

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Reproduzierbarkeit und Verteilung von Parametern der  
Mycosis fungoides – Evaluation mittels konfokaler  
Lasermikroskopie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jasmin Babilli

aus Essen

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. E. Stockfleth  
                          2. Prof. Dr. med. J. Welzel  
                          3. Prof. Dr. med. U. Reinhold

Datum der Promotion: 22.06.2014

## Inhaltverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1- 11</b>
1.1 Mycosis fungoides.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Pathogenetisches Konzept.....	1
1.1.3 Klassifizierung.....	1
1.1.3.1 Klinische Merkmale.....	2
1.1.3.2 Histologie.....	2
1.1.3.3 Immunphänotyp.....	3
1.1.3.4 Molekulare und genetische Merkmale.....	3
1.1.4 Stadieneinteilung.....	4
1.1.5 Diagnostik der Mycosis Fungoides.....	6
1.2 Konfokale Lasermikroskopie.....	6
1.2.1 Entwicklung und Historie.....	6
1.2.2 Konfokale Lasermikroskopie der normalen Haut.....	7
1.2.3 Konfokale Lasermikroskopie der Mycosis fungoides.....	7
1.3 Klinische und histologische Differentialdiagnose der Mycosis fungoides..	8
1.3.1 Sézary-Syndrom.....	9
1.3.2 Parapsoriasis en plaque.....	9
1.3.3 Lymphomatoide Papulose.....	9
1.3.4 Psoriasis.....	10
1.3.5 Lichenoide Dermatosen.....	10
1.3.6 Spongiotische Dermatitiden.....	11
<b>2. Fragestellungen.....</b>	<b>12-13</b>
2.1 Reproduzierbarkeit der postulierten Parameter.....	12
2.2 Konkordanzbestimmung.....	12
2.3 Verteilungshäufigkeit einzelner Merkmale.....	12
2.4 Sensitivität sowie Spezifität einzelner Merkmale.....	12
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>14- 21</b>
3.1 Konfokale Lasermikroskopie.....	14
3.1.1 Optisches Grundprinzip der konfokalen Lasermikroskopie.....	14
3.1.2 Technischer Aufbau des konfokalen Lasermikroskops.....	15
3.2 Studienteilnehmer und Studienprotokoll.....	16
3.3 Morphologische Analyse.....	18
3.4 Statistische Analyse.....	19
3.4.1 Cochran-Test.....	19
3.4.2 Chi <sup>2</sup> -Test.....	20
3.4.3 Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse.....	20

<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>22- 37</b>
4.1 Studienpopulation.....	22
4.2 Morphologische konfokalmikroskopische Analyse der MF.....	22
4.2.1 Spongiose.....	23
4.2.2 Epidermale Unordnung.....	23
4.2.3 Verschwommene interzelluläre Abgrenzungen.....	23
4.2.4 Schwach reflektierende Papillen.....	24
4.2.5 Atypische Lymphozyten.....	25
4.2.6 Vesikelartige Strukturen.....	26
4.2.7 Keratinozyten mit länglichen Zellkernen.....	28
4.2.8 Dilatierte Gefäße.....	28
4.2.9 Dendritische Zellen.....	29
4.2.10 Fibrose/ Kollagenbündel.....	31
4.2.11 Siebartige Perforationen.....	31
4.3 Ergebnisse der statistischen Analyse.....	32
4.3.1 Konkordanzbestimmung.....	32
4.3.2 Chi <sup>2</sup> -Analyse.....	33
4.3.2.1 Mycosis fungoides.....	34
4.3.2.2 Parapsoriasis.....	35
4.3.2.3 Sézary-Syndrom.....	35
4.3.2.4 Lymphomatoide Papulose.....	35
4.3.3 Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse.....	36
4.3.3.1 Mycosis fungoides.....	36
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>38- 47</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>48-49</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>50- 55</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>56</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>57</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>58</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>59</b>

## **1. Einleitung**

### 1.1 Mycosis fungoides

#### 1.1.1 Definition

Die Mycosis fungoides (MF) gehört zu den primär kutanen T-Zell-Lymphomen und ist mit 44% der häufigste Vertreter der Gruppe der kutanen Lymphome [1]. Sie macht jedoch nur 0,5% aller Non-Hodgkin-Lymphome aus. Die Krankheit hat eine Jahresinzidenz von 0,3 pro 100 000 Personen. Sie tritt typischerweise im Erwachsenenalter zwischen dem 50. und 65. Lebensjahr auf. Männer sind häufiger betroffen als Frauen [2].

#### 1.1.2 Pathogenetisches Konzept

Die Pathogenese der MF ist multifaktoriell bedingt und bisher noch nicht vollständig geklärt. Burg et al. haben 2006 in einem Übersichtsartikel die Ergebnisse der aktuellen Forschung zusammengefasst und daraus ein pathogenetisches Konzept zur Entstehung kutaner Lymphome entwickelt, das sich in drei Schritte gliedert [3]. Hierbei wird postuliert, dass zu Beginn ein (hyper-) reaktiver, inflammatorischer Prozess aufgrund verschiedener chronischer Stimuli vorliegt: genetische, infektiöse, immunologische sowie Umweltfaktoren führen zu einer chronischen Aktivierung genetisch instabiler Lymphozyten [3-6]. Aus diesem Prozess entsteht eine potentiell reversible prä-Neoplasie [3, 7-9]. In einem hypothetischen zweiten Schritt führt die persistierende Antigen-Stimulation zur definitiven Ausbildung eines niedriggradigen Lymphoms. Selbst-Co-Stimulation führt zu weiterer T-Zell-Proliferation [1]. Im dritten Schritt kommt es zur weiteren Aktivierung endogener Wachstumsfaktoren sowie einer Down-Regulierung von Zellzyklus regulierenden Genen. Diese Prozesse führen schließlich zur Proliferation von neoplastischen lymphoiden Zellen. Es kommt zur Tumorbildung und Transformation in hochgradig maligne Lymphome. In einem vierten Schritt ist die extrakutane Dissemination mit Beteiligung von Lymphknoten, Knochenmark, Blut und anderen Organen durch Veränderungen der Homing-Rezeptoren möglich [3, 10, 11].

#### 1.1.3 Klassifizierung

Eine Klassifizierung der kutanen Lymphome wurde 2005 von der WHO (World Health Organization) und der EORTC (European Organisation of Research and Treatment of

Cancer) gemeinsam veröffentlicht [12]. 2007 wurde diese Klassifizierung von der EORTC und der ISCL (International Society for Cutaneous Lymphomas) überarbeitet und um genaue Leitlinien zur Stadieneinteilung der MF ergänzt [13]. Die Klassifizierung beruht auf klinischen, histologischen, immunphänotypischen, molekularen sowie genetischen Merkmalen.

#### 1.1.3.1 Klinische Merkmale

Nach Erstmanifestation an der Haut zeigt die MF typischerweise einen phasenhaften Verlauf. Die Krankheit beginnt charakteristischerweise mit flachen ekzematösen Läsionen an der Haut („Patches“). Ein Patch ist als Hautveränderung jeglicher Größe definiert, die keine Erhebung oder Verhärtung aufweist [13]. Nach Jahren oder Jahrzehnten können sich Patches in dickere Plaques weiterentwickeln, die definitionsgemäß erhaben und infiltriert sind [12, 13]. Bei einer Minderheit der Patienten kommt es nach weiteren Jahren zur Entwicklung von Tumoren und zu einer extrakutanen Beteiligung mit Dissemination in Lymphknoten, Blut, Knochenmark und innere Organe. Die MF entwickelt sich nicht kontinuierlich progredient sondern schrittweise, was daraufhin deutet, dass die einzelnen Krankheitsschübe kumulative Mutationen in verschiedenen Genen widerspiegeln [5, 12, 14].

#### 1.1.3.2 Histologie

Ein wichtiger Pfeiler der Diagnostik der MF ist die histopathologische Analyse [3, 12]. Hierbei wird dem Patienten unter lokaler Betäubung und mithilfe einer Stanze ein im Durchmesser 3-5 mm großer Gewebestück aus der fraglichen Läsion entnommen, anschließend fixiert, in Paraffin eingebettet und histologisch und immunhistologisch gefärbt um dann unter dem Lichtmikroskop von einem Experten untersucht zu werden. Die Diagnose einer MF im Frühstadium stellt sich oftmals als schwierig dar, da die Histopathologie oftmals unspezifisch ist und chronisch inflammatorischen Dermatosen ähneln kann. Es können Lymphozyten mit unregelmäßig konturiertem Zellkern oder hell erscheinendem zytoplasmatischem Randsaum, epidermotrope Lymphozyten, leichte Spongiose und ein bandförmiges Infiltrat in der Basalzellschicht oder oberen Dermis vorhanden sein [15, 16].

Im frühen Plaquestadium ist die Histologie meist charakteristischer und zeigt diagnostische Merkmale in Form von einem dichten bandförmigen Infiltrat von Lymphozyten im Stratum basale, v.a. an den Spitzen der Reteleisten. Zudem kann

Epidermotropismus einzelner Zellen beobachtet werden. Das Infiltrat kann außerdem Eosinophile, Plasmazellen, Makrophagen und dendritische Zellen enthalten. Die Mehrzahl der Zellen sind kleine, differenzierte Lymphozyten mit runden oder nur leicht cerebriformem Zellkern, teilweise auch mit einem hellen Randsaum, was im englischen Sprachraum als „haloed lymphocytes“ bezeichnet wird. Akanthose, Hyperkeratose, Ödeme und Fibrose sind weitere, jedoch unspezifische Merkmale. Teilweise ist eine Proliferation von postkapillären Venolen mit prominenten Endothelzellen sichtbar [17, 18]. Im fortgeschrittenen Plaquestadium enthält das subepidermal gelegene Infiltrat v.a. atypische Zellen mit cerebriformem Zellkern. Der Epidermotropismus ist noch stärker ausgeprägt und oftmals sind zwei bis drei Zellen in Gruppen angeordnet. Schließen sich noch mehr Lymphozyten zusammen, entstehen Pautrier'sche Mikroabszesse, ein spezifisches Merkmal, das allerdings studienabhängig nur in 4% bis 41% der Fälle zu finden ist [12, 16, 19].

Im Tumorstadium werden die dermalen Infiltrate diffuser und der Epidermotropismus kann verschwinden. Die Tumorzellen nehmen sowohl an Größe als auch in ihrer Zahl zu und sind als Zellen mit unterschiedlich großen, cerebriformen Zellkernen gekennzeichnet [12].

#### 1.1.3.3 Immunphänotyp

Der immunphänotypische Prototyp der MF wird anhand von bestimmten CD- (= Cluster of Differentiation) Oberflächenmarkern und Antigenrezeptormerkmalen auf T-Lymphozyten festgelegt. Es handelt sich um einen CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD45RO+, CD8-, TCRbeta+ und CD30+ Phänotyp. Mit Fortschreiten der Erkrankung kann es v.a. in den epidermotropen cerebriformen Zellen zu einem Verlust von CD7, CD2 und CD5 kommen [12].

#### 1.1.3.4 Molekulare und genetische Merkmale

Der Antigenrezeptor von T-Lymphozyten besteht aus zwei membranständigen Polypeptidketten: der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette oder der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette. In der fortgeschrittenen MF ist eine monoklonale Umlagerung von T-Zell-Rezeptor- $\gamma$ -Genen üblich, in frühen Stadien ist diese jedoch nur bei der Hälfte der Fälle zu finden, da mindestens 1% der Zellen monoklonal sein müssen, um sie mittels PCR detektieren zu können [20]. Auch sind bereits sowohl strukturelle als auch numerische Chromosomenaberrationen identifiziert worden, die bei MF-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gehäuft

auftreten. Außerdem konnten Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen gefunden werden [4, 12, 21].

#### 1.1.4 Stadieneinteilung

Die meist genutzte Möglichkeit, die MF in Stadien einzuteilen, ist die Nutzung des TNM-Systems. 2007 haben die EORTC und ISCL zusammen die aktuell gültige Einteilung entwickelt. Die Klassifizierung nach TNM-System ist in Tabelle 1.1 und die daraus resultierende Stadieneinteilung in Tabelle 1.2 zu sehen. Eine Beteiligung der Lymphknoten wird anhand der „Dutch grade“-Skala bewertet, die 1980 entwickelt wurde und vier Schweregrade der histopathologischen Mitbeteiligung der Lymphknoten umfasst [22].

**Tabelle 1.1:** ISCL/EORTC Klassifizierung der Mycosis fungoides und des Sézary Syndroms

<b>TNMB Stadien</b>	
<b>Haut</b>	
T1	Patches und Plaques auf <10% der Körperoberfläche
T2	Patches und Plaques auf >10% der Körperoberfläche
T3	Mindestens ein Tumor (Durchmesser > 1cm)
T4	Konfluierendes Erythem, das > 80% der Körperoberfläche bedeckt
<b>Lymphknoten</b>	
N0	Keine klinisch abnormale Lymphknoten; Biopsie nicht erforderlich
N1	Klinisch abnormale periphere Lymphknoten; Histopathologie Dutch grade 1
	N1a Klon negativ
	N1b Klon positiv
N2	Klinisch abnormale periphere Lymphknoten; Histopathologie Dutch grade 2
	N2a Klon negativ
	N2b Klon positiv
N3	Klinisch abnormale periphere Lymphknoten; Dutch grades 3-4
Nx	Klinisch abnormale periphere Lymphknoten; keine histologische Absicherung
<b>Innere Organe</b>	
M0	Keine Mitbeteiligung innerer Organe
M1	Mitbeteiligung innerer Organe (pathologische Sicherung notwendig)
<b>Blutbeteiligung</b>	
B0	Keine Blutbeteiligung: <5% des peripheren Bluts sind atypische (Sézary) Zellen
	B0a Klon negativ
	B0b Klon positiv
B1	>5% der peripheren Lymphozyten sind atypisch, aber noch nicht B2
	B1a Klon negativ
	B1b Klon positiv
B2	>1000 Sézary-Zellen mit Klon/mm <sup>3</sup>



**Tabelle 1.2:** ISCL/EORTC Stadieneinteilung der Mycosis fungoides und des Sézary Syndroms

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>B</b>
<b>IA</b>	1	0	0	0,1
<b>IB</b>	2	0	0	0,1
<b>II</b>	1,2	1,2	0	0,1
<b>IIB</b>	3	0-2	0	0,1
<b>III</b>	4	0-2	0	0,1
<b>IIIA</b>	4	0-2	0	0
<b>IIIB</b>	4	0-2	0	1
<b>IVA1</b>	1-4	0-2	0	2
<b>IVA2</b>	1-4	3	0	0-2
<b>IVB</b>	1-4	0-3	1	0-2

In dieser Klassifizierung wurden erstmals bestimmte Variablen genau definiert, die zuvor noch von der Interpretation des jeweiligen Untersuchers abhängig waren.

An der Haut (T-Klassifikation) ist die genaue Differenzierung zwischen den einzelnen Läsionen notwendig um eine genaue Stadieneinteilung vorzunehmen, die wiederum entscheidend für Prognose, Wahl und Ansprechen auf die Therapie sein kann. Entscheidend für die Stadieneinteilung ist außerdem, wie viel Prozent der Körperoberfläche von Hautveränderungen bedeckt sind.

In Bezug auf das N-Stadium wurden klinisch abnormale Lymphknoten als solche definiert, die einen Längendurchmesser von mindestens 1,5 cm haben oder in der körperlichen Untersuchung als fest, unregelmäßig oder fixiert auffallen. Es wurde festgelegt, dass nur noch diese Lymphknoten biopsiert werden sollen. Eine komplette Exzision des veränderten Lymphknotens ist z.B. einer Feinnadelpunktion vorzuziehen.

Die M-Klassifikation bezieht sich auf den Befall innerer Organe, der ein signifikant prognostischer Faktor bei der MF ist. Meist ist dieser Befall asymptomatisch und somit unterdiagnostiziert. Viszeraler Befall kann in allen Organen vorkommen, besonders häufig jedoch in Milz, Leber, Knochenmark und Lunge.

Das B-Stadium schließlich gibt die Blutbeteiligung wieder, die angenommen wird, wenn über 5% der peripheren Lymphozyten im Lichtmikroskop atypisch erscheinen. Wenn über 20% der Lymphozyten atypisch sind, hat dies -auch unabhängig von dem T- oder N-Stadium- prognostische Signifikanz. In der Diagnostik wird des Weiteren festgestellt, ob die atypischen Zellen einen T-Zell-Rezeptorklon enthalten. [13]

### 1.1.5 Diagnostik der Mycosis Fungoides

Die Diagnose einer Mycosis fungoides in frühen Stadien ist häufig eine differentialdiagnostische Herausforderung. Der Zeitraum vom erstmaligen Auftreten von Hautsymptomen bis zur Diagnosestellung beträgt im Durchschnitt 6 Jahre, in denen häufig keine entsprechende Therapie stattfindet [23]. Wie eingangs kurz erwähnt, wird die Diagnosestellung dadurch erschwert, dass die Mycosis fungoides (MF) oftmals ekzematösen und papulosquamösen Dermatosen ähnelt wie z.B. der Parapsoriasis, dem mikrobiellen und anderen Ekzemen, der Tinea corporis und der Psoriasis vulgaris [16, 23].

Die Diagnosestellung der MF stützt sich auf eine Kombination aus klinischen, histopathologischen, immunphänotypischen, molekularen und genetischen Merkmalen. Aufgrund der Tatsache, dass die Histopathologie der frühen MF oftmals unspezifisch ist, ergibt sich häufig die Notwendigkeit wiederholt Hautproben zu entnehmen [16, 23, 24]. Dies ist für den Patienten mit Schmerzen, einer Narbenbildung sowie dem Risiko von Infektionen verbunden.

## 1.2 Konfokale Lasermikroskopie

### 1.2.1 Entwicklung und Historie

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde bereits in den 1950er Jahren von Marvin Minsky entdeckt, damals unter Verwendung von Weißlicht. Erst zu einem späteren Zeitpunkt wurde diese Art der Mikroskopie mit dem Ziel weiter entwickelt, die klinisch-dermatologische Evaluation durch optisch hochauflösende in-vivo Mikroskopie zu ergänzen [25]. Rajadhyaksha et al. entwickelten 1995 an der Harvard Medical School den ersten Prototyp eines konfokalen Mikroskops, der einen Laser als Lichtquelle verwendete.

Mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops können epidermale und oberflächlich dermale Strukturen mit hoher Auflösung dargestellt werden ohne dazu Gewebeproben entnehmen zu müssen [26, 27]. Dies könnte in Zukunft dazu dienen Probiopsien zu ersetzen oder im Vorfeld zu ihnen eine geeignete Lokalisation festzulegen um Entnahmefehlern vorzubeugen.

In bisherigen Studien wurde die Anwendbarkeit der konfokalen Lasermikroskopie für die in vivo Diagnostik von Hauttumoren [28-32], des Kontaktekzems [33-38], systemischer Sklerose [39] und Psoriasis [40] untersucht. In allen Studien wurde die konfokale

Lasermikroskopie als vielversprechendes Hilfsmittel zur non-invasiven Diagnostik von Hauterkrankungen beschrieben.

### 1.2.2 Konfokale Lasermikroskopie der normalen Haut

Im konfokalen Lasermikroskop können die verschiedenen Schichten der Haut unterschieden werden. In der horizontalen Schnitfführung erscheint zunächst das Stratum corneum als oberste Hautschicht. Es besteht aus großen (10-30 µm), polygonalen Zellen ohne Zellkern. Aufgrund des hohen optischen Brechungsindex (n=1,44) des Stratum corneums wird viel Licht zurückreflektiert, woraus sich die helle Darstellung der Strukturen erklärt. Hautfalten, Furchen und die normale Felderung der Haut sind als dunkle Linien zu erkennen.

Das Stratum granulosum und spinosum (n=1,37) zeigt typischerweise ein honigwabenartiges Muster aus 10-25 µm großen, polygonalen Zellen mit dunklem Zellkern, die von einem hellen Zytoplasma umrandet sind.

Die darunter gelegenen Basalzellen sind mit 7-12 µm noch kleiner und erscheinen je nach Melaningehalt (n=1,72) unterschiedlich hell und kontrastreich. In der horizontalen Schnitfführung durch die Junctionszone und dermalen Papillen kommen die Basalzellen ringförmig die Papillen umgebend zur Darstellung, in deren Mitte sich ein schleifenförmig verlaufendes Gefäß befindet. Bei der in-vivo Untersuchung können hierbei einzelne Blutzellen und Blutfluss beobachtet werden. [26, 27, 41]

### 1.2.3 Konfokale Lasermikroskopie der Mycosis fungoides

Bisher befassten sich zwei Studien mit der konfokalen Lasermikroskopie der Mycosis fungoides. 2007 wurden von Agero et al. in einer Pilotstudie an sieben Patienten verschiedene konfokalmikroskopische Parameter beschrieben. Wie die Autoren auch selbst kritisch diskutierten, war diese Studie rein deskriptiven Charakters ohne statistische Analyse über die Anwendbarkeit der postulierten Merkmale [42]. 2009 wurde von Koller et al. eine weitere Studie über die konfokale Lasermikroskopie der MF und ihre Anwendbarkeit für die Diagnostik veröffentlicht [43].

Agero et al haben in ihrer Pilotstudie MF-typische konfokale Parameter und deren Korrelation mit der Histopathologie beschrieben. Hierbei wurden erstmals insgesamt sieben Patienten konfokalmikroskopisch untersucht, die unter MF in verschiedenen Stadien litten.

### *Ekzemstadium*

In diesen Analysen konnten bereits im Ekzemstadium konfokalmikroskopisch sichtbare Veränderungen dargestellt werden. In der Epidermis zeigten sich ein gestörter Aufbau und Spongiose, die im konfokalen Mikroskop durch verdickte und verschwommene Zellgrenzen charakterisiert ist. Des Weiteren waren epidermotrope atypische Lymphozyten sichtbar, die sich als schwach reflektierende ovale bis runde Zellen darstellen. In der dermoepidermalen Junctionszone stellten sich die dermalen Papillen, die in gesunder Haut als helle, d.h. stark reflektierende Ringe erscheinen, dunkler dar. Als histopathologisches Korrelat hierzu wurde eine Infiltration des Stratum basale mit atypischen Lymphozyten diskutiert. In der Dermis konnten in diesem Stadium, auch aufgrund der zu geringen optischen Eindringtiefe des konfokalen Lasermikroskops, keine Veränderungen festgestellt werden.

### *Plaquestadium*

Im Plaquestadium waren in der Epidermis - zusätzlich zu den bereits im Ekzemstadium sichtbaren Veränderungen - runde vesikelartige dunkle Hohlräume zu sehen, in denen sich schwach reflektierende runde Strukturen befanden. Dies entspricht am ehesten den pathogonischen Pautrier'schen Mikroabszessen mit Ansammlungen von Lymphozyten. Außerdem wurden Zellen mit verlängertem Zellkern beschrieben. In der DEJ waren in diesem Stadium zusätzlich zur Hyporeflexion der Papillen atypische Lymphozyten zu sehen. In der Dermis waren erweiterte Blutgefäße sichtbar.

### *Tumorstadium*

Im Tumorstadium wurden in der Epidermis zusätzlich zu den erwähnten Veränderungen 21-40 µm große, reflektierende, ovale bis längliche Strukturen beschrieben. Die zugehörige Histopathologie zeigte mäßig atypische Lymphozyten in einer leicht spongiosisch veränderten Epidermis. [42]

## 1.3 Klinische und histologische Differentialdiagnose der MF

Im Folgenden wird eine Reihe an Erkrankungen vorgestellt, die Differentialdiagnosen zur MF darstellen. Dies ergibt sich entweder aus histologischen oder klinischen Ähnlichkeiten. Histologisch spielen somit vor allem Hauterkrankungen mit lymphozytärem Infiltrat eine Rolle, klinisch sind insbesondere Krankheiten mit ekzematösen Hautläsionen mit einer frühen MF zu verwechseln.

### 1.3.1 Sézary-Syndrom

Umstrittene Zugehörigkeit zur MF hat das Sézary-Syndrom, auf das das oben beschriebene Staging-System ebenfalls anzuwenden ist. Histologisch sind die beiden Erkrankungen nicht zu unterscheiden, klinisch ist das Sézary-Syndrom jedoch zusätzlich durch die Trias Erythrodermie, generalisierte Lymphadenopathie und atypische, sogenannte Sézary-Zellen im peripheren Blut, Lymphknoten und Haut mit einer absoluten Sézary-Zellzahl von mindestens 1000 Zellen/mm<sup>3</sup> gekennzeichnet. Klinisch sind zusätzlich Ödeme, Hyperkeratose von Handflächen und Fußsohlen und therapieresistenter Pruritus typisch. [12, 44]

Hiervon wird in der 2002 durch die International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) veröffentlichten Studie eine erythrodermische Form der Mycosis fungoides unterschieden, die bei typischer Klinik (noch) keine Blutbeteiligung aufweist. [44]

### 1.3.2 Parapsoriasis en plaque

Bei der Parapsoriasis en plaque handelt es sich um eine chronisch-rezidivierende Entzündung der Haut unbekannter Ätiologie. Es können eine klein- und eine großfleckige Form der Krankheit unterschieden werden. Als Vorstufe der MF gilt lediglich die großfleckige Variante. Die erythematösen und schuppigen Läsionen sind entlang der Hautspaltlinien angeordnet. Histologisch sieht man in der von Hyperkeratose und Parakeratose bestimmten Epidermis ein oberflächliches Infiltrat aus kleinen, teilweise atypischen Lymphozyten. Andere Entzündungszellen, die bei der MF beobachtet werden können, fehlen. [45]

### 1.3.3 Lymphomatoide Papulose

Die Lymphomatoide Papulose ist eine chronisch wiederkehrende, selbstheilende, papulonodulär erscheinende Hauterkrankung. Klinisch hat sie einen benignen Verlauf, histologisch zeigt sie jedoch Merkmale eines CD30+ malignen Lymphoms.

Die histologischen Merkmale sind variabel und hängen vom Stadium der Läsion und der Erkrankung ab. Es werden drei histologische Typen unterschieden. In Typ A sind die Tumorzellen große, atypische Zellen. Zusätzlich sind zahlreiche inflammatorische Zellen wie Neutrophile, Eosinophile, Histiozyten sowie einige Plasmazellen zu sehen. Außerdem ist ein auffälliges Ödem der oberen Dermis typisch. Typ B ist gekennzeichnet durch ein bandförmiges Infiltrat kleiner cerebriformer Zellen und in Typ C sieht man

große atypische lymphoide Zellen, die in zusammenhängenden Zellverbänden wachsen. Oft sind auch Anzeichen einer Vaskulitis zu sehen.

Es können gleichzeitig mehrere histologische Typen in einem Patienten vorhanden sein. [46, 47]

#### 1.3.4 Psoriasis

Die Psoriasis ist eine der häufigsten chronisch entzündlichen Hauterkrankungen. Das klinische Bild sowie der Krankheitsverlauf sind nicht einheitlich und zeigen eine große Variabilität von lokal begrenzten Manifestationen bis hin zu generalisierter Hautbeteiligung und extrakutanen Manifestationen [48]. Die Diagnose lässt sich in der Regel anhand der typischen Klinik diagnostizieren. Die histopathologischen Befunde variieren mit dem Alter der Läsionen und können teilweise den Befunden einer MF ähneln: Es finden sich die charakteristischen Munro'schen Mikroabszesse, die einer subcornealen Ansammlung neutrophiler Granulozyten entsprechen, somit also höher liegen als die Pautrier'schen Mikroabszesse der MF. Die frühesten histopathologischen Veränderungen der Psoriasis sind unspezifisch und bestehen aus einem perivaskulären T-Lymphozyten-Infiltrat, gefolgt von der Entwicklung dilatierter und gewundener Blutgefäße in den dermalen Papillen. Des Weiteren sind dermale Ödembildung und leichte Spongiose mit T-Lymphozyten- und Neutrophilen-Exozytose zu beobachten. In klinisch voll entwickelten Plaques kommen schließlich noch die charakteristischen Anzeichen einer Verlängerung der Reteleisten und einer ausgeprägten Hyperkeratose hinzu. [49]

#### 1.3.5 Lichenoide Dermatosen

Unter dem Begriff der lichenoiden Dermatosen werden einige klinisch unterschiedliche und noch nicht vollständig verstandene entzündliche Hauterkrankungen zusammengefasst, die durch eine Reihe von histopathologischen Gemeinsamkeiten gekennzeichnet sind. Ein lichenoides Reaktionsmuster wird dabei in so unterschiedlichen Krankheiten wie Medikamentenreaktionen (Steven-Johnson-Syndrom), Kollagenosen (Lupus erythematoses), chronischer graft-versus-host-Krankheit sowie dem Lichen planus als „Prototyp“ beobachtet. Eine lichenoid Form der Mycosis fungoides ist auch beschrieben. Gemeinsames histologisches Korrelat ist eine Schädigung der epidermalen Basalzellen zusammen mit einer bandförmigen Anordnung von mononukleärem Entzündungszellinfiltrat aus aktivierten T-Zellen, Makrophagen und

dendritischen Zellen in den Papillen und der mittleren Dermis. Die Krankheiten werden traditionsgemäß in zellreiche und -arme Formen unterteilt. [50]

### 1.3.6 Spongiotische Dermatitiden

Als spongiotische Dermatitiden wird eine Gruppe von Krankheiten bezeichnet, die ebenfalls ein typisches histopathologisches Muster gemein haben. Typischerweise findet sich in der Epidermis ein interzelluläres Ödem mit oder ohne Vesikelbildung und darauffolgender Verlängerung der interzellulären Brücken. Oftmals ist auch Exozytose von Lymphozyten vorzufinden. Typische Beispiele sind die atopische und seborrhoische Dermatitis, das Kontaktekzem, das nummuläre Ekzem sowie die Pityriasis rosea. Spongiotische Dermatitiden werden histopathologisch, anhand ihres zeitlichen Verlaufs (akut, subakut und chronisch) und des dominierenden Entzündungszelltyps (Lymphozyten, eosinophile oder neutrophile Granulozyten) unterschieden. [51]

## **2. Fragestellungen**

Ziel der vorliegenden Studie war es, die konfokale Lasermikroskopie und die 2007 postulierten Merkmale auf ihre Anwendbarkeit zur Diagnostik der Mycosis fungoides im klinischen Alltag zu überprüfen und sie mit den Ergebnissen bisheriger Studien zu vergleichen. Dabei wurde mit folgenden Zielsetzungen gearbeitet:

### **2.1 Reproduzierbarkeit der postulierten Parameter**

Zunächst von Interesse war die Frage, ob die beschriebenen Parameter auch in den Untersuchungen dieser Studie nachgewiesen werden können. Das Ziel war also wie bereits in der Pilotstudie eine morphologische, deskriptive Analyse der beobachteten Veränderungen, bei der besonderes Augenmerk auf die von Agero et al. postulierten Merkmale gelegt wird [42]. Außerdem interessierte es aber auch, ob während der Untersuchung weitere Merkmale auffallen, die zuvor nicht beschrieben worden waren.

### **2.2 Konkordanzbestimmung**

Zur kritischen Beurteilung der Ergebnisse sowie dem klinischen Einsatz des Mikroskops, ist es wichtig, die Ergebnisübereinstimmung und Reproduzierbarkeit einzelner Parameter zwischen den Untersuchern zu bestimmen. Es ist davon auszugehen, dass die Zuverlässigkeit bestimmter Parameter höher ist, wenn sie von mehreren Untersuchern unabhängig übereinstimmend beschrieben werden. Es ergab sich die Fragestellung, ob die Untersucher in Bezug auf die Entdeckung einzelner Merkmale, wie auch in Bezug auf die Diagnosestellung insgesamt, zu übereinstimmenden Ergebnissen kommen.

### **2.3 Verteilungshäufigkeit einzelner Merkmale**

Um die differenzialdiagnostische Bedeutung der konfokalen Lasermikroskopie für die Diagnose der MF zu untersuchen wurde die Verteilungshäufigkeit der einzelnen Merkmale anhand typischer MF-Läsionen und der MF-ähnlichen Krankheitsbilder untersucht.

### **2.4 Sensitivität sowie Spezifität einzelner Merkmale**

Schließlich wurden diejenigen Parameter, deren Reproduzierbarkeit innerhalb der Untersuchung Signifikanzniveau erreichten, einer Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse



unterzogen, um die Zuverlässigkeit der konfokalen Lasermikroskopie für die Diagnose der MF zu untersuchen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Konfokale Lasermikroskopie

##### 3.1.1 Optisches Grundprinzip der konfokalen Lasermikroskopie

Das Prinzip der konfokalen Lasermikroskopie beruht auf der selektiven Erfassung von Licht aus einer fokussierten Ebene. Es ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.

Ein 830 nm Dioden-Laserstrahl wird durch eine Linse auf eine Ebene innerhalb der Haut fokussiert. Dort trifft er auf endogene Chromophore wie Melanin, Zellorganellen und andere Mikrostrukturen, die das Licht entweder reflektieren, absorbieren oder streuen. Das reflektierte Licht gelangt durch das optische System zurück und wird über eine Silikon-Diode detektiert. Vor diesem Detektor befindet sich eine kleine Lochblende, die ermöglicht, dass nur das Licht für die Bildgebung verwendet wird, welches aus der fokussierten Ebene kommt; das von außerhalb dieser Ebene reflektierte Licht wird herausgefiltert. So kommen nur diejenigen Strukturen mit hoher Auflösung zur Darstellung, die der Untersucher durch Auswahl der Untersuchungsebene festlegt. Die Lichtquelle, der fokussierte Punkt und die Detektorblende befinden sich in optisch konjugierten fokalen Ebenen, woher sich der Name der Technologie ableiten lässt. Der Detektor ist mit einer Computereinheit verbunden, der mit entsprechender Software aus den Einzelpunktbildern 2-dimensionale Schnittbilder in Graustufen zusammensetzt.

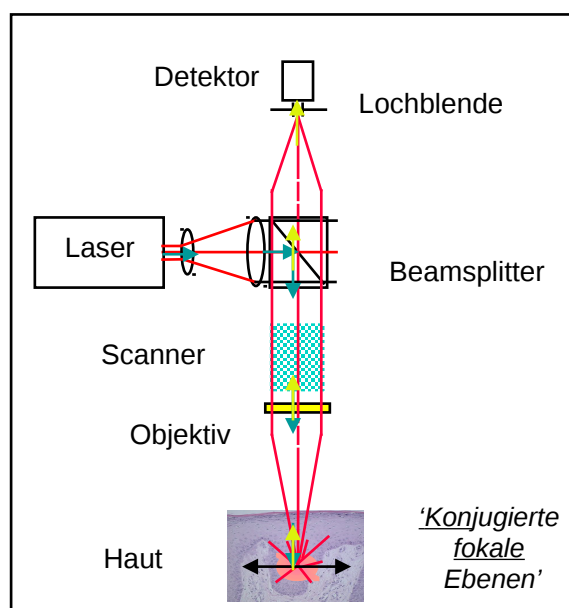


Abb. 3.1

**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung des optischen Prinzips der konfokalen Lasermikroskopie. Ein Laserstrahl wird durch eine Linse in die Haut hineinfokussiert (blaue Pfeile). Das reflektierte Licht (gelbe Pfeile) gelangt durch das optische System zurück zu einem Detektor, vor welchem sich eine Lochblende befindet. Diese filtert alle Lichtsignale heraus, die nicht aus der fokussierten Ebene kommen.

Im Gegensatz zur herkömmlichen Histologie, in der das Gewebe in Schnitten senkrecht zur Hautoberfläche untersucht wird, sind die optischen Schnittbilder der konfokalen Lasermikroskopie parallel zur Hautoberfläche ausgerichtet. [26, 27]

Die Rückstreuung des Lichts ist bei Strukturen mit hohem Brechungsindex und/oder einer Größe, die der verwendeten Wellenlänge entspricht, besonders hoch. Der Bildkontrast entsteht aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindices der Strukturen. Der stärkste Kontrastgeber in der Haut ist Melanin mit einem Refraktionsindex von  $n=1,72$ , weshalb basal gelegene Keratinozyten und Melanozyten hell erscheinen. Weitere stark reflektierende Hautkomponenten sind Kollagen ( $n=1,43$ ) und Keratin ( $n=1,51$ ), die, umgeben von Epidermis ( $n=1,34$ ) und Dermis ( $n=1,41$ ), hell erscheinen. [25]

Da eine konfokale Schnittebene mit ca. 3-5  $\mu\text{m}$  weniger breit ist als eine einzelne Zellschicht, können intrazelluläre Einzelheiten sichtbar gemacht werden. [27]

In neueren Modellen des Mikroskops wird mit Lasern unterschiedlicher Wellenlänge gearbeitet, zudem gibt es einen Fluoreszenzmodus. Um diesen zu benutzen wird ein hautverträglicher, fluoreszierender Farbstoff auf das zu untersuchende Hautareal appliziert. Wird dieser durch das Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, beginnt er zu fluoreszieren und verstärkt somit den Kontrast, so dass intradermale Strukturen noch deutlicher dargestellt werden können. Im Rahmen dieser Studie wurde jedoch nur der Reflexionsmodus benutzt. [52]

### 3.1.2 Technischer Aufbau des konfokalen Lasermikroskops

Zur Untersuchung der Patienten wurde ein handelsübliches konfokales Lasermikroskop verwendet (Vivascope 1500, Lucid, Henrietta, NY; <http://www.lucid-tech.com>). Es enthält einen 830 nm Dioden Laser mit einer Beleuchtungsstärke von 5-10mW, was keinen Gewebeschaden verursacht. Routinemäßig wird ein 30x Wasserimmersions-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,9 verwendet. Dies liefert ein Blickfeld von 0,5 mm und eine laterale Auflösung von 0,7  $\mu\text{m}$ . Die Dicke der optischen Schichten beträgt 3  $\mu\text{m}$ , was mit konventionellen Histologieschnitten vergleichbar ist. Bis zu 300  $\mu\text{m}$  tief können die Epidermis, die dermoepidermale Junctionszone und die obere Dermis dargestellt werden. Das Mikroskop wird über einen Metallring mit einem transparenten Kunststofffenster (Lucid®, Rochester, NY, USA, VivaScope 1500 Adhesive Windows) mechanisch an der Haut fixiert, um bewegungsbedingte

Bildartefakte zu minimieren. Der Ring wird magnetisch mit dem Gehäuse des Objektivs verbunden. [25]

Zwischen die Haut und das Glasfenster wird ein Tropfen Immersionsöl gegeben, da dessen Refraktionsindex ( $n=1,5$ ) dem des Stratum corneum ( $n=1,55$ ) nahe kommt. Das Öl ermöglicht zudem zwischen Haut und Kunststofffenster eine Kontakt Herstellung ohne Lufteinschluss, was zu Artefakten führen könnte. Es wird ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet, da der Refraktionsindex von Wasser ( $n=1,33$ ) beinahe dem der Epidermis ( $n=1,34$ ) entspricht. Typischerweise werden daher als Immersionsmedium Gels auf Wasserbasis wie z.B. Ultraschallgel ( $n=1,35$ ) benutzt. Durch die Anpassung der Refraktionsindices soll erreicht werden, dass möglichst wenig Licht bereits an der Oberfläche gebrochen wird und somit für die Bilddarstellung verloren geht; dadurch gelangt mehr Licht in tiefere Schichten der Haut, so dass auch diese dargestellt werden können. [25]

Um größere Hautgebiete in einer Übersichtsaufnahme darstellen zu können, kann mithilfe der Computersoftware ein Mosaik aus bis zu  $16 \times 16$  Einzelbildern erzeugt werden (Vivablock®), welches einem Hautareal von bis zu  $8 \times 8$  mm entspricht. Nach Erstellen dieser horizontalen Mappe in der XY-Ebene können die einzelnen Bilder aufgerufen und einer genauen Bildanalyse unterzogen werden. Des Weiteren ist es möglich aus mehreren Übersichtsaufnahmen einen Würfel mit Einbezug der XYZ-Ebene herzustellen, eine vertikale Mappe in der Z-Achse als „VivaStack®“ zu speichern oder intravitale Videos mit 15-25 Bildern pro Sekunde in Echtzeit aufzunehmen.

### 3.2 Studienteilnehmer und Studienprotokoll

Eine Gesamtzahl von 15 Patienten ( $n=15$ ) im Alter zwischen 32 und 76 Jahren (Durchschnittsalter 62 Jahre) mit einer vorab histologisch gesicherten Diagnose einer MF, Parapsoriasis, Sézary-Syndrom oder Lymphomatoiden Papulose wurde in die klinische Studie eingeschlossen, deren Eigenschaften in Tabelle 3.1 zu sehen sind. Von diesem Kollektiv waren 11 Patienten männlich und vier weiblich. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte aus dem Hauttumorzentrum (HTCC) und der allgemeinen Hochschulambulanz der Charité Universitätsmedizin Berlin, Deutschland. Die Richtlinien der Ethikkommission (Ethikantrag Nummer EA1/020/09) wurden beachtet und alle klinischen Untersuchungen in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Einschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren das Vorliegen einer der untersuchten Hauterkrankungen und das Unterschreiben der

Einverständniserklärung. Ausschlusskriterien waren das Ablehnen der Einverständniserklärung, schwere körperlich oder geistige Behinderung sowie Kontaktallergie gegen Pflastermaterial. Es durften männliche und weibliche Personen über 18 Jahre sowie Minderjährige mit Einverständnis der Erziehungsberechtigten teilnehmen. Belastungen für die Studienteilnehmer ergaben sich lediglich aus dem Zeitaufwand für die Untersuchung von ca. 15 Minuten. Das normale diagnostische sowie therapeutische Vorgehen wurde durch die Untersuchung nicht beeinflusst, sie wurde lediglich als diagnostische Methode zusätzlich zur Probebiopsie und körperlichen Untersuchung eingesetzt. Die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes fanden in der Verschlüsselung der Daten mit numerischem System ohne Namen oder Geburtsdatum Anwendung.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Patienten bereits vorbehandelt oder nahmen an therapeutischen Studien teil. Die bei dem Patientenkollektiv zur Anwendung gekommenen Therapien beinhalteten Steroide, PUVA, Retinoide, lokale Zytostatikatherapie sowie Radiatio.

**Tabelle 3.1:** Eigenschaften der in die Studie eingeschlossenen Patienten: Alter (Geburtsjahr) und Geschlecht (w = weiblich, m = männlich), diagnostizierte Krankheiten und Lokalisation (UA = Unterarm, OA = Oberarm, US = Unterschenkel, OS = Oberschenkel) der konfokalmikroskopisch untersuchten Läsionen sowie der untersuchten gesunden Hautstellen (Normal).

Patient Nr.	Geburtsjahr/ Geschlecht	Diagnose/Stadium	Läsion
1	1937/w	Sézary Syndrom	Arm links
			Brust
		Gesunde Kontrolle	Arm links
2	1934/m	MF, Ekzemstadium	UA rechts
			OA rechts
		Gesunde Kontrolle	Bauch
3	1933/w	MF, Plaquestadium	Knie rechts
			Knie
		Gesunde Kontrolle	
4	1935/m	MF, Plaquestadium	Bauch
			Unterarm
		Gesunde Kontrolle	Bauch
5	1962/m	MF, Ekzemstadium	Handgelenk
			Bauch
		Gesunde Kontrolle	Bauch
6	1938/m	Parapsoriasis	Oberschenkel
7	1954/m	MF, Plaquestadium, in Therapie	Unterarm
			Oberarm
		Lymphomatoide Papulose	Handgelenk
			Oberarm
8	1935/m	Lymphomatoide Papulose	Unterschenkel

9	1977/m	MF, Tumorstadium	Knoten OS
			Plaque OS
10	1937/w	Parapsoriasis	US links
			US rechts
11	1960/w	MF, Ekzemstadium	Rücken links
			OS links
		Lymphomatoide Papulose	Arm
		Gesunde Kontrolle	Oberschenkel
12	1933/m	MF, Plaquestadium	OA rechts
		Gesunde Kontrolle	UA rechts
13	1964/m	MF, Tumorstadium	Plaque Taille
			Knoten UA
			Ohr
14	1960/m	MF, Ekzemstadium	Brust links
			Brust rechts
		Gesunde Kontrolle	Brust
15	1943/m	Parapsoriasis	OS links
			OS links hinten
		Gesunde Kontrolle	OS links normal

w = weiblich, m = männlich, UA = Unterarm, OA = Oberarm, US = Unterschenkel, OS = Oberschenkel

### 3.3 Morphologische Analyse

Innerhalb jeder Hautebene (Stratum corneum, granulosum, spinosum, dermoepidermale Junktionszone und Dermis) wurden jeweils ca. 6 Einzelbilder (Dimensionen 500x500 µm), 1-2 XYZ Mappen von Größe (Dimensionen mm) und in Einzelfällen sogenannte VivaStacks in der Z-Ebene angefertigt, wodurch die einzelnen Parameter für den jeweiligen Patienten dokumentiert wurden.

Aus diesem Bildmaterial wurde vom Untersucher eine Auswahl von jeweils 10 repräsentativen Bildern von jeder Hautstelle zusammengestellt und so einer verblindeten Beurteilung durch zwei unabhängige Untersucher, die bereits über Erfahrung mit der konfokalen Lasermikroskopie verfügten, zugeführt. Davor erhielten diese anhand eines Bild-Trainings eine Einführung in die Bildinterpretation des konfokalen Mikroskops unter Einbezug aller bislang beschriebenen Merkmale der Mycosis fungoides. Die Verblindung erfolgte in Bezug auf die Diagnose, den Untersuchungszeitpunkt, vorangegangene Therapien, Alter und Geschlecht des Patienten. Das Scoring der Einzelbilder erfolgte mit Hilfe eines binären Klassifikationssystems (vorhanden/ nicht vorhanden). Während der Untersuchung wurden die Bilder nach allen Parametern gemustert, die zuvor in der Studie von Agero et al. postuliert worden waren [40]. Tabelle 3.2 zeigt das benutzte Studienprotokoll mit

den untersuchten Parametern, unterteilt nach epidermalen und dermalen Befunden sowie Befunden in der dermoepidermalen Junktionszone.

**Tabelle 3.2:** Das angewendete Studienprotokoll mit den konfokalmikroskopischen Parametern, bewertet nach einem binären Klassifikationssystem.

<b>Konfokalmikroskopische Parameter</b>	<b>Fehlend</b> -	<b>Vorhanden</b> +
<b>Epidermale Befunde</b>		
Epidermotrope atypische Lymphozyten		
Epidermale Unordnung		
Spongiose		
Verschwommene interzelluläre Abgrenzungen		
Vesikelartige Strukturen (Pautrier'sche Mikroabszesse)		
Keratinocyten mit länglichen Zellkernen		
Dendritische Zellen		
<b>Befunde in der dermoepidermalen Junktionszone</b>		
Blasse Basalzellen/ Schwach reflektierende Ringe		
Atypische Lymphozyten		
<b>Befunde in der Dermis</b>		
Schwach reflektierende Strukturen (Atypische Lymphozyten)		
Dilatierte Gefäße		
Kollagen/ Fibrose		

### 3.4 Statistische Analyse

Nach Abschluss der klinischen Untersuchungen wurden ausgesuchte konfokalmikroskopische Bilder einer verblindeten Analyse durch zwei unabhängige Untersucher zugeführt. Die Ergebnisse des verblindeten Scorings wurden mithilfe des Chi<sup>2</sup>-Tests und des Cochran-Tests statistisch ausgewertet und anschließend einer Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse zugeführt. Die Datenanalyse erfolgte mithilfe entsprechender Software (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

#### 3.4.1 Cochran-Test

Der Cochran-Test wird eingesetzt, um die Homogenität der Varianzen bei mehreren Stichproben zu überprüfen. Wird ein Alternativmerkmal mehr als zweifach gemessen, lässt sich mithilfe des Q-Tests nach Cochran (1950) prüfen, ob die Häufigkeiten für die Merkmalskategorien konstant bleiben oder ob Veränderungen eintreten. Im Rahmen

dieser Studie wurde auf diese Weise die Konkordanz zwischen den verschiedenen Untersuchern analysiert.

Die für diese Studie formulierte Nullhypothese lautet, dass alle Untersucher zur gleichen Diagnose kommen. Die Alternativhypothese lautete dementsprechend, dass mindestens ein Untersucher zu einem anderen Ergebnis kommt. Bei einem p-Wert  $>0,05$  muss die Nullhypothese nicht verworfen werden, in diesem Fall besteht also eine signifikante Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Untersucher.

### 3.4.2 Chi<sup>2</sup>-Test

Mit dem Chi<sup>2</sup>-Test können Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit untersucht werden. Es erfolgt eine Prüfung, wie gut die beobachtete Verteilung von Alternativdaten mit der gemäß der Nullhypothese H<sub>0</sub> erwarteten Verteilung übereinstimmt. Er wird insbesondere bei größeren Stichproben eingesetzt. In dieser Studie wurde der Chi<sup>2</sup>-Test zur Analyse der Verteilung der einzelnen Parameter bei den verschiedenen Erkrankungen (MF, Parapsoriasis, Sézary Syndrom, Lymphomatoide Papulose, normale Haut) benutzt. Dabei wurde das Vorhandensein/ die Abwesenheit eines Merkmals in kranker Haut in Beziehung zu dessen Auftreten in gesunder Haut gesetzt.

Die für diese Studie formulierte Nullhypothese H<sub>0</sub> ging davon aus, dass die einzelnen konfokalmikroskopischen Parameter in normaler und kranker Haut zu gleichen Anteilen vorhanden sind. Die Alternativhypothese H<sub>1</sub> behauptete dementsprechend, dass die Parameter in normaler und kranker Haut unterschiedlich oft vorkommen.

Bei errechneten p-Werten  $<0,05$  kann die Nullhypothese verworfen werden und es ist wahrscheinlich, dass das Merkmal nicht gleich verteilt ist. Für einen diagnostischen Test (konfokalmikroskopische Lasermikroskopie) ist dies ein positives Merkmal, weil es bedeutet, dass der Parameter in gesunder und in kranker Haut unterschiedlich oft entdeckt wird.

### 3.4.3 Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse

Sensitivität und Spezifität sind Maße zur Beschreibung der Güte eines diagnostischen Tests. Die Sensitivität eines diagnostischen Tests bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, eine tatsächlich positive Diagnose auch durch ein positives Testergebnis zu erkennen. Sie gibt also den Anteil der richtig als positiv erkannten Erkrankten an der Gesamtheit der in Wirklichkeit Erkrankten an. Umgekehrt gibt die Spezifität die Wahrscheinlichkeit



an, bei einer tatsächlich negativen Diagnose auch ein negatives Testergebnis zu erhalten. Sie bezeichnet also den Anteil der richtig als gesund Erkannten an allen tatsächlich Gesunden. In der vorliegenden Studie wurden diese Analysen im Vergleich zum Goldstandard der histologischen auf ihre Sensitivität und Spezifität hin analysiert.

## **4. Ergebnisse**

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie dargestellt. Nach klinischer und konfokalmikroskopischer Auswertung konnten 15 Patienten mit insgesamt 39 erfassten Läsionen (n=39) in die endgültige Analyse eingeschlossen werden. Die im Rahmen der Untersuchung erfassten Bilder wurden zunächst einer rein deskriptiv-morphologischen Analyse unterzogen, danach erfolgte die statistische Berechnung der Konkordanz zwischen den Untersuchern. Die Merkmale, die eine relevante Übereinstimmung zwischen den Untersuchern erbrachten, wurden schließlich in die Chi<sup>2</sup>- sowie die Sensitivitäts- und Spezifitätsanalysen miteinbezogen.

Die Diagnose der MF anhand der konfokalmikroskopischen Bilder wurde durch die zwei verblindeten Untersucher insgesamt in 84% bzw. 90% richtig gestellt. Die Untersucher diagnostizierten insgesamt lediglich fünf Läsionen falsch: in vier Fällen wurde das Vorliegen einer Parapsoriasis vermutet. In einem Fall wurde eine MF fälschlicherweise als normale Haut eingestuft.

### **4.1. Studienpopulation**

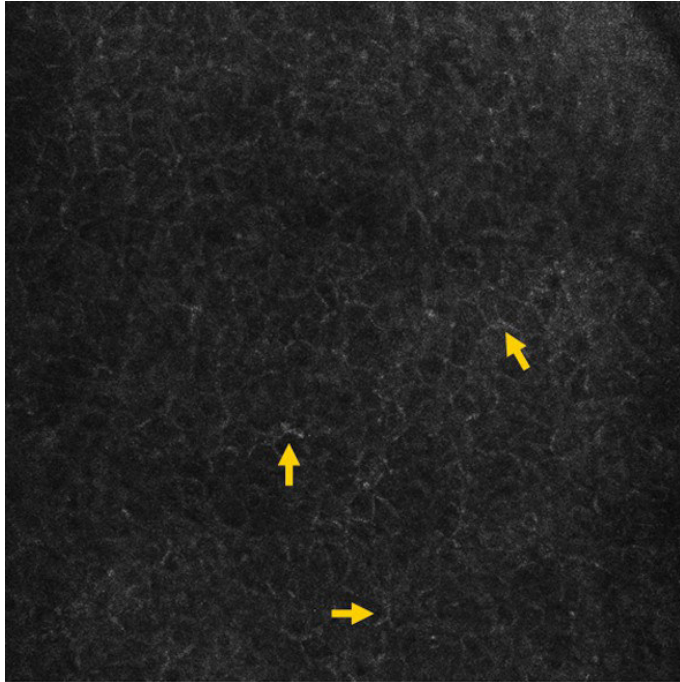
Die Eigenschaften der in die Studie eingeschlossenen Patienten sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Es wurden zehn Patienten mit vorab histologisch gesicherter Mycosis fungoides, drei mit Parapsoriasis en plaque, drei mit lymphomatoider Papulose und ein Patient mit Sézary-Syndrom eingeschlossen. Hiervon wiesen zwei Patienten das gleichzeitige Bestehen von Mycosis fungoides und Lymphomatoider Papulose auf. Von allen Patienten wurden je nach klinischer Ausprägung mehrere Teststellen konfokalmikroskopisch untersucht, so dass insgesamt für die MF 19 Läsionen, für die Parapsoriasis fünf Läsionen, für das Sézary-Syndrom zwei Läsionen sowie für die lymphomatoide Papulose vier Läsionen in die Analyse einbezogen wurden. Des Weiteren wurden insgesamt neun Teststellen normaler Haut untersucht.

### **4.2 Morphologische konfokalmikroskopische Analyse der MF**

Die während unserer Analyse erhobenen Bilder waren weitestgehend in Übereinstimmung mit den vorab publizierten Daten zur konfokalen Lasermikroskopie der MF. Die Einzelparameter werden im folgenden Abschnitt im Detail beschrieben, in der Reihenfolge der laut Chi<sup>2</sup>-Analyse am häufigsten beobachteten Veränderungen.

#### 4.2.1 Spongiose

Spongiose konnte mithilfe der konfokalmikroskopischen Analyse dargestellt werden. Hierbei stellten sich die interzellulären Abgrenzungen im Vergleich zur normalen Haut heller und verbreitert dar (siehe Abbildung 4.1). Dies lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass die interzelluläre Ödembildung die Zell-Zellgrenzen mit höherer Reflexion zur Darstellung bringt.



**Abb. 4.1:** Konfokalmikroskopische Aufnahme in der Ebene des Stratum spinosum: die interzellulären Abgrenzungen erscheinen als Zeichen der Spongiose heller und verbreitert (gelbe Pfeile).

**Abb. 4.1**

#### 4.2.2 Epidermale Unordnung

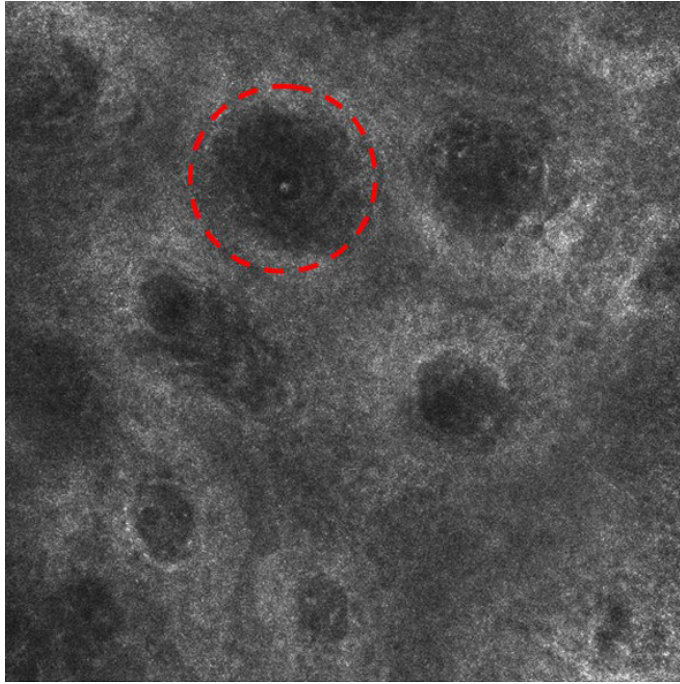
Das Merkmal der epidermalen Unordnung war in der mikroskopischen Untersuchung charakterisiert durch den Verlust des typischen Honigwabenmusters (siehe Abbildung 4.4). Die Zellen des Stratum spinosum und granulosum zeigten unterschiedlich ausgeprägte Kernpolymorphie bzw. Zellgrößen, wodurch die regelhafte epidermale Architektur aufgehoben scheint.

#### 4.2.3 Verschwommene interzelluläre Abgrenzungen

Als weiteres Merkmal wurden verschwommene interzelluläre Abgrenzungen beobachtet. Hierbei waren Zellgrenzen erschwert zu erkennen und es konnte zwischen fokaler, multifokaler und diffuser Verteilung unterschieden werden. (Abbildung 4.7)

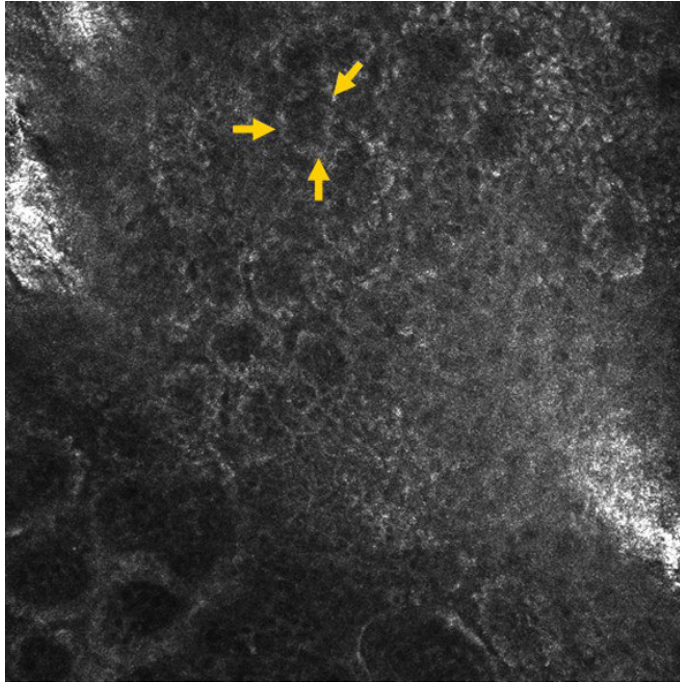
#### 4.2.4 Schwach reflektierende Papillen

Die Basalzellen konnten konfokalmikroskopisch als schwach reflektierende, also weniger hell erscheinende Ringe, die den Papillenspitzen entsprechen, dargestellt werden (Abbildung 4.2). Die abgeschwächte Reflexion wird mit einer Infiltration der Basalzellen mit Lymphozyten und Entzündungszellen erklärt. Innerhalb der Papillenspitzen konnte oftmals Blutfluss beobachtet werden.



**Abb. 4.2:** Konfokalmikroskopische Aufnahme auf Höhe der dermoepidermalen Junktionszone mit ringförmig um die dunkel erscheinenden Papillen (roter Kreis) angeordneten Basalzellen, die im Vergleich zur klinisch gesunden Haut des gleichen Patienten (Abb. 4.3) signalarm, d.h. dunkel erscheinen.

**Abb. 4.2**

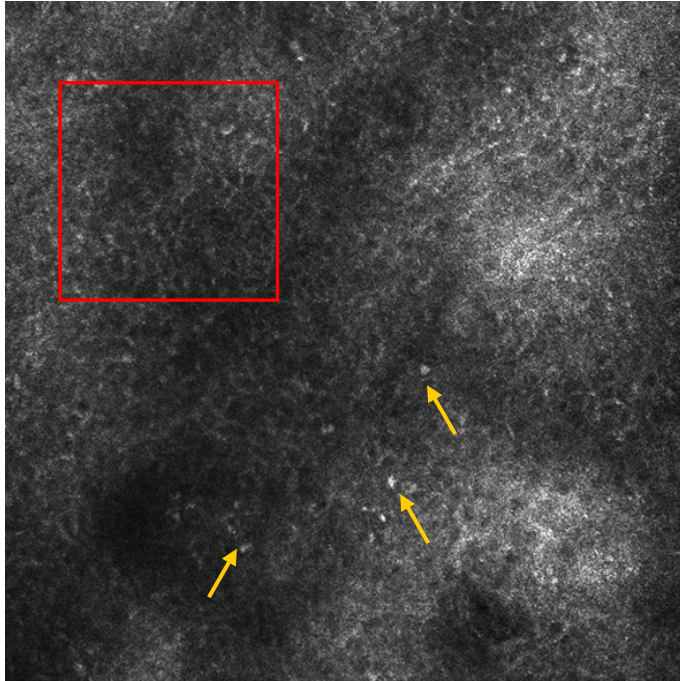


**Abb. 4.3:**  
Konfokalmikroskopische Aufnahme in der Ebene der dermoepidermalen Junctionszone. In der klinisch gesunden Haut desselben Patienten kommen die Basalzellen deutlich heller und z.T. voneinander abgrenzbar zur Darstellung (gelbe Pfeile).

**Abb. 4.3**

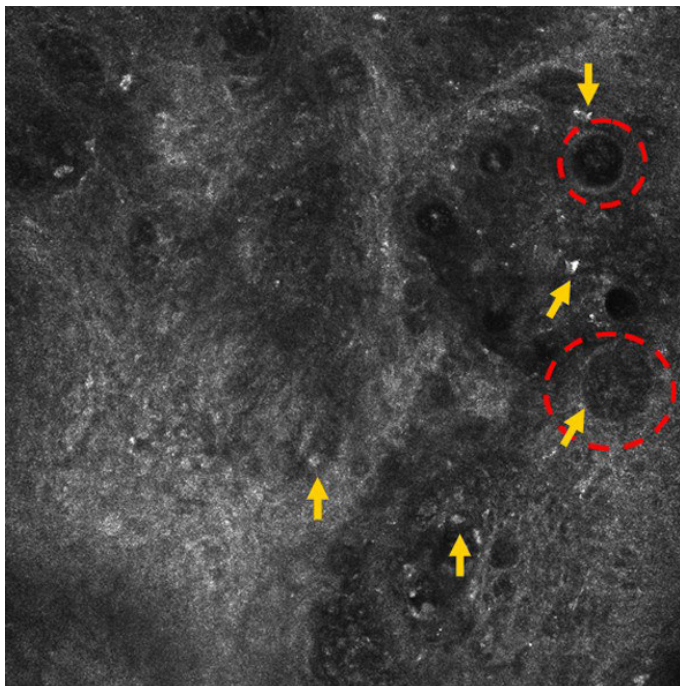
#### 4.2.5 Atypische Lymphozyten

Atypische Lymphozyten stellten sich im konfokalen Lasermikroskop als schwach reflektierende, ovale bis runde Zellen mit einem Durchmesser von 4 bis 8  $\mu\text{m}$  dar (siehe Abbildungen 4.4 und 4.5, 4.13). Sie konnten in Gruppen oder einzeln verteilt entdeckt werden und wurden des Weiteren nach ihrer Lokalisation in epidermale (EAL), junktionale (JAL) und dermale (DAL) atypische Lymphozyten unterschieden. In der Epidermis wurden die Zellen im Stratum spinosum und granulosum vorgefunden (Abbildung 4.4), in der dermoepidermalen Junctionszone erschienen sie am Rande der Papillenspitzen (Abbildung 4.5) und in der Dermis waren sie in der bindegewebigen Matrix zu erkennen. Typische Veränderungen wie cerebriforme Zellkerne und Zellen mit einem hellen Randsaum, wie sie charakteristischerweise in der Histologie beschrieben werden, konnten mit dem konfokalen Lasermikroskop nicht dargestellt werden.



**Abb. 4.4:**  
 Konfokalmikroskopische Aufnahme auf der Ebene des Stratum spinosums: Lymphozyten, die sich als rundliche, helle Zellen darstellen, sind in der Epidermis verteilt (gelbe Pfeile). Des Weiteren ist eine deutliche epidermale Unordnung zu erkennen, das übliche Honigwabemuster des Stratum spinosum ist nahezu aufgehoben und ersetzt durch unregelmäßig große Zellen mit unterschiedlicher Kernmorphologie (roter Kasten).

**Abb. 4.4**



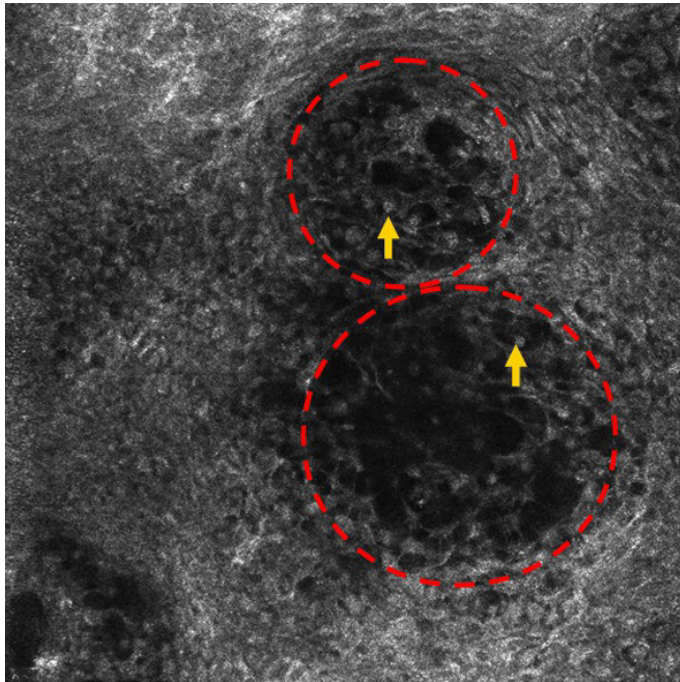
**Abb. 4.5:**  
 Konfokalmikroskopische Aufnahme in der Ebene der dermoepidermalen Junctionszone. Die Papillen lassen sich als runde Strukturen (rote Kreise) von der epidermalen Umgebung abgrenzen. Es sind Lymphozyten erkennbar (gelbe Pfeile).

**Abb. 4.5**

#### 4.2.6 Vesikelartige Strukturen

In einigen Teststellen stellten sich konfokalmikroskopisch vesikelartige Strukturen dar, von denen angenommen wird, dass sie den Pautrier'schen Mikroabszessen entsprechen. Diese kamen in den oberen Epidermisschichten, also subcorneal, als dunkle, polyzyklisch begrenzte Strukturen zur Darstellung, in denen sich diskrete

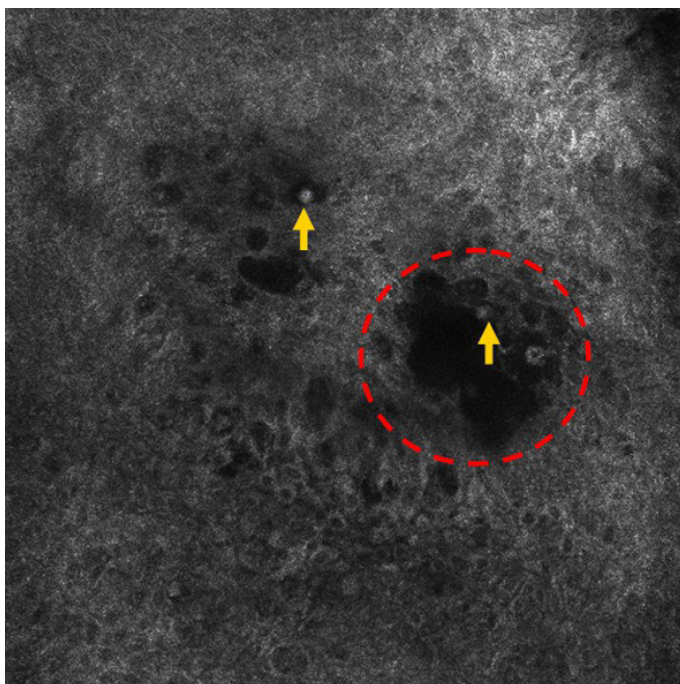
Ansammlungen ovaler bis rundlicher, schwach bis mäßig reflektierender Zellen befinden, die atypischen Lymphozyten entsprechen (Abbildungen 4.6 und 4.7). Ihre Ausdehnung reichte von den subcornealen Zellschichten bis in die Basalzellschicht. Teilweise konnten nur einzelne vesikelartige Strukturen entdeckt werden, in anderen Fällen waren sie multipel in der Epidermis verteilt.



**Abb. 4.6**

**Abb. 4.6:**

Die konfokalmikroskopische Aufnahme in der Ebene des Stratum spinosums zeigt das charakteristische Bild eines Pautrier'schen Mikroabszesses. Diese sind als vesikel- oder mikrovesikelartige dunkle Hohlräume mit unscharfer Abgrenzung zur Umgebung zu erkennen (auf der Abb. durch rote Kreise markiert), in deren Lumen sich rundliche bis ovale schwach reflektierende Zellen befinden (gelbe Pfeile). Letztere entsprechen möglicherweise Entzündungszellen oder apoptotischen Keratinozyten.



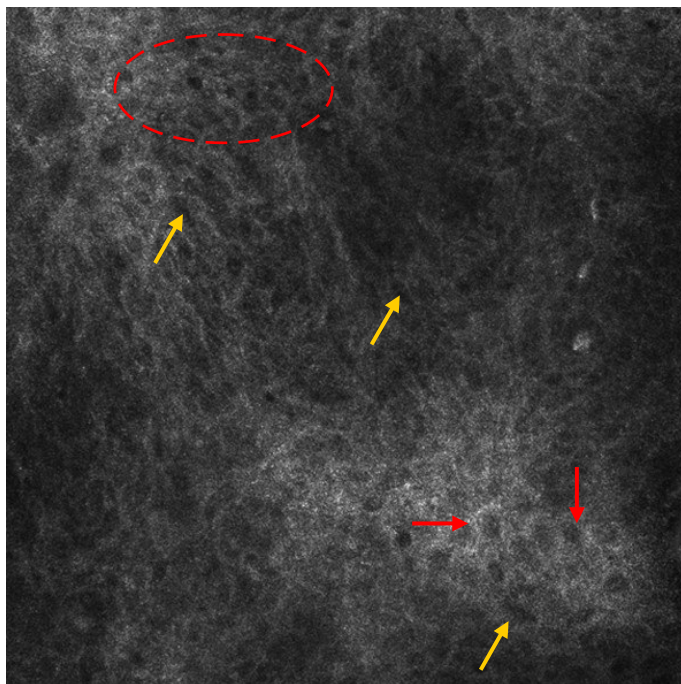
**Abb. 4.7**

**Abb. 4.7:**

Die konfokalmikroskopische Aufnahme in der Ebene des Stratum granulosums zeigt Lymphozyten als schwach reflektierende rundliche Zellen (gelbe Pfeile) innerhalb der polyzyklisch begrenzten dunklen Hohlräume (roter Kreis). Des Weiteren stellen sich die interzellulären Abgrenzungen deutlich verschwommen dar. Die epidermale Architektur wirkt unordentlich.

#### 4.2.7 Keratinozyten mit länglichen Zellkernen

Die in der Studie von Agero et al. beschriebenen Keratinozyten mit -im Vergleich zu den charakteristischerweise polygonalen dunklen Zellkernen- länglichen Zellkernen konnten ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 4.8). Die Morphologie der Keratinozyten kanneinerseits als mögliches Korrelat für atypische Lymphozyten gewertet werden oder ebenfalls als Ausdruck der deutlichen Spongiose mit Aufhebung der normalen epidermalen Architektur.



**Abb. 4.8:**

Die konfokalmikroskopische Aufnahme in der Ebene des Stratum granulosums zeigt Keratinozyten mit länglichen Zellkernen, die sich als dunkle, länglich- ovale Strukturen darstellen (gelbe Pfeile). Im Vergleich dazu stellen sich die Zellkerne der benachbarten Keratinozyten rundlicher dar (rote Pfeile).

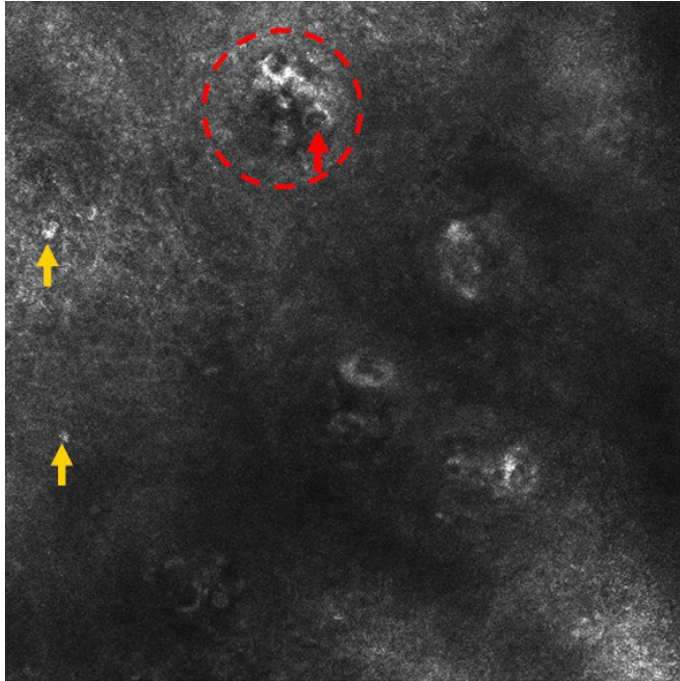
Als weitere Auffälligkeiten stellt sich die Epidermis verschwommen und ungeordnet dar. Am oberen Bildrand sind siebartige Perforationen zu sehen (roter Kreis).

**Abb. 4.8**

#### 4.2.8 Dilatierte Gefäße

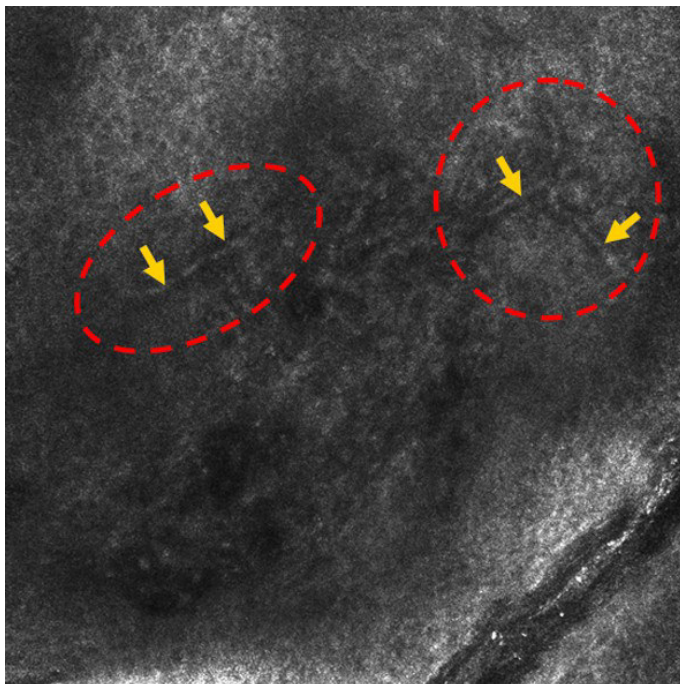
Dilatierte Gefäße konnten konfokalmikroskopisch ebenfalls beobachtet werden. Sie stellten sich innerhalb der Papillenspitzen als schleifenförmige, U-förmige oder kanalikuläre Strukturen dar (Abbildungen 4.9 und 4.10). Während der Untersuchung konnten sich im Blutstrom bewegende Erythrozyten beobachtet werden. Ein Gefäß wurde als dilatiert eingestuft, wenn sich das Gefäßlumen im Vergleich zur gesunden Haut verbreitert darstellte, bzw. einen beschleunigten Blutfluss aufwies.





**Abb. 4.9:** Konfokalmikroskopische Aufnahme auf Höhe der dermoepidermalen Junctionszone zeigt hell erscheinende, halbmondförmige Strukturen, die innerhalb schwach reflektierenden Papillen (roter Kreis) zur Darstellung kommen und den Anschnitten von Kapillaren mit verdickten Gefäßwänden entsprechen. Die Gefäßlumina selbst kommen dunkel zur Darstellung (roter Pfeil). Außerdem kommen Lymphozyten zur Darstellung (gelbe Pfeile).

**Abb. 4.9**



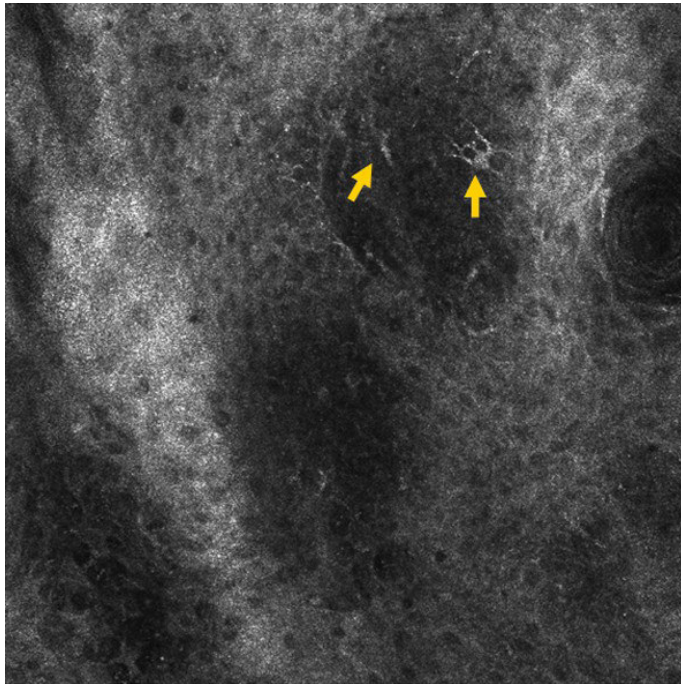
**Abb. 4.10:** Konfokalmikroskopische Aufnahme auf Höhe der dermoepidermalen Junctionszone zeigt länglich-kanalikuläre Strukturen (gelbe Pfeile/ rote Kreise), die elongierten und dilatierten Gefäßen entsprechen. In der in-vivo-Untersuchung ist hier Blutfluss zu erkennen, durch den Gehalt an erythrozytärem Hämoglobin kommen die Gefäßstrukturen hell zur Darstellung.

**Abb. 4.10**

#### 4.2.9 Dendritische Zellen

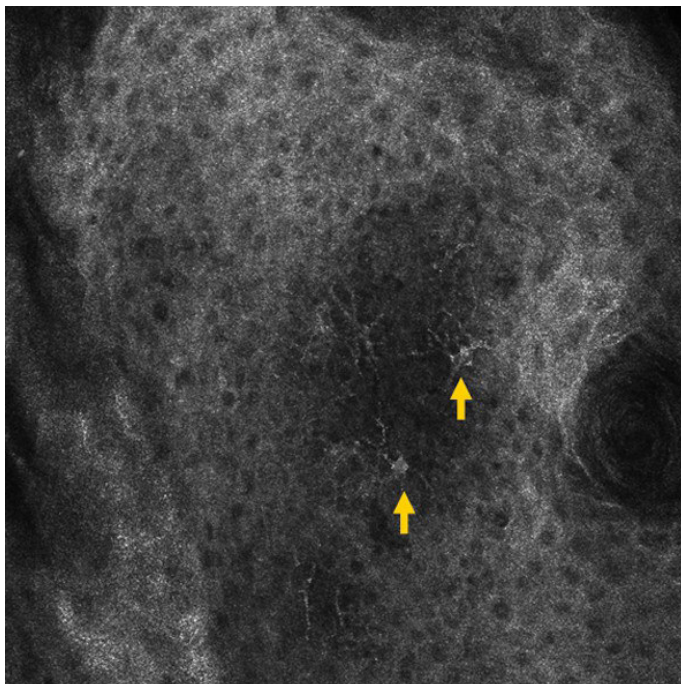
Dendritische Zellen stellten sich in der konfokalmikroskopischen Analyse als hell erscheinende Zellen mit feingliedrig verzweigten Zellfortsätzen dar (Abbildungen 4.11 und 4.12). Oft konnten nur einzelne dendritische Zellen in der Epidermis entdeckt

werden. In einem Fall waren die dendritischen Zellen in deutlicher örtlicher Beziehung zu den Papillenspitzen in Höhe der dermoepidermalen Junctionszone zu finden.



**Abb. 4.11**

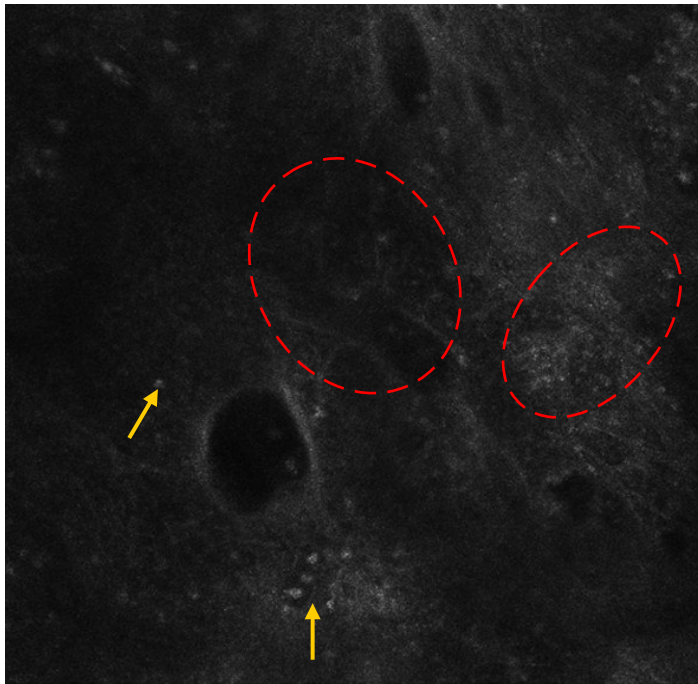
**Abb. 4.11 und 4.12:** Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen in der Ebene des Stratum granulosum zeigen mehrere stark reflektierende Zellen mit feingliedrig verzweigten Dendriten (gelbe Pfeile). In **Abb. 11** kommen diese randständig im Bereich eines unregelmäßig begrenzten, dunkel erscheinenden Hohlraums zur Darstellung, welcher am ehesten einem Pautrier'schen Mikroabszess entspricht.



**Abb. 4.12**

#### 4.2.10 Fibrose/ Kollagenbündel

Auch das Merkmal des fibrotischen Umbaus der oberen Dermis kam mithilfe der konfokalen Lasermikroskopie zur Darstellung. Die zu Bündeln angeordneten Kollagenfasern stellen sich konfokalmikroskopisch als in eine Richtung ziehende, schwach reflektierende, helle Strukturen dar (Abbildung 4.13).



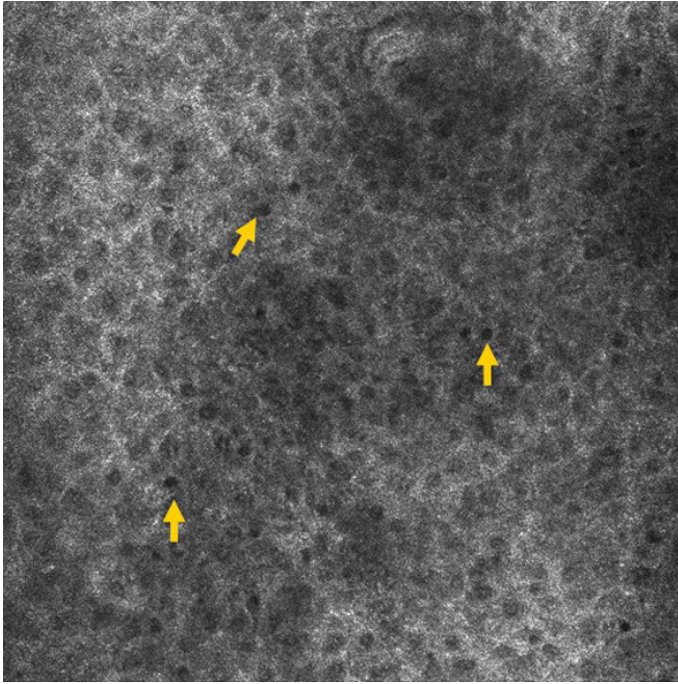
**Abb. 4.13:**

Konfokalmikroskopische Aufnahme auf Höhe der dermoepidermalen Junktionszone mit Anschnitten der oberen Dermis. Es stellen sich hell erscheinende und in eine bestimmte Richtung ziehende Strukturen dar, die am ehesten einem fibrotischen Umbau der oberen Dermis entsprechen (rote Kreise, rechter oberer Bildrand). Des Weiteren sind zahlreiche Lymphozyten zu sehen (gelbe Pfeile).

**Abb. 4.13**

#### 4.2.11 Siebartige Perforationen

Während der Untersuchungen im Rahmen dieser Studie wurde als weiteres, in bisherigen Arbeiten noch nicht beschriebenes Merkmal, das Vorhandensein siebartiger, schwarzer Perforationen innerhalb der Epidermis entdeckt und in die statistische Analyse miteinbezogen. Diese stellen sich als kleine, dunkle Löcher im Stratum granulosum und spinosum dar, die teils einzeln, meist jedoch gruppiert zu finden sind (Abbildung 4.14). Als histomorphologisches Korrelat hierzu kommen sowohl frühe Pautrier'sche Mikroabszesse sowie eine ausgeprägte Spongiose in Frage.



**Abb. 4.14:** Konfokalmikroskopische Aufnahme in der Ebene des Stratum granulosum zeigt zahlreiche dunkle, runde, lochartige Strukturen innerhalb der Epidermis, deren Architektur mit verschwommenen Zellgrenzen ungeordnet wirkt.

**Abb. 4.14**

### 4.3 Ergebnisse der statistischen Analyse

#### 4.3.1 Konkordanzbestimmung

Mithilfe des Cochran-Tests wurde die Homogenität unter den einzelnen Untersuchern analysiert. Für einige Merkmale konnten mit p-Werten zwischen 0,867 und 0,069 signifikante Konkordanzwerte, also eine Übereinstimmung zwischen den Untersuchern gezeigt werden. Bei p-Werten unter 0,05 wurde keine Konkordanz angenommen, dies war bei den Merkmalen der „siebartigen Perforationen“, der „vesikelartigen Strukturen“, der „Fibrose“, der „dermalen atypischen Lymphozyten“ und der „Keratinozyten mit länglichen Zellkernen“ der Fall. Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse der Cochran-Analyse.

**Tabelle 4.1:** Ergebnis der Cochran-Analyse, in absteigender Reihenfolge der p-Werte. Bei p-Werten <0,05 wurde keine Übereinstimmung zwischen den Untersuchern angenommen (n.k.= nicht konkordant)

Rang	Konfokalmikroskopischer Parameter	p-Wert
1	Junktionale atypische Lymphozyten	0,867
2	Epidermale Unordnung	0,848
3	Spongiose	0,811
4	Hyporeflexion der Papillen	0,670
5	Dilatierte Blutgefäße	0,420
6	Epidermale atypische Lymphozyten	0,156
7	Verschwommene Zellgrenzen	0,093
8	Dendritische Zellen	0,069
9	Siebartige Perforationen	0,039, n.k.
10	Vesikelartige Strukturen	0,030, n.k.
11	Fibrose	0,017, n.k.
12	Dermale atypische Lymphozyten	0,002, n.k.
13	Keratinocyten mit länglichem Zellkern	0,0001, n.k.

n.k.= nicht konkordant

#### 4.3.2 Chi<sup>2</sup>-Analyse

Mit der Chi<sup>2</sup>-Analyse wurden die Verteilungseigenschaften der einzelnen Parameter in den verschiedenen Krankheiten erfasst. Bis auf die Merkmale der „siebartigen Perforationen“ und der „Fibrose“ erreichten in den Beobachtungen von Untersucher 1 (UNT I) alle Parameter Signifikanzniveau, was bedeutet, dass ihre Verteilung in den verschiedenen Erkrankungen bzw. gesunder Haut nicht gleich ist. In den Beobachtungen des zweiten verblindeten Untersuchers (UNT II) konnten für die Merkmale der „dendritischen Zellen“ und der „Fibrose“ kein Signifikanzniveau erreicht werden. Für ausgewählte Parameter konnten exzellente Signifikanzniveaus mit p-Werten <0,0001 erreicht werden. (Tabelle 4.2)

Im folgenden Text sind exemplarisch die Untersuchungsergebnisse des ersten Untersuchers (UNT I) beschrieben und in einer Rangliste nach deren Häufigkeit sortiert, die Ergebnisse beider Untersucher sind in der Tabelle zu finden.

**Tabelle 4.2:** p-Werte der einzelnen Parameter in der Chi<sup>2</sup>-Analyse beider Untersucher. Bei einem p-Wert >0,05 wurde keine Signifikanz angenommen.

Konfokalmikroskopischer Parameter	p-Wert UNT I	p-Wert UNT II
Spongiose	0,0001	0,0001
Verschwommene Zellgrenzen	0,0001	0,0001
Junktionale atypische Lymphozyten	0,0001	0,0001
Epidermale atypische Lymphozyten	0,0001	0,001
Vesikelartige Strukturen	0,0001	0,023
Epidermale Unordnung	0,001	0,0001
Dermale atypische Lymphozyten	0,001	0,0001
Keratinocyten mit länglichem ZK	0,003	0,032
Hyporeflexion der Papillen	0,004	0,0001
Dendritische Zellen	0,007	0,094*
Dilatierte Gefäße	0,044	0,0001
Siebartige Perforationen	0,273*	0,039
Fibrose/ Kollagenbündel	0,376*	0,115*

\*= nicht signifikant

#### 4.3.2.1 Mycosis fungoides

Bei der Mycosis fungoides wurden Spongiose und verschwommene Zellgrenzen mit 94,7% am häufigsten beobachtet, gefolgt von epidermaler Unordnung (89,5%) und schwach reflektierenden Papillen (78,9%). Vesikelartige Strukturen, epidermale sowie junktionale atypische Lymphozyten wurden in 73,7% der MF-Läsionen als „vorhanden“ beschrieben. In lediglich drei Läsionen (16%) konnte in der verblindeten Analyse kein Epidermotropismus, egal ob in Form Pautrier'scher Mikroabszesse, epidermaler oder junktionaler Lymphozyten beobachtet werden. Etwa gleich oft als vorhanden wie als nicht vorhanden erkannt wurden dermale Lymphozyten (63,2%), Keratinocyten mit länglichen Zellkernen (63,2%), dilatierte Blutgefäße (57,9%), Fibrose (52,6%) und dendritische Zellen (52,6%). Siebartige Perforationen wurden nur in 21,1% der Fälle beschrieben, ihr Vorhandensein erreichte zudem kein Signifikanzniveau. (Tabelle 4.3)

**Tabelle 4.3:** Ergebnis der Chi<sup>2</sup>-Analyse für die Mycosis fungoides, sortiert nach den Parametern, die von Untersucher 1 (UNT I) am häufigsten beobachtet wurden.

Rang	Konfokalmikroskopischer Parameter	UNT I	UNT II
1	Spongiose	94,7	100
	Verschwommene Zellgrenzen	94,7	94,7
2	Epidermale Unordnung	89,5	100
3	Hyporeflexion der Papillen	78,9	84,2
4	Epidermale atypische Lymphozyten	73,7	68,4
	Vesikelartige Strukturen	73,7	52,6
	Junktionale atypische Lymphozyten	73,7	84,2
5	Dermale atypische Lymphozyten	63,2	73,7
	Keratinocyten mit länglichem Zellkern	63,2	42,1
6	Dilatierte Blutgefäße	57,9	78,9
7	Dendritische Zellen	52,6	36,8*
	Fibrose/ Kollagenbündel	52,6*	57,9*
8	Siebartige Perforationen	21,1*	47,4

\*= nicht signifikant

#### 4.3.2.2 Parapsoriasis

Bei der Parapsoriasis konnten nur wenige Merkmale mit dem konfokalen Lasermikroskop beschrieben werden. Dies waren die Merkmale der epidermalen Unordnung und der Fibrose, zudem wurden Spongiose und schwach reflektierende Papillen beobachtet. Bei insgesamt nur 5 Gesamtproben entfällt eine statistische Analyse.

#### 4.3.2.3 Sézary-Syndrom

Im Falle des Sézary-Syndrom konnten beinahe alle untersuchten Parameter beschrieben werden. Lediglich Keratinocyten mit länglichen Zellkernen konnten in keiner der Läsionen entdeckt werden. Da lediglich zwei Läsionen von Patienten mit Sézary-Syndrom untersucht wurden entfällt eine statistische Analyse.

#### 4.3.2.4 Lymphomatoide Papulose

Bei der Lymphomatoiden Papulose wurden in jeder der Läsionen die Merkmale Spongiose, verschwommene Zellgrenzen, junktionale und dermale atypische Lymphozyten, epidermale Unordnung sowie schwach reflektierende Papillen beobachtet. Epidermale atypische Lymphozyten sowie Fibrose, vesikelartige Strukturen und dendritische Zellen wurden hingegen seltener entdeckt. Eine statistische Analyse entfällt bei insgesamt nur vier Gesamtläsionen. Ungewöhnliche Gefäßstrukturen und Gefäßwandveränderungen, die während der Untersuchung beschrieben wurden, fanden keinen Eingang in die Analyse. Dies begründet sich damit, dass diese während

der Analyse erstmalig beobachtet wurden und sich zudem sehr von den MF-typischen Wandveränderungen unterscheiden.

#### 4.3.3 Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse

Mit Hilfe der Sensitivität und Spezifität kann die Wertigkeit der einzelnen Parameter für die Diagnosestellung beschrieben werden. In diese Analyse wurden nur Parameter einbezogen, die sich in der Konkordanzbestimmung als relevant erwiesen haben bzw. in vorangegangenen Studien als diagnostisches Hauptkriterium für die Diagnose der MF beschrieben wurden. Aufgrund der geringen Konkordanz in der vorangegangenen Analyse fanden die Parameter Fibrose (FIB), dermale atypische Lymphozyten (DAL) sowie Keratinozyten mit länglichen Zellkernen (KEN) in dieser Analyse keinen Eingang. Für das Merkmal der vesikelartigen Strukturen konnte zwar keine Konkordanz nachgewiesen werden, da in dieser Studie jedoch angenommen wurde, dass es sich hierbei um die pathognomonischen Pautrier'schen Mikroabszesse handelt und diese ein diagnostisches Hauptkriterium darstellen, nahm es dennoch Einzug in die Analyse. Da im Falle des Sézary-Syndroms, der Parapsoriasis und der lymphomatoiden Papulose nur mit sehr kleinen Gesamtproben gearbeitet wurde, entfällt hier eine Errechnung der Sensitivität und Spezifität, lediglich für die Mycosis fungoides war ein ausreichend großer Gesamtprobenumfang gegeben.

Im folgenden Text werden exemplarisch die Ergebnisse von Untersucher 1 beschrieben. Die Ergebnisse beider Untersucher sind in den darauffolgenden Tabellen zu sehen.

##### 4.3.3.1 Mycosis fungoides

Bei der Mycosis fungoides zeigte sich, dass verschwommene Zellgrenzen sowie Spongiose mit je 95% die höchste Sensitivität aufweisen, gefolgt von epidermaler Unordnung (90%) und schwach reflektierenden Papillen (80%). Als weniger sensitiv jedoch hochspezifisch erwiesen sich die vesikelartigen Strukturen, epidermalen und junktionalen atypischen Lymphozyten. Für diese Merkmale wurden jeweils eine Sensitivität von 74% und eine Spezifität von 100% erreicht. Eine untergeordnete Rolle in der konfokalmikroskopischen Diagnostik der MF spielt hingegen die Erweiterung der Blutgefäße mit nur mäßigen Werten sowohl für die Sensitivität (58%) als auch für die Spezifität (78%). Die Merkmale der dendritischen Zellen sowie der siebartigen Perforationen erreichten mit 53% bzw. 22% nur schlechte Sensitivitätswerte, jedoch höchste Spezifität. (Tabellen 4.4 und 4.5)



**Tabelle 4.4:** Ergebnisse der Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse von Untersucher 1 für die einzelnen Merkmale bei der Mycosis fungoides. Die Zuordnung von Rangplätzen erfolgte nach der Sensitivität.

Rang	Konfokalmikroskopischer Parameter	Sensitivität	Spezifität	p-Wert
1	Spongiose	94,7	88,9	0,0001
	Verschwommene Zellgrenzen	94,7	88,9	0,0001
2	Epidermale Unordnung	89,5	77,8	0,0001
3	Schwach reflektierende Papillen	78,9	88,9	0,001
4	Junktionale atypische Lymphozyten	73,7	100	0,0001
	Epidermale atypische Lymphozyten	73,7	100	0,0001
	Vesikelartige Strukturen	73,7	100	0,0001
5	Dilatierte Gefäße	57,9	77,8	0,077
6	Dendritische Zellen	52,6	100	0,007

**Tabelle 4.5:** Ergebnisse der Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse von Untersucher 2 für die einzelnen Merkmale bei der Mycosis fungoides. Die Zuordnung von Rangplätzen erfolgte nach der Sensitivität.

Rang	Konfokalmikroskopischer Parameter	Sensitivität	Spezifität	p-Wert
1	Spongiose	100	77,8	0,0001
	Epidermale Unordnung	100	77,8	0,0001
2	Verschwommene Zellgrenzen	94,7	77,8	0,0001
3	Schwach reflektierende Papillen	84,2	100	0,0001
	Junktionale atypische Lymphozyten	84,2	100	0,0001
4	Dilatierte Gefäße	78,9	100	0,0001
5	Epidermale atypische Lymphozyten	68,4	100	0,001
6	Vesikelartige Strukturen	52,6	88,9	0,036
7	Dendritische Zellen	36,8	100	0,035

## **5. Diskussion**

Im Rahmen dieser Studie untersuchten wir die Reproduzierbarkeit, Verteilung, Konkordanz sowie die Sensitivität und Spezifität verschiedener konfokalmikroskopischer Parameter, die bereits 2007 in einer Pilotstudie von Agero et al. definiert worden waren [42].

In der morphologischen Analyse konnten zunächst alle konfokalmikroskopischen Parameter dargestellt und ein zusätzliches neues Merkmal definiert werden. Auch die Konkordanzanalyse erbrachte überwiegend positive Ergebnisse, da für einen Großteil der Parameter eine signifikante Übereinstimmung zwischen den Untersuchern nachgewiesen werden konnte.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der statistischen Analyse in Bezug auf die einzelnen konfokalmikroskopischen Merkmale nacheinander diskutiert und mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen. Dem folgen eine kritische Auseinandersetzung mit den Limitationen der vorliegenden Studie sowie ein Ausblick auf mögliche Zielsetzungen zukünftiger Studien.

In der Konkordanzanalyse konnte für das konfokalmikroskopisch beobachtete Merkmal der Spongiose eine signifikante Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Untersucher nachgewiesen werden. Spongiose wurde in der Bildanalyse der MF mit 95% (UNT I) bzw. 100% (UNT II) betroffenen Läsionen am häufigsten beobachtet. In anhand retrospektiver Analysen großer Stichproben durchgeführten histologischen Studien wurde Spongiose mit Werten zwischen 4% und 55% als weniger häufig beobachtetes Kriterium beschrieben [15, 53, 54]. Widersprüchlich hierzu wird in Studien, die sich mit der Anwendbarkeit der histologischen Parameter beschäftigen, das Merkmal der Spongiose stets als häufig beobachtet jedoch wenig spezifisch beschrieben [55, 56, 57]. So war es beispielsweise in der Studie von Inchara et al. in 88% der Proben zu finden, jedoch ebenfalls in 67% der inflammatorischen Kontrollproben [57].

Da die in histologischen Studien beschriebenen Häufigkeiten sich teilweise sehr von denen in dieser Studie beobachteten Häufigkeiten unterscheiden, ist es vorstellbar, dass einige Veränderungen fälschlicherweise als Spongiose gewertet wurden. Histologisches Korrelat der im konfokalmikroskopischen Bild als Spongiose gewerteten Auffälligkeiten könnte möglicherweise auch eine bandförmige Aufreihung atypischer Lymphozyten entlang der dermoepidermalen Junctionszone sein. Mittels der horizontalen Bilder, die mit dem konfokalen Lasermikroskop entstehen, ist

-insbesondere bei einer retrospektiv durchgeführten Bildanalyse- teilweise keine genaue Beurteilung möglich, in welcher Hautebene sich die beobachteten Veränderungen befinden, wie dies bei vertikaler Schnitfführung möglich wäre.

In der Pilotstudie von Agero et al. wurden die Merkmale der verschwommenen epidermalen Zellgrenzen und der epidermalen Unordnung ebenfalls als Ausdruck spongiotischer Schädigung diskutiert [42]. Auch Ardigò et al. postulierten in ihrer Studie zum diskoiden Lupus erythematoses ähnliche Annahmen [58]. Beide Parameter wurden in der vorliegenden Studie oft nachgewiesen. Bemerkenswert ist, dass sie bisher nicht für die Kontaktdermatitis beschrieben wurden und somit zur Differenzierung von dieser entscheidend beitragen könnten. Bei Kontaktdermatitiden ist im Gegensatz zur MF eher eine Verbreiterung der Zellgrenzen und eine Verstärkung derer Konturen aufgrund des interzellulären Ödems anzutreffen [33-36]. Ein weiteres Merkmal, das möglicherweise mit spongiotischen Veränderungen in der Histologie korreliert, sind die siebartigen Perforationen, die in späteren Abschnitten weiterführend diskutiert werden sollen. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass all diese Veränderungen verschiedenen Schweregraden von Spongiose entsprechen und auf einem kontinuierlichen Spektrum angefangen von milder Spongiose bis hin zur fortgeschrittenen Zerstörung der Adhäsionen zwischen den Keratinozyten und somit der epidermalen Architektur eingeordnet werden können. Außerdem könnten sie einer spezifischen Variante der Spongiose entsprechen, was künftig näher gehend zu untersuchen ist.

Der konfokalmikroskopische Parameter der schwach reflektierenden Papillen wurde in 79% (UNT I) bzw. 84% (UNT II) der MF-Fälle als vorhanden beschrieben und weist signifikante Konkordanz- sowie gute Sensitivitäts- und Spezifitätswerte auf. Wie von Agero et al. 2007 postuliert, erklärt sich die dunkle Darstellung der Papillen am ehesten mit einer lymphozytären Infiltration der Basalzellschicht und oberen Dermis [42]. Eine lineare Anordnung von Lymphozyten im Stratum basale wird ebenfalls in vielen histologischen Studien als wichtiges Merkmal einer MF beschrieben [15, 16, 53-57]. Im Rahmen der an 228 histologischen Schnitten durchgeführten Studie von Nickoloff et al. konnte dieser Parameter in 87% der Proben beschrieben werden und wurde sogar als wichtigstes Kennzeichen zur Diagnosestellung einer frühen MF postuliert [53]. Kontroverse Daten zeigten sich in der Studie von Massone et al., die eine basale Infiltration durch Lymphozyten lediglich in 23% und eine oberflächlich dermale perivaskuläre Infiltration nur in 3% beschrieben [54].

Bei den schwach reflektierenden Papillen handelt es sich jedoch um eine Eigenschaft, die stets fallspezifisch beurteilt werden muss: bei hellen Hauttypen stellen sich die Basalzellen der dermoepidermalen Junktionszone aufgrund des mangelnden Melaningehalts ebenfalls als schwach reflektierende, also dunkle Ringe um die Papillen dar. Somit ist eine Beurteilung der Hyporeflexion als pathologisch oder physiologisch nur unter Beachtung des jeweiligen Hauttyps möglich.

In diesem Zusammenhang kann sich die Untersuchung im Falle von Patienten mit hellem Hauttyp schwierig gestalten, wobei dieser Parameter als nicht beurteilbar gewertet werden muss. Bei der verblindeten Beurteilung der konfokalmikroskopischen Bilder im Rahmen dieser Studie kannten die Untersucher den Hauttyp der Patienten nicht, es ist daher möglich, dass aufgrund des Fehlens klinischer Informationen einige Läsionen zwar richtigerweise als positiv beurteilt wurden, dies jedoch keinen pathologischen Wert hat. Dies ist ein Nachteil der konfokalen Lasermikroskopie gegenüber der Standardhistologie, in der sich die Infiltration mit Lymphozyten klar von den pigmentierten Basalzellen differenzieren lässt.

Die lymphozytären Infiltrate waren ein weiteres untersuchtes Merkmal. Die Bilder wurden von den Untersuchern auf epidermale, junktionale sowie dermale Lymphozyten analysiert. In der Konkordanzanalyse konnten signifikante Übereinstimmungen zwischen den Untersuchern lediglich für die Merkmale der junktionalen und epidermalen Lymphozyten gezeigt werden. Beide Merkmale wurden in je 74% (UNT I) der MF-Läsionen beobachtet. In vier MF-Läsionen (21%) konnte keiner der beiden Parameter nachgewiesen werden, in einem dieser Fälle wurden dafür Lymphozyten in Form Pautrier'scher Mikroabszesse beschrieben. Insgesamt liegt die Häufigkeit eines beobachteten lymphozytären Epidermotropismus in jeglicher Form bei 89% und erweist sich somit in der vorliegenden Studie als wichtiges und sensibles Merkmal. Als solches wurde es auch in zahlreichen histologischen Studien diskutiert [15, 16, 53-57, 59]. Auch Koller et al. postulierten den atypischen epidermotropen Lymphozyten in ihrer konfokalmikroskopisch durchgeführten Studie eine hohe Spezifität [43].

Wie bereits in der Pilotstudie beschrieben, konnten auch in dieser Studie keine morphologischen Besonderheiten der Lymphozyten entdeckt werden [42]. Dennoch wurde der Begriff der „atypischen Lymphozyten“ aus dieser vorangegangenen Studie übernommen. In zahlreichen histologischen Studien sind als wichtiges Merkmal Lymphozyten mit hellem zytoplasmatischen Randsaum sowie Lymphozyten mit stark gefaltetem Zellkern beschrieben [15, 16, 54-57]. Diese Phänomene wurden 1994 von

Smith am ehesten als Schrumpfungs-Artefakt im Rahmen der Fixierung erklärt [60]. Dies erklärt, warum es nicht mit dem konfokalen Lasermikroskop beobachtet werden konnte, da hier das Gewebe in vivo untersucht wird. Atypische Lymphozyten sowie pleomorphe Tumorzellen wie in der konfokalmikroskopischen Studie von Koller et al. beschrieben, konnten in dieser Studie nicht dargestellt werden [43]. In mehreren histologischen Studien, die sich mit den Diagnosekriterien in frühen MF-Stadien befassen, wird das Kriterium der atypischen Lymphozyten als nicht signifikant eingestuft [15, 53, 54, 59]. Massone et al. konnten in der 2005 an 745 histologischen Schnitten durchgeführten Studie in lediglich 9% atypische Zellen nachweisen und schlossen sich den Ergebnissen von Smoller et al. an, der 1995 postuliert, dass die Beurteilung v.a. leichter Atypien sehr subjektiv ist [15, 54].

Ebenfalls ein Ausdruck lymphozytärer Infiltration ist das Merkmal der vesikelartigen Strukturen, das auch in vorangegangenen korrelativen Studien am ehesten dem Vorliegen Pautrier'scher Mikroabszesse entspricht [42, 43]. In der Cochran-Analyse konnte keine Konkordanz zwischen den Untersuchern festgestellt werden: bei zwei Untersuchungen, darunter die vor der Verblindung unter Kenntnis klinischer Informationen durchgeführte Analyse, zeigte sich eine Häufigkeitsverteilung von 53%. In der dritten verblindeten Analyse wurden vesikelartige Strukturen in 74% der MF-Fälle beschrieben. Dieser Unterschied zwischen den postulierten Häufigkeiten der vesikelartigen Strukturen könnte damit zusammenhängen, dass im Vorhinein keine genaue morphologische Definition des Merkmals wie z.B. Anzahl der im Vesikel vorhandenen Lymphozyten, Beschaffenheit der Begrenzung oder Größe der Ausdehnung festgelegt worden war. So könnte die Differenzierung zwischen ausgeprägter, lokalisierter Spongiose und initialer Formierung der Mikroabszesse den Untersuchern Schwierigkeiten bereitet haben. Wie Santucci et al. in ihrer 2000 durchgeführten Studie zur Konkordanz sowie Reproduzierbarkeit der histologischen Diagnosestellung kutaner T-Zelllymphome postulierten, kann die Reproduzierbarkeit eingeschränkt sein, wenn die Kriterien zur Diagnosestellung nicht genau festgelegt sind [55].

Dennoch ist es bemerkenswert, dass konfokalmikroskopisch beobachtete vesikelartige Strukturen, die als das Pendant zu Pautrier'schen Mikroabszessen eingestuft wurden, in dieser Studie in der Mehrheit der MF-Fälle beobachtet werden konnten. Denn Pautrier'sche Mikroabszesse gelten als sehr spezifisches, jedoch auch seltenes Merkmal der MF, insbesondere in frühen Stadien der Erkrankung. In fortgeschrittenen

Stadien können sie dagegen häufiger beobachtet werden. Ihr Vorkommen wird in der Literatur mit Werten zwischen 4% [16] und 41% [57] angegeben. Im Rahmen dieser Studie wurden vesikelartige Strukturen in 53 bzw. 74% der MF-Läsionen gesehen, außerdem in Sézary-Syndrom-Läsionen sowie in untersuchten Läsionen eines Studienteilnehmers mit Lymphomatoider Papulose. Dies ist jedoch nicht als negativ in Bezug auf die Spezifität des Parameters zu werten, da das Sézary-Syndrom sich durch die gleichen histologischen Merkmale kennzeichnet wie die MF, zusätzlich jedoch noch extrakutane Manifestationen aufweist. Unter Anbetracht des typischen klinischen Bildes der Lymphomatoiden Papulose ist anzunehmen, dass die vesikelartigen Strukturen zwar beschrieben worden wären, jedoch nicht als Pautrier'sche Mikroabszesse gewertet worden wären. Diese Differenzierung war durch die Verblindung nicht gewährleistet.

Dass im Rahmen dieser Studie die Prävalenz der Pautrier'schen Mikroabszesse höher ist als in histologischen Studien beschrieben, könnte einerseits damit zusammenhängen, dass mit dem konfokalen Lasermikroskop während der Untersuchung ein größeres Hautareal (8 x 8 mm) untersucht wird als bei der durch Biopsie gewonnenen Histologie (3 - 5 mm Biopsatdurchmesser). Bereits einzelne vesikelartige Strukturen können konfokalmikroskopisch bemerkt werden, deren Detektion durch technische Gründe wie Schnittführung und Fixierung versäumt werden kann.

Andererseits muss kritischerweise bemerkt werden, dass in die Studie nur Patienten mit histologisch eindeutig diagnostizierter MF und bestehenden Hautläsionen eingeschlossen wurden. Dieser Patientenbestand kann möglicherweise nicht als repräsentativ für den Großteil der MF-Erkrankungen, auch in Bezug auf das Vorhandensein von Pautrier'schen Mikroabszessen bei der Erstdiagnose, gewertet werden.

Als weiteres Merkmal wurde der Parameter der dendritischen Zellen beschrieben und untersucht. Er wurde nur in etwa der Hälfte der MF-Läsionen beschrieben, zeichnete sich jedoch durch höchste Spezifität aus. In einem Fall konnten dendritische Zellen beobachtet werden, die sich um die Papillen der dermoepidermalen Junctionszone befanden. Sollte diese Besonderheit in künftigen Studien erneut auffallen, wäre es möglicherweise sinnvoll, mit Hilfe von Histologie und Immunphänotypisierung nach einem erkennbaren Muster der korrelierenden Zellen zu suchen.

Des Weiteren wurden in der morphologischen Analyse erweiterte Blutgefäße untersucht. Das Merkmal erreichte in der Konkordanzanalyse Signifikanzniveau, zeichnete sich in der weiteren statistischen Analyse jedoch durch nur mäßige Werte sowohl bezüglich der Sensitivität als auch der Spezifität aus. Da konfokalmikroskopisch auch in gesunder Haut Blutfluss und Blutgefäße beobachtet werden können, ist eine Beurteilung ob ein Gefäß erweitert ist oder nicht, möglicherweise subjektiven Schwankungen unterlegen. Zudem handelt es sich um dynamische Prozesse, die während der Untersuchung besser beurteilt werden können als anhand stehender Bilder, die den Untersuchern unter der Verblindung zur Verfügung standen.

Das Merkmal der siebartigen Perforationen wurde im Rahmen dieser Studie erstmalig beschrieben und erreichte weder in der Konkordanz- noch in der Chi<sup>2</sup>-Analyse signifikante Werte. Welchen histopathologischen Veränderungen diese Auffälligkeiten entsprechen, ist bisher unklar. Es wurden hypothetisch drei Möglichkeiten diskutiert: einerseits könnte es sich um eine Vorstufe Pautrier'scher Mikroabszesse handeln. Hierfür spricht, dass diese sich ebenfalls als „Löcher“ in der Epidermis darstellen, in denen sich Lymphozyten befinden. Die beschriebenen siebartigen Perforationen stellen sich als sehr kleine Hohlräume dar, die sich in einigen Bildern gruppiert in der Epidermis liegend darstellen. Es ist also vorstellbar, dass sie sich zu größeren Mikroabszessen zusammenschließen. Es ist aber auch möglich, dass es sich um die in zahlreichen histologischen Studien als wichtiges Kriterium beschriebenen Lymphozyten mit hellem Randsaum handelt, die in der englischen Literatur als „haloed lymphocytes“ bezeichnet werden. Wie bereits erwähnt, entspricht dies zwar am ehesten einem Schrumpfungartefakt großer Lymphozyten, jedoch wird hypothetisch angenommen, dass die Zellen trotzdem zytologische Besonderheiten aufweisen müssen, um sich entsprechend histologisch darzustellen [60]. Für diese Hypothese spricht, dass dieses Merkmal in vielen histologischen Studien beschrieben wird ohne dass ein konfokalmikroskopisches Korrelat gefunden werden kann. Andererseits lassen sich keine stark reflektierenden Strukturen in Beziehung zu diesen Hohlräumen darstellen, die als Zellkern gewertet werden könnten. Schließlich wäre es noch möglich, dass die siebartigen Perforationen einer Maximalform der Spongiose entsprechen. Dieses Merkmal sollte in Studien mit korrelierender Histopathologie untersucht werden.

Für die im Folgenden diskutierten konfokalmikroskopischen Parameter konnte in der Konkordanzanalyse keine Übereinstimmung erreicht werden, sie fanden daher keinen Eingang in die Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse. Dies war für die Merkmale der

Keratinocyten mit länglichen Zellkernen, der dermalen Lymphozyten und der Fibrose der Fall.

Die Keratinocyten mit länglichen Zellkernen wurden in 63% (UNT I) bzw. 42% (UNT II) der Fälle gesehen. Es konnte jedoch keine signifikante Übereinstimmung zwischen den Untersuchern erreicht werden, was möglicherweise damit zu begründen ist, dass es sich um ein Merkmal handelt, das leicht übersehen werden kann und dessen Analyse somit starken subjektiven Schwankungen unterlegen ist. Es ist noch zu analysieren, welchem histopathologischen Korrelat dieser Parameter entspricht. Agero et al. diskutierten ihn in ihrer Pilotstudie als Ausdruck einer spongiotisch veränderten Epidermis [42].

Für den Parameter der dermal gelegenen Lymphozyten zeigte sich in der Konkordanzanalyse ebenfalls keine Übereinstimmung zwischen den Untersuchern. Das schlechte Ergebnis für diesen Parameter lässt sich am ehesten mit der begrenzten optischen Auflösung des konfokalen Lasermikroskops in tieferen Hautschichten erklären.

Auch für das Merkmal der dermalen Fibrose und Kollagenbündel konnte in der Cochran-Analyse keine Reproduzierbarkeit gezeigt werden. Die schlechten Ergebnisse für diesen Parameter sind möglicherweise ebenfalls der geringen optischen Auflösung des konfokalen Lasermikroskops in tieferen Hautschichten geschuldet. Dies steht im Einklang mit der Pilotstudie von Agero et al., in der in lediglich einer Läsion Fibrose nachgewiesen werden konnte [42]. Da sich Fibrose und Kollagen konfokalmikroskopisch als in eine Richtung oder durcheinander verlaufende stark reflektierende, also helle Stränge und Bündel darstellen und sich das Bild bei schlechter werdender Auflösung oftmals aufhellt, kann eine Unterscheidung zwischen Parameter und Bildartefakt für den Untersucher problematisch sein. In der 2009 durchgeführten Studie von Koller et al. wurde Fibrose ebenfalls nicht als wichtiges Merkmal zur konfokalmikroskopischen Diagnosestellung der MF erwähnt [43].

Die diagnostische Wichtigkeit der Fibrose wird in histopathologischen Studie kontrovers diskutiert. In rein deskriptiven Studien wird Fibrose stets als sehr häufig beobachtetes und wichtiges Merkmal der MF angegeben [53, 54]. In Studien, in die jedoch auch Kontrollen miteinbezogen wurden, wurde stets nachgewiesen, dass es sich bei dem Parameter der Fibrose um ein häufiges jedoch wenig spezifisches Merkmal handelt. Teilweise konnte kein Signifikanzniveau erreicht werden [15, 16, 56]. Lediglich Inchara et al. errechneten 2008 in ihrer Analyse eine hohe Spezifität von 90% [57]. Im



Widerspruch hierzu stehen die Ergebnisse von Santucci et al., die die Abwesenheit dermalen Fibrose als hochspezifisches und mäßig sensitives Merkmal postulierten [16]. Es ist anzumerken, dass die Studien teils nur bedingt miteinander zu vergleichen sind, da ihr inhaltlicher Fokus auf unterschiedliche Stadien der MF gerichtet ist. Außerdem ist es durchaus möglich, dass unterschiedliche Definitionen der Parameter verwendet wurden, was einen Vergleich ebenfalls erschwert.

Insgesamt stellten die Untersucher anhand der konfokalmikroskopischen Bilder die Diagnose einer MF in 84% bzw. 90% richtig. Lediglich fünf MF-Läsionen wurden insgesamt falsch diagnostiziert: in vier Fällen wurde das Vorliegen einer Parapsoriasis vermutet. In einem Fall wurde eine MF fälschlicherweise als normale Haut eingestuft. Dass die Läsionen als Parapsoriasis fehldiagnostiziert wurden, zeigt, dass zwar Veränderungen vorhanden waren, diese jedoch nicht als prägnant genug gewertet wurden. Es ist denkbar, dass während der dynamischen Untersuchung am konfokalen Lasermikroskop noch mehr Veränderungen aufgefallen wären. Dies war bei der verblindeten Demonstration einzelner, stehender Bilder nicht gewährleistet.

Die Untersucher diagnostizierten fälschlicherweise vier Nicht-MF-Läsionen als MF. Zwei davon waren Läsionen eines Patienten mit Sézary Syndrom sowie zweier Patienten mit Lymphomatoider Papulose. Da das Sézary-Syndrom auch anhand histologischer Merkmale nicht sicher von einer MF zu unterscheiden ist [12], ist diese Fehldiagnose also nicht negativ zu werten, insbesondere weil die Bildanalyse ohne weitere klinische Informationen erfolgte. Auf der anderen Seite befand sich die Erkrankung der Patienten mit Lymphomatoider Papulose zum Zeitpunkt der Untersuchung in einem inaktiven Zustand, so dass den Läsionen möglicherweise charakteristische Merkmale fehlten.

Im Folgenden werden die Limitationen der vorliegenden Studie und derer Ergebnisse kritisch diskutiert.

Zu allgemeinen technischen Limitationen des Mikroskops lässt sich sagen, dass die konfokale Lasermikroskopie eine rein morphologische Beurteilung der epidermalen Vorgänge erlaubt und keine genaue Typisierung der einzelnen Zellen möglich ist. So ist eine genaue Differenzierung z.B. der infiltrierenden Lymphozyten oder der dendritischen Zellen ausschließlich mit invasiven Maßnahmen wie der Biopsieentnahme mit anschließender Immunhistologie und/oder Genotypisierung möglich. Insbesondere in

frühen Krankheitsstadien der MF haben jedoch auch diese Methoden wenig Aussagekraft [15, 53].

Weitere technische Grenzen des Gerätes bestehen in der optischen Eindringtiefe. Dieser ist es geschuldet, dass bestimmte Merkmale wie dermal gelegene Lymphozyten und dermale Fibrose nicht ausreichend und übereinstimmend beurteilt werden können. Als Hauptlimitation dieser Studie ist es anzumerken, dass akut bzw. chronisch inflammatorische Dermatosen wie das Kontaktekzem, die in der histopathologischen Differentialdiagnostik zur MF eine große Rolle spielen, nicht in die Studie eingeschlossen wurden. Dies lag zum einen an der fehlenden Rekrutierung geeigneter Patienten, zum anderen an der eigentlichen Zielsetzung der Studie, bei der die Reproduzierbarkeit der konfokalmikroskopischen Parameter der MF mehr im Vordergrund stand als die tatsächliche Differenzierung von anderen entzündlichen Krankheitsbildern.

Als begrenzender Faktor für die Gültigkeit der hier diskutierten Ergebnisse wirkt sich des Weiteren die geringe Patientenanzahl von 15 Studienteilnehmern aus. Zwar wurden pro Patient mehrere Hautläsionen konfokalmikroskopisch untersucht und meist auch statistisch relevante Werte erzielt, dennoch ist bei einer kritischen Beurteilung der Ergebnisse zu beachten, dass insgesamt mit einem kleinen Probenumfang gearbeitet wurde, so dass die Aussagekraft der Ergebnisse denen einer vorläufigen Studie entspricht.

Für den Entwurf einer allgemein gültigen Leitlinie sind noch weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven nötig. Insbesondere sollten in künftige Studien auch Patienten mit entzündlichen Dermatosen miteinbezogen werden. Des Weiteren sollte auch besonderes Augenmerk auf das Merkmal der Spongiose gelegt werden, da in der vorliegenden Studie die drei Parameter der verbreiterten Zellgrenzen („normale“ Spongiose), der verschwommenen Zellgrenzen und der epidermalen Unordnung hypothetisch mit ihr gleichgesetzt wurden. Dies sollte in histokorrelativen Studien näher gehend untersucht werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die konfokale Lasermikroskopie ein vielversprechendes Werkzeug zur Diagnostik der MF darstellt. Dies gilt insbesondere unter der Annahme, dass dem Untersucher im klinischen Alltag weitere Informationen wie das Erscheinungsbild und die Beschwerden des Patienten zur Verfügung stehen. Alle in der Pilotstudie postulierten Merkmale konnten in der vorliegenden Studie reproduziert werden, zusätzlich wurden siebartige Perforationen neu beschrieben. Die

Untersucher kamen in Bezug auf fast alle Parameter zu übereinstimmenden Ergebnissen. In der Chi<sup>2</sup>-Analyse erlangten lediglich die Merkmale der dermalen Fibrose sowie der siebartigen Perforationen kein Signifikanzniveau. Am häufigsten wurden relativ unspezifische Merkmale wie Spongiose, verschwommene Zellgrenzen und epidermale Unordnung beschrieben. Dies kann eine Abgrenzung zu anderen Hauterkrankungen wie z.B. entzündlichen Dermatosen nicht erleichtern, da solche Veränderungen bei diesen auch zu finden sind. Das gleiche Problem zeigt sich allerdings auch in der standardmäßig durchgeführten Histologie, weshalb man sagen kann, dass die konfokale Lasermikroskopie in diesem Punkt nicht unterlegen ist. Als hoch spezifische Merkmale erwiesen sich die vesikelartigen Strukturen, epidermale und junktionale Lymphozyten sowie dendritische Zellen. Diese Parameter konnten bei relativ häufiger Beschreibung auch hohe Spezifitätswerte erzielen und könnten für eine konfokalmikroskopische Diagnosestellung in Zukunft besonders nützlich sein.

## **6. Zusammenfassung**

Die Mycosis fungoides gehört zur Gruppe der T-Zell-Lymphome und ist der häufigste Vertreter der primär kutanen T-Zell-Lymphome. Goldstandard zur Diagnosestellung ist die Histologie, die durch immunologische und molekulargenetische Untersuchungen ergänzt werden kann. Insbesondere in frühen Stadien der Krankheit erweist sich eine Diagnosestellung jedoch als schwierig, da sowohl Klinik als auch Histologie relativ unspezifisch sein können und Krankheitsbildern wie der Psoriasis, dem Kontaktekzem, lichenoiden sowie spongiotischen Dermatosen ähneln können. Oftmals sind daher multiple Biopsieentnahmen notwendig, was aufgrund der Invasivität des Verfahrens einen Nachteil für den Patienten darstellt. In einer Pilotstudie wurde die konfokale Lasermikroskopie als non-invasives Verfahren zur Untersuchung der MF benutzt und charakteristische Merkmale beschrieben. Ziel der vorliegenden Studie ist es, diese Parameter auf ihre Reproduzierbarkeit, Inter-Observer-Reproduzierbarkeit (Konkordanz), Sensitivität sowie Spezifität hin zu beurteilen. Dazu wurden insgesamt 39 Hautläsionen untersucht, davon 19 Läsionen von MF-Patienten. Zur vergleichenden Beurteilung wurden des Weiteren Hautareale von Patienten mit Parapsoriasis, Sézary-Syndrom sowie Lymphomatoider Papulose und neun gesunde Hautstellen in die statistische Analyse eingeschlossen.

Insgesamt zeigten die postulierten Merkmale der MF eine hohe Reproduzierbarkeit, die sich auch in der Konkordanzanalyse zwischen den Untersuchern für ausgesuchte Parameter darstellte. Für die Merkmale der vesikelartigen Strukturen, der Fibrose, der siebartigen Perforationen, der dermalen atypischen Lymphozyten und der Keratinozyten mit länglichen Zellkernen wurden keine übereinstimmenden Ergebnisse unter den Untersuchern gefunden.

In der Chi<sup>2</sup>-Analyse erwiesen sich die Merkmale der Spongiose sowie die ebenfalls auf spongiotische Veränderungen hindeutenden verschwommenen Zellgrenzen und die epidermale Unordnung als am häufigsten beobachtete Veränderungen. Die Parameter der schwach reflektierenden Papillen, der vesikelartigen Strukturen sowie der epidermalen und junktionalen Lymphozyten -allesamt Ausdruck eines lymphozytären Epidermotropismus- wurden ebenfalls häufig gesehen und erwiesen sich dementsprechend als sensitive Merkmale. Als im höchsten Maße spezifische Parameter erwiesen sich epidermale und junktionale Lymphozyten, vesikelartige Strukturen sowie dendritische Zellen. Die auf spongiotische Veränderungen hindeutenden Merkmale

sowie das Merkmal der schwach reflektierenden Papillen zeigten in der Spezifitätsanalyse nur mäßige Werte.

Hauptlimitation dieser Studie stellt die Tatsache dar, dass keine chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie beispielsweise das Kontaktekzem in die Studie eingeschlossen wurden. Ein weiterer begrenzender Faktor ist die relativ geringe Zahl der Studienteilnehmer.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die konfokale Lasermikroskopie ein vielversprechendes Verfahren zur non-invasiven Diagnostik der MF ist. In Zukunft könnte sie insbesondere bei der Auswahl geeigneter Biopsie-Entnahmestellen hilfreich sein und somit die Zeit bis zur Diagnosestellung verkürzen sowie dem Patienten weitere Biopsien ersparen. Darüber hinaus wäre ein Einsatz der konfokalen Lasermikroskopie zum non-invasiven Monitoring des Therapieverlaufs denkbar. Insgesamt sind die Ergebnisse dieser Studie jedoch von vorläufigem Charakter und es sollten weitere Studien mit größerer Patientenzahl und unter Einbezug inflammatorischer Dermatosen durchgeführt werden.

## **7. Literaturverzeichnis**

1. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005;105:3768-85
2. Magro CM, Mihm MC, Crowson AN. Mycosis fungoides. In: Magro CM, Crowson AN, Mihm MC, eds. *The cutaneous lymphoid proliferations: a comprehensive textbook of lymphocytic infiltrates of the skin*. 1<sup>st</sup> ed. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007: 267-99
3. Burg G, Kempf W, Cozzio A, et al. Cutaneous malignant lymphomas: Update 2006. *JDDG* 2006; 4:914-933
4. Karenko L, Hyytinen E, Sarna S, et al. Chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma and in its premalignant conditions as detected by G-banding and interphase cytogenetic methods. *J Invest Dermatol* 1997;108(1):22-9
5. Burg G, Kempf W, Haeffner A, et al. From inflammation to neoplasia: new concepts in the pathogenesis of cutaneous lymphomas. *Recent Results Cancer Res* 2002;160:271-80
6. Shimakage M, Sasagawa T, Kawahara K, et al. Expression of Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphoma including mycosis fungoides. *Int J Cancer* 2001;92(2):226-31
7. Qin JZ, Dummer R, Burg G, et al. Constitutive and interleukin7/interleukin-15 stimulated DANN binding of Myc, Jund, and novel Myc-like proteins in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* 1999;93(1):260-7
8. Qin JZ, Zhang CL, Kamarashev J, et al. Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myb genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* 2001;98(9):2778-83
9. Qin JZ, Kamarashev J, Zhang CL, et al. Constitutive and interleukin-7- and interleukin-15-stimulated DNA binding of STAT and novel factors in cutaneous T-cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol* 2001;117(3):583-9
10. Armerding D, Kupper TS. Functional cutaneous lymphocyte antigen can be induced in essentially all peripheral blood lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;199(3):212-22
11. Ferenczi K, Fuhlbrigge RC, Pinkus J, et al. Increased CCR4 expression in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2002;119(6):1405-10

12. Burg G, Kempf W, Cozzio A, et al. WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *J Cutan Pathol* 2005;32:647-674
13. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sézary syndrome: a proposal of the international Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 2007;110(6):1713-22
14. Burg G, Dummer R, Nestle FO, Doebbeling U, Haeffner A. Cutaneous lymphomas consist of a spectrum of nosologically different entities including mycosis fungoides and small plaque parapsoriasis. *Arch Dermatol* 1996;132(5):567-72
15. Smoller BR, Bishop K, Glusac E, et al. Reassessment of histologic parameters in the diagnosis of mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1423-30
16. Santucci M, Biggeri A, Feller AC, et al. Efficacy of histologic criteria for diagnosing early mycosis fungoides: an EORTC cutaneous lymphoma study group investigation. *Am J Surg Pathol* 2000;24(1):40-50
17. Shapiro PE, Pinto FJ. The histologic spectrum of mycosis fungoides/Sézary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma). A review of 222 biopsies, including newly described patterns and the earliest pathologic changes. *Am J Surg Pathol* 1994;18:645-67
18. Guitart J, Kennedy J, Ronan S, et al. Histologic criteria for the diagnosis of mycosis fungoides. Proposal for a grading system to standardize pathology reporting. *J Cutan Pathol* 2001;28:174-83
19. Inchara YK, Rajalakshmi T. Early mycosis fungoides vs. inflammatory mimics: how reliable is histology? *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008;74(5):462-6
20. Wood GS, Tung RM, Haeffner AC, et al. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sézary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol* 1994;103(1):34-41
21. Mao X, Lillington D, Scarisbrick JJ, et al. Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alterations in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2002;147(3):464-75
22. Scheffer E, Meijer CJ, Van Vloten WA. Dermatopathic lymphadenopathy and lymph node involvement in mycosis fungoides. *Cancer* 1980 Jan 1;45(1):137-48

23. Hoppe RT, Wood GS, Abel EA. Mycosis fungoides and the Sézary syndrome: Pathology, staging, and treatment. *Curr Probl Cancer* 1990;14(6):297-361
24. Glass LF, Keller KL, Messina JL, Dalton J, Yag-Howard C, Fenske NA. Cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Control* 1998;5(1):11-8
25. Gareau DS, Patel YG, Rajadhyaksha M. Basic principles of reflectance confocal microscopy. In: González S, Gill M, Halpern AC, eds. *Reflectance confocal microscopy of cutaneous tumors: an atlas with clinical, dermoscopic and histological correlations*. 1<sup>st</sup> ed. London, England: Informa Healthcare, 2008:1-6
26. Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol* 1995;104(6):947-52
27. Rajadhyaksha M, González S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol* 1999;113(3):293-303
28. Aghassi D, Anderson RR, Gonzalez S. Confocal laser microscopic imaging of actinic keratoses in vivo: a preliminary report. *J Am Acad Dermatol* 2000;43(1Pt1):42-8
29. Ulrich M, Maltusch A, Rius-Diaz F, et al. Clinical applicability of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnosis of actinic keratoses. *Dermatol Surg* 2008;34(5):610-9
30. Nori S, Rius-Diaz F, Cuevas J, et al. Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma: a multicenter study. *J Am Acad Dermatol* 2004;51(6):923-30
31. Langley RGB, Rajadhyashka M, Dwyer PJ, Sober AJ, Flotte TJ, Anderson RR. Confocal scanning laser microscopy of benign and malignant melanocytic skin lesions in vivo. *J Am Acad Dermatol* 2001;45(3):365-76
32. Gerger A, Koller S, Kern T, et al. Diagnostic applicability of in vivo confocal laser scanning microscopy in melanocytic skin tumors. *J Invest Dermatol* 2005;124(3):493-8
33. Astner S, González S, Gonzalez E. Non-invasive evaluation of allergic and irritant contact dermatitis by in-vivo reflectance confocal microscopy. *Dermatitis* 2006;17(4):182-91
34. Astner S, González E, Cheung AC, et al. Non-invasive evaluation of the kinetics of allergic and irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2005;124:351-59



35. Astner S, Burnett N, Rius-Díaz F, Doukas AG, González S, Gonzalez E. Irritant contact dermatitis induced by a common household irritant: a noninvasive evaluation of ethnic variability in skin response. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(3):458-65
36. Astner S, Gonzalez E, Cheung A, Rius-Díaz F, González S. Pilot study on the sensitivity and specificity of in vivo reflectance confocal microscopy in the diagnosis of allergic contact dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005;53(6):986-92
37. Swindells KJ, Burnett N, Rius-Diaz F, González E, Mihm MC, González S. Reflectance confocal microscopy may differentiate acute allergic and irritant contact dermatitis in vivo. *J Am Acad Dermatol* 2004 Feb;50(2):220-8.
38. Hicks SP, Swindells KJ, Middelkamp-Hup MA, Sifakis MA, González E, González S. Confocal histopathology of irritant contact dermatitis in vivo and the impact of skin color (black vs white). *J Am Acad Dermatol* 2003 May;48(5):727-34
39. Sauermann K, Gambichler T, Jaspers S, et al. Histometric data obtained by in vivo confocal laser scanning microscopy in patients with systemic sclerosis. *BMC Dermatol* 2002;6(2):8
40. González S, Rajadhyaksha M, Rubinstein G, Anderson RR. Characterization of psoriasis in vivo by reflectance confocal microscopy. *J Med* 1999;30(5-6):337-56
41. Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M, Sala R, Pellacani G. Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. *Photochemistry and Photobiology* 2008;84:1421-30
42. Agero ALC, Gill M, Ardigo M, Myskowski P, Halpern AC, González S. In vivo reflectance confocal microscopy of mycosis fungoides: a preliminary study. *J Am Acad Dermatol* 2007;57(3):435-41
43. Koller S, Gerger A, Ahlgrimm-Siess V, Weger W, Smolle J, Hofmann-Wellenhof R. In vivo reflectance confocal microscopy of erythematous skin diseases. *Exp Dermatol* 2009;18(6):536-40
44. Vonderheid EC, Bernengo MG, Burg G, et al. Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 2002;46(1):95-106
45. Magro CM, Guitart J, Crowson AN. Precursor lesions of cutaneous T-cell lymphoma. In: Magro CM, Crowson AN, Mihm MC, eds. *The cutaneous lymphoid proliferations: a comprehensive textbook of lymphocytic infiltrates of the skin*. 1<sup>st</sup> ed. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007:93-140

46. Macaulay WL. Lymphomatoid papulosis. A continuing self-healing eruption, clinically benign - histologically malignant. *Arch Dermatol* 1968;97(1):23-20
47. El Shabrawi-Caelen L, Kerl H, Cerroni L. Lymphomatoid papulosis: reappraisal of clinicopathologic presentation and classification into subtypes A, B and C. *Arch Dermatol* 2004;140(4):441-7
48. Naldi L. The clinical spectrum of psoriasis. *Clinics in Dermatology* 2007;25:510-8
49. Murphy M, Kerr P, Grant-Kels JM. The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007;25(6):524-8
50. Sontheimer R. Lichenoid tissue reaction/interface dermatitis: clinical and histological perspectives. *J Invest Dermatol* 2009;129:1088-99
51. Summey BT, Bowen SE, Allen HB. Lichen planus-like atopic dermatitis: expanding the differential diagnosis of spongiotic dermatitis. *J Cutan Pathol* 2008;35(3):311-4
52. Welzel J, Ulrich M, Lange-Asschenfeldt S, Hohenleutner U. Konfokale Lasermikroskopie in der Dermatologie. [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/013-076l\\_S1\\_Konfokale\\_Lasermikroskopie\\_2011-07\\_01.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/013-076l_S1_Konfokale_Lasermikroskopie_2011-07_01.pdf) ; Zugriff am 28.10.2013
53. Nickloff B. Light-microscopic assessment of 100 patients with patch/plaque-stage mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 1988;10(6):469-77
54. Massone C. Histopathologic features of early (patch) lesions of mycosis fungoides: a morphologic study on 745 biopsy specimens from 427 patients. *Am J Surg Pathol* 2005;29(4):550-60
55. Santucci M, Biggeri A, Feller AC, Burg G. Accuracy, concordance, and reproducibility of histologic diagnosis in cutaneous T-cell lymphoma: an EORTC cutaneous lymphoma project group study. *Arch Dermatol* 2000;136(4):497-502
56. Naraghi Z. Assessment of histologic criteria in the diagnosis of mycosis fungoides. *International Journal of Dermatology* 2003;42:45-52
57. Inchara YK, Rajalakshmi T. Early mycosis fungoides vs. inflammatory mimics: how reliable is histology? *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008;74(5):462-6
58. Ardigò M, Maliszewski I, Cota C, et al. Preliminary evaluation of in vivo reflectance confocal microscopy features of discoid lupus erythematosus. *Br J Dermatol.* 2007;156(6):1196-203
59. Sanchez JL, Ackermann AB. The patch stage of mycosis fungoides. Criteria for histologic diagnosis. *Am J Dermatopathol.* 1979;1(1):5-26

60. Smith NP. Histologic criteria for early diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Clin* 1994;12(2):315-22

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Publikationen**

Lange-Asschenfeldt S, Babilli J, Beyer M, et al. Consistency and distribution of reflectance confocal microscopy features for diagnosis of cutaneous T cell lymphoma. J Biomed Opt. 2012 Jan;17(1):016001

## Erklärung

„Ich, Jasmin Babilli, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Reproduzierbarkeit und Verteilung von Parametern der Mycosis fungoides – Evaluation mittels konfokaler Lasermikroskopie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 25.11.2013

\_\_\_\_\_  
Unterschrift: Jasmin Babilli

## Danksagung

Besonderer Dank gilt Dr. Martina Ulrich und Dr. Dr. Susanne Lange-Asschenfeldt, die mir zu jedem Zeitpunkt der Arbeit für viele kritische Diskussionen, Hilfestellungen und mit fachlicher Kompetenz zur Verfügung standen. Ihre geduldigen, sachkundigen und wertvollen Unterstützungen haben maßgeblich zum Fertigstellen dieser Dissertation beigetragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stockfleth für die Möglichkeit meiner Promotion am Hauttumorzentrum der Charité. Ich fühlte mich stets gut betreut.

Herrn Dr. Marc Beyer möchte ich für die Hilfe und die fachliche Unterstützung bei der Rekrutierung geeigneter Patienten danken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Francisca Ríus-Díaz für die umfassende Hilfe bei Fragen zur statistischen Auswertung der gesammelten Daten.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihre lebenslange und uneingeschränkt großzügige Unterstützung, so auch bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ein großer Dank gilt meiner Schwester, die mich immer wieder zum Weitermachen und Fertigstellen dieser Arbeit angespornt hat. Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Bruder, meinem Schwager und meinen Neffen, die ein wichtiger Teil meines Lebens sind.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für ihre Treue, Geduld und die vielen Aufmunterungen, mit denen sie mir stets zur Seite standen.

Schlussendlich danke ich insbesondere den vielen Patienten, die so bereitwillig ihre Zeit geopfert haben um an dieser Studie mitzuarbeiten und somit einen Beitrag zur Entwicklung der konfokalen Mikroskopie geleistet haben.