

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR DERMATOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. M. BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*EVALUATION VON NATIVEN GEWEBESCHNITTEN IN DER MIKROSKOPISCH
KONTROLLIERTEN CHIRURGIE UNTER VERWENDUNG VON NILBLAU-
FLUORESZENZ-FARBSTOFF UND KONFOKALER LASERMIKROSKOPIE*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Thomas Moeser

2014

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR DERMATOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. M. BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*EVALUATION VON NATIVEN GEWEBESCHNITTEN IN DER MIKROSKOPISCH
KONTROLLIERTEN CHIRURGIE UNTER VERWENDUNG VON NILBLAU-
FLUORESZENZ-FARBSTOFF UND KONFOKALER LASERMIKROSKOPIE*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Thomas Moeser

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Hohenleutner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Kühnel

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.08.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung.....	10
1.1 Basalzellkarzinome	10
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	10
1.1.2 Klinik und Histologie.....	11
1.1.3 Diagnostik	13
1.1.4 Therapie und Prognose	13
1.2 Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie	18
1.2.1 Mohs Surgery	18
1.2.2 Münchner Methode	19
1.2.3 3-D Histologie (Randstreifen-Methode).....	19
1.3 Konfokale Lasermikroskopie	22
1.3.1 Technische Grundlagen.....	22
1.3.2 Entwicklung der konfokalen Lasermikroskopie	23
1.3.3 Einsatz in der Wissenschaft.....	24
1.3.4 Einsatz in der Dermatologie	24
1.3.5 Alternativen zur CLSM in der MKC	27
2 Fragestellung.....	28
3 Material und Methoden.....	28
3.1 Material	28
3.1.1 Präparate	28
3.1.2 Chemikalien und Materialien.....	29
3.1.3 Konfokales Lasermikroskop.....	30

3.2 Methoden.....	32
3.2.1 Erstellung der Präparate.....	32
3.2.2 Vorbereitung der Präparate.....	32
3.2.3 Scannen im konfokalen Lasermikroskop.....	33
3.2.4 Auswertung der Bilder.....	35
4 Ergebnisse.....	35
4.1 Morphologie des gesunden Gewebes.....	35
4.1.1 Aufnahmen von CLSM und konventioneller Histologie im Vergleich.....	40
4.2 Morphologie des tumorinfiltrierten Gewebes.....	44
4.3 Anzahl und Tumorart der untersuchten Präparate.....	48
4.4 Vergleich der Befunde zur konventionellen Histologie.....	48
4.5 Zeitaufwand.....	54
4.6 Gesamtergebnis.....	55
5 Diskussion.....	56
5.1 Fehlerquellen.....	56
5.1.1 Probleme der Präparatvorbereitung.....	56
5.1.2 Probleme bei bestimmten Tumortypen / Hauttypen.....	56
5.1.3 Technische Probleme.....	57
5.2 Verbesserungsmöglichkeiten.....	57
5.3 Praktikabilität in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie.....	58
5.4 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien.....	58
6 Zusammenfassung.....	60
6.1 Fragestellung.....	60
6.2 Material und Methoden.....	60
6.3 Ergebnisse.....	60
6.4 Schlussfolgerung.....	60
7 Abbildungsverzeichnis.....	62

8 Literaturverzeichnis	63
9 Erklärung	73
10 Danksagung	74

Abkürzungsverzeichnis

BCC	Basalzellkarzinom, Basal Cell Carcinoma
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
MKC	Mikroskopisch Kontrollierte Chirurgie
z. Bsp.	Zum Beispiel
vgl.	vergleiche
PDT	Photodynamische Therapie
PEC	Plattenepithelcarcinom
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Eine weltweit zu beobachtende steigende Inzidenz von Hauttumoren fordert immer mehr dermatologische Operationen zur Heilung dieser Hautveränderungen. Bei häufig vorkommenden und meist fazial lokalisierten Tumoren wie dem Basalzellkarzinom ist eine möglichst minimal-invasive und schonende Exzision anzustreben. Dies wird durch den Einsatz der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie gewährleistet. Hierbei werden die Hautveränderungen ohne größeren Sicherheitsabstand exzidiert und anschließend nach histologischer Aufarbeitung an ihren Schnitträndern auf Tumorfreiheit untersucht. Die hier vorgelegte Studie untersucht die Praktikabilität des Einsatzes der konfokalen Laserscanmikroskopie, in Verbindung mit einer Nilblau-Färbung, in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie, um den großen apparativen und zeitlichen Aufwand dieser Operationsmethode postoperativ zu verkleinern.

1.1 Basalzellkarzinome

Das Basalzellkarzinom (Epithelioma basocellulare, Basaliom, basal cell carcinoma, kurz: BCC) ist die häufigste epitheliale Neoplasie der behaarten Haut. Diese Art von Neoplasie wird oft als semimaligner Tumor bezeichnet, da er zwar lokal infiltrierendes und destruierendes Wachstum aufweist, jedoch nur in sehr seltenen Fällen metastasiert (Lo et al. 1991). Das Risiko einer Metastasierung wird mit unter 1:1000 angegeben (Hauschild et al. 2008). Histologisch erinnern die Tumorzellen, aufgrund ihres großen, ovalen und stark basophilen Zellkerns und deren palisadenartigen Stellung zueinander, stark an Zellen des Stratum basale der Epidermis.

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das BCC ist der häufigste Tumor des Menschen. Circa 80% der nichtmelanozytären Hauttumoren sind BCC (Rubin et al. 2005). Mit steigendem Lebensalter nimmt die Häufigkeit der Erkrankung zu. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Die Inzidenz schwankt stark in Abhängigkeit der Hautfarbe und der

durch die geographische Lage bedingten UV-Exposition (Lear et al. 2007). Während die höchste Inzidenz in Australien mehr als 1000 pro 100000 Einwohner beträgt, wird für Teile Afrikas eine Zahl der Neuerkrankungen von weniger als 1 pro 100000 Einwohner angegeben (Lomas et al. 2012). In Deutschland wird eine Inzidenz von ca. 100 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner angenommen (Hauschild et al. 2008).

Viele aktuelle Studien weisen auf einen deutlichen Anstieg der Neuerkrankungen hin. Eine Untersuchung von Flohil et al. aus dem Jahre 2011, basierend auf den Daten für die niederländische Bevölkerung vom Eindhoven Cancer Registry, weist einen starken Anstieg von histologisch überprüften BCC über den Zeitraum von 1973 – 2008 nach. Im Jahre 1973 ergab sich eine Inzidenz von 34 für Frauen, bzw. 40 für Männer, pro 100000 Einwohner, während im Jahr 2008 die Inzidenz bei 141 (Frauen), bzw. 148 (Männer) betrug.

Als der ätiologisch wichtigste Faktor für die Entstehung von BCC ist die UV-Strahlung zu nennen, wobei der Einfluss der kurzwelligeren UV-B Strahlung (280-320nm) die größten Erbgut schädigenden Effekte aufweist. Erhöhte UV-Exposition, speziell bei Hauttyp I und II, zunehmende UV-B Strahlung, durch geringere Adsorption einer verminderten Ozonschicht, werden, neben anderen Faktoren, wie dem demographischen Wandel und einer erhöhten Aufmerksamkeit von Arzt und Patient, als Hauptursachen des Inzidenzanstiegs diskutiert (Braun-Falco 2005).

Als weitere Risikofaktoren gelten Immunsuppression, Strahlentherapien und Arsenexposition. Langandauernde chronische Hautschädigungen, wie Ulzera und Narben können zur Entstehung eines BCC führen. Außerdem findet man das BCC im Rahmen von assoziierten Syndromen wie Xeroderma pigmentosum, Albinismus und dem Basalzellnaevussyndrom (Woolgar et al. 1987, Gorlin 1987)

.

1.1.2 Klinik und Histologie

Das BCC entsteht ohne vorherige Präkanzerose auf klinisch unauffälliger Haut, und tritt ausschließlich auf der behaarten Haut auf. Die häufigste Lokalisation des BCC, mit ca. 80%, ist der Kopf-Hals Bereich, wobei die Nase und die oberen zwei Gesichtsdrittel am häufigsten betroffen sind. Mit abnehmender Häufigkeit finden sich BCC auch am Rumpf, im unteren Gesichtsdrittel, Kapillitium, sowie andere Hautareale (Rubin et al. 2005)

Klinisch weist das BCC eine hohe Variationsbreite von Subtypen auf, welche sich häufig auch in der Histologie unterscheiden. Der am häufigsten vorkommende Subtyp ist das noduläre BCC, welches sich klinisch meist als langsam wachsende, erhabene und scharf begrenzte hautfarbene / glasiggraue bis rötliche Papel von derber Konsistenz darstellt. Weiteres Charakteristikum ist ein perlschnurartig aufgeworfener Randsaum, welcher von Teleangiektasien durchzogen ist. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es häufig zu Erosionen und Ulzerationen. Bei Ausbildung eines Ulcus terebrans mit exzessiver Destruktion von knöchernen und knorpeligen Geweben kann es trotz fehlender Metastasierung zu lebensbedrohlichen Zuständen, infolge von Blutungen und Infektionen, kommen (Braun-Falco 2005).

Die in der Histologie charakteristischsten Merkmale sind von der Basalzellschicht knötchen- und strangförmig proliferierende und basaloid differenzierte Tumorzellverbände. Die Tumorzellen haben große, basophile und oval geformte Zellkerne mit schmalen Zytoplasmasaum und sind im Randbereich des Tumors in einer Palisadenstellung angeordnet. Die Epidermis über dem Tumor ist meist atrophisch, erodiert oder ulzeriert und zwischen Tumorepithel und Stroma lässt sich vor allem beim solid-nodulären BCC häufig eine Spaltbildung beobachten. Solid-noduläre BCC weisen asymmetrisch geformte Tumorknoten auf, während dagegen das sklerodermiforme BCC eher schmale Tumorstränge von nur 2-3 Zellschichten ausbildet, die sich hirschgeweihartig in die Tiefe verzweigen und von einem dichten fibroblastenreichen Stroma umgeben werden. Das superfizielle BCC ist histologisch durch multi-fokale, knospenförmige und kleine Tumorzellverbände gekennzeichnet. Die Ausbreitung in die Tiefe ist nicht so ausgeprägt und reicht meist nur bis in das obere Korium. (Braun-Falco 2005)

In der WHO Klassifikation (Heenan 1996) kommen weitere histologische Differenzierungsmuster zum Ausdruck:

- Multifokales superfizielles BCC
- Noduläres BCC (solide, adenoid, zystisch)
- Infiltratives BCC (nicht-sklerosierend, sklerosierend, desmoplastisch, morphea-artig)
- Fibroepitheliales BCC

- BCC mit adnexoider Differenzierung (follikulär, ekkrin)
- Basosquamöses BCC
- Pigmentiertes BCC
- BCC beim Basalnaevussyndrom
- Mikronoduläres BCC

1.1.3 Diagnostik

Die Diagnose wird in der Regel klinisch gestellt (Telfer et al. 1999). Während sich die meisten BCC anhand der typischen Merkmale klinisch - eventuell unter Sicherung einer Probebiopsie- gut diagnostizieren lassen, sind manche Varianten des BCC im klinischen Erscheinungsbild oft schwieriger zu diagnostizieren. Das sklerodermiforme BCC ist meist unscharf begrenzt und weist ein keloidiformes Aussehen auf. Superfizielle BCC treten häufig als rötliche Flecken am Rumpf auf und können Ähnlichkeit mit einer entzündlichen Dermatose aufweisen. Des Weiteren existieren pigmentierte Varianten des nodulären BCC, welche aufgrund des Melaningehaltes differenzialdiagnostisch mit malignen Melanomen oder Naevi verwechselt werden können (Braun-Falco 2005). Bei den pigmentierten BCC erleichtert die Auflichtmikroskopie die Diagnosesicherung (Kreusch, Rassner 1991).

In dem seltenen Fall des Verdachts auf Metastasierung oder bei stark destruierenden Tumoren können weitere bildgebende Verfahren notwendig werden (Hauschild et al. 2008)

1.1.4 Therapie und Prognose

Bei geringem Metastasierungspotenzial des BCC besteht die Therapie in der lokalen Tumorkontrolle. Die Auswahl der Therapie des BCC erfolgt nach Größe, Lokalisation, klinischem Subtyp, sowie Allgemeinzustand, Alter und Begleiterkrankungen des Patienten. Eine weitere wichtige Rolle bei der Auswahl des Therapieverfahrens spielt die Rezidivrate und der Evidenzgrad des jeweiligen Verfahrens.

1.1.4.1 Operative Therapie

Das Standardvorgehen in der Therapie des BCC besteht in der vollständigen Exzision mit anschließender histologischer Untersuchung des Exzidats (Bath-Hextall et al. 2004).

Um hohe Heilungsraten zu gewährleisten, empfiehlt sich nach der Exzision eine systematische Randschnittkontrolle (Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie, vgl. 1.2), mit der im Kryostatschnitt- oder im Paraffinschnittverfahren alle Seiten und die Tiefe des Präparats dargestellt werden. Mit dieser Methode lassen sich bei Primärtumoren Heilungsraten von ca. 95% erzielen (Breuninger 1984; Riefkohl et al. 1985; Rowe et al. 1989). Die Defektdeckung erfolgt nach funktionellen und ästhetischen Regeln der plastischen Chirurgie und kann entweder primär oder sekundär, nach Abwarten des histologischen Befundes, erfolgen.

Wird keine Randschnittkontrolle (vgl. 1.2) durchgeführt, sondern eine konventionelle Exzision und eine histologische Untersuchung mit Stichproben durchgeführt, so müssen bei der Exzision des BCC tumoradaptierte Sicherheitsabstände eingehalten werden um eine ausreichende Rezidivsicherheit sicherzustellen. Laut der deutschen Leitlinie Basalzellkarzinom (Breuninger 2005) werden mit Sicherheitsabständen von 3-5 mm für kleinere BCC unter 20 mm und solide Tumore ausreichende Rezidivraten von 5-15 % erreicht. Bei größeren, infiltrativen oder sklerodermiformen Tumortypen müssen, bei konventioneller Exzision, deutlich höhere Sicherheitsabstände gewählt werden.

Bei sehr kleinen BCC und bei multiplen superfiziellen BCC ist alternativ auch eine tangentielle Abtragung in Form einer Horizontalexzision (Shave-Exzision) möglich. (Harrison 1994)

Des Weiteren können zur Behandlung von kleinen, initialen und superfiziellen BCC auch die Verfahren der Kürettage / Elektrodesikkation und die CO₂-Laser-Ablation eingesetzt werden, wobei bei diesen Therapieformen eine histologische Kontrolle nicht mehr möglich ist. (Hauschild et al. 2008)

1.1.4.2 Kryotherapie

Die Kryotherapie stellt ein thermisch destruierendes Verfahren dar, welches vor allem bei kleinen, oberflächlichen und gut abgrenzbaren BCC, sowie BCC der Augenlider zum Einsatz kommt (Tuppurainen 1995). Das Tumorgewebe wird mit

flüssigem Stickstoff bei -196 °C im Spray- oder Kontaktverfahren behandelt, wobei die Ergebnisse bei einer Einhaltung von üblichen Sicherheitsabständen mit denen der konventionellen Chirurgie vergleichbar sind (Rowe et al. 1989).

Aufgrund der fehlenden Möglichkeit einer histologischen Aufbereitung, sowie komplizierterer Wundheilung und - im Vergleich zu der konventionellen Exzision - nicht befriedigenden ästhetischen Ergebnissen bleibt dieses thermisch destruierende Verfahren dem Einzelfall vorbehalten.

1.1.4.3 Strahlentherapie

Die Indikation für eine Strahlentherapie eines BCC besteht vor allem bei primär inoperablen Tumoren oder postoperativ bei Resttumoren (R1- oder R2-Resektion) und Rezidivtumoren, wenn keine Möglichkeit einer kompletten Resektion besteht. Eine weitere Indikation stellen ältere Patienten dar, deren Vorerkrankungen und Allgemeinzustand eine operative Therapie nicht zulassen oder bei der Ablehnung eines operativen Eingriffs.

Die Strahlentherapie erfolgt mit Röntgenstrahlen oder schnellen Elektronen. Abhängig von der Größe und Lokalisation des BCC sollte ein umliegender Sicherheitsbereich von 5 bis 15 mm mitbestrahlt werden. Bei stark exophytischem Wachstum ist eine vorherige chirurgische Planierung indiziert (Hauschild et al. 2008). Die Bestrahlung erfolgt in Einzeldosen zwischen 2-5 Gy, abhängig von Größe und umgebenden Strukturen. Die Gesamtdosis beträgt bei Primärtherapie bis zu 70 Gy (Griep et al. 1995). Um die möglichen Folgen einer Bestrahlung, wie Radiodermatitis, zu minimieren, sollten alle umliegenden Gewebe und Organe mit Bleimasken bedeckt und die Strahlentherapie in möglichst vielen, aber geringen Einzeldosen durchgeführt werden.

Die Erfolgsaussichten einer Strahlentherapie sind mit denen einer konventionellen chirurgischen Intervention vergleichbar (Silverman et al. 1992ab; Rowe et al. 1989ab).

1.1.4.4 Photodynamische Therapie

Bei der photodynamischen Therapie, werden photosensibilisierende Substanzen lokal auf den Tumor appliziert und eine intensive Lichtbestrahlung, meist mit Rotlicht,

durchgeführt. Als Photosensitizer werden meist Hämatoporphyrinderivate wie 5-Aminolävulinsäure und deren Ester eingesetzt. In der Kombination aus photosensibilisierendem Wirkstoff, der sich vor allem in den Tumorzellen anreichert, und der Lichtenergie entstehen im Tumorgewebe reaktive Sauerstoffspezies, welche selektiv zur Zerstörung der Tumorzellen führen.

Die PDT erzielt ähnliche Resultate wie die Kryotherapie (Klein 2008 et al.; Hauschild et al. 2008), bei im Vergleich zur chirurgischen Entfernung sehr guten kosmetischen Ergebnissen. Es werden stark unterschiedliche Heilungsraten für bestimmte Typen des BCC angegeben. Während bei dünnen, oberflächlichen Tumoren höhere Werte angegeben werden, fallen diese Werte für noduläre und dickere Tumore deutlich schlechter aus. Diese Nachteile der PDT bei dickeren Tumoren ergeben sich aus der begrenzten Eindringtiefe des Photosensitizers, wodurch es bei tieferen BCC zum Verbleib von Tumorresten und Ausbildung von Rezidivtumoren kommen kann. Außerdem fehlt eine histologische Absicherung. Der Einsatz der PDT sollte sich daher auf oberflächliche BCC beschränken. (Morton et al. 2008; Bath-Hextall et al. 2007)

Neuere Studien verweisen auf vergleichbare Erfolge mit systemischer Gabe von photosensibilisierenden Substanzen (Betz et al. 2012) oder einer Kombination der PDT mit CO₂ Laser Behandlung (Shokrollahi et al. 2013)

1.1.4.5 Lokale Chemotherapie / Immuntherapie

Eine weitere Möglichkeit der Therapie, vor allem bei multiplen superfiziellen BCC, stellt die topische Applikation von Wirkstoffen wie dem Immunmodulator Imiquimod oder dem Zytostatikum 5-Fluorouracil dar (Hauschild et al. 2008)

Das lokale Immuntherapeutikum Imiquimod 5% wird nach Empfehlung der europäischen Arzneimittelagentur (EMA) einmal täglich an fünf Tagen die Woche, über einen Zeitraum von sechs Wochen appliziert. Der Wirkstoff führt zu einer erhöhten Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon alpha und Tumornekrosefaktor, welche aus Makrophagen freigesetzt werden. Klinisch kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Erythem, Erosion und Krustenbildung welche aber im Allgemeinen ohne Narbenbildung und Residuen abheilt (Geisse et al. 2004). Die Abheilungsraten erscheinen vielversprechend, es liegen jedoch keine

Langzeitstudien vor, so dass in Bezug auf die Rezidivraten keine Vergleiche zu anderen Therapieformen möglich sind (Hauschild et al. 2008)

Das lokale Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil, in Form einer 1-5 % Creme oder Salbe, wird ebenfalls für einen Zeitraum von 4-6 Wochen täglich topisch angewendet. Es wirkt selektiver auf die hyperproliferativen Anteile epidermaler Kanzerosen, führt jedoch über einen Zeitraum von 1-2 Wochen ebenfalls zu einer lokalen entzündlichen Reaktion der Haut. Die Abheilungsrate liegt bei etwa 90 %, mit einem guten kosmetischem Ergebnis (Gross et al. 2007, Tsuji et al. 1993).

Vor allem bei Patienten mit multiplen und oberflächlichen Läsionen, z. B. im Rahmen eines Basalzellnaevussyndroms, stellen diese lokalen medikamentösen Therapieformen eine schonende Alternative zur operativen Therapie dar.

1.1.4.6 Systemische Chemotherapie

Die systemische Chemotherapie eines BCC wird nur im seltenen Fall der Metastasierung vorgenommen. Die Therapie erfolgt mit Cis-platin, eventuell in Kombination mit 5-Fluorouracil. Die Prognose bei metastasierendem BCC ist ungünstig. Als mittlere Überlebenszeit werden 10-20 Monate angegeben (Lo et al. 1991, Hauschild et al. 2008)

1.1.4.7 Prognose

Letale Verläufe sind im Gegensatz zu anderen Tumoren selten. Die Tumore wachsen langsam. Meist ergeben sich lebensbedrohliche Zustände nur bei weit fortgeschrittenem Wachstum (Ulcus rodens, Ulcus terebrans) mit einhergehender Zerstörung tieferliegender wichtiger Gewebestrukturen wie der Arteria carotis und des knöchernen Schädels. Metastasierungen sind sehr selten und in Fallzahlen von 0,003% bis zu 0,55% aufgeführt. Metastasen treten am häufigsten in Lymphknoten, Knochen oder Lunge auf (Robinson, Dahiya 2003).

Für das Basalzellkarzinom werden je nach Therapieform unterschiedliche Heilungsraten nach primärer Therapie von 95-99% angegeben. Bei Rezidivtumoren liegen die Heilungsraten mit ca. 90% niedriger (Rowe 1995).

1.2 Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie

Ziel der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie (MKC) ist eine vollständige Entfernung von malignen Hautumoren. Im Gegensatz zur konventionellen Exzision wird bei diesem Verfahren auf große Sicherheitsabstände bei der Schnitfführung verzichtet. Bei allen Verfahren der MKC wird der Tumor stattdessen anhand seiner klinisch erkennbaren Grenzen ohne großen Sicherheitsabstand exzidiert und das gewonnene Präparat topografisch markiert. Es folgt eine histologische Aufarbeitung im Kryostat- oder Paraffinschnittverfahren und lückenlose Untersuchung der Schnittländer. Die histopathologische Beurteilung der Präparate erfolgt im Idealfall durch den Operateur. Sind in den Randschnitten oder in der Tiefe des Präparats noch Tumorreste erkennbar, kann anhand der vorherigen topografischen Markierung gezielt nachexzidiert werden. Der definitive Defektverschluss erfolgt erst nach histologisch gesicherter Tumorfreiheit der gewonnenen Randschnitte. Ein sofortiger Wundverschluss ist prinzipiell möglich, sofern keine Nachteile für einen möglichen zweiten Eingriff entstehen, ansonsten wird eine provisorische Defektdeckung mit Wundverbänden angestrebt.

Indiziert ist das Verfahren vor allem in Problemlokalisationen, z. B. im Gesichtsbereich, da dort häufig keine ausreichenden Sicherheitsabstände ohne die Verletzung von Nachbarstrukturen eingehalten werden können. Auch bei aggressiv wachsenden Tumoren und aufwändigeren Defektdeckungen ist eine, durch die MKC gewährleistete, histologisch vorab gesicherte restlose Tumorentfernung vorteilhaft. Des Weiteren lassen sich im Rahmen der MKC, aufgrund der kleineren Exzisionsgröße, gute kosmetische Ergebnisse erzielen.

Es existieren zahlreiche unterschiedliche Methoden der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie. Sie unterscheiden sich vor allem in der Schnitfführung und der Art der histologischen Verfahren.

1.2.1 Mohs Surgery

Ein im Jahre 1941 von dem Amerikaner Frederic Edward Mohs erstmals angewandtes chemochirurgisches Verfahren, bei dem zunächst eine schmerzhafte Gewebefixation mithilfe Zinkchloridpaste am Patienten, vor der eigentlichen Exzision, erfolgte. Nachdem im Jahre 1974 die neu entwickelte Kryostatentechnik ein Kryostat-

Schnellschnitt-Verfahren ermöglichte, nannte F. Mohs das Verfahren „Microscopically Controlled Surgery“.

Der Unterschied zu anderen Verfahren der MKC liegt vor allem in der nicht senkrecht, sondern im 45° Winkel zur Hautoberfläche liegenden Schnitfführung. Es entsteht ein kegelförmiges Präparat, welches je nach Größe geteilt, und im Kryostat-Schnellschnitt-Verfahren von der Schnittkante horizontal aufgeschnitten wird. Dabei werden basale und laterale Schnittränder des Gewebestücks so auf eine Gefrierplatte aufgedrückt, dass sie in einer Ebene liegen. Somit können die dreidimensionalen Schnittränder nun in zweidimensionalen Schnitten begutachtet werden (Löser et al 2010).

1.2.2 Münchner Methode

Die Münchner Methode - auch horizontales Verfahren genannt - wurde 1975 von Burg und Konz erstmals publiziert. Im Unterschied zur Mohs Surgery wird bei dieser Methode mit einer horizontalen, zur Hautoberfläche 90° gerichtete, Schnitfführung gearbeitet. Es entsteht ein annähernd zylinderförmiges Exzidat, welches Epidermis, Dermis und Subkutis enthält.

Das zylinderförmige Exzidat wird daraufhin im Kryostaten in Abständen im Mikrometerbereich, beginnend an der Basis, in sequentielle horizontale Stufenschnitte geschnitten. In der histopathologischen Begutachtung kann nun der gesamte Tumor hinsichtlich seiner dreidimensionalen Ausdehnung im Präparat beurteilt werden. Im Gegensatz zu anderen Verfahren der MKC, bei denen nur die Schnittränder der Exzidate beurteilt werden, ist bei dieser Methode für die Begutachtung ein hoher Aufwand durch eine erhöhte Anzahl an Schnitten erforderlich.

1.2.3 3-D Histologie (Randstreifen-Methode)

Die 3-D Histologie fasst eine Vielzahl von Techniken wie die Tübinger Torte (Breuninger 1982), La Galette (Drepper 1963), Flunder oder Muffin-Technik (Möhrle, Breuninger 2006), Square-Procedure (Johnson 1997), Quadranten-Methode (Smeets 2005) und Wallgraben- oder Perimeter-Technik (Blum 2004; Mahoney 2005) unter diesem Oberbegriff zusammen (Löser et al. 2010).

Die einzelnen Techniken unterscheiden sich vor allem in der Art und Reihenfolge der Präparation des Gewebes. Das Ziel ein zylinderförmiges, im rechten Winkel zur Hautoberfläche geschnittenes, Präparat zu erhalten, dessen Ränder zu histologischen Schnitten aufbereitet werden, ist jedoch bei allen Techniken gleich.

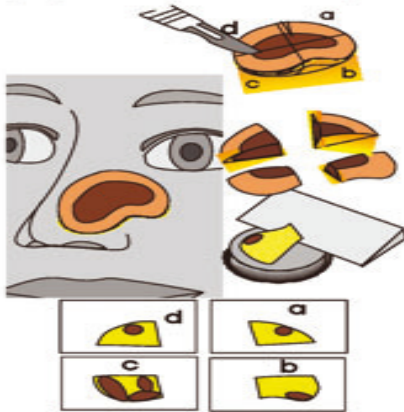
Im Fall der Tübinger Torte wird nach der zylinderförmigen Exzision des Tumors, zuerst eine topografische Markierung in Form eines Fadens am kranialen Pol des Präparats angebracht. Daraufhin erfolgt durch einen zirkulären, parallel zur äußeren Schnittfläche geführten Schnitt die Abtrennung eines Randstreifens, welcher in etwa gleich große Abschnitte geteilt wird. Damit die Tumorfreiheit auch in der Tiefe untersucht werden kann, wird ein zweiter Schnitt parallel zur Hautoberfläche durch die Basis des Präparats geführt.

Bei kleineren Tumoren bis zu einer Größe von 2 cm, kann eine andere Variante der 3-D Histologie, die sogenannte Muffin-Technik, zur Anwendung kommen. Hierbei wird der Rand des Präparats nicht abgetrennt, sondern nur zirkulär eingeschnitten und mithilfe seitlicher Einschnitte nach außen geklappt. Dadurch können die seitlichen Ränder und die Basis des Präparats in eine Ebene gebracht werden und mithilfe eines Schnittes komplett beurteilt werden (Möhrle, Breuninger 2006)

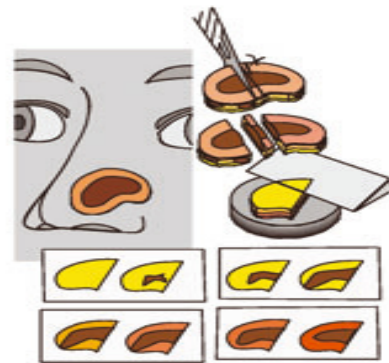
Die histologische Aufbereitung erfolgt in der Regel mit Formalinfixierung und Paraffineinbettung, eine Aufarbeitung im Kryostatverfahren ist jedoch auch denkbar. Da nur Randschnitte betrachtet werden, ist der Aufwand zur Beurteilung geringer als bei der Münchner Methode. Es kann allerdings keine Aussage über die exakte Ausdehnung des Tumors im Präparat getroffen werden.

Abbildung 1: Schemata der verschiedenen Schnitttechniken in der MKC

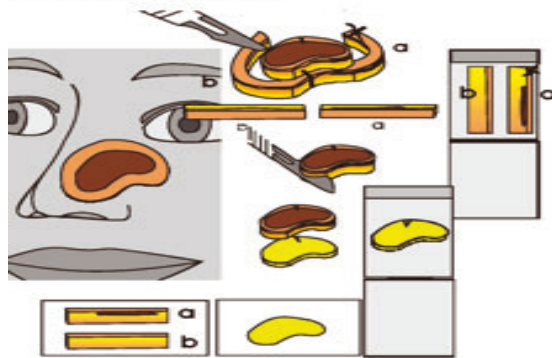
1. Mohs' surgery (cryostat procedure)



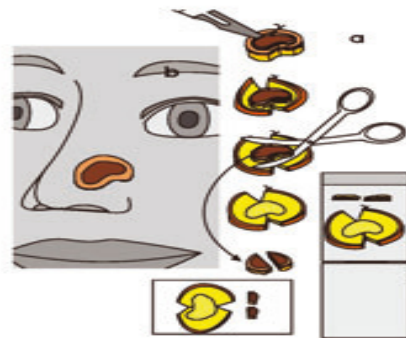
2. horizontal sections



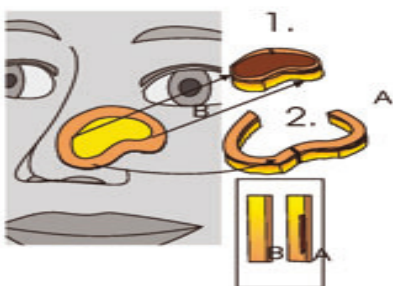
3. Tübinger tort



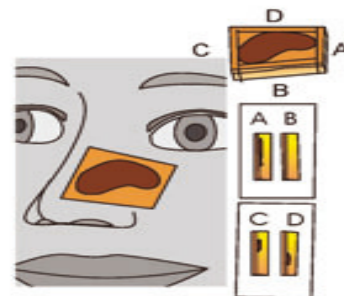
4. Muffin technique



5. La Galette procedure (excision of tumor, then margin)



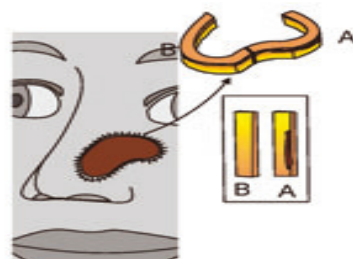
6. square procedure (double-bladed scalpel)



7. quadrant technique (margin sections from fixed tissue)



8. Perimeter or Wallgraben technique



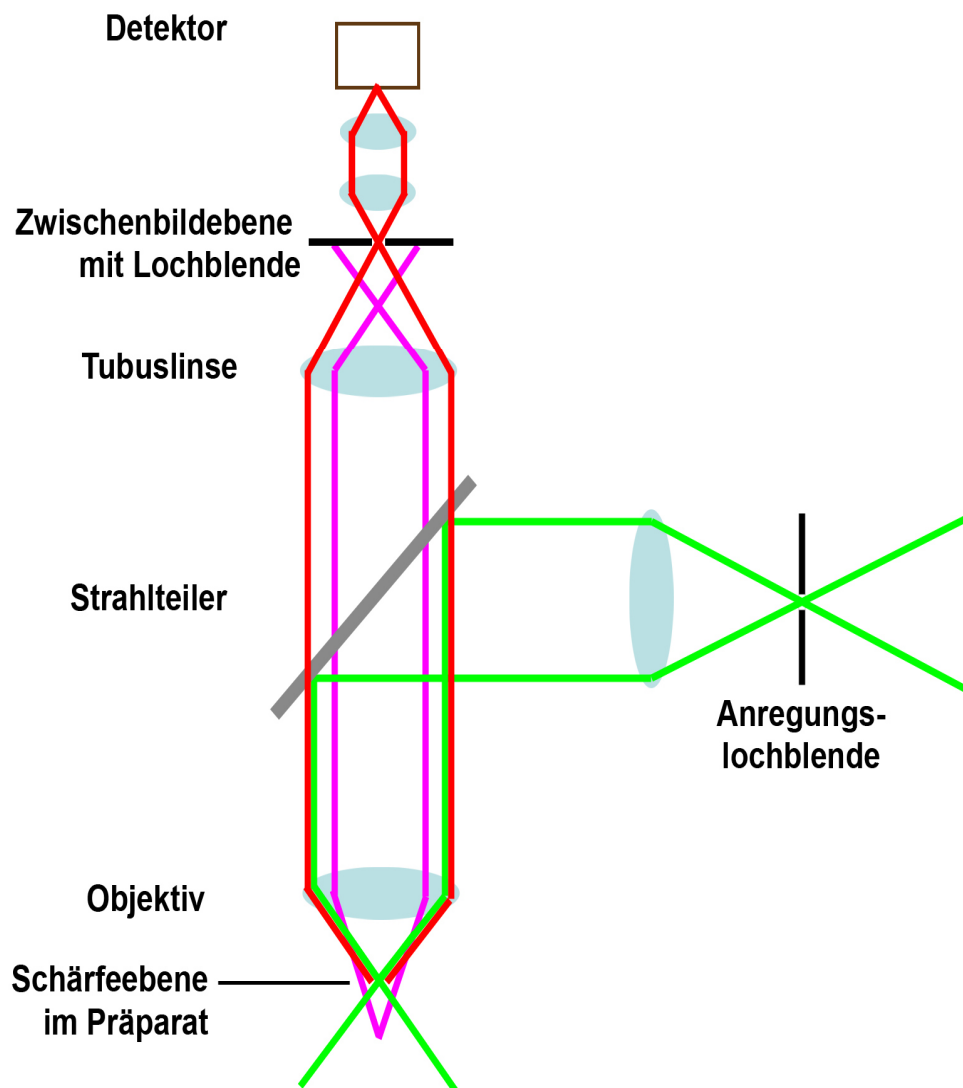
Quelle: Löser et al.: Microscopically controlled surgery (MCS). J Dtsch Dermatol Ges 8 (11)

1.3 Konfokale Lasermikroskopie

1.3.1 Technische Grundlagen

Der Begriff „konfokal“ beschreibt in der Optik das Vorhandensein zweier optischer Systeme, welche denselben Brennpunkt besitzen. Im Fall des konfokalen Mikroskops besitzen der Beleuchtungs- und der Beobachtungsstrahlengang denselben Brennpunkt. Während in einem konventionellen Lichtmikroskop das gesamte Präparat beleuchtet wird, wird in einem konfokalen Mikroskop das im Brennpunkt liegende Präparat mithilfe eines Lichtflecks oder Laserstrahls Punkt für Punkt abgerastert. Durch die die im Präparat liegenden Strukturen kommt es zu einer Reflektion und Streuung des einfallenden Lichtes. Im Anschluss erfolgt eine Konstruktion des Bildes durch das Zusammensetzen der einzelnen Bildpunkte des auf dem Detektor auftreffenden Lichts. Durch den Einsatz einer sehr kleinen Lochblende (Apertur) vor dem Detektor werden die Anteile des Lichts, die außerhalb der Fokusebene liegen, herausgefiltert. Dies bedingt zwar einen nur sehr kleinen scharfen Bildpunkt (geringe Schärfentiefe), bewirkt jedoch dadurch ein hohes Auflösungsvermögen des Mikroskops entlang der optischen Achse. Dieses hohe axiale Auflösungsvermögen erlaubt bei der Erstellung von mehreren Bildern auch ein dreidimensionales Bild der Probe (Cox 2012).

Abbildung 2: Schemazeichnung der Strahlengänge eines konfokalen Mikroskops in Auflichtbauweise



Quelle: www.wikipedia.org

1.3.2 Entwicklung der konfokalen Lasermikroskopie

Das erste Mikroskop welches in konfokaler Bauweise arbeitete, war ein Lichtmikroskop und wurde in den 1950er Jahren von Minsky entwickelt. Es erwies sich aber aufgrund von Problemen mit der Beleuchtung als untauglich. Erst im Jahr 1969 wurde von Davidovids und Egger ein arbeitsfähiges konfokales Mikroskop unter der Verwendung eines Lasers entwickelt.

Die heute am meisten verbreiteten konfokalen Mikroskope sind konfokale-Laser-Scanning-Mikroskope (engl. confocal laser scanning microscope, CLSM). Als Lichtquellen kommen verschiedene Arten von Lasern zum Einsatz. Es existieren

unterschiedliche Laser für Fluoreszenz- oder Reflexionsmikroskopie. Während im Rahmen der Reflexionsmikroskopie meist ein 830nm Infrarotlaser zum Einsatz kommt (Rajadhyaksha et al. 2001), werden in der Fluoreszenzmikroskopie meist Laser mit den Wellenlängen 445nm, 488nm, 658nm und 785nm verwendet. Weitere Unterschiede der Bauart befinden sich in der Art der Abtastung der einzelnen Bildpunkte. Neben Punktscannern, die einzelne Punkte nacheinander aufzeichnen, sind Linienscanner, mit gleichzeitiger Abtastung mehrerer Punkte, im Einsatz.

1.3.3 Einsatz in der Wissenschaft

Die konfokale Laserscanmikroskopie kommt in einer großen Zahl an wissenschaftlichen Fachrichtungen zum Einsatz. Deshalb sei hier nur ein Überblick über die Vielzahl an Einsatzgebieten dargestellt.

Weit verbreitet ist die CLSM vor allem in Biologie und Medizin, durch die Möglichkeiten der Untersuchung von lebendem Gewebe, sowie einem Einsatz mit einer Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen und der Erstellung dreidimensionaler Bilder. Aber auch im Bereich der Materialwissenschaften und der Geologie, in denen der Reflexionsmodus eine größere Rolle spielt.

Verwendung findet die CLSM ebenfalls im industriellen Bereich im Rahmen der Qualitätssicherung, beispielsweise in der Fehlersuche bei Halbleitertechnik.

1.3.4 Einsatz in der Dermatologie

1.3.4.1 Einsatz in-vivo

Durch die bauartbedingte Möglichkeit als Auflichtmikroskop konzipiert zu sein, findet die konfokale Laserscanmikroskopie seit einigen Jahren sehr erfolgreich Anwendung in der nicht invasiven, in-vivo Untersuchung einer ganzen Reihe von verschiedenen oberflächlichen Hautläsionen. Mithilfe handelsüblicher Geräte wie dem VivaScope 1500 (www.vivascope.de) bietet sie eine gute Möglichkeit der Diagnostik und der Verlaufsbeobachtung in Ergänzung zur Auflichtmikroskopie.

Das Gerät erlaubt einen Einblick in die Haut, bis auf die obersten Schichten des Stratum reticulare (www.vivascope.de). Bei einer Schichtdicke von 3 bis 5 μm (axiale Auflösung) und einer lateralen Auflösung von 0,5 – 1 μm (Rajadhyaksha et al. 1995;

Rajadhyaksha et al. JID 1999; Rajadhyaksha et al. Applied Optics 1999). Zur Bildabtastung im Reflexionsmodus dient meist ein 830 nm Infrarotlaser. Hierbei bilden die unterschiedlichen Brechungsindizes von zellulären Mikrostrukturen, Kollagen, Melanin und Hämoglobin das „endogene“ Kontrastmittel. Im Unterschied zu der in dieser Studie „ex-vivo“ vorgenommenen Vorbehandlung der Gewebe mit Zitronensäure („acetowhitening“, vgl 3.2.2.1), stellen sich die Zellkerne aufgrund der fehlenden Kompaktierung des Chromatins hier dunkel dar (Rajadhyaksha et al. 2001; Chung et al. 2004). Der hohe Brechungsindex der Hautoberfläche wird durch die Nutzung eines Immersionsmediums, meist Öl oder wasserbasierte Gele, reduziert. Bei Geräten wie dem Vivascope 1500 Multilaser besteht, neben der Möglichkeit der Betrachtung im Reflexionsbereich bei 830 nm und 785 nm, die Option weitere Wellenlängen von 488 nm und 658 nm zur kombinierten oder alleinigen Fluoreszenzdiagnostik zu nutzen. Als topisch oder intrakutan gespritzte Fluorophoren kommen hierfür Methylen- und Patentblau, sowie Indocyaningrün in Frage.

Bei der Untersuchung von Tumoren dient die CLSM vor allem der Unterscheidung und Einstufung von benignen melanozytären Veränderungen und dem malignen Melanom. Aufgrund des „Kontrastmittels“ Melanin lassen sich diese Veränderungen gut darstellen. Aber auch Tumore wie das Basalzellkarzinom lassen sich anhand typischer Veränderungen in der CLSM erkennen. Dazu zählen laut der S1-Leitlinie „Konfokale Lasermikroskopie in der Dermatologie“: elongierte, monomorphe Zellkerne, Polarisierung dieser Zellen entlang einer Achse, ausgeprägtes Entzündungsinfiltrat, vermehrte sowie dilatierte Gefäße und Verlust der epidermalen Honigwabenstruktur (Nori et al. 2004) und Inseln in der Dermis von Tumorzellen mit peripherer Palisadenstellung (González et al. 2002; Goldgeier et al. 2003; Willard et al. 2011; Schüle et al. 2009; Sauermann et al. 2002; Patel et al. 2007; Agero et al. 2006; Segura et al. 2007; Ruocco et al. 2004; Marra et al. 2005). Beim intraoperativen in vivo Einsatz der CLSM in der MKC erwies sich Aluminiumchlorid als kontrastverstärkend. Neben seinen hämostatischen Eigenschaften, erzeugte es einen verbesserten Kontrast der Tumorzellen gegenüber dem umliegenden Gewebe (Tannous et al. 2003)

Zum Einsatz kommt die CLSM auch bei aktinischen Keratosen und dem Plattenepithelkarzinom, wobei hier häufig hyperkeratotische Bezirke eine genaue Betrachtung der Läsionen erschwert (Eichert et al 2010). Ebenso lassen sich

Verlaufskontrollen bei konservativer Therapie z. Bsp. mit Imiquimod mithilfe der CLSM durchführen (Goldgeier et al 2003).

Starke Nutzung erfährt die CLSM auch in der Untersuchung entzündlicher Dermatosen wie dem akutem Kontaktekzem und der Psoriasis (Swindells et al. 2004; Hicks et al. 2003; Astner et al. JAAD 2006; Astner et al. Dermatitis 2006; Ardigo et al. 2009; Koller et al. 2009; Sauermann et al. 2002).

Weitere Einsatzgebiete und Gegenstand aktueller Studien sind die Beobachtung mikrovaskulärer Veränderungen der Haut (Altintas et al. 2009), Erregerdiagnostik bei Pilzinfektionen (Meyer et al 2005) und bei Parasitenbefall wie Scabies (Longo et al Arch. Dermatol 2005), sowie in der kosmetologischen Forschung die Objektivierung und Quantifizierung von Therapieeffekten (Sauermann et al. 2002; Yamashita et al. 2007; Ulrich et al. 2009; Middelkamp-Hup et al. JID 2006).

1.3.4.2 Einsatz ex-vivo

Die Anwendungsgebiete von ex-vivo Geräten, wie dem Vivascope 2500 (www.vivascope.de), sind derzeit nicht so vielfältig und weniger untersucht als die Anwendung auf lebendem Gewebe. Hauptsächlicher Gegenstand der Untersuchungen ist die Praktikabilität der Untersuchung von Gewebeschnitten aus der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie. (Chung et al. 2004; Kaeb et al. 2009; Patel et al. 2007; Schüle et al. 2009; Ziefle et al. 2010; Karen et al. 2009; Gareau et al. 2012). Hierbei werden die Außenseiten der Schnitte mit maximalen Eindringtiefen von ca. 200 µm, bei gleichen axialen und lateralen Auflösungsvermögen wie in der in-vivo Methode, auf Tumorreste untersucht. In einer Studie von 2004 konnten Chung et al. erstmals beim Vergleich von 92 konfokalen Bildern von BCC mit Aufnahmen der konventionellen Histopathologie eine Korrelation in 67 Bildern aufzeigen. Sie nutzten für diese Studie ein Vivascope 2000 im Reflexionsmodus bei 830 nm.

Im Jahr 2007 fanden Al-Arashi eine Möglichkeit der Verbesserung des Verfahrens durch die Nutzung des Fluoreszenzmodus und einer Färbung von Methylene- oder Toluidinblau. In der Fluoreszenztechnik bei einer Wellenlänge von 445 nm wurden bisher ebenfalls Studien mit dem Farbstoff Acridinorange durchgeführt, welche die Kontrastwiedergabe der Nuclei deutlich verbesserte (Karen et al 2009). Es ergaben sich eine Spezifität und Sensitivität für das Auffinden von Tumorgewebe, von 89,2 %

bzw. 96,6 % im Vergleich zur konventionellen Histologie. Etwas schlechtere Werte ergaben sich für in der Reflexionstechnik durchgeführte Untersuchungen von Schüle et al 2009, Käß et al 2009 und Ziefle et al 2010. Bei den im Reflexionsmodus durchgeführten Untersuchungen diente zur Kontrastverstärkung nur eine Proteinfällung („acetowhitening“) mithilfe von Essig- oder Zitronensäure.

Gareau et al zeigten in einer Versuchsreihe von 2009 eine neue Variante bei der ex-vivo Untersuchung von BCC auf indem sie Reflexions- und Fluoreszenz-CLSM kombinierten. Zellkerne wurden im Fluoreszenzmodus erfasst, während kollagene Fasern und Cytoplasma im Reflektionsmodus erfasst wurden. Eine Software erzeugte aus den Schwarz zu Weiß kontrastierten Bildern anschliessend digital Lila zu Pink gefärbte Bilder. Dies sollte die konfokalen Bilder im Erscheinungsbild noch stärker an die Bilder der konventionellen Histologie annähern.

Abeytunge et al veröffentlichten 2013 eine Methode um auch größere Tumore in der CLSM deutlich schneller zu erfassen und damit einer intraoperativen Nutzung der ex-vivo CLSM eine noch höhere Praktikabilität zu verleihen. Grundlage der Untersuchung war ein mechanisch und in der Datenverarbeitung modifiziertes Vivascope 2000, welches anstelle von quadratischen Einzelbildern das Gesamtbild aus kleineren rechteckigen Streifen erzeugte („strip-mosaicing“). Außerdem kam ein modifizierter Objektisch mit einem Wasser gefüllten Ballon zur Erzielung einer gleichmäßigeren Auflage auch großer Gewebeproben auf dem Objektträger zum Einsatz. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass sich mithilfe einiger Veränderungen an Software und Mechanik deutliche Verbesserungen des Zeitaufwandes, bei gleichzeitig akzeptabler Bildqualität, erzielen lassen. In einer Untersuchung der Methode des „strip-mosaicing“ auf ihre Umsetzbarkeit erreichten Larson et al 2013, bei der Begutachtung von 34 Gewebeproben mit BCC eine Spezifität von 89,2 % und eine Sensitivität von 96,6 % bei deutlich schnelleren Zeiten für die Erstellung der Bilder.

1.3.5 Alternativen zur CLSM in der MKC

In einer 2011 veröffentlichten Studie zeigten Moehrle et al einen alternativen Weg zur schnellen Diagnostik mithilfe der CLSM auf. Mit der sog. „Rapid Lump Examination“ Methode, wurden unter Benutzung verschiedener Lichtmikroskope und eines

Färbeprotokolls mit Toluidinblau 207 Proben auf BCC untersucht. Die Sensitivität und Spezifität erreichten hierbei Werte zwischen 90 % und 94 %.

Genutzt wurden hierfür sowohl ein digitales Mikroskop, sowie ein Stereomikroskop mit polarisiertem Licht, um Lichtreflexe der Präparatoberfläche zu minimieren. Zur besseren Handhabung der Präparate kam ebenfalls ein baulich veränderter Objektträger zum Einsatz.

Zusätzlich zur Färbung mit Toluidinblau und Essigsäure, mit einem Zeitaufwand von nur 95 Sekunden, erprobten Moehrle et al eine immunhistologische Färbung mit dem für BCC hochspezifischen Antikörper BerEp4 und Hämatoxylin, welche ca. 7 Min Vorbereitungszeit benötigte. Es konnte die Machbarkeit einer immunhistologischen Färbung an frischem Gewebe in einem akzeptablen Zeitfenster dargestellt werden, allerdings stehen Untersuchungen zu einer Verbesserung der Diagnosegenauigkeit, die hiermit erzielt werden kann, noch aus.

2 Fragestellung

Die Aufgabe dieser Studie ist eine Validierung des Farbstoffs Nilblau zur Anfärbung von Schnitten des Basalzellkarzinoms aus der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie in der Untersuchung am konfokalen Laserscanmikroskop bei Nutzung eines Lasers mit 658 nm. Welche Kontrastverstärkung ist mit dem Fluorophor Nilblau erreichbar? Wie gut lassen sich Tumorausläufer in Randschnitten, im Vergleich zur konventionellen Histologie diagnostizieren?

Vor der Durchführung dieser Studie wurde ein Antrag bei der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg eingereicht und bewilligt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Präparate

Für diese Arbeit wurden 49 Exzisionen von Basalzellkarzinomen untersucht. Die häufigsten Entnahmestellen waren für das BCC typische Lokalisationen wie Oberlippe, Nase, Schläfe und Stirn.

Begutachtet wurden außerdem 7 Exzisionen von anderen Tumorarten wie Spinaliom, Fibroxanthom und Morbus Bowen, sowie 14 weitere Basalzellkarzinome. Die letztgenannten 21 Präparate wurden jedoch aufgrund einer nicht möglichen Betrachtung aller Randstreifen nicht zur Auswertung hinzugezogen.

3.1.2 Chemikalien und Materialien

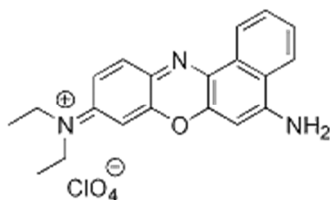
3.1.2.1 Citronensäure (10%)

Citronensäure in Aqua dest. gelöst mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml.

3.1.2.2 Nilblau (20%)

Nilblau, (5-Amino-9-(diethylamino)benzo[a]phenoxazin-7-ium) (Color Index 51180) in 70% Ethanol gelöst mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml.

Abbildung 3: Nilblau



Quelle: www.wikipedia.org

Gelöst in Alkohol zeichnet sich Nilblau durch ein Emmissionsmaximum bei 667 nm und ein Absorptionsmaximum von 628 nm aus (Jose, Burgess 2006). Neben den weiteren Eigenschaften einer guten Anfärbung von Zellkernen und elastischen Fasern, sowie einer geringen Toxizität, ist dieser Farbstoff somit gut für die CLSM Untersuchung mit einem Laser bei 658 nm Wellenlänge geeignet.

3.1.2.3 Natriumchloridlösung (0.9%)

Natriumchlorid in Aqua dest. gelöst mit einer Konzentration von 9 g/l

3.1.2.4 Formalin (4 %)

Formaldehyd in Wasser gelöst, mit Zusatz von Methanol

3.1.2.5 Geliperm

Geliperm Feuchtgelplatte, Wundverband 96% Aqua dest. in Netz aus Polyacrylamid und Polysacharid (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz)

3.1.3 Konfokales Lasermikroskop

Für diese Arbeit wurde ein im Handel erhältliches konfokales Laserscanmikroskop, in Auflichtbauweise verwendet (VivaScope 2500 Multilaser, Lucid Inc., Rochester) (Vertrieb in Deutschland durch die Firma MAVIG GmbH, München).

Abbildung 4: VivaScope 2500, Fa. MAVIG,



Quelle: www.vivascope.de

Das Mikroskop verfügt als Lichtquelle über einen Infrarotlaser mit einer Wellenlänge von 830 nm oder 758 nm, für den Reflexionsmodus, sowie über zwei weitere Laser bei 658 nm (rot) und 488 nm (blau). Die Laser bei 658 nm und 488 nm ermöglichen einen Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, wie beispielsweise Methyleneblau,

Acridinorange oder Fluorescein. Das eingebaute Objektiv (Lucid StableView) ist ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer 30fachen Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 0,9. Als Immersionsmedium diente ein handelsübliches Ultraschallgel. Die optische Auflösung wird vom Hersteller horizontal mit weniger als 2 μm , in der vertikalen mit weniger als 5 μm , bei einer Eindringtiefe bis von bis zu 350 μm , angegeben.

Da bei Vorversuchen zu vorherigen Versuchsreihen (Käb et al 2011), der mit dem Gerät serienmäßig verbaute Objektträger, mit zwei Metallklammern, nur einen unzureichenden und ungleichmäßigen Anpressdruck des Präparats erlaubte, kam eine in der Universität Regensburg entwickelte Eigenkonstruktion zum Einsatz. Diese Konstruktion ermöglicht es, mithilfe eines über Schrauben befestigten Deckglases, einen gleichmäßigeren Anpressdruck auf die Probe auszuüben.

Das Gesamtbild wird aus Einzelbildern mit einem Ansichtsbereich von 500 x 500 μm zusammengesetzt. Es kann ein Bildfeld von maximal 16 x 16 mm abgebildet werden. Die Bilder wurden in Form einer Rastergrafik im Windows Bitmap Format (BMP) mit einer Bildauflösung von 1000 x 1000 Pixeln gespeichert. Die Verarbeitung und Begutachtung der Bilder erfolgte mit der Software VivaScan (Version 7)

Abbildung 5: Modifizierter Objektisch für Vivascope 2500

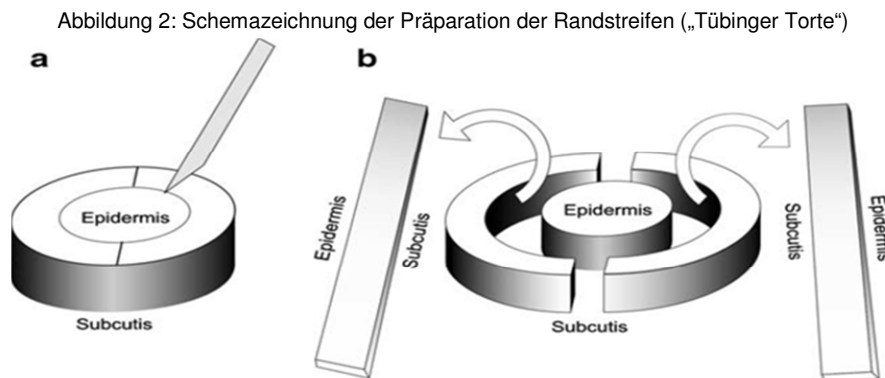


3.2 Methoden

3.2.1 Erstellung der Präparate

Das Tumorgewebe wurde von den Operateuren am Stück und nahezu zylindrischer Form exzidiert. Danach erfolgte eine Zerlegung des Präparats nach den Vorgaben der Tübinger Randschnittmethode („Tübinger Torte“, vgl. Kap 1.2.3.3).

Abhängig von der Größe des Präparats entstanden hierbei mehrere Randstreifen, sowie einen restlichen aus der Mitte stammenden Teil, welcher zur Tiefe hin untersucht wurde. Bei Nachexzisionen war meist nur ein einzelner Gewebestreifen zu begutachten.



Quelle: Kaeb S, et al.: Confocal laser scanning microscopy. Lasers Med Sci 24

Die einzelnen Randstreifen und der mittlere Anteil wurden auf einer Kompresse gelegt und mit Nummern beschriftet. Die Streifen wurden immer mit dem Exzisionsrand zur Kompresse hin aufgelegt. Zusammen mit einer separat erstellten Skizze des OP-Gebiets wurde so die exakte topographische Zuordnung sichergestellt.

3.2.2 Vorbereitung der Präparate

3.2.2.1 Färbemethode

Die Vorbehandlung der einzelnen Gewebestücke erfolgte zeitnah nach der Operation. Vor der Anfärbung wurde mithilfe eines wasserfesten handelsüblichen Filzstiftes, eine kleine Markierung an einer Seite der Probe aufgetragen, um nach der Untersuchung am Mikroskop eine fehlerfreie Reponierung der Probe auf die Kompresse sicherzustellen. Dann wurden die Proben 60 s in Citronensäure 10%

vorbehandelt, um das in den Zellkernen enthaltene Chromatin zu verdichten und eine verbesserte Darstellung der Zellkerne zu erhalten. Durch die Kompaktierung des Chromatins kommt es zu einer hellen, deutlich kontrastreicherer Darstellung der Zellkerne. Die verdünnte Säure verändert die Bildqualität der anschließenden konventionellen Histologie nicht (Rajahyaksha et al. 2001; Chung et al. 2004).

Nach sorgfältiger Spülung mit Natriumchloridlösung 0,9% folgte die Färbung in Ethanol 70% gelöstem Nilblau für 120 s. Darauf erfolgte eine zweite Spülung mit Natriumchloridlösung 0,9%, welche auch auf der Probe belassen wurde und als Immersionsmedium diente.

Jedes Präparat wurde einzeln gefärbt und danach sofort mikroskopiert. Die genaue Einhaltung der Färbezeiten erfolgte mithilfe einer Stoppuhr.

3.2.2.2 Aufbringung auf Objektträger

Das Gewebe wurde im noch im feuchten Zustand auf den Objektisch aufgebracht. Vor Aufbringung der Deckplatte wurde jede Probe mit einer, auf die Größe der Probe zugeschnittenen, Geliperm Feuchtgel Platte (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz) bedeckt. Dieser Vorgang verbesserte, in Kombination mit dem veränderten Objektträger (vgl. Kap 3.1.3), die Gleichmäßigkeit des Auflagedrucks auf dem Objektisch.

3.2.3 Scannen im konfokalen Lasermikroskop

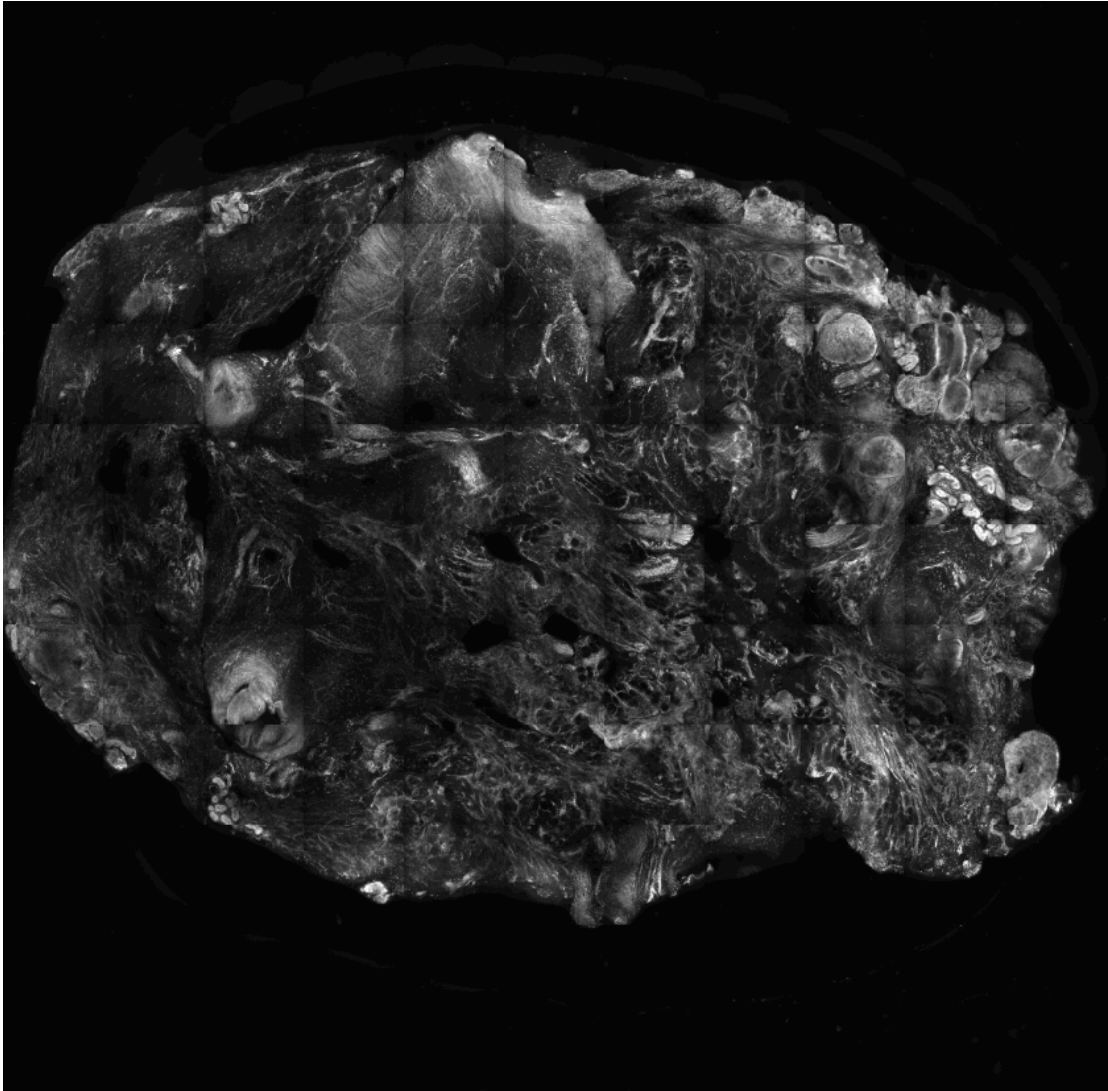
Der Scanvorgang erfolgte mit dem Laser bei 658 nm. Über die Software des Mikroskops wurden Fokustiefe (Fokussierung), die Laserleistung (Helligkeit), sowie Startpunkt und Größe des Scanvorgangs manuell eingestellt. Das Mikroskop erstellte Einzelbilder von 0,5 x 0,5 mm. Diese wurden schon während des Scannens durch die Software zu einem maximal 16 x 16 mm messenden Gesamtbild zusammengefügt und in dieser Form („VivaBlocks“) gespeichert. Je nach Größe des Präparats waren mehrere Scanvorgänge und eine manuelle Verschiebung erforderlich um das komplette Präparat erfasst zu haben.

Nachdem alle Randschnitte und die Tiefe der jeweiligen Exzision nacheinander untersucht worden waren, wurde alles sofort der konventionellen Histologie zugeführt um Verzögerungen im normalen Ablauf der MKC zu vermeiden.

Abbildung 6: Randschnitt in der Übersichtsansicht, Größe ca. 4 x 6,5 mm



Abbildung 7: Übersicht der Aufnahme der Tiefe einer Probe, Größe ca. 6 x 5,5 mm



3.2.4 Auswertung der Bilder

Die einzelnen VivaBlocks wurden auf das Vorhandensein von Tumorgewebe untersucht. Waren in einem Randschnitt Tumorreste nachweisbar wurde der Randschnitt mit positiv gekennzeichnet. Bei tumorfreien Randschnitten dagegen als negativ. Die Auswertung der Bilder erfolgt zuerst durch mich, jedes Bild wurde aber auch von Prof. Dr. U. Hohenleutner, als erfahrener Histologen, überprüft.

Unabhängig von der Befundung am konfokalen Mikroskop erfolgte die konventionelle histologische Aufbereitung der Gewebeproben mithilfe von Gefrierschnitten. Es konnte kein Einfluss der Nilblau-Färbung auf die nachfolgende Bearbeitung der Proben bei der konventionellen histologischen Aufbereitung festgestellt werden. Nach dem Vorliegen der dort entstandenen Präparate wurden die Ergebnisse verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie des gesunden Gewebes

Bei den konfokalen Aufnahmen, der mit Nilblau eingefärbten Proben, entstanden zumeist sehr detail- und kontrastreiche Bilder mit einer hohen Deckungsgleichheit zu den Bildern der darauffolgenden Lichtmikroskopie.

Während das Zytoplasma sehr dunkel wiedergegeben wurde, stellten sich die hellen Zellkerne in den Vordergrund. Dies förderte eine sehr kontrastreiche Darstellung zellreicher Strukturen. Sowohl unterschiedliche Schichten der Epidermis, als auch Blutgefäße, Fettzellen, Muskelfasern und Hautanhangsgebilde, wie Schweiß- und Talgdrüsen, sowie Haarfollikel, waren meist voneinander gut abzugrenzen. Kontrastreich wurden auch die kollagenen und elastischen Fasern der Dermis dargestellt.

Abbildung 8: Gesunde Haut, Epidermis und Dermis, Größe ca. 0,5 x 0,5 mm

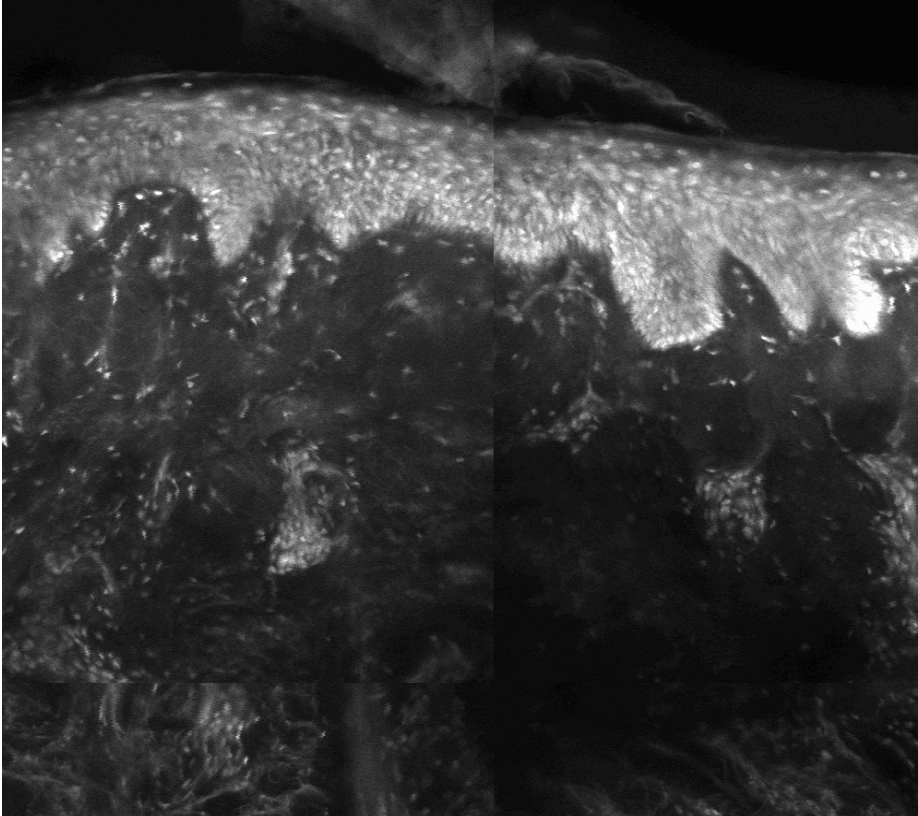


Abbildung 9: Fettzellen und Bindegewebe, Größe ca. 0,5 x 0,5 mm

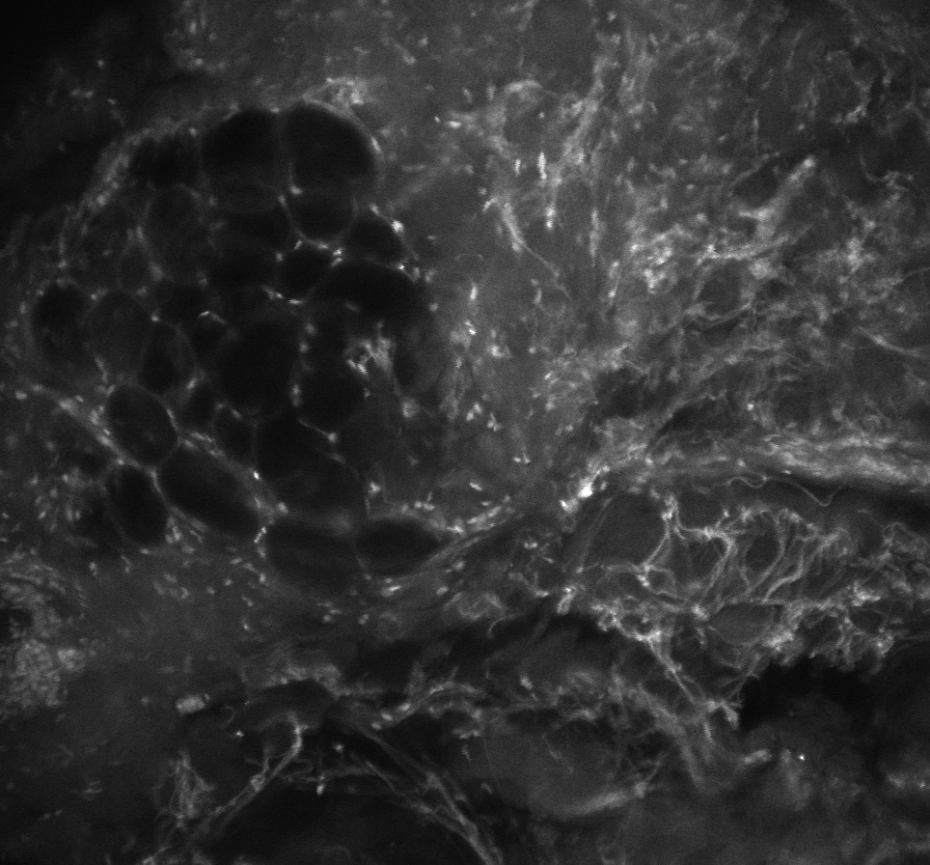


Abbildung 10: Querschnitt eines Blutgefäßes mit Fettgewebe, Größe ca. 0,5 x 0,5 mm

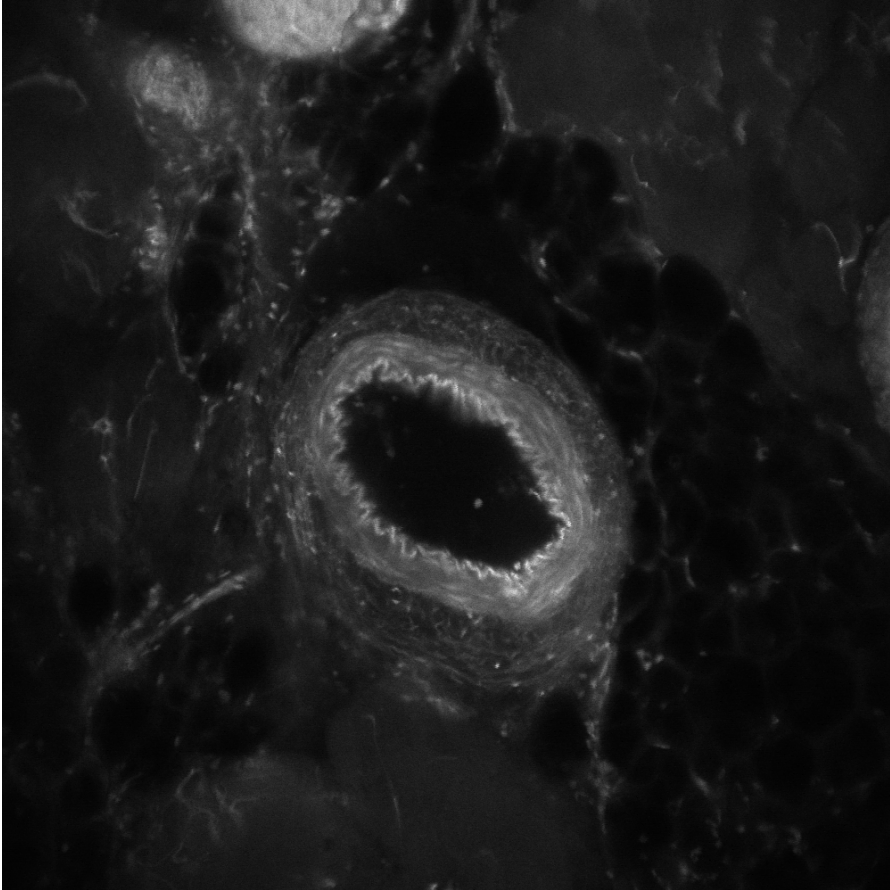


Abbildung 11: Muskelfasern, quer- und längsgeschnitten, Größe ca. 1 x 1 mm

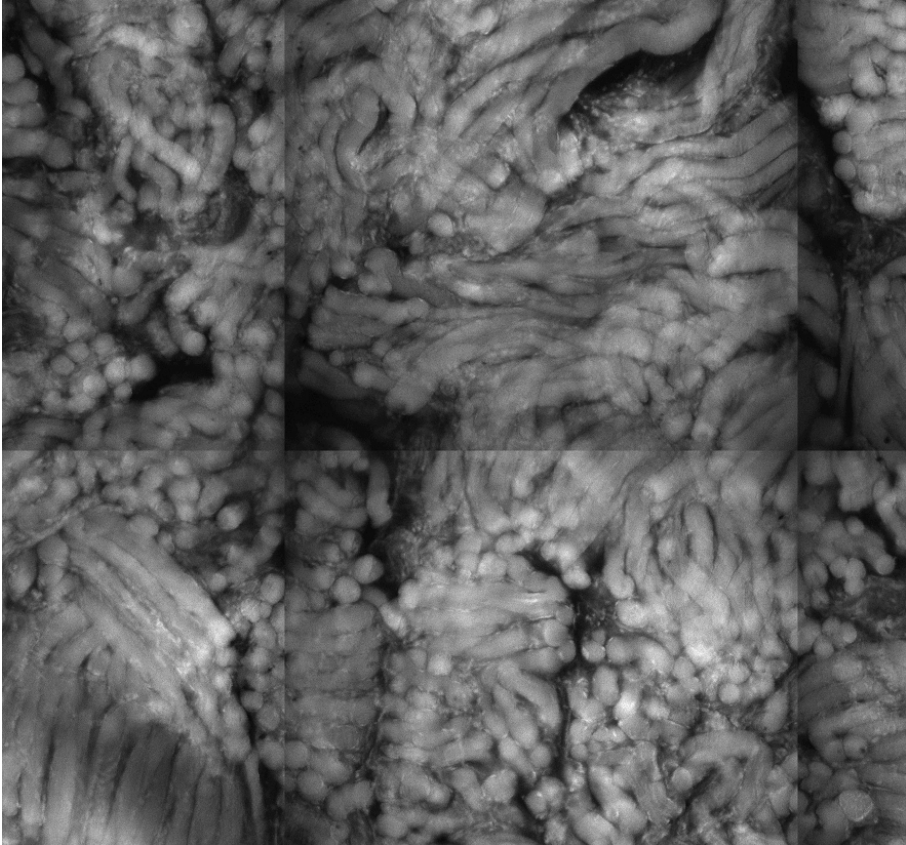


Abbildung 12: Talgdrüsen und Haarfollikel, Größe ca. 1,5 x 1,5 mm

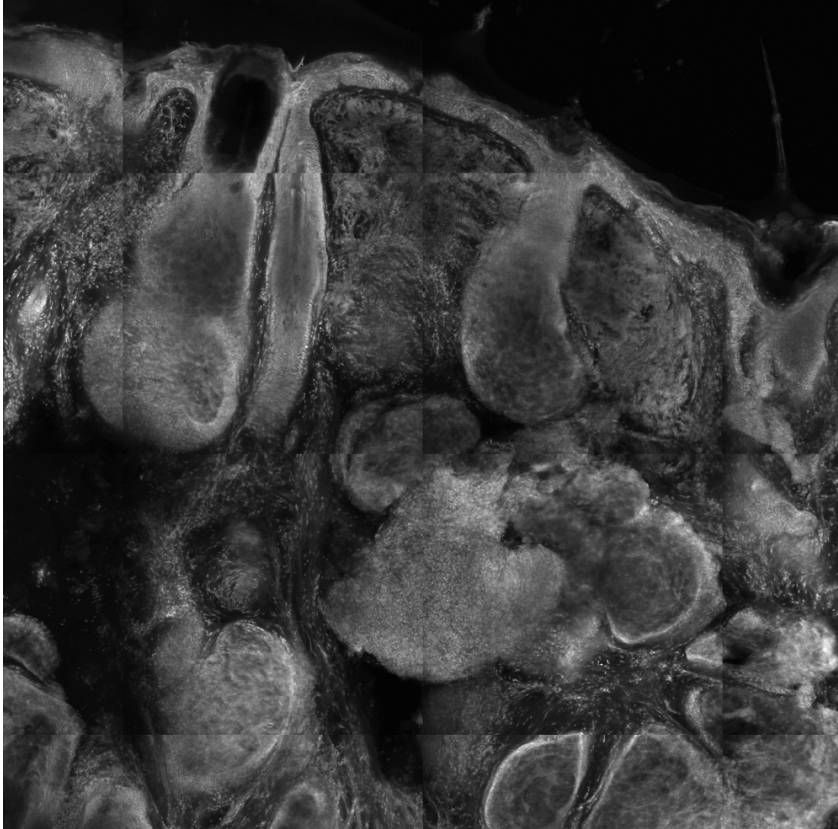


Abbildung 13: Talgdrüsen und Haarfollikel, Größe ca. 1,5 x 1,5 mm



Abbildung 14: Talgdrüsen, Größe ca. 1,25 x 1,25 mm



Abbildung 15: Detailansicht Drüsengewebe, Größe ca. 0,5 x 0,5 mm

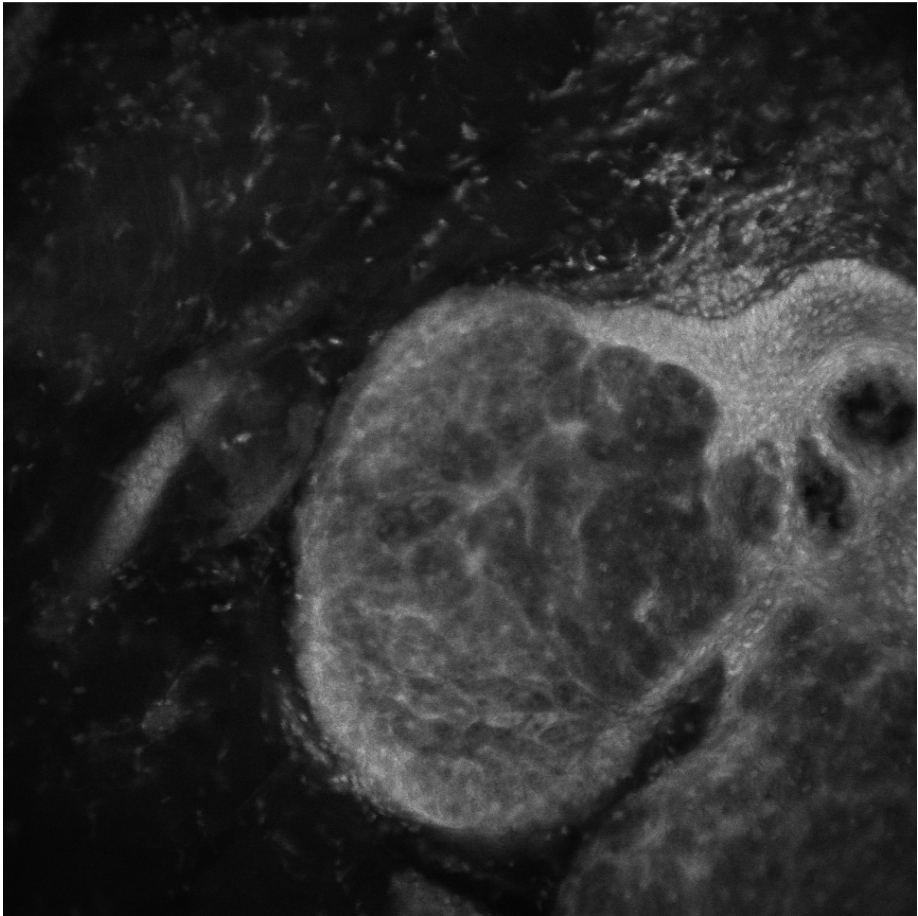
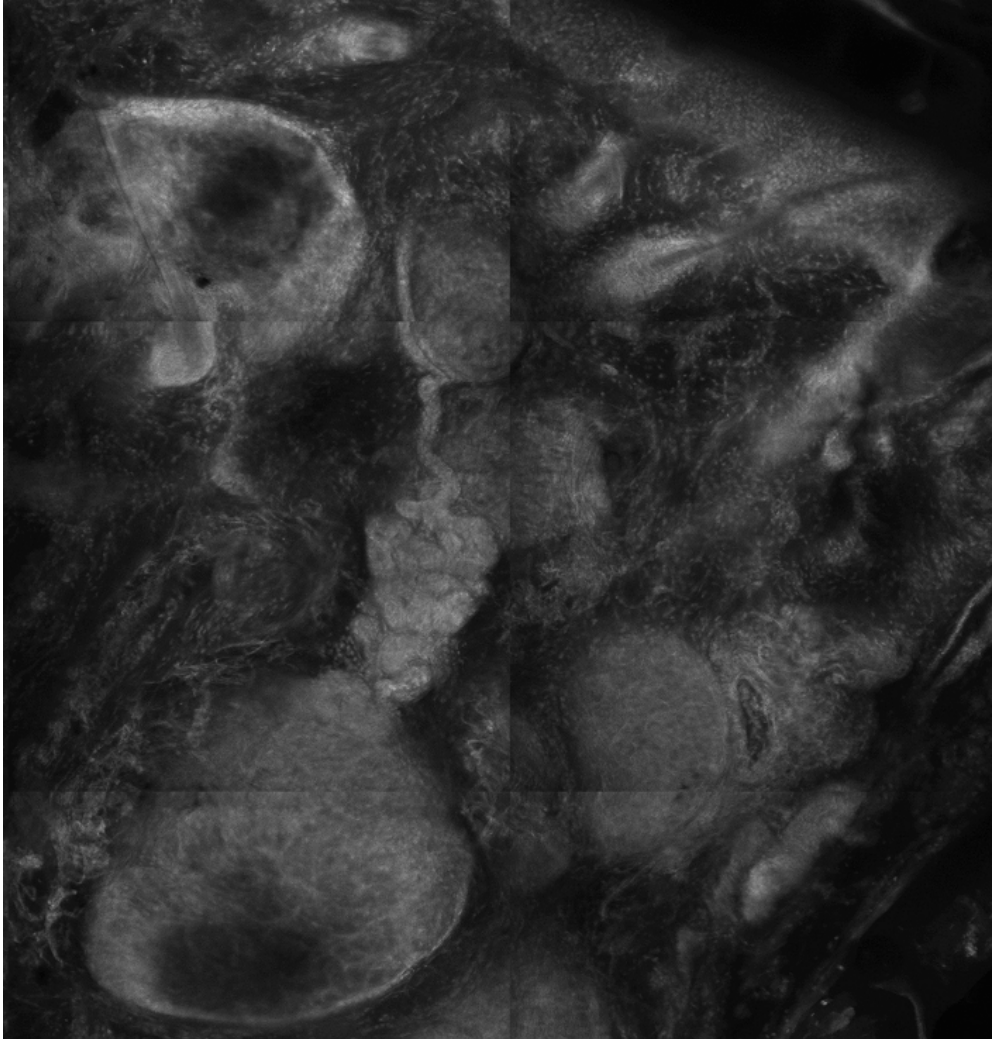


Abbildung 16: Schweißdrüse mit Ausführungsgang, Größe ca. 1 x 1,5 mm



4.1.1 Aufnahmen von CLSM und konventioneller Histologie im Vergleich

Die folgenden Bildpaare aus drei unterschiedlichen Präparaten zeigen eine hohe Deckungsgleichheit - mit Ausnahme der Färbung - zwischen den in CLSM und den in einer konventionellen histologischen Färbung im Lichtmikroskop erstellten Aufnahmen. Gleichartige Strukturen lassen sich in beiden Bildtypen gut identifizieren.

Abbildung 17: Basalzellkarzinom, HE Färbung, konventionelle Histologie

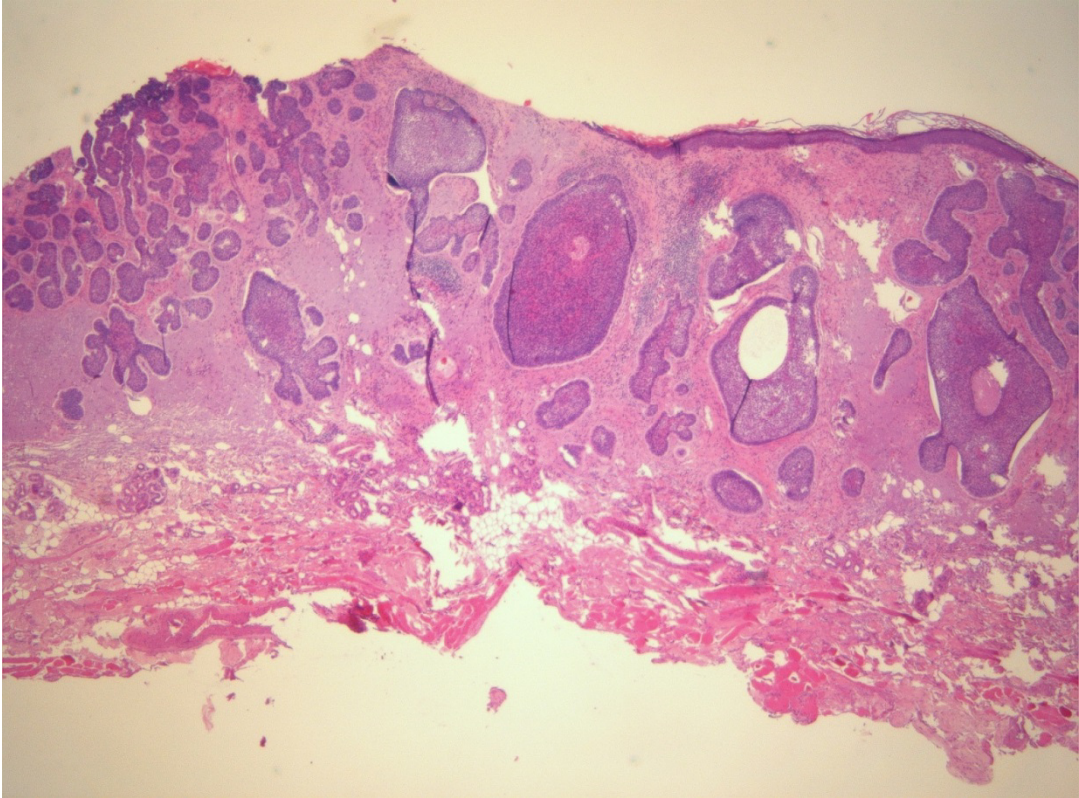


Abbildung 18: Basalzellkarzinom, CLSM

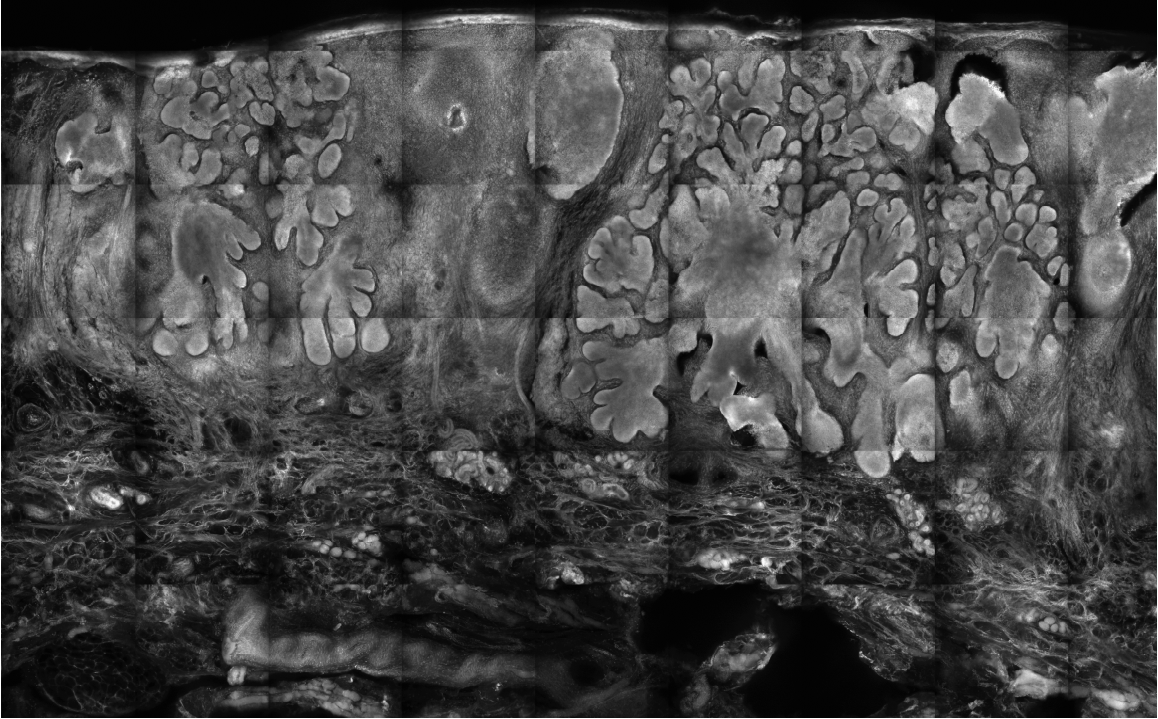


Abbildung 19: Basalzellkarzinom, HE Färbung, konventionelle Histologie

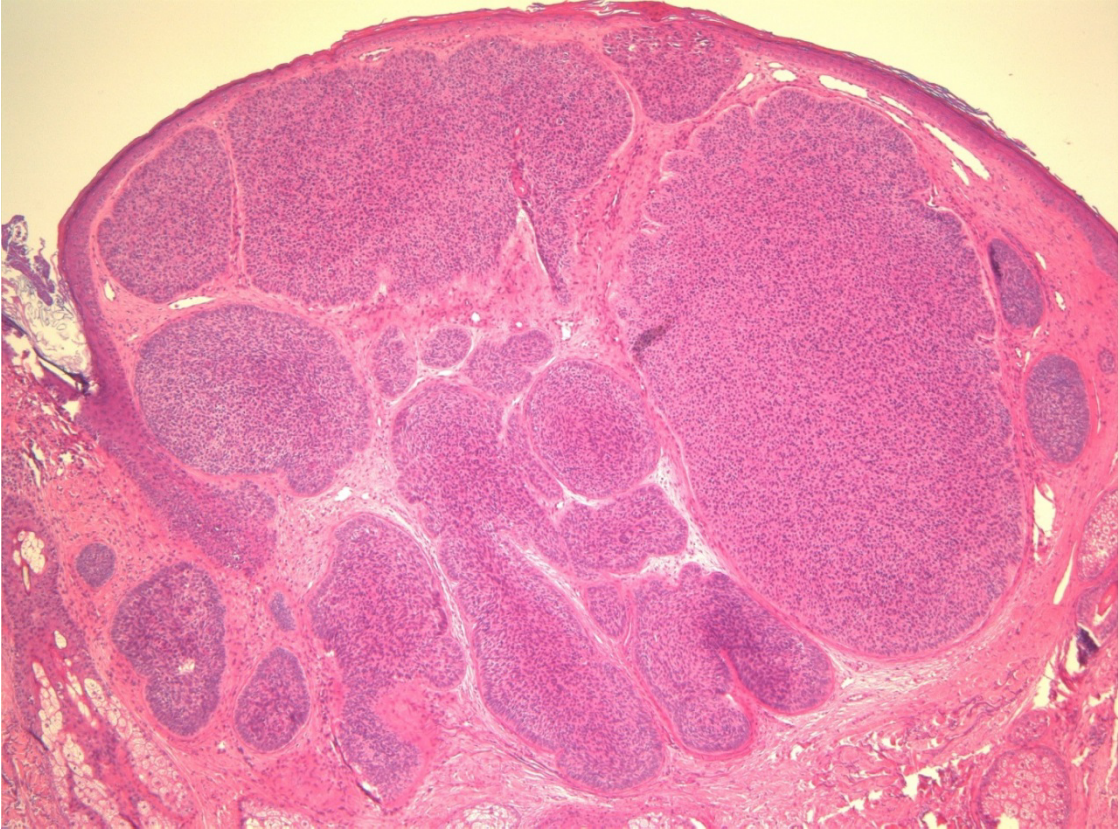


Abbildung 20: Basalzellkarzinom, CLSM

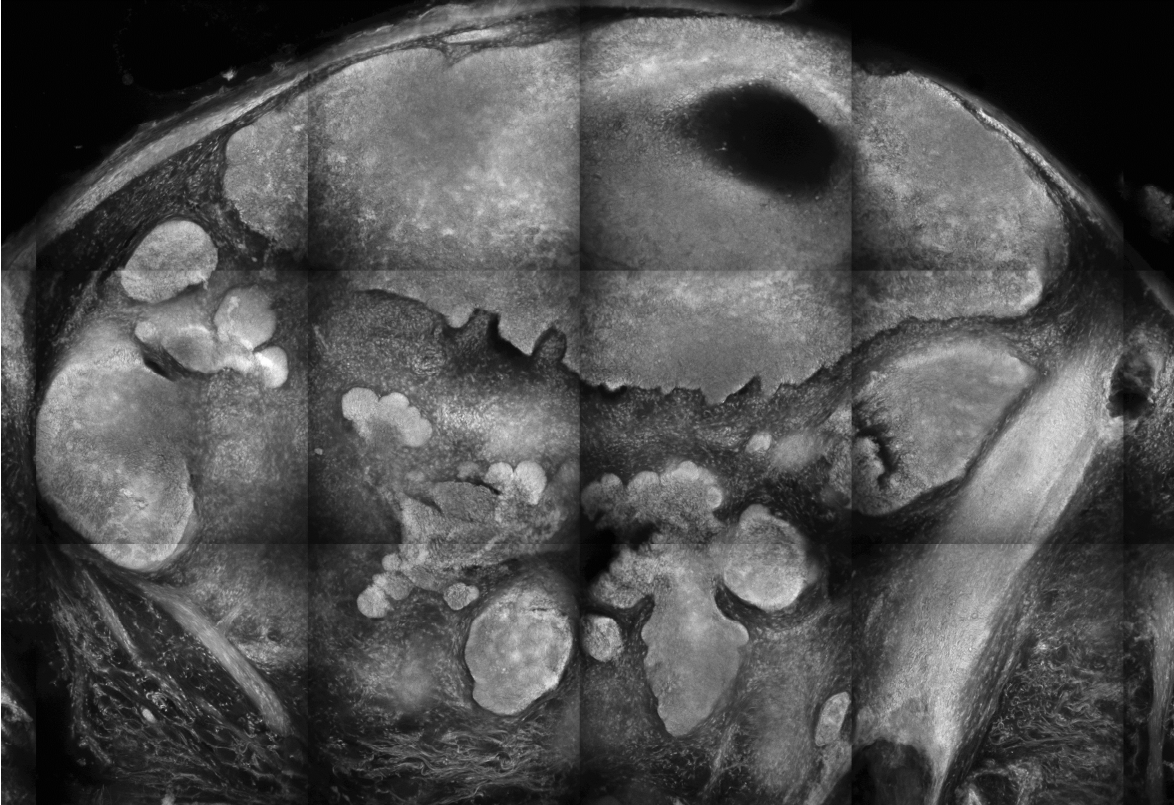


Abbildung 21: Basalzellkarzinom, HE Färbung, konventionelle Histologie

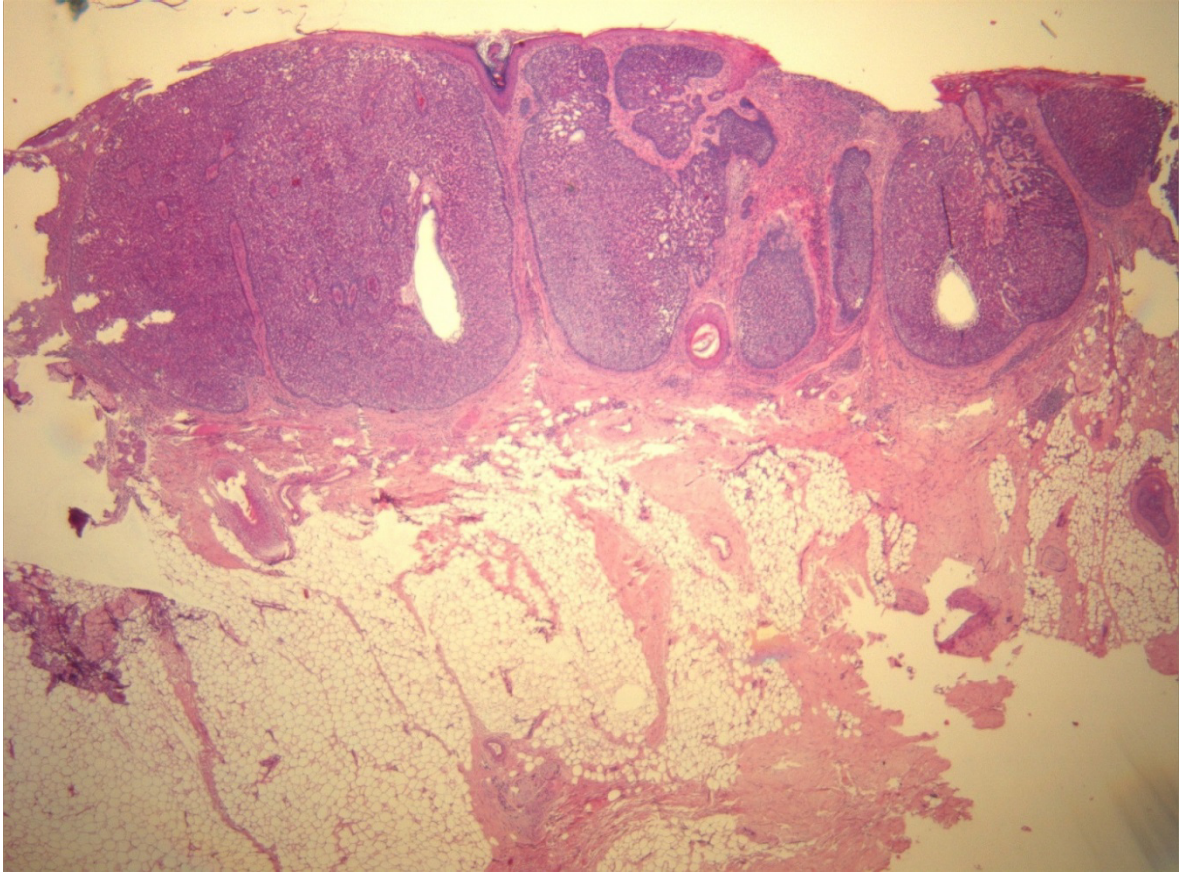
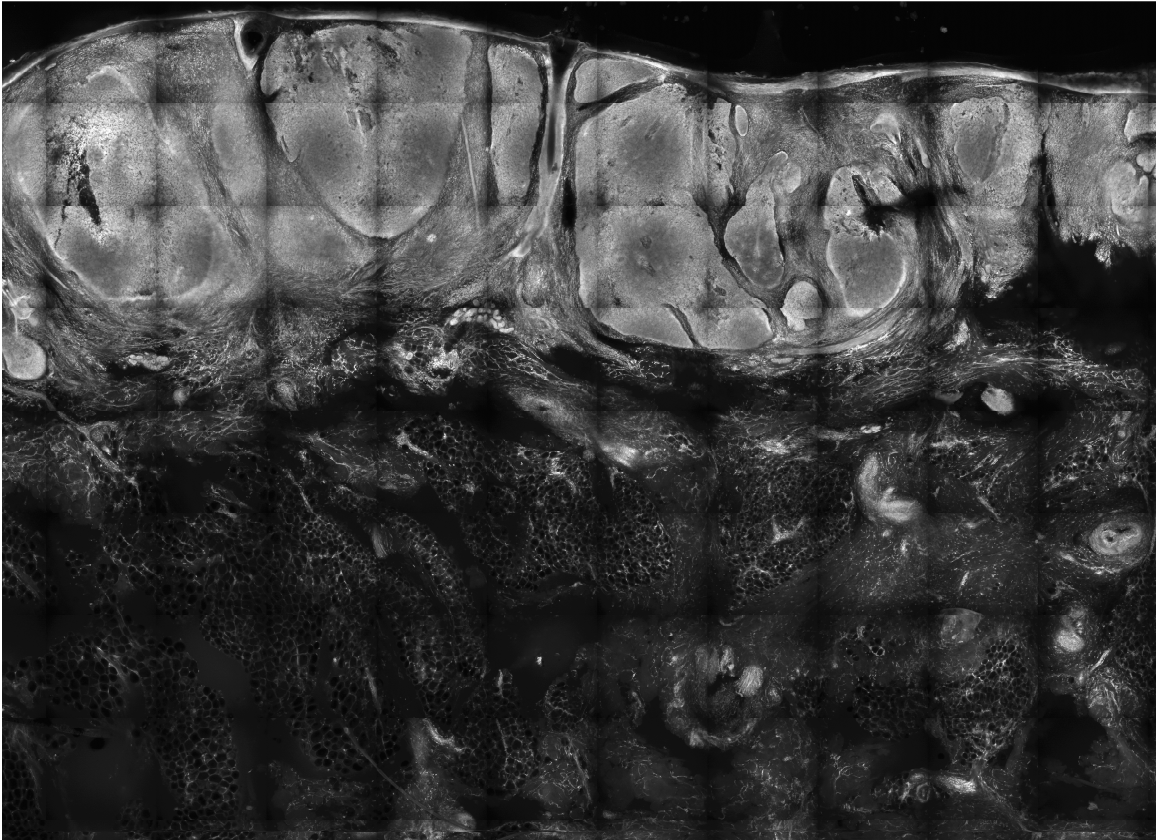


Abbildung 22: Basalzellkarzinom, CLSM



4.2 Morphologie des tumorinfiltrierten Gewebes

Die histologischen Merkmale der Tumore in der konfokalen Mikroskopie unterschieden sich kaum von den Aufnahmen der konventionellen Lichtmikroskopie, mit Ausnahme der Schwarz-Weiß-Darstellung in der CLSM.

Bei den Gewebeschnitten mit BCC waren alle wichtigen Merkmale eines BCC zu erkennen. Die zellreichen Zellverbände der Tumornester wurden von einem einreihig und palisadenförmig angeordneten Zellsaum begrenzt. Die großen und ovalen Tumorzellen zeigten eine verschobene Kern-Zytoplasmarelation. Ihre Zellkerne imponierten durch eine sehr helle Darstellung. Auch eine peritumorale Spaltbildung ließ sich beobachten. Des Weiteren konnten anhand der Form der Tumornester Rückschlüsse auf die einzelnen Unterarten des BCC getroffen werden.

Bei Präparaten mit PEC wurden in den konfokalen Aufnahmen die meist fingerförmig die Basalmembran durchbrechenden Tumornester gut dargestellt. Es ließen sich weiterhin eine starke parakeratotische Aktivität, sowie eine Pleomorphie der Zellkerne erkennen.

Abbildung 23: Basalzellkarzinom auf Randschnitt mit im Randbereich palisadenförmig angeordneten Zellsaum und peritumorale Spaltbildung, Größe ca. 0,5 x 0,5mm

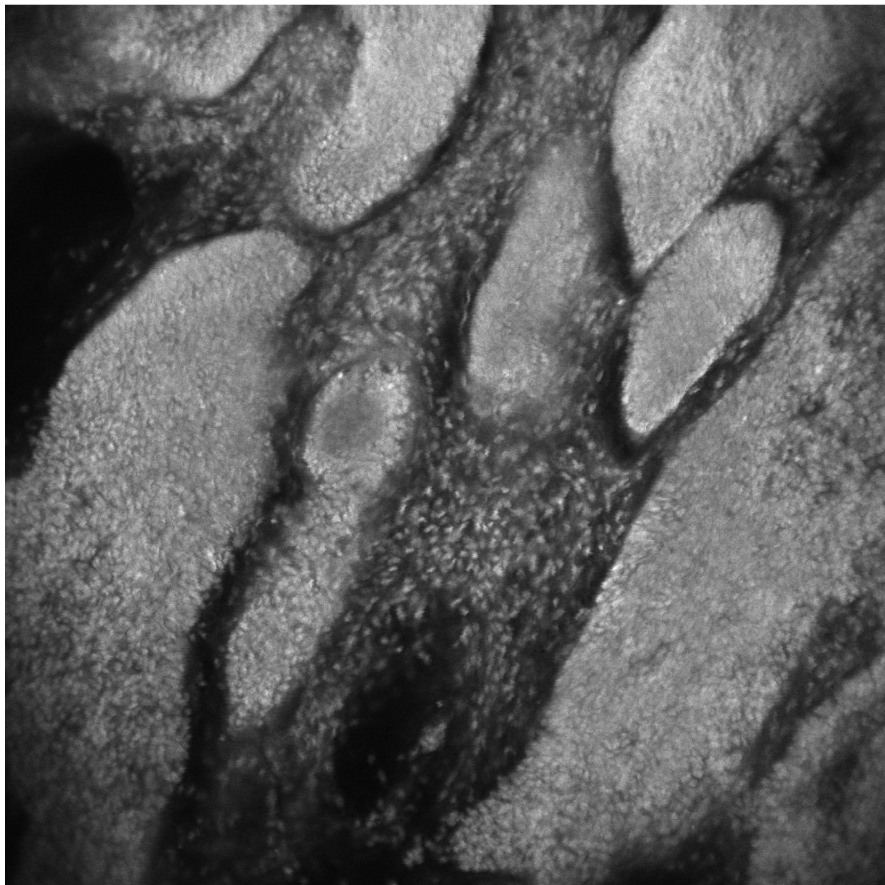


Abbildung 24: Basalzellkarzinom auf Randschnitt mit im Randbereich palisadenförmig angeordneten Zellsaum und peritumoraler Spaltbildung, Größe ca. 0,5 x 0,5mm



Abbildung 25: Basalzellkarzinom, Schnitt aus der Präparatmitte, Größe ca. 1,5 x 1,5 mm

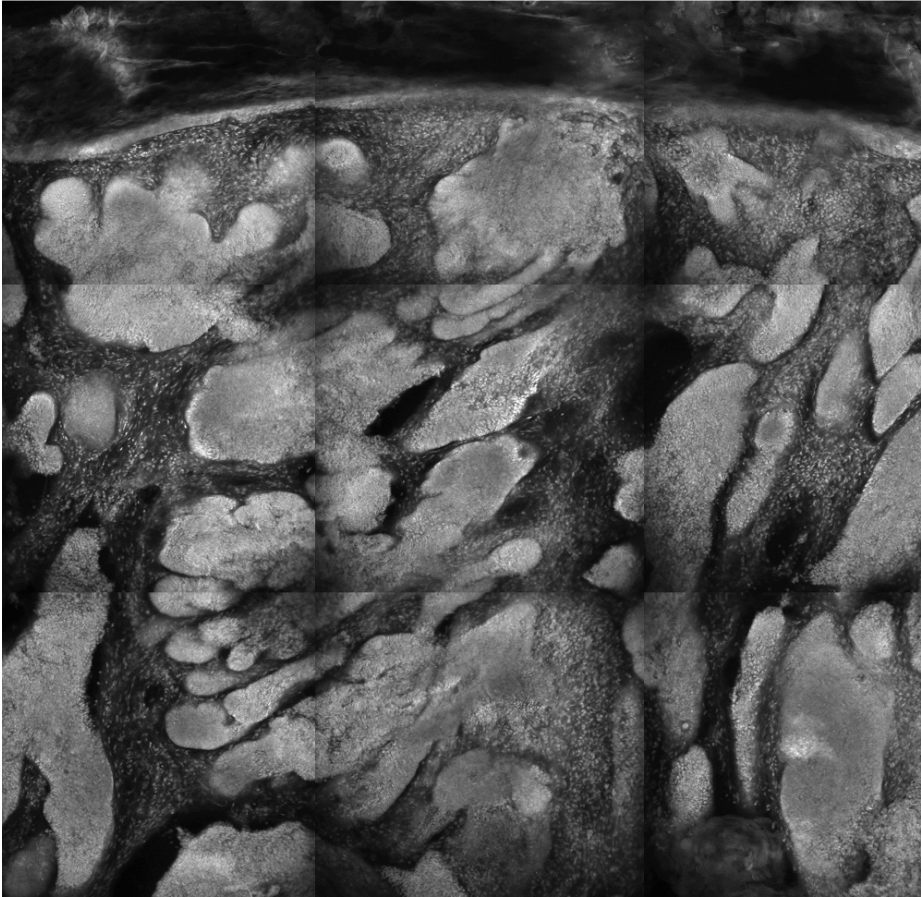


Abbildung 26: Basalzellkarzinom, Randschnitt, Größe ca. 1 x 1,5 mm

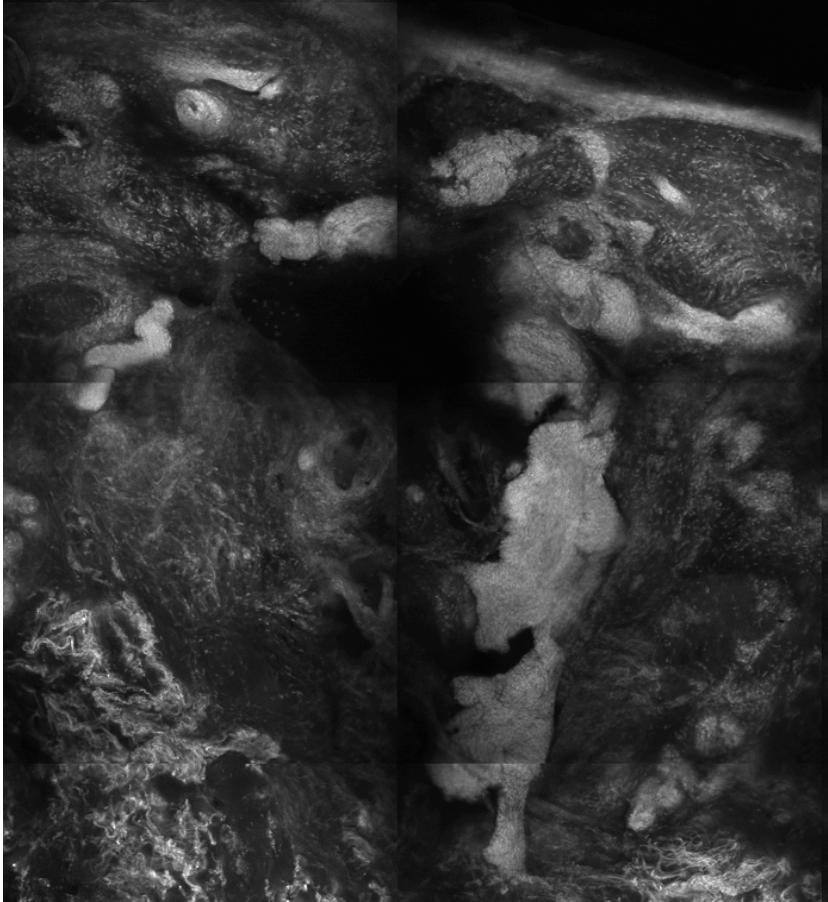


Abbildung 27: Basalzellkarzinom, sklerodermiformer Typ, in Randstreifen, Größe ca. 1 x 1 mm

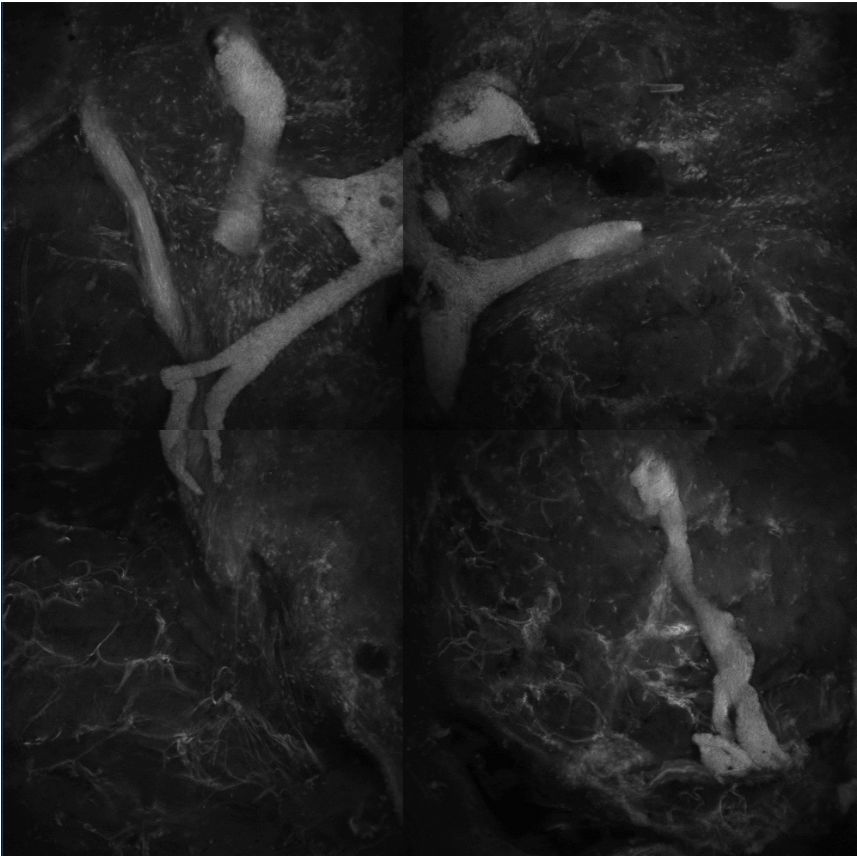


Abbildung 28: Basalzellkarzinom, Randschnitt, Größe ca. 1,5 x 1 mm

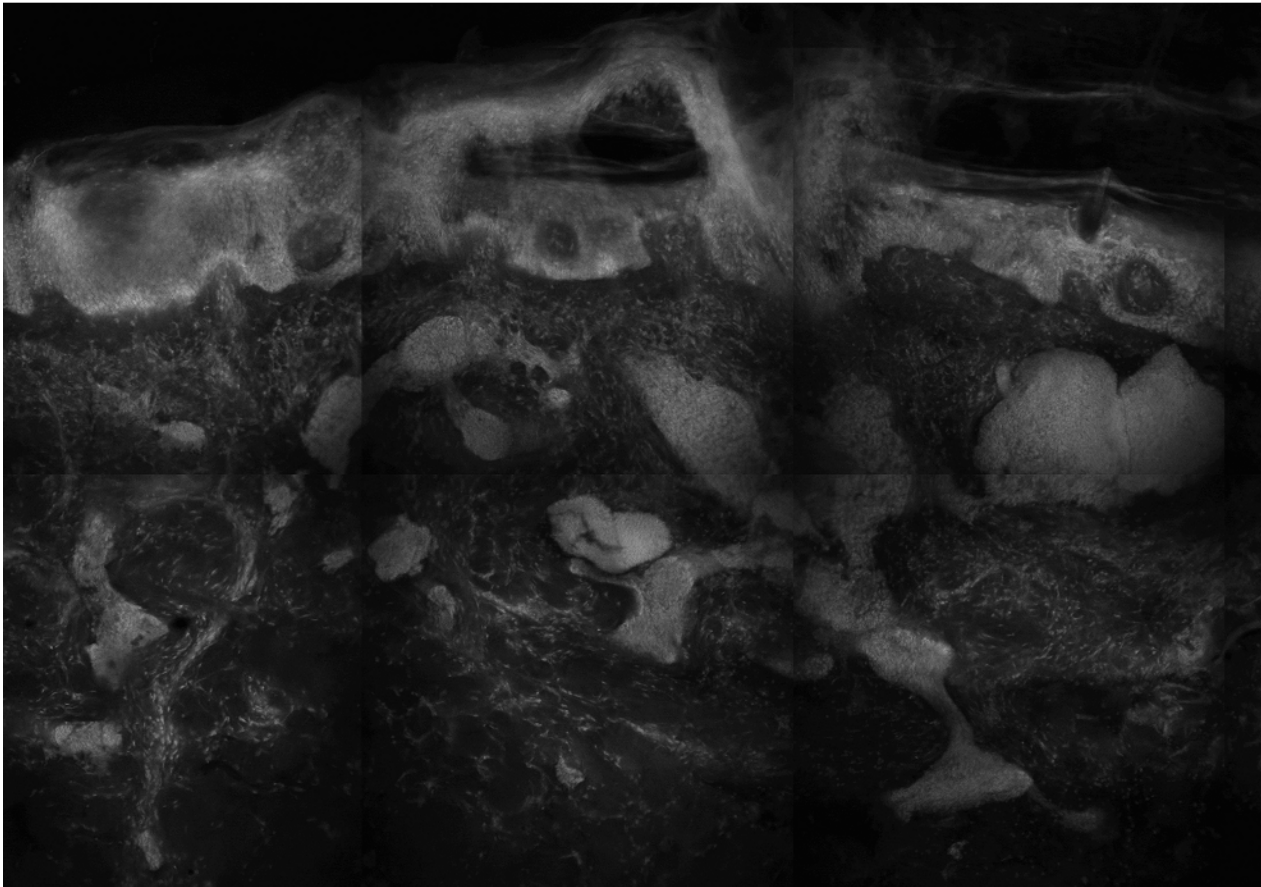
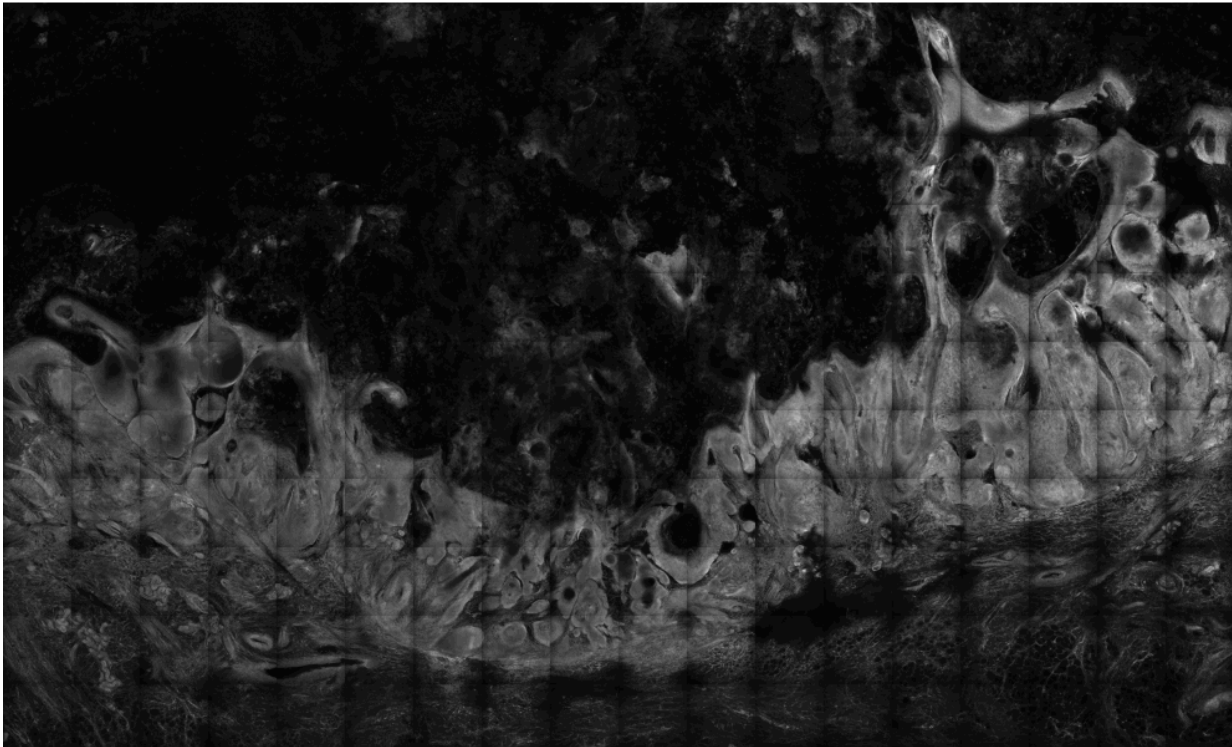


Abbildung 29: Mittenschnitt eines Plattenepithelkarzinoms, Größe ca. 6 x 9 mm



4.3 Anzahl und Tumorart der untersuchten Präparate

Es wurden insgesamt 49 Exzisionen von Basalzellkarzinomen, entnommen an 37 Patienten, untersucht.

Die Hauptaufgabe dieser Studie bestand in der Untersuchung der Sensitivität und Spezifität der konfokalen Lasermikroskopie mithilfe der Nilblau-Färbung an humanen BCC-Präparaten, im direkten Vergleich zur konventionellen Histologie. Im Rahmen dieser Fragestellung wurden 49 Exzidate von BCC in Form von 162 Schnitten aus dem Rand oder der Tiefe auf Vorhandensein von BCC untersucht. Darin enthalten waren 128 Randschnitte und 47 Präparate der Tiefe. 147 Proben waren von Erstexzisionen und 15 Proben aus Nachexzisionen.

Außerhalb dieser Fragestellung wurden von weiteren 7 Exzisionen anderer Tumorarten wie Spinaliom, Fibroxanthom und Morbus Bowen Bilder erstellt, um die Tauglichkeit der Nilblau-Färbemethode in Zusammenhang mit anderen Tumoren abzuschätzen.

Bei anderen 14 Exzidaten von BCC konnten aufgrund Zeitmangels im Klinikablauf, nur einzelne Schnitte und nicht die kompletten Ränder mikroskopiert werden.

Die zuletzt genannten 21 Exzisionen flossen nicht in die nachfolgende Auswertung ein.

4.4 Vergleich der Befunde zur konventionellen Histologie

Nach dem Vergleich der 162 Randschnitte mit den Ergebnissen der konventionellen Histologie ergibt sich eine Übereinstimmung in 154 Schnitten. Davon waren 22 Schnitte richtig positiv und 132 Schnitte richtig negativ bewertet worden. Damit ergibt sich eine Übereinstimmung in 95,1% der Randschnitte. In 3 Fällen ergab sich ein falsch positives Ergebnis und in 5 Fällen ein falsch negatives Ergebnis.

Eine detaillierte Form der Auswertung wird in Tabelle 1 wiedergegeben:

Tabelle 1

Patient	Exzision	Lokalisation	Diagnose	Randschnitt	Richtig pos.	Richtig neg.	Falsch pos.	Falsch neg.
1	1	Nase, rechts	Solides BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		

4 Ergebnisse

				4		1		
2	1	temporal, links	Mikronoduläres BCC	1	1			
				2	1			
				3		1		
				4		1		
	2	temporal, links NE	Mikronoduläres BCC	1		1		
3	1	Nase, links	Solides BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5		1		
4	1	Oberlippe, rechts	Sklerodermiformes BCC	1	1			
				2	1			
				3		1		
	2	Oberlippe, rechts NE	Sklerodermiformes BCC	1		1		
				2		1		
5	1	Nase, links	Solides / Sklerodermiformes BCC	1		1		
				2		1		
				3	1			
				4		1		
				5		1		
	2	Nase, links NE	Solides / Sklerodermiformes BCC	1		1		
6	1	Nase, rechts	Solid-Adenoides BCC	1	1			
				2			1	
				3		1		
				4		1		
				5	1			
7	1	Oberlippe, rechts	Sklerodermiformes BCC	1		1		

4 Ergebnisse

				2		1		
				3	1			
				4		1		
				5		1		
	2	Oberlippe, rechts	Sklerodermiformes BCC	1		1		
8	1	Augeninnenwinkel, links	Solides BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5		1		
9	1	Nase, links	???	1		1		
				2			1	
				3		1		
				4		1		
				5		1		
10	1	Nase	Solides BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5		1		
11	1	Nase rechts	Sklerodermiformes BCC auf Rhinophym	1	1			
				2	1			
				3		1		
				4		1		
	2	Nase rechts NE	Sklerodermiformes BCC auf Rhinophym	1		1		
				2		1		
				3		1		
12	1	Temporal links	BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		

4 Ergebnisse

				4		1		
				5		1		
				6		1		
13	1	Nase, links	Adenoides BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5		1		
14	1	Nasentrücken	Multinodulär- Sklerodermiform es BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5		1		
15	1	Nase, rechts NE	Solides BCC	1		1		
				2		1		
16	1	Wange links	Multinoduläres BCC	1		1		
				2		1		
17	1	Temporal, rechts	Solid- adnoidzystische s BCC	1		1		
18	1	Temporal, links	Sklerodermiform es BCC	1	1			
				2	1			
				3	1			
				4	1			
				5		1		
19	1	Temporal, links	Sklerodermiform es BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5		1		
				6		1		

4 Ergebnisse

				7		1		
20	1	Nasolabial	Sklerodermiformes BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5	1			
				6		1		
21	1	Nasolabial, links	Sklerodermiformes BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5		1		
22	1	Nase, rechts	Sklerodermiformes BCC, basosquamös	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5	1			
23	1	Stirn, links	Sklerodermiformes BCC	1				1
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5		1		
				6		1		
	2	Stirn, links NE	Sklerodermiformes BCC	1		1		
24	1	Ohr, links	Sklerodermiformes BCC	1				1
				2		1		
				3	1			
				4				1
				5	1			
25	1	Nase, links	Solides BCC	1		1		

4 Ergebnisse

26	1	Nase, rechts	Solides BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5		1		
27	1	Augebraue, rechts	Sklerodermiformes BCC	1		1		
28	1	Nase	Sklerodermiformes BCC	1		1		
	2	Nase	Sklerodermiformes BCC	1		1		
29	1	Nase, links NE	BCC-Rest / Narbe	1		1		
30	1	Nase, rechts	Sklerodermiformes BCC	1		1		
31	1	Augenunterlid, links	Solides BCC	1		1		
	2	Auge	Solides BCC	1		1		
32	1	Infraorbital, links	Narbe	1		1		
33	1	Nase	Solides BCC	1	1			
	2	Nase NE	Solides BCC	1		1		
34	1	Nase, rechts	Sklerodermiformes BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
35	1	Oberlippe, rechts	Sklerodermiformes BCC	1		1		
				2		1		
				3		1		
				4		1		
				5		1		
36	1	Stirn	Mikronoduläres BCC	1	1			
				2	1			
				3				1
				4		1		
	2	Stirn NE	Mikronoduläres BCC	1		1		

				2		1		
				3		1		
37	1	Nase, rechts	Solides BCC	1		1		
				2			1	
				3		1		
				4		1		
				5		1		
	2	Nasenspitze	Sklerodermiformes BCC	1		1		
				2	1			
				3		1		
				4		1		
				5				1
	3	Nasenspitze NE	Sklerodermiformes BCC	1		1		
	162	Randschnitte			22	132	3	5
	49	Exzisionen			9	33	3	4

4.5 Zeitaufwand

Die benötigte Zeit für Vorbereitung und Aufnahme der jeweiligen Probe war annähernd proportional zu der Größe und der daraus resultierenden Mehranzahl an aufzunehmenden Bildern. Im Durchschnitt wurde für einen einzelnen Schnitt mit einer Aufnahme inklusive Präparatvorbereitung etwas mehr als 5 Minuten an Zeit benötigt. Diese Zeit setzt sich aus ca. 3,5 Minuten für die Präparatvorbereitung, ca. einer halben Minute für das Aufbringen des Präparats auf den Objektträger und ca. einer weiteren Minute für Einstellungen der Startposition (XY-Position) und dem eigentlichen Aufnahmevorgang.

Erhöhter Zeitaufwand entstand bei größeren Präparaten mit mehreren Aufnahmen um jeden Teil des Schnittes zu erfassen, sowie bei schwierig zu handhabenden Proben (vgl. Kap. 5.1.2), die eine Wiederholung einer einzelnen Aufnahme notwendig machten.

Der Zeitaufwand ist Vergleich zur konventionellen Histologie als sehr gering einzuschätzen. Während für eine histologische Aufarbeitung in der Gefrierschnitttechnik mit darauffolgender H&E Färbung ca. 20-40 Minuten benötigt werden, sind die in der CLSM benötigten 5-6 Minuten ein bedeutender Zeitvorteil. Bei zusätzlicher Routine in der Bedienung des konfokalen Mikroskops, eventueller kleiner technischer Verbesserungen und einem erfahrenem Team lässt sich die oben angegebene Zeit sicherlich noch weiter verkürzen.

4.6 Gesamtergebnis

Tabelle 2 gibt die Sensitivität und Spezifität, sowie den positiven und negativen Vorhersagewert (PPV / NPV), der in Tabelle 1 dargestellten Daten wieder. Es erfolgte eine Aufteilung nach einzelnen Schnitträndern und nach kompletten Exzisionen.

Tabelle 2:

	Schnittränder	Exzisionen
Übereinstimmung absolut	95,1%	85,7%
Sensitivität	81,5%	69,2%
Spezifität	97,7%	91,7%
PPV	88,0%	75,0%
NPV	96,3%	89,2%

5 Diskussion

5.1 Fehlerquellen

5.1.1 Probleme der Präparatvorbereitung

Ein wichtiger Faktor für die Qualität der generierten Bilder war die Qualität des Randstreifens. Zu dicke Proben oder ungleichmäßig stark geschnittene Proben, sowie häufig auch die Tiefe des Exzidats, waren nicht optimal zu Mikroskopieren, da sie sich nicht im vollständigen Kontakt zum Objektträger befanden (vgl. auch 5.1.3). Es mussten daher in diesen Fällen mehrere Aufnahmen, in verschiedenen Fokusebenen erfolgen um alle Bereiche des Randstreifens oder der Tiefe begutachten zu können.

5.1.2 Probleme bei bestimmten Tumortypen / Hauttypen

Die überwiegende Anzahl der mithilfe von CLSM, erstellten Bilder ließen sich gut befunden. Es zeigten sich klar voneinander abgegrenzte Strukturen und größere Tumornester waren gut zu identifizieren. In einigen Fällen zeigte sich jedoch, dass diese Bildqualität, trotz mehrerer Einstellungsversuche, nicht zu hundert Prozent reproduzierbar ist. Diese inkonsistente Bildqualität, führte vor allem in Kombination mit schwierig zu diagnostizierbarem Gewebe zu Fehleinschätzungen.

Als kompliziert erwies sich in manchen Fällen die Abgrenzung zwischen BCC und Talgdrüsen. Bei Proben von der Nase oder allgemein sehr talgdrüsenhaltigem Gewebe fiel eine Abgrenzung oftmals schwer. Wie in Tabelle 1 ersichtlich, waren alle als falsch-positiv eingestuft Randschnitte an der Nase exzidiert worden.

Ebenfalls problematisch, gerade in Zusammenhang mit verminderter Bildqualität, war das Erkennen von kleinsten Tumornestern. Gerade bei feinen infiltrierenden Ausläufern des sklerodermiformen BCC, sowie mikronodulären Formen, besteht hier noch ein Defizit gegenüber der Lichtmikroskopie. Auch in diesem Zusammenhang erwähnenswert ist, dass alle falsch-negativ bewerteten Randschnitte ein sklerodermiformes oder mikronoduläres BCC beinhalteten.

5.1.3 Technische Probleme

Das Erreichen eines konstanten und gleichmäßigen Auflagedrucks der Proben auf dem Objektträger stellt weiterhin eine der größten technischen Schwierigkeiten in der CLSM dar. Obwohl mit dem Bau eines verbesserten Objektträgers an der Universität Regensburg (vgl. 3.1.3) und der Zuhilfenahme von Geliperm Feuchtgelplatten eine große Verbesserung hinsichtlich der Aufbringung auf den Objektträger erfolgt ist, bestehen hier weiterhin Defizite, die einer konsistenten Bildqualität im Wege stehen.

Eine größere Beweglichkeit des Objektträgers wäre ebenfalls wünschenswert, da bei größeren Proben mehrfach die Probe manuell auf dem Objektträger verschoben werden muss, um Aufnahmen von allen Rändern der Probe zu erhalten.

Probleme mit der Bildqualität ergaben sich aus teilweise nicht optimal zusammengesetzten Einzelbildern, dem sogenannten „bad stitching“. Einzelne Bilder der VivaBlocks wurden gegeneinander verschoben, so dass teilweise eine Beurteilung erheblich erschwert war.

Im Bereich der Software des Herstellers zeigten sich kleinere Schwächen beim Verarbeiten der Bilder. Bei VivaBlocks, welche aus mehr als 10x10 Einzelbildern zusammengesetzt wurden, war beispielsweise der Abruf einer zu vergrößernden Gesamtansicht, welche für die Beurteilung sehr gut geeignet war, nicht immer möglich. Auch weitere stufenlose Vergrößerungseinstellungen und nachträgliche Kontrastbearbeitungsmöglichkeiten wären hier im Sinne einer verbesserten Handhabung und Beurteilbarkeit der erstellten Aufnahmen wünschenswert.

5.2 Verbesserungsmöglichkeiten

Ein wesentlicher Punkt, welcher das Gesamtergebnis dieser Studie hinsichtlich Sensitivität und Spezifität verbessern könnte, ist sicherlich eine Durchführung der Studie mit professionellem histologischem Personal, mit größerer Erfahrung, welche - ohne Zeitdruck im klinischen Ablauf - die Erstellung der Bilder und deren gleichzeitige Begutachtung vornimmt. Hierbei lässt sich aller Wahrscheinlichkeit nach auch der Zeitaufwand pro Bild weiter minimieren. Auch die gezielte Schulung des Operationsteams, hinsichtlich einer optimalen Randschnittstellung für die CLSM, birgt sicherlich das Ergebnis weiter verbesserndes Potential.

Auch von der technischen Seite sind eine weitere Optimierung der Software und die Möglichkeit, einen größeren Bildausschnitt erfassen zu können, wünschenswert. Auch eine weitere Verbesserung der Aufbringung der Proben auf den Objektträger und der Erzeugung eines gleichmäßigeren Auflagedrucks spielt hierbei eine Rolle. Zur weiteren Verbesserung der Tumorerkennung in der CLSM könnten immunhistochemische Färbungen mit monoklonalen Antikörpern wie BerEp4 als Tumorzellmarker die Sensitivität und Spezifität dieser Methode noch deutlich erhöhen.

5.3 Praktikabilität in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie

Die in dieser Studie mithilfe der Nilblau-Fluoreszenz-Färbung erreichte Sensitivität von 81,5% und Spezifität von 97,7% - bezogen auf die Randschnitte - ist noch nicht ausreichend um die Kryostat-Technik in der MKC zu ersetzen. Dazu erreicht die CLSM vor allem bei kleinen, infiltrativ wachsenden Tumoren oder wenigen Tumorzellen eine nicht zufriedenstellende Sensitivität. Dies wurde auch schon in früheren Studien berichtet (Chung et al. 2004; Patel et al. 2007; Gareau et al. 2009). Die Nilblau-Färbung in Kombination mit der CLSM, in der MKC, ist jedoch eine günstige, vergleichsweise einfache und schnelle Technik, welche durchaus ohne Probleme die sicherere Identifizierung von mittleren und größeren Tumoren in Randschnitten ermöglicht.

Denkbar für den Einsatz in der MKC wäre eine intraoperative Vorschaltung der CLSM vor der Kryostat-Technik. Die Bilder könnten im Vergleich zu der konventionellen Methode, nach wenigen Minuten vorliegen, und von dem Computer des Mikroskops direkt auf einen Monitor im Operationssaal geschaltet werden. Bei einem klar positiven Befund in der CLSM kann eine unmittelbare Nachexzision erfolgen. Bei negativem Befund in der CLSM müsste weiterhin ein normaler histopathologischer Befund erfolgen.

5.4 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien

Weitere Untersuchungen zur Nutzung einer Nilblau-Färbung in der CLSM liegen bisher noch nicht vor.

Ebenfalls unter Benutzung des Fluoreszenzmodus, untersuchten Karen et al in einer Studie von 2009 mit dem Farbstoff Acridinorange 48 Proben BCC hinsichtlich Spezifität und Sensitivität. Es erfolgte keine Vorbehandlung mit verdünnter Säure, sondern eine reine Färbung mit Acridinorange, ein Fluoreszenzfarbstoff welcher in der Molekularbiologie vor allem zur Unterscheidung von DNA und RNA dient (Rost 1995). Als Laser diente ein Argon-Ion Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm, verbaut in einem VivaScope 2000. Sie erreichten dabei eine Spezifität von 89,2 % und eine deutlich gegenüber dieser Studie verbesserte Sensitivität von 96,6 %. Die Untersuchung der Gewebeproben erfolgte dabei allerdings nicht wie in dieser Studie vor der konventionellen Histologie, sondern nutzte überschüssige Gewebereste die sonst nach der Histologie verworfen worden wären. Die nachträgliche Untersuchung und Begutachtung der Proben ermöglichte ein Arbeiten ohne Zeitdruck im klinischen Ablauf und wurde zudem nicht von einem Student, sondern von erfahrenen Histologen, Technikern und Chirurgen durchgeführt.

Etwas schlechtere Ergebnisse erzielten Studien, welche im Reflexionsmodus durchgeführten wurden. Im Jahr 2009 untersuchten Schüle et al. 66 BCC, unterteilt in 58 Mittenschnitte, 24 „Muffin“-Schnitte, 197 laterale Randschnitte und 5 Tiefschnitte mit Vorbehandlung durch Zitronensäure auf das Vorhandensein von BCC. Es ergaben sich Sensitivitäten / Spezifitäten von 94 % / 33 % für die Mittenschnitte, 42 % / 77 % für laterale Randschnitte, 0 % / 70 % für „Muffin“-Schnitte und eine Spezifität von 100 % für die Tiefen. In einer Studie von Kaeb et al. ebenfalls 2009 erstellt, ergaben sich bei gleicher Vorbehandlung der bei insgesamt 44 untersuchten Exzisionen eine Sensitivität von 74,2 % und eine Spezifität von 96,1 %. Ziefle et al erreichten 2010 eine Sensitivität von 73,7 % und eine Spezifität von 69,2 % für laterale Randschnitte von 72 Exzidaten des BCC. Vorbehandelt wurden die Proben hierbei mit Zitronensäure, mit anschließender Färbung durch Toluidinblau.

6 Zusammenfassung

6.1 Fragestellung

In dieser Studie wurde die Sensitivität und Spezifität der konfokalen Laserscanmikroskopie im Fluoreszenzmodus, mit in Nilblau-Fluoreszenz-Farbstoff gefärbten Gewebeschnitten des Basalzellkarzinoms, im Rahmen der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie im Vergleich zu histologischer Routinediagnostik untersucht.

6.2 Material und Methoden

Es wurden Aufnahmen von 162 Randschnitten und Tiefen aus 49 Exzidaten von 37 Patienten mit Diagnose Basalzellkarzinom im konfokalen Laserscanmikroskop erstellt. Danach erfolgte eine histologische Aufbereitung mittels Kryostat-Technik und lichtmikroskopischer Befundung. Die Ergebnisse beider Methoden wurden im Anschluss daran miteinander verglichen.

6.3 Ergebnisse

Der Vergleich ergab eine Übereinstimmung der Befunde in 95,1% der Fälle. Es ergab sich eine Sensitivität von 81,5% und eine Spezifität von 97,7% in Bezug auf die einzelnen Randstreifen. Vor allem bei kleineren infiltrativen Tumorausläufern und mikronodulären Formen des Basalzellkarzinoms kam es zu falsch negativen Ergebnissen, während es sich bei den falsch positiven Ergebnissen meist um irrtümlich für tumoröse Strukturen gehaltene Talgdrüsen handelte.

6.4 Schlussfolgerung

Trotz einer absoluten Übereinstimmung in 95,1% der untersuchten Randstreifen, reicht eine Sensitivität von 81,5% nicht, um eine sichere Diagnose auf Tumorfreiheit in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie zu gewährleisten. Derzeit kann eine konfokale Laserscanmikroskopie nicht die Zuverlässigkeit der gängigen histologischen Routineverfahren erreichen. Aufgrund des geringen Zeitaufwandes kann sie jedoch eine Ergänzung zur konventionellen Histopathologie darstellen und

mit einer schnellen Entscheidung über eine Nachexzision die Methode der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie beschleunigen. Dies könnte mit der Behandlung von immer häufiger auftretenden Hauttumoren noch mehr an Bedeutung gewinnen.

Mit steigender Erfahrung in der Interpretation der Bilder, sowie verbesserter Technik der Mikroskope und neuen Färbetechniken z. Bsp. unter Zuhilfenahme von tumorspezifischen Antikörpern, wie für das Basalzellkarzinom z.B. BerEp4, in Verbindung mit fluoreszierenden Farbstoffen hat die konfokale Laserscanmikroskopie, in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie durchaus das Potential in den nächsten Jahren noch mehr an Bedeutung zu gewinnen.

7 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATA DER VERSCHIEDENEN SCHNITTTECHNIKEN IN DER MKC	21
ABBILDUNG 2: SCHEMAZEICHNUNG DER STRAHLENGÄNGE EINES KONFOKALEN MIKROSKOPS IN AUFLICHTBAUWEISE	23
ABBILDUNG 3: NILBLAU	29
ABBILDUNG 4: VIVASCOPE 2500, FA. MAVIG,	30
ABBILDUNG 5: MODIFIZIERTER OBJEKTSTISCH FÜR VIVASCOPE 2500	31
ABBILDUNG 6: RANDSCHNITT IN DER ÜBERSICHTSANSICHT, GRÖÖE CA. 4 X 6,5 MM	34
ABBILDUNG 7: ÜBERSICHT DER AUFNAHME DER TIEFE EINER PROBE, GRÖÖE CA. 6 X 5,5 MM	34
ABBILDUNG 8: GESUNDE HAUT, EPIDERMIS UND DERMIS, GRÖÖE CA. 0,5 X 0,5 MM	36
ABBILDUNG 9: FETTZELLEN UND BINDEGEWEBE, GRÖÖE CA. 0,5 X 0,5 MM	36
ABBILDUNG 10: QUERSCHNITT EINES BLUTGEFÄSSES MIT FETTGEWEBE, GRÖÖE CA. 0,5 X 0,5 MM	37
ABBILDUNG 11: MUSKELFASERN, QUER- UND LÄNGSGESCHNITTEN, GRÖÖE CA. 1 X 1 MM	37
ABBILDUNG 12: TALGDRÜSEN UND HAARFOLLIKEL, GRÖÖE CA. 1,5 X 1,5 MM	38
ABBILDUNG 13: TALGDRÜSEN UND HAARFOLLIKEL, GRÖÖE CA. 1,5 X 1,5 MM	38
ABBILDUNG 14: TALGDRÜSEN, GRÖÖE CA. 1,25 X 1,25 MM	39
ABBILDUNG 15: DETAILANSICHT DRÜSENGEWEBE, GRÖÖE CA. 0,5 X 0,5 MM	39
ABBILDUNG 16: SCHWEIÖDRÜSE MIT AUSFÜHRUNGSGANG, GRÖÖE CA. 1 X 1,5 MM	40
ABBILDUNG 17: BASALZELLKARZINOM, HE FÄRBUNG, KONVENTIONELLE HISTOLOGIE	41
ABBILDUNG 18: BASALZELLKARZINOM, CLSM	41
ABBILDUNG 19: BASALZELLKARZINOM, HE FÄRBUNG, KONVENTIONELLE HISTOLOGIE	42
ABBILDUNG 20: BASALZELLKARZINOM, CLSM	42
ABBILDUNG 21: BASALZELLKARZINOM, HE FÄRBUNG, KONVENTIONELLE HISTOLOGIE	43
ABBILDUNG 22: BASALZELLKARZINOM, CLSM	43
ABBILDUNG 23: BASALZELLKARZINOM AUF RANDSCHNITT MIT IM RANDBEREICH PALISADENFÖRMIG ANGEORDNETEN ZELLSAUM UND PERITUMORALER SPALTBILDUNG, GRÖÖE CA. 0,5 X 0,5MM	44
ABBILDUNG 24: BASALZELLKARZINOM AUF RANDSCHNITT MIT IM RANDBEREICH PALISADENFÖRMIG ANGEORDNETEN ZELLSAUM UND PERITUMORALER SPALTBILDUNG, GRÖÖE CA. 0,5 X 0,5MM	45
ABBILDUNG 25: BASALZELLKARZINOM, SCHNITT AUS DER PRÄPARATMITTE, GRÖÖE CA. 1,5 X 1,5 MM	45
ABBILDUNG 26: BASALZELLKARZINOM, RANDSCHNITT, GRÖÖE CA. 1 X 1,5 MM	46
ABBILDUNG 27: BASALZELLKARZINOM, SKLERODERMIFORMER TYP, IN RANDSTREIFEN, GRÖÖE CA. 1 X 1 MM	46
ABBILDUNG 28: BASALZELLKARZINOM, RANDSCHNITT, GRÖÖE CA. 1,5 X 1 MM	47
ABBILDUNG 29: MITTENSCHNITT EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS, GRÖÖE CA. 6 X 9 MM	47

8 Literaturverzeichnis

Abeytunge S, Li Y, Larson B, Peterson G, Seltzer E et al. (2013): Confocal microscopy with strip mosaicing for rapid imaging over large areas of excised tissue. *J Biomed Opt* 18 (6), 61227.

Agero A, Busam K, Benvenuto-Andrade C, Scope A, Gill M et al. (2006): Reflectance confocal microscopy of pigmented basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 54 (4), 638–643.

Al-Arashi M, Salomatina E, Yaroslavsky A (2007): Multimodal confocal microscopy for diagnosing nonmelanoma skin cancers. *Lasers Surg Med* 39 (9), 696–705.

Altintas M, Altintas A, Guggenheim M, Gohritz A, Meyer-Marcotty M et al. (2009): Reflectance confocal-laser-scanning microscopy in vivo assessments of cigarette-induced dynamic alterations of cutaneous microcirculation on histomorphological level. *Microsc. Res. Tech.* 72 (4), 347–350.

Ardigo M, Cota C, Berardesca E, González S (2009): Concordance between in vivo reflectance confocal microscopy and histology in the evaluation of plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23 (6), 660–667.

Astner S, Gonzalez E, Cheung A, Rius-Diaz F, González S (2005): Pilot study on the sensitivity and specificity of in vivo reflectance confocal microscopy in the diagnosis of allergic contact dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53 (6), 986–992.

Astner S, González S, Gonzalez E (2006): Noninvasive evaluation of allergic and irritant contact dermatitis by in vivo reflectance confocal microscopy. *Dermatitis* 17 (4), 182–191.

Bath-Hextall F, Bong J, Perkins W, Williams H (2004): Interventions for basal cell carcinoma of the skin: systematic review. *BMJ* 329 (7468), 705.

Betz C, Rauschnig W, Stranadko E, Riabov M, Volgin V et al. (2012): Long-term outcomes following Foscan®-PDT of basal cell carcinomas. *Lasers Surg Med* 44 (7), 533–540.

Blum A, Möhrle M (2004): Wallgrabentechnik. Zweizeitige operative Versorgung von ausgedehnten Basalzellkarzinomen im Lippenbereich. *Hautarzt* 55 (9), 869–873.

Braun-Falco O: Dermatologie und Venerologie. 5. Aufl. Heidelberg: Springer 2005.

Breuninger H, Rassner G, Undeutsch W (1984): Operative Behandlung von Basaliomen mit errechnetem Sicherheitsabstand und histologischer Randkontrolle. *Hautarzt* 35 (6), 303–307.

Chung V, Dwyer P, Nehal K, Rajadhyaksha M, Menaker G et al. (2004): Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg* 30 (12 Pt 1), 1470–1478.

Cox G: Optical imaging techniques in cell biology. 2. Aufl. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis 2012.

Drepper H (1963): Die systematische histologische Kontrolle des Tumorbettes als Fortschritt bei der operativen Entfernung des tiefgreifenden Gesichtskrebses der Haut. *Hautarzt* 14, 420–423.

Eichert S, Möhrle M, Breuninger H, Röcken M, Garbe C et al. (2010): Diagnosis of cutaneous tumors with in vivo confocal laser scanning microscopy. *J Dtsch Dermatol Ges* 8 (6), 400–410.

Flohil S, Vries E de, Neumann H, Coebergh J-W, Nijsten T (2011): Incidence, prevalence and future trends of primary basal cell carcinoma in the Netherlands. *Acta Derm. Venereol.* 91 (1), 24–30.

Gareau D, Bar A, Snavely N, Lee K, Chen N et al. (2012): Tri-modal confocal mosaics detect residual invasive squamous cell carcinoma in Mohs surgical excisions. *J Biomed Opt* 17 (6), 66018.

Gareau D (2009): Feasibility of digitally stained multimodal confocal mosaics to simulate histopathology. *J Biomed Opt* 14 (3), 34050.

Gareau D, Karen J, Dusza S, Tudisco M, Nehal K et al. (2009): Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *J Biomed Opt* 14 (3), 34012.

Gareau D, Li Y, Huang B, Eastman Z, Nehal K et al. (2008): Confocal mosaicing microscopy in Mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology. *J Biomed Opt* 13 (5), 54001.

Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P et al. (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 (5), 722–733.

Goldgeier M, Fox C, Zavislan J, Harris D, Gonzalez S (2003): Noninvasive imaging, treatment, and microscopic confirmation of clearance of basal cell carcinoma. *Dermatol Surg* 29 (3), 205–210.

González S, Tannous Z (2002): Real-time, in vivo confocal reflectance microscopy of basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47 (6), 869–874.

Gorlin R (1987): Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Medicine (Baltimore)* 66 (2), 98–113.

Griep C, Davelaar J, Scholten A, Chin A, Leer J (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 (5), 1347–1350.

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 (4), 433-9; discussion 440.

Harrison P (1994): Shave excision for basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 20 (5), 350.

Hauschild A, Breuninger H, Kaufmann R, Kortmann R-D, Schwipper V et al. (2008): Short German guidelines: basal cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges* 6 Suppl 1, S2-4.

Heenan P J: Histological typing of skin tumours. 2. Aufl. Berlin: Springer op. 1996.

Hicks S, Swindells K, Middelkamp-Hup M, Sifakis M, González E et al. (2003): Confocal histopathology of irritant contact dermatitis in vivo and the impact of skin color (black vs white). *J. Am. Acad. Dermatol.* 48 (5), 727–734.

Johnson T, Headington J, Baker S, Lowe L (1997): Usefulness of the staged excision for lentigo maligna and lentigo maligna melanoma: the "square" procedure. *J. Am. Acad. Dermatol.* 37 (5 Pt 1), 758–764.

Jose J, Burgess K (2006): Syntheses and properties of water-soluble Nile Red derivatives. *J. Org. Chem.* 71 (20), 7835–7839.

Kaeb S, Landthaler M, Hohenleutner U (2009): Confocal laser scanning microscopy--evaluation of native tissue sections in micrographic surgery. *Lasers Med Sci* 24 (5), 819–823.

Karen J, Gareau D, Dusza S, Tudisco M, Rajadhyaksha M et al. (2009): Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy. *Br. J. Dermatol.* 160 (6), 1242–1250.

Klein A, Babilas P, Karrer S, Landthaler M, Szeimies R-M (2008): Photodynamic therapy in dermatology--an update 2008. *J Dtsch Dermatol Ges* 6 (10), 839-45, 839-46.

Koller S, Gerger A, Ahlgrimm-Siess V, Weger W, Smolle J et al. (2009): In vivo reflectance confocal microscopy of erythematosquamous skin diseases. *Exp. Dermatol.* 18 (6), 536–540.

Kreusch J, Rassner G (1991): Standardisierte auflichtmikroskopische Unterscheidung melanozytischer und nichtmelanozytischer Pigmentmale. *Hautarzt* 42 (2), 77–83.

Larson B, Abeytunge S, Seltzer E, Rajadhyaksha M, Nehal K (2013): Detection of skin cancer margins in Mohs excisions with high-speed strip mosaicing confocal microscopy: a feasibility study. *Br. J. Dermatol.*

Lear J, Strange R, Fryer A (1997): Re: relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (6), 454–455.

Lo J, Snow S, Reizner G, Mohs F, Larson P et al. (1991): Metastatic basal cell carcinoma: report of twelve cases with a review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* 24 (5 Pt 1), 715–719.

Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F (2012): A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.* 166 (5), 1069–1080.

Longo C, Bassoli S, Monari P, Seidenari S, Pellacani G (2005): Reflectance-mode confocal microscopy for the in vivo detection of *Sarcoptes scabiei*. *Arch Dermatol* 141 (10), 1336.

Löser C, Rompel R, Breuninger H, Möhrle M, Häfner H-M et al. (2010): Microscopically controlled surgery (MCS). *J Dtsch Dermatol Ges* 8 (11), 920–925.

Mahoney E, Dolan R, Choi E, Olbricht S (2005): Surgical reconstruction of lentigo maligna defects. *Arch Facial Plast Surg* 7 (5), 342–346.

Marra D, Torres A, Schanbacher C, Gonzalez S (2005): Detection of residual basal cell carcinoma by in vivo confocal microscopy. *Dermatol Surg* 31 (5), 538–541.

Meyer L, Otberg N, Sterry W, Lademann J (2006): In vivo confocal scanning laser microscopy: comparison of the reflectance and fluorescence mode by imaging human skin. *J Biomed Opt* 11 (4), 44012.

Meyer L, Otberg N, Tietz, H-J, Sterry W, Lademann, J (2005): In vivo imaging of Malassezia yeasts on human skin using confocal laser scanning microscopy. *Laser Phys. Lett.* 2 (3), S. 148-152.

Middelkamp-Hup M, Park H-Y, Lee J, Gilchrest B, Gonzalez S (2006): Detection of UV-induced pigmentary and epidermal changes over time using in vivo reflectance confocal microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 126 (2), 402–407.

Moehrle M, Käflein L, Ziefle S, Metzler G (2011): Rapid lump examination (RLE) - a new tool for Mohs surgery? *J Dtsch Dermatol Ges* 9 (7), 534–538.

Möhrle M, Breuninger H (2006): Die Muffin-Technik--eine Alternative zur Mohs' Chirurgie. *J Dtsch Dermatol Ges* 4 (12), 1080–1084.

Morton C, McKenna K, Rhodes L (2008): Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br. J. Dermatol.* 159 (6), 1245–1266.

Nori S, Rius-Díaz F, Cuevas J, Goldgeier M, Jaen P et al. (2004): Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma: a multicenter study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 51 (6), 923–930.

Patel Y, Nehal K, Aranda I, Li Y, Halpern A et al. (2007): Confocal reflectance mosaicing of basal cell carcinomas in Mohs surgical skin excisions. *J Biomed Opt* 12 (3), 34027.

Rajadhyaksha M, Anderson R, Webb R (1999): Video-rate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues in vivo. *Appl Opt* 38 (10), 2105–2115.

Rajadhyaksha M, González S, Zavislan J, Anderson R, Webb R (1999): In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J. Invest. Dermatol.* 113 (3), 293–303.

Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb R, Anderson R (1995): In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J. Invest. Dermatol.* 104 (6), 946–952.

Rajadhyaksha M, Menaker G, Flotte T, Dwyer P, 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 (5), 1137–1143.

Riefkohl R, Pollack S, Georgiade G (1985): A rationale for the treatment of difficult basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Ann Plast Surg* 15 (2), 99–104.

Robinson J, Dahiya M (2003): Basal cell carcinoma with pulmonary and lymph node metastasis causing death. *Arch Dermatol* 139 (5), 643–648.

Rost F W: Fluorescence microscopy. Cambridge u. a: Cambridge Univ. Press.

Rowe D (1995): Comparison of treatment modalities for basal cell carcinoma. *Clin. Dermatol.* 13 (6), 617–620.

Rowe D, Carroll R, Day C (1989): Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol* 15 (3), 315–328.

Rowe D, Carroll R, Day C (1989): Mohs surgery is the treatment of choice for recurrent (previously treated) basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 15 (4), 424–431.

Rubin A, Chen E, Ratner D (2005): Basal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 353 (21), 2262–2269.

Ruocco E, Argenziano G, Pellacani G, Seidenari S (2004): Noninvasive imaging of skin tumors. *Dermatol Surg* 30 (2 Pt 2), 301–310.

Sauermann K, Gambichler T, Wilmert M, Rotterdam S, Stücker M et al. (2002): Investigation of basal cell carcinoma [correction of carcinoma] by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res Technol* 8 (3), 141–147.

Sauermann K, Clemann S, Jaspers S, Gambichler T, Altmeyer P et al. (2002): Age related changes of human skin investigated with histometric measurements by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res Technol* 8 (1), 52–56.

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 (3), 698–700.

Segura S, Puig S, Carrera C, Palou J, Malvehy J (2007): Dendritic cells in pigmented basal cell carcinoma: a relevant finding by reflectance-mode confocal microscopy. *Arch Dermatol* 143 (7), 883–886.

Shokrollahi K, Javed M, Au-Yeung K, Ghattaura A, Whitaker I et al. (2013): Combined Carbon Dioxide Laser with Photodynamic Therapy for Nodular and Superficial Basal Cell Carcinoma: Almost Scarless Cure With Minimal Recurrence. *Ann Plast Surg.*

Silverman M, Kopf A, Bart R, Grin C, Levenstein M (1992): Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 3: Surgical excision. *J Dermatol Surg Oncol* 18 (6), 471–476.

Silverman M, Kopf A, Gladstein A, Bart R, Grin C et al. (1992): Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 4: X-ray therapy. *J Dermatol Surg Oncol* 18 (7), 549–554.

Smeets N (2005): Little evidence available on treatments for basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Treat. Rev.* 31 (2), 143–146.

Swindells K, Burnett N, Rius-Diaz F, González E, Mihm M et al. (2004): Reflectance confocal microscopy may differentiate acute allergic and irritant contact dermatitis in vivo. *J. Am. Acad. Dermatol.* 50 (2), 220–228.

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 (8), 839–846.

Telfer N, Colver G, Bowers P (1999): Guidelines for the management of basal cell carcinoma. British Association of Dermatologists. *Br. J. Dermatol.* 141 (3), 415–423.

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 (8), 507–513.

Tuppurainen K (1995): Cryotherapy for eyelid and periocular basal cell carcinomas: outcome in 166 cases over an 8-year period. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 233 (4), 205–208.

Ulrich M, Rüter C, Astner S, Sterry W, Lange-Asschenfeldt B et al. (2009): Comparison of UV-induced skin changes in sun-exposed vs. sun-protected skin—preliminary evaluation by reflectance confocal microscopy. *Br. J. Dermatol.* 161 Suppl 3, 46–53.

Willard K, Warschaw K, Swanson D (2011): Use of reflectance confocal microscopy to differentiate hidrocystoma from basal cell carcinoma. *Dermatol Surg* 37 (3), 392–394.

Woolgar J, Rippin J, Taylor M, Browne R (1987): The basal cell naevus syndrome. *Br J Hosp Med* 38 (4), 344-6, 350.

Yamashita T, Akita H, Astner S, Miyakawa M, Lerner E et al. (2007): In vivo assessment of pigmentary and vascular compartments changes in UVA exposed skin by reflectance-mode confocal microscopy. *Exp. Dermatol.* 16 (11), 905–911.

Ziefle 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 (8), 843–847.

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 31 Abs. 7 der Rahmenprüfungsordnung, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel "*Evaluation von Nativen Gewebeschnitten in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie unter Verwendung von Nilblau-Fluoreszenz-Farbstoff und konfokaler Lasermikroskopie*" selbständig verfasst, noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benützt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Regensburg, den 2. September 2014

Unterschrift

10 Danksagung

Besonderer Dank geht an Prof. Dr. U. Hohenleutner für die Überlassung dieses Themas und für die freundliche Unterstützung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Poliklinik für Dermatologie, insbesondere dem OP-Team und der histologischen Abteilung, welche mich während der Experimente immer unterstützt haben.

Im Speziellen danken möchte ich meinen Eltern, welche mich in jeder Lebenslage unterstützt haben und ohne die ich in meiner bisherigen Laufbahn niemals so weit gekommen wäre.