

Aus der
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Ex vivo konfokale Laserscannmikroskopie zur Diagnostik und
Charakterisierung von inflammatorischen und neoplastischen
Hautveränderungen im Vergleich zu der traditionellen Histologie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Gabriela Vladimirova

aus
Sofia, Bulgarien

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Daniela Hartmann
Zweites Gutachten: Prof. Dr. Elke Sattler
Drittes Gutachten: Prof. Dr. Tanja von Braunmühl

Promovierter Mitbetreuer: Prof. Dr. Miklos Sárdy
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2024

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Vladimirova, Gabriela

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Ex vivo konfokale Laserscanmikroskopie zur Diagnostik und Charakterisierung von inflammatorischen und neoplastischen Hautveränderungen im Vergleich zu der traditionellen Histologie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.01.2024

Gabriela Vladimirova

Inhaltsverzeichnis

Affidavit	
Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
Publikationsliste	
Eigener Beitrag zu den Veröffentlichungen	
1.1 Beitrag zu Publikation I.....	
1.2 Beitrag zu Publikation II.....	
1.3 Beitrag zu Publikation III (Anhang).....	
2 Einleitung	
2.1 Die konfokale Laserscanmikroskopie.....	
2.2 Funktionsprinzip.....	
2.3 In vivo und ex vivo KLSM.....	
2.4 Ex vivo KLSM-Gerät und seine Modalitäten.....	
2.5 Diagnostik benigner und maligner Hauttumoren.....	
2.6 Münchner Methode.....	
2.7 Histopathologie und direkte Immunfluoreszenz von Lichen planus.....	
2.8 Promotionsziel.....	
2.9 Einsatzgebiete der ex vivo KLSM in der Dermatologie.....	
3 Studiendesign	
4 Ergebnisse	
5 Zusammenfassung	
6 Summary	
7 Paper I	
8 Paper II	
9 Literaturverzeichnis	
Anhang A: Paper III	
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

AUC	Area under the curve/ Fläche unter der Kurve
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DS	Digital Staining/ Digitale Färbung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FM	Fluorescence mode/ Fluoreszenzmodus
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
KI/ CI	Konfidenzintervall
KLSM	Konfokale Laserscanmikroskopie
MKC	Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie
NPW	Negativer prädiktiver Wert
PPW	Positiver prädiktiver Wert
RM	Reflectance mode/ Reflexionsmodus
ROC-Kurve	Receiver operating characteristic curve/ Grenzwertoptimierungskurve
OM	Overlay Mode/ Überlappungsmodus

Publikationsliste

Übersicht bereits veröffentlichter Publikationen

Bağcı, I. S., Ergün, E. Z., Avci, P., Aoki, R., Krammer, S., Vladimirova, G., Sárdy, M., Ruzicka, T., & Hartmann, D. (2023). Indirect immunofluorescence for bullous pemphigoid using ex vivo confocal laser scanning microscopy. *The Journal of dermatology*, 10.1111/1346-8138.16773. Advance online publication.

Bağcı, I. S., Aoki, R., Vladimirova, G., Sárdy, M., Ruzicka, T., French, L. E., & Hartmann, D. (2021). Simultaneous immunofluorescence and histology in pemphigus vulgaris using ex vivo confocal laser scanning microscopy. *Journal of Biophotonics*, 14(5), e202000509.

Sinem Bağcı, I., Aoki, R., Vladimirova, G., Ergün, E., Ruzicka, T., Sárdy, M., French, L. E., & Hartmann, D. (2021). New-generation diagnostics in inflammatory skin diseases: Immunofluorescence and histopathological assessment using ex vivo confocal laser scanning microscopy in cutaneous lupus erythematosus. *Experimental Dermatology*, 30(5), 684–690.

Krammer, S., Krammer, C., Vladimirova, G., Salzer, S., Ruini, C., Sattler, E., French, L. E., & Hartmann, D. (2020). Ex vivo confocal laser scanning microscopy: a potential new diagnostic imaging tool in onychomycosis comparable with gold standard techniques. *Frontiers in Medicine*, 7, 586648.

Publikationen zur kumulativen Dissertation

Vladimirova, G.[§], Ruini, C.[§], Kapp, F., Kendziora, B., Ergün, E. Z., Bağcı, I. S., Krammer, S., Jastanayah, J., Sattler, E. C., Flaig, M. J., French, L. E., & Hartmann, D. (2022). Ex vivo confocal laser scanning microscopy: A diagnostic technique for easy real-time evaluation of benign and malignant skin tumours. *Journal of Biophotonics*, 15(6), e202100372.

Ruini, C., Vladimirova, G., Kendziora, B., Salzer, S., Ergun, E., Sattler, E., French, L. E., & Hartmann, D. (2021). Ex-vivo fluorescence confocal microscopy with digital staining for characterizing basal cell carcinoma on frozen sections: A comparison with histology. *Journal of Biophotonics*, 14(8), e202100094.

Bağcı, I. S., Aoki, R., Krammer, S., Vladimirova, G., Ruzicka, T., Sárdy, M., French, L. E., & Hartmann, D. (2020). Immunofluorescence and histopathological assessment using ex vivo confocal laser scanning microscopy in lichen planus. *Journal of Biophotonics*, 13(12), e202000328.

[§]geteilte Erstautorenschaft

Eigener Beitrag zu den Veröffentlichungen

1.1 Beitrag zu Publikation I

Durch folgende Arbeiten habe ich zur Entstehung dieser Publikation beigetragen: die Auswahl und Aufklärung der Patienten, die Vorbereitung aller Gewebeproben (inklusive der Färbung der Präparate mit Acridine Orange, die Spülung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, die Nachbehandlung mit 10%-iger Zitronensäure), das Scannen aller Hautproben mit dem ex vivo konfokalen Laserscanmikroskop, die durch meine Betreuerin unterstützte Erarbeitung von gemeinsamen histopathologischen und konfokalen Kriterien zur Charakterisierung der unterschiedlichen Tumorentitäten, die unter Aufsicht von meiner Betreuerin durchgeführte Untersuchung und Beurteilung von den ex vivo konfokalen Abbildungen, die unter Aufsicht von meiner Betreuerin durchgeführte Untersuchung und Beurteilung von den dazugehörigen histopathologischen Schnitten, den gemeinsam mit meiner Betreuerin durchgeführten Vergleich der Ergebnisse der ex vivo KLSM und der Histopathologie, die Erstellung von den Text- und Bildmaterialien, die Durchführung von bestimmten statistischen Auswertungen und die Erstellung des Manuskripts dieser Publikation.

1.2 Beitrag zu Publikation II

Zur Erstellung dieser Publikation habe ich durch die Auswahl und Aufklärung von Patienten, die Vorbereitung von den Gewebeproben, das Scannen von Hautproben mit dem ex vivo KLSM Gerät und die Vorbereitung von ex vivo KLSM und histopathologischen Bildern und der Auswahl von Patienten für die Kontrollgruppe beigetragen.

1.3 Beitrag zu Publikation III (Anhang)

Für diese Publikation habe ich durch die Datensammlung, die Vorbereitung und das Scannen von den Gewebeproben mit dem ex vivo konfokalen Laserscanmikroskop, die Vorbereitung von Bildmaterialien und die Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts beigetragen.

2 Einleitung

2.1 Die konfokale Laserscanmikroskopie

Die konfokale Laserscanmikroskopie (KLSM) ist ein optisches Verfahren zur hochauflösenden Diagnostik von Hautveränderungen. Die Untersuchung ist nicht invasiv, findet in Echtzeit statt und ermöglicht eine zelluläre Darstellung des Gewebes.

Die erste Idee für ein konfokales Mikroskop wurde von Marvin Minsky im Jahr 1955 entwickelt, mit dem Ziel das Gerät an Gehirngewebe anzuwenden (1). Erst nach den technischen Innovationen im Bereich der Laser- und Computersysteme in den 1990er Jahren fanden die konfokalen Laser breitere Anwendung (2).

Die Methode lässt sich in vivo direkt am Patienten und ex vivo an frisch exzidierten oder gefrorenen Präparaten einsetzen. Diese Dissertation fokussiert sich auf die ex vivo konfokale Laserscanmikroskopie.

2.2 Funktionsprinzip

Die KLSM basiert auf der Reflektion eines in unterschiedlichen Hautschichten fokussierten Laserstrahls, der als Energiequelle dient. Einerseits streut das Laserlicht im Vergleich zum Tageslicht weniger, andererseits kann ein Laser unterschiedliche Tiefen im Präparat anhand von seiner Intensität erreichen. Das Untersuchungspräparat wird mittels KLSM nicht als Ganzes, sondern punktwise, d.h. seriell, beleuchtet. Die KLSM-Geräte werden deshalb auch Punktscanner genannt. Mittels ein Spiegelsystems (Scansystem) wird der Laser Stück für Stück durch das Präparat geleitet. Je nach eingestellter Laserintensität kann die gewünschte Hautebene erfasst werden. Auf diese Weise werden multiple Scans mit hohem Kontrast auf unterschiedlichen Ebenen in Richtung der optischen Achse (z) durchgeführt. Mittels einer Software werden diese Scans zusammengelegt, damit eine scharfe 3D-Darstellung des untersuchten Präparats rekonstruiert wird. Mittels der ex vivo KLSM wird eine Darstellung auf zellulärer Ebene mit exakter Lokalisationsbestimmung der untersuchten Strukturen erreicht.

Damit die Streuung maximal eliminiert wird, werden Lochblenden (engl. pinholes) im Strahlengang des detektierten Lichts vor dem Detektor eingebaut. Dadurch kann nur Licht aus der Fokusebene den Detektor erreichen, die Umgebungsfluoreszenz aus anderen Ebenen wird eliminiert. Das Licht aus der Fokusebene wird auf diese Lochblende fokussiert, bevor sie im Detektor projiziert wird. Der Punkt in der Mitte der Lochblende und der beleuchtete Punkt im Präparat sind auf diese Weise gleichzeitig im Fokus, d.h. konfokal zueinander (3).

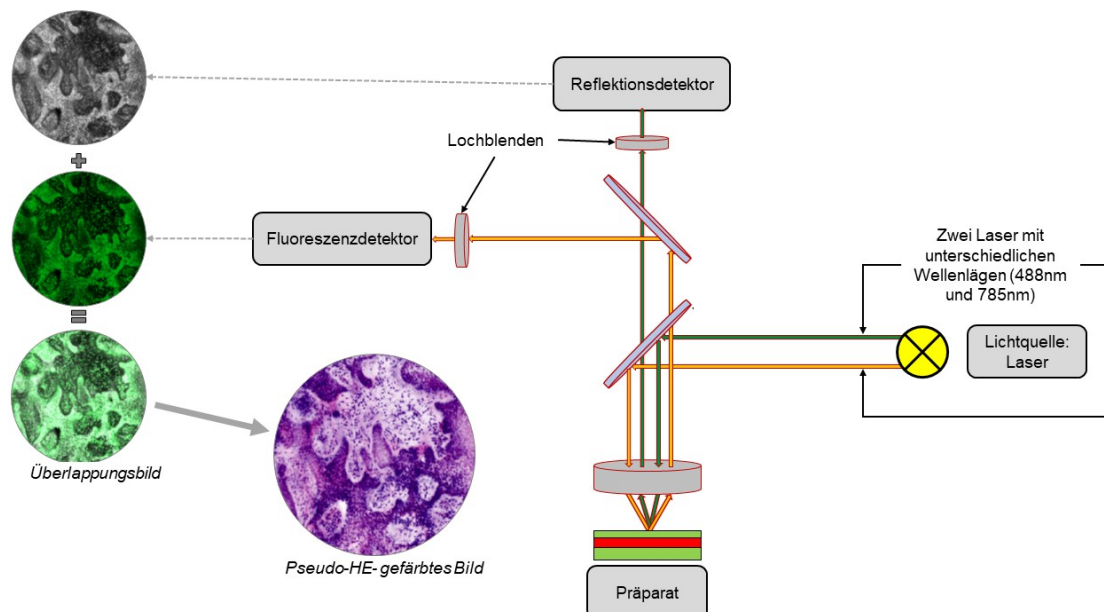


Abbildung 1: Funktionsprinzip der ex vivo KLSM Vivascope 2500G4 (eigene Darstellung entsprechend der Broschüre von VivaScope GmbH (Stand 08/2020) mit eigenem Beispielpräparat eines Basalzellkarzinoms)

2.3 In vivo und ex vivo KLSM

Die in vivo KLSM ermöglicht eine schnelle schmerzfreie und hochauflösende Darstellung von Hautstrukturen mit einer Eindringtiefe bis in die oberflächliche Dermis (maximal 300 μm) direkt am Patienten (4, 5). Mittels der in vivo KLSM werden Horizontalschnitte in der gewünschten Hautebene erzeugt. Das Verfahren beruht auf den unterschiedlichen Brechungsindizes (RI) verschiedener Hautstrukturen. Keratin, Melanin und Kollagen weisen eine hohe Reflexion in der Haut auf und erscheinen somit hell auf den in vivo KLSM-Aufnahmen (6, 7). Die in vivo KLSM hat sich insbesondere bei der Diagnostik und der Verlaufskontrolle von melanozytären und epithelialen Hauttumoren etabliert. Zudem wird das Gerät auch häufig im Rahmen der Diagnostik von entzündlichen, autoimmunen und infektiösen Hauterkrankungen angewendet (8-11).

Mittels ex vivo KLSM kann eine intraoperative Gewebebegutachtung bis auf Zellebene von frisch exzidierten Präparaten innerhalb von wenigen Minuten durchgeführt werden. Die ex vivo KLSM wird auch Bedside-Histologie genannt. Wie bei der konventionellen Histologie, werden Vertikalschnitte von der untersuchten Gewebeprobe erzeugt. Im Gegensatz zu der in vivo KLSM, besteht bei der ex vivo KLSM keine Tiefenlimitierung, sodass auch die dermalen und die subkutanen Strukturen scharf dargestellt werden können. Eine zusätzliche Fluoreszenzdiagnostik mithilfe von Immunfluoreszenztechniken ist am gleichen Präparat möglich. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe stehen aktuell zur Verfügung, u.a. Nile Blau und Fluorescein, jedoch kommt Acridine Orange am häufigsten zum Einsatz (12). Mittels ex vivo KLSM werden Digitalbilder erzeugt und damit wird auch eine Fernbeurteilung gewährleistet (13).

2.4 Ex vivo KLSM-Gerät und seine Modalitäten

Für beide Veröffentlichungen wurde das Vivascope 2500 G4 Multilaser (MAVIG GmbH, München, Deutschland) verwendet. Das Gerät beinhaltet zwei Laser: ein Laser mit einer Wellenlänge von 488nm (blau) und einer mit einer Wellenlänge von 785nm (infrarot). Es ermöglicht eine hochauflösende Untersuchung in drei Modalitäten: Reflexions- (RM), Fluoreszenz- (FM) und Überlappungsmodus (OM). Durch integrierte Algorithmen werden die verschiedenen Graustufen aus dem FM und RM farblich umkodiert und auf diese Weise ein digitales pseudo HE(Hämatoxylin-Eosin) -gefärbtes Bild aus der Kombination der RM und FM erstellt. Diese Bilder simulieren die konventionellen HE-gefärbten Schnitte (14-16).

Das Prinzip der RM beruht, wie die in vivo KLSM, auf die unterschiedlichen Brechungsindizes (RI) der Hautstrukturen. Mit steigendem Brechungsindex erscheinen die Hautstrukturen heller auf den ex vivo KLSM-Aufnahmen. Somit sind die Melanozyten und Keratinozyten sowie die Matrixstrukturen, wie die Kollagen- und elastische Fasern, sehr gut erkennbar (7).

Das Prinzip der FM basiert auf der spontanen Emission von Fluoreszenzlicht als Reaktion auf eine optische Anregung, in diesem Fall als Reaktion auf eine Laserbestrahlung. Der Fluoreszenzfarbstoff Acridine Orange in einer Konzentration von 1.2mg/ml hat sich als der bisher Geeignetste gezeigt und wird heutzutage meistens verwendet. Er bietet eine zuverlässige Zellkernfärbung und erhöht somit den Kontrast zwischen dem Epithel und dem umliegenden Stroma (12). Die Präparate bleiben nach der Färbung unverändert und können histopathologisch und immunhistochemisch untersucht werden (17).

Der OM bietet ein kombiniertes Bild aus beiden o.g. Modi und ermöglicht deshalb die gleichzeitige klare Darstellung von Zell- und Matrixstrukturen in einem Bild (13).

2.5 Diagnostik benigner und maligner Hauttumoren

Die histopathologische Untersuchung von exzidiertem Gewebe stellt den Goldstandard bei der Diagnostik von Hauttumoren dar. Die Diagnosesicherung ist zur Planung der Therapie essentiell (18). Der histopathologischen Untersuchung geht eine zeit- und personalaufwendige Aufarbeitung voran. Diese Aufarbeitung wird auch „Histotechnik“ genannt und beginnt mit der Fixierung des Präparats mittels einer in der Regel neutral gepufferten 4%-igen Formalinlösung. Danach erfolgen das senkrechte Zuschneiden des Präparats und die mehrschrittige Einbettung in erwärmtes, verflüssigtes Paraffin. Als Nächstes findet das Ausblocken statt, damit das Paraffin die notwendige Festigkeit erreicht. Zuletzt werden das Schneiden und das Färben der Schnitte durchgeführt (19). Die Vorbereitung dauert mehreren Stunden und erfordert eine große Präzision und Expertise.

2.6 Münchner Methode

Die Münchner Methode ist eine Variante der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie (MKC), die eine vollständige Resektion des Hauttumors bei gleichzeitiger Schonung der nicht befallenen Umgebungsgewebe erzielt. Dabei werden die Hauttumore zylinderförmig exzidiert. Danach werden Horizontalschnitte des Präparats angefertigt und mittels HE gefärbt. Anschließend

erfolgt die histopathologische Untersuchung. Auf diese Weise wird eine dreidimensionale mikroskopische Beurteilung des gesamten Präparats ermöglicht. Deshalb wird die Methode auch 3D-Histologie genannt.

Beim Vorliegen von Tumorresten im histopathologischen Präparat werden eine Nachexzision im betroffenen Randareal und eine erneute mikroskopische Begutachtung durchgeführt. Dieser Vorgang wiederholt sich bis zum Erreichen einer kompletten Tumorfreiheit. Deshalb ist die Münchner Methode ein zwei- oder mehrzeitiges Verfahren. Besonders geeignet ist diese Methode für Hauttumore im Gesichtsbereich (20, 21). Bei großen Wunddefekten oder Problemlokalisationen erfolgt der Wundverschluss zeitlich versetzt von der Tumorentfernung.

Die diagnostische Sicherheit dieser Methode ist von großem Vorteil. Trotzdem ist dieser Vorgang im klinischen Alltag zeit- und personalintensiv, da viele Schnitte histologisch aufgearbeitet und beurteilt werden müssen.

2.7 Histopathologie und direkte Immunfluoreszenz von Lichen planus

Bei der entzündlichen, nicht infektiösen Hauterkrankung Lichen planus zeigt sich klinisch und histopathologisch eine große Variabilität.

Histopathologisch finden sich typischerweise ein bandförmiges lymphozytäres Infiltrat an den Spitzen der Reteleisten und entlang der Junktionszone, eine basale vakuolige Degeneration und Apoptose von Keratinozyten mit Bildung von Kolloidkörperchen (bzw. Civatte-Körperchen), eine kompakte Orthohyperkeratose und eine Hypergranulose. Durch die Vakuolisierung ist die Ausbildung von subepidermalen Spalten (Josephsche Räume) möglich (22).

Typisch für den Lichen planus ist die Interface Dermatitis. Als Interface Dermatitis wird das histologische Muster einer oberflächlichen Dermatitis bezeichnet, bei dem Lymphozyten in die Epidermis einwandern und zu einer Apoptose der basalen Keratinozyten führen. Zudem kann eine sägezahnartige Papillomatose histologisch vorkommen (22).

In der direkten Immunfluoreszenz finden sich Ablagerungen von Komplement, Immunglobulinen und Fibrinogen in den Kolloidkörperchen an der dermoepidermalen Junktionszone (22, 23).

2.8 Promotionsziel

Das Ziel dieser Dissertation ist die Auswertung der Zuverlässigkeit der ex vivo konfokalen Laserscanmikroskopie bei der Beurteilung von benignen und malignen Hauttumoren, sowie bei entzündlichen Dermatosen im klinischen Alltag.

In der Publikation „Ex vivo confocal laser scanning microscopy: a diagnostic technique for easy real-time evaluation of benign and malignant skin tumors“ wurden in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Ludwig-Maximilians-Universität innerhalb von 6 Monaten (von Januar 2019 bis Juni 2019) insgesamt 120 Hautproben von benignen und malignen Hauttumoren gesammelt und anhand von 23 erarbeiteten konfokalen Kriterien untersucht. Proben von Basalzellkarzinom und seinen Subtypen, Plattenepithelkarzinom und seinen Subtypen, basosquamösem Karzinom, aktinischer Keratose, Morbus Bowen, Melanom, Melanom Metastase, Merkelzell Karzinom, atypischem Fibroxanthom, Verruca vulgaris, Fibroma molle, dermalem Nävus, Neurofibrom, Molluscum contagiosum und Condyloma

acuminatum wurden mittels des ex vivo KLSM-Geräts ausgewertet. Das Ziel war die Genauigkeit der ex vivo KLSM bei der Diagnostik von diesen Erkrankungen im Vergleich zu dem diagnostischen Goldstandard zu evaluieren und ihre Eignung für den klinischen Alltag zu überprüfen. Sekundäres Ziel war die Präzision der neuen digitalen HE-Färbung und ihre Ähnlichkeit zu der konventionellen HE-Färbung an pathologisch veränderter Haut zu untersuchen.

Die Publikation „Immunofluorescence and histopathological assessment using ex vivo confocal laser scanning microscopy in lichen planus“ beruht auf der Auswertung von insgesamt 33 gefrorenen Proben von Lichen planus mittels ex vivo KLSM. Die Schnitte wurden von dem Autoimmunlabor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Ludwig-Maximilians-Universität gesammelt, mit Acridine Orange und Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-fibrinogen Antikörpern beschichtet und anschließend mittels der ex vivo KLSM untersucht und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit denen der konventionellen Histopathologie und der direkten Immunfluoreszenz (DIF) verglichen, mit dem Ziel, die Zuverlässigkeit der ex vivo KLSM bei der histopathologischen und immunhistochemischen Diagnostik von Lichen planus zu beurteilen. Als Kontrollgruppe wurden 21 Präparate gesunder Haut und unterschiedlicher Hauttumoren verwendet.

Bei der Publikation “Ex-vivo fluorescence confocal microscopy with digital staining for characterizing basal cell carcinoma on frozen sections: A comparison with histology” wurden 46 Patienten mit histologisch gesichertem BCC eingeschlossen. Das Ziel war die ex vivo KLSM an gefrorenen Schnitten im Rahmen der Münchner Methode einzusetzen und ihre Aussagekraft bei der Schnitttrandkontrolle und bei der Basalzellkarzinomsubtypisierung auszuwerten. Sekundäres Ziel war es die vorkommenden Artefakte zu analysieren und das DS an pathologisch veränderter Haut bezüglich der richtigen Erkennung von morphologischen Strukturen zu testen.

2.9 Einsatzgebiete der ex vivo KLSM in der Dermatologie

Die ex vivo KLSM hat sich primär in multiplen Studien als eine zuverlässige Methode zur schnellen intraoperativen Schnellschnittuntersuchung und Schnitttrandkontrolle im Rahmen von mikrografisch kontrollierten Exzisionen von Basalzellkarzinomen gezeigt (23). Nachfolgend wurde die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens auch bei Plattenepithelkarzinomen bestätigt (24, 25). Zudem wurden vielversprechende Ergebnisse bei der histopathologischen Auswertung von melanozytären Tumoren gezeigt (26). Konfokale Kriterien für die Auswertung von melanozytären Hautveränderungen wurden formuliert (27). Außerdem konnte in Studien eine zuverlässige Tumordickenmessung nach Breslow bei Melanom gezeigt werden (26). Ein erfolgreicher Einsatz von ex vivo KLSM wurde auch zur intraoperativen Schnitttrandkontrolle im Rahmen von mikrografisch kontrollierten Exzisionen von Lentigo maligna beschrieben (28). Seltener Hauttumoren, wie das Dermatofibrosarcoma protuberans und syringomatöses Karzinom, sowie Tumoren an schwer zu erreichenden Lokalisationen, wie Nageltumoren und Augentlidtumoren wurden auch in kleineren Studien mittels ex vivo KLSM erfolgreich untersucht (29-32).

Die ex vivo KLSM wurde bereits zur Auswertung von infektiösen Dermatosen, wie z.B. Mucormycosis und Herpes Infektionen eingesetzt (33, 34). Die entzündlichen und autoimmunen Dermatosen sind Hauptthema der aktuellsten ex vivo Forschung. Entzündliche Muster bei den häufigen Dermatosen wurden beobachtet und beschrieben (35, 36).

Zudem wird aktuell die Anwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in der ex vivo KLSM untersucht, mit dem Ziel die Histomorphologie und Immunreaktivität in der gleichen Sitzung zuverlässig zu beurteilen und somit eine schnelle Untersuchung zu ermöglichen, die beide Methoden kombiniert. Zum Zeitpunkt der ersten Studien gab es vielversprechende Studienergebnisse bei dem Nachweis von fluoreszenzmarkierten IgG-, IgM-, IgA-, C3- und Fibrinogen-Antikörpern bei kutaner Vaskulitis (37) und von fluoreszenzmarkierten IgG- und C3-Antikörpern bei bullösem Pemphigoid (38). Fluoreszenzmarkierte S-100A10-, Melan-A- und anti-Ber-EP4-Antikörper bei unterschiedlichen melanozytären und nicht-melanozytären Hauttumoren konnten ebenfalls erfolgreich im Studiensetting detektiert werden (27).

Zum Zeitpunkt unserer ersten Studie gab es keine Publikationen über den Einsatz von ex vivo KLSM in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei Pemphigus vulgaris, kutanem Lichen planus und Lupus erythematodes. Außerdem existierten nur wenige Publikationen, bei denen die letzte Generation des ex vivo KLSM-Geräts bei den Untersuchungen verwendet wurde. Die digitale Färbung wurde bis dahin nur an gesunder Haut deskriptiv beschrieben. Die Zuverlässigkeit und der Grad der Übereinstimmung der digitalen Färbung mit der HE-Färbung bei der Auswertung von pathologisch veränderter Haut wurden noch nicht geklärt. Bis dahin war es unklar, ob die neue Generation der ex vivo KLSM zur Untersuchung von den häufigsten benignen und malignen Hauttumoren in der alltäglichen Praxis geeignet ist.

3 Studiendesign

Alle genannten Studien sind Pilotstudien. Pilotstudien sind Planungsstudien, die als Einstieg in das Thema beziehungsweise Methode durchgeführt werden, um die Realisierbarkeit und die Aussagekraft eines größeren geplanten Studie zu überprüfen (39).

Für die Studie „Ex vivo confocal laser scanning microscopy: A diagnostic technique for easy real-time evaluation of benign and malignant skin tumors“ wurden 120 frische Gewebeproben von 91 Patienten mit unterschiedlichen benignen und malignen Hauttumoren mit dem ex vivo KLSM Vivascope 2500G4 Multilaser in RM, FM, OM und DS untersucht und anhand von 23 definierten konfokalen Kriterien ausgewertet. Danach wurden die Gewebeproben histopathologisch begutachtet. Die konfokalen und histopathologischen Auswertungen wurden von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt, die vor der histopathologischen Diagnose verblindet wurden. Die Ergebnisse von beiden Untersuchungsmethoden wurden verglichen und statistisch analysiert.

Die diagnostische Übereinstimmung, auch Interrater-Reliabilität genannt, zwischen KLSM und der konventionellen Histopathologie wurde kalkuliert. Die Sensitivität, die Spezifität, der positive prädiktive Wert (PPW), der negative prädiktive Wert (NPV), die Cohens Kappa, die Fläche unter der Kurve (AUC) und die Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) der ex vivo KLSM wurden bei der Erkennung von Malignität und bei der Diagnostik von den Hauttumoren mit $n > 10$, sowie bei den 23 definierten konfokalen Kriterien berechnet.

Bei der Studie „Immunofluorescence and histopathological assessment using ex vivo confocal laser scanning microscopy in lichen planus“ wurden 33 gefrorene Schnitte von 17 Patienten mit kutaner und mucosaler Lichen planus nach Färbung mit Acridine Orange und Beschichtung mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierten Anti-Fibrinogen Antikörpern mit dem ex vivo KLSM bezüglich in RM, FM, OM und DS untersucht. Als Kontrollgruppe für die histopathologische Korrelation dienten 21 Gewebeproben von gesunder Haut oder unterschiedlichen Hauttumoren. Die Präparation der Lichen planus-Schnitte mit den FITC-markierten Anti-Fibrinogen Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4 Grad Celsius in einem dunklen, feuchten Raum. Alle Schnitten wurden anhand von 11 vordefinierten konfokalen Kriterien und bezüglich ihrer Immunreaktivität durch 2 unabhängige Dermatologen untersucht, die vor der histopathologischen Diagnose verblindet wurden.

Die statistische Auswertung beinhaltet die Berechnung der Interrater-Variabilität mittels Cohens Kappa für die konfokalen Kriterien. Eine ROC-Kurvenanalyse wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die drei häufigsten konfokalen Lichen planus Kriterien ausreichend sind, um eine Differenzierung zwischen Lichen planus und die Diagnosen aus der Kontrollgruppe zu ermöglichen.

Für die Studie “Ex-vivo fluorescence confocal microscopy with digital staining for characterizing basal cell carcinoma on frozen sections: A comparison with histology.” wurden 46 gefrorene Horizontalschnitte von Basalzellkarzinomen der Kopf-Hals Region, die im Rahmen der Münchner Methode erzeugt wurden, mit dem ex vivo KLSM bezüglich in RM, FM, OM und DS untersucht. Die Schnittrandkontrolle und die Subtypisierung wurden mittels KLSM durchgeführt. Zudem wurden die Artefakte, die Morphologie und die Diagnosesicherheit der Untersucher beurteilt. Alle Schnitte wurden anschließend auch histopathologisch ausgewertet und alle

Ergebnisse wurden mit dem Goldstandard, der 3D-Histologie, verglichen. Die Auswertung erfolgte durch zwei erfahrene Dermatologen. Die Untersucher wurden vor den Ergebnissen der 3D-Histologie verblindet, um eine Verzerrung der Studienergebnisse zu vermeiden.

Bei dieser Studie wurden die Sensitivität, die Spezifität und die AUC von der ex vivo KLSM bei der Schnittrandkontrolle bestimmt. Die Interrater-Reliabilität zwischen der ex vivo KLSM und der konventionellen 3D Histologie bei der Schnittrandkontrolle und bei der Subtypisierung sowie die Sensitivität, die Spezifität, die AUC der ex vivo KLSM für jeden Subtyp wurden berechnet. Zudem wurden die Sensitivität und die Spezifität für die drei häufigsten konfokalen Kriterien für Basalzellkarzinome und weitere häufige anatomische Strukturen kalkuliert. Das Vorhandensein von Artefakten, ihre Auswirkung auf die Qualität und die Diagnosesicherheit für die Auswertung mit jedem einzelnen ex vivo KLSM-Modus wurden mittels deskriptiver Statistik, chi-square Test und logistischer Regression objektiviert.

4 Ergebnisse

In der Studie „Ex vivo confocal laser scanning microscopy: A diagnostic technique for easy real-time evaluation of benign and malignant skin tumours“ wurden 120 Gewebeproben von 91 Patienten mit unterschiedlichen benignen und malignen Hauttumoren mittels ex vivo KLSM und konventioneller Histopathologie untersucht. Proben von folgenden Tumorentitäten konnten nachgewiesen werden: 46 Basalzellkarzinome, 27 kutane Plattenepithelkarzinome, 3 Morbus Bowen, 10 aktinische Keratosen, 2 Melanome, 1 Melanommetastase, 1 Merkelzellkarzinom, 1 atypisches Fibroxanthom, 1 Neurofibrom, 7 Fibromata mollia, 1 dermaler Nävus, 2 Verrucae vulgares, 2 Mollusca contagiosa, 1 Condyloma acuminatum und 1 Probe mit kutanem Plattenepithelkarzinom und aktinischer Keratose. Der Rest der Proben war tumorfrei. Die Auswertung der Präparate erfolgte anhand von 23 vordefinierten konfokalen Kriterien, welche entsprechende histopathologische Korrelate aufwiesen.

Insgesamt konnte eine hohe diagnostische Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden gezeigt werden, nämlich 89,2% (KI 82,2, 94,1). Der Nachweis von Malignität erfolgte bei der ex vivo KLSM mit einer Sensitivität von 98% (KI 0,92, 1,00) und einer Spezifität von 76% (KI 0,56, 0,90). Die Cohens Kappa von 0,78 (KI 0,65, 0,92) und AUC von 0,87 (KI 0,79, 0,95) bewiesen eine sehr hohe Übereinstimmung der Methoden bei der Erkennung von Malignität. Folgende Interpretation von Cohens Kappa wurde angewendet: Werte $<0,00$ zeigten keine Übereinstimmung; Werte von 0,00 bis 0,21- schwache; 0,21 bis 0,40- faire; 0,41 bis 0,60- mittelmäßige; 0,61 bis 0,80- umfangreiche; 0,81 bis 1,00- fast perfekte Übereinstimmung. Der meistvertretere Hauttumor in der Studie, das Basalzellkarzinom, wurde von der ex vivo KLSM mit einer Sensitivität von 98% (KI 0,88, 1,00) und einer Spezifität von 95% (KI 0,87, 0,99) erkannt. Das PPV von 0,92 (KI 0,80, 0,98) und das NPV von 0,99 (KI 0,92, 1,00), sowie die Cohens Kappa von 0,91 (KI 0,84, 0,99) und die AUC von 0,96 (KI 0,92, 1,00) bestätigen die fast perfekte Übereinstimmung von der ex vivo KLSM und der Histopathologie bei der Erkennung von Basalzellkarzinomen. Die ex vivo KLSM zeigte in dieser Studie eine Sensitivität von 93% (KI 0,76, 0,99), Spezifität von 97% (KI 0,91, 0,99), PPV von 0,90 (KI 0,73, 0,98) und NPV von 0,98 (KI 0,92, 1,00) bei der Feststellung von kutanen Plattenepithelkarzinomen. Das AUC von 0,94 (KI 0,89, 1,00) und die Cohens Kappa von 0,88 (KI 0,79, 0,98) beweisen eine sehr hohe Übereinstimmung beider Methoden auch bei der Diagnostik dieser Tumorentität. Eine wesentliche Übereinstimmung zwischen der ex vivo KLSM und der konventionellen Histopathologie konnte auch mit der Cohens Kappa von 0,76 (KI 0,56, 0,96) und der AUC von 0,90 (KI 0,77, 1,00) für die Erkennung von aktinischen Keratosen gezeigt werden. Eine hohe Sensitivität von 82% (KI 0,48, 0,98) und Spezifität von 97% (KI 0,92, 0,99), sowie eine PPV von 0,75 (KI 0,43, 0,95) und eine NPV von 0,98 (KI 0,93, 1,00) konnten berechnet werden. Die restlichen Hauttumoren mit einer Fallzahl $n < 10$ konnten ebenso in den meisten Fällen richtig erkannt werden. Alle 3 Morbus Bowen, 2 Melanome, 1 Melanommetastase, 1 Merkelzellkarzinom, 1 atypisches Fibroxanthom, 1 Neurofibrom, 7 Fibrome, 1 dermaler Nävus, 2 Verrucae vulgares, 2 Mollusca contagiosa, 1 Condyloma acuminatum, 1 Probe mit kutanem Plattenepithelkarzinom und aktinische Keratose wurden von der ex vivo KLSM detektiert.

Die diagnostische Richtigkeit der ex vivo KLSM für die 23 vordefinierten mikroskopischen Kriterien kann Tabelle 1 entnommen werden. Bei allen Kriterien konnte eine fast perfekte oder wesentliche Übereinstimmung zwischen beiden Methoden gezeigt werden. Eine fast perfekte

Übereinstimmung konnte bei den folgenden Kriterien nachgewiesen werden: Hyperkeratose, Parakeratose, Erosion/Ulzeration, Akanthose, Papillomatose, atypische Keratinozyten in der Epidermis, atypische Melanozyten in der Epidermis, lockere Bindegewebe, Koilozyten, Spaltbildung, Palisadenstellung, Kernpleomorphie, atypische Keratinozyten in der Dermis, atypische Melanozyten in der Dermis, fehlende Reifung der dermalen Melanozyten.

Eine wesentliche Übereinstimmung konnte für die folgenden Kriterien gezeigt werden: architektonische epidermale und/oder dermale Unordnung, aktinische Elastose, basale Hyperpigmentierung, Tumormasse in der Dermis und/oder Subkutis, Stroma, Keratinperlen, Mitosen der dermalen Tumorzellen, entzündliches Infiltrat.

Bei der Studie „Immunofluorescence and histopathological assessment using ex vivo confocal laser scanning microscopy in lichen planus“ wurden 33 gefrorene Gewebeproben von Lichen planus und 21 Gewebeproben von gesunder Haut und unterschiedlichen Hauttumoren als Kontrollgruppe mittels ex vivo KLSM und anschließend mittels konventioneller Histopathologie und Immunfluoreszenz untersucht. Alle Präparate wurden für das Vorhandensein von 11 typischen mikroskopischen Merkmalen von Lichen planus geprüft. Die ausgewerteten Kriterien waren: kompakte Orthohyperkeratose, Parakeratose, Akanthose, Spongiose, sägezahnartige Papillomatose, Interface-Dermatitis, vakuolige Degeneration der Basalzellen, Epidermotropismus, bandförmige Infiltration, perivaskuläre Infiltration, subepidermale Blasenbildung.

Insgesamt zeigte die ex vivo KLSM ähnliche Resultate zu der konventionellen Histopathologie bei der Erkennung der histomorphologischen Merkmale von Lichen planus. Jedoch hatte die ex vivo KLSM eine niedrigere Sensitivität bei der Beurteilung der Immunoreaktivität als die DIF, nämlich konnten die Fibrinogen Ablagerungen in 62,5% der Fälle mittels ex vivo KLSM und in 93,75% der Fälle mittels konventioneller DIF detektiert werden. Eine perfekte Übereinstimmung zwischen der ex vivo KLSM und der klassischen Histopathologie konnte für die folgenden Kriterien nachgewiesen werden: Interface Dermatitis, vakuolige Degeneration und bandförmige Infiltration (Kappa von 1,000 (KI: 1,000, 1,000)). Mit einer mäßigen bis guten Übereinstimmung zwischen beiden Methoden wurden die kompakte Orthohyperkeratose mit einem Kappa von 0,430 (KI: 0,084, 0,775), der Epidermotropismus mit einem Kappa von 0,455 (KI: -0,143, 1,000) und die sägezahnartige Papillomatose mit einem Kappa von 0,640 (KI: 0,273, 1,000) detektiert. Die Übereinstimmung zwischen der ex vivo KLSM und der konventionellen Histopathologie für alle untersuchten mikroskopischen Kriterien, quantifiziert durch Kappa, ist in Tabelle 2 dargestellt. Zudem konnte mittels ROC-Analyse gezeigt werden, dass eine Unterscheidung zwischen den Gewebeproben mit Lichen planus und den Proben aus der Kontrollgruppe mithilfe der häufigsten Lichen planus Kriterien (Interface-Dermatitis, vakuolige Degeneration und bandförmige Infiltration) möglich ist.

In der Studie “Ex-vivo fluorescence confocal microscopy with digital staining for characterizing basal cell carcinoma on frozen sections: A comparison with histology“ wurden 46 gefrorene Horizontalschnitte von Basalzellkarzinomen mittels der ex vivo KLSM und anschließend mittels konventioneller Histopathologie untersucht.

Ex vivo KLSM zeigte eine hohe Sensitivität von 92% (KI 0,73-0,99) und Spezifität von 91% (KI 0,71-0,99) mit einem Cohens Kappa von 0,83 (0,66-0,99) und AUC von 0,91 (KI 0,83-1,00) bei der Schnitttrandkontrolle von Basalzellkarzinomen. Diese Studie konnte eine hohe Übereinstimmung von 88% (KI: 0,74-0,96) zwischen der ex vivo KLSM und der konventionellen Histopathologie auch bei der Subtypisierung der Basalzellkarzinome nachweisen. Die höchste

Sensitivität der ex vivo KLSM von 100% (KI: 0,86-1,00) wurde für die Erkennung vom nodulären Subtyp gezeigt. Infiltrative Basalzellkarzinome konnten mit einer Sensitivität von 88% (KI: 0,47-1,00), wobei gemischte Subtypen mit einer deutlich niedrigeren Sensitivität von 56% (KI: 0,21-0,86) detektiert werden konnten. Die ex vivo KLSM konnte auch in dieser Studie hohe Sensitivitäts- und Spezifitätswerte für die typischen mikroskopischen Merkmale von Basalzellkarzinomen bestätigen. Die genauen Werte sind in Tabelle 3 präsentiert. Artefakte waren in 61% der Schnitte vorhanden, nämlich Verschleierung in 33%, schlecht definierte Grenzen in 30%, Schnittartefakte in 28% und verändertes Mosaik mit quadratischen Blöcken in 13% der Fälle. Alle Präparate konnten untersucht und ausgewertet werden. Die meisten waren von guter oder mittlerer Qualität (54% von guter und 41% von mittlerer Qualität). Die Diagnosesicherheit war 91% für den FM, 93,5% für den RM und OM und 93% für den DS.

	bei x Fällen	Sensitivität		KI		Spezifität	KI		PPW	KI		NPW	KI		AUC	KI		κ	KI	
		untere	obere	untere	obere		untere	obere		untere	obere		untere	obere		untere	obere			
Hyperkeratose	72	0,93	0,98	1,00	0,89	1,00	0,95	1,00	1,00	0,95	1,00	0,86	0,71	0,95	0,97	0,94	0,99	0,89	0,80	0,98
Parakeratose	34	0,97	1,00	0,96	0,88	0,99	0,78	0,98	0,92	0,88	0,99	0,99	0,92	1,00	0,96	0,93	1,00	0,91	0,83	1,00
Erosion/Ulzeration	29	0,93	0,99	0,96	0,89	0,99	0,73	0,98	0,90	0,73	0,98	0,97	0,91	1,00	0,95	0,89	1,00	0,88	0,78	0,98
Akanthose	31	0,9	0,74	0,98	0,65	0,99	0,74	0,98	0,9	0,74	0,98	0,96	0,88	0,99	0,93	0,87	0,99	0,86	0,75	0,97
Papillomatose	18	0,89	0,65	0,98	0,92	1,00	0,65	0,99	0,89	0,65	0,99	0,98	0,92	1,00	0,93	0,85	1,00	0,87	0,74	0,99
Epidermale und/oder dermale Unordnung	99	1,00	0,96	1,00	0,46	0,88	0,88	0,98	0,94	0,88	0,98	1,00	0,77	1,00	0,85	0,75	0,95	0,80	0,64	0,95
Atypische Keratinozyten in der Epidermis	45	0,96	0,85	0,99	0,83	0,98	0,77	0,97	0,90	0,77	0,97	0,97	0,89	1,00	0,94	0,90	0,98	0,87	0,78	0,96
Atypische Melanozyten in der Epidermis	2	1,00	0,16	1,00	0,97	1,00	0,16	1,00	1,00	0,16	1,00	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Aktinische Elastose	55	0,80	0,67	0,90	0,83	0,97	0,90	0,78	0,90	0,78	0,97	0,85	0,74	0,92	0,86	0,80	0,92	0,73	0,61	0,85
Lockeres Bindegewebe	3	1,00	0,29	1,00	0,97	1,00	0,29	1,00	1,00	0,29	1,00	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Basale Hyperpigmentierung	2	0,50	0,01	0,99	0,97	1,00	0,03	1,00	1,00	0,03	1,00	0,99	0,95	1,00	0,75	0,26	1,00	0,66	0,04	1,00
Kollozyten	3	1,00	0,29	1,00	0,97	1,00	0,29	1,00	1,00	0,29	1,00	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Tumormasse in der Dermis und/oder Subkutis	82	0,96	0,90	0,99	0,81	0,98	0,84	0,97	0,92	0,84	0,97	0,91	0,76	0,98	0,89	0,82	0,95	0,80	0,68	0,92
Spaltbildung	46	1,00	0,92	1,00	0,65	0,98	0,90	0,79	0,97	0,84	0,97	1,00	0,95	1,00	0,97	0,94	1,00	0,91	0,84	0,99
Palisadenstellung	46	0,98	0,88	1,00	0,87	0,99	0,80	0,98	0,92	0,80	0,98	0,99	0,92	1,00	0,96	0,93	1,00	0,91	0,84	0,99
Kernpleomorphie	93	0,99	0,94	1,00	0,89	0,98	0,91	0,99	0,97	0,91	0,99	0,96	0,80	1,00	0,94	0,88	1,00	0,90	0,81	1,00
Stroma	52	0,81	0,67	0,90	0,88	0,99	0,82	0,99	0,93	0,82	0,99	0,87	0,77	0,93	0,88	0,82	0,94	0,78	0,66	0,89
Atypische Keratinozyten in der Dermis	30	0,87	0,69	0,96	0,91	0,99	0,90	0,73	0,98	0,82	0,99	0,96	0,89	0,99	0,92	0,85	0,98	0,84	0,73	0,96
Keratinperlen	20	0,75	0,51	0,99	0,95	1,00	0,94	0,70	1,00	0,70	1,00	0,95	0,89	0,98	0,87	0,77	0,97	0,80	0,65	0,95
Atypische Melanozyten in der Dermis	2	1,00	0,16	1,00	0,97	1,00	0,16	1,00	1,00	0,16	1,00	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fehlende Reifung der dermalen Melanozyten	1	1,00	0,03	1,00	0,97	1,00	0,03	1,00	1,00	0,03	1,00	1,00	0,97	1,00	1,00	x	x	1,00	1,00	1,00
Mitosen der dermalen Tumorzellen	35	0,66	0,48	0,81	0,88	0,99	0,66	0,96	0,85	0,66	0,96	0,87	0,78	0,93	0,80	0,72	0,89	0,65	0,50	0,81
Entzündliches Infiltrat	106	0,92	0,84	0,96	0,66	1,00	0,99	0,94	0,99	0,94	1,00	0,59	0,36	0,79	0,80	0,72	0,89	0,68	0,49	0,86

Tabelle 1: Diagnostische Richtigkeit der ex vivo KLSM bei den 23 vordefinierten mikroskopischen Kriterien (übernommen mit Genehmigung von Vladimirova et al.)

	Ex vivo KLSM n=17	Histopathologie n=17	Kappa	Standardfehler	95% KI	Grad der Übereinstimmung
Kompakte Orthohyperkeratose	4 (23,5%)	9 (52,9%)	0,430	0,176	0,084 bis 0,775	mäßig
Parakeratose	7 (41,2%)	13 (76,5%)	0,139	0,177	-0,208 bis 0,487	gering
Akanthose	12 (70,6%)	15 (88,2%)	0,485	0,231	0,031 bis 0,938	mäßig
Spongiose	10 (58,8%)	12 (70,6%)	0,746	0,163	0,427 bis 1,000	gut
Sägezahnartige Papillomatose	5 (29,4%)	7 (41,2%)	0,640	0,187	0,273 bis 1,000	gut
Interface-Dermatitis	16 (94,1%)	16 (94,1%)	1,000	0,000	1,000 bis 1,000	perfekt
Vakuolige Degeneration	16 (94,1%)	16 (94,1%)	1,000	0,000	1,000 bis 1,000	perfekt
Epidermotropismus	1 (5,9%)	3 (17,6%)	0,455	0,305	-0,143 bis 1,000	mäßig
Bandförmige Infiltration	16 (94,1%)	16 (94,1%)	1,000	0,000	1,000 bis 1,000	perfekt
Perivaskuläre Infiltration	14 (82,3%)	15 (88,2%)	0,767	0,220	0,336 bis 1,000	gut
Subepidermale Blasenbildung	1 (5,9%)	4 (23,5%)	0,338	0,260	-0,172 bis 0,847	gering

Tabelle 2: Histomorphologische Kriterien von Lichen planus und die Übereinstimmung zwischen der ex vivo KLSM und der Histopathologie basierend auf Cohens Kappa (übernommen mit Genehmigung von Bağcı et al.)

	Sensitivität	Spezifität
Stroma	94% (KI: 0,81-0,99)	78% (KI: 0,40-0,97)
Palisadenstellung	97% (KI: 0,82-1,00)	73% (KI: 0,45-0,92)
Spaltbildung	97% (KI: 0,82-1,00)	87% (KI: 0,60- 0,98)

Tabelle 3: Sensitivität und Spezifität der ex vivo KLSM an gefrorenen Schnitten bei der Beurteilung der häufigsten Merkmale der Basalzellkarzinome

5 Zusammenfassung

Die ex vivo konfokale Laserscanmikroskopie ermöglicht eine noninvasive, schnelle, vor-Ort hochauflösende Untersuchung von frisch exzidierten Gewebeproben, vergleichbar zur konventionellen Histopathologie. Bisher wurde das Verfahren in Studien erfolgreich bei der intraoperativen Schnellschnittdiagnostik von Basalzellkarzinomen, aber auch bei der mikroskopischen Auswertung von anderen in situ und invasiven Hauttumoren sowie infektiösen, entzündlichen und autoimmunen Hauterkrankungen angesetzt.

Das Ziel dieser Dissertation war die Überprüfung der Zuverlässigkeit der ex vivo KLSM bei der mikroskopischen Gewebeuntersuchung von pathologisch veränderter Haut in der alltäglichen Praxis, einerseits bei der intraoperativen Begutachtung von unterschiedlichen Hauttumoren, andererseits bei der Untersuchung von der entzündlichen Hauterkrankung Lichen planus. Als Vergleichsmethode wurde die konventionelle Histopathologie angewendet.

Für die Studie „Ex vivo confocal laser scanning microscopy: A diagnostic technique for easy real-time evaluation of benign and malignant skin tumours“ wurden 120 Gewebeproben von 91 Patienten mit unterschiedlichen benignen und malignen Hauttumoren untersucht. Die Präparate wurden anhand von 23 vordefinierten konfokalen Kriterien ausgewertet. Anschließend erfolgte eine konventionelle histopathologische Auswertung. In dieser Studie konnte eine hohe diagnostische Übereinstimmung von 89.2% (KI 82.2, 94.1) zwischen den beiden Methoden gezeigt werden. Malignität konnte mit einer Sensitivität von 98% (KI 0.92, 1.00), einer Spezifität von 76% (KI 0.56, 0.90), Cohens Kappa von 0.78 (KI 0.65, 0.92) und AUC von 0.87 (KI 0.79, 0.95) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die ex vivo KLSM eine alternative und nahezu vergleichbare Methode zum Goldstandard bei der Untersuchung von Hauttumoren darstellt. Bei allen 23 vordefinierten konfokalen Kriterien konnte eine fast perfekte oder mindestens wesentliche Übereinstimmung zwischen den beiden Verfahren gezeigt werden. Schlussfolgernd konnte die ex vivo KLSM sowohl architektonische, als auch zytomorphologische Merkmale in einer sehr hohen Übereinstimmung mit dem Goldstandard erkennen.

In der Studie „Immunofluorescence and histopathological assessment using ex vivo confocal laser scanning microscopy in lichen planus“ wurden 33 gefrorene Gewebeproben von Lichen planus und 21 Gewebeproben von gesunder Haut und unterschiedlichen Hauttumoren als Kontrollgruppe untersucht. Alle Präparate wurden anhand von 11 typischen mikroskopischen Merkmalen des Lichen planus ausgewertet. Eine perfekte Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden konnte für die folgenden drei histopathologischen Kriterien nachgewiesen werden: Interface Dermatitis, vakuolige Degeneration und bandförmige Infiltration (Cohens Kappa von 1,000 (KI: 1,000, 1,000)). Die Fibrinogen Ablagerungen konnten in 62,5% der Fälle mittels einem ex vivo konfokalen Mikroskop und in 93,75% der Fälle mittels konventioneller DIF detektiert werden. Die ROC-Kurvenanalyse (Grenzwertoptimierungskurvenanalyse) zeigte, dass eine Unterscheidung zwischen den Gewebeproben mit Lichen planus und den Proben aus der Kontrollgruppe mithilfe der häufigsten Lichen planus Kriterien (Interface-Dermatitis, vakuolige Degeneration und bandförmige Infiltration) möglich ist. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die ex vivo KLSM ähnliche Resultate zu der konventionellen Histopathologie bei der Erkennung von den histomorphologischen Merkmalen von Lichen planus erzielt, jedoch eine niedrigere Sensitivität bei der Beurteilung der Immunreaktivität als die DIF aufweist.

Für die Studie "Ex-vivo fluorescence confocal microscopy with digital staining for characterizing basal cell carcinoma on frozen sections: A comparison with histology" wurden 46 gefrorene Horizontalschnitte von Basalzellkarzinomen untersucht. Eine hohe Sensitivität von 92% (KI 0,73-0,99) und Spezifität von 91% (KI 0,71-0,99) mit einem Cohens Kappa von 0.83 (KI 0,66-0,99) und AUC von 0.91 (KI 0,83-1,00) konnte bei der Schnitttrandkontrolle von Basalzellkarzinomen gezeigt werden. Zudem wurde eine hohe Übereinstimmung von 88% (KI: 0,74-0,96) zwischen der ex vivo KLSM und der konventionellen Histopathologie bei der Subtypisierung der Basalzellkarzinome nachgewiesen. Artefakte waren in 61% der Schnitte vorhanden. Trotzdem konnten alle Präparate untersucht und ausgewertet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Zuverlässigkeit der ex vivo KLSM an gefrorenen Basalzellkarzinompräparaten.

Abschließend lässt sich sagen, dass die ex vivo KLSM eine schnelle und zuverlässige intraoperative mikroskopische Hauttumordiagnostik an frischen und gefrorenen Präparaten darstellen könnte. Zudem zeigt diese Methode vielversprechende Ergebnisse bei der Auswertung von Lichen planus und lässt sich somit möglicherweise als ein schnelles, biopsiesparendes, ergänzendes Verfahren zur Diagnostik von Lichen planus betrachten, das im Vergleich zur Histopathologie und DIF beide Untersuchungen am gleichen Präparat und am gleichen Gerät ermöglicht.

6 Summary

The ex vivo confocal laser scanning microscopy (CLSM) enables a non-invasive, fast, on-site, high-resolution examination of freshly excised tissue, which is comparable to conventional histopathology. To date, this technique has been successfully applied in studies in the intraoperative frozen section pathological examination of basal cell carcinoma, but also in the microscopic examination of other in situ and invasive skin tumours, as well as infectious, inflammatory, and autoimmune diseases.

The aim of this doctoral dissertation was the verification of the reliability of the ex vivo CLSM in the microscopic examination of skin diseases in the daily routine, on the one hand in the intraoperative assessment of different skin tumours, on the other hand in the evaluation of the inflammatory skin disease lichen planus. The conventional histopathology has been used as a comparison method.

A total of 120 tissue samples from 91 patients with different benign and malignant skin tumours were examined for the study "Ex vivo confocal laser scanning microscopy: A diagnostic technique for easy real-time evaluation of benign and malignant skin tumours". The samples were evaluated based on 23 predefined confocal criteria. Subsequently a histopathologic examination took place. A high diagnostic agreement of 89.2% (CI: 82.2, 94.1) between both methods was reached in this study. Ex vivo CLSM achieved a detection sensitivity of malignancy of 98% (CI: 0.92, 1.00), specificity of 76% (CI: 0.56, 0.90), Cohens Kappa of 0.78 (CI: 0.65, 0.92) and AUC of 0.87 (CI: 0.79, 0.95). These results suggest that the ex vivo CLSM represents an alternative and almost comparable method to the gold standard in the skin tumour diagnostics. An almost perfect or substantial agreement between both methods has been reached for all 23 predefined confocal criteria. In conclusion, the ex vivo CLSM managed to detect both architecture and cytological features with a high agreement with the gold standard.

A total of 33 frozen lichen planus samples and 21 samples of healthy skin and different skin tumours, serving as a control group, were examined in the study "Immunofluorescence and histopathological assessment using ex vivo confocal laser scanning microscopy in lichen planus". All specimens were evaluated based on 11 typical microscopic features of lichen planus. A perfect agreement between both methods has been reached for the following three criteria: interface dermatitis, vacuolar degeneration and band-like infiltration (Cohens Kappa of 1.000 (CI: 1.000, 1.000)). The fibrinogen deposition was detected in 62.5% of the cases with the ex vivo confocal microscope and in 93.75% of the cases with conventional DIF (direct immunofluorescence) microscopy. The ROC (receiver operating characteristic) curve analysis proved that differentiating lichen planus samples from the control group using the most common lichen planus features (interface dermatitis, vacuolar degeneration and band-like infiltration) is possible. The results indicate that the ex vivo CLSM recognises histomorphological features of lichen planus with similar results comparing to conventional histopathology. However, it reaches a lower sensitivity than DIF microscopy in the assessment of immunoreactivity.

46 frozen horizontal sections of basal cell carcinoma were examined in the study "Ex-vivo fluorescence confocal microscopy with digital staining for characterizing basal cell carcinoma on frozen sections: A comparison with histology". A high sensitivity of 92% (CI: 0.73-0.99) and specificity of 91% (0.71-0.99) with a Cohens Kappa of 0.83 (0.66-0.99) and AUC of 0.91 (0.83-

1.00) has been reached in the microscopically controlled surgery with evaluation of the excisional margins of basal cell carcinoma. Furthermore, a high agreement between ex vivo CLSM and the conventional histopathology has been achieved in the subtyping of those tumours. Artefacts were seen in 61% of the sections. Nevertheless, an assessment was possible in all cases. These results confirm the reliability of ex vivo CLSM on frozen sections of basal cell carcinoma.

In conclusion, the ex vivo CLSM could offer fast and reliable intraoperative microscopic skin tumour evaluation on fresh and frozen tissue. Moreover, this method shows promising results in the assessment of lichen planus and can therefore be probably considered in the future as a fast, biopsy saving, additional diagnostic tool, which allows a simultaneous histopathological examination and direct immunofluorescence on the same skin sample and with the same device.

7 Paper I

Ex vivo confocal laser scanning microscopy: A diagnostic technique for easy real-time evaluation of benign and malignant skin tumours

Veröffentlicht in:

Vladimirova, G., Ruini, C., Kapp, F., Kendziora, B., Ergün, E. Z., Bağcı, I. S., Krammer, S., Jastanayah, J., Sattler, E. C., Flaig, M. J., French, L. E., & Hartmann, D. (2022). Ex vivo confocal laser scanning microscopy: A diagnostic technique for easy real-time evaluation of benign and malignant skin tumours. *Journal of Biophotonics*, 15(6), e202100372.

DOI: [10.1002/jbio.202100372](https://doi.org/10.1002/jbio.202100372)

Impact Factor: 3.207 (2020)

8 Paper II

Immunofluorescence and histopathological assessment using ex vivo confocal laser scanning microscopy in lichen planus

Veröffentlicht in:

Bağcı, I. S., Aoki, R., Krammer, S., Vladimirova, G., Ruzicka, T., Sárdy, M., French, L. E., & Hartmann, D. (2020). Immunofluorescence and histopathological assessment using ex vivo confocal laser scanning microscopy in lichen planus. *Journal of Biophotonics*, 13(12), e202000328.

DOI: [10.1002/jbio.202000328](https://doi.org/10.1002/jbio.202000328)

Impact Factor: 3.207 (2020)

9 Literaturverzeichnis

1. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*. 1988;10(4):128-38.
2. Paddock SW, Eliceiri KW. Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques. *Methods Mol Biol*. 2014;1075:9-47.
3. Mueller M. *Introduction to Confocal Fluorescence Microscopy*. Bellingham, UNITED STATES: SPIE; 2005.
4. MAVIG GmbH. Technische Daten VivaScope® 1500/3000 [Status: 06/2018]. Abrufbar unter der URL: https://www.vivascope.de/wp-content/uploads/2019/06/DATASHEET_VS-1500-3000_Gen.4_07.18.pdf
5. Levine A, Markowitz O. Introduction to reflectance confocal microscopy and its use in clinical practice. *JAAD Case Rep*. 2018;4(10):1014-23.
6. Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M, Sala R, Pellacani G. Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. *Photochem Photobiol*. 2008;84(6):1421-30.
7. Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol*. 1995;104(6):946-52.
8. Pimenta R, Soares-de-Almeida L, Arzberger E, Ferreira J, Leal-Filipe P, Bastos PM, et al. Reflectance confocal microscopy for the diagnosis of skin infections and infestations. *Dermatol Online J*. 2020;26(3).
9. Guida S, Longhitano S, Ardigò M, Pampena R, Ciardo S, Bigi L, et al. Dermoscopy, confocal microscopy and optical coherence tomography features of main inflammatory and autoimmune skin diseases: A systematic review. *Australas J Dermatol*. 2022;63(1):15-26.
10. Gerger A, Hofmann-Wellenhof R, Samonigg H, Smolle J. In vivo confocal laser scanning microscopy in the diagnosis of melanocytic skin tumours. *Br J Dermatol*. 2009;160(3):475-81.
11. Welzel J UM, Lange- Asschenfeldt S, Stolz W, Sattler E. Leitlinie: Konfokale Lasermikroskopie in der Dermatologie [Stand: 07/2017].
12. Malvey J, Pérez-Anker J, Toll A, Pigem R, Garcia A, Alos LL, et al. Ex vivo confocal microscopy: revolution in fast pathology in dermatology. *Br J Dermatol*. 2020;183(6):1011-25.
13. MAVIG GmbH.MAVIG VivaScope® 2500 – Ex Vivo Brochure [Status 02/2020]. Abrufbar unter der URL: https://www.vivascope.de/wp-content/uploads/2020/03/ExVivo_Brochure_022020.pdf
14. Schüürmann M, Stecher MM, Paasch U, Simon JC, Grunewald S. Evaluation of digital staining for ex vivo confocal laser scanning microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34(7):1496-9.
15. Gareau DS. Feasibility of digitally stained multimodal confocal mosaics to simulate histopathology. *J Biomed Opt*. 2009;14(3):034050.
16. Combalia M, Pérez-Anker J, García-Herrera A, Alos L, Vilaplana V, Marqués F, et al. Digitally Stained Confocal Microscopy through Deep Learning. In: Cardoso MJ, Aasa F, Ben G, Ender K, Ipek O, Gozde U, et al., editors. *Proceedings of The 2nd International Conference on Medical Imaging with Deep Learning; Proceedings of Machine Learning Research: PMLR*; 2019. p. 121--9.
17. Hartmann D, Ruini C, Mathemeier L, Dietrich A, Ruzicka T, von Braunmühl T. Identification of ex-vivo confocal scanning microscopic features and their histological correlates in human skin. *J Biophotonics*. 2016;9(4):376-87.
18. Greenwood JD, Merry SP, Boswell CL. Skin Biopsy Techniques. *Prim Care*. 2022;49(1):1-22.

19. Schärer L. Histologische Techniken. In: Cerroni L, Garbe C, Metze D, Kutzner H, Kerl H, editors. *Histopathologie der Haut*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 3-13.
20. Löser CR, Rempel R, Möhrle M, Häfner HM, Kunte C, Hassel J, et al. S1 guideline: microscopically controlled surgery (MCS). *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015;13(9):942-51.
21. Kopke LFF, Konz B. Mikrographische Chirurgie Eine methodische Bestandsaufnahme. *Der Hautarzt*. 1995;46(9):607-14.
22. Cerroni L, Garbe C, Metze D, Kutzner H, Kerl H. *Histopathologie der Haut*. 2. Auflage ed. Cerroni L, Garbe C, Metze D, Kutzner H, Kerl H, editors. Berlin: Springer; 2016.
23. Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M. *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. 7. Aufl. 2018 ed. Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M, editors. Berlin, Heidelberg: Springer; 2018.
24. Longo C, Ragazzi M, Gardini S, Piana S, Moscarella E, Lallas A, et al. Ex vivo fluorescence confocal microscopy in conjunction with Mohs micrographic surgery for cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(2):321-2.
25. Hartmann D, Krammer S, Bachmann MR, Mathemeier L, Ruzicka T, Bağcı IS, et al. Ex vivo confocal microscopy features of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Biophotonics*. 2018;11(4):e201700318.
26. Hartmann D, Krammer S, Ruini C, Ruzicka T, von Braunmühl T. Correlation of histological and ex-vivo confocal tumor thickness in malignant melanoma. *Lasers Med Sci*. 2016;31(5):921-7.
27. Hartmann D, Krammer S, Vural S, Bachmann MR, Ruini C, Sárdy M, et al. Immunofluorescence and confocal microscopy for ex-vivo diagnosis of melanocytic and non-melanocytic skin tumors: A pilot study. *J Biophotonics*. 2018;11(3).
28. Cinotti E, Belgrano V, Labeille B, Grivet D, Douchet C, Chauleur C, et al. In vivo and ex vivo confocal microscopy for the evaluation of surgical margins of melanoma. *J Biophotonics*. 2020;13(11):e202000179.
29. Lamberti A, Cinotti E, Habougat C, Labeille B, Rubegni P, Perrot JL. Ex vivo confocal microscopy for dermatofibrosarcoma protuberans. *Skin Res Technol*. 2019;25(4):589-91.
30. Cinotti E, Haouas M, Grivet D, Perrot JL. In Vivo and Ex Vivo Confocal Microscopy for the Management of a Melanoma of the Eyelid Margin. *Dermatol Surg*. 2015;41(12):1437-40.
31. Longo C, Ragazzi M, Gardini S, Moscarella E, Argenziano G. Ex Vivo Fluorescence Confocal Microscopy of Eccrine Syringomatous Carcinoma: A Report of 2 Cases. *JAMA Dermatol*. 2015;151(9):1034-6.
32. Debarbieux S, Gaspar R, Depaepe L, Dalle S, Balme B, Thomas L. Intraoperative diagnosis of nonpigmented nail tumours with ex vivo fluorescence confocal microscopy: 10 cases. *Br J Dermatol*. 2015;172(4):1037-44.
33. Leclercq A, Cinotti E, Labeille B, Perrot JL, Cambazard F. Ex vivo confocal microscopy: a new diagnostic technique for mucormycosis. *Skin Res Technol*. 2016;22(2):203-7.
34. Cinotti E, Perrot JL, Labeille B, Campolmi N, Thuret G, Naigeon N, et al. First identification of the herpes simplex virus by skin-dedicated ex vivo fluorescence confocal microscopy during herpetic skin infections. *Clin Exp Dermatol*. 2015;40(4):421-5.
35. Bertoni L, Azzoni P, Reggiani C, Pisciotta A, Carnevale G, Chester J, et al. Ex vivo fluorescence confocal microscopy for intraoperative, real-time diagnosis of cutaneous inflammatory diseases: A preliminary study. *Exp Dermatol*. 2018;27(10):1152-9.
36. Mentzel J, Stecher MM, Paasch U, Simon JC, Grunewald S. Ex vivo confocal laser scanning microscopy with digital staining is able to map characteristic histopathological features and tissue reaction patterns of inflammatory skin diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2021;35(4):e263-e5.
37. Bağcı IS, Aoki R, Krammer S, Ruzicka T, Sárdy M, Hartmann D. Ex vivo confocal laser scanning microscopy: An innovative method for direct immunofluorescence of cutaneous vasculitis. *J Biophotonics*. 2019;12(9):e201800425.

38. Bağcı IS, Aoki R, Krammer S, Ruzicka T, Sárdy M, French LE, et al. Ex vivo confocal laser scanning microscopy for bullous pemphigoid diagnostics: new era in direct immunofluorescence? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(11):2123-30.
39. Thabane L, Ma J, Chu R, Cheng J, Ismaila A, Rios LP, et al. A tutorial on pilot studies: the what, why and how. *BMC Med Res Methodol*. 2010;10:1.

Anhang A: Paper III

Ex-vivo fluorescence confocal microscopy with digital staining for characterizing basal cell carcinoma on frozen sections: A comparison with histology.

Veröffentlicht in:

Ruini, C., Vladimirova, G., Kendziora, B., Salzer, S., Ergun, E., Sattler, E., French, L. E., & Hartmann, D. (2021). Ex-vivo fluorescence confocal microscopy with digital staining for characterizing basal cell carcinoma on frozen sections: A comparison with histology. *Journal of Biophotonics*, 14(8), e202100094.

DOI: [10.1002/jbio.202100094](https://doi.org/10.1002/jbio.202100094)

Impact Factor: 3.207 (2020)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Betreuern Frau Prof. MUDr. Daniela Hartmann, Frau Prof. Dr. med. Elke Sattler und Herrn Prof. Dr. dr. med. Miklós Sárdy meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. MUDr. Daniela Hartmann für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Arbeit, begleitet von vielen produktiven und motivierenden Gesprächen.

Meinen Eltern und meinem Freund Nikolay danke ich für ihre moralische Unterstützung und lieben Worte während der Erarbeitung meiner Dissertation.