

**Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Röcken**

**Konfokale Laser Scanning Mikroskopie vs 3D-
Histologie in Paraffinschnitten in der mikroskopisch
kontrollierten Chirurgie von Basalzellkarzinomen**

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

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

vorgelegt von

Sarah Ziefle

aus

Nagold

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Möhrle

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Maassen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Das Basalzellkarzinom	5
1.2 Mohs mikroskopisch kontrollierte Chirurgie und 3D-Histologie	6
1.3 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).....	8
2. Material und Methoden	10
2.1 Vorversuche	10
2.1.1 Färbungen	10
2.1.2 Pigmentiertes Gewebe	13
2.2 Gewebeproben zur Erhebung der Studie.....	15
2.3 Exzision und Aufbereitung des Gewebes	15
2.3.1 Sicherheitsabstand.....	16
2.3.2 Makroskopischer Zuschnitt.....	17
2.4 Inkubation und Färbung des Gewebes	21
2.5 Konfokale Laser Scanning-Mikroskopie	22
2.5.1 VivaScope 2500	25
2.6 Platzierung des Gewebes	27
2.7 Entstehung der konfokalen Mosaike	27
2.8 Vergleich von konfokalen Mosaiken und konventionell hergestellten histopathologischen Schnitten	28
2.9 Statistik	31
3. Ergebnisse	33
3.1 Diagnostizierte BZK-Subtypen	33

3.2 Schnellere Auswertung von chirurgischen Präparaten mittels CLSM	34
3.3 Vergleich zwischen Histologie und CLSM.....	35
4. Diskussion.....	41
4.1 Genauigkeit der CLSM.....	41
4.2 Schnelligkeit/Zeit	44
4.3 Technische Fortschritte der Gewebsbehandlung	45
4.4 Technische Fortschritte und Herausforderungen der CLSM	46
4.5 Fazit	48
5. Zusammenfassung	50
6. Literaturverzeichnis	52
7. Veröffentlichung	55
Publikation.....	55
8. Erklärung zum Eigenanteil	61
9. Danksagung	63
10. Lebenslauf.....	64

1. Einleitung

1.1 Das Basalzellkarzinom

Das Basalzellkarzinom (BZK, Basaliom) ist ein Tumor, der von den Basalzellen der Epidermis ausgeht. Dieser Tumor wächst lokal infiltrierend und destruierend, metastasiert aber in der Regel nicht. Das BZK ist bei steigender Inzidenz (1,2) von weltweit ungefähr 70% aller malignen Hauterkrankungen (3,4) der häufigste Hauttumor (5).

Aufgrund einer größeren Sonnenexposition entstehen BZKs hauptsächlich im Bereich des Kopfes und Halses. Personen mit einer genetischen Disposition aufgrund geringer Hautpigmentierung haben ebenfalls ein höheres Risiko an einem BZK zu erkranken.

Man unterscheidet histologisch verschiedene Subtypen von BZK. Die Haupttypen sind:

- Das *solide/noduläre BZK* ist die am häufigsten vorkommende Art. Im Normalfall hautfarbenes, glasiges, derbes und schmerzloses Knötchen mit feinen Teleangiektasien. Durch zentrale Einsenkung entsteht der typisch perlartige Randsaum. Diese Form neigt oftmals zu zentraler Ulzeration mit hämorrhagischer Verkrustung.
- Das *fibrosierendes BZK* kommt vor allem an Nase, Stirn und Wange vor. Ist schwer erkennbar, meist wachsartig, flach und besitzt eine schlecht abgrenzbare Infiltrationsplatte.
- Das *solid-fibrosierende BZK* ist eine Mischung aus solidem und fibrosierendem BZK. Meist zentral als noduläres Basaliom erkennbar, doch mit fibrosierenden, klinisch schwer erkennbaren Ausläufern.

- Das *superfizielle BZK* ist ein sehr oberflächlich gelegenes plaqueförmiges Basaliom. Meist symptomlos, langsam wachsend und scharf begrenzt. Insbesondere bei Bräunung der umgebenden Haut treten die Läsionen als hellere rötliche Plaques mit glänzendem Randsaum auf.

Ein definiert abgrenzbarer Rand ist das Erkennungsmerkmal beim nodulären BZK, weshalb dieses leicht von den anderen Subtypen zu unterscheiden ist. Die anderen Formen hingegen sind schwieriger vom gesunden Gewebe abzugrenzen. Hier spielt für die diagnostische Sicherheit und RO-Resektion (Exzision des Tumors im Gesunden) die Histopathologie eine wichtige Rolle.

1.2 Mohs mikroskopisch kontrollierte Chirurgie und 3D-Histologie

Frederic E. Mohs war der erste Operateur, der im Jahre 1941 die lückenlose histologische Untersuchungen der chirurgisch exzidierten Ränder eingeführt hat. Diese Technik wird auch „Mohs´ micrographic surgery“ genannt (6,7). Aufgrund des chirurgischen und histologischen Vorgehens wurde diese Technik ursprünglich als Chemochirurgie begonnen. Ein Tumor wurde durch Zinkchloridplasten *in situ* fixiert und die Ränder des exzidierten Tumors wurden histopathologisch aufbereitet (7). Einige Jahre später wurde die Chemochirurgie durch normale Chirurgie mit einer Untersuchung des Gewebes an Gefrierschnitten („fresh tissue technique“) ersetzt (8). Nach heutigem Verständnis stellt Mohs´ mikroskopisch kontrollierte Chirurgie nicht eine spezielle chirurgische, sondern eher eine histopathologische Technik dar.

Es wird folgende Vorgehensweise angewendet (9,10,11):

Als erster Schritt findet eine Tumorabtragung statt. Je nach Größe und Lokalisation erfolgt dies durch eine Kürettage oder einer Resektion en bloc. Anschließend wird der Tumor unter topographischer Markierung komplett exziiert und in einem dritten Schritt wird das entnommene Gewebe aufbereitet, um eine Darstellung der Ränder durch Gefrierschnitte zu ermöglichen. Die Gefrierschnitte werden in der Regel durch den Operateur beurteilt. Nach diesem 20-45 Minuten andauernden Verfahren kann, sofern in den Rändern keine Tumorausläufer gefunden werden, der Exzisionsdefekt verschlossen werden. Sind in den histopathologischen Gefrierschnitten weiterhin Tumor tragende Ränder vorzufinden, wird das gesamte Verfahren so oft wiederholt bis tumorfreie Ränder vorliegen. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die Qualität dieser Schnitte schlechter als die von Paraffinschnitten ist. Diese sind jedoch aufwändiger herzustellen (9).

Die Exzision durch mikroskopisch kontrollierte Chirurgie ist die Standardbehandlung für BZKs, welche in kosmetisch bedeutenden und risikoreichen Bereichen des Gesichts entnommen werden müssen.

Breuninger führte einige Jahre danach die Technik der kompletten 3D-Histologie der exziierten Ränder mit Paraffinschnitten ein (12,13,14). Dieses Verfahren ist sehr präzise. Es ermöglicht eine genaue Exzision des tumorösen Gewebes und den Erhalt des gesunden umliegenden Gewebes.

In den vergangenen Jahren wurde der Weiterentwicklung der 3D-Histologie in Europa immer mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Für die Aufbereitung der Gewebeblöcke werden in letzter Zeit die Aufbereitungsverfahren "Tübinger Torte" (12-15) und "Muffin" (16,17) als Techniken der Wahl angewandt.

Für die "Tübinger Torte" wird von chirurgisch entferntem Exzidat ein schmaler lateraler Streifen vertikal um den kompletten Perimeter des exziierten Tumorgewebes entnommen. Dadurch ist eine komplette Visualisierung der Tumorränder möglich. Anschließend wird separat die Basis des Tumors untersucht. Bei der Muffin-Technik ist die Basis des exziierten Tumors in der

gleichen Ebene wie die lateralen Ränder. Dadurch wird eine 3D-Visualisierung in einem einzigen Schritt ermöglicht.

Die Präparate für die Tübinger Torte und Muffin werden in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Paraffinschnitte sind nach circa 20 Stunden verfügbar. Diese Prozedur wird so lange wiederholt bis die Randschnitte tumorfrei sind. Dies bedeutet, dass der Patient häufig stationär aufgenommen wird. Falls die Ränder nicht tumorfrei sind, kann sich dieser Aufenthalt um 2-4 Tage verlängern.

1.3 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Die "confocal laser scanning microscopy" (CLSM, Konfokale Laser Scanning Mikroskopie) ist eine sich neu entwickelnde Methode mikroskopischer Untersuchung in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie, die eine attraktive Alternative zur Kryostat-Histologie oder zum Paraffinschnittverfahren bieten könnte (18,19).

CLSM kann sowohl *in vivo* (am Hautgewebe vor der operativen Entfernung) als auch *ex vivo* (an chirurgisch entferntem Gewebe) angewandt werden.

Die *in vivo* CLSM wurde in den letzten Jahren schwerpunktmäßig zum Gegenstand der klinischen Forschung (5,20,21). Sie wird teilweise als alternatives Verfahren zur diagnostischen Probeentnahme angesehen, mit der die Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs minimiert werden könnte. Die *in vivo* CLSM ermöglicht eine optische Biopsie. Eine Darstellung der oberen Schichten der Haut (bis nur circa 300 µm) wird mit einem nicht invasivem Verfahren durchgeführt. Zelluläre Mikrostrukturen der Haut können in horizontalen "live" Schnitten beurteilt werden. Patienten kann durch dieses Verfahren eine schmerzhaft und möglicherweise unnötige Gewebsexzision erspart werden. Das Ergebnis liegt sofort vor, ohne jegliche Kontrastmittelaufnahme. Falls notwendig kann zu einem späterem Zeitpunkt noch eine Gewebsentnahme erfolgen.

In vivo CLSM wird im klinischen Alltag in verschiedenen Bereichen angewandt, unter anderem für melanozytäre Läsionen (schwarzer Hautkrebs und seine Frühformen) (22,23), nicht-melanozytäre Läsionen (heller Hautkrebs und seine Frühformen) (24), Verbrennungen (Differenzierung der Verbrennungsstadien) (25,26) und Dermatitis (Unterscheidung von irritativer und allergischer) (27,28).

Die *ex vivo* CLSM ist für den Bereich der operativen Dermatopathologie von großem Interesse, da hier zwar der chirurgische Eingriff nicht vermeidbar ist, aber die Wartezeit auf die histologisch angefertigten Schnitte um einiges verkürzt werden könnte. Durch die *ex vivo* CLSM wird eine zeitnahe Beurteilung des entnommenen Gewebes ermöglicht. Wird ein solches Verfahren im Rahmen einer Operation durchgeführt, könnte ein Zweiteingriff überflüssig werden. Für das *ex vivo* CLSM Verfahren gibt es derzeit nur Studien, aber keine klinisch anerkannte Anwendung des Verfahrens (19,29).

Der Schwerpunkt unserer Studie lag daher auf der *ex vivo* CLSM.

Das Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob die *ex vivo* CLSM eine schnellere und effektivere Alternative als das Standardverfahren der Paraffinschnitte und Histologie zur mikroskopischen Darstellung der Schnittländer von BZK des Gesichts darstellt. Es sollte außerdem geprüft werden, ob dieses neue Verfahren im klinischen OP-Ablauf angewandt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Vorversuche

Um die bestmögliche Färbung für frisch entnommenes BZK-Gewebe herauszufinden und um festzustellen, wie sich pigmentiertes gesundes Gewebe in der CLSM darstellt, wurde vor der Hauptuntersuchung eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt.

2.1.1 Färbungen

Die Vorversuche wurden mit den Färbemitteln Polyvinylpyrrolidoneiodin-Mischungen (9%), Pico-Fuchsin (1:5), Eosin (was auch für die Standardfärbung mit Hämatoxilin-Eosin verwendet wird) und Toluidinblau (0,2% 1:5 und 0,2% 1:10) durchgeführt. In diesen Vorversuchen wurden sowohl die Konzentrationen der jeweiligen Mittel als auch die Färbezeiten variiert und verglichen.

Ausgleichsdreiecke, auch "dog ears" genannt (Abbildung 1), welche bei dermatologischen Operationen anfielen, wurden in diesen Vorversuchen zur Überprüfung der Farbanreicherung und Zellstrukturdifferenzierung verwendet.

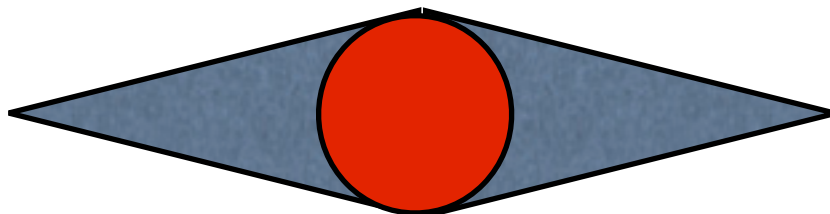


Abbildung 1

Schematische Darstellung der Ausgleichsdreiecke. Der rote Kreis stellt den Tumor dar,

der exzidiert wird. In grau sind die Ausgleichsdreiecke dargestellt, gesundes Gewebe, das auf Grund der Narbenheilung entnommen wird und im Rahmen der Vorversuche verwendet wurde.

Es zeigte sich, dass mit zwei Färbungen (Toluidinblau und Eosin) eine deutliche Färbung und Differenzierung der einzelnen Zellstrukturen möglich war. Aufgrunddessen wurden diese zwei Färbungen für den nächsten Schritt verwendet.

Die zweite Phase der Vorversuche beinhaltete die Färbung von übrigem Tumorgewebe, das bei der Entnahme großflächiger BKZ-Areale entstand und keine weitere Verwendung hatte. Hierfür wurden aus diesem Gewebe unterschiedliche Gewebstreifen (circa 2 mm dick) angefertigt und die Färbung mit Toluidinblau und Eosin angewandt. Diese Schnitte wurden nach der CLSM Bildgebung fixiert und mit dem Paraffinverfahren aufbereitet, um einen genaueren Vergleich mit dem histopathologischen Standardverfahren zu erhalten.

Die durch die Färbungen entstandenen CLSM-Bilder zeigten im Vergleich zur Hämatoxilin-Eosin gefärbten Histologie, dass mit einer 2 Minuten langen Färbung in Toluidinblau (0,2% 1:5) die genauesten und deutlichsten CLSM Bilder der BZKs erzeugt werden konnten (Abbildung 2 & 3).

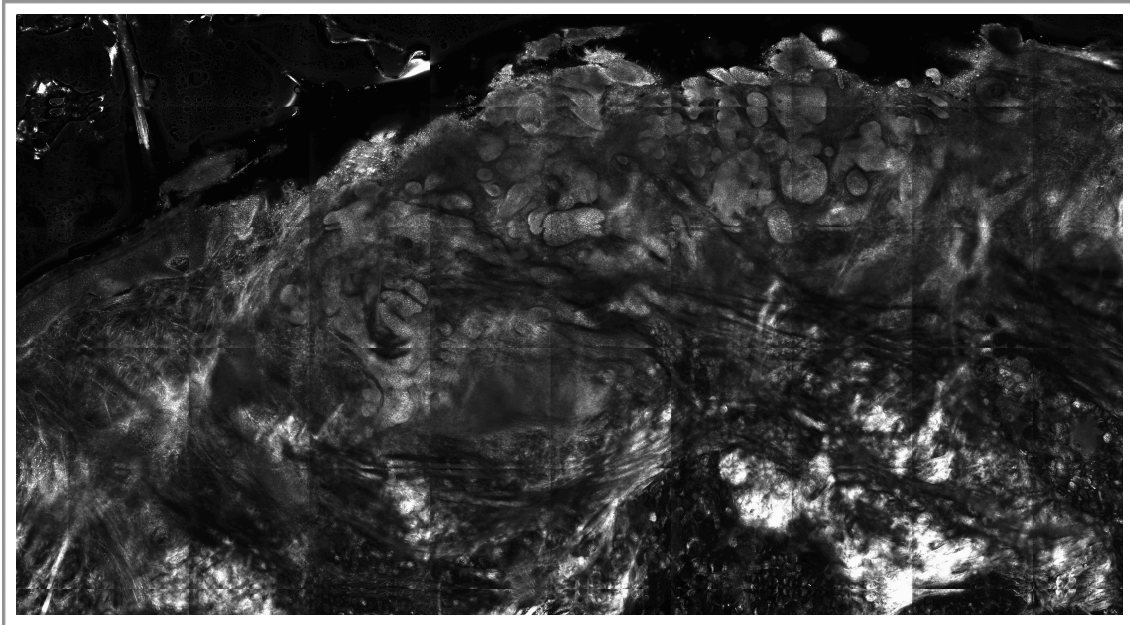


Abbildung 2

Konfokales Laser Scanning Mikroskopie Bild eines nodulären Basalzellkarzinoms, nachdem der Tumor in 10% Essigsäure für 90 Sekunden inkubiert wurde. Die Inkubation in Essigsäure führt zur Kondensation des Chromatins, was sich im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop durch eine stärkere Reflektion des Lichtes darstellt und somit die Zellkerne leichter zu identifizieren sind.

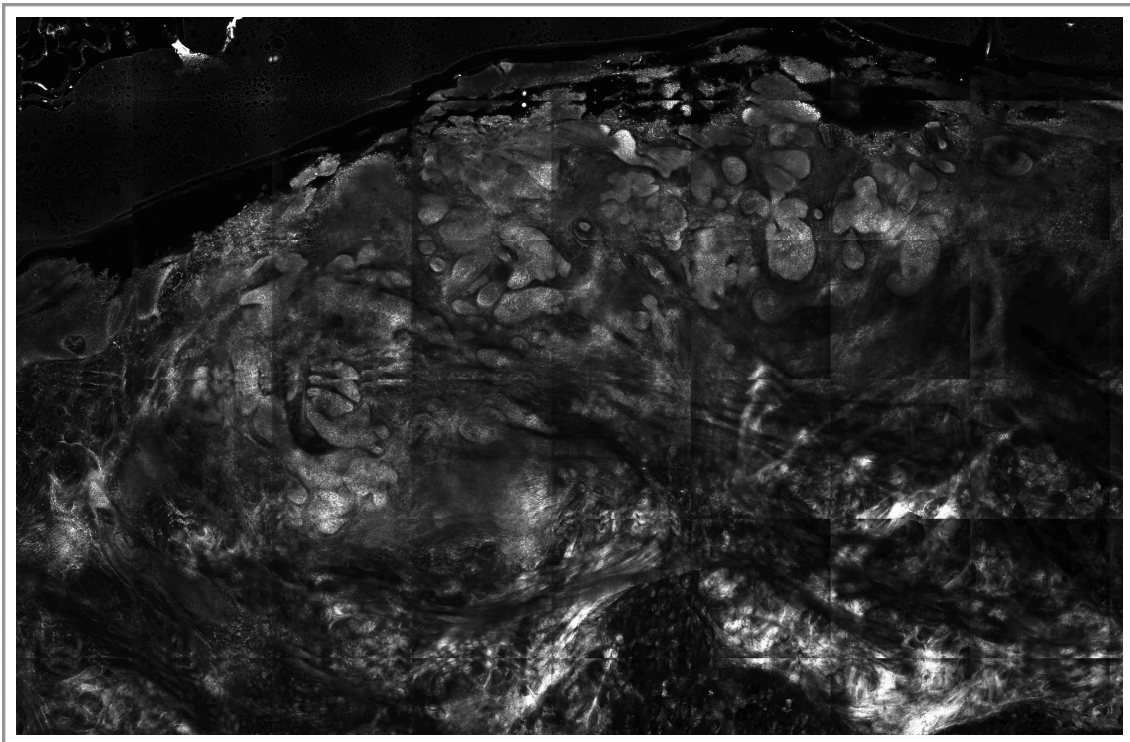


Abbildung 3

Konfokales Laser Scanning Mikroskopie Bild des nodulären Basalzellkarzinoms dargestellt in Abbildung 2, nachdem der Tumor in 10% Essigsäure für 90 Sekunden und zusätzlich für 120 Sekunden in Toluidinblau inkubiert wurde. Ein stärkerer Kontrast der Tumorzellen ist zu erkennen.

Zusätzlich wurde in dieser Phase der Vorversuche Essigsäure in 2 verschiedenen Konzentrationen, 10% und 5%, verglichen, da in anderen Studien beide Konzentrationen angewandt wurden (17,18). Beim Vergleich der Bilder zeigte sich, dass beide Konzentrationen ähnliche Ergebnisse erzielten, die Inkubationsdauer der 5% Lösung aber länger war. So wurde festgelegt, die 10% Lösung weiterhin zur Fixierung zu verwenden.

Mit 10% Essigsäure und einer zusätzlichen Färbung mit Toluidinblau ließen sich die besten CLSM-Bilder erzeugen.

2.1.2 Pigmentiertes Gewebe

In bislang durchgeführten *in vivo* CLSM Studien (30,31,32) wurde gezeigt, dass sich pigmentiertes Gewebe gut darstellen lässt. Um zu evaluieren, ob dies auch auf die *ex vivo* CLSM übertragbar ist, wurden 20 pigmentierte Gewebestreifen mit dem bildgebenden Verfahren der *ex vivo* CLSM untersucht.

In diesem Teil der Vorversuche wurden 20 Streifen von fünf verschiedenen Naevuszellnaevi (NZN) hergestellt. Hierfür wurde Restgewebe verwendet, welches zuvor einzelnen Patienten zweimal an Wade, Bauchnabel, Rücken und Nacken entnommen wurden war und für diagnostische Zwecke nicht mehr benötigt wurde.

Es wurde gezeigt, dass pigmentiertes Gewebe in der *ex vivo* CLSM wie auch in der *in vivo* CLSM leicht zu erkennen und einzuordnen ist. Um noch einen Schritt weiterzugehen und auch diese Versuche hinweisend für diese Studie zu

benutzen, wurde die Färbung des Gewebes mit Toluidinblau vorgenommen und die Bilder mit und ohne Färbung verglichen. Hierbei wurde sichtbar, dass die Färbung bei pigmentiertem Gewebe nicht zu einer Verbesserung der Bildgebung führte (Abbildung 4 & 5).

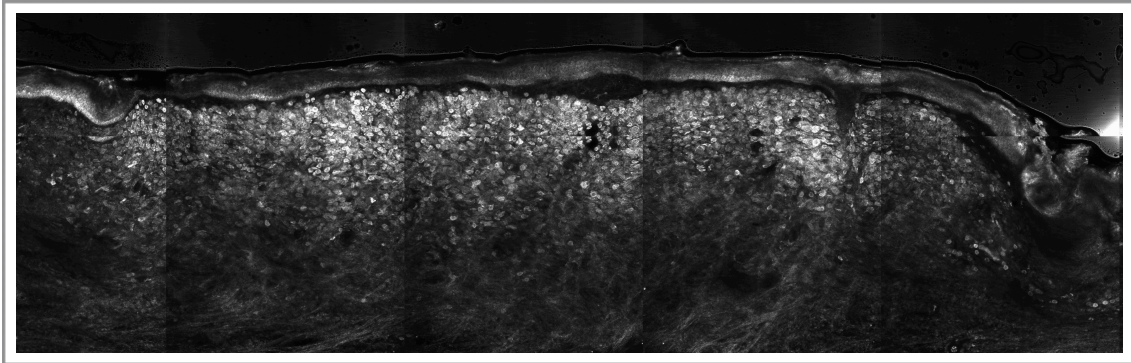


Abbildung 4

Konfokales Laser Scanning Mikroskopie Bild eines Naevuszellnaevus (pigmentiertes Gewebe). Das Bild wurde direkt nach Exzision im OP, ohne jegliche Färbung oder sonstige Behandlung, erstellt.



Abbildung 5

Konfokales Laser Scanning Mikroskopie Bild eines Naevuszellnaevus (pigmentiertes Gewebe) nachdem das entsprechende Gewebe für 120 Sekunden in Toluidinblau inkubiert wurde. Im Vergleich zu Abbildung 4 ist trotz Färbung keine bessere Qualität der Bildgebung zu erkennen.

Aufgrund der Vorversuche wurde diese Studie an BZK mit folgendem Protokoll durchgeführt:

- Inkubation der Gewebstreifen über 90 Sekunden in 10% Essigsäure.
- Inkubation des Gewebes über 120 Sekunden in 0,2% 1:5 Toluidinblau.
- Spülen mit destilliertem Wasser über 5 Sekunden.

2.2 Gewebeproben zur Erhebung der Studie

Für diese Studie wurden zweiundsiebzig fortlaufend chirurgisch entfernte Basalzellkarzinome in der Universitäts Hautklinik Tübingen exzidiert und untersucht. Das Gewebe stammte aus allen chirurgischen Eingriffen mit Verdacht auf BZK, in einer Zeitspanne von 9 Wochen im Jahr 2008 in der Hautklinik Tübingen, was das Spektrum von Alter, Geschlecht und Größe der Tumore sehr breit fächerte.

Ein positives Votum der Ethik Kommission des Universitätsklinikums Tübingen lag vor.

2.3 Exzision und Aufbereitung des Gewebes

Die Exzision des klinisch festgestellten Tumors erfolgte im OP unabhängig von der späteren Technik des makroskopischen Zuschnitts, die anschließend *ex vivo* für das entnommene Gewebe angewandt wurde.

Bei der Gewebeentnahme markierte der Operateur zusätzlich einen klinischen Sicherheitsabstand (siehe unten) und begann dann mit der eigentlichen Exzision. Um die Wundheilung zu erleichtern, wurde das Skalpell vertikal bis leicht unterminierend (90°-110°) geführt. Der Tumor wurde vom Operateur im Saal exzidiert und direkt markiert, damit auch im Nachhinein eine topographische Lokalisation der Ränder des Tumors möglich war. Mit einem Einschnitt bei 12 Uhr war auch nach der *ex vivo* Aufbereitung eine genaue

Lokalisation der Ränder noch möglich. Die Markierung erfolgte in Relation zur Körperachse des Patienten, wobei 12 Uhr in Richtung Vertex zeigt.

2.3.1 Sicherheitsabstand

Alle zweiundsiebzig Exzidate wurden mit einem Sicherheitsabstand von 2-4 mm um den klinisch sichtbaren Tumor entnommen.

Unter einem "Sicherheitsabstand" wird ein klinisch gesunder Rand um den sichtbaren Tumor beschrieben. Der Operateur markierte mit einem Stift den Abstand vom klinisch sichtbaren Tumor und exzidierte den Tumor mitsamt diesem Sicherheitsabstand. Diese Maßnahme diente der Exzision kleinerer, subklinischer Tumor-Ausläufer zur Vermeidung eines Rezidives und der Notwendigkeit einer zweiten Operation (Abbildung 6).

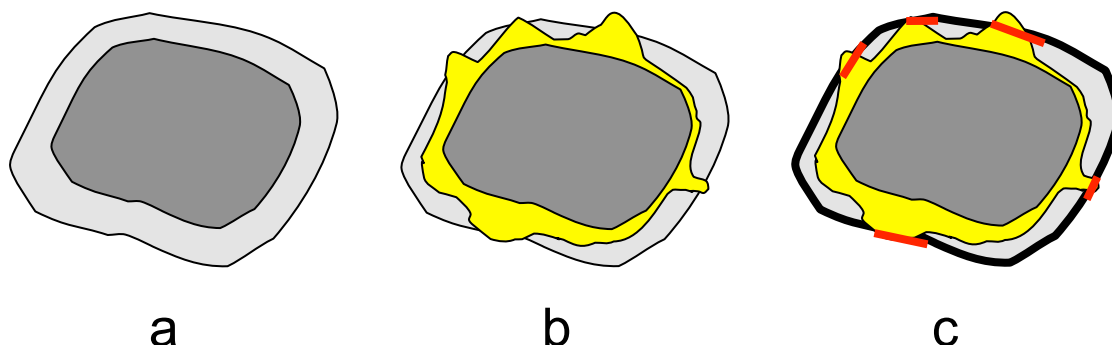


Abbildung 6

Darstellung des Sicherheitsabstands

- a) In dunkelgrau ist der klinisch sichtbare Tumor dargestellt, der von einem 2-5 mm breiten Rand (hellgrau) begrenzt wird um in dieser entsprechenden Größe exzidiert zu werden. Dieser Rand wird auch als „Sicherheitsabstand“ definiert. b) In gelb ist die wirkliche (klinisch nicht komplett identifizierbare) Ausbreitung der Tumorzellen dargestellt. c) In diesem Schema ist zu erkennen, dass der Tumor, trotz Sicherheitsabstand, nicht komplett exzidiert wird. Das Ziel des Sicherheitsabstands ist das Risiko für übersehene Tumorausläufer so klein wie möglich zu halten und somit eine zweite OP zu vermeiden.

2.3.2 Makroskopischer Zuschnitt

Nach der Exzision und Markierung wurde die Gewebeprobe *ex vivo* für die 3D-Histologie aufbereitet. Der makroskopische Zuschnitt erfolgte entweder als "Tübinger Torte", "Muffin" oder "Brotlaib" (33). In allen Fällen wurde zur Diagnosesicherung zusätzlich ein Mittelschnitt gemacht.

Tübinger Torte

Nach der Tumorexzision erfolgte die Entnahme eines topographisch bei 12 Uhr beginnenden und endenden, schmalen lateralen Streifens, vertikal 360° um den Tumor. Da das Gewebe anschließend in eine Histologie-Einbettkassette zur horizontalen Fixierung platziert werden musste, wurde es vor der Einbettung in kleinere Abschnitte aufgeteilt. Anschließend wurde ein horizontaler Basisschnitt vom Grund des exzidierten Tumors entnommen und ebenso in eine Kassette zur horizontalen Fixierung platziert und in Formalin fixiert (Abbildung 7).

Über Nacht wurde in Paraffin eingebettet und Hämatoxylin-Eosin Schnitte angefertigt. Diese Methode ermöglicht eine 3D-Darstellung des komplett exzidierten Tumorrandes.

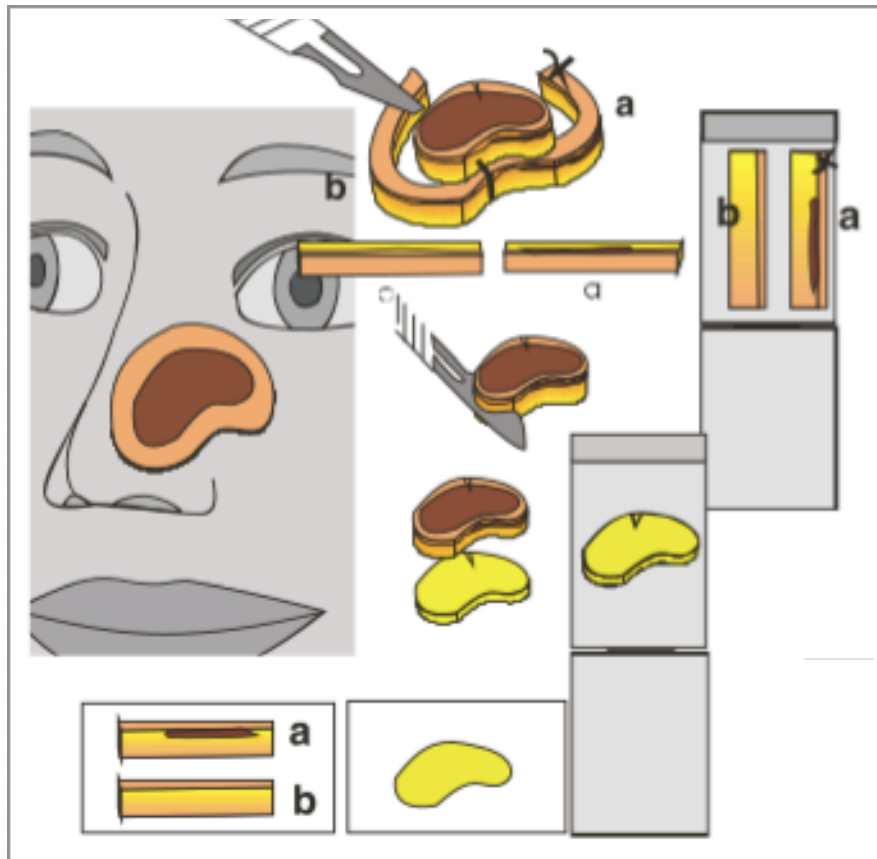


Abbildung 7

Schematische Darstellung der Tübinger-Torte-Technik (Breuninger *et al.* 1982, 12,13).

Der Tumor wird identifiziert und mitsamt eines klinischen Sicherheitsabstandes exziiert. Von dem exziierten Tumor wird ein schmaler Streifen vertikal 360° um den kompletten Tumor abgetragen. Dieser Streifen kommt in eine Histologie-Einbettkassette. Vom restlichen Exzidat wird die Basis abgetrennt und in eine zweite Histologie Kassette platziert. 20 Stunden später stehen die Paraffinschnitte zur Verfügung (Abbildung von Publikation Möhrle M, 33).

Muffin-Technik

Um die korrekte Ausrichtung und Lokalisation des Tumors zu gewährleisten, wurde auch hier bei 12 Uhr ein Einschnitt gemacht. Es erfolgt zusätzlich eine Gegeninzision bei 6 Uhr. Anschließend wurde ringsherum ein Rand von circa 2 mm in einem 60° Winkel subtotal inzidiert, wobei hier im Gegensatz zu der Tübinger Torte, die Basis nicht durchtrennt wurde (Abbildung 8) (16).

Ähnlich wie beim Auspacken der Backware Muffin aus ihrem Papier, konnten auch hier die Ränder des entnommenen Exzidats auf eine horizontale Ebene gelegt werden. Dieses Präparat konnte direkt vom Operateur auf das Einbettpapier in die Histologie-Einbettkassette gelegt werden. Die histologischen Paraffinschnitte waren innerhalb von 20 Stunden verfügbar und ermöglichten eine komplette 3D-Darstellung der Ränder und Basis des exzidierten Tumors in einem einzigen Schnitt.

Diese Technik konnte für Präparate von bis zu 2 cm Durchmesser angewandt werden.

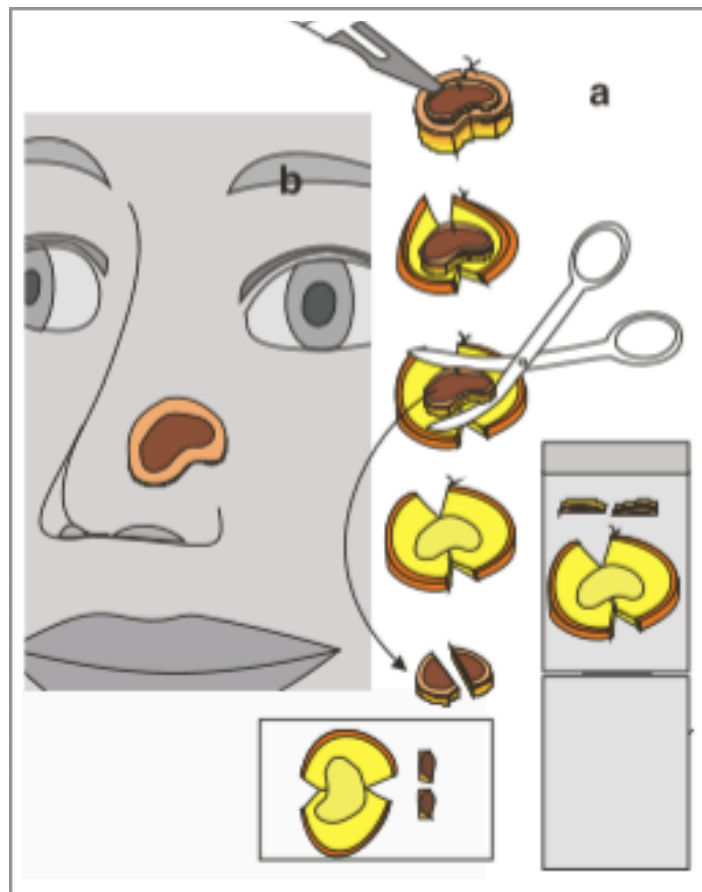


Abbildung 8

Schematisch Darstellung der Muffin-Technik (Möhrle & Breuninger 2006, 16).
Der Tumor wird identifiziert und mitsamt eines klinischen Sicherheitsabstandes exzidiert. Der exzidierte Tumor wird auf 12 Uhr und 6 Uhr leicht eingeschnitten und als ganzes in die Histologie-Einbettkassette platziert. Zusätzlich wird von der Tumormitte

ein Schnitt entnommen. 20 Stunden später stehen die Paraffinschnitte zur Verfügung (Abbildung von Publikation Möhrle M, 33).

Brotlaib-Technik

Bei der Brotlaib-Technik erfolgte ebenfalls eine Inzision bei 12 Uhr, damit die topographische Lokalisation des Exzidats auch nach der histologischen Verarbeitung noch garantiert werden konnte. Zusätzlich sollte hier der rechte Rand (0-6 Uhr) mit einer Histologiefarbe markiert werden. Anschließend wurde das Exzidat wie ein Brotlaib in 1 mm große Scheiben geschnitten (siehe Abbildung 9). Diese Schnitte wurden auf einem Einbettpapier platziert, um in einer Routinekassette fixiert zu werden. Die Hämatoxilin-Eosin gefärbten Paraffinschnitte standen innerhalb von 20 Stunden zur Verfügung.

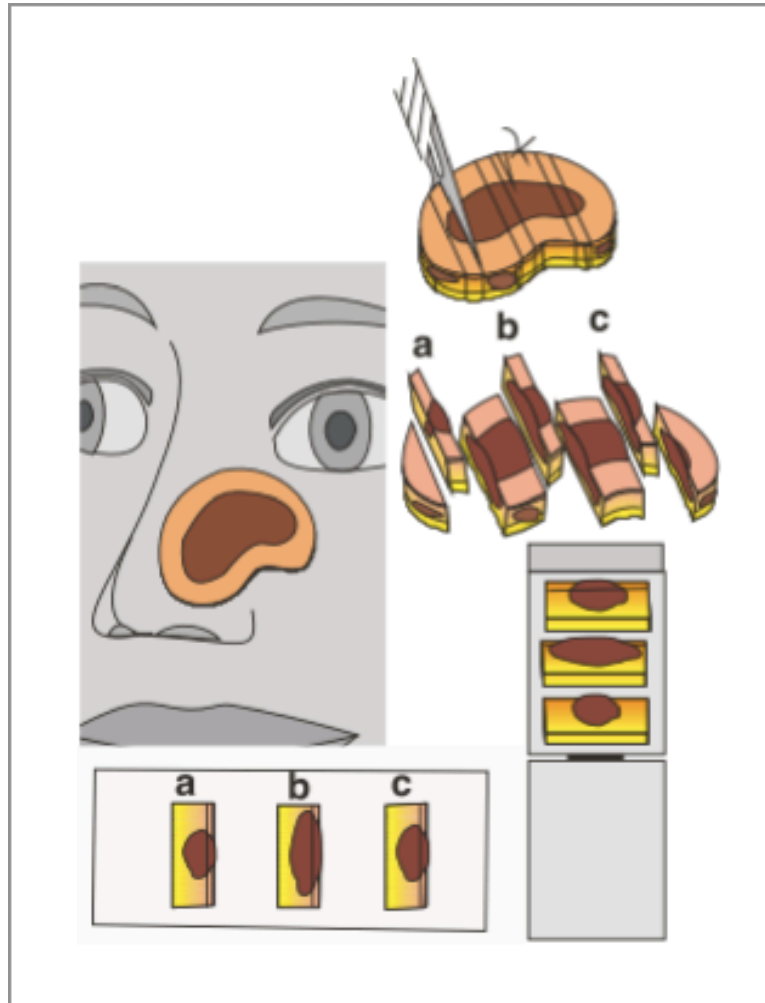


Abbildung 9

Schematische Darstellung der Brotlaib-Technik. Der Tumor wird identifiziert und mitsamt eines klinischen Sicherheitsabstandes exzidiert. Der exzidierte Tumor wird wie ein Brotlaib in 1-2mm Schritten aufgeschnitten und die entsprechenden Schnitte werden in eine Histologie-Einbettkassette platziert. 20 Stunden später stehen die Paraffinschnitte zur Verfügung (Abbildung von Publikation Möhrle M, 33)

2.4 Inkubation und Färbung des Gewebes

Durch die Inkubation der Gewebeproben in Essigsäure wird das Chromatin im Nukleus kondensiert, wie bereits in anderen Studien gezeigt wurde (34). Im CLSM bewirkt die Kondensation des Chromatins eine starke Rückstreuung des eingehenden Lichtstrahls, diese Rückstreuung des Lichts lässt die Nuklei durch

die CLSM Linse aufleuchten. Dadurch wird Gewebe mit vielen Zellen und Zellteilungen leicht identifiziert, hierunter fällt auch das Basalzellkarzinom.

Aus diesem Grund wurde bei dieser Studie jeder Schnitt zuerst für 90 Sekunden in 10% Essigsäure inkubiert.

In einer vorherigen Studie (17) wurde gezeigt, dass eine Inkubation mit Essigsäure nicht ausreichend war, um eine hohe Trefferquote der BKZ-Identifizierung mit Hilfe von CLSM-Bildern zu erreichen. Aus diesem Grund wurden in den Vorversuchen verschiedene Färbungen untersucht, um die Identifizierung von BZK zu verbessern (siehe Vorversuche).

Wie in den Vorversuchen bereits demonstriert, erwies sich Toluidinblau als die Färbung der Wahl für die in 10% Essigsäure inkubierten Präparate. Die Gewebeproben wurden daher stets für 2 Minuten in Toluidinblau inkubiert.

Nach der Färbung des Gewebes wurde das Präparat mit destilliertem H₂O gespült und schlussendlich erfolgte mit dem CLSM eine Bildgebung.

2.5 Konfokale Laser Scanning-Mikroskopie

Um die Untersuchung und Bildgebung der Schnitte durchzuführen, wurde eine abgeänderte Version des handelsüblichen CLSM (VivaScope 2500; Lucid Inc, Rochester, New York) benutzt. Diese Version des Geräts wurde für *ex vivo* Bildgebung von frischem Gewebe entwickelt.

Der Aufbau und die Ausstattung eines CLSM wurde in vorhergehenden Studien beschrieben (18,19,29):

Das Prinzip der CLSM ist dem des Ultraschalls sehr ähnlich. Im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop befindet sich eine Punktlichtquelle. Diese sendet Lichtwellen im nahen Infrarotbereich durch eine zweigeschaltete Optik und einen Beamsplitter auf eine bestimmte Ebene des zu untersuchenden

Gewebes. Das Licht, das von dem fokussierten Punkt aus emittiert wird, wird auf eine variable Lichtblende fokussiert ("pinhole", Punktlichtdetektor oder Lochblende genannt) und dahinter detektiert. Im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie tragen nur die Photonen der fokussierten Ebene zur Bildgebung bei und nicht die Photonen aus der darüber und darunter liegenden Ebene. Dies wird mit Hilfe des Punktlichtdetektors erreicht, da dies dafür verantwortlich ist, das Licht der nicht fokussierten Ebenen auszublenden. So werden nur die Strukturen abgebildet, die sich unmittelbar in der Brennebene des Mikroskopobjektivs befinden. Die Punktlichtquelle, der Punktlichtdetektor und der beugungsbegrenzte Lichtpunkt in der Brennebene liegen dabei exakt in einer Linie. Licht das von außerhalb dieser Brennebene stammt, wird im Detektor nicht registriert, da es nicht scharf am Punktlichtdetektor fokussiert wird. Die Auflösung des Mikroskops, welches der Schichtdicke der Abbildungsebene entspricht, wird durch die Wellenlänge des Lichts und der numerischen Apertur bestimmt (Abbildung 10).

Um ein Bild zu erzeugen und nicht nur einen fokussierten Punkt zu haben, wird der Laser mittels galvanometrischer Scanspiegel sequenziell über die Fokusebene des Präparats geführt. Die Fokusebene kann in x, y oder z-Richtung beliebig variiert werden und ein 3D-Bild kann erstellt werden (35,36).

Durch dieses Verfahren ist es möglich eine hohe Bildqualität zu erreichen.

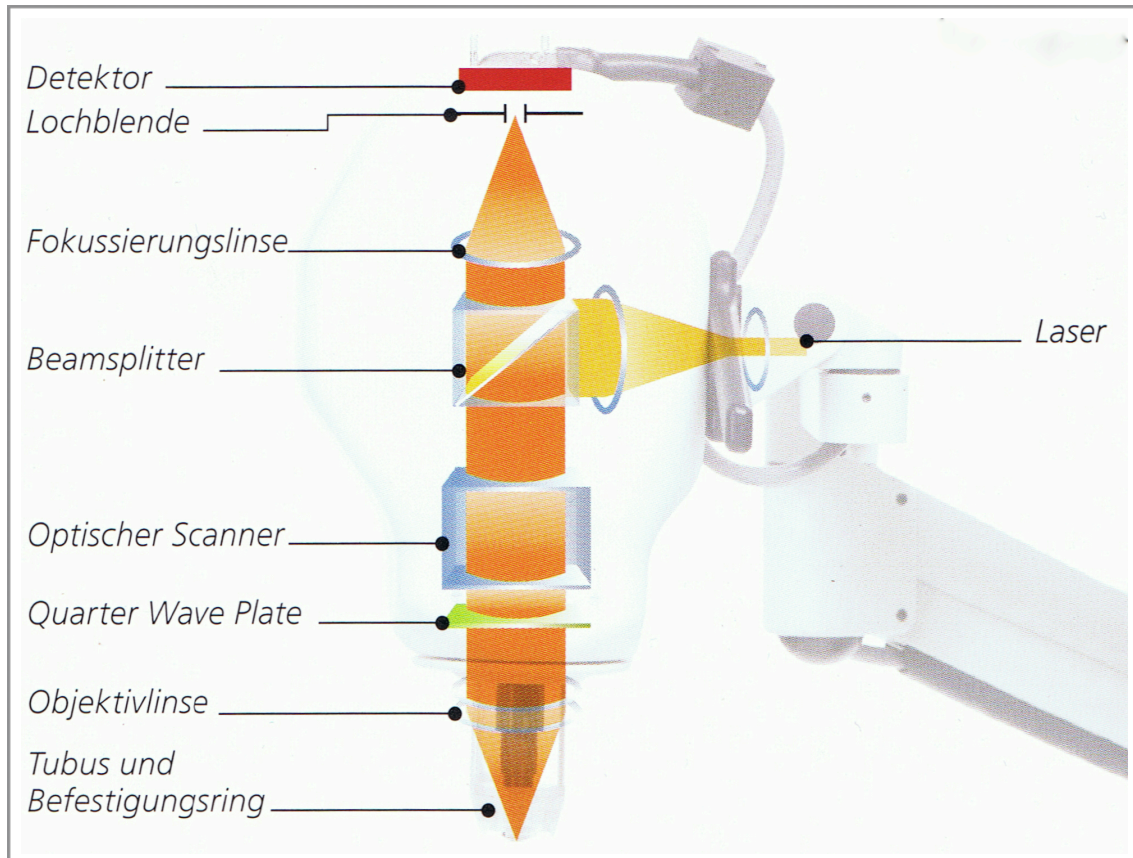


Abbildung 10

Auf diesem Schema sind der Aufbau und die verschiedenen Bauteile eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops dargestellt.

Von einer Punktlichtquelle (Laser) werden Lichtwellen im nahen Infrarotbereich eine mittels einer zweigeschalteten Optik und eines Beamsplitters auf die Ebene des zu untersuchenden Gewebes gesendet. Auf dieser Ebene wird das Licht reflektiert, durch die Lochblende (auch „pinhole“) zurückgestrahlt und auf dem Detektor erkannt. So entstehen die konfokalen Bilder.

(© Schema wurde von MAVIG erstellt und zur Nutzung im Rahmen dieser Dissertation freigegeben)

Die Eindringtiefe des CLSM ist nicht sehr groß. Sie geht bis zu $400\mu\text{m}$, in Abhängigkeit des zu untersuchenden Gewebes. Die CLSM wird hauptsächlich in der Dermatologie zur Untersuchung der Hautoberfläche (*in vivo*) und bei exzidiertem Gewebe (*ex vivo*) angewandt.

2.5.1 VivaScope 2500

Die Beleuchtungswellenlänge des VivaScops 2500 (siehe Abbildung11) betrug 830 nm eines Diodenlaser, mit einer Beleuchtungsstärke von weniger als 16 mW auf der Gewebsebene.

Eine 30-fache Wasser-Immersion-Objektivlinse (Lucida Stable View, Lucid Inc) mit einer numerischen Apertur von 0,9 wurde eingesetzt. Dadurch wurde ein effektives Messfeld von 0,5 x 0,5 mm² ermöglicht. Im Zentrum des Bildfelds konnte horizontal eine optische Auflösung von weniger als 2µm und vertikal von weniger als 5 µm erzielt werden. Die auf dem Bildschirm einsehbaren Bilder konnten mit einer Auflösung von 1000 x 1000 Pixeln betrachtet werden.

Bei einer Wasser-Immersion-Objektivlinse ließen sich mit Wasser oder Ultraschallgel sphärische Aberrationen durch die Lichtbrechung an der Oberfläche des Gewebes minimieren. In dieser Studie wurden die Präparate mit normalem Wasser befeuchtet, einem Deckglas bedeckt und die Linse des CLSM mit Ultraschallgel umgeben. So war eine optimale optische Erkennung zu erreichen. Das Gewebe wurde nicht mit Ultraschallgel verunreinigt, war aber dennoch in direktem Kontakt mit der Linse.



Abbildung 11

Darstellung des benutzten Konfokalen Laser Scanning Mikroskops: VivaScope 2500.
(© Das Bild wurde von MAVIG erstellt und zur Nutzung im Rahmen dieser Dissertation
freigegeben)

2.6 Platzierung des Gewebes

Das Ziel war es das Gewebe plan auf dem Objektträger des Mikroskops zu platzieren, ohne es dabei zu beschädigen.

Da die handelsüblichen Objektträger des VivaScope nur für kleinere und sehr flache Schnitte benutzt werden konnten, wurde für die Darstellung von größeren Gewebeproben ein neuer Gewebshalter entwickelt. Eine quadratische Platte aus Plastik, mit einer Größe von 10 cm x 10 cm und einer Aussparung von 4 cm x 4 cm in der Mitte wurde erstellt. Die Aussparung wurde mit Schaumstoff ausgefüllt, wodurch das Gewebe flach gepresst werden konnte, ohne dass es dabei beschädigt wurde. Ein zweites Plastikquadrat wurde auf die Außenseite des Schaumstoffs platziert um einen Widerstand zu erzeugen und dadurch eine flache Darstellung des Gewebes zu ermöglichen. Dieses zweite Plastikquadrat wurde mit bis zu sechs Bleiwürfeln (10 g) beschwert. So wurde eine plane Auflage des Gewebes erreicht und dadurch eine bessere Bildgebung mit dem CLSM ermöglicht.

Die Beleuchtung wurde automatisch vom Mikroskop angepasst. Die Tiefe des Scans musste manuell eingestellt werden.

Mit dem VivaScope 2500 war es möglich sowohl eine horizontale als auch vertikale Bildgebung zu erstellen. Für die Zielsetzung dieser Studie wurde von uns aber nur die horizontale Bildgebung genutzt, da diese mit der Histologie vergleichbar war.

2.7 Entstehung der konfokalen Mosaik

Wie bereits erwähnt, hatte das CLSM ein effektives Messfeld von 0,5 mm x 0,5 mm, woraus sich ein Bildfeld von 0,25 mm² ergab. Um das definitive Bild eines

Gewebestücke zu erzeugen wurden je nach Größe des Schnittes bis zu 572 solcher kleiner Kacheln (quadratischen Abschnitte) zu einem Mosaik zusammengefügt. Das Erstellen eines 13 mm x 11 mm großen Mosaiks nahm 150 Sekunden in Anspruch und das darauf folgende Zusammensetzen der einzelnen Bilder nahm nochmals 30 Sekunden in Anspruch.

Alle so erzeugten Mosaikbilder konnten direkt mit einer Zoomfunktion auf dem Bildschirm des CLSM angesehen und bewertet werden.

Alle einzelnen und zusammengesetzten Bilder wurden auf einer internen Festplatte im Mikroskop gespeichert. Zusätzlich wurden alle Daten und erstellten Bilder direkt auf eine externe Festplatte exportiert, wo sie automatisch in ein .gif-Format umgewandelt wurden, um auf einem gewöhnlichen Computerbildschirm angesehen werden zu können.

2.8 Vergleich von konfokalen Mosaiken und konventionell hergestellten histopathologischen Schnitten

Unmittelbar nach jeder Operation wurden alle konfokalen Mosaikbilder des exzidierten Tumors von dem jeweiligen Operateur auf dem Display des Mikroskops betrachtet und bewertet (Prof. Dr. med. Helmut Breuninger, Dr. med. Wilfried Schippert, Prof. Dr. med. Matthias Möhrle). Alle drei Operateure sind Dermatologen mit langjähriger Erfahrung in der dermatopathologischen Bewertung von Hauttumorpräparaten im Rahmen der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie.

Die drei Operateure waren bereits mit der CLSM im Kontext einer ähnlichen Studie im Jahr 2007 vertraut (17). Alle drei Dermatologen wurden in die Laser Scanning Mikroskopie und die Auswertung der konfokal erzeugten Bilder unterwiesen.

Der besseren Übersichtlichkeit wegen wurden alle aufgenommenen Mosaikbilder ausgedruckt (Abbildung 13). Auf diesem Papierausdruck wurden die identifizierten BZK und die verdächtigen Areale unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff rot markiert (Abbildung 14).

Nachdem die CLSM-Untersuchung am nativ gefärbtem Gewebeblock erfolgreich war, wurde das Gewebe zur Validierung in die Routinekassetten platziert, fixiert, im Standard-Paraffinverfahren und mit Hämatoxilin-Eosin Färbung aufgearbeitet.

Am folgenden Tag erhielt der Operateur die entsprechenden histologische Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitte (Abbildung 15) und konnte die am Vortag erstellten CLSM-Bilder mit dem histopathologischen Schnitt vergleichen. Auf dem Ausdruck des Vortags wurden histologisch nachgewiesene Tumorausläufer grün markiert. Dadurch wurden eine genaue topographische Auswertung und der Vergleich beider Verfahren ermöglicht.

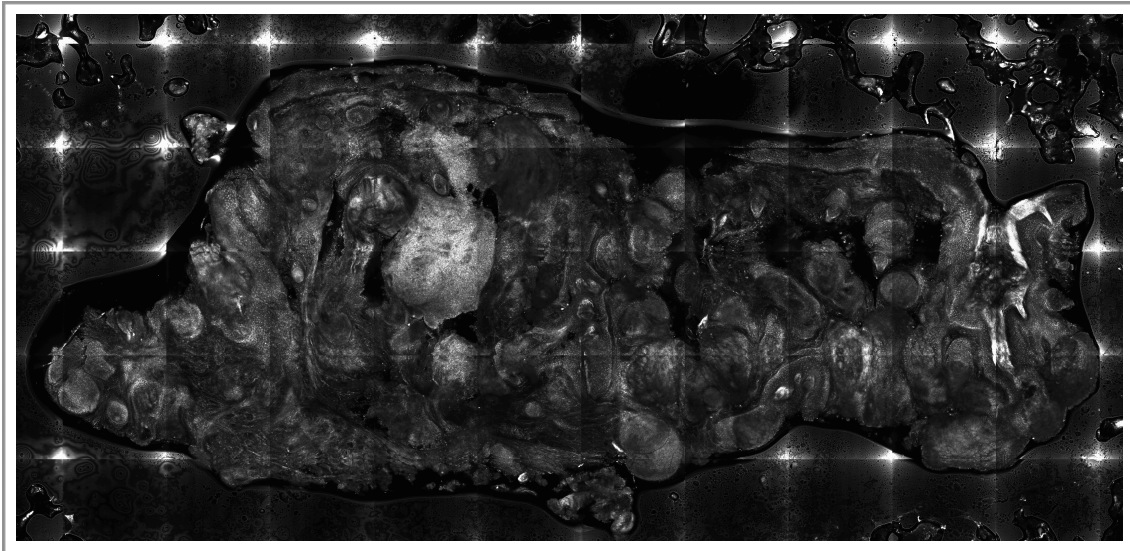


Abbildung 13

CLSM-Bild, auf dem ein Basalzellkarzinom erkannt werden kann. Das Bild wurde im Rahmen dieser Studie in Vergrößerung auf dem Bildschirm des CLSM zur direkten Bewertung der Untersucher nach der jeweiligen OP aufgerufen.

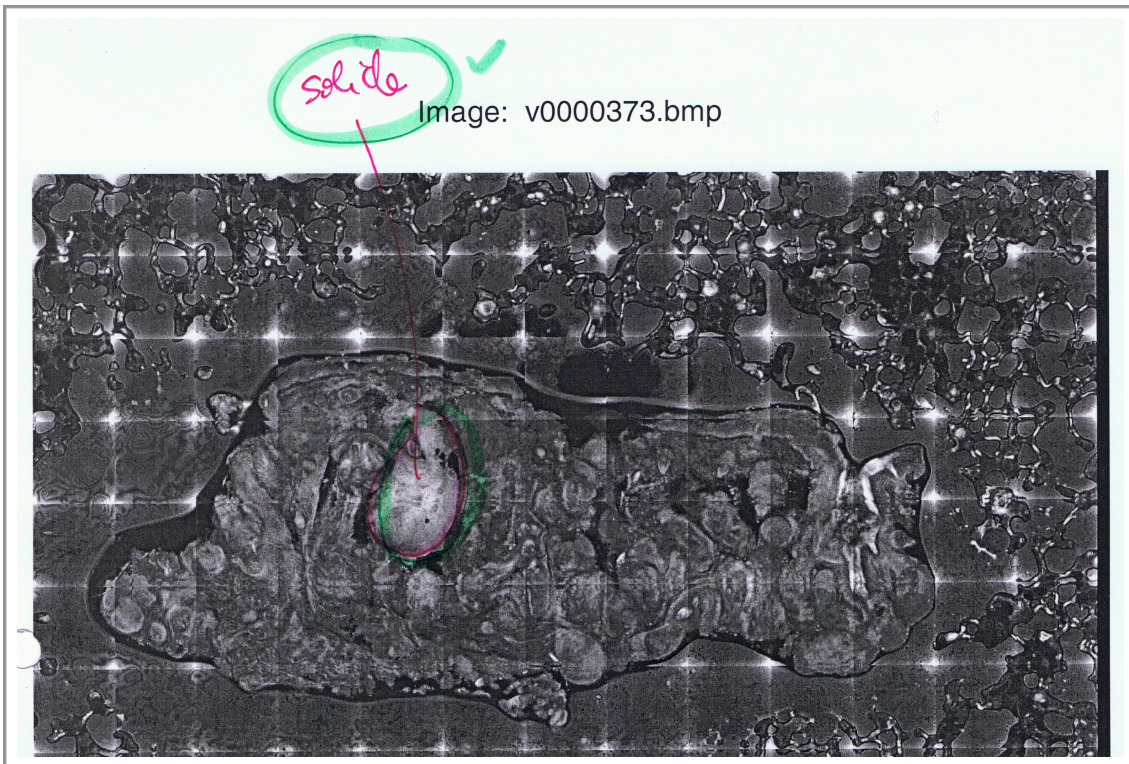


Abbildung 14

Papierausdruck von Abbildung 13. Direkt nach der OP wurde der Scan am CLSM beurteilt und BZK verdächtige Bereiche wurden mit rot auf diesem Ausdruck markiert. Am nächsten Tag wurde die Beurteilung des CLSM Scans mit dem Histologiepräparat verglichen und auf dem Ausdruck wurde der Befund der Paraffinschnitte grün markiert.

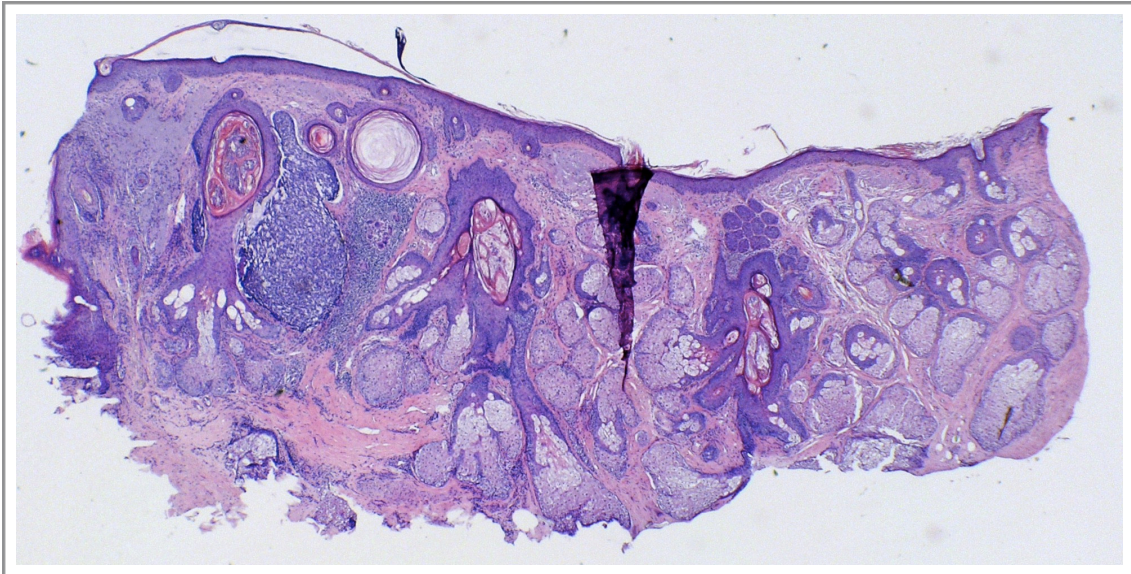


Abbildung 15

Hämatoxylin-Eosin gefärbter Histologieschnitt des eingescannten Präparats von Abbildung 13 und 14. Man erkennt einen klaren Basalzellkarzinomherd, der auch auf dem entsprechenden CLSM-Bild zu sehen ist.

2.9 Statistik

Sensitivität, die Wahrscheinlichkeit die tatsächlich Kranken als krank zu erkennen, und Spezifität, die Wahrscheinlichkeit die tatsächlich Gesunden als gesund zu erkennen, sind die Grundlagen um eine neue Technik oder Methode zu beurteilen und anschließend zu implementieren.

Eine hohe Sensitivität garantiert die Fähigkeit eine Krankheit, oder in diesem Falle BZK-Zellen, zu detektieren am Ort ihrer Lokalisation. Im Gegensatz dazu ist auch die hohe Spezifität grundlegend, da hierdurch mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass eine Krankheit, oder in diesem Falle die Abwesenheit von BZK-Zellen, vorliegen und der Patient als gesund gelten kann.

Sensitivität: ist die Wahrscheinlichkeit die tatsächlich Kranken als krank zu erkennen.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtig Positive}}{(\text{richtig Positive} + \text{falsch Negative})}$$

Spezifität: ist die Wahrscheinlichkeit die tatsächlich Gesunden als gesund zu erkennen.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtig Negative}}{(\text{richtig Negative} + \text{falsch Positive})}$$

PPV (positive predictive value, Positiver Vorhersagewert): ist der Prozentsatz der wirklich Kranken, die unter den Patienten/Proben als krank diagnostiziert werden.

$$\text{PPV} = \frac{\text{richtig Positive}}{(\text{richtig Positive} + \text{falsch Positive})}$$

NPV (negative predictive value, Negativer Vorhersagewert): ist der Prozentsatz der wirklich Gesunden, die unter den Patienten/Proben als gesund diagnostiziert werden.

$$\text{NPV} = \frac{\text{richtig Negative}}{(\text{richtig Negative} + \text{falsch Negative})}$$

3. Ergebnisse

3.1 Diagnostizierte BZK-Subtypen

Es wurden 312 CLSM Bilder von 72 chirurgisch entfernten BZKs erzeugt, davon waren 73 Mittelschnitte, 196 Ränder, 23 Muffins und 20 Brotlaibschnitte (Tabelle 1).

Tabelle 1

Diagnostizierte Subtypen der exzidierten Basalzellkarzinome: Von 72 chirurgisch exzidierten BZK wurden 312 Bilder mittels CLSM erstellt, nachdem unterschiedliche Präparate (Mittelschnitte, Ränder, Muffins, Brotlaib) hergestellt wurden.

BZK Subtypen	Mittelschnitte (n=73)	Ränder (n=196)	Muffin (n=23)	Brotlaib (n=20)
Noduläres BZK	37	69	3	9
Infiltratives BZK	5	9	0	2
Kombiniertes BZK	9	18	1	0
Superfizielles BZK	0	3	1	0
Tumorfreie Schnitte	19	95	18	9
Histologie nicht auswertbar	3	2	0	0

3.2 Schnellere Auswertung von chirurgischen Präparaten mittels CLSM

Eine der Zielsetzungen und Fragestellung dieser Studie war es eine schnellstmögliche Aufbereitung der CLSM-Bilder zu determinieren.

Durchschnittlich benötigte das Aufbereiten und Färben des Gewebes für die CLSM Darstellung nur 4,5 Minuten. In diese Zeit eingerechnet wurden:

- 30 Sekunden für die Präparierung des chirurgisch entfernten Gewebes
- 90 Sekunden für die Inkubation in Essigsäure
- 120 Sekunden für die Toluidinblaufärbung
- 30 Sekunden für die Fixierung des Gewebes auf dem Objektträger.

Nachdem das Gewebe fertig bearbeitet war, dauerte das Erstellen der einzelnen Kacheln und das Zusammensetzen verschiedenen Kacheln eines 143 mm² Mosaiks 3 Minuten. Jedes fertig zusammengesetzte Mosaik dieser Größe war innerhalb von nur 7,5 Minuten fertig zur Beurteilung des Operateurs. Die benötigte Zeit der CLSM VivaScan Software um die einzelnen Kacheln zu einem Mosaik zusammensetzen ist von der Anzahl der Kacheln abhängig und steigt drastisch ab einer Größe von 144 mm².

Im Gegensatz zu einer vorhergehenden Studie konnten größere Bilder von bis zu 20 mm x 20 mm auf dem Bildschirm angesehen werden. Es zeigte sich jedoch, dass nur Bilder bis zu einer Größe von 144 mm² direkt auf dem Bildschirm vergrößert werden konnten.

Die Zoomfunktion direkt auf dem Bildschirm des CLSM war im Bereich von 0,5 mm x 0,5 mm bis 1,5 mm x 1,5 mm möglich.

3.3 Vergleich zwischen Histologie und CLSM

Die Sensitivität und Spezifität der Erkennung von BZK variierte stark zwischen Mittelschnitten (Abbildung 16 & 17), Rändern (Abbildung 18, 19 & 20), Muffins und Brotlaibschnitten. Die Sensitivität in den Muffins und Brotlaibschnitten betrug 80%, bei den Rändern 73,7% und bei den Mittelschnitten 94%. Mittelschnitte hatten eine hohe Wahrscheinlichkeit ein größeres BZK-Nest zu enthalten, im Gegensatz zu den Rändern, wo man eher keine BZK-Nester mehr erwarten würde, oder nur noch sehr kleine Nester vorhanden waren.

Im Gegensatz dazu wurde in den Muffins eine Spezifität von 61,1% erreicht, bei Brotlaibschnitten 77,8%, bei Rändern 69,2% und bei den Mittelschnitten 36,8% (Tabelle 2).

Tabelle 2

Ergebnisse von Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert (PPV und NPV), falsch positive und falsch negative Auswertung um BZK in konfokalen Bildern zu identifizieren.

* Die CLSM-Bilder entsprachen nicht den Hämatoxylin-Eosin Schnitten, aufgrund technischer Artefakte in 4 Mittelschnitten, 6 Rändern und 1 Brotlaibschnitt.

	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	falsch positiv	falsch negativ
Mittelschnitte (n=69*)	94,0 %	36,8%	79,7%	70,0%	63,2%	6,0%
Ränder (n=190*)	73,7%	69,2%	70,7%	72,2%	30,9%	26,3%
Muffin (n=23)	80,0%	61,1%	36,4%	91,7%	38,9%	20,0%
Brotlaib (n= 19*)	80,0 %	77,8%	80,0%	77,8%	22,2%	20,0%



Abbildung 16

CLSM-Bild eines Mittelschnittes. Klar zu erkennen ist ein Basalzellkarzinomnest im oberen, rot eingekreisten Abschnitt des Bildes.

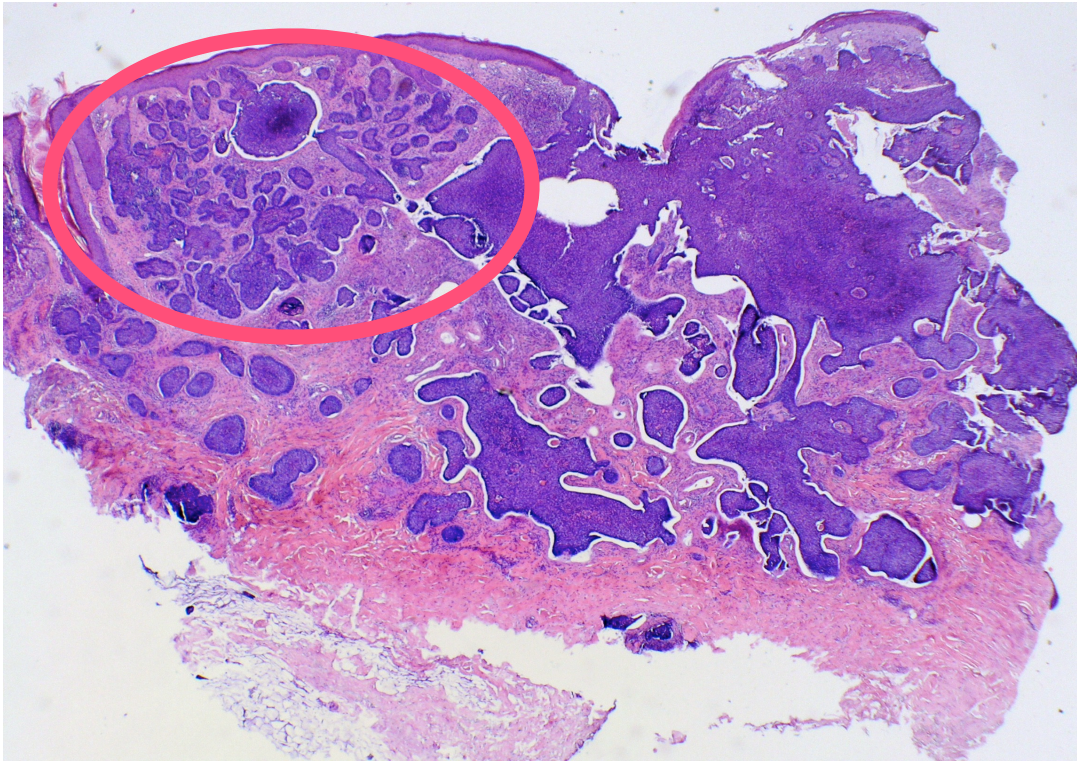


Abbildung 17

Hämatoxylin-Eosin gefärbter Histologieschnitt des eingescannten Mittelschnittes von Abbildung 16. Auch hier ist ein klares Basalzellkarzinomnest im oberen, rot eingekreisten Abschnitt des Bildes zu erkennen. Jedoch wurden die grossen Tumorausläufer im rechten Anteil des Schnittes in der CLSM (Abbildung 16) nicht erkannt.

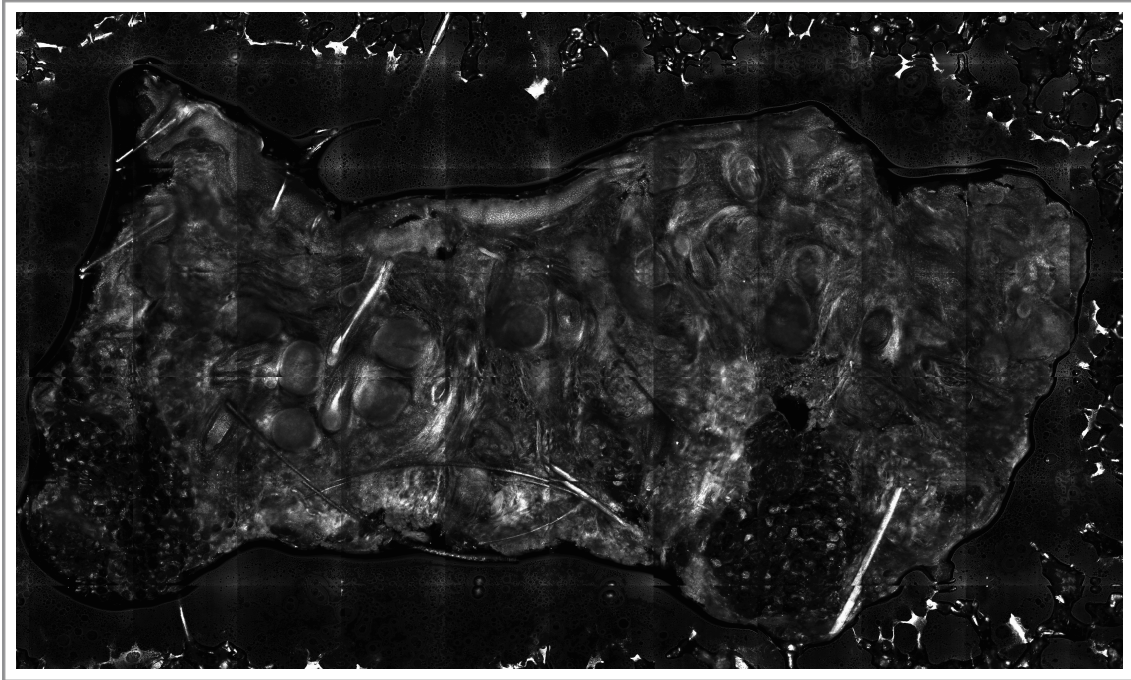


Abbildung 18
CLSM-Bild eines Randschnittes (Tübinger-Torte-Technik).

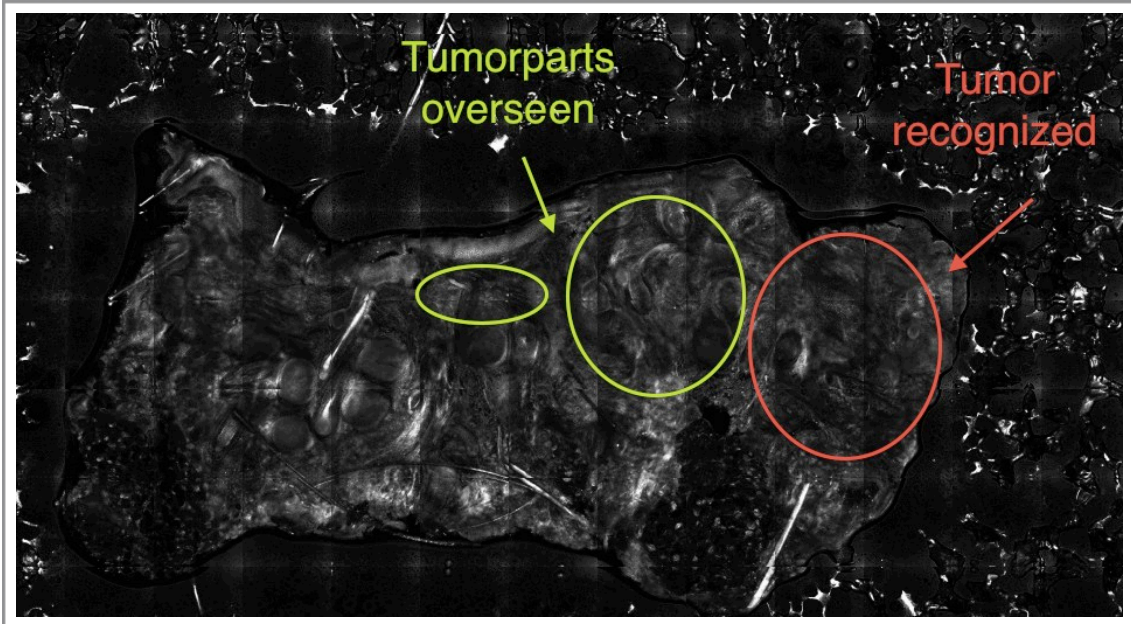


Abbildung 19
Papierausdruck des in Abbildung 18 dargestellten Randschnittes. In rot markiert sind die Basalzellkarzinomnester, die auf dem Bildschirm des CLSM erkannt wurden. In grün markiert sind die Basalzellkarzinomnester, die am darauffolgenden Tag durch das Histologiepräparat noch zusätzlich erkannt wurden.

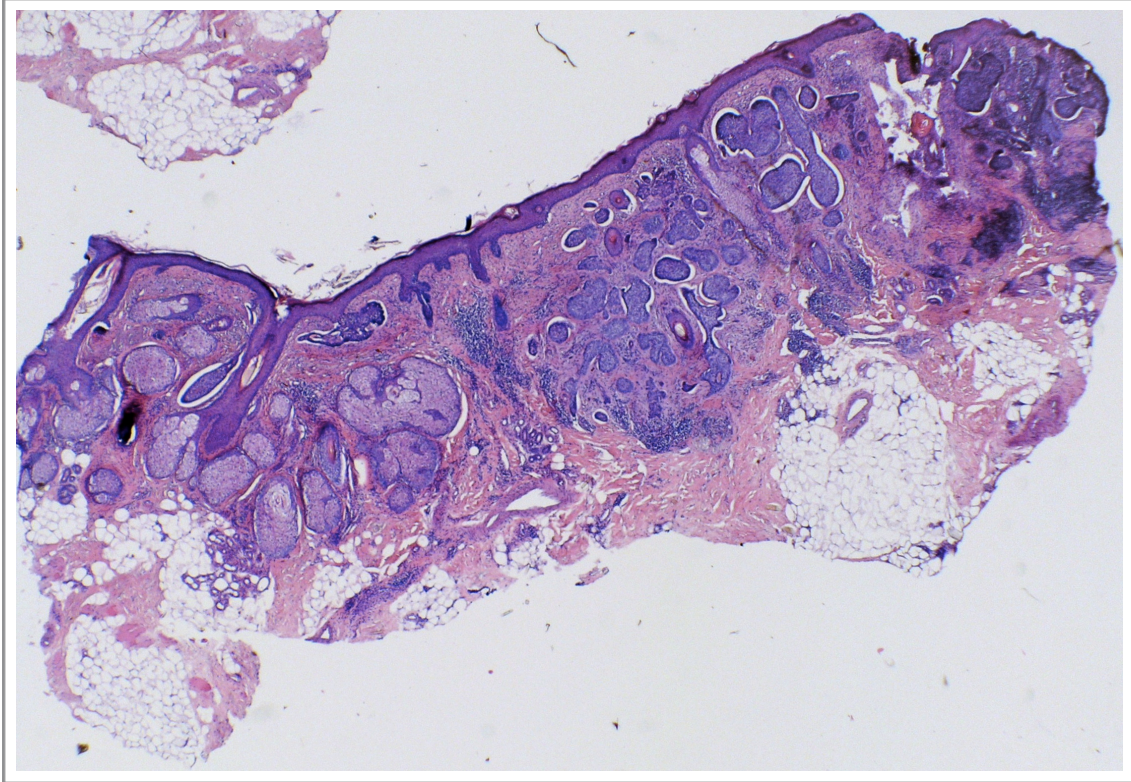


Abbildung 20

Hämatoxylin-Eosin gefärbter Histologieschnitt des eingescannten Randschnittpräparats von Abbildung 18 & 19

Die Genauigkeit der CLSM Diagnose war neben der Art des makroskopischen Zuschnitts auch vom jeweiligen Beobachter abhängig. Beobachter 1 beurteilte zwar die meisten Präparate, hatte aber auch die niedrigste Sensitivität (71,4%), im Gegensatz zu Beobachter 3, der nur 5 Präparate weniger untersuchte aber eine hohe Sensitivität (86,9%) und auch eine höhere Spezifität (70,2%) erreichte. Beobachter 2 hat eine ziemlich niedrige Spezifität erreicht (45,8%), jedoch eine gute Sensitivität (86,1%). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3

Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert (PPV und NPV), falsch positive und falsch negative Auswertung der einzelnen Beobachter.

	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	falsch positiv	falsch negativ
Beobachter 1 (n=127)	71,4%	66,1%	69,2%	68,4%	33,9%	28,6%
Beobachter 2 (n= 61)	86,1%	45,8%	70,5%	68,8%	54,2%	13,9%
Beobachter 3 (n=123)	86,9%	70,2%	75,7%	83,3%	29,8%	13,1%

4. Diskussion

4.1 Genauigkeit der CLSM

Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) ist sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* eine neue Methode zur schnellen und genauen Diagnosestellung in der Dermatologie. Die *in vivo* CLSM wird trotz ihrer niedrigen Eindringtiefe schrittweise im Labor und im klinischen Alltag eingeführt, da sie die Möglichkeit einer optischen, nicht invasiven Biopsie eröffnet (37,38). Im Vergleich hierzu befindet sich die Etablierung der *ex vivo* CLSM noch in ihren Anfängen.

In den letzten Jahren gab es kleinere (39,40,41) und größere (17) Studien, in welchen Tumore und deren Ränder beurteilt wurden, um die Verlässlichkeit der CLSM-Ergebnisse mit den histologischen Schnitten zu vergleichen. Die empfohlenen Verbesserungsvorschläge sowohl hinsichtlich der CLSM als auch der Gewebsaufbereitung und des technischen Vorgehens wurden in der vorliegenden Studie umgesetzt. Die Untersuchung von Mittelschnitten, Rändern, Muffins und Brotlaib Schnitten deckte ein sehr breites Spektrum an Techniken ab und spiegelte die Einführung der CLSM in die alltäglich chirurgische Routine wider.

Alle drei in die Studie eingeschlossene Operateure wiesen vergleichbare Vorkenntnisse in der Bewertung der histopathologischen Schnitte und der CLSM-Bilder auf. Dennoch gab es beträchtliche Unterschiede in der Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Beobachter. Eine der größten Herausforderungen war zum Einen die Genauigkeit der Aufbereitung der Gewebsschnitte und zum Anderen das Erstellen sowie das Auswerten der CLSM-Bilder durch die Beobachter innerhalb des zeitlichen Rahmens des normalen chirurgischen Tagesablaufs. Wegen der Unmittelbarkeit der Beurteilung und Auswertung der Bilder während, zwischen und nach den

Operationen konnten Faktoren wie Zeitdruck, Stress oder Müdigkeit die Ergebnisse der Beobachter negativ beeinflusst haben. Daher sind die unterschiedlichen Ergebnisse der drei Untersucher im Rahmen des praxisbezogenen Klinikalltags zu interpretieren, welcher als Grundlage des Studienaufbaus diente. Andere Studien (39,41,42) wurden präklinisch oder nur im Labor durchgeführt, wodurch diese Art von Störfaktoren keine Beachtung fanden. Doch muss man sich im Klaren sein, dass eine Methode erst dann zum neuen Standard werden kann, wenn sie auch im klinischen Alltag eine vergleichbare Genauigkeit zu bisherigen Standardmethoden erreicht und nicht nur unter störfreien Laborbedingungen signifikante Aussagen treffen kann.

Die drei Untersucher der CLSM-Bilder hatten in der Zeit zwischen der ersten Studie im Jahr 2007 und der aktuellen Studie aus dem Jahr 2008 keine weiteren Erfahrungen oder Fortbildungen mit CLSM-Bildern. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde sichtbar, dass die Beurteilung der ersten CLSM-Bilder durch die fehlende Einführung der CLSM für die Untersucher die Trefferquote insgesamt beeinträchtigte. Eine kurze Erinnerungseinheit vor der ersten Auswertung wäre hier sicher hilfreich gewesen. Die Verbesserung der Genauigkeit der Ergebnisse im Laufe der Studie kann auch dadurch erklärt werden, dass es eine kontinuierliche Optimierung der Handhabung und Aufbereitung des frischen Gewebes gab.

In vorherigen Studien (17,18,28) wurde gezeigt, dass kleine BZK-Nester bei der Bewertung von CLSM-Bildern übersehen wurden. In diesen Studien wurde das Gewebe mit Essig- oder Zitronensäure vorbehandelt, was anscheinend nicht ausreichend war um alle BZK-Nester zu erkennen. Daher wurde in der aktuellen Studie das Gewebe zusätzlich in Toluidinblau inkubiert. Die Färbung mit Toluidinblau band nicht 100% basaliomspezifisch, wurde aber schon in vorhergehenden Studien zur Färbung von Karzinoma *in vivo* erfolgreich angewandt (43).

Durch die Inkubation des Gewebes in Essigsäure und der zusätzlichen Färbung mit Toluidinblau wurde ein größerer Kontrast zwischen gesundem und BZK-Gewebe erreicht. Dies basiert auf der Wellenlänge des CLSM. Bei einer

Wellenlänge von 830 nm konnten durch Toluidinblau Kerne und Bindegewebsstrukturen hell aufleuchtend dargestellt werden. Dieses Phänomen verstärkt sich außerdem durch die Kondensation des Chromatins durch Essigsäure. Die Kombination dieser beiden Effekte erklärt, weshalb die Ergebnisse im Vergleich zur ersten Studien besser ausfielen (17), denn die Zellkerne und die Tumorstrukturen waren in der vorliegenden Studie leichter zu erkennen und zu differenzieren.

Eine hohe Sensitivität und Spezifität muss für die CLSM gefordert werden, um gegebenenfalls die Paraffinhistologie als Standardmethode ersetzen zu können. Die Sensitivität lag, außer in den Mittelschnitten, unter 90% und die erwünschte Spezifität wurde ebenfalls nicht erreicht.

In neueren Studien (43,44) zeigte sich, dass Fluoreszenzmarker eine höhere Kontrastierung und Erkennung von Tumorzellen ermöglichen. Mit dieser Grundlage führten Gareau et al. (41) 2009 eine präklinische Studie durch. Bei dieser Studie wurde eine Sensitivität von 96,6% und eine Spezifität von 89,2% im Erkennen von BZK auf den CLSM-Bilder erreicht. Die Genauigkeit, die in dieser Studie erreicht wurde, ist etwas höher als die in der vorliegenden Studie. Ein Grund weshalb eine höhere Sensitivität und Spezifität erzielt wurde, liegt wahrscheinlich an der Inkubation mit einem Fluoreszenzmarker, wodurch sich die BZK besser darstellen und somit leichter identifizieren ließen als nach Inkubation mit Essigsäure und Toluidinblau. Die Erstellung der CLSM-Bilder, deren Auswertung, sowie das Vergleichen der CLSM-Bilder und Histologieschnitte führten Gareau et al. unter Laborbedingungen durch. Zeitdruck, Alltagsstress und Klinikablauf waren somit als Störfaktoren ausgeschaltet. Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Gareau's Studie vergleichen zu können müssten diese Bedingungen äquivalent sein. Da dies nicht zutrifft, ist ein Vergleich von Sensitivität und Spezifität der beiden Studien nur eingeschränkt möglich und muss durch künftige ähnlich konzipiert Studien weiter überprüft werden.

Ebenso wie in der histologischen Auswertung von Präparaten an

Paraffinschnitten wurde in dieser Studie bestätigt, dass die Erkennung von soliden Basaliomen in den CLSM-Bildern weit über der von Tumoren des fibrosierenden Subtypus lag. Die Unterscheidung der soliden BZK-Nester von fibrosierendem BZK erleichterte sich dadurch, dass solide Tumore oft klar abgrenzbare Pallisadenstellung der Zellkerne zeigten. Im Gegensatz dazu waren fibrosierende Tumore meist in gesundes Gewebe hineingewoben, weshalb sie nicht klar abgrenzen ließen. Diese Einschränkung wird auch in Zukunft eine große Herausforderung in der CLSM-Bildgebung der BZK darstellen.

In einer der Studien, die sich mit der *in vivo* Mikroskopie der BZKs befasst hat (20), wurde bewiesen, dass eines der Merkmale zur Erkennung der BZK-Nester oder Zellen ein Spalt zwischen Tumor und gesundem Gewebe darstellt. Der Spalt entspricht dem in der Histologie bekanntem "Retraktionsspalt", von dem man bisher annahm, dass es sich um einen Fixationsartefakt handelte. In der Histologie war dieser Spalt teils größer als *in vivo* beobachtet, was vermutlich an der Präparierung und Fixierung des Gewebes lag. *Ex vivo* CLSM verarbeitet das noch nicht fixierte Gewebe, daher müsste auch hier der in der Studie beschriebene Spalt erkennbar sein. Bei weiteren Studien könnte dies ein neuer Anhaltspunkt zur besseren Identifizierung von BZKs sein. Auf den 312 von uns erstellten CLSM-Bilder wurden bei einigen Präparaten solche Spaltbildungen beobachtet, jedoch nicht in die Auswertung einbezogen, sodass die vorliegende Studie hierüber keine Aussagen treffen kann.

4.2 Schnelligkeit/Zeit

Die 3D Histologie an Gefrierschnitten oder in Paraffintechnik ist sehr zeitaufwändig und teuer. Die Kryostathistologie benötigt eine spezialisierte und teure Ausstattung wie auch trainiertes und fachkundiges Personal. Im Gegensatz dazu eröffnet die CLSM im Bereich der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie eine effektivere, zeitsparendere und günstigere Alternative.

Diese Studie ist eine der Ersten, in welcher dieses neue Verfahren im klinischen Alltag und nicht unter Laborbedingungen angewandt wurde. Eine der Zielsetzungen unserer Studie war es, einen möglichst geringen Zeitaufwand für das Erstellen der CLSM-Bilder und deren Auswertung zu erreichen und dies im Vergleich zu Standardmethode darzustellen.

Für die Aufbereitung, Färbung und Fixierung des Gewebes auf dem Objektträger wurden im Mittel circa 4,5 Minuten benötigt. Für die konventionelle Methode (Paraffintechnik) müssen durchschnittlich circa 20 Stunden eingerechnet werden, um die Gewebsschnitte für die Beurteilung zu erhalten (32). Anschließend wurde ein komplettes 13 mm x 11 mm zusammengesetztes Mosaik in weniger als 3 Minuten mit dem CLSM erstellt. Zum Vergleich wurden in früheren Studien (40,41) zur CLSM, mindestens 9 Minuten für den gleichen Prozess, aber für die Erstellung von kleineren Mosaiken benötigt. Die verbesserte Geschwindigkeit der Bildgebung und der Zusammensetzung der einzelnen Kacheln war eines der größten Entwicklungen und Fortschritte in dieser Untersuchung. Diese immense Verbesserung und zeitgewinnende CLSM-Bilderstellung hängt sicherlich mit den technisch implementierten Verbesserungen des VivaScops 2500 im Vergleich zu den gesamten vorhergehenden Studien zusammen. Diese zeitliche Optimierung stellt eine solide Grundlage für weitere Studien in diesem Bereich dar.

Ebenso zeigte diese Studie, dass mit der CLSM mikroskopische Bilder von frischem Gewebe in 7,5 Minuten erstellt und bewertet werden konnten. Im Vergleich zu den bisherigen wissenschaftlichen Ergebnissen der *ex vivo* CLSM-Bildgebung ist dieses das schnellste bildgebende Verfahren (17,41).

4.3 Technische Fortschritte der Gewebsbehandlung

Eine der größten Herausforderungen der CLSM war es, schnellst möglich eine plane Schnittfläche aus dem frisch exzidierten Gewebe zu untersuchen, ohne

das Gewebe zu beschädigen oder zu verdrehen. Mit der Technik, die in dieser Studie zur Abflachung des Gewebes benutzt wurde, war es möglich für fast alle Größen und Dicken der frisch entnommenen Tumore eine glatte Oberfläche für den Scan zu erzeugen. Da diese Prozedur direkt im OP stattfand, war eine schnelle und doch gewebsschonende Behandlung zur Abflachung notwendig. Im Laufe der Wochen wurde eine Verbesserung, sowohl in der Zeit als auch in der Qualität der Abflachung des Gewebes erreicht. Dies weist auf eine Lernkurve und die Notwendigkeit von trainiertem Personal hin. In einer Studie im Jahr 2009 (42) wurde eine etwas zeitaufwändigere Methode zur flachen Darstellung der Gewebeproben benutzt. Das entnommene Gewebe wurde eingefroren, und Kryostatschnitte erzeugt, um von den Kryostatschnitten eine CLSM Randkontrolle durchzuführen. Durch das Herstellen der Kryostatschnitte war es einfacher, glatte Flächen zu erhalten. Allerdings konnte dadurch die äußere Schicht des Präparates nicht beurteilt werden. Diese „histologisch-chirurgische“ Methode zur Abflachung des Gewebes erhöht die Rate der falsch positiven Ergebnisse. Dies beruht darauf, dass in einer tieferen Schnittebene die Wahrscheinlichkeit steigt BZK Tumorausläufer anzutreffen, obwohl sie am äußersten Schnitt nicht präsent waren.

Da bei der verwendeten Methode der vorliegenden Studie die Gefrierschritte zur Histopathologie oder zur Herstellung von CLSM Präparaten entfallen waren, war es möglich eine mikroskopische Bildgebung direkt nach der OP „am Bett des Patienten“ zu machen.

4.4 Technische Fortschritte und Herausforderungen der CLSM

Aufgrund der technischen Verbesserung war es zum ersten Mal möglich, dass die kompletten 312 fertiggestellten CLSM-Mosaik direkt auf dem Display des konfokalen Mikroskops betrachtet und bewertet wurden. Wie schon erwähnt, konnte die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie dadurch erstmals direkt in die alltägliche chirurgische Routine integriert werden. Die jeweiligen Scans waren direkt nach der Operation verfügbar. Demzufolge wäre eine

Diagnosestellung "am Patientenbett" möglich gewesen, um das weitere therapeutische Vorgehen festzulegen. In der im Jahre 2007 durchgeführte Studie von D. Schüle (17) musste jedes einzelne CLSM-Bild erst digital umformatiert werden, um später an einem Computerbildschirm bewertet werden zu können. In einer anderen Studie (39) wurden die Bilder in einer externen Datei gespeichert, um später bewertet zu werden, da eine Bewertung am Mikroskop nicht gut durchzuführen war. Auch in der Studie von Gareau im Jahre 2008 (44) wurden die CLSM-Bilder erst extrahiert, in Photoshop© bearbeitet und schließlich zusammengesetzt, bevor sie ausgewertet werden konnten. In einer neueren Studie von Gareau aus dem Jahre 2009 (41) war es ebenfalls nicht möglich die Bilder direkt am CLSM zu beurteilen, sodass die gewonnenen CLSM-Bilder einige Wochen nach ihrer Erstellung an einem besonderen Bildschirm ausgewertet werden mussten.

Ein weiterer technischer Faktor, der einen zeitlichen Gewinn sowie eine Vereinfachung der CLSM-Bilderstellung bedeutete, war die automatische Helligkeits- und Kontrasteinstellung des CLSM. In vorherigen Studien (17,39) mussten alle Parameter für jedes Bild manuell neu eingestellt werden. Durch die automatische Helligkeits- und Kontrasterkennung des Geräts minimierte sich der Prozess zur Bilderzeugung, was sich auf die Zeitverkürzung auf weniger als drei Minuten auswirkte.

Ein zusätzlich Verbesserung in der CLSM war eine Zoomfunktion, wodurch Proben mit einer maximalen Größe von 143 mm^2 bis auf ein Bildfeld von $0,5 \times 0,5 - 1,5 \times 1,5 \text{ mm}^2$ vergrößert und auf dem Bildschirm betrachtet werden konnten. Die Vergrößerung und Auflösung, die am CLSM bis jetzt erzielt wurde, reicht dennoch nicht an die Qualität von Paraffinschnitten heran. Derzeit ist allerdings das Prinzip der CLSM mit der Funktion eines Lichtmikroskops vergleichbar. Nicht nur der ganze Schnitt des Gewebes war vollständig sichtbar, sondern Details konnten vergrößert und direkt eingesehen werden. Im Vorgängermodell des eingesetzten Mikroskops war ein direktes Zoomen am Gerät nicht möglich. Vergrößerungen in dieser früheren Studie konnten nur

nachträglich am Computer durchgeführt werden (17). Von diesen Schwierigkeiten wird auch in der Studie von Gareau berichtet (44), weshalb sie sich entschieden haben, die Bilder in kleineren Abschnitten aber dafür hoher Auflösung zu erstellen und später die einzelnen Bilder extern (Photoshop©) zu einem Bild wieder zusammenzufügen. Dadurch wurde schlussendlich die gleiche Vergrößerung wie in unserer Studie erreicht, jedoch mit einem deutlich höherem Zeitaufwand, der mit dem klinischen Alltag nicht in diesem Ausmaß vereinbar wäre.

Um mit der Standardmethode (Paraffinschnitte) und der Qualität der Lichtmikroskopie konkurrieren zu können, wäre es von großer Wichtigkeit für weitere Studien diese Zoomfunktion am CLSM weiterzuentwickeln. Insbesondere sollte dabei die Vergrößerung aller erzeugten CLSM-Bildern ermöglicht werden, was eine schnellere Software erfordert.

Eine weitere große Herausforderung der CLSM-Technik war die Zusammensetzung ("stitching"), der einzelnen kleinen Kacheln zu einem CLSM-Bild. In der horizontalen Zusammensetzung der Bilder gab es eine Überlappung innerhalb eines Rahmens von 1-2%, eine Genauigkeit, die in der Beurteilung der Bilder von großem Vorteil war, wohingegen eine Überlappung von 8-10% in der Vertikalen die Bildbeurteilung erschwerte. Besonders bemerkbar machte sich dieses Phänomen in Bereichen fraglicher Tumorlokalisierung. Diese Bereiche wurden durch die Überlappung entweder übersehen oder aufgrund von doppelter Darstellung zweier Zellreihen überinterpretiert. Von diesem Sachverhalt wurde außer in der Studie von Schüle (17) in anderen Studien (39,41,42) nichts berichtet. Für eine Verbesserung der Ergebnisse und eine Anwendung der CLSM Technik muss demnach die Qualität der Zusammensetzung der einzelnen Kacheln verbessert werden.

4.5 Fazit

Derzeit stellen sich bei der CLSM noch einige Mängel der notwendigen

Sensitivität und Spezifität dar, um auch die minimalsten Tumorausläufer entdecken zu können und diese Methode als Standardmethode einführen zu können.

Es ist elementar die Operateure für die CLSM Auswertung der Bilder zu trainieren, sollte dieses Verfahren in den klinisch chirurgischen Alltag eingeführt werden.

Zukünftige Studien sollten einen Schwerpunkt auf die Befähigung der Dermatopathologen zur Beurteilung und Auswertung der konfokalen Bilder legen. Ebenso wäre es denkbar, dass digitale CLSM-Bilder direkt aus dem Operationssaal zu einem Pathologen übermittelt werden, welcher für die Auswertung dieser Bilder trainiert ist. Dies würde allen Operateuren, ungeachtet ob sie eine spezifische dermatopathologische Ausbildung besitzen, ermöglichen Operationen mit CLSM gestützter mikrographisch-kontrollierter Chirurgie durchzuführen.

Für die mikroskopisch kontrollierte Chirurgie könnte die CLSM eine zeit- und ressourcensparende Alternative zur klassischen histopathologischen Diagnostik darstellen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war der Vergleich der *ex vivo* Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM, Konfokale Laser Scanning Mikroskopie), mit dem Standardverfahren der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie (dreidimensionalen Histologie, 3D-Histologie, in Paraffintechnik).

Im Rahmen einer Studie wurden zweiundsiebzig fortlaufend chirurgisch entfernte Basalzellkarzinome (BZK) untersucht. Die Tumoren wurden makroskopisch entweder als "Tübinger Torte", "Muffin" oder in "Brotlaib"-Technik aufbereitet.

Nach der Vorbehandlung mit Essigsäure wurden die einzelnen Proben als native Gewebeblöcke mit Toluidinblau eingefärbt und mit der CLSM untersucht. Die fixierten Proben wurden anschließend im Paraffinverfahren aufbereitet und anhand von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitten histologisch beurteilt.

Für die CLSM-Bildgebung wurde eine modifizierte Version des kommerziell erhältlichen CLSM (VivaScope2500; Lucid Inc, Rochester, New York) benutzt. Die kurze Dauer des Scanvorgangs hatte den Vorteil, dass der Operateur die CLSM-Bilder unmittelbar nach der Operation beurteilen konnte.

Es wurden 312 CLSM-Bilder erzeugt: 73 Mittelschnitte, 196 Randschnitte, 23 "Muffins" und 20 "Brotlaibschnitte". Die Sensitivität der CLSM betrug bei den Mittelschnitten 94%, bei den Randschnitten 73,7%, bei den Muffins und Brotlaibschnitten jeweils 80%.

Mit dem technisch verbesserten Vivascope2500, konnten alle 312 CLSM-Bilder direkt auf dem CLSM-Bildschirm betrachtet und bewertet werden. Die Erstellung der CLSM-Bilder erforderte weniger als 3 Minuten. Erstmals konnte die *ex vivo* CLSM als diagnostisches Verfahren in den klinischen OP-Ablauf bei Patienten mit Basalzellkarzinomen integriert werden.

Mit der *ex vivo* CLSM konnte allerdings keine hinreichende diagnostische Sicherheit erreicht werden. Die Beurteilung der CLSM-Bilder war untersucherabhängig. Da die Auswertung zwischen oder während der Operationen erfolgte, waren Stress, Zeitdruck und Aufmerksamkeit des jeweiligen Untersuchers/Operators mögliche Störfaktoren. Im Verlauf der Studie verbesserte sich die Qualität der CLSM-Bilder.

Das Ziel einer Verbesserung der CLSM sollte das Erreichen einer höheren Sensitivität und Spezifität sein. In weiteren Studien könnten beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe zur spezifischen Darstellung von Tumorgewebe bei der CLSM eingesetzt werden. Die CLSM könnte in Zukunft eine zeitsparende und kostengünstigere Alternative zur bis jetzt verwendeten 3D-Histologie im Kryostat- oder Paraffinverfahren darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Green A (1992) Changing patterns of non-melanoma skin cancer. *Epithelial Cell Biol* 1: 47-51.
2. Astner S, Ulrich M. (2010) Confocal laser scanning microscopy. *Hautarzt* 61: 421-8.
3. Casson P (1980) Basal cell carcinoma. *Clin Plast Surg* 7: 301-11.
4. Dahl E, Aberg M, Rausing A, Rausing EL (1992) Basal cell carcinoma: an epidemiologic study in a defined population. *Cancer* 70: 104-8.
5. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58: 71-96.
6. Mohs FE (1976) Chemosurgery of skin cancer: fixed tissue and fresh tissue techniques. *Arch Dermatol* 112: 211-15.
7. Mohs FE (1950) Chemosurgical treatment of melanoma: a microscopically controlled method of excision. *Arch Dermatol Syph* 62: 269-72.
8. Tromovitch TA, Stegeman SJ (1974) Microscopically controlled excision of skin tumors. *Arch Dermatol* 110: 231-232.
9. Shriner DL, McCoy DK, Goldberg DJ, Wagner RFJ (1998) Mohs micrographic surgery. *J Am Acad Dermatol* 39: 79-97.
10. Weber PJ, Moody BR, Dryden RM, Foster JA (2000) Mohs surgery and processing: novel optimizations and enhancements. *Dermatol Surg* 26: 909-914.
11. Davis DA, Pellowski DM, William HC (2004) Preparation of frozen sections. *Dermatol Surg* 30: 1479-1485.
12. Breuninger H, Schaumburg-Lever G (1988) Control of excisional margins by conventional histopathological techniques in the treatment of skin tumours. An alternative to Mohs' technique. *J Pathol* 154: 167-171.
13. Breuninger H (1984) Histologic control of excised tissue edges in the operative treatment of basalcell carcinomas. *J Dermatol Surg Oncol* 10: 724-728.
14. Breuninger H, Dietz K (1991) Prediction of subclinical tumor infiltration in basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 17: 574-578.
15. Moehrle M, Dietz K, Garbe C, Breuninger H (2006) Conventional histology vs. three-dimensional histology in lentigo maligna melanoma. *Br J Dermatol* 154: 453-459.
16. Möhrle M, Breuninger H (2006) The Muffin technique - an alternative to Mohs' micrographic surgery. *J Dtsch Dermatol Ges* 4: 1080-1084.
17. Schüle D, Breuninger H, Schippert W, Dietz K, Moehrle M (2009) Confocal laser scanning microscopy in micrographic surgery (three-dimensional histology) of basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 161: 698-700.
18. Rajadhyaksha M, Menaker G, Flotte T, Dwyer PJ, González S (2001) Confocal examination of nonmelanoma cancers in thick skin excisions to potentially guide mohs micrographic surgery without frozen histopathology. *J Invest Dermatol* 117: 1137-1143.

19. Chung VQ, Dwyer PJ, Nehal KS, Rajadhyaksha M, Menaker GM, Charles C, Jiang SB (2004) Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg* 30: 1470-1478.
20. Ulrich M, Roewert-Huber J, González S, Rius-Diaz F, Stockfleth E, Kanitakis J (2011) Peritumoral cleaving in basal cell carcinoma: correlation of in vivo reflectance confocal microscopy and routine histology. *J Cutan Pathol* 38: 190–195.
21. Koller S, Horn M, Weger W, Massone C, Smolle J, Gerger A (2009) Confocal laser scanning microscopy-guided surgery for neurofibroma. *Clin Exp Dermatol* 34: 670-2.
22. Kang HY, Bahadoran P, Ortonne JP (2010) Reflectance confocal microscopy for pigmentary disorders. *Exp Dermatol* 19: 233-9.
23. Gerger A, Hofmann-Wellenhof R, Samonigg H, Smolle J (2009) In vivo confocal laser scanning microscopy in the diagnosis of melanocytic skin tumours. *Br J Dermatol* 160: 475-81.
24. Sgambato A, Buffon RB, Cota C, Matrianni A, Ardigò M (2009) In vivo reflectance confocal microscopy for cutaneous metastasis of bladder adenocarcinoma. *Arch Dermatol* 145: 213-5.
25. Altintas MA, Altintas AA, Guggenheim M, Busch KH, Niederbichler AD, Aust MC, Vogt PM (2009) Is superficial burn caused by ultraviolet radiation (sunburn) comparable to superficial burn caused by heat a histomorphological comparison by in vivo Reflectance-Mode-Confocal Microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23: 1389-93.
26. Altintas MA, Altintas AA, Guggenheim M, Aust MC, Niederbichler AD, Knobloch K, Vogt PM (2010) Insight in microcirculation and histomorphology during burn shock treatment using in vivo confocal-laser-scanning microscopy. *J Crit Care* 25: 173.
27. Astner S, González E, Cheung AC, Rius-Díaz F, Doukas AG, William F, González S (2005) Non-invasive evaluation of the kinetics of allergic and irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 124: 351-9.
28. Swindells K, Burnett N, Rius-Diaz F, González E, Mihm MC, González S (2004) Reflectance confocal microscopy may differentiate acute allergic and irritant contact dermatitis in vivo. *J Am Acad Dermatol* 50: 220-8.
29. Patel YG, Nehal KS, Aranda I, Li Y, Halpern AC, Rajadhyaksha M (2007) Confocal reflectance mosaicing of basal cell carcinomas in Mohs surgical skin excisions. *J Biomed Opt* 12: 034027.
30. Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR (1995) In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol* 104: 946–952.
31. Rajadhyaksha M, Anderson RR, Webb RH (1999) Video-rate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues in vivo. *Appl Opt* 38: 2105-15.
32. Rajadhyaksha M, González S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH (1999) In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol* 13: 293–303.

33. Moehrle M, Breuninger H, Rocken M (2007) A confusing world: what to call histology of three-dimensional tumour margins? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21: 591-595.
34. Drezek RA, Collier T, Brookner CK, Malpica A, Lotan R, Richards-Kortum RR, Follen M (2000) Laser scanning confocal microscopy of cervical tissue before and after application of acetic acid. *Am J Obstet Gynecol* 182: 1135-1139.
35. Roderfeld M, Matern S, Roeb E (2003) Confocal laser scanning microscopy: a deep look into the cell. *Dtsch Med Wochenschr* 128: 2539-42.
36. Engelhardt J, Knebel W (1993) Konfokale Laserscanning-Mikroskopie. *Physik in unserer Zeit* 24: 70-78.
37. Ulrich M, Maltusch A, Röwert-Huber J, González S, Sterry W, Stockfleth E, Astner S (2007) Actinic keratoses: non-invasive diagnosis for field cancerisation. *Br J Dermatol* 156: 13-7.
38. Aghassi D, Anderson RR, González S (2000) Confocal laser microscopic imaging of actinic keratoses in vivo: a preliminary report. *J Am Acad Dermatol* 43: 42-8.
39. Kaeb S, Landthaler M, Hohenleutner U (2009) Confocal laser scanning microscopy-evaluation of native tissue sections in micrographic surgery. *Lasers Med Sci* 24: 819-823.
40. Gareau DS, Patel YG, Li Y, Halpern AC, Rajadhyaksha M (2009) Confocal mosaicing microscopy in skin excisions: a demonstration of rapid surgical pathology. *J Microsc* 233: 149-159.
41. Gareau DS, Karen JK, Dusza SW, Tudisco M, Nehal KS, Rajadhyaksha M (2009) Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *J Biomed Opt* 14: 034012.
42. Karen JK, Gareau DS, Dusza SW, Tudisco M, Rajadhyaksha M, Nehal KS (2009) Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy. *Br J Dermatol* 160: 1242-1250.
43. Al-Arashi MY, Salomatina E, Yaroslavsky AN (2007) Multimodal confocal microscopy for diagnosing nonmelanoma skin cancers. *Lasers Surg Med* 39: 696-705.
44. Gareau DS, Li Y, Huang B, Eastman Z, Nehal KS, Rajadhyaksha M (2008) Confocal mosaicing microscopy in Mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology. *J Biomed Opt* 13: 054001.

7. Veröffentlichung

Publikation

Ziefle S, Schüle D, Breuninger H, Schippert W, Moehrl M (2010) Confocal Laser Scanning Microscopy vs 3-Dimensional Histologic Imaging in Basal Cell Carcinoma. Archives of Dermatology 146: 843-847.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Eigenanteil

Sarah Ziefle

Diese Studie wurde von Prof. Dr. med. M. Möhrle und mir konzipiert und durchgeführt. Die Vorversuche wurden von mir geplant und entsprechend durchgeführt. Im Anfangsstadium (die ersten 3 Tage) wurde ich von D. Schüle unterstützt.

Die Präparierung, Einlegung und Färbung des Gewebes für diese Studie wurde selbständig von mir durchgeführt. Alle 312 Konfokalen Laser Scanning Mikroskop Bilder wurden von mir erstellt und zur Beurteilung den entsprechenden Ärzten vorgelegt. Die Tabellen; mit den Daten der Operateure, den Histologie Ergebnissen, den anonymisierten Daten der Patienten und den verschiedenen Parametern der einzelnen Proben, wurden von mir erhoben und zusammengestellt. Mit unterstützenden Beratung des biometrischen Institut in Tübingen wurden die Tabellen von mir ausgewertet.

Die Verfassung dieser Dissertation ist selbständig von mir durchgeführt worden. Wenn Material von dritten benutzt wurde, ist es dementsprechend im Literaturverzeichnis vermerkt.

Die Publikation wurde selbständig von mir verfasst und von den Koautoren Korrektur gelesen.

Anteil der Koautoren

Deborah Schüle

Sie hat mich in die CLSM eingeführt, während der ersten Tage im OP und am CLSM Gerät unterstützt. Sie hat die Publikation Korrektur gelesen.

Helmut Breuninger, MD

Er hat den Studienaufbau unterstützt, war an der Datenerhebung (viele von ihm durchgeführten OPs) und an der Auswertung der CLSM-Bildern beteiligt. Er hat die Publikation Korrektur gelesen.

Wilfried Schippert, MD

Er war an der Datenerhebung (viele von ihm durchgeführte OPs) und an der Auswertung der CLSM-Bilder beteiligt. Er hat die Publikation Korrektur gelesen.

Matthias Möhrle, MD

Er war, zusammen mit mir, der Hauptverantwortliche in der Konzipierung, Planung und Durchführung dieser Studie. Er hat meine Arbeit betreut und bis zum Ende unterstützt. Er war an der Datenerhebung (viele von ihm durchgeführte OPs) und an der Auswertung der CLSM-Bilder beteiligt. Er hat die Publikation Korrektur gelesen.

9. Danksagung

Ich bin sehr dankbar für meinen Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. med. M. Möhrle, der mich in diesem langen Prozess immer wieder neu angeleitet hat und mir mit seiner Zeit und Erfahrung ermutigend zur Seite stand. Von der Konzipierung dieser Arbeit an bis zum Druck der Dissertation stand er hinter mir und dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Ich möchte Prof. Dr. med. H. Breuninger und Dr. med. W. Schippert für ihre Unterstützung und Mitarbeit in der experimentellen Phase der Studie danken. Ich möchte auch Dr. G. Metzler für ihre Unterstützung bei der Bildgebung der Histologie danken und Deborah Schüle für ihre Unterstützung während der experimentellen Phase dieser Arbeit.

Ich danke von Herzen meinen Eltern, die in jeder Hinsicht hinter mir standen und mich immer wieder neu ermutigt haben wenn ich nicht weiter kam. Auch meinen Geschwistern ein herzliches Dankeschön, da sie immer ein ermutigendes Wort für mich hatten wenn ich mit den Kräften am Ende war.

Auch noch bedanken möchte ich mich von Herzen bei all meinen Freunden und ganz besonders bei Evelyn Böttger, die während dieser Zeit für mich da waren, mich unterstützt haben und mir geholfen haben nicht aufzugeben und das Ziel zu erreichen.

Der größte Dank und Lob gehört jedoch Gott. Er gab mir die Kraft und das Durchhaltevermögen diese Arbeit zu beginnen und zu vollenden.

Ihm allein sei die Ehre!

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sarah Ziefle
Geburtsdatum: 20.04.1987
Geburtsort: Nagold, Deutschland

Bildung

1999-2005 Schweizer Schule, Santiago de Chile.

12/2005 Abitur in Schweizer Schule, Santiago de Chile.

04/2006 Studienplatz in Human Medizin, Universität Tübingen
Deutschland.

04/2008 1. Staatsexamen (Physikum), Tübingen, Deutschland.

08/2010 1. Publikation
Ziefle S, Schüle D, Breuninger H, Schippert W, Moehrle M
(2010) Confocal Laser Scanning Microscopy vs 3-Dimensional
Histologic Imaging in Basal Cell Carcinoma. Archives of
Dermatology 146: 843-847.

07/2011 2. Publikation
Möhrle M, Käflein L, Ziefle S, Metzler G. (2011) Rapid Lump
Examination (RLE) - eine neue Technik in der mikroskopisch -
kontrollierten Chirurgie? J Dtsch Dermatol Ges 9: 534-9.

15.05.2013 Ärztliche Prüfung / Zweiter Abschnitt.