

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
DERMATOLOGIE
DIREKTOR: PROFESSOR DR. DR. H.C. M. LANDTHALER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

KONFOKALE LASERMIKROSKOPIE
EVALUATION AN NATIVEN GEWEBESCHNITTEN FÜR MIKROGRAPHISCHE
CHIRURGIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sabine Käb

2011

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Hohenleutner
2. Berichterstatter: PD Dr. Norbert Ahrens
Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2012

INHALT

1. Einleitung und Zielstellung	5
2. Einführung in die Problematik	6
2.1. Das Basalzellkarzinom	6
2.1.1. Definition, Epidemiologie, Ätiologie	6
2.1.2. Klinik und Histologie	7
2.1.3. Therapie	8
2.1.4. Prognose	11
2.3. Mikrographisch kontrollierte Chirurgie (mikroskopisch kontrollierte Chirurgie, MKC)	11
2.3.1. Mohs Surgery	12
2.3.2. Münchner Methode	13
2.3.3. Randstreifen-Methode (3D-Histologie)	13
2.4. Konfokale Lasermikroskopie	14
2.4.1. Technik	14
2.4.2. Anwendungsgebiete in der Dermatologie	17
3. Material, Methoden.....	20
3.1. Materialgewinnung und Präparation	20
3.2. Konfokale Lasermikroskopie	20
3.3. Probenvorbehandlung	26
3.4. Strategie der Auswertung	26
4. Ergebnisse	27
4.1. Morphologische Merkmale gesunder Haut in der konfokalen Mikroskopie	27
4.2. Morphologische Merkmale des Basalzellkarzinoms in der konfokalen Mikroskopie ..	32
4.3. Zeitaufwand	36
4.4. Anzahl der untersuchten Präparate	36
4.5. Vergleich der konfokalen mit den lichtmikroskopischen Befunden	36
4.6. Gesamtergebnis	43
5. Diskussion	44
5.1. Fehlerquellen	44
5.1.1. Probleme in der Handhabung des Gerätes	44
5.1.2. Inkonsistente Bildqualität	44
5.2. Verbesserungsansätze	45
5.2.1. Verbesserung des Objektträgers	45

5.2.2. Verstärkung des Kontrasts mit Hilfe von Farbstoffen und Fluoreszenz	45
5.2.3. Verkürzung der Untersuchungszeiten durch Vergrößerung des Bildfelds.....	46
5.3. Einsatzmöglichkeiten in der mikrografischen Chirurgie.....	46
6. Zusammenfassung.....	48
6.1. Zielstellung.....	48
6.2. Untersuchungsmaterial und Methodik	48
6.3. Ergebnisse	48
6.4. Schlussfolgerung	48
7. Abbildungsverzeichnis.....	50
8. Literaturverzeichnis.....	52

1. Einleitung und Zielstellung

Basalzellkarzinome sind die häufigsten malignen Tumore in den USA, Australien und Europa. Meist sind sonnenexponierte Körperstellen betroffen: Bei bis zu 85% der Patienten sind die Hautveränderungen an Kopf oder Nacken lokalisiert.

Insbesondere faziale Basalzellkarzinome müssen unter maximaler Schonung der umgebenden gesunden Haut exzidiert werden. Dies wird durch den Einsatz der mikrographischen Chirurgie (MKC) erreicht. Diese Methode ist durch die lückenlose histologische Darstellung sämtlicher Schnittränder gekennzeichnet und erreicht so eine Minimierung der Rezidivraten bei größtmöglicher Schonung des gesunden Gewebes (Boztepe et al. 2004). Nachteil der Methode ist der enorme Zeitaufwand: Nach jeder Exzision muss das Gewebe fixiert oder gefroren, eingebettet und gefärbt werden.

Die konfokale Lasermikroskopie ermöglicht die Erzeugung virtueller Schnittbilder in nativem Gewebe. Dadurch kann die histologische Diagnostik deutlich beschleunigt werden.

In der vorliegenden Studie wurden die Einsatzmöglichkeiten der konfokalen Lasermikroskopie im Rahmen der mikrographischen Chirurgie untersucht.

2. Einführung in die Problematik

2.1. Das Basalzellkarzinom

2.1.1. Definition, Epidemiologie, Ätiologie

Das Basalzellkarzinom (basal cell carcinoma, BCC) ist eine epitheliale Neoplasie der behaarten Haut. Es ist durch lokal infiltrierendes und destruierendes Wachstum gekennzeichnet, metastasiert jedoch sehr selten und wird daher als semimaligine bezeichnet (Lo et al. 1991).

Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Frauen und Männer sind gleichermaßen betroffen. Das BCC ist der häufigste Tumor des Menschen. Im Jahr 2005 wurden in den USA eine Million neue BCC diagnostiziert. Für Deutschland wird die Inzidenz mit 100 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner mit einer jährlichen Zunahme von 3 bis 10% angegeben.

Flohil et al. errechneten in einer aktuellen Studie auf Grundlage der Daten des Eindhoven Cancer Registry für die Niederlande einen Anstieg der Inzidenz bei Frauen von 34 auf 141 pro 100 000 in den Jahren 1973 bis 2008. Bei den Männern stieg die Inzidenz im gleichen Zeitraum von 40 auf 148 pro 100 000. Die Ursachen dieser Zunahme sind im Anstieg des Durchschnittsalters, veränderter UV-Exposition sowie einer erhöhten Aufmerksamkeit von Ärzten und Patienten im Hinblick auf nichtmelanozytäre Hauttumore zu suchen (Flohil et al. 2011). Bemerkenswert ist, dass zunehmend jüngere Menschen betroffen sind.

Helle Hautfarbe und erhöhte UV-Exposition stellen die wichtigsten Risikofaktoren dar. So wird die höchste Inzidenz mit 2074 Fällen pro 100 000 Einwohnern unter australischen Männern gefunden (Lear et al. 2007). 85% der Tumore entstehen an lichtexponierten Körperstellen wie Kopf oder Nacken. Ein erhöhtes Risiko besteht auch bei Immunsuppression, nach Strahlentherapie und Arsenexposition. Ferner werden BCC auf Narben und Naevi sebacei beobachtet.

Insbesondere bei jungen Patienten tritt das BCC im Rahmen hereditärer Syndrome wie Xeroderma pigmentosum, Basalzellnävus-Syndrom, okulokutaner Albinismus, Rombo-Syndrom oder Bazex-Dupré-Christol-Syndrom auf.

2.1.2. Klinik und Histologie

Prädilektionsstelle für das BCC ist das Gesicht. Es entsteht – im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom – ohne Vorstufen auf klinisch unauffälliger Haut.

Das BCC manifestiert sich anfangs zumeist als flach erhabene, umschriebene, grauweiße bis gelblichrötliche Papel oder Plaque mit Teleangiektasien und einem perl schnurartigen Randsaum. Im Verlauf kommt es zu Erosionen und Ulzerationen. Der Tumor kann knorpelige und knöcherne Strukturen zerstören, so dass Organamputationen wie Exenteratio orbitae, Amputatio nasi oder auris notwendig werden.

Daneben existieren andere Varianten wie die als rote Flecken erscheinenden Rumpfhautbasaliome (superfizieller Typ) oder die an Vernarbungen erinnernden sklerodermiformen BCC.

Histologisch zeigt sich eine Proliferation basaloid differenzierter Zellverbände, die sich zu Knötchen oder Strängen formieren. Die Tumorzellen weisen große ovaläre basophile Nuklei auf, die von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben sind. Charakteristisch für das BCC ist die Palisadenstellung der Tumorzellen im Randbereich. Dermales Stroma umgibt die Tumorknoten. Zwischen Tumorepithel und Stroma beobachtet man häufig eine für BCC typische peritumorale Spaltbildung.

Die klinischen Subtypen weisen auch histologische Unterschiede auf:

Das solid-noduläre BCC ist gekennzeichnet durch asymmetrische Tumorknoten mit peritumoraler Spaltbildung und Stromareaktion. Gelegentlich beobachtet man eine Melanineinlagerung in Tumorepithel und -stroma.

Das sklerodermiforme oder szirrhöse BCC dagegen besteht aus schmalen Tumorsträngen, die nur etwa 2-3 Zelllagen dick sind und von einem dichten, fibroblastenreichen Stroma umgeben werden. Durch die hirschgeweihartige Aufzweigung der Zellstränge ist der Tumor zur Seite und Tiefe hin schlecht abgrenzbar.

Im Unterschied hierzu reichen die Tumorzellverbände des oberflächlich-multifokalen BCCs in der Regel nur bis ins obere Korium und stehen breitbasig mit der Epidermis in Verbindung (Braun-Falco et al. 2005; Kempf et al. 2007).

2.1.3. Therapie

2.1.3.1. Operative Therapie

Die Standardtherapie des BCC besteht in der Exzision mit anschließender histologischer Aufarbeitung des Gewebes.

Kleinere BCC sowie an Stamm und Extremitäten lokalisierte größere Tumore werden mit einem tumoradaptierten Sicherheitsabstand von 3 bis 5 mm exzidiert, um eine ausreichende Rezidivfreiheit zu gewährleisten. Für BCC mit einem Durchmesser unter 20 mm wird die Wahrscheinlichkeit für Tumorreste bei einem Sicherheitsabstand von 3 mm mit 15 %, bei einem Sicherheitsabstand von 4-5 mm mit 5 % angegeben (Breuninger, Dietz 1991). Für sklerodermiforme BCC und Rezidivtumore liegen diese Werte deutlich höher, so dass hier die Methoden der mikrographischen Chirurgie (vgl. 2.3.) mit vollständiger histologischer Aufarbeitung der Schnittränder zur Anwendung kommen.

Zur Behandlung superfizieller BCC an Stamm und Extremitäten eignet sich auch die Kürettage mit anschließender Elektrodesikkation oder die tangentiale Abtragung (Shave-Exzision). (Silverman et al. 1992b) Nachteile dieser Methoden sind die fehlende histologische Kontrolle der Schnittränder und das im Vergleich zur Exzision oft weniger befriedigende kosmetische Ergebnis.

2.2.1.2. Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist indiziert bei primär inoperablen Tumoren oder wenn nach inkomplettier chirurgischer Entfernung eine Nachexzision nicht durchgeführt werden kann. Auch Rezidivtumore können einer Strahlentherapie zugeführt werden, sollte keine Möglichkeit der R0-Resektion bestehen.

Insbesondere bei älteren Patienten stellt die Radiatio eine Alternative zur Exzision dar, falls ein operativer Eingriff abgelehnt wird oder der Patient aufgrund von Vorerkrankungen nicht operabel ist. Die Rezidivraten entsprechen etwa denen der konventionellen operativen Therapie (Silverman et al. 1992a).

Je nach Tumorgröße und Lokalisation wird neben dem sichtbaren Tumor ein Sicherheitssaum von 5 bis 15 mm mitbestrahlt. In der Regel werden Röntgenweichstrahlen oder schnelle Elek-

tronen eingesetzt. Die Einzeldosis beträgt abhängig von der Tumorausdehnung und der Entfernung zu strahlenempfindlichen Strukturen zwischen 1,8 und 5 Gy. Pro Woche erfolgen drei bis sechs Behandlungen. Bei postoperativer Radiatio wird eine Gesamtdosis zwischen 40 und 60 Gy appliziert, bei Primärtherapie bis zu 70 Gy (Griep et al. 1995).

Treten die BCC im Rahmen hereditärer Syndrome auf, ist eine Strahlentherapie kontraindiziert.

2.1.3.2. Kryotherapie

Kleine und oberflächliche BCC können mittels Kryotherapie behandelt werden. Die Kryotherapie mit flüssigem Stickstoff wird bei -196 °C im Spray- oder offenen Kontaktverfahren durchgeführt (Hauschild et al. 2008). Die Ergebnisse sind bei Einhaltung entsprechender Sicherheitsabstände denen der konventionellen Chirurgie vergleichbar (Rowe et al. 1989). Wie bei allen destruierenden Verfahren fehlt auch hier die histologische Kontrolle.

2.1.3.3. Immunologische Therapie

Eine weitere Alternative zur Therapie ausschließlich oberflächlicher Basaliome stellt die Behandlung mit dem Immunmodulator Imiquimod dar (Hauschild et al. 2008). Imiquimod ist ein Toll-like-Rezeptor 7-Agonist, der Makrophagen zur Produktion von Interferon alpha und anderen Zytokinen anregt. Diese bewirken eine lokale Entzündungsreaktion mit Erythem, Erosionen und Krustenbildung, wobei das Ausmaß dieser Reaktion mit der Abheilungsrate korreliert. Entsprechend den Zulassungsstudien empfiehlt die EMEA die tägliche Anwendung von Imiquimod 5% an fünf Tagen pro Woche über einen Zeitraum von insgesamt sechs Wochen. Die Abheilungsraten liegen bei knapp 80 %, so dass diese Therapieform eine Alternative zur operativen Sanierung oberflächlicher Basalzellkarzinome darstellt, die vor allem für Patienten mit multiplen Läsionen, z. B. im Rahmen eines Basalzellnävussyndroms, geeignet ist. Allerdings liegen derzeit noch keine Langzeitstudien vor, so dass hinsichtlich der Rezidivraten kein Vergleich zu den etablierten Therapieverfahren möglich ist. Ein Vorteil von Imiquimod ist die im Allgemeinen narbenlose Abheilung (Geisse et al. 2004).

2.1.3.4. Lokale Chemotherapie

Die lokale Chemotherapie mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil wird ebenso wie Imiquimod meist zur Behandlung multipler oberflächlicher Basalzellkarzinome eingesetzt. 5-Fluorouracil wird als 1 - 5-prozentige Zubereitung täglich über 4-6 Wochen angewandt. Nach etwa 1-2 Wochen zeigt sich an den betroffenen Stellen eine Entzündungsreaktion. Zwar wirkt es relativ selektiv auf die tumorbefallenen Areale, es können aber auch auf gesunder Haut Irritationen auftreten (Tsuji et al. 1993). Diese sind jedoch in der Regel milder ausgeprägt als bei der Behandlung mit Imiquimod. Die Abheilungsraten liegen bei etwa 90%, das kosmetische Ergebnis ist meist zufriedenstellend (Gross et al. 2007).

2.1.3.5. Photodynamische Therapie

Bei der photodynamischen Therapie wird das Tumorgewebe nach topischer Applikation photosensibilisierender Substanzen mit Licht aus dem sichtbaren Wellenlängenbereich bestrahlt. Als Photosensibilisatoren werden Hämatoporphyrinderivate wie 5-Aminolävulinsäure (ALA) und Methyl-Aminolävulinsäure (MAL) eingesetzt. Es kommt zur Bildung von Protoporphyrin IX, das vor allem in Tumorzellen akkumuliert. Die nachfolgende Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge, in der Regel 580 bis 700 nm, bewirkt eine photodynamische Reaktion, bei der reaktive Sauerstoffspezies, insbesondere Singulett-Sauerstoff, entstehen. Deren immunmodulierende und zytotoxische Effekte führen schließlich zur Zerstörung des Tumorgewebes.

Mit dieser Methode können sehr gute kosmetische Ergebnisse erzielt werden. Nachteilig sind die fehlende histologische Kontrolle sowie die geringe Eindringtiefe, die den Einsatz der photodynamischen Therapie auf oberflächliche Basalzellkarzinome beschränkt. So liegen die Remissionsraten für oberflächliche Basalzellkarzinome bei 87 %, für noduläre hingegen nur bei 53 % (Marmur et al. 2004; Morton et al. 2002).

Die mittels PDT erzielten Abheilungsraten oberflächlicher BCC sind den durch Kryotherapie erreichten vergleichbar, wobei mittels PDT bessere kosmetische Resultate erreicht werden (Basset-Seguin et al. 2008; Wang et al. 2001). Besonders geeignet ist die PDT für die simultane Behandlung multipler oberflächlicher BCC (Babilas et al. 2010).

2.1.4. Prognose

Die Heilungsraten nach Therapie primärer BCC werden mit 95 – 99% angegeben, für Rezidivtumoren mit 90%. Prognostisch relevant sind klinische Tumorgröße, Lokalisation, histologischer Typ, histologische Tiefenausdehnung und therapeutischer Sicherheitsabstand.

Das Basalzellkarzinom wächst im Zeitraum von Monaten bis Jahren. Bei längeren Verläufen treten Ulzerationen auf (Ulcus rodens). Werden tieferliegende Gewebestrukturen zerstört, spricht man vom Ulcus terebrans. Letale Verläufe treten infolge von Blutungen, Infektionen oder zentralnervösen Komplikationen auf, wie sie bei Einwachsen des Tumors in Schädelkalotte oder Augenhöhle möglich sind.

Metastasen treten nur bei etwa 0,003 – 0,1% aller BCC auf. Meist handelt es sich hierbei um große, ulzerierte, tief infiltrierende Rezidivtumoren. Am häufigsten metastasiert das BCC in Lymphknoten, Lunge und Knochen. Die Überlebenszeit liegt nur selten über 18 Monaten (Robinson, Dahiya 2003).

2.3. Mikrographisch kontrollierte Chirurgie (mikroskopisch kontrollierte Chirurgie, MKC)

Die MKC hat die vollständige Entfernung von Hauttumoren unter größtmöglicher Schonung des umgebenden gesunden Gewebes zum Ziel.

Gerade im Gesichtsbereich können Hauttumore aufgrund ihrer Lokalisation oft nicht primär mit größerem Sicherheitsabstand exzidiert werden. Um in diesen Fällen eine sichere R0-Resektion mit akzeptablem kosmetischem Ergebnis zu erreichen, wird hier die mikrographische Chirurgie angewandt. Bei diesem Verfahren wird der Tumor den klinischen Tumorgrenzen folgend exzidiert. Nach topografischer Markierung des Präparats erfolgt die lückenlose histologische Aufarbeitung und Untersuchung der Schnittränder. Etwaige Tumorreste können so exakt lokalisiert und gezielt nachexzidiert werden. Erst bei histologisch gesicherter R0-Resektion wird der Defekt verschlossen.

Die unterschiedlichen Methoden der mikrographischen Chirurgie unterscheiden sich durch die Operationstechnik und die Art der histologischen Aufarbeitung.

2.3.1. Mohs Surgery

Der Begriff “Microscopically Controlled Surgery” wurde von Frederic Edward Mohs geprägt, der im Jahr 1941 zunächst die Chemochirurgie mit präoperativer in-situ-Fixierung des Tumors einführte: Vor der Exzision wurde das Tumorgewebe zur Permeabilitätssteigerung mit Di- oder Trichloressigsäure behandelt und über Nacht mit einer Zinkchlorid-Paste fixiert (Mohs 1947). Anschließend erfolgte die histopathologische Aufarbeitung und Untersuchung der Schnittränder.

Da dieses Vorgehen mit starken Schmerzen verbunden war, wurde es in den Siebzigerjahren durch die Exzision in Lokalanästhesie und anschließende histologische Aufarbeitung im Kryostatschnellschnittverfahren abgelöst (Tromovitch, Stegeman 1974).

Der Unterschied zu anderen Methoden der MKC besteht vor allem in der Schnittführung: Zunächst wird der exophytische Anteil des Tumors tangential exzidiert oder kürtiert. Das verbleibende Tumorgewebe wird dann schüsselförmig exzidiert, wobei der Neigungswinkel des Skalpells zur Hautoberfläche 45 ° beträgt. Man erhält so bei kreisförmiger Schnittführung ein flaches kegelförmiges Exzidat. Um die topografische Zuordnung der Schnittflächen zu gewährleisten, werden diese farbig oder durch kleine seitliche Einschnitte markiert. Vor der histologischen Aufarbeitung werden Tumore, die größer als 2 cm sind, in mehrere Segmente geteilt.

Bei der Einbettung drückt man das Gewebe so auf eine Gefrierplatte auf, dass basale und laterale Schnittränder in einer Ebene zu liegen kommen. Der Block wird dann horizontal von der Schnittfläche her aufgeschnitten. So werden die dreidimensionalen Schnittränder in zweidimensionalen histologischen Schnitten vollständig dargestellt. Die histopathologische Beurteilung wird in der Regel direkt vom Operateur übernommen. Kann in den Schnitträndern noch Tumorgewebe nachgewiesen werden, wird unmittelbar entsprechend der Markierung nachexzidiert. Dieses Vorgehen wird wiederholt, bis die Schnittränder tumorfrei sind.

Die histologische Aufarbeitung muss von speziell geschultem Laborpersonal durchgeführt werden. Wird die Einbettung des Gewebes und die Anfertigung der Schnitte nicht exakt durchgeführt, werden die Schnittränder des Exzidats nur unvollständig abgebildet, was zu einer Verfälschung der histopathologischen Resultate führen kann. Aufgrund der Komplexität des Verfahrens bleibt diese Methode der MKC spezialisierten Zentren vorbehalten und wird heute vor allem in den USA praktiziert (Löser et al. 2010).

2.3.2. Münchner Methode

Diese Methode wurde in den 1970er Jahren von Burg und Konz entwickelt und ist durch die horizontale Schnittführung bei der histologischen Aufarbeitung des Gewebes gekennzeichnet: Der Tumor wird - wie bei anderen dermatochirurgischen Eingriffen - so exzidiert, dass man ein im Idealfall annähernd zylinderförmiges Gewebestück erhält, das Epidermis, Dermis und Subkutis enthält. Die topographische Orientierung wird durch Anfertigung einer Schema-zeichnung und Farbmarkierung der Schnittränder gewährleistet.

Anschließend werden beginnend an der Basis des Präparates, also in der Subkutis, parallel zur Hautoberfläche verlaufende horizontale Kryostatschnitte im Abstand von etwa 150 bis 200 µm angefertigt. Auf diese Weise wird der komplette Tumor bis zur Epidermis aufgearbeitet. Bei der histopathologischen Untersuchung kann so der gesamte Tumor in seinem dreidimensionalen Wachstumsverhalten beurteilt werden. Reichen in einem der Schnitte Tumorzellen bis an den Rand des Präparats oder sind Tumorausläufer im untersten Schnitt an der Basis des Präparates nachweisbar, muss eine Nachexzision an der entsprechenden Stelle angeschlossen werden. Im Gegensatz zu den anderen Verfahren der MKC, bei denen nur die Schnittränder beurteilt werden, ist hier die Begutachtung einer Vielzahl von Schnitten erforderlich. Überschreitet der Tumordurchmesser eine Ausdehnung von 2,5 cm – dies entspricht dem Durchmesser des Kryostaten – muss das Präparat geteilt werden, wodurch sich die Anzahl der zu beurteilenden Schnitte weiter erhöht. Die Beurteilung der Epidermis ist nur begrenzt möglich, da sie in den oberflächennahen Schnitten in der Regel nur teilweise zur Darstellung kommt. Vorteilhaft ist wie bei allen Gefrierschnitttechniken die Möglichkeit des zeitnahen Wundverschlusses noch am Tag der Exzision.

Die Beurteilung der horizontalen Schnitte bedarf besonderer Erfahrung. Die Abgrenzung des Tumorgewebes von quer geschnittenen Follikeln gestaltet sich oft schwierig. Im Gegensatz zur Mohs-Technik wird die Einordnung unklarer Strukturen jedoch durch die Einbeziehung weiterer Schnittstufen in die Diagnostik erleichtert (Boztepe et al. 2004; Kopke, Konz 1995).

2.3.3. Randstreifen-Methode (3D-Histologie)

Bei diesem Verfahren wird der Tumor wie bei der Münchener Methode zylinderförmig exzidiert. Nach Fadenmarkierung des kranialen Pols wird durch einen zirkulären Schnitt der gesamte Rand des Präparates abgetrennt und in mehrere etwa gleich große Abschnitte geteilt („Tübinger Torte“). Diese Gewebestücke enthalten jeweils Epidermis, Dermis und Fettgewe-

be. Die Schnittführung erfolgt nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung parallel zur äußeren Schnittfläche. Zur Beurteilung der Tiefe des Präparates wird wie bei der Münchener Methode der Schnitt parallel zur Hautoberfläche durch die Basis des Tumors geführt (Kopke, Konz 1995).

Bei kleinen Tumoren bis zu einer Größe von 2 cm kann eine Variante der Randstreifenmethode, die sog. „Muffin-Technik“ angewandt werden: Hierbei wird durch einen zirkulären Einschnitt der Rand des Präparates nur teilweise abgetrennt. Die Tumormitte wird unter Belassen der Basis herausgetrennt. Der verbleibende Rand wird mehrfach von der Epidermis Richtung Subkutis eingeschnitten, so dass die seitlichen Schnittränder nach außen geklappt und mit der Basis des Tumors in eine Ebene gebracht werden können. Durch die Anfertigung eines einzigen Schnittes können so - ähnlich der Mohs Surgery – alle seitlichen sowie der basale Schnittrand beurteilt werden (Möhrle, Breuninger 2006).

Da hier nur die ersten Schnitte relevant sind, müssen diese sicher gelingen. Es erfolgt keine vollständige Aufarbeitung und Darstellung des Tumors. Die zusätzliche Anfertigung eines Querschnitts durch das Zentrum des Tumors kann die diagnostische Einordnung erleichtern. Neben der Paraffineinbettung ist auch die Aufarbeitung im Kryostatverfahren denkbar.

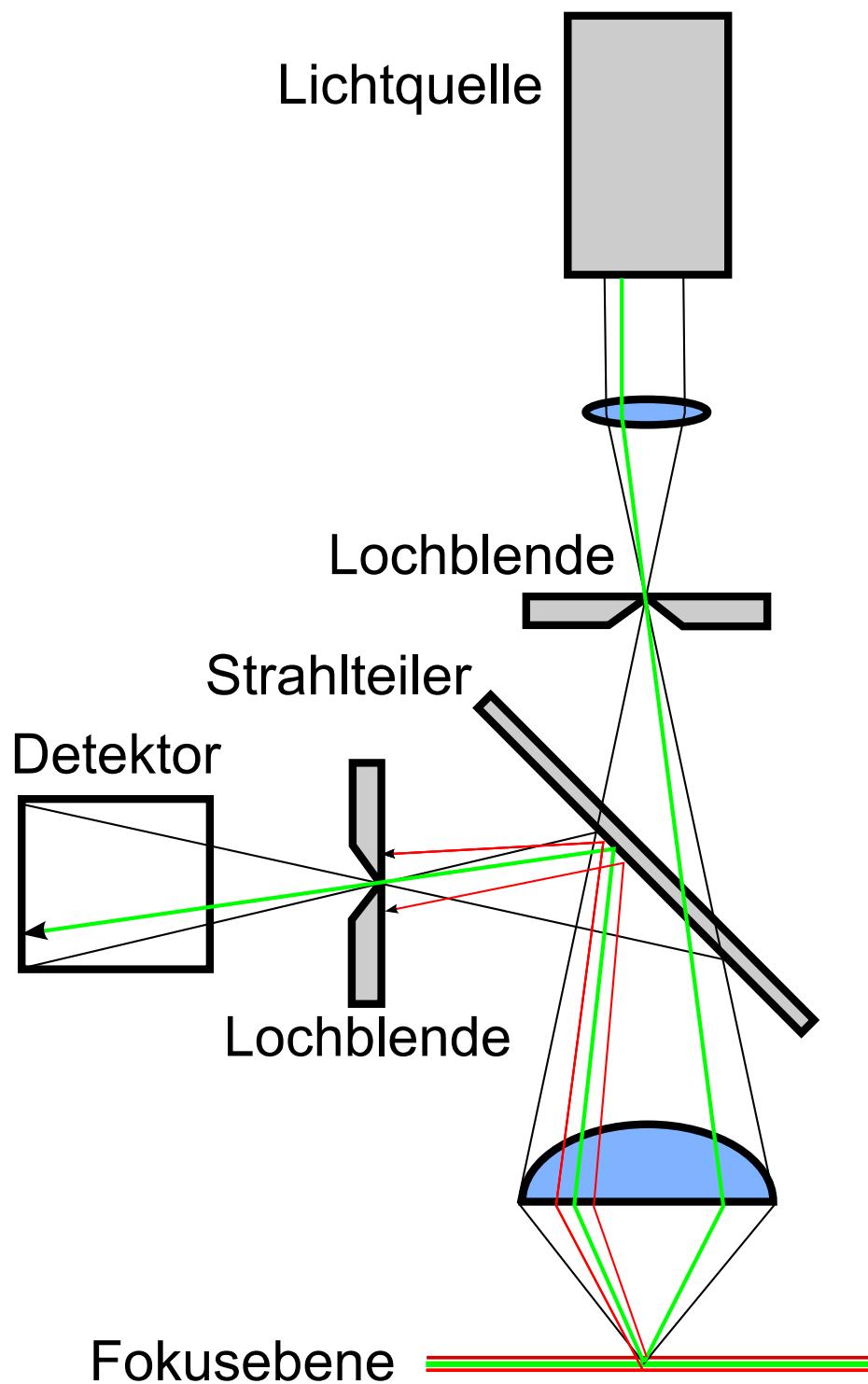
2.4. Konfokale Lasermikroskopie

2.4.1. Technik

Das erste konfokale Mikroskop wurde 1957 von Minsky entwickelt. Das konfokale Prinzip besagt, dass Lichtquelle und Detektor einen gemeinsamen Brennpunkt besitzen.

Die Probe befindet sich in diesem Brennpunkt. Das aus der Fokusebene reflektierte Licht wird dann durch eine Lochblende punktgenau auf dem Detektor abgebildet (Abb. 1, grüner Strahl). Die von ober- und unterhalb der Fokusebene stammenden Anteile des reflektierten Lichts werden unterdrückt (Abb. 1, roter Strahl).

Abbildung 1: Aufbau eines konfokalen Mikroskops



Das zu untersuchende Gewebe wird senkrecht zur optischen Achse Punkt für Punkt in zwei Dimensionen gescannt, so dass ein virtuelles schwarz-weißes Schnittbild erzeugt wird („optical sectioning“).

Als Lichtquelle werden Laser unterschiedlicher Wellenlängen verwendet, im Falle der Reflexionsmikroskopie meist ein Infrarotlaser der Wellenlänge 830 nm (Rajadhyaksha et al. 1995; Nehal et al. 2008).

Der Kontrast wird durch die unterschiedlichen Brechungsindizes der Zellen, Organellen und Mikrostrukturen erzeugt und kann durch Vorbehandlung mit verdünnten Säurelösungen verstärkt werden. Diese bewirkt durch Kompaktierung des Chromatins eine Zunahme der Reflexion, so dass Zellkerne hell zur Darstellung kommen („acetowhitening“) (Abb. 3). Ohne Behandlung mit Säurelösung erscheinen die Nuklei dunkel (Rajadhyaksha et al. 2001) (Abb. 2).

Abbildung 2: Haarfollikel, Map 1x1 mm nach Vorbehandlung mit NaCl 0,9%

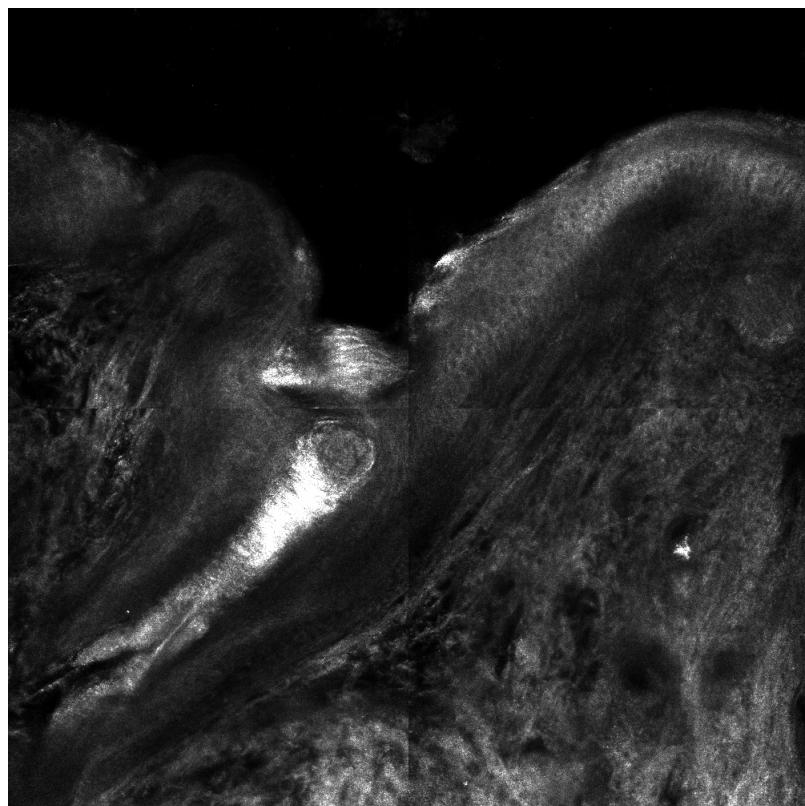
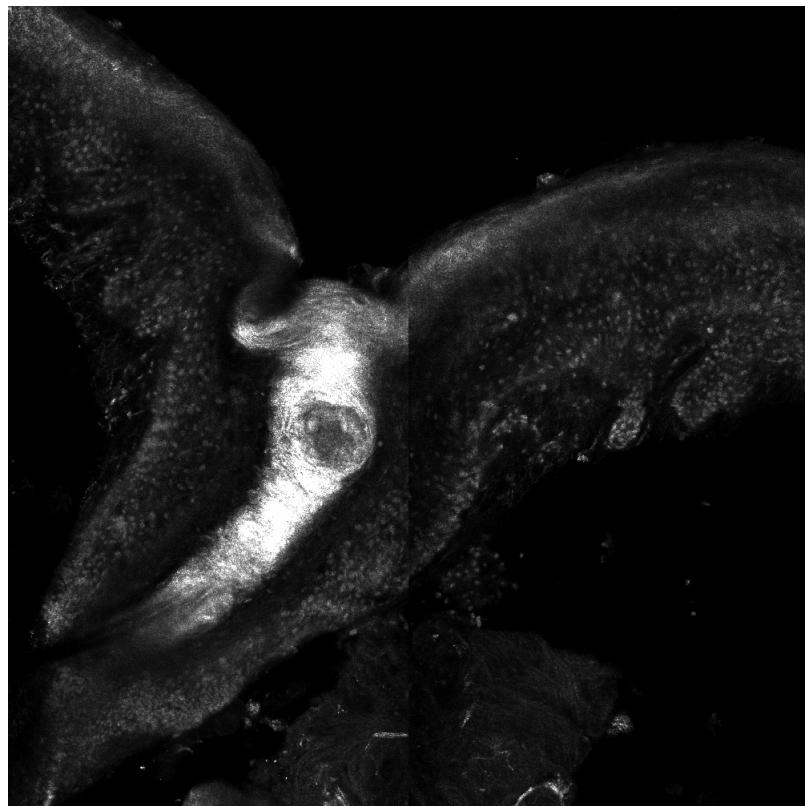


Abbildung 3: Haarfollikel, Map 1x1 mm nach Vorbehandlung mit Zitronensäure 10%



2.4.2. Anwendungsgebiete in der Dermatologie

2.4.2.1. In vivo

Seit einigen Jahren wird in der klinischen dermatologischen Diagnostik ergänzend zur Auflichtmikroskopie auch die In-vivo-CLSM eingesetzt, die einen Einblick in die lebende Haut auf zellulärer Ebene ermöglicht. Dabei können in Echtzeit Schnittbilder in verschiedenen Tiefen parallel zur Hautoberfläche erzeugt werden. Die maximale Eindringtiefe liegt bei etwa 350 µm, so dass bei dünner Epidermis die papilläre Dermis dargestellt werden kann. Die laterale Auflösung beträgt je nach Gewebe 0,4–1,25 µm.

Da das Acetowhitening in der In-vivo-CLSM nicht durchführbar ist, kommen die Zellkerne hier dunkel zu Darstellung. Hell erscheinen dagegen Melanin, somit auch das Zytoplasma von Melanozyten, und Kollagen. Der Brechungsindex von Keratin ist etwas niedriger, so dass das Zytoplasma von Keratinozyten dunkler imponiert (Rajadhyaksha et al. 1995; Eichert et al. 2010).

Derzeit wird die CLSM zur ergänzenden Diagnostik von Hauttumoren wie Naevi, malignen Melanomen, spinozellulären Karzinomen, aktinischen Keratosen und Basalzellkarzinomen eingesetzt (Eichert et al. 2010; Ruocco et al. 2004). Aufgrund der starken Kontrastierung melanozytärer Veränderungen kommt der CLSM besondere Bedeutung in der Diagnostik pigmentierter Hautveränderungen zu. Zur Abgrenzung atypischer Nävi vom malignen Melanom kann die CLSM ergänzend zur Auflichtmikroskopie eingesetzt werden (Pellacani et al. 2005). Neben der präoperativen Diagnosesicherung ist auch die Verlaufskontrolle nach konservativer Therapie z. B. mittels Imiquimod von Interesse (Goldgeier et al. 2003). Auch zur Diskriminierung hypopigmentierter Hautveränderungen erwies sich diese Technik als nützlich (Xiang et al. 2010). Weitere Arbeiten befassen sich mit der Darstellung entzündlicher Hauterkrankungen wie allergischer Kontaktdermatitis, Psoriasis und diskoidem Lupus erythematoses mittels CLSM (González et al. 1999; Koller et al. 2009). Ferner kann die In-vivo-CLSM zur qualitativen und quantitativen Beobachtung dynamischer Prozesse der kutanen Mikrozirkulation eingesetzt werden (Altintas et al. 2009).

Die Festlegung diagnostischer Kriterien für die in vivo-CLSM ist derzeit noch Gegenstand zahlreicher Studien, so dass die „optische Biopsie“ mittels CLSM die Biopsie mit anschließender Histologie noch nicht ersetzen kann. Die Anwendung der In-vivo-CLSM ist auch durch die geringe Eindringtiefe von maximal 350 µm limitiert. Gerade bei hyperkeratotischen Hautveränderungen oder an Lokalisationen mit kräftigem Stratum corneum, wie z. B. Palmae und Plantae, sind nur oberflächliche Epidermisschichten beurteilbar (Eichert et al. 2010).

2.4.2.2. Ex vivo

Im Gegensatz zur In-vivo-CLSM ist die entsprechende Ex-vivo-Anwendung weit weniger etabliert. Weltweit sind derzeit nur sehr wenige Geräte im Einsatz. Der große Vorteil gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie von HE-Schnitten liegt in der Möglichkeit, Nativgewebe unmittelbar postoperativ ohne aufwendige Vorarbeiten beurteilen zu können. Die für die Lichtmikroskopie erforderlichen Aufarbeitungsschritte wie Färben, Fixieren, Einbetten und Schneiden entfallen. Daher ist diese neue Technologie insbesondere für die Anwendung im Rahmen der Schnellschnittdiagnostik und MKC interessant: Durch eine Verkürzung der histologischen Diagnostik könnte das gesamte Vorgehen deutlich beschleunigt werden. Chung et al. zeigten, dass konfokale Bilder von gesunder Haut und von BCC gut mit lichtmikroskopischen Befunden übereinstimmen. In einer Vorabstudie verglichen sie konfokale Bilder von 92 BCC mit konventioneller Mohs Histopathologie und fanden in 69 Fällen eine positive

Korrelation. Sie konnten zeigen, dass diese neue Technologie zur Bewertung von Randschnitten in der Mohs Chirurgie angewandt werden kann. Sie kann die Gefrierschnitttechnik jedoch noch nicht ersetzen, da Schwierigkeiten in der Diagnostik von infiltrativen BCC oder kleinen Tumornestern bestehen (Chung et al. 2004).

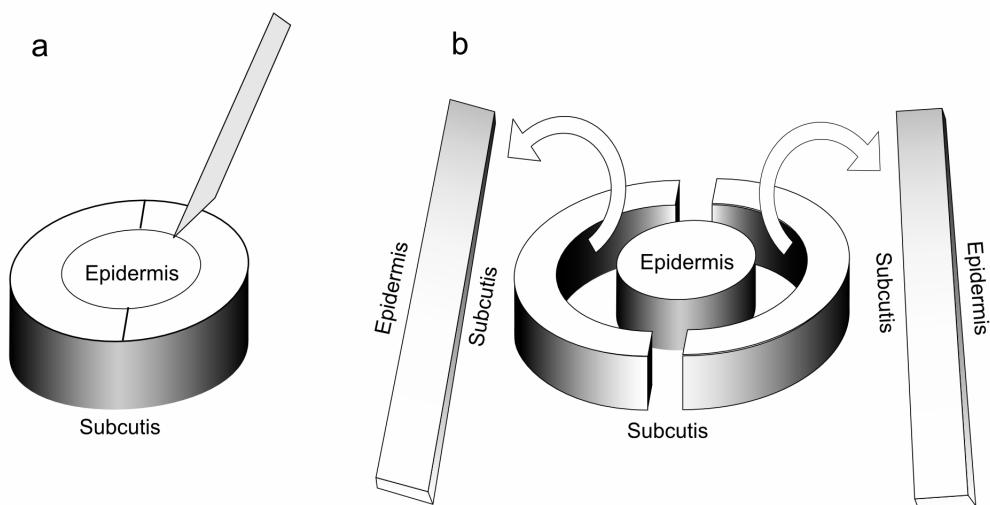
Im Gegensatz zur in Europa gebräuchlichen 3D-Histologie wurden die BCC in der in den USA üblichen Mohs Technik gewonnen und aufbereitet. Zur Anwendung der CLSM in der MKC lagen bislang keine Studien vor.

3. Material, Methoden

3.1. Materialgewinnung und Präparation

Die MKC wurde folgendermaßen durchgeführt: Der Tumor wurde en bloc exzidiert, so dass nahezu zylindrische Proben gewonnen wurden. Anschließend fertigten wir gemäß der Tübinger Randschnittmethode („Tübinger Torte“) Randschnitte an (Abb. 4).

Abbildung 4: Tübinger Randschnittmethode („Tübinger Torte“)



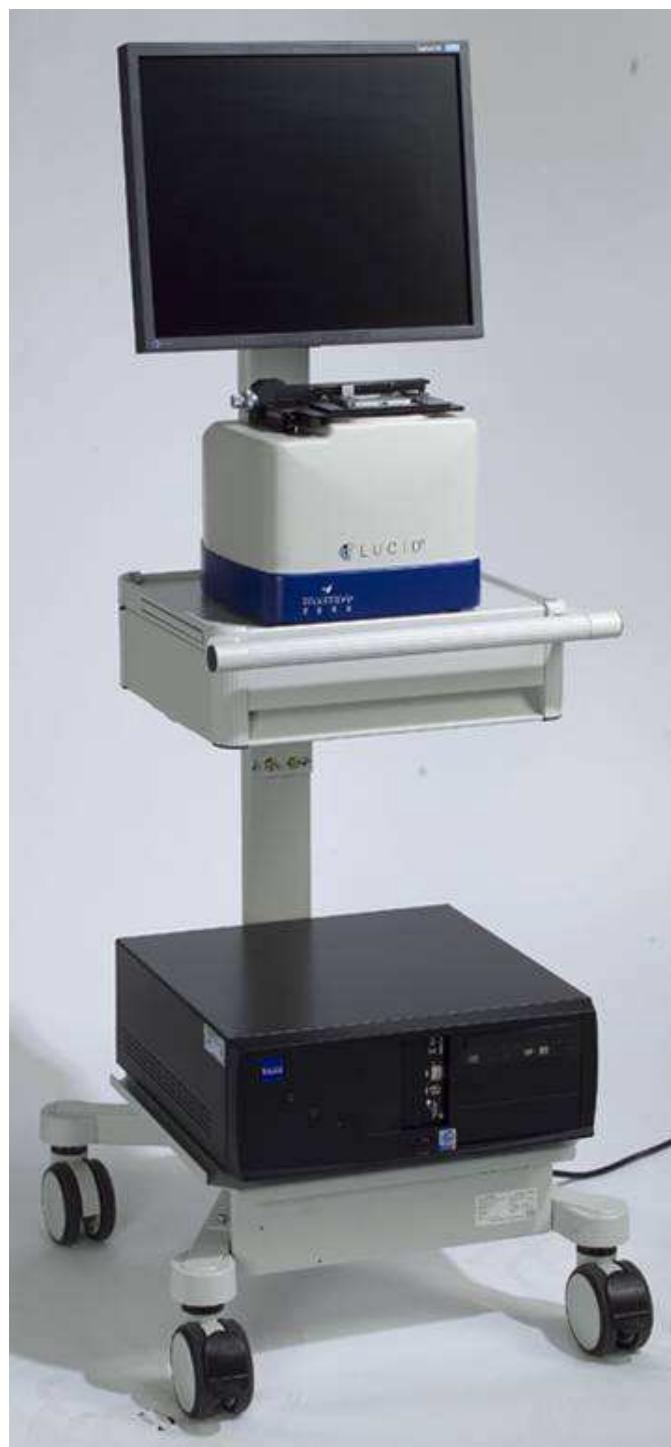
Nach der Untersuchung der Außenseiten dieser Randschnitte mittels konfokaler Mikroskopie wurden die Präparate der üblichen Routinediagnostik zugeführt, d. h. es wurden hämatoxylin- und eosingefärbte Gefrierschnitte angefertigt, die anschließend lichtmikroskopisch begutachtet wurden.

Die Unterseite der Präparate wurde ebenfalls zunächst mittels konfokaler Mikroskopie beurteilt, anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und von der Tiefe beginnend horizontal aufgeschnitten.

3.2. Konfokale Lasermikroskopie

Wir verwendeten ein handelsübliches konfokales Laserscanmikroskop (VivaScope 2500; Lucid Inc., Rochester NY) (Abb. 5).

Abbildung 5: Vivascope 2500

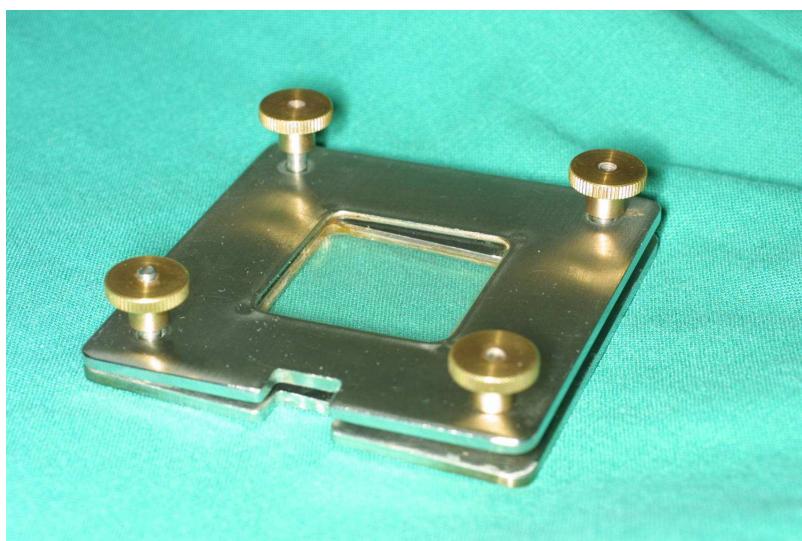


Als Lichtquelle diente ein Infrarotlaser der Wellenlänge 830 nm mit einer maximalen Leistung von 16 mW. Bei dem Objektiv handelte es sich um ein 30X Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 0,9. Es wird eine vertikale Auflösung von weniger als 5 μm erreicht. Die Eindringtiefe in das Gewebe beträgt 200-350 μm .

Zur Fixierung des Präparates standen zwei identische in Metall gefasste Glasplättchen zur Verfügung, von denen eines als Objektträger und eines als Deckplättchen diente. Beide waren

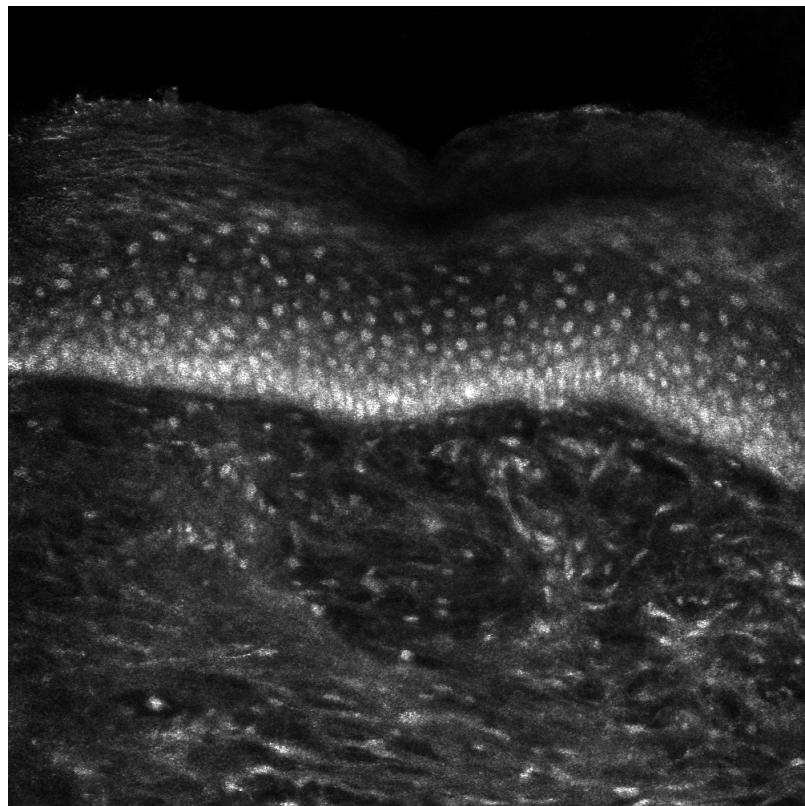
mittels zwei Metallklammern am Objekttisch zu befestigen. Initial beabsichtigten wir, gemäß der oben beschriebenen und in unserer Klinik routinemäßig durchgeführten Münchner Methode vorzugehen. Dazu wollten wir zunächst die seitlichen Schnittflächen mittels konfokaler Mikroskopie beurteilen. Wurden die seitlichen Ränder auf den Objektträger aufgebracht, war es jedoch aufgrund der oft starken Krümmung der Schnittflächen nicht möglich, die lateralen Ränder vollständig zu beurteilen. Auch die Befestigung der hochkant aufgestellten Präparate mit Hilfe o. g. Deckglases war kaum möglich, ohne das Präparat zu kippen oder quetschen. Verschiedene Versuche, das Gewebe seitlich mittels verschiedener Hilfsmittel abzustützen brachten nicht den gewünschten Erfolg, so dass wir uns dazu entschlossen, Randschnitte anzufertigen („Tübinger Torte“). Es zeigte sich jedoch, dass auch die so erhaltenen Proben häufig nicht komplett auf dem Objektträger zu liegen kamen, da durch die Befestigung des Deckglases mittels der zwei Metallklammern oft ein sehr unregelmäßiger Druck auf die Probe ausgeübt wurde. Stellenweise wurde das Gewebe zu stark gequetscht, häufig kam es auch zum Einschluss von Luftbläschen, was eine konfokale Bildgebung unmöglich machte. Diese Schwierigkeiten traten insbesondere bei Proben mit unregelmäßigen Schnitträndern auf. Schließlich entwickelten wir einen Objektträger, an dem das Deckglas mittels vier verstellbaren Schrauben befestigt wurde, was eine gleichmäßige Einstellung des Auflagedrucks auch bei Präparaten von sehr ungleichmäßiger Dicke ermöglichte (Abb. 6).

Abbildung 6: Objektträger



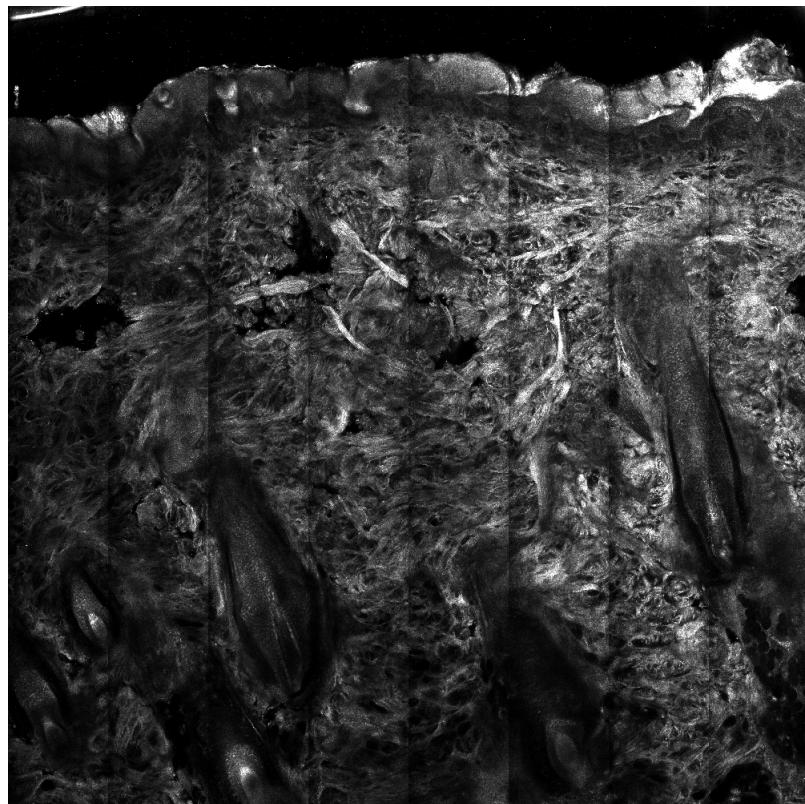
Als Immersionsmedium wurde Natriumchloridlösung 0,9 % verwendet. Das gescannte Bildfeld maß 500 x 500 µm (Abb. 7).

Abbildung 7: Bildfeld 500x500µm, Epidermis



Mit Hilfe eines Schrittmotors konnte der Objekttisch in XY-Richtung bewegt werden. Mittels der Vivascope Software wurden die so gewonnenen Einzelbilder von jeweils $500 \times 500 \mu\text{m}$ zu Übersichtsaufnahmen, sog. Viva Blocks zusammengefügt. Ein Mosaik aus 8×8 Bildern bildete einen $4 \times 4 \text{ mm}$ messendes Bildfeld ab (Abb. 8).

Abbildung 8: VivaBlock 4x4 mm



Die Aufnahme eines 4 x 4 mm Viva Block dauerte etwa 35 s. Blöcke mit geringerer Vergrößerung (bis zu 12 x 12 mm) erschienen nicht sinnvoll, vor allem weil sie zeitaufwändiger waren (bis zu 580 s pro Block) und kleinere Tumornester nicht identifiziert werden konnten. Nach Einstellung der Tiefe (Fokussierung) und Laserleistung (Helligkeit) nahmen wir das gesamte Präparat in Form von Viva Blocks der Größe 4 x 4 mm auf. Fielen in den Übersichtsaufnahmen suspektes Areale auf, wählten wir das entsprechende Einzelbild an und untersuchten die Lokalisation in höherer Vergrößerung (Abb. 9 u. 10).

Abbildung 9: Solides Basalzellkarzinom, Map 4x4 mm

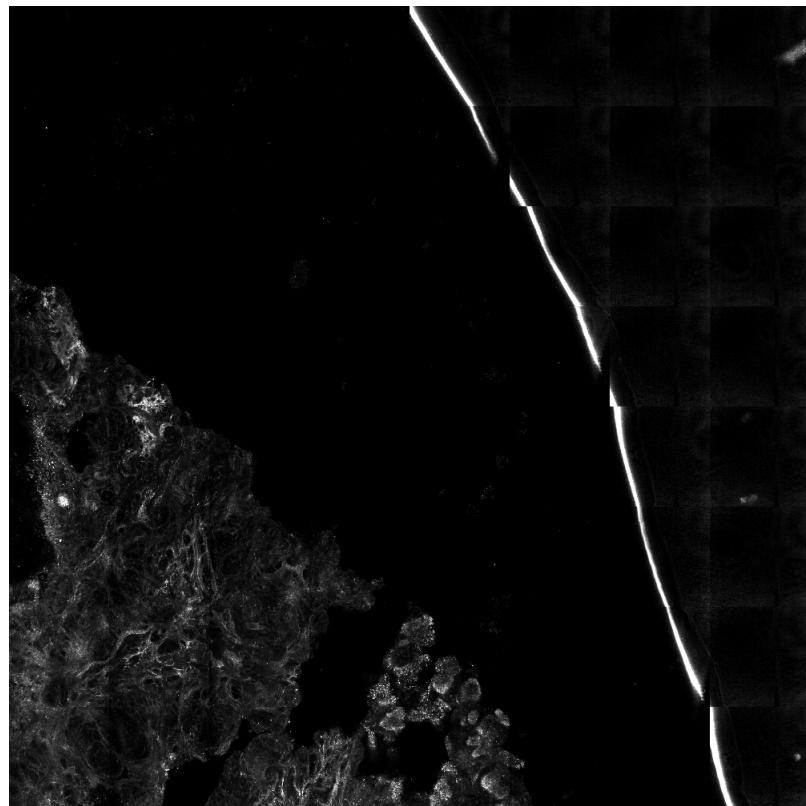
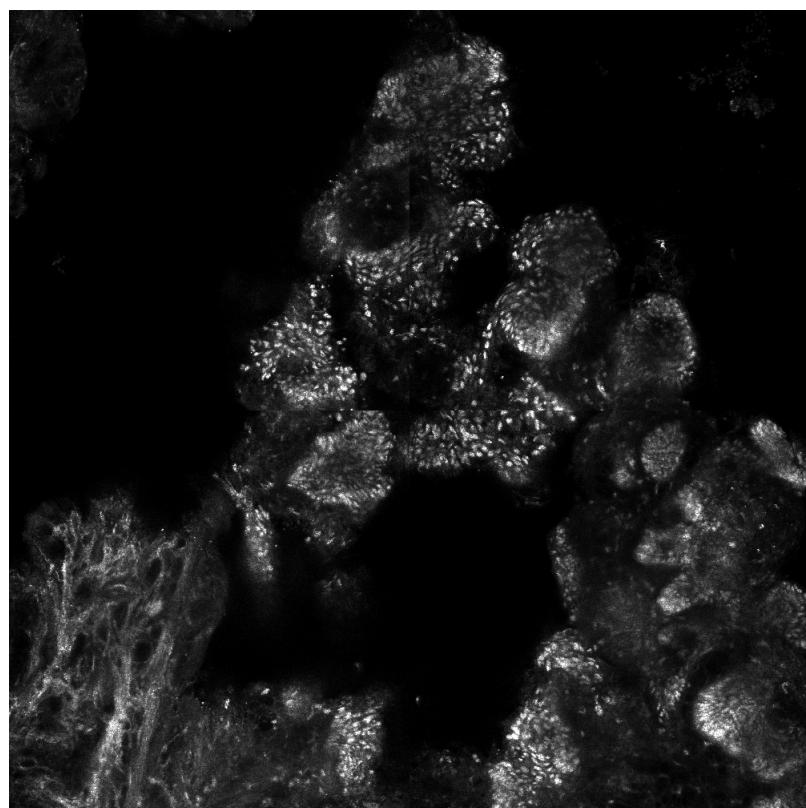


Abbildung 10: Solides Basalzellkarzinom, suspektes Areal in stärkerer Vergrößerung, Map 1,5x1,5 mm



Alle Bilder wurden digital im BMP Fileformat in einer Auflösung von 1000 x 1000 Pixel gespeichert, um die Befunde später mit den Ergebnissen der Lichtmikroskopie vergleichen zu

können. Die Software speicherte auch Untersuchungsparameter (Laserleistung..) und Kommentare im Textfileformat.

Da die in das VivaScope integrierte Software ein komfortables Handling der Bilder, wie z.B. den Vergleich mehrerer Bilder nebeneinander, nicht erlaubte, setzten wir eine handelsübliche Bilddatenbank ein (MediaDex®; Canto GmbH, Berlin). Ein selbst programmiertes Java Plugin verknüpfte die Datenbank mit der VivaScope Software.

3.3. Probenvorbehandlung

Die Proben wurden 60 s mit Zitronensäure 10% behandelt und anschließend mit Natriumchloridlösung 0,9 % gespült. Rajadhyaksha et al. wiesen im Vorfeld nach, dass nachfolgende Arbeitsschritte der konventionellen histopathologischen Diagnostik durch diese Vorbehandlung nicht beeinträchtigt werden (Rajadhyaksha et al. 2001).

Das vorbereitete Gewebe wurde anschließend wie oben beschrieben auf den Objektträger aufgebracht.

Nach der Beurteilung der Proben mittels konfokaler Mikroskopie wurde das Gewebe wie gewohnt für die konventionelle Histopathologie aufbereitet und lichtmikroskopisch begutachtet.

3.4. Strategie der Auswertung

Die konfokalen Befunde der Schnittländer wurden hinsichtlich des Vorhandenseins von Tumorresten untersucht. Waren Tumorreste in den Schnittländern nachweisbar, wurden diese als positiv bezeichnet, waren keine Tumorreste nachweisbar, als negativ. Nach entsprechender Aufarbeitung der Präparate erfolgte unabhängig von der konfokalen Befundung die konventionelle histopathologische Diagnostik. Abschließend verglichen wir beide Ergebnisse.

4. Ergebnisse

4.1. Morphologische Merkmale gesunder Haut in der konfokalen Mikroskopie

In den konfokalen Aufnahmen stellten sich die Zellkerne hell, das Zytoplasma dunkel dar. Stärker kontrastgebend als das Zytoplasma waren die kollagenen und elastischen Fasern der Dermis (Abb. 11, Abb. 12). Neben den unterschiedlichen Schichten der Epidermis waren auch Hautanhängsgebilde wie Haarfollikel (Abb. 13), Talgdrüsen (Abb. 14), ekkrine Schweißdrüsen (Abb. 15) und deren Ausführungsgänge gut abzugrenzen. Auch Blutgefäße (Abb. 16) und Muskelfasern (Abb. 17) kamen zur Darstellung. Insgesamt korrelierten die konfokalen Aufnahmen sehr gut mit den aus der Lichtmikroskopie bekannten Bildern (Abb. 18, Abb. 19).

Abbildung 11: Gesunde Haut, starke Kontrastierung der kollagenen und elastischen Fasern

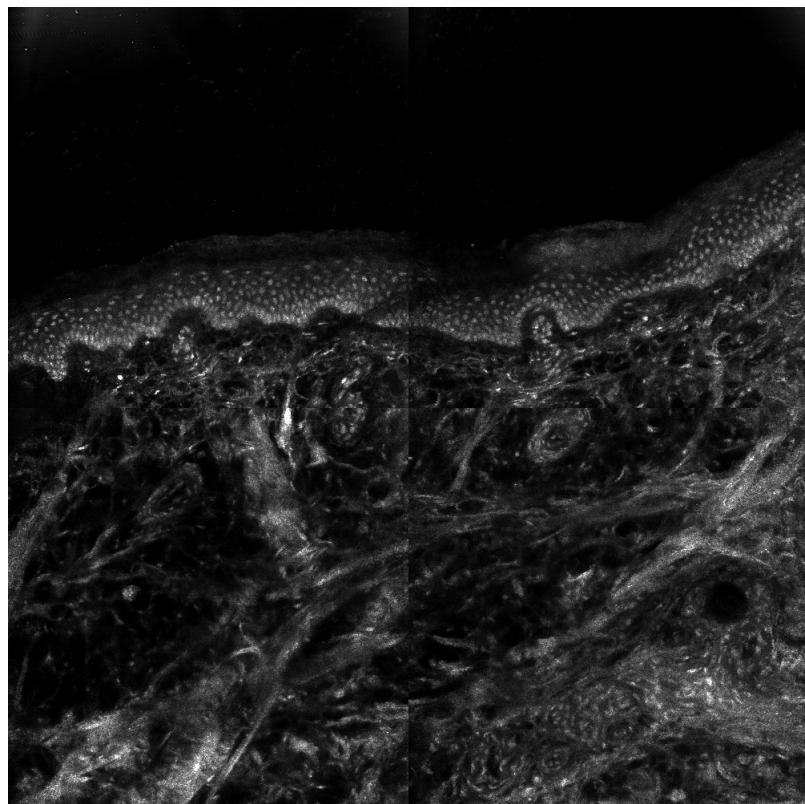


Abbildung 12: Altershaut mit aktinischer Elastose, Map 1,5x1,5 mm

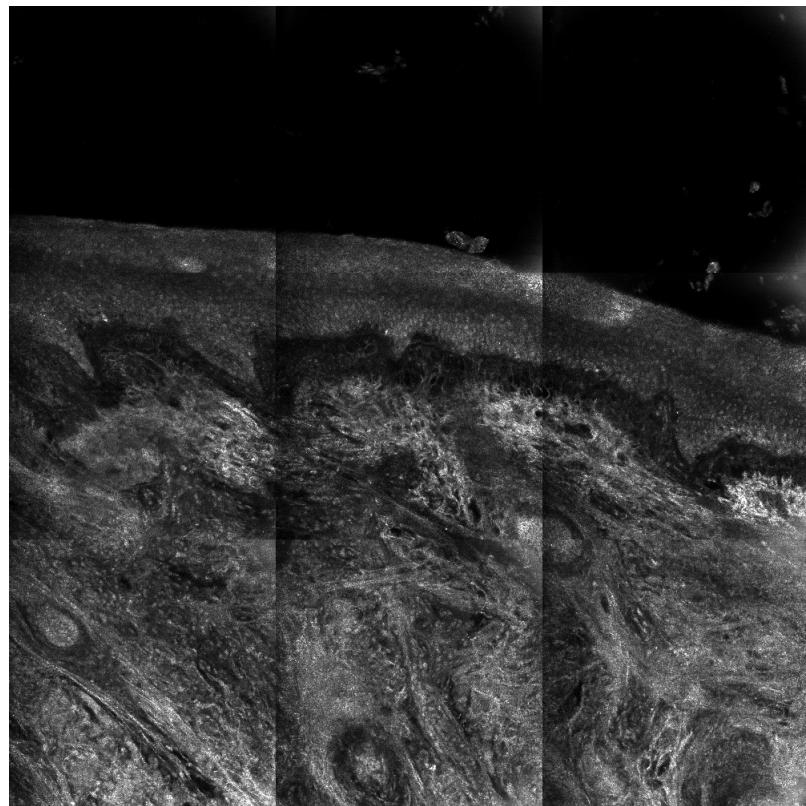


Abbildung 13: Normalhaut des Kapillitiums, Haarfollikel mit Talgdrüsen, Map 1,5x1,5 mm

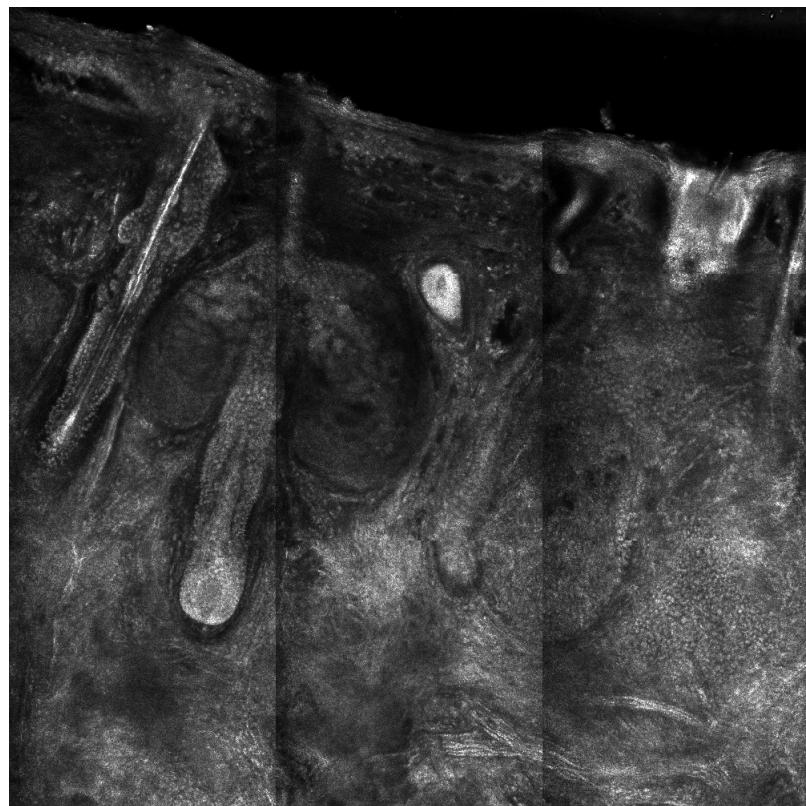


Abbildung 14: Talgdrüse, Detail 0,5x0,5 mm

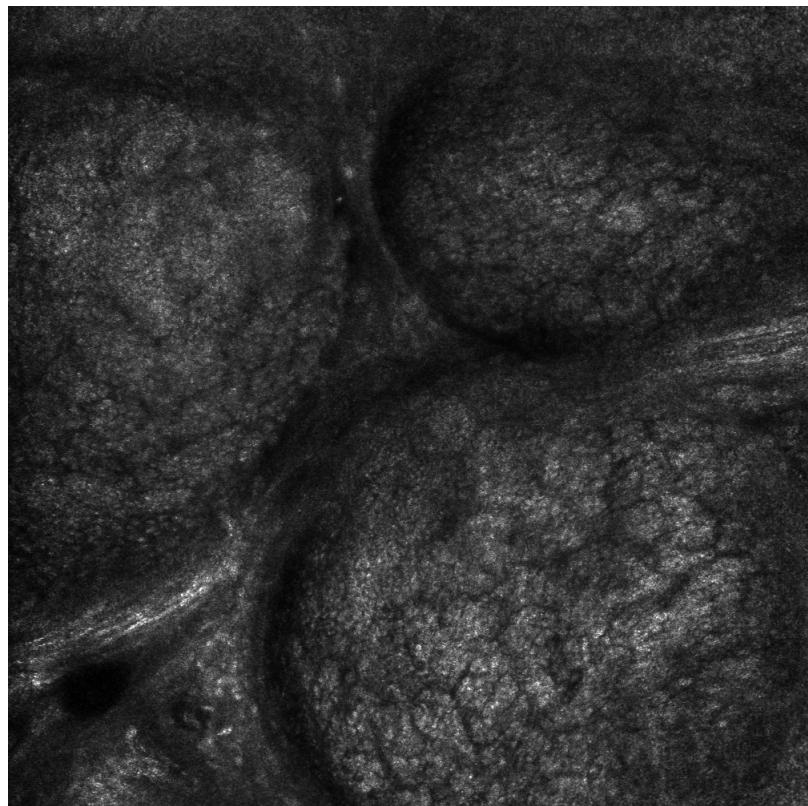


Abbildung 15: ekkrine Schweißdrüse, Detail 0,5x0,5 mm

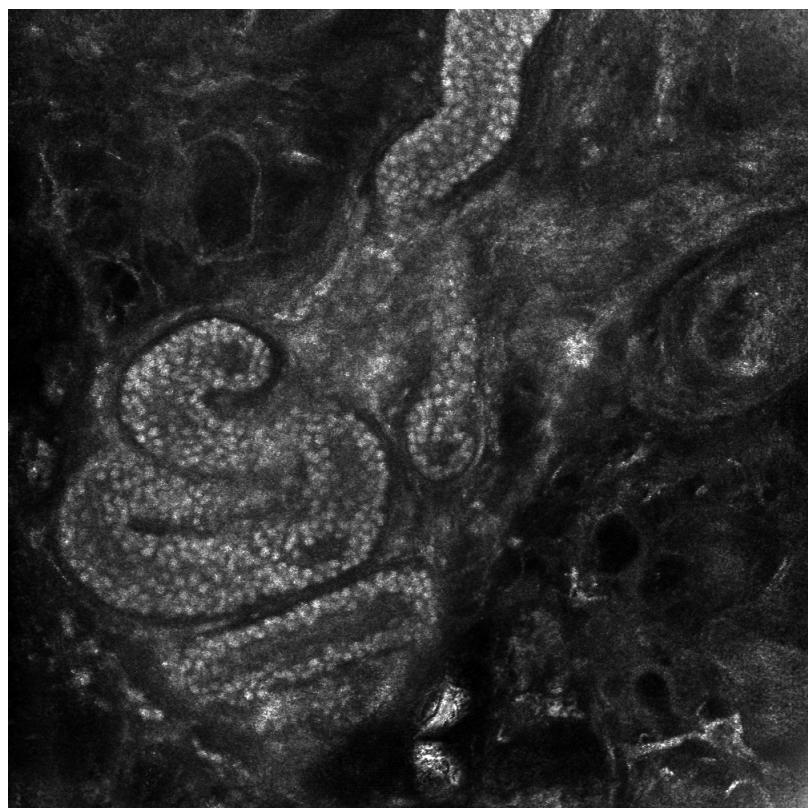


Abbildung 16: Gefäß, Detail 0,5x0,5 mm

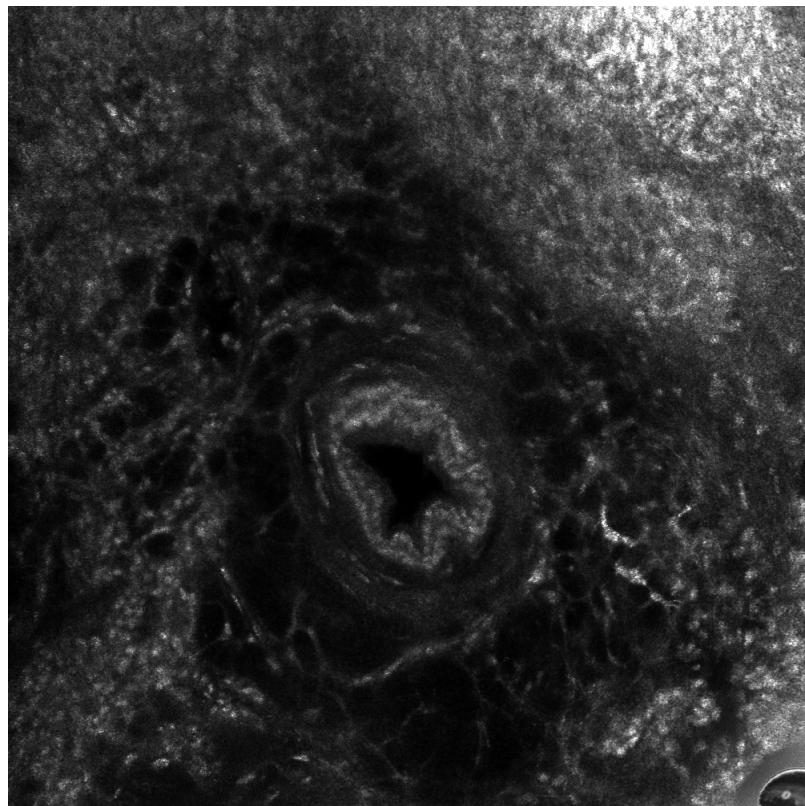


Abbildung 17: Muskulatur, Map 1x1 mm

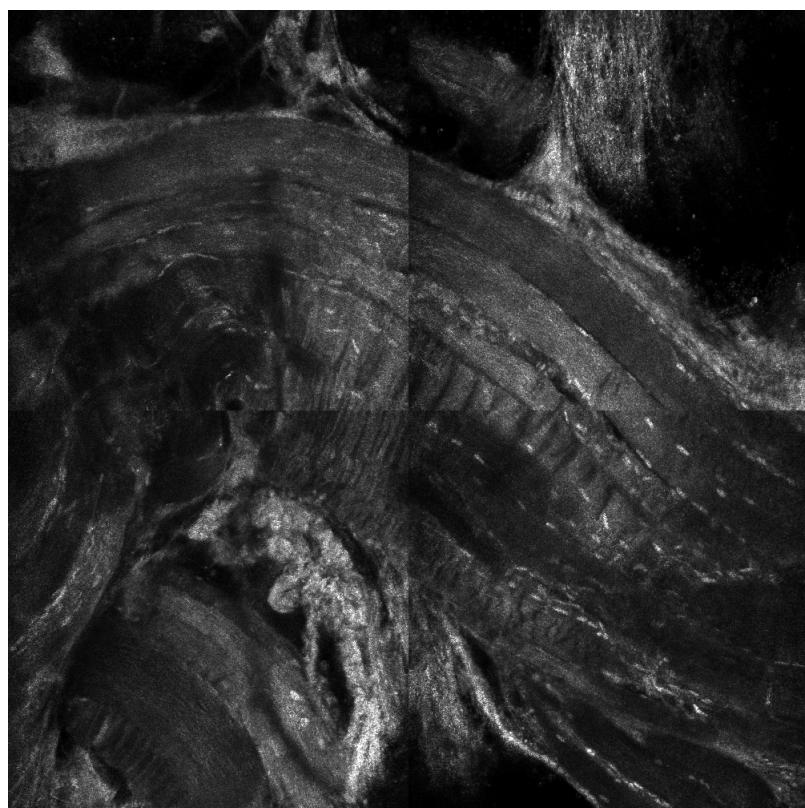


Abbildung 18: Gesunde Haut, CLSM

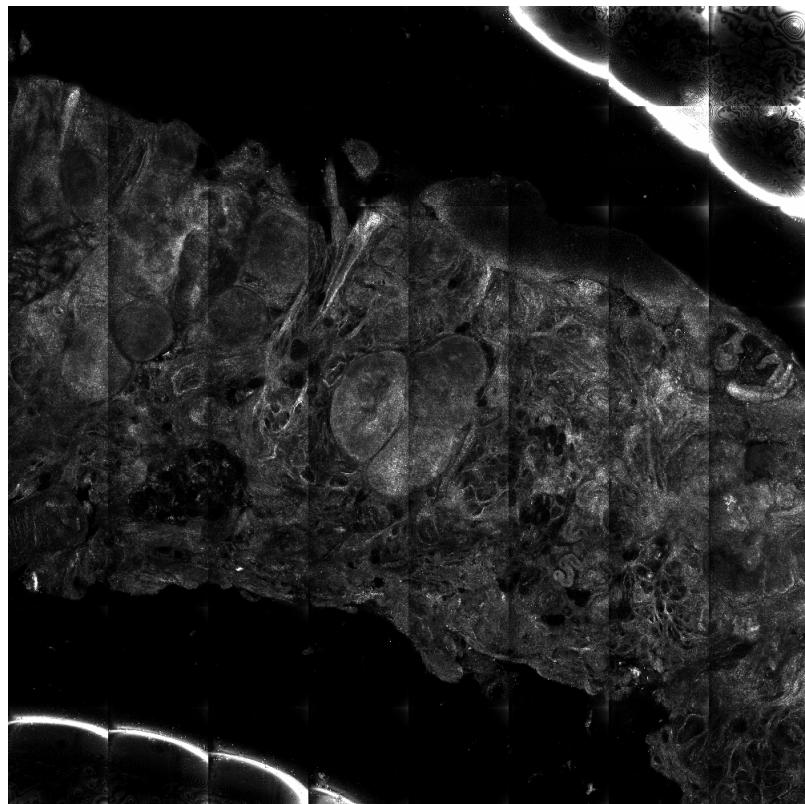
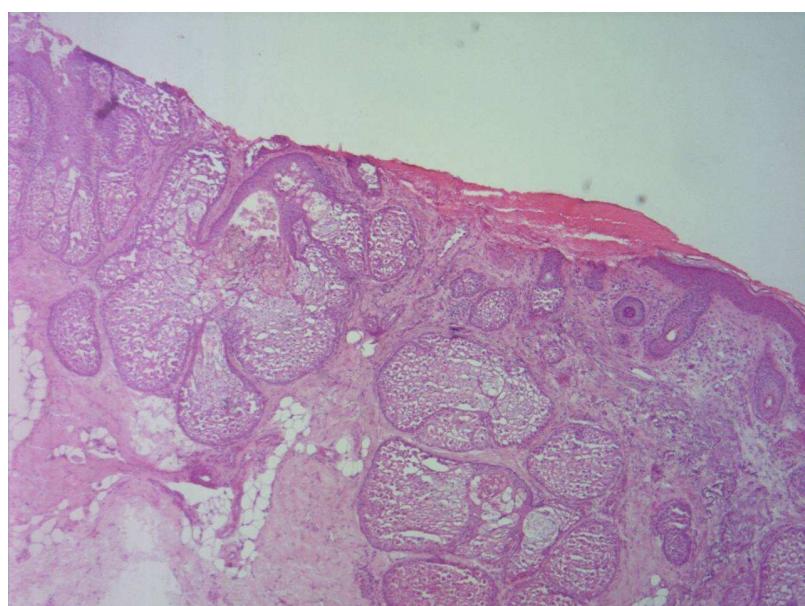


Abbildung 19: Gesunde Haut, konventionelle Lichtmikroskopie



4.2. Morphologische Merkmale des Basalzellkarzinoms in der konfokalen Mikroskopie

Die morphologischen Merkmale der BCC in den konfokalen Bildern entsprachen denen der konventionellen Histopathologie: Wir fanden scharf abgrenzbare Nester unregelmäßig angeordneter und dicht gepackter zytoplasmaarmer Tumorzellen, die sich im Randbereich palisadenartig anordnen. Die elongierten Zellkerne erscheinen hell. Die aus der Lichtmikroskopie bekannte und bislang als Artefakt gewertete peritumorale Spaltbildung war auch auf den konfokalen Aufnahmen erkennbar. (Abb. 20-26). Um Tumorzellen von anderen Strukturen unterscheiden zu können, musste die Untersuchungsebene manchmal dynamisch verändert werden.

Abbildung 20: Basalzellkarzinom mit elongierten Zellkernen, im Randbereich Palisadenstellung, peritumorale Spaltbildung. Detail 0,5x0,5 mm



Abbildung 21: Basalzellkarzinom mit elongierten Zellkernen, im Randbereich Palisadenstellung, peritumorale Spaltbildung. Map 1x1 mm



Abbildung 22: Basalzellkarzinom mit elongierten Zellkernen, im Randbereich Palisadenstellung, peritumorale Spaltbildung. Map 4x4 mm

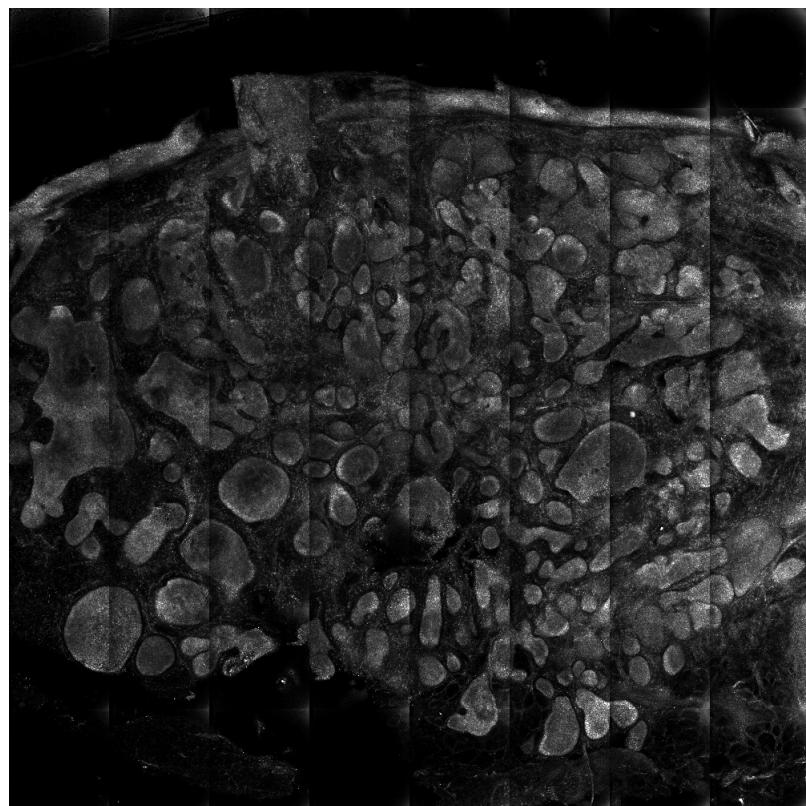


Abbildung 23: Basalzellkarzinom, CLSM

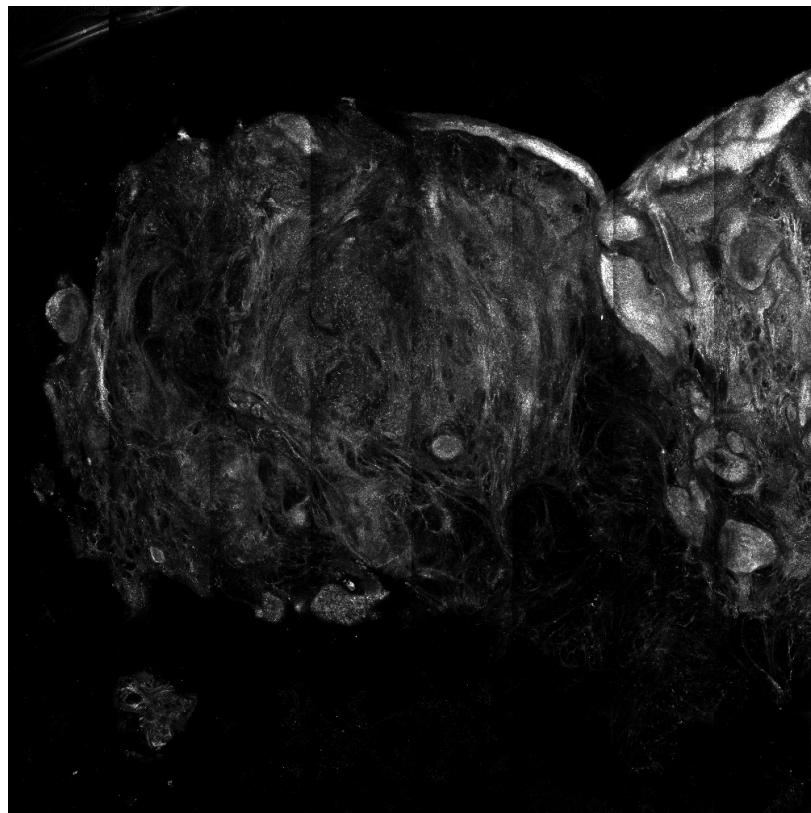


Abbildung 24: Basalzellkarzinom, konventionelle Lichtmikroskopie

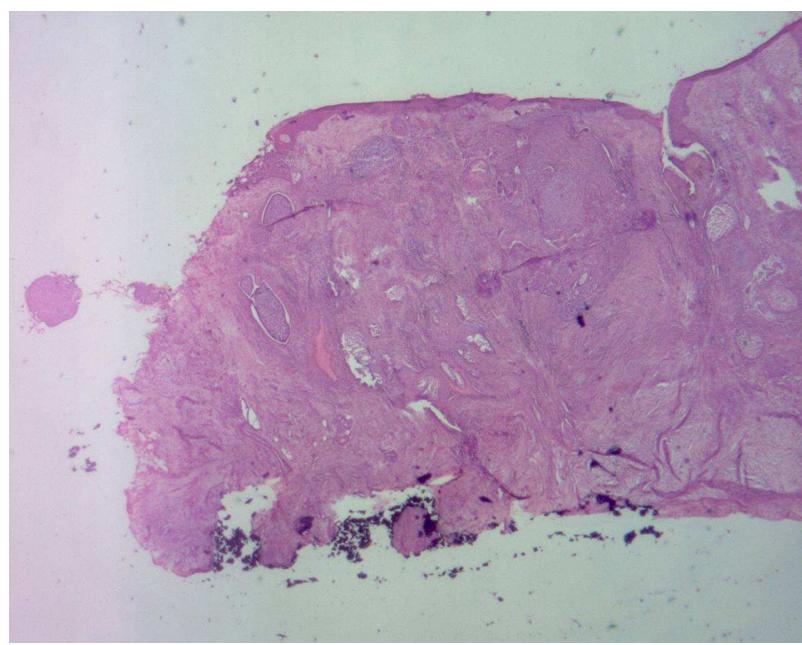


Abbildung 25: Basalzellkarzinom, CLSM, Detail 0,5x0,5mm

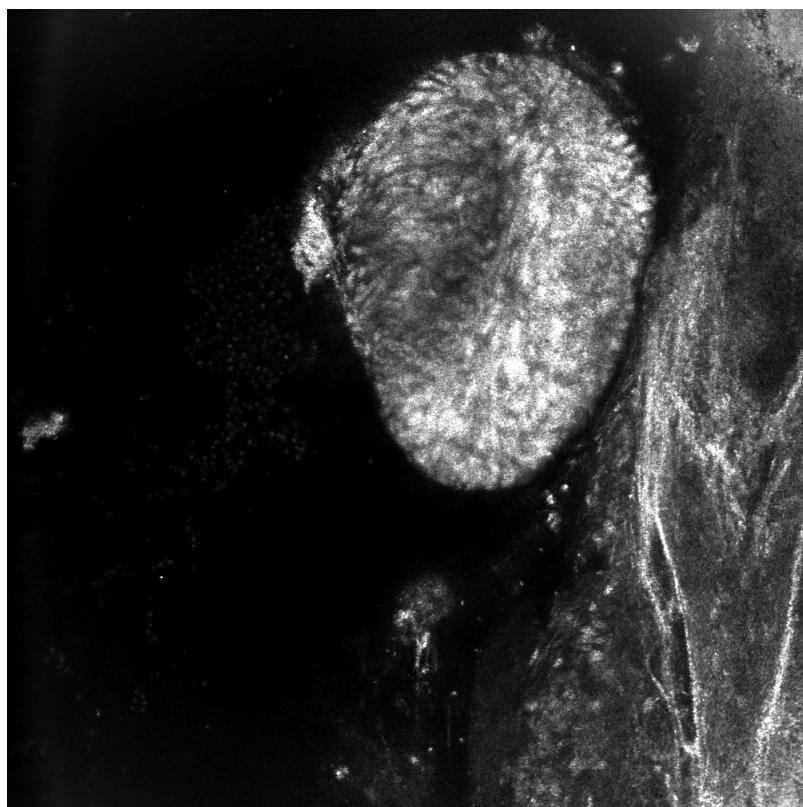
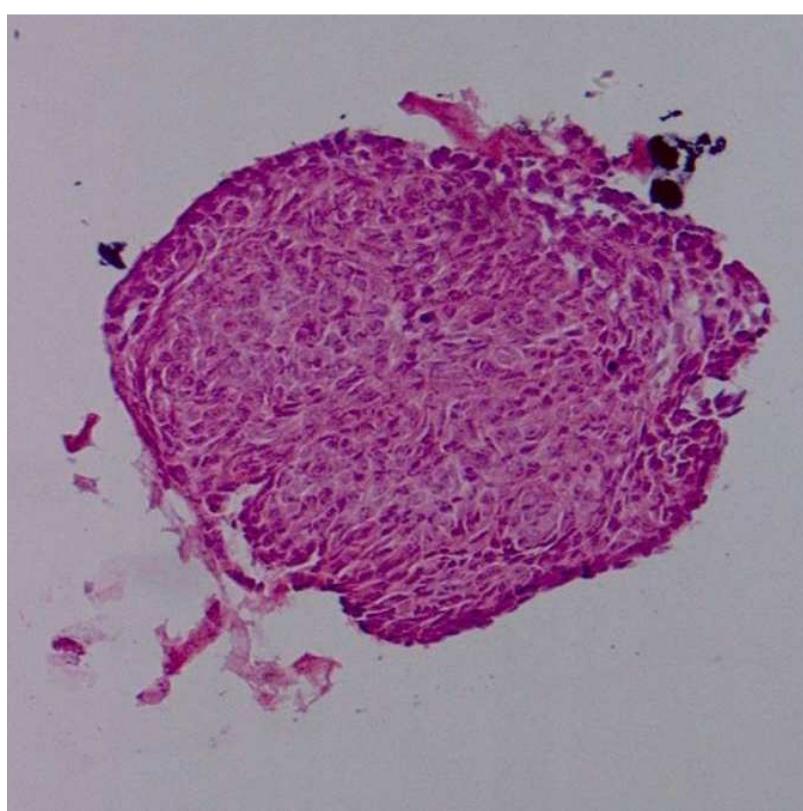


Abbildung 26: Basalzellkarzinom, konventionelle Lichtmikroskopie, Detail



4.3. Zeitaufwand

Abhängig von der Größe des untersuchten Gewebes nahmen Präparation und Bildgebung etwa 6 Minuten in Anspruch. Nach Einwirken der Zitronensäure über 60 s benötigten wir ca. eine weitere Minute, um die Probe auf dem Objektträger zu positionieren, das Deckglas zu fixieren und den Objektträger auf dem Objektisch zu platzieren sowie die XY-Position, Laserleistung und Untersuchungsebene (Z-Position) einzustellen. Die Abbildung eines 12 x 8 mm messenden Gewebestücks in 6 je 4 x 4 mm großen Übersichtsaufnahmen, die jeweils innerhalb von 35 s aufgenommen wurden, dauerte beispielsweise 3,5 min.

4.4. Anzahl der untersuchten Präparate

Im Rahmen der Studie wurden 52 Exzidate beurteilt. Dabei handelte es sich sowohl um Primär- als auch um Nachexzisionen. Insgesamt wurden 134 Randschnitte und Unterseiten („Tiefen“) untersucht.

4.5. Vergleich der konfokalen mit den lichtmikroskopischen Befunden

Betrachtet man die 134 Randschnitte und Tiefen, findet man eine Übereinstimmung in 122 Proben (23 richtig positiv, 99 richtig negativ). Dies entspricht 91,0%. Es ergibt sich eine Sensitivität von 74,2 % und eine Spezifität von 96,1%. Der positive Vorhersagewert (PPV) lag bei 85,2%, der negative Vorhersagewert bei 92,5%. Die detaillierten Ergebnisse werden in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1: Einzelergebnisse

Patient	Exzision	Lokalisation	Diagnose	Schnitt rand	richtig pos.	richtig neg.	falsch pos.	falsch neg.
1	1	Nase	sklerodermif. BCC	1		1		
				2		1		
2	1	Nase	sklerodermif. BCC	1		1		
3	1	Schläfe	sklerodermif. BCC	1		1		
				2		1		
				3				
				4		1		
	2	Schläfe	sklerodermif. BCC	1		1		
							1	

4	1	Nase	solides BCC	1	1	1	
5	1	Schläfe	Trichofollikulom	1		1	
6	2	Schläfe	Trichofollikulom	1		1	
6	1	Nase	solides BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
				4		1	
				5		1	
7	1	Nase	solides BCC	1	1	1	
7	2	Nase	solides BCC	1		1	
8	1	Wange	solides BCC	1			1
				2	1		
				3	1		
				4			1
				5	1		
	2	Wange	solides BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
				4		1	
9	1	Nase	solid-sklerodermif. BCC	1			1
	2	Nase	solid-sklerodermif. BCC	1	1		
10	1	Nase	solid-sklerodermif. BCC	1	1		
				2			1
				3		1	
				4		1	
				5	1		
	2	Nase	solid-sklerodermif. BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
				4		1	
11	1	Lippe	sklerodermif. BCC	1			1
				2		1	
				3			1
				4			1
				5		1	
	2	Lippe	sklerodermif. BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
				4		1	
				5		1	
12	1	Nase	solides BCC	1	1		
				2		1	
				3		1	
				4		1	
				5	1		
	2	Nase	solides BCC	1		1	
	3	Nase	solides BCC	1	1		

13	4	Nase	solides BCC	1	1	1	
	5	Nase	solides BCC	1		1	
	1	Retroaur.	solides BCC	1		1	
				2		1	
14	1	Nase	Schweißdrüsenträgerkarzinom	1		1	
15	1	Nase	sklerodermif. BCC	1		1	
	2	Nase	sklerodermif. BCC	1		1	
16	1	Nase	sklerodermif. BCC	1		1	
				2		1	
17	1	Wange	mikronoduläres BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
18	1	Nase	solides BCC	1	1		
19	1	Stirn	sklerodermif. BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
				4		1	
				5		1	
				6		1	
				7		1	
				8		1	
				9	1		
	2	Stirn	sklerodermif. BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
	3	Präauriculär	solid-sklerodermif. BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
	4	Stirn	sklerodermif. BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
20	1	Nase	solides BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
				4		1	
				5		1	
				6		1	
21	1	Nase	solides BCC	1			
				2		1	
				3		1	
				4			1
	2	Nase	solides BCC	1		1	
				2		1	
22	1	Wange	solid-zystisches BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
	2	Wange	solid-zystisches BCC	1		1	
				2		1	
				3		1	
23	1	Augenwinkel	solides BCC	1		1	
24	1	Nase	Narbe	1		1	

		2	Nase	sklerodermif. BCC	1		1		
		3	Nase	sklerodermif. BCC	1		1		
		4	Nase	sklerodermif. BCC	1		1		
	25	1	Augenwin-kel	solides BCC	2	1	1		
					2			1	
					3		1		
					4		1		
					5			1	
	26	1	Nase	solides BCC	1		1		
					2		1		
					3		1		
					4		1		
	27	1	Kinn	sklerodermif. BCC	1		1		
	28	1	Nase	sklerodermif. BCC	1				1
		2	Nase	sklerodermif. BCC	1	1			
					2		1		
		3	Nase	sklerodermif. BCC	1	1			
					2	1			
	29	4	Nase	sklerodermif. BCC	1	1			
		1	Nase	solid-sklerodermif. BCC	1		1		
					2		1		
Summe						23	99	4	8

Bezogen auf die 52 Exzidate bzw. Tumore stimmten in 44 Fällen konfokale und lichtmikroskopische Befundung überein. Dies entspricht 84,6 %. Von diesen 44 Proben waren 30 richtig negativ und 14 richtig positiv.

Bei 8 Exzidaten wichen die konfokale Beurteilung von der lichtmikroskopischen Befundung ab: 3 Präparate wurden mittels CLSM falsch positiv, 4 falsch negativ befunden. In einem Fall wurde ein Randschnitt falsch positiv, ein anderer Randschnitt des gleichen Tumors falsch negativ bewertet. Die Sensitivität lag bei 77,8%, die Spezifität bei 90,9%. Es errechnet sich ein positiver Vorhersagewert (PPV) von 82,4%, der negative Vorhersagewert lag bei 88,2%. Die Ergebnisse einschließlich der histologischen Tumortypen werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Ergebnisse nach histologischen Tumortypen

Fälle (= Exzidierte Tumore bzw. Nachexzisionen)	richtig		falsch		
	Richtig positiv	Richtig negativ	Falsch positiv	Falsch negativ	Tumore mit falsch positiv und falsch negativ bewerteten Rändern
Solide	8	8		2	1
Solid-zystisch		2			
Solid-sklerodermiform	1	3	2		
Sklerodermiform	5	12	1	2	
Mikronodulär		1			
Tumorfreie Narbe		1			
Trichofollikulom		2			
Schweißdrüsenkarzinom		1			
	14	30	3	4	1
Summe	44		8		

Vier Präparate wurden falsch positiv bewertet. In drei Fällen konnten Haarfollikel nicht von Tumorzellen unterschieden werden. In einer Probe wurde eine Talgdrüse für ein BCC angesehen (Abb. 27, Abb. 28). Allerdings bereitete in diesem Fall die Beurteilung auch in der konventionellen Histologie Schwierigkeiten.

Abbildung 27: Gequetschte Talgdrüsen, Detail 0,5x0,5 mm

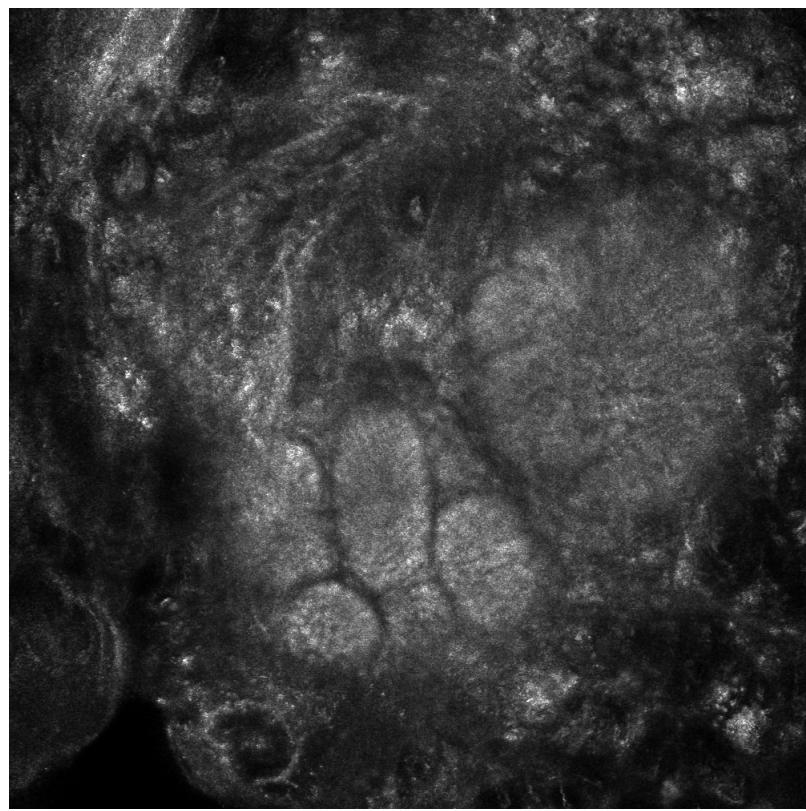
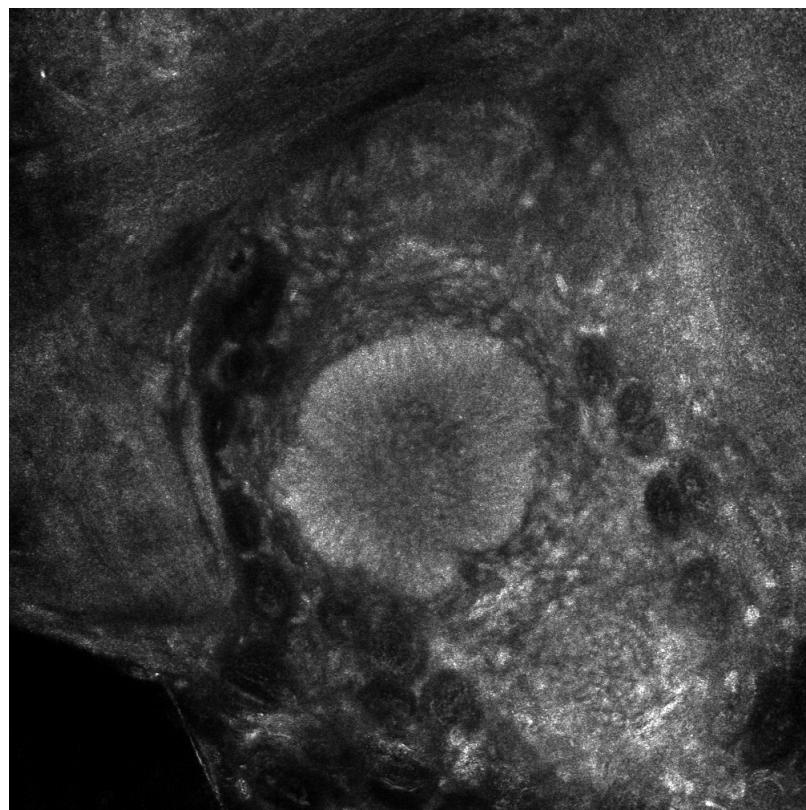


Abbildung 28: Gequetschte Talgdrüsen, Detail 0,5x0,5 mm



Fünf BCC wurden auf den konfokalen Aufnahmen nicht erkannt. Hier waren zum Teil die Schnitträder unregelmäßig. Dies führte dazu, dass das Gewebe nicht vollständig auf dem Objektträger auflag, so dass nicht die gesamte Fläche abgebildet werden konnte. In anderen Fällen war die Bildqualität nicht ausreichend, um die Kerne eines BCC abgrenzen zu können (Abb. 29 u. 30). Falsch negativ bewertet wurden die Schnitträder von zwei der insgesamt 7 sklerodermiformen und drei der insgesamt 11 soliden BCC.

Abbildung 29: Mangelhafte Bildqualität, BCC nicht abgrenzbar, Map 4x4 mm

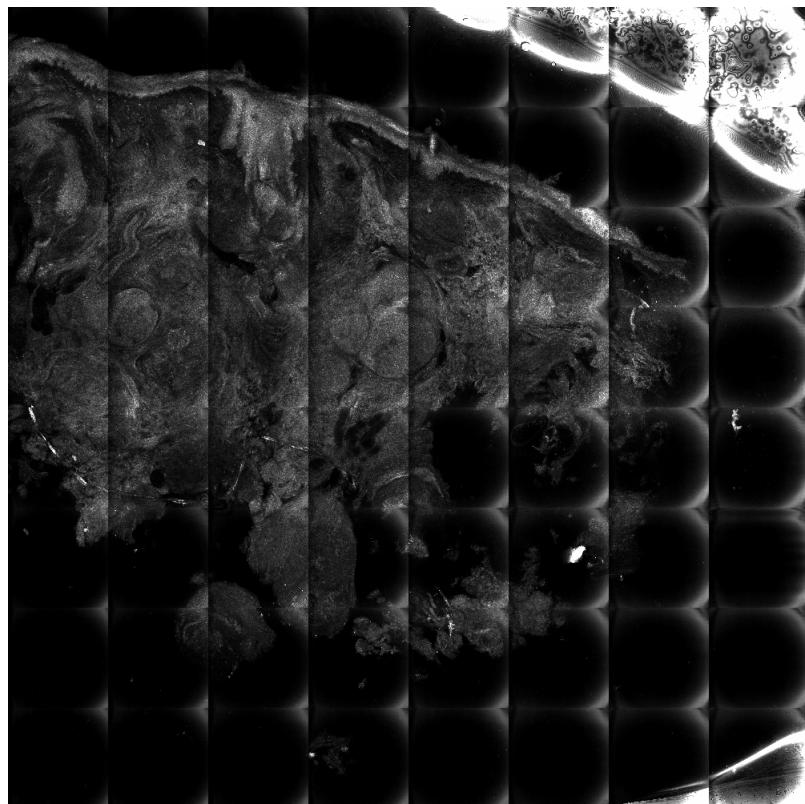
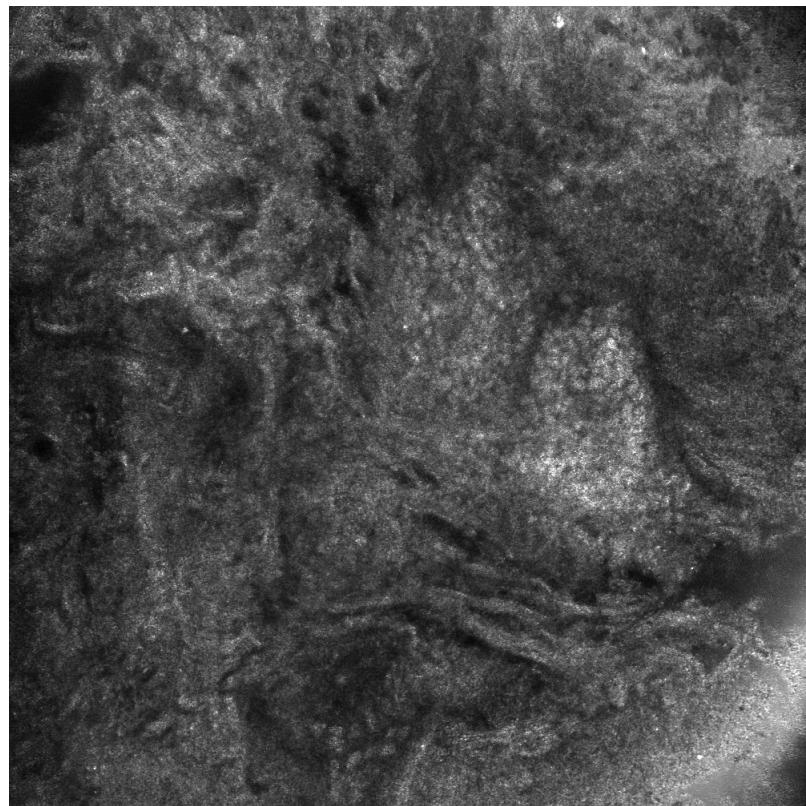


Abbildung 30: Mangelhafte Bildqualität, BCC nicht abgrenzbar, Detail 0,5x0,5 mm



4.6. Gesamtergebnis

Das Gesamtergebnis wird in Tabelle 3 zusammengefasst. Es ergeben sich bessere Resultate für die Bewertung nach einzelnen Schnitträndern. Diese sind geeignet, die Vergleichbarkeit der beiden Mikroskopietechniken einzuschätzen. Um eine Beurteilung der Anwendbarkeit in der Klinik vornehmen zu können, erfolgte zusätzlich eine Auswertung nach Exzisionen: Für das Procedere ist entscheidend, dass alle Schnittränder richtig beurteilt werden.

Tabelle 3: Gesamtergebnis

	Schnittränder	Exzisionen
Übereinstimmung mit Lichtmikroskopie	91,0%	84,6%
Sensitivität	74,2%	77,8%
Spezifität	96,1%	90,9%
PPV	85,2%	82,4%
NPV	92,5%	88,2%

5. Diskussion

5.1. Fehlerquellen

5.1.1. Probleme in der Handhabung des Gerätes

Der mitgelieferte Objektträger erlaubt die problemlose Untersuchung von gleichmäßig flachen Proben, während seitliche Ränder nicht immer dargestellt werden können. Oft kippt das Präparat zur Seite oder wird stark gequetscht, so dass eine korrekte konfokale Untersuchung nicht möglich ist. Auch bei unregelmäßigen Schnittflächen ist oft der vollständige Kontakt zum Objektträger nicht gewährleistet. Dieses Problem tritt insbesondere bei Gewebe auf, das in Nachexzisionen gewonnen wurde.

Es wurde versucht, dieses Problem mittels des oben erwähnten selbst konstruierten Objektträgers zu lösen. Aber auch hiermit war die vollständige Abbildung sehr unregelmäßiger Exzidate nicht in allen Fällen möglich.

5.1.2. Inkonsistente Bildqualität

Die Anwendung der konfokalen Mikroskopie ist auch durch die inkonsistente Bildqualität limitiert. Im Allgemeinen generierten wir scharfe Bilder, die Zellkerne waren gut abgrenzbar. In einigen Fällen jedoch war die Fokussierung problematisch, so dass eine sichere Unterscheidung zwischen Tumor- und benignen Zellen, insbesondere Talgdrüsen oder Follikeln, nicht möglich war.

Ein weiteres Problem bestand im sog. bad stitching: Die Einzelbilder, aus denen die VivaBlocks zusammengefügt wurden, waren oft gegeneinander verschoben, so dass im Bereich dieser Bildgrenzen die Beurteilbarkeit eingeschränkt war.

Gerade die Diagnostik von sklerodermiformen BCC erfordert jedoch optimale Fokussierung und Bildqualität, da diese Tumore oft infiltrierende Ausläufer aufweisen, die nur aus wenigen Zelllagen bestehen.

5.2. Verbesserungsansätze

5.2.1. Verbesserung des Objektträgers

Die Weiterentwicklung dieser viel versprechenden Technologie sollte sich auf das Handling der Probe konzentrieren, speziell auf die Konstruktion des Objektträgers. Patel et al. (Patel et al. 2007) konstruierten einen Objekttsch, der es durch den Einsatz von Flügelschrauben, die mit Sprungfedern versehen sind, erlaubt, sowohl die Neigung als auch den Abstand zwischen Objektträger und Objektivlinse zu justieren. Ein konstanter Auflagedruck wird durch eine Polsterung des Gewebes mit 3 %-igen Agarosepads erreicht, die zwischen Gewebe und einem Kolben eingelegt werden. Der durch den Kolben erzeugte Druck verteilt sich so gleichmäßig auf das Gewebe.

5.2.2. Verstärkung des Kontrasts mit Hilfe von Farbstoffen und Fluoreszenz

Die sichere Erkennung von Tumorzellen setzt eine konstant hohe Bildqualität voraus. Die Abgrenzung von benignen Strukturen wie z.B. Haarfollikeln könnte durch den Einsatz von tumorspezifischen Kontrastverstärkern erleichtert werden.

Die ersten Entwicklungen in dieser Richtung wurden von Tannous, Torres und Gonzales berichtet (Tannous et al. 2003), die zeigten, dass Aluminiumchlorid vermehrt von Kernen der Tumorzellen aufgenommen wird im Vergleich zum umgebenden gesunden Gewebe. Allerdings wurde in dieser Arbeit vorrangig die Anwendung in der In-vivo-Diagnostik untersucht, die Resultate wurden nicht mit säurebehandeltem Gewebe verglichen.

Eine Weiterentwicklung der konfokalen Reflexionsmikroskopie stellt die konfokale Fluoreszenzmikroskopie dar. Al Arashi, Salomatina und Yaroslavsky berichten, dass die Detektion von Tumorzellen durch Fluoreszenz-Polarisations-Mikroskopie von mit Toluidin- und Methylenblau behandelten Proben erleichtert werden kann. Diese Methode scheint vor allem im Hinblick auf In-vivo-Anwendungen interessant zu sein, da diese Farbstoffe nicht toxisch sind. Auch hier muss jedoch noch überprüft werden, ob die Methode einen Verbesserung gegenüber der Vorbehandlung mit verdünnten Säuren bedeutet (Al-Arashi et al. 2007).

Gareau et al. konnten zeigen, dass durch die Vorbehandlung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridin-Orange der Kontrast der Zellkerne zur Dermis deutlich verstärkt wird. Dies ermöglicht die Detektion auch kleinerer Basaliomnester (Gareau et al. 2008). In einer 45 Exzidate

umfassenden Studie zur Anwendung dieser verbesserten Technik in der Mohs Chirurgie lag die Sensitivität bei 96,6 %, die Spezifität bei 89,2 % (Gareau et al. 2009).

Eine Kontrastverstärkung kann auch durch Einsatz von Kreuz-Polarisation erreicht werden: Patel et al. zeigten, dass das Kollagen der oberen Dermis dunkler erscheint und so der Gesamtkontrast bei verminderter Artefaktbildung verbessert wird. So kann die Diagnostik von BCC in der papillären, nicht aber in der tiefer gelegenen retikulären Dermis erleichtert werden (Patel et al. 2007).

5.2.3. Verkürzung der Untersuchungszeiten durch Vergrößerung des Bildfelds

Das Bildfeld des VivaScopes 2500 misst 500 x 500 µm. Zur Erstellung eines Mosaiks der Größe 4 x 4 mm werden also 64 Einzelaufnahmen zusammengefügt. Durch eine Vergrößerung des Bildfeldes könnte die Zahl der benötigten Einzelaufnahmen reduziert und die Aufnahmedauer der Blöcke verkürzt werden.

5.3. Einsatzmöglichkeiten in der mikrografischen Chirurgie

Derzeit kann die konfokale Lasermikroskopie die heute in der Routinediagnostik eingesetzte Kryostat-Technik nicht ersetzen, da eine Rate von 84,6% richtig bewerteten Proben nicht ausreichend ist. Im Falle klar positiver Randschnitte kann jedoch unmittelbar nachexzidiert werden. Negative Befunde müssen weiterhin vor dem Wundverschluss durch die Histopathologie bestätigt werden.

Schüle et al. untersuchten in einer 2009 veröffentlichten Studie ebenfalls die Anwendung der CLSM in der MKC (Schüle et al. 2009). Die BCC wurden in Muffin-Technik oder nach der Randschnittmethode („Tübinger Torte“) exzidiert und anschließend – wie auch in unserer Studie – mit einem VivaScope 2500 untersucht. Die konfokalen Befunde wurden mit HE gefärbten Paraffinschnitten verglichen. Insgesamt wurden hier 284 Schnitte von 66 Tumoren durch drei Untersucher bewertet. Die Sensitivität bezogen auf Schnitte lag je nach Untersucher zwischen 0% und 96%, die Spezifität zwischen 29% und 89%. Probleme bereitete auch hier die Unterscheidung zwischen Talgdrüsen und BCC in talgdrüsenreichen Arealen.

Zieffle et al. verwendeten ein VivaScope 2500 mit Zoomfunktion und verbessertem Objektträger. Durch Färbung mit Toluidinblau konnte der Kontrast der Tumorzellen gegenüber dem gesunden Gewebe verstärkt werden. Beurteilt wurden 312 Randschnitte, Muffins, Mittelschnitte und „Brotleibschnitte“. Die Untersucher waren identisch mit o.g. Studie und erreichten nun eine Sensitivität von 71,4% bis 86,9% sowie eine Spezifität von 66,1% bis 70,2%. Die mittlere Sensitivität für Randschnitte lag bei 73,7%. Die von den Autoren angestrebte Sensitivität von 90%, die den Ersatz der konventionellen Lichtmikroskopie durch die CLSM erlauben würde, konnte auch in dieser Studie nicht annähernd erreicht werden (Zieffle et al. 2010).

6. Zusammenfassung

6.1. Zielstellung

In dieser Studie wurde die Anwendung der konfokalen Laserscanmikroskopie in der Routine-diagnostik von Randschnitten in der MKC (mikroskopisch kontrollierte Chirurgie) untersucht.

6.2. Untersuchungsmaterial und Methodik

Wir untersuchten 52 mittels MKC gewonnene Exzidate, die insgesamt 134 Randschnitte und Tiefen umfassten. Nach Beurteilung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie wurden die Schnitte für die konventionelle Histopathologie aufbereitet und lichtmikroskopisch begutachtet. Die Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden wurden miteinander verglichen.

6.3. Ergebnisse

Die histologischen Merkmale des BCC (basal cell carcinoma) in der konfokalen Lasermikroskopie entsprachen den aus der Lichtmikroskopie bekannten Charakteristika. 44 Proben (84,6%) wurden in Übereinstimmung mit dem lichtmikroskopischen Befund beurteilt, davon waren 30 richtig negativ und 14 richtig positiv. Die Sensitivität lag bei 77,8%, die Spezifität bei 90,9%.

6.4. Schlussfolgerung

Obwohl die in der konfokalen Mikroskopie beobachteten histologischen Charakteristika des BCC gut mit den aus der konventionellen Histologie bekannten korrespondieren, kann diese neue Technologie die Gefrierschnittdiagnostik derzeit noch nicht ersetzen, da ein Anteil von nur 84,6 % korrekten Untersuchungsergebnissen nicht akzeptabel ist. Dennoch kann die CLSM die konventionelle Histopathologie ergänzen: In Fällen von eindeutig erkennbaren BCC in Randschnitten kann auf Grundlage der konfokalen Befunde die Nacherxzision innerhalb weniger Minuten durchgeführt werden. Negative konfokale Resultate müssen weiterhin

durch die konventionelle Mikroskopie bestätigt werden, die durch die vorangehende nicht-invasive konfokale Bildgebung nicht beeinträchtigt wird.

Verbesserungsbedarf besteht vor allem in der Handhabung der Proben im Sinne einer Optimierung des Objektträgers und Objekttisches. Ferner sollte die Entwicklung tumorspezifischer Kontrastmittel angestrebt werden.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines konfokalen Mikroskops	15
Abbildung 2: Haarfollikel, Map 1x1 mm nach Vorbehandlung mit NaCl 0,9%	16
Abbildung 3: Haarfollikel, Map 1x1 mm nach Vorbehandlung mit Zitronensäure 10%.....	17
Abbildung 4: Tübinger Randschnittmethode („Tübinger Torte“).....	20
Abbildung 5: Vivascope 2500.....	21
Abbildung 6: Objektträger	22
Abbildung 7: Bildfeld 500x500µm, Epidermis.....	23
Abbildung 8: VivaBlock 4x4 mm	24
Abbildung 9: Solides Basalzellkarzinom, Map 4x4 mm.....	25
Abbildung 10: Solides Basalzellkarzinom, suspektes Areal in stärkerer Vergrößerung, Map 1,5x1,5 mm	25
Abbildung 11: Gesunde Haut, starke Kontrastierung der kollagenen und elastischen Fasern	27
Abbildung 12: Altershaut mit aktinischer Elastose, Map 1,5x1,5 mm	28
Abbildung 13: Normalhaut des Kapillitiums, Haarfollikel mit Talgdrüsen, Map 1,5x1,5 mm	28
Abbildung 14: Talgdrüse, Detail 0,5x0,5 mm.....	29
Abbildung 15: ekkrine Schweißdrüse, Detail 0,5x0,5 mm	29
Abbildung 16: Gefäß, Detail 0,5x0,5 mm	30
Abbildung 17: Muskulatur, Map 1x1 mm.....	30
Abbildung 18: Gesunde Haut, CLSM	31
Abbildung 19: Gesunde Haut, konventionelle Lichtmikroskopie.....	31
Abbildung 20: Basalzellkarzinom mit elongierten Zellkernen, im Randbereich Palisadenstellung, peritumorale Spaltbildung. Detail 0,5x0,5 mm	32
Abbildung 21: Basalzellkarzinom mit elongierten Zellkernen, im Randbereich Palisadenstellung, peritumorale Spaltbildung. Map 1x1 mm	33

Abbildung 22: Basalzellkarzinom mit elongierten Zellkernen, im Randbereich Palisadenstellung, peritumorale Spaltbildung. Map 4x4 mm	33
Abbildung 23: Basalzellkarzinom, CLSM	34
Abbildung 24: Basalzellkarzinom, konventionelle Lichtmikroskopie.....	34
Abbildung 25: Basalzellkarzinom, CLSM, Detail 0,5x0,5 mm	35
Abbildung 26: Basalzellkarzinom, konventionelle Lichtmikroskopie, Detail	35
Abbildung 27: Gequetschte Talgdrüsen, Detail 0,5x0,5 mm.....	41
Abbildung 28: Gequetschte Talgdrüsen, Detail 0,5x0,5 mm.....	41
Abbildung 29: Mangelhafte Bildqualität, BCC nicht abgrenzbar, Map 4x4 mm	42
Abbildung 30: Mangelhafte Bildqualität, BCC nicht abgrenzbar, Detail 0,5x0,5 mm.....	43

8. Literaturverzeichnis

1. Al-Arashi MY, Salomatina E, Yaroslavsky AN (2007) Multimodal confocal microscopy for diagnosing nonmelanoma skin cancers. *Lasers Surg Med* 39:696–705
2. Altintas MA, Altintas AA, Guggenheim M, Gohritz A, Meyer-Marcotty M, Vogt PM (2009) Reflectance confocal-laser-scanning microscopy *in vivo* assessments of cigarette-induced dynamic alterations of cutaneous microcirculation on histomorphological level. *Microsc Res Tech*. 72:347–350
3. Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies R (2010) Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermat Photoimmunol Photomed* 26:118–132
4. Basset-Seguin N, Ibbotson SH, Emtestam L, Tarstedt M, Morton C, Maroti M et al. (2008) Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy versus cryotherapy for superficial basal cell carcinoma: a 5 year randomized trial. *Eur J Dermatol* 18:547–553
5. Boztepe G, Hohenleutner S, Landthaler M, Hohenleutner U (2004) Munich method of micrographic surgery for basal cell carcinomas: 5-year recurrence rates with life-table analysis. *Acta Derm Venereol* 84:218–222
6. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf W, Landthaler M (Hrsg.) (2005) Dermatologie und Venerologie, 5. Aufl., Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio
7. Breuninger H, Dietz K (1991) Prediction of subclinical tumor infiltration in basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 17:574–578
8. 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 non-melanoma skin cancers. *Dermatol Surg* 30:1470–1478
9. Eichert S, Möhrle M, Breuninger H, Röcken M, Garbe C, Bauer J (2010) Diagnosis of cutaneous tumors with *in vivo* confocal laser scanning microscopy. *J Dtsch Dermatol Ges* 8:400–410
10. Flohil SC, de Vries E, Neumann HA, Coebergh JW, Nijsten T (2011) Incidence, prevalence and future trends of primary basal cell carcinoma in the Netherlands. *Acta Derm Venereol* 91:24–30
11. 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: 34012
12. 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: 54001

13. Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M (2004) Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol* 50:722–733
14. Goldgeier M, Fox CA, Zavislan JM, Harris D, Gonzalez S (2003) Noninvasive imaging, treatment, and microscopic confirmation of clearance of basal cell carcinoma. *Dermatol Surg* 29:205–210
15. González S, Rajadhyaksha M, Rubinstein G, Anderson RR (1999) Characterization of psoriasis in vivo by reflectance confocal microscopy. *J Med* 30:337–356
16. Griep C, Davelaar J, Scholten AN, Chin A, Leer JW (1995) Electron beam therapy is not inferior to superficial x-ray therapy in the treatment of skin carcinoma. *Int. J Radiat Oncol Biol Phys* 32:1347–1350
17. Gross K, Kircik L, Kricorian G (2007) 5% 5-Fluorouracil cream for the treatment of small superficial Basal cell carcinoma: efficacy, tolerability, cosmetic outcome, and patient satisfaction. *Dermatol Surg* 33:433-9; discussion 440
18. Hauschild A, Breuninger H, Kaufmann R, Kortmann R, Schwipper V, Werner J et al. (2008) Short German guidelines: basal cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges* 6 Suppl 1:2-4
19. Kempf W, Hantschke M, Kutzner H, Burgdorf WHC (2007) *Dermatopathologie*, 1. Aufl., Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio
20. Koller S, Gerger A, Ahlgrimm-Siess V, Weger W, Smolle J, Hofmann-Wellenhof R (2009) In vivo reflectance confocal microscopy of erythematous squamous skin diseases. *Exp Dermatol* 18:536–540
21. Kopke LF, Konz B (1995) [Micrographic surgery. A current methodological assessment]. *Hautarzt* 46:607–614
22. Lear W, Dahlke E, Murray CA (2007) Basal cell carcinoma: review of epidemiology, pathogenesis, and associated risk factors. *J Cutan Med Surg* 11:19–30
23. Lo JS, Snow SN, Reizner GT, Mohs FE, Larson PO, Hruza GJ (1991) Metastatic basal cell carcinoma: report of twelve cases with a review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 24:715–719
24. Löser C, Rompel R, Breuninger H, Möhrle M, Häfner H, Kunte C et al. (2010) Microscopically controlled surgery (MCS). *J Dtsch Dermatol Ges* 8:920–925
25. Marmur ES, Schmults CD, Goldberg DJ (2004) A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Surg* 30:264–271
26. Möhrle M, Breuninger H (2006) [The Muffin technique--an alternative to Mohs' micrographic surgery]. *J Dtsch Dermatol Ges* 4:1080–1084
27. Mohs FE (1947) Chemosurgical treatment of cancer of the face; a microscopically controlled method of excision. *Arch Dermatol Syph* 56:143–156

28. Morton CA, Brown SB, Collins S, Ibbotson S, Jenkinson H, Kurwa H et al. (2002) Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol* 146:552–567
29. Nehal KS, Gareau D, Rajadhyaksha M (2008) Skin imaging with reflectance confocal microscopy. *Semin Cutan Med Surg* 27:37–43
30. 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: 34027
31. Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S (2005) Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions--improvement in melanoma diagnostic specificity. *J Am Acad Dermatol* 53:979–985
32. 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
33. 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
34. Robinson JK, Dahiya M (2003) Basal cell carcinoma with pulmonary and lymph node metastasis causing death. *Arch Dermatol* 139:643–648
35. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL (1989) Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol* 15:315–328
36. Ruocco E, Argenziano G, Pellacani G, Seidenari S (2004) Noninvasive imaging of skin tumors. *Dermatol Surg* 30:301–310
37. 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
38. Silverman MK, Kopf AW, Gladstein AH, Bart RS, Grin CM, Levenstein MJ (1992) Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 4: X-ray therapy. *J Dermatol Surg Oncol* 18:549–54
39. Silverman MK, Kopf AW, Bart RS, Grin CM, Levenstein MS (1992) Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 3: Surgical excision. *J Dermatol Surg Oncol* 18:471–6
40. Tannous Z, Torres A, González S (2003) In vivo real-time confocal reflectance microscopy: a noninvasive guide for Mohs micrographic surgery facilitated by aluminum chloride, an excellent contrast enhancer. *Dermatol Surg* 29:839–846
41. Tromovitch TA, Stegeman SJ (1974) Microscopically controlled excision of skin tumors. *Arch Dermatol* 110:231–232

42. Tsuji T, Otake N, Nishimura M (1993) Cryosurgery and topical fluorouracil: a treatment method for widespread basal cell epithelioma in basal cell nevus syndrome. *J Dermatol* 20:507–513
43. Wang I, Bendsoe N, Klinteberg CA, Enejder AM, Andersson-Engels S, Svanberg S, Svanberg K (2001) Photodynamic therapy vs. cryosurgery of basal cell carcinomas: results of a phase III clinical trial. *Br J Dermatol* 144:832–840
44. Xiang W, Xu A, Xu J, Bi Z, Shang Y, Ren Q (2010) In vivo confocal laser scanning microscopy of hypopigmented macules: a preliminary comparison of confocal images in vitiligo, nevus depigmentosus and postinflammatory hypopigmentation. *Lasers Med Sci* 25:551–558
45. Zieffle S, Schüle D, Breuninger H, Schippert W, Moehrle M (2010) Confocal laser scanning microscopy vs 3-dimensional histologic imaging in basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 146:843–847

Danksagung

Ich danke allen, die zum Entstehen der Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Hohenleutner für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit und Auswertung der histologischen Befunde.

Den Mitarbeiterinnen des Histologielabors danke ich für die gute Zusammenarbeit.