

2 Material und Methoden

Für die Rekrutierung der Probanden galten strenge Ein- und Ausschlusskriterien. Allgemeine Richtlinien für die unterschiedlichen Probandenkollektive waren, neben dem Mindestalter von 18 Jahren, keine bekannte durch Licht oder verwendete Substanzen provozierbare Übererregbarkeit, keine Schwangerschaft oder Stillperiode sowie eigenverantwortliche Entscheidungsfähigkeit. Wurde die Untersuchung an Probanden mit einem Defekt oder Erkrankung der Haut durchgeführt, so durfte die Messung mit dem LSM die Genesung des Patienten nicht beeinträchtigen. Die Einstufung der Probanden in die jeweilige Hauttypgruppe erfolgte nach Fitzpatrick [98].

2.1 *In vivo* Darstellung der gesunde Haut

2.1.1 Probandenkollektiv

Für die Darstellung der gesunden menschlichen Haut wurden insgesamt 12 freiwillige Probanden von kaukasischer Abstammung rekrutiert. Das Kollektiv bestand aus drei Männern und neun Frauen im Alter von 24 bis 44 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 28 ± 6 Jahren. Von den Probanden wurden acht in die Hauttypgruppe 2 und vier in die Hauttypgruppe 3 eingestuft. Alle Probanden sind beruflich in Gebäuden beschäftigt, d.h. sie arbeiten weitestgehend abgeschirmt von äußeren Umweltfaktoren, wie der Sonnenbestrahlung und den Witterungsverhältnissen, welche einen Einfluss auf die Hautbeschaffung haben könnten. Zu dem Zeitpunkt der Untersuchung befanden sich alle Probanden in einem guten gesundheitlichen Zustand. Es lagen keine bekannten Erkrankungen einschließlich Hauterkrankungen vor. Die zu untersuchende Hautareale waren klinisch unauffällig und nicht mit Salben, Cremes, etc. vorbehandelt.

2.1.2 Definition der untersuchten Hautareale

Insgesamt wurden sechs verschiedene Körperregionen der gesunden menschlichen Haut *in vivo* dargestellt. Die Untersuchung der unterschiedlichen Hautareale wurde bei jedem Probanden an gleicher Lokalisation in Relation zu anatomischen Landmarken des Körpers durchgeführt (Tab. 2.1).

Die Untersuchungen schlossen also insgesamt sechs routinemäßige nicht-sonnenexponierte Hautareale ein. Teilweise wurden die verschiedenen Körperregionen eines Probanden nicht an einem Tag vermessen. Dieses geschah dann in zwei bis drei Sitzungen, oft zu unterschiedlichen Tageszeiten. Bei einigen Probanden wurden nicht alle oben aufgeführten Körperregionen ausgemessen. So ließ sich das Probandenkollektiv für die *in vivo* Untersuchung der gesunden Haut in zwei Subgruppen von jeweils sechs Personen unterteilen:

1. **Gruppe A**, bei denen als einzige Körperregion die Schädelhaut vermessen wurde. Die gesamte Gruppe ist eingeschlechtlich weiblich.
2. **Gruppe B**, bei denen verschiedene Körperregionen vermessen wurden. Die Gruppe ist zweigeschlechtlich mit jeweils drei Männern und drei Frauen.

Tab. 2.1: Untersuchte Hautareale am gesunden Probanden.

| Körperregion | Lokalisation des Hautareals |
|---------------|--|
| Kopf | Okzipitalbereich: von dem am stärksten hervortretenden Punkt in der Medianlinie des Hinterhaupthöckers, dem Inion 3cm kranial. |
| Rücken | Auf der Verbindungslinie der beiden Schulterblattgräten, etwa auf der Höhe des Dornfortsatzes T3, paravertebral. |
| Arm | Unterarmbeugenseite: auf der halben Strecke, zwischen Ellenbeuge und proximales Handgelenk, mittig, beidseits. |
| Hand | Kleinfingerballenbereich (Hypothenar): palmar, beidseits. |
| Finger | Beugeseite des Mittelfingers: mittig des Fingermitteglied, beidseits. |
| Bein | Medialer Unterschenkelbereich: auf halber Strecke der Verbindungslinie zwischen dem Condylus medialis der Tibia und dem Innenknöchel, beidseits. |

Einen Überblick über die Gruppensituation in Abhängigkeit von den explorierten Hautarealen liefert Tabelle 2.2.

Tab. 2.2: Probandenkollektiv A und B.

| Probanden | Geschlecht | Hauttyp | Hautareal | | | | | |
|-----------|------------|---------|-----------|--------|-----|------|--------|------|
| Gruppe A | | | Kopf | Rücken | Arm | Hand | Finger | Bein |
| 1 | weiblich | 3 | ja | - | - | - | - | - |
| 2 | weiblich | 3 | ja | - | - | - | - | - |
| 3 | weiblich | 2 | ja | - | - | - | - | - |
| 4 | weiblich | 2 | ja | - | - | - | - | - |
| 5 | weiblich | 2 | ja | - | - | - | - | - |
| 6 | weiblich | 2 | ja | - | - | - | - | - |
| Gruppe B | | | Kopf | Rücken | Arm | Hand | Finger | Bein |
| 1 | weiblich | 2 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 2 | weiblich | 2 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 3 | weiblich | 3 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 4 | männlich | 2 | - | ja | ja | ja | ja | ja |
| 5 | männlich | 2 | - | ja | ja | ja | ja | ja |
| 6 | männlich | 3 | - | ja | ja | ja | ja | ja |

2.2 *In vivo* Darstellung der erkrankten Haut

Die konfokale mikroskopische Untersuchung der pathologisch veränderten Haut wurde an freiwilligen Probanden durchgeführt, die als Patienten in der Hautklinik der Charité behandelt wurden. Ferner wurden Personen mit leichten Hautläsionen und –defekten von außerhalb des Krankenhauses rekrutiert. Die schriftliche Zustimmung der Ethikkommission zu diesen Untersuchungen lag vor. Messungen wurden nur im Einverständnis des behandelnden Arztes durchgeführt. Insgesamt wurden 25 Personen mit einem breiten Spektrum verschiedener entzündlichen und proliferativen dermalen Veränderungen und Erkrankungen zur *in vivo* Messung herangezogen. Sie wurden zur Auswertung in mehrere Subpopulationen gegliedert. Die jeweilige Verteilung von Alter, Geschlecht und Hauttyp, ist in den folgenden Unterkapiteln vorzufinden. Tabelle 2.3 präsentiert eine Übersicht.

Tab. 2.3: Aufstellung der laser-scan-mikroskopisch explorierten Hautpathologien.

| Hautveränderung | Anzahl der Patienten/ Probanden |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| Akute UV-Schädigung | 3 |
| Malassezia assoziierte Erkrankungen | 4 |
| Darstellung von Dermatophyten | 2 Schweineohren |
| Psoriasis | 6 |
| Herpes Zoster | 3 |
| Exanthem | 4 |
| Lichen ruber | 1 |
| Demodexfollikulitis | 1 |
| Basalzellkarzinom | 3 |

2.2.1 Akute UV-Schädigung der Haut



Abb. 2.1: UV-Erythem.

Drei Probandinnen mit einem Sonnenbrand (UV-Erythem) im Alter von jeweils 26 Jahren und den Hauttypen 2 und 3 wurden mit der fluoreszierenden Methode der kLSM untersucht. Die Messung erfolgte 24h nach künstlicher UV-Exposition (dermalight[®] Erythemtester, Dr. Hönle, Medizintechnik GmbH) am Rücken paravertebral des vierten Lendenwirbels. Das geschädigte Hautareal stellte sich als hellrotes, schmerzhaftes, scharf auf den Ort der Lichteinwirkung begrenztes Erythem ohne Blasenbildung und Nekrose dar. Keine systemischen

Infektzeichen (Fieber, Krankheitsgefühl, etc.) lagen vor. Eine Vergleichsuntersuchung wurde an makroskopisch unauffälliger Haut auf gleicher Höhe der Läsion durchgeführt.

2.2.2 Pilzkolonisation der Haut

2.2.2.1 Hefen als Besiedler der gesunden Haut

Die kLSM kann dazu verwendet werden, Pilzstrukturen auf der Hautoberfläche und den Nägeln *in vivo* darzustellen [39, 40, 99, 100]. Pilze sind heterotrophe Eukaryonten. Sie leben auf oder in organischem Material und reproduzieren sich sexuell, teils asexuell. Traditionell und morphologisch werden sie in Hefen (Sprosspilze) und Myzelen (Fadenpilze) unterteilt. Zusätzlich existiert die Gruppe der dimorphen Pilze, welche sich in ihrer Form den

Umgebungseinflüssen anpassen können. Die Gruppe der dimorphen Pilze beinhaltet auch das ubiquitäre Geschlecht der Malassezia. Im vielfältigen Reich der Pilze bilden nur ihre Hefen einen Teil der gesunden menschlichen Hautmikroflora. Hefen verschiedener Malasseziaspezies wurden bei den 12 gesunden Probanden der Gruppe A und B (Tab. 2.2) regional in abwechselnder numerischer Dichte entdeckt und aufgrund ihrer spezifischen Morphologie taxonomisch klassifiziert [101, 102].

2.2.2.2 *Malassezia als Pathogen*

Pilze aus dem Malasseziageschlecht können ebenfalls als Pathogen agieren. Durch den Wandel ihrer äußeren Gestalt von der Hefe- zu der Myzelenform werden sie mit einigen infektiösen Pilzkrankungen der Haut (Mykosen) in Verbindung gebracht. Dieser Übergang vom gesunden Zustand zum Krankheitserreger ist bis heute noch nicht verstanden. Die Tabelle 2.4 gibt einen Überblick über diese Verhältnisse wieder.

Tab. 2.4: Pilzkrankungen assoziiert mit Malassezia Hefen.

| | |
|--|---|
| Pityriasis versicolor (moderates Klima) | M. globosa |
| Pityriasis versicolor (tropisches Klima) | M. furfur, M. obtusa |
| Seborrhoische Dermatits | M. globosa, M. restricta |
| Malassezia Follikulitis | M. furfur, M. globosa, M. pachydermatis |
| Atopische Dermatitis | Malassezia spp. |
| Konfluente Papillomatosis | M. furfur |
| Neonatale Pustulosis | M. globosa |
| Otits | M. sympodialis |
| Onychomykosis | Malassezia spp. |

Es erfolgte eine Gegenüberstellungen durch die Fluoreszenzmethode der kLSM der natürlichen Malasseziabesiedlung auf der gesunden menschlichen Haut und ihrer pathogenen Besiedlung bei Hautmykosen. Vier Probanden wurden für diese *in vivo* Pilzuntersuchung am Menschen rekrutiert. Das Probandenkollektiv P bestand aus einer Frau und drei Männern. Ihr Durchschnittsalter betrug 38 ± 11 Jahre und die Hauttypgruppen 2 und 3 waren vertreten. Entweder litten die Testpersonen (P1 und P2) zum Zeitpunkt der Untersuchung an einer klinisch manifesten, Malassezia assoziierte Mykose oder waren in einem klinisch unauffälligen, halbjährigen Zustand nach einer solchen Erkrankung (P3 und P4). Alle Befunde waren hinsichtlich der Diagnose histologisch abgesichert und bestätigt. Die Tabelle 2.5 gibt einen Aufschluss über die Probanden, ihre Krankheitsverhältnisse und den Ort der Mykose wieder.

Tab. 2.5: Probandenkollektiv P mit oder nach Pilzerkrankung.

| Gruppe P | Geschlecht | Hauttyp | Mykose | Lokalisation |
|----------|------------|---------|--|------------------|
| 1 | weiblich | 2 | Seborrhoische Dermatitis | Stirn/nasolabial |
| 2 | männlich | 3 | Pityriasis versicolor alba | Nacken/Schulter |
| 3 | männlich | 2 | 6-monatiger Z.n. Pityriasis versicolor | Nacken/Schulter |
| 4 | männlich | 2 | 6-monatiger Z.n. M. Follikulitis | Brust/Beine |

Das aktuelle klinische Bild zum Zeitpunkt der Untersuchung:

- Probandin P1 litt zum Zeitpunkt der Untersuchung an einer Seborrhoischen Dermatitis, insbesondere im Gesichtsbereich der Stirn und Nasolabialfalten. Es handelte sich um ein fein schuppendes, braun-rötliches Erythem. Es juckte mäßig.
- Der Proband P2 mit der Diagnose Pityriasis versicolor alba zeigte zum Zeitpunkt der Untersuchung pathogene Hauterscheinungen am oberen Rumpf (insbesondere Brust und Rücken), den Schultern und am Hals. Die Effloreszenzen bildeten scharf umschriebene glatte Flecken, teils linsen- und pfennigstückgroß, teils größer und zu landkartenartigen Herden konfluierend. Die befallenen Stellen zeigten eine homogene und vollständige Depigmentierung. Es bestanden keine Schmerzen und kaum Juckreiz.
- Die Prädilektionsstellen der Probanden P3 und P4 zeigten ein unauffälliges makroskopisches Erscheinungsbild zum Zeitpunkt der konfokalen lasermikroskopischen Untersuchung.

2.2.2.3 Dermatophyten

Neben der Untersuchung am lebenden Menschen wurden zwei Schweineohren mit dem Fadenpilz *Trichophyton mentagrophytes* bepflanzt. Gezeigt werden sollte die Machbarkeit der Darstellung von obligat pathologischen Fadenpizzen. *T. mentagrophytes* ist einer von diesen und wird beim Mensch und beim Tier (zoophiler Dermatophyt) für verschiedene Mykosen verantwortlich gemacht [103].

Die Schweineohren kamen von Tieren der domestizierten Schweinerasse „Deutsche Landrasse“. Alle Schweineohren wurden von einem lokalen Metzger bezogen und innerhalb den ersten 24h post mortem zur Untersuchung genutzt. Zur Entfernung der Schmutzrückstände wurde die Hautoberfläche vorsichtig mit Wasser abgewaschen und anschließend getrocknet. Die Haut war zum Zeitpunkt der Pilzimpfung ansonsten nicht vorbehandelt und bis auf kleinere Läsionen und

Wunden klinisch unauffällig. Die Bepflanzung erfolgte an einer Sterilbank mit einer keimfreien Öse. Die Fadenpilze stammten aus einer *in vitro* Kultur. Eine kleine Probe wurde mittig auf ein markiertes Areal des Schweineohres aufgetragen und vorsichtig mit der Öse verrieben. Eine Darstellung erfolgte wenige Minuten nach der Aufbringung und wurde in einem Abstand von jeweils 24h drei Tage lang wiederholt. An jedem kontaminierten Schweineohrreal wurden also insgesamt vier Vermessungen absolviert.

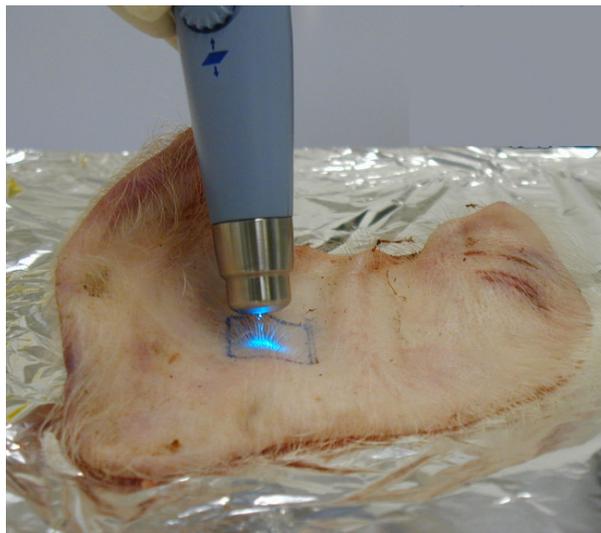


Abb. 2.2: Justierung des Handscanners auf dem Schweineohr.

2.2.3 Psoriasis (Schuppenflechte)



Abb. 2.3: Nummulärer Rundherd der Schuppenflechte an der Streckseite des Unterarms.

Die Schuppenflechte ist eine chronisch rezidivierend verlaufende Hautkrankheit. Ca. 1-2 % der Weltbevölkerung ist von ihr betroffen. Die Pathogenese bleibt bis heute ungeklärt. Weitestgehend handelt es sich um eine abnorme kutane Entzündungsreaktion, vermittelt durch Lymphozyten und Neutrophile Granulozyten, einhergehend mit einem von der Norm abweichenden epidermalen zytoplastischen Verhalten. Vermehrtes, überstürztes Wachstum der Epidermis ist das Hauptmerkmal der Schuppenflechte. Makroskopisch imponieren in der Regel scharf begrenzte, erythematöse, mit silberweißen Schuppen bedeckte, zuweilen juckende Herde verschiedener Größe und Gestalt, besonders an den Streckseiten der Extremitäten, Kreuzbeinregion und behaartem Kopf. Lichtmikroskopisch ist die Psoriasis wohl untersucht: Neben einer Verhornungsstörung der Epidermis mit kernhaltigen Keratinozyten im Stratum corneum und einer weitgehend fehlender Granulosazellschicht (Parakeratose) kommt es zu einer Einwanderung von Entzündungszellen entlang der Epidermis, Munro-Abszesse formend. Die Reteleisten liegen aufgrund einer einheitlich verdickten Stratum spinosum (Akanthose) in einer großen Tiefe. Gewundene und dilatierte Blutgefäße sind in vergrößerten und breiten Papillen zu entdecken (Papillomatosis) [34].

Für die *in vivo* Untersuchungen der Schuppenflechte wurden insgesamt sechs Probanden männlichen Geschlechtes mit einem Durchschnittsalter von 47±12 Jahren rekrutiert. Nummuläre Rundherde (Abb. 2.3) wurden für die Betrachtung verwendet. Dargestellt wurden, neben der hyperkeratotischen Haut, die Grenzen der Herde zur scheinbar gesunden Haut sowie medikamentös anbehandelte Haut mit reduzierter Schuppschicht. Die Tabelle 2.6 gibt eine Übersicht über das Probandenkollektiv S, Hauttypen, Messlokalisation und Untersuchungszeitpunkt nach Behandlungsbeginn. Proband 1 und Proband 6 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt vermessen.

Tab. 2.6: Patientenkollektiv S der Psoriatiker.

| Gruppe S | Geschlecht | Hauttyp | Untersuchungszeitpunkte | Lokalisation |
|----------|------------|---------|-------------------------|--------------|
| 1 | männlich | 2 | 1. Tag, 13. Tag | Handrücken |
| 2 | männlich | 3 | 23. Tag | Ellenbogen |
| 3 | männlich | 2 | 14. Tag | Knie |
| 4 | männlich | 2 | 18. Tag | Handgelenk |
| 5 | männlich | 3 | 7. Tag | Unterarm |
| 6 | männlich | 1 | 2. Tag, 14 Tag | Unterarm |

2.2.4 Weitere entzündliche Hauterkrankungen/-veränderungen

2.2.4.1 Zoster

Der Zoster (Gürtelrose) ist eine Hautkrankheit, die durch eine Reaktivierung in sensiblen Spinalganglien persistierender Herpes Zoster-Viren nach primärer Varizelleninfektion hervorgerufen wird. Die Inzidenz korreliert stark mit dem Lebensalter und der Abwehrlage des Immunsystems und ist im Durchschnitt 2-5 /1000 Personen /Jahr. Bei Älteren liegt sie 4x so hoch wie bei jungen Erwachsenen.

Unser Probandenkollektiv Z bestand aus drei Patienten der Charité - Berlin, die aufgrund der Schwere ihres Verlaufes klinisch aufgenommen wurden.

Sie alle zeigten floride, erythematös entzündliche Herde mit gruppiert stehenden Bläschen, welche auf das Hautsegment des befallenen Spinalganglions begrenzt waren. Einige Bläschen waren bereits pustulös umgewandelt und verkrustet. Jeweils nur ein Segment war einseitig befallen: bei Proband 1 das Th 2-Segment (Schultergürtel, links), bei Proband 2 und 3 der erste Ast des Trigeminus (Herpes zoster ophthalmicus) im Gesichtsbereich mit Augenbeteiligung. Mittelschwere neuralgiforme Schmerzen im Bereich des Segmentes waren vorhanden. Alle Patienten waren männlichen Geschlechtes mit Hauttypen 2 und 3 und einem Durchschnittsalter von 77 ± 4 Jahren. Allgemeinsymptome bestanden nicht, eine Immundefizienz war aus der Vorgeschichte nicht bekannt. Eine systemische Therapie mit dem Nukleosidanaloga Aciclovir wurde bei allen kurz vor der Untersuchung eingeleitet. Der Proband 1 wurde zu einem späteren Zeitpunkt erneut untersucht.

Tab. 2.7: Patientenkollektiv Z mit klinisch manifesten Herpes Zoster.

| Gruppe Z | Geschlecht | Hauttyp | Untersuchungszeitpunkte | Lokalisation |
|----------|------------|---------|-------------------------|---------------------|
| 1 | männlich | 2 | 1. Tag, 14. Tag | Schulter, links |
| 2 | männlich | 3 | 1. Tag | Zoster ophthalmicus |
| 3 | männlich | 3 | 1. Tag | Zoster ophthalmicus |

2.2.4.2 Exanthem

Ein Exanthem ist ein akut auftretender Hautauschlag. Er kommt häufig bei infektiösen Allgemeinerkrankungen wie Masern, Röteln, Windpocken oder Scharlach vor, kann aber auch Folge einer Arzneimittelunverträglichkeit sein. Grundsätzlich kann jedes Medikament einen Arzneimittelausschlag hervorrufen, wobei das Exanthem mit nahezu 50% die häufigste dermale Reaktion auf Arzneimittelunverträglichkeiten darstellt. Seltener sind Nahrungsmittel und physikalische Faktoren (z.B. UV-Licht) als auslösende Ursachen.

Exantheme betreffen die Haut und angrenzende Schleimhäute (Enanthem) und zeichnen sich durch eine außergewöhnliche morphologische Vielfalt aus. Die Pathogenese ist nicht genau geklärt und inkomplett und soll an dieser Stelle nicht genauer erörtert werden. Die wichtigste Unterscheidung in Infekt- und Medikament-bedingter Exantheme erfolgt auf Basis der Anamnese, Klinik und Serologie.

Wir untersuchten insgesamt vier Exanthem-Patienten. In zwei Fällen handelte es sich um eine Reaktion auf Penizillin. Penizillin wurde bei ihnen im Vorfeld 1-2 Wochen vor dem Auftreten des Hautauschlages verabreicht (Proband 1 und 2). Die Exantheme gingen mit Juckreiz einher, besonders Rumpf und Arme waren befallen. Allgemeinsymptome bestanden zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht. Proband 3 entwickelte ein paar Tage nach Fieberbeginn und allgemeiner Schwäche einen spontanen Hautauschlag ohne weitere Medikamentenanamnese, insbesondere im Rumpf- und Gesichtsbereich. Es handelte sich um ein infektiös bedingtes Exanthem. Bei Probanden 4 ohne Medikamentenanamnese und ohne Krankheitszeichen konnte keine Ursache gefunden werden. Es waren die Arme und Beine, weniger der Rumpf betroffen. Trotz unterschiedlicher Ursache und Lokalisation glichen sich die Effloreszenzen im Erscheinungsbild: kleinfleckige, konfluierende, makulöse Exantheme. Eine leichte Schuppung war zu erkennen.

Das Probandenkollektiv E war im Durchschnitt 32 ± 12 Jahre alt, die Tabelle 2.8 erlaubt eine Übersicht und gibt die genaue Messlokalisation wieder.

Tab. 2.8: Probandenkollektiv E mit Exanthem.

| Gruppe E | Geschlecht | Hauttyp | Arzneimittel | Lokalisation |
|----------|------------|---------|---------------------|--------------|
| 1 | Männlich | 3 | Penizillin | Oberarm |
| 2 | Weiblich | 3 | Penizillin | Ellenbogen |
| 3 | Weiblich | 2 | Infektion | Knie |
| 4 | Weiblich | 2 | Unbekannt (Infekt?) | Unterarm |

2.2.4.3 *Lichen ruber (Knötchenflechte)*

Für die lasermikroskopische Darstellung eines Lichen ruber planus konnte lediglich ein Patient rekrutiert werden. Er war männlichen Geschlechtes und zum Untersuchungszeitpunkt 53 Jahre alt mit dem Hauttyp 2. Es handelte sich um die Erstmanifestation eines Lichen ruber mit Betonung an den Beugeseiten der distalen Extremitäten. Die Einzelmorphe war eine Papel von charakteristischer helllivider Farbe, scharf begrenzt und abgeflacht. Punktförmig bis zu Linsengröße standen sie in Gruppen, teilweise kam es zur Konfluenz zu unregelmäßigen Plaques. Deutlich erkennbar war die fein-weißliche, netzartige Wickham-Streifung. Ein Befall der Mundschleimhaut lag nicht vor. Durch den intensiven Juckreiz waren teilweise Kratzspuren erkennbar. Die Untersuchung erfolgte vor dem Beginn einer Behandlung an einer Effloreszenz am rechten dorsalen Unterarm.

2.2.4.4 *Demodex folliculorum u. brevis (Haarbalgmilbe)*



Abb. 2.4: Lichtmikroskopische Vergrößerung einer Haarbalgmilbe.

Die Haarbalgmilbe gehört zu der Gruppe der Arthropoden, die permanente Ektoparasiten des Menschen sind. Sie besiedeln die Haarfollikel bzw. Talgdrüsenausführungsgänge bei fast allen gesunden Erwachsenen. Sie kommen fast ausschließlich im Gesicht vor, haben kurze Beinstummel, eine zigarrenförmige Gestalt und nähren sich, mit den Kopf nach unten im Follikel steckend, vom Zelldebris. Obwohl ihre pathogene Rolle umstritten ist, spielen sie gelegentlich eine Rolle bei Dermatosen.

Bei einer 64-jährigen Frau mit Verdacht auf bakterielle bzw. Malassezia Follikulitis am

Haaransatz und Nackenbereich wurden lasermikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Papulopustulöse folliculäre Eruptionen waren zu erkennen. Zur Überraschung stellte sich dem Untersucher eine massive Besiedlung der betroffenen Haarfollikel mit Demodexmilben dar.

2.2.5 Neoplastische Hauttumore/Basalzellkarzinom

Für die Darstellung neoplastisch veränderter Hauttumoren wurde in dieser Arbeit lediglich das Basalzellkarzinom verwendet. Es ist der häufigste Hauttumor weltweit und verantwortlich für annähernd 70% aller malignen, kutanen Neoplasien. Eine weitere besorgniserregende Tatsache ist die stark wachsende Inzidenzrate in den letzten Jahren [43, 44, 45].

Drei Patientinnen wurden für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie rekrutiert. Ihr Durchschnittsalter lag bei 68 ± 6 Jahren, vertreten waren Hauttypen 2 und 3. Die Basalzellkarzinome befanden sich alle im Gesichts- bzw. im Schläfenbereich. Es handelte sich bei den Basalzellkarzinomen ausschließlich um knotige Tumore. Sie erschienen durchscheinend wachsgelb bis graurötlich, überzogen von Teleangiektasien und umgeben von perlenschnurrartig aufgeworfenem Randsaum. Die Durchmesser erstreckten sich auf 3-8 cm, einer der Tumore zeigte eine zentrale Ulzeration. Die Therapie bestand aus einer chirurgischen Exzision im Gesunden.

Die Untersuchungen mit dem LSM erfolgte einen Tag vor dem operativen Eingriff. Die histologische Nachuntersuchung ergab in allen drei Fällen das Bild einer neoplastischen Veränderung im Sinne eines Basalzellkarzinoms.

Tab. 2.9: Probandenkollektiv B mit Basalzellkarzinom.

| Gruppe B | Geschlecht | Hauttyp | Untersuchungszeitpunkte | Lokalisation |
|----------|------------|---------|-------------------------|----------------|
| 1 | Weiblich | 2 | 1. Tag | Schläfe, links |
| 2 | Weiblich | 3 | 1. Tag | Stirn, links |
| 3 | Weiblich | 3 | 1. Tag | Wange, rechts |

2.3 Studiendesign

Die Untersuchungen wurden von März 2004 bis April 2006 im Bereich für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut an der Hautklinik der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

In Übereinstimmung mit der Zielsetzung der Promotionsarbeit wurde sowohl Schweinehaut als auch gesunde und erkrankte humane Haut mit der fluoreszierenden Methode der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie visuell dargestellt. Nach der Bildgewinnung wurden die digitalisierten Bilder mit adäquaten Analyseprogrammen nachgearbeitet, vermessen und letztlich analysiert.

2.4 Ethische Genehmigung

Alle Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung des Ethikkomitees der Universitätsklinik Charité – Universitätsmedizin Berlin. Alle Probanden wurden vor Versuchbeginn schriftlich und mündlich genau über die Fragestellung und Zielsetzung sowie über die Risiken und mögliche unerwünschte Wirkungen der Untersuchung aufgeklärt. Sie unterzeichneten als Einwilligung zu ihrer freiwilligen Studienteilnahme eine schriftliche Einverständniserklärung.

Das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin erteilte dem Bereich für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut, eine Forschungsabteilung der Hautklinik der Charité – Universitätsmedizin Berlin, eine Genehmigung zur Verwendung der Tierkörper Teile „Schweineohren“ zu wissenschaftlichen Lehr- und Forschungszwecken.

2.5 Methoden

2.5.1 Das dermatologische Laser-Scan-Mikroskopie „Stratum“

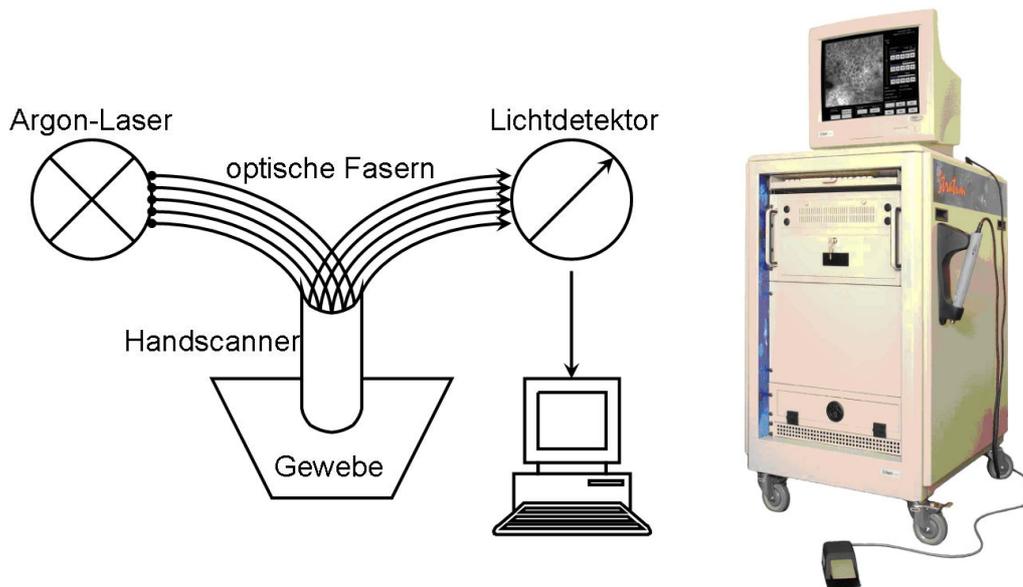


Abb. 2.5: Skizze und Photographie des dermatologischen LSM „Stratum“.

Die folgenden Untersuchungen wurden unter Verwendung des dermatologischen und faser-optischen konfokalen Laser-Scan-Mikroskops „Stratum“ (OptiScan Ltd., Melbourne, Australien) durchgeführt. Die Laserquelle ist ein 50 mW luftgekühlter Argon-Ionen Laser. Er erzeugt ein monochromatisches, blaues Laserlicht mit einer Wellenlänge von 488 nm. Das Laserlicht wird in einer Lichtleitfaser eingekoppelt und zu einem tragbaren, miniaturisierten Handscanner transferiert. Das optische Fenster des Handstücks kann direkt auf das zu untersuchende Hautareal aufgebracht werden (siehe Abbildung 2.6). Ein sanfter Druck führt zu einer Stabilisierung der Optik auf der Haut, wodurch Verwackelungsartefakte auf den Aufnahmen reduziert werden. Dagegen bewirkt ein leichtes Gleiten des Handscanners die fortlaufende Evaluation seitlich anliegender Hautareale. Durch das Laserlicht wird ein $250 \times 250 \mu\text{m}$ großes Hautareal homogen ausgeleuchtet und visuell erfasst.



Abb. 2.6: Demonstration des unkomplizierten Gebrauchs des Handscanners.

Die fluoreszierende Emission des zuvor applizierten und vom Laserlicht angeregten Kontrastmittels wird simultan durch den Handscanner detektiert. Das Vorschalten verschiedener Spektralfilter vor den Lichtdetektor gewährleistet die Auswahl bestimmter Detektionswellenlängen. Bei folgenden Untersuchungen wurde ein stark empfindlicher Multialkalifotokathodendetektor mit einem Barrierefilter verwendet. Die Detektionsbandweite dieser Kombination liegt bei 505-580 nm. In diesem Spektralbereich ist die natürliche Untergrundfluoreszenz der menschlichen Haut vernachlässigbar gering. Über optische Fasern wird das Licht einem Spektrometer zur Visualisierung zugesandt. Die Intensität des Signals wird in eine 12 bit Grauskala zur digitalen Darstellung, Vermessung und Speicherung umgewandelt. Ein Tiefenscan wird durch manuelle Änderung der Fokusebene mittels Kontrollrad, welches auf dem Handstück angebracht ist, realisiert. Durch Drehung des Rades wird die Lage der Objektlinse im Handstück variiert. Daraus resultiert eine Veränderung der Tiefenposition der Fokusebene im Zielgewebe (Abb. 2.7).

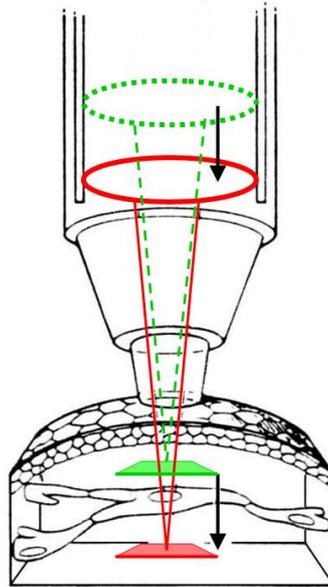


Abb. 2.7: Skizzenzeichnung über die Tiefendarstellung: In Abhängigkeit der Position der Linse verändert sich die Tiefenlage des Laserfokus im Gewebe.

Der Ar^+ -Laser hat bei einer Wellenlänge von 488 nm eine Endenergie von 3 mW, welche die Haut erreicht. Die maximale Penetrationstiefe liegt im Hautgewebe bei ungefähr 200 μm , variiert aber stark von der Zusammensetzung des Gewebes. In der Regel können Stratum corneum (Hornschicht) die unterschiedlichen Schichten der Epidermis sowie der obere Teil der Dermis inspiziert werden. Die Tiefenskala bei dem Gerät „Stratum“ ist nicht in absoluten Einheiten kalibriert. Die angezeigte Skala gibt die relativen Einheiten (rE) des Analog-Digital-Konverters von dem Linsen-Position-Sensor wieder. Diese Skala umfasst insgesamt einen Bereich von 4096 relativen Einheiten. Anzumerken ist, dass der Sensor in dem Messintervall linear arbeitet und eine relative Einheit etwa 0,8 μm entspricht.

Abhängig von der Scannzeit ist die digitale Auflösung. Für eine hohe Auflösung (1024x1024 Pixel) wurde eine Bildfrequenz von einem Bild pro 1,4 Sekunden gewählt. Annähernd eine 1000fache Vergrößerung wird durch diese konfokale Darstellungstechnik gewährt. Dabei wird eine laterale optische Auflösung von weniger als 2,5 μm und axial von unter 4 μm (Schichtdicke) erreicht. Die Schnittdicke ist also vergleichbar mit der routinemäßig gewählten 5 μm Schichtdicke der konventionellen Histologie. Nach der digitalen Umwandlung der Lichtsignale durch ein Spektrometer wird das Bild des ausgeleuchteten Hautareals auf einem 19 Zoll durchmessenden Computermonitor visuell wiedergegeben.

Das dermatologische LSM „Stratum“ liefert kontinuierlich Echtzeitbildersequenzen. Repräsentative Bilder der unterschiedlichen epidermalen und dermalen Hautschichten können in Abhängigkeit von der Lokalisation und der Zeit digital eingefangen werden. Ein Fußpedal als Auslöser der Bildspeicherung erleichtert dabei die Handhabung des konfokalen Mikroskops wesentlich. Die digital gespeicherten Abbildungen können in Kontrast und Helligkeit nachgearbeitet, auf andere Datenträger übertragen und mit entsprechenden Mess- und Analyseprogrammen evaluiert werden.

2.5.2 Applizierte Substanzen

Bei der fluoreszierenden Methode der konfokal mikroskopischen Darstellung der Haut wird ein exogener Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen, um einen Bildkontrast zu erzeugen. Die applizierte Farbstoffsubstanz muss durch ein Laserlicht angeregt werden, bevor eine Erfassung der Fluoreszenzmission möglich ist. Das Absorptionsmaximum der Substanz und die Wellenlänge des verwendeten monochromatischen Laserlichtes müssen für eine hohe Fluoreszenzausbeute möglichst im gleichen Wellenbereich liegen. Der bei den Untersuchungen eingesetzte Ar⁺-Laser arbeitet mit einer Wellenlänge von 488 nm. Deshalb bot sich die Verwendung der Lebensmittelfarbstoffe Curcumin und Natrium-Fluoreszein an. Bei den folgenden Messungen haben wir aufgrund dem breiten Toleranzspektrum und der guten klinischen Erfahrung auf den Lebensmittelfarbstoff Na-Fluoreszein zurückgegriffen.

Na-Fluoreszein kommt sowohl in der industriellen Forschung als auch im klinischen Bereich zum Einsatz. Routinemäßig wird es als diagnostisches Kontrastmittel in der Ophthalmologie verwendet. Auch bei der Durchführung der Fluoreszenzangiographie ist es gebräuchlich. Bei lokaler Anwendung sind bis außer seltenen allergischen Reaktionen keine unerwünschten Neben- und Wechselwirkungen beschrieben [104, 105, 106].

Na-Fluoreszein absorbiert blaues Licht bei einem Absorptions- und Anregungshöchstwert im Wellenlängenbereich von 460-500 nm, also in dem Wellenlängenbereich des anregenden Ar⁺-Lasers. Die emittierte Fluoreszenz erscheint als gelbgrünes Licht und besitzt ein maximales Signal bei ungefähr 520 nm, also im Detektionsbereich des verwendeten LSMs. Eine industriell hergestellte 0,2%ige wässrige und leicht basische Lösung des Na-Fluoreszeins (Fluorescein SE, Hersteller Alcon, Frankreich) wurde zur Markierung der kutanen Mikrostrukturen verwendet.

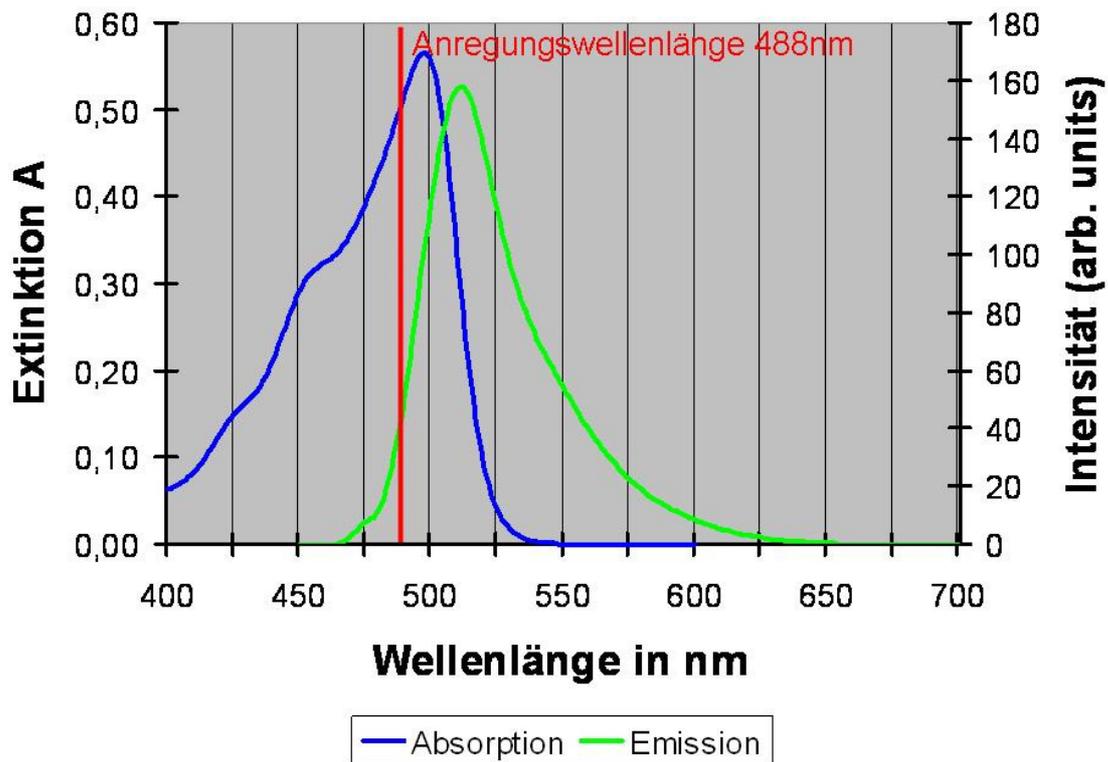


Abb. 2.8: Absorptions- und Emissionsmaxima von Na-Fluorescein.

2.5.3 Applikationsformen

Vor dem Untersuchungsbeginn muss bekannt sein, welche Strukturen der Haut durch das Kontrastmittel dargestellt werden sollen. Durch die unterschiedlichen Applikationsformen des Farbstoffes ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, es resultieren aber auch unterschiedliche Bildartefakte. Der Einfluss der Applikationsformen auf die Bildqualität wird im Ergebnisteil noch genauer erörtert.

2.5.3.1 Topische Applikation

Zur Markierung der kutanen Mikroflora, der Hautoberfläche (die oberen Zellschichten des Stratum corneum) sowie der Hautanhangsgebilde genügt eine topische Applikation der Fluoreszenzlösung auf das zu evaluierende Areal. Der Farbstoff wird oberflächlich aufgetropft und mit einem Wattestäbchen gleichmäßig verteilt. Vor der Messdurchführung wird nach einer

kurzen Einwirkzeit von etwa einer halben Minute das behandelte Areal mit einem Papiertuch wieder vorsichtig trocken getupft.

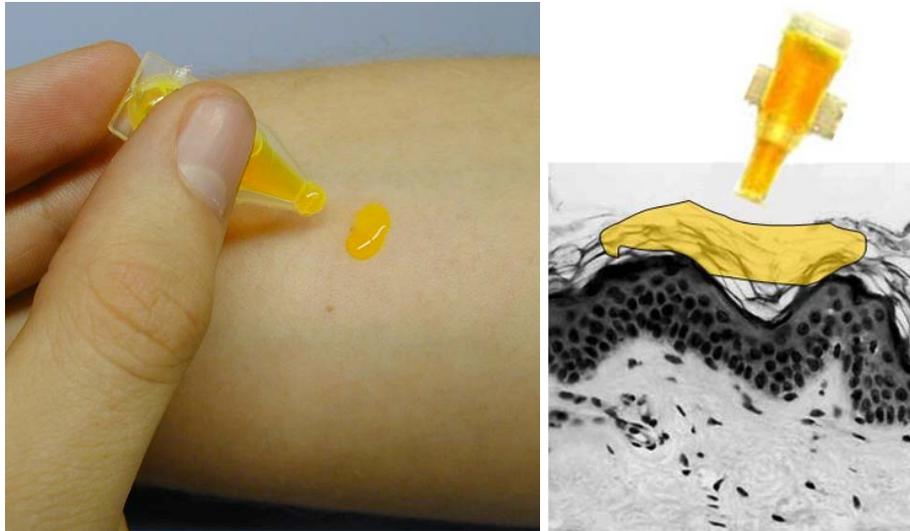


Abb. 2.9: Oberflächliche Applikation des Farbstoffes. Durch die Penetrationsbarriere der Hornschicht kann lediglich die Oberfläche angefärbt werden.

2.5.3.2 *Intradermale Injektion*

Sollen die in der Tiefe liegenden epidermalen Schichten sowie der obere Teil der Dermis angefärbt werden, so muss durch eine intradermale Injektion die Diffusionsbarriere des Stratum corneum umgangen werden. Nach einer standardmäßigen alkoholischen Desinfektion (Softasept N, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) werden ca. 20 μl der 0,2%igen Natrium-Fluoreszein-Lösung mittels einer 29-gaugh feinen Nadel intradermal in das zu untersuchende Areal injiziert. Es kommt anfangs zu einer starken Farbstoffanreicherung am Injektionspunkt, bemerkbar durch eine geringe Erhebung der Hautoberfläche. Durch eine intradermale Spreitung kommt es zur Umverteilung der Fluoreszenzlösung und die Elevation verschwindet. Insgesamt bei einem gesunden Hautareal wird eine Fläche von ungefähr 0,8 cm Durchmesser pro Injektion erfasst. Durch die Anwendung der intradermalen Injektion können Stratum basale bis einschließlich Stratum granulosum der Epidermis sowie dermale Papillen und der obere Teil der Dermis analysiert werden.

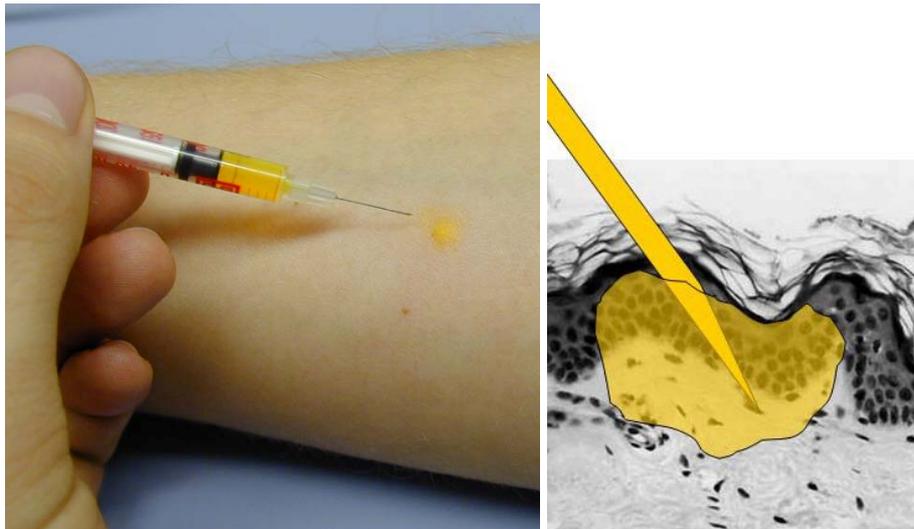


Abb. 2.10: Intradermale Injektion des Farbstoffes zur Anfärbung tieferer epidermaler und dermaler Schichten.

2.5.3.3 Kombination beider Darreichungsformen

Eine adäquate Darstellung der gesamten Epidermis und der oberen Dermis wird durch eine Kombination beider Einbringungsformen gesichert. Nach der intradermalen Injektion wird auf die gleiche Stelle ein Tropfen der Na-Fluoreszeinlösung aufgebracht. Dadurch ist eine durchgängige Visualisierung eines Hautareals von der Oberfläche bis zur Dermis möglich. Diese Darreichungsform wurde in dieser Arbeit als Applikationsstandart definiert.

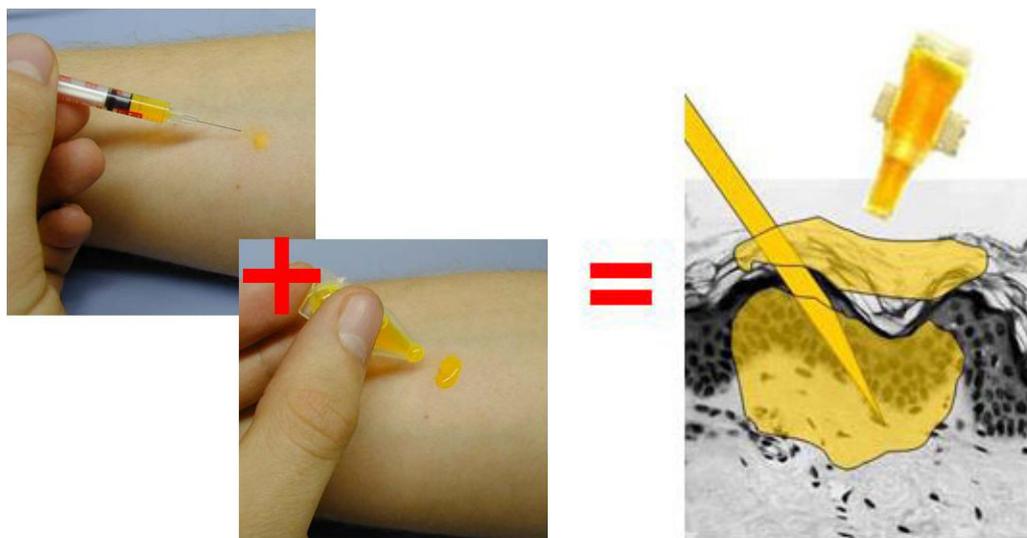


Abb. 2.11: Die Kombination von topischer und intradermalen Applikation an einem Areal erlaubt die kontinuierliche Schichtdarstellung von Oberfläche bis zur Dermis.

2.6 Probandenvorbereitung

Die zu untersuchenden Körperregionen jedes Probanden wurden 24 Stunden vor der laser-scan-mikroskopischen Messung nicht mehr mit Seifenlösung oder anderen kosmetischen Produkten behandelt. Beim Vorhandensein eines therapeutischen Arzneimittels auf einem erkrankten, zu untersuchenden Hautareal wurde dieses mit Leitungswasser abgespült und mit einem Papiertuch trocken getupft. Die Untersuchungsareale wurden mit Folienstiften markiert und für den Handscanner zugänglich und angemessen positioniert. Es folgte eine kurze Akklimatisierungszeit, in dem sich der Proband an die Raumparameter des Untersuchungsortes in entspannter Sitz- oder Liegeposition anpassen konnte. Die Augen jedes Probanden wurden vor der Laserstrahlung mit einer speziellen Schutzbrille geschützt.

2.7 Messdurchführung

Die Untersuchung eines Hautareals wurde immer nach dem gleichen standardisierten Schema durchgeführt. Um für gleich bleibende äußere Messbedingungen, wie konstante Zimmertemperatur und Luftfeuchtigkeit Sorge zu tragen, erfolgten alle Untersuchungen in der gleichen räumlichen Umgebung bei einer Umgebungstemperatur von 21 ± 2 °C. Der Ar⁺-Laser des faser-optischen konfokalen LSMs benötigte nach Betriebsnahme wenige Minuten, um seine Arbeitstemperatur zu erreichen. Währenddessen konnten die Daten des Probanden zur Wiederfindung der Bilddateien eingegeben werden. Außerdem war Zeit genug, den Probanden vorzubereiten. War das konfokale Mikroskop messbereit, wurde eine Standardapplikation der wässrigen Na-Fluoreszeinlösung durchgeführt. Nach einer halben Minute Einwirkungszeit, konnte die überstehende Farbstofflösung mit einem Papiertuch vorsichtig abgetragen werden. Die optische Darstellung des Hautareals konnte nun beginnen.

Die Messung erfolgte kontinuierlich von Minute 1 bis Minute 20 nach Applikation des Farbstoffes. Dieser zeitliche Rahmen wurde aufgrund von Vorversuchen festgelegt und versprach, abhängig von der sich ändernden Farbstoffverteilung, den höchsten Bildkontrast. Des Weiteren musste Rücksicht auf die Messzone im angefärbten Untersuchungsareal genommen werden. Ein Scannen zu Nah am Injektionspunkt der Fluoreszenzlösung provozierte ein zu

starkes Fluoreszenzsignal, wählte man hingegen einen Messpunkt zu weit entfernt vom Injektionspunkt, so erschien der Bildkontrast zu gering. Um eine gute Bildqualität zu erzielen, musste eine Messzone zwischen den beiden maximalen Varianten gefunden werden. Die Abbildung 2.12 illustriert diese Problematik.

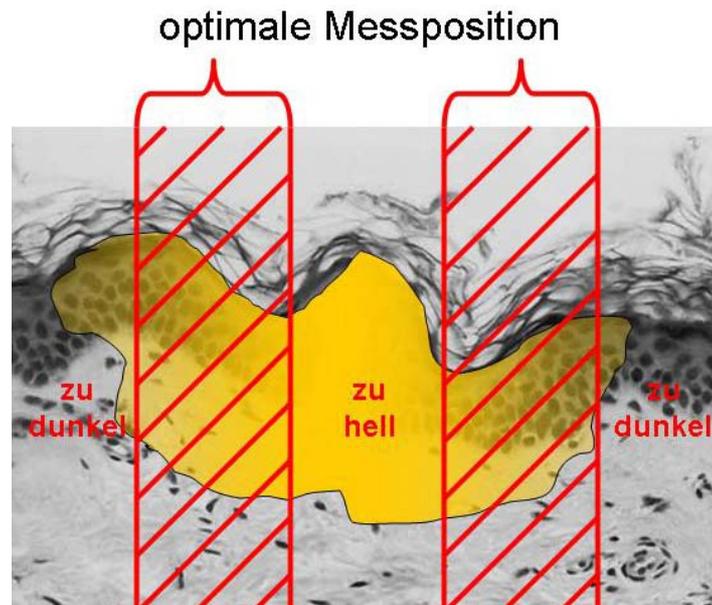


Abb. 2.12: Bestimmung der optimalen Messposition.

Hatte man eine gute Messposition gefunden, wurde der mobile Handscanner auf das Untersuchungsgewebe durch einen leichten Druck fixiert. Das blaue Laserlicht wurde ausgestrahlt und das grüne Fluoreszenzsignal konnte durch das gleiche optische Fenster des Handstückes detektiert werden. Durch Drehung des Tiefenrades änderte sich die Fokusebene entlang der z- Achse. Durch ein vorsichtiges Gleiten des Handscanners auf der Haut, erreichte man eine Darstellungsänderung entlang der x- und y-Achse. Um einen Vergleich in der Auswertung der Schichttiefen zu ermöglichen, wurde bei Tiefenmessungen die Ebene der Hautoberfläche jeweils als Nullpunkt in der Skala des Messgerätes festgesetzt. Repräsentative Bilder der verschiedenen Schichten der Haut wurden unter Kontrolle der relativen Einheiten (rE) der Messskala aus unterschiedlichen Tiefenlagen digital festgehalten. Für eine spätere Nachbearbeitung und Analyse konnten die gespeicherten Abbildungen sofort in Helligkeit und Kontrast aufgearbeitet werden.

Während der Untersuchung war es für die Bildqualität gelegentlich nötig, das optische Fenster des Handscanners mit einem Wattestäbchen und einer alkoholischen Reinigungslösung sporadisch zu säubern. Von der Hautoberfläche stammende Verunreinigungspartikel, wie Talk, Schweiß, Hautschuppen etc., lagerten sich an der Optik ab und führten zu einer Qualitätseinschränkung der konfokalen Bildgebung.

Die digital gespeicherten Bilder der Epidermis und oberen Dermis konnten zur weiteren Bearbeitung auf andere Datenträger transferiert werden. Eine Vermessung und Analyse der gesammelten Histobilder mit adäquaten Programmen war nun möglich. Bei der Untersuchung von erkrankter Haut wurde, wenn möglich, gesunde Haut des Probanden auf der kontralateralen Seite zum Vergleich gescannt.

Nach Beendigung der Messung erfolgte eine Reinigung und Desinfektion des Untersuchungsraumes und des konfokalen Laser-Scan-Mikroskops „Stratum“, insbesondere des Handstücks mit der Optik.

2.8 Histologische Gewebsentnahme und fotografische Abbildungen

Für diese Arbeit wurden keine Biopsien zur mikroskopischen Feinbetrachtung entnommen. Nichtsdestotrotz werden an einigen Stellen dieser Veröffentlichung lichtmikroskopische Darstellungen von histologischen Schnitten zum besseren Verständnis gezeigt. Diese stammen aus Beständen unseres Labors. Die fotografischen Abbildungen kommen hingegen meist aus der Fotoabteilung der Dermatologischen Klinik Charité Campus Mitte. Beide Bildmedien werden nicht zur Vermessung verwendet, sondern dienen lediglich zur Illustrierung und Verdeutlichung des Textes.

2.9 Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Parameter der gesunden Haut ermittelt. Die morphologischen Gegebenheiten wurden auf den eingefangenen Bildern mit mehreren Mess- und Analyseprogrammen evaluiert. So wurden, neben der Vermessung von Tiefe, verschiedene Zelldurchmesser und –größen bestimmt. Diese quantitativen Resultate wurden statistisch analysiert und zum Vergleich zwischen den einzelnen Probandengruppen genutzt.

2.9.1 Morphometrische Analyse

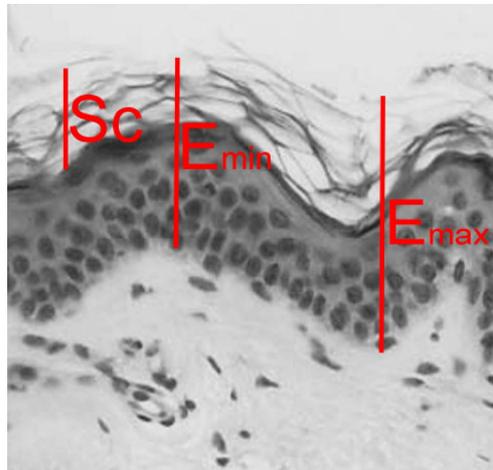


Abb. 2.13: Unterschiedliche Tiefenparameter der Epidermis.

Insgesamt wurden drei Tiefengrößen der Epidermis erforscht. Zunächst wurde die Dicke der Hornschicht (Sc) in relativen Einheiten (rE) ermittelt. Die Hornschicht erschien in der konfokalen LSM als relativ homogene Zellschicht. Ihre charakteristischen Zellen ließen sich gut von den lebenden Zellen der tiefern Epidermis unterscheiden. Bei dem Tiefenscan wurde so die Strecke zwischen Hautoberfläche und dem ersten Erscheinen der lebenden Zellen bestimmt. Auf ähnliche Art und Weise erfolgte auch die Lotung des zweiten Tiefenparameters, die minimale Epidermisdicke (E_{min}). Die Papillen offenbarten sich in dieser optischen Darstellungstechnik als helle, rundliche Flecken. Gut konnte der Beginn ihrer Spitzen abgegrenzt werden. E_{min} gibt also die Distanz zwischen Hautoberfläche und dem Auftreten der Papillenspitzen wieder. Hingegen beschreibt die maximale Tiefe der Epidermis (E_{max}) die Distanz zwischen Hautoberfläche und

dem Übergang der tiefen Reteleisten zur Dermis. Nicht bei allen Hautregionen konnte diese Schnitttiefe mit dem Laserlicht erreicht und bestimmt werden. Durch diese Tiefenwerte ließ sich die Papillenhöhe (P_a) rechnerisch durch die Formel:

$$P_a = E_{\max} - E_{\min}$$

annähernd ermitteln. Die histologische Abbildung 2.14 gibt die Vermessung der Tiefenverhältnisse schematisch wieder. Da eine geringe Schräglage des Handscanners zur unebenen Hautoberfläche meist eine schiefe Schnittebene erzeugte, wurden die $250 \times 250 \mu\text{m}$ umfassenden *en face* Bilder der Haut in vier Regionen unterteilt. Es wurde in jeder Region E_{\min} und E_{\max} bestimmt und der Mittelwert (MW) mit der Standardabweichung (SA) dieser einen Tiefenmessungen errechnet. Insgesamt wurden sechs Messungen auf jedem angefärbten Hautareal durchgeführt. MW und SA wurden für die gesammelten Parameter angesetzt.

Neben den Tiefenwerten wurden mannigfache Zellparameter bestimmt. Die *in vivo* konfokale Fluoreszenzdarstellung brachte Echtzeit-Scansequenzen der lebenden Haut in horizontaler Ansicht dar. Repräsentative Abbildungen wurden festgehalten und für die histologische Zellanalyse verwendet. Als Marker für die Zellgrößen wurden der longitudinale Zelldurchmesser und/oder die Fläche vermessen. Dafür kamen Keratinozyten aus den verschiedenartigen epidermalen Schichten, in die Epidermis eingewanderte Entzündungszellen, Hefepilze und pathologisch veränderte Hautzellen in Betracht. Die unterschiedlichen Zellen wurden aufgrund ihrer archetypischen Tiefe, ihrer charakteristischen Form, Größe und Morphologie der Zelle und des Kerns sowie an den typischen Erscheinungsstrukturen von Hautanhangsgebilden in der Epidermis/Dermis, wie Haarfollikel oder Schweißdrüsenausführungsgang, identifiziert. Für eine adäquate morphometrische Analyse und einen Vergleich wurden nur Darstellungen spezifischer Tiefe für die Auswertung verwendet. Genauere Angaben darüber finden sich im dazu gehörigen Ergebnistext.

Insgesamt wurden 10 Zellen pro Merkmal auf je drei verschiedenen Arealen mit dem Bildanalyseprogramm „analySis“ (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) vermessen. MW und SA wurden für die gesammelten Parameter errechnet.

2.9.2 Statistische Methoden

Der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SA) wurden für jeden quantitativ veranlagten, morphologischen Parameter kalkuliert. Der arithmetische Mittelwert einer Menge von n Beobachtungen x_1, x_2, \dots, x_n eines metrisch skalierten Merkmals X ist definiert als

$$MW = \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i .$$

Der MW ist folglich die Summe aller Beobachtungen x_i geteilt durch die Anzahl der Beobachtungen n .

Die SA gibt Aufschluss über die Variabilität eines Merkmals. Sie ist die Quadratwurzel von der Summe der quadrierten Abweichung jedes Einzelwertes x_i vom Mittelwert \bar{x} , dividiert durch die um 1 reduzierte Anzahl der Beobachtungen n :

$$SA = s = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{1}{n - 1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} .$$

Liegt eine starke Streuung, also eine hohe Verteilungsvielfalt der Einzelwerte vor, so wird auch SA groß ausfallen.

Um die verschiedenen Hautparameter beurteilen zu können, wurde nach Bestimmung der Mittelwerte mit den Standardabweichungen ein Vergleich der Mittelwerte durchgeführt. Als Statistikprogramm wurde dabei SPSS 12.0 für Windows (Copyright SPSS Inc. 1989-2003) verwendet.

Bei der Analyse vergleichen wir Mittelwerte quantitativer Merkmale abhängiger/verbundener Stichproben. Die Messergebnisse der unterschiedlichen Hautregionen an den gleichen Probanden soll miteinander verglichen werden. Zwei Hypothesen werden aufgestellt:

H₀: Es gibt keinen Unterschied zwischen den Merkmalen von verschiedenen Hautregionen.

H_A: Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Merkmalen verschiedener Regionen.

Liegen zwei Stichproben eines quantitativen Merkmals x vor, so geht es also um die Frage, ob sich die beiden Proben in den Erwartungswerten $\mu(x)$, $\mu(y)$ (geschätzt durch die Mittelwerte) wesentlich unterscheiden oder nicht. Da die Differenzen $d = x - y$ der unterschiedlichen Hautregionen normalverteilt sind, entsprechen die sachlichen Hypothesen diesen statistischen Hypothesen:

H0: $\mu(x) = \mu(y)$

HA: $\mu(x) \neq \mu(y)$

Der statistische Test für den Vergleich normalverteilter Messgrößen in zwei verbundenen Stichproben ist der t-Test mit der folgenden Formulierung der Prüfgröße:

$$t = \frac{\bar{d}}{sd} \sqrt{n} .$$

Dabei bedeutet \bar{d} den Mittelwert der Differenzen $d = x - y$ und sd die SA dieser Differenzen, n entspricht der Fallzahl.

Es kommt zu Ablehnung von H0, wenn die Differenz der Mittelwerte groß und die Variabilität klein sind. Wir lehnen die Nullhypothese H0 bei zweiseitiger Fragestellung ab, wenn dem berechneten t-Wert zugehörige Wahrscheinlichkeit p kleiner als die Irrtumswahrscheinlichkeit α ist. Als signifikanter Unterschied werden Merkmale ausgewiesen, wenn die zweiseitige Wahrscheinlichkeit $p < \alpha$, für $\alpha = 0,05$ oder 5% ausfällt.