

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

Direktor: Prof. Dr. med. Lars E. French

**INNOVATIVE BILDGEBENDE VERFAHREN
FÜR DIE DIAGNOSTIK UND DAS MONITORING VON
HAUTERKRANKUNGEN**

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia Legendi

der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

für das Fach Haut- und Geschlechtskrankheiten

vorgelegt von

Dr. med. Dott. Cristel Ruini

2021

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

Fachmentorat: Prof. Dr. med. Lars E. French (geschäftsführender Mentor)

PD MUDr. Daniela Hartmann, PhD

Prof. Dr. med. Sebastian Theurich

INHALTSVERZEICHNIS

1. VORBEMERKUNGEN	5
2. HINTERGRUND UND STAND DER FORSCHUNG	7
2.1. In-vivo nicht-invasive physikalische Diagnostik in der Dermatologie	7
2.1.1. Konfokale Laserscanmikroskopie (KLSM)	8
2.1.2. Optische Kohärenztomographie	13
2.1.3. Line-field konfokale optische Kohärenztomographie	16
2.2. Hautkrebs	18
2.3. Allergische Kontaktdermatitis	22
3. WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN	23
3.1 Erste Einsatzgebiete des höchstinnovativen Verfahrens LC-OCT: Anwendung zur nicht-invasiven Charakterisierung der gesunden Haut und der häufigsten Hauttumoren im Vergleich zur Goldstandard Histologie und zu bereits etablierten diagnostischen Verfahren	23
3.1.1. Publikation: Line-field-confocal optical coherence tomography – practical applications in dermatology and comparison with established imaging methods. Ruini C. et al., Skin Research Technology 2021 (Epub 2020).	24
3.1.2. Publikation: Line-field optical coherence tomography: in vivo diagnosis of basal cell carcinoma and subtype compared to histopathology and to other established imaging techniques. Ruini C. et al., Clin Exp Dermatol. 2021.	25
3.1.3. Publikation: In-vivo LC-OCT evaluation of the downward proliferation pattern of keratinocytes in actinic keratosis in comparison with histology: first impressions from a pilot study. Ruini C. et al., Cancers 2021	28
3.2 Neue Indikationen und Funktionen der OCT: nicht-invasive Charakterisierung der allergischen Kontaktdermatitis und Entwicklung eines OCT-basiertes Algorithmus zur Einstufung der ECT Ergebnissen	31
3.2.1. Publikation: Nickel contact dermatitis evaluated by means of optical coherence tomography: first impressions. Ruini C. et al., J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019	32
3.2.2. Publikation: Optical coherence tomography for patch test grading: a prospective study on its use for non-invasive diagnosis of allergic contact dermatitis. Contact Dermatitis 2020	34
3.3. Neue Indikationen der Kombination aus OCT und KLSM: nicht-invasive Charakterisierung der Hautmorphologie in unterschiedlichen ethnischen Gruppen unter Behandlung mit einer hydratisierenden Lotion	36
3.3.1. Publikation: Effects of Short-Term Moisturizer Application in Different Ethnic Skin Types:Noninvasive Assessment with Optical Coherence Tomography and Reflectance Confocal Microscopy. Bağcı IS, Ruini C, et al. Skin Pharmacol Physiol. 2018	36
3.4. Innovative Kombination der OCT und KLSM für das therapeutisches Monitoring der Feldkanzerisierung	38
3.4.1. Publikation: Non-invasive monitoring of subclinical and clinical actinic keratosis of face and scalp under topical treatment with ingenol mebutate gel 150 mcg/g by means of reflectance confocal microscopy and optical coherence tomography: New perspectives and comparison of diagnostic techniques. Ruini C. et al., J Biophotonics. 2019	38

3.5. Einsatz der KLSM im Alltag für schwer diagnostizierbare, klinisch und dermatoskopisch unklare Hauttumorfälle	40
3.5.1. Publikation: The invisible basal cell carcinoma: how reflectance confocal microscopy improves the diagnostic accuracy of clinically unclear facial macules and papules. Ruini C. et al., Lasers Med Sci. 2016	40
3.5.2. Publikation: Reflectance confocal microscopy correlates of dermoscopic patterns of facial lesions help to discriminate lentigo maligna from pigmented nonmelanocytic macules. De Carvalho N., ... Ruini C., et al., Br J Dermatol. 2015	42
3.6. Neue Anwendungen der ex-vivo KLSM im Vergleich mit der mikrographisch kontrollierten und konventionellen Histologie	44
3.6.1. Publikation: Ex-vivo fluorescence confocal microscopy with digital staining for characterizing basal cell carcinoma on frozen sections: a comparison with histology. Ruini C. et al., J Biophotonics 2021	44
3.6.2. Publikation: Identification of ex-vivo confocal scanning microscopic features and their histological correlates in human skin. Hartmann D., Ruini C. et al., J Biophotonics. 2016	46
4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	47
5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	51
7. VERZEICHNIS DER IN DER HABILITATIONSSCHRIFT ZUSAMMENGEFASSTEN PUBLIKATIONEN	52
8. WEITERE THEMENBEZOGENE PUBLIKATIONEN	53
9. REFERENZEN	56
10. DANKSAGUNG	62
11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG UND ERKLÄRUNG	64

1. VORBEMERKUNGEN

Die Dermatologie ist ein vielfältiges und faszinierendes Fach, welches über eine enorme Anzahl an Diagnosen verfügt, die der Kliniker unterscheiden können sollte. In den meisten Fällen, um eine korrekte therapeutische Versorgung leisten zu können, muss die Verdachtsdiagnose durch eine invasive, chirurgische Biopsie einschließlich histopathologischer Begutachtung bestätigt werden.

Um die Diagnosestellung zu unterstützen, haben sich in den letzten Jahren neue bildgebende Verfahren zuerst im akademischen und seit einigen Jahren auch im klinischen Alltag entwickelt, bei denen die Haut nicht-invasiv und hochauflösend mikroskopiert werden kann. Diese dienen der Früherkennung von Hautkrebs und weiterer Hautkrankheiten und können somit potentiell in vielen Fällen die Therapieentscheidung und das weitere Vorgehen zielführend verbessern.

Es ist zu erwarten, dass die zunehmende Optimierung dieser Verfahren und ihre Verbreitung zusammen mit dem stetig ansteigenden Interesse der Patienten und von Klinikern, langfristig zu einer wesentlichen Verbesserung der Frühdiagnostik sowie des Therapiemonitorings von Hauttumoren und zahlreichen Dermatosen führen werden.

Die Projekte, die in dieser Habilitationsschrift zusammengefasst sind, basieren auf einer Reihe von Untersuchungen zur innovativen Diagnostik unterschiedlicher Hautkrankheiten, die in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München stattgefunden haben und weiterhin erfolgen, sowie im Rahmen verschiedener nationaler und internationaler Kooperationen. Dazu zählen die erfolgreiche Mitarbeit mit der Universitätsklinik Augsburg sowie der Universität Modena und Reggio Emilia (Italien).

Ziel dieser Forschungstätigkeit war die Etablierung o.g. innovativer Verfahren im klinischen Alltag sowie neue dafür geeignete Anwendungsbereiche zu erforschen, mit der Feststellung standardisierter diagnostischer Kriterien.

Die vorgelegte Habilitationsschrift fasst nach einem kurzen Überblick über die wesentlichen Grundlagen der bildgebenden Verfahren optische Kohärenztomographie (OCT), in-vivo und ex-vivo konfokale Laserscanmikroskopie (KLSM) und line-field konfokale optische Kohärenztomographie (LC-OCT), sowie über Hautkrebs und kontaktallergische Dermatitis, die wichtigsten eigenen wissenschaftlichen Untersuchungen zu diesem Thema zusammen. Zum Schluss werden die zukünftigen Zielsetzungen zum Einsatz und Anwendungsmöglichkeiten von bildgebenden Verfahren in der Dermatologie charakterisiert.

In der Zusammenschau der Ergebnisse sind für die bildgebende Diagnostik in der Dermatologie neue Erkenntnisse entstanden, die langfristig die Evaluation, die Klassifikation, die Schnellschnittuntersuchung und die Therapiekontrolle von Hautkrankheiten und speziell Hauttumoren verbessern können. Insbesondere wurde für das erste Mal systematisch der Einsatz des neuen Verfahrens LC-OCT im klinischen Alltag untersucht; es wurden diagnostische Kriterien und histopathologische Korrelate festgelegt, die die Einsatzgebiete dieses Verfahrens eröffnen konnten. Die neuen und bereits etablierten physikalischen diagnostischen Techniken in der Dermatologie wurden zusätzlich für originale Fragestellungen genutzt, kombiniert und miteinander verglichen. Evaluiert wurde auch der Einsatz solcher Verfahren für Krankheitsbilder, bei denen eine histologische Sicherung nicht Mittel der Wahl im klinischen Alltag ist, aber Informationen über die mikroskopische Struktur der Haut wichtige Hinweise für die diagnostische Einstufung oder das therapeutische Follow-Up gewinnen lassen.

2. HINTERGRUND UND STAND DER FORSCHUNG

2.1. IN-VIVO NICHT-INVASIVE PHYSIKALISCHE DIAGNOSTIK IN DER DERMATOLOGIE

Die dermatologische Diagnostik hat in den letzten zwei Jahrzehnten enorme Fortschritte gemacht. Bis zu den 90er Jahren konnte zum Beispiel die Diagnose des schwarzen Hautkrebs nur im weit fortgeschrittenen Stadium bei knotigen und blutigen Tumoren gestellt werden. Die Dermatoskopie hat die Genauigkeit der Diagnose von hellem und schwarzem Hautkrebs signifikant erhöht.^{19, 20} Nach und nach kam es zu ihrem systematischen Einsatz auch in anderen Indikationen wie entzündliche Erkrankungen, Haarerkrankungen oder Parasitosen. Die Dermatoskopie ist im Vergleich zu anderen diagnostischen Verfahren günstig, das Gerät leicht und in der Kitteltasche transportierbar und das Grundtraining überschaubar. Neben der Dermatoskopie entwickelten sich komplexe physikalische bildgebende Verfahren wie zum Beispiel die OCT, die in-vivo und ex-vivo KLSM und vor kurzem die LC-OCT.⁹³

Die OCT hat eine gute Eindringtiefe bis zur tiefen Dermis, allerdings auf Kosten einer geringeren Auflösung, und wird deswegen hauptsächlich bei hellem Hautkrebs oder gesunder Haut angewandt.⁵⁹ Im Gegensatz dazu, eignet sich die KLSM dank ihrer Auflösung auf zellulärer Ebene besonders gut zur Differentialdiagnostik melanozytärer Läsionen.⁶¹ Diese kann auch ex-vivo (an exzidiertem Gewebe direkt postoperativ) angewandt werden, um eine virtuelle, schnellere Art der Histologie zu ermöglichen.^{36, 50}

Die LC-OCT ist ein neues Verfahren, was über eine zelluläre Auflösung und Eindringtiefe bis zur mittleren Dermis verfügt, so dass nicht nur die Morphologie, sondern auch die Invasionstiefe zahlreicher Tumoren dadurch bestimmt werden kann.^{23, 24, 58} Die präliminären Studien zeigen ein hohes Potential in der Dermatologie, vor allem zur Charakterisierung von gesunder Haut, aktinischen Keratosen (AK), Plattenepithelkarzinomen (PEK) und

Feldkanzerisierung, Basalzellkarzinomen (BZK), bullösen Dermatosen und Milbenerkrankungen.^{55, 72-75, 84, 85} Weitere Erfahrungen mit dieser Technik sind nötig, um eine standardisierte Erfassung der diagnostischen Kriterien sowie weitere Einsatzgebiete zu ermöglichen.

Unmittelbare Zwecke solcher modernen therapeutischen Verfahren sind neben der Verbesserung der reinen Blickdiagnostik auch die Möglichkeiten der präoperativen Schnitttrandbestimmung, Verlaufskontrollen, die Beurteilung von Rezidiven und die Erfolgskontrolle lokaler Therapien.

Gerät	Bilder	Gesichtsfeld	Auflösung	Eindringtiefe	Zeit	Interpretation
KLSM	horizontal	500x500 µm, Mosaik bis 8x8 mm	1-3 µm	200-250 µm	Minuten	Wie Dermatoskopie
OCT	vertical (horizontal, 3D)	6x6x1.5 mm	7.5-10 µm	1.5 mm	Sekunden	Wie Sonographie
LC-OCT	horizontal, vertikal, 3D	1.2x1.2x0.5 mm	1.1-1.3 µm	500 µm	Sekunden	Wie Histologie
EX-VIVO KLSM	vertikal	750x750µm, Mosaik bis 20x20mm	1,25-3 µm	200 µm	Minuten	Wie Histologie

Tabelle 1. Hauptmerkmale der angewandten diagnostischen Techniken

2.1.1. KONFOKALE LASERSCANMIKROSKOPIE (KLSM)

Die KLSM fand ihren ersten Einsatz in der Dermatologie in den 90er Jahren im Memorial Sloan Kettering Hospital in New York.⁶⁷ Geboren als ex-vivo Technik an Hautschnitten, fand sie zunächst ihren Erfolg als in-vivo Technik und erst in den letzten Jahren wurde sie wieder aufs ex-vivo Gebiet, dieses Mal mit großem Erfolg, ausgebreitet.^{10, 83}

Die in-vivo KLSM (weiter KLSM genannt, im Gegensatz zu ex-vivo KLSM), ist ein optisches Verfahren, das auf einer Infrarot-Laser-Lichtquelle (830 nm Wellenlänge) basiert. Das Gerätesystem besteht aus einem Gerätewagen, Computer mit Monitor und Tastatur, Ablagefläche, Kamera und Laser-Einheit. Mittlerweile ermöglicht eine Kamera sowohl ein

makroskopisches Bild der Hautoberfläche als auch ein dermatoskopisches Bild der zu untersuchenden Läsion, welches eine Live-Navigation durch die Läsion ermöglicht. Während der in-vivo Untersuchung sollte die Haut mit einem klebenden Metallring fixiert werden, um Bewegungsartefakte zu minimieren. Um die Reflektanz des Stratum corneums (SC) und der Luft zu minimieren werden Immersionsöl zwischen Haut und Klebering und Ultraschallgel zwischen Klebfenster und Optik benötigt. Zwei Modelle, produziert von der Firma Mavig GmbH (München, Deutschland), stehen zur Verfügung: das Vivascope© 1500 und eine kompaktere, handheld Version (Vivascope© 3000).

Die Bilder der KLSM sind horizontal – also Hautoberflächen-parallel - und schwarz-weiß; die Methodik benötigt kein Kontrastmittel: der Kontrast entsteht durch die Unterschiede in der Stärke der Reflektion der natürlichen Chromophore in der Haut, wie Keratin und Melanin. Da diese relativ hohe Brechungsindices im Vergleich zu Luft und Wasser besitzen, sehen pigmentierte Zellen sehr hell aus, während sich das wässrige Zytoplasma dunkel darstellt.

Eine dreischichtige Standard Aufnahme soll die Epidermis, die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ) und die oberflächliche Dermis erfassen. Da ab 200-250 µm Tiefe die Bilder unscharf werden, ist das Gerät nicht für dickere Hornschichten oder tiefer liegende Strukturen geeignet, bietet dafür aber eine Auflösung von 1,25 µm, was die Darstellung von Einzelzellen erlaubt.

Die KLSM ist vor allem zur Diagnostik melanozytärer Tumore geeignet, da sie die zelluläre Atypie darstellen kann. Sie ist auch für epitheliale Hauttumoren wie AK, PEK und BZK gut einsetzbar. Die Sensitivität und Spezifität liegt für Melanome (MM), BZK und PEK zwischen 80 und 100%.^{21, 22, 25}

Die KLSM eignet sich zusätzlich für die nicht-invasive Charakterisierung zahlreicher dermatologischer Erkrankungen, unter anderem Psoriasis, atopisches Ekzem, Pemphigus und

Pemphigoid.¹ Demodikose bei Rosazea und Skabiesmilben können einfach dargestellt werden.^{71,77}

Der Vergleich mit der Histologie (vertikale Schnitte) ist etwas gewöhnungsbedürftig auf Grund der horizontalen Aufnahmen. Die Hautschichten können allerdings nach einem Basistraining erfolgreich differenziert werden. Die Korneozyten vom SC erscheinen als nebeneinander liegende, große, polygonale Zellen und homogen hell; darunter findet man das Stratum granulosum und spinosum, die einem Teppich aus gleichgroßen, polygonalen Keratinozyten mit heller Kontur und schwarzem Zytoplasma entsprechen. Dadurch entsteht eine polygonale Struktur, die „Honigwabenmuster“ genannt wird, den Honigwaben aus der Natur entsprechend. An der DEJ bilden die helleren pigmentierten basalen Keratinozyten und Melanozyten eine Art Ring um die dunkleren dermalen Papillen, die horizontal angeschnitten sind („Ringmuster“). In der Papillenmitte sind Kapillargefäße sichtbar. Eine in-vivo Darstellung des Blutflusses ist möglich.^{15, 51, 56, 65, 82}

In der oberflächlichen Dermis sind hauptsächlich Blutgefäße und Kollagenfasern auffindbar. In der Tiefe verliert die KLSM kontinuierlich die Auflösung.

AK, Morbus Bowen (MB), Bowen-Karzinom (BK) und PEK werden durch ein unregelmäßiges Honigwabenmuster in der Epidermis charakterisiert.^{54, 63, 76} Die KLSM Atypie dieser Struktur korreliert mit dem Schweregrad der zytologischen Atypie. Eine erhöhte und oft chaotische Vaskularisierung ist darstellbar, z.B. glomeruläre Gefäße bei MB. Bei solarer Elastose finden sich irreguläre Kollagenfasern sowie entzündliche Partikel. Diese sind sowohl bei Hautalterung als auch bei chronischen Sonnenschäden sichtbar.¹³

BZK sind auch für Nicht-Experten sehr gut erkennbar; es zeigen sich: ein atypisches Honigwabenmuster in der Epidermis, Tumornester aus basaloiden Zellen mit stromlinienförmiger Anordnung und Polarisierung der Zellen, sowie einer umgebenden

stromalen Reaktion und einem peripheren dunklen Randsaum, der der Ablagerung von Muzin entspricht.^{30, 69, 70}

KLSM wird nicht für die Routinediagnose der entzündlichen Dermatosen angewandt, kann aber in schwierigen Fällen eine valide Unterstützung darstellen. Vereinzelt Studien weisen zusätzlich auf eine gute Darstellung der Milbeninfestationen hin: insbesondere Demodexmilben zeigen sich als graue Strukturen mit heller Kontur in den Haarfollikeln, während Skabiesmilben als rund-ovale Wesen innerhalb ihres dunklen Ganges zu sehen sind^{49, 77}.

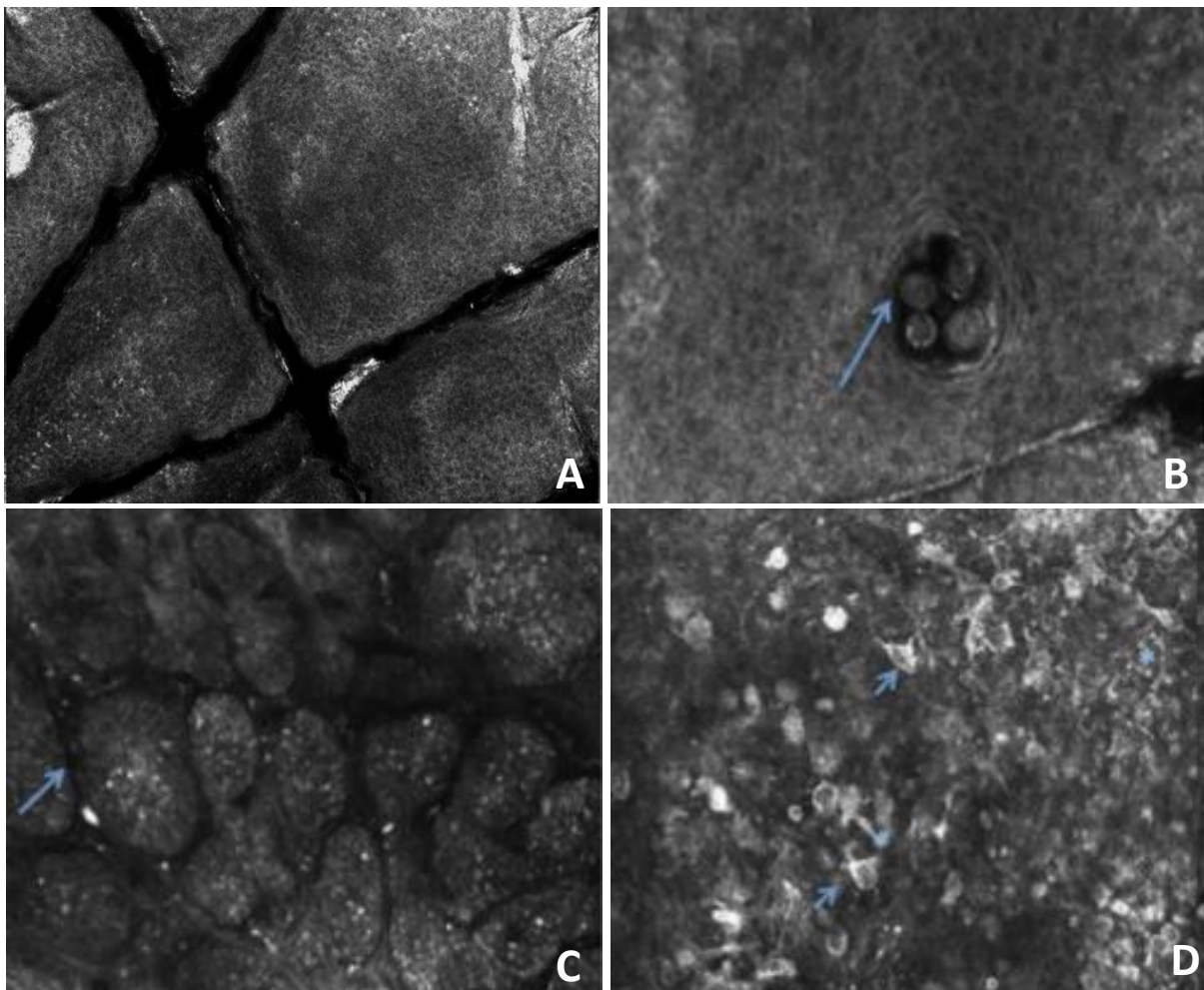


Abbildung 1: KLSM Darstellung A. der gesunden Gesichtshaut mit den polygonalen Keratinozyten, in einem Honigwabemuster arrangiert, und den tiefen dunklen Hautfurchten B. eines Haarfollikels mit vier Demodex folliculorum Milben (Pfeil) an der Wange einer Patientin mit Rosacea papulo-pustulosa C. eines soliden BZKs der Stirn mit den typischen ovoiden Tumornestern (Pfeil) D. eines superfiziell spreitendes MM mit der pagetoiden Ausbreitung der malignen Melanozyten in die Epidermis (Pfeil).

In den letzten Jahren kam es zur Etablierung der KLSM auch im ex-vivo Bereich, also an frisch exzidiertem Gewebe ohne Vorfixierung.^{9, 34, 37} Das verfügbare Gerät (VivaScope® 2500) kann

sowohl im Fluoreszenz- (FM) als auch im Reflektionsmodus (RM) angewendet werden; zusätzlich bestehen im neuesten Modell der vierten Generation noch ein Überlappungsmodus (OM) und eine digitale Staining-Software (DS), die die Farben der Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung imitiert. Die ex-vivo KLSM verwendet zwei Laser-Wellenlängen von 488 nm (blau) und 758 nm (infrarot). Der blaue Laser regt Fluoreszenzfarbstoffe an, wie z. B. Acridinorange, und markiert Kernstrukturen, die in FM grün erscheinen. Der Infrarotlaser hingegen erzeugt ein Reflexionssignal, das Chromophoren wie Melanin und Keratin hervorhebt; diese erscheinen in RM in verschiedenen Grautönen. Das OM erlaubt eine Kombination aus FM und RM, um die Genauigkeit der Bilddarstellung zu verbessern.

Die Schnitte werden mit Essig- oder Zitronensäure vorbehandelt, um den Kontrast zu erhöhen. Damit die Zellkerne besser visualisiert werden können, wird das Präparat noch mit Acridinorange oder anderen Farbstoffe gefärbt. Die Vorbehandlung und die Untersuchung sind für das Gewebe nicht schädlich, sodass die Präparate anschließend für die reguläre histopathologische Begutachtung fixiert und genutzt werden können. Ein direkter Vergleich mit der Histologie ist somit möglich und einfach, dank der vertikalen Schnitte.^{31, 32, 35} Sogar die Tumordicke ist einschätzbar.^{33, 36} In den letzten Jahren wurden auch zahlreiche entzündliche Dermatosen und infektiöse Hautkrankheiten anhand der ex-vivo KLSM charakterisiert.^{4-8, 11, 42}

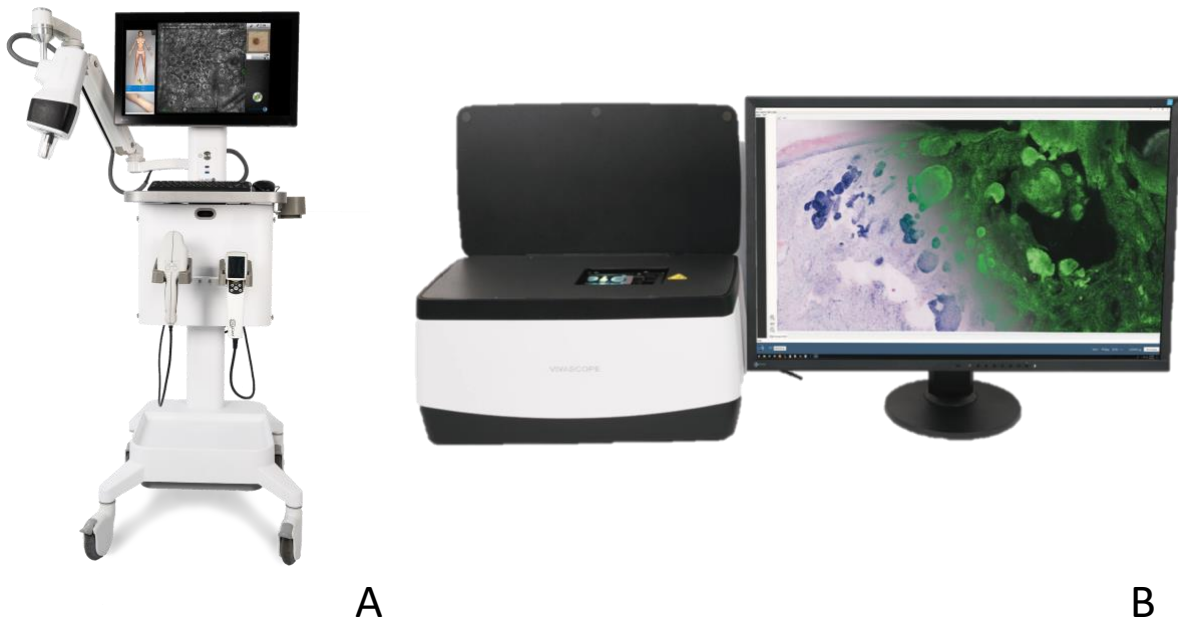


Abbildung 2: A. Gerät für die in-vivo konfokale Laserscannmikroskopie (Vivascope® 1500-3500); B. Gerät für die ex-vivo konfokale Laserscannmikroskopie der vierten Generation (Vivascope® 2500); mit freundlicher Genehmigung des Herstellers Mavig GmbH, München).

2.1.2. OPTISCHE KOHÄRENZTOMOGRAPHIE

Die OCT, die bereits seit mehreren Jahren in der Augenheilkunde eingesetzt wird, findet nun auch vermehrt Verwendung in der Dermatologie. Das OCT-System besteht aus einem Gerätewagen, PC mit Monitor und Tastatur, Ablagefläche und Laser-Einheit. Eine integrierte Kamera erlaubt eine Live-Navigation der untersuchten Hautveränderung.^{26, 87, 90-92}

Die OCT beruht auf einer kohärenten Lichtinterferometrie. Die live in-vivo Darstellung der Haut bis zum subkutanen Gewebe (1-2mm Eindringtiefe) ist möglich, allerdings mit einer geringeren Auflösung ($\approx 10\text{-}20\mu\text{m}$) im Vergleich zur KLSM. Die Bilder sind schwarz-weiß, vertikal und horizontal. Die dynamische Funktion zeigt die Blutgefäße in roter Farbe.

Hauptindikationen der OCT sind auf Grund der geringeren Auflösung die nicht-melanozytären Hauttumore, insbesondere BZK und AK, MB, BK und PEK. Selbstverständlich können

zahlreiche entzündliche und infektiöse Hauterkrankungen potentiell untersucht werden (Ekzem, Rosacea, Narbenbildung, Hauthydratisierung).⁹³

Das aktuell kommerziell weltweit verfügbare Modell ist das OCT Gerät VivoSight ® (Michelson Diagnostics Ltd., Maidstone, Kent, England).

Die OCT Bilder können mit histologischen Grundkenntnissen interpretiert werden, da sie auch in vertikalen Schnitten dargestellt werden. Im vertikalen Schnitt erkennt man das breite SC, von Schweißdrüsenausführungsgängen unterbrochen. Das darunter liegende Stratum granulosum/spinosum ist durch eine schmale, dunkle Linie (die dermo-epidermale Junktion) von der oberflächlichen Dermis getrennt. Die Dermis ist signalreicher im Stratum papillare, wird aber signalärmer im Stratum reticulare, wo Gefäße als dunkle, runde oder längliche Strukturen abgrenzbar sind.

Die Feldkanzerisierung kann mit hoher Sensitivität und Spezifität untersucht werden. AK zeigen eine inhomogene Verdickung des Stratum corneum, die gemessen werden kann, zusammen mit einer akanthotischen Verdickung der restlichen Epidermis. Eine zunehmende Atypie zeigt sich bei PEK nicht nur mit Hyperkeratose, sondern auch mit Strukturverlust der normalen epidermalen und junktionalen Struktur.⁸⁰

BZK werden durch eine atrophe Epidermis und die typischen scharf begrenzten, signalarmen, ovoiden oder runden Tumorknoten charakterisiert. Teilweise bestehen zentrale zystische Anteile bei nodulären Formen. Oberflächliche BZK zeigen miteinander verbundene, lineare und ovoide Zapfen, während sklerodermiforme BZK schwieriger zu diagnostizieren sind: häufig ist eine Art von „Fischschwarm“ aus inhomogenen, länglichen hyporeflektiven Strukturen der diagnostische Hinweis.^{17, 40, 81}

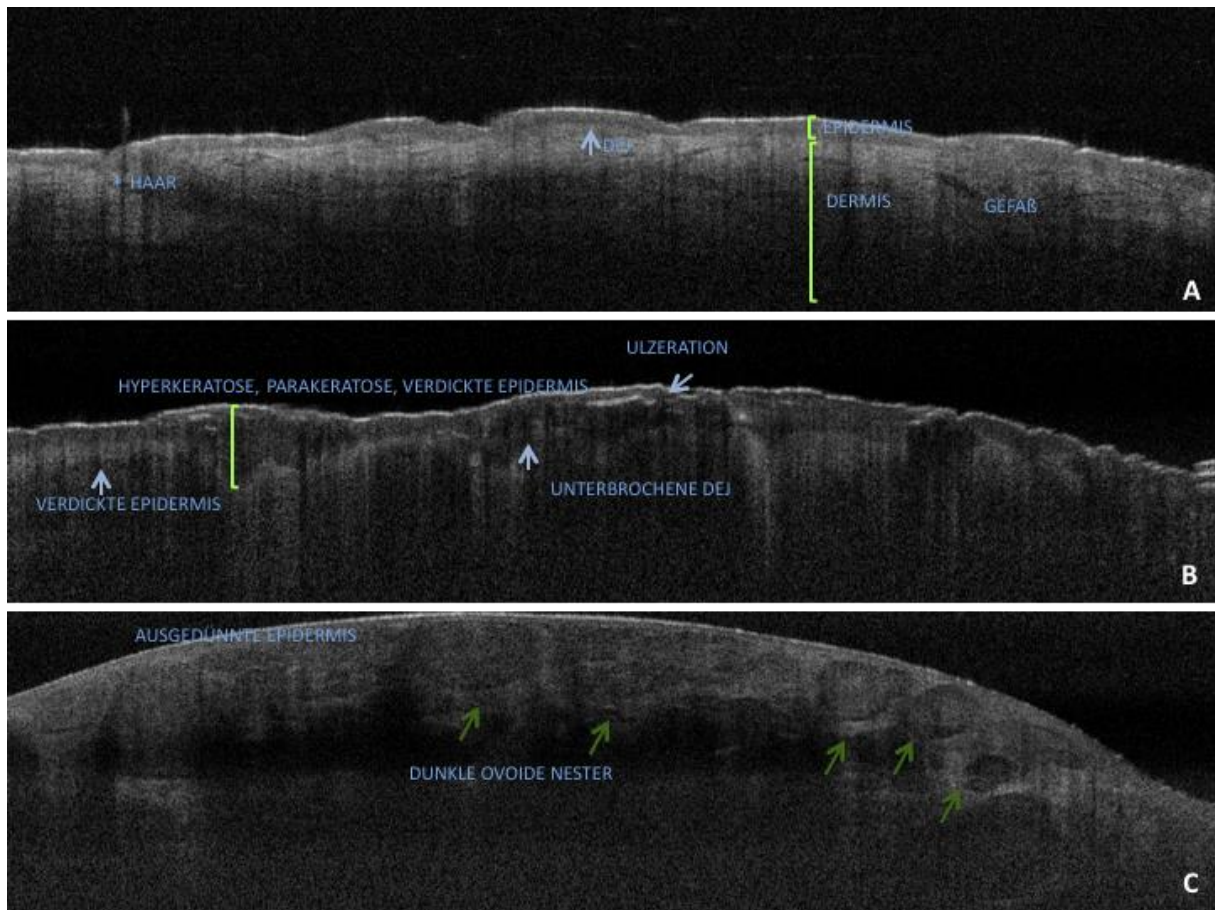


Abbildung 3: OCT Darstellung A. der gesunden Haut des Unterarms B. eines PEKs des Kapillitiums C. eines soliden BZKs des Rückens

Die OCT ist eine bedienerabhängige Technik und die Erfahrung des beurteilenden Arztes beeinflusst die Bildinterpretation. Um diesen Nachteil partiell zu überwinden und um die Hautmorphologie standardisiert untersuchen zu können, vor allem in klinischen Studien, wurde eine spezielle Software entwickelt. VivoTools® analysiert die OCT Bilder der Haut und bestimmt eine Reihe aus objektiven Parametern, die signifikante Informationen über die Hautmorphologie liefern. Insbesondere sind eine Bestimmung: der Blutgefäßdicke in Funktion der Tiefe, der Rauheit der Haut, der Epidermisdicke und der optische Hautschwächungskoeffizient (AC) möglich. Ferner können Haarfollikel und Poren in 2D und 3D dargestellt werden. Das Software befindet sich noch in der Validierungsphase, hat aber in unserer Erfahrung vielversprechende Ergebnisse gezeigt; es könnte speziell in den

Vergleichsstudien Anwendung finden, um die Änderungen o.g. Hautparameter vor, während und nach Behandlungen mit Kosmetika und Lokalthérapeutika zu evaluieren.^{14, 15, 41}

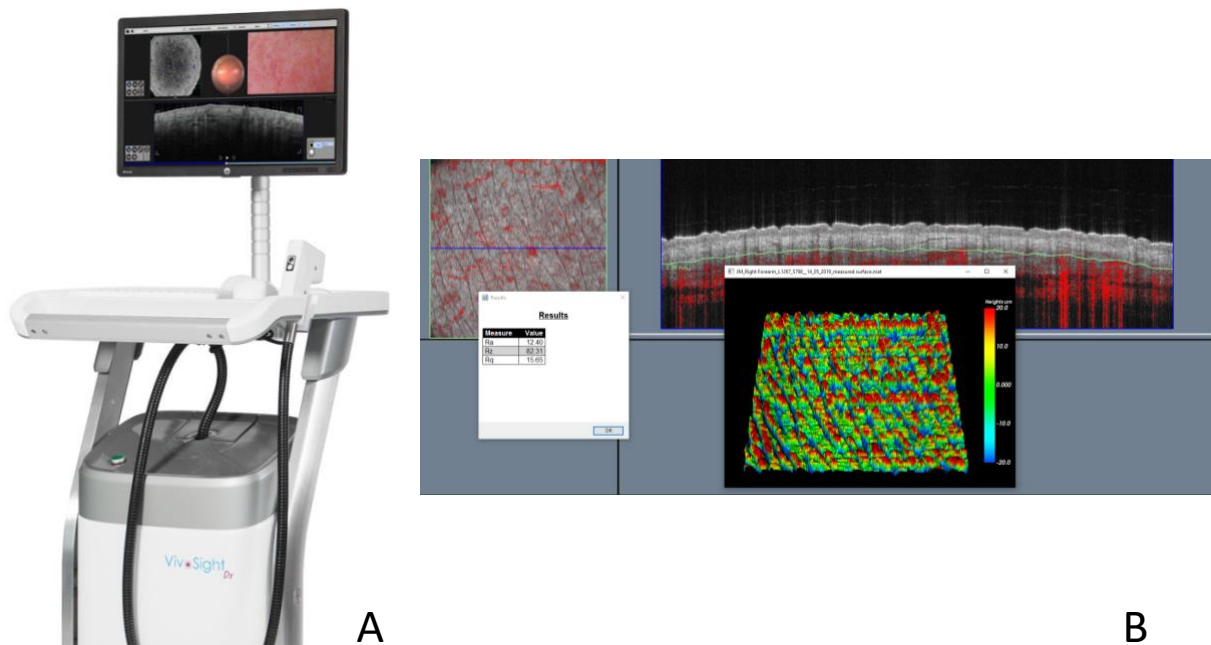


Abbildung 4: A: Gerät für die optische Kohärenztomographie VivoSight® und Software VivoTools® mit freundlicher Genehmigung des Herstellers VivoSight® (Michelson Diagnostics Ltd., Maidstone, Kent, England).

2.1.3. LINE-FIELD KONFOKALE OPTISCHE KOHÄRENZTOMOGRAPHIE

Die Line-field konfokale optische Kohärenztomographie (LC-OCT) wurde von einer französischen Start-up Firma (DAMAE-medical, Paris, Frankreich) entwickelt und soll die Vorteile der beiden oben genannten diagnostischen Methoden kombinieren. Es handelt sich um ein optisches Verfahren, das auf einer Laser-Lichtquelle mit kontinuierlichem Spektrum basiert (Zentralband: 800nm Wellenlänge). Das Gerätesystem besteht aus der LC-OCT-Sonde und einem stabilen Gerätewagen, PC mit Monitor und Tastatur, Ablagefläche und Laser-Einheit. Immersionsöl wird zwischen Haut und Sonde aufgetragen, um die Reflektion zu reduzieren und die Brechungsindices anzugleichen. Im neuesten Prototyp ist zusätzlich eine Kamera eingebaut, um in einem auflichtmikroskopischen Bild der zu untersuchenden Läsion live navigieren zu können. Es wird kein Kontrastmittel benötigt: der Kontrast in den schwarz-weißen Bildern

entsteht durch Unterschiede in der Stärke der Reflektion der natürlichen Chromophore der Haut, wie Keratin und Melanin. Auch hier zeigen sich pigmentierte Zellen sehr hell, im Vergleich zum wasserreichen dunklen Zytoplasma, dank der unterschiedlichen Brechungsindices von Luft und Wasser.^{23, 24, 58}

Das Gerät ermöglicht eine Liveaufnahme der Hautstrukturen in-vivo bis zur mittleren bis tiefen Dermis (500µm Eindringtiefe) kombiniert mit einer hohen Auflösung von 1–2µm. Auch hier bewegt der Anwender die Sonde auf dem zu untersuchenden Areal. Die Bilder, die in Echtzeit auf dem Monitor erscheinen, sind schwarz-weiß, entweder vertikal (en-coupe) oder horizontal (en-face). Auch Video-3D-Rekonstruktionen werden durch eine integrierte Software hergestellt.

Die Maschine ist CE-zertifiziert, allerdings noch nicht kommerziell verfügbar und bisher nur in wenigen Zentren auf der Welt im Rahmen von experimentellen Studien im Einsatz.

Die LC-OCT Bilder sind ebenso wie die OCT Bilder mit histologischen Grundkenntnissen interpretierbar, vor allem im vertikalen Schnitt. Ein breites Stratum corneum unterbrochen von Schweißdrüsenausführungsgängen ist sichtbar. Die einzelnen Keratinozyten sind im Stratum granulosum/spinosum auch mit zunehmender Größe darstellbar. Die dermo-epidermale Junktion erscheint von unterschiedlicher Helligkeit abhängig vom Phototyp. In der Dermis sieht man hellere Kollagenfasern zusammen mit dunkleren Gefäßen, in denen bewegliche Blutzellen zu erkennen sind. Der Vergleich mit dem histologischen Schnitt gelingt sehr intuitiv vor allem in der vertikalen Aufnahme, während die Interpretation der horizontalen Bilder mehr gewöhnungsbedürftig ist, allerdings den KLSM-Bildern ähnlich^{55, 75}



Abbildung 5: Gerät für die line-field optische Kohärenztomographie deepLive® mit freundlicher Genehmigung des Herstellers DAMAE (DAMAE Medical, Paris, Frankreich).

2.2. HAUTKREBS

Hautkrebs ist eine der häufigsten malignen Erkrankungen in der Bevölkerung mit Fototyp I-III (helle Haut). Es wird geschätzt, dass ca. 50% der Krebsarten, die jährlich detektiert werden, diesem Typ angehören. Die Inzidenz von Hautkrebs steigt von Jahr zu Jahr mit alarmierender Geschwindigkeit. Die ansteigende Morbidität und Mortalität spiegelt sich auch in den erhöhten Behandlungskosten wider.⁴⁵

Hautkrebs kann in zwei Hauptklassen unterteilt werden: schwarzer (Melanom) und weißer Hautkrebs (Plattenepithelkarzinom, Basalzellkarzinom usw.) und deren Vorstufen.

Das Melanom ist die aggressivste Art, mit einer hohen Morbidität und Sterblichkeit, wenn es nicht in einem frühen Stadium erkannt wird.^{28, 29} Das Basalzellkarzinom ist die häufigste Form von Hautkrebs (etwa 75% der weißen Hautkrebs-Arten), hat aber eine viel geringere Sterblichkeit als das Melanom.⁴³ Das Plattenepithelkarzinom repräsentiert etwa 20% der weißen Hautkrebs-Formen; die damit verbundenen Risiken sind geringer als beim Melanom.³⁸

Allerdings ist weißer Hautkrebs häufig an den sonnenexponierten (und gut sichtbaren) Arealen des Körpers lokalisiert. Falls die Behandlung nicht in einem frühen Stadium durchgeführt wird, können die funktionellen und kosmetischen Ergebnisse nach operativer Behandlung unbefriedigend sein.⁴⁸

Das Basalzellkarzinom (BZK) ist ein semimaligner, langsam wachsender, lokal destruierender epithelialer Hauttumor, der von den Zellen der Basalzellschicht und/oder der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel ausgeht. Er infiltrierte das Gewebe oft irregulär mit fingerförmigen Ausläufern. Eine Metastasierung ist extrem selten, aber die Morbidität wird durch die lokale Gewebeinvasion und -destruktion bestimmt, die horrende Ausmaße annehmen kann (Ulcus terebrans, Ulcus rodens). Das BZK ist zu 80% im Kopf- und Halsbereich lokalisiert und betrifft überwiegend Männer und Frauen mit hellem Hauttyp (Kaukasier). Das BZK ist der häufigste maligne Tumor in der allgemeinen mitteleuropäischen Bevölkerung. Die Behandlung von BZK richtet sich idealerweise nach der klinischen Beurteilung, wobei es allerdings in der Regel nicht sicher möglich ist, die Ausdehnung des Tumors in die Breite und in die Tiefe exakt abzuschätzen. Die Tumorstadium erfolgt nämlich häufig weit über den klinisch erkennbaren Anteil, so dass eine vollständige Entfernung gerade bei größeren Tumoren bei der ersten Exzision oft nicht gegeben ist.^{16, 64}

Nach der histologischen Bestätigung der Diagnose erfolgt eine Therapie, die von der Lokalisation, Ausdehnung und Subtyp abhängig ist. BZK werden meistens chirurgisch entfernt, oberflächliche Formen können aber auch kältechirurgisch, lasertherapeutisch, topisch medikamentös oder mittels photodynamischer Therapie (PDT) behandelt werden. Bei inoperablen Formen kommen die Strahlentherapie, die Elektrochemotherapie und die systemische Therapie mit PTCH1-Signalweginhibitoren in Frage.^{44, 64}

Bei BZK im Gesichtsbereich kann die operative Versorgung sehr destruktiv wirken, und häufig ist eine plastische Rekonstruktion erforderlich. Um unnötig breite Sicherheitsabstände zu

vermeiden, gesundes Hautgewebe zu sparen und einen optimierten und einen rezidivfreien Wundverschluss zu garantieren werden insofern die spezielle histologische Aufarbeitungsmethoden der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie (MKC) angewandt. Diese unterscheiden sich in der Schnittführung und Begutachtung und sollen die Vollständigkeit der operativen Tumorentfernung sicherstellen. Bei allen Techniken wird das entfernte Gewebe markiert und eine Skizze angefertigt, um die genaue topografische Orientierung zu gewährleisten. Bevorzugt werden die Methoden, welche den Exzidatschnitttrand lückenlos darstellen; dazu zählen unter anderen die Tübinger-Torte und die Münchner Methode. Bei der Münchner Methode werden die Präparate nicht in Formalin fixiert, sondern mit Kochsalzlösung befeuchtet. Vom Gewebe werden horizontale Kryoschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt, um die Seitenränder und die Basis zu begutachten. Bei vollständiger Resektion kann der Wundverschluss am gleichen Tag oder am darauffolgenden Tag erfolgen; bei Resttumoranteilen wird gezielt an den betroffenen Stellen weiterschnitten. Das Verfahren wird so lange wiederholt, bis der Tumor sicher komplett entfernt wird. Die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit ist im Vergleich zur konventionellen Chirurgie geringer.^{60, 88}

Auch kutane PEK entstehen hauptsächlich in den sonnenexponierten Arealen und sind nach den BZK die zweithäufigste Hauttumoren.⁴⁸ Die höchste Inzidenzrate entfällt auf die über 50-Jährigen im Gesicht und am Kapillitium. Multiplikative Faktoren (z.B. Haarfarbe, positive Familienanamnese, Grad der Sonnenbräune, Sonnenexposition insbes. UV-Strahlen) spielen für die Entstehung eine wesentliche Rolle. Während AK mittels lokaler Therapien wie topischer Externa (zB Imiquimod, 5-Fluorouracil und Ingenolmebutat) oder photodynamischer Therapie behandelt werden können, müssen fortgeschrittene PEK chirurgisch entfernt werden. Die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung hängt eng mit der Tumorgöße (> 2 cm) und dem Tiefenwachstum in die darunter gelegenen Gewebe zusammen. Metastasierte und inoperable Tumore haben meistens eine ungünstige Prognose und können mittels Radiotherapie,

traditioneller Chemotherapie (Cisplatin, 5-Fluorouracil) oder Immuntherapie (anti-PD1 Antikörper) behandelt werden.^{39, 46}

Das maligne Melanom ist für 90% der Mortalität aller malignen Hauttumoren verantwortlich und hat innerhalb der letzten Jahrzehnte stark an Häufigkeit zugenommen. Auch von diesem Tumor sind vornehmlich keltische Hauttypen betroffen und eine akut-intermittierende starke UV-Belastung stellt einen wichtigen Risikofaktor dar.^{12, 28} Das maligne Melanom entstammt überwiegend den Melanozyten in der Haut und ist bei frühzeitiger Diagnosestellung heilbar. Allerdings steigt das Risiko der Metastasierung mit der histologischen Tumordicke erheblich und dann ist der Tumor trotz Chemo-, Immun- oder Radiotherapie in der Regel letal, obwohl neue systemische zielgerichtete und Immuntherapien viel Hoffnung in der Behandlung gebracht haben.^{29, 47}

Eine frühzeitige Diagnose und optimierte Randkontrolle der Hauttumoren sind somit essentiell. In den letzten Jahren konnten durch Einsatz moderner Techniken Sensitivität und Spezifität von Hautkrebsscreenings deutlich verbessert werden. Mehrere Studien belegen, dass mithilfe der Dermatoskopie im direkten Vergleich zur alleinigen klinischen Untersuchung die Treffsicherheit um 35% gesteigert werden konnte³. Die Kombination von Dermatoskopie mit anderen modernen Geräten wie konfokaler Laserscannmikroskopie (KLSM) und optischer Kohärenztomographie (OCT) erlaubt eine weitere Steigerung von 68%^{30, 62}. Die Cochrane Reviews aus den letzten Jahren ergaben ein hohes Potential bei beiden Verfahren, mit Bedarf nach größeren, prospektiven Studien.^{21, 22, 26} Solche nicht-invasiven bildgebenden Verfahren haben nicht nur in der nicht-invasiven Früherkennung von Hautkrebs einen wichtigen Stellenwert, sondern auch in der Verlaufsbeobachtung entzündlicher Hauterkrankungen und in der Objektivierung von Therapieeffekten^{68, 86}.

2.3. ALLERGISCHE KONTAKTDERMATITIS

Die Kontaktdermatitis auf Umweltallergene ist eine sehr häufige Erkrankung mit einer geschätzten Prävalenz von 20 % in der Allgemeinbevölkerung.² Es handelt sich um ein Reaktionsmuster der Haut auf exogene Agenzien, das entweder durch eine zellvermittelte Typ-IV-Immunantwort (allergisch) oder nicht (irritativ oder toxisch) verursacht wird. Histologisch kommt es zu einer kutanen Entzündung mit Spongiose, Bläschenbildung und Vasodilatation in der akuten Phase, die sich zu einer chronischen spongiotischen Dermatitis mit Hyperkeratose, Parakeratose, unregelmäßiger Akanthose und elongierter Reteleisten entwickeln kann. Es ist allerdings nicht immer möglich, zwischen kontaktallergischer und irritativer oder toxischer Dermatitis zu unterscheiden.⁸⁹ Die Diagnose basiert auf einer genauen Anamnese und klinischen Untersuchung, gefolgt von Epikutantestungen (ECT).¹⁸

Letztere stellen den diagnostischen Goldstandard dar. Die ECT erfolgt unter standardisierten Bedingungen durch die kontrollierte Applikation von Kontaktallergenen um eine spezifische verzögerte Immunreaktion auszulösen, die zu einer umschriebenen Ekzemreaktion führt. Die Indikation zur Testung muss immer anhand der Anamnese festgestellt werden. Standardisierte Konzentrationen von Allergenen werden unter Okklusion auf die Haut des Rückens (selten der Extremitäten) aufgetragen. Die nachgewiesene Spezifität und Sensitivität liegen je nach getesteter Substanz zwischen 70 % und 80 %.⁵⁷ Die International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) hat ein Scoring-System entwickelt, das die Reaktion beim Patch-Test anhand der vorgegebenen morphologischen Kriterien in sechs Gruppen einteilt. Diese reichen von keiner Reaktion (0) bis zu einer extrem positiven bullösen Reaktion (3+), und umfassen zusätzlich fraglich positive (?+) und irritative Reaktionen (IR).^{52, 53}

3. WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN

Vor dem oben beschriebenen Hintergrund wurden im Rahmen dieses Habilitationsverfahrens folgende Teilprojekte bearbeitet: die weiteren Einzelheiten und detaillierte methodische Angaben inkl. der statistischen Analysen sind in den Volltexten der unten aufgelisteten Publikationen ausgeführt.

1. Erste Einsatzgebiete des höchstinnovativen Verfahrens LC-OCT: Anwendung zur nicht-invasiven Charakterisierung der gesunden Haut und der häufigsten Hauttumoren im Vergleich zur Goldstandard Histologie und zu bereits etablierten diagnostischen Verfahren
2. Neue Indikationen und Funktionen der OCT: nicht-invasive Charakterisierung der allergischen Kontaktdermatitis und Entwicklung eines OCT-basiertes Algorithmus zur Einstufung der ECT Ergebnissen
3. Neue Indikationen der Kombination aus OCT und KLSM: nicht-invasive Charakterisierung der Hautmorphologie in unterschiedlichen ethnischen Gruppen unter Behandlung mit einer hydratisierenden Lotion
4. Innovative Kombination der OCT und KLSM für das therapeutisches Monitoring der Feldkanzerisierung
5. Einsatz der KLSM im Alltag für schwer diagnostizierbare, klinisch und dermatoskopisch unklare Hauttumorfälle
6. Neue Anwendungen der ex-vivo KLSM im Vergleich mit der mikrographisch kontrollierten und konventionellen Histologie

3.1 ERSTE EINSATZGEBIETE DES HÖCHSTINNOVATIVEN VERFAHRENS LC-OCT: ANWENDUNG ZUR NICHT-INVASIVEN CHARAKTERISIERUNG DER GESUNDEN HAUT UND DER HÄUFIGSTEN HAUTTUMOREN IM VERGLEICH ZUR GOLDSTANDARD HISTOLOGIE UND ZU BEREITS ETABLIERTEN DIAGNOSTISCHEN VERFAHREN

3.1.1. PUBLIKATION: LINE-FIELD-CONFOCAL OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY – PRACTICAL APPLICATIONS IN DERMATOLOGY AND COMPARISON WITH ESTABLISHED IMAGING METHODS. RUINI C. ET AL., SKIN RESEARCH TECHNOLOGY 2021 (EPUB 2020).

In dieser Publikation wurden das erste Mal preliminäre histomorphologische Korrelate der innovativen LC-OCT Hautbildgebung beschrieben, in Bezug auf den Vergleich mit den bereits etablierten Methoden KLSM und OCT. Standardmerkmale für RCM und OCT sowie vergleichbare Merkmale für LC-OCT wurden analysiert.

In der Oberfläche beschrieb man zuerst die Kerneozyten: helle, nebeneinanderliegende, große, polygonale Strukturen. Das SC zeigte sich hyporeflektiv, je nach Lokalisation unterschiedlich dick und unterbrochen von Schweißdrüsenausführungsgängen und Haaren. Die Einzelkeratinozyten waren im Stratum granulosum/spinosum gut erkennbar. Im horizontalen Schnitt konnte man ein Honigwabemuster ähnlich der KLSM erkennen; dieser war in AK und MM atypisch, sprich aus in Größe, Form und Kontur unterschiedlichen Keratinozyten bestehend. Die DEJ war als scharf begrenzte Linie zwischen Epidermis und Dermis vertikal sichtbar, und horizontal als angeschnittene, hyporeflektive dermale Papillen, die von hyperreflektiven pigmentierten basalen Keratinozyten umgeben waren. Diese war bei AK sichtbar, aber nicht bei BZK und MM. In der Dermis waren hyperreflektive Kollagenfasern und dunklere, runde oder längliche Gefäße mit Blutzellen sichtbar. Mit zunehmender Tiefe (mittlere Dermis) verlor das Gerät an Auflösung. Einzelzellen waren in horizontalem und vertikalem Modus darstellbar. Bei MM konnten in beiden Modi die maligne Melanozyten als größere, hyperreflektive, runde oder dendritischen Zellen mit hyporeflektiven Kern visualisiert werden. Bei nodulärem BZK bildeten die malignen Zellen dermale, scharfbegrenzte Knoten mit peripherer Palisadenstellung, analog zur KLSM und OCT.

Die LC-OCT Bilder konnten mit histologischen und Imaging Grundkenntnissen leicht interpretiert werden, vor allem im vertikalen Modus gelang ein direkter Vergleich mit dem

histologischen Schnitt und der OCT Aufnahmen; die horizontalen Bilder überschneiden sich mit den KLSM Aufnahmen. Die Auflösung der KLSM zeigte sich allerdings höher als bei LC-OCT im horizontalen Modus, eine Eigenschaft, die eine wesentliche Rolle bei der Beurteilung der pagetoiden Ausbreitung der malignen Melanozyten in die Epidermis spielen könnte. Die LC-OCT Eindringtiefe ist der OCT unterlegen, was die Diagnose der tief invasiven Tumoren erschweren könnte; allerdings nimmt die effektive Auflösung der OCT auch in den unteren Teilen der aufgenommenen Bilder wesentlich ab.

Die präliminären Ergebnisse zeigten, dass die LC-OCT die Vorteile von OCT und KLSM kombinieren kann, und mit optimaler Auflösung und Eindringtiefe zur Darstellung gesunder Haut, epithelialer und melanozytärer Tumoren eingesetzt werden kann.

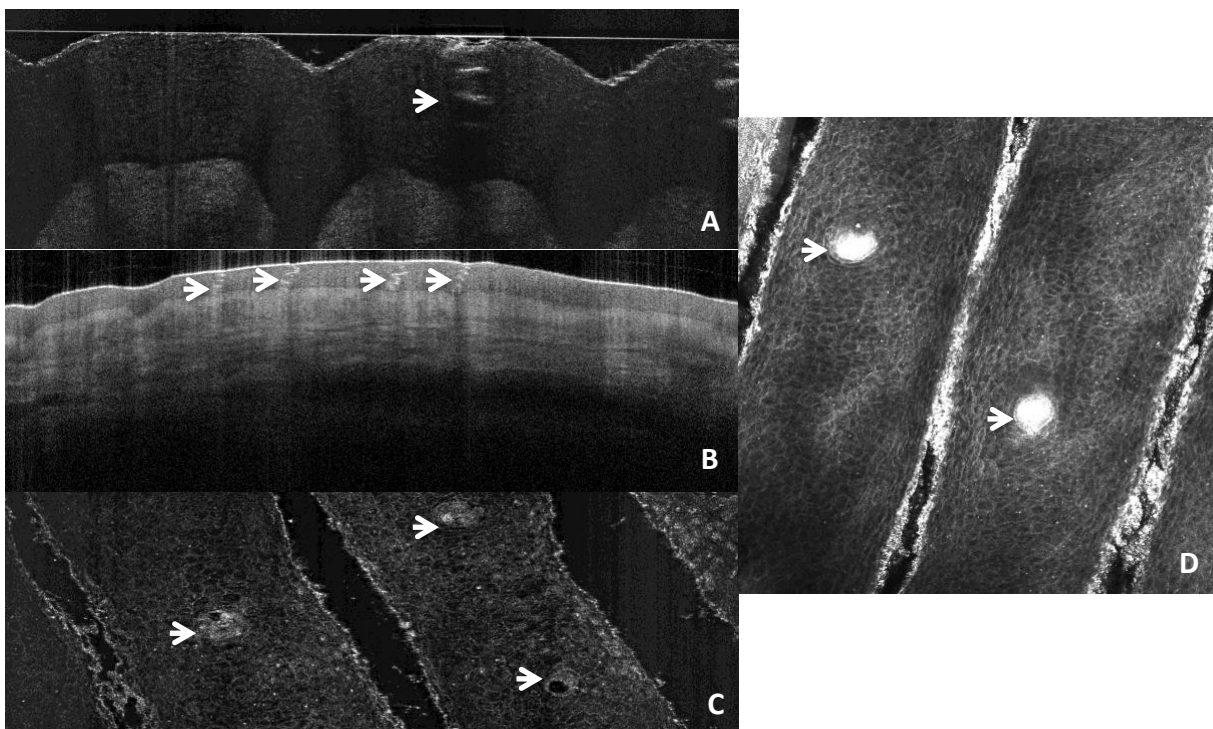


Abbildung 6: Nicht-invasive Darstellung der gesunden Haut der Fingerkuppe. A. Vertikale LC-OCT Aufnahme B. konventionelle OCT Aufnahme C. Horizontale LC-OCT Aufnahme D. KLSM Aufnahme.

3.1.2. PUBLIKATION: LINE-FIELD OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY: IN VIVO DIAGNOSIS OF BASAL CELL CARCINOMA AND SUBTYPE COMPARED TO HISTOPATHOLOGY AND TO OTHER ESTABLISHED IMAGING TECHNIQUES. RUINI C. ET AL., CLIN EXP DERMATOL. 2021.

Das BZK ist der häufigste Hautkrebs in der Allgemeinbevölkerung. Die Behandlungen

variieren je nach Subtyp von der MKC bis zur topischen Therapie. Die Dermatoskopie, die KLSM und die OCT haben im klinischen Alltag Einzug gehalten, um die Diagnose und die subtypgerechte Behandlung zu optimieren. Während nämlich noduläre und sklerodermiforme Subtype eine chirurgische Exzision benötigen, können oberflächliche BZK topisch, mit PDT oder Laserverfahren behandelt werden. Das neue Gerät LC-OCT ermöglicht eine Bildgebung mit hoher Auflösung und Eindringtiefe, sein Einsatz wurde allerdings noch nicht in größeren Studien untersucht.

In dieser Studie wurden die wichtigsten LC-OCT-Kriterien für die Diagnose und Subtypisierung von BZK im Vergleich zu Histopathologie, OCT und RCM evaluiert.

Zweiundfünfzig histopathologisch gesicherte BZK wurden anhand der histomorphologischen Merkmalen beschrieben. Die Kriterien wurden basierend auf der histologischen, OCT und KLSM Nomenklatur definiert. Die Häufigkeit dieser Kriterien, prädiktive Werte und ROC-Kurven wurden berechnet. Eine multinomiale Regression mit schrittweiser Variablenauswahl zur Unterscheidung von BZK-Subtypen wurde durchgeführt.

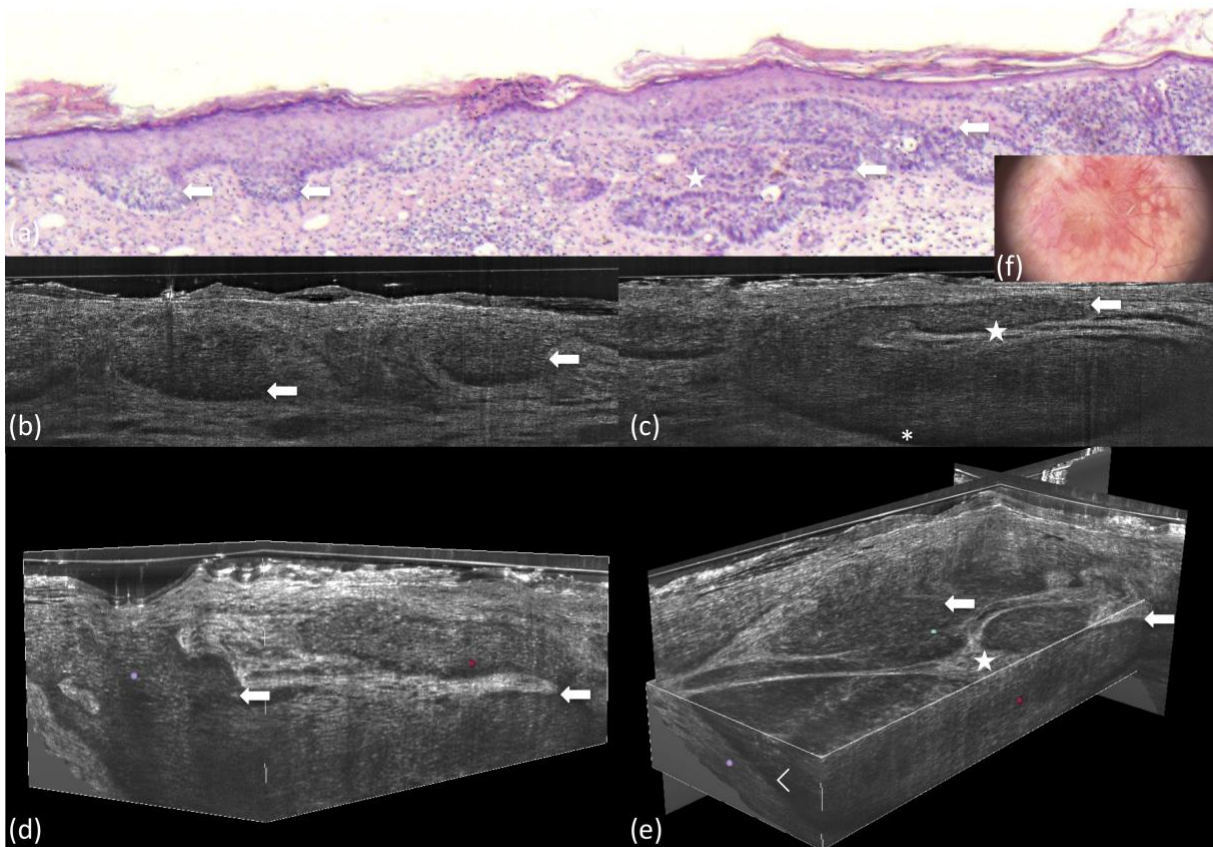


Abbildung 7. LC-OCT im vertikalen (B,C) und im 3D (D,E) Modus und dermatoskopisches (F) Erscheinungsbild eines nodulär-superfiziellen BZKs des Gesichts bei einem 60-jährigen männlichen Patienten. Man beachte die hyporeflektierenden, ovoiden Strukturen, die in einem Perlenkettenmuster angeordnet sind (◄), zusammen mit beginnenden nodulären Komponenten (<), die ihre Verbindung zur Epidermis verloren haben, getrennt durch eine diskrete Stromareaktion (★)

Noduläre BCCs waren hauptsächlich durch atypische Keratinozyten, veränderte DEJ, Tumornester in der Dermis, hyporeflektive Spaltbildung (clefing), prominente Vaskularisation und weißes hyperreflektierendes Stroma gekennzeichnet. Oberflächliche BZK zeigten eine Verdickung der Epidermis durch Tumorknoten mit deutlicher Verbindung zur DEJ (Perlenkettenmuster). Sklerodermiforme BZK waren durch längliche hyporeflektierende Tumorstränge gekennzeichnet, die von hellem Kollagen umgeben waren (Fischschwammmuster). Die Gesamtübereinstimmung des BZK-Subtyps zwischen LC-OCT und konventioneller Histologie betrug 90,4 % (95% Konfidenzintervall – CI - : 79,0, 96,8). Die Sensitivität und Spezifität der LC-OCT im Vergleich zur Histologie waren jeweils: 96%,96%

für noduläre Subtypen, 82%, 100% für oberflächliche Formen, 100%, 98% für sklerodermiforme Varianten und 91%, 95% für gemischte, teils nodulär teils oberflächliche Entitäten. Die multinomiale logistische Regression mit schrittweiser Auswahl der Variablen identifizierte folgende Merkmale als am nützlichsten für die Unterscheidung von BZK-Subtypen: ausgedünnte Epidermis, atypisches Honigwabemuster, prominente Gefäße/Neoangiogenese, Fischeschwammuster, Perlenkettenmuster und weißes hyperreflektierendes Stroma.

LC-OCT ermöglichte die nicht-invasive Echtzeit-Identifikation von BCCs und deren Subtypen im vertikalen, horizontalen und 3D-Modus im Vergleich zu Histologie, RCM und OCT.

3.1.3. PUBLIKATION: IN-VIVO LC-OCT EVALUATION OF THE DOWNWARD PROLIFERATION PATTERN OF KERATINOCYTES IN ACTINIC KERATOSIS IN COMPARISON WITH HISTOLOGY: FIRST IMPRESSIONS FROM A PILOT STUDY. RUINI C. ET AL., CANCERS 2021

Es ist bekannt, dass AK zu invasiven PEK fortschreiten können. Das histologische PRO-Grading von AK basiert auf dem Wachstumsmuster der basalen Keratinozyten und steht im Zusammenhang mit ihrem Progressionsrisiko. Die PRO-Klassifikation (aus „protruding“, ragen, protrudieren) unterteilt die Wachstumstendenzen der basalen Keratinozyten in drei Stufen (PRO I–III). Bei PRO I drängen sich vermehrt atypische Keratinozyten über der basalen Schicht; in der Stufe PRO II sind basal kleine, semizirkuläre Ausbuchtungen darstellbar, die bis in die obere papilläre Dermis gelangen und kleine Ansammlungen atypischer Keratinozyten bilden. Die PRO III Stufe ist von größeren Nestern atypischer Keratinozyten charakterisiert, die fingerförmig in das Stratum papillare hinein reichen.^{78, 79}

AK können in unserer Erfahrung nicht-invasiv mit LC-OCT charakterisiert werden. Ziele dieser Studie waren: LC-OCT Kriterien für das Grading von AK zu definieren, die auf der histologischen PRO Klassifikation basieren; das daraus entstandene LC-OCT Grading mit dem histologischen Korrelat zu vergleichen; die Interobserver-Übereinstimmung für die LC-OCT PRO-Klassifikation zu berechnen.

Fünfzig AKs wurden mittels LC-OCT abgebildet und zur Histopathologie biopsiert. Die histologische PRO-Einstufung wurde durch einen Expertenkonsens bewertet, während zwei Auswertergruppen separat die LC-OCT-Einstufung an Vertikalschnitten vornahmen. Gewichteter Cohen-Kappa-Koeffizient mit linearen Gewichten wurde verwendet, um die Korrelation zwischen LC-OCT und histopathologischem PRO-Score einschließlich CI zu berechnen; die Korrelation wurde auch in den verschiedenen Untergruppen (PRO I und II/III) geschätzt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Die Übereinstimmung zwischen LC-OCT und histologischem PRO-Grading betrug 75% für alle Läsionen (gewichteter Kappa 0,66, 95% CI 0,48-0,83, $p < 0,001$) und 85,4% beim Vergleich der Untergruppen PRO I vs. PRO II/III (gewichteter Kappa 0,64, 95% CI 0,40-0,88, $p < 0,001$). Die Interobserver-Übereinstimmung für LC-OCT betrug 90% (Cohen's Kappa 0,84, 95% CI 0,71-0,91, $p < 0,001$).

In dieser Pilotstudie konnte gezeigt werden, dass LC-OCT potenziell in der Lage ist, AK auf der Grundlage des basalen Wachstumsmusters der Keratinozyten zu klassifizieren und dabei die histologische PRO-Klassifikation in-vivo zu reproduzieren, mit hoher Interobserver-Übereinstimmung und guter Korrelation mit der Histopathologie. Anhand dieses Klassifikationssystem könnte insofern das maligne Potential der AK nicht-invasiv geschätzt werden.

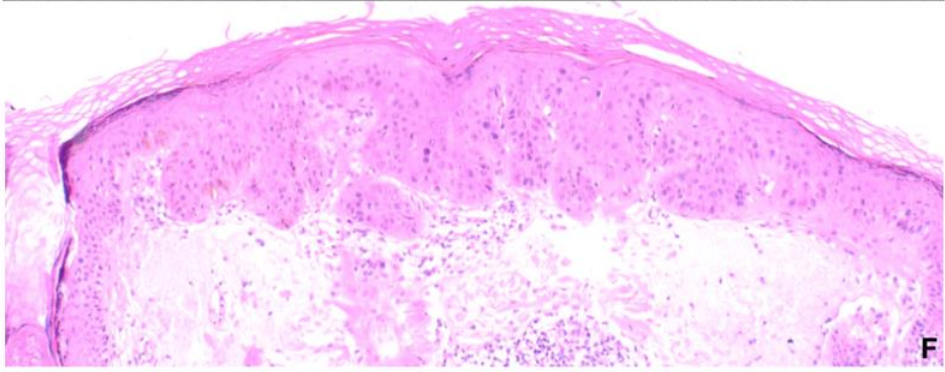
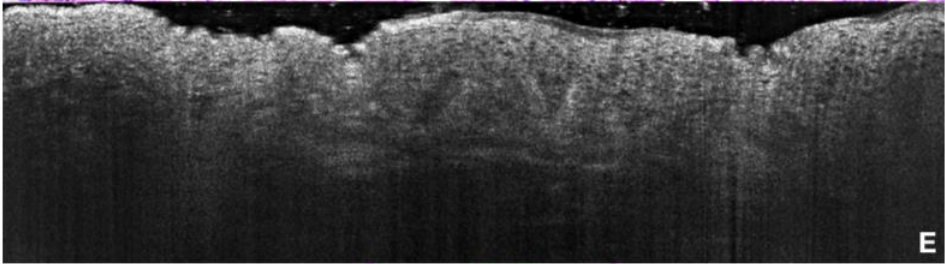
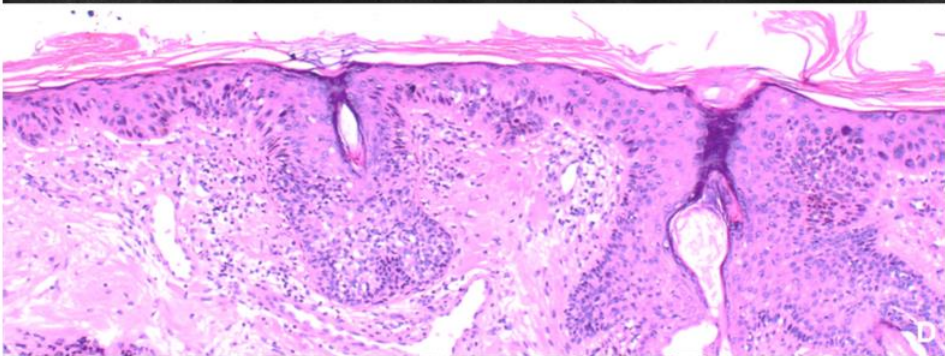
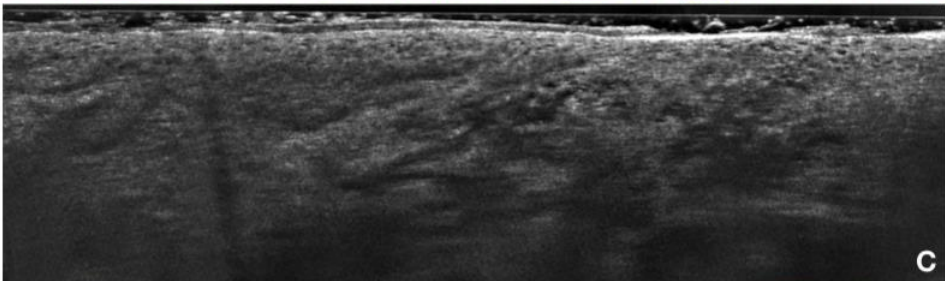
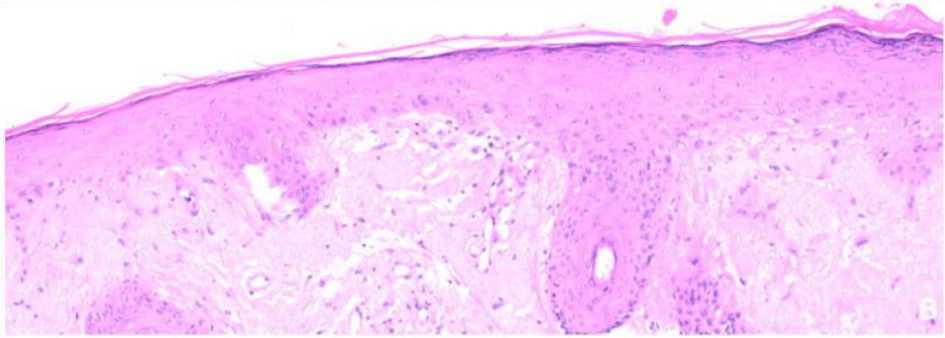
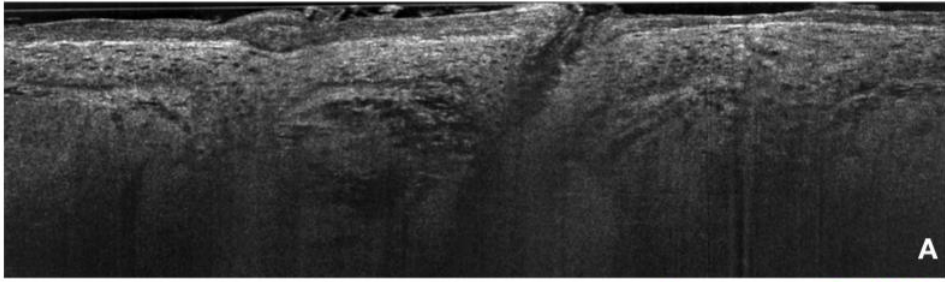


Abbildung 8. Beispiel für drei AK-Läsionen in LC-OCT (A, C, E) und Histologie (B, D, F) in H&E-Schnitten, Originalvergrößerung 40x. A-B. AK PRO I zeigt basale Verdichtung von Keratinozyten in einer ansonsten regelmäßig geschichteten Epidermis, ohne Ausstülpungen in die Dermis. C-D. AK PRO II zeigt Spikes von atypischen Keratinozyten, die leicht in die papilläre Dermis hineinragen. E-F. AK PRO III zeigt das ausgedehnte, nach unten gerichtete Wachstum atypischer Keratinozyten mit „Stacheln“, die dicker sind als die darüber liegende Epidermis

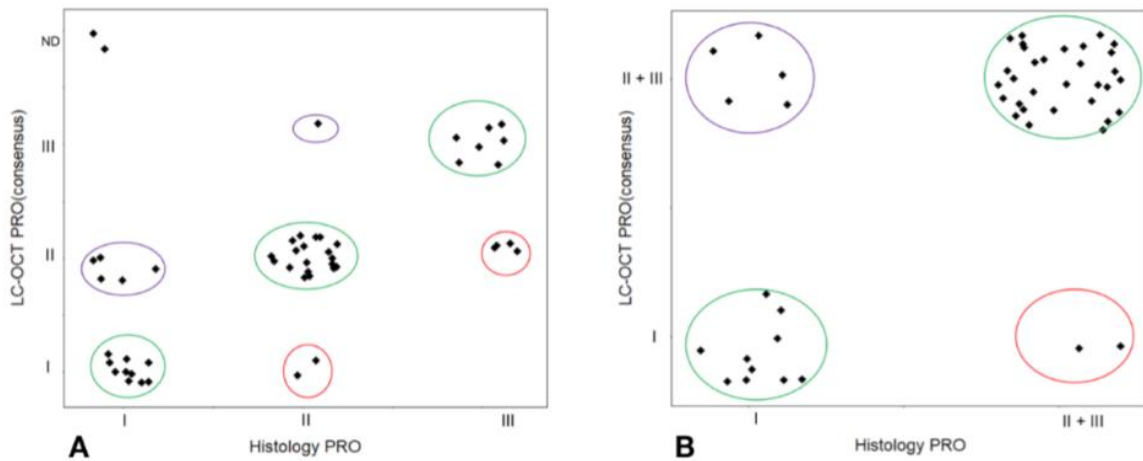


Abbildung 9. Gesamt- (A) und Subgruppen- (B) Korrelation zwischen LC-OCT und histopathologischem PRO-Grading von AKs. ND: nicht definierbar

3.2 NEUE INDIKATIONEN UND FUNKTIONEN DER OCT: NICHT-INVASIVE

CHARAKTERISIERUNG DER ALLERGISCHEN KONTAKTDERMATITIS UND ENTWICKLUNG EINES OCT-BASIERTES ALGORITHMUS ZUR EINSTUFUNG DER ECT ERGEBNISSEN

Kontaktallergien stellen ein großes Gesundheitsproblem in der Allgemeinbevölkerung dar, gelten häufig als Berufskrankheit und bringen erheblichen Kosten mit sich. Die Diagnose wird in der Regel durch die Anamnese, Klinik und geeignete ECT gestellt. Die Ergebnisse der ECT werden gemäß den deutschen und internationalen Leitlinien in einer Scala von 0 bis 3+ ausgewertet, sind allerdings nicht vollständig objektivierbar und werden durch die Erfahrung des Beobachters beeinflusst. Eine histologische Sicherung wird nur in sehr seltenen Fällen und bei spezifischen Indikationen durchgeführt. Außerdem entwickelt nicht jede Person, die eine Sensibilisierung in den ECT aufweist, eine klinisch relevante Kontaktallergie. Von äußerster Bedeutung ist auch eine mögliche Differenzierung einer echten allergischen Reaktion aus einer reinen irritativen Reaktion. Es wurden insofern folgende Hypothesen aufgestellt: dass die OCT

in-vivo nützliche Details bei der Charakterisierung der kontaktallergischen Dermatitis liefern kann; dass die OCT die Interpretation von ECT vereinfachen bzw. objektivieren kann; dass die OCT eine objektive Graduierung der ECT erlauben kann; dass die OCT schließlich subklinische Veränderungen der subjektiven Reaktionen auf bekannte Kontaktallergene erkennen könnte, die sich im Alltag nicht eindeutig zeigen, insbesondere bei Nickel-sensibilisierten Patientinnen, die Schreibutensilien mit Nickelinhalt benutzen.

3.2.1. PUBLIKATION: NICKEL CONTACT DERMATITIS EVALUATED BY MEANS OF OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY: FIRST IMPRESSIONS. RUINI C. ET AL., J EUR ACAD DERMATOL VENEREOL. 2019

In dieser Pilotstudie wurden 18 Frauen mit nachgewiesener Nickelallergie rekrutiert (Durchschnittsalter 51,5 Jahre), die in der Studie "Kompatibilität von Schreibgeräten mit nickelhaltigen Komponenten bei Personen mit Nickelallergie" eingeworben waren. Ziel o.g. Studie war es, festzustellen, ob die Anwendung von nickelhaltigen Schreibgeräten eine Kontaktallergie bei Patientinnen mit bekannter Nickel-Sensibilisierung reaktivieren kann.

In unserer OCT Teilstudie analysierten wir die Standard-ECT der rekrutierten Frauen sowohl klinisch nach der ICDRG Leitlinien als auch mit der OCT. Die untersuchten OCT-Merkmale waren: OCT Eingangssignal, Epidermisdicke (gemessen als Abstand zwischen dem Eingangssignal, das dem SC entspricht, und der dunklen Linie, die der dermo-epidermalen Grenze entspricht, als Medianwert von 10 aufeinanderfolgenden Messungen verschiedener Sektoren desselben Bildes), Spongiose (erweiterte interkeratinozytäre Räume), Bläschenbildung, Vasodilatation und Ödem in der Dermis.

In einem zweiten Schritt analysierten wir sowohl klinisch als auch mit OCT die Fingerkuppen der Schreibhand der 13 Studienteilnehmer, die über subjektive und objektive Symptome wie Juckreiz, Erythem oder Trockenheit unmittelbar 2 h nach Handschrift mit sowohl nickelhaltigen als auch nicht-nickelhaltigen Stiften berichteten. Bei fehlendem klinischem

Korrelat wurde der betroffene Bereich anhand der Angaben der Patientinnen ausgewählt. Eine Negativkontrolle auf der umgebenden Haut wurde ebenso untersucht.

Das Ziel unserer Pilotstudie war es festzustellen, ob durch OCT die histomorphologischen Veränderungen einer Kontaktallergie sichtbar gemacht werden können, was eine objektive Auswertung von ECT ermöglicht. Außerdem versuchten wir zu beurteilen, ob OCT subklinische Veränderungen bei nickelsensibilisierten Patienten, die über subjektive Symptome nach längerem Kontakt mit Schreibgeräten berichten, erkennen kann.

Bei positivem ECT konnte das OCT nach 72 Stunden eine Kombination von Merkmalen nachweisen, die auf eine Kontaktdermatitis an der betroffenen Hautstelle des Rückens hindeuten: ein erhöhtes Eingangssignal und eine erhöhte Epidermisdicke im Vergleich zu gesunden Bereichen (5/5), eine akute Spongiose, die als größere interzelluläre Räume zwischen Keratinozyten und Mikrovesikulationen sichtbar wurde (5/5), eine Vasodilatation, die als erhöhte Anzahl und Größe dunkler hyporeflektiver Gefäße sichtbar wurde (5/5) und ein Ödem der papillären Dermis, das als geringere dermale Reflektivität sichtbar wurde (4/5). Diese Veränderungen waren in zunehmendem Maße sowohl bei schwachen (1+), stark positiven (2+) als auch bei sehr positiven (3+) allergischen Reaktionen sichtbar; im Falle einer 3+ Reaktion wurde die Bildung von Makrovesikeln beobachtet, die als zusammenwachsende dunkle runde Räume in der Epidermis zwischen Keratinozyten mit zellulärem Infiltrat dargestellt waren. Milde Spongiose und Vasodilatation (aber keine Vesikulation) konnte nur bei 4/13 der Patienten mit subjektiven Symptomen nach dem Handschreiben festgestellt werden. Diese Merkmale waren nur in den dünneren Interdigitalräumen nachweisbar und nicht in der dickeren Palmarhaut. Solche unspezifischen Veränderungen sind auch bei mechanischer Reizung und atopischer Haut vorhanden. Ekzemähnliche Reaktionen wie Hyperkeratose und Parakeratose wurden nicht festgestellt. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Symptomen, den festgestellten Veränderungen und der Verwendung von nickelhaltigen Stiften.

Zusammenfassend konnten wir festlegen, dass mikroskopische Hautmerkmale bei akutem allergischem Kontaktekzem mittels OCT in-vivo dargestellt werden können, und dass das Gerät potenziell bei zweifelhafter klinischer Interpretation oder schwieriger Einstufung von ECT Ergebnissen helfen könnte. Zusätzlich konnte das OCT bei nickelsensibilisierten Patienten nach Exposition mit nickelhaltigen Schreibgeräten keine subklinischen Veränderungen im Zusammenhang mit subjektiven Symptomen nachweisen. Das OCT war insofern hilfreich, um eine subklinische akute Kontaktdermatitis auszuschließen.

3.2.2. PUBLIKATION: OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY FOR PATCH TEST GRADING: A PROSPECTIVE STUDY ON ITS USE FOR NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF ALLERGIC CONTACT DERMATITIS. CONTACT DERMATITIS 2020

Im Anschluss an die in Punkt 3.2.1. berichtete Pilotstudie haben wir eine größere systematische Studie durchgeführt, um die Anwendung der OCT bei Kontaktallergien und Auswertung der ECT besser charakterisieren zu können. Insbesondere fokussierten wir uns auf die OCT Analyse der in-vivo morphologischen Veränderungen bei ECT Reaktionen im Vergleich zu gesunder Haut, auf die Erkennung subklinischer Veränderungen bei fraglichen Reaktionen und auf die Entwicklung eines OCT-basierten Algorithmus zur Unterstützung der ECT Graduierung, sowie auf die mögliche Unterscheidung zwischen irritativen und allergischen Reaktionen. Wir nahmen 129 ECT Bereiche mit Standard und dynamischer OCT auf (mind. 2 Scans per Areal, 6 mm × 6 mm groß, bis zu einer Tiefe von 1-1,5 mm); folgende Merkmale wurden bewertet: Architektur der Haut basiert auf den histologischen Korrelaten, vaskuläre Morphologie, Epidermisdicke, AC und Blutfluss in der Tiefe von 0,1, 0,2 und 0,35 mm. In der statistischen Analyse wurden die kontinuierlichen Variablen durch Mittelwert, Standardabweichung und 95 % CI für die Gesamtstichprobe und für die Reaktionsgrade beschrieben. Der Blutfluss, die AC und die Epidermisdicke wurden mit Hilfe von Einweg-Varianzanalysen (ANOVA) zwischen den verschiedenen Reaktionsgraden und der gesunden Haut verglichen. Zum Vergleich der kategorialen Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test auf

Unabhängigkeit verwendet. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Die häufigsten OCT-Merkmale akuter kontaktallergischer Reaktionen im Patch-Test waren Spongiose mit Mikrovesikeln (94,8 %), Makrovesikeln (60,3 %) und zusammenwachsenden Vesikeln (46,6 %), wobei letztere zur Unterscheidung zwischen akuter allergischer und irritativer Dermatitis nützlich waren ($p < 0.05$). Objektive quantitative Parameter korrelierten gut mit dem Schweregrad der ECT Reaktion: Epidermisdicke aufgrund der Spongiose, AC ($p < 0.05$) und Blutfluss bei 0,2 und 0,35 mm ($p < 0.01$).

Es wurde eine OCT-Einstufung der Patch-Test-Reaktionen durchgeführt, basierend auf den Kriterien für die klinische Evaluation. OCT-Spongiose und Mikrovesikel wurden mit +, Makrovesikel mit ++ und zusammenwachsende Vesikel mit +++ eingestuft. Die retrospektive Neubewertung mit OCT ergab im Vergleich zum klinischen Grading eine höhere Einstufung in 54,6 % der + Fälle und 66,7 % der ++ Fälle. Eine niedrigere Einstufung wurde bei 6,1 % der +, bei 8,4 % der ++ und bei 50 % der +++ positiven ECT Ergebnissen gesehen. Alle klinisch unklaren Läsionen konnten durch OCT eingestuft werden (keine Reaktion in 13,3%, + in 20%, ++ in 20% und +++ in 46,7%).

Zusammenfassend wurde bestätigt, dass die OCT als nicht-invasives Diagnoseinstrument nicht nur für die Hautkrebsdiagnose, sondern auch für die Beurteilung von kontaktallergischen ECT Reaktionen nützlich sein kann. Nicht nur morphologische, sondern auch objektive Merkmale wie Blutfluss und AC korrelieren mit dem Schweregrad der Reaktion.

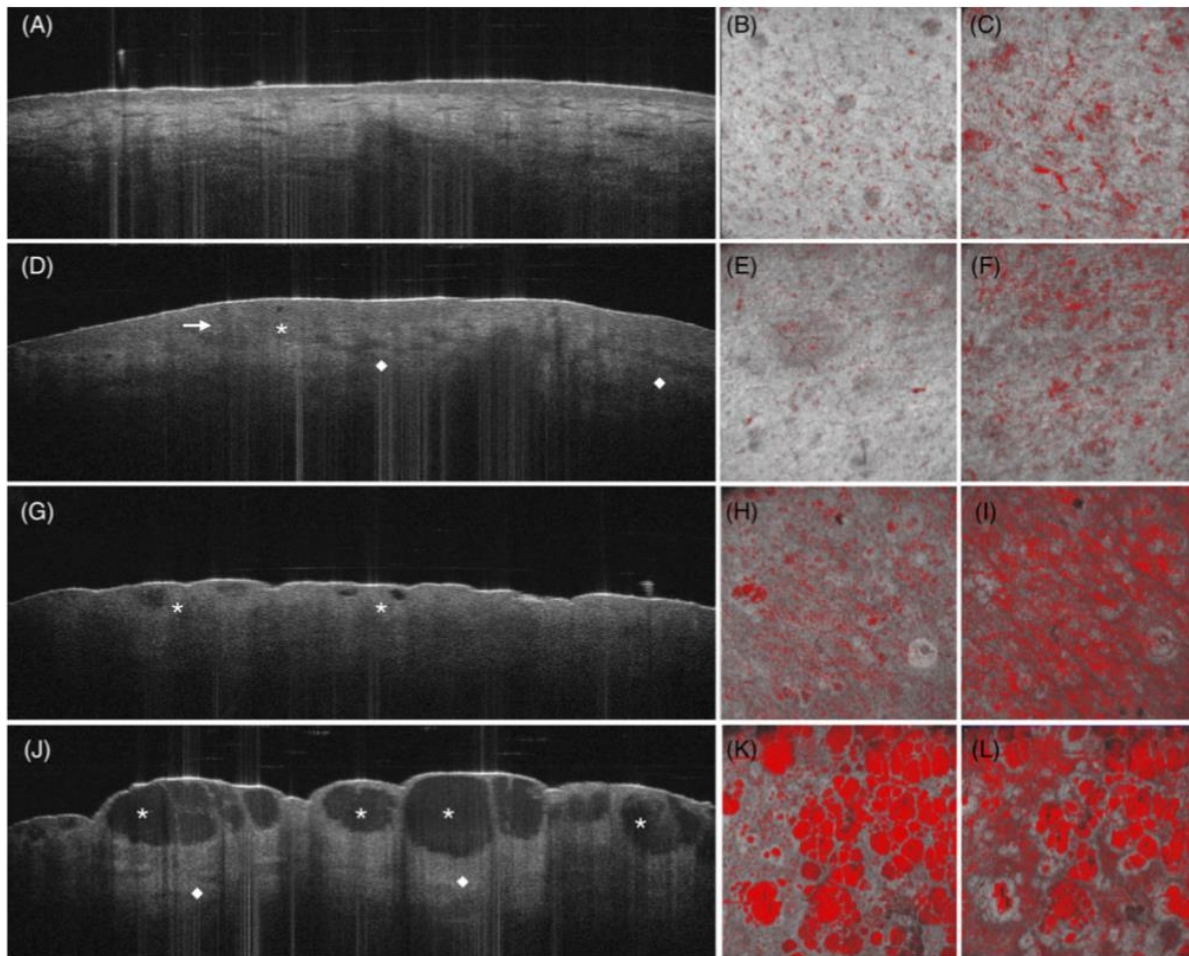


Abbildung 10. Optische Kohärenztomographie (OCT) Bilder en face (links) und im dynamischen Modus en coupe bei 0,2 mm (Mitte) und bei 0,35 mm (rechts) Tiefe von: einer gesunden Kontrollstelle (A-C) und drei Patienten mit allergischem Kontaktekzem mit positivem ECT Grad + (D-F), ++ (G-I), und +++ (J-L). Beachten Sie den Unterschied zwischen den gesunden Hautschichten des ersten Patienten (A) mit regelmäßiger Epidermis und normalem Vaskularisationsmuster (B,C) und der leichten positiven Reaktion, bei der akute Spongiose (Pfeil), Bläschenbildung (Stern) und Gefäßerweiterung (Raute) im OCT zu erkennen sind (D-F). Diese Merkmale, diskret als Mikrovesikel und Spongiose in Grad + ECT-Reaktionen (D), sind deutlicher in stark positiven klinischen Reaktionen (G,I) und deutlich sichtbar als zusammenwachsende Bläschen (J) und ausgeprägte Vasodilatation (K,L) im letzten Patienten.

3.3. NEUE INDIKATIONEN DER KOMBINATION AUS OCT UND KLSM: NICHT-INVASIVE CHARAKTERISIERUNG DER HAUTMORPHOLOGIE IN UNTERSCHIEDLICHEN ETHNISCHEN GRUPPEN UNTER BEHANDLUNG MIT EINER HYDRATISIERENDEN LOTION

3.3.1. PUBLIKATION: EFFECTS OF SHORT-TERM MOISTURIZER APPLICATION IN DIFFERENT ETHNIC SKIN TYPES:NONINVASIVE ASSESSMENT WITH OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY AND REFLECTANCE CONFOCAL MICROSCOPY. BAĞCI IS, RUINI C, ET AL. SKIN PHARMACOL PHYSIOL. 2018

Es ist bekannt, dass sich ethnische Hauttypen in ihren morphologischen und physiologischen

Merkmale unterscheiden. Daher kann die Hautantwort auf eine Anwendung von topischen Produkten bei verschiedenen ethnischen Typen unterschiedlich ausfallen. Es existieren nur wenige Studien zur Beurteilung der Hautmorphologie bei verschiedenen Ethnien mit nicht-invasiven bildgebenden Verfahren der Haut,^{27, 66} ein interethnischer Vergleich der nicht-invasiven Behandlungsverfolgung wurde jedoch noch nicht durchgeführt. Unser Ziel war es, die Hautmorphologie verschiedener Ethnien zu beurteilen und die Wirkung einer kurzzeitigen Feuchtigkeitsapplikation mittels OCT und KLSM zu vergleichen.

Dreißig gesunde weibliche Probanden mitteleuropäischer (Hauttyp I-II nach der Fitzpatrick Klassifikation), asiatischer (Hauttyp II-III) und afrikanischer Ethnie (Hauttyp V-VI) im Alter von 30-45 Jahren wurden in die Studie aufgenommen. Die Probandinnen wurden angewiesen, die mitgegebene, feuchtigkeitsspendende Lotion einmal täglich auf den linken volaren Unterarm aufzutragen und jede andere topische Behandlung auf beiden Armen zu vermeiden. Die OCT- und KLSM Bildgebung wurde an der Wange (zum Studienbeginn) und an beiden Unterarmen (zum Studienbeginn und nach 2-wöchige Anwendung der Lotion) durchgeführt, um die Morphologie zu vergleichen.

Für den Vergleich der Epidermisdicke in verschiedenen Gruppen wurde der nichtparametrische, ungepaarte, zweiseitige Mann-Whitney-Test durchgeführt. Für den Vergleich der Epidermisdicke und der Faltenbreite zwischen den linken und rechten Unterarmen der Probandinnen wurde der Wilcoxon-Test (gepaart, zweiseitiger Test) durchgeführt. Der Kruskal-Wallis-Test wurde für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen verwendet.

Die Epidermisdicke und die Morphologie der Hautporen variierte zwischen den drei ethnischen Gruppen, wobei die Probanden mit dunklerem Hauttyp die dickste Epidermis und die größten Hautporen aufwiesen. Am behandelten Unterarm zeigten OCT-Messungen eine signifikant dickere Epidermis in allen Gruppen im Vergleich zum unbehandelten Unterarm. Die Breite der

Hautfalten am behandelten Unterarm wurde mittels KLSM gemessen und war in allen ethnischen Gruppen signifikant geringer als am unbehandelten Unterarm.

Als Schlussfolgerung konnten wir feststellen, dass unterschiedliche ethnische Hauttypen Variationen in der Hautmorphologie und im Ansprechen auf eine kurzfristige Feuchtigkeitsapplikation zeigten. OCT und KLSM waren nützliche Methoden zur nicht-invasiven, wiederholten Echtzeit Evaluation ethnischer Haut.

3.4. INNOVATIVE KOMBINATION DER OCT UND KLSM FÜR DAS THERAPEUTISCHES MONITORING DER FELDKANZERISIERUNG

3.4.1. PUBLIKATION: NON-INVASIVE MONITORING OF SUBCLINICAL AND CLINICAL ACTINIC KERATOSIS OF FACE AND SCALP UNDER TOPICAL TREATMENT WITH INGENOL MEBUTATE GEL 150 MCG/G BY MEANS OF REFLECTANCE CONFOCAL MICROSCOPY AND OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY: NEW PERSPECTIVES AND COMPARISON OF DIAGNOSTIC TECHNIQUES. RUINI C. ET AL., J BIOPHOTONICS. 2019

Das Konzept der Feldkanzerisierung ist zwar nicht neu, allerdings durch die neuen lokal therapeutischen Möglichkeiten in den letzten Jahren vermehrt in den Focus gerückt. Schon 1953 hatten Slaughter et al. anhand der histologischen Beurteilung oraler PEK und ihrer Umgebung feststellen können, dass solche Karzinome häufig in der klinisch erscheinungsfreien unmittelbaren Tumorumgebung nachfolgend auftreten können. Jahrzehnte später wurde klar, dass der Feldkanzerisierung genetische Ursachen zugrunde liegen. Wenn man sich auf PEK und ihre Frühstadien, die AK einschränkt, sind p53 Mutationen die am besten charakterisiertesten. In diesem Fall definiert man die Feldkanzerisierung als ein Hautareal, in dem sich klinisch sichtbare AK aber auch noch mit bloßem Auge unsichtbare AK befinden, die in der unmittelbaren Zukunft auch zu weiteren klinisch eindeutigen AK oder direkt PEK führen können. Das Konzept hat für die Therapie eine besondere Bedeutung, in dem auch die Umgebung von AK als behandlungsbedürftiges Krebsfeld gesehen wird. Es wird dann ein Feldkonzept des Therapieverfahrens bevorzugt, damit alle subklinischen Läsionen

mitbehandelt werden können, um den Krebsprogress zu verhindern. Zur Identifizierung der „noch unsichtbaren“ aber potenziell gefährlichen Läsionen (subklinischen AK, sAK) kommen dann die nicht-invasiven diagnostischen Verfahren, insbesondere OCT und KLSM zum Einsatz, in dem die zelluläre und strukturelle Atypie dadurch in-vivo begutachtet werden kann, ohne eine Biopsie entnehmen zu müssen. Ziel dieser Studie war es, in-vivo die Veränderungen der Feldkanzerisierung unter der Behandlung mit topischem Ingenol Mebutat (was eine direkte lokale Zelltoxizität zusammen mit der Förderung von Entzündungsreaktionen hervorruft) durch die Kombination von RCM und OCT zu bewerten, im Vergleich zur gesunden Haut. Dabei sollten die mikroskopischen Veränderungen eines gesamten Feldkanzerisierungsareals nicht-invasiv beurteilt werden, um die AK von den subklinischen AK sowie von der gesunden Haut differenzieren zu können. Die Kriterien für die nicht-invasive Diagnose von klinischen und subklinischen AKs mittels jeweils OCT und KLSM sollten untersucht und miteinander verglichen werden. Des Weiteren sollte das therapeutische Ansprechen mittels klinischer, OCT, KLSM und kombinierter Begutachtung evaluiert werden.

Zwanzig Patienten mit Feldkanzerisierung im Gesicht und auf der Kopfhaut wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit Ingenol Mebutat-Gel (150 mcg/g) auf einer Fläche von 25 cm² behandelt, die mindestens zwei AK, zwei sAK und zwei scheinbar gesunde Stellen enthielt. Einhundertzwanzig Läsionen wurden durch klinische Untersuchung und klinische, dermatoskopische, KLSM- und OCT-Bilder an Tag 0, 4, 14 und 56 anhand der Diagnosekriterien für AK bewertet.

Die wichtigsten pathologischen Merkmale verbesserten sich sowohl bei AK als auch bei sAK, insbesondere die mittels OCT gemessene Epidermisdicke und die mittels KLSM bewertete epidermale Atypie. Lokale Hautreaktionen (LSR) traten im Vergleich zur gesunden Haut überwiegend im Bereich der Läsion auf. Eine vollständige Clearance wurde bei 58 % der AK und bei 55 % bzw. 72 % der sAK, gemessen mit KLSM und OCT, festgestellt. Sowohl OCT

als auch KLSM ermöglichen die morphologische Darstellung der Feldkanzerisierung einschließlich subklinischer Läsionen und liefern komplementäre Informationen.

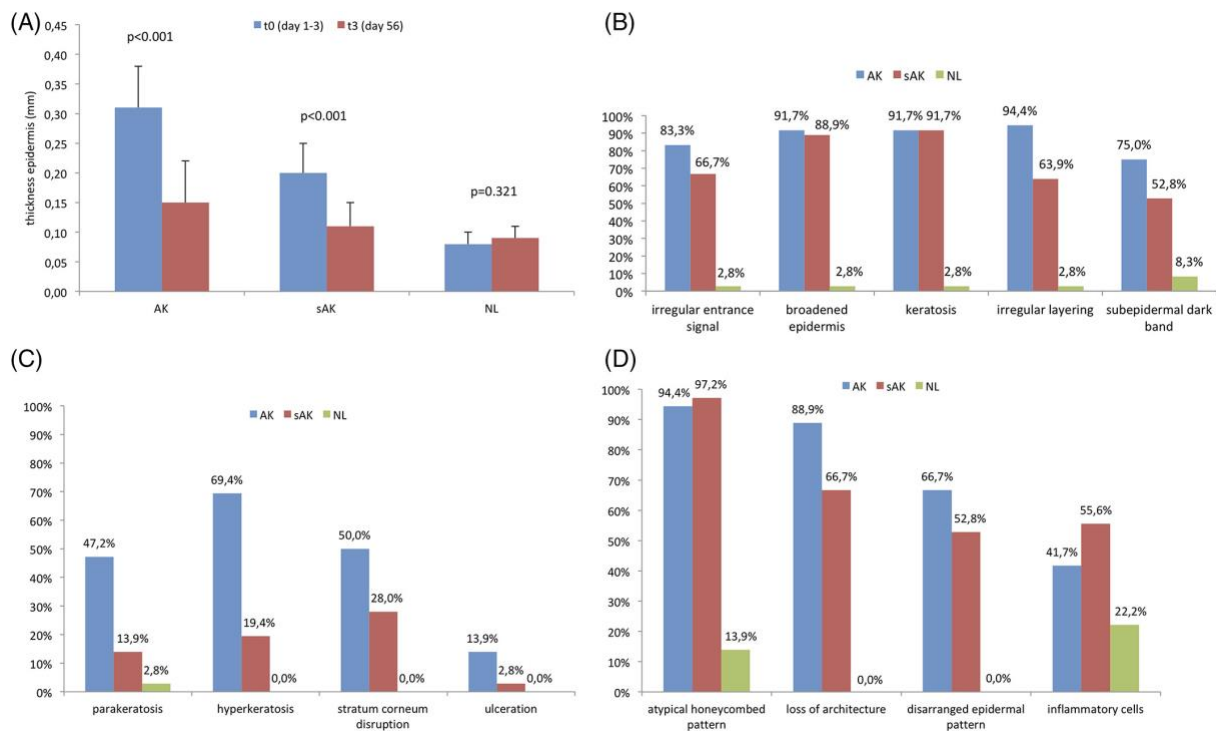


Abbildung 11. Veränderungen der Epidermisdike (A) und der wichtigsten diagnostischen Merkmale (B) von AKs, sAKs und nicht läsionalen Haut (NLS), gemessen mittels OCT bei T3 (56 Tage nach Behandlung mit topischem Ingenol Mebutat) im Vergleich zum Ausgangswert. Veränderungen der wichtigsten RCM-Diagnosemerkmale für AKs, sAKs und nicht-lesionäre Haut bei T3 im Vergleich zum Ausgangswert, gemessen im SC (C) und im Stratum granulosum-spinosum (D).

3.5. EINSATZ DER KLSM IM ALLTAG FÜR SCHWER DIAGNOSTIZIERBARE, KLINISCH UND DERMATOSKOPISCH UNKLARE HAUTTUMORFÄLLE

3.5.1. PUBLIKATION: THE INVISIBLE BASAL CELL CARCINOMA: HOW REFLECTANCE CONFOCAL MICROSCOPY IMPROVES THE DIAGNOSTIC ACCURACY OF CLINICALLY UNCLEAR FACIAL MACULES AND PAPULES. RUINI C. ET AL., LASERS MED SCI. 2016

Schwierig zu diagnostizierende und frühe nicht-melanozytäre Hauttumoren sind im klinischen Alltag häufig anzutreffen. Neben präkanzerösen Läsionen wie AK weisen BZK die höchste Häufigkeit unter den Hauttumoren auf. Neben der klinischen Untersuchung wird die Dermatoskopie im Alltag für die Diagnose o.g. Hautveränderungen genutzt, mit höher Sensitivität und Spezifität. Allerdings gibt es Fälle, in denen die Dermatoskopie nicht wegweisend ist. In solchen Fällen können nicht-invasive diagnostische Techniken wie die

KLSM zum Einsatz kommen.

Ziel unserer Studie war es, die praktische Bedeutung der KLSM bei der Diagnose von BZK mit unklaren klinischen und dermatoskopischen Merkmalen zu erforschen. Wir untersuchten retrospektiv 27 histologisch nachgewiesene BZK, bei denen die Diagnose aufgrund der Untersuchung mit dem bloßen Auge und der Dermatoskopie nicht möglich war; wir überprüften separat die klinischen, dermatoskopischen und konfokalmikroskopischen Merkmale und bewerteten unsere diagnostische Sicherheit. Alle Läsionen waren klinisch unklar und wiesen keine charakteristischen BZK Merkmale auf.

Die Dermatoskopie zeigte in den meisten Fällen unspezifische Teleangiektasien (74 %) und Mikroerosionen (52%). Die KLSM zeigte in den meisten Fällen das Vorhandensein spezifischer Kriterien: periphere Palisadenstellung der Zellkerne (89%), periphere Spaltbildung (70%), Stromareaktion (70%), dunkle Silhouetten (70%), entzündliche Partikel (70%) und Tumorinseln (67%).

In Abwesenheit signifikanter diagnostischer klinischer Zeichen und bei unklaren dermatoskopischen Merkmalen waren jedoch spezifische KLSM Muster in den meisten Läsionen vorhanden, so dass diese eine korrekte Diagnose ermöglichten. BZK spezifische KLSM Merkmale sind nämlich in den meisten Fällen nachweisbar und leicht zu erkennen, selbst bei fehlenden signifikanten klinischen und dermatoskopischen Merkmalen. Die KLSM kann daher ein hilfreiches Instrument bei der Diagnose der sogenannten „unsichtbaren“ BZK sein.

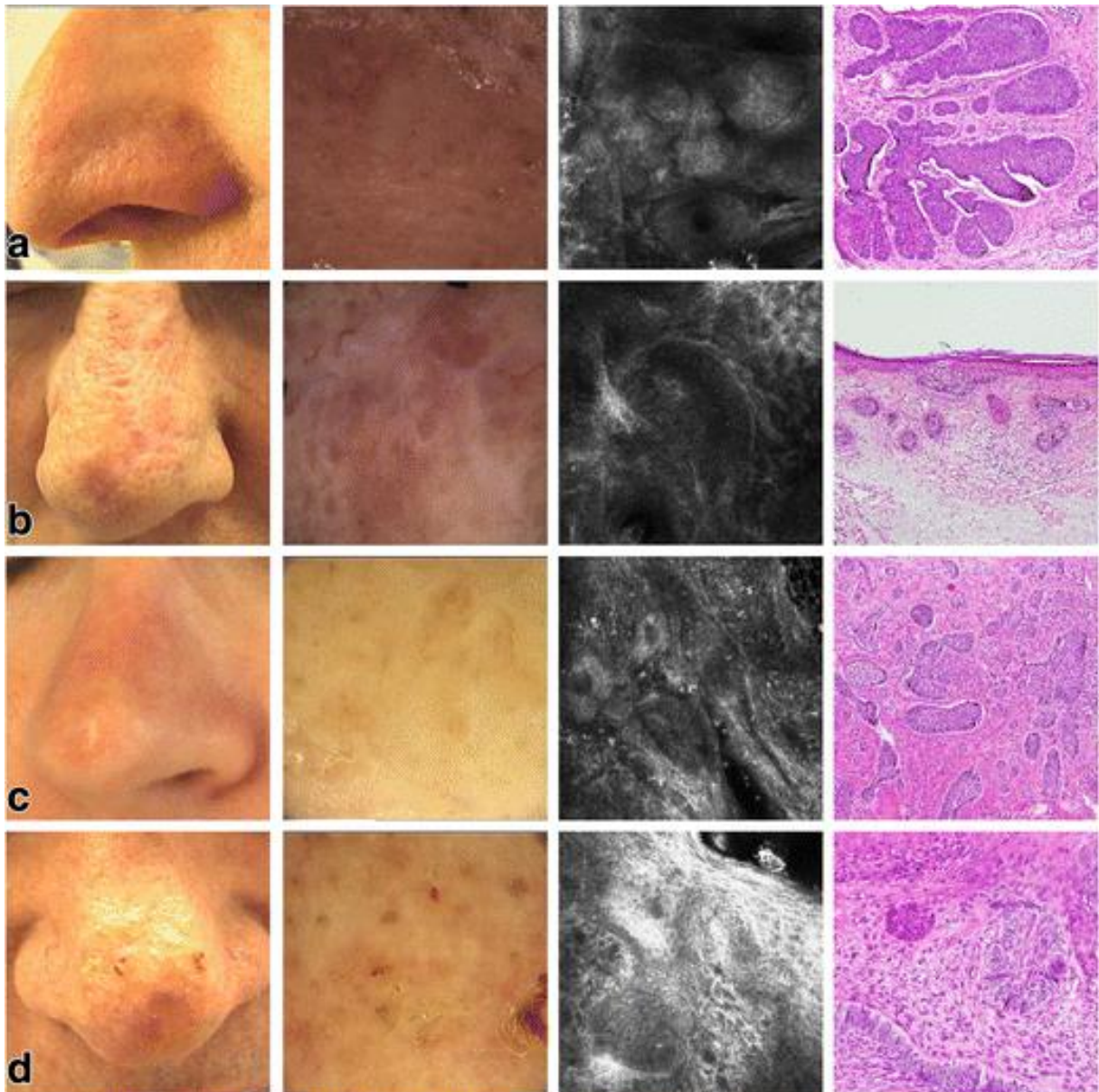


Abbildung 12. Von links nach rechts: klinische, dermatoskopische, KLSM und histologische Details exemplarischer Läsionen. A. 73-jähriger Mann mit nodulärem BZK, beachte gut umschriebene Tumorinseln mit Spaltbildung und Palisadenstellung. B. 75-jährige Frau mit oberflächlichem BZK C. 36-jährige Frau mit nodulärem-infiltrativem BZK, beachte Tumorinseln umgeben von entzündlichem Infiltrat. d 73-jähriger Mann mit Rezidiv eines oberflächlichen BZKs innerhalb einer Narbe

3.5.2. PUBLIKATION: REFLECTANCE CONFOCAL MICROSCOPY CORRELATES OF DERMOSCOPIC PATTERNS OF FACIAL LESIONS HELP TO DISCRIMINATE LENTIGO MALIGNA FROM PIGMENTED NONMELANOCYTIC MACULES. DE CARVALHO N., ... RUINI C., ET AL., BR J DERMATOL. 2015

Die klinische Diagnose einer Lentigo maligna (LM) und eines LM-Melanoms (LMM) kann aufgrund der überlappenden Merkmale, die sie mit anderen pigmentierten Maculae der Haut

teilen, sehr herausfordernd sein. Nicht-invasive diagnostische Techniken können bei der Differentialdiagnose helfen.

Ziel dieser Studie war die Identifizierung von KLSM Korrelaten und den wichtigsten dermatoskopischen Merkmalen von flachen pigmentierten Gesichtsläsionen, insbesondere LM.

Sechzig pigmentierte Gesichtsläsionen (LM, invasives MM, solare Lentigo/flache seborrhoische Keratose, Lichen Planus-artige Keratose, pigmentierte AK) wurden retrospektiv analysiert. Die wichtigsten dermatoskopischen und KSM Merkmale wurden beschrieben und innovativ miteinander korreliert.

Ein „Pseudonetwork“ (Pseudonetzwerk 37/60), ein „annular granular Pattern“ (ringförmiges körniges Muster, 37/60) und „Blotches“ (pigmentierten homogenen Flecken, 27/60) waren die häufigsten dermatoskopischen Merkmale in pigmentierten Gesichtsläsionen, unabhängig von ihrer Malignität. Die KLSM Korrelate o.g. Merkmalen waren aber bei benignen und malignen Läsionen unterschiedlich.

LM/LMM mit „Pseudonetwork“ und „annular granular pattern“ waren in der KLSM überwiegend durch eine intraepidermale Proliferation dendritischer Zellen mit Adnextropismus gekennzeichnet, die selten in benignen Läsionen zu sehen waren. Weitere „Medusa head structures“ (Caput medusae ähnliche Strukturen) wurden beobachtet: es handelt sich um längliche, hyporeflektive Knospen, die sich aus dem Haarfollikel herauswölben und aus Konglomeraten von dendritischen/pleomorphen Zellen entstehen; diese korrelieren in der Regel mit einer asymmetrischen Follikelpigmentierung oder einem „Pseudonetwork“. „Blotches“ waren häufiger in LM/LMM, der chaotischen intraepidermalen Proliferation maligner dendritischen und pleomorphen Zellen entsprechend; an der DEJ war das „meshwork pattern“ (Maschenmuster) prädominant. In den wenigen benignen Läsionen mit schwarz-braunen „Blotches“ zeigte die KLSM im Gegensatz eine regelmäßige epidermale („Cobblestone

pattern“, Pflastersteinmuster) und junktionale Architektur („ringed pattern“, ringförmiges Muster) sowie junktionale polyzyklische papilläre Konturen. Diese wurden hauptsächlich in benignen Läsionen nachgewiesen, jedoch auch in einer LM, wegen der Überlappung mit einer solaren Lentigo.

KLSM zeigte sich nützlich für die Identifizierung der histomorphologischen Korrelate dermatoskopischer Merkmale bei pigmentierten Gesichtsläsionen. Zusätzlich konnte sie eine bessere Eingrenzung des Läsionsareals erlauben, um die Diagnose zu vereinfachen.

3.6. NEUE ANWENDUNGEN DER EX-VIVO KLSM IM VERGLEICH MIT DER MIKROGRAPHISCH KONTROLLIERTEN UND KONVENTIONELLEN HISTOLOGIE

3.6.1. PUBLIKATION: EX-VIVO FLUORESCENCE CONFOCAL MICROSCOPY WITH DIGITAL STAINING FOR CHARACTERIZING BASAL CELL CARCINOMA ON FROZEN SECTIONS: A COMPARISON WITH HISTOLOGY. RUINI C. ET AL., J BIOPHOTONICS 2021

Die Ex-vivo-Fluoreszenz-KLSM hat sich bei der Untersuchung des frischen Gewebes etabliert, es gibt jedoch wenig Erfahrung mit Gefrierschnitten. Wir untersuchten die Anwendbarkeit der KLSM an Gefrierschnitten von BZK, nach der Exzision in MKC nach der Münchner Methode. Die Schnitte wurden mit Acridinorange angefärbt, mit KLSM in FM, RM und OM aufgenommen und mit der speziellen digitalen Staining-Software verarbeitet, um die H&E Farben zu simulieren. Ziel der Studie war es, unsere Sensitivität und Spezifität bei der Diagnose und Subtypisierung von BZK mittels KLSM im Vergleich zum Goldstandard (H&E-gefärbte Gefrierschnitte, die in der MKC nach der Münchner Methode genutzt werden) zu bestimmen. Zusätzlich wurden die typischen Artefakte der KLSM bei Gefrierschnitten beschrieben, und mit denen für das frische Gewebe verglichen.

Sechsvierzig primäre BZK wurden auf die Radikalität der Exzisionsränder sowie den histologischen Subtyp mit allen KLSM-Modi und konventioneller H&E-Färbung analysiert. Adnexe, Artefakte und diagnostische Sicherheit wurden bewertet. Freie Exzisionsränder

wurden mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 92% und 91% identifiziert. Die Konkordanz zwischen KLSM und konventioneller Histologie für den Tumorsubtyp betrug 88%. In 61% der Fälle konnten Gefrierartefakte beobachtet werden, die jedoch nicht mit der diagnostischen Sicherheit korrelierten. Die spezielle digitale Färbung konnte unsere diagnostische Sicherheit erhöhen.

Die ex-vivo KLSM kann sowohl bei frischem Gewebe als auch bei gefrorenen Proben eingesetzt werden, wenn auch mit reduzierter Leistung und mit unterschiedlichen Artefakten. Das Gerät einschließlich digitaler Färbung zeigte sich nützlich für die intraoperative Diagnose, die Subtypisierung und das Margin-Mapping von BZK.

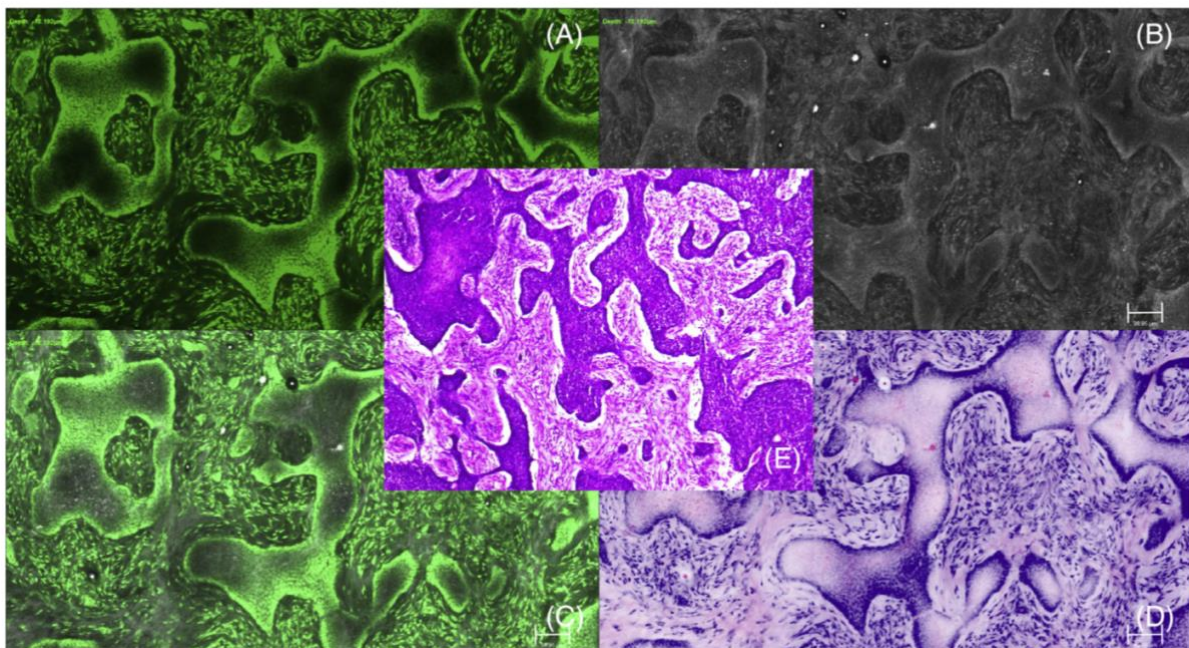


Abbildung 13. Sklerodermiformes BZK in ex-vivo KLSM in FM (A), RM (B), OM (C), DS (D) und H&E 10x (E). Man beachte die typischen infiltrativen Stränge, blau-lila gefärbt in DS (D) und H&E (E), mit Palisadenstellung der peripheren Kerne, umgeben von Leerräumen (Clefting) und Stromareaktion.

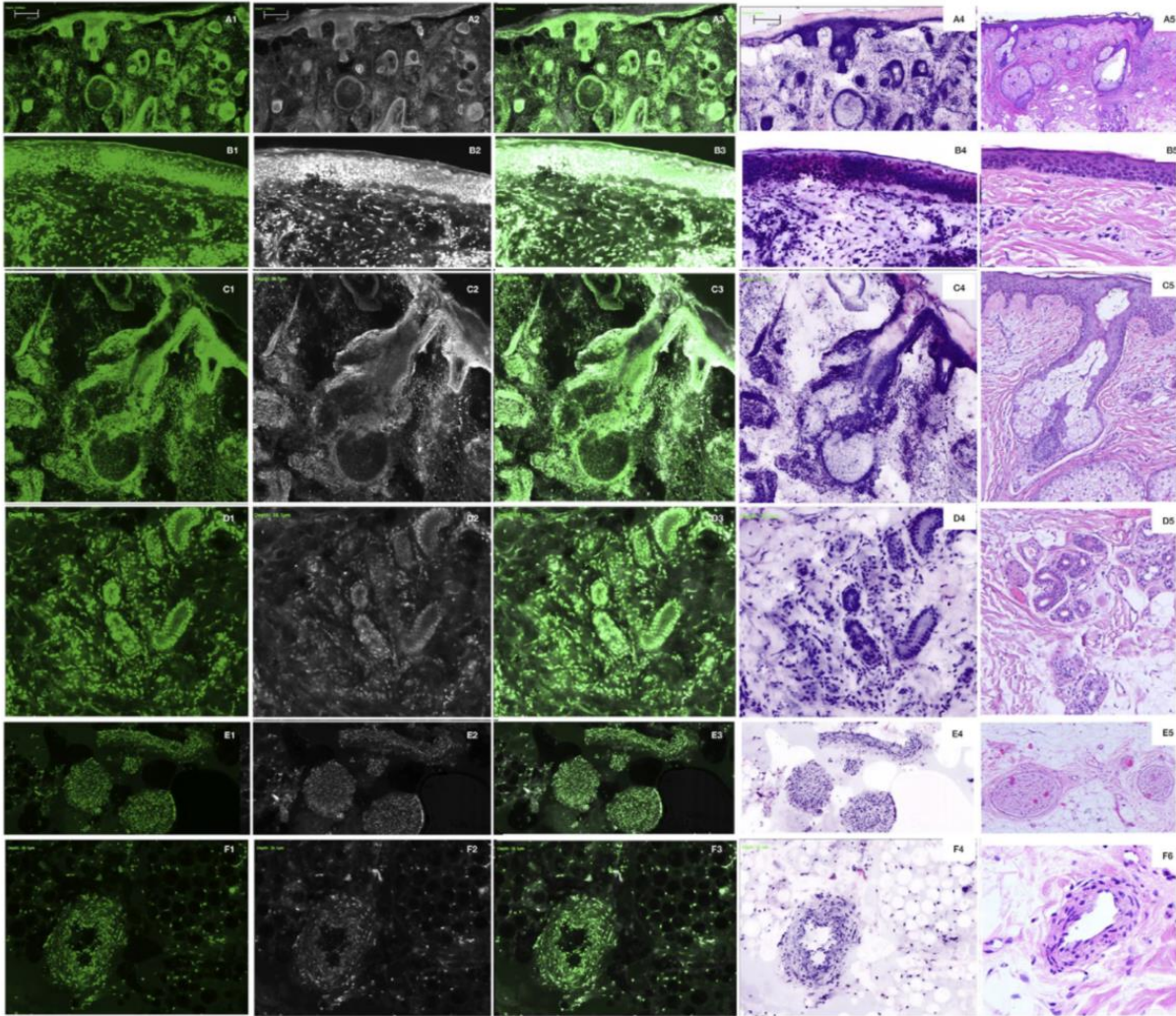


Abbildung 14. Gesunde Haut (A) mit der Epidermis und der darunter liegenden Dermis mit Haarfollikeln; Epidermis mit mehreren Schichten von Keratinozyten (B); Haarfollikel mit seiner Talgdrüse (C); Schweißdrüse mit ihrer typischen Doppelschichtung von Zellen (D); Ausschnitt eines Nervs (E); Arteriole mit ihrem Lumen und der Tunica intima, media und adventitia (F), umgeben von Fettgewebe mit mehreren Adipozyten mit ihren peripheren Kernen in FCM FM (1), RM (2), OM (3), DS (4) und H&E (5)

3.6.2. PUBLIKATION: IDENTIFICATION OF EX-VIVO CONFOCAL SCANNING MICROSCOPIC FEATURES AND THEIR HISTOLOGICAL CORRELATES IN HUMAN SKIN. HARTMANN D., RUINI C. ET AL., J BIOPHOTONICS. 2016

Die ex-vivo KLSM ist ein innovatives diagnostisches Gerät, das eine schnelle und einfache mikroskopische Gewebeuntersuchung ermöglicht. Die erste Generation dieser Geräte hat bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Evaluierung von BZK im Vergleich zur Mohs-Chirurgie gezeigt. Dennoch ist für die Diagnostik von pathologischen Hautläsionen die Kenntnis normaler Hautmerkmale essenziell. Daher untersuchten wir 50 Proben gesunder Haut

von verschiedenen anatomischen Lokalisationen, darunter Kopf und Hals (n = 25), Rumpf (n = 10), obere (n = 10) und untere Extremitäten (n = 5) mit einem ex-vivo KLSM Gerät der dritten Generation, und verglichen die Befunde mit den entsprechenden histologischen Schnitten. In der KLSM war es möglich, die verschiedene Epidermisschichten darzustellen, Keratinozyten und Melanozyten zu unterscheiden sowie Hautanhangsgebilde einschließlich Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen genauer zu beschreiben. Alle Merkmale konnten mit den entsprechenden histopathologischen Korrelaten verglichen werden. Außerdem wurden Strukturen der Dermis und Subcutis dargestellt. Artefakte wurden auch dokumentiert. Die Studie bietet einen Überblick über die wichtigsten ex-vivo KLSM Hautmerkmale im Vergleich zur histologischen Standarduntersuchung und hilft, häufige Artefakte zu erkennen und zu vermeiden.

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Diese kumulative Habilitationsschrift umfasst ein breites Spektrum von Fragestellungen im Rahmen der nicht-invasiven Diagnostik in der Dermatologie. Die konstante Entwicklung der modernen Technologien, das Interesse an der Reduktion der unnötigen invasiven Maßnahmen zusammen mit dem zunehmendem Gesundheitsbewusstsein der Patienten haben auch zu einem umfangreichen Einsatz nicht-invasiver Diagnosetechniken geführt, insbesondere bei der Frühdiagnose von Hauttumoren, und der Suche nach neuen Anwendungsgebieten derselben außerhalb der Onkologie. Diese Arbeit leistet einen Beitrag zu einem besseren Verständnis von o.g. Methoden und ihren Einsatz. Darüber hinaus befasst sie sich mit unmittelbar praxis- und therapierelevanten Aspekten in der alltäglichen Versorgung von Patienten mit Hauttumoren und „konservativen“ Hautkrankheiten wie der Rosacea und der kontaktallergischen Dermatitis.

Die Diagnostik von Hauttumoren und unklaren Hautkrankheiten erfolgt durch eine invasive Gewebeprobe, die den klinischen Verdacht mit bloßem Auge und Dermatoskopie bestätigt.

Es handelt sich aber um ein teures Verfahren, das nicht immer zur korrekten Diagnose führt; eine große oder multilokuläre Läsion kann z.B. durch eine minimale Gewebeentnahme unterschätzt oder fehldiagnostiziert werden. Ein sehr aktuelles Thema in der Dermatologie ist heutzutage die Verbesserung der Frühdiagnostik, um invasive chirurgische Behandlungen zu minimieren, und den erheblichen sozioökonomischen Schaden zu reduzieren. Es ist mittlerweile bekannt zum Beispiel, dass die frühe Erkennung und Behandlung von Hauttumoren für ein erhöhtes Überleben, eine Verbesserung der Lebensqualität und Reduktion der Behandlungskosten sorgt. Auch bei konservativen Hautkrankheiten soll auf unnötige Gewebeprobe n verzichtet werden, allerdings ist die klinische Diagnose vor allem in den Frühstadien manchmal komplex.

Die konventionelle Histologie bleibt noch der diagnostische Goldstandard bei Hauttumoren und vielen Hautkrankheiten, ist aber sehr zeitaufwendig und kostenintensiv. Aus diesem Grund wird nach Methoden gesucht, die eine vergleichbare diagnostische Genauigkeit besitzen und sie unterstützen können. Zu diesem Zweck zeigt die ex-vivo KLSM ein enormes Potential, vor allem in der perioperativen Schnellschnittuntersuchung von Hauttumoren, wie Basalzellkarzinomen. Ihr Einsatz könnte zukünftig zu einer signifikanten Reduktion des Zeitaufwandes und der Kosten der feingeweblichen Untersuchung führen.

Auf diesen Gründen war Ziel dieser Arbeit eine Verbesserung in der dermatologischen Diagnostik, um schnellere, sicherere und vorteilhafte diagnostische Verfahren zu etablieren, sowie neue Anwendungsbereiche dafür zu erforschen.

In dieser Arbeit konnten wir die innovative und bisher kaum erforschte Technik LC-OCT untersuchen, um die nicht-invasive diagnostische Kriterien Korrelate im Vergleich zu den bereits etablierten KLSM und OCT und zu den korrelierenden H&E Schnitten festzustellen. Aufnahmen von gesunder Haut und verschiedenen Hauttumoren wurden mit den jeweiligen konventionellen histologischen Präparaten verglichen um die Merkmale der untersuchten

Einheiten herausarbeitet; dadurch kann in der Zukunft ein korrekter Befund der Hautveränderung nicht-invasiv erstellt werden. Die Hauptlimitationen wurden auch analysiert. Wir konnten eine hohe Genauigkeit für die Diagnose und Subtypisierung der Basalzellkarzinome, sowie eine Verbesserung der diagnostischen Sicherheit im Vergleich zu anderen diagnostischen Techniken bestätigen. Das kann zu erheblichen Vorteilen im klinischen Alltag führen, da die korrekte Einstufung des BZKs erlaubt, unnötige Biopsien zu verzichten und den Patienten direkt zur korrekten Behandlung (nicht-operativ bei oberflächlichen Tumoren, operativ bei nodulären und sklerodermiformen Entitäten) einzuweisen. Der Vergleich zu anderen etablierten Methoden wie KLSM und OCT war zu Gunsten der LC-OCT. Wir konnten zusätzlich beweisen, dass LC-OCT AK auf der Grundlage des basalen Wachstumsmusters der Keratinozyten klassifizieren kann und dabei die histologische PRO-Klassifikation in-vivo reproduzieren kann. Da diese mit dem Progressionsrisiko zum PEK korreliert, kann es vermutet werden, dass das maligne Potential der AK nicht-invasiv geschätzt werden kann.

Weiter zum Thema Hautkrebs konnten wir die Effektivität der KLSM im klinischen Alltag für die Diagnostik der schwer diagnostizierbare BZK überprüfen und die KLSM diagnostische Kriterien beweisen, selbst wenn die klinische und dermatoskopische Merkmale unspezifisch oder fast unsichtbar sind. Ähnlich konnten wir KLSM Kriterien evaluieren, die es erlauben zwischen benignen und malignen pigmentierten Gesichtsläsionen zu unterscheiden, wenn dies in der klinischen und dermatoskopischen Untersuchung nicht möglich ist.

Diagnostische Techniken haben selbstverständlich auch Limitationen, zum Beispiel in der geringen Eindringtiefe (KLSM) oder Auflösung (OCT). Die Methoden wurden insofern innovativ kombiniert um die komplexe Entität der Feldkanzerisierung nicht-invasiv darzustellen und um das therapeutische Ansprechen der AK auf topische Therapien zu verfolgen. Das nicht-invasive Monitoring der Wirkung von topischen medizinischen oder

kosmetischen Präparaten stellt ein sehr relevantes Einsatzgebiet der nicht-invasiven Diagnostik dar. Wir nutzten die Kombination aus OCT und KLSM für die Evaluierung der Hautmorphologie unterschiedlicher ethnischer Hauttypen vor und nach einer kurzfristigen Feuchtigkeitsapplikation.

Die innovative Bildgebung in der Dermatologie erfasst nicht nur die präoperative, sondern auch die postoperative Diagnostik, insbesondere die ex-vivo KLSM. In diesem Bereich konnten wir die Merkmale der gesunden Haut an frisch exzidierten Geweben im Vergleich zur konventionellen H&E Schnitten beschreiben. Des Weiteren evaluierten wir zum ersten Mal die Anwendbarkeit der KSLM einschließlich DS an Gefrierschnitten von BZK, nach der Exzision in MKC nach der Münchner Methode. Wir konnten demonstrieren, dass sich dieses Verfahren sowohl an frischem als auch tief-gefrorenem Gewebe gut eignet, und eine Übersicht über die häufigsten Artefakte erstellen. Letztendlich konnten wir die Vorteile der DS erläutern.

Die innovativen bildgebenden Verfahren in der Dermatologie haben in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Sie dienen nicht nur der Früherkennung und Einstufung von Hautkrebs, sondern auch der korrekten Diagnostik zahlreicher Hautkrankheiten und der Verbesserung der Bedside-Histologie. Weit davon entfernt, die erfahrenen Kliniker ersetzen zu wollen, sollen diese neuen Diagnosetechniken sie in ihrem Alltag unterstützen.

Da die nicht invasive Diagnostik ein innovatives und vielversprechendes Forschungsgebiet ist, erwarten wir die Weiterentwicklung bereits existierender Techniken sowie die Etablierung neuer Methoden, die unser klinisches Auge weiter verbessern können. Ausgehend davon ergeben sich für zukünftige Arbeiten beispielweise folgende Ziele: die Entwicklung von LC-OCT diagnostischen Kriterien für die melanozytären Läsionen, die systematische Überprüfung der LC-OCT Kriterien für Hauttumoren und entzündliche Dermatosen in multizentrischen Studien, der Einsatz der künstlichen Intelligenz in der in-vivo und ex-vivo Diagnostik.

5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	optische Hautschwächungskoeffizient
AK	Aktinische Keratose/n
BK	Bowen Karzinom
BZK	Basalzellkarzinom/e
CI	Konfidenzintervall
DEJ	Dermo-epidermale Junctionszone
DS	Digitale Färbung (digital staining)
H&E	Hämatoxylin-Eosin
KLSM	Konfokale Laserscanmikroskopie
FM	Fluoreszenzmodus
LC-OCT	Line-field konfokale optische Kohärenztomographie
LM	Lentigo maligna
LMM	Lentigo maligna Melanom
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MB	Morbus Bowen
MKC	Mikroskopisch kontrollierte Chirurgie
MM	Malignes Melanom
OCT	Optische Kohärenztomografie
OM	Überlappungsmodus (overlay mode)
PEK	Plattenepithelkarzinom/e
SC	Stratum corneum
RM	Reflexionsmodus

7. VERZEICHNIS DER IN DER HABILITATIONSSCHRIFT ZUSAMMENGEFASSTEN PUBLIKATIONEN

1. Bağcı IS, **Ruini C**, Niesert AC, Horváth ON, Berking C, Ruzicka T, von Braunmühl T. Effects of Short-Term Moisturizer Application in Different Ethnic Skin Types: Noninvasive Assessment with Optical Coherence Tomography and Reflectance Confocal Microscopy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018 Mar 14;31(3):125-133.
2. de Carvalho N, Farnetani F, Ciardo S, **Ruini C**, Witkowski AM, Longo C, Argenziano G, Pellacani G. Reflectance confocal microscopy correlates of dermoscopic patterns of facial lesions help to discriminate lentigo maligna from pigmented nonmelanocytic macules. *Br J Dermatol*. 2014 Nov 21.
3. Hartmann D, **Ruini C**, Mathemeier L, Dietrich A, Von Braunmühl T. Identification of ex-vivo confocal scanning microscopic features and their histological correlates in human skin. *J Biophotonics*. 2016 Apr;9(4):376-87. Epub 2015 May 21.
4. **Ruini C**, Hartmann D, Bastian M, Ruzicka T, French LE, Berking C, von Braunmühl T. Non-invasive monitoring of subclinical and clinical actinic keratosis of face and scalp under topical treatment with ingenol mebutate gel 150 mcg/g by means of reflectance confocal microscopy and optical coherence tomography: New perspectives and comparison of diagnostic techniques. *J Biophotonics*. 2019 Jan 17:e201800391.
5. **Ruini C**, Rahimi F, Fiocco Z, French LE, Hartmann D, Oppel E, Sattler E. Optical coherence tomography for patch test grading: a prospective study on its use for non-invasive diagnosis of allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 2020, Oct. 4.
6. **Ruini C**, Schuh S, Gust C, French L.E., Hartmann D., Sattler E., Welzel J. In-vivo LC-OCT evaluation of the downward proliferation pattern of keratinocytes in actinic keratosis in comparison with histology: first impressions from a pilot study. *Cancers* 2021. Epub 2021 Jun 08
7. **Ruini C**, Schuh S, Gust C, Kendziora B, Frommherz L, Hartmann D, French LE, Welzel J*, Sattler E*. Line-field optical coherence tomography: in vivo diagnosis of basal cell carcinoma and subtype compared to histopathology and to other established imaging techniques. *Clin Exp Dermatol*. 2021. Epub
8. **Ruini C**, Vladimirova G, Kendziora B, Salzer S, Ergun E, Sattler E, French LE, Hartmann D. Ex-vivo fluorescence confocal microscopy with digital staining for characterizing basal cell carcinoma on frozen sections: a comparison with histology. *J Biophotonics*. 2021 May 14:e202100094.
9. **Ruini C**, Wittmann D, Summer B, von Braunmühl T, French LE, Thomas P. Nickel contact dermatitis evaluated by means of optical coherence tomography: first impressions. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019 Feb 28.
10. **Ruini C***, Hartmann D*, Saral S, Krammer S, Ruzicka T, von Braunmühl T. The invisible basal cell carcinoma: how reflectance confocal microscopy improves the diagnostic accuracy of clinically unclear facial macules and papules. *Lasers Med Sci*. 2016 Nov;31(8):1727-1732.

11. **Ruini C***, Schuh S*, Sattler E*, Welzel J*. Line-field-confocal optical coherence tomography – practical applications in dermatology and comparison with established imaging methods. *Skin Research Technology* 2020 Oct. 21.

*geteilte Autorenschaft

8. WEITERE THEMENBEZOGENE PUBLIKATIONEN

1. Boone MA, Suppa M, Pellacani G, Marneffe A, Miyamoto M, Alarcon I, **Ruini C**, Hofmann-Wellenhof R, Malvey J, Jemec GB, Del Marmol V. High-definition optical coherence tomography algorithm for discrimination of basal cell carcinoma from clinical BCC imitators and differentiation between common subtypes. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Feb 24.
2. 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 Jul;31(5):921-7. Epub 2016 Apr 7.
3. Hartmann D, Krammer S, Vural S, Bachmann MR, **Ruini C**, Sárdy M, Ruzicka T, Berking C, von Braunmühl T. Immunofluorescence and confocal microscopy for ex-vivo diagnosis of melanocytic and non-melanocytic skin tumors: A pilot study. *J Biophotonics*. 2018 Mar;11(3).
4. Hartmann D, **Ruini C**, Mathemeier L, Bachmann MR, Dietrich A, Ruzicka T, von Braunmühl T. Identification of ex-vivo confocal laser scanning microscopic features of melanocytic lesions and their histological correlates. *J Biophotonics*. 2017 Jan;10(1):128-142. Epub 2016 Apr 19
5. Krammer S, Krammer C, Vladimirova G, Salzer S, **Ruini C**, Sattler E, French LE, Hartmann D. “Ex vivo Confocal Laser Scanning Microscopy: A Potential New Diagnostic Imaging Tool in Onychomycosis Comparable With Gold Standard Techniques”. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Nov 6;7:586648.
6. Niculescu L, **Ruini C**, Srour J, Salzer S, Schönbuchner I, von Braunmühl T, Ruzicka T, Hohenleutner U, Giehl KA, Fischer J, Wollenberg A. Tazarotene 0.015% Cream as a Potential Topical Agent for Management of Ichthyosis in Dorfman-Chanarin Syndrome. *Acta Derm Venereol*. 2019 Mar 1;99(3):345-346.
7. Pollio A, Tomasi A, Pellacani G, **Ruini C**, Mandel VD, Fortuna G, Seidenari S, Ponti G. Multiple primary melanomas versus single melanoma of the head and neck: a comparison of genetic, diagnostic, and therapeutic implications. *Melanoma Res*. 2014 Mar 14.
8. Ponti G, Meschieri A, Pollio A, **Ruini C**, Manfredini M, Longo C, Mandel VD, Ciardo S, Tomasi A, Giannetti L, Pellacani G. Fordyce granules and hyperplastic mucosal sebaceous glands as distinctive stigmata in Muir-Torre syndrome patients: characterization with reflectance confocal microscopy. *J Oral Pathol Med*. 2014 Sep 12.
9. Ponti G, **Ruini C**, Massi D, Pellacani G, Tomasi A, Paglierani M, Loschi P, Seidenari S. Fluorescence in-situ hybridization and dermoscopy in the assessment of controversial melanocytic tumors. *Melanoma Res*. 2013 Dec;23(6):474-80.

10. **Ruini C**, Daxenberger F, Gust C, Schuh S, French LE, Welzel J, Sattler EC. Neues von der optischen Kohärenztomographie [Advances in optical coherence tomography]. *Hautarzt*. 2021 Dec;72(12):1048-1057.
11. **Ruini C**, Kendziora B, Ergun EZ, Sattler E, Gust C, French LE, Bagci IS, Hartmann D. In vivo examination of healthy human skin after short-time treatment with moisturizers using confocal Raman spectroscopy and optical coherence tomography: Preliminary observations. *Skin Res Technol*. 2021 Sep 23.
12. **Ruini C.**, Klammer-Engelhofen B., Heppt M., Herzinger T., Sardy M., Ruzicka T., Reinholz M. Cantharidin as an alternative treatment for genital warts: report of a case monitored through OCT. *Acta Derm Venereol*. 2020 Sep 8;100(16):adv00259.
13. **Ruini C.**, Manfredini M., Pellacani G., Desmond Mandel V., Tomasi A., Ponti G. Confocal microscopy characterization of BRAFV600E mutated melanomas. *Melanoma Res*. 2015 Aug;25(4):367-71.
14. **Ruini C.**, Ruzicka T., von Braunmühl T., Hartmann D. Granulomatous reaction after Cholla cactus spines; report of a case successfully treated with punch excisions and short review of the literature. *Cutis*. 2020 Mar;105(3):143-145;E2.
15. **Ruini C.**, Sattler E. Line-field confocal OCT. *Aktuelle Dermatologie (Thieme)*. 2020, April (German).
16. **Ruini C**, Sattler E, Hartmann D, Reinholz M, Ruzicka T, von Braunmühl T. Monitoring structural changes in Demodex mites under topical Ivermectin in Rosacea by means of Reflectance confocal microscopy: a case series. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Jun;31(6):e299-e301.
17. **Ruini C***, Schlingmann S*, Jonke Ž, Avcı P, Padrón-Laso V, Neumeier F, Koveshazi I, Ikeliani IU, Patzer K, Kunrad E, Kendziora B, Sattler E, French LE, Hartmann D. Machine Learning Based Prediction of Squamous Cell Carcinoma in Ex Vivo Confocal Laser Scanning Microscopy. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 3;13(21):5522.
18. **Ruini C**, Schuh S, Gust C, Kendziora B, Frommherz L, French LE, Hartmann D, Welzel J, Sattler EC. Line-field confocal optical coherence tomography for the In vivo real-time diagnosis of different stages of keratinocyte skin cancer: a preliminary study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2021 Aug 20.
19. **Ruini C**, Schuh S, Hartmann D, French L, Welzel J, Sattler E. Noninvasive real-time imaging of mite skin infestations with line-field confocal optical coherence tomography. *Br J Dermatol*. 2020 Dec 14.
20. **Ruini C.**, Schuh S., Pellacani G., French L.E., Sattler E., Welzel J. In vivo Imaging of *Sarcoptes scabiei* infestation using Line-field Confocal Optical Coherence Tomography. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 May 26.
21. **Ruini C.**, Witkowski A.M., Cesinaro A.M., De Carvalho N., Pellacani G. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma: an evidence of biologic and morphologic progression. *J Am Acad Dermatol*. 2015 Jan;72(1 Suppl):S8-S10.
22. Saral S, Letule V, Hartmann D, **Ruini C***, von Braunmühl T*. ‘Twin lesions’: Which one is the bad one? Improvement of clinical diagnosis with reflectance confocal microscopy. *Dermatol Pract Concept*. 2017 Jan 31;7(1):11-17.

23. Schuh S, **Ruini C**, Sattler E, Welzel J. Konfokale Line-Field-OCT [Confocal line-field OCT]. *Hautarzt*. 2021 Dec;72(12):1039-1047.

*geteilte Autorenschaft

9. REFERENZEN

1. Agozzino M, Gonzalez S, Ardigò M. Reflectance Confocal Microscopy for Inflammatory Skin Diseases. *Actas Dermosifiliogr* 2016; 107:631-9.
2. Alinaghi F, Bennike NH, Egeberg A, Thyssen JP, Johansen JD. Prevalence of Contact Allergy in the General Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Contact Dermatitis* 2019; 80:77-85.
3. Argenziano G, Albertini G, Castagnetti F, De Pace B, Di Lernia V, Longo C, et al. Early Diagnosis of Melanoma: What Is the Impact of Dermoscopy? *Dermatol Ther* 2012; 25:403-9.
4. 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; 33:2123-30.
5. 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:e201800425.
6. Bağcı IS, Aoki R, Krammer S, Vladimirova G, Ruzicka T, Sárdy M, et al. Immunofluorescence and Histopathological Assessment Using Ex Vivo Confocal Laser Scanning Microscopy in Lichen Planus. *J Biophotonics* 2020; 13:e202000328.
7. Bağcı IS, Aoki R, Vladimirova G, Ergün E, Ruzicka T, Sárdy M, et al. New-Generation Diagnostics in Inflammatory Skin Diseases: Immunofluorescence and Histopathological Assessment Using Ex Vivo Confocal Laser Scanning Microscopy in Cutaneous Lupus Erythematosus. *Exp Dermatol* 2020.
8. Bağcı IS, Aoki R, Vladimirova G, Sárdy M, Ruzicka T, French LE, et al. Simultaneous Immunofluorescence and Histology in Pemphigus Vulgaris Using Ex Vivo Confocal Laser Scanning Microscopy. *J Biophotonics* 2021.
9. Bennassar A, Carrera C, Puig S, Vilalta A, Malvey J. Fast Evaluation of 69 Basal Cell Carcinomas with Ex Vivo Fluorescence Confocal Microscopy: Criteria Description, Histopathological Correlation, and Interobserver Agreement. *JAMA Dermatol* 2013; 149:839-47.
10. Bennassar A, Vilalta A, Puig S, Malvey J. Ex Vivo Fluorescence Confocal Microscopy for Fast Evaluation of Tumour Margins During Mohs Surgery. *Br J Dermatol* 2014; 170:360-5.
11. 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; 27:1152-9.
12. Bolick NL, Geller AC. Epidemiology of Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2021; 35:57-72.
13. Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M, Sala R, Pellacani G. Reflectance Confocal Microscopy for in Vivo Skin Imaging. *Photochem Photobiol* 2008; 84:1421-30.
14. Chang S, Bowden A. Review of Methods and Applications of Attenuation Coefficient Measurements with Optical Coherence Tomography. *Journal of Biomedical Optics* 2019; 24:090901.
15. Ciardo S, Pezzini C, Guida S, Del Duca E, Ungar J, Guttman-Yassky E, et al. A Plea for Standardization of Confocal Microscopy and Optical Coherence Tomography Parameters to Evaluate Physiological and Para-Physiological Skin Conditions in Cosmetic Science. *Exp Dermatol* 2021.
16. Cohen PR, Schulze KE, Nelson BR. Basal Cell Carcinoma with Mixed Histology: A Possible Pathogenesis for Recurrent Skin Cancer. *Dermatol Surg* 2006; 32:542-51.

17. De Carvalho N, Schuh S, Kindermann N, Kästle R, Holmes J, Welzel J. Optical Coherence Tomography for Margin Definition of Basal Cell Carcinoma before Micrographic Surgery-Recommendations Regarding the Marking and Scanning Technique. *Skin Res Technol* 2018; 24:145-51.
18. Dickel H, Mahler V. [Diagnosis of Contact Allergy in Practice Using Current Guidelines]. *Hautarzt* 2020; 71:182-9.
19. Dinnes J, Deeks JJ, Chuchu N, Ferrante di Ruffano L, Matin RN, Thomson DR, et al. Dermoscopy, with and without Visual Inspection, for Diagnosing Melanoma in Adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 12:Cd011902.
20. Dinnes J, Deeks JJ, Chuchu N, Matin RN, Wong KY, Aldridge RB, et al. Visual Inspection and Dermoscopy, Alone or in Combination, for Diagnosing Keratinocyte Skin Cancers in Adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 12:Cd011901.
21. Dinnes J, Deeks JJ, Chuchu N, Saleh D, Bayliss SE, Takwoingi Y, et al. Reflectance Confocal Microscopy for Diagnosing Keratinocyte Skin Cancers in Adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 12:Cd013191.
22. Dinnes J, Deeks JJ, Saleh D, Chuchu N, Bayliss SE, Patel L, et al. Reflectance Confocal Microscopy for Diagnosing Cutaneous Melanoma in Adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 12:Cd013190.
23. Dubois A, Levecq O, Azimani H, Davis A, Ogien J, Siret D, et al. Line-Field Confocal Time-Domain Optical Coherence Tomography with Dynamic Focusing. *Opt Express* 2018; 26:33534-42.
24. Dubois A, Xue W, Levecq O, Bulkin P, Coutrot AL, Ogien J. Mirau-Based Line-Field Confocal Optical Coherence Tomography. *Opt Express* 2020; 28:7918-27.
25. Edwards SJ, Osei-Assibey G, Patalay R, Wakefield V, Karner C. Diagnostic Accuracy of Reflectance Confocal Microscopy Using Vivascope for Detecting and Monitoring Skin Lesions: A Systematic Review. *Clin Exp Dermatol* 2017; 42:266-75.
26. Ferrante di Ruffano L, Dinnes J, Deeks JJ, Chuchu N, Bayliss SE, Davenport C, et al. Optical Coherence Tomography for Diagnosing Skin Cancer in Adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 12:Cd013189.
27. Gambichler T, Matip R, Moussa G, Altmeyer P, Hoffmann K. In Vivo Data of Epidermal Thickness Evaluated by Optical Coherence Tomography: Effects of Age, Gender, Skin Type, and Anatomic Site. *J Dermatol Sci* 2006; 44:145-52.
28. Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Bastholt L, et al. European Consensus-Based Interdisciplinary Guideline for Melanoma. Part 1: Diagnostics - Update 2019. *Eur J Cancer* 2020; 126:141-58.
29. Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Bastholt L, et al. European Consensus-Based Interdisciplinary Guideline for Melanoma. Part 2: Treatment - Update 2019. *Eur J Cancer* 2020; 126:159-77.
30. 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. *J Invest Dermatol* 2012; 132:2386-94.
31. Hartmann D, Krammer S, Bachmann MR, Mathemeier L, Ruzicka T, Bagci IS, et al. Ex Vivo Confocal Microscopy Features of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Biophotonics* 2018; 11:e201700318.
32. Hartmann D, Krammer S, Bachmann MR, Mathemeier L, Ruzicka T, von Braunmühl T. Simple 3-Criteria-Based Ex Vivo Confocal Diagnosis of Basal Cell Carcinoma. *J Biophotonics* 2018; 11:e201800062.
33. 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; 31:921-7.

34. 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; 31:921-7.
35. 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.
36. 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; 9:376-87.
37. 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; 9:376-87.
38. Heppt MV, Leiter U, Steeb T, Amaral T, Bauer A, Becker JC, et al. *J Dtsch Dermatol Ges* 2020; 18:275-94.
39. Heppt MV, Leiter U, Steeb T, Amaral T, Bauer A, Becker JC, et al. S3 Guideline for Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma - Short Version, Part 1: Diagnosis, Interventions for Actinic Keratoses, Care Structures and Quality-of-Care Indicators. *J Dtsch Dermatol Ges* 2020; 18:275-94.
40. Holmes J, von Braunmühl T, Berking C, Sattler E, Ulrich M, Reinhold U, et al. Optical Coherence Tomography of Basal Cell Carcinoma: Influence of Location, Subtype, Observer Variability and Image Quality on Diagnostic Performance. *Br J Dermatol* 2018; 178:1102-10.
41. Kislevitz M, Akgul Y, Wamsley C, Hoopman J, Kenkel J. Use of Optical Coherence Tomography (Oct) in Aesthetic Skin Assessment—a Short Review. *Lasers in surgery and medicine* 2020; 52:699-704.
42. Krammer S, Krammer C, Vladimirova G, Salzer S, Ruini C, Sattler E, et al. Ex Vivo Confocal Laser Scanning Microscopy: A Potential New Diagnostic Imaging Tool in Onychomycosis Comparable with Gold Standard Techniques. *Front Med (Lausanne)* 2020; 7:586648.
43. Lang BM, Balermipas P, Bauer A, Blum A, Brotsch GF, Dirschka T, et al. S2k-Leitlinie Basalzellkarzinom Der Haut - Teil 1: Epidemiologie, Genetik Und Diagnostik. *J Dtsch Dermatol Ges* 2019; 17:94-104.
44. Lang BM, Balermipas P, Bauer A, Blum A, Brotsch GF, Dirschka T, et al. S2k-Leitlinie Basalzellkarzinom Der Haut - Teil 2: Therapie, Pravektion Und Nachsorge. *J Dtsch Dermatol Ges* 2019; 17:214-31.
45. Lang BM, Balermipas P, Bauer A, Blum A, Brölsch GF, Dirschka T, et al. S2k Guidelines for Cutaneous Basal Cell Carcinoma - Part 2: Treatment, Prevention and Follow-Up. *J Dtsch Dermatol Ges* 2019; 17:214-30.
46. Leiter U, Heppt MV, Steeb T, Amaral T, Bauer A, Becker JC, et al. S3 Guideline for Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma (Csc) - Short Version, Part 2: Epidemiology, Surgical and Systemic Treatment of Csc, Follow-up, Prevention and Occupational Disease. *J Dtsch Dermatol Ges* 2020; 18:400-13.
47. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Kurzversion 3.3, 2020f, AWMF Registernummer: 032/024OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/>.
48. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A Systematic Review of Worldwide Incidence of Nonmelanoma Skin Cancer. *Br J Dermatol* 2012; 166:1069-80.
49. Longo C, Bassoli S, Monari P, Seidenari S, Pellacani G. Reflectance-Mode Confocal Microscopy for the in Vivo Detection of *Sarcoptes Scabiei*. *Arch Dermatol* 2005; 141:1336.

50. 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. *Br J Dermatol* 2014; 171:561-70.
51. Longo C, Zalaudek I, Argenziano G, Pellacani G. New Directions in Dermatopathology: In Vivo Confocal Microscopy in Clinical Practice. *Dermatol Clin* 2012; 30:799-814, viii.
52. Mahler V, Nast A, Bauer A, Becker D, Brasch J, Breuer K, et al. S3 Guidelines: Epicutaneous Patch Testing with Contact Allergens and Drugs - Short Version, Part 1. *J Dtsch Dermatol Ges* 2019; 17:1076-93.
53. Mahler V, Nast A, Bauer A, Becker D, Brasch J, Breuer K, et al. S3 Guidelines: Epicutaneous Patch Testing with Contact Allergens and Drugs - Short Version, Part 2. *J Dtsch Dermatol Ges* 2019; 17:1187-207.
54. Manfredini M, Longo C, Ferrari B, Piana S, Benati E, Casari A, et al. Dermoscopic and Reflectance Confocal Microscopy Features of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; 31:1828-33.
55. Monnier J, Tognetti L, Miyamoto M, Suppa M, Cinotti E, Fontaine M, et al. In Vivo Characterization of Healthy Human Skin with a Novel, Non-Invasive Imaging Technique: Line-Field Confocal Optical Coherence Tomography. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2020.
56. Navarrete-Dechent C, Liopyris K, Monnier J, Aleissa S, Boyce LM, Longo C, et al. Reflectance Confocal Microscopy Terminology Glossary for Melanocytic Skin Lesions: A Systematic Review. *J Am Acad Dermatol* 2021; 84:102-19.
57. Nethercott J, Holness D. The Positive Predictive Value of Patch Tests in the Evaluation of Patients with Suspected Contact-Dermatitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 1989; 9:549-54.
58. Ogien J, Levecq O, Azimani H, Dubois A. Dual-Mode Line-Field Confocal Optical Coherence Tomography for Ultrahigh-Resolution Vertical and Horizontal Section Imaging of Human Skin in Vivo. *Biomed Opt Express* 2020; 11:1327-35.
59. Olsen J, Holmes J, Jemec GB. Advances in Optical Coherence Tomography in Dermatology-a Review. *J Biomed Opt* 2018; 23:1-10.
60. Paoli J, Cogrel O, Geer Svd, Krekels G, Leeuw Jd, Matthias, et al. Esms Position Document on the Use of Mohs Micrographic Surgery and Other Micrographic Surgery Techniques in Europe. 2019.
61. Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. In Vivo Assessment of Melanocytic Nests in Nevi and Melanomas by Reflectance Confocal Microscopy. *Mod Pathol* 2005; 18:469-74.
62. Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. Reflectance-Mode Confocal Microscopy of Pigmented Skin Lesions--Improvement in Melanoma Diagnostic Specificity. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53:979-85.
63. Pellacani G, Ulrich M, Casari A, Prow TW, Cannillo F, Benati E, et al. Grading Keratinocyte Atypia in Actinic Keratosis: A Correlation of Reflectance Confocal Microscopy and Histopathology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2015; 29:2216-21.
64. Peris K, Fargnoli MC, Garbe C, Kaufmann R, Bastholt L, Seguin NB, et al. Diagnosis and Treatment of Basal Cell Carcinoma: European Consensus-Based Interdisciplinary Guidelines. *Eur J Cancer* 2019; 118:10-34.
65. Que SK, Fraga-Braghiroli N, Grant-Kels JM, Rabinovitz HS, Oliviero M, Scope A. Through the Looking Glass: Basics and Principles of Reflectance Confocal Microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2015; 73:276-84.

66. Querleux B, Baldeweck T, Diridollou S, de Rigal J, Huguet E, Leroy F, et al. Skin from Various Ethnic Origins and Aging: An in Vivo Cross-Sectional Multimodality Imaging Study. *Skin Res Technol* 2009; 15:306-13.
67. 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; 104:946-52.
68. Ruini C, Hartmann D, Bastian M, Ruzicka T, French LE, Berking C, et al. Non-Invasive Monitoring of Subclinical and Clinical Actinic Keratosis of Face and Scalp under Topical Treatment with Ingenol Mebutate Gel 150 Mcg/G by Means of Reflectance Confocal Microscopy and Optical Coherence Tomography: New Perspectives and Comparison of Diagnostic Techniques. *J Biophotonics* 2019; 12:e201800391.
69. Ruini C, Hartmann D, Saral S, Krammer S, Ruzicka T, von Braunmühl T. The Invisible Basal Cell Carcinoma: How Reflectance Confocal Microscopy Improves the Diagnostic Accuracy of Clinically Unclear Facial Macules and Papules. *Lasers Med Sci* 2016; 31:1727-32.
70. Ruini C, Hartmann D, Saral S, Krammer S, Ruzicka T, von Braunmühl T. The Invisible Basal Cell Carcinoma: How Reflectance Confocal Microscopy Improves the Diagnostic Accuracy of Clinically Unclear Facial Macules and Papules. *Lasers Med Sci* 2016; 31:1727-32.
71. Ruini C, Sattler E, Hartmann D, Reinholz M, Ruzicka T, von Braunmühl T. Monitoring Structural Changes in Demodex Mites under Topical Ivermectin in Rosacea by Means of Reflectance Confocal Microscopy: A Case Series. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; 31:e299-e301.
72. Ruini C, Schuh S, Gust C, Kendziora B, Frommherz L, French LE, et al. Line-Field Optical Coherence Tomography: In Vivo Diagnosis of Basal Cell Carcinoma Subtypes Compared to Histopathology. *Clin Exp Dermatol* 2021.
73. Ruini C, Schuh S, Hartmann D, French L, Welzel J, Sattler E. Noninvasive Real-Time Imaging of Mite Skin Infestations with Line-Field Confocal Optical Coherence Tomography. *Br J Dermatol* 2021; 184:e3.
74. Ruini C, Schuh S, Pellacani G, French L, Welzel J, Sattler E. In Vivo Imaging of *Sarcoptes Scabiei* Infestation Using Line-Field Confocal Optical Coherence Tomography. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2020.
75. Ruini C, Schuh S, Sattler E, Welzel J. Line-Field Confocal Optical Coherence Tomography-Practical Applications in Dermatology and Comparison with Established Imaging Methods. *Skin Res Technol* 2021; 27:340-52.
76. Ruini C, Witkowski AM, Cesinaro A, Teixeira De Carvalho N, Pellacani G. From Actinic Keratosis to Squamous Cell Carcinoma: Evidence of Morphologic and Biologic Progression. *J Am Acad Dermatol* 2015; 72:S8-S10.
77. Sattler EC, Hoffmann VS, Ruzicka T, Braunmühl TV, Berking C. Reflectance Confocal Microscopy for Monitoring the Density of Demodex Mites in Patients with Rosacea before and after Treatment. *Br J Dermatol* 2015; 173:69-75.
78. Schmitz L, Gambichler T, Gupta G, Stücker M, Stockfleth E, Szeimies RM, et al. Actinic Keratoses Show Variable Histological Basal Growth Patterns - a Proposed Classification Adjustment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018; 32:745-51.
79. Schmitz L, Gupta G, Stücker M, Doerler M, Gambichler T, Welzel J, et al. Evaluation of Two Histological Classifications for Actinic Keratoses - Pro Classification Scored Highest Inter-Rater Reliability. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019; 33:1092-7.
80. Schuh S, Kaestle R, Sattler E, Welzel J. Comparison of Different Optical Coherence Tomography Devices for Diagnosis of Non-Melanoma Skin Cancer. *Skin Res Technol* 2016; 22:395-405.

81. Schuh S, Kaestle R, Sattler EC, Welzel J. Optical Coherence Tomography of Actinic Keratoses and Basal Cell Carcinomas - Differentiation by Quantification of Signal Intensity and Layer Thickness. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016; 30:1321-6.
82. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Malveyh J, Puig S, Rajadhyaksha M, et al. In Vivo Reflectance Confocal Microscopy Imaging of Melanocytic Skin Lesions: Consensus Terminology Glossary and Illustrative Images. *J Am Acad Dermatol* 2007; 57:644-58.
83. Shahriari N, Grant-Kels JM, Rabinovitz H, Oliviero M, Scope A. Reflectance Confocal Microscopy: Principles, Basic Terminology, Clinical Indications, Limitations, and Practical Considerations. *J Am Acad Dermatol* 2021; 84:1-14.
84. Suppa M, Fontaine M, Dejonckheere G, Cinotti E, Yelamos O, Diet G, et al. Line-Field Confocal Optical Coherence Tomography of Basal Cell Carcinoma: A Descriptive Study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2021; 35:1099-110.
85. Tognetti L, Cinotti E, Suppa M, Guazzo R, Habougit C, Santi F, et al. Line Field Confocal Optical Coherence Tomography: An Adjunctive Tool in the Diagnosis of Autoimmune Bullous Diseases. *J Biophotonics* 2021; 14:e202000449.
86. Ulrich M. [Confocal Laser Scanning Microscopy]. *Hautarzt* 2015; 66:504-10.
87. Ulrich M, Themstrup L, de Carvalho N, Ciardo S, Holmes J, Whitehead R, et al. Dynamic Optical Coherence Tomography of Skin Blood Vessels - Proposed Terminology and Practical Guidelines. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018; 32:152-5.
88. van Loo E, Mosterd K, Krekels GA, Roozeboom MH, Ostertag JU, Dirksen CD, et al. Surgical Excision Versus Mohs' Micrographic Surgery for Basal Cell Carcinoma of the Face: A Randomised Clinical Trial with 10 Year Follow-Up. *Eur J Cancer* 2014; 50:3011-20.
89. Weedon D, Johnston RB. *Weedon's Skin Pathology Essentials*: Churchill Livingstone; 2012.
90. Welzel J. Reflectance Confocal Microscopy: New Micromorphological Insights into Inflammatory Skin Diseases. *Br J Dermatol* 2016; 175:239-40.
91. Welzel J, Bruhns M, Wolff HH. Optical Coherence Tomography in Contact Dermatitis and Psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2003; 295:50-5.
92. Welzel J, Lankenau E, Birngruber R, Engelhardt R. Optical Coherence Tomography of the Skin. *Curr Probl Dermatol* 1998; 26:27-37.
93. Welzel J, Schuh S. Nichtinvasive Diagnostik in Der Dermatologie. *J Dtsch Dermatol Ges* 2017; 15:999-1017.

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mir die Erstellung meiner Habilitationsarbeit ermöglicht und erleichtert haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Lars E. French für die volle Unterstützung des Habilitationsprojektes an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München. Ebenso bin ich meiner langjährigen Mentorin PD MUDr. Daniela Hartmann, PhD verpflichtet, für ihre uneingeschränkte Betreuung und die außergewöhnliche personelle, organisatorische und technische Rahmenbedingung zur klinischen, operativen und wissenschaftlichen Weiterbildung und Durchführung dieser Habilitation. Ein ganz besonderer Dank geht an meine Doktormutter und Mentorin Frau Prof. Dr. Elke Sattler, für ihre durchgehende Betreuung und Förderung. Mein Dank gilt ebenso Frau Prof. Julia Welzel, mit der zahlreiche Projekte in kollegialer Zusammenarbeit durchgeführt werden konnten. Mein Dank gilt darüber hinaus Frau Prof. Dr. Tanja von Braunmühl und Herrn Professor Dr. Thomas Ruzicka, die meine klinische und wissenschaftliche Entwicklung ab dem ersten Tag in der Klinik gefördert haben. Ferner gilt mein Dank Frau Prof. Franziska Ruëff, Herrn Prof. Andreas Wollenberg, Frau Dr. Eva Oppel, Herrn Prof. Michael Flaig, Herrn Prof. M. Schlaak, Frau Prof. Carola Berking für ihre wohlhabende Unterstützung im klinischen Alltag. Herrn Professor Dr. Sebastian Theurich danke ich herzlich für die Betreuung im Rahmen des Fachmentorats. Meinen ehemaligen Mentoren Prof. Giovanni Pellacani und Prof. Francesca Farnetani möchte ich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die Begeisterung für die Dermatologie danken. Weiterhin möchte ich dankend an die Kolleginnen und Kollegen des OP- und Imaging Teams, Frau Charlotte Gust, Fabia Daxenberger, Frau Sandra Schuh und die fleißigen Doktorandinnen erinnern.

Meiner Familie danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung auf meinem Lebensweg.

Mein Dank gilt nicht zuletzt den Patienten und Probanden, die mit Geduld bereit waren, an unseren zahlreichen klinischen und wissenschaftlichen Projekten teilzunehmen.

11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG UND ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die schriftliche Habilitationsleistung selbständig verfasst und die Herkunft des verwendeten oder zitierten Materials ordnungsgemäß kenntlich gemacht habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich noch kein Habilitationsverfahren im gleichen Fach ohne Erfolg beendet habe, mir kein akademischer Grad entzogen worden ist und auch kein Verfahren gegen mich anhängig ist, dass die Entziehung eines akademischen Grades zur Folge haben könnte.

München, 09.06.21

Dr. med. Dott. Cristel Ruini