidenz des malignen Melanoms von 3 auf 19 Fälle /100.000 Einwohner [5]. Auch wenn die Daten für Basalzell- und Plattenepithelkarzinome in Deutschland ebenfalls lückenhaft sind, wird auch hier von einem Anstieg der Inzidenz von 400% und höher innerhalb der letzten 30 Jahre ausgegangen [4]. Dies macht es notwendig, sichere und schnelle Verfahren zur Behandlung der oben genannten Tumoren zu finden und stetig weiterzuentwickeln.

1.1 Übersicht Hauttumore

Hauttumore werden üblicherweise in maligne Melanome und in Non-Melanoma-Skin-Cancer (NMSC) eingeteilt.

1.1.1 Maligne Melanome

Maligne Melanome gehen von epidermalen Melanozyten aus. Ein Risikofaktor für maligne Melanome ist eine erhöhte UV-Strahlung, vor allem während der Kindheit [6]. Es konnte gezeigt werden, dass das Risiko für Melanome umso höher ist, je öfter in der Kindheit Sonnenbrände erlitten wurden [7].

Des Weiteren korreliert die Anzahl der melanozytären Nävi mit dem Risiko an einem malignen Melanom zu erkranken [8]. Bei einem Naevus handelt es sich um eine benigne Ansammlung von Melanozyten. Häufig entstehen Melanome, vor allem der Subtyp des superfiziell-spreitenden Melanoms, aus bereits bestehenden Naevi [9]. Der Anteil von Melanomen, welche auf Naevi

zurückgehen, wird auf 30% geschätzt [9, 10].

Auch der Phänotyp spielt eine Rolle. So erkranken hellhäutige, rothaarige Menschen überdurchschnittlich häufig an malignen Melanomen. Als weitere Risikofaktoren wurden helle Augen, Sommersprossen vor dem Alter von 15 Jahren, erhöhte Photosensitivität und nur geringe Bräunung der Haut nach Sonneneinwirkung festgestellt [11]. Während in jungen Jahren die Inzidenz maligner Melanome bei Frauen höher ist, erkranken in hohem Alter doppelt so häufig Männer. Die altersstandardisierte Inzidenz liegt für Männer mit 19,5/100.000 Einwohner höher als für Frauen (18,6/100.000 Einwohner) [4]. Auch die Mortalität ist für Männer höher als für Frauen [4].

Es werden die folgenden großen Subtypen unterschieden: superfiziell spreitendes Melanom (SSM), noduläres malignes Melanom (NMM), lentigo-maligna-Melanom (LMM) sowie das akral-lentiginöses Melanom.

Die Mortalität korreliert mit der Eindringtiefe. Je länger das Melanom besteht, desto tiefer dringt es in die Haut ein und desto höher ist die Mortalität. Ein regelmäßiges Screening nach verdächtigen Hautläsionen ist notwendig, um eine Diagnose bereits bei geringer Eindringtiefe stellen zu können [4].

1.1.2 Non Melanoma Skin Cancer (NMSC)

NMSCs werden in zwei große Untergruppen aufgeteilt: in Basalzellkarzinome (BZK) und die kutanen Plattenepithelkarzinom (PEK).

1.1.2.1 Basalzellkarzinome (BZK)

BZKs sind die häufigsten Tumoren innerhalb der Gruppe der NMSCs. Sie gehen von den basalen Zellen der Epidermis aus. Im Gegensatz zu den PEKs sind BZKs deutlich weniger aggressiv. Sie wachsen zwar infiltrativ, aber lokal begrenzt und metastasieren extrem selten. Im Falle einer Metastasierung sind am häufigsten Lymphknoten betroffen, gefolgt von der Lunge, den Knochen und der Haut [12]. Das Wachstum ist zwar invasiv, jedoch sehr langsam, was die Prognose insgesamt günstig macht.

Unter anderem werden die Subtypen nodulär, superfiziell, solide und fibrosierend unterschieden. Diese unterscheiden sich sowohl in ihrer

histologischen Erscheinung als auch in der Art der Therapie [4].

Risikofaktoren für das Auftreten eines BZKs sind UV-Strahlung, ein heller Hauttyp, Rauchen, Immunsuppression sowie die (häufige) Bräunung im Solarium [13].

1.1.2.2 Kutane Plattenepithelkarzinome (PEK)

Kutane Plattenepithelkarzinome gehen von den Keratinozyten aus. Sie bilden innerhalb der NMSCs die zweitgrößte Gruppe.

Die Risikofaktoren ähneln denen des BZKs, vor allem der Phänotyp und eine intensive Belastung mit Sonnenlicht erhöhen das Risiko, an einem PEK zu erkranken [14]. Jedoch wachsen PEKs im Vergleich zu BZKs deutlich aggressiver und metastasieren häufiger [15]. Für das Wachstum kutaner PEKs scheint außerdem auch das Mikromilieu eine wichtige Rolle zu spielen. So entstehen PEKs häufig auf bereits chronisch geschädigtem Gewebe wie zum Beispiel Narben, Brandwunden [16] oder sonnengeschädigter Haut [17]. Wie auch bei den Melanomen ist die Tumordicke für die Prognose und die Behandlung entscheidend, je tiefer der Tumor bereits in die Dermis eingedrungen ist, desto wahrscheinlicher ist eine Metastasierung [18]. Mit steigender Tumordicke, aber auch unter Immunsuppression, verschlechtert sich die Prognose für die Patienten [17, 19].

Es werden unterschiedliche Subtypen unterschieden: das akantulytische Plattenepithelkarzinom, das spindelzellige Plattenepithelkarzinom, das verruköse Plattenepithelkarzinom, das pseudovaskuläre Plattenepithelkarzinom, das adenosquamöse Plattenepithelkarzinom und der M. Bowen [4]. Auch diese können, genau wie die verschiedenen Subtypen des BZKs, mit der H&E (Hämatoxylin und Eosin) Histologie unterschieden werden.

1.2 Behandlung von Hauttumoren

Zur Behandlung von Hauttumoren stehen heutzutage unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Möglich sind eine chirurgische Therapie, Strahlentherapie, topische Therapie (Kryotherapie, Laser, ...) oder Systemtherapie [20]. Häufig wird eine operative Entfernung der Tumoren

durchgeführt.

Im Folgenden werden verschiedene operative Verfahren zur Entfernung eines Tumors vorgestellt, dann die unterschiedlichen Möglichkeiten zur Aufbereitung des Exzidats und zum Schluss die histopathologische Auswertung erläutert.

1.2.1 Operative Verfahren zur Entfernung von Hauttumoren

1.2.1.1 Mohs Mikrographisch kontrollierte Chirurgie (MMS)

Frederic Mohs entwickelte Anfang Mitte des 20. Jahrhunderts die später nach ihm benannte klassische „Mohs Mikrographisch kontrollierte Chirurgie“ (MMS). Die MMS sieht eine schüsselförmige Entfernung des Tumors vor. Das Skalpell wird im 45° Winkel angesetzt und der Tumor kreisrund umfahren. Das schüsselförmige Exzidat wird sodann farbig oder mit Einschnitten markiert, sodass eine topographische Orientierung für die histopathologische Aufarbeitung und Befundung gegeben ist. Nach ungefähr 30-60 Minuten kann der Dermatopathologe die Gefrierschnitte der Schnittländer beurteilen [21, 22]. Das Verfahren ist jedoch relativ komplex. Eine besondere Infrastruktur und entsprechend geschultes Personal ist erforderlich. Die Ergebnisse sind in der Regel reproduzierbar, außer wenn bei der Erstellung der Gefrierschnitte Material verloren geht [21]. Ist die lückenlose Schnittlandkontrolle gegeben, weist die MMS eine hohe Sensitivität auf und hat wenig Rezidive [22].

1.2.1.2 Mikrographisch kontrollierte Chirurgie (MS)

Die MS entwickelte sich aus der MMS. Die Grundprinzipien einer Schnittlandkontrolle sowie der Anbringung von Markierungen zur topographischen Orientierung der MMS wurden in der MS beibehalten. Die MS setzt jedoch auf eine andere Art der Tumorentfernung und auf unterschiedliche Techniken zur Aufbereitung des Exzidats.

Die MS sieht eine Schnittführung im 90° Winkel vor, dadurch ist nach der Tumorentfernung eine bessere Adaption der Wundländer und somit eine bessere Wundheilung gegeben. Analog zur MMS erfolgt aber auch hier eine topographische Markierung mit Hilfe von Farbe, Einschnitten und/oder dem Anbringen eines Fadens.

Die Exzision erfolgt in der MS mit einem Sicherheitsabstand, welcher in Abhängigkeit von der Art des Tumors, der Lokalisation und der Größe des Tumors bestimmt wird [21, 22]. Er beträgt meist zwischen 2-3 mm [22], kann jedoch je nach Art und Größe des Tumor auch größer oder kleiner gewählt werden (1-10mm) [21].

Unter allen Verfahren zeigen die MMS und MS die niedrigsten Rezidivraten sowie die besten ästhetischen Ergebnisse. Bei aggressiv wachsenden Tumoren und wenn eine sichere R0-Resektion erforderlich ist, ist die MMS und MS aufgrund der Befundung des gesamten Schnittrandes die Methode der Wahl [22]. Außerdem ist die Methode gut für Problemlokalisationen geeignet, da wenig Gewebe entfernt wird und somit gute ästhetische Ergebnisse erzielt werden [22]. Die Patientenzufriedenheit ist bei der MS sehr hoch [22]. In einer Studie mit über 5.000 Befragten, bei welcher ein BZK oder PEK mithilfe der MS entfernt worden war, bewerteten über 80% das kosmetische Ergebnis als „gut“ oder „exzellent“ [23].

1.2.2 Aufbereitung des Exzidats

Es gibt verschiedene Arten des makroskopischen Zuschnittes eines Tumorexzidates, um die Schnittränder lückenlos beurteilen zu können [21, 22]. Im Folgenden wird lediglich auf diejenigen Verfahren eingegangen, welche in Deutschland vorwiegend praktiziert werden. Diese können unter dem Namen „3D-Histologie“ zusammengefasst werden [24].

1.2.2.1 Tübinger Torte

Die Methode wurde von H. Breuninger in Tübingen als Alternative zur klassischen MMS entwickelt. Das entfernte Exzidat wird in eine Basis, den Rand und die Tumormitte aufgeteilt. Somit ist eine Kontrolle der Schnittränder, der Basis und des Tumors an sich möglich [25].

Zur besseren Einbettung des Schnittrandes in Histologie-Kassetten wird der Rand meist in mehrere Abschnitte aufgeteilt. Höchste Priorität hat dabei, dass die topographische Orientierung weiterhin gegeben ist und jedem Schnittrand die zugehörige Stelle im Gewebe zugeordnet werden kann. Dies kann durch

Farbmarkierungen, Einschnitte oder das Anbringen eines Fadens sichergestellt werden [26].

1.2.2.2 Muffin-Technik

Bei der Muffintechnik wird der Tumor mit dem nötigen Sicherheitsabstand entfernt und eine Markierung zur Orientierung angebracht. Meist erfolgt ein Einschnitt bei 12 Uhr, 6 Uhr und ggf. 2 Uhr. Die Schnittränder werden nach außen geklappt, sodass das Präparat flach auf dem Objektträger zu liegen kommt. Somit ist die Basis mit den Schnitträndern vollständig beurteilbar. Je nach Größe des Tumors und der Flexibilität des Gewebes kann es nötig sein, eine weitere Inzision am Rand zu platzieren. Ist das Gewebe sehr derb und bildet keine plane Oberfläche, so können diese weiteren Einschnitte eine Entlastung des unter Zug stehenden Gewebes ermöglichen. Damit wird die flache Einbettung des Muffins in die Kassette erleichtert.

Nach Präparation des Muffins wird sodann die Tumormitte, welche sich mittig im Muffin befindet, entfernt. Auch diese wird zur Beurteilung durch den Dermatopathologen mit eingeschickt.

Im Falle von sehr großen Exzidaten ist eine Teilung möglich. Die topographische Orientierung muss auch bei Teilung des Exzidats gegeben sein [21, 22].

1.2.2.3 Münchner Methode

Während das Vorgehen bei der Tübinger Torte sowie bei der Muffintechnik relativ ähnlich ist (Entfernung des Tumors am Stück, Beurteilung aufgeteilt in Tumormitte, Rand und Basis) wird bei der Münchner Methode das Gewebe horizontal aufbereitet [22]. Der Tumor wird meist schüsselförmig entfernt. Sodann werden von unten nach oben horizontale Serienschnitte angefertigt. Eine große Zahl an histologischen Schnitten muss daher beurteilt werden. Dies ermöglicht eine Verfolgung des Wachstumsmusters des Tumors durch die Haut [21, 22].

Jedoch ist das Verfahren nicht geeignet für epidermale Läsionen wie beispielsweise Lentigo maligna oder M. Bowen, da die Epidermis nur eingeschränkt beurteilt werden kann [22].

1.2.3 Beurteilung der Schnittränder

In Deutschland erfolgt die Beurteilung der Schnittränder überwiegend an H&E-gefärbten Paraffinschnitten. Diese Methode ist bedeutend langsamer als die Erstellung von Gefrierschnitten, die Schnitte liegen bei einer guten Organisation nach ca. 20 Stunden vor. Die Infrastruktur für die Erstellung von Gefrierschnitten im dermatochirurgischen Routinetrieb ist in Deutschland nicht gegeben [21, 22].

Die Wunde sollte im Regelfall nicht geschlossen werden, wenn die Auswertung der Schnittränder noch nicht vorliegt, denn im Falle von verbliebenem Rest-Tumorgewebe ist eine Nachresektion bei bereits erfolgtem Wundverschluss erschwert.

In diesem Fall erfolgt die Behandlung häufig zweizeitig oder im Rahmen einer stationären Aufnahme. Liegt das Ergebnis der histopathologischen Untersuchung der Schnittränder vor, kann die Wunde bei Tumorfreiheit geschlossen werden.

Die Beurteilung der Schnittränder an H&E-gefärbten Paraffinschnitten besitzt den Nachteil einer deutlichen zeitlichen Verzögerung mit einem gesteigerten Infektionsrisiko für die noch nicht verschlossene Wunde.

1.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die histologische Beurteilung von (dermatologischen) Exzidaten erfolgt heutzutage überwiegend durch die Erstellung von Gefrierschnitten oder paraffineingebetteten H&E-Schnitten. Seit einigen Jahren wird jedoch eine weitere Methode für den Einsatz im klinischen Alltag getestet und weiterentwickelt: die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) [27].

Die CLSM wurde bereits Mitte des 20. Jahrhunderts von M. Minsky entwickelt. [28]. Ihr liegt folgendes Prinzip zugrunde: Ein Laser scannt Gewebe mit monochromatischem Licht ab. Vom Gewebe zurückstreuende Photonen werden detektiert, aus der Intensität der Photonen berechnet sich das konfokale Bild.

Das Licht wird dabei abhängig vom Brechungsindex des Gewebes reflektiert.

Hieraus ergibt sich das Bild im sogenannten Reflektionsmodus.

Eine weitere Möglichkeit ist die Färbung des Gewebes mit fluoreszierenden Farbstoffen. Scannt der Laser das Gewebe ab, werden die fluoreszierenden Farbstoffe angeregt und ebenfalls Photonen ausgesendet. Diese können detektiert werden. Hieraus ergibt sich das Bild im sogenannten Fluoreszenzmodus [29, 30].

Reflektions- und Fluoreszenzmodus können im sogenannten Fusionsmodus kombiniert werden. [31, 32].

Die Besonderheit bei der CLSM im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie liegt darin, dass bei der CLSM durch eine Lochblende lediglich die Signale der an fokussierten Ebene registriert werden [30][Thieme Roderfeld]. Alle anderen Signale, welche über oder unter der fokussierten Ebene liegen, werden gefiltert [30].

Hinter der Lochblende befindet sich ein Photomultiplier (PMT), welcher das Licht, welches von der Lochblende durchgelassen wurde, detektiert.

Während die ersten, in den 80er Jahren entwickelten Geräte die Präparate zunächst noch mit einer unbeweglichen Lichtquelle scannten, war es im Laufe der Jahre möglich, das Gewebe systematisch mithilfe eines Laserstrahls abzuscannen [33]. Ab den neunziger Jahren war eine räumliche Trennung zwischen der Kühlung des Lasers (und dem Laser an sich) und dem Scankopf möglich. Somit wurden weniger Artefakte durch Vibrationen erzeugt. Außerdem wurde dadurch der Laser an sich besser erreichbar für Wartungen und Reparaturen [33].

Moderne konfokale Mikroskope ermöglichen es, Fluoreszenz- und Reflektionsmodus miteinander zu kombinieren. Die Auflösung ist deutlich größer. Des Weiteren ist es möglich, die schwarz-weißen CLSM-Scans mithilfe einer Software „anzufärben“, z.B. in rosa und blau („pink and blue“) [34]. Hierdurch erscheinen die digitalen Scans in ähnlichen Farben wie auch die H&E-gefärbten Paraffinschnitte. Die Befundung ist deutlich leichter und benötigt weniger Einarbeitung.

Heutzutage hat sich die CLSM bereits in vielen Disziplinen der Biologie und der Medizin etabliert. In der Medizin werden in vivo von ex vivo Verfahren unterschieden. Bei der in vivo CLSM wird die Läsion direkt am Patienten untersucht. Die Eindringtiefe beträgt 200 [35] - 300 μm [36]. Die Läsion wird im Reflektionsmodus gescannt, vor allem Melanin, Keratin und Kollagen erscheinen aufgrund des höheren Brechungsindex heller und bilden einen Kontrast zum umliegenden Gewebe [35]. Durch die geringe Eindringtiefe kann lediglich die Epidermis vollständig dargestellt werden, die Darstellung der Dermis ist nur anteilig möglich [37]. Dadurch können mithilfe der in vivo CLSM invasive Tumoren sowie dermale Prozesse nur unzureichend dargestellt werden.

Bei der ex vivo CLSM wird die bereits exzidierte Läsion mithilfe eines Lasers gescannt und ein digitales Bild erstellt. Durch die Entnahme der Läsion kann diese auch subepidermal gescannt und begutachtet werden.

Sauermann et al. hatten bereits 2002 die sogenannte in vivo CLSM verwendet, um Charakteristika von BZKs in 12 Patienten auszumachen [38]. Seitdem gab es zahlreiche Studien, die die Anwendung der CLSM in unterschiedlichen Gebieten der Medizin, genauer in der Dermatologie, untersucht haben. Die Beurteilung von Schnitträndern kann mithilfe der ex vivo CLSM erfolgen. So wurde die ex vivo CLSM zur Auswertung von Schnitträndern von OP-Exzidaten verschiedener Tumoren (BZK, PEK, Melanom), zur Begutachtung entzündlicher Veränderung (Psoriasis, Ekzeme, Lichen planus sowie Lupus erythematoses), bei Dermatofibrosarcoma protuberans sowie bei Tumoren der Nägel eingesetzt [39]. Besonders die Auswertung von Schnitträndern bei Basalzellkarzinomen [39-45], Plattenepithelkarzinomen [39, 43, 46] und melanozytären Läsionen [39, 47-51] wurden bereits mithilfe der ex vivo CLSM untersucht [39]. Auch wurden unterschiedliche Färbeprotokolle in Bezug auf die diagnostische Genauigkeit ausgewertet. So färbten Hartmann et al. melanozytäre Läsionen mithilfe von Immunfluoreszenz-Farbstoffen, um eine eventuell verbesserte Darstellung melanozytärer Strukturen nachzuweisen [47]. Aber auch unterschiedliche Färbungen zur besseren Darstellung von Basalzellkarzinomen und generell

Tumoren der Haut (Toluidinblau, Methylenblau, Ethitidumbromid,...) wurden in Studien bereits eingesetzt [39].

1.4 Fragestellung

Die vorliegende Dissertation untersucht die Möglichkeit zur Integration der ex vivo CLSM in den klinischen Workflow einer operativen Hautarztpraxis.

Es wurden drei Fragestellungen untersucht: die diagnostische Genauigkeit der CLSM im Rahmen der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie von BZKs, der Einsatz der CLSM bei melanozytären Läsionen sowie die Untersuchung von Präparaten aus der allgemeinen Dermatologie mithilfe der CLSM.

1.4.1 Diagnostische Genauigkeit der CLSM bei der Untersuchung von BZKs

Tumormittelschnitte und Randkontrollen von Basalzellkarzinomen sollten mit dem konfokalen Mikroskop gescannt werden. Ziel war es herauszufinden, ob die ex vivo CLSM eine gute Möglichkeit darstellt, schnell und mit hoher Genauigkeit die entnommenen Tumoren und deren Schnittränder zu befunden und ob ein Einsatz im intraoperativen Setting umsetzbar wäre.

1.4.2 Diagnostische Genauigkeit der CLSM bei der Untersuchung von melanozytären Tumoren

Es wurde untersucht, ob im Routine-Workflow einer dermatologischen Praxis mit der ex vivo CLSM eine sichere und schnelle Befundung melanozytärer Exzisionen möglich ist.

1.4.3 Diagnostische Genauigkeit der CLSM bei der Untersuchung von Präparaten der Allgemeindermatologie

Häufig wurde die Anwendung der CLSM unter dem Aspekt definierter Tumorentitäten untersucht. Eine Implementierung der CLSM im alltäglichen allgemeindermatologischen Workflow einer Praxis oder Klinik wurde bis dato noch nicht untersucht. Daher sollten alle Patienten, bei denen im Untersuchungszeitraum eine Biopsie oder ein Exzidat entnommen wurde, in die Studie eingeschlossen werden. Die entnommenen Gewebe sollten mit dem ex vivo CLSM gescannt werden.

Auch hier wäre eine Anwendung der ex vivo CLSM im Falle hoher diagnostischer Sicherheit in Zukunft denkbar: Die Entscheidung über das

weitere diagnostische und therapeutische Procedere könnte unmittelbar nach einer mikroskopischen Sicherung direkt in der Praxis oder Ambulanz getroffen werden.

2. Material und Methoden

Die Studie fand von April bis Mai 2020 während der Zeit der ersten Welle der Coronavirus SARS-CoV-2 Pandemie in der Praxisklinik Tübingen - Haut und Venen statt.

Ein positives Votum der Ethik-Kommission der Eberhard Karls Universität Tübingen lag vor (Antrags-Nummer: 899/2019BO1). Alle Patienten gaben vor der Aufnahme in die Studie ihr informiertes schriftliches Einverständnis.

Die Befundung der Scans erfolgte durch die Dermatopathologen A und B. Beide sind Dermatologen mit der Zusatzbezeichnung Dermathohistologie.

Dermatopathologin A hat mehr als 20 Jahre Berufserfahrung im universitären und außeruniversitären Bereich, Dermatopathologe B hat 4 Jahre Berufserfahrung im universitären Bereich.

Es wurden insgesamt 114 Patienten in die Studie eingeschlossen. Bei 107 wurden die Daten erhoben und ausgewertet. Bei 2 Patienten war die Auswertung der Daten aufgrund von Fehlern nicht möglich. Die Präparate von 5 Patienten dienten zur Einarbeitung der zwei befundenden Dermatopathologen A und B.

13 der 107 Patienten kamen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten in der Zeit zwischen April und Mai 2020 in die Praxisklinik; ein Patient kam zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten. Dies ergab sich meist aus der Notwendigkeit einer (oder zwei) Nachresektion(-en) aufgrund von verbliebenem Tumorgewebe. Da die entnommenen Gewebeproben an unterschiedlichen Tagen gewonnen wurden, erhielten die Patienten für jeden Besuch bzw. jede Intervention in der Praxisklinik eine neue Probandennummer. Insgesamt wurden somit 122 Probandennummern für 114 Probanden vergeben.

Es wurden 64 Frauen und 48 Männer in die Studie eingeschlossen. Sie waren zwischen 21 und 94 Jahre alt.

Für die Studie wurde das Gerät „VivaScope 2500M-G4“ verwendet [Fa. Mavig, München]. Das Gerät wurde von der Firma Mavig kostenlos zur Verfügung gestellt. Das Scannen konnte in zwei Wellenlängen bei 488 und 785nm erfolgen. Der Laser konnte Präparate bis zu einer Größe von 25x25 mm scannen.



Abbildung 1: Vivascope2500M-G4. Links der eigentliche Scanner mit der Öffnung für das Einlegen des Objektträgers (weißer Stern). In der Mitte unten ist der Joystick zum Verschieben der Probe über dem Laser bzw. der Kamera (gelber Stern). Rechts der zum Laser dazugehörige Bildschirm (grüner Stern).

Mit freundlicher Genehmigung der Firma Mavig; [<https://www.vivascope.de/products/vivascope-2500m-g4/>].

Um einen Scan zu erstellen, wurde der Objektträger in die vorgesehene Halterung mittig eingespannt (vergleiche Abbildung 1). Der Laserkopf befindet sich auf der linken Seite der Öffnung Vivascopes, auf der rechten Seite der Öffnung ist eine Kamera angebracht, welche den Objektträger von unten abfilmt. Durch die Kamera konnte die Lagerung der Probe der Probe in hoher Auflösung bereits vor dem Starten des Scanvorgangs begutachtet werden. Über den Bildschirm war die Auswahl des zu scannenden Bereichs der Probe möglich. Mithilfe des Joysticks konnte der eingespannte Objektträger über der Kamera bzw. über dem Laser bewegt werden.

Die Präparate von 5 Probanden wurden zu Beginn A und B zur Einarbeitung zur Verfügung gestellt (n=26). Sowohl A als auch B erhielten im Rahmen der Trainingsphase die digitalen Scans sowie die dazugehörigen H&E-gefärbten Objektträger gleichzeitig. Dies ermöglichte es, nachzuvollziehen, wie sich die Strukturen der H&E-Objektträger auf den digitalen CLSM-Scans darstellten. Für die Einarbeitung standen Objektträger und digitale Scans jeweils mehrere Tage zur Verfügung, um eine ausreichende Einarbeitung zu gewährleisten. Die Präparate der Einarbeitung wurden nicht für die weitere Studie verwendet.

Für die Studie wurden insgesamt 620 Präparate gescannt.

26 Präparate von den ersten 5 Patienten dienten der Einarbeitung, es verblieben daher noch 594 Präparate für die Auswertung.

Für das Erstellen eines jeden Scans wurde die dafür benötigte Zeit gemessen und dokumentiert. Häufig ergaben sich Verzögerungen und Schwierigkeiten aufgrund von technischen Problemen. Folgende technischen Probleme traten vorwiegend auf:

- Der Scan erschien stark streifig. In diesem Fall musste der Scan abgebrochen werden, das Präparat nochmals neu platziert werden und der Scan wiederholt werden (siehe Abbildung 2)
- Der Laser scannte nicht den ausgewählten Bereich ab. Eine Ursache dafür konnte auch nach Rücksprache mit der Firma Mavig nicht gefunden werden. Mehrere Neustarts des PCs waren in diesem Fall notwendig
- Das Programm reagierte nicht mehr. Ein Beenden des Programmes und einer, teilweise auch mehrere Neustarts waren von Nöten

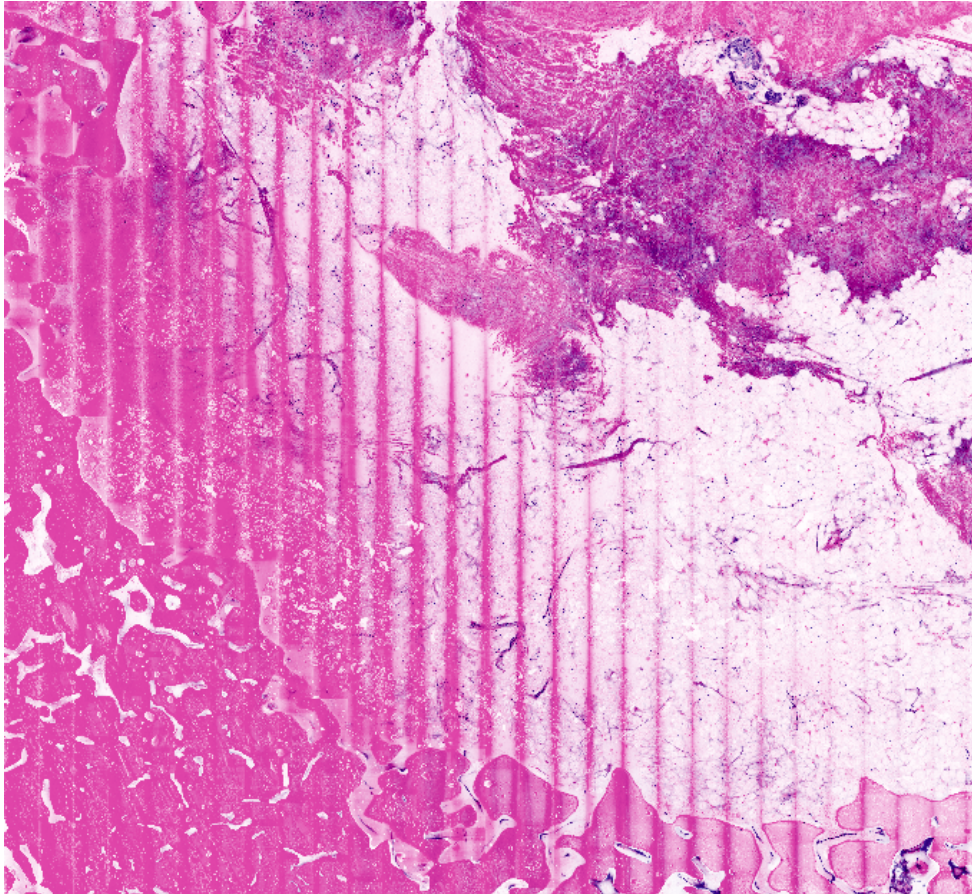


Abbildung 2: Stark streifiger CLSM-Scan. Das fehlerhafte Scannen war meist an den Rändern am ausgeprägtesten, wohingegen die Mitte des Scans häufig ohne starke Streifenbildung gescannt wurde.

Die genannten Probleme erhöhten die benötigte Zeit pro Scan deutlich. Meist dauerte die Behebung eines technischen Problems zwischen 5 und 10 Minuten. Daher wurde bei jedem Präparat dokumentiert, ob ein technisches Problem während des Scannens vorlag oder nicht. Die Dokumentation technischer Probleme wurde nicht von Anfang an, sondern erst ab dem Proband 15 begonnen.

Die Präparate wurden für den Scan und zur Beurteilung durch den Dermatopathologen folgendermaßen aufbereitet:

- in Muffins, welche jeweils in 4 Quadranten aufgeteilt wurden
- in geteilte, halbierte Stenzen
- in Tumormittelschnitte
- in Randschnitte
- und in Basisschnitte.

Tabelle 1: Übersicht über die Anzahl und Art der Präparate

Muffinquadranten	207
Halbierte Stenzen	42
Tumormittelschnitte	239
Randschnitte	86
Basisschnitte	20
Gesamt:	594

Von den 107 Patienten wurden insgesamt 594 Präparate beurteilt. Diese hohe Anzahl an Präparaten im Vergleich zur Anzahl der Patienten erklärt sich durch folgende Gründe:

1. Der Zuschnitt, welcher die korrekte Befundung im Rahmen der 3D-Histologie ermöglicht, bedingt die Aufteilung einer einzigen Läsion in mehrere Präparate. Der Zuschnitt einer Läsion mithilfe der Technik der „Tübinger Torte“ ergibt beispielsweise eine Basis, 4 Ränder und 1-3 Tumormittelschnitte; bei der Aufbereitung als Muffin fallen ebenfalls ein bis drei Tumormittelschnitte zusätzlich zum Muffin an.

Jede Stanze wurde in der Mitte halbiert, um die dadurch entstehende Schnittkante anschließend mit dem konfokalen Mikroskop plan scannen zu können.

2. In der MMS ist es üblich einen Tumor in sog. Quadranten zu zerteilen und zu beurteilen [22]. Ein Muffin wurde zwar nicht makroskopisch in vier Quadranten

zerteilt wie in der Mohs Chirurgie; jedoch aus Gründen der Vergleichbarkeit mit diesem Verfahren der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie immer virtuell in vier Quadranten aufgeteilt und auch durch die befundenden Dermatopathologen als vier getrennte Quadranten ausgewertet: 0:00 - 3:00h, 3:00 - 6:00h, 6:00 - 9:00h und 9:00 - 12:00h. Somit ergab ein Muffin vier Präparate.

3. Einige Patienten hatten mehrere Tumore an unterschiedlichen Lokalisationen oder wurden an der gleichen Lokalisation mehrfach, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten operiert (siehe oben).

2.1 Scannen der Proben

Nach Entnahme des Exzidats erfolgte der Zuschnitt durch den Dermatochirurgen (z.B. als Tübinger Torte, Muffin o. Ä.). Sofern es notwendig war, wurden außerdem Schnitte zur Entlastung und/oder zur Orientierung angebracht. Das war in erster Linie bei einem Muffin-Zuschnitt der Fall oder bei sehr derber, wenig flexibler Haut.

Anschließend wurden alle Präparate direkt vor Ort in der Praxisklinik Haut und Venen gescannt. Da häufig mehrere Präparate pro Patient anfielen (s.o.) wurden die Präparate bis zum Färben und Scannen auf mit Ringer-Lösung angefeuchteten Kompressen gelagert. So konnte ein Austrocknen der Proben verhindert werden. Außerdem garantierte das Lagern auf feuchten Kompressen, dass die Proben durch die CSLM in der Praxisklinik nicht für die spätere Einbettung in Paraffin beeinträchtigt wurden.

Für den Scanvorgang wurden die Proben zunächst 30 Sekunden im Färbebad eingefärbt [Färbewännchen „Tissue-Tek Cryomod – Standard“, Fa. Sakura Finetek, USA, LOT 32571]. Dieses bestand aus ca. 2,5ml Ringerlactat Lösung [500 ml, Fa. Braun] sowie 20 Tropfen Acridine Orange [Fa. Morphisto, 1%].

In der vorliegenden Studie kam ein neues Färbeprotokoll zur Anwendung. Im Gegensatz zu bisherigen Verfahren [49, 52] wurde das Präparat im Anschluss an das Färbebad nicht noch einmal in NaCl-Lösung oder Ringerlactat-Lösung gewaschen, sondern direkt auf dem Objektträger platziert. Dieses neue,

schnellere Vorgehen bei der Einfärbung der Präparate hatte keine Beeinträchtigung in der Bildqualität zur Folge.

Das Präparat musste mit der zu scannenden Seite nach unten auf dem Objektträger auf dem inversen Mikroskop platziert werden. Insbesondere bei Präparaten, welche der Randkontrolle dienten oder oberflächliche (epidermale) Läsionen enthielten, musste die Epidermis plan auf dem Objektträger aufliegen. Das flache Platzieren der Epidermis auf dem Objektträger bereitete insgesamt die größten Probleme. Die unfixierten Präparate konnten meist nur schwer vollständig plan platziert werden, hieraus resultierte eine nur unzureichende Darstellung der Epidermis.

Um die plane Positionierung der Präparate auf dem Objektträger zu ermöglichen, konnte das Präparat zwischen einem Objektträger und einer Glasplatte mithilfe von Magneten eingeklemmt werden (siehe Abbildung 3). Durch Kombination unterschiedlich großer Magneten des Objektträgers und der Glasplatte konnte der Abstand variiert werden. Eine grobe Voranpassung an die Dicke des Präparats war dadurch möglich. War bereits absehbar, dass ein hoher Druck benötigt werden würde, um das Präparat flach auf den Objektträger aufzubringen, konnte bereits vor der Lagerung des Präparats ein stärkerer Magnet gewählt werden.

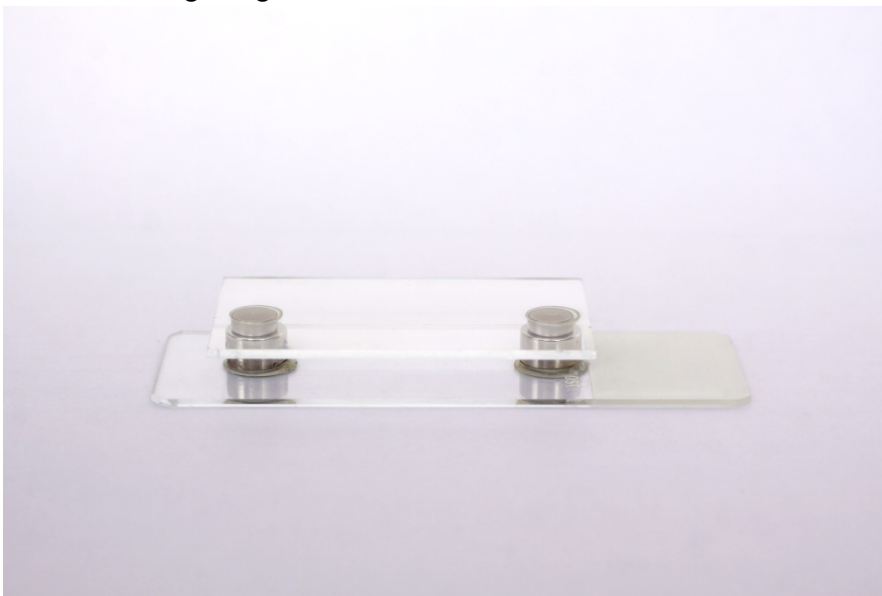


Abbildung 3: Kombination von Objektträger und Glasplatte. Verbindung mithilfe von Magneten.

Um den ausgeübten Druck an das Präparat anpassen zu können, wurde zusätzlich Schaumstoff über dem Präparat zwischen Objektträger und Glasplatte platziert (siehe Abbildung 4). Durch das Hinzufügen von Schaumstoff konnte der Druck weiter erhöht werden. Durch die Verwendung unterschiedlich harten Schaumstoffs und einen an das Präparat angepassten Zuschnitt konnte der Druck variiert und an das Präparat angepasst werden.

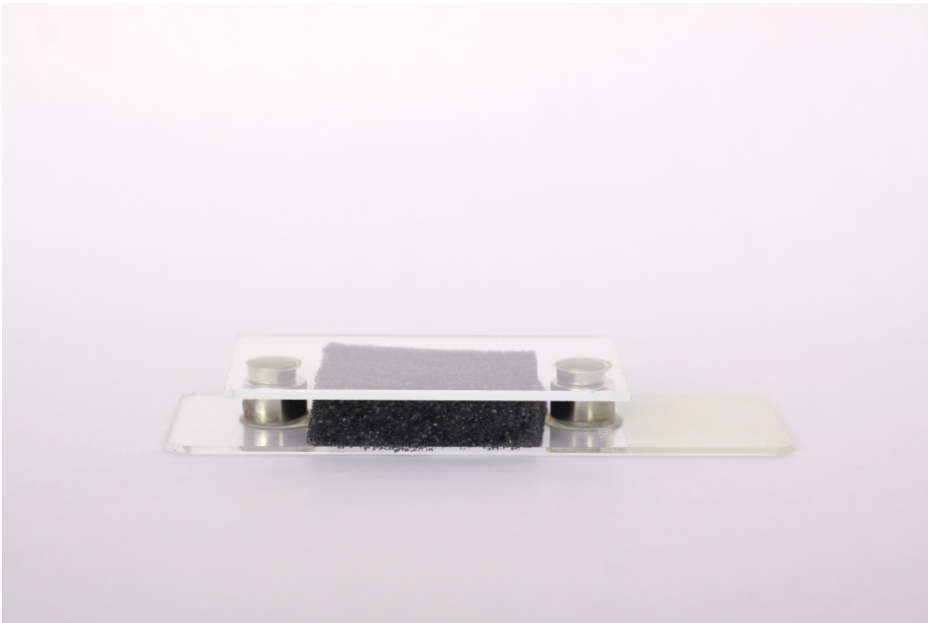


Abbildung 4: Es wurde Schaumstoff zwischen Glasplatte und Objektträger geklemmt, um ein besseres Fixieren der Probe mit mehr Druck zu ermöglichen.

Des Weiteren wurde eine Methode von Peters et al. übernommen, welche das Fixieren der Präparate auf dem Objektträger erleichterte [53]. Hierbei wurde Knete verwendet und über dem Präparat platziert (siehe Abbildung 5). Die Knete wurde in Frischhaltefolie gewickelt, um Verunreinigung des Präparats auszuschließen.



Abbildung 5: Bereits vorbereitete Knete, welche geformt und in Frischhaltefolie gewickelt ist.

Je nach Beschaffenheit des Präparats (Dicke, Derbheit der Haut, Grad der Unebenheit) konnte die Knete leicht angepasst werden.

Es ergaben sich durch diese Methode mehrere Vorteile. Die Knete war weniger nachgiebig als der Schaumstoff. Bei besonders derben Präparaten konnte somit durch die Knete mehr Druck aufgebaut werden als mit Schaumstoff. Dies war beispielsweise bei Präparaten der Nase oder der Kopfhaut häufig notwendig, da diese sich nur schwer dem Objektträger anpassen. Zusätzlich war es möglich den Druck innerhalb des Präparats entsprechend zu variieren. So konnte beispielsweise durch das Formen eines Rings aus Knete gezielt der Rand eines Muffins rundherum flach auf den Objektträger angedrückt werden, während der Druck auf der Basis des Muffins vergleichsweise geringgehalten werden konnte. Die Gefahr von Quetsch-Artefakten konnte hierdurch minimiert werden (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: Platzierung der Knete zwischen Glasplatte und Objektträger.

Nach dem Einlegen des Objektträgers in das VivaScope war ein makroskopisches Bild als Vorschau verfügbar. Anhand dieses Bildes konnte direkt eingeschätzt werden, ob das Präparat richtig positioniert und die Epidermis dargestellt war oder ob das Präparat neu gelagert werden musste (siehe Abbildung 7).



Abbildung 7: Makroskopisches Bild. Das Präparat ist durch das Färbebad mit Acridine Orange leicht orange-rötlich gefärbt. Zur besseren Fixierung und Aufbringung von Druck ist es von Schaumstoff umgeben, rechts ist einer der Magneten sichtbar.

Folgende Kriterien mussten erfüllt sein, um eine gute Lagerung der Probe anhand des makroskopischen Bildes garantieren zu können:

- Keine Stellen mit überlappendem Gewebe
- Keine Stellen mit Gewebe, welches nach oben weggeklappt ist
- Epidermis überall sichtbar
- Präparat mittig gelagert (nicht zu nah an den Magneten rechts und links; nicht über den Objektträger hinausschauend)
- Keine Luftblasen unter dem Gewebe eingeschlossen (sonst ist ein Scannen mit dem Laser nicht möglich)

War nach Einschätzung mithilfe des makroskopischen Bildes das Präparat richtig gelagert, wurde mit dem eigentlichen Scanvorgang begonnen. Dieser

dauerte je nach Größe des Präparats zwischen 20 Sekunden und mehreren Minuten. Häufig war erst nach Beurteilung des Scans durch den Laser ersichtlich, an welchen Stellen des Präparats die Epidermis nicht ausreichend dargestellt war. In diesen Fällen war ein neues Lagern der Probe und die Wiederholung des bereits genannten Vorgehens erforderlich.

War der Scanvorgang beendet und das Präparat zufriedenstellend dargestellt, konnte die Probe in Histologie-Kassetten eingebettet und in Formalin gelagert werden. Das Bild wurde in dieser Zeit auf dem PC gespeichert. Der Speichervorgang benötigte 10 bis 20 Sekunden, die Größe der Bilder betrug teilweise mehrere Gigabyte.

2.2 Beurteilung der Proben sowie der digitalen Scans

Nach dem Scannen der Proben in der Praxisklinik Haut und Venen wurden die Proben im Institut für Pathologie, Zytologie und Dermatohistologie | Dr. Geppert und Kollegen in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Die erstellten H&E-Objektträger wurden zunächst von Dermatopathologin A befundet und anschließend von Dermatopathologe B. Sowohl A als auch B befundeten jeweils lediglich die H&E-gefärbten Objektträger eines jeden Präparats, nicht jedoch Schnitte welche mittels Immunhistochemie gefärbt wurden. Somit wurde sichergestellt, dass ein Vergleich von CLSM nur mit den H&E-gefärbten Paraffinschnitten möglich war.

Bei der Befundung sowohl der Objektträger als auch der digitalen Scans, waren den Befundenden das Alter des Patienten, Lokalisation der Läsion sowie klinische Angaben - wie auf dem Überweisungsschein vermerkt - bekannt. Die Präparate waren jedoch noch nicht den drei Fragestellungen zugeordnet. Es war für den Befundenden nicht ersichtlich, ob der CLSM-Scan zur Gruppe der BZKs, der melanozytären Läsionen oder der allgemeinen Dermatologie gehörte. Sie befundeten die Scans in einer chronologischen Reihenfolge.

B befundete zuerst die CLSM Scans, danach erfolgte die Befundung durch A. Beide dokumentierten dabei jeweils zusätzlich zum Befund der Scans vier weitere Parameter:

1. Benötigte Zeit für die Beurteilung eines Scans [in Sekunden]. Während A die Befundung in den Workflow der täglichen Praxisroutine integrierte und somit mehr zeitlichen Druck hatte, konnte B die Befundung bei freier Zeiteinteilung vornehmen. Um dies abzubilden, wurde die Zeit pro Scan festgehalten.
2. Note [Qualität des Schnittes; von 1 = sehr gut bis 6 = ungenügend]. Die Einschätzung des Scans erfolgte jeweils subjektiv durch den Dermatopathologen. Fehlende Epidermis, schlechte Färbung (zu schwach / zu stark), umgeklappte Areale oder auch durch technische Probleme hervorgerufene Streifen im Scan führten zu einer schlechteren Note.
3. Dargestellte Epidermis [in %]. Die vollständige Darstellung der Epidermis ist insbesondere bei der Befundung epidermaler Läsionen wie beispielsweise einem M. Bowen von entscheidender Bedeutung und wurde daher dokumentiert.
4. Die diagnostische Sicherheit des Untersuchers bei der Befundung [„sicher“ vs. „unsicher“].

Diese Parameter wurden zur weiteren Auswertung herangezogen. Ziel war es, eventuelle Prädiktoren ausmachen zu können, mit welchen sich einschätzen ließe, ob der Befund eher richtig oder eher falsch sein würde.

Des Weiteren wurde die Größe aller Präparate bestimmt. Hierfür wurde ein integriertes Tool der Software „VivaScan“ der Fa. Mavig verwendet. Mithilfe dieses Tools konnten Länge und Breite der Präparate schnell und genau gemessen werden und damit annäherungsweise die Fläche berechnet werden. Auch hier wurde der Parameter erhoben, um auszuwerten, inwiefern Unterschiede in der Größe der Präparate sich bei der Genauigkeit der Befundung niederschlagen.

2.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Arbeit wurde die Beratung durch Frau Anne-Kristin Münch des Instituts für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie in Anspruch genommen.

Zur statistischen Auswertung wurde die Software IBM SPSS ®; Version 27 verwendet.

Die Präparate wurden entsprechend der drei verschiedenen Fragestellungen (BZKs, melanozytäre Läsionen und allgemeine Dermatologie) in drei Gruppen aufgeteilt.

Innerhalb jeder Gruppe wurden Sensitivität, Spezifität und diagnostische Genauigkeit der Untersucher A und B bestimmt.

Die Interrater-Reliabilität (Cohens Kappa) wurde sowohl für die Auswertung der CLSM-Scans als auch für die Auswertung der H&E-gefärbten Schnitte bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Darstellung des gescannten Gewebes in der CLSM

Durch die digitale Färbung der gescannten Gewebe wird die H&E-Färbung zwar imitiert, jedoch ergeben sich auch einige Abweichungen bei der Darstellung im CLSM-Scan. Im Folgenden wird zunächst auf die Besonderheiten in der CLSM-Bildgebung bei Basalzellkarzinomen, bei melanozytären Läsionen sowie bei Präparaten der Allgemeindermatologie eingegangen. Am Ende des Kapitels wird eine Übersicht über die Darstellung dermatologischer Strukturen im CLSM-Scan gegeben.

3.1.1 CLSM von Basalzellkarzinomen

Typisch bei der Darstellung von Basalzellkarzinomen ist die Palisadenstellung der Zellen am Rand des Tumors sowie die Spaltbildung zwischen Tumorzellen und dem Tumorstroma. Basalzellkarzinome wachsen häufig in Tumorsträngen oder Tumorinseln (vergleiche Abbildung 8). Die Darstellung von Basalzellkarzinomen im CLSM-Scan ist der Erscheinung im H&E-gefärbten Präparat sehr ähnlich. Die Zellkerne färben sich im H&E-gefärbten Schnitt durch die Anfärbung mit Hämatoxylin blau (siehe Abbildung 9), die digitale Färbung des CLSM-Scans führt ebenfalls zur Blaufärbung der Zellkerne (siehe Abbildung 10). Aufgrund der geringeren Auflösung im CLSM-Scan kann die Morphologie der Zellkerne mithilfe der ex vivo CLSM nicht ausreichend beurteilt werden. Im H&E-Schnitt können sich die Zellkerne der Tumorzellen eines Basalzellkarzinoms länglich und vergrößert zeigen.

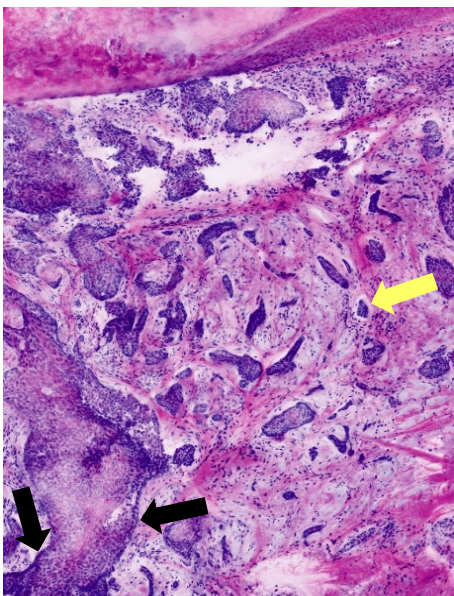


Abbildung 8: CLSM-Detailscan eines fibrosierenden, infiltrativ wachsenden Basalzellkarzinoms. Die Palisadenstellung der peripheren Tumorzellen ist im CLSM-Scan gut zu erkennen (schwarze Pfeile). Auch die Spaltbildung rund um das Tumorgewebe ist sichtbar (gelber Pfeil).

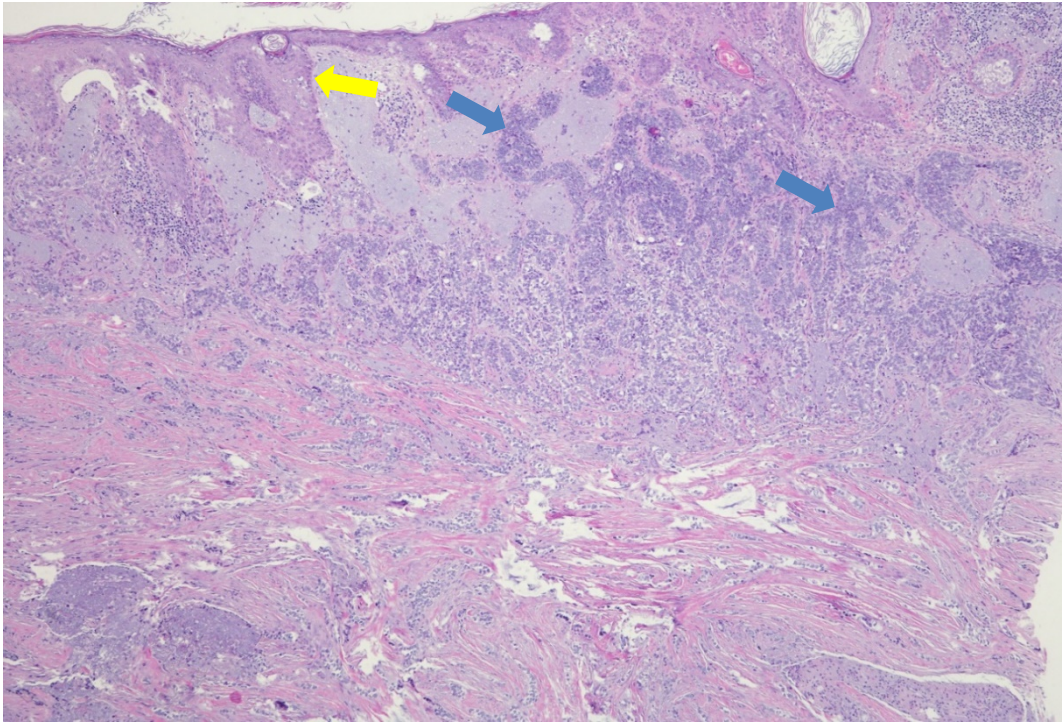


Abbildung 9: H&E-Schnitt eines fibrosierenden Basalzellkarzinoms, 40-fache Vergrößerung. Gut sichtbar sind die Tumorstränge, welche das Bindegewebe durchziehen (blaue Pfeile). Am Unterrand der Epidermis ist, etwas dunkler angefärbt, die Basalzellschicht zu erkennen (gelber Pfeil).

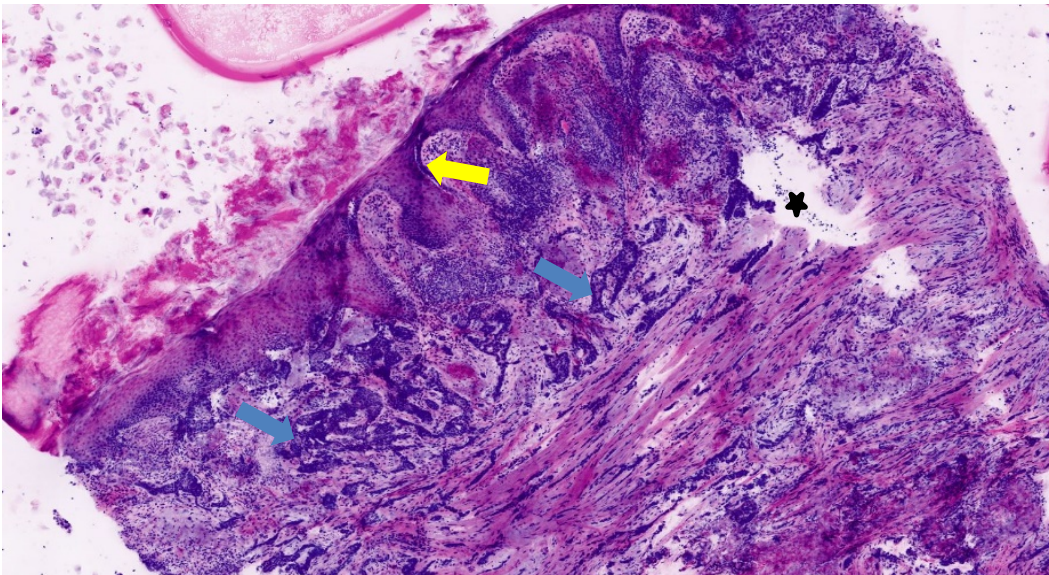


Abbildung 10: Übersichtsvergrößerung des CLSM-Scans aus Abbildung 9. Auch im CLSM-Scan sind schon bei niedriger Vergrößerung die Tumorstränge des Basalzellkarzinoms sichtbar (blaue Pfeile). Rechts oben außen wurde zu wenig Druck auf das Präparat aufgebracht, wodurch das Gewebe nicht vom Laser erfasst werden konnte (schwarzer Stern). Gut zu erkennen ist die Basalzellschicht der Epidermis, welche ebenfalls durch die großen, runden Zellkerne dunkel angefärbt ist (gelber Pfeil).

3.1.2 CLSM von melanozytären Läsionen

Während es bei der Darstellung von Basalzellkarzinomen wenig Abweichungen zwischen H&E-Färbung und CLSM-Scan gibt, ist die Erscheinung melanozytärer Läsionen im CLSM-Scan abweichend.

Das Melanin der Melanozyten erscheint im H&E-gefärbten Präparat braun (vergleiche Abbildung 12) und hebt sich dadurch vom restlichen, pink-blau gefärbten Gewebe ab. Im CLSM-Scan wird Melanin als Chromophor im Reflexionsmodus jedoch intensiv pink dargestellt (vergleiche Abbildung 11 sowie Abbildung 13) und ist dadurch nicht so schnell und einfach vom restlichen rosa Gewebe (u.a. Kollagen, Keratin) abzugrenzen. Dies kann die Diagnosestellung bei melanozytären Läsionen erschweren.

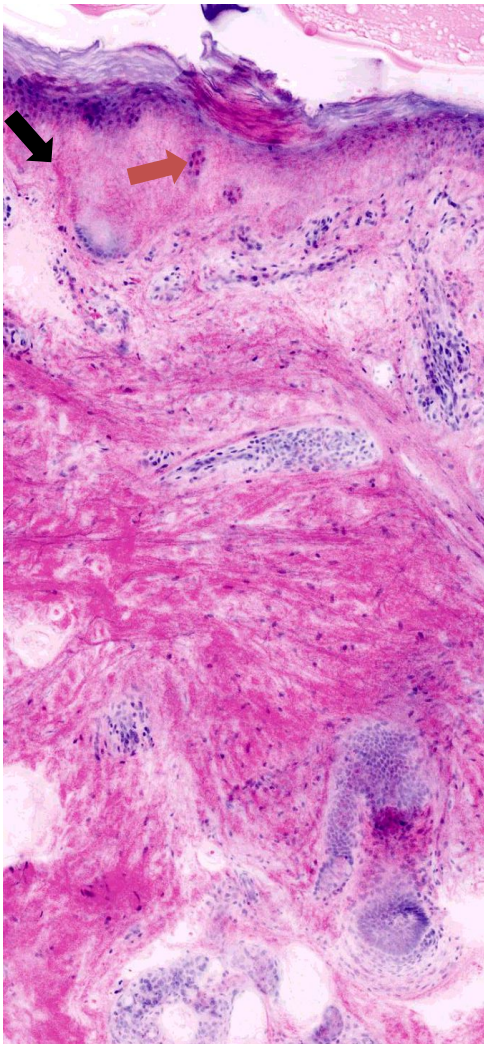


Abbildung 11: CLSM-Scan eines Melanoma in situ, SSM-Typ. Die Melanozyten erscheinen im CLSM-Scan grellpink (schwarzer Pfeil). Teilweise sind Melanozytennester zu erkennen (roter Pfeil). Die Zellform der Melanozyten lässt sich im CLSM-Scan aufgrund der fehlenden Auflösung nur schwer ausmachen.

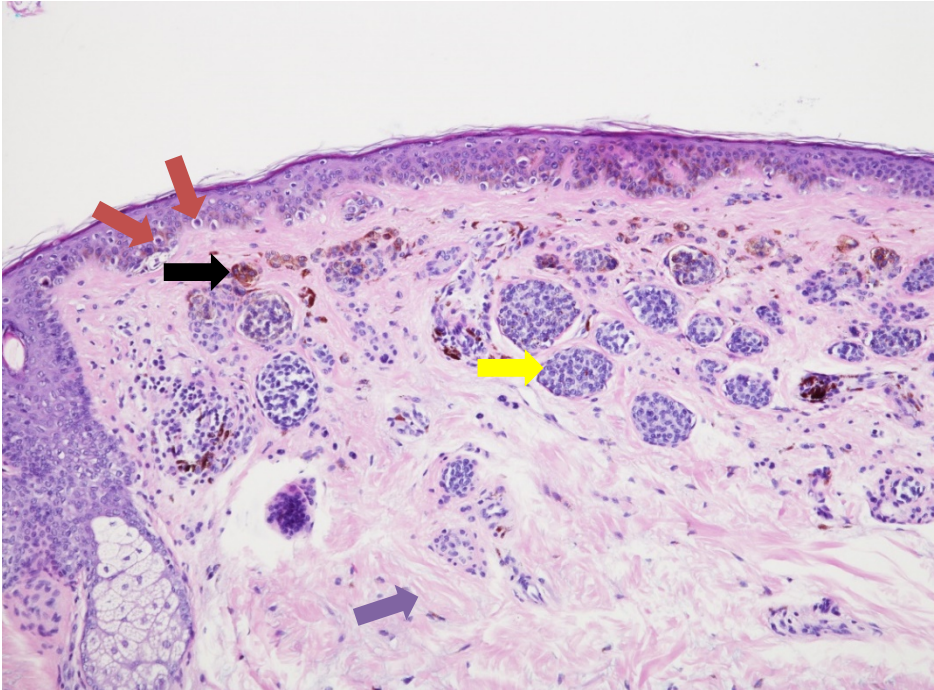


Abbildung 12: H&E-gefärbtes Präparat eines Compoundnaevus, 100-fache Vergrößerung. Junctional zeigen sich überwiegend einzelstehende, kleine Melanozyten. Diese zeigen auf Grund der fehlenden Zytokeratine im Zytoplasma ein Halo-artiges Retraktionsartefakt zum Zellkern (rote Pfeile). Dermal sind Melanozytennester zu sehen, apikal sind diese stark pigmentiert (schwarze Pfeile), zur Tiefe hin verliert sich die Pigmentierung (gelbe Pfeile) In der mittleren Dermis sind Kollagenfibrillen zu erkennen (lila Pfeil).

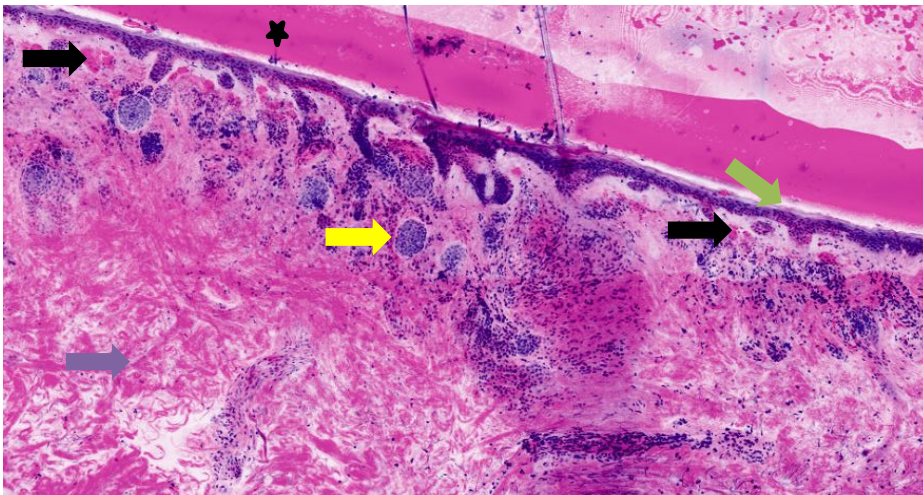


Abbildung 13: CLSM-Scan des Compoundnaevus aus Abbildung 12. Im CLSM-Scan stellen sich die apikalen, stark pigmentierten Melanozytennester (schwarzer Pfeil) im Gegensatz zur H&E-Färbung intensiv pink gefärbt dar, tiefer dermal gelegen zeigen sich die nicht-pigmentierten Melanozytennester (gelber Pfeil). Das Stratum corneum der Epidermis ist schräg angeschnitten (grüner Pfeil). Die Kollagenfibrillen färben sich im CLSM-Scan deutlich stärker an als im H&E-Schnitt (siehe lila Pfeil, vergleiche oberes Bild). Außerhalb des gescannten Gewebes wurde der Objektträger sowie Reste der Färbelösung mitgescannt, welche ebenfalls stark pink erscheinen, jedoch nicht zum Präparat an sich gehören (schwarzer Stern).

3.1.3 CLSM von Präparaten der allgemeinen Dermatologie

Die Präparate der allgemeinen Dermatologie umfassen eine Vielzahl an Diagnosen (vergleiche auch Tabelle 9).

Die Darstellung von Fett (z.B. in einem Lipom) unterscheidet sich im CLSM-Scan von der H&E-Färbung. Die Zellkerne werden stärker angefärbt und die Zellgrenzen sind deutlicher zu erkennen (vergleiche Abbildung 14 und Abbildung 15). Weitere Präparate der allgemeinen Dermatologie weisen eine hohe Übereinstimmung im CLSM-Scan mit dem H&E-gefärbten Präparat auf. Seborrhoische Keratosen (*Vv. seborrhoicae*) sind durch eine Hyperkeratose sowie Hyperpigmentierung gekennzeichnet. Gelegentlich sind auch Hornperlen sichtbar. Die Hyperkeratose ist im CLSM-Scan wie auch im H&E-gefärbten Präparat deutlich sichtbar, pigmentierte Melanozyten sind jedoch, wie bereits erwähnt, im CLSM-Scan durch die Darstellung in pink schwerer zu erkennen (vergleiche Abbildung 16 und Abbildung 17).

Die Plattenepithelkarzinome zeigten im CLSM-Scan genauso wie im H&E-gefärbten Schnitt eine deutliche Akanthose und teilweise Hornperlen (vergleiche Abbildung 18 und Abbildung 19). Die zwiebelschalenartige Schichtung der Hornperlen ist in der H&E-Färbung besser zu erkennen als im CLSM-Scan.

Entzündliche Infiltrate, also die Ansammlung von Lymphozyten, Histiozyten und Granulozyten im Gewebe, zeigen sich sowohl in der H&E-Färbung als auch in der CLSM blau gefärbt. Eine Differenzierung der Entzündungszellen gelingt auf Grund der geringeren Auflösung in der CLSM nur schwer (Abbildung 20 und Abbildung 21).

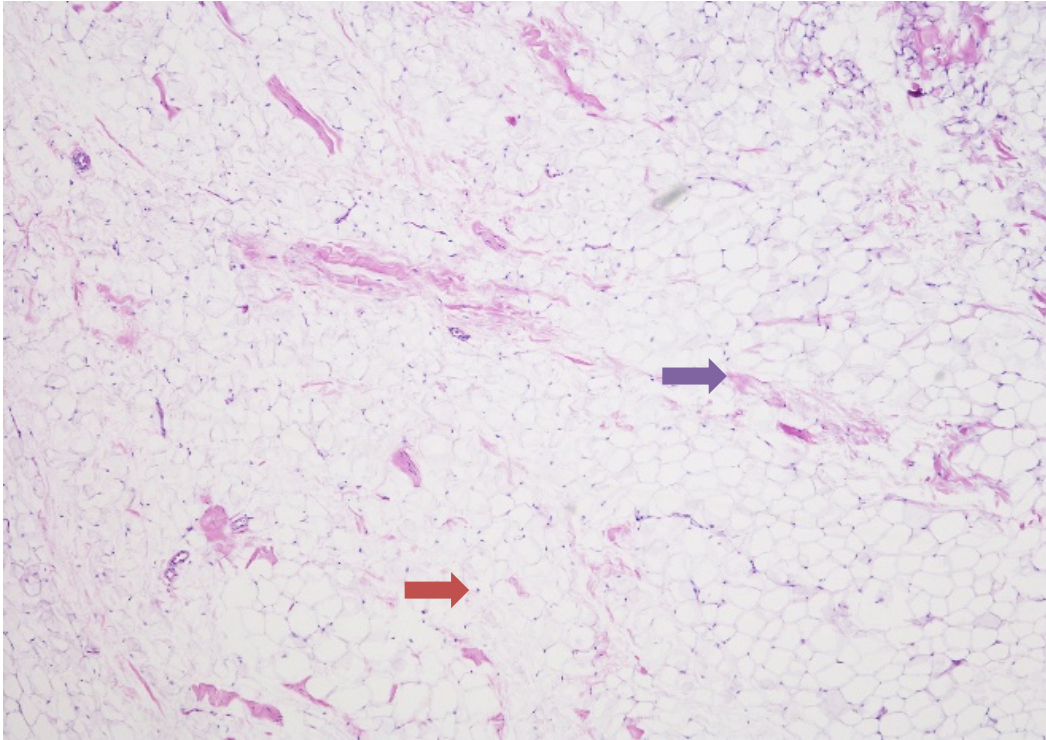


Abbildung 14: H&E-gefärbtes Präparat eines Lipoms, 40-fache Vergrößerung. Zwischen den Adipozyten ist Bindegewebe zu erkennen (lila Pfeil). Die Zellkerne der Adipozyten sind flach und am Rand lokalisiert (roter Pfeil). Die Zellgrenzen sind in der H&E-Färbung spärlich angefärbt nur schwach zu erkennen.

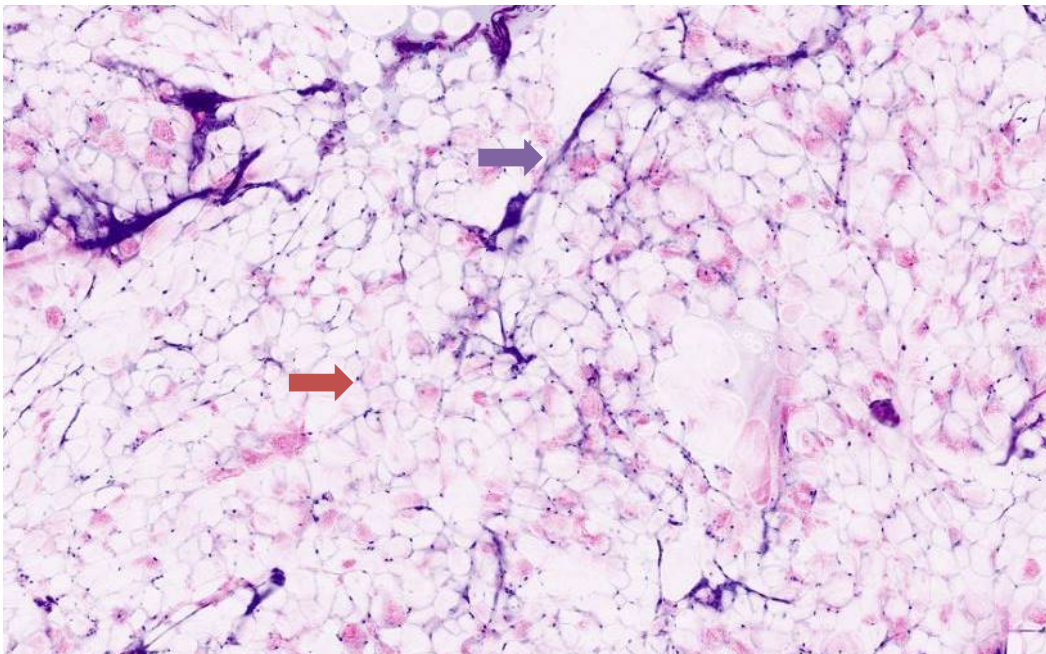


Abbildung 15: CLSM-Scan des Lipoms aus Abbildung 14. Auch hier ist Bindegewebe zwischen den Adipozyten zu erkennen, welches sich im Vergleich zum H&E-gefärbten Schnitt deutlich stärker anfärbt (lila Pfeil). Die exzentrisch gelegenen Zellkerne sind intensiver angefärbt (roter Pfeil). Die Zellgrenzen zwischen den Adipozyten sind im Vergleich zum H&E-gefärbten Schnitt aus Abbildung 14 deutlicher zu erkennen.

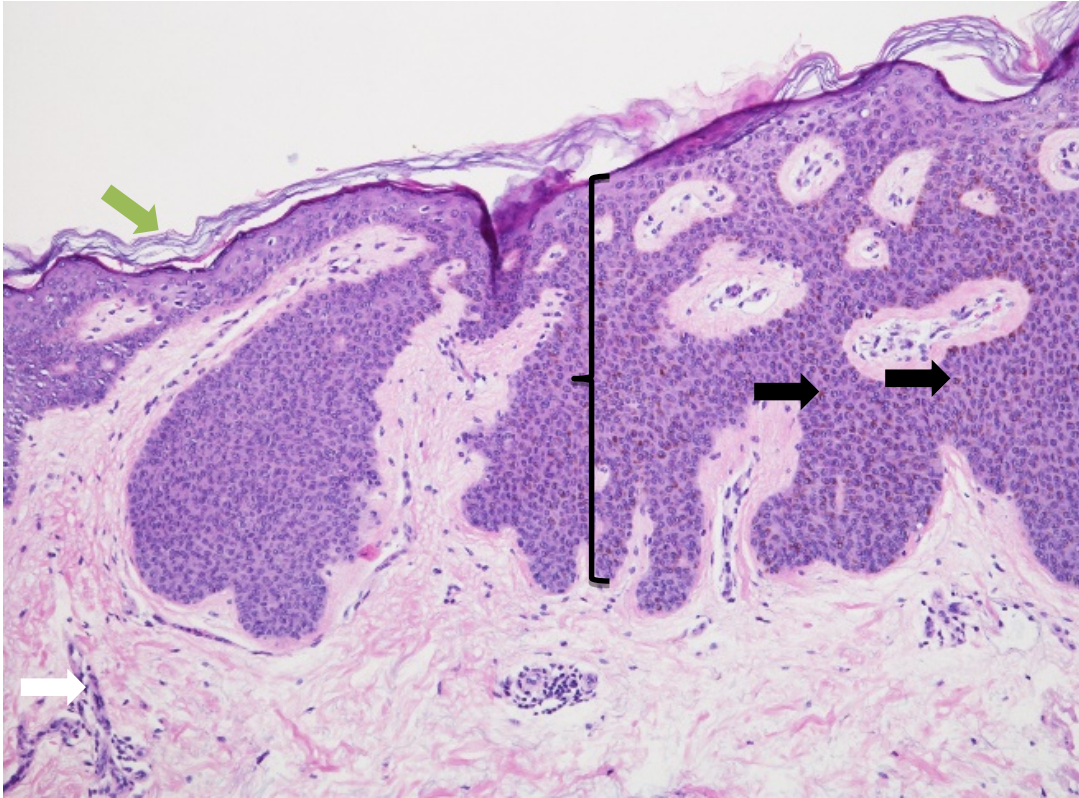


Abbildung 16: H&E-gefärbtes Präparat einer V. seborrhoica, 100-fache Vergrößerung. Zu sehen ist die Akanthose (geschwungene Klammer) sowie das braun erscheinende Melanin der pigmentierten Keratinozyten (schwarze Pfeile). Der weiße Pfeil zeigt auf ein Gefäß, apikal ist das Stratum corneum zu sehen (grüner Pfeil).

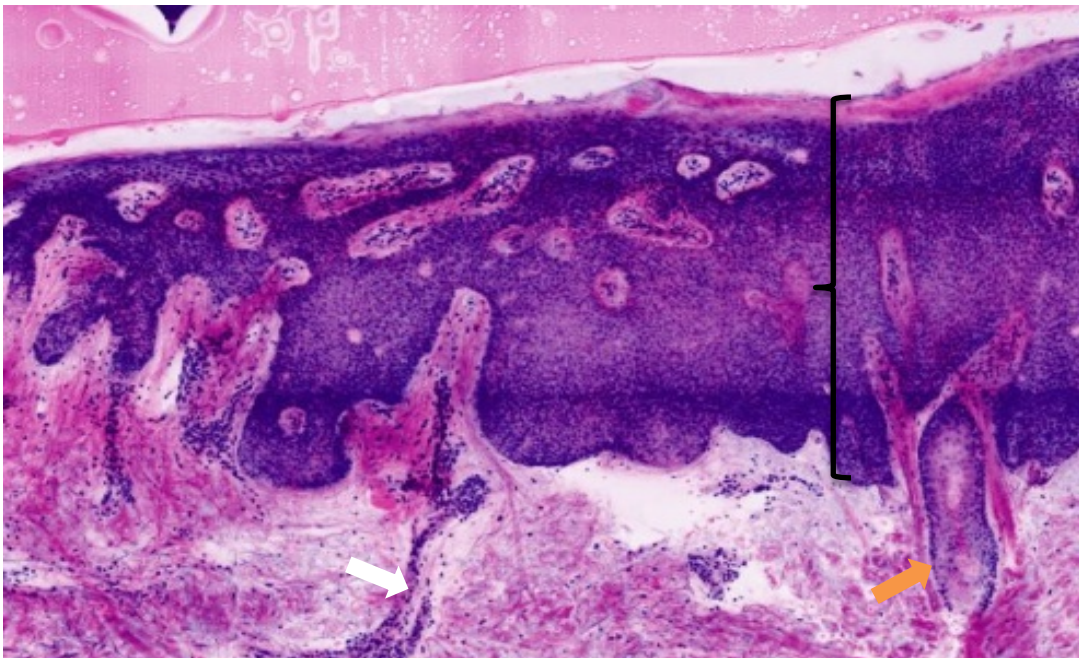


Abbildung 17: CLSM-Scan der V. seborrhoica aus

Abbildung 16. Auch hier zeigt sich eine ausgeprägte Akanthose (geschwungene Klammer). Auch im CLSM-Scan sind Blutgefäße zu erkennen (weißer Pfeil). Unten rechts ist ein Haarfollikel zu sehen (orangener Pfeil).

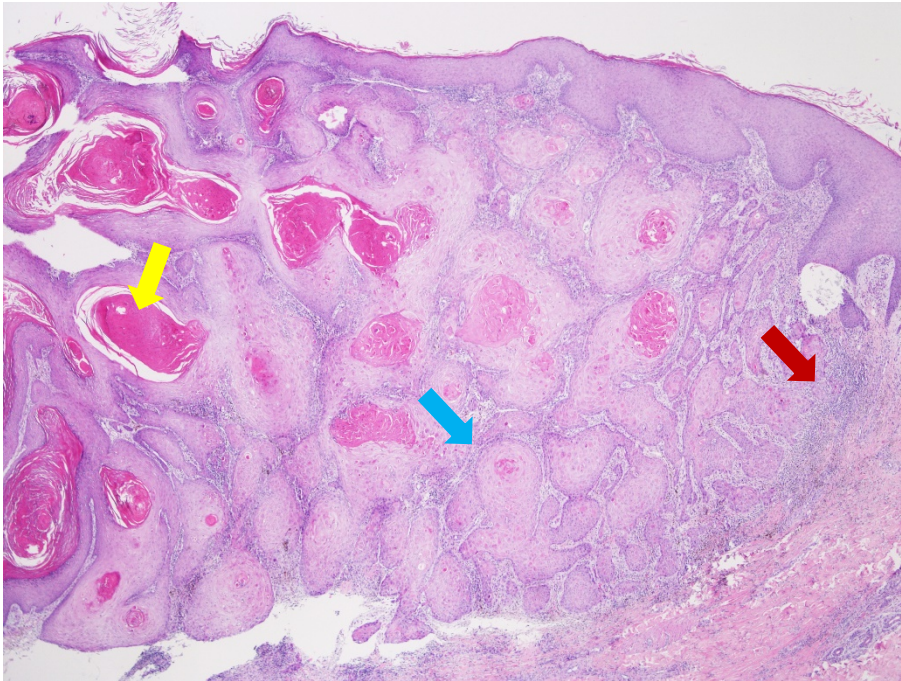


Abbildung 18: H&E-gefärbtes Präparat eines hochdifferenzierten PEKs, 20-fache Vergrößerung.
 Es finden sich infiltrativ wachsende Nester atypischer Keratinozyten (blauer Pfeil).
 Diese zeigen zentral zahlreiche Hornperlen (gelber Pfeil). Begleitend findet sich ein
 lymphozytäres Infiltrat (roter Pfeil).

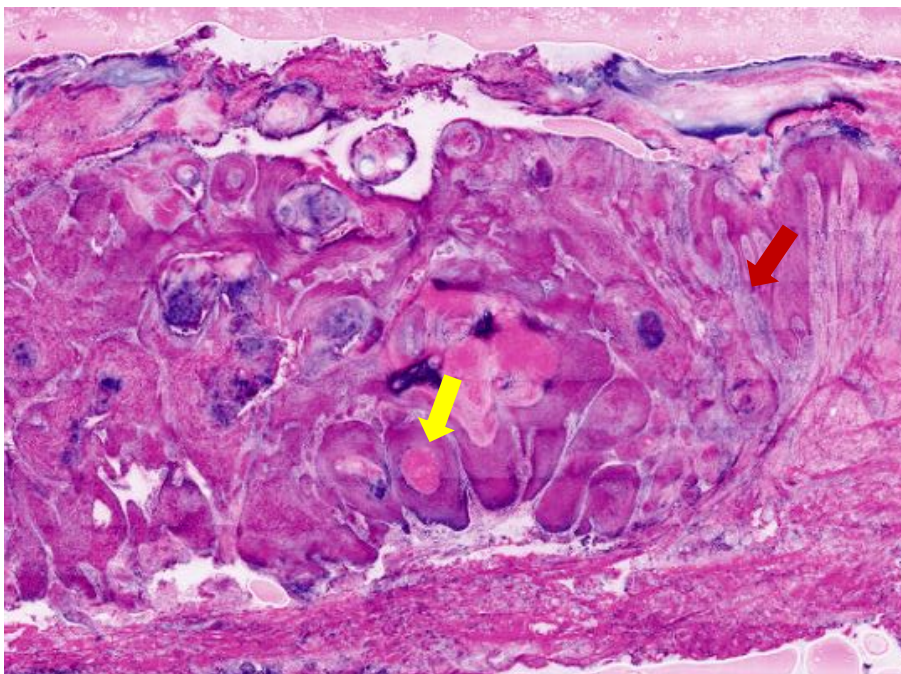


Abbildung 19: CLSM-Scan des hochdifferenzierten PEKs aus Abbildung 18. Auch im
 CLSM-Scan zeigen sich infiltrative Nester atypischer Keratinozyten mit zahlreichen
 Hornperlen (gelber Pfeil) sowie lymphozytäres Infiltrat (roter Pfeil).

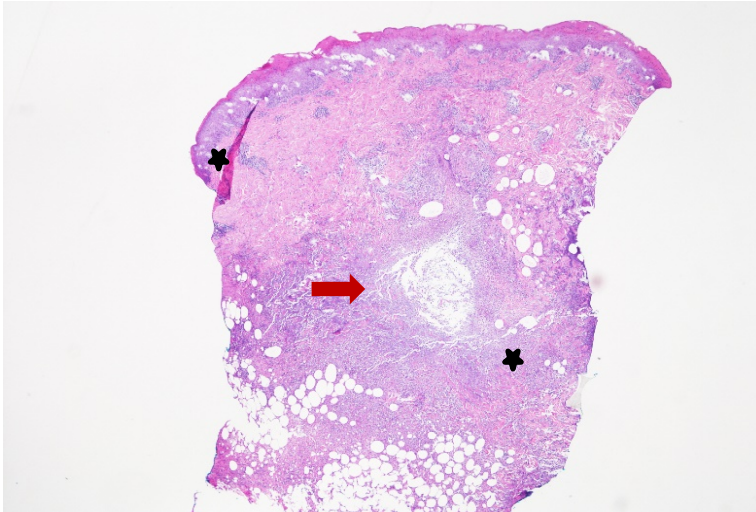


Abbildung 20: H&E-gefärbtes Präparat eines Abszesses (halbierte Stanze), 20-fache Vergrößerung. Tief dermal gelegen findet sich eine neutrophilenreiche Entzündungsreaktion, begleitend auch lymphozytäre und histiozytäre Infiltrate (roter Pfeil), ganz unten ist univakuoläres Fettgewebe zu sehen. Aufgrund des Einbettens in Paraffin ist es zu Artefakten (Überlagerungen und Rissbildung) im Präparat gekommen (schwarze Sterne).

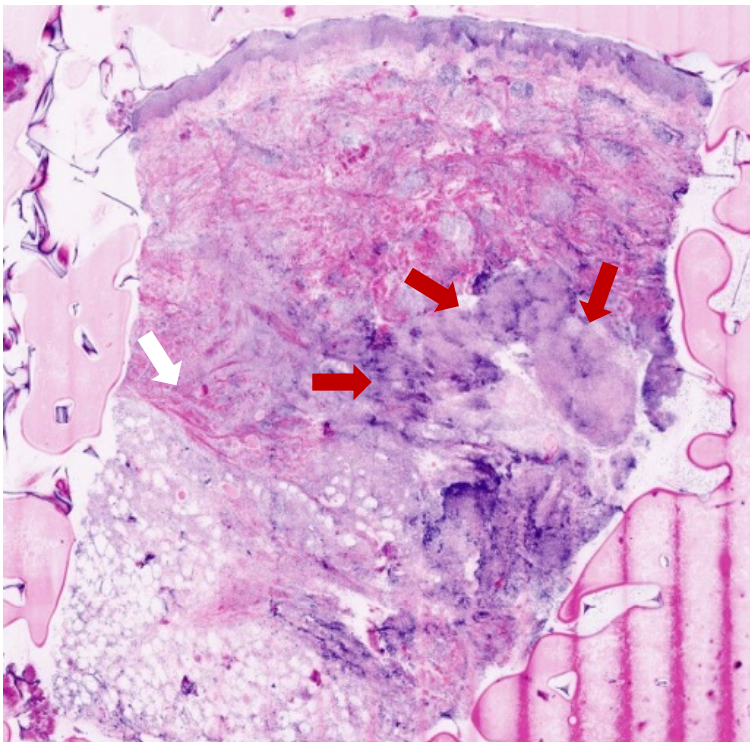


Abbildung 21: CLSM-Scan des Abszesses aus Abbildung 20. In der tiefen Dermis finden sich entzündliche Infiltrate (rote Pfeile), ganz unten ist univakuoläres Fettgewebe zu sehen. Auch ein Gefäßbaum ist zu erkennen (weißer Pfeil).

3.1.4 Darstellung weiterer Hautstrukturen im CLSM-Scan

Im Folgenden wird ein Überblick über die Darstellung allgemeiner Strukturen der gesunden Haut im CLSM-Scan gegeben.

3.1.4.1 Gefäße

Gefäße sind im CLSM-Scan gut zu erkennen. Die Zellkerne der Endothelzellen sind dunkelblau gefärbt, die Gefäße sind häufig von kollagenen Fasern umgeben (vergleiche Abbildung 22 und Abbildung 23). Je nach Schnittführung kann eine Aufsicht auf die Zellen des Endothels möglich sein oder das Lumen eröffnet sein (im Quer- oder Längsschnitt).

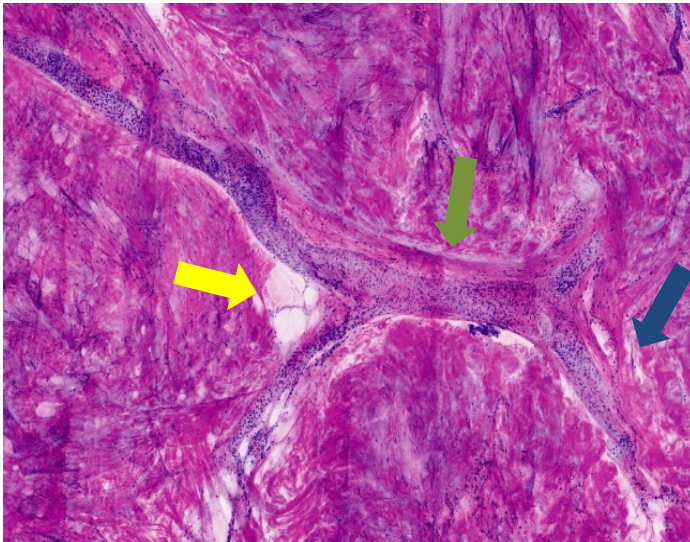


Abbildung 22: Darstellung eines Gefäßbaums in einem CLSM-Scan. Das Epithel des Gefäßes ist angeschnitten, das Lumen jedoch nicht eröffnet. Die Zellkerne sind dunkel angefärbt. Das Gefäß ist von kollagenen Fasern (blauer Pfeil) sowie teilweise auch Fettgewebe (gelber Pfeil) umgeben. Parallel zum Gefäß verläuft ein Nerv (grüner Pfeil, vergleiche auch

Abbildung 24)

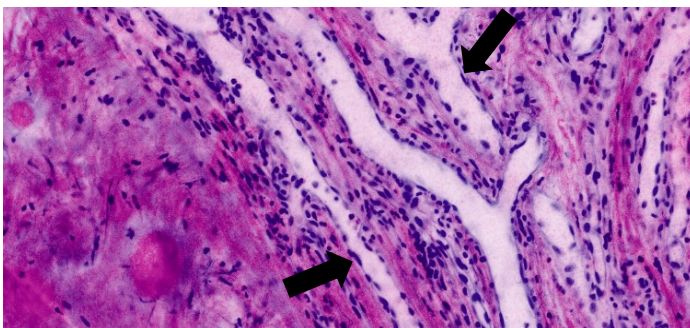


Abbildung 23: Darstellung von Gefäßen in einem CLSM-Scan. Das Lumen ist eröffnet, die flachen, dunkel angefärbten Zellkerne des Endothels sind randständig zu erkennen (schwarze Pfeile).

3.1.4.2 Nerven

Auch periphere Nerven sind im CLSM-Scan sichtbar. In der Haut folgen die Nerven häufig dem Verlauf der Gefäße (vergleiche Abbildung 24, sogenannter „Gefäß-Nerven-Strang“). Der Nerv ist von mehreren Lamellen flacher Zellen umgeben, deren längliche Kerne sich im CLSM-Scan dunkelblau färben. Die Lamellen sind teilweise im CLSM-Scan als längliche Streifung zu erkennen. Das Zytoplasma erscheint hell-pink, der Nerv ist in das Bindegewebe der Haut eingebettet.

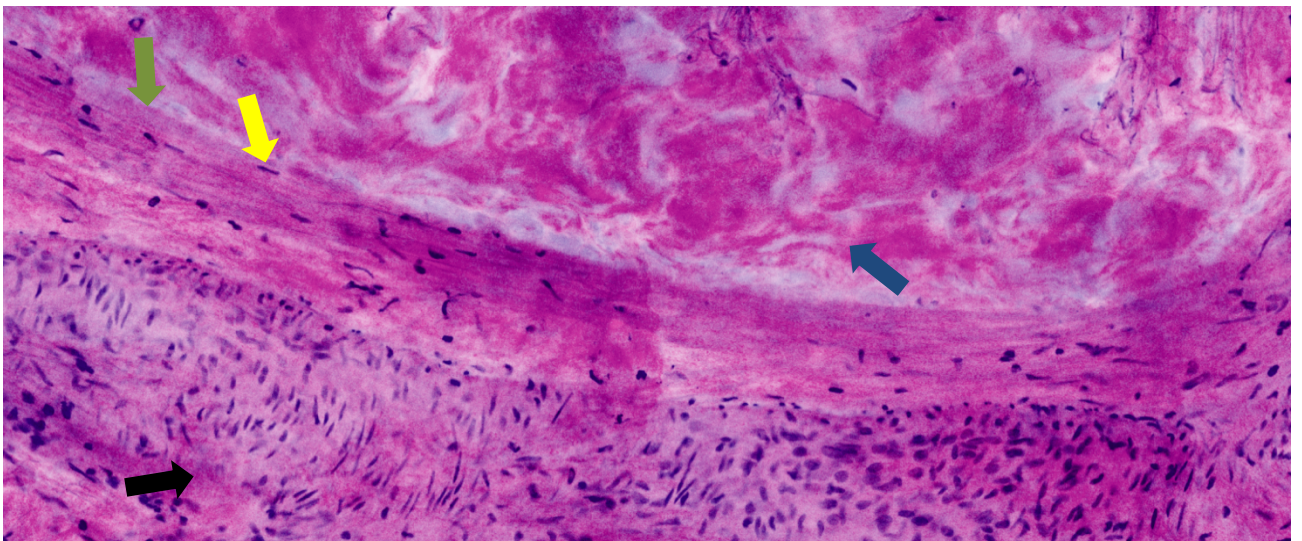


Abbildung 24: Ausschnitt eines CLSM-Scans. Ein Nerv (grüner Pfeil) verläuft parallel zu einem Gefäß (schwarzer Pfeil). Der Nerv ist von mehreren Lamellen flacher Zellen umgeben, welche einen länglichen Zellkern aufweisen (gelber Pfeil), welcher dunkel gefärbt ist. Um den Nerv findet sich Bindegewebe (blauer Pfeil), welches den Nerv schützt.

3.1.4.3 Muskelgewebe

Im Gegensatz zu Nerven und Gefäßen entspricht die Anfärbung von Muskelgewebe im CLSM-Scan nicht dem H&E-Schnitt (vergleiche Abbildung 25 und Abbildung 26). Während sich im H&E-Schnitt Muskelgewebe rot färbt, erscheint es in der CLSM blau. Die randständigen Zellkerne sind sowohl in der H&E-Färbung als auch im CLSM-Scan gut zu erkennen und blau angefärbt.

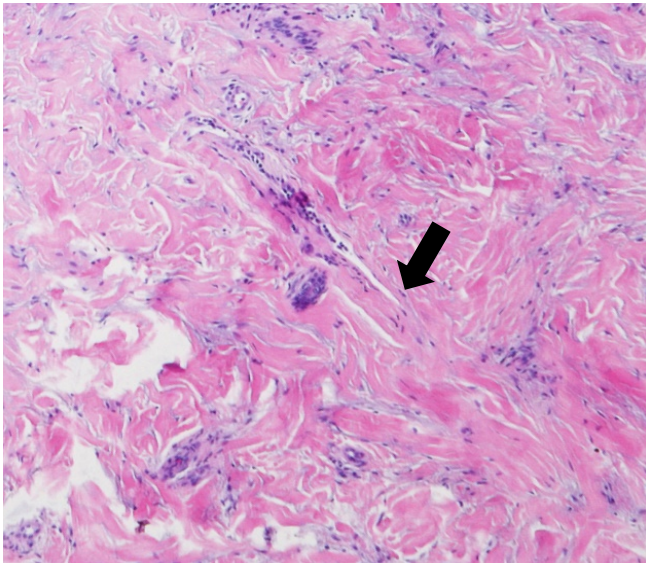


Abbildung 25: Ausschnitt eines H&E-gefärbter Schnitts, 40-fache Vergrößerung. Die einzelnen Muskelfasern färben sich rot an. Randständig sind in blau die Kerne zu erkennen (schwarzer Pfeil).

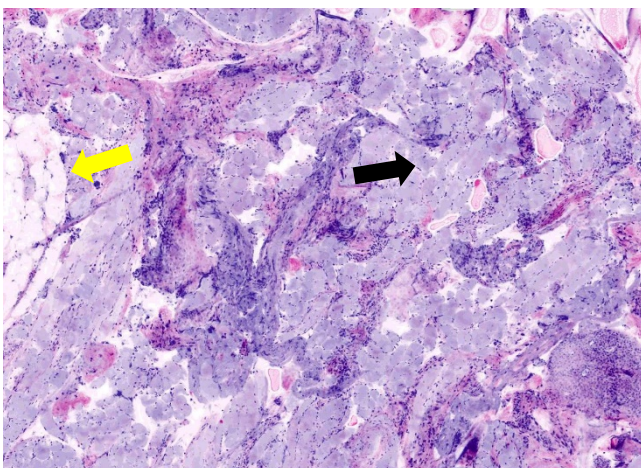


Abbildung 26: Ausschnitt eines CLSM-Scans. Darstellung von Muskelfasern in hellblau. Die Zellkerne sind dunkelblau gefärbt (schwarzer Pfeil). Links ist Fettgewebe zu erkennen (gelber Pfeil).

3.1.4.4 Elastischer Knorpel

Im Rahmen der Studie wurde ein Teil des elastischen Knorpels der Ohrmuschel bei einem Patienten entnommen. In diesem sind sowohl die Chondrozyten als auch die elastischen Fasern gut zu sehen (vergleiche Abbildung 27). Die Zellkerne der Chondrozyten sind blau gefärbt, während das Zytoplasma hell gefärbt ist.

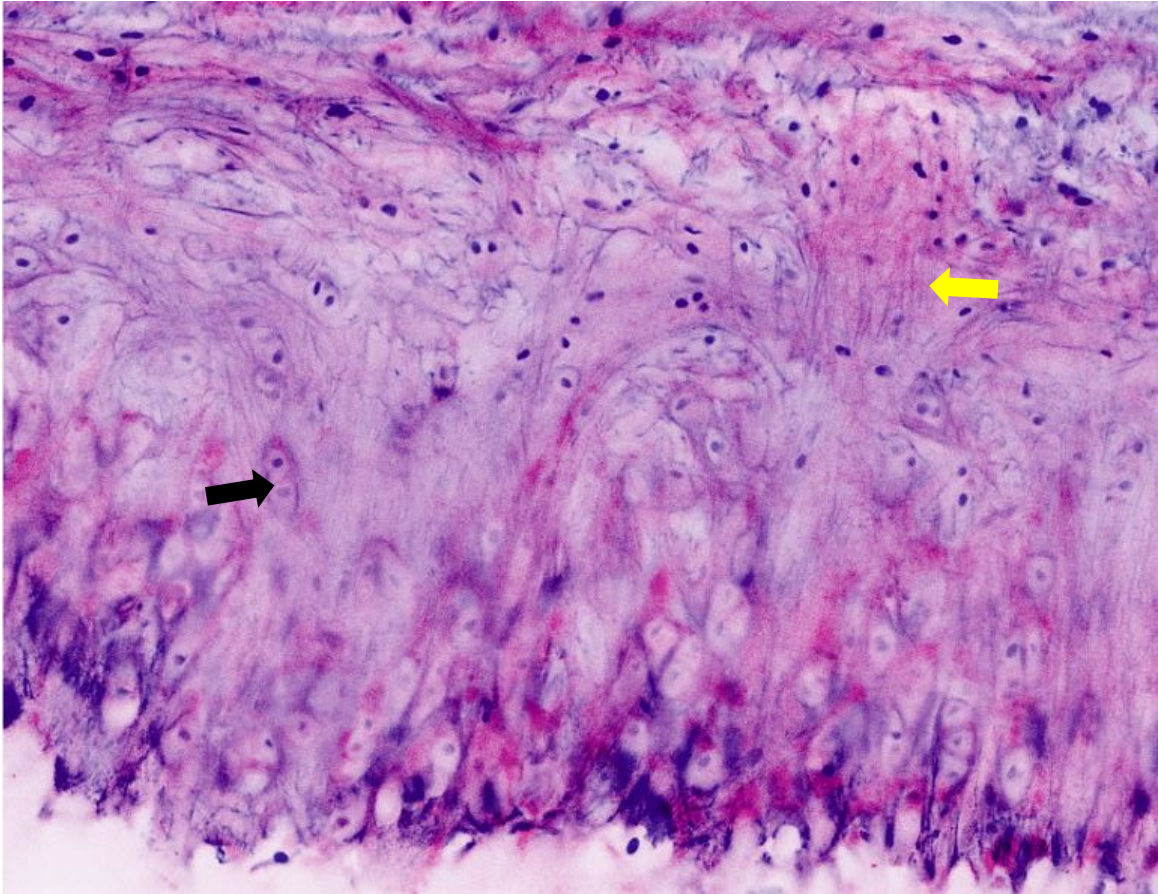


Abbildung 27: Ausschnitt eines CLSM-Scans mit Darstellung von elastischem Knorpel. Zu sehen sind die Chondrozyten (schwarzer Pfeil) sowie die dunkel angefärbten elastischen Fasern (gelber Pfeil).

3.1.4.5 Ekkrine Schweißdrüsen

Sowohl die ekkrinen Schweißdrüsenendstücke als auch die Ausführungsgänge sind im CLSM-Scan deutlich zu erkennen. Die Schweißdrüsenendstücke sind wie in der HE-Färbung stark aufgeknäult (vergleiche Abbildung 28). Daher erkennt man im CLSM-Scan, bedingt durch die Schnitfführung, häufig viele Anschnitte des Ganges dicht nebeneinander. Meist sind die Schweißdrüsenendstücke von Fettgewebe umgeben. Neben myoepithelialen Zellen gibt es zwei verschiedene sekretorische Zellarten innerhalb der ekkrinen Schweißdrüsen, seröse und muköse Zellen. Die serösen Zellen zeigen sich im CLSM-Scan wie auch im H&E-gefärbten Schnitt hellgefärbt, wohingegen die mukösen Zellen jeweils dunkler gefärbt sind.

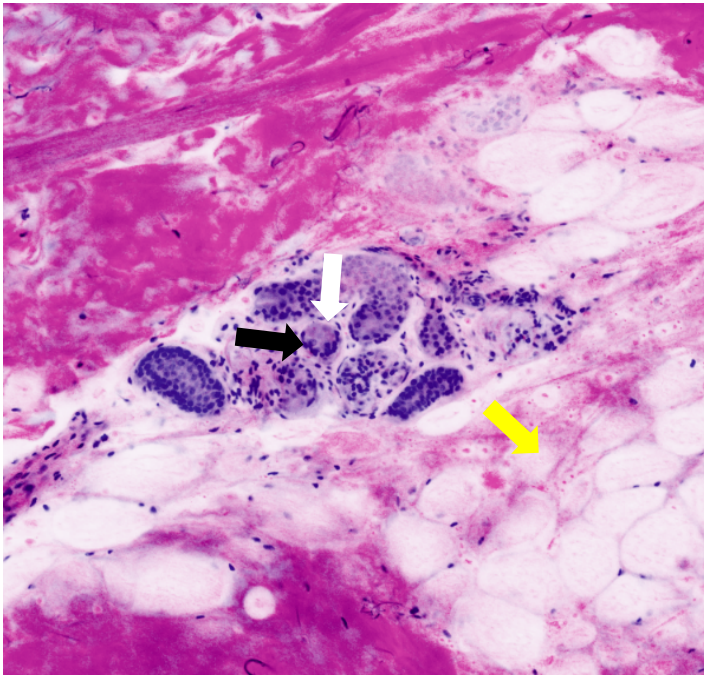


Abbildung 28: Ausschnitt eines CLSM-Scans mit Darstellung eines ekkrinen Schweißdrüsenendstücks. Der Gang ist mehrfach angeschnitten. Zu sehen sind sowohl helle, seröse Zellen (weißer Pfeil) als auch dunkle, muköse Zellen (schwarzer Pfeil). Die Drüse ist von Fettgewebe umgeben (gelber Pfeil).

Die Endstücke ekkriner Schweißdrüsen verlaufen gerade und nicht mehr geknäult. Sie durchziehen Dermis sowie Epidermis und enden auf der Haut. Das Epithel ist kubisch und zweireihig (vergleiche Abbildung 29).

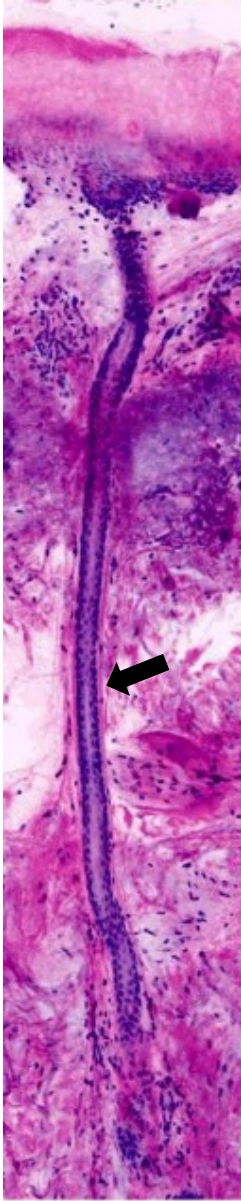


Abbildung 29: Ausschnitt eines CLSM-Scans mit Darstellung eines Ausführungsganges einer ekkrinen Schweißdrüse. Der Gang verläuft nicht mehr geknäult, sondern gerade durch Dermis und Epidermis. Das Epithel ist kubisch, die Zellen sind im CLSM-Scan stark dunkel angefärbt (schwarzer Pfeil).

3.1.4.6 Haarfollikel

Haare und Haarfollikel sind im CLSM-Scan gut zu erkennen. Das Melanin färbt sich im CLSM-Scan pink und nicht, wie in der H&E-Färbung, braun (siehe Abbildung 30).

Im Haarbulbus sind die verschiedenen Schichtungen zu erkennen. Zentral befindet sich das Haar, welches intensiv pink gefärbt ist. Teilweise sind noch einzelne Zellkerne von Zellen zu erkennen, welche noch nicht verhornt sind. Um das Haar ist die Wurzelscheide mit verschiedenen Schichtungen zu erkennen.

Umhüllt wird das Haar von einer bindegewebigen Schicht. Ebenfalls häufig neben einem Haarfollikel zu finden sind Talgdrüsen sowie der M. arector pili.

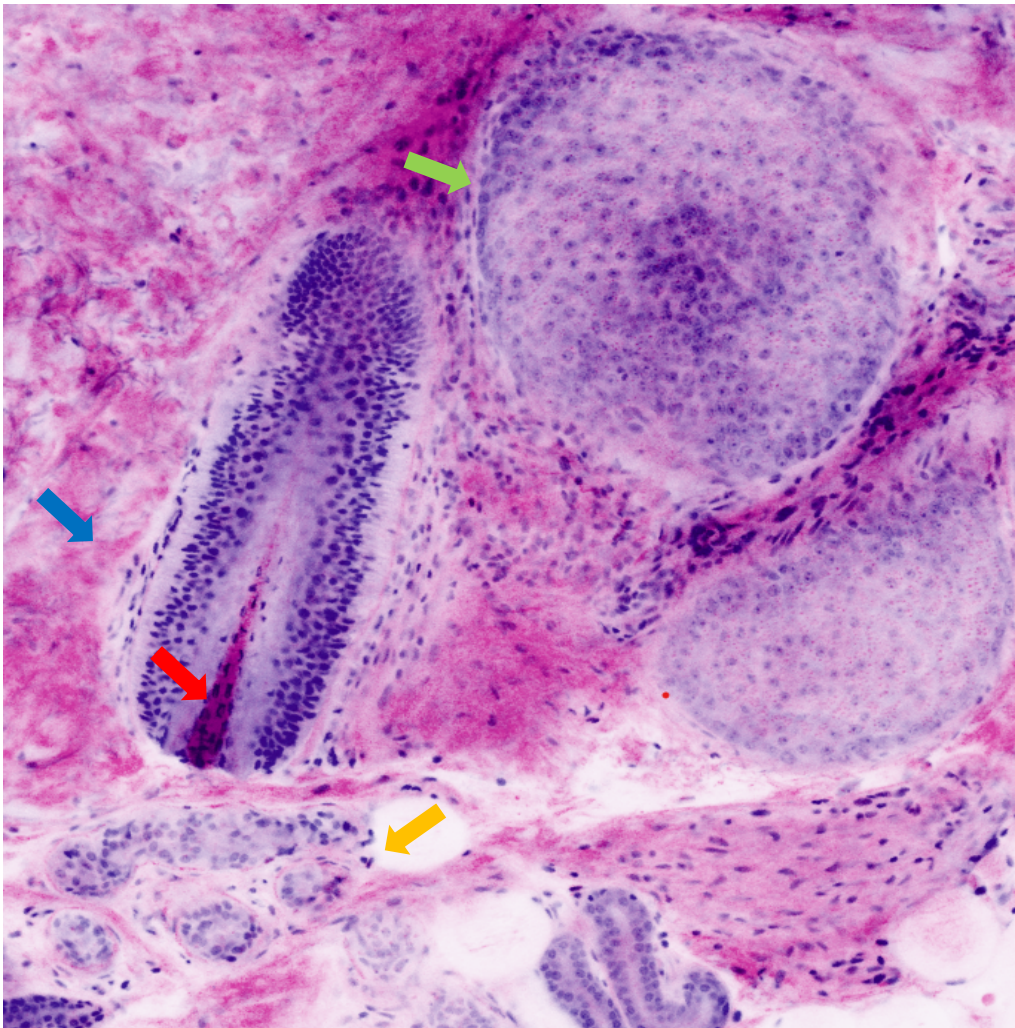


Abbildung 30: Ausschnitt eines CLSM-Scans mit Haarfollikel, Talgdrüse und ekkriner Schweißdrüse. Der Haarfollikel zeigt den Haarschaft (roter Pfeil), die epitheliale Wurzelscheide sowie das umgebende Bindegewebe (blauer Pfeil). Rechts neben dem Haarfollikel ist eine Talgdrüse (grüner Pfeil), unterhalb des Haarfollikels eine Schweißdrüse (orangener Pfeil) zu sehen. Der M. arector pili ist auf diesem Scan nicht dargestellt.

3.1.4.7 Talgdrüsen

Talgdrüsen sind in Läppchen gegliedert und meist assoziiert an Haarfollikeln zu finden (vergleiche Abbildung 31). Peripher sind die Zellen noch klein und haben einen, im Verhältnis zum Zytoplasma, großen Zellkern. Diese peripheren Zellen erscheinen dunkelblau. Nach zentral nimmt die Größe des Zellkerns relativ zum Zytoplasma ab. Die zentralen Zellen erscheinen daher heller und haben nur noch einen kleinen Zellkern.

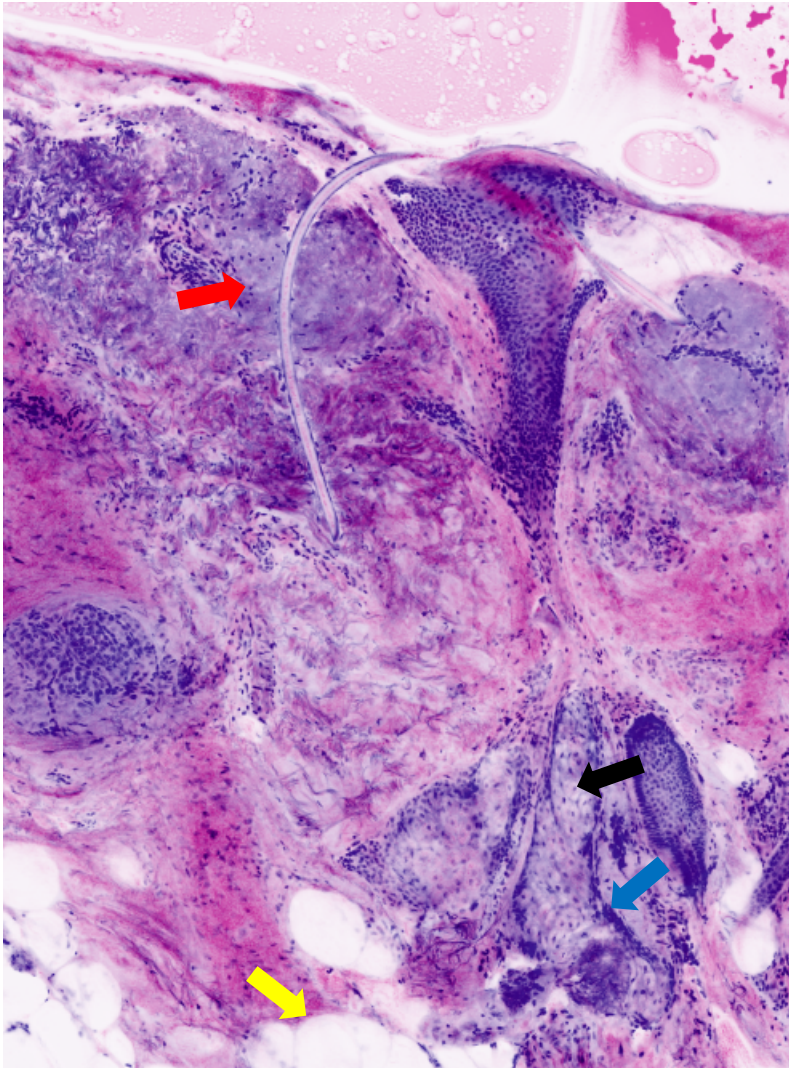


Abbildung 31: Ausschnitt eines CLSM-Scans mit Darstellung einer Talgdrüse. Die Talgdrüse ist in Läppchen gegliedert. Die peripheren Zellen erscheinen dunkelblau (blauer Pfeil), die zentralen Zellen erscheinen durch die Lipidvakuolen heller und haben mittig den Zellkern (schwarzer Pfeil). Unterhalb der Epidermis zeigt sich aufgrund des Lichtschadens eine ausgeprägte solare Elastose (roter Pfeil), die Talgdrüse ist von Fettgewebe (gelber Pfeil) umgeben.

3.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte aufgeteilt in die drei Fragestellungen.

3.2.1 Basalzellkarzinome

Insgesamt wurden 335 Präparate der Fragestellung 1 (Basalzellkarzinome) zugeordnet. Das Präparat eines Probanden konnte aufgrund von technischen Problemen nicht in die Auswertung aufgenommen werden. Somit wurden 334 Präparate in die Auswertung eingeschlossen.

176 Präparate stammten von männlichen Probanden, 158 Präparate von weiblichen Probandinnen. Die Probandinnen und Probanden waren im Mittel 67,57 Jahre alt bei einem Minimum von 37 Jahren und einem Maximum von 89 Jahren.

Die häufigste Lokalisation der Läsionen war mit 26,3 % die Nase, gefolgt von Stirn/Schläfe mit 22,94%.

181 Präparate dienten der Randkontrolle (Quadranten oder Randschnitte). In der überwiegenden Zahl der Fälle handelte es sich bei den Randschnitten um gezielte Nachexzisionen nach vorausgegangenem Biopsien oder Exzisionen. 153 Präparate waren Tumormitten, halbierte Stenzen oder Basen.

204 der 334 Präparate waren tumorfrei. Die gesicherten BZK-Diagnosen wurden weiter unterteilt in Basalzellkarzinom-Subtypen (vergleiche auch Tabelle 2). Es fanden sich folgende Subtypen: 3 pigmentierte, adenoide oder keratotische BZKs, 67 BZKs konnten dem soliden oder superfiziell-soliden Typ zugeordnet werden, 28 mal wurde ein superfizielles BZK gefunden, 13 BZKs waren fibrosierend und 17 BZKs waren schmalsträngig/infiltrativ beziehungsweise kleinknospig. Des Weiteren wurden zwei Präparate eines Angiofibroms in die erste Fragestellung eingeschlossen, da dieses nach den klinischen Angaben verdächtig war auf ein BZK.

Bei der Auswertung galt ein Präparat immer dann als richtig positiv befundet, wenn ein in der H&E-Histologie vorliegendes BZK auch im Scan als BZK erkannt wurde. Die Bewertung als richtig positiv erfolgte unabhängig von der

Klassifizierung des Subtyps. Wurde eine andere Läsion erkannt, beispielsweise ein PEK oder eine melanozytäre Läsion, so wurde der Befund als falsch positiv gewertet.

Als richtig negativ wurde jedes Präparat gewertet, welches in der H&E-Histologie tumorfrei war und in der CLSM ebenfalls als tumorfrei bewertet wurde.

Tabelle 2: Übersicht über die Diagnosen und Subtypen der Fragestellung 1: Basalzellkarzinome

Diagnose / Subtyp	Häufigkeit
Tumorfrei / "normale" Haut	204
Pigmentiertes, adenoides oder keratotisches BZK	3
Superfiziell-solides oder solides BZK	67
Superfizielles BZK	28
Fibrosierendes BZK	13
Schmalsträngig / infiltratives bzw. Kleinknospiges BZK	17
Angiofibrom	2
Gesamt	334

Die Dermatopathologin A gab in 72,8% der Fälle eine hohe Sicherheit bei der Befundung an, in 27,2% war sie sich unsicher. Der Dermatopathologe B gab bei der Befundung in 79,9% der Fälle an, sich bei der Befundung sicher zu sein, in 20,1% war er sich unsicher.

A benotete die Qualität der Bilder im Schnitt mit einer Schulnote von 2,31 (Minimum: 1, Maximum: 6), B mit einer Schulnote von 2,46 (Minimum: 1, Maximum:5)

A gab im Mittel an, dass 75,91% der Epidermis auf den Scans abgebildet wäre (Median: 90%). B gab im Mittel an, dass 73,96% der Epidermis abgebildet wäre (Median: 80%).

Die Präparate waren im Schnitt 13,5mm lang und 7,3mm breit. Im Durchschnitt betrug die Größe der gescannten Präparate 79,85mm² (Median: 60,3 mm²).

Die Zeit zur Erstellung der Scans betrug im Mittel 7,97 Minuten (Median = 6 Minuten). Das Minimum lag bei einer Minute, für die längste Erstellung eines Scans wurden 35 Minuten benötigt. Es traten bei 12,62% der Präparate technische Probleme bei der Erstellung der Scans auf.

Für die Befundung benötigte A im Schnitt 26,56 Sekunden (Minimum 5 Sekunden, Maximum 200 Sekunden; Median 20 Sekunden), B benötigte im Mittel 45,96 Sekunden (Minimum 15 Sekunden, Maximum 210 Sekunden; Median 42,5 Sekunden), siehe auch Tabelle 3.

Tabelle 3: benötigte Zeit für die Befundung der Scans der Fragestellung 1 (BZK) durch Dermatopathologin A und Dermatopathologe B

		Zeit A	Zeit B
N	Gültig	334	334
	Fehlend	0	0
Mittelwert		26,56	45,96
Standardfehler des Mittelwerts		1,140	1,108
Median		20,00	42,50
Std.-Abweichung		20,827	20,242
Varianz		433,755	409,740
Minimum		5	15
Maximum		200	210
Perzentile	25	10,00	30,00
	50	20,00	42,50
	75	30,00	60,00

A erreichte eine Sensitivität von 59,5% (95%KI= [50,20; 68,33%]) und eine

Spezifität von 94,79% (95%KI= [90,86%; 97,37%]) (siehe Tabelle 4). B erreichte eine Sensitivität von 71,09% (95% Konfidenzintervall KI= [62,42%;78,76%]) und eine Spezifität von 89,81% (95%KI= [84,84%; 93,58%]), vergleiche Tabelle 5.

Die Interrater-Reliabilität der H&E-Histologie Diagnosen von A und B war bei kappa= 0,891. Dies entspricht einer beinahe perfekten Übereinstimmung.

Die Interrater-Reliabilität der CLSM-Diagnosen von A mit der H&E-Diagnose lag bei kappa = 0,440. Nach Landis und Koch (1977) entspricht dies einer moderaten Übereinstimmung.

Die Interrater-Reliabilität der CLSM-Diagnosen von B mit der H&E-Diagnose lag bei kappa = 0,558. Nach Landis und Koch (1977) entspricht dies einer moderaten Übereinstimmung.

Tabelle 4: Übersicht über die diagnostische Genauigkeit von Dermatopathologin A für die Fragestellung 1: Basalzellkarzinome

Dermatopathologin A	Wert	95% Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Sensitivität	59.50%	50.20% ^a	68.33% ^a
Spezifität	94.79%	90.86% ^a	97.37% ^a
Accuracy	81.93%	77.36% ^a	85.92% ^a
Positive Likelihood Ratio	11.41	6.30 ^b	20.67 ^b
Negative Likelihood Ratio	0.43	0.34 ^b	0.53 ^b
Prävalenz	36.45%	31.39% ^c	41.71% ^c
Positive Predictive Value	86.75%	78.38% ^c	92.89% ^c
Negative Predictive Value	80.32%	75.10% ^c	84.93% ^c

^a Exakte Clopper-Pearson-Konfidenzintervalle nach Clopper & Pearson (1934)

^b „Log method“ - Konfidenzintervalle nach Altman et al. (2000)

^c Profile-Likelihood-Konfidenzintervall nach Venzon & Moolgavkar (1988)

Tabelle 5: Übersicht über die diagnostische Genauigkeit von Dermatopathologie B für die Fragestellung 1: Basalzellkarzinome

Dermato- pathologie B	Wert	95% Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Sensitivität	71.09%	62.42% ^a	78.76% ^a
Spezifität	89.81%	84.84% ^a	93.58% ^a
Accuracy	82.63%	78.14% ^a	86.54% ^a
Positive Likelihood Ratio	6.97	4.58 ^b	10.62 ^b
Negative Likelihood Ratio	0.32	0.24 ^b	0.42 ^b
Prävalenz	38.32%	33.21% ^c	43.61% ^c
Positive Predictive Value	81.25%	73.36% ^c	87.73% ^c
Negative Predictive Value	83.33%	78.06% ^c	87.83% ^c

^a Exakte Clopper-Pearson-Konfidenzintervalle nach Clopper & Pearson (1934)

^b „Log method“ - Konfidenzintervalle nach Altman et al. (2000)

^c Profile-Likelihood-Konfidenzintervall nach Venzon & Moolgavkar (1988)

In einem weiteren Schritt wurde für die erste Fragestellung ausgewertet, inwieweit es mithilfe der CLSM möglich ist, auch den Subtyp eines BZKs richtig zu bestimmen. Hierfür dokumentierten sowohl A als auch B zusätzlich zu der Diagnose (tumorfrei vs. BZK) auch den Subtyp, welchem sie das BZK zuordnen würden.

B diagnostizierte in 76,6% den BZK-Subtyp richtig; A in 74,5%. A hatte in 67% der Fälle den Subtyp des fibrosierenden BZKs im CLSM-Scan richtig erkannt, B in 73% der Fälle. B dokumentierte den Subtyp bei 90 der 128 Präparate mit einem BZK, A bei 51 der 128 Präparate. Die Bestimmung des Subtyps wurde bei schlecht auswertbaren Scans nicht vorgenommen.

3.2.2 Melanozytäre Läsionen

Es wurden 86 Präparate in die Fragestellung 2 (Melanozytäre Läsionen) eingeschlossen.

60 Präparate stammten von weiblichen Probandinnen, 26 von männlichen Probanden.

Die Probandinnen und Probanden waren im Schnitt 61,17 Jahre alt (Minimum 21 Jahre, Maximum 91 Jahre).

18,6% der Präparate waren an der Wange lokalisiert, 11,63% an den Augen / den Augenlidern. An Ohr, Wirbelsäule / Flanke und Gesäß / Genitalbereich waren jeweils weitere 10% der Präparate lokalisiert.

28 der 86 Präparate waren tumorfrei. Bei 22 Präparaten konnte in der H&E-Histologie eine Lentigo maligna / ein Melanoma in situ gesichert werden. Bei 10 Präparaten wurde ein dysplastischer Naevus diagnostiziert, bei 26 ein melanozytärer Naevus / eine naevoide Lentigo.

Ein Präparat wurde dann als richtig positiv in der CLSM-Befundung gewertet, wenn die Diagnose der H&E-Diagnose entsprach. Es wurde keine Unterteilung in Subtypen o.Ä. durchgeführt. Ein CLSM-Befund war dann richtig negativ, wenn auch in der H&E-Histologie kein Tumorgewebe und keine melanozytäre Läsion diagnostiziert wurde.

Die Dermatopathologin A war sich in 37% der Fälle bei der Befundung sicher, Dermatopathologe B war sich bei 18,6% aller Präparate sicher. B hatte alle Präparate (n=86) befundet, A hatte 13 der 86 Präparate als "nicht auswertbar" eingestuft und keine Befundung durchgeführt.

A benötigte durchschnittlich pro Scan 27,81 Sekunden für die Befundung (Minimum: 10 Sekunden, Maximum: 120 Sekunden; Median: 20 Sekunden). B benötigte für die Befundung im Durchschnitt 70,29 Sekunden (Minimum: 30, Maximum 160 Sekunden; Median 60 Sekunden).

A benotete die Scans im Durchschnitt mit einer 2,14 (Minimum: 1, Maximum: 4, Median: 2). B bewertete die Scans der melanozytären Läsionen im Durchschnitt mit einer Schulnote von 2,73 (Minimum: 1, Maximum: 5, Median: 2).

A bewertete, dass im Mittel 84,25% der Epidermis bei den Scans zu sehen war; B schätzte, dass 75,29% der Epidermis auf den Scans abgebildet waren.

Die Präparate waren im Schnitt 14,4mm lang und 11,39mm breit. Die Größe der Präparate betrug im Durchschnitt 136,96mm² (Median 75,5mm²).

Die Erstellung der Scans dauerte im Schnitt 8,22 Minuten (Minimum: 2 Minuten, Maximum 31 Minuten, Median: 5,75 Minuten). Die Befundung benötigte bei A im Durchschnitt 27,81 Sekunden, bei B 70,29 Sekunden (siehe Tabelle 6). Es traten bei 4,8% der Scans technische Probleme auf.

Tabelle 6: Übersicht über die benötigten Zeiten für die Befundung der melanozytären Läsionen durch Dermatopathologin A und Dermatopathologe B.

		Zeit A	Zeit B
N	Gültig	73	86
	Fehlend	13	0
Mittelwert		27,81	70,29
Standardfehler des Mittelwerts		2,717	3,322
Median		20,00	60,00
Std.-Abweichung		23,214	30,806
Varianz		538,879	949,032
Minimum		10	30
Maximum		120	160
Perzentile	25	10,00	50,00
	50	20,00	60,00
	75	30,00	80,00

A erreichte eine Sensitivität von 19,05% (95%KI= [8,60; 34,12%]) und eine Spezifität von 96,3% (95%KI= [81,03%; 99,91%]), B erreichte eine Sensitivität von 85,11% (95% Konfidenzintervall KI= [71,69%;93,80%]) und eine Spezifität von 66,67% (95%KI= [49,78%; 80,91%]); siehe Tabelle 7 und Tabelle 8.

Die Interrater-Reliabilität der H&E-Histologie Diagnosen von A und B war bei $\kappa = 0,905$. Dies entspricht einer beinahe perfekten Übereinstimmung.

Die Interrater-Reliabilität der CLSM-Diagnosen von A mit der H&E-Diagnose lag bei $\kappa = 0,187$. Nach Landis und Koch (1977) entspricht dies einer geringen Übereinstimmung.

Die Interrater-Reliabilität der CLSM-Diagnosen von B mit der H&E-Diagnose lag bei $\kappa = 0,672$. Nach Landis und Koch (1977) entspricht dies einer substanziellen Übereinstimmung.

Tabelle 7: Übersicht über die Genauigkeit der Diagnosen durch Dermatopathologin A für die Fragestellung 2: Melanozytäre Läsionen

Dermato- pathologin A	Wert	95% Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Sensitivität	19.05%	8.60% ^a	34.12% ^a
Spezifität	96.30%	81.03% ^a	99.91% ^a
Accuracy	50.72%	38.41% ^a	62.98% ^a
Positive Likelihood Ratio	5.14	0.68 ^b	38.84 ^b
Negative Likelihood Ratio	0.84	0.71 ^b	0.99 ^b
Prävalenz	60.87%	49.11% ^c	71.83% ^c
Positive Predictive Value	88.89%	59.47% ^c	99.33% ^c
Negative Predictive Value	43.33%	31.27% ^c	55.95% ^c

^a Exakte Clopper-Pearson-Konfidenzintervalle nach Clopper & Pearson (1934)

^b „Log method“ - Konfidenzintervalle nach Altman et al. (2000)

^c Profile-Likelihood-Konfidenzintervall nach Venzon & Moolgavkar (1988)

Tabelle 8: Übersicht über die Genauigkeit der Diagnosen durch Dermatopathologe B für die Fragestellung 2: Melanozytäre Läsionen

Dermato- pathologe B	Wert	95% Konfidenzinter- vall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Sensitivität	85.11%	71.69% ^a	93.80% ^a
Spezifität	66.67%	49.78% ^a	80.91% ^a
Accuracy	76.74%	66.39% ^a	85.18% ^a
Positive Likelihood Ratio	2.55	1.61 ^b	4.04 ^b
Negative Likelihood Ratio	0.22	0.11 ^b	0.46 ^b
Prävalenz	54.65%	44.11% ^c	64.92% ^c
Positive Predictive Value	75.47%	62.86% ^c	85.68% ^c
Negative Predictive Value	78.79%	63.00% ^c	90.28% ^c

^a Exakte Clopper-Pearson-Konfidenzintervalle nach Clopper & Pearson (1934)

^b „Log method“ - Konfidenzintervalle nach Altman et al. (2000)

^c Profile-Likelihood-Konfidenzintervall nach Venzon & Moolgavkar (1988)

3.2.3 Allgemeine Dermatologie

174 der insgesamt 594 Präparate wurden in den dritten Teil der Studie (Allgemeine Dermatologie) eingeschlossen.

80 Präparate stammten von männlichen Probanden, 94 von weiblichen Probandinnen. Die Probandinnen und Probanden waren zwischen 25 und 95 Jahren alt (Mittelwert: 69,3103 Jahre, Median: 73 Jahre).

21,82% der Proben wurden an der Stirn oder Schläfe entnommen. 18,79% der Präparate waren an Unterschenkel bzw. Fuß lokalisiert, 13,33% am Arm.

35,1% der Präparate waren tumorfrei bzw. zeigten in der H&E-Histologie "normale" Haut (z.B. bei Nachexzisionen oder Randkontrollen in sano). Ein PEK konnte in 16% aller Präparate gesichert werden, eine V. seborrhoica in 12,07% der Fälle (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht über die Diagnosen Allgemeine Dermatologie (Fragestellung 3) mit Häufigkeit und Anzahl der Präparate. Zur besseren Auswertbarkeit der Daten wurden teilweise unterschiedliche, aber ähnliche Diagnosen in Gruppen zusammengefasst.

Diagnoseübersicht Allgemeine Dermatologie				
	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	61	35,1	35,1	35,1
Tumorfrei/normale Haut				
Trichoepitheliom	2	1,1	1,1	36,2
Hypertrophe solare Keratose	3	1,7	1,7	37,9
M. Bowen/ Bowenoide solare Keratose	14	8,0	8,0	46,0
PEK G1 & Keratokanthom	18	10,3	10,3	56,3
Desmoplastisches PEK	10	5,7	5,7	62,1
V. seborrhoeica	21	12,1	12,1	74,1
Lichen ruber	11	6,3	6,3	80,5
Prurigoläsion/Chron. Ekzem	4	2,3	2,3	82,8
Abszess/Epidermalzyste/Lipom	14	8,0	8,0	90,8
Dermatofibrom/M. Lederhose	9	5,2	5,2	96,0
Fehlverhornung/Lymphozytäres Infiltrat (unspez. Veränderungen)	7	4,0	4,0	100,0
Gesamt	174	100,0	100,0	

A war sich bei 60,9% der befundeten CLSM-Scans sicher bei der Diagnose; B war sich in 66,1% der Fälle sicher. Keines der Präparate wurde als "nicht auswertbar" gewertet.

A bewertete die Scans im Durchschnitt mit einer 2,26 (Minimum: 1, Maximum: 5, Median: 2), B gab für die Scans der Präparate im Durchschnitt eine Bewertung mit der Schulnote 2,34 (Minimum: 1, Maximum: 5, Median: 2).

82,80% der Epidermis waren laut A auf den Scans abgebildet, 73,57% laut B.

Die Präparate der Gruppe "Allgemeine Dermatologie" waren im Durchschnitt 12,3mm lang, 8,2mm breit und hatten eine Fläche von 99,02mm² (Median: 68,5mm²).

A benötigte durchschnittlich 28,71 Sekunden pro Präparat für die Befundung (Minimum: 10 Sekunden, Maximum 150 Sekunden, Median: 20 Sekunden), B benötigte im Durchschnitt 46,93 Sekunden (Minimum: 10 Sekunden, Maximum: 200 Sekunden, Median: 45 Sekunden), siehe Tabelle 10. Die Erstellung der Scans benötigte im Durchschnitt 7,07 Minuten (Minimum: 2,5 Minuten, Maximum: 33 Minuten, Median: 5,75 Minuten). Es gab bei 11,2% der Präparate technische Probleme bei der Erstellung des Scans.

Tabelle 10: Übersicht über die benötigten Zeiten für die Befundung der Präparate der allgemeinen Dermatologie durch Dermatopathologin A und Dermatopathologe B

		Zeit A	Zeit B
N	Gültig	174	174
	Fehlend	0	0
Mittelwert		28,71	46,93
Standardfehler des Mittelwerts		1,688	2,022
Median		45,00	20,00
Std.-Abweichung		26,673	22,268
Varianz		495,862	711,445
Minimum		10	10
Maximum		150	200
Perzentile	25	10,00	30,00
	50	20,00	45,00
	75	40,00	60,00

A erreichte eine Sensitivität von 75,00% (95%KI= [64,36; 83,81%]) und eine Spezifität von 80,00% (95%KI= [70,25%; 87,69%]). Die Sensitivität von B betrug 91,01% (95% Konfidenzintervall KI= [83,05%;96,04%]), die Spezifität betrug 71,76% (95%KI= [60,69%; 81,00%]); siehe Tabelle 11 und Tabelle 12.

Die Interrater-Reliabilität der H&E-Histologie Diagnosen war bei kappa= 0,902. Dies entspricht einer beinahe perfekten Übereinstimmung.

Die Interrater-Reliabilität der CLSM-Diagnosen von A mit der H&E-Diagnose lag bei kappa = 0,614. Nach Landis und Koch (1977) entspricht dies einer substanziellen Übereinstimmung.

Die Interrater-Reliabilität der CLSM-Diagnosen von B mit der H&E-Diagnose lag bei kappa = 0,740. Nach Landis und Koch (1977) entspricht dies einer substanziellen Übereinstimmung.

Tabelle 11: Übersicht über die diagnostische Genauigkeit bei der Auswertung der CLSLM-Befundung durch Dermatopathologin A für die Fragestellung 3: allgemeine Dermatologie

Dermatopathologin A	Wert	95% Konfidenzintervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Sensitivität	75.00%	64.36% ^a	83.81% ^a
Spezifität	80.00%	70.25% ^a	87.69% ^a
Accuracy	77.59%	70.66% ^a	83.55% ^a
Positive Likelihood Ratio	3.75	2.44 ^b	5.77 ^b
Negative Likelihood Ratio	0.31	0.21 ^b	0.46 ^b
Prävalenz	48.28%	40.92% ^c	55.68% ^c
Positive Predictive Value	77.78%	67.94% ^c	85.88% ^c
Negative Predictive Value	77.42%	68.25% ^c	85.10% ^c

^a Exakte Clopper-Pearson-Konfidenzintervalle nach Clopper & Pearson (1934)

^b „Log method“ - Konfidenzintervalle nach Altman et al. (2000)

^c Profile-Likelihood-Konfidenzintervall nach Venzon & Moolgavkar (1988)

Tabelle 12: Übersicht über die diagnostische Genauigkeit bei der Auswertung der CLSLM-Befundung durch Dermatopathologe B für die Fragestellung 3: allgemeine Dermatologie

Dermato- pathologe B	Wert	95% Konfidenzinter- vall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Sensitivität	91.01%	83.05% ^a	96.04% ^a
Spezifität	71.76%	60.96% ^a	81.00% ^a
Accuracy	81.61%	75.04% ^a	87.07% ^a
Positive Likelihood Ratio	3.22	2.28 ^b	4.55 ^b
Negative Likelihood Ratio	0.13	0.06 ^b	0.25 ^b
Prävalenz	51.15%	43.75% ^c	58.52% ^c
Positive Predictive Value	77.14%	68.52% ^c	84.46% ^c
Negative Predictive Value	88.41%	79.49% ^c	94.53% ^c

^a Exakte Clopper-Pearson-Konfidenzintervalle nach Clopper & Pearson (1934)

^b „Log method“ - Konfidenzintervalle nach Altman et al. (2000)

^c Profile-Likelihood-Konfidenzintervall nach Venzon & Moolgavkar (1988)

3.2.4 Übersicht statistische Auswertung

Tabelle 13: Übersicht über die Ergebnisse der Fragestellungen BZK, Melanozytäre Läsionen sowie die Präparate der Allgemeinen Dermatologie.

	BZK		Melanozytäre Läsionen		Allgemeine Dermatologie	
	A	B	A	B	A	B
Noten	2,31	2,46	2,14	2,73	2,26	2,34
Notendurchschnitt	2,39		2,44		2,3	
Sicherheit	72,8%	79,9%	37,0%	18,6%	60,9%	66,1%
% Epidermis	75,91 %	73,96 %	84,25%	75,29%	82,80%	73,57%
Größe der Präparate (Durchschnitt)	79,85mm ²		136,96mm ²		99,02mm ²	
Größe der Präparate (Median)	60,3mm ²		74,5mm ²		68,5mm ²	
Zeit Erstellung des Scans	7,97 min		8,22 min		7,07 min	
Technischer Fehler	12,62%		4,8%		11,2%	
Zeit Befundung	26,56 s	45,96 s	27,81s	70,29s	28,71s	46,93s
Sensitivität	59,5%	71,09 %	19,05%	85,11%	75%	91,01%
Spezifität	94,79 %	89,81 %	96,30%	66,67%	80%	71,76%

4. Diskussion

4.1 Technische Probleme allgemein

4.1.1 Positionierung der Proben für den Scanvorgang

Eine häufige Schwierigkeit beim Erstellen der CLSM-Scans war die plane Positionierung der Probe auf dem Objektträger, so dass das Präparat flach auf dem Objektträger zu liegen kam und die Unterseite des Gewebes vollständig gescannt werden konnte. Diese Schwierigkeit des sogenannten „flattening“ wurde auch schon von anderen Gruppen beschrieben [36, 53]. Gerade wenn das Gewebe sehr weich und die Epidermis dünn war (z.B. Auge, Lippe, Wange), konnte das Gewebe, insbesondere die Epidermis, oft nur unvollständig dargestellt werden. Dies bedingte in der Folge auch eine unvollständige Befundung und erschwerte die Diagnosestellung. Besonders wichtig war die vollständige Darstellung der Epidermis vor allem bei melanozytäre Läsionen wie Junctions- und Compound-Nävi, da diese eine epidermale Komponente besitzen. Bei unvollständiger Epidermisdarstellung konnte es vorkommen, dass die eigentliche Läsion nicht auf dem Scan erschien. BZKs, entzündliche Hauterkrankungen, Lipome etc. können teilweise auch bei unzureichend dargestellter Epidermis befundet werden.

4.1.2 Färbung der Präparate

Frühere Generationen von CLSM-Geräten lieferten üblicherweise schwarz-weiße Bilder für den Reflexionsmodus [44, 46, 50, 51, 54-57] und meist grün gefärbte Darstellungen im Fluoreszenzmodus [40-42, 45, 46, 48, 50, 53, 55, 57-59] welche getrennt oder als Overlays begutachtet wurden.

Mittlerweile ist es auch möglich, digital gefärbte „pink and blue“-CLSM-Scans zu erstellen [31, 34, 43, 60], welche eine hohe Ähnlichkeit zu den H&E-gefärbten Schnitten aufweisen.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Verfügbarkeit der bereits „pink and blue“ gefärbten CLSM Bilder als Ansatz gewählt.

Die pink-blau gefärbten CLSM-Scans weisen eine hohe morphologische Ähnlichkeit zu den H&E-gefärbten Schnitten auf, jedoch entspricht die artifizielle

Färbung der CLSM-Scans nicht immer der H&E-Färbung.

Strukturen mit besonders hohem Brechungsindex wie beispielsweise Melanin oder Haarschafte , stellen sich im CLSM-Scan anders dar als in der H&E-Färbung [31] und bergen daher das Risiko, dass Strukturen verwechselt oder übersehen werden (vergleiche auch Abbildung 12 und Abbildung 13).

Im Reflexionsmodus erscheinen Melanozyten aufgrund des hohen Brechungsindex des Melanins als helle, weiße Punkte [61]. Auf diesem Effekt beruht der Einsatz der in vivo CLSM bei oberflächlichen melanozytären Hautveränderungen.

In der digital gefärbten ex vivo CLSM erscheinen Melanozyten und andere pigmentierte Strukturen (Haarschaft / Haarwurzel), intensiv pink und sind dadurch deutlich schwerer innerhalb des restlichen pink-blauen Scans zu identifizieren (Abbildung 12 und Abbildung 13).

An H&E-gefärbten lichtmikroskopischen Schnitten zeigen sich die Melanozyten aufgrund des Melanins meist als helle oder braun-gefärbte dendritische oder ballonierte Zellen. Sie heben sich vom restlichen pink-blau eingefärbten Gewebe ab und können daher gut erkannt werden.

Das Melanin ist in Abbildung 12 (H&E-Färbung) als braunes Band subepidermal zu sehen. In der CLSM (Abbildung 13) sind die Melanozytennester stark pink angefärbt und deutlich schwerer zu sehen.

Es bestehen weitere Unterschiede zwischen dem CLSM-Scan und H&E-gefärbten Präparaten. Die Basalmembran lässt sich nicht so gut abgrenzen wie in der H&E-Färbung [31]. Die Auflösung der CLSM-Scans ist geringer als in der H&E-Histologie. Eine Beurteilung der Zellkerne ist im CLSM-Scan nur eingeschränkt möglich, hierdurch können maligne Veränderungen schlechter beurteilt werden.

Beide Dermatopathologen sind geübt in der Befundung von H&E-gefärbten Objektträgern, welche ein rot-blaues mikroskopisches Bild ergeben („pink and blue“). Die CLSM-Scans wurden in der gleichen Farbkombination artifiziell dargestellt und wirkten daher sehr ähnlich zu den H&E-gefärbten Objektträgern. Der an H&E-gefärbten Schnitten geschulte Blick von Dermatopathologen

verbindet mit der Farbe rosa Eosin-gefärbte Strukturen wie z.B. Keratin, Kollagen, Muskelfilamente oder Erythrozyten. In den „pink and blue“ CLSM-Scans sind jedoch auch pigmentierte Strukturen pink gefärbt.

Es wäre denkbar, dass die stark H&E-ähnlichen CLSM-Scans dazu verleiten, die Diagnose schnell zu stellen und nicht auf die Besonderheiten in der Darstellung des Gewebes in der CLSM zu achten. Bei einer zu schnellen Befundung innerhalb weniger Sekunden könnte daher Tumorgewebe in der CLSM übersehen werden und dadurch eine niedrige Sensitivität zustande kommen.

4.1.3 Aufbereitung der Präparate für die H&E-Färbung

Neben den Unterschieden in der Färbung bei CLSM und H&E kommt noch ein weiterer, wichtiger Unterschied zum Tragen. Bei der CLSM wird das Frischgewebe unfixiert gescannt. Das zu scannende Gewebe wird flach auf den Objektträger aufgebracht und direkt von dem Laser gescannt.

Bei der Erstellung H&E-gefärbter Objektträger muss die Probe zunächst in Paraffin eingebettet werden. Nach der Einbettung kann das Präparat am Mikrotom in ca. 2-5µm dicke Scheiben geschnitten werden. Diese Scheiben werden anschließend auf einem Objektträger fixiert und mit H&E gefärbt. Damit das Präparat auf einer Schnittstufe vollständig zur Darstellung kommt, ist es häufig notwendig, zunächst die ersten Schnitte zu verwerfen. Da das Präparat nicht perfekt parallel zur Schnittebene des Mikrotoms gelagert ist, wird es bei den ersten Schnittstufen nur teilweise angeschnitten. Diese Schnittstufen sind nicht verwertbar, da das Präparat nicht in seiner Gesamtheit zur Darstellung kommt.

Peters et al. diskutierten bereits 2019 die Möglichkeit falsch negativer Ergebnisse in H&E-gefärbten Schnitten durch die unterschiedliche Art der Probenaufbereitung bei CLSM und H&E-gefärbten Schnitten [53]. Demnach ist es denkbar, dass ein Resttumor zwar in den tieferen Schnittstufen der H&E-Histologie sichtbar ist, jedoch die tatsächlichen, äußersten Schnittränder, welche in der CLSM gescannt wurden, tumorfrei sind. Da die H&E-Histologie

als Goldstandard dient, führt dies irrtümlich zu falsch negativen Befunden in der CLSM und somit zu niedrigeren Werten in der Sensitivität.

4.1.4 Einarbeitung

Gegebenenfalls hätte die diagnostische Treffsicherheit mit einer längeren und intensiveren Einarbeitung gesteigert werden können.

Mu et al. berichten zwar über eine Einarbeitungszeit von lediglich 5 Minuten zur Auswertung digital gefärbter CLSM-Mosaik [43]. Eine intensive Umstellung oder Einarbeitung der Histopathologien wie bei früheren CLSM Bildern, welche in weiß / schwarz dargestellt waren, schien nicht mehr erforderlich.

Der "Leitfaden Digitale Pathologie" des Bundesverbands deutscher Pathologen e.V. jedoch empfiehlt einen Probenumfang von 60 Präparaten, welche "das Spektrum und die Komplexität der Probentypen und Diagnosen der Routinediagnostik repräsentativ abbilden" [62]. Diese Empfehlung wurde in der vorliegenden Studie nicht umgesetzt. Lediglich 26 Präparate dienten zur Einarbeitung.

In zukünftigen Studien sollte darauf geachtet werden, ausreichend Präparate zur Verfügung zu stellen, um sicherzustellen, dass ein hinreichendes Training der (Dermato-)Pathologen stattfindet.

4.2 Basalzellkarzinome

Die Einbettung von entnommenen Gewebeproben in Paraffin, der aktuelle Goldstandard, ist sehr zeitaufwändig. Daher ist im Regelfall nur eine zwei-beziehungsweise mehrzeitige Behandlung des Patienten möglich. Erst nach garantierter Tumorfreiheit kann die Wunde verschlossen werden. Das Offenlassen der Wunde birgt ein Infektionsrisiko, welches mit der Gefrierschnitt-Methode oder der CLSM verringert werden könnte. Mit der CLSM stünde daher neben der Gefrierschnitttechnik eine Möglichkeit zur Verfügung, mit welcher auch perioperativ befundet und im Falle von verbleibenden Tumorsträngen direkt nachreseziert werden könnte. Bei Tumorfreiheit könnte der Defekt noch in derselben OP-Sitzung verschlossen und somit ein einzeitiges Behandlungskonzept realisiert werden.

Fraglich ist, ob die diagnostische Genauigkeit der ex vivo CLSM für die mikroskopisch kontrollierte Chirurgie von Basalzellkarzinomen ausreichend ist und ob die ex vivo CLSM im ambulanten intraoperativen Setting umsetzbar wäre.

Die Befundenden hatten hohe Werte für die Spezifität (A: 94,79%, B: 89,81%). Wurde ein Präparat als tumorfrei befundet, so traf dies auch mit einer Wahrscheinlichkeit von 89,81% bzw. 94,79% zu. Dies bedeutet umgekehrt, dass bei 10 bzw. 5 von 100 Patienten, bei welchen in der CLSM kein Tumor gesehen wurde, noch ein Resttumor vorhanden war.

Die Ergebnisse decken sich mit den Werten, welche bisher publiziert wurden. Malvey et al. geben für die Spezifität, welche bei 7 Studien zur CLSM von BZKs mit CLSM gefunden wurden, Werte zwischen 89,2% und 100% an [39-45, 53].

Die Sensitivität betrug bei Dermatopathologin A 59,50%, bei B 71,09%.

Malvey et al. geben für 7 verschiedene Studien bei der Befundung von BZKs mithilfe von CLSM Sensitivitäten zwischen 73% bis 100% an [39-45, 53].

Die in dieser Studie gefundenen Werte liegen (zum Teil deutlich) darunter.

Jedoch wurden bei einem Großteil der Vergleichsstudien ausschließlich BZKs eingeschlossen [39, 40, 42, 45, 53]. Für die Befundenden der bereits

publizierten Studien war also von vornherein klar, dass in dem CLSM-Scan entweder ein BZK zu sehen ist oder "normale" Haut / tumorfreies Gewebe.

Da den Befundenden in dieser Studie lediglich klinische Angaben bekannt

waren, nicht aber welcher Gruppe der CLSM-Scan zugeordnet war (BZK,

Melanozytäre Läsionen, allgemeine Dermatologie), gab es deutlich mehr

Möglichkeiten an Diagnosen. Es war nicht im Voraus selektiert worden, welches

Präparat ein BZK enthielt und welches eine melanozytäre Läsion oder

allgemeine dermatologische Krankheitsbilder. Diese Zuordnung fand erst nach

der abschließenden Befundung der H&E-Objektträger und der CLSM-Scans

statt. So konnte es sich zwar entweder um ein BZK oder "normale" Haut /

tumorfreies Gewebe handeln, aber darüber hinaus war auch eine Vielzahl an

weiteren dermatologischen Diagnosen prinzipiell vorstellbar. Dieses Vorgehen

ermöglichte es, die CLSM in einem realistischen Setting zu erproben. Zwar wird

in aller Regel bei Nachexzisionen bereits vor Beginn der Befundung des CLSM-Scans bekannt sein, um welchen Tumor es sich handelt, da dieser bei der Erstbehandlung diagnostiziert wurde. Bei der Vielzahl an Patienten, die erstmalig mit einer auffälligen Hautläsion den Hautarzt aufsuchen, wird es jedoch bei der überwiegenden Mehrheit nicht von vornherein feststehen, um welche Hautläsion es sich handelt. Analog dazu war auch in der vorliegenden Studie nicht eindeutig ersichtlich, um welche Art der Läsion es sich handelte; Anhaltspunkte ergaben lediglich die klinischen Angaben auf dem Überweisungsschein. So konnte ein realistisches Setting im ambulanten Workflow einer operativen Hautarztpraxis oder Klinikambulanz imitiert werden. Für den klinischen Einsatz der ex vivo CLSM bei BZK ist die in dieser Studie festgestellte Sensitivität von 65,3% und Spezifität von 92,3% noch nicht ausreichend, um die Histologie mit HE gefärbten Paraffinschnitten zu ersetzen.

Die Zeit zur Erstellung der Scans war für die BZK-Präparate im Vergleich zur Größe der Präparate lang. Die Präparate hatten die kleinste durchschnittliche Größe (79,85mm²), jedoch brauchte der Scan trotzdem fast eine Minute länger als der Scan der Präparate "Allgemeine Dermatologie" (7,97min (Median: 6,0 Minuten) vs. 7,07min (Median: 5,75 Minuten)).

Eine Erklärung für diese verlängerte BZK-Scanzeit könnte die Notwendigkeit der absolut planen Positionierung bei Randkontrollen und die höhere Rate an technischen Problemen sein: Bei 12,62% aller Scans der BZK-Gruppe trat ein technisches Problem auf, mehr als in den beiden anderen Gruppen. Die hohe Anzahl an technischen Problemen in der BZK-Gruppe könnte sich wiederum auf die Bildqualität ausgewirkt haben. Dafür spricht, dass bei Präparaten der BZK-Gruppe die Epidermis unzureichender auf den Scans abgebildet war (durchschnittlich 75%).

Dennoch fielen die Schulnoten für die erzielten digitalen Scans der BZKs nicht schlechter aus (Note BZK-Gruppe: Durchschnitt 2,39 | Median 2,0; Melanozytäre Läsionen: 2,44 | Median 2,0; Allgemeine Dermatologie: Durchschnitt 3,0 | Median 2,0).

Die Befunder gaben eine hohe Sicherheit bei der Diagnose der BZK-Scans an. Zumeist erschwerte ein technischer Fehler bei Erstellung des Scans die spätere

Diagnosefindung, da der eigentlich klinisch relevante Bereich nicht gescannt werden konnte oder der Scan stark streifig erschien. Bei der Gruppe der BZKs jedoch zeigte sich, dass die Untersucher die höchste Sicherheit hatten (76,35% gegenüber 63,5% (Allgemeine Dermatologie) und 27,8% (melanozytär)) und die Befundung am schnellsten durchführten (durchschnittlich 36,26 Sekunden gegenüber 37,82 Sekunden (Allgemeine Dermatologie) und 49,05 Sekunden (melanozytär)). Die BZK-typischen basaloiden Tumorinseln mit peripherer Palisadenstellung konnten in guten Scans "auf einen Blick" erkannt und befundet werden (vergleiche auch Abbildung 8).

Eventuell verleiteten die CLSM-Scans in der gewohnten Farbkodierung die Befunder dazu, die Präparate routiniert schnell, aber möglicherweise nicht hinreichend genau zu befunden. Dafür könnte die schnelle Zeit und hohe „gefühlte Sicherheit“ bei der Befundung sprechen. Diese Problematik wird in den bisherigen Studien, welche digital gefärbte CLSM-Scans ausgewertet haben, nicht thematisiert [31, 34, 43, 60]. Jedoch wird dort darauf hingewiesen, dass einige Strukturen sich im CLSM-Scan anders darstellen als in der H&E-Färbung [31, 34]. Eine erhöhte Fehleranfälligkeit durch die befundenden Dermato- bzw. Histopathologen wird nicht genannt.

4.3 Melanozytäre Läsionen

Eine besondere Schwierigkeit liegt in der Beurteilung von melanozytären Läsionen mithilfe eines ex vivo konfokalen Mikroskops. Während für das Befunden von Basalzellkarzinomen bereits einige Studien mit größeren Fallzahlen vorliegen, ist die Untersuchung von melanozytären Läsionen mittels der ex vivo CLSM noch nicht gut erforscht [39].

Die Epidermis war von allen Scans in der Gruppe der melanozytären Läsionen am vollständigsten abgebildet; durchschnittlich waren 79,77% der Epidermis sichtbar. Dennoch wurden die CLSM-Scans von GM und SF am schlechtesten bewertet (Durchschnittliche Note: 2,44 | Median 2,0).

Von allen Scans war die Erstellung der CLSM-Scans melanozytärer Läsionen am zeitintensivsten, durchschnittlich 8,22 Minuten wurden benötigt. Technische

Fehler traten hingegen am seltensten auf, in 4,8% der Fälle (im Vergleich dazu traten bei den BZK-Scans mehr als doppelt so häufig (12,62%) technische Fehler auf).

Der erhöhte Zeitaufwand lässt sich in diesem Fall daher nicht mit dem Auftreten technischer Probleme erklären.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass während des Scannens bewusst ein starker Fokus auf die vollständige Darstellung der Epidermis gelegt wurde.

Dafür spricht, dass in keiner anderen Gruppe ein so hoher Prozentsatz der Epidermis dargestellt werden konnte. Um die Epidermis möglichst vollständig scannen zu können, waren bei ca. der Hälfte aller Präparate zwei oder mehr Versuche notwendig, um die Epidermis darstellen zu können. Dies resultiert in einem höheren Zeitbedarf, unabhängig von technischen Problemen.

Nicht nur der Zeitaufwand für das Erstellen der CLSM-Scans in der Gruppe der melanozytären Läsionen war höher, auch der Zeitbedarf zur Befundung der Scans durch A und B war in der Gruppe der melanozytären Läsionen am höchsten (durchschnittlich 49,05 Sekunden | Median 40 Sekunden) im Vergleich zu durchschnittlich 37,82 Sekunden | Median 32,5 Sekunden (Allgemeine Dermatologie) und durchschnittlich 36,26 Sekunden | Median 20,557 Sekunden (BZK).

Der höhere Zeitaufwand könnte sich durch größere Präparate ergeben. Mit 136,96mm² waren die Präparate in der Gruppe der melanozytären Läsionen mit Abstand am größten. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass die Scans durch die ungewohnte Farbgebung schwieriger zu befunden waren. Für eine größere Unsicherheit bei der Befundung spricht, dass die Sicherheit bei der Befundung lediglich bei durchschnittlich 27,8% lag; ein sehr niedriger Wert im Vergleich zur Sicherheit bei der Befundung von BZKs (durchschnittlich 76,35%) und allgemeinen dermatologischen Läsionen (63,5%). Die große Unsicherheit bei der Befundung könnte auch die schlechten Noten trotz sehr vollständiger Darstellung der Epidermis und wenigen technischen Fehlern erklären.

Bis dato gab es noch keine Studie, in welcher eine größere Anzahl an melanozytären Läsionen in der ex vivo CLSM im Vergleich mit der H&E-

Histologie untersucht wurde. Hartmann et al. beschrieben aber diagnostische Kriterien zur Befundung von CLSM-Scans melanozytärer Läsionen [50]. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass die Tumordicke von Melanomen in der CLSM sehr gut mit der Tumordicke in der H&E-Histologie korreliert [49]. Eine Studie zur diagnostischen Genauigkeit bei der Anwendung der ex vivo CLSM bei melanozytären Läsionen liegt bis dato jedoch nicht vor.

Die Sensitivität betrug bei A lediglich 19,05%, bei B 85,11%. Eine Sensitivität von lediglich 19,05% ist extrem niedrig. Von 100 Patienten, bei welchen eine melanozytäre Läsion von A diagnostiziert wurde, hätten nur 20 Patienten tatsächlich eine solche.

Aufgrund dieser Werte ist eine Implementierung der CLSM in den Routinealltag einer Praxis oder Klinikambulanz gegenwärtig keinesfalls geeignet. Im Gegensatz zu der Befundung von Basalzellkarzinomen braucht es zum Erkennen von melanozytären Läsionen, aufgrund der Unterschiede in der Färbung zwischen CLSM und H&E (vergleiche Kapitel 3.1.2), eine deutlich gründlichere Einarbeitung. Um eine höhere diagnostische Genauigkeit zu erreichen, wäre eine neue, gegebenenfalls spezifischere Färbung denkbar. Hartmann et al. färbten Melanome bereits mit Immunfluoreszenzfarbstoffen (S100 und Melan A) und erstellten anschließend CLSM-Scans. Hierdurch konnte eine spezifischere Anfärbung erreicht werden, jedoch dauerte das Anfärben des Gewebes bis zu zwei Stunden [47]. Nicht nur das Färbemittel, auch eine andere Laserfrequenz könnte eventuelle eine Verbesserung der Darstellung von Melanomen ergeben. Melanin hat bei einer Wellenlänge von 335nm sein Absorptionsmaximum [63]. Der in der Studie verwendete Laser scannte bei Wellenlängen von 488 und 785nm. Eventuell könnte das Scannen bei einer Wellenlänge von 335nm (insbesondere bei melanozytären Läsionen) neue Erkenntnisse und eine bessere Beurteilbarkeit ergeben.

Die Spezifität betrug bei A 96,30% und bei B 66,67%. Diese Werte liegen deutlich höher als bei der Sensitivität. Wurde in dem CLSM-Scan eines Präparats keine melanozytäre Läsion (wie beispielsweise ein melanozytärer Naevus oder ein Melanoma in situ) gesehen, so war mit einer

Wahrscheinlichkeit von rund 67% bzw. 96% auch tatsächlich kein Tumor vorhanden. Auch hier liegen analog zur Sensitivität keine Vergleichswerte vor.

Insgesamt muss festgestellt werden, dass die diagnostische Genauigkeit noch nicht ausreicht, um melanozytäre Tumoren allein auf der Basis von CLSM-Scans mit einem kombinierten Reflexions- und Fluoreszenzmodus mit Acridine Orange Kernfärbung zu stützen.

4.4 Allgemeine Dermatologie

Die Gruppe "Allgemeine Dermatologie" enthielt alle Präparate, welche weder BZKs (und deren Randkontrollen / Nachexzisionen) oder melanozytäre Läsionen (und deren Randkontrollen / Nachexzisionen) enthielten. In dieser Gruppe konnten die höchsten Werte für Sensitivität (A: 75,00%, B: 91,01%) und Spezifität (A: 80,00%, B: 71,76%) erzielt werden. Auch die Schulnoten für die digitalen Scans waren mit durchschnittlich 2,30 (BZK: 2,38, Melanozytär: 2,44) am besten. Die vergebenen Noten und die erreichten Werte für Sensitivität bzw. Spezifität korrelieren miteinander: je besser die Note für die Scans innerhalb einer Gruppe, desto höher waren Sensitivität und Spezifität.

Jedoch waren sich die Befundenden bei der Begutachtung der CLSM-Scans der dritten Gruppe nur in 63,5% der Fälle mit der Diagnose sicher. Bei über einem Drittel der Fälle waren sie sich hingegen unsicher. Trotzdem war die Diagnose im Vergleich zu den beiden anderen Fragestellungen am häufigsten richtig.

Gründe hierfür könnten die bereits genannten sein: es könnte sein, dass die Pathologen bei der Befundung der BZKs aufgrund der sehr schnellen Befundung (durchschnittlich ca. 36 Sekunden pro Präparat) häufiger Tumor und/ oder Resttumore übersahen. Dagegen spricht jedoch, dass für die Gruppe der Allgemeinen Dermatologie lediglich ca. 1,5 Sekunden mehr Zeit für die Befundung im Vergleich zu den BZKs notwendig war. Ein größerer Unterschied besteht in der Sicherheit bei der Befundung. Bei keiner der drei Gruppen waren sich die Befundenden so sicher, wie bei der Gruppe der BZKs, ohne dass jedoch auch die Ergebnisse am besten waren. Bei der Befundung der Scans der allgemeinen Dermatologie bestand mehr Unsicherheit. Diese Unsicherheit

könnte dazu geführt haben, dass die Scans genauer und kritischer ausgewertet wurden und somit weniger Auffälligkeiten übersehen wurden. Unter Umständen könnte sich die etwas größere Unsicherheit positiv auswirken und die besseren Werte für Sensitivität und Spezifität erklären.

Bei den melanozytären Läsionen war eines der großen Probleme, dass das Melanin farblich nicht klar abgrenzbar war von dem umliegenden Gewebe (vergleiche Abbildung 10) [31]. Diese Probleme gab es weder bei der ersten Gruppe der BZKs noch bei den Präparaten, welche der allgemeinen Dermatologie zugeordnet wurden. Die fehlende Abgrenzbarkeit des Melanins hat mit hoher Wahrscheinlichkeit dazu beigetragen, dass in der Gruppe der melanozytären Läsionen relativ schlechte Werte für Sensitivität und Spezifität erreicht wurden, vor allem im Vergleich mit jenen Werten der Präparate der allgemeinen Dermatologie.

Es wurden viele Präparate gescannt, welche eine Verruca seborrhoeica, ein Plattenepithelkarzinom bzw. Keratoakanthom, ein Lipom oder einen Abszess zeigten (vergleiche Tabelle 9). Diese Präparate machten neben den tumorfreien Präparaten einen Großteil der Präparate aus und zeigten sich im CLSM-Scan sehr ähnlich zu den H&E-Schnitten (siehe Abbildung 15, Abbildung 17, Abbildung 19 und Abbildung 21). Die Gesamtstruktur der Läsion als „prima vista“- Eindruck und eine große Ähnlichkeit zwischen H&E-gefärbtem Objektträger und CLSM-Scan könnte die diagnostische Genauigkeit erhöht haben.

Vergleicht man die Anzahl der möglichen Diagnosen, so war diese in der Gruppe Allgemeine Dermatologie am größten: insgesamt wurden die Präparate 12 Diagnosegruppen zugeordnet (vergleiche Tabelle 9). Für die erste Gruppe der BZKs gab es nur 2 mögliche Diagnosen (tumorfrei oder BZK), in der Gruppe der melanozytären Läsionen 4 mögliche Diagnosen (tumorfrei, Melanoma in situ, dysplastischer Naevus oder melanozytärer Naevus/ naevoide Lentigo). Obwohl die Anzahl möglicher Diagnosen deutlich größer war wurden dennoch die besten Werte für Sensitivität und Spezifität erreicht. Bisher wurde die ex vivo CLSM wie in dieser Studie noch nicht bei allgemeinen Hautläsionen

eingesetzt. Es keine Vergleichswerte in der Literatur vor. Jedoch wurden bereits einzelne Krankheitsbilder spezifisch mithilfe der CLSM untersucht [39]. Bertoni et al. untersuchten die Darstellung von Psoriasis, Lichen planus, Ekzemen und diskoidem Lupus erythematoses mithilfe der ex vivo Fluoreszenz-mikroskopie. Hierbei zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen dem ex vivo Scan und den H&E-gefärbten Schnitten [64]. Die Darstellung entzündlicher Hauterkrankungen im ex vivo CLSM-Scan korreliert gut mit dem H&E-gefärbten Schnitt [65]. Bullöse Pemphigoide können ebenfalls mithilfe der CLSM dargestellt werden, dabei wurden hohe Werte für die Spezifität, jedoch nur niedrige Werte für die Sensitivität (47,75%) erreicht [66]. Auch Mucormykosen konnten in der ex vivo und in vivo CLSM dargestellt werden [67]. Des Weiteren konnte mithilfe der ex vivo CLSM innerhalb weniger Minuten der Nachweis eines intracerebralen Pilzbefalls erbracht werden [68]. Cinotti et al. konnten tinea capitis und tinea barbae mithilfe der ex vivo und in vivo CLSM darstellen und so innerhalb weniger Minuten die Verdachtsdiagnose bestätigen [69]. Bagci et al. färbten Präparate kutaner Vaskulitis mithilfe von Immunfluoreszenzfarbstoffen und scannten die Präparate mithilfe der ex vivo CLSM im Fluoreszenzmodus. Hierbei zeigte sich eine gute Korrelation im Vergleich zur direkten Immunfluoreszenz [70]. Die bisherigen Studien zeigen, dass häufig eine gute Korrelation zwischen dem CLSM-Scan und den H&E-gefärbten Präparaten besteht. Dies könnte die hohe diagnostische Genauigkeit der vorliegenden Arbeit erklären.

Dass eine so hohe diagnostische Genauigkeit erreicht werden kann, selbst wenn ohne Vorauswahl alle entnommenen Präparate in die Studie eingeschlossen werden, ließe eine Anwendung der CLSM im Setting einer Hautarztpraxis oder Klinikambulanz denkbar erscheinen. Auffällige Läsionen, welche makroskopisch nicht ausreichend zu beurteilen sind, könnten so innerhalb weniger Minuten gescannt werden und größtenteils in unter einer Minute befundet werden. Eine schnelle Rückmeldung an den Patienten und die Planung des weiteren Vorgehens wäre im Idealfall und bei eindeutigem Befund des CLSM-Scans innerhalb eines Termins möglich.

4.5 Schlussfolgerung

Die vorliegende klinische Studie wurde im Routineablauf einer dermatochirurgischen Praxis durchgeführt.

Die CLSM schnitt bei der Befundung von BZKs mit einer Sensitivität von 65,23% und Spezifität von 92,3% schlechter ab als in den Studien, welche bereits publiziert worden sind. Die bisherigen, besseren Ergebnisse könnten unter Umständen dadurch zustande gekommen sein, dass bereits eine Vorauswahl getroffen wurde und ausschließlich BZKs in die Studie eingeschlossen wurden. Die schlechteren Ergebnisse könnten aber auch durch die eventuell ungenügende Einarbeitung der (Dermato-) Pathologen bedingt sein.

Die Befundung von melanozytären Läsionen ist durch die veränderte Färbung des Melanins in pink (im CLSM-Scan) anstatt braun (im H&E-gefärbten Schnitt) deutlich schwieriger. Bei melanozytären Läsionen fand sich die geringste diagnostische Genauigkeit mit einer Sensitivität von 52,08% und Spezifität von 81,485%. Zurzeit ist eine diagnostische Anwendung der CLSM im Bereich der melanozytären Läsionen nicht sinnvoll. Mit intensiverem Training in der Befundung digitaler CLSM-Scans melanozytärer Läsionen und ggf. durch den Einsatz anderer Färbeprotokolle und Wellenlängen könnten in der Zukunft die diagnostische Treffsicherheit ggf. gesteigert werden.

Die besten Ergebnisse wurden bei allgemeindermatologischen Präparaten erreicht: Die Sensitivität betrug 83,01%, die Spezifität 75,88%. Bislang gibt es keine Untersuchungen zur CLSM in diesem Bereich. Hier ist ein Einsatz der ex vivo CLSM aufgrund der relativ hohen diagnostischen Genauigkeit denkbar.

Die ex vivo CLSM ist eine sehr schnelle Methode zur Untersuchung von unfixiertem Frischgewebe. Die Erstellung eines digitalen CLSM-Scans ist innerhalb weniger Minuten möglich. Auch die Befundung kann sehr schnell erfolgen. Bei einem ausreichenden Training ist zusätzlich zur Standardhistologie an H&E-gefärbten Paraffinschnitten ein supportiver Einsatz eines konfokalen Mikroskops vorstellbar.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Die CLSM ermöglicht eine schnelle Erstellung histopathologischer, digitaler Scans von unfixiertem Frischgewebe. Die Befundung von Schnitträndern, Tumormitten, Stanzbiopsien und weiteren Proben ist innerhalb weniger Minuten möglich.

Fragestellung: Der Einsatz der CLSM im Routinealltag einer dermatologischen Hautarztpraxis wurde hinsichtlich Zeitbedarf und diagnostischer Genauigkeit bei BZKs, melanozytären Läsionen und allgemeinen dermatologischen Läsionen untersucht.

Material und Methoden: Die Studie fand von April bis Mai in der "Praxisklinik Tübingen - Haut und Venen" statt. Es wurden 594 Präparate von 107 Patienten in die Auswertung eingeschlossen. Zwei (Dermato-)Pathologen (A und B) befundeten unabhängig voneinander jeweils die H&E-gefärbten Objektträger einer Läsion und die digitalen CLSM-Scans. Sensitivität, Spezifität und Interrater-Reliabilität wurden erhoben. Weitere Parameter wie die Sicherheit bei der Befundung, Zeitaufwand, Anteil der dargestellten Epidermis und subjektive Bewertung der Qualität des Scans wurden durch die Pathologen dokumentiert.

Ergebnisse: Die Auswertung erfolgte in drei Gruppen: BZKs und Schnittrandkontrollen, melanozytäre Läsionen und alle weiteren Präparate, welcher weder der ersten noch der zweiten Gruppe zugehörig waren ("Allgemeine Dermatologie"). Die Werte für Sensitivität und Spezifität waren in der Gruppe der BZKs zwar hoch, jedoch niedriger als in bisher publizierten Studien (Sensitivität: A = 59,5%; B = 71,09% | Spezifität: A = 94,79%; B = 89,81%). Melanozytäre Läsionen unterlagen bei der Befundung häufig Fehlern und wiesen eine nur unzureichende diagnostische Genauigkeit auf (Sensitivität: A = 19,05%; B = 85,11% | Spezifität: A = 96,30%; B = 66,67%). Die Befundung der Präparate Allgemeine Dermatologie ging mit relativ hohen Werten für Sensitivität und Spezifität einher (Sensitivität: A = 75,00%; B = 91,01% | Spezifität: A = 80,00%; B = 71,76%). Die Erstellung der Scans dauert im Durchschnitt 7,75 Minuten.

Diskussion: Die niedrigeren Werte bei der Befundung der BZKs im Vergleich zu bisherigen Studien könnten durch die höhere Anzahl unterschiedlicher Präparate erklärt werden. Melanozytäre Läsionen sind in der CLSM aufgrund der anderen Anfärbung des Melanins (pink statt wie in der H&E-Färbung braun) schwerer zu diagnostizieren. Die Befundung der Präparate in der letzten Gruppe "Allgemeine Dermatologie" lieferte eine hohe diagnostische Genauigkeit; bisher gibt es keine Vergleichsstudien.

Schlussfolgerung: Die CLSM ist eine sehr schnelle Methode, welche die Art der Diagnosefindung in der Pathologie revolutionieren könnte. Dennoch zeigen die gefundenen Ergebnisse, dass die diagnostische Genauigkeit noch nicht ausreicht, um die H&E-Histologie zu ersetzen. Eine supportive Anwendung wäre in einigen Fällen denkbar (z.B. Präparate der allgemeinen Dermatologie).

Abbildungsverzeichnis

*Abbildung 1: Vivascope2500M-G4. Links der eigentliche Scanner mit der Öffnung für das Einlegen des Objektträgers (weißer Stern). In der Mitte unten ist der Joystick zum Verschieben der Probe über dem Laser bzw. der Kamera (gelber Stern). Rechts der zum Laser dazugehörige Bildschirm (grüner Stern). Mit freundlicher Genehmigung der Firma Mavig;
[<https://www.vivascope.de/products/vivascope-2500m-g4/>]. 21*

Abbildung 2: Stark streifiger CLSM-Scan. Das fehlerhafte Scannen war meist an den Rändern am ausgeprägtesten, wohingegen die Mitte des Scans häufig ohne starke Streifenbildung gescannt wurde. 23

Abbildung 3: Kombination von Objektträger und Glasplatte. Verbindung mithilfe von Magneten. 27

Abbildung 4: Es wurde Schaumstoff zwischen Glasplatte und Objektträger geklemmt, um ein besseres Fixieren der Probe mit mehr Druck zu ermöglichen. 28

Abbildung 5: Bereits vorbereitete Knete, welche geformt und in Frischhaltefolie gewickelt ist. 28

Abbildung 6: Platzierung der Knete zwischen Glasplatte und Objektträger. 29

Abbildung 7: Makroskopisches Bild. Das Präparat ist durch das Färbebad mit Acridine Orange leicht orange-rötlich gefärbt. Zur besseren Fixierung und Aufbringung von Druck ist es von Schaumstoff umgeben, rechts ist einer der Magneten sichtbar. 30

Abbildung 8: CLSM-Detailscan eines fibrosierenden, infiltrativ wachsenden Basalzellkarzinoms. Die Palisadenstellung der peripheren Tumorzellen ist im CLSM-Scan gut zu erkennen (schwarze Pfeile). Auch die Spaltbildung rund um das Tumorgewebe ist sichtbar (gelber Pfeil). 34

Abbildung 9: H&E-Schnitt eines fibrosierenden Basalzellkarzinoms, 40-fache Vergrößerung. Gut sichtbar sind die Tumorstränge, welche das Bindegewebe durchziehen (blaue Pfeile). Am Unterrand der Epidermis ist, etwas dunkler angefärbt, die Basalzellschicht zu erkennen (gelber Pfeil). 35

Abbildung 10: Übersichtsvergrößerung des CLSM-Scans aus Abbildung 9. Auch im CLSM-Scan sind schon bei niedriger Vergrößerung die Tumorstränge des Basalzellkarzinoms sichtbar (blaue Pfeile). Rechts oben außen wurde zu wenig Druck auf das Präparat aufgebracht, wodurch das Gewebe nicht vom Laser erfasst werden konnte (schwarzer Stern). Gut zu erkennen ist die Basalzellschicht der Epidermis, welche ebenfalls durch die großen, runden Zellkerne dunkel angefärbt ist (gelber Pfeil). 35

Abbildung 11: CLSM-Scan eines Melanoma in situ, SSM-Typ. Die Melanozyten erscheinen im CLSM-Scan grellpink (schwarzer Pfeil). Teilweise sind Melanozytennester zu erkennen (roter Pfeil). Die Zellform der Melanozyten lässt

<i>sich im CLSM-Scan aufgrund der fehlenden Auflösung nur schwer ausmachen.</i>	36
<i>Abbildung 12: H&E-gefärbtes Präparat eines Compoundnaevus, 100-fache Vergrößerung. Junktional zeigen sich überwiegend einzelstehende, kleine Melanozyten. Diese zeigen auf Grund der fehlenden Zytokeratine im Zytoplasma ein Halo-artiges Retraktionsartefakt zum Zellkern (rote Pfeile). Dermal sind Melanozytennester zu sehen, apikal sind diese stark pigmentiert (schwarze Pfeile), zur Tiefe hin verliert sich die Pigmentierung (gelbe Pfeile) In der mittleren Dermis sind Kollagenfibrillen zu erkennen (lila Pfeil).</i>	37
<i>Abbildung 13: CLSM-Scan des Compoundnaevus aus Abbildung 12. Im CLSM-Scan stellen sich die apikalen, stark pigmentierten Melanozytennester (schwarzer Pfeil) im Gegensatz zur H&E-Färbung intensiv pink gefärbt dar, tiefer dermal gelegen zeigen sich die nicht-pigmentierten Melanozytennester (gelber Pfeil). Das Stratum corneum der Epidermis ist schräg angeschnitten (grüner Pfeil). Die Kollagenfibrillen färben sich im CLSM-Scan deutlich stärker an als im H&E-Schnitt (siehe lila Pfeil, vergleiche oberes Bild). Außerhalb des gescannten Gewebes wurde der Objektträger sowie Reste der Färbelösung mitgescannt, welche ebenfalls stark pink erscheinen, jedoch nicht zum Präparat an sich gehören (schwarzer Stern).</i>	37
<i>Abbildung 14: H&E-gefärbtes Präparat eines Lipoms, 40-fache Vergrößerung. Zwischen den Adipozyten ist Bindegewebe zu erkennen (lila Pfeil). Die Zellkerne der Adipozyten sind flach und am Rand lokalisiert (roter Pfeil). Die Zellgrenzen sind in der H&E-Färbung spärlich angefärbt nur schwach zu erkennen.</i>	39
<i>Abbildung 15: CLSM-Scan des Lipoms aus Abbildung 14. Auch hier ist Bindegewebe zwischen den Adipozyten zu erkennen, welches sich im Vergleich zum H&E-gefärbten Schnitt deutlich stärker anfärbt (lila Pfeil). Die exzentrisch gelegenen Zellkerne sind intensiver angefärbt (roter Pfeil). Die Zellgrenzen zwischen den Adipozyten sind im Vergleich zum H&E-gefärbten Schnitt aus Abbildung 14 deutlicher zu erkennen.</i>	39
<i>Abbildung 16: H&E-gefärbtes Präparat einer V. seborrhoica, 100-fache Vergrößerung. Zu sehen ist die Akanthose (geschwungene Klammer) sowie das braun erscheinende Melanin der pigmentierten Keratinozyten (schwarze Pfeile). Der weiße Pfeil zeigt auf ein Gefäß, apikal ist das Stratum corneum zu sehen (grüner Pfeil).</i>	40
<i>Abbildung 17: CLSM-Scan der V. seborrhoica aus Abbildung 16. Auch hier zeigt sich eine ausgeprägte Akanthose (geschwungene Klammer). Auch im CLSM-Scan sind Blutgefäße zu erkennen (weißer Pfeil). Unten rechts ist ein Haarfollikel zu sehen (orangener Pfeil).</i>	40
<i>Abbildung 18: H&E-gefärbtes Präparat eines hochdifferenzierten PEKs, 20-fache Vergrößerung. Es finden sich infiltrativ wachsende Nester atypischer</i>	

<i>Keratinocyten (blauer Pfeil). Diese zeigen zentral zahlreiche Hornperlen (gelber Pfeil). Begleitend findet sich ein lymphozytäres Infiltrat (roter Pfeil).....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 19: CLSM-Scan des hochdifferenzierten PEKs aus Abbildung 18. Auch im CLSM-Scan zeigen sich infiltrative Nester atypischer Keratinocyten mit zahlreichen Hornperlen (gelber Pfeil) sowie lymphozytäres Infiltrat (roter Pfeil).</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 20: H&E-gefärbtes Präparat eines Abszesses (halbierte Stanze), 20-fache Vergrößerung. Tief dermal gelegen findet sich eine neutrophilenreiche Entzündungsreaktion, begleitend auch lymphozytäre und histiozytäre Infiltrate (roter Pfeil), ganz unten ist univakuoläres Fettgewebe zu sehen. Aufgrund des Einbettens in Paraffin ist es zu Artefakten (Überlagerungen und Rissbildung) im Präparat gekommen (schwarze Sterne).</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 21: CLSM-Scan des Abszesses aus Abbildung 20. In der tiefen Dermis finden sich entzündliche Infiltrate (rote Pfeile), ganz unten ist univakuoläres Fettgewebe zu sehen. Auch ein Gefäßbaum ist zu erkennen (weißer Pfeil).</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 22: Darstellung eines Gefäßbaums in einem CLSM-Scan. Das Epithel des Gefäßes ist angeschnitten, das Lumen jedoch nicht eröffnet. Die Zellkerne sind dunkel angefärbt. Das Gefäß ist von kollagenen Fasern (blauer Pfeil) sowie teilweise auch Fettgewebe (gelber Pfeil) umgeben. Parallel zum Gefäß verläuft ein Nerv (grüner Pfeil, vergleiche auch Abbildung 24)</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 23: Darstellung von Gefäßen in einem CLSM-Scan. Das Lumen ist eröffnet, die flachen, dunkel angefärbten Zellkerne des Endothels sind randständig zu erkennen (schwarze Pfeile).</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 24: Ausschnitt eines CLSM-Scans. Ein Nerv (grüner Pfeil) verläuft parallel zu einem Gefäß (schwarzer Pfeil). Der Nerv ist von mehreren Lamellen flacher Zellen umgeben, welche einen länglichen Zellkern aufweisen (gelber Pfeil), welcher dunkel gefärbt ist. Um den Nerv findet sich Bindegewebe (blauer Pfeil), welches den Nerv schützt.</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 25: Ausschnitt eines H&E-gefärbter Schnitte, 40-fache Vergrößerung. Die einzelnen Muskelfasern färben sich rot an. Randständig sind in blau die Kerne zu erkennen (schwarzer Pfeil).</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 26: Ausschnitt eines CLSM-Scans. Darstellung von Muskelfasern in hellblau. Die Zellkerne sind dunkelblau gefärbt (schwarzer Pfeil). Links ist Fettgewebe zu erkennen (gelber Pfeil).</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 27: Ausschnitt eines CLSM-Scans mit Darstellung von elastischem Knorpel. Zu sehen sind die Chondrozyten (schwarzer Pfeil) sowie die dunkel angefärbten elastischen Fasern (gelber Pfeil).</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 28: Ausschnitt eines CLSM-Scans mit Darstellung eines ekkrinen Schweißdrüsenendstücks. Der Gang ist mehrfach angeschnitten. Zu sehen sind</i>	

sowohl helle, seröse Zellen (weißer Pfeil) als auch dunkle, muköse Zellen (schwarzer Pfeil). Die Drüse ist von Fettgewebe umgeben (gelber Pfeil). 47

Abbildung 29: Ausschnitt eines CLSM-Scans mit Darstellung eines Ausführungsganges einer ekkrinen Schweißdrüse. Der Gang verläuft nicht mehr geknäult, sondern gerade durch Dermis und Epidermis. Das Epithel ist kubisch, die Zellen sind im CLSM-Scan stark dunkel angefärbt (schwarzer Pfeil). 48

Abbildung 30: Ausschnitt eines CLSM-Scans mit Haarfollikel, Talgdrüse und ekkriner Schweißdrüse. Der Haarfollikel zeigt den Haarschaft (roter Pfeil), die epitheliale Wurzelscheide sowie das umgebende Bindegewebe (blauer Pfeil). Rechts neben dem Haarfollikel ist eine Talgdrüse (grüner Pfeil), unterhalb des Haarfollikels eine Schweißdrüse (orangener Pfeil) zu sehen. Der M. arector pili ist auf diesem Scan nicht dargestellt..... 49

Abbildung 31: Ausschnitt eines CLSM-Scans mit Darstellung einer Talgdrüse. Die Talgdrüse ist in Läppchen gegliedert. Die peripheren Zellen erscheinen dunkelblau (blauer Pfeil), die zentralen Zellen erscheinen durch die Lipidvakuolen heller und haben mittig den Zellkern (schwarzer Pfeil). Unterhalb der Epidermis zeigt sich aufgrund des Lichtschadens eine ausgeprägte solare Elastose (roter Pfeil), die Talgdrüse ist von Fettgewebe (gelber Pfeil) umgeben. 50

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht über die Anzahl und Art der Präparate.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 2: Übersicht über die Diagnosen und Subtypen der Fragestellung 1: Basalzellkarzinome</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 3: benötigte Zeit für die Befundung der Scans der Fragestellung 1 (BZK) durch Dermatopathologin A und Dermatopathologe B.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 4: Übersicht über die diagnostische Genauigkeit von Dermatopathologin A für die Fragestellung 1: Basalzellkarzinome</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 5: Übersicht über die diagnostische Genauigkeit von Dermatopathologe B für die Fragestellung 1: Basalzellkarzinome</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 6: Übersicht über die benötigten Zeiten für die Befundung der melanozytären Läsionen durch Dermatopathologin A und Dermatopathologe B.</i>	<i>59</i>
<i>Tabelle 7: Übersicht über die Genauigkeit der Diagnosen durch Dermatopathologin A für die Fragestellung 2 – Melanozytäre Läsionen</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 8: Übersicht über die Genauigkeit der Diagnosen durch Dermatopathologe B für die Fragestellung 2 – Melanozytäre Läsionen</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 9: Übersicht über die Diagnosen Allgemeine Dermatologie (Fragestellung 3) mit Häufigkeit und Anzahl der Präparate. Zur besseren Auswertbarkeit der Daten wurden teilweise unterschiedliche, aber ähnliche Diagnosen in Gruppen zusammengefasst.</i>	<i>64</i>
<i>Tabelle 10: Übersicht über die benötigten Zeiten für die Befundung der Präparate der allgemeinen Dermatologie durch Dermatopathologin A und Dermatopathologe B.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 11: Übersicht über die diagnostische Genauigkeit bei der Auswertung der CLSLM-Befundung durch Dermatopathologin A für die Fragestellung 3 – allgemeine Dermatologie.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 12: Übersicht über die diagnostische Genauigkeit bei der Auswertung der CLSLM-Befundung durch Dermatopathologe B für die Fragestellung 3 – allgemeine Dermatologie.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabelle 13: Übersicht über die Ergebnisse der Fragestellungen BZK, Melanozytäre Läsionen sowie die Präparate der Allgemeinen Dermatologie....</i>	<i>69</i>

Literaturverzeichnis

1. World Cancer Research Fund. *Skin cancer statistics* [cited 2020, October 18]; Available from: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/skin-cancer-statistics>.
2. Gomolin, T., Cline, A. and Handler, M.Z., *The danger of neglecting melanoma during the COVID-19 pandemic*. Journal of Dermatological Treatment, 2020. **31**(5): p. 444-445. DOI: 10.1080/09546634.2020.1762844.
3. Quante, A.S., Ming, C., Rottmann, M., Engel, J., Boeck, S., Heinemann, V., Westphalen, C.B. and Strauch, K., *Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030*. Cancer Medicine, 2016. **5**(9): p. 2649-2656. DOI: 10.1002/cam4.767.
4. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe and AWMF. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prävention von Hautkrebs*. 2020 [cited 2021, January 7]; Langversion 2.01 (Konsultationsfassung), AWMF Registernummer: 032/052OL:[Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hautkrebs-praevention/>].
5. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe and AWMF. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms*. 2020 [cited 2021, January 7]; Langversion 3.3, 2020, AWMF Registernummer: 032/024OL]. Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/>.
6. Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C.R. and Alaibac, M., *Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification*. In Vivo, 2014. **28**(6): p. 1005-11.
7. Whiteman, D. and Green, A., *Melanoma and sunburn*. Cancer Causes Control, 1994. **5**(6): p. 564-72. DOI: 10.1007/bf01831385.
8. Garbe, C., *Risk factors for the development of malignant melanoma and identification of risk groups in German-speaking regions*. Hautarzt, 1995. **46**(5): p. 309-14. DOI: 10.1007/s001050050257.
9. Shain, A.H. and Bastian, B.C., *From melanocytes to melanomas*. Nature Reviews Cancer, 2016. **16**(6): p. 345-358. DOI: 10.1038/nrc.2016.37.
10. Shitara, D., Nascimento, M.M., Puig, S., Yamada, S., Enokihara, M.M.S.S., Michalany, N. and Bagatin, E., *Nevus-Associated Melanomas: Clinicopathologic Features*. American Journal of Clinical Pathology, 2014. **142**(4): p. 485-491. DOI: 10.1309/ajcp4I5cJgktjvdd.
11. Titus-Ernstoff, L., Perry, A.E., Spencer, S.K., Gibson, J.J., Cole, B.F. and Ernstoff, M.S., *Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk*. Int J Cancer, 2005. **116**(1): p. 144-9. DOI: 10.1002/ijc.21001.
12. McCusker, M., Basset-Seguín, N., Dummer, R., Lewis, K., Schadendorf, D., Sekulic, A., Hou, J., Wang, L., Yue, H. and Hauschild, A., *Metastatic basal cell carcinoma: Prognosis dependent on anatomic site and spread*

- of disease. *European Journal of Cancer*, 2014. **50**(4): p. 774-783. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.12.013>.
13. Prieto-Granada, C. and Rodriguez-Waitkus, P., *Basal cell carcinoma: Epidemiology, clinical and histologic features, and basic science overview*. *Current Problems in Cancer*, 2015. **39**(4): p. 198-205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2015.07.004>.
 14. Prieto-Granada, C. and Rodriguez-Waitkus, P., *Cutaneous squamous cell carcinoma and related entities: Epidemiology, clinical and histological features, and basic science overview*. *Current Problems in Cancer*, 2015. **39**(4): p. 206-215. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2015.07.005>.
 15. Breuninger, H., Brantsch, K.D., Eigentler, T. and Häfner, H.-M., *Comparison and evaluation of the current staging of cutaneous carcinomas*. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2012. **10**(8): p. 579-586. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2012.07896.x>.
 16. Nissinen, L., Farshchian, M., Riihilä, P. and Kähäri, V.-M., *New perspectives on role of tumor microenvironment in progression of cutaneous squamous cell carcinoma*. *Cell and Tissue Research*, 2016. **365**(3): p. 691-702. DOI: 10.1007/s00441-016-2457-z.
 17. Brantsch, K.D., Meisner, C., Schönfish, B., Trilling, B., Wehner-Caroli, J., Röcken, M. and Breuninger, H., *Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study*. *The Lancet Oncology*, 2008. **9**(8): p. 713-720. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70178-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70178-5).
 18. Potenza, C., Bernardini, N., Balduzzi, V., Losco, L., Mambrin, A., Marchesiello, A., Tolino, E., Zuber, S., Skroza, N. and Proietti, I., *A Review of the Literature of Surgical and Nonsurgical Treatments of Invasive Squamous Cells Carcinoma*. *BioMed Research International*, 2018. **2018**: p. 9489163. DOI: 10.1155/2018/9489163.
 19. Eigentler, T.K., Leiter, U., Häfner, H.-M., Garbe, C., Röcken, M. and Breuninger, H., *Survival of Patients with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Results of a Prospective Cohort Study*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2017. **137**(11): p. 2309-2315. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.06.025>.
 20. Lang, B.M., Balermipas, P., Bauer, A., Blum, A., Brölsch, G.F., Dirschka, T., Follmann, M., Frank, J., Frerich, B., Fritz, K., Hauschild, A., Heindl, L.M., Howaldt, H.-P., Ihrler, S., Kakkassery, V., Klumpp, B., Krause-Bergmann, A., Löser, C., Meissner, M., Sachse, M.M., Schlaak, M.S., M. P. , Tischendorf, L., Tronnier, M., Vordermark, D., Welzel, J., Weichenthal, M., Wiegand, S., Kaufmann, R., and Grabbe, S. *S2k-Leitlinie Basalzellkarzinom der Haut* [cited 2021, January 8]; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-021l_S2k_Basalzellkarzinom-der-Haut_2018-09_01.pdf.
 21. Löser, C.R., Rempel, R., Möhrle, M., Häfner, H.-M., Kunte, C., Hassel, J., Hohenleutner, U., Podda, M., Sebastian, G., Hafner, J., Kaufmann, R. and Breuninger, H., *S1-Leitlinie: Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie*

- (MKC). JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2015. **13**(9): p. 942-951. DOI: https://doi.org/10.1111/ddg.140_12665.
22. Paoli, J., Cogrel, O., Van der Geer, S., Krekels, G., De Leeuw, L., Moehrle, M., Ostertag, J., Ríos Buceta, L., Sheth, N. and Läubli, S., *ESMS position document on the use of Mohs micrographic surgery and other micrographic surgery techniques in Europe*. 2020 [cited 2020 October 28]; Available from: <https://esms-mohs.eu/>.
 23. Eberle, F.C., Schippert, W., Trilling, B., Röcken, M. and Breuninger, H., *Cosmetic results of histographically controlled excision of non-melanoma skin cancer in the head and neck region*. J Dtsch Dermatol Ges, 2005. **3**(2): p. 109-12. DOI: 10.1111/j.1610-0378.2005.04738.x.
 24. Moehrle, M., Breuninger, H. and Röcken, M., *A confusing world: what to call histology of three-dimensional tumour margins?* Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2007. **0**(0): p. 070328074210014. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2007.02187.x.
 25. Breuninger, H. and Schaumburg-Lever, G., *Control of excisional margins by conventional histopathological techniques in the treatment of skin tumours. An alternative to Mohs' technique*. The Journal of Pathology, 1988. **154**(2): p. 167-171. DOI: 10.1002/path.1711540209.
 26. Eberle, F.C., Kanyildiz, M., Schnabl, S.M., Schulz, C., Häfner, H.-M., Adam, P. and Breuninger, H., *Three dimensional (3D) histology in daily routine: practical implementation and its evaluation*. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2014. **12**(11): p. 1028-1035. DOI: <https://doi.org/10.1111/ddg.12466>.
 27. Bayguinov, P.O., Oakley, D.M., Shih, C.-C., Geanon, D.J., Joens, M.S. and Fitzpatrick, J.A.J., *Modern Laser Scanning Confocal Microscopy*. Current Protocols in Cytometry, 2018. **85**(1): p. e39. DOI: 10.1002/cpcy.39.
 28. Krammer, S., *Anwendungsmöglichkeiten der ex-vivo konfokalen Laserscanmikroskopie in der Dermatologie bei verschiedenen Tumorentitäten*, in *Medizinische Fakultät*. 2019, Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
 29. Ilie, M.A., Caruntu, C., Lupu, M., Lixandru, D., Tampa, M., Georgescu, S.-R., Bastian, A., Constantin, C., Neagu, M., Zurac, S.A. and Boda, D., *Current and future applications of confocal laser scanning microscopy imaging in skin oncology*. Oncology letters, 2019. **17**(5): p. 4102-4111. DOI: 10.3892/ol.2019.10066.
 30. Roderfeld, M., Matern, S. and Roeb, E., *Konfokale Laserscanning-Mikroskopie: Der Blick in die Zelle*. Dtsch Med Wochenschr, 2003. **128**(48): p. 2539-2542. DOI: 10.1055/s-2003-44951.
 31. Schürmann, M., Stecher, M.M., Paasch, U., Simon, J.C. and Grunewald, S., *Evaluation of digital staining for ex vivo confocal laser scanning microscopy*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2019. DOI: 10.1111/jdv.16085.
 32. Bağcı, I.S., Aoki, R., Krammer, S., Ruzicka, T., Sárdy, M. and Hartmann, D., *Ex vivo confocal laser scanning microscopy: An innovative method for direct immunofluorescence of cutaneous vasculitis*. Journal of

- Biophotonics, 2019. **12**(9): p. e201800425. DOI: 10.1002/jbio.201800425.
33. Paddock, S.W., *Confocal Laser Scanning Microscopy*. BioTechniques, 1999. **27**(5): p. 992-1004. DOI: 10.2144/99275ov01.
 34. Gareau, D.S., *Feasibility of digitally stained multimodal confocal mosaics to simulate histopathology*. Journal of Biomedical Optics, 2009. **14**(3): p. 034050. DOI: 10.1117/1.3149853.
 35. Shahriari, N., Grant-Kels, J.M., Rabinovitz, H., Oliviero, M. and Scope, A., *In vivo reflectance confocal microscopy image interpretation for the dermatopathologist*. Journal of Cutaneous Pathology, 2018. **45**(3): p. 187-197. DOI: 10.1111/cup.13084.
 36. Peters, N., *Direktuntersuchung mit der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) und der „Rapid Lump Examination“ (RLE) im Vergleich zu Paraffinschnitten bei der mikrographisch kontrollierten Chirurgie von Basalzellkarzinomen*, in *Universitäts Hautklinik Tübingen*. 2018, Eberhard Karls Universität zu Tübingen
 37. Carrera, C., Puig, S. and Malveyh, J., *In vivo confocal reflectance microscopy in melanoma*. Dermatologic Therapy, 2012. **25**(5): p. 410-422. DOI: 10.1111/j.1529-8019.2012.01495.x.
 38. Sauermann, K., Gambichler, T., Wilmert, M., Rotterdam, S., Stücker, M., Altmeyer, P. and Hoffmann, K., *Investigation of basal cell carcinoma by confocal laser scanning microscopy in vivo*. Skin Research and Technology, 2002. **8**(3): p. 141-147. DOI: 10.1034/j.1600-0846.2002.20345.x.
 39. Malveyh, J., Pérez-Anker, J., Toll, A., Pigem, R., Garcia, A., Alos, L.L. and Puig, S., *Ex vivo confocal microscopy: revolution in fast pathology in dermatology*. British Journal of Dermatology, 2020. **183**(6). DOI: 10.1111/bjd.19017.
 40. Karen, J.K., Gareau, D.S., Dusza, S.W., Tudisco, M., Rajadhyaksha, M. and Nehal, K.S., *Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy*. British Journal of Dermatology, 2009. **160**(6): p. 1242-1250. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2009.09141.x.
 41. Larson, B., Abeytunge, S., Seltzer, E., Rajadhyaksha, M. and Nehal, K., *Detection of skin cancer margins in Mohs excisions with high-speed strip mosaicing confocal microscopy: a feasibility study*. British Journal of Dermatology, 2013. **169**(4): p. 922-926. DOI: 10.1111/bjd.12444.
 42. Bennassar, A., Vilata, A., Puig, S. and Malveyh, J., *Ex vivo fluorescence confocal microscopy for fast evaluation of tumour margins during Mohs surgery*. Br J Dermatol, 2014. **170**(2): p. 360-5. DOI: 10.1111/bjd.12671.
 43. Mu, E.W., Lewin, J.M., Stevenson, M.L., Meehan, S.A., Carucci, J.A. and Gareau, D.S., *Use of Digitally Stained Multimodal Confocal Mosaic Images to Screen for Nonmelanoma Skin Cancer*. JAMA Dermatology, 2016. **152**(12): p. 1335. DOI: 10.1001/jamadermatol.2016.2997.
 44. Espinasse, M., Cinotti, E., Grivet, D., Labeille, B., Prade, V., Douchet, C., Cambazard, F., Thuret, G., Gain, P. and Perrot, J.L., *‘En face’ ex vivo reflectance confocal microscopy to help the surgery of basal cell*

- carcinoma of the eyelid*. Clinical & Experimental Ophthalmology, 2017. **45**(5): p. 442-447. DOI: 10.1111/ceo.12904.
45. Longo, C., Pampena, R., Bombonato, C., Gardini, S., Piana, S., Mirra, M., Raucci, M., Kyrgidis, A., Pellacani, G. and Ragazzi, M., *Diagnostic accuracy of ex vivo fluorescence confocal microscopy in Mohs surgery of basal cell carcinomas: a prospective study on 753 margins*. British Journal of Dermatology, 2019. **180**(6): p. 1473-1480. DOI: 10.1111/bjd.17507.
 46. Hartmann, D., Krammer, S., Bachmann, M.R., Mathemeier, L., Ruzicka, T., Bagci, I.S. and von Braunmühl, T., *Ex vivo confocal microscopy features of cutaneous squamous cell carcinoma*. Journal of Biophotonics, 2018. **11**(4): p. e201700318. DOI: 10.1002/jbio.201700318.
 47. Hartmann, D., Krammer, S., Vural, S., Bachmann, M.R., Ruini, C., Sardy, M., Ruzicka, T., Berking, C. and von Braunmühl, T., *Immunofluorescence and confocal microscopy for ex-vivo diagnosis of melanocytic and non-melanocytic skin tumors: A pilot study*. Journal of Biophotonics, 2018. **11**(3). DOI: 10.1002/jbio.201700211.
 48. Bennassar, A., Vilalta, A., Carrera, C., Puig, S. and Malvehy, J., *Rapid Diagnosis of Two Facial Papules Using Ex Vivo Fluorescence Confocal Microscopy: Toward a Rapid Bedside Pathology*. Dermatol Surg, 2012. **38**(9): p. 1548-1551. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2012.02467.x.
 49. Hartmann, D., Krammer, S., Ruini, C., Ruzicka, T. and von Braunmühl, T., *Correlation of histological and ex-vivo confocal tumor thickness in malignant melanoma*. Lasers in Medical Science, 2016. **31**(5): p. 921-927. DOI: 10.1007/s10103-016-1936-5.
 50. Hartmann, D., Ruini, C., Mathemeier, L., Bachmann, M.R., Dietrich, A., Ruzicka, T. and von Braunmühl, T., *Identification of ex-vivo confocal laser scanning microscopic features of melanocytic lesions and their histological correlates*. Journal of Biophotonics, 2017. **10**(1): p. 128-142. DOI: 10.1002/jbio.201500335.
 51. Cinotti, E., Haouas, M., Grivet, D. and Perrot, J.L., *In Vivo and Ex Vivo Confocal Microscopy for the Management of a Melanoma of the Eyelid Margin*. Dermatol Surg, 2015. **41**(12): p. 1437-1440. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000517.
 52. Hartmann, D., Ruini, C., Mathemeier, L., Dietrich, A., Ruzicka, T. and von Braunmühl, T., *Identification of ex-vivo confocal scanning microscopic features and their histological correlates in human skin*. Journal of Biophotonics, 2016. **9**(4): p. 376-87. DOI: 10.1002/jbio.201500124.
 53. Peters, N., Schubert, M., Metzler, G., Geppert, J.P. and Moehrle, M., *Diagnostic accuracy of a new ex vivo confocal laser scanning microscope compared to H&E-stained paraffin slides for micrographic surgery of basal cell carcinoma*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2019. **33**(2): p. 298-304. DOI: 10.1111/jdv.15243.
 54. Ziefle, S., Schüle, D., Breuninger, H., Schippert, W. and Möhrle, M., *Confocal Laser Scanning Microscopy vs 3-Dimensional Histologic Imaging in Basal Cell Carcinoma*. Archives of Dermatological Research, 2010. **146**(8).

55. Hartmann, D., Krammer, S., Bachmann, M.R., Mathemeier, L., Ruzicka, T. and von Braunmühl, T., *Simple 3-criteria-based ex vivo confocal diagnosis of basal cell carcinoma*. Journal of Biophotonics, 2018. **11**(7): p. e201800062. DOI: 10.1002/jbio.201800062.
56. Schule, D., Breuninger, H., Schippert, W., Dietz, K. and Moehrle, M., *Confocal laser scanning microscopy in micrographic surgery (three-dimensional histology) of basal cell carcinomas*. British Journal of Dermatology, 2009. **161**(3): p. 698-700. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2009.09354.x.
57. Perez-Anker, J., Ribero, S., Yelamos, O., Garcia-Herrera, A., Alos, L., Alejo, B., Combalia, M., Moreno-Ramirez, D., Malveyh, J. and Puig, S., *Basal cell carcinoma characterization using fusion ex vivo confocal microscopy: a promising change in conventional skin histopathology*. British Journal of Dermatology, 2019. DOI: 10.1111/bjd.18239.
58. Bennassar, A., Carrera, C., Puig, S., Vilalta, A. and Malveyh, J., *Fast evaluation of 69 basal cell carcinomas with ex vivo fluorescence confocal microscopy: criteria description, histopathological correlation, and interobserver agreement*. JAMA Dermatol, 2013. **149**(7): p. 839-47. DOI: 10.1001/jamadermatol.2013.459.
59. Longo, C., Ragazzi, M., Castagnetti, F., Gardini, S., Palmieri, T., Lallas, A., Moscarella, E., Piana, S., Pellacani, G., Zalaudek, I. and Argenziano, G., *Inserting ex vivo fluorescence confocal microscopy perioperatively in Mohs micrographic surgery expedites bedside assessment of excision margins in recurrent basal cell carcinoma*. Dermatology, 2013. **227**(1): p. 89-92. DOI: 10.1159/000353577.
60. Mercuri, S.R., Rizzo, N., Bellinzona, F., Pampena, R., Brianti, P., Moffa, G., Colombo Flink, L., Bearzi, P., Longo, C. and Paolino, G., *Digital ex-vivo confocal imaging for fast Mohs surgery in nonmelanoma skin cancers: An emerging technique in dermatologic surgery*. Dermatologic Therapy, 2019. **32**(6): p. e13127. DOI: 10.1111/dth.13127.
61. Dinnes, J., Deeks, J.J., Saleh, D., Chuchu, N., Bayliss, S.E., Patel, L., Davenport, C., Takwoingi, Y., Godfrey, K., Matin, R.N. and et al., *Reflectance confocal microscopy for diagnosing cutaneous melanoma in adults*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2018(12). DOI: 10.1002/14651858.CD013190.
62. Bundesverband Deutscher Pathologen e. V. *Leitfaden Digitale Pathologie in der Diagnostik – Befunderstellung an digitalen Bildern*. 2018 [cited 2021 March 23]; Available from: https://www.pathologie.de/fachinfos/nachschlagewerke-handbuchreihe/leitfaeden/leitfaeden-detailansicht/?tx_ttnews%5Btt_news%5D=1480&cHash=ec31a0751fdcf421977056e5aafdd387.
63. Kollias, N., *The Spectroscopy of Human Melanin Pigmentation*. 1995.
64. Bertoni, L., Azzoni, P., Reggiani, C., Pisciotta, A., Carnevale, G., Chester, J., Kaleci, S., Reggiani Bonetti, L., Cesinaro, A.M., Longo, C. and Pellacani, G., *Ex vivo fluorescence confocal microscopy for intraoperative, real-time diagnosis of cutaneous inflammatory diseases:*

- A preliminary study*. *Experimental Dermatology*, 2018. **27**(10): p. 1152-1159. DOI: 10.1111/exd.13754.
65. Mentzel, J., Stecher, M.M., Paasch, U., Simon, J.C. and Grunewald, S., *Ex vivo confocal laser scanning microscopy with digital staining is able to map characteristic histopathological features and tissue reaction patterns of inflammatory skin diseases*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2021. **35**(4). DOI: 10.1111/jdv.17006.
66. Bagci, I.S., Aoki, R., Krammer, S., Ruzicka, T., Sardy, M., French, L.E. and Hartmann, D., *Ex vivo confocal laser scanning microscopy for bullous pemphigoid diagnostics: new era in direct immunofluorescence?* *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2019. **33**(11): p. 2123-2130. DOI: 10.1111/jdv.15767.
67. Leclercq, A., Cinotti, E., Labeille, B., Perrot, J.L. and Cambazard, F., *Ex vivo confocal microscopy: a new diagnostic technique for mucormycosis*. *Skin Research and Technology*, 2016. **22**(2): p. 203-207. DOI: 10.1111/srt.12251.
68. Forest, F., Cinotti, E., Habougit, C., Ginguéné, C., Perrot, J.L., Labeille, B., Flori, P., Botelho-Nevers, E. and Pécóh, M., *Rapid characterization of human brain aspergillosis by confocal microscopy on a thick squash preparation*. *Cytopathology*, 2016. **27**(3): p. 221-222. DOI: 10.1111/cyt.12258.
69. Cinotti, E., Perrot, J.L., Labeille, B., Raberin, H., Flori, P. and Cambazard, F., *Hair dermatophytosis diagnosed by reflectance confocal microscopy: six cases*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2015. **29**(11): p. 2257-2259. DOI: 10.1111/jdv.12557.
70. Bagci, I.S., Aoki, R., Krammer, S., Ruzicka, T., Sardy, M. and Hartmann, D., *Ex vivo confocal laser scanning microscopy: An innovative method for direct immunofluorescence of cutaneous vasculitis*. *Journal of Biophotonics*, 2019. **12**(9): p. e201800425. DOI: 10.1002/jbio.201800425.

Erklärung zum Eigenanteil

Die Studie wurde in der „Praxisklinik Tübingen - Haut und Venen“ unter Betreuung durch Prof. Dr. Matthias Möhrle durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Möhrle.

Die Entnahme der Proben erfolgte durch Prof. Dr. Möhrle, Dr. Kauder und Dr. Krug. Das Scannen der Proben erfolgte durch mich. Die Befundung der H&E-gefärbten Schnitte sowie der CLSM-Scans erfolgte durch Dr. Gisela Metzler sowie Dr. Stephan Forchhammer. Dr. Forchhammer erstellte die in dieser Arbeit verwendeten Fotos der H&E-gefärbten Objektträger.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Anne-Kristin Münch (Institut für Biometrie, Tübingen). Die Tabellen 3-12 stammen von Frau Münch.

Die Betreuung der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Möhrle. Die Korrektur des Manuskriptes erfolgte ebenfalls durch Prof. Dr. Möhrle.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Möhrle verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 20.10.2021

Hanna Ogrzewalla

Danksagung

Mein größter Dank gilt zuallererst Prof. Dr. med. Matthias Möhrle, dessen außerordentliches Engagement diese Arbeit entscheidend geprägt und vorangebracht hat. Herzlichen Dank für das Überlassen des Themas sowie für die zahllosen Stunden an Unterstützung und Hilfestellungen. Herzlichen Dank auch für die schnellen Rückmeldungen und die gute Erreichbarkeit. Ohne Prof. Dr. Möhrle wäre die vorliegende Arbeit nicht in der Form möglich gewesen. Für die hervorragende Betreuung bin ich sehr dankbar.

(Und: danke für die mit sanftem Nachdruck versehene Kritik durch Prof. Möhrle an meiner Angewohnheit, alles Wichtige auf kleine Zettelchen zu schreiben. Ich habe mein Notizbuch mittlerweile sehr zu schätzen gelernt und würde es gegen nichts in der Welt wieder gegen meine alte „Zettelwirtschaft“ eintauschen!)

Vielen Dank an das Praxisteam von Prof. Dr. med. Möhrle für den herzlichen Empfang, die fröhliche Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei Problemen.

Herzlichen Dank auch an Dr. med. Gisela Metzler und Dr. med. Stephan Forchhammer für die zeitaufwändige Befundung aller Präparate sowie die Erklärung der histologischen Präparate. Vielen Dank an Dr. med. Stephan Forchhammer für das Erstellen der Fotos der H&E-gefärbten Schnitte, die problemlose Kommunikation und die Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion. Vielen Dank an Dr. med. Gisela Metzler für die Erklärung so vieler H&E-Schnitte und die spannenden Gespräche.

Des Weiteren möchte ich dem Team des Instituts für Dermatohistologie, Pathologie und Zytologie für die Einblicke in das Histologie-Labor sowie für die unermüdliche Suche nach fehlenden Objektträgern danken.

Vielen herzlichen Dank an Frau Münch vom Institut für Biometrie Tübingen für die statistische Beratung, das Engagement und die verständlichen Erklärungen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Eigentler für die Zweitbetreuung der Doktorarbeit und die Unterstützung beim Verfassen wissenschaftlicher Texte.

Und zuletzt möchte ich noch meinem Freund danken, der mir stets mit großer Geduld bei jeglichen Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand und mir durch meine Formatierungs-Krisen half.