

Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen

„Direktuntersuchung mit der konfokalen Laser Scanning  
Mikroskopie (CLSM) und der „Rapid Lump Examination“  
(RLE) im Vergleich zu Paraffinschnitten bei der mikrogra-  
phisch kontrollierten Chirurgie von Basalzellkarzinomen“

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Nina Peters

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Möhrle

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. Vogel

Tag der Disputation: 13.07.2018

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	5
1. Einleitung .....	6
1.1 Basalzellkarzinome .....	6
1.1.1 Definition und Einteilung .....	6
1.1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	6
1.1.3 Therapie.....	7
1.2 Mikrographisch kontrollierte Chirurgie.....	7
1.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie .....	9
1.4 Rapid Lump Examination .....	9
2. Fragestellung .....	10
3. Material und Methoden.....	12
3.1 Material und Methoden Teil A: CLSM.....	12
3.1.1 Studiendesign und Aufbau .....	12
3.1.2 Prozedur .....	13
3.1.2.1 Exzision und Präparation.....	13
3.1.2.2 Färben und Positionieren .....	13
3.1.2.3 Digitale Abbildungen.....	16
3.1.2.4 Evaluation.....	16
3.1.2.5 Statistik.....	18
3.2 Material und Methoden Teil B: RLE .....	18
3.2.1 Studiendesign und Aufbau .....	18
3.2.2 Prozedur .....	19
3.2.2.1 Exzision und Präparation.....	19
3.2.2.2 Fixierung, Färbung und Positionierung.....	20
3.2.2.3 Evaluation.....	20
3.2.2.4 Statistik.....	21
4. Ergebnisse .....	22
4.1 Ergebnisse Teil A: CLSM .....	22
4.2 Ergebnisse Teil B: RLE .....	36
5. Diskussion.....	43
5.1 Diskussion Teil A: CLSM.....	43
5.2 Diskussion Teil B: RLE.....	48
6. Schlussfolgerung.....	52

6.1	Schlussfolgerung Teil A: CLSM.....	52
6.2	Schlussfolgerung Teil B: RLE.....	52
7.	Zusammenfassung.....	54
8.	Literaturverzeichnis .....	56
	Abbildungsverzeichnis.....	59
	Tabellenverzeichnis.....	60
9.	Erklärungen zum Eigenanteil .....	63
10.	Veröffentlichungen.....	64
	Danksagung .....	65

## **Abkürzungsverzeichnis**

BZK	Basalzellkarzinom
BZKs	Basalzellkarzinome
MKC	Mikrographisch kontrollierte Chirurgie
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy (Konfokale Laser Scanning Mikroskopie)
RLE	Rapid Lump Examination
OCT	Optical Coherence Tomography (Optische Kohärenztomographie)
H&E	Hämatoxylin-Eosin
sek	Sekunden
KI	Konfidenzintervall
HD-OCT	High Definition Optical Coherence Tomography (hochauflösende Optische Kohärenztomographie)

# 1. Einleitung

## 1.1 Basalzellkarzinome

### 1.1.1 Definition und Einteilung

Das Basalzellkarzinom (BZK) ist ein Tumor der Haut. Es wurde früher als „semimaligne“ bezeichnet, da dieser Tumor zwar destruierend und infiltrativ wächst, jedoch praktisch nie metastasiert [4, 6]. Die entarteten Zellen im BZK bilden inselartige Tumorstränge aus vielen zytoplasmaarmen Zellen [1]. Im histologischen Bild zeigen sich u.a. atypische, basaloide Tumorzellen ausgehend von der Epidermis oder Haarfollikeln, Retraktionsartefakte, randständige Palisaden von Zellkernen, solare Elastose in der Epidermis und entzündliches Infiltrat im umgebenden Gewebe [7]. BZKs werden klinisch in verschiedene Subtypen eingeteilt: knotiges, superfizielles, sklerodermiformes, pigmentiertes und destruierendes BZK [1]. Abhängig vom Typ des BZKs ist es klinisch schwierig, die Grenze der Infiltration festzulegen [1]. Dies beeinflusst die Wahl der Therapie.

### 1.1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

Basalzellkarzinome (BZKs) wurden erstmals 1900 von Krompecher beschrieben und sind heutzutage mit einer Inzidenz von ca. 70-100/100.000 Einwohnern/Jahr in Deutschland die am häufigsten vorkommenden (semi-)malignen Hauttumoren [1]. Risikofaktoren sind u.a. intensive Sonnenexposition und gehäufte Sonnenbrände, v.a. in der Kindheit [2, 3]. Deshalb sind vorwiegend helle Hauttypen und Menschen mit rotblondem Haar gefährdet, an einem BZK zu erkranken [3, 4]. Außerdem steigt das Risiko z.B. durch den Kontakt mit karzinogenen Substanzen und Therapie mit Immunsuppressiva [1]. Bedingt durch die Risikofaktoren, tritt das BZK vermehrt an sonnenexponierten Arealen der Haut, wie dem Gesicht, den Ohren und dem Kapillitium auf. Der Stamm und die Extremitäten sind seltener, Schleimhäute nicht primär betroffen [1, 5].

### 1.1.3 Therapie

Da die Inzidenz der BZKs weiter steigt, ist es von großem Interesse, diese sehr häufigen Tumoren früh und sicher zu therapieren [6, 8]. Folgende Therapieoptionen stehen dabei zum jetzigen Zeitpunkt zur Verfügung: Exzision, mikrographisch kontrollierte Chirurgie (MKC), Kürettage und Elektrodesikkation, Kryochirurgie, ablativ Lasertherapie (CO<sub>2</sub>-Laser, Erbium-YAG-Laser), Strahlentherapie, photodynamische Therapie, immunmodulatorische Behandlungen (z.B. Imiquimod), oder Hedgehog-Signalweg-Inhibitoren. Die verschiedenen Therapieoptionen werden abhängig von Art des BZKs, der Tumorlokalisation und dem klinischem Fall angewendet [1, 9].

Insbesondere, wenn das BZK klinisch nicht eindeutig abgrenzbar ist, ist die effektivste Therapie mit der geringsten Rezidivrate die mikrographisch kontrollierte Chirurgie [1, 10].

## 1.2 Mikrographisch kontrollierte Chirurgie

Der Begriff der „mikrographisch kontrollierten Chirurgie“ (MKC) geht zurück auf den amerikanischen Chirurgen Frederic Mohs und beschreibt eine spezielle chirurgische Exzisionstechnik von Hauttumoren, bei der eine komplette lückenlose Randkontrolle erfolgt. Das bedeutet, dass die Oberfläche eines Gewebestück nach seiner Exzision *topografisch* orientiert und vollständig *mikroskopisch* betrachtet wird, um zurückbleibende Tumorausläufer im Patienten sicher nachweisen und lokalisieren zu können. Dies ist wichtig, um eine R0-Resektion und somit eine Heilung herbeizuführen und Rezidive zu verhindern [11].

Falls notwendig, können weitere gezielte Nachexzisionen durchgeführt werden, die auf die gleiche Art mikrographisch untersucht werden, bis eine R0-Resektion erfolgt ist [4, 12, 13]. Wunden können in unkomplizierten Fällen schon bei der primären Operation verschlossen werden, große Tumoren oder problematische Läsionen werden jedoch mit einer vorläufigen Defektdeckung versorgt, um erst bei sicherer Tumorfreiheit verschlossen zu werden [11].

Heutzutage existiert der Begriff „Mohs‘ Chirurgie“ neben vielen anderen Verfahren, welche alle das gleiche Prinzip beschreiben: Verschiedene chirurgische Exzisionstechniken mit einer kompletten histologischen Schnittrandkontrolle (3D-Histologie) [4, 12, 13].

Unter allen möglichen Therapieformen von Basalzellkarzinomen, geht diese Technik mit der geringsten Rezidivrate einher [8, 10]. Außerdem ist sie sehr gewebeschonend und verspricht daher gute kosmetische Ergebnisse. Um Gewebe zu schonen und gleichzeitig den Tumor möglichst vollständig zu entfernen, wird ein Sicherheitsabstand gewählt, welcher sich nach Tumorgröße, Lokalisation des Tumors und Tumortyp richtet [11].

Es gibt verschiedene Methoden, das Exzidat zu entfernen und makroskopisch zu präparieren, um möglichst alle Ränder des Gewebes untersuchen zu können. In der 3D-Histologie werden die Tumore meist en bloc entfernt und nach Techniken wie der „Tübinger Torte“ oder der „Muffin-Methode“ zugeschnitten. Bei der „Tübinger Torte“ werden die Tumorränder als 1-3mm breite Streifen und die untere Basis entfernt. Somit entstehen Mittelstück, Ränder und Basis.

Bei der „Muffin-Technik“ werden die Ränder und die Basis als ein Stück vom Mittelteil getrennt und durch kleine Relaxierungs-Schnitte in eine Ebene gebracht, als ob eine Muffin-Papierform in eine Ebene aufgefaltet würde. Somit entstehen Mittelstück und Rand und Basis als ein Stück. Bei beiden Methoden werden die einzelnen Teile so oft geteilt, dass sie in eine Standard Histologie-Kassette passen, um sie histologisch aufzuarbeiten [11].

Die Standardmethode für die mikrographische Randkontrolle in Deutschland beruht auf der Erstellung von Paraffinschnitte, welche viel Zeit benötigen (20h – 72h). Bis das Ergebnis der histologischen Untersuchung vorliegt, müssen Wunden offengelassen werden oder erneut eröffnet werden, falls die histologische Randkontrolle positiv ist. Dies ist unangenehm für den Patienten und verursacht mehrzeitige Operationen. Deshalb werden neben den Standarduntersuchungen heutzutage auch Alternativen für die histopathologische Untersuchung erforscht [14]. Dazu gehören z.B. die nicht invasiven *in vivo* Methoden der optischen Ko-



härenz-Tomographie (OCT) und der *in vivo* konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM), welche in Zukunft Probeexzisionen ersetzen könnten. Bei der OCT kann die Haut noch vor der Exzision vertikal mit einer Tiefe von bis zu 1-2 mm dargestellt werden [15]. Zur Anwendung dieser Methode bei Basalzellkarzinomen existieren derzeit zu wenige aussagekräftige Studien [16, 17]. Die Eindringtiefe der *in vivo* CLSM beträgt im Gegensatz zur OCT nur bis zu 350 µm [18, 19].

Zwei alternative *ex vivo* Methoden wurden in der folgenden Studie untersucht: die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) und die Rapid Lump Examination (RLE). Im Gegensatz zur Paraffinhistologie kann mit diesen beiden Methoden Frischgewebe innerhalb kürzester Zeit untersucht und damit noch intraoperativ entschieden werden, ob bei Tumorfreiheit die Wunde zu verschließen ist, oder bei verbleibenden Tumoranteilen eine Nachexzision durchzuführen ist.

### **1.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie**

Die CLSM wurde 1957 von Marcin Minsky patentiert und seitdem stetig weiterentwickelt. Die *ex vivo* CLSM wird bisher hauptsächlich in der MKC von Basalzellkarzinomen eingesetzt [20]. Sie ermöglicht die Untersuchung frischen Gewebes in hoher Auflösung mit einer Darstellung kleinsten Details. Somit entfällt die aufwändige Erstellung von Paraffin- oder Gefrierschnitten. Bei der CLSM scannt ein Laser eine bestimmte Ebene und es entsteht ein hochauflösendes digitales Bild, welches auf einem Bildschirm dargestellt wird. Zurzeit werden verschiedene Modi angewendet: der Reflexions-Modus, welcher v.a. *in vivo* und daher in ungefärbtem Gewebe angewendet wird [21], der Fluoreszenz-Modus, bei dem das Gewebe mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelt wird oder die Kombination aus Reflexion und Fluoreszenz-Färbung, welche v.a. bei *ex vivo* Untersuchungen Anwendung findet [14, 22].

### **1.4 Rapid Lump Examination**

Die RLE wurde von Moehrle et al. 2011 zur Untersuchung von Basalzellkarzinomen erstmals beschrieben und durchgeführt.

Hierbei wird das zu untersuchende Frischgewebe nach kurzer Fixierung und Färbung auf einem Objektträger untersucht. Verwendet wird hierbei ein Stereomikroskop mit einer großen Tiefenschärfe, mit welchem eine dreidimensionale Darstellung der kompletten Gewebeoberfläche mikroskopisch möglich ist [23].

In einer ersten Pilotstudie 2011 erreichte die Methode im Vergleich zu Hämatoxylin & Eosin-gefärbten (H&E) Paraffinschnitten eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 94% [23]. 2016 wurde von Veenstra et al. eine Pilotstudie mit geringerer Fallzahl in der Niederlande durchgeführt, in der Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu mit H&E gefärbten Gefrierschnitten 84% und 94% betragen [24].

Die RLE könnte eine ergänzende Rolle spielen, um noch vor der standardmäßigen histologischen Beurteilung einschätzen zu können, ob weiteres Gewebe entfernt werden muss [25].

## **2. Fragestellung**

Der H&E-gefärbte Paraffinschnitt als Goldstandard zur histopathologischen Randkontrolle von Tumorexzidaten ist sehr zeit- und arbeitsaufwändig, weshalb keine intraoperative Befundung der Absetzungsränder erfolgen kann. Der Nachweis von Tumorverbänden im Absetzungsrand hat somit ein mehrzeitiges operatives Vorgehen zur Folge, welches für den Patienten belastend ist und die Behandlungskosten erhöht.

Um den Behandlungsprozess schneller durchführen zu können und den Patienten diese Nachteile zu ersparen, werden Alternativen gesucht. Bis heute gibt es außer der Gefrierschnitttechnik keine Methode mit ausreichender Genauigkeit, welche als Alternative zum Paraffinschnittverfahren eingesetzt werden kann. Deshalb ist es von großem Interesse, histologische Verfahren für die MKC zu entwickeln und deren Genauigkeit in ausreichend hohen Fallzahlen zu überprüfen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, innerhalb eines regulären klinisch-operativen Behandlungsablaufes die RLE mit einem Stereomikroskop und die *ex vivo* CLSM

mit einem neuen, erstmals klinisch eingesetzten konfokalen Laser Scanning Mikroskop in der MKC von Basalzellkarzinomen im Vergleich zu H&E-gefärbten Paraffinschnitten zu untersuchen.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Material und Methoden Teil A: CLSM**

#### **3.1.1 Studiendesign und Aufbau**

Das Studiendesign wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen zur Beurteilung vorgelegt (Protokoll Nummer 169/2016BO2). Alle Patienten erklärten nach einer entsprechenden Aufklärung schriftlich ihr Einverständnis zur Studienteilnahme und Verwendung der Daten.

Die Studie wurde im August und September 2016 in der Praxisklinik Tübingen und an der Universitäts-Hautklinik Tübingen durchgeführt.

145 Patienten mit noch nicht bestätigtem Verdacht auf BZKs wurden in die Studie aufgenommen. Eine Unterscheidung zwischen den klinischen Subtypen, Primärtumoren und Rezidiven erfolgte nicht. 65 Patienten waren männlich, 80 Patienten weiblich. Das Alter der Patienten lag zwischen 44 und 82 Jahren.

Von insgesamt 148 vermuteten Basalzellkarzinomen wurden mit einem neuen konfokalen Laser Scanning Mikroskop (HistologScanner™) 544 digitale Bilder erstellt. Dieses Mikroskop wurde durch die Firma SamanTree Medical SA, einer Ausgründung der École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland entwickelt und für diese Studie kostenlos zur Verfügung gestellt.

An beiden Untersuchungsstandorten wurde die Verwendung des Mikroskops in den klinischen Ablauf integriert.

In der Praxisklinik Tübingen war Prof. Dr. Matthias Möhrle (MM) der Dermatochirurg. Die histopathologischen Diagnosen an den Paraffinschnitten erstellte Dr. Jan-Phillip Geppert am pathologischen Institut Dr. Geppert und Kollegen. MM führte als Dermatopathologe die Beurteilung der digitalen Bilder des konfokalen Laser Scanning Mikroskops durch.

In der Universitäts-Hautklinik Tübingen operierten diverse Operateure, verschiedene Dermatopathologen befundeten die H&E-Schnitte, während MM klinisch

nicht involviert war und nachfolgend die digitalen mikroskopischen Bilder ohne klinische Hintergrundinformationen befundete.

Die digitalen Bilder wurden an beiden Standorten durch die Doktorandin erstellt.

### **3.1.2 Prozedur**

#### **3.1.2.1 Exzision und Präparation**

Die meisten BZKs wurden makroskopisch auf zwei verschiedene Arten präpariert: zum einen mit der „Muffin-Methode“, welche v.a. in der Praxisklinik Tübingen angewandt wurde und aus der Mittelstücke mit zugehörigen Quadranten (Q, n=195) resultierten, zum anderen mit der „Tübinger Torte“, welche v.a. in der Universitäts-Hautklinik angewandt wurde und aus der Basisschnitte (B, n=58), laterale Ränder (L, n=137) und Mittelstücke (C, insgesamt n=104) resultierten [11, 12]. Die Exzidate wurden *en bloc* vertikal zur Hautoberfläche mit Sicherheitsabständen von 2-3mm entfernt. Außerdem wurden Stanzbiopsien (P, n=22) und Shave-Exzisionen (S, n=9) bei Verdacht auf BZKs in der Praxisklinik entnommen.

Die Häufigkeiten der verschiedenen Proben und ihre Verteilung zeigt Tabelle 1.

Aufgrund der Größe der histologischen Kassetten mussten einige der 148 Exzidate geteilt werden. Die chirurgische makroskopische Präparation erfolgte auf Basis der Standardverfahren, um den klinischen Alltag realistisch beizubehalten. Es war dann jedoch aufgrund der Größe der histologischen Präparate häufig notwendig, solche Präparate ggf. mit mehreren Bildern vollständig abzubilden.

#### **3.1.2.2 Färben und Positionieren**

Nach der Exzision und makroskopischen Präparation wurden die Proben in einer 0,1%igen Fluoreszenz-Proflavinlösung für 30 sek gefärbt und kurz in Phosphatpufferlösung gewaschen. Voruntersuchungen zeigten, dass diese Aufarbeitung nicht die nachfolgende histologische Einbettung in Paraffin und die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) beeinflusste.

Anschließend wurden die Proben auf dem transparenten Boden einer modifizierten Petrischale positioniert (Glass Bottom  $\mu$ -Dish 35 mm, Ibidi, Germany) (Abbildung 1). Das verwendete Mikroskop (Histolog<sup>TM</sup> Scanner, SamanTree Medical SA, Switzerland) ist ein inverses Mikroskop, d.h. die Probe wird über dem Laser positioniert, welcher von unterhalb scannt.

Durch den Bildausschnitt des konfokalen Mikroskops (16x16 mm) mussten von einigen Präparaten – zusätzlich zur bereits erfolgten makrochirurgischen Präparation – mehrere Bilder erstellt werden. So entstanden insgesamt 544 digitale mikroskopische Bilder.

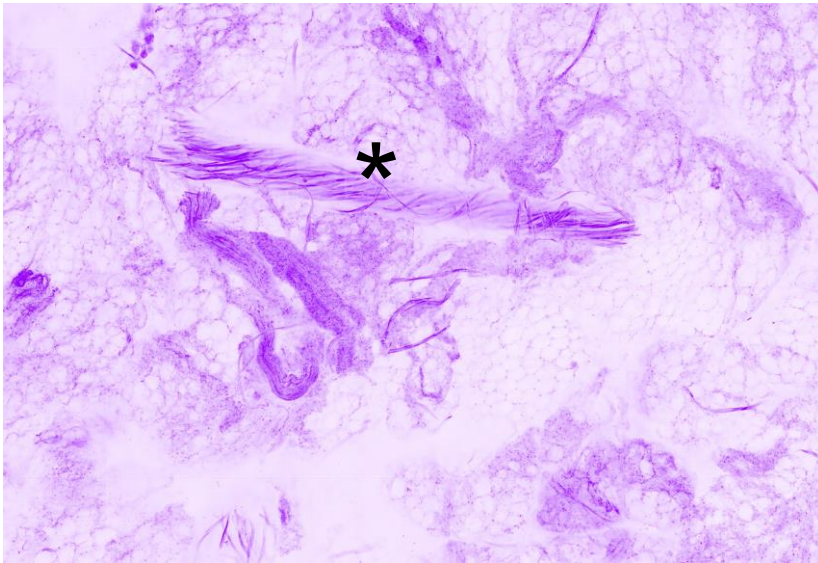
Das Mikroskop scannt in einer zweidimensionalen Ebene. Das bedeutet, dass alle Gewebeanteile, welche nicht in dieser Ebene liegen, nicht gescannt werden und somit nicht auf dem Bild erscheinen.



*Abbildung 1: Gewebeprobe in einer speziellen Schale mit transparentem Boden auf dem invertierten Mikroskop positioniert*

Unförmige Gewebestücke erforderten kleine relaxierende Inzisionen am Rand, um das Gewebe flacher in eine Ebene bringen zu können.

Da das Gewebe für die CLSM unfixiert gefärbt wurde, war eine saubere Oberfläche wichtig, um Artefakte z.B. durch Fasern eines Tupfers zu vermeiden (Abbildung 2).



*Abbildung 2: konfokales Bild; Artefakt durch Faser eines Tupfers (\*)*

Lediglich die Ebene, welche genau dem Boden der Schale auflag, wurde gescannt. Entscheidend war deshalb, eine Technik für eine plane und vollständige Auflage des Gewebes am Boden der Petrischale zu entwickeln. Neben den bereits genannten Hilfsinzisionen wurde eine selbst entworfene Konstruktion verwendet: ein kleiner Ball aus Knete wurde in Frischhaltefolie gewickelt, wie eine Art Pfannkuchen geformt und mit leichtem Druck über dem Gewebestück positioniert (Abbildung 3). Durch die Flexibilität der Knete konnte diese für jedes Gewebestück individuell angepasst werden, in Abhängigkeit der Oberflächencharakteristik. In 27% der Fälle mussten die Gewebestücke auf diese Art geebnet werden. Das Ebnen und die exakte Positionierung der Proben war der aufwändigste Teil der Erstellung der CLSM-Bilder.



*Abbildung 3: Knete in Frischhaltefolie zum Ebenen der Proben*

### **3.1.2.3 Digitale Abbildungen**

Im Hauptmenü des Mikroskops hatte der Nutzer die Möglichkeit, eine Vorschau des zu analysierenden Gewebes zu erstellen. Diese Vorschau zeigte den Bildausschnitt in einer geringen Auflösung. Die Vorschau war innerhalb von 10 sek möglich und erlaubte eine schnelle Übersicht über die Gewebeprobe und ihre Position.

Im Falle eines nicht zufriedenstellenden Ergebnisses war eine schnelle Re-Positionierung der Probe möglich. Anschließend konnte ein Bild in höherer Auflösung innerhalb von 2,5 min erstellt werden. Das Mikroskop scannte mehrere kleine Quadrat-förmige Bereiche („Kacheln“), welche am Ende zu einem Gesamtbild mit beinahe nahtlosem Übergang addiert wurden („Mosaik“).

Die Bilder wurden auf einem externen Speichergerät anonymisiert für die spätere Evaluation gespeichert.

### **3.1.2.4 Evaluation**

Nach der Erstellung der digitalen Bilder wurden die Gewebeproben topographisch orientiert in Histologiekassetten eingebettet und zur weiteren Aufarbeitung in das pathologische Institut Dr. Geppert und Kollegen (Proben der Praxisklinik Tübingen) bzw. in das dermatopathologische Labor der Universitäts-Hautklinik Tübingen (Proben der Hautklinik) verschickt



Der Prozess des Einbettens, Fixierens und Färbens für die Paraffinschnitte dauerte ca. 20h.

Die digitalen Bilder der CLSM wurden nachfolgend von Prof. Dr. Matthias Möhrle, einem erfahrenen Dermatochirurgen mit der Zusatzbezeichnung Histopathologie auf einem Computermonitor (iMac, Apple Inc., Cupertino, CA, USA) evaluiert. Der Untersucher verfügte über Erfahrungen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop eines anderen Herstellers (VivaScope 2500, Mavig).

Die folgenden BZK-spezifischen Kriterien wurden bei der histopathologischen Untersuchung zugrunde gelegt: basaloide Tumorzell-Knospen aus der Epidermis, Inseln mit variablen Atypien innerhalb der Epidermis, Tumorinseln mit entzündlichem Infiltrat, periphere Pallisadenbildung der Zellkerne, artifizielle Spaltbildung des Stromas und solare Elastose in der Dermis.

Des Weiteren wurden folgende verschiedene Parameter dokumentiert: die histopathologische Diagnose und die jeweils benötigte Zeit zur Erstellung und Analyse der digitalen Bilder.

Um einen möglichen Lerneffekt bei der Positionierung der Proben und Erstellung der digitalen CLSM Bilder nachzuweisen wurde der Zusammenhang zwischen Probennummer (als Faktor des zeitlichen Verlaufs) und die benötigte Zeit zum Erstellen des digitalen Bildes analysiert.

Die Qualität der Bilder wurde nach den Schulnoten 1 bis 6 (1 = sehr gut, 2 = gut, 3 = befriedigend, 4 = ausreichend, 5 = mangelhaft, 6 = ungenügend) bewertet. Dabei wurden folgende Kriterien berücksichtigt: „Prozentanteil der dargestellten Epidermis“, „Helligkeit/Kontrast“, „Färbung“ und „fehlende Areale“ (z.B. durch fehlerhaftes Positionieren oder Scannen oder Staub).

Es wurde außerdem dokumentiert, ob sich der Untersucher seiner Diagnose, die er aufgrund der Auswertung der CLSM Bilder erstellte, sicher oder unsicher war.

### **3.1.2.5 Statistik**

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen bei Frau Dipl.-Stat. Aline Naumann in Anspruch genommen.

Für die statistische Analyse wurde das Programm IBM® SPSS® (Version 24) verwendet.

Die histopathologische Diagnose der CLSM Bilder wurde mit den Diagnosen, welche anhand der Auswertung von H&E-gefärbten Paraffinschnitte gestellt wurden, verglichen:

Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen wurden berechnet. Diese Berechnungen wurden für alle Proben insgesamt durchgeführt und zusätzlich getrennt für die Proben der Praxisklinik bzw. Universitäts-Hautklinik. Außerdem wurden Sensitivität und Spezifität in Bezug auf die verschiedenen Probenarten kalkuliert, abhängig von der verwendeten Technik der makroskopischen Präparation. Neben der Gesamtberechnung der Sensitivität und Spezifität in Bezug auf alle Probenarten, wurde diese erneut mit Ausschluss von Stanzbiopsien (P) und Shave-Exzisionen (S) durchgeführt.

Der Zusammenhang zwischen korrekter Diagnose und Qualität der Bilder in Form von Schulnoten und der Zusammenhang zwischen korrekter Diagnose und Sicherheit bzgl. der Diagnose wurden untersucht.

## **3.2 Material und Methoden Teil B: RLE**

### **3.2.1 Studiendesign und Aufbau**

90 Patienten mit klinisch diagnostizierten BZKs bzw. Nachexzisionen von biop-tisch gesicherten oder von nicht in sano operierten Tumoren nahmen im August und September 2016 an der Untersuchung in der Praxisklinik Tübingen teil.

Das Studiendesign lag der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen zur Beurteilung vor (Protokollnummer 169/2016BO2).

Das Alter der Patienten lag zwischen 51 und 93 Jahren. 42 der Patienten waren männlich, 48 weiblich. Alle Subtypen von Basalzellkarzinomen wurden eingeschlossen: solide, fibrosierende, superfizielle und andere Mix- oder Subtypen wurden analysiert.

Das Frischgewebe wurde unmittelbar nach der chirurgischen Exzision, makroskopisch präpariert und nach einer Untersuchung mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (im Rahmen einer anderen Studie, vgl. Teil A) durch den Dermatochirurgen/Dermatohistologen (Prof. Dr. Matthias Möhrle.) mit einem Stereomikroskop beurteilt. Bei dieser mikroskopischen Direktbefundung lagen daher klinische Hintergrundinformationen über die Patienten vor.

Das Frischgewebe wurde topographisch orientiert in Histologiekassetten eingebettet und zur standardmäßigen histopathologischen Untersuchung ins pathologische Institut Dr. Geppert und Kollegen verschickt, Die H&E-gefärbten Paraffinschnitte wurden durch einen Histopathologen (Dr. Jan-Philipp Geppert) beurteilt. Anschließend wurden die RLE-Diagnosen mit den am Paraffinschnitt gestellten Befunden verglichen.

### **3.2.2 Prozedur**

#### **3.2.2.1 Exzision und Präparation**

Die Tumore wurden vom Dermatochirurgen exzidiert und makroskopisch präpariert. Die Präparation erfolgte nach Standardverfahren der mikrographisch kontrollierten Chirurgie und wurde für die Studie nicht abgewandelt. Hauptsächlich wurde die „Muffin-Methode“, wie in den deutschen S1-Leitlinien für mikrographisch kontrollierte Chirurgie beschrieben, verwendet: das Exzidat wurde bei 12 Uhr markiert und das Mittelstück wird vom Rest getrennt. Der restliche Teil wurde durch kleine Hilfs-Einschnitte in eine Ebene gebracht. Dabei entstanden die Mittelstücke (C) und die dazugehörigen Quadranten der Außenseite des Muffins (Q).

Einige Exzidate wurde nach der „Tübinger Torte“ präpariert. Hier entstanden Mittelstücke (C), laterale Ränder (L) und die Basis (B) aus dem Exzidat [11]. Außerdem wurden auch Stanzbiopsien (P) und Shave-Exzisionen (S) gewonnen und analysiert.

### **3.2.2.2 Fixierung, Färbung und Positionierung**

Der RLE-Studie mit dem Stereomikroskop ging eine Untersuchung des Gewebes mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop voraus (Teil A).

Die nativen Proben wurde nach folgendem Protokoll aufgearbeitet: 20 sek Fixierung in Essigsäure, 10 sek waschen in Leitungswasser, 20 sek Färbung in Toulidinblau (Toulidinblau O für die Mikroskopie, Merck AG, Darmstadt) und nochmals waschen für 5 sek in Leitungswasser. Vorherige Untersuchungen zeigten, dass die Verwendung des konfokalen Laser Scanning Mikroskops zuvor und das verwendete Färbeprotokoll die weiteren histologischen Standardverfahren nicht beeinflussten.

Nach der Aufarbeitung wurde das Gewebe auf einen Standard-Objektträger aufgebracht. Dieser wurde auf einer speziell entwickelten Halterung durch einen Saugnapf fixiert. Mithilfe dieser speziellen Halterung war es möglich, den Objektträger in allen drei Ebenen zu bewegen und somit gesamte Oberfläche des Gewebes einer vollständigen mikroskopischen Betrachtung zugänglich zu machen. Ein Stereomikroskop mit einer großen Tiefenschärfe (Leica MA205A; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) erlaubte eine plastische 3-dimensionale Darstellung des Gewebes. Durch eine angebrachte Kamera war es möglich, 2-dimensionale Bilder des Gewebes zu erstellen, welche jedoch nur zu demonstrativen und nicht zu diagnostischen Zwecken verwendet wurden.

### **3.2.2.3 Evaluation**

Wie bereits erwähnt, erfolgte die postoperative Evaluation des Frischgewebes mit der RLE durch Prof. Dr. Matthias Möhrle als Dermatochirurgen und Dermatohistologen in Personalunion. Er führte die Tumorexzision durch und verfügte daher über klinischen Patienteninformationen. Das Stereomikroskop wurde mit ei-

ner Vergrößerung von 10-100x verwendet. BZK-spezifische histologische Kriterien wurden berücksichtigt: Spaltbildung, periphere Pallisadenbildung, typische basaloide Tumorinseln und eine entzündliche Stromareaktion.

Die Zeit, welche zur Präparation und Evaluation benötigt wurde, wurde dokumentiert.

Nach der Durchführung der RLE wurde das Gewebe standardmäßig für die histologische Aufarbeitung in Histologie-Kassetten eingebettet. Die H&E-gefärbten Paraffinschnitte lagen dem Histopathologen Dr. Jan-Philipp Geppert vor, welcher die endgültige Diagnose stellte. Diese Verfahren zur histopathologischen Diagnostik entsprach dem Standard der Praxisklinik und erforderte ca. 20 h.

Zuletzt wurden die Diagnosen der RLE mit denen der Histopathologie verglichen. Kriterien waren die An- und Abwesenheit von Basaliomgewebe und dessen Lokalisation im Präparat.

#### **3.2.2.4 Statistik**

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen bei Frau Dipl.-Stat. Aline Naumann in Anspruch genommen.

Zur statistischen Analyse wurde IBM® SPSS® (Version 24) verwendet. Sensitivität und Spezifität der RLE wurde im Vergleich der Diagnosen mit denen der Histopathologie berechnet. Diese Berechnungen wurden für die Gesamtanzahl an Gewebeproben und für die verschiedenen, aus der Präparation resultierenden, Teile gemacht. Des Weiteren wurden Sensitivität und Spezifität der Methode insgesamt mit Ausschluss von Stanzbiopsien (P) und Shave-Exzisionen (S) berechnet. Außerdem wurden Minimum, Median und Maximum der Zeit zur Präparation und Evaluation des Gewebes errechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse Teil A: CLSM

Aufgrund der makroskopischen Präparation und des Bildausschnittes des konfokalen Mikroskops, wurden aus 148 vermuteten BZKs 544 Gewebsbereiche analysiert. Aus der makroskopischen Präparation resultierten verschiedene Probentypen. In 19 von 544 Fällen konnten die Ergebnisse nicht verwendet und in die Studie eingeschlossen werden. Es war in diesen Fällen nicht möglich, eine sichere Aussage über das Vorhandensein eines BZKs zu treffen. Dies lag daran, dass teilweise zu große Teile der Epidermis fehlten, Artefakte auftraten oder Knorpel nicht plan dargestellt werden konnte. Letztendlich wurden 525 Proben in die statistische Analyse eingeschlossen (Tabelle 1).

*Tabelle 1: Anzahl verschiedener Probentypen, resultierend aus der makroskopischen Präparation der CLSM*

Probe	n
C	104
Q	195
B	58
L	137
P	22
S	9
Gesamt	525*

C = Zentrales Stück eines Exzidates nach Entfernung der Ränder bei „Tübinger Torte“ oder „Muffin Technik“

Q = Quadrant eines „Muffins“

B = Basis einer „Tübinger Torte“

L = Lateraler Rand einer „Tübinger Torte“

P = Probeentnahme in Form einer Stanzbiopsie

S = Shave-Exzision

Unter den histologischen Subtypen waren 46 solide, 11 fibrosierende und 22 superfizielle BZKs, außerdem 15 andere oder gemischte Typen. Dreiundzwanzig Proben waren tumorfreie Nachexzisionen. In 29 Exzisionen mit dem klinischen Verdacht auf ein BZK wurden andere Läsionen wie aktinische Keratose (n=9), Plattenepithelkarzinom (n=6), seborrhoische Keratose (n=3), Follikulitis (n=3), Narbengewebe (n=3), M. Bowen (n=2), Talgdrüsenhyperplasie (n=1) fibröse Nasenpapil (n=1) und dermale Fibrose (n=1) nachgewiesen (Tabelle 2). Diese Fälle

wurden nicht ausgeschlossen, da es das Ziel der Studie war, das Mikroskop in einem realistischen klinischen Ablauf zu testen.

*Tabelle 2: Verschiedene BZK Subtypen bei der CLSM*

Subtyp	n
Solides BZK	46
Fibrosierendes BZK	11
Superfizielles BZK	22
Andere Subtypen und Mischformen	15
Tumorfremie Nachexzision	25
Klinische Fehldiagnosen	29
Gesamt	148

Von den 148 Exzidaten befanden sich 15 am Kapillitium, 7 an den Extremitäten, 10 am Ohr, 14 am Stamm und 101 im Gesicht (Tabelle 3). In einem Fall wurde die Lokalisation nicht dokumentiert.

*Tabelle 3: Lokalisation der Exzidate der CLSM*

Lokalisation	n
Kapillitium	15
Extremitäten	7
Ohr	10
Stamm	14
Gesicht	101
Gesamt	147*

\*in einem Fall wurde die Lokalisation nicht dokumentiert

Die Größe der exzidierten Tumore variierte zwischen den kleinsten Shave-Exzisionen und Stanzbiopsien von 3 mm bis hin zum größten entfernten Tumor von 85x21 mm. Die Verteilung der Größen ohne Sicherheitsabstand ist in Tabelle 4 dargestellt.

*Tabelle 4: Verteilung der Größe der exzidierten Gewebestücke der CLSM in mm (n=525) ohne Sicherheitsabstand*

	Minimum	Median	Maximum
Länge (mm)	3	11	85
Breite (mm)	1	9	35

Die mediane Zeit zur Generierung und Evaluation eines CLSM Bildes betrug 5 min (Minimum 2 min und Maximum 20 min). Die mediane Zeit zur ausschließlichen Generierung eines digitalen Bildes war 5 min (Minimum 2 min; Maximum 3 min) und zur ausschließlichen Evaluation eines Bildes 10 sek (Maximum 60 sek; Minimum 2 sek).

Im Verlauf der Studie verkürzte sich die Zeit zur Generierung – nicht zur Evaluation – eines Bildes verkürzte (Abbildung 4). Dies zeugt von einer Lernkurve in der Positionierung und im Umgang mit dem Mikroskop.



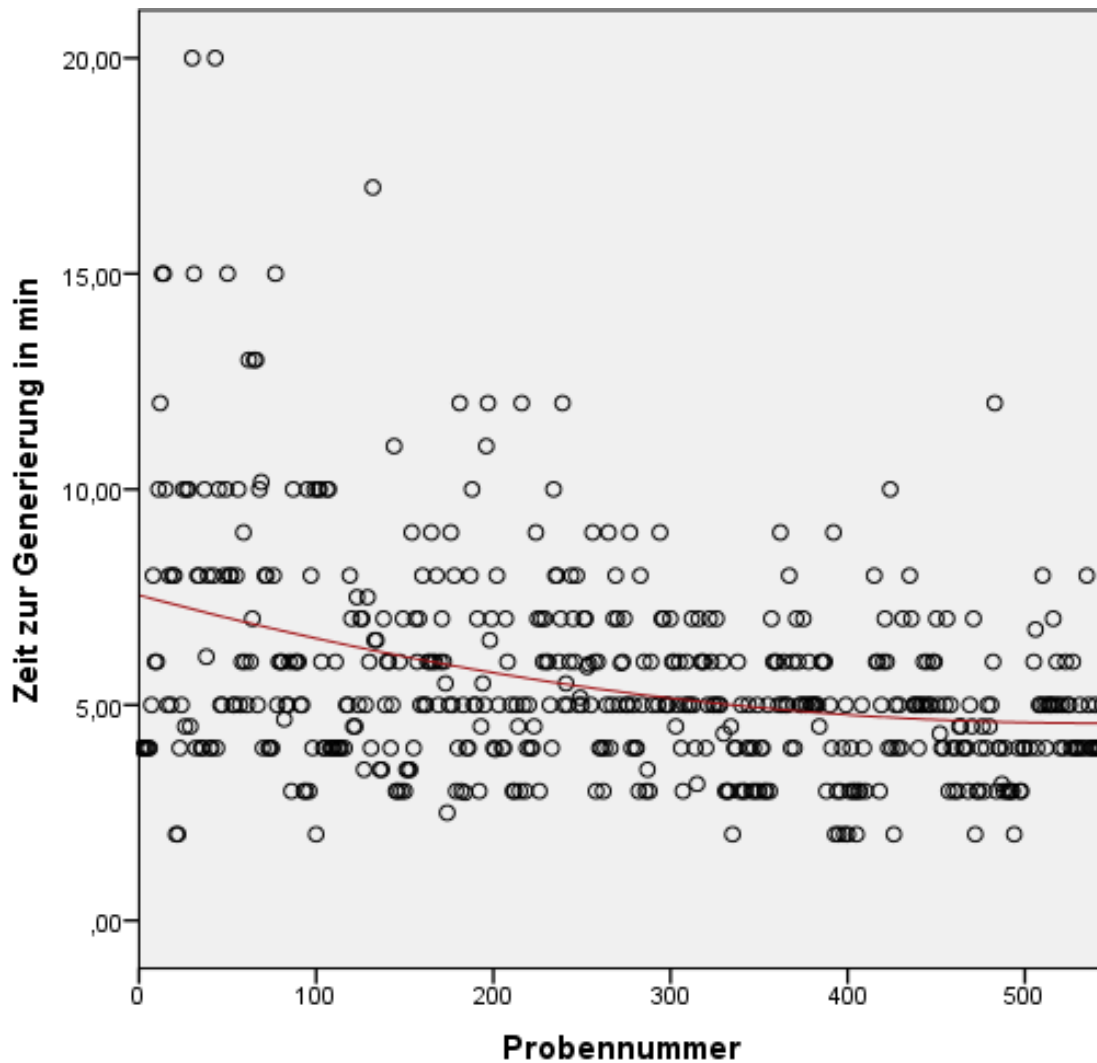
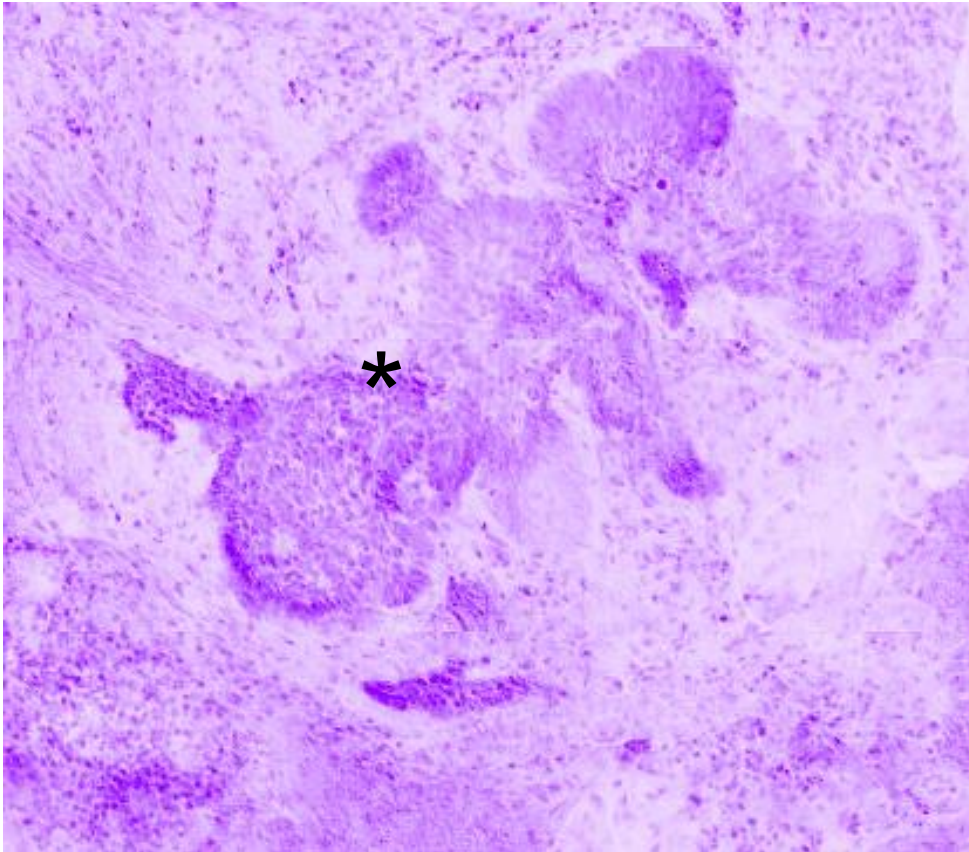


Abbildung 4: x-Achse: Probennummer als Maß für den zeitlichen Verlauf; y-Achse: Zeit zur Generierung eines digitalen Bildes in Minuten; Darstellung des Lerneffektes im Generieren eines digitalen Bildes im Verlauf der Studie

Die histopathologischen Kriterien zur Diagnose eines BZKs konnten in den konfokalen Bildern nicht immer angewandt werden. Manche Kriterien oder Artefakte, welche normalerweise durch die histologische Aufarbeitung zustande kommen, konnten in den konfokalen Bildern nicht gefunden werden. Der Grund dafür ist die Untersuchung von frischem, also unfixiertem Gewebe. Das Phänomen bzw. Artefakt der Spaltbildung war nicht vorhanden. Dahingegen konnten Kriterien wie

periphere Pallisadenbildung, typische basaloide Tumorinseln und eine entzündliche Stroma Reaktion durchaus auch im konfokalen Bild nachgewiesen werden (Abbildung 5).



*Abbildung 5: konfokales Bild; basaloide Tumorinsel mit peripherer Pallisadenbildung (\*), umgeben von entzündlicher Stromareaktion*

Die Verteilung der verschiedenen Probenarten und die Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen insgesamt beim Vergleich der Diagnosen der konfokalen Bilder mit denen der H&E-gefärbten Paraffinschnitte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Der Vergleich der Diagnosen der konfokalen Bilder mit denen der H&E-gefärbten Paraffinschnitte ergab insgesamt eine Sensitivität von 73% (95%KI = [65,27%;80,47%]) und eine Spezifität von 96% (95%KI = [93,40%;97,60%]). In kleinen Proben wie Shave-Exzisionen und Stanzbiopsien erreichten Sensitivität und Spezifität 100% (Tabelle 6).

Da kleine Proben wie Shave-Exzisionen und Stanzbiopsien nicht mit der klassischen MKC untersucht werden, wurden diese aus den Berechnungen ausgeschlossen.

Tabelle 7 zeigt den Vergleich der Diagnosen der konfokalen Bilder mit denen der H&E-gefärbten Paraffinschnitte (ohne Shave-Exzisionen und Stanzbiopsien), die Anzahl an richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen. Es ergab sich eine Sensitivität von 70% (95%KI=[61,61%;78,40%]) und eine Spezifität von 96% (95%KI=[93,17%;97,52%]) (Tabelle 8).

*Tabelle 5: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten insgesamt. Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte*

	<b>n</b>	<b>Richtig positiv</b>	<b>Falsch Positiv</b>	<b>Richtig negativ</b>	<b>Falsch negativ</b>
<b>C</b>	104	67	1	23	13
<b>Q</b>	195	6	8	178	3
<b>B</b>	58	6	0	48	4
<b>L</b>	137	6	7	108	16
<b>P</b>	22	16	0	6	0
<b>S</b>	9	1	0	7	1
<b>Gesamt</b>	525	102	16	370	37

*Tabelle 6: Sensitivität und Spezifität einzelner Probenarten und aller Probenarten insgesamt beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte*

	<b>n</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>
<b>C</b>	104	84%	96%
<b>Q</b>	195	67%	96%
<b>B</b>	58	60%	100%
<b>L</b>	137	27%	94%
<b>P</b>	22	100%	100%
<b>S</b>	9	50%	100%
<b>Gesamt</b>	525	<b>73%</b>	<b>96%</b>

Sensitivität (95%KI=[65,27%;80,47%]), Spezifität (95%KI=[93.40%;97.60%])

C = Zentrales Stück eines Exzidates nach Entfernung der Ränder bei „Tübinger Torte“ oder „Muffin Technik“

Q = Quadrant eines „Muffins“

B = Basis einer „Tübinger Torte“

L = Lateraler Rand einer „Tübinger Torte“

P = Probeentnahme in Form einer Stanzbiopsie

S = Shave-Exzision

*Tabelle 7: Probenzahl n Gesamt und deren Verteilung in richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte. Stanzbiopsien und Shave-Exzisionen ausgeschlossen*

	<b>n</b>	<b>Richtig positiv</b>	<b>Falsch positiv</b>	<b>Richtig negativ</b>	<b>Falsch negativ</b>
<b>Gesamt</b>	494	85	16	357	36

*Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität aller Probenarten insgesamt beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte. Stanzbiopsien und Shave-Exzisionen ausgeschlossen.*

	<b>n</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>
<b>Gesamt</b>	494	<b>70%</b>	<b>96%</b>

Sensitivität (95%KI=[61,61%;78,40%]), Spezifität (95%CI=[93,17%;97,52%])

Da die Studie zum einen Teil in der Praxisklinik Tübingen und zum anderen Teil in der Universitäts-Hautklinik Tübingen stattfand, wurden die Berechnungen von Sensitivität und Spezifität der CLSM verglichen mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitten für beide Untersuchungsorte separat berechnet (Tabelle 9 + 10 und Tabelle 11 + 12)

*Tabelle 9: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten in der **Praxisklinik** Tübingen. Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte*

	<b>n</b>	<b>Richtig positiv</b>	<b>Falsch positiv</b>	<b>Richtig negativ</b>	<b>Falsch negativ</b>
<b>C</b>	64	39	1	16	8
<b>Q</b>	172	4	7	158	3
<b>B</b>	14	4	0	6	4
<b>L</b>	16	0	2	14	0
<b>P</b>	22	16	0	6	0
<b>S</b>	9	1	0	7	1
<b>Gesamt</b>	297	64	10	207	16

C = Zentrales Stück eines Exzidates nach Entfernung der Ränder bei „Tübinger Torte“ oder „Muffin Technik“

Q = Quadrant eines „Muffins“

B = Basis einer „Tübinger Torte“

L = Lateraler Rand einer „Tübinger Torte“

P = Probeentnahme in Form einer Stanzbiopsie

S = Shave-Exzisionen

*Tabelle 10: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten in der **Praxisklinik** Tübingen. Sensitivität und Spezifität der CLSM verglichen mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte*

	<b>n</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>
<b>C</b>	64	83%	94%
<b>Q</b>	172	57%	96%
<b>B</b>	14	50%	100%
<b>L</b>	16	-	88%
<b>P</b>	22	100%	100%
<b>S</b>	9	50%	100%
<b>Gesamt</b>	297	80%	95%

Sensitivität (95%KI=[69,66%;88,09%]), Spezifität (95%KI=[91,74%;97,77%])

C = Zentrales Stück eines Exzidates nach Entfernung der Ränder bei „Tübinger Torte“ oder „Muffin Technik“

Q = Quadrant eines „Muffins“

B = Basis einer „Tübinger Torte“

L = Lateraler Rand einer „Tübinger Torte“

P = Probeentnahme in Form einer Stanzbiopsie

S = Shave-Exzisionen

*Tabelle 11: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten in der Universitäts-Hautklinik Tübingen. Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte*

	<b>n</b>	<b>Richtig positiv</b>	<b>Falsch positiv</b>	<b>Richtig negativ</b>	<b>Falsch negativ</b>
<b>C</b>	40	28	0	7	5
<b>Q</b>	23	2	1	20	0
<b>B</b>	44	2	0	42	0
<b>L</b>	121	6	5	94	16
<b>Gesamt</b>	228	38	6	163	21

C = Zentrales Stück eines Exzidates nach Entfernung der Ränder bei „Tübinger Torte“ oder „Muffin Technik“

Q = Quadrant eines „Muffins“

B = Basis einer „Tübinger Torte“

L = Lateraler Rand einer „Tübinger Torte“

*Tabelle 12: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten n der Universitäts-Hautklinik Tübingen. Sensitivität und Spezifität der CLSM verglichen mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte*

	<b>n</b>	<b>Sens.</b>	<b>Spez.</b>
<b>C</b>	40	85%	100%
<b>Q</b>	23	100%	95%
<b>B</b>	44	100%	100%
<b>L</b>	121	27%	95%
<b>Gesamt</b>	228	64%	96%

Sensitivität (95%KI=[50,90%;75,51%], Spezifität (95%KI=[92,37%;98,69%])

C = Zentrales Stück eines Exzidates nach Entfernung der Ränder bei „Tübinger Torte“ oder „Muffin Technik“

Q = Quadrant eines „Muffins“

B = Basis einer „Tübinger Torte“

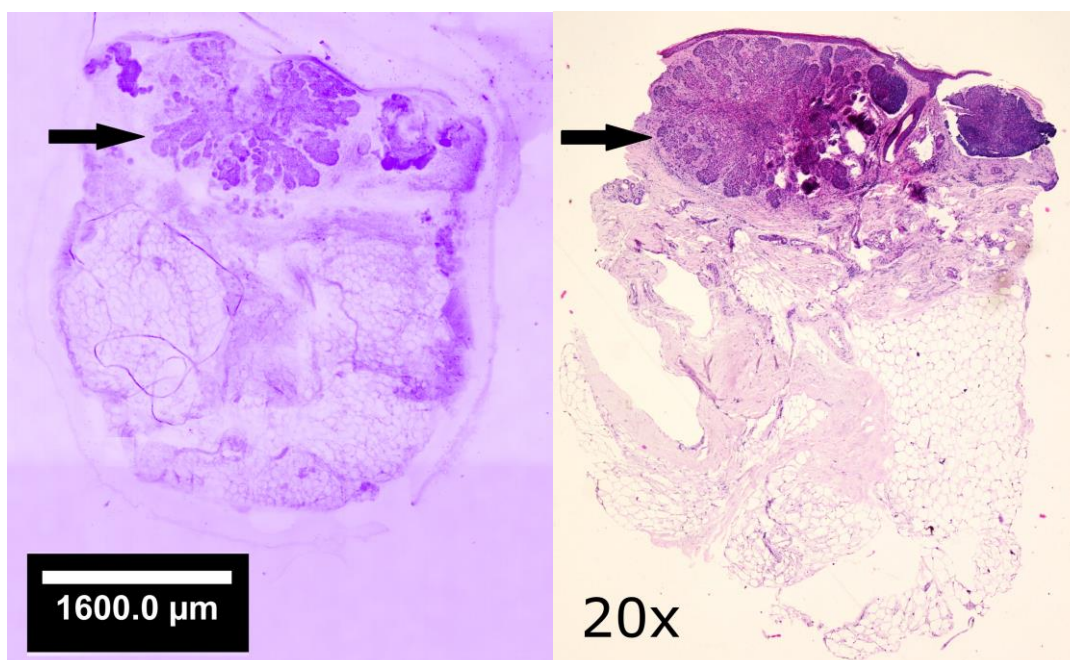
L = Lateraler Rand einer „Tübinger Torte“



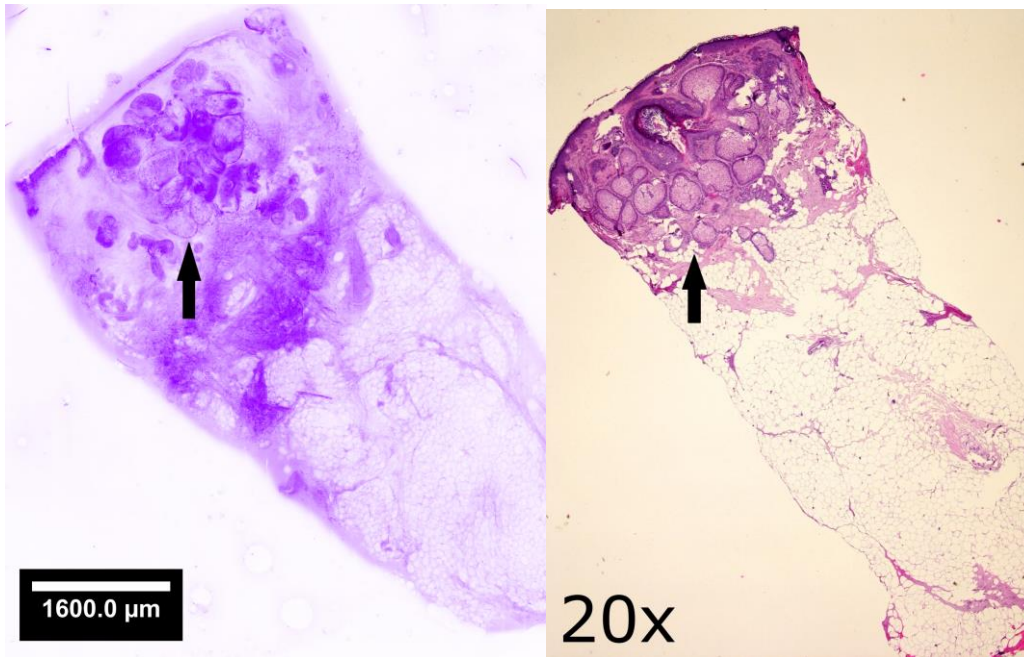
In der Praxisklinik wurde eine höhere Sensitivität von 80% (95%KI=[69,66%;88,09%]) und eine ähnliche Spezifität von 95% (95%KI=[91,74%;97,77%]) (n=297) im Vergleich zur Universitäts-Hautklinik erreicht. In beiden Szenarien gab es mehr falsch negative als falsch positive Ergebnisse. Kleinere Proben wie Stanzbiopsien (P), welche in der Mitte geteilt wurden, erreichten die höchste diagnostische Genauigkeit. Die noch kleineren Shave-Exzisionen waren aufgrund ihrer Dünne wiederum schwieriger zu positionieren.

Die digitalen Bilder erscheinen in hoher Auflösung und in einer violetten Farbe, die der H&E-Färbung in Teilen ähnelt (Abbildung 6).

Auch Differentialdiagnosen wie Talgdrüsenhyperplasien wurden als solche erkannt (Abbildung 7).



*Abbildung 6: Stanzbiopsie eines nodulären Basalzellkarzinoms. Konfokales Bild (links) mit dazugehörigem H&E-Schnitt (rechts).*



*Abbildung 7: Stanzbiopsie einer Talgdrüsenhyperplasie. Konfokales Bild (links) mit dazugehörigem H&E-Schnitt (rechts).*

Wie bereits erwähnt, wurde die Bildqualität in Schulnoten in Bezug zur Korrektheit der Diagnose gesetzt. Generell war die Bildqualität vorwiegend gut: 80% der Bilder wurden mit den Noten 1-3 bewertet. Mit einer guten Schulnote für die Bildqualität wurden häufiger richtige Diagnosen gestellt. Dies zeigt, dass die richtige Diagnose stark mit der Bildqualität zusammenhängt, welche wiederum von der Positionierung der Probe abhängt (Tabelle 13).

*Tabelle 13: Qualität der konfokalen Bilder in Schulnoten in Relation zu korrekten und inkorrekten Diagnosen bei der CLSM*

		Korrekte Diagnose	Inkorrekte Diagnose	Gesamt
1	n (%)	70 (98)	1 (1)	71
2	n (%)	199 (91)	18 (8)	217
3	n (%)	120 (85)	20 (14)	140
4	n (%)	50 (87)	7 (12)	57
5	n (%)	30 (83)	6 (16)	36
6	n (%)	3 (75)	1 (25)	4
Gesamt	n	472	53	525

Schulnoten: 1 = sehr gut, 2 = gut, 3 = befriedigend, 4 = ausreichend, 5 = mangelhaft, 6 = ungenügend

Korrekte und inkorrekte Diagnosen wurden außerdem in Zusammenhang mit der subjektiven Diagnosesicherheit des Untersuchers betrachtet. Es waren insgesamt mehr richtige Diagnosen, wenn der Untersucher sich seiner Diagnose sicher war. Mit einer mehr als dreifach höheren Chance war es wahrscheinlicher, eine korrekte Diagnose mit einer sicheren Diagnose zu stellen als mit einer unsicheren Diagnose (Odds Ratio  $[0; \infty] = 3,57$ ) (Tabelle 14).

*Tabelle 14: Sicherheit des Untersuchers in Bezug auf seine Diagnose im Verhältnis zu korrekten und inkorrekten Diagnosen bei der CLSM*

		Korrekte Diagnose	Inkorrekte Diagnose	Gesamt
„sicher“	n (%)	384 (92)	29 (7)	413
„unsicher“	n (%)	88 (78)	24 (21)	112
Gesamt	n	472	53	525

Odds Ratio  $[0; \infty] = 3,57$

## 4.2 Ergebnisse Teil B: RLE

Unter den insgesamt 90 Exzidaten waren 35 solide, 3 fibrosierende und 17 superfizielle BZKs. Fünf Fälle waren tumorfreie Nachresektate. Dreißig Exzisionen mit dem klinischen Verdacht auf ein BZK zeigten andere Läsionen: aktinische Keratose (n=14), Narbengewebe (n=5), seborrhoische Keratose (n=4), Plattenepithelkarzinom (n=4), dermale Fibrose (n=1), Talgdrüsenhyperplasie (n=1) und fibröse Papel (n=1) (Tabelle 15).

*Tabelle 15: Verschiedene BZK Subtypen der RLE*

Subtyp	n
Solides BZK	35
Fibrosierendes BZK	3
Superfizielles BZK	17
Tumorfreie Nachresektate	5
Klinische Fehldiagnosen	30
Gesamt	90

Da die RLE im Kontext eines klinischen Settings getestet wurde, sollte die Methode in der Lage sein, BZKs von anderen Tumoren oder Diagnosen zu unterscheiden. Deshalb wurden die klinischen Fehl- bzw. Differentialdiagnosen nicht aus der Analyse ausgeschlossen.

In 28 von diesen 30 klinischen Fehl- bzw. Differentialdiagnosen, wurde mit der RLE die gleiche Diagnose wie am H&E-gefärbten Paraffinschnitt gestellt. Im einen Fall handelte es sich in der RLE um einen „kleinen knotigen metachromatischen Tumor“, welcher nicht wie in der Paraffinhistologie als Kombination einer solaren und seborrhoischen Keratose eingeordnet wurde. Im anderen Fall handelte es sich in der Paraffinhistologie um eine solare Keratose, welche in der RLE fälschlicherweise als BZK diagnostiziert wurde.

Sechs der vermuteten BZKs waren am Kapillitium lokalisiert, sechs an den Extremitäten, neun am Ohr, 14 am Stamm und 54 im Gesicht (Tabelle 16).

*Tabelle 16: Lokalisation der Exzidate der RLE*

Lokalisation	n
Kapillitium	6
Extremitäten	6
Ohr	9
Stamm	14
Gesicht	54
Gesamt	90

Aufgrund der makroskopischen Präparation, wurden aus den 90 klinisch diagnostizierten BZK bzw. Nachexzisionen 300 Gewebestücke präpariert, woraus verschiedene Probenarten resultierten.

Für die makroskopische Präparation der Exzidate wurden die Standardverfahren („Muffin-Technik“, „Tübinger Torte“) durchgeführt und es waren keine weiteren Schritte notwendig. Dabei entstanden die in Tabelle 17 aufgeführten Probenarten:

*Tabelle 17: Anzahl verschiedener Probenarten, resultierend aus der makroskopischen Präparation der RLE*

Probe	n
C	65
Q	171
B	16
L	16
S	10
P	22
Gesamt	300

C = Zentrales Stück eines Exzidates nach Entfernung der Ränder bei „Tübinger Torte“ oder „Muffin Technik“

Q = Quadrant eines „Muffins“

B = Basis einer „Tübinger Torte“

L = Lateraler Rand einer „Tübinger Torte“

S = Shave-Exzision

P = Probeentnahme in Form einer Stanzbiopsie

Das größte entfernte Exzidat war 33x43 mm, das kleinste 3x12 mm. Sicherheitsabstände von 1-4 mm wurden angewendet.

Die Fixierung und Färbung dauerte 55 sek (Tabelle 18).

*Tabelle 18: Fixierungs- und Färbeprotokoll der RLE*

Lösung	Zeit (sek)
Essigsäure (10%)	20
Leitungswasser	10
Toulidinblau-Lösung (0,2%)	20
Leitungswasser	5
Gesamt	55

Die Positionierung des Gewebes bereitete keine Probleme, da die leicht feuchten Präparate gut auf dem Objektträger hafteten, selbst wenn dieser auf der speziellen Halterung gekippt und gedreht wurde. Durch die dreidimensionale Betrachtung musste das Gewebe nicht in eine Ebene gebracht werden. In Fällen kleinerer Exzidate war es sogar möglich, alle Teile auf einen Objektträger aufzubringen, was die Evaluation beschleunigte.

Es zeigte sich, dass das Gewebe sehr zeitnah nach der Präparation analysiert werden musste, da sich ansonsten bei Trockenheit die Ränder des Gewebes leicht aufgerollt hätten und somit Teile der Oberfläche verdeckt worden wären.

Die Gesamtzeit zur Aufarbeitung und Evaluation der Gewebeteile war mit einem Minimum von 60 sek, einem Median von 120 sek und einem Maximum von 480 sek sehr schnell, wobei die benötigte Zeit in 7 Fällen nicht dokumentiert wurde (Tabelle 19).

*Tabelle 19: Zeit zur Aufarbeitung und Evaluation der Gewebeteile für die RLE nach der Entfernung und makroskopischen Präparation in Sekunden (n=83\*)*

	Minimum	Median	Maximum
Zeit (sek)	60	120	480

\*In 7 von 90 Fällen wurde die Zeit nicht dokumentiert

Einige der erwähnten histologischen Kriterien zum Nachweis von BZKs wie periphere Palisadenbildung, spezifische basaloide Tumorinseln und entzündliche Stromareaktionen konnten in der RLE auch beobachtet werden. Das Phänomen der Spaltbildung konnte jedoch auch hier nicht nachgewiesen werden. Außerdem war es schwierig, kleinste Tumorstränge in der RLE wahrzunehmen, wohingegen Tumorinseln und größere Tumorstränge eindeutig zu identifizieren waren (Abbildung 8 und 9).

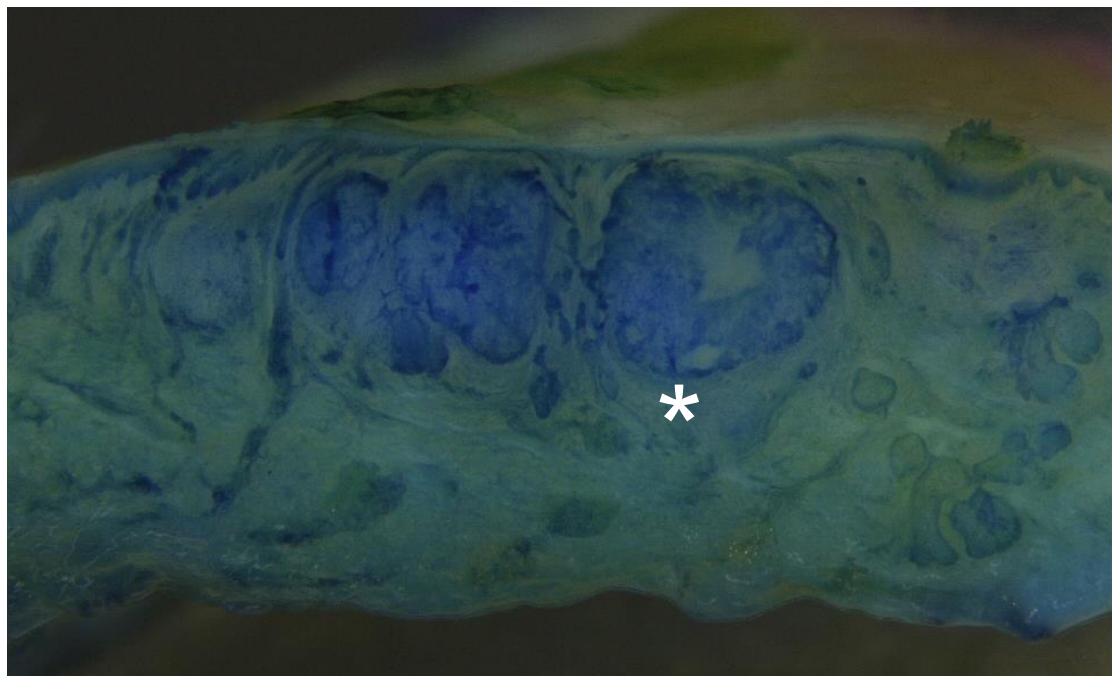
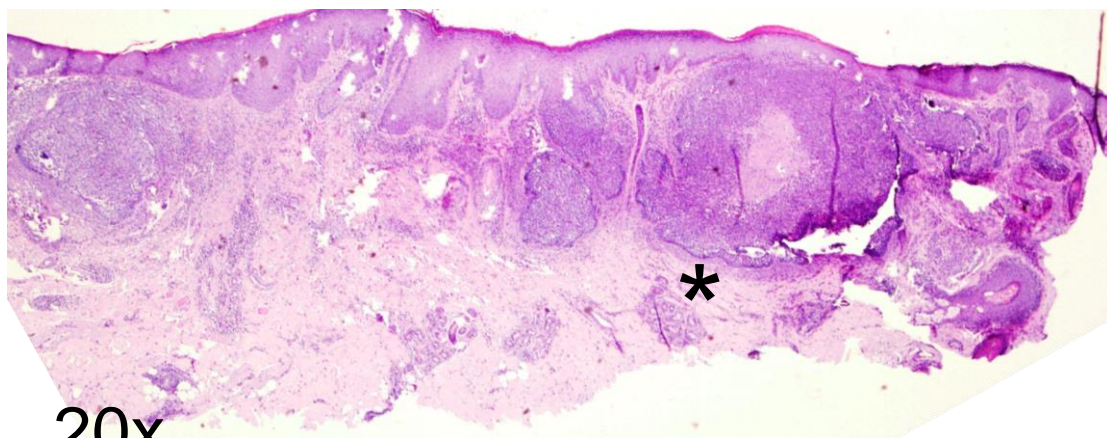


Abbildung 8: Solides Basaliom (\*), H&E-Schnitt (oben) und RLE (unten)

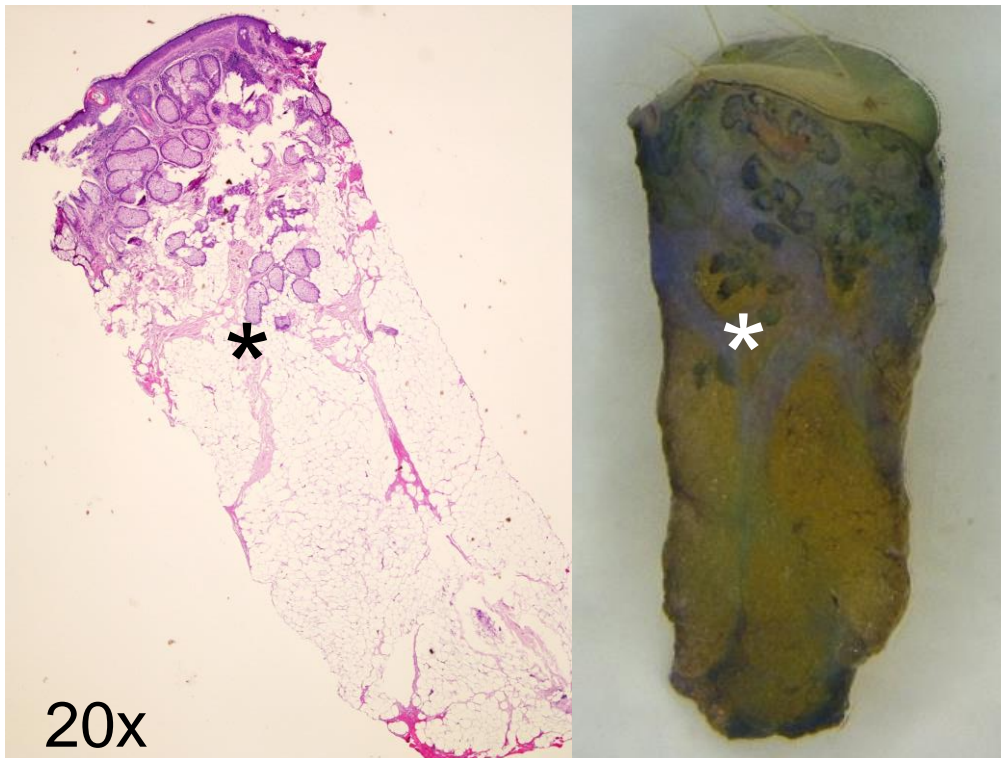


Abbildung 9: Stanzbiopsie, Talgdrüsenhyperplasie (\*), H&E-Schnitt (links) und RLE (rechts)

Untersucher gewöhnen sich an die dreidimensionale Darstellung und die unübliche blaue Färbung, wobei hier der Histopathologe (MM) durch frühere Arbeiten in der RLE Erfahrungen gesammelt hatte.

Nach dem Vergleich der Diagnosen der RLE mit denen der H&E-gefärbten Paraffinschnitte ergaben sich eine Sensitivität von 92% (95%KI=[83,4%;92,1%]) und eine Spezifität von 98% (95%KI=[95,21%;99,51%]). Diese Werte wurden auch für jeden Probenotyp insgesamt berechnet (Tabelle 20 und 21). Außerdem wurden Sensitivität und Spezifität erneut insgesamt ohne Shave-Exzisionen und Stanzbiopsien berechnet, um ein für die MKC relevantes Ergebnis zu erhalten (Tabelle 22 und 23).



*Tabelle 20: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten insgesamt. Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der RLE mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte*

Probe	n	Richtig positiv	Richtig negativ	Falsch positiv	Falsch negativ
<b>C</b>	65	44	19	0	2
<b>Q</b>	171	4	157	8	2
<b>B</b>	16	5	10	0	1
<b>L</b>	16	0	16	0	0
<b>S</b>	10	1	8	0	1
<b>P</b>	22	15	5	1	1
<b>Gesamt</b>	<b>300</b>	69	215	9	7

C = Zentrales Stück eines Exzidates nach Entfernung der Ränder bei „Tübinger Torte“ oder „Muffin Technik“

Q = Quadrant eines „Muffins“

B = Basis einer „Tübinger Torte“

L = Lateraler Rand einer „Tübinger Torte“

S = Shave-Exzision

P = Probeentnahme in Form einer Stanzbiopsie

*Tabelle 21: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten insgesamt. Sensitivität und Spezifität der RLE verglichen mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte*

Probe	n	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
<b>C</b>	65	96	100
<b>Q</b>	171	67	95
<b>B</b>	16	83	100
<b>L</b>	16	100	100
<b>S</b>	10	50	100
<b>P</b>	22	94	84
<b>Gesamt</b>	<b>300</b>	<b>92</b>	<b>98</b>

Sensitivität (95%KI=[83,4%;92,1%]), Spezifität (95%KI=[95,21%;99,51%])

C = Zentrales Stück eines Exzidates nach Entfernung der Ränder bei „Tübinger Torte“ oder „Muffin Technik“

Q = Quadrant eines „Muffins“

B = Basis einer „Tübinger Torte“

L = Lateraler Rand einer „Tübinger Torte“

S = Shave-Exzision

P = Probeentnahme in Form einer Stanzbiopsie

*Tabelle 22: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten insgesamt. Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der RLE mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte. Probeentnahmen und Shave-Exzisionen ausgeschlossen*

<b>Probe</b>	<b>n</b>	<b>Richtig positiv</b>	<b>Richtig negativ</b>	<b>Falsch positiv</b>	<b>Falsch negativ</b>
<b>Gesamt</b>	268	53	208	3	4

*Tabelle 23: Anzahl der Proben. Sensitivität und Spezifität der RLE verglichen mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte. Probeentnahmen und Shave-Exzisionen ausgeschlossen.*

	<b>n</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
<b>Gesamt</b>	268	93	99

Sensitivität (95%KI=[81,48%;98,05%]), Spezifität (95%KI=[95,88%;99,71%])

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion Teil A: CLSM

Im Vergleich zu anderen konfokalen Laser Scanning Mikroskopen, erschien die Bedienung des verwendeten Mikroskops sehr einfach. Aufgrund der automatischen Kontrasteinstellung wurden hochauflösende Bilder generiert, ohne eigene Einstellungen vornehmen zu müssen.

Andere Laser Scanning Mikroskope besitzen die Möglichkeit, die Intensität des Lasers zu verändern oder den Reflexions- und/oder Fluoreszenzmodus zu wählen [26]. In manchen Fällen könnte dies nützlich sein, aber die Arbeit mit dem verwendeten Mikroskop zeigte, dass es auch ohne aufwändige Optionen möglich war, ein gutes Bild zu erhalten.

Der zeitaufwändigste und schwierigste Teil der Untersuchung war die Positionierung und das Ebenen der Proben. Es war dabei bei der Generierung der Bilder eine Lernkurve zu beobachten.

Die Zeitersparnis durch die mikroskopische Untersuchung unfixierten Gewebes durch die CLSM im Vergleich zu Paraffinschnitten ist unumstritten. Die minimale Zeit zur Generierung und Evaluation eines digitalen Bildes lag bei 2,05 min, der Median bei 5,17 min. Sogar der maximale Zeitbedarf von 20,17 min in dieser Studie war deutlich schneller als die normalerweise benötigte Zeit für H&E-gefärbte Gefrier- oder Paraffinschnitte. Die erforderliche Zeit wurde beeinflusst von der Positionierung und dem Ebenen, welches bei großen oder unförmigen Proben notwendig war. Außerdem summieren sich diese Zeiten, wenn mehrere digitale Bilder notwendig sind, um ein Exzidat komplett zu analysieren.

In anderen Studien, in denen konfokale Mikroskopie verwendet wurden, wurden ähnliche Zeiten erreicht [27]. Allerdings fehlen in diesen Arbeiten detaillierte Angaben über den Aufwand bei der Positionierung der Proben [26].

Karen et al. stellten eine Verbesserung von Sensitivität im Verlauf fest, welche sie auf die Lernkurve in der Evaluation konfokaler Bilder zurückführten [28]. In dieser Studie war eine Lernkurve nur in Bezug auf die benötigte Zeit, ein Bild zu generieren, zu erkennen. Es gab keinen nachweisbaren Lerneffekt in der Evaluation des Dermatochirurgen/Dermatohistologen (M.M.), was möglicherweise mit

dessen langjähriger Erfahrung in der CLSM erklärt werden könnte. Außerdem erinnerten die Bilder dieses Mikroskops mit ihrer „digitalen Färbung“ sehr an H&E-gefärbte Schnitte.

Da Histopathologen an die H&E-Färbung gewöhnt sind, versuchten auch Gareau et al. diese Färbung in der konfokalen Mikroskopie zu imitieren. Dabei verwendeten sie ein mulimodales konfokales Mikroskop und eine Kombination aus Reflexionsmodus (Bindegewebe) und Fluoreszenzmodus (Kernfärbung) [14, 29].

Die in dieser Studie im Fluoreszenzmodus generierten hochauflösenden Bilder erschienen durch die „digitale Färbung“ in einer violetten Farbe, welche sehr an H&E-gefärbte Schnitte erinnerte. Dadurch war die Analyse für den Dermatohistologen, der an diese blau-pinke Färbung gewöhnt ist, einfacher.

In vorherigen Studien zur konfokalen Mikroskopie, waren die aus Einzelbildern („Kacheln“) zusammengesetzten Mosaiken durch Stufenbildungen schwer zu beurteilen [20, 26]. In den Bildern des Histolog<sup>TM</sup>Scanners fielen die Grenzen dieser „Kacheln“ nicht auf, was die Interpretation großer konfokaler Bilder erleichterte.

Digitale Bilder haben den Vorteil, dass ihre Information über weite Distanzen austauschbar ist. Dies könnte die interdisziplinäre Kooperation und den Experten-austausch in der Histopathologie vereinfachen. Außerdem werden die Bilder digital gespeichert und können zu einem späteren Zeitpunkt erneut leicht aufgerufen werden.

Wie bereits erwähnt, war das Ebenen der Proben essentiell. Kleine Proben waren durch die begrenzte Größe des Tisches und deren Form leichter zu handhaben. Die chirurgische Teilung der Exzidate in dieser Studie basierte auf den Standardverfahren („Muffin-Technik“, „Tübinger Torte“). Für das verwendete Mikroskop und seine kleine Schale wäre eine weitere makroskopische Dissektion in sehr kleine Proben notwendig gewesen. Dies wurde in der Studie jedoch nicht durchgeführt, um die Standardprozedur in der mikrographisch kontrollierten Chirurgie zu bewahren. So mussten Gewebstücke in der Petrischale mehrfach verschoben werden, um sie mit mehreren Bildern vollständig abbilden zu können.

Eine Optimierung des Histolog<sup>TM</sup>Scanner wären eine größere Schale zur einfacheren Positionierung und die Möglichkeit, tiefere optische Schnitte zu erstellen,

um die Epidermis vollständig darzustellen. Die Darstellung weiterer tieferer Schichten wurde in einer Studie von Bennàssar et al. mit dem VivaScope® 2500 beschrieben [30]. Andere konfokale Laser Scanning Mikroskope besitzen die Möglichkeit, durch Variation der Laser-Intensität in tiefere Ebenen zu gelangen [30, 31] oder zwischen Reflexionsmodus und einer Kombination aus Reflexion und Fluoreszenz wählen [14, 22, 32].

Das Problem der inkomplett dargestellten Epidermis bestand auch in anderen Studien: In verschiedenen Arbeiten wurden konfokale Bilder von BZKs publiziert, in denen Teile der Epidermis fehlten [26, 27, 30].

Die Sensitivität und Spezifität dieser Studie variierte in Abhängigkeit vom Probenotyp. Vor allem in kleinen Proben wie Probeentnahmen, war die Sensitivität ideal (100%). Die Sensitivität insgesamt von 73% bedeutet jedoch, dass 27% der Patienten das Risiko eines Rezidivs haben. Wenn kleine Proben wie Shave-Exzisionen und Stanzbiopsien ausgeschlossen werden, bedeutet dies sogar ein Rezidiv-Risiko von 30%. Zu diesem Zeitpunkt kann die konfokale Laser Scanning Mikroskopie nicht den Standard der H&E-gefärbten Paraffinschnitte ablösen. Mit einer Spezifität von 96% ist es denkbar, CLSM als unterstützende diagnostische Methode vor dem Vorliegen H&E-gefärbter Schnitte zu verwenden: Sind keine Tumorstränge in den konfokalen Bildern zu sehen, bestünde somit ein geringes Risiko an Überresten von Tumorsträngen im Patienten.

Die höhere Sensitivität (80%) in der Praxisklinik kann damit erklärt werden, dass der Untersucher über klinische Hintergrundinformationen über Patienten und Tumorcharakteristika verfügte, da er gleichzeitig der Operateur war. Ohne diesen klinischen Hintergrund ist es in vielen diagnostischen Methoden schwieriger, eine richtige Diagnose zu stellen. Klinische Hintergrundinformationen sind wichtig für Histopathologen. Der Zusammenhang in der Praxisklinik kommt näher an die Realität der Mohs' Chirurgie, in welcher der Chirurg auch die Rolle des Pathologen besetzt.

Es gab mehr „falsch negative“ als „falsch positive“ Ergebnisse. Das heißt, Tumorreste wurden öfter übersehen, als dass sie fälschlicherweise diagnostiziert wurden.

Ein sogenanntes „falsch negatives“ Ergebnis heißt, dass keine Tumorstränge in dem konfokalen Bild zu erkennen waren, während diese im zugehörigen H&E-gefärbten Paraffinschnitt vorhanden waren. Technisch gesehen muss man bedenken, dass in der Produktion klassischer Gefrier- oder Paraffinschnitte immer Gewebe verloren geht, welches vom Gefrier- oder Paraffinblock abgehobelt wurde. Diese dünnen Gewebeschnitte erscheinen nicht auf den Objektträgern, sondern werden verworfen. In der Betrachtung von frischem Gewebe, direkt von der Oberfläche des chirurgischen Exzidates, wie es in der Analyse der CLSM in dieser Studie durchgeführt wurde, wurde kein Gewebe verworfen.

Basierend auf diesen Fakten, könnte es sein, dass in den „falsch negativen“ Fällen, in denen im konfokalen Bild kein BZK erkennbar war, Tumorgewebe durch ein technisches Artefakt an die Oberfläche gelangte; indem der Laborant/die Laborantin dünne Schichten eines ursprünglich negativen Randes abgehobelt hatte.

Letztendlich muss davon ausgegangen werden, dass in einigen Fällen die standardmäßige Aufarbeitung der Paraffinblöcke zu fälschlicherweise positiven Rändern geführt hat, während die negative CLSM Diagnose korrekt gewesen wäre.

Auf der anderen Seite könnte ein falsch positives Ergebnis im konfokalen Bild folgendermaßen erklärt werden: Tumorstränge, die im konfokalen Bild erkannt wurden, könnten bei der histopathologischen Aufarbeitung herausgebrochen oder abgehobelt worden sein. Abbildung 10 zeigt ein Beispiel, in welchem ein Teil eines BZKs im konfokalen Bild dargestellt wird, jedoch im zugehörigen H&E-gefärbtem Schnitt fehlt.

In solchen Fällen, könnten Paraffin-, aber auch Gefrierschnitte als Goldstandard nicht korrekt sein und keine komplett sichere Detektion von Tumorsträngen garantieren. Deshalb kann angenommen werden, dass die tatsächliche Sensitivität und Spezifität dieser Studie höher liegen müsste als angegeben.

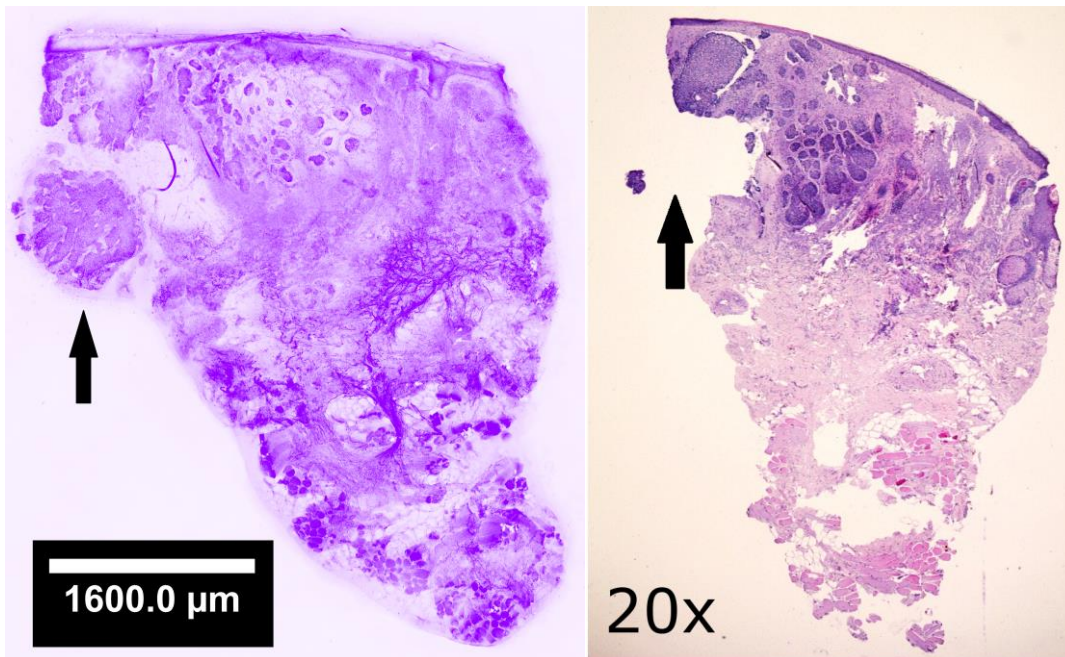


Abbildung 10: Noduläres Basalzellkarzinom. Konfokales Bild (links) mit dazugehörigem H&E-Schnitt (rechts). Pfeil: BZK-Insel, die im H&E-Schnitt fehlt

Der positive Zusammenhang zwischen Schulnoten und korrekter/inkorrektur Diagnose zeigt, dass die gewählten Kriterien „dargestellte Epidermis in Prozent“, „Helligkeit/Kontrast“, „Färbung“ und „fehlende Bereiche“ (z.B. als Folge unzureichenden Ebenens, eines inkompletten Scans oder Artefakte durch Fasern ö.Ä.) relevant sind, um eine richtige Diagnose zu stellen. Deshalb sollten diese Kriterien bei der Verbesserung des Mikroskops und generell der Generierung der Bilder, beachtet werden.

Die Sicherheit über die Diagnose wurde offensichtlich auch durch die Bildqualität beeinflusst. Vom klinischen Standpunkt aus war es auffallend, dass die Diagnose in den meisten Fällen richtig gestellt wurde, wenn sich der Dermatochirurg/Dermatopathologe sicher war. Daraus lässt sich Folgendes schließen: Bei einer großen subjektiven Sicherheit des Untersuchers könnte die CLSM mit dem Histolog™ Scanner eine gute Basis für klinische Entscheidungen darstellen. Falls eine Unsicherheit bestünde, könnte der Operateur das Ergebnis der Paraffin- oder Gefrierschnitte abwarten.

Die Differentialdiagnosen zwischen Adnexstrukturen der Haut wie Haarfollikeln oder Drüsen und BZKs war oft schwierig. Trotzdem konnten in dieser Arbeit in

durch die hohe Qualität der Bilder auch andere Hauterscheinungen wie die Talgdrüsenhyperplasien von BZKs differenziert werden (Abbildung 9). Mit einer Verbesserung der Bildauflösung wäre es in der Zukunft ggf. möglich, die CLSM für weitere Indikationen zu nutzen.

Hartmann et al. untersuchten melanozytäre Läsionen mithilfe der *ex vivo* CLSM [22]. Longo et al. beschrieben die Differentialdiagnose von Adnexstrukturen, normaler Haut und BZKs in konfokalen Bildern im Fluoreszenzmodus. In einer Serie von 64 BZKs erreichten sie im Vergleich der konfokalen Bilder zu H&E-gefärbten Gefrierschnitten eine Sensitivität von 94,9% und eine Spezifität von 96,8% [26]. Benassar et al. erreichten eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 99% in 80 Fällen von BZKs, indem sie konfokale Bilder des Fluoreszenzmodus mit Gefrierschnitten verglichen [30].

Es gibt wenige Informationen über die *ex vivo* Verwendung von OCT. Eine HD-OCT Studie von Maier et al. zeigte eine Sensitivität und Spezifität von 74% und 64% in 20 Fällen von BZKs im Vergleich zu Gefrierschnitten [17]. Verglichen mit der OCT, sind die Ergebnisse des Histolog<sup>TM</sup>Scanners eindeutig höher.

Das Problem des Ebnens und der Positionierung zur vollständigen Darstellung der Epidermis tritt bei der Methode der RLE hingegen nicht auf.

Die jetzige Studie untersucht die CLSM als mögliche Alternative zu Paraffin- oder Gefrierschnitten. Um als solche Alternative genutzt werden zu können, müssen die Ergebnisse bzgl. der diagnostischen Genauigkeit in der Zukunft weiter verbessert werden. In bestimmten Situationen könnte die Untersuchung von Frischgewebe sogar genauer sein als die heutigen Standardverfahren.

## **5.2 Diskussion Teil B: RLE**

Generell ist die Bedienung des verwendeten Stereomikroskops sehr ähnlich zu klassischen Lichtmikroskopen, welche zur routinemäßigen histologischen Untersuchung verwendet werden.

Die standardmäßige makroskopische Präparation nach der „Tübinger Torte“ bzw. „Muffin Technik“ eignete sich perfekt für die Untersuchung mit dem Stereomikroskop. [11]. Somit konnte die RLE gut in den klinischen Alltag als Zusatz integriert werden.



Das Färbeprotokoll war 20-40 sek kürzer als in vorangegangenen RLE Studien [23, 24]. Mit einem Median von 120 sek (Minimum 60 sek; Maximum 480 sek) für die Erstellung und Beurteilung eines kompletten Exzidates war die RLE deutlich schneller als die CLSM [22]. Dieser kurze Zeitbedarf für eine histopathologische Diagnosestellung mithilfe der RLE wäre von großem Vorteil für Patient und Operateur im Vergleich zu Gefrier- oder Paraffinschnitten.

Der ganze Prozess der Präparation und Positionierung war sehr einfach ohne die Notwendigkeit, das zu untersuchende Gewebe in irgendeiner Art zu ebneten oder fixieren, wie es bei anderen Techniken wie der CLSM oder Gefrierschnitten notwendig ist [26, 33, 34].

Der Untersucher erhielt unverzüglich eine dreidimensionale Übersicht und konnte mit einer bis zu 100fachen Vergrößerung arbeiten. Die RLE hatte kein limitiertes Sichtfeld oder ein zusammengefügtes Bildmosaik wie bei der CLSM [33]. Dies erleichterte die Gewebsuntersuchung deutlich.

Es wurde bereits beschrieben, dass Untersucher sich an die dreidimensionale Darstellung und die Toluidinblau-Färbung des Gewebes der RLE gewöhnen [24]. Eine Mikroskop-Kamera erlaubte es, zweidimensionale Fotos des Gewebes anzufertigen, in denen jedoch der dreidimensionale Effekt und die dadurch gewonnenen Zusatzinformationen verloren gingen. Daher würde eine Analyse von zweidimensionalen RLE Bildern, welche im Rahmen einer Studie verschiedenen Untersuchern zur Beurteilung vorgelegt würden, keinen Sinn ergeben.

Die Sensitivität und Spezifität betrug insgesamt 92% und 98%. Für laterale Ränder bei der Tübinger Torte wurde eine Sensitivität und Spezifität von 100% erreicht. Trotzdem hatte die RLE in den Quadranten der Muffins nur eine Sensitivität von 67%. Unter 171 Quadranten waren 3 falsch positive und 2 falsch negative Fälle. In den sogenannten „falsch-negativen“ Fällen, zeigten die H&E-Schnitte winzige superfizielle Tumorausläufer.

Es muss bedacht werden, dass diese Tumorstränge ggf. nur sichtbar wurden, nachdem dünne Schichten im Labor vom Paraffinblock abgehobelt werden, bevor der zu beurteilende Schnitt auf den Objektträger aufgezogen wurde. Möglicherweise konnten diese Tumorstränge nur durch die labortechnische Aufarbeitung

an die Oberfläche gelangen. Der H&E Schnitt zeigte dann Tumorausläufer, während der chirurgische Schnittrand *a priori* tumorfrei war.

Andererseits zeigen die falsch positiven Ergebnisse, dass z.B. Haarfollikel in der RLE für kleine BZK-Knospen gehalten wurden. In einem Fall wurde aufgrund eines Artefaktes auf dem H&E-Schnitt der in der RLE beschriebene Tumorausläufer an dieser Stelle im H&E-Schnitt nicht diagnostiziert. Solche Artefakte könnten eine niedrigere Sensitivität erklären und es bleibt fraglich, ob die H&E-Schnitte die tatsächlichen Ergebnisse der chirurgischen Ränder repräsentieren.

Wie alle Techniken, bei denen Frischgewebe untersucht wird, besitzt auch die RLE den Vorteil, dass kein Gewebe verloren geht, so wie es bei der Aufarbeitung von Paraffin- oder Gefrierschnitten der Fall ist.

Dies könnte die „falsch negativen“ Ergebnisse der RLE erklären: in diesen Fällen waren Tumorstränge im H&E-Schnitt vielleicht nur sichtbar, da eigentlich tumorfreie Ränder erst durch den Anschnitt bei der Aufarbeitung Tumor enthielten. Andererseits könnten bei sog. „falsch positiven“ Fällen Tumorstränge, die in der RLE sichtbar waren, durch die Aufarbeitung abgeschnitten worden sein und somit irrtümlicherweise zu „tumorfremen“ Ränder im H&E-gefärbten Paraffinschnitt geführt haben.

Ein Nachteil der RLE ist die fehlende Funktion, tiefere histologische oder optische Schnitte zu erstellen, was für die histopathologische Beurteilung oft von Vorteil ist und z.B. neben Gefrier- und Paraffinschnitten auch mit der OCT möglich ist [17].

Da die diagnostische Genauigkeit der RLE noch nicht ausreichend ist, kann die RLE derzeit nur als Unterstützung zur Standardhistologie dienen: sollten in der RLE Tumorstränge zu sehen sein, könnte ein Operateur ziemlich sicher sein, dass an dieser Stelle nachgeschnitten werden muss. Eine solche Nachexzision könnte unmittelbar erfolgen, wobei alle histologischen Präparate dennoch zur routinemäßigen histopathologischen Untersuchung an Paraffinschnitten geschickt werden sollten. Bei tumorfreien Schnitträndern in der RLE könnte der Defekt offen gelassen werden, falls Zweifel bestünden bzw. eine komplexe Rekon-

struktion (wie z.B. mittels Transpositions-Lappen) notwendig wäre. Ist der chirurgische Defekt mit einem einfacheren Primärverschluss oder einem Transplantat zu verschließen, wäre die sofortige Rekonstruktion bei einem negativen Schnittrand in der RLE denkbar. Hiermit bestünde ein geringes Risiko, dass zu einem späteren Zeitpunkt dennoch eine Nachexzision aufgrund positiver H&E-gefärbter Randschnitte notwendig wäre.

## **6. Schlussfolgerung**

### **6.1 Schlussfolgerung Teil A: CLSM**

Diese Studie zeigt, dass die CLSM eine vielversprechende und schnelle Technik in der MKC von BZKs ist.

Durch den Einsatz der CLSM könnte sich die Behandlung von Basaliompatienten durch kürzere Krankenhausaufenthalte oder einer schnelleren ambulanten Therapie verbessern, indem eventuelle Nachexzisionen noch in derselben Sitzung durchgeführt werden könnten. Die Kombination aus Randkontrollen mit minimalen Sicherheitsabständen und einer schnelleren Patientenbehandlung mit geringerem Risiko für Infektionen durch die Vermeidung von offenen Wunden, könnte zu geringeren Komplikationsraten und evtl. zu besseren kosmetischen Ergebnissen führen.

Das in dieser Studie verwendete konfokale Mikroskop Histolog<sup>TM</sup>Scanner war leicht zu bedienen und ermöglichte eine exzellente Übersicht in hochauflösenden mikroskopischen Bildern, welche an H&E-gefärbte Schnitte erinnerten.

Weitere Untersuchungen und technische Verbesserungen sind notwendig.

Um Wissen und Expertise auszutauschen, sollten Arbeitsgruppen, die sich mit dem Einsatz der CLSM in der mikrographisch kontrollierten Chirurgie beschäftigen, enger kooperieren.

### **6.2 Schlussfolgerung Teil B: RLE**

Die RLE ist eine vielversprechende, jedoch nicht weit verbreitete Technik. Für einen erfahrenen Untersucher eröffnet sie neue Dimensionen und einen relativ sicheren und schnellen Weg zu histologischen Informationen.

Übung oder die Teilnahme als Untersucher an einer Studie sind notwendig, um die RLE-Technik mit einer Genauigkeit anzuwenden, welche den Ergebnissen dieser Studie entspricht.

Die RLE ist deutlich schneller als die CLSM oder die in der „Mohs‘ Surgery“ etablierte Gefrierschnellschnittmethode und ermöglicht daher die Vermeidung mehrzeitiger Operationen. Patienten müssten nur in wenigen Fällen oder überhaupt

nicht mit offenen Wunden stationär auf das histologische Ergebnis der Paraffinschnitte warten.

Die diagnostische Genauigkeit der RLE sollte weiter verbessert werden.

Immunfärbungen am Frischgewebe mit BZK-spezifischen Antikörpern, wie z.B. Anti-BerEp4-Antikörpern, könnten einen Ansatz für eine Immun-RLE darstellen.

## 7. Zusammenfassung

*Hintergrund:* Die sichere Entfernung maligner Hauttumoren wie Basalzellkarzinomen erfordert tumorfreie Schnittränder. Goldstandard zur Evaluierung der Schnittränder sind Gefrierschnitte oder H&E-gefärbte Paraffinschnitte. Vor allem die Herstellung von Paraffinschnitten benötigt viel Zeit (>20 h). Exzisionsdefekte müssen bis zum Vorliegen freier Schnittränder häufig offengelassen werden. Histologische Verfahren, welche diese Zeitspanne verkürzen, dienen der Patientensicherheit.

*Ziel:* Evaluation der Erstellung und Befundung von Bildern mit einem neuen konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Histolog™Scanner, SamanTree, Lausanne) und Analyse der diagnostischen Genauigkeit einer weiteren Methode - der Rapid Lump Examination (RLE) - im realen OP-Ablauf.

*Methoden:* Bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) wurden 544 digitale Bilder von 148 Exzisionen mit Verdacht auf Basalzellkarzinom generiert. Das Frischgewebe wurde nach Inkubation mit 0,01%iger Proflavinlösung untersucht. 303 Proben wurden in der „Praxisklinik Tübingen“ und 241 an der Universitäts-Hautklinik Tübingen gescannt. Die Diagnosen der Bilder wurden mit der Paraffinhistologie verglichen.

Bei der Verwendung der RLE wurden 300 Gewebsabschnitte aus 90 Exzisionen mit Verdacht auf Basalzellkarzinom untersucht. Das entnommene Frischgewebe wurde 20 sek in 10%iger Essigsäure, 10 sek in Leitungswasser, 20 sek in 0,2%iger Toulidinblau-Lösung und 5 sek in Leitungswasser inkubiert. Anschließend konnte das Gewebe direkt auf einem Objektträger unter einem Stereomikroskop untersucht werden. Die histopathologische Diagnose wurde mit der Paraffinhistologie verglichen.

*Ergebnisse:* Bei der CLSM waren 525 von 544 Bildern auswertbar. Die Sensitivität der CLSM war 73% (95%KI = [65,27%;80,47%]), die Spezifität 96% (95%KI = [93,40%;97,60%]). Die mediane Gesamtzeit für die Erstellung und Befundung betrug 310 sek (Minimum 123 sek und Maximum 1210 sek). Der aufwändigste

Faktor beim Erstellen der Bilder war die plane Positionierung der Gewebeproben auf dem Mikroskop.

Bei der RLE lag die Zeit zur Fixierung, Färbung und Beurteilung der Proben im Median bei 120 sek (Minimum 60 sek und Maximum 480 sek). Die Sensitivität und Spezifität betragen 92% (95%KI=[83,4%;92,1%]) und 98% (95%KI=[95,21%;99,51%]).

*Diskussion:* Die digitale Einfärbung der CLSM erleichtert die histopathologische Beurteilung, trotzdem sollte die diagnostische Genauigkeit der CLSM noch verbessert werden. Ausschlaggebend ist hier das Ebenen der Gewebeproben, um eine komplette Darstellung auch großer Proben zu erhalten.

Die RLE ist eine schnelle Alternative, deren dreidimensionale Ansicht die histopathologische Beurteilung erleichtert; jedoch sollte die diagnostische Genauigkeit noch erhöht werden.

*Schlussfolgerung:* Sowohl die CLSM, als auch die RLE ermöglichen eine zeitsparende histologische Beurteilung im Vergleich zu klassischen Paraffinschnitten oder Gefrierschnitten. Zahlreiche mehrzeitige Operationen könnten unter Einsatz der Methoden vermieden werden. Ihre diagnostische Genauigkeit ist derzeit jedoch noch zu gering, um die klassische Paraffinhistologie ersetzen zu können.

Teile der Zusammenfassung sind in Form von Abstracts im Internet einsehbar:

Freier Vortrag FV39: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) im Vergleich zu HE-gefärbten Paraffinschnitten in der Mohs Chirurgie von Basalzellkarzinomen, 2017, Freie Vorträge. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 15: 1–19. doi:10.1111/ddg.13299

Poster P58: Mikrographisch kontrollierte Chirurgie von Basalzellkarzinomen: Rapid Lump Examination (RLE) im Vergleich zu HE-gefärbten Paraffinschnitten, 2017, Poster. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 15: 6–11. doi:10.1111/ddg.13252

## 8. Literaturverzeichnis

1. *Basalzellkarzinom - Übersicht*. Altmeyers Enzyklopädie, <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/basalzellkarzinom-ubersicht-622> 14.01.18; 17:26 Uhr, 2017.
2. Gallagher, R.P., et al., *Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma*. Arch Dermatol, 1995. **131**(2): p. 157-63.
3. Wu, S., et al., *Basal-cell carcinoma incidence and associated risk factors in U.S. women and men*. Am J Epidemiol, 2013. **178**(6): p. 890-7.
4. Telfer, N.R., G.B. Colver, and C.A. Morton, *Guidelines for the management of basal cell carcinoma*. Br J Dermatol, 2008. **159**(1): p. 35-48.
5. Fritsch, P., *Dermatologie Venerologie*. 2004, Berlin: Springer.
6. Rubin, A.I., E.H. Chen, and D. Ratner *Basal-Cell Carcinoma*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(21): p. 2262-2269.
7. Rapini, R.P., *Practical Dermatopathology*. Vol. Second Edition. 2012: Elsevier.
8. Boehringer, A., et al., *Analysis of incomplete excisions of basal-cell carcinomas after breadloaf microscopy compared with 3D-microscopy: a prospective randomized and blinded study*. J Cutan Pathol, 2015. **42**(8): p. 542-53.
9. Hauschild, A., H. Breuninger, and R. Kaufmann, *Kurzleitlinie - Basalzellkarzinom der Haut*. AWMF online [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-021I\\_S2k\\_Basalzellkarzinom\\_2013-verlaengert.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-021I_S2k_Basalzellkarzinom_2013-verlaengert.pdf) 15.01.18, 15:38 Uhr, 2013.
10. Marzuka, A.G. and S.E. Book, *Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management*. Yale J Biol Med, 2015. **88**(2): p. 167-79.
11. Löser, C.R., et al., *S1 guideline: microscopically controlled surgery (MCS)*. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2015. **13**(9): p. 942-951.
12. Moehrle, M., H. Breuninger, and M. Rocken, *A confusing world: what to call histology of three-dimensional tumour margins?* J Eur Acad Dermatol Venereol, 2007. **21**(5): p. 591-5.
13. Moehrle, M., et al., *Conventional histology vs. three-dimensional histology in lentigo maligna melanoma*. Br J Dermatol, 2006. **154**(3): p. 453-9.
14. Gareau, D.S., et al., *Rapid screening of cancer margins in tissue with multimodal confocal microscopy*. J Surg Res, 2012. **178**(2): p. 533-8.
15. Olmedo, J.M., et al., *Optical coherence tomography for the characterization of basal cell carcinoma in vivo: a pilot study*. J Am Acad Dermatol, 2006. **55**(3): p. 408-12.
16. Gambichler, T., et al., *In vivo optical coherence tomography of basal cell carcinoma*. J Dermatol Sci, 2007. **45**(3): p. 167-73.



17. Maier, T., et al., *Ex vivo high-definition optical coherence tomography of basal cell carcinoma compared to frozen-section histology in micrographic surgery: a pilot study*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2014. **28**(1): p. 80-85.
18. Eichert, S., et al., *Diagnosis of cutaneous tumors with in vivo confocal laser scanning microscopy*. J Dtsch Dermatol Ges, 2010. **8**(6): p. 400-10.
19. Ghita, M.A., et al., *Reflectance confocal microscopy and dermoscopy for in vivo, non-invasive skin imaging of superficial basal cell carcinoma*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 3019-3024.
20. Ragazzi, M., C. Longo, and S. Piana, *Ex Vivo (Fluorescence) Confocal Microscopy - State of the art*. Advances in Anatomic Pathology, 2016. **23**(3): p. 159-169.
21. Longo, C., et al., *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.
22. Hartmann, D., et al., *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.
23. Möhrle, M., et al., *Rapid Lump Examination (RLE) – a new tool for Mohs surgery?* JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2011. **9**(7): p. 534-539.
24. Veenstra, M., et al., *Rapid Lump Examination as a New Aid to Speedup Mohs Micrographic Surgery: A Pilot Study*. Dermatol Surg, 2016. **42**(5): p. 665-71.
25. Kaufmann, R., *Beschleunigung im OP? – Zum Stellenwert der Rapid Lump Examination (RLE)*. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2011. **9**(7): p. 499-500.
26. Longo, C., et al., *Evaluating ex vivo fluorescence confocal microscopy images of basal cell carcinomas in Mohs excised tissue*. Br J Dermatol, 2014. **171**(3): p. 561-70.
27. Ziefle, S., et al., *Confocal laser scanning microscopy vs 3-dimensional histologic imaging in basal cell carcinoma*. Archives of Dermatology, 2010. **146**(8): p. 843-847.
28. Karen, J.K., et al., *Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy*. Br J Dermatol, 2009. **160**(6): p. 1242-50.
29. Bini, J., et al., *Confocal mosaicing microscopy of human skin ex vivo: spectral analysis for digital staining to simulate histology-like appearance*. Journal of Biomedical Optics, 2011. **16**(7): p. 076008.
30. Bennàssar, A., et al., *Ex vivo fluorescence confocal microscopy for fast evaluation of tumour margins during Mohs surgery*. British Journal of Dermatology, 2014. **170**(2): p. 360-365.
31. De Giorgi, V., et al., *Combined non-linear laser imaging (two-photon excitation fluorescence microscopy, fluorescence lifetime imaging microscopy, multispectral multiphoton microscopy) in cutaneous tumours: first experiences*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2009. **23**(3): p. 314-6.

32. Gareau, D., et al., *Tri-modal confocal mosaics detect residual invasive squamous cell carcinoma in Mohs surgical excisions*. Journal of biomedical optics, 2012. **17**(6): p. 066018.
33. Gareau, D.S., et al., *Confocal mosaicing microscopy in Mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology*. J Biomed Opt, 2008. **13**(5): p. 054001.
34. Larson, B., et al., *Detection of skin cancer margins in Mohs excisions with high-speed strip mosaicing confocal microscopy: a feasibility study*. Br J Dermatol, 2013. **169**(4): p. 922-6.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gewebeprobe in einer speziellen Schale mit transparentem Boden auf dem invertierten Mikroskop positioniert.....	14
Abbildung 2: Konfokales Bild; Artefakt durch Faser eines Tupfers (*).....	15
Abbildung 3: Knete in Frischhaltefolie zum Ebenen der Proben.....	16
Abbildung 4: x-Achse: Probennummer als Maß für den zeitlichen Verlauf; y-Achse: Zeit zur Generierung eines digitalen Bildes in Minuten; Darstellung des Lerneffektes im Generieren eines digitalen Bildes im Verlauf der Studie.....	25
Abbildung 5: Konfokales Bild; basaloide Tumorinsel mit peripherer Pallisadenbildung (*), umgeben von entzündlicher Stromareaktion.....	26
Abbildung 6: Stanzbiopsie eines nodulären Basalzellkarzinoms. Konfokales Bild (links) mit dazugehörigem H&E-Schnitt (rechts) .....	33
Abbildung 7: Stanzbiopsie einer Talgdrüsenhyperplasie. Konfokales Bild (links) mit dazugehörigem H&E-Schnitt (rechts) .....	34
Abbildung 8: Solides Basaliom (*), H&E-Schnitt (oben) und RLE (unten) .....	39
Abbildung 9: Stanzbiopsie, Talgdrüsenhyperplasie (*), H&E-Schnitt (links) und RLE (rechts) .....	40
Abbildung 10: Noduläres Basalzellkarzinom. Konfokales Bild (links) mit dazugehörigem H&E-Schnitt (rechts). Pfeil: BZK-Insel, die im H&E-Schnitt fehlt.....	47

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl verschiedener Probenarten, resultierend aus der makroskopischen Präparation der CLSM.....	22
Tabelle 2: Verschiedene BZK Subtypen bei der CLSM.....	23
Tabelle 3: Lokalisation der Exzidate der CLSM.....	23
Tabelle 4: Verteilung der Größe der exzidierten Gewebestücke der CLSM in mm (n=525) ohne Sicherheitsabstand.....	24
Tabelle 5: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten insgesamt. Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte.....	28
Tabelle 6: Sensitivität und Spezifität einzelner Probenarten und aller Probenarten insgesamt beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte.....	28
Tabelle 7: Probenzahl n Gesamt und deren Verteilung in richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitten. Stanzbiopsien und Shave-Exzisionen ausgeschlossen....	29
Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität aller Probenarten insgesamt beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitten. Stanzbiopsien und Shave-Exzisionen ausgeschlossen....	29
Tabelle 9: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten in der Praxisklinik Tübingen. Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte.....	30
Tabelle 10: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten in der Praxisklinik Tübingen. Sensitivität und Spezifität der CLSM verglichen mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte.....	31

Tabelle 11: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten in der Universitäts-Hautklinik Tübingen. Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der CLSM mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte.....	32
Tabelle 12: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten n der Universitäts-Hautklinik Tübingen. Sensitivität und Spezifität der CLSM verglichen mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte....	32
Tabelle 13: Qualität der konfokalen Bilder in Schulnoten in Relation zu korrekten und inkorrekten Diagnosen bei der CLSM.....	35
Tabelle 14: Sicherheit des Untersuchers in Bezug auf seine Diagnose im Verhältnis zu korrekten und inkorrekten Diagnosen bei der CLSM.....	35
Tabelle 15: Verschiedene BZK Subtypen der RLE.....	36
Tabelle 16: Lokalisation der Exzidate der RLE.....	37
Tabelle 17: Anzahl verschiedener Probentypen, resultierend aus der makroskopischen Präparation der RLE.....	37
Tabelle 18: Fixierungs- und Färbeprotokoll der RLE.....	38
Tabelle 19: Zeit zur Aufarbeitung und Evaluation der Gewebeteile für die RLE nach der Entfernung und makroskopischen Präparation in Sekunden (n=83*).....	38
Tabelle 20: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten insgesamt. Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der RLE mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte.....	41
Tabelle 21: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten insgesamt. Sensitivität und Spezifität der RLE verglichen mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitte.....	41
Tabelle 22: Anzahl der Proben und verschiedenen Probenarten insgesamt. Anzahl der richtig positiven, falsch positiven, richtig negativen und	

falsch negativen Diagnosen beim Vergleich der RLE mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitten. Probeentnahmen und Shave-Exzisionen ausgeschlossen.....42

Tabelle 23: Anzahl der Proben. Sensitivität und Spezifität der RLE verglichen mit der Histopathologie H&E-gefärbter Paraffinschnitten. Probeentnahmen und Shave-Exzisionen ausgeschlossen.....42

## 9. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Praxisklinik Tübingen – Haut und Venen und der Universitäts-Hautklinik Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Matthias Möhrle durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Matthias Möhrle, Dermatologe in der Praxisklinik Tübingen – Haut und Venen.

Die komplette Durchführung der Färbung und Positionierung der Proben und die Datenerfassung für die CLSM wurde von mir eigenständig durchgeführt.

Die Färbung und Vorbereitung der Proben und die Datenerfassung der RLE wurden von mir in Zusammenarbeit mit der Assistenzärztin Melanie Schubert durchgeführt.

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen bei Frau Dipl.-Stat. Aline Naumann in Anspruch genommen.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Matthias Möhrle.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren, als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## 10. Veröffentlichungen

Im Rahmen meiner Arbeit hatte ich die Möglichkeit, meine Ergebnisse in Form von Postern oder freien Vorträgen auf folgenden Kongressen vorzustellen:

- ESMS (European Society for Micrographic Surgery) Mohs Surgery Course 2016, Zürich
- 49. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 2017, Berlin
- 25. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Histologie 2017, Bad Cannstatt
- 27. Deutscher Hautkrebskongress 2017, Mainz
- 33. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Dermatochirurgie e.V. 2017, Mannheim

Anlässlich des 27. Deutschen Hautkrebskongresses 2017 in Mainz wurden folgende Abstracts veröffentlicht:

Freier Vortrag FV39: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) im Vergleich zu HE-gefärbten Paraffinschnitten in der Mohs Chirurgie von Basalzellkarzinomen, 2017, Freie Vorträge. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 15: 1–19. doi:10.1111/ddg.13299

Poster P58: Mikrographisch kontrollierte Chirurgie von Basalzellkarzinomen: Rapid Lump Examination (RLE) im Vergleich zu HE-gefärbten Paraffinschnitten, 2017, Poster. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 15: 6–11. doi:10.1111/ddg.13252

Auf dem 27. Deutschen Hautkrebskongress 2017 in Mainz wurde mir von der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO) der Posterpreis in der Kategorie „Klinische Dermato-Onkologie“ für den Beitrag „Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) im Vergleich zu HE-gefärbten Paraffinschnitten in der Mohs Chirurgie von Basalzellkarzinomen“ verliehen.



## Danksagung

Für die Entstehung dieser Arbeit habe ich einigen Menschen meinen Dank auszusprechen. Der größte Dank gebührt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Matthias Möhrle: Für das Überlassen dieses tollen Themas, für die gute Organisation und die Ermöglichung, wertvolle Erfahrungen in der Wissenschaft zu machen. Ich habe unheimlich viel gelernt und hatte auch noch Freude daran. Am meisten danke ich ihm aber für die hervorragende Unterstützung und Erreichbarkeit in den letzten Jahren – sogar während seiner Urlaube. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können.

Großen Dank möchte ich Melanie Schubert für das Teilen ihres Wissens, ihre Beratung während der Entstehung der Arbeit und unsere stets amüsanten Treffen aussprechen.

Das tolle Team der Praxisklinik Tübingen hat mich während meiner Zeit bei ihnen großartig unterstützt und allzeit herzlich empfangen. Ich danke ihnen allen sehr dafür.

Außerdem bin ich den Pathologen Frau Dr. med. Gisela Metzler und Herrn Dr. med. Jan-Philipp Geppert dankbar, die bei Fragen und zusätzlichen histologischen Untersuchungen zur Verfügung standen.

Danke an das gesamte OP-Team der Universitäts-Hautklinik Tübingen, die mich während meiner Zeit dort begleitet haben und von denen ich viel lernen konnte.

Vielen Dank auch an Frau Dipl.-Stat. Aline Naumann für ihre außerordentlich gute statistische Beratung und ihre verständlichen Erklärungen.

Des Weiteren möchte ich noch Nils Nüßle sehr für die Vermittlung des Themas und die große Unterstützung während dieser Zeit danken.

Zuletzt geht mein Dank an meine Familie, die mich in meinem Vorhaben jederzeit bestärkt hat und immer zu mir steht.