

Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen

„Rapid Lump Examination“- eine neue Methode
in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie
im Vergleich zu Paraffinschnitten
bei der 3D-Histologie von Basalzellkarzinomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Schubert, Melanie Renate

2019

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Möhrle
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. U. Vogel
Tag der Disputation:	19.09.2019

Für meine Mutter

Inhalt

1	EINLEITUNG	7
1.1	Basalzellkarzinom	9
1.1.1	Epidemiologie	9
	Inzidenz und Mortalität	9
1.1.2	Risikofaktoren und Ursachen	11
	UV-Exposition	11
	Hautpigmentierung	12
	Melanin	13
1.1.3	Pathogenese	14
	Sporadische Basalzellkarzinome	14
	Genetische Faktoren	14
	Hereditäre Basalzellkarzinome	15
1.1.4	Früherkennung, Diagnostik und Therapie	16
	Früherkennung und Diagnostik	16
	Diagnostik	17
	Therapie	17
1.1.5	Prognosefaktoren und Einteilungen des Basalzellkarzinoms	20
	Behandlungsassoziierte Prognosefaktoren	20
	Tumorassoziierte Prognosefaktoren	20
1.2	Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie	24
1.2.1	Mohs' Chirurgie	28
1.2.2	3-D-Histologie	29
	Randstreifen-Methode (Tübinger Torte)	29
	Muffin Technik	30
	Vertikale Stufenschnitte (Brotlaibtechnik)	31
1.3	Rapid Lump Examination	32
1.4	Zielsetzung	33
2	MATERIAL UND METHODEN	34
2.1	Untersuchungskollektiv	34
2.2	Studiendesign und -ablauf	38
	Rapid Lump Examination	38
	Paraffinhistologie	41
2.3	Statistische Auswertung	42

3	ERGEBNISSE.....	43
3.1	Zeitbedarf	43
3.2	Bildgebende Analyse.....	43
3.3	Art des Präparates und Untersucherabhängigkeit	50
3.4	Differentialdiagnostische Schwierigkeiten.....	51
4	DISKUSSION	52
	Genauigkeit der Rapid Lump Examination und Untersucherabhängigkeit	52
	Rolle der Färbung und Anwendung eines dreidimensionalen Mikroskops.....	55
	Elimination der Lichtreflexion.	56
	Betrachtung von außen vs. Herstellung von histologischen Schnitten	56
4.1	Weitere mikroskopische Verfahren.....	57
	Multiphoton Laser-Scanning-Mikroskopie (MPLSM)	57
	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM).....	57
	Optische Kohärenztomographie (OCT).....	59
	Rapid Lump Examination im Vergleich mit anderen mikroskopischen Verfahren.....	60
4.2	Schlußfolgerung	62
	ZUSAMMENFASSUNG	63
	LITERATURVERZEICHNIS	64
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	68
	TABELLENVERZEICHNIS	69
	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....	70
	DANKSAGUNG	71

Abkürzungen

BAP	BRCA1-assoziiertes Protein
BRCA	BReast CAncer
BZK	Basalzellkarzinom/ Basaliom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
3D	dreidimensional
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
HE	Hämatoxylin & Eosin
IARC	International Agency for Research on Cancer
iBZK	infiltrativer BZK-Typ
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
Min	Minuten
MKC	mikroskopisch kontrollierte Chirurgie
MM	malignes Melanom
MSC	melanozytäre Hauttumoren
nBZK	nodulärer BZK-Typ
NMSC	nicht-melanozytäre Hauttumoren
PTCH1	proteinkodiertes Homolog 1-Gen
RKI	Robert Koch Institut
RLE	Rapid Lump Examination
ROS	freie Sauerstoffradikale
SCC	Plattenepithelkarzinom/ Spinaliom
Sec	Sekunden
SHH	Sonic-Hedgehog
SMO	Smoothened
sBZK	superfizieller BZK-Typ
UV	ultraviolett
XP	Xeroderma pigmentosum

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat die Häufigkeit von Hauttumoren, vor allem die des Basalzellkarzinoms (BZK), besonders auch bei jungen Menschen rasant zugenommen (1). Besonders betroffen sind sonnenexponierte Körperflächen überwiegend im Kopf- und Halsbereich (2). Um dieser wachsenden Hautkrebsepidemie gerecht zu werden, welche auch Auswirkungen auf die dermatochirurgisch-onkologische Versorgung der Hauttumorpatienten mit sich bringt, besteht die dringende Notwendigkeit für eine schnelle, zuverlässige und kosteneffiziente neue Diagnostikmethode.

Die bereits etablierten Standardverfahren wie die von Frederic Mohs eingeführte und weiter modifizierte mikroskopisch-kontrollierte Chirurgie (MKC) ermöglichen, den Tumor vollständig und gewebeschonend zu entfernen (3-5). Die darauffolgende topographisch orientierte histologische Auswertung liefert dem ärztlichen Entscheidungsträger sicher und zuverlässig therapierrelevante Informationen hinsichtlich der An- oder Abwesenheit von Tumor in den Schnitträndern. Exzisionen und histopathologische Beurteilungen müssen wiederholt werden, bis die chirurgischen Ränder frei von Tumorzellen sind. In Abhängigkeit von der klinischen Situation oder der Präferenz des Chirurgen wird die MKC an Gefrierschnitten durchgeführt, die innerhalb von 30 Minuten bis zu einigen Stunden zur Verfügung stehen („Mohs Surgery“), oder an in Paraffin eingebetteten Schnitten, die mindestens 20 Stunden Bearbeitungszeit beanspruchen („Slow Mohs“). Eine zeitsparende neuere Gewebeuntersuchungsmethode, die *ex vivo* konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), liefert sehr schnell zweidimensionale schwarz-weiß Bilder mikroskopischer Morphologie in weniger als 30 Minuten. Allerdings zeigten Studien eine unzureichende Korrelation zwischen Histologie und CLSM Bildern (6). Die Rapid Lump Examination (RLE) als neues Werkzeug der Mohs-Chirurgie könnte den Prozess der histopathologischen Untersuchung von Tumorgewebe unmittelbar nach der Exzision beschleunigen (7). Die Zuverlässigkeit von RLE in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie ist noch nicht ausreichend belegt. Daher war es das Ziel der hier vorgelegten Untersuchung, die Anwendung der

RLE mit Hämatoxylin & Eosin (HE) gefärbten Paraffinschnitten in der mikroskopisch-kontrollierten Chirurgie (MKC) bzw. in der dreidimensionalen Histologie (3D-Histologie) in der klinischen Routine zu vergleichen.

1.1 Basalzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Inzidenz und Mortalität

Laut der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) und dem Robert Koch Institut (RKI) gehört der Hautkrebs mit einer Inzidenz von 206.500 Neuerkrankungen pro Jahr zu den häufigsten bösartigen Tumoren bei Männern und Frauen in Deutschland (8).

Die Einteilung von Hautkrebs erfolgt in melanozytäre (MSC) und nicht-melanozytäre (NMSC) Hauttumoren. Unter dem Begriff melanozytäre Hauttumoren werden alle Formen des malignen Melanoms (MM) gezählt. Zu den nicht-melanozytären Hauttumoren gehören neben den häufigsten Arten, dem Basalzellkarzinom (BZK) und dem Plattenepithelkarzinom (SCC / Spinaliom) (9), auch seltene Hautkrebsformen, zu denen u.a. die Merkel-Zelltumoren, Fibrosarkome sowie Karzinome der Talg- und Schweißdrüsen gehören (8, 9).

Nach Bewertungen des Robert Koch Instituts ist die Erfassung nicht-melanozytärer Hauttumoren in bevölkerungsbezogenen Krebsregistern international aufgrund der geringen Sterblichkeit noch nicht alltäglich, so daß die vorhandenen Daten nur eingeschränkt zu beurteilen sind (10).

Ebenso beschränkt ist die Datenlage in Deutschland, wodurch sich nur eine geringfügige Aussage über die Inzidenz- und Mortalitätsrate der einzelnen Arten nicht-melanozytärer Hauttumoren, speziell für das in dieser Arbeit relevante Basalzellkarzinom, machen läßt (10).

Es wurde berichtet, dass in den letzten Jahrzehnten die Häufigkeit von Hauttumoren, vor allem die des Basalzellkarzinoms, besonders auch bei jungen Menschen rasant zugenommen hat (1).

Männer waren häufiger betroffen als Frauen; jedoch war die Inzidenzzunahme in den letzten zehn Jahren bei Frauen steiler (11).

Männer erkrankten im Mittel mit 72 Jahren und somit später als Frauen, bei welchen im Mittel mit 71 Jahren die Diagnose eines Basalzellkarzinoms gestellt wurde.

Mit einer Inzidenz von über 159.200 Neuerkrankungen bundesweit zählen Basalzellkarzinome bei Männern und Frauen zu den häufigsten malignen Tumoren (8).

Steigende Inzidenzraten wurden nicht nur in Deutschland, sondern auch in anderen Europäischen Ländern, Nordamerika und Australien verzeichnet (1, 12). Mit ihrer interaktiven Internet-basierten Datenbank, die 'up-to-date' Daten zu allen Krebsarten liefert, zeigte die altersstandardisierte Rate (Europastandard) von nicht-melanozytären Hauttumoren eine Zunahme von 72,7 auf 115,7 Fällen/ 100 000 bei Männern und von 50,8 auf 85,0 Fällen/ 100 000 bei Frauen im Zeitraum von 2003 bis 2012 (13).

Altersstandardisierte Mortalitätsraten (Europastandard) von nicht-melanozytären Hauttumoren waren sehr niedrig mit 0,6 Todesfällen pro 100 000 Männer und 0,3 Todesfälle pro 100 000 Frauen im Jahr 2012 (13).

Im Vergleich beider Haupt-Hautkrebsarten, dem Melanom und dem nicht-melanozytären Hautkrebs, wurden die Fallzahlen der Neuerkrankungen nicht-melanozytärer maligner Hauttumoren 7-fach (69319 NMSC / 9919 Melanome) höher bei Männern und 6,3-fach (61290 / 9672) höher bei Frauen im Jahre 2012 geschätzt (GEKID). Die Mortalität hingegen war für beide Geschlechter wesentlich niedriger (13).

Jährlich verstarben etwa 688 Patienten an den Folgen von malignen nicht-melanozytären Hauterkrankungen (8). Eine Differenzierung nach verschiedenen Karzinomsubtypen kann mittels der Todesursachenstatistik nicht erfolgen.

1.1.2 Risikofaktoren und Ursachen

Die Haut als größtes Organ des menschlichen Körpers ist das gesamte Leben über immer wieder verschiedenen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt.

Das Basalzellkarzinom als am häufigsten auftretender nicht-melanozytärer Tumor der Haut tritt besonders an sonnenexponierten Körperoberflächen wie dem Kopf- und Halsbereich auf (2).

UV-Exposition

Das gehäufte Auftreten eines BZK im Kopf- und Halsbereich wird mit einer Langzeit-Exposition gegenüber ultraviolette (UV)-Strahlung im Sinne eines wiederholt auftretenden Sonnenbrandes assoziiert (14). Die UV-Strahlung ist die häufigste Ursache für die Entwicklung von Hautkrebs und führt zu DNA-Schäden und Gen-Mutationen, die bei Menschen höheren Alters im Verlauf des Lebens das Hautkrebsrisiko stark ansteigen lassen (15).

Das Sonnenlicht ist ein kontinuierliches Spektrum elektromagnetischer Strahlung, das sich abhängig von der Wellenlänge in drei große Spektren einteilen lässt: ultraviolett, sichtbar und infrarot. Der ultraviolette Bereich ist das bedeutendste Spektrum des Sonnenlichtes, welches für die lichtbedingte Hautalterung und verschiedene Formen von Hautkrebs verantwortlich ist (16).

Die UV-Strahlung wird unterteilt in UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) und UVC (100-280 nm)(17).

Etwa 95% der langwelligen UVA-Strahlung und nur 5% der kurzwelligen UVB-Strahlung erreichen die Erdoberfläche (18).

Das Eindringen von UVB durch die Erdatmosphäre wird durch die zunehmende Verarmung der Ozonschicht stetig erleichtert, wodurch sich das Risiko für ein UV-induziertes Karzinom erhöht (19).

Zu den akuten Reaktionen der menschlichen Haut auf UV-Strahlung gehören Erytheme, Mutationen, Immunsuppression, die Synthese von Vitamin D sowie die Hyperpigmentierung (Bräunung). Zu den chronischen, durch UV-Strahlung bedingten Schäden der Haut zählen die Hautalterung und die Karzinogenese, die beide durch Mutationen induziert werden (14).

UVA und UVB zeigen unterschiedliche Eigenschaften ihrer biologischen Wirkungen auf die Haut. UVB-Strahlung hat eine zellschädigendere und mutagenere Wirkung als UVA, wohingegen UVA in tiefere Hautschichten als UVB eindringen kann.

Während UVB direkt von der DNA absorbiert wird und einen grundlegenden DNA-Schaden hervorruft, ist UVA hauptsächlich für einen indirekten DNA-Schaden durch die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffradikalen verantwortlich (20).

Hautpigmentierung

Hautkrebs ist eine der häufigsten Formen von Krebs in der hellhäutigen Bevölkerungsgruppe in vielen Bereichen der Welt (15).

Das Auftreten von Hautkrebs hängt sowohl proportional mit der Menge an UV-Strahlung als auch umgekehrt proportional mit dem „Grad der Pigmentierung der Haut“ zusammen (15). Die heute gebräuchlichste Einteilung verschiedener Hauttypen erfolgt nach Fitzpatrick, einem amerikanischen Dermatologen, der erstmals 1975 eine derartige Klassifikation entwickelte. Diese wurde im Lauf der Jahrzehnte erweitert und umfaßt heute sechs Hauttypen. Ausschlaggebend für die klinische Zuordnung zu einem Hauttyp ist die Farbe der mit Sonnenlicht unbestrahlten Haut, sowie das Bräunungsverhalten und die Neigung, einen Sonnenbrand zu entwickeln. Pathogenetisch hängt die Einteilung von der Menge des individuell produzierten Melanins ab.

Melanin

Neben der vom Melaniningehalt abhängigen Einteilung der Hauttypen besitzt Melanin den natürlichsten Hautschuttfaktor gegenüber UV-Strahlung.

Epidemiologische Studien unterstützen die protektive Rolle von Melanin gegenüber Sonnenlicht, da sich eine entgegengesetzte Korrelation zwischen der Hautpigmentierung und dem Auftreten von sonnenbedingtem Hautkrebs gezeigt hat (18). Somit besteht eine geringere Häufigkeit von Hautkrebs bei Individuen dunkler Hautfarbe als bei Hellhäutigen (14).

Die abschirmende Wirkung besonders von Eumelanin beruht auf seiner Fähigkeit, als Breitband-UV-Absorptionsmittel und damit als physikalische Barriere das Eindringen von UV-Strahlung in die Epidermis zu reduzieren (21).

Bei Menschen mit weniger oder gar nicht vorhandenem Melanin in Haaren, Haut und Augen, den sogenannten Albinos bzw. Menschen mit Albinismus, liegt ein höheres Risiko vor, Hauttumoren im Laufe des Lebens zu entwickeln. Ein 10-Jahres retrospektives Review von Kiprono et al. hat gezeigt, dass das Hautkrebsrisiko in afrikanischen Albinos bedingt durch die Nähe zum Äquator und die damit verbundene höhere UV-Strahlungsbelastung und dem geringeren bis fehlenden Melaniningehalt größer ist (22).

Bislang galt, dass die Pigmentierung der Haut der wichtigste protektive Faktor gegenüber UV-Strahlung ist, da Melanin neben der Funktion als Breitband-UV-Absorptionsmittel auch antioxidative Eigenschaften hat und damit als Radikalfänger dient. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass Melanin vor allem nach UV-bedingter Sonnenexposition auch eine gewisse toxische Wirkung entfalten kann. So kann Melanin über die Erzeugung von freien Sauerstoffradikalen (ROS) nach UVA-Exposition DNA-Schäden erzeugen und als Photosensibilisator fungieren (23).

1.1.3 Pathogenese

Das Basalzellkarzinom wurde erstmals im Jahre 1827 von Arthur Jacob als ein destruierendes Geschwür seltsamen Charakters beschrieben, welches einen außergewöhnlich langsamen Wachstumsprozess, veränderten Rand und Oberfläche aufzeigt, das sich ohne die Entfernung nicht zurückbildet und benachbarte Lymphgefäße nicht infiltriert (24).

Ausgehend von den Basalzellen entwickelt sich das BZK im Bereich des Haarfollikelbalges, den follikulären Matrixzellen und speziellen Basalzellen der interfollikulären Epidermis. Man geht von pluripotenten Vorläuferzellen bei Erwachsenen und epithelialen Stammzellen bei Kindern mit multiplen BZKs aus (25).

Sporadische Basalzellkarzinome

Der überwiegende Teil der jährlich neu diagnostizierten BZKs ist sporadischer Natur und tritt im Vergleich zu dem Plattenepithelkarzinom so gut wie nie aus einer Karzinomvorstufe auf. Neben den oben bereits erwähnten exogenen Faktoren spielen untergeordnet auch endogene Faktoren wie genetische Defekte eine Rolle in der Entstehung.

Genetische Faktoren

Somatische Mutation im Sonic-Hedgehog (SHH) –Signalweg

Auf Molekularebene durchgeführte Untersuchungen zeigten bei Basalzellkarzinomen Störungen in der Regulation des Sonic-Hedgehog-Signalweges insbesondere durch Mutationen des Suppressor-Proteins Protein patched homolog 1-Gen (PTCH1). Diese Art der Mutation wurde vor allem bei BZKs im Rahmen des Basalzellnaevus-Syndroms beobachtet (25).

Hereditäre Basalzellkarzinome

Gorlin-Goltz-Syndrom

Das Basalzellnaevus-Syndrom wird auch Gorlin-Goltz-Syndrom genannt.

Ein geringer Teil aller neu aufgetretenen Basalzellkarzinomerkrankungen entstehen aus hereditären Krebsyndromen. Der Unterschied zum sporadischen Basalzellkarzinom besteht in Mutationen in der Keimbahn. Bei diesen Keimbahnmutationen sind alle Körperzellen betroffen, wohingegen beim sporadisch auftretenden Basalzellkarzinom die genetischen Defekte nur im Tumorgewebe zu finden sind. Das mit Abstand häufigste Auftreten hereditär bedingter Basalzellkarzinome zeigt sich bei dem autosomal-dominant vererbten Gorlin-Goltz-Syndrom.

Neben dem Auftreten multipler BZKs in bereits jungen Jahren zeigen diese Patienten weitere Fehlbildungen insbesondere des Skelettsystems wie Kieferzysten und des ZNS wie Verkalkungen der Falx cerebri (26).

Untersuchungen haben bei Patienten mit einem Gorlin-Goltz-Syndrom eine inkomplette Penetranz von Mutationen für das PTCH-Tumorsuppressorgen sowie für den Hedgehog-Signalweg nachgewiesen (27).

PTCH1 kodiert für ein Transmembranprotein, das als Rezeptor für die Hemmung eines weiteren Proteins, des Smoothened (SMO)-Proteins, zuständig ist.

Ein Defekt des PTCH1 führt zu einer ständigen Aktivierung des SMO, wodurch die Zellproliferation stimulierenden Signale dominieren (27).

Mutation des BRCA1- assoziiertem Protein 1 (BAP1)-Gens

Eine weitere Keimzellmutation, die ein Syndrom mit erhöhtem Risiko für das Auftreten von epithelialen Hauttumoren wie das BZK zur Folge hat, zeigte die aktuelle Studie von Mochel et al. Die in dieser Studie untersuchten Patienten wiesen eine heterozygote Keimzellmutation in dem BRCA1- assoziierten Protein 1 (BAP1), einem weiteren Tumorsuppressorgen, auf. Alle sieben mit BAP1 Keimbahnmutation untersuchten BZKs zeigten einen Verlust in der immunohistochemischen BAP1 Zellkernfärbung. Im Vergleich dazu konnten in 30 von 31 sporadisch aufgetretenen BZKs der Kontrollgruppe eine positive BAP1 Zellkernfärbung nachgewiesen werden (28).

1.1.4 Früherkennung, Diagnostik und Therapie

Früherkennung und Diagnostik

Das Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose ist nicht wie bei den überwiegenden Karzinomerkrankungen entscheidend für das Langzeitüberleben des Patienten, sondern für das operative Ausmaß und für die Art des damit verbundenen Verschlusses.

Als Untersuchung zur Früherkennung (Screening) wird in der Leitlinie ‚Basalzellkarzinom der Haut‘, veröffentlicht von der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) im Auftrag der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO) der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, zuletzt überarbeitet im Jahre 2012, die Empfehlung ausgesprochen, dass die Diagnose eines Basalzellkarzinoms i.d.R. klinisch gestellt wird. Die Sicherheit der klinischen Diagnose kann durch die Auflichtmikroskopie (Dermatoskopie) verbessert werden und in der Differentialdiagnostik hilfreich sein.

Die Auflichtmikroskopie ist ein nicht invasives Verfahren, welches abhängig vom Subtyp des Basalzellkarzinoms unterschiedliche Merkmale aufweist. Im Falle eines Basalzellkarzinoms des superfiziellen Typs (sBZK) zeigen sich dermatoskopisch typischerweise feine Teleangiektasien, viele kleine Erosionen und Strukturen entsprechend der dermoepidermalen Pigmentierung. Im Gegensatz dazu lässt sich ein sBZK beim Nachweis von eiförmigen Nestern ausschließen, während verzweigte Gefäße und große Ulzerationen Basalzellkarzinomen vom nodulären (nBZK) und infiltrativen (iBZK) Typ zugeordnet werden (29). Abhängig von den zum Teil oben genannten Kriterien zum Nachweis der unterschiedlichen Subtypen eines Basalzellkarzinoms konnten in einer Studie von Lallas et al. in 80% der untersuchten BZKs der richtige histopathologische Subtyp dermatoskopisch im Voraus erkannt werden (30).

Bei dem Verdacht auf das Vorliegen eines Basalzellkarzinoms der Haut sollte die Untersuchung des gesamten Hautorgans erfolgen und zur Diagnosesicherung eine histologische Untersuchung durchgeführt werden (31).

Deutschlandweit wird seit dem 01.Juli 2008 ein flächendeckendes Hautkrebs-Screeningprogramm von den gesetzlichen Krankenkassen angeboten. Anspruchsberechtigt ist jeder gesetzlich Versicherte über dem 35.Lebensjahr. Die Untersuchung kann alle 2 Jahre erfolgen. Die Kosten dafür werden von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen (32).

Diagnostik

Fakultative bildgebende Untersuchungen wie die Computertomographie zum Ausschluss einer Metastasierung sind in der Regel nicht notwendig. Eine lymphogene und hämatogene Metastasierung kommt bei Basalzellkarzinomen selten vor (33). Eine genaue Aussage über die Inzidenz der Metastasierung bei BZKs lässt sich in der Literatur nicht ausreichend belegen. Die niedrigste publizierte Inzidenz von Metastasen liegt bei 0,0028%. In einem Fallbeispiel von Cunneen et al. aus dem Jahre 2008 wurde von einem Patienten berichtet, bei dem neun Jahre nach Entfernung eines BZKs am Augenlid multiple Lungenmetastasen festgestellt worden sind. Histopathologisch stellte sich ein metatypisches, in der Fachsprache auch basosquamös genanntes BZK mit ähnlichen Eigenschaften wie der Primärtumor heraus. Ein metatypisches BZK weist sowohl BZK- als auch Plattenepithelkarzinomzellen auf und bringt ein höheres Risiko für eine Fernmetastasierung mit sich (34).

Therapie

Nach dem amerikanischen Krebsinstitut sind Basalzellkarzinome als Tumoren definiert, die so gut wie nie metastasieren und ein destruktives, infiltratives Tumorwachstum aufzeigen (35).

Bei der Behandlung des Basalzellkarzinoms wird nicht wie bei Karzinomen üblich zwischen einer kurativen und palliativen Therapie differenziert, sondern soweit es die lokale Tumorausdehnung zulässt, im Allgemeinen eine kurative Behandlung angestrebt.

Auch bleibt eine Unterscheidung zwischen einer neoadjuvanten und adjuvanten Behandlung bei Basalzellkarzinomen aus.

Eine Vielzahl an möglichen wirksamen Behandlungen ist bekannt und umfasst sowohl invasive als auch nicht-invasive Therapiemöglichkeiten. Letztere

umfassen lokale medikamentöse Behandlungen mit Imiquimod, einem Immunmodulator, sowie lokal destruierende Verfahren wie Kürettage, Kryotherapie, Lasertherapie und photodynamische Therapie (31, 36).

Eine Übersicht findet sich in Tabelle 1.

Nicht-operative Therapie und ihre Indikationen	
Strahlentherapie	<ul style="list-style-type: none"> • Bei primärer Inoperabilität • Nach inkompletter chirurgischer Entfernung (R1,R2) • Kontraindiziert beim Basalzellkarzinom-Syndrom (Gorlin-Goltz-Syndrom)
Kryotherapie	<ul style="list-style-type: none"> • Kleinere oberflächliche Tumoren, z.B.an den Augenlidern • besonders bei Patienten mit höherem Alter, bei denen eine Operation eine größere Belastung darstellt
Immunologische Therapie mit Imiquimod	<ul style="list-style-type: none"> • v.a. bei superfiziellen Basalzellkarzinomen und bei Basalzellkarzinom-Syndrom
Photodynamische Therapie (PDT)	
Lokale Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU)	
Hedgehog-Inhibitoren (Vismodegib;LDE225)	<ul style="list-style-type: none"> • bei Patienten mit inoperablen, nicht strahlentherapierbarem bzw. nicht erfolgreich strahlentherapiertem und/oder metastasierendem Basalzellkarzinom

Tabelle 1: Therapiealternativen zur operativen Therapie (ohne histologische Kontrolle) (31).

Bei diesen Verfahren bleibt eine histologische Kontrolle des Behandlungsergebnisses aus. Ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Rezidiven im Vergleich zum operativen Standard liegt vor.

Die Basis der kurativen Therapie des Basalzellkarzinoms stellt gegenwärtig die chirurgische Resektion des Tumors im Gesunden mit histologischer Kontrolle dar (31). Diese Standardtherapie kann entweder durch eine Operation mit systematischer Schnittrandkontrolle (mikroskopisch kontrollierte Chirurgie) oder durch eine Operation mit tumoradaptiertem Sicherheitsabstand und konventioneller Histologie erfolgen (Tab. 2) (31).

Bei superfiziellen Basalzellkarzinomen wird häufig auch eine Horizontalexzision („Shave-Exzision“) durchgeführt.

Operative Therapie und ihre Indikationen	
Operation mit systemischer Schnittrandkontrolle (mikroskopisch kontrollierte Chirurgie)	<ul style="list-style-type: none"> • „Problemlokalisationen“ im Gesicht in Verbindung mit Größe und histologischem Typ • Rezidivtumoren
Operation mit tumoradaptiertem Sicherheitsabstand und konventioneller Histologie	<ul style="list-style-type: none"> • Kleine Tumoren in jeder Lokalisation • größere Tumoren an Stamm und Extremitäten
Horizontalexzision mit konventioneller Histologie, Kürettage	<ul style="list-style-type: none"> • Multifokale, superfizielle Basalzellkarzinome vor allem an Stamm und Extremitäten (Rumpfhauttyp)

Tabelle 2: Empfehlungen zur operativen Therapie des Basalzellkarzinoms (mit histologischer Kontrolle) in Bezug auf Tumortyp, Lokalisation und Rezidivrisiko (31).

Bleibt eine komplette Resektion des Tumorgewebes *in sano* aus, sollte eine erneute operative Entfernung bis zur erwünschten R0-Resektion durchgeführt werden, soweit dies der Allgemeinzustand des Patienten und die Tumorausdehnung zulassen.

1.1.5 Prognosefaktoren und Einteilungen des Basalzellkarzinoms

Behandlungsassoziierte Prognosefaktoren

Die Prognose von Patienten mit Basalzellkarzinom hängt von der Behandlung ab. Einer der entscheidenden Prognosefaktoren ist der mikroskopisch tumorfreie oder nicht tumorfreie Resektionsrand des resezierten Tumors. Dieser Resektionsrand und die damit verknüpfte mögliche Anwesenheit eines Residualtumors ist die Verbindung zwischen Behandlungs- und Tumorassoziierten Prognosefaktoren.

Tumorassoziierte Prognosefaktoren

Bis heute wurde in der Literatur eine Vielzahl von histopathologischen Subtypen von BZKs beschrieben. In der Arbeit von Vantuchová et al. wurde abhängig von unterschiedlichen Autoren eine Übersicht dieser Vielfalt möglicher BZK-Subtypen zusammengefasst (37).

Eine Übersicht über unterschiedliche Basalzellkarzinom-Einteilungen gibt Tabelle 3.

Sloan 1977	Sexton 1990	Ripley 1998	Weedon 2002	Rosai 2004	WHO 2006
Nodulär/ Solid	Nodulär/ Solid	Nodulär, incl. Mikro- Nodulär	Nodulär/ Solid	Nodulär/ Solid	Nodulär/ Solid
Super- fiziell	Super- fiziell	Superfiziell	Superfiziell	Superfiziell	Superfiziell
Infiltrativ	Infiltrativ	Infiltrativ, incl. Sklero- sierend	Infiltrativ	Infiltrativ	Infiltrativ
Nodulär mit infiltrativen Rändern	Mikro- nodulär		Mikro- nodulär	Mikro- Nodulär	Mikro- nodulär
			Fibro- epithelial	Fibro- epithelial	Fibro- epithelial
			Baso- squamös	Baso- squamös (Meta- typisch)	Baso- squamös
			Keratotisch	Keratotisch	Keratotisch
			Pigmen- tiert	Pigmentiert	
			Infundibulo- zystisch	Infundibulo- zystisch	Mit Adnex- Differen- zierung
			Adenoid	Adenoid	
			Zystisch	Zystisch	
	Sklero- sierend		Sklero- sierend	Sklero- sierend	
			Meta- typisch	Feinzellig	
	Ge- mischt	Gemischt	Gemischt		

Tabelle 3: Vergleich von Einteilungen von BZKs, modifiziert nach (37).

Die meisten Autoren verwendeten zwei grundlegende Kriterien bei der Erstellung ihrer Klassifikationen: Das histologische Wachstumsmuster und die histologische Differenzierung. Der überwiegende Teil der Autoren war sich einig, dass dem histologischen Wachstumsmuster die größte Bedeutung zuzuordnen ist (37). Im Gesamten betrachtet wurden in allen Arbeiten sowohl der noduläre als auch der superfizielle und infiltrative Subtyp genannt.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt das Basalzellkarzinom histologisch in acht verschiedene Arten (38).

Laut der S3-Leitlinie „Prävention Hautkrebs“ sind dabei BZKs vom nodulären Typ am häufigsten anzutreffen (39).

Die Einteilung der solitären bösartigen Tumoren erfolgt nach dem TNM System der „International Union against cancer“ (UICC). Im klinischen Alltag finden sie allerdings bei der Einteilung von BZKs kaum Anwendung, da die T-Klassifizierung zur Ausbreitung des Primärtumors zu grob ist und der Lymphknotenbefall (N) und die Fernmetastasierung (M) praktisch nicht vorkommen.

Eine weitere Information über den Primärtumor kann unter der Rubrik histopathologischer Differenzierungsgrad (Grading) festgehalten werden. Das Grading ist ein weiterer wichtiger Faktor der Prognoseeinschätzung.

Insbesondere, wenn gut und mäßig differenzierte („low grade“) Tumoren mit gering und undifferenzierten („high grade“) Tumoren verglichen wurden, konnte eine prognostische Bedeutung nachgewiesen werden, wobei die „high grade“ Tumoren eine signifikant schlechtere Prognose aufwiesen (38).

In Tabelle 4 ist das histopathologische Grading nach den Richtlinien der UICC aufgeführt (40)

Prognosefaktoren	Low-Risk	High-Risk
Lokalisation	<ul style="list-style-type: none"> • L < 20mm • M < 10mm • H < 6mm 	<ul style="list-style-type: none"> • L > 20mm • M > 10mm • H > 6mm
Tumordicke	< 2mm	> 6mm
Tumorgrenze	Gut definiert	Schlecht definiert
Resektionsrand-Status	Negativ	Positiv
Ort		Lippe, Ohr, Genital
Perineurale Invasion	Nicht, nur einzeln, asymptomatisch	Mehrere, symptomatisch
Schnelles Wachstum	Nicht vorhanden	Vorhanden
Subtyp	Nodulär, superfiziell	Mikronodulär, infiltrativ, sklerosierend

L: Stamm, Extremitäten; M: Wange, Stirn, Kopf und Hals; H: Gesicht

Tabelle 4: Prognosefaktoren abhängig vom histopathologischen Grading in Low-Risk und High-Risk-BZKs, (nach (40)).

Wichtig ist, dass die gebräuchlichen Einteilungssysteme wie das TNM System keine individuellen Vorhersagen erlauben. Aus diesem Sachverhalt heraus entstand der Gedanke, dass die mikroskopische Kontrolle des exzidierten BZKs für eine exaktere individuelle Prognoseeinschätzung und Therapie unabdingbar ist.

1.2 Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie

Vor der Therapie kann die Ausdehnung der bösartigen Hauttumoren trotz einer Vielzahl modernster Methoden bis heute makroskopisch nicht ausreichend beurteilt werden. Ein ausgeprägtes subklinisches Tumorwachstum zeigt sich mit dünnen Tumorausläufern und wenige Zellschichten breit. Somit besteht das Risiko, die Resektionsränder zu knapp oder unnötig weit zu wählen (41, 42).

Unter dem Begriff der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie (MKC) hat man eine Reihe an Methoden zusammengefasst, welche die Möglichkeit bieten, einen Tumor vollständig zu entfernen (RO Resektion / histologisch im Gesunden) und unter histologischer Sicherung das angrenzende gesunde Gewebe soweit wie möglich unberührt zu lassen (41).

Ihre Anwendung findet diese gewebeschonende chirurgische Technik für Hauttumoren an problematischen Lokalisationen im Rahmen von aggressivem Tumorwachstum oder wenn eine RO Resektion in jedem Falle sichergestellt werden sollte (41).

Die MKC teilt man in Methoden ein, die eine komplette und eine inkomplette Untersuchung der Resektionsränder ermöglichen (41).

Eine Übersicht der Methoden mit einer kompletten Untersuchung der Resektionsränder und ihren Vor- sowie Nachteilen bietet Tabelle 5.

Methoden	Vorgehen	Vorteile	Nachteile
Mohs-Chirurgie	Schüssel-förmige Exzision Kryostatschnitte	+ Komplette Schnitttrandkontrolle + zeitnaher Wundverschluss	- artefaktreich und fehleranfällig - nicht reproduzierbar - kompliziert und aufwendig - Qualitäts-einbußen durch Kryostatschnitte möglich
Münchener Methode	Horizontale Stufenschnitte Zylinder-förmige Exzision Kryostatschnitt	+ eindeutige Bestimmung der kompletten Exzision durch Darstellung des Gesamttumors (3D) + zeitnaher Wundverschluss	- zahlreiche Schnitte zu beurteilen - Beurteilung der Epidermis eingeschränkt - Interpretation erfordert besondere Erfahrung - nicht reproduzierbar
3D-Histologie- Techniken			
Randstreifen-Methode/ Muffin-Technik	Exzision en bloc Abtrennung von Rändern und ggf. Basis am nativen oder fixierten Exzidat	+ komplette Schnitttrandkontrolle + Exzision en bloc innerhalb eines Präparationsvorganges + für große (Randstreifen-Technik) und für kleine (Muffin-Technik) Exzisionen geeignet + bei Verständnis gut durchführbar	- Tumormitte bei kleinen Exzidaten schlechter beurteilbar - man benötigt geometrische Vorstellung

La Galette	Nachträgliche Entfernung von Rändern und Basis in situ	+ komplette Schnittrandkontrolle möglich + gutes Präparat des Tumors	- erschwerte Schnittführung - doppelte Blutstillung (Tumor und Ränder)
Square Procedure	Eckige Exzision zur besseren Abtrennung der Randschnitte	+ komplette Schnittrandkontrolle möglich	- eckige Wunddefekte - erschwerte Schnittführungen
Quadranten-Technik	Entfernung der Ränder am fixierten Präparat	+ komplette Schnittrandkontrolle + kein Mehraufwand außer bei der Fadenmarkierung	- durch die vorausgegangene Fixierung ist ein planer Anschnitt von der Peripherie erschwert
Wallgraben oder Perimeter-Technik	Zuerst Randexzision, Tumor ist zunächst Platzhalter	+ komplette Kontrolle des lateralen Schnittrandes möglich + Tumor bleibt zunächst in situ	- die Basis kann erst bei einem späteren Operationsschritt kontrolliert werden - nur für oberflächliche Tumoren

Tabelle 5: Methoden der Mikroskopisch kontrollierten Chirurgie mit vollständiger Darstellung der Schnittränder (41).

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die Methoden der inkompletten Untersuchung der Resektionsränder.

Methoden	Vorteile	Nachteile
Vertikale Stufenschnitte (Brotlaibtechnik)	+ Bestimmung der kompletten Exzision nur für die jeweilige Schnittebene + einfach in der geometrischen Vorstellung	- nur vertikale Zufallsschnitte, insbesondere bei größeren Exzidaten - diagnostische Lücken (je größer das Exzidat, desto größer die Lücken). - Ggf. viele Schnitte zu beurteilen
Vertikale Stufenschnitte und zusätzliche Proben vom Rand Probepbiopsien sind als „Mapping“ gedacht	+ eindeutige Bestimmung der kompletten Exzision (nur für die jeweilige Schnittebene) und der Proben + reproduzierbar bei aufwändiger Dokumentation + einfach, kaum Artefakte	- nur vertikale Zufallsschnitte und Zufallsbiopsien - zahlreiche Schnitte zu beurteilen - Probepbiopsien haben sehr große diagnostische Lücken (< 1% der Schnittränder werden untersucht)

Tabelle 6: Methoden der Mikroskopisch kontrollierten Chirurgie mit unvollständiger Darstellung der Schnittränder (41).

1.2.1 Mohs' Chirurgie

Eingeführt wurde die mikroskopisch kontrollierte Chirurgie in den vierziger Jahren von Frederic Mohs. Der amerikanische Dermatologe führte eine Art lückenlos histologisch kontrollierte Chemochirurgie ein, bei der, vor der eigentlichen Exzision des Tumor, dieser mittels einer Zinkchloridpaste lokal fixiert wurde (3). Aufgrund des sehr schmerzhaften Vorgehens wurde diese Methode im Verlauf der Jahre durch eine Vielzahl bekannter Dermatologen weiter modifiziert. Einer von ihnen war Tromovitch. Dieser hat im Jahre 1974 das Kryostatverfahren publiziert, bei der unter Lokalanästhetikum der Tumor entfernt und anschließend mittels Kryostatsschnitten histologisch untersucht wurde (4).

Die modifizierten Verfahren ermöglichen heute zuverlässig und schnell den Tumor gewebeschonend und sicher zu entfernen (4, 43).

Wie folgende Graphiken zeigen, wird der Hauttumor bei der klassischen Mohs' Surgery zunächst mit einer Kürettage abgetragen („debulking“), anschließend schüsselförmig exzidiert und in vier Quadranten geteilt.

Die histopathologische Beurteilung der Gewebeexzidate erfolgt an Gefrierschnitten (43).

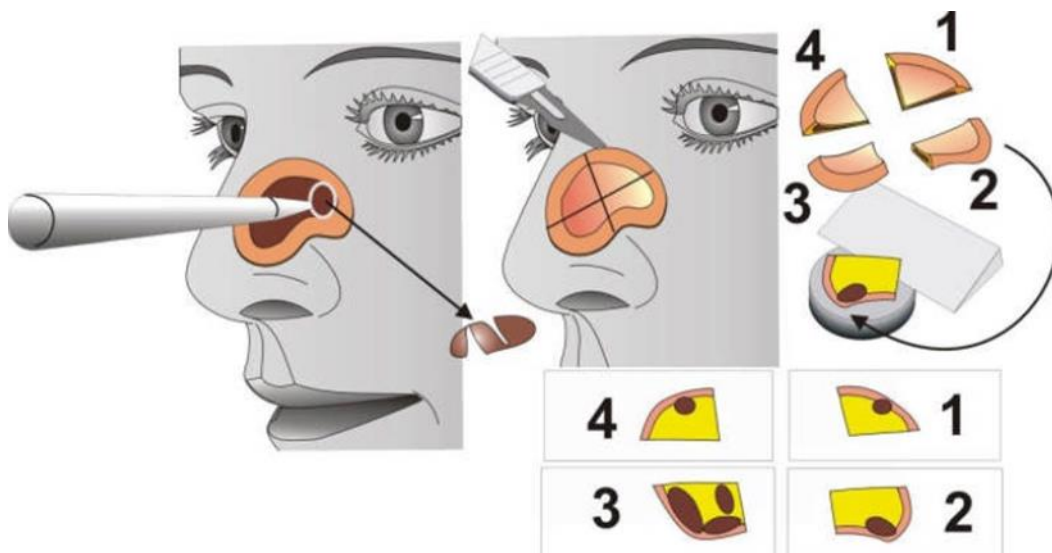


Abbildung 1: Mohs-Chirurgie (Kryostatverfahren) (41).

1.2.2 3-D-Histologie

Der Begriff „3D-Histologie“ wird als Überbegriff bzw. Abkürzung für die zahlreichen ähnlichen Verfahren der MKC international verwendet (44).

Darunter versteht man eine komplette dreidimensionale Schnitttrandkontrolle eines exzidierten Tumors durch systematisches Herausschneiden des Tumors und einer histologischen Beurteilung seiner Ränder und Basis von außen.

Dabei wird bei allen 3D-Verfahren eine Schnittführung senkrecht zur Hautoberfläche mit dem Skalpell durchgeführt und eine Entfernung des Tumors im Gesamten ermöglicht.

Eine intraoperative Inzision oder Fadenmarkierung des Tumors an einer definierten Stelle, bevorzugt bei 12 Uhr (in Bezug auf den Scheitelpunkt / Vertex des Kopfes) bietet eine einheitliche topographische Orientierung.

Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Techniken für den makroskopischen Zuschnitt des nicht fixierten Gewebes, von denen die für diese Arbeit wichtigsten kurz näher erwähnt werden (41).

Randstreifen-Methode (Tübinger Torte)

Die Randstreifen-Methode findet ihre Anwendung vor allem bei größeren Hauttumoren (größer als 2 cm Durchmesser).

Bei dieser Methode werden die Tumorränder von dem Resektat in einem Streifen von ungefähr 1-3 mm Dicke abgeschnitten und abhängig von der Größe in zwei oder mehr Abschnitte geteilt. Anschließend wird die Basis vom Mittelstück abgehoben und zusammen mit den Randschnitten in einer Histologie-Kassette für die histopathologische Untersuchung positioniert (41).

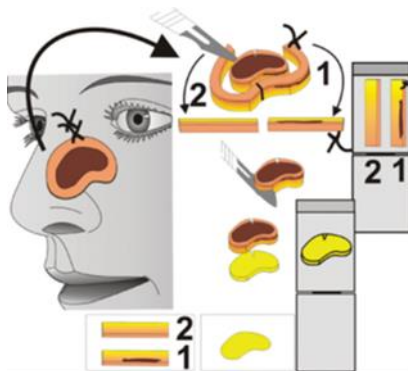


Abbildung 2: Randstreifenmethode (Tübinger Torte) (41).

Muffin Technik

Kleine Tumorexzidate (unter 2 cm Durchmesser) oder Anwender-abhängig auch größere können mit der Muffin-Technik zugeschnitten werden, welche in dieser Studie bevorzugt angewandt wurde.

Diese Methode bringt Ränder und Basis in eine Ebene.

Dabei wird der Tumor mit einem Sicherheitsabstand unter einer senkrechten bis leicht unterminierenden (90-110°) Skalpelführung en bloc exziiert. Nach der Operation wird das Exzidat für die 3D-Histologie folgendermaßen aufbereitet (Abb.3): Nach tiefen Einschnitten bei 12:00 und 6:00 Uhr relativ zur Körperachse, wird ein schmaler seitlicher Randstreifen ohne Abtrennung der Basis in einem etwa 60°-Winkel inzidiert. Ähnlich wie das Abziehen einer Muffin-Papierform können diese Ränder seitlich in eine horizontale Ebene gefaltet und die Tumormitte unter Belassen der Basis mit einer Präparierschere herausgetrennt werden (45).

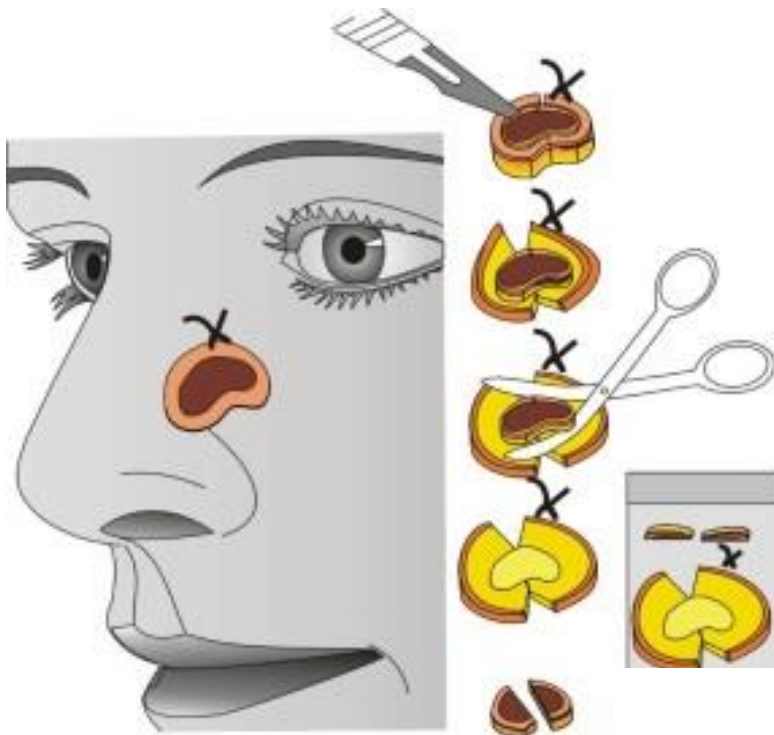


Abbildung 3: Muffintechnik (Rand und Basis in einer Ebene), modifiziert nach (41).

Vertikale Stufenschnitte (Brotlaibtechnik)

Häufige Anwendung zur histologischen Beurteilung bösartiger Hauttumoren findet das Verfahren der konventionellen histologischen Querschnittuntersuchung, auch als vertikale Stufenschnitte oder Brotlaibtechnik bezeichnet. Diese Methode wird ebenfalls oft fälschlicherweise unter dem Begriff der MKC angeführt, jedoch muss dieses Verfahren als Methode mit inkompletter Untersuchung der Schnittränder eingestuft werden, da es das eigentliche Ziel der MKC, eine komplette Tumorentfernung mit histologischer Sicherung, nicht vollständig gewährleistet (Tabelle 6) (41).

Bei diesem Verfahren wird der exzidierte Tumor, wie ein Brotlaib, in schmale Streifen geschnitten.

Je weniger Schnittstufen man durch ein Exzidat legt, umso größer werden die diagnostischen Lücken und umso höher wird die Gefahr, dass Tumorausläufer histologisch nicht identifiziert werden und somit eine Resektion im Gesunden vorgetäuscht werden kann (42). Bei Vermehrung der Schnittstufen erhöht sich der Arbeitsaufwand sowohl im Labor als auch bei der Beurteilung durch den Dermatopathologen (42).

Nützlich ist diese Methode hingegen zur gründlichen Beurteilung der Tumorarchitektur (41).

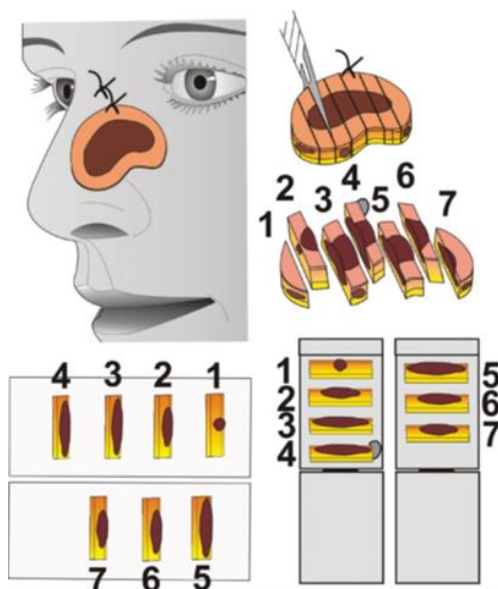


Abbildung 4: Vertikale Stufenschnitte (Brotlaibtechnik) (41).

1.3 Rapid Lump Examination

Vor acht Jahren wurde ein Verfahren zur sofortigen mikroskopischen Inspektion eines entfernten Gewebestücks auf Tumorfreiheit der Ränder und Basis publiziert: „Rapid Lump Examination“ (RLE) (7).

Diese neue Methode besteht aus einer kurzen standardisierten Färbung (Tabelle 8) des entfernten Gewebes nach makroskopischem Zuschnitt und einer im direkten Anschluss durchgeführten histologischen Beurteilung unter Anwendung eines dreidimensionalen Stereomikroskops.

Die schnelle mikroskopische Untersuchung mittels RLE könnte den Zeitaufwand der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie auf ein Minimum reduzieren, den Ablauf vereinfachen und eine vollständige Entfernung sicherstellen.

Die Pilotstudie von Moehrle et al. im Jahre 2010 zeigte eine hohe Sensitivität (90%) und Spezifität (94%) dieser Methode bei der Untersuchung von 78 Präparaten mit einem Stereomikroskop (7). Die Ergebnisse sind statistisch gesehen sehr zufriedenstellend. Eine Fehleranfälligkeit in der Beurteilung von Basalzellkarzinomen mit RLE wurde in dieser Studie auf der einen Seite bei der Differenzierung zwischen Tumorinseln und Hautanhangsgebilden wie Drüsenausführungsgängen gesehen auf der anderen Seite abhängig von der Erfahrung des Dermatopathologen in der Beurteilung von RLE-Bildern.

In der von Veenstra et al. veröffentlichten Studie wurden 22 Basalzellkarzinome mit Hilfe der RLE-Methode im Vergleich zu Kryostatschnitten untersucht. Für RLE zeigte sich eine Sensitivität von 83,8% und eine Spezifität von 94,0% (46). Auch Veenstra et al. kamen mit ihrer Studie zu der Schlussfolgerung, dass die diagnostische Genauigkeit von RLE vielversprechend ist; jedoch hat sich auch hier eine Notwendigkeit für eine weitere Verfeinerung der Methode herausgestellt (46).

1.4 Zielsetzung

Die zum jetzigen Zeitpunkt routinemäßig eingesetzten Diagnoseverfahren zur histopathologischen Beurteilung auf Tumorfreiheit der Schnittränder und Basis eines chirurgisch entfernten Basalzellkarzinoms, sind zeitaufwändig und benötigen einen definierten organisatorischen Arbeitsablauf.

‘Rapid Lump Examination‘ als neue Methode der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie/Mohs-Chirurgie könnte eine Möglichkeit bieten, das Basalzellkarzinom perioperativ schneller und sicherer zu diagnostizieren, ohne dabei die Qualität des Tumorexzidates zu beeinflussen. Die Zuverlässigkeit von RLE in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie ist noch nicht ausreichend belegt.

Das zentrale Thema dieser Arbeit beinhaltet das Ziel, ‘Rapid Lump Examination‘ an einer größeren Fallzahl als in der Pilotstudie innerhalb der klinischen Routine durchzuführen und mit den standardisierten HE gefärbten Paraffinschnitten in der 3D-Histologie zu vergleichen.

Ein weiteres Ziel der hier vorgelegten Untersuchung ist die Antwort auf die Frage, ob mit Hilfe der RLE der Versorgungsablauf sowohl im ambulanten als auch im klinischen Alltag vereinfacht werden könnte, indem bei hoher Sicherheit die Anzahl der operativen Eingriffe auf ein patientenschonendes Minimum reduziert würde.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungskollektiv

An der Studie nahmen insgesamt 86 Patienten teil (54 männlich, Durchschnittsalter 69 Jahre; 32 weiblich, Durchschnittsalter 65 Jahre; Tab.7).

Die Einwilligung in die Studienteilnahme erfolgte nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung über die histopathologischen Untersuchungen und die Datenerhebung.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhards-Karls-Universität Tübingen geprüft und nach deren Richtlinien durchgeführt (Protokoll-Nr. 683/2013BO2).

Bei den 86 Patienten wurden insgesamt 118 Tumoren operativ entfernt. Die dabei untersuchten verschiedenen Subtypen sowie eine Übersicht der Lokalisation der Basalzellkarzinome zeigt Tabelle 7.

		Anzahl	Relativ
Geschlecht (Mittelwert Alter bei OP)	Männer (69,0 Jahre)	54	62,8%
	Frauen (65,4 Jahre)	32	37,2%
	Mann/Frau Ratio	1,69	
Lokalisation des BZKs		n=118	
	Nase	28	23,7%
	Stirn	14	11,9%
	Schläfe	13	11,0%
	Wange	21	17,8%
	Ohr	9	7,6%
	Augenlid	5	4,2%
	Augeninnenwinkel	12	10,2%
	Lippe	2	1,7%
	Nasolabial	1	0,8%
	Stamm	13	11,0%

Histologischer Typ des BZKs		n=82	
	Nodulär/solide	44	53,7%
	Sklerodermiform/ fibrosierend	14	20,7%
	Superfiziell- multizentrisch	7	8,5%
	Mikronodulär	4	4,9%
	Ulzeriert	4	4,9%
	Nicht definierte BZK	9	11,0%
	Andere Hautveränderung	n=36	
Solare Keratose/ Morbus Bowen	17	47,2%	
Seborrhoische Keratose	1	2,8%	
Plattenepithelkarzinom	4	11,1%	
Talgdrüsenhyperplasie	2	5,6%	
Keratoakanthom	2	5,6%	
Chondrodermatitis	1	2,8%	
Dermaler melanozytärer Naevus	3	8,4%	
Postinflammatorische Granulation	5	13,9%	

Tabelle 7: Patientenalter (Mittelwert: 67 Jahre; Median: 72 Jahre; Max. 90 Jahre; Min. 27 Jahre), Tumorlokalisation, histologischer Tumortyp und andere Hautveränderung

Die nachfolgende Tabelle (Tab.8) zeigt eine Übersicht der histologischen Subtypen des Basalzellkarzinoms abhängig von den jeweiligen Settings sowie die verschiedenen Tumorgrößen.

		Gesamt	Praxis		Haut- klinik	
		Anzahl	Anzahl	Relativ	Anzahl	Relativ
Tumorgröße		n=118	n=59		n=59	
	< 5mm	12	3	5,1%	9	15,3%
	5– 10 mm	30	8	13,6%	22	37,3%
	10- 20 mm	46	29	49,2%	17	28,8%
	> 20 mm	20	13	22,0%	7	11,9%
	Keine Angaben	10	6	10,2%	4	6,8%
Tumor- lokalisation	Nase	28	24	40,7%	4	6,8%
	Stirn	14	7	11,9%	7	11,9%
	Schläfe	13	4	6,8%	9	15,3%
	Wange	21	8	13,6%	13	22,0%
	Ohr	9	2	3,4%	7	11,9%
	Augenlid	5	5	8,5%	0	
	Augeninnenwinkel	12	5	8,5%	7	11,9%
	Lippe	2	1	1,7%	1	1,7%
	Nasolabial	1	1	1,7%	0	
	Stamm	13	2	3,4%	11	18,6%
Histologischer Typ des BZKs		n=82	n=31		n=51	
	Nodulär/ Solide	44	15	48,4%	29	56,9%
	Sklerdermiform/ Fibrosierend	14	3	9,7%	11	21,6%
	Superfiziell- multizentrisch	7	3	9,7%	4	7,8%
	Mikronodulär	4	0		4	7,8%
	Ulzeriert	4	4	12,9%	0	
	Nicht definierte BZK	9	6	19,4%	3	5,9%

Andere Hautveränderung	n=36	n=28		n=8	
Solare Keratose/ Morbus Bowen	17	15	53,6%	2	25,0%
Seborrhoische Keratose	1	1	3,6%	0	
Plattenepithelkarzinom	4	2	7,1%	2	25,0%
Talgdrüsenhyperplasie	2	1	3,6%	1	12,5%
Keratoakanthom	2	2	7,1%	0	
Chondrodermatitis	1	1	3,6%	0	
Dermaler Melanozytärer Naevus	3	1	3,6%	2	25,0%
Postinflammatorisches Granulationsgewebe	5	5	17,9%	0	
Lentigo solaris	1	0		1	12,5%

Tabelle 8: Tumorgroße, Tumorlokalisation, histologischer Tumortyp und andere Hautveränderung in Abhängigkeit des Settings.

2.2 Studiendesign und -ablauf

Die an dieser Studie teilnehmenden 86 Patienten ließen sich im Zeitraum zwischen August und September 2014 aufgrund eines Basalzellkarzinoms in der Universitäts-Hautklinik Tübingen oder in der Praxisklinik Tübingen-Haut und Venen, Dr. Bern & Prof. Möhrle operieren.

In den ersten drei Wochen des Untersuchungszeitraumes wurden 39 Patienten in der Praxisklinik Tübingen-Haut und Venen eingeschlossen. In den darauffolgenden drei Wochen 47 Patienten in der Universitäts-Hautklinik Tübingen.

Im ambulanten Setting der Praxisklinik und im klinischen Ablauf des Krankenhauses wurden die exzidierten Tumoren mit der RLE-Methode untersucht und im Verlauf mit den HE-gefärbten Paraffinschnitten verglichen.

Rapid Lump Examination

In der Studie wurden in der Praxisklinik alle Tumoren von erfahrenen Dermatochirurgen exzidiert. In der Universitäts-Hautklinik wurde die Exzision auch von Assistenzärzten durchgeführt.

Die Tumoren wurden in einem separat zum Untersuchungsraum befindlichen Operationssaal entfernt und vom Pflegepersonal in den Arbeitsbereich, in dem das Stereomikroskop seinen festen Platz hatte, gebracht oder selbst im OP-Saal übernommen.



Abbildung 5: RLE Arbeitsplatz in der Praxisklinik Tübingen – Haut und Venen mit dem Leica- Stereomikroskop MA205A und einem selbstentwickelten Halteapparat.

Alle Tumoren wurden nach dem Prinzip der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie (MKC) entfernt, um die histologisch nachgewiesene vollständige Entfernung maligner Tumoren (R0-Resektion) bei größtmöglicher Schonung der nicht tumorbefallenen Umgebung zu ermöglichen (41).

Neben der direkten Tumorentfernung erfolgte bei wenigen Patienten eine primäre Probebiopsie oder Shaveexzision, um den klinisch nicht ganz eindeutigen Verdacht auf ein BZK sicherzustellen.

Die Tumoren wurden nach der chirurgischen Entfernung makroskopisch zugeschnitten (41). Am Häufigsten angewendet wurde in dieser Studie die Muffin-Technik (Abb.3): Zusätzlich zu tiefen Einschnitten im Exzusat bei 12:00 & 6:00 Uhr zur Körperachse erfolgte ein Einschnitt bei 2:00 Uhr, um eine anschließende topographische Orientierung nach Anwendung des Färbeprotokolls für RLE zu gewährleisten.

Beide Dermatopathologen (MM und JB) brachten eine langjährige Erfahrung in der Beurteilung von Hauttumoren und ihrer Tumorränder in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie mit.

MM war vor Beginn der Studie bereits mit der RLE-Methode und dem Beurteilen der entsprechenden stereomikroskopischen Bilder durch seine Vorarbeiten vertraut (7, 46).

JB hingegen erhielt von MM vor Beginn der Studie eine kurze Einführung in die Interpretation und Beurteilung von RLE-Bildern.

Das bereits in der Pilotstudie von Moehrle et al. beschriebene Färbeprotokoll wurde in Vorversuchen optimiert (Tabelle 9 und Tabelle 10) und hatte keinen Einfluss auf die weitere Verarbeitung der Gewebeprobe (7).

Fixierung	Essigsäure 10%	20 sec
Reinigung	Leitungswasser	10 sec
Färbung	Toluidinblau 2%	20 sec
Reinigung	Leitungswasser	10 sec

Tabelle 9: Standardisiertes Färbeprotokoll (Toluidinblau) und Aufbereitung des Präparates

Name	Bezugsquellen
Essigsäure (Acetic acid glacial)	VWR Chemicals
Toluidinblau O für Mikroskopie	Reagenzien Merck AG Darmstadt
Leica Stereomikroskop MA205A	Leica
Probenhalterung	Eigenentwicklung

Tabelle 10: Herstellernachweis der verwendeten Materialien.

Durchschnittlich dauerte die Präparation und das Färben des Gewebes für die RLE 2 Minuten. Im Schnitt wurden 30 Sek. für die Präparation der Gewebeprobe benötigt.

Das Färben erfolgte in vier Schritten. Zuerst wurde das Gewebe für 30 Sek. in einen kleinen Behälter zur Fixierung in Essigsäure gegeben. Die anschließende Spülung in Leitungswasser benötigte etwa 10 Sek. Zum Färben wurde das Gewebe für weitere 20 Sek. in einem mit Toluidinblau gefüllten Behälter inkubiert und anschließend nochmalig für 10 Sek. in Leitungswasser gespült.

Nach Ablauf des Färbeprotokolls (60 Sek.) wurden die Präparate bei Bedarf auf einer Kompresse kurz abgetrocknet und anschließend auf einen Glasobjektträger gelegt.

Der Glasobjektträger wurde auf einer selbst entwickelten Halterung positioniert. Mit diesem Selbsthalteapparat konnten alle Rand- und Basisanteile des Präparates systematisch in allen Ebenen mikroskopisch betrachtet werden (Abb.5).

Bei den überwiegend durchgeführten Muffin-Schnitten wurde meist mit der Beurteilung der Mittelschnitte begonnen. Eine Orientierung im zentrumnah gelegenen Tumorgewebe zur besseren Beurteilung von Rand und Basis auf Tumorfreiheit war dadurch gegeben.

Anschließend wurden die 382 Präparate mit Hilfe eines Stereomikroskops (Leica MA205A) mit großer Tiefenschärfe und einer 10-bis 100-fachen Vergrößerung unter einer Beleuchtung mit kreuzpolarisiertem Licht direkt nach Tumorexzision und Toluidin-Schnellfärbung beurteilt und schriftlich dokumentiert.

Ausgewählte Exemplare wurden zusätzlich bildlich festgehalten.

Bei nicht planen Präparaten bietet die mit dem Stereomikroskop angeschlossene Software die Möglichkeit aus zusammengesetzten Bildstapeln eine einzige tiefenscharfe 2-dimensionale Aufnahme zu erzeugen.

Die histologische Diagnosestellung mit der Paraffin-Technik als Goldstandard schloss sich an die Untersuchung mit der RLE-Methode an.

Paraffinhistologie

Nach der Beurteilung mit dem RLE-Verfahren wurden alle Präparate auf einem Einbettpapier in einer Histologiekassette platziert, die 'Muffins' mittels einer Farbmarkierung bei 12:00 -1:00 Uhr markiert, und über Nacht in Formalin fixiert (45).

Alle Anteile des Gewebes wurden in Paraffin eingebettet, mittels eines Mikrotoms geschnitten und die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Die Resektate, die in der Universitäts-Hautklinik Tübingen exzidiert wurden, wurden an die Dermatopathologie im eigenen Hause zur histologischen Begutachtung überführt. Eine Beurteilung der HE-gefärbten Paraffinschnitte erfolgte am Folgetag.

Die Tumorexzidate aus der Praxisklinik gingen zur histopathologischen Beurteilung an die Praxis für Pathologie & Zytologie Dr. Geppert / Beinhofer & Kollegen in Tübingen, mit konsiliarischer dermatopathologischer Nachbefundung durch Prof. Dr. M. Möhrle. Das histopathologische Ergebnis der HE-gefärbten Schnitte wurde bei Dringlichkeit am Folgetag kommuniziert oder wurde nach einigen Tagen übermittelt.

Im Anschluss wurden die histopathologischen Ergebnisse der Dauerpräparate mit dem RLE-Ergebnis verglichen und dokumentiert.

Abhängig von dem jeweiligen histopathologischen Befund und dem vorausgegangenen operativen Vorgehen, erfolgte nach Vorliegen der HE-Schnitte eine Nachresektion bei Tumoren, die nicht *in sano* entfernt worden waren. Bei diesen Patienten wurde das gesamte Verfahren wiederholt durchgeführt, bis Tumorfreiheit gewährleistet war. Bei histologischen Befunden, die eine direkte vollständige Tumorsektion bestätigten, konnte ein, wenn

bereits bei Tumorentfernung noch nicht direkt durchgeführter, zweizeitiger Wundverschluss erfolgen.

Abhängig von der Defektgröße erfolgte eine direkte primäre Hautnaht, ein lokaler Verschiebelappen oder eine Defektdeckung mit Hilfe von Spalt- oder Vollhaut.

Die Nachsorge der Tumorpatienten erfolgte in der jeweiligen Einrichtung, in der die Entfernung des Basalzelltumors durchgeführt wurde. Dabei sollten die Patienten nach dem chirurgischen Eingriff je nach klinischem postoperativen Befund in dem entsprechenden Zeitintervall in der Ambulanz der Universitäts-Hautklinik, in der Praxisklinik Tübingen oder bei dem betreuenden Hausarzt zur weiteren Wundkontrolle und Entfernung der Fäden vorstellig werden. Eine Wiedervorstellung zum jährlichen Hautscreening wurde den Patienten empfohlen.

2.3 Statistische Auswertung

Die RLE-Diagnose am Frischgewebe wurde in beiden Einrichtungen jeweils durch einen Dermatopathologen (MM oder JB) erstellt.

Die Ergebnisse der analysierten RLE-Bilder wurden mit den histopathologischen Befunden der Paraffinschnitte verglichen und dokumentiert.

Die diagnostische Genauigkeit der RLE zum Nachweis von Resttumorzellen wurde durch Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positivem Vorhersagewert (PPV) und negativem Vorhersagewert (NPV) bestimmt.

3 Ergebnisse

Im Gesamten wurden 382 Präparate aus 118 Tumoren von 86 Patienten einschließlich 72 Mittelschnitten, 281 Quadranten (Rand & Basis), 10 Shave-Exzisionen und 19 Stanzbiopsien untersucht.

3.1 Zeitbedarf

Durchschnittlich dauerte die Präparation und Färbung des Gewebes für die RLE-Methode 2 Minuten: 30 Sek. für die Präparation der Gewebeprobe, 30 Sek. zur Fixierung in Essigsäure und anschließender Spülung in Leitungswasser, 30 Sek. zur Färbung in Toluidinblau und anschließender nochmaliger Spülung in Leitungswasser sowie 30 Sek. für die Platzierung des Gewebes auf dem Objektträger.

3.2 Bildgebende Analyse

Alle 382 Präparate wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops (Leica MA205A) direkt nach der Tumorexzision und Durchführung der Färbung von einem der beiden Dermatopathologen (Prof. Dr. M. Möhrle (MM) oder Prof. Dr. Jürgen Bauer (JB)) in den jeweiligen Settings beurteilt.

Das Stereomikroskop erlaubt eine 10 bis 100-fache Vergrößerung sowie eine dreidimensionale Darstellung des Präparates.

Innerhalb weniger Sekunden bis Minuten war es möglich, durch Betrachtung aller Ränder und der Basis eine Aussage über den Resektionsstatus zu machen.

Die Beurteilung aller Präparate wurde schriftlich dokumentiert. Ausgewählte Exemplare wurden zusätzlich bildlich festgehalten.

Bei den nicht planen Präparaten bot die mit dem Stereomikroskop angeschlossene Software die Möglichkeit, aus zusammengesetzten Bildstapeln eine einzige scharfe 2-dimensionale Aufnahme zu erzeugen.

Mit den nachfolgenden Bilderpaaren soll ein Ausschnitt der bildgebenden Analyse dieser Studie veranschaulicht werden.

In dem ersten Bilderpaar zeigt das linke Bild die Anwendung der RLE-Methode am Beispiel eines Mittelschnittes eines zuvor makroskopisch zugeschnittenen

Tumors nach der Muffin-Technik. Unterhalb der hell dargestellten Epidermis mit vereinzelt in die Höhe ragenden Haaren zeigen sich multiple scharf abgrenzbare Tumorinseln mit einer randbetonten Blaufärbung und zentralen Aufhellung. Die randbetonte Blaufärbung lässt sich mit Hilfe der für BZK typischen palisadenförmigen Anordnung der Zellen erklären. Das selbige histologische Korrelat lässt sich in dem rechten Bild mit Hilfe eines HE gefärbten Paraffinschnittes darstellen.

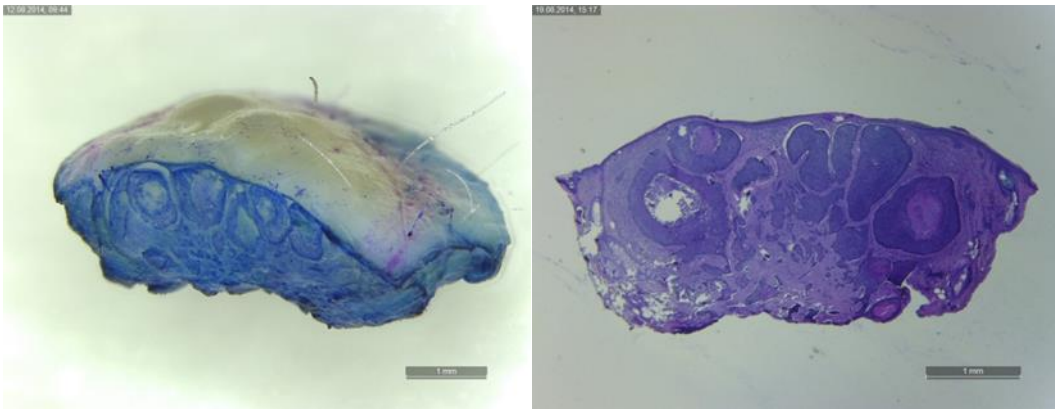


Abbildung 6: Noduläres Basalzellkarzinom. (a) Rapid lump examination (RLE), schnelle Toluidin- Färbung. Direkte Stereomikroskopie. (b) HE-gefärbter Paraffinschnitt. .

Das nachfolgende Bilderpaar zeigt ein scharf abgrenzbares noduläres BZK mit einer zentral gelegenen Ulzeration. Deutlich wird an diesem Bild die bestehende Verbindung des Tumors zur Epidermis. Auf dem RLE-Bild lässt sich das subkutane Fettgewebe in der Tiefe gelblich darstellen.

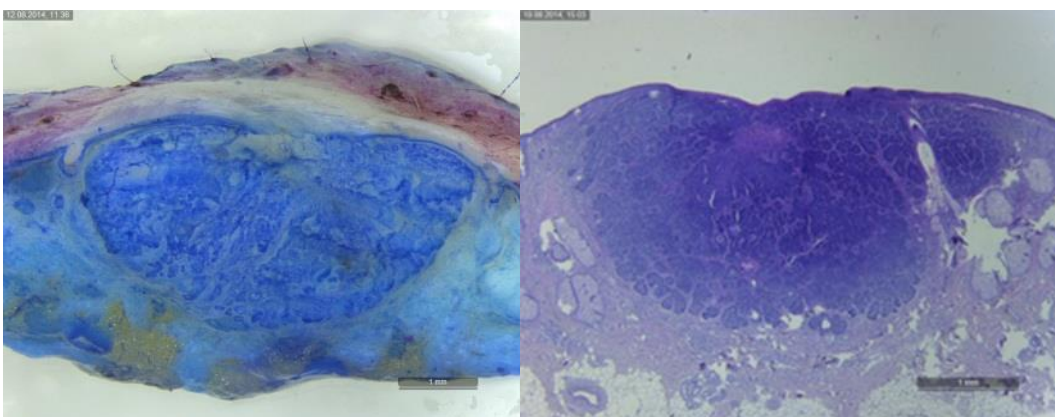


Abbildung 7: Ulzeriertes noduläres, zum Teil solides, besonders keratotisches Basalzellkarzinom. (a) Rapid lump examination (RLE), schnelle Toluidin- Färbung. Direkte Stereomikroskopie. (b) HE-gefärbter Paraffinschnitt.

Die größte Herausforderung in der Beurteilung der RLE-Bilder ist sicherlich die Unterscheidung zwischen Tumorinseln und Hautanhangsgebilden wie Talg- oder Schweißdrüsen. Die nachfolgenden Bilder machen dies deutlich. Auf dem ersten Bilderpaar ist die Tumormitte eines superfiziellen multizentrischen BZKs zu sehen. In dem zweiten Bilderpaar ist ein Ausschnitt des Muffins von dem selbigen Tumor dargestellt. Histopathologisch sind die Ränder und Basis des Muffins mittels des HE-gefärbten Paraffinschnitts tumorfrei gesichert. Betrachtet man die einzelnen Tumorinseln genauer, weisen sie eine gewisse Ähnlichkeit mit den multiplen Talgdrüsen auf dem RLE-Bild des Muffins auf. Bei der direkten Untersuchung mit dem Stereomikroskop besteht die Möglichkeit, einzelne Ausläufer näher zu fokussieren und auf eine mögliche Verbindung zum Haarschaft hin zu untersuchen.

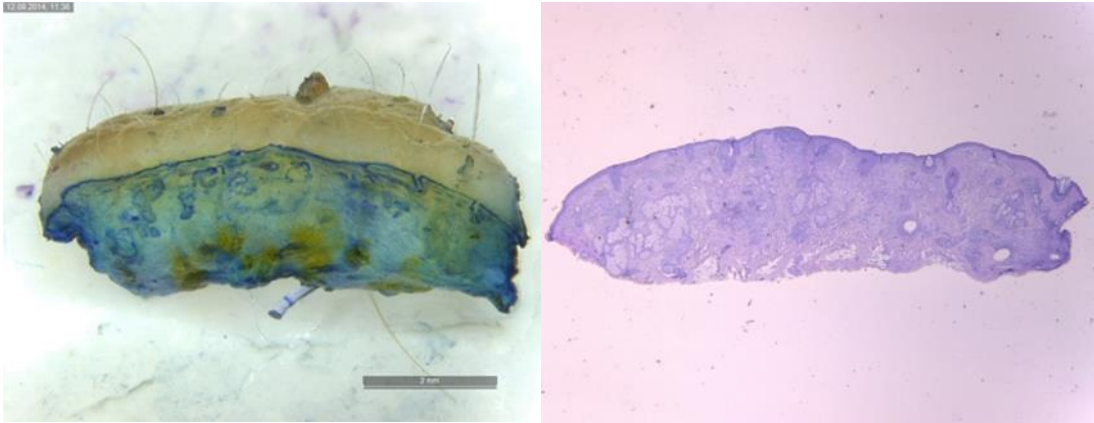


Abbildung 8: Tumormitte mit Ausläufern eines superfiziellen multizentrischen BZK (a) Rapid lump examination (RLE), schnelle Toluidin- Färbung. Direkte Stereomikroskopie. (b) HE-gefärbter Paraffinschnitt.

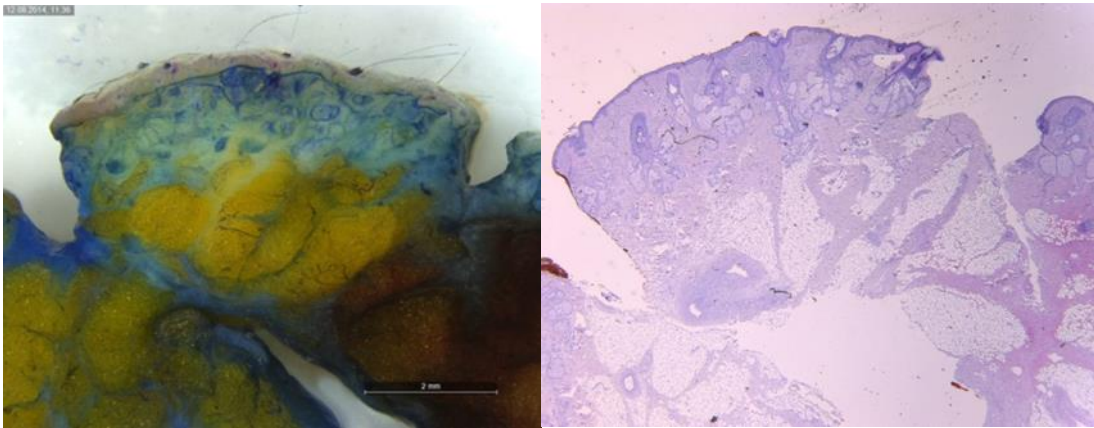


Abbildung 9: Tumorfreier Muffin (a) Rapid lump examination (RLE), schnelle Toluidin- Färbung. Direkte Stereomikroskopie. (b) HE-gefärbter Paraffinschnitt.

Die Ergebnisse der analysierten RLE-Bilder wurden mit den histopathologischen Befunden der Paraffinschnitte verglichen und dokumentiert.

Die diagnostische Genauigkeit der RLE zum Nachweis von Resttumorzellen wurde durch Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positivem Vorhersagewert (PPV) und negativem Vorhersagewert (NPV) bestimmt.

Die folgenden Tabellen 11-13 zeigen die Ergebnisse der jeweiligen Dermatopathologen insgesamt wie auch getrennt voneinander ausgewertet.

Praxisklinik und Univ.-Hautklinik	Korr pos	Korr neg	Falsch pos	Falsch Neg	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
Gesamt (n=382)	71	262	27	22	76%	91%	72%	92%
Mittelschnitt (n=72)	50	14	3	5	91%	82%	94%	74%
Quadrant Rand oder Basis (n=281)	10	232	23	16	38%	91%	30%	94%
Shave (n=10)	5	5	0	0	100%	100%	100%	100%
Probebiopsie (n=19)	6	11	1	1	86%	92%	86%	92%

Korr pos =korrekt positiv; Korr neg = korrekt negative; Falsch pos = falsch positiv, Falsch neg = falsch negativ; PPV= positiver Vorhersagewert; NPV= negativer Vorhersagewert

Tabelle 11: Ergebnisse des ambulanten und des klinischen Settings. MM und JB

Insgesamt zeigte bei allen in dieser Studie untersuchten 382 Präparaten die RLE eine Sensitivität und Spezifität von 76% und 91%. Die mit dem RLE-Verfahren in der Praxisklinik und in der Universitäts-Hautklinik Tübingen durch die Dermatopathologen beurteilten Präparate waren in 71 der 93 am HE-Schnitt positiven Fällen richtig positiv und in 262 der 289 am HE-Schnitt negativen Fälle richtig negativ. 27 der 289 negativen Präparate wurden als falsch positiv befundet. Bei 22 der 93 positiven Präparate wurden in der RLE keine Tumorzellen gesehen, jedoch waren diese in den HE gefärbten Paraffinschnitten vorliegend. Der positive Vorhersagewert lag bei 72%, der negative bei 92%.

Bei den Mittelschnitten war die Sensitivität 91% und die Spezifität 82%. Im Bereich der Quadranten lag die Sensitivität und Spezifität bei 38% und 91%. Die Shaves zeigten einen Sensitivitäts- und Spezifitätswert von jeweils 100% und die Probebiopsien einen Sensitivitätswert von 86% und einen Spezifitätswert von 92%.

Praxisklinik	Korr pos	Korr neg	Falsch pos	Falsch Neg	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
Gesamt (n=139)	23	110	3	3	88%	97%	88%	97%
Mittelschnitt (n=28)	12	12	2	2	86%	86%	86%	86%
Quadrant Rand oder Basis (n=85)	0	85	0	0	-	100%	-	100%
Shave (n=8)	5	3	0	0	100%	100%	100%	100%
Probebiopsie (n=18)	6	10	1	1	86%	91%	86%	91%

Korr pos =korrekt positiv; Korr neg = korrekt negative; Falsch pos = falsch positiv, Falsch neg = falsch negativ; PPV= positiver Vorhersagewert; NPV= negativer Vorhersagewert

Tabelle 12: Ergebnisse im ambulanten Setting, Praxisklinik Tübingen – Haut und Venen. MM als erfahrener Untersucher in der Beurteilung von stereomikroskopischen Bildern nach Anwendung der RLE-Methode (die Proben stimmen nicht mit denen überein, welche von von JB beurteilt worden sind: Tabelle 13).

In der Praxisklinik Tübingen–Haut und Venen wurden insgesamt 139 Präparate untersucht. Davon wurden 23 als korrekt positiv und 110 als korrekt negativ erkannt. In 3 von 139 Präparaten wurden vom erfahrenen Untersucher MM Tumorinseln mit Hilfe der RLE-Methode diagnostiziert, welche sich in dem HE-gefärbten Paraffinschnitt nicht bestätigten. In 3 der Präparate wurden Tumorzellen mit RLE nicht gesehen, stellten sich jedoch im HE-Präparat dar. Im Gesamten ergab sich eine Sensitivität von 88%, eine Spezifität von 97%. Der positive Vorhersagewert lag bei 88% und der negative bei 97%.

Die Sensitivität und Spezifität lagen bei den Mittelschnitten bei 86% und 86%.

Die Beurteilung der Quadranten, Rand und Basis, zeigt einen Spezifitätswert von 100%. Alle 85 Quadranten wurden mit Hilfe der RLE-Methode als korrekt

tumorfrei beurteilt. Bei allen Shaves (n=8) lag die Spezifität und die Sensitivität bei 100%. Hingegen bei den Probebiopsien (n=18) zeigte sich ein Spezifitätswert von 86% und ein Sensitivitätswert von 91%.

Univ.-Hautklinik-	Korr pos	Korr neg	Falsch pos	Falsch Neg	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
Gesamt (n=243)	48	152	24	19	72%	86%	67%	89%
Mittel-Schnitt (n=44)	38	2	1	3	93%	67%	97%	40%
Quadrant, Rand oder Basis (n=196)	10	147	23	16	38%	86%	30%	90%
Shave (n=2)	0	2	0	0	-	100%	-	100%
Probebiopsie (n=1)	0	1	0	0	-	100%	-	100%

Korr pos =korrekt positiv; Korr neg = korrekt negative; Falsch pos = falsch positiv, Falsch neg = falsch negativ; PPV= positiver Vorhersagewert; NPV= negativer Vorhersagewert

Tabelle 13: Ergebnisse des klinischen Settings in der Universitäts-Hautklinik. JB als weniger erfahrener Untersucher in der Beurteilung von stereomikroskopischen Bildern nach Anwendung der RLE-Methode (die Proben stimmen nicht mit denen überein, welche von MM in der Praxisklinik beurteilt worden sind: Tabelle 12).

In der Universitäts-Hautklinik Tübingen wurden für diese Arbeit insgesamt 243 Präparate beurteilt. In mehr als der Hälfte der Präparate (n=152) wurden mit RLE in Übereinstimmung mit der HE-Histologie keine Tumorzellen diagnostiziert. In 48 der 243 Präparate wurden Tumorausläufer mit RLE und der Paraffinhistologie festgestellt. 24 Präparate wurden falsch positiv und 19 falsch negativ beurteilt. Im Allgemeinen ergaben sich eine Sensitivität von 72%, eine Spezifität von 86%, ein PPV von 67% und ein NPV von 89%.

Bei den Mittelschnitten lagen die Sensitivität bei 93% und die Spezifität bei 67%. In den Quadranten konnten mit Hilfe von RLE in 10 von 196 Präparaten Tumorzellen korrekt positiv und in 147 der 196 als korrekt negativ identifiziert werden. Als falsch positiv stellten sich 23 und als falsch negativ 16 der 196 Quadranten dar. Es zeigte sich eine Sensitivität von 38% und eine Spezifität von 86% in den Quadranten.

3.3 Art des Präparates und Untersucherabhängigkeit

Die Genauigkeit der RLE-Diagnosen unterschied sich abhängig von der Art der makroskopischen Präparation und dem Betrachter. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11-13 zusammengefasst.

Mittelschnitte besitzen eine höhere Wahrscheinlichkeit, Anteile von Basalzellkarzinomen aufzuzeigen.

In dem ambulanten Setting der Praxisklinik wurden in den Mittelschnitten mit Hilfe von RLE in 12 von 14 im HE-Schnitt positiven Präparaten Tumorzellen gesehen. 12 von 14 Präparaten waren korrekt negativ (Sensitivität 86% und Spezifität 86%).

Im klinischen Setting der Universitäts-Hautklinik waren in den Mittelschnitten 38 Präparate von 41 im HE-Schnitt richtig positiv und in 2 von 3 Präparaten wurden Tumorzellen richtig negativ diagnostiziert (Sensitivität 93% und Spezifität 67%).

In den Quadranten (Resektionsränder und Basis), bei welchen mit gewisser Wahrscheinlichkeit eher wenige und dünne Tumorausläufer gefunden werden können, wurde in der Praxisklinik mit dem RLE-Verfahren in allen 85 Präparaten die Abwesenheit von Tumorzellen richtig erkannt (Spezifität 100%). In der Universitäts-Hautklinik wurden in 10 von 26 positiven Präparaten Tumorzellen mittels RLE korrekt festgestellt und das Fehlen von Tumorzellen in 147 von 170 Präparaten diagnostiziert. Die Sensitivität lag bei 38% und die Spezifität bei 86%. RLE war extrem hilfreich in der schnellen histopathologischen Diagnostik von Shaveexzisionen: Insgesamt zeigten 10 Shaveexzisionen eine perfekte Übereinstimmung zwischen RLE und HE-gefärbten Paraffinschnitten (Sensitivität und Spezifität 100%).

Insgesamt wurden mit der RLE Tumorzellen eines Basalzellkarzinoms in 71 von 93 Präparaten in demselben Bereich wie in der Histologie nachgewiesen (Sensitivität 76%). Tumorfremde Proben wurden in 262 von 289 Präparaten festgestellt und auch als solche in den HE-gefärbten Paraffinschnitten diagnostiziert (Spezifität 91%).

3.4 Differentialdiagnostische Schwierigkeiten

Unter den 382 Präparaten waren 4 histologisch gesicherte Plattenepithelkarzinome. Keines von ihnen wurde als ein solches durch die RLE-Stereomikroskopie diagnostiziert, sondern als ein Basalzellkarzinom interpretiert. In der statistischen Auswertung haben wir diese Interpretation als Tumornachweis und daher als richtig positiv angesehen. Hingegen wurde ein Tumor als Plattenepithelkarzinom in der RLE-Stereomikroskopie diagnostiziert, welcher sich in der Paraffinhistologie als ein solides Basalzellkarzinom darstellte. Diese Interpretation haben wir gleichermaßen als Tumornachweis und somit als richtig positiv in die Statistik einfließen lassen. Die Problematik der Fehlbeurteilung sahen wir in kleinen Adnexstrukturen, die sich zum Teil schwer zu Baszellinseln abgrenzen lassen. Sowohl die Tatsache, dass bei einer Toluidinfärbung von Nativgewebe Keratin nicht zur Darstellung kommt als auch die starke Anfärbung von Muskelgewebe mit Toluidinblau verursachten mitunter differentialdiagnostische Unsicherheiten.

4 Diskussion

Rapid Lump Examination ist ein neues, schnelles und einfaches Verfahren in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie von Basalzellkarzinomen.

In der Pilotstudie von Moehrle et al. zeigte RLE bereits eine hohe Diagnosegenauigkeit für den Nachweis von BZKs mit einer Sensitivität und Spezifität von 90% und 94% (7).

In der vorliegenden Studie wurden 382 frische Gewebeproben aus 118 Tumoren gesammelt und mit der RLE-Methode untersucht. Im Anschluss wurden HE-gefärbte Paraffinschnitte zur herkömmlichen Beurteilung mittels eines Lichtmikroskops durchgeführt.

Der Ablauf der RLE-Methode bei der Untersuchung von 118 Hauttumoren zeigte in dieser Studie eine gute Anwendbarkeit dieser neuen Methode sowohl im ambulanten als auch im klinischen Alltag. Die Vorbereitungszeit von RLE für die mikroskopische Beurteilung der Präparate dauert nur etwa 2 Min.

Genauigkeit der RLE und Untersucherabhängigkeit

RLE scheint sehr untersucherabhängig zu sein. Eine deutliche Lernkurve bei der Auswertung von Toluidinblau-gefärbtem frischem Gewebe war im Verlauf der Studie zu beobachten.

Ähnlich wie in der Pilotstudie (7) lag die Spezifität des erfahrenen Untersuchers bei 97%, die Sensitivität etwas niedriger bei 88%, der positive Vorhersagewert bei 88% und der negative Vorhersagewert bei 97%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass RLE besonders hilfreich war, sowohl das Vorliegen als auch die Abwesenheit von Tumorsträngen aufzuzeigen. Bei dem weniger erfahrenen Untersucher lagen die Sensitivität und Spezifität niedriger (72% und 86%).

Vor allem die relativ hohe Spezifität bei beiden Untersuchern macht RLE besonders nützlich, um das Nicht-Vorhandensein von Tumorzellen zu belegen.

Die geringeren Sensitivitätswerte können durch die Tatsache begründet werden, dass die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Tumorzellen in einer Probe abhängig vom Ausmaß der Anzahl vorhandener Tumorzellen ist. Die

Wahrscheinlichkeit, Tumorzellen aus der Mitte eines exzidierten Tumors nachzuweisen, ist größer als in den Resektionsrändern, wo mit weniger Tumorzellen zu rechnen ist.

Besonders deutlich wird diese Hypothese beim Betrachten der Quadranten.

In der Praxisklinik waren alle 85 Quadranten negativ und wurden mit der RLE korrekt negativ befundet (Sensitivität nicht berechenbar, Spezifität 100%).

In der Klinik waren bei den Quadranten, Rand- und Basisschnitten lediglich in 10 von 26 im HE-Schnitt positiven Präparaten Tumorzellen mittels RLE korrekt positiv. Das Fehlen von Tumorzellen wurde in 147 von 170 Präparaten korrekt negativ diagnostiziert. Die Sensitivität lag hier lediglich bei 38% und die Spezifität bei 86%.

Begründen könnte man diese Werte durch eine eher zurückhaltende Beurteilung des Präparates durch den Untersucher. Dabei wurden einzelne Tumoringeln offensichtlich als Muskelgewebe oder Hautanhangsgebilde falsch interpretiert.

Es erschien daher wichtig, die Ergebnisse in Bezug auf die verschiedenen Settings zu differenzieren, vor allem in Hinsicht auf die Quadranten (Resektionsränder und Basis).

Die Wahrscheinlichkeit, einen Tumor in einem operativ entfernten Gewebestück zu diagnostizieren, kann von der Tumorart und seinem Wachstumsmuster abhängen, aber auch vom Ausmaß des vom Operateur gewählten Sicherheitsabstandes, von den verschiedenen Winkeln der Inzisions- und Exzisionsränder und zu guter Letzt von der histopathologischen Aufarbeitung.

Hier könnte die operative Erfahrung des Operateurs eine entscheidende Rolle spielen. In einem Lehrkrankenhaus gibt es eine große Breite an praktischen Erfahrungen sowohl in der Beurteilung der makroskopischen Resektionsränder von Basalzellkarzinomen als auch im operativen Umgang mit dem Skalpell, welche zu unterschiedlichen Inzisionswinkeln und Sicherheitsabständen zum Hauttumor führen kann. Dies beeinflusst nicht unwesentlich die Wahrscheinlichkeit, ob ein Tumor vollständig oder unvollständig exzidiert wird.

In der Praxisklinik war eine langjährige operative Erfahrung gewährleistet. Alle 80 seitlichen und tiefen Ränder der Quadranten waren frei von Tumorsträngen in der RLE und in den HE Schnitten. Eine perfekte Übereinstimmung beider

histopathologischer Verfahren war gegeben. Dies könnte Ausdruck der erfahreneren klinischen Einschätzung sowie der Wahl und chirurgischen Umsetzung eines adäquaten Sicherheitsabstandes sein.

Auch verschiedene Invasionsmuster der Basalzellkarzinome in den zwei Kollektiven könnten als Erklärung dienen.

Die Beurteilung der Präparate mittels RLE erfolgte durch Anwenden der bei der Beurteilung H&E gefärbter Paraffinschnitte benutzten histopathologischen Kriterien. Hierbei zeigen bei den Basalzellkarzinomen die Tumorzellen eine typische palisadenförmige Stellung im Randbereich und besitzen große ovaläre basophile Nuklei, die von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben sind. BZKs zeigen charakteristischerweise eine Proliferation basaloid differenzierter Zellverbände, die sich zu Knoten oder Strängen anordnen. Diese Tumorknoten werden von dermale Stroma umgeben und man kann häufig zwischen Tumorepithel und Stroma eine für Basalzellkarzinome typische peritumorale Spaltbildung beobachten.

Entscheidend für die Auswertung der Ergebnisse dieser Studie sind die histologischen Unterschiede der klinischen Subtypen: Das solid-noduläre Basalzellkarzinom ist gekennzeichnet durch asymmetrische Tumorknoten mit peritumorale Spaltbildung und Stromareaktion. Eine scharfe Abgrenzung des Tumors lässt eine einfachere Begutachtung annehmen.

Das sklerodermiforme Basalzellkarzinom dagegen besteht aus schmalen Tumorsträngen, die aus nur sehr dünnen Zellschichten bestehen und von einem dichten, fibroblastenreichen Stroma umgeben werden. Durch die krakenartige Aufzweigung der Zellstränge ist der Tumor zur Seite und Tiefe hin schlecht abgrenzbar. Daraus lässt sich vermuten, dass dieser Subtyp schwieriger zu beurteilen sei.

In dieser Studie hingegen zeichneten sich die oben genannten histologischen Unterschiede der klinischen Subtypen nicht ganz eindeutig ab.

In Anbetracht der verschiedenen Settings und verschiedenen Invasionsmuster wurden in der Praxisklinik 26 von 29 nodulären/ soliden Basalzellkarzinome mittels dem RLE-Verfahren hinsichtlich der Absetzungsränder und in den

Mittelschnitten richtig befundet. In der Hautklinik wurden 12 der 15 nodulären/soliden Basalzellkarzinome ebenfalls richtig diagnostiziert. Bei der vermuteten schwierigeren Beurteilung sklerodermiformer/fibrosierender Basalzellkarzinome zeigte sich in der Praxisklinik eine Übereinstimmung bei 10 von 11 und in der Hautklinik bei 3 von 3 Basalzellkarzinomen.

Daraus kann man schlussfolgern, dass bei Anwendung des RLE-Verfahrens die histologischen Unterschiede der klinischen Subtypen zu keinen größeren Herausforderungen bzw. zu keiner schlechteren Anwendbarkeit führen als bei den Paraffinschnitten.

Eine der grundlegenden histologischen Herausforderungen in dieser Studie war die Unterscheidung zwischen Hautanhangsgebilden wie beispielsweise einer Haarwurzel oder Talgdrüse im Querschnitt und kleinen Basalzellkarzinomsträngen in der RLE.

Für den Untersucher ohne bisherigen Umgang mit RLE hat die Genauigkeit für RLE mit der Erfahrung zugenommen. Die anfänglich schwierige Differenzierung zwischen Hautanhangsgebilden und Basalzellkarzinominseln wurde im Verlauf der Studie einfacher.

Ähnlich wie andere bildgebende Verfahren, wie zum Beispiel die Röntgendiagnostik oder Sonographie, ist die RLE eine untersucherabhängige Technik. Zahlreiche Studien im Bereich der diagnostischen Radiologie haben diesen Aspekt bereits belegt, so wie eine vor kurzem veröffentlichte Studie von Barcaui et al. Daraus geht hervor, dass die korrekte Übereinstimmung der Beurteilung der Haut mit 22-MHz Ultraschall im Vergleich zu histologischen Schnitten von der Erfahrung und dem anatomischen Wissen des Untersuchers abhängig ist (47).

Rolle der Färbung und Anwendung eines dreidimensionalen Mikroskops

Eine Pilotstudie von Veenstra et al. zeigte, dass RLE als vielversprechende Methode im Vergleich zu den Gefrierschnitten mit einer Sensitivität und Spezifität von 83,8% und 94% die mikroskopisch kontrollierte Chirurgie beschleunigen kann (46). Die Verfasser dieser Studie diskutierten die verschiedenen Färbemethoden beider Verfahren als einen limitierenden Faktor, durch den sich zeigte, dass die Anwendung von Toluidinblau sich besser zur Darstellung

stromaler Zellen eignete als die für gewöhnlich bei Gefrierschnitten angewendete HE-Färbung (46).

Der Gebrauch eines Stereomikroskops für RLE offenbart zusätzliche Informationen zu den bekannten zweidimensionalen Bildern eines normalen histologischen Schnittes und beeindruckt den Dermatopathologen mit einer dreidimensionalen mikroskopischen Ansicht.

Elimination der Lichtreflexion.

Das Problem der mikroskopischen Beurteilung von frischem, *en bloc* entfernten, Gewebe ist die Lichtreflexion auf der nassen Präparatoberfläche. Diese Lichtreflexion kann durch Anwendung von Immersionsöl oder Auflegen eines Deckglases umgangen werden. Dabei entstehen Quetschartefakte. Die erste Pilotstudie zeigte jedoch, dass die Untersuchung mit polarisiertem Licht solche Reflexionsartefakte bei nassen Nativpräparaten am besten eliminieren kann (7).

Betrachtung von außen vs. Herstellung von histologischen Schnitten

In der herkömmlichen Histopathologie besitzt der Dermatologe die Möglichkeit, zusätzliche tiefere Schnittebenen zu beurteilen, die ihm helfen, seine Diagnose abzusichern. Ein solches „tiefer in das Präparat Hineinsehen“ steht bei der RLE nicht zur Verfügung.

Bei der konventionellen Histopathologie wird der in Paraffin eingebettete Gewebekblock durch das Laborpersonal bei der tangentialen Einbettung von der Basis oder vom Rand her nach zentral zum Tumorgewebe hin abgehobelt. Durch das Verwerfen der äußersten, womöglich noch negativen Randschnitte besteht bei diesem allgemein so praktizierten technischen Vorgehen ein gewisses Risiko, dann erst auf Tumorgewebe zu stoßen. Dies resultiert in ‚falsch-positiven‘ Ergebnissen in der Randschnittkontrolle im Paraffinschnittverfahren. Wobei die entsprechende Problematik falsch-positiver Befunde ebenso beim Erstellen von Gefrierschnitten vorliegt.

Es muss daher postuliert werden, dass ein Teil der Präparate in der RLE in Wirklichkeit richtig-negativ war, jedoch als „falsch-negativ“ eingestuft wurde, da der Goldstandard Paraffinschnitt zu einem artifiziell-bedingten falsch-positiven Ergebnis führte.

Von großem Vorteil ist, dass die RLE-Methode nach minimaler Fixierung und Schnellfärbung ohne den Bedarf an histologischen Schnitten das Gewebe von außen betrachtet und dabei weder das Gewebe verändert noch zerstört. Somit steht es der weiteren herkömmlichen histologischen Begutachtung oder für immunhistologische Untersuchungen uneingeschränkt zur Verfügung.

4.1 Weitere mikroskopische Verfahren

Multiphoton Laser-Scanning-Mikroskopie (MPLSM)

In einer Studie von Paoli et al. wurde ein Verfahren beschrieben, die Multiphoton Laser-Scanning-Mikroskopie (MPLSM), dessen Anwendung zu thermischen Gewebeschäden führen kann (48, 49). Als Folge wurde einer Spaltung der dermoepidermalen Junktionszone beobachtet (48). Bei diesem neuen, nicht-invasiven Diagnostikverfahren von nicht-melanozytären Hauttumoren wurde ein Problem in dem geringen autofluoreszierenden Signal der Gewebeprobe bei der Durchführung der MPLSM gesehen. Um tiefere Bereiche betrachten zu können, musste dabei die Laserleistung erhöht werden. Durch die Erhöhung der Laserleistung bestand die Gefahr der thermischen Gewebeschädigung. Ein Kompromiss zwischen der Laserleistung, der Detektorverstärkung und der Scanrate musste gemacht werden, um MPLSM-Bilder mit einer ausreichenden Kontrastierung zu erhalten, ohne eine thermische Schädigung des Gewebes zu erzeugen. Die Bildaufnahmen erfolgten von der Epidermis bis zu einer maximalen Scantiefe von 135 µm, woraus eine limitierte Beurteilbarkeit der Gewebestücke resultierte (49).

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Eine neuere Technik ist die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), welche die mikroskopisch kontrollierte Chirurgie ebenfalls beschleunigen könnte. Die CLSM stellt einen Ansatz dar, bei dem optische Schnitte eine histopathologische Beurteilung von Nativgewebe ermöglichen.

Die *in vivo* CLSM zeichnet sich durch eine hohe Auflösung von < 1 µm aus und lässt eine Beurteilung der Haut auf zellulärer und subzellulärer Ebene zu. Eine hohe Genauigkeit dieses Verfahrens wurde mit 100% Sensitivität und 88,5% Spezifität bei der *in vivo* Untersuchung von BZKs erreicht (50).

Hingegen beträgt bei der CLSM die maximale Eindringtiefe 0,35 mm, sodass sich die Beurteilbarkeit der Tumoren *in vivo* mikroskopisch auf die Epidermis und papilläre Dermis beschränkt (51). Mit der *ex vivo* CLSM können operativ entfernte Gewebeproben von der Außenseite der Schnittränder untersucht werden.

Die *ex vivo* Reflexions-CLSM zeigte eine bislang unzureichende Korrelation zwischen Histologie und CLSM-Bilder (6, 52). Die Kontrasterhöhung der Zellkerne durch Inkubation in Essigsäure wurde nicht für alle Basalzellkarzinom-Subtypen optimal erreicht. Besonders schwer war das Erkennen mikronodulärer und infiltrativer Typen des BZK in der Dermis (53).

In einer aktuellen Studie wurden unter Anwendung der *ex vivo* Fluoreszenz-basierten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (FCLSM) von Longo et al. die Eigenschaften der normalen Haut und des Basalzellkarzinoms im Vergleich zur standardisierten histopathologischen Untersuchungen beschrieben. Durch das Ersetzen der Essigsäure durch einen Fluoreszenz-Farbstoff war es möglich, Kerne anzufärben und damit den Kontrast zwischen der Kernmorphologie und dem umliegenden Gewebe zu erhöhen (54).

Der Nachteil der CLSM liegt darin, dass sie nur an Quetschpräparaten durchführbar ist. Aufgrund des, durch die Methode festgelegten 12 x 12 mm² großen Leserasters können nur kleine Tumoren gescannt werden.

Ein schnelleres Scannen und eine automatisierte Anpassung der Laserleistung müsste noch entwickelt werden, um standardisierte kontrollierbare Bilder zu erzielen. Wie auch in unserer Studie wurde dieses Verfahren bei Basalzellkarzinomen untersucht und sollte durch weitere Studien auf seine Anwendbarkeit zur Diagnostik anderer Hauttumoren überprüft werden (54). Mit einer neueren Studie von Bennassar et al. wurde hervorgehoben, dass die FCLSM bislang die Epidermis nur unzureichend darstellt und deshalb eine lückenlose Beurteilung eines Präparates auf Tumorfreiheit der Schnittränder mittels FCLSM nicht gelingt (55).

Die Ursache liegt in dem eingeschränkten planen Scannen der einzelnen exzidierten Tumoren und der damit verbundenen schlechteren Beurteilbarkeit durch mangelhaft dargestellte Epidermisabschnitte.

Optische Kohärenztomographie (OCT)

Eine weitere aktuelle Alternative ist die optische Kohärenztomographie (OCT). Basierend auf Infrarotlicht werden vergleichbar mit der CLSM optische Schnitte bis zu einer Scantiefe von 2 mm unter der Hautoberfläche und einer Auflösung von 7,5 µm erstellt. Die Einschränkung der Scantiefe von 2 mm *in vivo* ist sicherlich einer der wichtigsten Nachteile bei der Anwendung von OCT, da dadurch eine Beurteilung der tiefer gelegenen Basalzellkarzinominseln nur einschränkt möglich ist. Obwohl bereits eine große Anzahl von pathologischen Veränderungen mit OCT visualisiert und von normaler Haut unterschieden werden konnte, sind die Sensitivität und Spezifität der dafür benötigten Kriterien noch nicht ausreichend durch größere prospektive Studien belegt (56).

Wang et al. zeigte kürzlich, dass durch den Einsatz von präoperativer OCT die klinisch vorgeschriebenen Mindestabstände zwischen Tumor und Resektionsrand für die Anwendung der Mohs-Chirurgie verringert werden konnten, ohne die Sicherheit tumorfreier Ränder zu gefährden (57). So wurden 79% der Tumoren nach Anwendung der Mohs-Chirurgie mit ausreichendem Sicherheitsabstand entfernt. Hingegen mussten 21% in einem zweiten Schritt nachreseziert werden (57). *In vivo* OCT ist ein nicht invasives, präoperatives Verfahren, das eine unzureichende Übereinstimmung mit *ex vivo* Gefrierschnitten bei der Diagnostik von Basalzellkarzinomen hatte (54).

In der vorliegenden Studie war es ein großes Anliegen, ein zeitsparenderes und weniger aufwendiges Verfahren im Vergleich zu Paraffinschnitten zu untersuchen. Die Studie von Cunha et al. (58) hat diese Gesichtspunkte beim Vergleich der *ex vivo* OCT mit den herkömmlichen Gefrierschnitten ebenso beachtet; jedoch benötigt dieses Verfahren bis zur Diagnostik eines Basalzellkarzinoms nach Anwendung der Mohs-Chirurgie 7 Minuten zur Erstellung eines Bildes und ist somit zeitaufwendiger als die RLE.

Die RLE-Methode war der *ex vivo* OCT überlegen, bei welcher Sensitivität und Spezifität bei 19% bzw. 56% lagen und die Darstellung von Basalzellkarzinominseln im Vergleich zu Gefrierschnitten als unzureichend bezeichnet wurde (58). Ein Grund dafür wurde in der Nicht-Perfusion des *ex vivo* Gewebes

gesehen, welche eine verminderte Kontrastierung der OCT Bilder zur Folge hatte (58).

RLE im Vergleich mit anderen mikroskopischen Verfahren

Eine Übersicht der Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden im Vergleich zu RLE zeigt Tabelle 14.

Technik	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Zeit	Kosten
RLE	(72-)88	(86-)97	2 min/ Quadrant	+
Paraffinschnitte	100 ?	100 ?	24 h	+
Gefrierschnitte	100 ?	100 ?	30-60 min	+++
CLSM	40 – 95	30 – 75	5 min/ Quadrant	+++
OCT	19 – 74	~ 60	7 min/ Quadrant	+++

Tabelle 14: Sensitivität, Spezifität, Zeit- und Kostenfaktor der RLE im Vergleich zu anderen Verfahren in der mikrographisch kontrollierten Chirurgie von BZKs

RLE scheint unter den oben genannten Verfahren das schnellste und das günstigste Verfahren in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie zu sein. Die histologische Bildgebung mit Gefrierschnitten ist zeitaufwendig und teuer. Es erfordert eine entsprechende Ausstattung und speziell geschultes Personal. Folglich wurden bestimmte Indikationen diskutiert, die die Mohs Chirurgie unter Anwendung der Gefrierschnitttechnik limitieren sollten (59). Im Gegensatz dazu wird andererseits ein großzügiger Gebrauch der MKC für jede Art von Tumor befürwortet, welche mit subklinischen Ausläufern wächst (60).

Die RLE könnte eine zeitsparende und kostengünstige unterstützende Methode für die MKC darstellen. Die Anschaffungskosten für das Mikroskop (rund 10-20000 Euro) müssen einmalig getragen werden. Die Kosten für die Färbung der zu untersuchenden Gewebestücke sind zu vernachlässigen.

Die Anwendung der RLE erfordert zweifellos ein spezielles Training der anwendenden Dermatopathologen bzw. „Mohs' Chirurgen“, um das frische Gewebe richtig beurteilen zu können. Laborpersonal wird hingegen keines

benötigt. In kleinen Proben wie Shaves waren unter Anwendung von RLE 100% richtige Diagnosen von geübten als auch ungeübten Untersuchern gestellt worden. Im ambulanten Setting zeigte sich mit einem erfahreneren RLE-Untersucher auch eine fast perfekte Übereinstimmung zwischen RLE und Paraffinschnitten größerer Proben in der Randkontrolle.

Die RLE erreicht die hohe diagnostische Genauigkeit des Goldstandards der Gefrier- und Paraffinschnitttechnik.

Als eine reproduzierbare und zuverlässige Methode könnte RLE das Potential haben, die MKC zu revolutionieren.

Die kostengünstigen standardisierten HE-gefärbten Paraffinschnitte sollten aus forensischen Gründen weiterhin erstellt und befundet werden. Eine zuverlässige hochauflösende fotografische Archivierung sämtlicher Tumorabschnitte des dreidimensionalen Exzidates ist bei der RLE im Rahmen einer rationellen Diagnostik zumindest bislang aus Kosten und Zeitgründen nicht durchführbar.

Paraffin-Belegsschnitte scheinen aus diesem Grund in absehbarer Zukunft weiterhin erforderlich.

In Paraffin eingebettetes Gewebe stünde darüber hinaus für nachfolgend aufkommende spezielle Fragestellungen zur Verfügung, wie beispielsweise für immunohistologische oder genetische Untersuchungen.

4.2 Schlußfolgerung

Zusammenfassend ließ sich die RLE in der MKC von BZK-Patienten sowohl im ambulanten als auch im klinischen Setting sehr zufriedenstellend einsetzen.

Die operativ entfernten Hauttumoren konnten mit Hilfe von RLE innerhalb von 2 Minuten im Operationsbereich mikroskopisch beurteilt werden. Somit erlaubte diese Direktstereomikroskopie eine histologische "Bedside-Diagnose am OP-Tisch".

RLE ist in großem Maß anwenderabhängig und stützt sich auf einen speziell trainierten Umgang mit dem Verfahren.

Der klinische Nutzen von RLE könnte immens sein. Im Falle von sichtbaren Tumorausläufern an den Resektionsrändern hätte der Operateur die Möglichkeit, direkt in gleicher Sitzung in diesem Randbereich nachzuresezieren und somit das Ergebnis der Operation zu optimieren und die Anzahl der möglichen Eingriffe am Patienten zu minimieren. Bei Tumorfreiheit der chirurgischen Schnittränder wäre ein unmittelbarer Defektverschluss in gleicher Sitzung möglich. Durch die große Sicherheit einer lückenlosen Schnittrandkontrolle von BZKs könnten zahlreiche Operationen und Narkosen den Patienten erspart bleiben. Das perioperative Risiko durch länger offenstehende Wunden würde verringert werden.

Bisher wurde diese Methode nur für die Diagnostik von Basalzellkarzinomen angewendet. Es bedarf weiterer Studien, um zu klären, ob die RLE in der histopathologischen Beurteilung anderer Tumorentitäten, bei denen eine schnelle histologische Diagnostik notwendig ist, einsetzbar ist.

Zusammenfassung

Einleitung: Aufgrund steigender Inzidenzraten von Hautkrebs besteht die dringende Notwendigkeit für eine schnelle, zuverlässige und kosteneffiziente Therapie. In der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie (MKC) werden die lückenlosen Exzisionschnittränder an Gefrier- oder Paraffinschnitten untersucht. Neuere Verfahren sind die *ex vivo* CLSM und OCT, welche im Prinzip optische Schnitte erstellen. Im Gegensatz dazu wird bei der „Rapid Lump Examination“ (RLE) das native Tumorgewebe bzw. werden die Tumorränder unmittelbar mikroskopisch betrachtet.

Material und Methoden: 382 Präparate aus 118 Tumoren von 86 Patienten der Praxisklinik Tübingen und der Universitäts-Hautklinik Tübingen wurden untersucht. Das Tumorgewebe wurde makroskopisch als „Tübinger Torte“ oder in der „Muffin-Technik“ zugeschnitten. Die nativen Proben wurden nach einem standardisierten, 60 sek. dauernden Färbeprotokoll direkt mit einem Stereomikroskop unter polarisiertem Licht mikroskopisch untersucht. Beim anschließenden Paraffinschnittverfahren konnten die HE-gefärbten Schnitte nach frühestens 20 Stunden mikroskopisch beurteilt werden.

Ergebnisse: Die RLE-Methode verbrauchte kein Gewebe und führte zu keiner Beeinträchtigung der Qualität der nachfolgenden Paraffinschnitte. Im Vergleich zu Paraffinschnitten zeigte die RLE eine untersucherunabhängige hohe Spezifität (91%) und Sensitivität (76%); der PPV betrug 72% und der NPV 92%. Ein erfahrener Untersucher erzielte eine Sensitivität und Spezifität von 88 bzw. 97% sowie einen PPV und NPV von 88% und 97%.

Schlussfolgerung: Die RLE ist ein neues reproduzierbares und zuverlässiges Verfahren, welches die MKC von BZK deutlich beschleunigen kann. Sie bietet sowohl dem niedergelassenen als auch dem in der Klinik tätigen Arzt eine neue Möglichkeit, BZK schnell und sicher zu diagnostizieren und operative Eingriffe auf ein Minimum zu beschränken. HE-gefärbte Gefrier- oder Paraffinschnitte sollten aus forensischen Gründen als Goldstandard weiterhin erstellt werden.

Literaturverzeichnis

1. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *The British journal of dermatology*. 2012;166(5):1069-80.
2. Bakos RM, Kriz M, Mühlstlsquädt M, Kunte C, Ruzicka T, Berking C. Risk factors for early-onset basal cell carcinoma in a German institution. *European Journal of Dermatology*. 2011;21(5):705-9.
3. MOHS FE. Chemosurgery: a microscopically controlled method of cancer excision. *Archives of Surgery*. 1941;42(2):279-95.
4. Tromovitch TA, Stegeman SJ. Microscopically controlled excision of skin tumors. *Archives of dermatology*. 1974;110(2):231-2.
5. Löser C, Rompel R, Möhrle M, Häfner HM, Kunte C, Hassel J, et al. Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie (MKC). *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2010;8(11):920-5.
6. Schule D, Breuninger H, Schippert W, Dietz K, Moehrle M. Confocal laser scanning microscopy in micrographic surgery (three-dimensional histology) of basal cell carcinomas. *The British journal of dermatology*. 2009;161(3):698-700.
7. Moehrle M, Kaflein L, Ziefle S, Metzler G. Rapid lump examination (RLE) - a new tool for Mohs surgery? *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2011;9(7):534-8.
8. Dr. Peter Kaatsch DCSDK, Kapitel 4), Prof. Dr. Alexander Katalinic DSH, Dr. Sabine Luttmann, Christa Stegmaier, (GEKID K, 1.2, Anhang 5.2). Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Krebs in Deutschland 2011/2012, Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 10Ausgabe. 2015.
9. Madan V, Lear JT, Szeimies RM. Non-melanoma skin cancer. *Lancet*. 2010;375(9715):673-85.
10. Prof. Dr. Eckhard W. Breitbart, Antje Wende, Dr. Peter Mohr, Dr. Rüdiger Greinert, Dr. Beate Volkmer, Dermatologisches Zentrum Buxtehude, et al. Hautkrebs. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2004.
11. Rudolph C, Schnoor M, Eisemann N, Katalinic A. Incidence trends of nonmelanoma skin cancer in Germany from 1998 to 2010. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2015;13(8):788-97.
12. Trakatelli M, Ulrich C, del Marmol V, Euvrard S, Stockfleth E, Abeni D. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in Europe: accurate and comparable data are needed for effective public health monitoring and interventions. *The British journal of dermatology*. 2007;156 Suppl 3:1-7.
13. Association of Population-based Cancer Registries in Germany (GEKID). Map of cancer incidence and mortality in Germany (GEKID-Atlas). 2014.
14. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*. 2008;84(3):539-49.
15. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*. 2010;49(9):978-86.
16. Soehnge H, Ouhtit A, Ananthaswamy ON. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosci*. 1997;2:d538-51.
17. Organization. WH. Ultraviolet radiation and health [online]. Available from URL: http://www.who.int/uv/uv_and_health/en/. [Accessed Juli 2016].

18. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med.* 1999;340(17):1341-8.
19. De Fabo EC. Arctic stratospheric ozone depletion and increased UVB radiation: potential impacts to human health. *Int J Circumpolar Health.* 2005;64(5):509-22.
20. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of dermatology.* 2002;138(11):1462-70.
21. Kaidbey KH, Agin PP, Sayre RM, Kligman AM. Photoprotection by melanin--a comparison of black and Caucasian skin. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 1979;1(3):249-60.
22. Kiprono SK, Chaula BM, Beltraminelli H. Histological review of skin cancers in African Albinos: a 10-year retrospective review. *BMC Cancer.* 2014;14:157.
23. Korytowski W, Pilas B, Sarna T, Kalyanaraman B. Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. *Photochem Photobiol.* 1987;45(2):185-90.
24. Jacob A. Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face: publisher not identified; 1827.
25. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol.* 2006;19 Suppl 2:S127-47.
26. Gorlin RJ. Nevroid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin.* 1995;13(1):113-25.
27. Kim MY, Park HJ, Baek SC, Byun DG, Houh D. Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci.* 2002;29(1):1-9.
28. Mochel MC, Piris A, Nose V, Hoang MP. Loss of BAP1 Expression in Basal Cell Carcinomas in Patients With Germline BAP1 Mutations. *Am J Clin Pathol.* 2015;143(6):901-4.
29. Longo C, Lallas A, Kyrgidis A, Rabinovitz H, Moscarella E, Ciardo S, et al. Classifying distinct basal cell carcinoma subtype by means of dermatoscopy and reflectance confocal microscopy. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2014;71(4):716-24 e1.
30. Lallas A, Tzellos T, Kyrgidis A, Apalla Z, Zalaudek I, Karatolias A, et al. Accuracy of dermoscopic criteria for discriminating superficial from other subtypes of basal cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2014;70(2):303-11.
31. Hauschild A, Breuninger H, Kaufmann R, Kortmann RD, Klein M, Werner J, et al. S2k Kurzleitlinie—Basalzellkarzinom der Haut. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft.* 2013;11(s3):11-6.
32. Breitbart PDEW. Hautkrebs-Screening: Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Prävention (ADP) e.V.; 2016 [Available from: <http://www.hautkrebs-screening.de/allgemein/screening/screening-info.php>].
33. Ting PT, Kasper R, Arlette JP. Metastatic basal cell carcinoma: report of two cases and literature review. *J Cutan Med Surg.* 2005;9(1):10-5.
34. Cunneen TS, Yong JL, Benger R. Lung metastases in a case of metatypical basal cell carcinoma of the eyelid: an illustrative case and literature review to heighten vigilance of its metastatic potential. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2008;36(5):475-7.
35. Institute NC. Definition of BCC 2016 [Available from: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=46515>].
36. Telfer NR, Colver GB, Morton CA, British Association of D. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *The British journal of dermatology.* 2008;159(1):35-48.
37. Vantuchová Y. ČR. Histological types of basal cell carcinoma. *SCRIPTA MEDICA (BRNO)* 2006;– 79 (5–6): 261–270, December 2006.
38. LeBoit PE. Pathology and genetics of skin tumours: IARC; 2006.
39. der LO, Wissenschaftlichen Ad, Fachgesellschaften M, e. V. (AWMF) DK, Krebshilfe eVDuD, (DKH) eV. S3-Leitlinie Prävention von Hautkrebs. 2014.
40. Brian O'Sullivan JDB, Anil K. D'Cruz, Martin F. Fey, Raphael Pollok, Jan B. Vermorken, Shao Hui Huang. Manual of clinical oncology 2015 [27.08.2016]. Available from:

<https://books.google.de/books?id=m8kvCgAAQBAJ&pg=PA679&lpg=PA679&dq=uicc+tnm+bcc&source=bl&ots=juhLXJNzqE&sig=A03s5evdzeCnKBePgGN05PJuwqs&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwje8c7q3eHOAhULnBoKHTXiDf8Q6AEIJDAB#v=onepage&q=uicc%20tnm%20bcc&f=false>.

41. Loser CR, Rempel R, Mohrle M, Hafner HM, Kunte C, Hassel J, et al. S1-Leitlinie: Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie (MKC). Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG. 2015;13(9):942-51.
42. Breuninger H, Konz B, Burg G. Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie bei malignen Hauttumoren. Dtsch Arztebl. 2007;104(7):427-32.
43. Mohs FE. Chemosurgery: microscopically controlled surgery for skin cancer—past, present and future. The Journal of dermatologic surgery and oncology. 1978;4(1):41-54.
44. Moehrle M, Dietz K, Garbe C, Breuninger H. Conventional histology vs. three-dimensional histology in lentigo maligna melanoma. The British journal of dermatology. 2006;154(3):453-9.
45. Mohrle M, Breuninger H. [The Muffin technique--an alternative to Mohs' micrographic surgery]. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG. 2006;4(12):1080-4.
46. Veenstra M, Ostertag J, Verhaegh M, Nuessle N, Moehrle M. Rapid Lump Examination as a New Aid to Speedup Mohs Micrographic Surgery: A Pilot Study. Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]. 2016;42(5):665-71.
47. Barcaui Ede O, Carvalho AC, Pineiro-Maceira J, Barcaui CB, Moraes H. Study of the skin anatomy with high-frequency (22 MHz) ultrasonography and histological correlation. Radiol Bras. 2015;48(5):324-9.
48. Masters BR, So PT, Buehler C, Barry N, Sutin JD, Mantulin WW, et al. Mitigating thermal mechanical damage potential during two-photon dermal imaging. J Biomed Opt. 2004;9(6):1265-70.
49. Paoli J, Smedh M, Wennberg AM, Ericson MB. Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: morphologic features for future non-invasive diagnostics. The Journal of investigative dermatology. 2008;128(5):1248-55.
50. Guitera P, Menzies SW, Longo C, Cesinaro AM, Scolyer RA, Pellacani G. In vivo confocal microscopy for diagnosis of melanoma and basal cell carcinoma using a two-step method: analysis of 710 consecutive clinically equivocal cases. The Journal of investigative dermatology. 2012;132(10):2386-94.
51. Eichert S, Mohrle M, Breuninger H, Rocken M, Garbe C, Bauer J. Diagnosis of cutaneous tumors with in vivo confocal laser scanning microscopy. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG. 2010;8(6):400-10.
52. Ziefle S, Schule D, Breuninger H, Schippert W, Moehrle M. Confocal laser scanning microscopy vs 3-dimensional histologic imaging in basal cell carcinoma. Archives of dermatology. 2010;146(8):843-7.
53. Patel YG, Aranda I, Halpern AC, Rajadhyaksha M, Li Y, Nehal KS. Confocal reflectance mosaicing of basal cell carcinomas in Mohs surgical skin excisions. Journal of biomedical optics. 2007;12(3):034027--10.
54. Longo C, Rajadhyaksha M, Ragazzi M, Nehal K, Gardini S, Moscarella E, et al. Evaluating ex vivo fluorescence confocal microscopy images of basal cell carcinomas in Mohs excised tissue. The British journal of dermatology. 2014;171(3):561-70.
55. Bennàssar A, Vilata A, Puig S, Malveyh J. Ex vivo fluorescence confocal microscopy for fast evaluation of tumour margins during Mohs surgery. British Journal of Dermatology. 2014;170(2):360-5.

56. Alawi SA, Kuck M, Wahrlich C, Batz S, McKenzie G, Fluhr JW, et al. Optical coherence tomography for presurgical margin assessment of non-melanoma skin cancer - a practical approach. *Experimental dermatology*. 2013;22(8):547-51.
57. Wang KX, Meekings A, Fluhr JW, McKenzie G, Lee DA, Fisher J, et al. Optical coherence tomography-based optimization of Mohs micrographic surgery of Basal cell carcinoma: a pilot study. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2013;39(4):627-33.
58. Cunha D, Richardson T, Sheth N, Orchard G, Coleman A, Mallipeddi R. Comparison of ex vivo optical coherence tomography with conventional frozen-section histology for visualizing basal cell carcinoma during Mohs micrographic surgery. *The British journal of dermatology*. 2011;165(3):576-80.
59. Hoorens I, Batteauw A, Van Maele G, Lapiere K, Boone B, Ongenaes K. Mohs micrographic surgery for basal cell carcinomas: evaluation of indication criteria and predictive factors of extensive subclinical spread. *The British journal of dermatology*. 2015.
60. Moehrle M LS. Indications for Mohs Surgery. *Brit J Dermatol*. 2016;174(4):719-20.

Abbildungen

Abbildung 1: Mohs-Chirurgie (Kryostatverfahren)	28
Abbildung 2: Randstreifenmethode (Tübinger Torte)	29
Abbildung 3: Muffintechnik (Rand und Basis in einer Ebene).....	30
Abbildung 4: Vertikale Stufenschnitte (Brotlaibtechnik)	31
Abbildung 5: RLE Arbeitsplatz in der Praxisklinik Tübingen.....	38
Abbildung 6: Noduläres Basalzellkarzinom	44
Abbildung 7: Ulzeriertes noduläres Basalzellkarzinom.....	44
Abbildung 8: Tumormitte mit Ausläufern eines superfiziellen multizentrischen BZK	46
Abbildung 9: Tumorfreier Muffin	46

Tabellen

Tabelle 1:	Therapiealternativen zur operativen Therapie.....	18
Tabelle 2:	Empfehlungen zur operativen Therapie des BZKs	19
Tabelle 3:	Vergleich von Einteilungen von BZKs	21
Tabelle 4:	Prognosefaktoren abhängig vom histopathologischen Grading.....	22
Tabelle 5:	Methoden der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie mit vollständiger Darstellung der Schnittränder	26
Tabelle 6:	Methoden der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie mit unvollständiger Darstellung der Schnittränder	27
Tabelle 7:	Patientenalter, Tumorlokalisierung und histologischer Tumortyp	35
Tabelle 8:	Tumorgröße, Tumorlokalisierung, histologischer Tumortyp in Abhängigkeit des Settings.	37
Tabelle 9:	Standardisiertes Färbeprotokoll.....	39
Tabelle 10:	Herstellernachweis der verwendeten Materialien.	40
Tabelle 11:	Ergebnisse des ambulanten und des klinischen Settings.....	47
Tabelle 12:	Ergebnisse im ambulanten Setting	48
Tabelle 13:	Ergebnisse des klinischen Settings	49
Tabelle 14:	Sensitivität, Spezifität, Zeit- und Kostenfaktor der RLE im Vergleich zu anderen Verfahren in der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie von BZKs	60

Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. Matthias Möhrle, Dermatologe in der Praxisklinik Tübingen - Haut und Venen, Dr. Bern und Prof. Dr. Möhrle, und wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitäts-Hautklinik Tübingen.

Die gesamte Durchführung der Färbung und Vorbereitung der Präparate zur Beurteilung mittels eines Stereomikroskops durch einen der beiden Dermatopathologen wurde von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Möhrle. Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Berlin, den 09.09.2019

Melanie Schubert

Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichsten Dank.

Mein erster und größter Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn Prof. Dr. M. Möhrle, für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die Möglichkeit, einen Teil dieser Arbeit in der Praxisklinik Tübingen - Haut und Venen, Lehrpraxis der Medizinischen Fakultät Tübingen, durchzuführen. Die ständige Bereitschaft und die konstruktiven Arbeitsvorschläge von Herrn Prof. Dr. Möhrle leisteten mir während der Durchführung der Arbeit sehr wertvolle Hilfe. Seine Anregungen und Empfehlungen boten die Grundlage zu meiner weiteren wissenschaftlichen Arbeit. Nicht zuletzt basieren die bei dieser Arbeit entstandenen wissenschaftlichen Vorträge, Poster und der Publikationsentwurf auf seinen Ideen und seinem überdurchschnittlichen ständigen Engagement. Dadurch ergaben sich im Rahmen der Dissertation viele Möglichkeiten, wie die aktive Mitwirkung an nationalen als auch an internationalen Kongressen.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. med. J. Bauer. Im Untersuchungszeitraum an der Universitäts-Hautklinik Tübingen stand er mir neben dem Klinikalltag jederzeit zur Verfügung und bereicherte mich mit seinen Erfahrungen.

Ein Dankeschön schulde ich auch dem gesamten OP-Team der Universitäts-Hautklinik Tübingen, das mir einen Arbeitsplatz ermöglichte, an dem ich schnell und reibungslos arbeiten konnte.

Weiter danke ich auch den Operateuren Herrn Prof. Dr. med. H.-M. Häfner, Herrn Prof. Dr. med. H. Breuninger, Herrn Dr. med. W. Schippert und Frau Dr. med. C. Schulz für die Zusammenarbeit. Diese war eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen und das Gelingen der Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich auch Frau Prof. Dr. med. F. Ghoreschi für die Durchsicht der Publikation und die vielen Hinweise und Korrekturvorschläge, welche zur Vollendung notwendig waren.

Ebenfalls möchte ich an dieser Stelle auch noch meiner Familie danken - allen voran meiner Mutter Petra. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.