

3 Ergebnisse

3.1 Qualitative und quantitative Darstellung der gesunden Haut

Die Fluoreszenzmethode der kLSM erlaubt eine klare Darstellung der Histoarchitektur der gesunden menschlichen Haut. Die Bilder von den 12 gesunden Probanden zeigen deutlich die zelluläre Struktur der Epidermis von Hautoberfläche bis zur Basalzellschicht. In Abhängigkeit von der Topographie und der Hautdicke konnten Anteile der oberen Dermis inspiziert werden. Dabei werden Tiefen von bis zu 200 μm erreicht, wobei sich lediglich die ersten 100–150 μm scharf und in einer guten Bildqualität abbilden lassen. Die dermalen Papillen waren bei allen Versuchsteilnehmern sichtbar. Die Schichten der Epidermis konnten aufgrund der morphologischen Charakteristika ihrer Zellen und ihrer typischen Tiefenlokalisierung bestimmt werden. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl die Oberfläche der Haut als auch die Epidermisschichten uneben, dünn und wellenförmig angelegt sind (vergleiche Abb. 3.1), präsentieren die konfokalen Abbildungen meist mehrere Zellschichten in einem Schnitt.

Des Weiteren ist anzumerken, dass im lebenden Gewebe der Haut eine Umverteilung des Fluoreszenzfarbstoffes stattfindet. In Abhängigkeit von der Zeit wurden Strukturen durch den Farbstoff unterschiedlich betont. Folglich unterlag auch die Bildqualität bei der kLSM einem zeitlichen Wandel. Während zum Beginn der nicht-invasiven Untersuchung die Zellgrenzen deutlich abgrenzbar waren, wurden später die Zellkerne hell gefärbt. Letztlich fluoreszierte das gesamte Zytoplasma, wodurch der Kontrast und damit die Aussagekraft über die zellulären Gegebenheiten verloren gingen. Neben der Epidermis und Dermis konnten Hautanhangsgebilde und gutartige Hautveränderungen beim Gesunden „unter die Lupe“ genommen werden.

3.1.1 Epidermale Hautschichten und obere Dermis

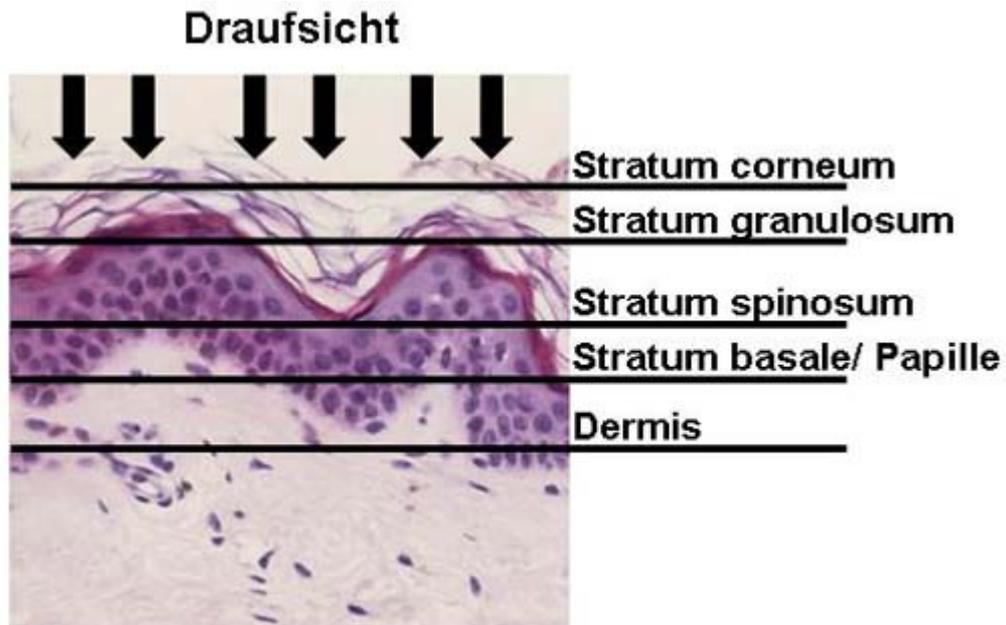


Abb. 3.1: Illustration der *en face* Perspektive bei der konfokalen Mikroskopie. Schnittebenen mit der jeweiligen Bezeichnung der epidermalen Schicht sind angegeben.

In dem folgenden Kapitel werden optische Schnittbilder durch die gesunde menschliche Haut präsentiert. Die Abbildungen der kLSM zeigen im Gegensatz zur konventionellen Histologie lediglich grau skalierte Bilder, mit einem ungewohnten Anschnitt horizontal zur Oberfläche. Die vertikale, konventionelle Histodarstellung der menschlichen Haut in Abbildung 3.1 soll den horizontalen Draufblick (*en face*) der LSM illustrieren. Die konfokalen Schnittebenen durch die verschiedenen epidermalen und dermalen Schichten werden demonstriert. Sie zeigen, auf welcher Höhe Bilder mit der konfokalen *in vivo* Mikroskopie aufgenommen wurden. Präsentiert werden die jeweiligen Epidermisschichten in Reihenfolge von der Hautoberfläche zur Tiefe hin.

3.1.1.1 *Stratum corneum*

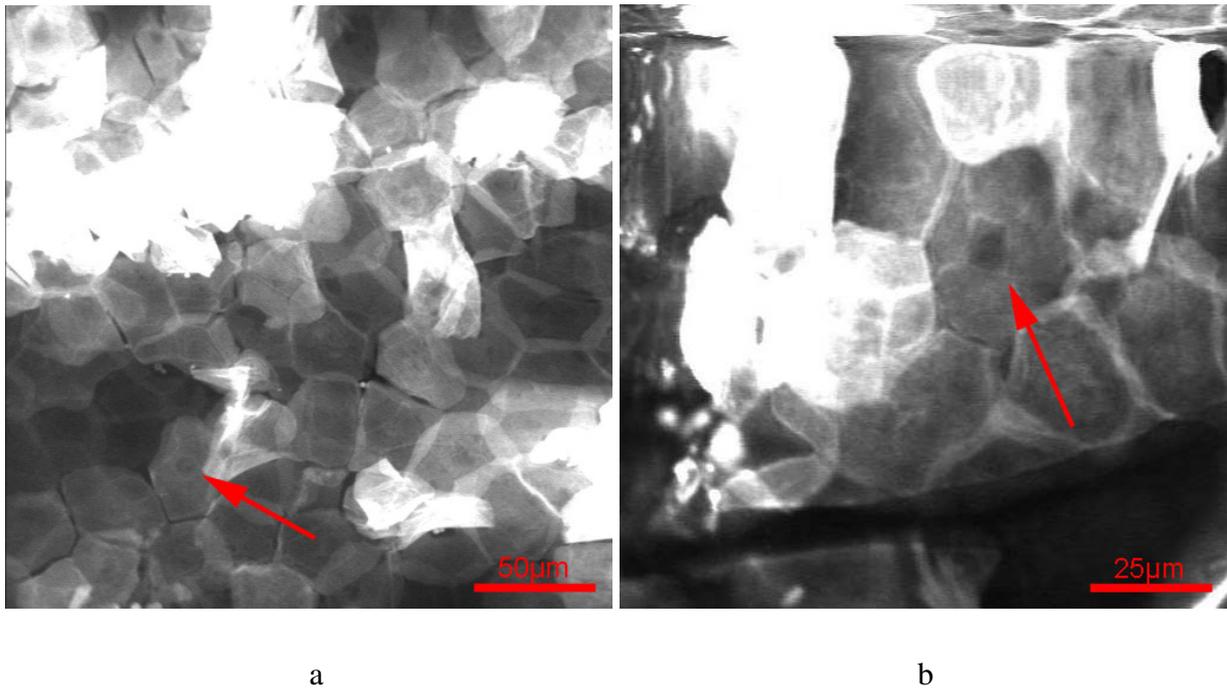


Abb. 3.2: Das typische Erscheinungsbild des Stratum corneum bei gesunder, menschlicher Haut. Links (a) eine Vollbildaufnahme, rechts (b) eine Vergrößerung zur besseren Darstellung von vereinzelt Kernüberresten in den Korneozyten (Pfeile).

Wird bei der konfokalen *in vivo* Darstellung mit der Messung an der Hautoberfläche begonnen, um anschließend beim gleichen Areal einen Tiefenscan durchzuführen, so stellt sich als erste Schicht der Epidermis die Hornschicht, das Stratum corneum, dar. Die Zellen des Stratum corneum, die Korneozyten, wurden durch die topisch aufgetragene Na-Fluoreszeinlösung klar und deutlich angefärbt. Detaillierte mikroskopische Strukturen waren auszumachen. Die Abbildungen dieser Ebene zeigen große, unregelmäßige, polygonal-geformte, flache Zellen. Die unterschiedlichen Zelllagen stellten sich in den konfokalen Aufnahmen überlappend dar. Bei einzelnen Hornzellen waren zusätzlich dunkle, pyknische Kernüberreste zu entdecken (Abb. 3.2, Pfeile). Es sammelten sich größere Farbstoffmengen in Furchen, Falten und Unebenheiten der Haut an. Sie bildeten helleuchtende „Kontrastsseen“, welche ein unregelmäßiges Erscheinungsbild der Hautoberfläche hervorrufen konnten.

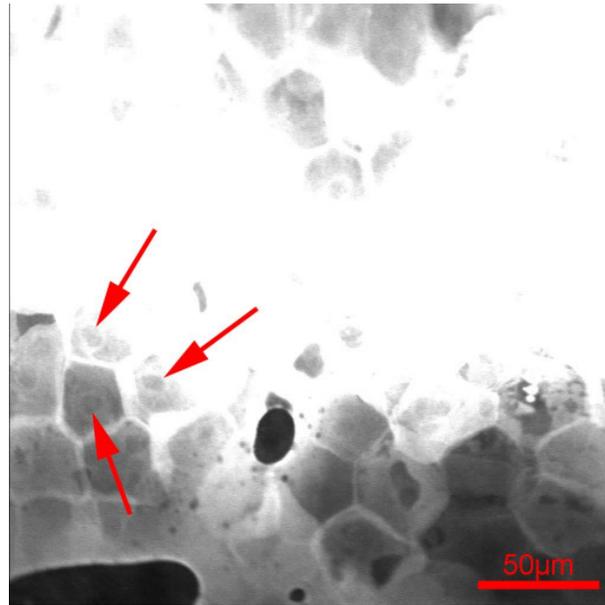


Abb. 3.3: Darstellung der tieferen Zellschichten des Stratum corneum. Die Zellen erscheinen geordneter und enthalten in der Regel Nuklei (Pfeile).

Die Form, Größe und Anordnung der Korneozyten variierte nicht nur in Abhängigkeit von der Körperregion, sondern auch von der fortschreitenden Darstellungstiefe der Hornschicht. So besaßen sie je nach topographischer Lokalisation einen Längsdurchmesser von etwa 25-45 µm. Tiefer liegende Zellen des Stratum corneum waren in der Regel in ihrer Anordnung ordentlicher und weniger zerklüftet, als die sich abschuppenden, beanspruchten und manchmal nur als Trümmer auszumachenden superfiziellen Zellen. Zusätzlich fanden sich in den tieferen Korneozytenlagen vermehrt Kerne bzw. ihre Überreste (Abb. 3.3, Pfeile). Leider wurde eine genaue Betrachtung dieser tieferen Hornzellen meist durch ein starkes Fluoreszenzsignal, wie es in der Abbildung 3.3 demonstriert wird, beeinträchtigt. Aufgrund der Barriereigenschaften der Hornschicht vermochte der oberflächlich applizierte Farbstoff die zur Außenwelt gerichtete epidermale Schutzschicht nur schlecht zu penetrieren. Das Na-Fluoreszein lagerte sich bereits in den oberen Zellschichten des Stratum corneum ein und überdeckte mit einer hohen Strahlungsintensität die darunter liegenden, nur schwach bis kaum gefärbten Korneozyten.

3.1.1.2 *Stratum granulosum*

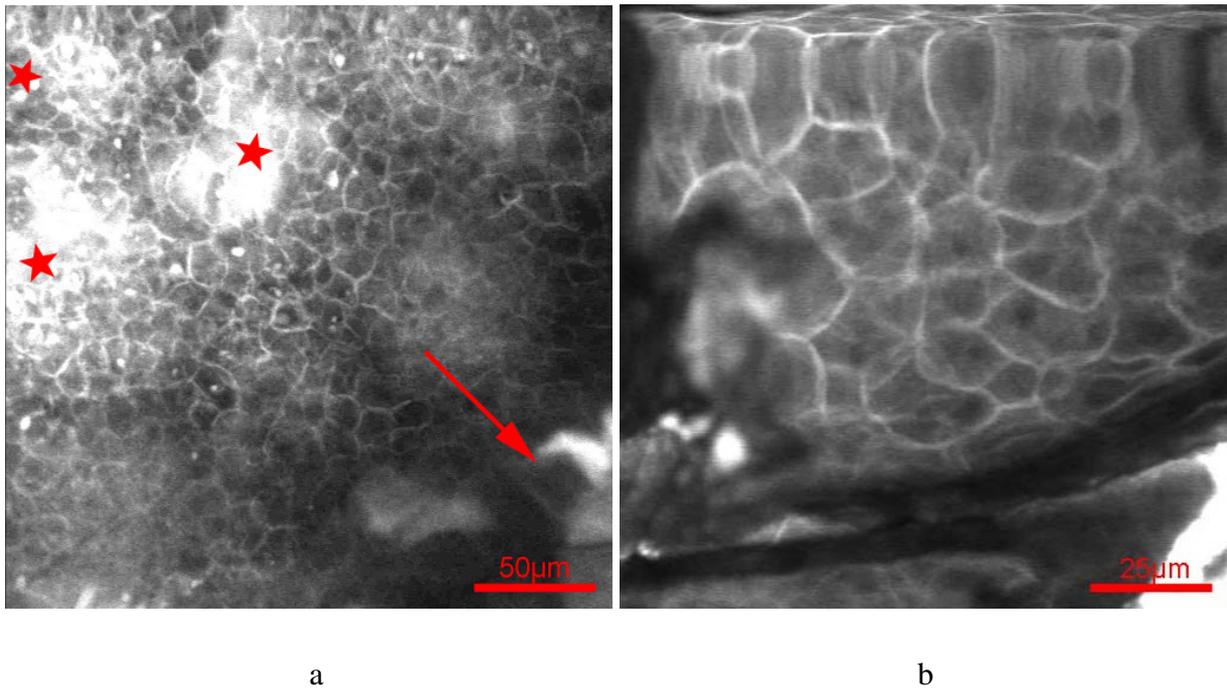


Abb. 3.4: Übersichtsaufnahme (a) und Detailaufnahme (b) der epidermalen Zellen des Stratum granulosum.

Die Schicht unterhalb des Stratum corneum umfasst nur wenige Zelllagen: das Stratum granulosum, die Körnerzellschicht. In Abhängigkeit von der Körperregion befanden sich diese ungefähr 10 µm (Rücken) bis über 100 µm (Handinnenfläche) unter der Hautoberfläche. Sie bestand meist nur aus 2-5 Zellreihen und es bedurfte etwas an Geschick, sie mit der *in vivo* kLSM visuell einzufangen. Die ungleichförmigen, zusammenhängenden Keratinozyten der Körnerzellschicht waren pflastersteinartig in ihrer Formation und nahmen rasch an Größe zur Tiefe hin ab (Abb. 3.4). Hinzuzufügen ist, dass bei einigen Untersuchungen eine flüchtige, dunkle Abgrenzungsschicht zwischen dem Stratum corneum und Stratum granulosum auszumachen war. Diese Schicht ist sowohl von dem Farbstoff, der topisch aufgetragen (Barrierefunktion), als auch von dem, der intradermal injiziert wurde, nicht gefärbt wurden. Abbildung 3.4 zeigt uns einen Blick auf die Körnerzellschicht als Übersichts- und Detailaufnahme. Durch eine leichte Kippung des Handscanners und der geringen Schichtdicke, zeigten sich in der Übersicht (Abb. 3.4.a) in der einen Ecke Zellen des darüber liegenden Stratum corneum (Pfeil), in der anderen die tiefer liegenden dermalen Papillen (Stern).

3.1.1.3 *Stratum germinativum*

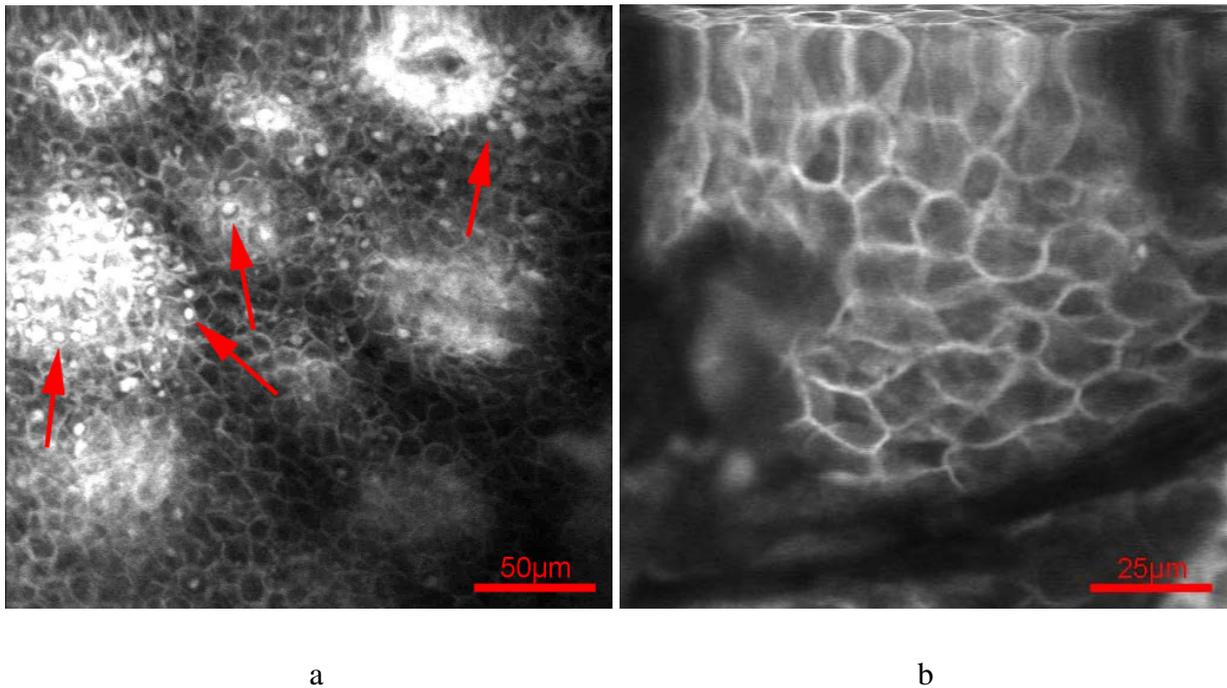


Abb. 3.5: Das Stratum spinosum in der Übersichtsaufnahme (a) und Detailaufnahme (b). Die Pfeile zeigen auf eine Färbung der Kerne der Stachelzellen hin. Dermale Papillen schimmern hell aus der Tiefe.

Die nächste epidermale Schicht der menschlichen Haut ist die Stachelzellschicht, das Stratum spinosum. Sie bildet zusammen mit dem Stratum basale die germinative Einheit und bestimmt mit ihrer dominierenden Breite meist das gesamte Bild der Epidermis. Die Stachelzellen waren in der horizontalen Schnittdarstellung der kLSM in einem bienenwabenförmigen Muster angeordnet. Von ihrer Größe her waren sie wesentlich kleiner als die Keratinozyten des Stratum granulosum (Abb. 3.4). Ihr Längsdurchmesser reduzierte sich mit fortschreitender Abbildungstiefe von ungefähr 20 µm bis auf 10 µm um die Hälfte. Besondere Aufmerksamkeit verdient in der Abbildung 3.5 (Pfeile) die intrazellulär erscheinenden und sich vermehrenden hellfluoreszierenden Flecken. Sie umgaben zunächst die Papillarkörper und stellten die angefärbten Zellkerne der Keratinozyten dar. Dieses Phänomen wird im nachfolgenden Kapitel der Farbstoffkinetik noch genauer erörtert.

3.1.1.4 Papillarkörper

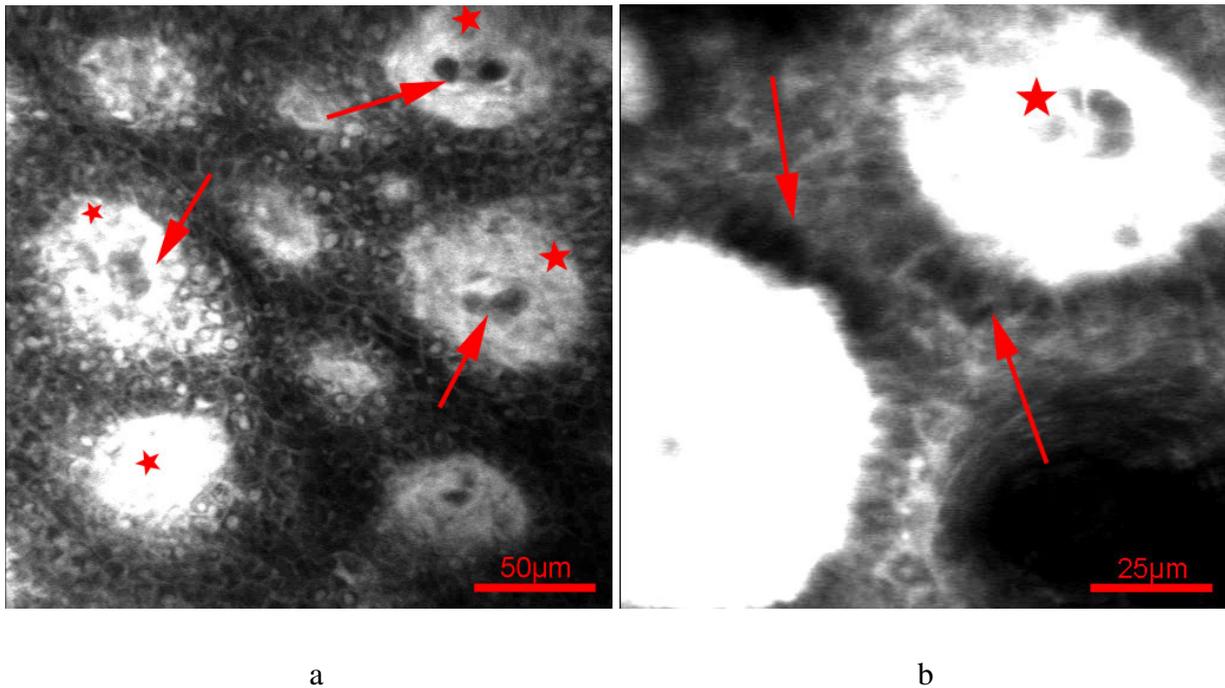


Abb. 3.6: Das Augenmerk liegt bei diesen Abbildungen auf den Papillarkörpern (Sternchen). Sie leuchten hell und enthalten dunkle Gefäße (a, Pfeile). Basalzellen sind an sie angelagert, besonders bei dunklem Hauttyp treten sie durch einen dunklen Kontrast zur Umgebung hervor (b, Pfeile).

Mit progressiver Tiefe und Annäherung an die Basalzellschicht, wurden immer mehr helle, azelluläre, rundliche Gebilde sichtbar (Abb. 3.6, Sternchen). Bei ihnen handelte es sich um die „Bergspitzen“ der papillären Dermis, den Papillarkörpern oder kurz Papillen. Die Papillen waren zwischen den epidermalen Zellen eingebettet. Ein dünner Saum von kleinen basalen Keratinozyten war, dicht gepackt, rundherum an die Papille angelagert. Einige dieser Basalzellen stachen deutlich mit ihrem signifikant dunkleren Zytoplasma gegenüber den restlichen kutanen Epithelzellen hervor (Abb. 3.6.b, Pfeile). Diese Erscheinung in Lokalisation des dermalen-epidermalen Überganges stellt Melanozyten und/oder stark melanierte Basalzellen dar. Sie kommen natürlich in dieser Tiefenzone beim Menschen vor, absorbieren das sichtbare Laserlicht vermehrt und konnten so einen starken, dunklen Kontrast in der Bildgestaltung spenden. Je nach Fülle der Farbstoffeinlagerung und Kontrastverstärkung am Gerät konnten die Papillen homogen hell erscheinen oder inhomogen und faserig wirken. In vielen der Papillen konnten kapilläre

Blutgefäße, mit jeweils einem zuführenden und einem abführenden Schenkel, nachgewiesen werden. Diese zeigten sich als zwei dunkle, rundliche Aussparungen im Papillarkörper (Abb. 3.6.a, Pfeile). Hin und wieder, wie in der Abbildung 3.6.b (Sternchen) gezeigt, war der verbindende Bogen der Gefäßschleife im Querschnitt getroffen. Bei gesunder Haut wurde in den dünnen Kapillaren nur selten ein dynamischer Blutfluss beobachtet. Dann allerdings erschien flüchtig ein dunkler, scheibenförmiger Kontrast einer sich durchpressenden Blutzelle im noch dunkleren Lumen des Blutgefäßes. Kaum erkannt, verschwand dieser Schatten auch schon wieder aus dem Blickfeld. Schnitt man eine dermale Papille mit Hilfe der konfokalen Methode optisch von der Spitze aus immer tiefer, so zeigten die Bilder eine Zunahme der Größe der runden Papille.

3.1.1.5 Dermis

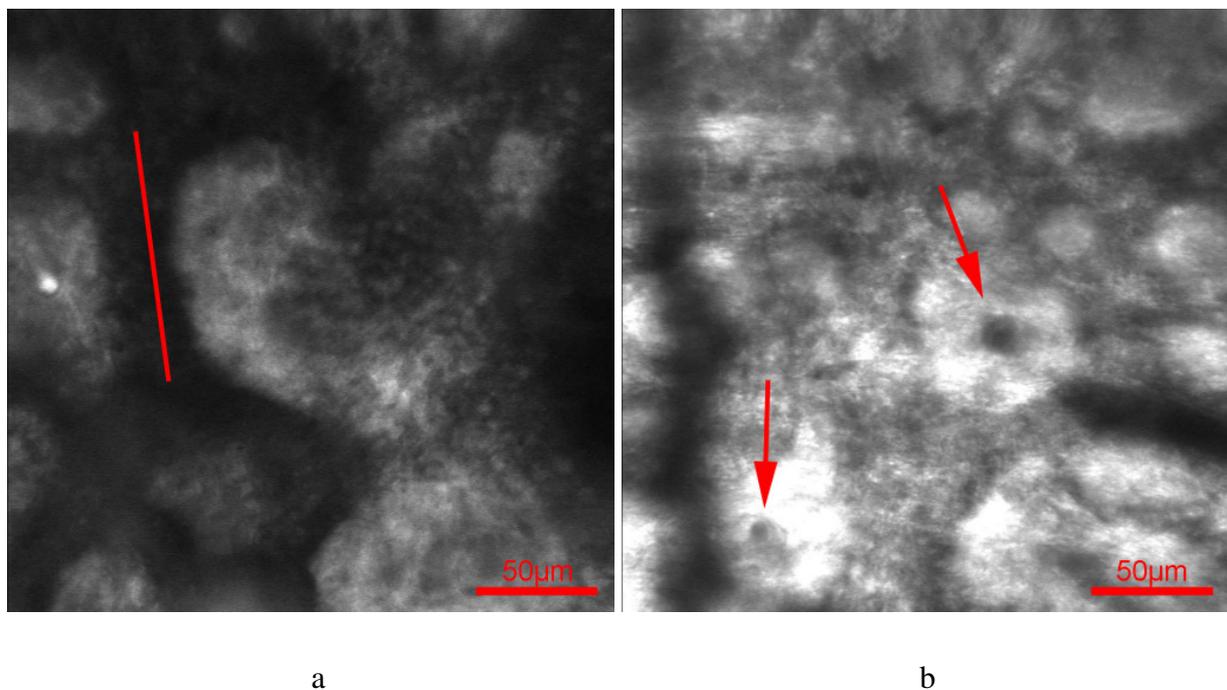


Abb. 3.7: Das Bild der Dermis bei einer dicken (a) und dünnen (b) Epidermis. Zu erkennen bei einer breiten Epidermis sind lediglich die hellen Strukturen der Papillen, eingerahmt von dunklen Reteleisten (a, Strich). Bei dünner Epidermis wird die tiefere Dermis sichtbar. Eine Maserung ist angedeutet, Zellen sind nicht zu erkennen, lediglich quer getroffene Gefäße (b, Pfeile).

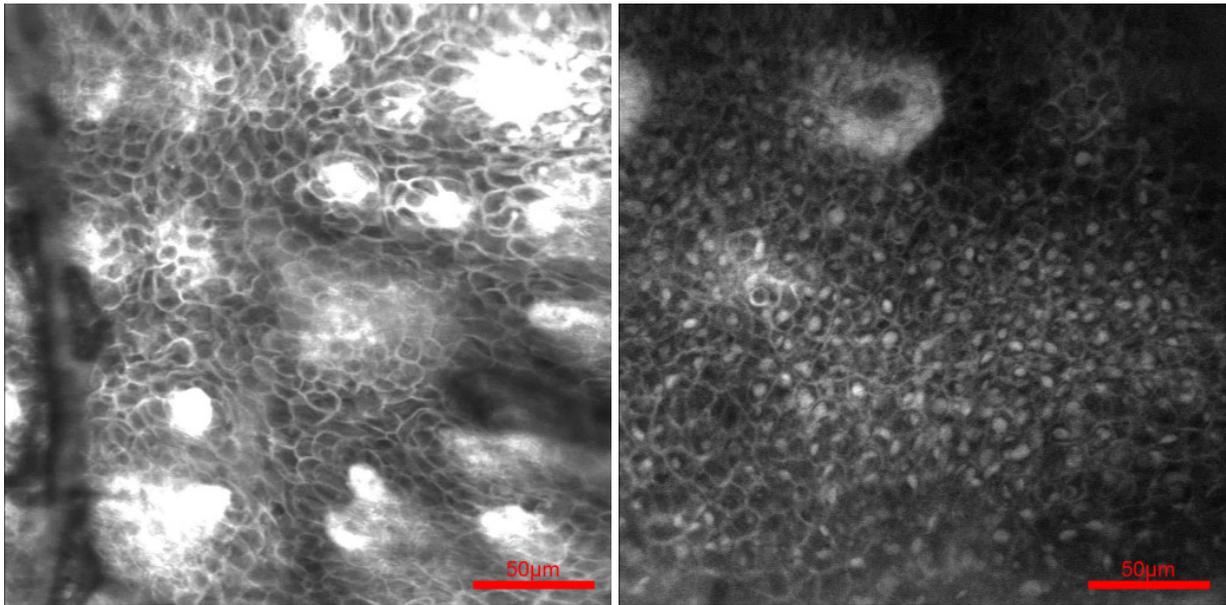
Der Übergang von der Epidermis zur Dermis wird von der dünnen Basalmembran gebildet. Sie und das einreihige, ihr aufliegende Stratum basale sind als Folge der starken Untergrundfluoreszenz der Dermis kaum auszumachen. Aufgrund der beschränkten Eindringtiefe des Laserlichtes konnte nicht an allen Körperregionen die retikuläre Dermis ausgeleuchtet werden. Außerdem war der dunkle Grund der tief gelegenen epidermalen Furchen, die Reteleisten, nicht immer einsehbar (Abb. 3.7.a, Linie). Sie wurden von den immer weiter auslaufenden, hellen Papillarkörpern eingerahmt.

An dünneren Hautstellen konnte eine visuelle Darstellung der Dermis bis zur retikulären Schicht erreicht werden. Mit fortschreitender Tiefe verschmolzen die Spitzen der dermalen Papillen allmählich miteinander zu „Bergkämme“, ihr Relief bestimmt nun das konfokale Bild. Die tiefen Reteleisten wurden immer besser inspizierbar und ihre „Täler“ verschwanden letztlich ganz, um völlig der papillären Dermis zu weichen. Die faserige, zellarme Dermis speicherte den Fluoreszenzfarbstoff vermehrt ein und strahlte deswegen dominanter als die Epidermis. Verschoob man die Fokusebene weiter in das Gewebe hinein so konnten manchmal sogar die retikuläre Dermis erkundet werden. Das Bild aus dieser Ebene wirkte verschwommen, faserig, teilweise fleckig und diffus. Eine Maserungsrichtung wurde in vielen Fällen ausgemacht, aber zelluläre Mikrostrukturen waren nicht zu sehen. Einige quer angeschnittene tiefe Kapillaren wurden im Querschnitt getroffen (Abb. 3.7.b, Pfeile). Eine genauere Analyse der Histoarchitektur dieser Ebene war in Folge der Unschärfe schwierig durchzuführen.

3.1.2 Farbstoffkinetik

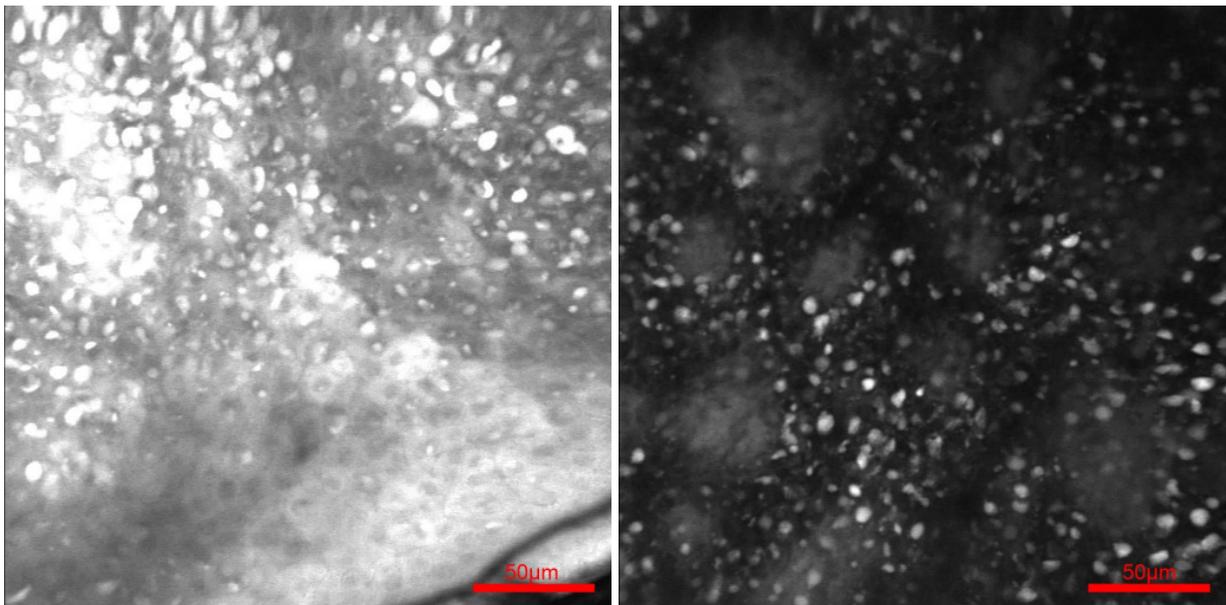
Die wässrige Na-Fluoreszeinlösung zeigte bei den Untersuchungen der ungeschädigten menschlichen Haut eine typische zeitabhängige Verteilung im Gewebe. Diese distributive Variation des Farbstoffes war bei allen gesunden Probanden in den gesamten epidermalen Schichten außer dem Stratum corneum nachvollziehbar. In Abhängigkeit von der Zeit ließen sich vier Phasen kategorisieren. Diese Phasen werden anhand der Abbildungen 3.8 a – d des Stratum spinosum verdeutlicht:

1. **Extrazelluläre Phase (a):** Initial, d.h. in den ersten drei Minuten nach der intradermalen Injektion, war der Farbstoff in der Epidermis vor allem in dem extrazellulären Bereich zwischen den Zellen, also im interzellulären Raum, anzufinden. Dadurch wurde bei den Darstellungen der Haut ein guter Zell-zu-Zell-Kontrast erzielt. Zellform und Zellgröße, die gesamte zelluläre Morphologie des Gewebes, waren in dieser Phase besonders gut messbar.
2. **Intrazelluläre, nukleäre Phase (b):** Der Fluoreszenzfarbstoff drang nach der extrazellulären Phase in die mononukleären Keratinozyten ein und färbte zunächst den basophilen Zellkern an. Von der dritten Minute an, erschienen so in der Gewebedarstellung immer mehr rundlich hellleuchtende Flecken. Sie stellten die Nuklei der epidermalen Keratinozyten dar. Durch den Umverteilungsprozess und die Diffusion des Farbstoffes, konnte die Zellmorphologie zu Gunsten der Zellkerne immer schlechter beurteilt werden.
3. **Intrazelluläre, zytoplasmatische Phase (c):** Nach ungefähr 15 Minuten fand eine starke Farbstoffanreicherung im Zytoplasma der Keratinozyten statt. Es waren wenig bis keine Zellgrenzen mehr auszumachen, die Histoarchitektur des kutanen Gewebes war aufgrund der mangelnden Kontrastierung nicht mehr beurteilbar. In einigen Bereichen kam es gar zu einer „Kontrastumkehrung“, d.h. die Zellkerne und/oder die interzellulären Zwischenräume, die bisher hell geleuchtet hatten, konnten nun in Relation zum Zytoplasma dunkel erscheinen. Diese Phase bestimmte bis zur 25.-30. Minute nach Applikation des Kontrastmittels das Gewebebild.
4. **Austreibungsphase (d):** Es fand während des gesamten Verteilungsprozesses auch eine ständig lokale Elimination des Farbstoffes statt. Besonders durch die papillären Kapillaren wurde der Farbstoff abtransportiert. Das Plasma der kapillären Blutgefäße färbte sich im Laufe der Zeit geringfügig heller, während der Kontrast in den epidermalen Schichten verblasste. Die stärkste Bindung besaß die Na-Fluoreszeinlösung zu den Zellkernen. Die Auswaschung erfolgte bei ihnen erst sehr spät. Ab der 30. Minute nach Farbstoffapplikation konnte so nur ein „Schneestöbern“ auf den Bildern dieser mikroskopischen Untersuchungstechnik festgehalten werden.



a

b



c

d

Abb. 3.8: Die vier Phasen der Kontrastverteilung in Abhängigkeit zur Zeit: Anfangs stellen sich die Zellgrenzen gut dar (a), danach diffundiert der Farbstoff mehr und mehr in die Zellen. Zunächst färbt er die Zellkerne (b), im Verlauf das Zytoplasma (c). Nach ungefähr 30 Minuten war ein großer Anteil des Na-Fluoreszeins lokal entfernt. Am längsten blieben die Zellkerne gefärbt (d), was zu einem Bild des „Schneegestöbers“ führt.

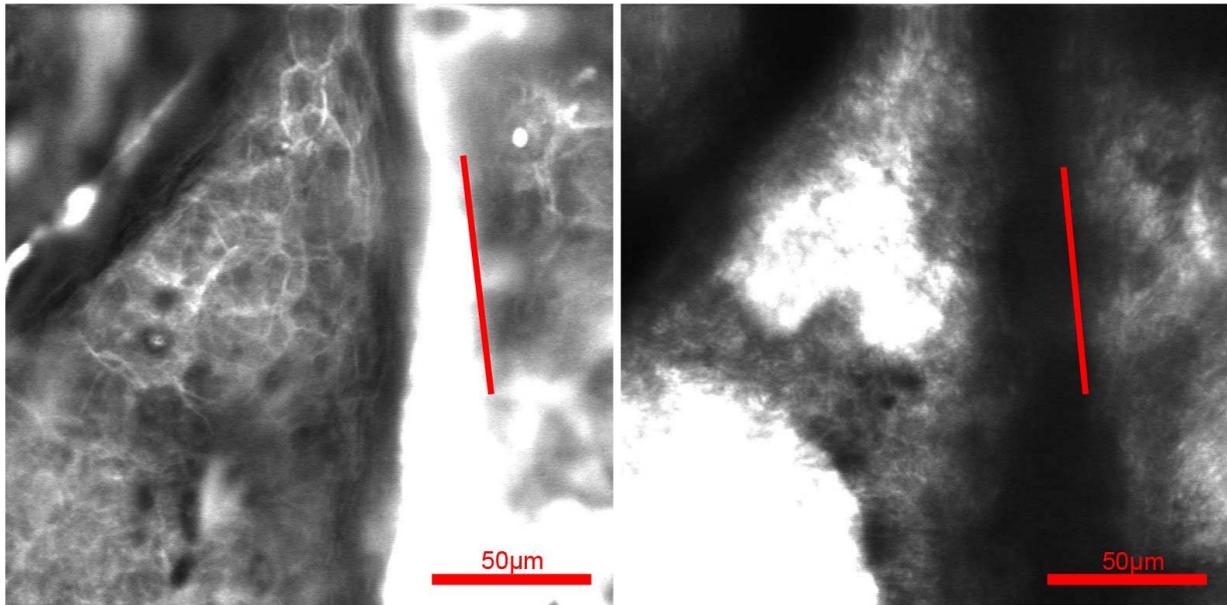
Ein kontinuierlicher, fließender Übergang war zwischen den verschiedenen Phasen auszumachen. Die Zeiten variierten von Individuum zu Individuum und der Messlokalisierung um wenige Minuten. Unabhängig waren die Farbstoffdiffusion und -clearance von der Intensität und Dauer der Lasereinstrahlung. Durch die Umverteilung des Farbstoffes wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Gewebestrukturen besonders gut dargestellt. War in der extrazellulären Phase die Zellmorphologie explorierbar, befand sich der Peak zur Analyse der Zellkerne erst in der zweiten, der intrazellulären, nukleären Phase 5-10 Minuten nach Applikation des Kontrastmittels. Färbte sich das Zytoplasma an, verringerten sich der Bildkontrast und die -qualität rasch, und es waren kaum noch Aussagen über das Gewebe zu treffen. Dieses Wissen zwang den Untersucher zu einer raschen und gezielten Exploration des Zielgewebes gleich nach Aufbringung des Farbstoffes.

3.1.3 Hautanhangsgebilde, gutartige Hautveränderungen und sich daraus ergebende Bildartfakte

Neben den verschiedenen Schichten der Epidermis und der oberen Dermis konnten an der gesunden Haut auch Hautanhangsgebilde und gutartige Hautveränderungen dargestellt werden. Durch ihren spezifischen Aufbau konnten sie in der Bildgebung der Fluoreszenzmethode der kLSM hervorragend interpretiert werden.

3.1.3.1 *Hautfurchen und Hautfalten*

Im topographischen Aufbau der Haut wurden Furchen und Falten in der Nähe der Oberfläche als helle Spalten gesehen (Abb. 3.9.a, Linie). Dieses resultierte aus der Tatsache, dass sie ähnlich einem Becken den topisch getropften Farbstoff speicherten. Verfolgte man die Rinnen in die Tiefe, so spitzten sie sich kielartig zu. Das Farbstoffreservoir nahm immer weiter ab und verschwand letztlich vollends. In dem Bereich darunter war dann ein dunkler Überlagerungsschatten der Furchen und Falten, wie in der Abbildung 3.9.b (Linie) gezeigt wird, zu erkennen. Waren sie also reichlich in dem Untersuchungsgebiet vertreten, konnten sie ein Hindernis zur Beurteilung tieferer Hautschichten in der konfokalen Mikroskopie darstellen.



a

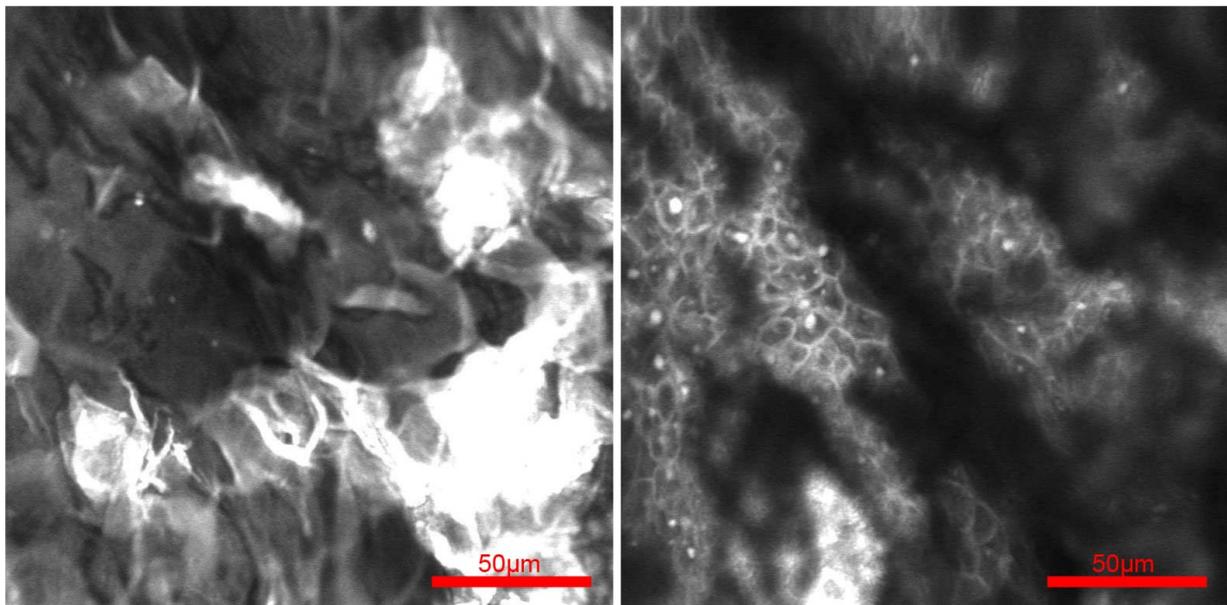
b

Abb. 3.9: Während oberflächlich die Furchen und Falten mit Farbstoff gefüllt sind (a, Linie), kommt es darunter in der Tiefe durch Überlagerungen zur Kontrastauslöschung (b, Linie).

3.1.3.2 Trockene Haut

Die Abbildung 3.10.a zeigt die Oberfläche trockener und spröder Haut. Vergleicht man diese mit normal feuchter Haut (Abb. 3.2), so wird der Unterschied deutlich. Die oberflächlichen Korneozyten standen bei Probanden mit einem trockenen Hauttyp ungeordnet, teilweise aufrecht, zueinander. Eine Überlappung der Hornzellen war bei ihnen nur ungenügend ausgeprägt. Häufig war es schwer, zelluläre Strukturen auszumachen, dazu waren viele Zelltrümmer vorhanden. Die stark zerklüftete Hautoberfläche lagerte den topisch applizierten Farbstoff unregelmäßig ein. Durch die schräg stehenden Korneozyten wurde zusätzlich das vom Scanner ausgestrahlte Laserlicht stark gebrochenen und reflektiert, so dass es nur unbefriedigend in das Zielgewebe eindrang. Dies hatte Folgen für die Darstellung der darunter liegenden epidermalen Schichten. Sie wurden durch einen geflechtartigen Korneozytenschatten überlagert, was die Bildqualität und Aussagekraft über diese Schichten wesentlich minderte (Abb. 3.10.b). Das gleiche Bild ergab sich bei einer Schuppung der Haut. Trockene Hauttypen konnten aufgrund dieses Wissens nur eingeschränkt und mit Vorbehalt durch die konfokale Mikroskopie *in vivo* untersucht werden. Bei ihnen lohnte sich eine Behandlung der Haut auf

Basis einer Feuchtigkeitscreme vor der Durchführung der laser-mikroskopischen Messung. Auch das standardmäßig verwendete, alkoholische Desinfektionsmittel zeigte einen gering austrocknenden Effekt auf die oberflächlichen Hornzellen.



a

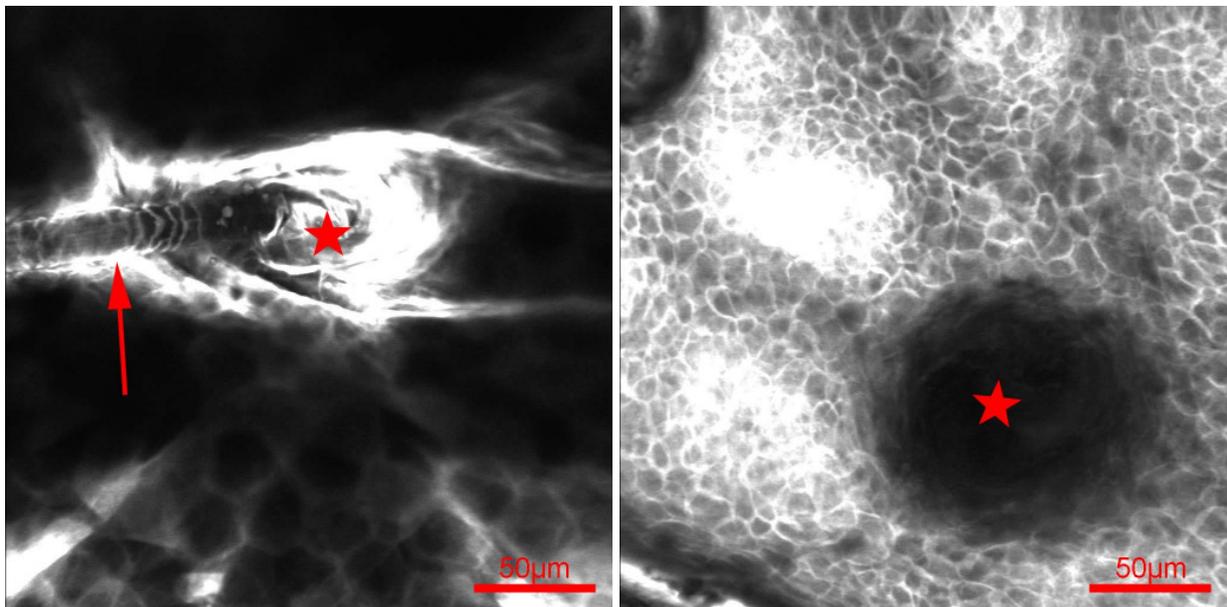
b

Abb. 3.10: Trockene, spröde Haut mindert die Aufnahmequalität der konfokalen Bilder. Sowohl die Hautoberfläche (a) als auch die Aufnahmen aus der Tiefe (b) sind hinsichtlich ihrer Aussagekraft eingeschränkt.

3.1.3.3 Haare

Unglücklicher Weise bestand eine große Schwierigkeit bei der Darstellung der Haare mittels LSM „Stratum“ darin, das gleiche Haar nach Absetzen des Handscanners erneut wieder zu finden. Trotzdem konnten auf der Hautoberfläche oft hell markierte, aus Follikel hervorgehende Haare beobachtet werden (Abb. 3.11.a). Ihre gerichtete Lamellenstruktur war deutlich erkennbar. Bildete sich ein Haar ohne seinen dazugehörigen Follikel ab, konnte durch vorsichtiges Gleiten des Handscanners der Haarschaft, der auf die Haut aufgedrückt war, bis zu seinem Ursprungsfollikel zurückverfolgt und mittig eingestellt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff drang innerhalb der kurzen Einwirkungszeit nur einen geringen Teil in den Haarfollikel ein. In allen

übrig darstellbaren Tiefen unter diesem fluoreszierenden Bereich war der Haarfollikel als große schwarze Ringstruktur zu erkennen (Abb. 3.11.b, Stern). Die dunkle Follikelstruktur konnte beim Tiefenscan als hilfreiche Orientierungsmarke verwendet werden.

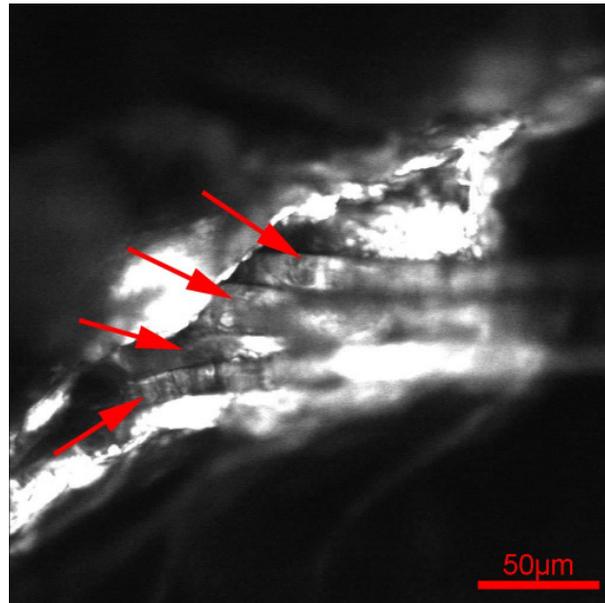


a

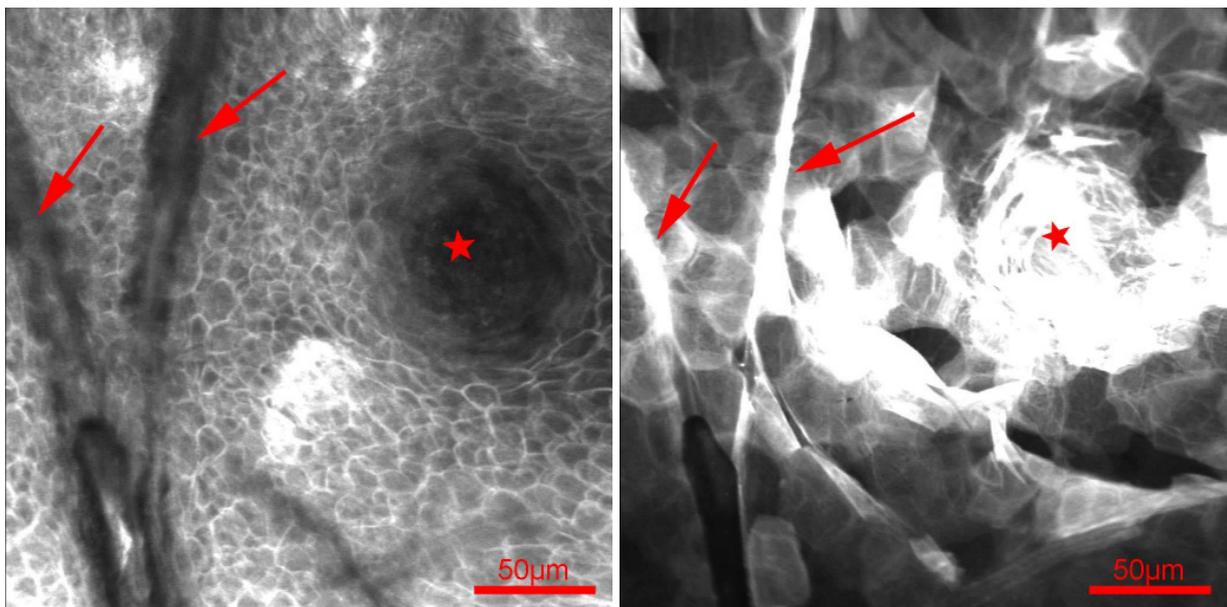
b

Abb. 3.11: Konfokale Darstellung eines Haares (a, Pfeil) und des dazugehörigen Follikels an der Oberfläche der Haut (a, Stern) und in einer tieferen Epidermisschicht (b, Stern).

Aufgrund der guten Darstellbarkeit des Haarschaftes und des Haarfollikels konnten strukturelle Haarveränderungen und interessante Haarphänomene mit der konfokalen Untersuchungstechnik am gesunden Lebenden visualisiert werden. So zeigt die Abbildungen 3.12.a eine trichostatische Veränderung des Haares. Aus einem Follikel kamen in diesem Falle vier dicht nebeneinander liegende, dünne Kolbenhaare. Das Synonym dieser Veränderung lautet auch Pinselhaar.



a



b

c

Abb. 3.12.: a: Vier Haare (Pfeile) teilen sich einen gemeinsamen Follikel – ein Phänomen, welches nur bei einem einzigen Probanden beobachtet wurde; b und c: Der „verschlossene“ Haarfollikel. Zu erkennen ist ein Haarfollikel ohne Haar (b und c, Sterne), welcher an der Hautoberfläche durch einen Pfropf abgedichtet wurde (c, Stern). Ein Zustand, welcher häufig bei allen Probanden beobachtet wurde.

Die Abbildungen 3.12.b und c zeigen hingegen ein anderes Phänomen. Die Bilder stammen aus unterschiedlichen Schnittebenen des gleichen Hautareals, zu erkennen anhand der identischen Furchung. Links (Abb. 3.12.b) sehen wir die Form eines dunklen, nicht angefärbten Haarfollikels auf Höhe des Stratum spinosum. Einige Papillenspitzen schimmerten deutlich unter den Keratinozyten hervor. Doch wie in der Abbildung 3.12.c der Oberfläche gezeigt, enthielt dieser Follikel keinen Haarschaft. Die Follikelöffnung war nach außen hin durch einen Pfropf abgeschirmt (Stern, Abb. 3.12.c). Dieser Pfropf bestand seitlich aus überlagernden Korneozyten und zur Öffnungsmitte hin aus kleineren Zelltrümmern. Ein Eindringen der wässrigen Farbstofflösung in die Follikelöffnung war nicht möglich. Dieses Verschlusssystem des leeren Haarfollikels konnte bei der Untersuchung der gesunden Haut häufiger entdeckt werden.

3.1.3.4 Mitesser (Komedones)



Abb. 3.13: Überschaubar stellt sich ein Mitesser dar. An der Oberfläche der Horn-Lipid-Pfropf (a, Stern), der in der Tiefe zunehmend dunkler wird (b, Stern).

Der Mitesser (Komedo) ist eine auf Hyperkeratose des Follikelostiums beruhende Talgdrüsenretentionszyste [107]. Komedones ließen sich mit dem LSM „Stratum“ gut darstellen. Auf der Abbildung 3.13 sehen wir anhand eines Einzelbeispiels zwei lasermikroskopische Aufnahmen eines offenen Komedos aus unterschiedlicher Tiefe. Makroskopisch klaffte bei diesem Mitesser die Follikelöffnung. Darinnen sah man den oberen Pol des Horn-Lipid-Pfropfes,

verursacht durch Schmutz und Melanin. In der *en face* Ansicht der kLSM war in der oberflächlichen Schnittebene der obere Pfropf in der gedehnten Follikelöffnung klar und deutlich wieder zuerkennen (a, Sternchen). Fuhr man mit der Scanebene in die Tiefe fort, wurde das Fluoreszenzsignal zunehmend schwächer (b, Sternchen), während der Follikelspalt immer mehr den Farbstoff annahm (b, Pfeile). Die Aufnahmen stammen aus einer fortgeschrittenen Phase der Farbstoffverteilung, weswegen vorwiegend die Kerne im Stratum spinosum angefärbt sind.

3.1.3.5 Schweißdrüsen

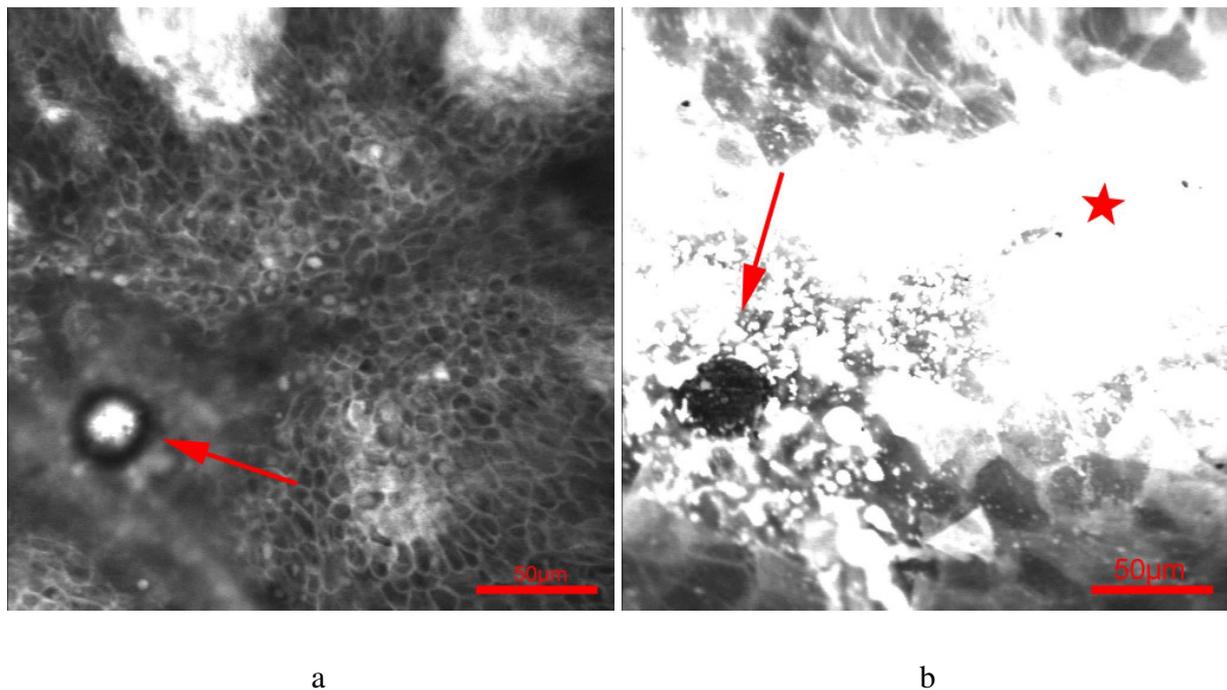


Abb. 3.14: Der Ausführungsgang der Schweißdrüsen dominierte in der Tiefe durch sein helles Kontrastsignal (a, Pfeil), während er sich an der Hautoberfläche immer dunkel zeigte (b, Pfeil), umlagert von Farbstoffflüssigkeit (b, Stern).

Von den Haarfollikeln abzugrenzen waren die durch die Epidermis ziehenden Ausführungsgänge der Schweißdrüsen. Sie kamen nahezu überall in der menschlichen Haut vor, besonders reichlich waren sie an der Stirn, dem Handteller und der Fußsohle auszumachen. Darzustellen war nur der letzte Teil des unverzweigten Ausführungsganges der Schweißdrüse. Er verlief meist geschlängelt durch die Epidermis. Ihm fehlt in diesem Bereich eine spezielle Epithelauskleidung, d. h. die Ableitung des Sekretes erfolgte durch erweiterte Interzellulargänge zwischen den Keratinozyten. Der Ausführungsgang nahm sich nach intradermaler Injektion rasch der Fluoreszenzlösung an (Abb. 3.14.a, Pfeil). Er leuchtete also im Gegensatz zum tiefen

Haarfollikel hell und besaß zur weiteren Differenzierung einen dünneren Durchmesser. Das Fluoreszenzsignal des Schweißsekretes war auffällig stark im Vergleich zu dem umgebenden kutanen Gewebe. Eingeschlossen wurde der Drüsenkanal von einer schwarzen Ringstruktur, welcher den Gang deutlich abgrenzte. Eine Verfolgung zur Hautoberfläche der Röhre war leicht praktikabel. Im Gegensatz zum oberflächlichen Haarfollikel war der Schweißdrüsenausführungsgang in dieser Ebene dunkel (Abb. 3.14.b, Pfeil). Um ihn herum war vermehrt Farbstoff angesammelt (Abb. 3.14.b, Stern). Ein Hinweis dafür, dass anscheinend ein aktiver Transport des Farbstoffes mit dem Schweiß an die Hautoberfläche stattfand. Das würde erklären, warum der Ausführungsgang den Farbstoff vermehrt einlagerte, sich das Endstück dunkel in der konfokalen Bildgestaltung darstellte und sich vermehrt „Fluoreszenzseen“ um den Ausführungsgang bildeten. Neben den dermalen Gefäßen stellte die Schweißdrüse vermutlich einen weiteren, natürlichen Eliminierungsweg des intradermal injizierten Kontrastmittels dar.

3.1.3.6 Melanozytäre Nävi

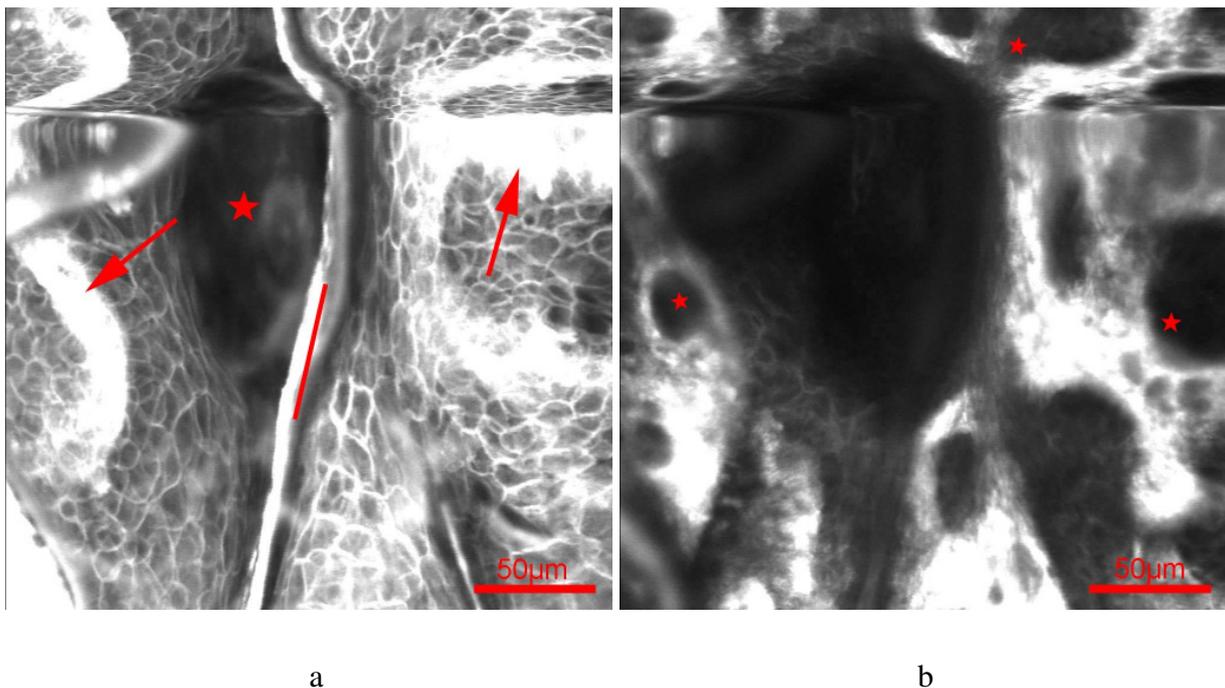


Abb. 3.15: Der gutartige Nävus stellt sich durch verschiedene Merkmale dar: Vermehrte Furchung (a, Linie), morphologisch veränderte Papillenspitzen (b, Pfeile) sowie dunkle Nävuszellnester (b, Sterne) waren die Hauptcharakteristika.

Pigmentierte, gutartige Hautläsionen zeigten einen großen Unterschied zur gesunden, unpigmentierten Haut in der konfokalen Mikroskopie. Im Folgenden werden diese Unterschiede am Beispiel eines melanozytären Pigmentnävus demonstriert. Die Anhäufung von Melanin in den Nävuszellen und in den Melanozyten versprach durch die Absorption des sichtbaren Lichtes einen dunklen Kontrast. Die Einteilung der melanozytären Nävi erfolgt nach der Lage der so genannten Nävuszellnester. Typischerweise sind die melaninproduzierenden Nävuszellen inselförmig zu solchen Haufen zusammengelagert. Liegen die Nävuszellnester histologisch in der Übergangszone (Junktionszone) zwischen Dermis und Epidermis, so spricht man von einem Junktionsnävi. Befinden sie sich in der Junktionszone und vermehrt im dermalen Bindegewebe, so spricht man nach Definition von einem Compound-Nävi. Sind die Zellnester ausschließlich in der Dermis zu finden, so heißen sie Dermale Nävi. Auf Sonderformen der melanozytären Nävi wird an dieser Stelle nicht eingegangen [79].

Mehrere Nävi wurden untersucht. Im Folgenden wird ein Einzelbeispiel angeführt: Ein knotiger, brauner bis braun-schwarzer, scharf begrenzter Nävus mit einer zerklüfteten Oberfläche wurde mit der fluoreszierenden Methode der kLSM untersucht. Die Darstellung 3.15 zeigt zwei optische Schnitte von demselben Hautareal aus unterschiedlicher Tiefe. Die linke Abbildung 3.15.a gibt das regelgerecht unveränderte Stratum spinosum und Teile des Stratum granulosum wieder. Die Zellgrenzen sind gut abgrenzbar, sie zeigen ihr charakteristisches pflasterstein- und bienenwabenförmiges Erscheinungsbild. Neben dem zentral gelegenen, dunklen Haarfollikel (Abb. 3.15.a, Stern) wird die starke Zerklüftung der Oberfläche (Abb. 3.15.a, Linie) und die kammartig angelegten, hellen Papillen deutlich (Abb. 3.15.a, Pfeile). Das Auffinden der Nävuszellnester erfolgte erst mit Annäherung an die epidermale-dermale Übergangszone. Waren anfangs einige dunkle, melaninhaltige Zellen zu sehen, wurde das Fluoreszenzsignal in der Tiefe von dem Melanin vollständig verschluckt. Die Zellnester waren als rundlich schwarze Löcher auf dem Hintergrund der hellen Dermis auszumachen (Abb. 3.15.b, Stern). Einzelne Nävuszellen ließen sich in den Nestern nicht mehr voneinander abgrenzen. Durch die Anwesenheit der Zellnester in der Junktionszone und der Dermis ergab sich in diesem Beispiel die histologische Sicherung eines Compound-Nävus.

3.1.3.7 Nägel

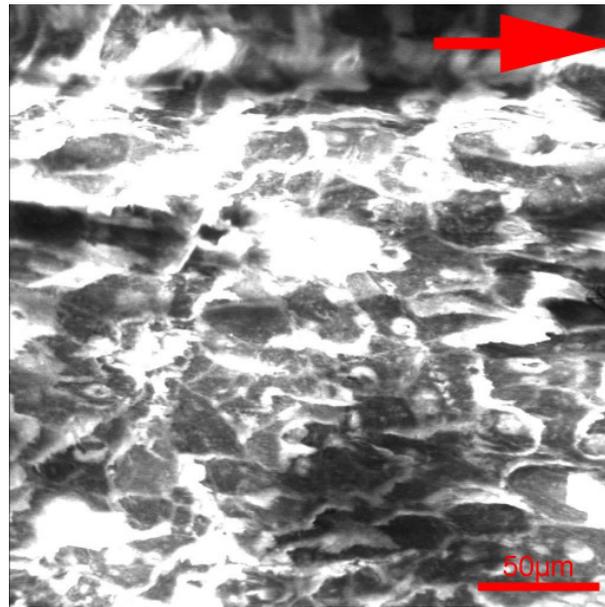


Abb. 3.16: Typisches Oberflächenrelief eines gesunden menschlichen Nagels. Der Pfeil zeigt in Richtung Fingerspitze.

Für die laser-mikroskopische Darstellung der Nägel war eine oberflächliche, topische Applikation des Farbstoffes ausreichend. Eine Injektion war nicht durchführbar und auch ein längeres Nagelbad mit dem Fluoreszenzfarbstoff erlaubte keinen Blick in die Nageltiefe. Es war also nur möglich, die Oberfläche des Nagels anzufärben und zu betrachten. Eine leichte Wölbung der Nagelplatte erschwerte den sicheren Halt des Handscanners. Häufige Verrutschungen waren die Folge. Nichtsdestotrotz konnten die Hornplatten des Nagels visuell festgehalten werden (Abb. 3.16). Sie sind unregelmäßig lamellenartig und weisen einen gerichteten Aufbau auf. Der Pfeil in der Abbildung 3.16 zeigt hier zur Verdeutlichung von der hinteren Nagelwurzel weg zur Fingerspitze.

3.1.4 Quantitative Vermessung der gesunden Haut

Zur Interpretation der konfokalen *in vivo* Darstellungen der abnormalen Haut muss dem Untersucher das Erscheinungsbild des gesunden Hautaspektes durch diese Visualisierungsmethode vertraut sein. Im ersten Abschnitt des Ergebniskapitels konnte gezeigt werden, dass sich die menschliche Haut mit der Fluoreszenzmethode der kLSM nicht-invasiv darstellen lässt. *En face* Abbilder von Mikrostrukturen der gesunden Haut, Hautanhangsgebilde und gutartigen Hautveränderungen wurden gezeigt. Außerdem wurden, neben der Farbstoffkinetik, sich aus der Anwendung ergebende Bildartefakte aufgewiesen.

Der folgende Abschnitt führt von der deskriptiven Ausführung zur Quantifizierung verschiedener Hautparameter mittels konfokaler Mikroskopie. Hornzellen, Keratinozyten und Hautdicken verschiedener Lokalisationen wurden geschlechtsspezifisch vermessen und verglichen. Die Kopfhaut wurde exemplarisch mit der konfokalen Mikroskopie genau analysiert. Die Werte konnten mit Messungen anderer in der Literatur angegebenen Parameter verglichen werden, um die Genauigkeit bzw. Abweichung der Fluoreszenzmethode der kLSM mit anderen histometrischen Studien zu vergleichen.

3.1.4.1 Kopfhaut (Gruppe A):

Rasch nach der Verabreichung der Na-Fluoreszeinlösung auf dem Skalp des okzipitalen Hinterkopfes konnte die gesamte Epidermis und die obere Dermis mit der kLSM sichtbar gemacht werden. Die topische Anwendung des Farbstoffes gestattete einen mikroskopischen Blick auf die oberflächlichen Hautstrukturen und Annexen. Besonders Haare, Haarfollikel, Hautfurchen und Falten, sowie Schweißdrüsen konnten auf zellulärer Ebene beobachtet werden. Bei Probanden mit langem und fettigem Haar war eine starke Besiedlung mit Hefepilze auszumachen (Abb. 3.17). Dies kam bei dem Probandenkollektiv Gruppe A mit einer Häufigkeit bei vier von den sechs Fällen vor. Eine taxonomische Klassifizierung der Hefepilze erfolgt beim Vergleich mit Dermatosen.

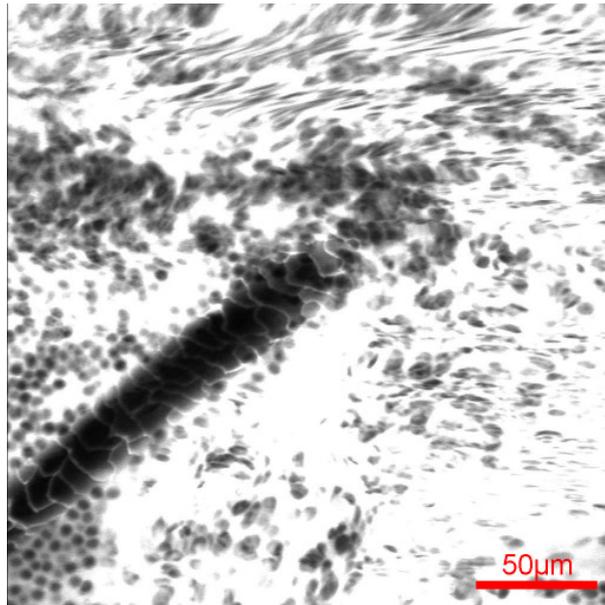


Abb. 3.17: Eine massive Hefenbesiedlung ist auf der Kopfhaut insbesondere bei langhaarigen Probanden zu beobachten. Hier umlagern die kernhaltigen Pilze ein zentral liegendes Haar.

Eine Evaluation der ersten epidermalen Schicht, dem Stratum corneum, war möglich. Sowohl die Fläche als auch der Längsdurchmesser der an der Oberfläche liegenden Korneozyten konnten wegen der guten Abbildungsqualität leicht bestimmt werden. Der mittlere Durchmesser am Kopf betrug $42,94 \mu\text{m}$, mit einer Standardabweichung (SA) von $\pm 2,14 \mu\text{m}$. Die mittlere Fläche der Hornzellen betrug $1256,11 \mu\text{m}^2$, mit einer SA von $\pm 54,37 \mu\text{m}^2$. Einen genaueren Aufschluss über die vorliegenden Verhältnisse geben die Tabelle 3.1 und die Abbildung 3.18 wieder.

Durch die intradermale Injektion war es leicht, reproduzierbare Darstellungen von Hautmikrostrukturen unter der Oberfläche zu erhalten. Es war ein kontinuierlicher Wandel der Keratinozytenform und -größe mit fortlaufendem Tiefenscan auszumachen. Übergänge zwischen den einzelnen epidermalen Zellschichten waren fließend. Allgemein war die *en face* numerische Dichte der epidermalen Zellen in der Tiefe wesentlich höher als im Stratum corneum. Das Stratum granulosum zeigte sich an der Kopfhaut nur spärlich ausgeprägt, die epithelialen Körnerzellen verloren rasch an Größe. Sie wurden bei jedem Probanden zum adäquaten Vergleich in der Tiefe 20-25 rE unter der Hautoberfläche bestimmt. Ihr mittlerer Durchmesser maß $19,05 \pm 1,59 \mu\text{m}$, die mittlere Fläche $366,77 \pm 19,94 \mu\text{m}^2$. Das sich darunter erstreckende Stratum spinosum wurde in einem Tiefenbereich von 55-65 rE vermessen. Ihre Keratinozyten zeigten ein charakteristisches Erscheinungsbild, sie waren bienenwabenhöförmig und regelmäßig

angeordnet. Sie besaßen einen mittleren Längsdurchmesser von $12,30 \pm 1,06 \mu\text{m}$ und eine Fläche von $149,88 \pm 6,2 \mu\text{m}^2$. Die basalen Keratinozyten bildeten die letzte epidermale Zelllage zur Dermis hin. Durch die Umlagerung der dermalen Papillen ließen sie sich gut abgrenzen und ihre Identifikation war ein leichtes Unterfangen. Ihr Längsdurchmesser betrug $9,82 \pm 0,68 \mu\text{m}$ im Mittel, ihre Fläche $107,63 \pm 16,01 \mu\text{m}^2$.

Tab. 3.1: Einzelaufstellung der Probanden der Gruppe A: Vermessung von Keratinozyten der gesunden Kopfhaut in verschiedenen Epidermisschichten.

Proband	Keratinozytengröße	Stratum corneum	Str. granulosum	Str. spinosum	Stratum basale
1	Durchmesser/ μm	44,81 $\pm 4,97$	18,96 $\pm 3,04$	11,89 $\pm 1,92$	9,19 $\pm 1,12$
	Fläche/ μm^2	1241,5 $\pm 165,64$	345,98 $\pm 40,16$	152,44 $\pm 10,11$	89,68 $\pm 13,39$
2	Durchmesser/ μm	42,73 $\pm 2,37$	21,08 $\pm 2,61$	12,26 $\pm 1,06$	9,59 $\pm 0,6$
	Fläche/ μm^2	1179,05 $\pm 121,34$	390,75 $\pm 51,95$	141,06 $\pm 16,25$	100,67 $\pm 12,9$
3	Durchmesser/ μm	43,93 $\pm 3,84$	16,87 $\pm 2,03$	11,81 $\pm 1,19$	9,64 $\pm 1,06$
	Fläche/ μm^2	1252,07 $\pm 109,33$	358,19 $\pm 65,34$	153,47 $\pm 13,63$	97,55 $\pm 18,55$
4	Durchmesser/ μm	43,22 $\pm 2,65$	17,64 $\pm 2,31$	13,27 $\pm 1,41$	10,87 $\pm 0,69$
	Fläche/ μm^2	1236,81 $\pm 104,04$	344,50 $\pm 69,33$	146,39 $\pm 16,29$	135,5 $\pm 17,22$
5	Durchmesser/ μm	38,83 $\pm 2,23$	20,28 $\pm 1,93$	13,74 $\pm 1,54$	9,22 $\pm 1,6$
	Fläche/ μm^2	1342,13 $\pm 264,18$	376,75 $\pm 77,90$	147,09 $\pm 24,17$	113,17 $\pm 12,99$
6	Durchmesser/ μm	44,14 $\pm 3,59$	19,47 $\pm 1,69$	10,82 $\pm 1,43$	10,42 $\pm 0,93$
	Fläche/ μm^2	1285,12 $\pm 151,72$	384,42 $\pm 50,75$	158,81 $\pm 21,03$	109,19 $\pm 14,28$
Mittelwert	Durchmesser/ μm	42,94 $\pm 2,14$	19,05 $\pm 1,59$	12,30 $\pm 1,06$	9,82 $\pm 0,68$
	Fläche/ μm^2	1256,11 $\pm 54,37$	366,77 $\pm 19,94$	149,88 $\pm 6,28$	107,63 $\pm 16,01$

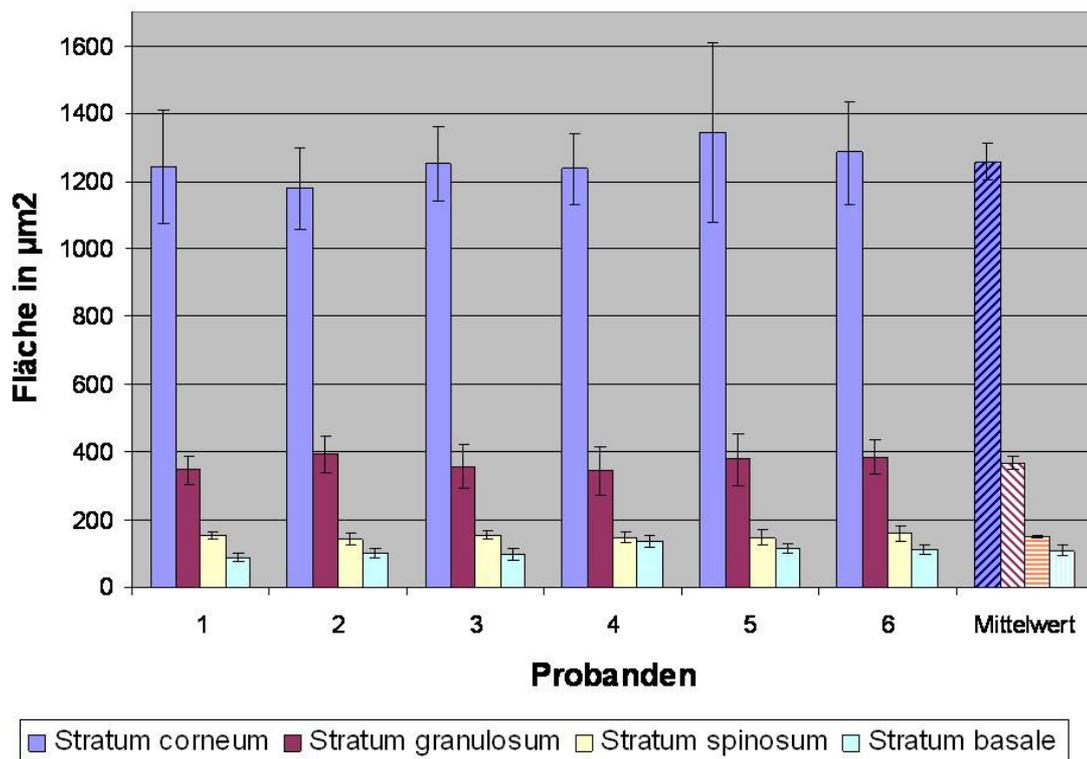
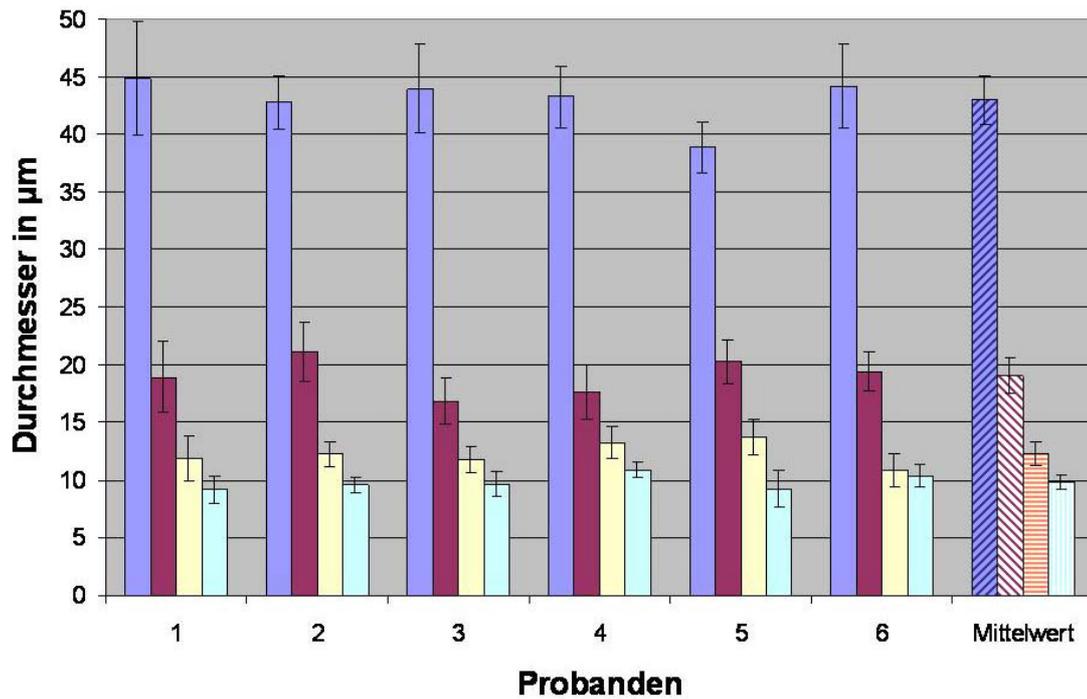


Abb. 3.18: Grafische Darstellung von Durchmesser und Fläche der Kopfhaut-Keratinozyten in verschiedenen Epidermisschichten bei den Probanden der Gruppe A.

Mühseliger als die Ausmessung der Keratinozytenmorphologie stellte sich die Auswertung der unterschiedlichen epidermale Zellschichttiefen dar. Vermessen wurde die Breite des Stratum corneum (E_{sc}), also die Dicke von Hautoberfläche bis zum Beginn der lebenden Zellen, die Tiefe von Hautoberfläche bis zum Erscheinen der Papillenspitzen (E_{min}) sowie die Tiefe von Hautoberfläche bis zum Übergang zwischen epidermalen Reteleisten und papillärer Dermis (E_{max}). Aus den Werten E_{max} und E_{min} konnte die Papillenhöhe (Pa) rechnerisch bestimmt werden. Die Tabelle 3.2 und das unten abgebildete Diagramm (Abb. 3.19) geben einen genauen Aufschluss über die vorliegenden Tiefenverhältnisse der okzipitalen Kopfhaut der sechs weiblichen Probanden. In Zusammenfassung: Die Breite des Stratum corneum schwankte zwischen den Tiefen 14-23 rE mit einem MW und einer SA von $19,97 \pm 3,47$ rE. Die minimale Epidermisdicke (E_{min}) besaß einen MW und eine SA von $46,14 \pm 7,90$ rE und die maximale Epidermisdicke (E_{max}) von $93,07 \pm 11,71$ rE. Kalkulatorisch wurde die Höhe der Papillen (Pa) ermittelt. Sie ragten im Mittel $46,93 \pm 9,22$ rE über die Dermis in die Oberhaut empor.

Tab. 3.2: Verschiedene epidermaler Tiefenparameter der Kopfhaut bei Probandengruppe A.

Proband	Tiefen in rE ±SA	Stratum corneum	E_{min}	E_{max}	Papillen- höhe
1		21,50 ±1,38	49,83 ±5,91	104,03 ±9,03	54,50 ±12,03
2		21,50 ±2,35	50,67 ±5,43	101,50 ±2,35	50,83 ±3,19
3		20,75 ±4,03	52 ±5,36	99,25 ±6,45	47,25 ±4,86
4		19,25 ±5,91	41,75 ±4,43	80,25 ±7,09	38,50 ±7,33
5		16,00 ±2,35	34,4 ±4,72	81 ±2,45	46,60 ±4,39
6		20,25 ±2,06	47 ±6,48	85,25 ±4,27	38,25 ±9,60
Mittelwert		19,97 ±3,47	46,14 ±7,90	93,07 ±11,71	46,93 ±9,22

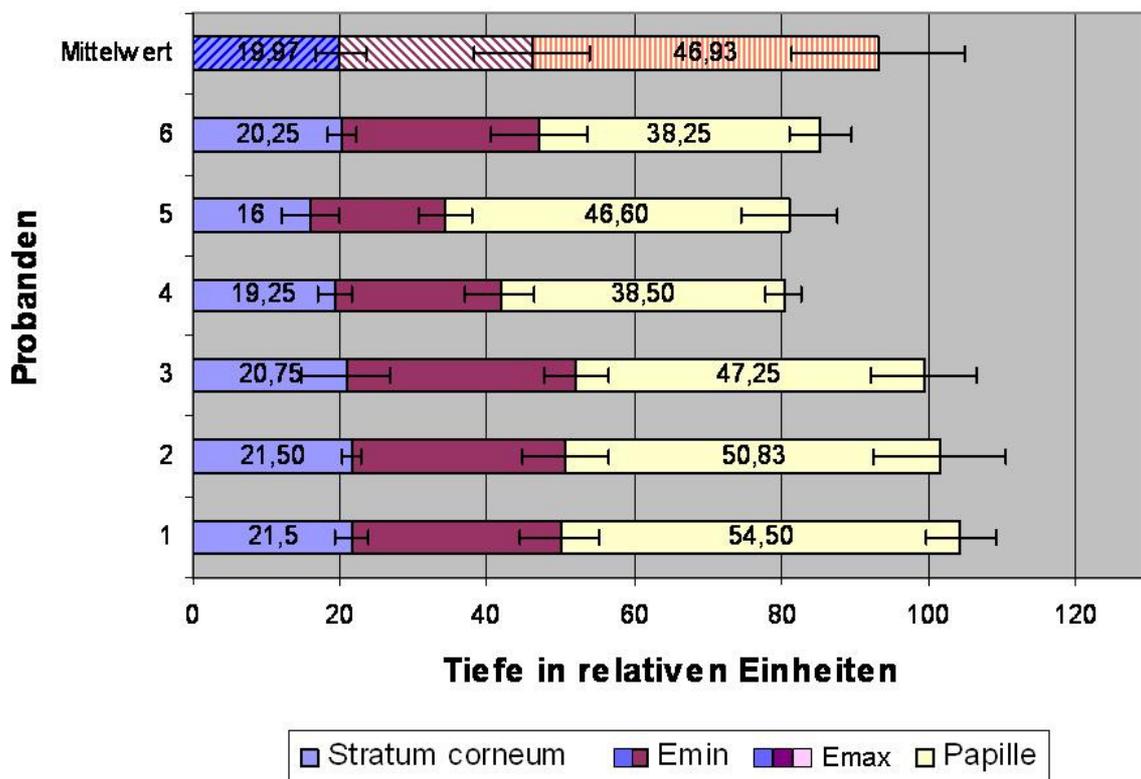


Abb. 3.19: Balkendiagramm zur Darstellung der Epidermisdicke an der Kopfhaut der Gruppe A. Dargestellt ist die maximale Epidermistiefe von Oberfläche bis Reteleiste (E_{max} , gesamter Balken), die minimale Epidermistiefe von Oberfläche bis Papillenspitze (E_{min} , blau-lila Anteil des Balkens), Stratum corneum-Tiefe (blauer Anteil des Balkens mit Wertangabe) sowie rechnerische Papillenhöhe (heller Anteil des Balkens mit Wertangabe) für jeden Probanden und im Mittelwert.

3.1.4.2 Weitere Körperregionen (Gruppe B):

Bei den freiwilligen Probanden der Gruppe B wurden verschiedene Körperregionen verglichen. Neben der Untersuchung der Felderhaut auf Kopf, Rücken, Arm und Bein wurde die Leistenhaut der Handinnenfläche und des Mittelfingers begutachtet. Es folgte eine Sonderung der erzielten Daten hinsichtlich zweier Merkmale: ob es geschlechtsspezifische und topographische Wesensunterschiede zwischen den vermessenen Hautarealen bei den verschiedenen Testpersonen gab. Die Probandinnen 1 bis 3 waren weiblichen, die Probanden 4 bis 6

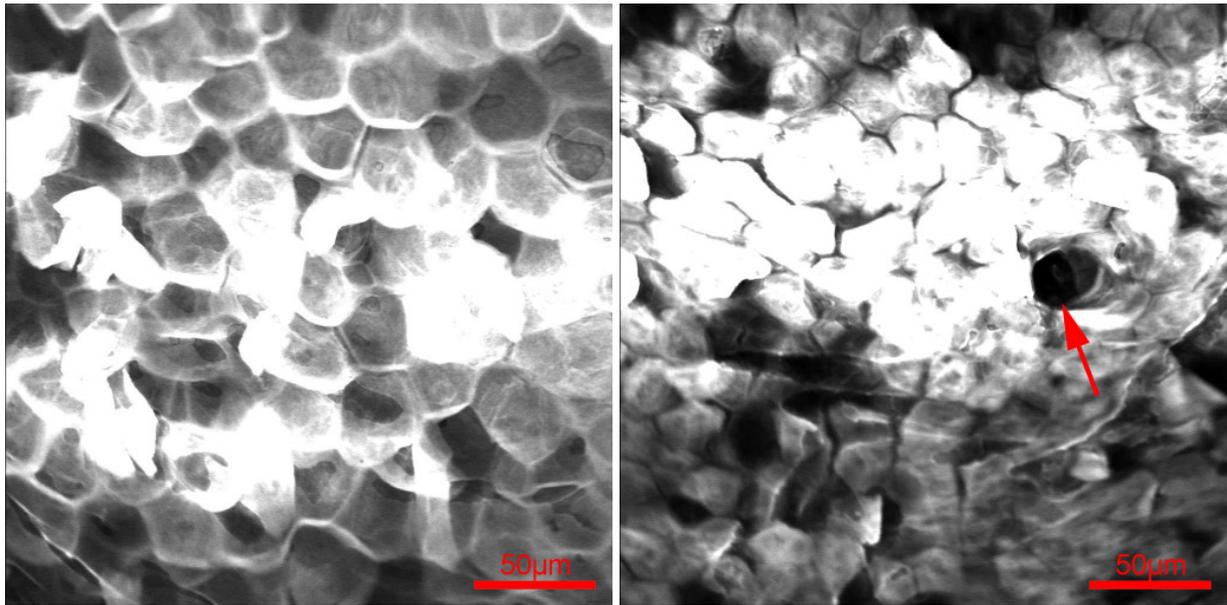
männlichen Geschlechtes. Aufgrund der Beschränkung der Eindringtiefe des blauen Ar⁺-Lasers war nicht zu erwarten, die gesamte Epidermis an allen Hautarealen (besonders am Handballenbereich) darstellen und so die maximale und minimale Epidermisdicke (E_{\max} und E_{\min}) bestimmen sowie vergleichen zu können. E_{\max} und E_{\min} wurden deshalb nur an den Regionen ermittelt, wo dieses mit der konfokalen Darstellungsmethode ausführbar war. Umso gründlicher sollte die Dicke des Stratum corneum (Sc) einheitlich quantitativ analysiert werden.

Vorweg, in den jeweiligen epidermalen Zellschichten war eine große Varianz der Keratinozytengröße auszumachen. Durch die Tiefe bedingt konnten z. B. die Stachelzellen des Stratum spinosum zu Oberfläche hin gar 20 μm im Längsdurchmesser umfassen, wobei die basal gelegenen teilweise nur 10 μm maßen. Aufgrund dieser tiefenabhängigen Schwankungen wurde als Merkmal für regionale epidermale Zellunterschiede lediglich der Längsdurchmesser der oberflächlichen Korneozyten (im Stratum corneum) erforscht. Dieser Wert bildet zusammen mit der Hornzellschichtbreite (Sc) ein Kriterium für den regionalen Aufbau der pharmakologisch interessanten Penetrationsbarriere der Haut. Andere topographische Gesichtspunkte der menschlichen Haut, wie Furchung, Fältelung, Behaarung usw., wurden deskriptiv wiedergegeben.

3.1.4.2.1 Topografische Unterschiede der Hautoberfläche und der Hornschicht

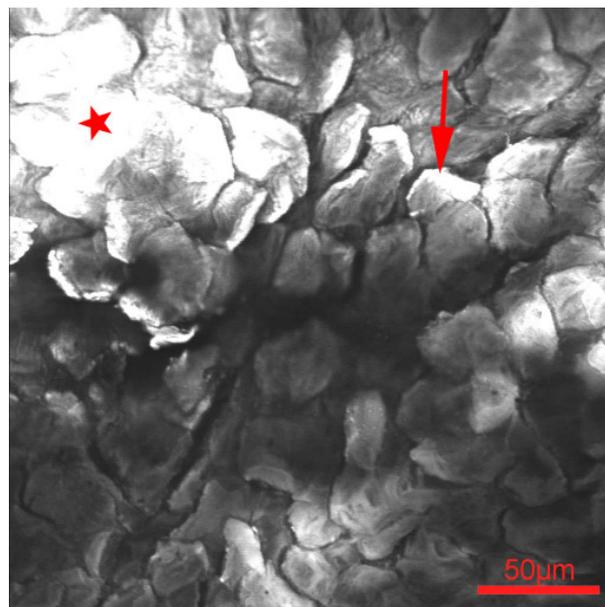
Merkmalsunterschiede der Oberfläche und der Anhangsgebilde der Haut gab es bei der konfokalen Darstellungstechnik im Wesentlichen zwischen der Felder- und Leistenhaut. Die Befurchung der Felderhaut ist schmaler, Drüsenausführungsgänge waren bei ihr nur selten zu entdecken. Haarfollikel und -schäfte variierten in ihrer Dichte und Ausprägung in Abhängigkeit der Körperregion (Kopf mit vielen und breiten Haaren) und des Geschlechtes (männliche Probanden 4 bis 6 zeigten am Rücken, Arm und Bein Haare mit einem stärkeren Kaliber). Die Leistenhaut an Hand und Finger stach dagegen mit einer hohen Schweißdrüsendichte und der vollständigen Abwesenheit einer Beharrung hervor. Das Wirbelmuster, gezeichnet durch die typische Anordnung von hohen Epidermisleisten und tiefen Furchen, war durch den geringen Bildausschnitt des Lasermikroskops (250x250 μm) nicht auszumachen. Des Weiteren bestand ein wesentlicher Unterschied der verschiedenen Hautregionen bezüglich ihrer natürlichen Hefepilzbesiedlung.

Bei der Betrachtung und Vermessung der Korneozyten der obersten Hornschicht wurden regionale Besonderheiten offenbar. Die drei Bilder der Abbildungen 3.20 spiegeln diese Unterschiede wieder. Sie zeigen das typische Erscheinungsbild von Hornzellen verschiedener Körperregionen. Bei dem Bild 3.20.a sind polygonal geformte, sich schuppenartig überlappende Zellen sichtbar. Die Korneozyten gleichen sich von der Form und Größe, ihr Längsdurchmesser beträgt hier im Mittel um die 45 μm , eine starke Abweichung der einzelnen Zellen ist nicht zu erschließen. Dieses Bild repräsentiert die charakteristische Erscheinungsform der oberflächlichen Hornzellschicht an Kopf, Arm und Bein. Anders präsentiert sich die Hautoberfläche an Hand und Finger. Die Abbildungen 3.20.b und c zeigen die oberste Schicht des Stratum corneum an diesen Körperregionen. Man sieht an der Fingeroberfläche kleine, polygonale und gleichmäßige Hautzellen, mit geringem Durchmesser im Vergleich zu den Regionen Kopf, Arm und Bein. Dieser Unterschied wird in der Tabelle 3.3 und der Abbildung 3.21 deutlich. Der Durchmesser der Hornzellen ist hier im Schnitt ungefähr 32 μm und unterscheidet sich trotz geringer Fallzahl signifikant von denen der restlichen Körperregionen. Nebenbefundlich ist die dunkle Ausgangsöffnung einer Schweißdrüse zu sehen (Abb. 3.20.b, Pfeil), sie kommen am Finger häufig vor. Die Hornzellen der Hand sind hingegen unregelmäßig in Form und teilweise miteinander verbacken (Abb. 3.20.c, Stern). Einzelne Zellen abzugrenzen scheint ein unmögliches Unterfangen. Dementsprechend variiert die Größenmessung sehr und die Standardabweichung vom Mittelwert ist enorm. Überraschend fällt auf, dass die Hornzellen am Rücken signifikant kleiner sind als am Arm, dagegen signifikant größer als am Finger. Im Vergleich zu Kopf und Bein konnte an dieser Arbeit aufgrund der geringen Fallzahl und der großen Varianz der Messwerte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden, auch wenn die Tendenzen klar und deutlich zu erkennen sind.



a

b



c

Abb. 3.20: Die Oberfläche der Haut variiert nach Körperregion stark. Während sie sich am Kopf, Arm und Bein gleicht (a), sind die Hornzellen an Fingerbeere (b) und Handinnenfläche (c) wesentlich kleiner.

Tab. 3.3: Korneozytendurchmesser (in μm) der Gruppe B an verschiedenen Körperregionen.

Probant	Region $\pm\text{SA}$					
	Kopf	Rücken	Arm	Hand	Finger	Bein
1	44,26 $\pm 3,62$	39,89 $\pm 2,58$	43,05 $\pm 3,11$	41,68 $\pm 11,1$	31,87 $\pm 2,48$	43,20 $\pm 2,99$
2	40,62 $\pm 3,10$	38,97 $\pm 2,80$	45,13 $\pm 4,79$	39,73 $\pm 13,4$	30,46 $\pm 2,90$	40,48 $\pm 3,67$
3	44,80 $\pm 2,60$	37,82 $\pm 2,08$	45,45 $\pm 3,22$	40,09 $\pm 9,28$	36,79 $\pm 3,04$	47,81 $\pm 3,41$
4		38,83 $\pm 3,16$	45,42 $\pm 2,71$	43,92 $\pm 12,7$	29,46 $\pm 3,75$	48,59 $\pm 2,89$
5		38,75 $\pm 2,46$	44,06 $\pm 3,44$	38,34 $\pm 15,3$	33,74 $\pm 4,02$	45,64 $\pm 4,84$
6		39,42 $\pm 3,10$	43,98 $\pm 4,56$	40,88 $\pm 10,60$	32,40 $\pm 4,23$	43,33 $\pm 3,45$
Mittelwert	43,23 $\pm 2,27$	38,95 $\pm 0,70$	44,52 $\pm 0,97$	40,73 $\pm 1,91$	32,48 $\pm 2,57$	44,84 $\pm 3,08$

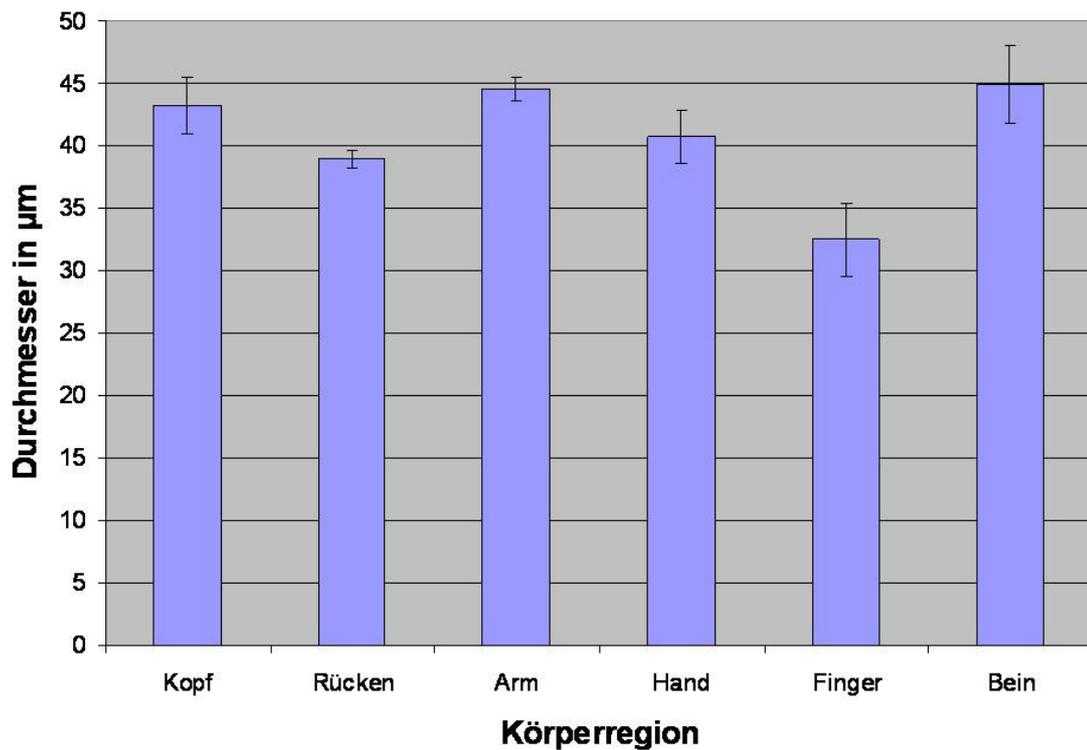


Abb. 3.21: Mittelwert der Korneozytendurchmesser der Probanden der Gruppe B in Abhängigkeit zur Körperregion.

Ein weiterer morphologischer Parameter, und damit sehr wichtig für Penetrationstudien, ist die Breite des Stratum corneum. Dieses Vorhaben zeigte Einschränkungen der konfokalen Untersuchungsmethode auf. Besonders an den Körperregionen mit einer stark ausgeprägten Epidermis, wie Hand und Finger, war es teilweise nicht möglich die Dicke zu bestimmen. Aufgrund der Tiefenrestriktion der Technik, der starken Streuung der Hornschicht und der Schwierigkeit der Farbstoffapplikation sind die Aussagen an diesen Stellen limitiert. Nur bei zwei Probanden war dies an Hand und Finger machbar. Tabelle 3.4 und Abbildung 3.22 geben uns eine genaue Auflistung der Messwerte.

Die Hornschicht offenbarte sich mit einem Mittelwert von 12,22 μm am Rücken bei allen Probanden am dünnsten, gefolgt von der Region Arm mit 17,82 μm im Mittel. Nicht wesentlich unterschieden sich die Regionen Bein und Kopf bei ungefähr 22 μm . Die Hornschicht fiel an Finger und Hand am breitesten aus, mit einer Tendenz am Finger um 40 μm und an der Hand um 70 μm . Signifikante Tiefenunterschiede des Stratum corneum lagen bei allen Körperregionen vor. Lediglich die Region Kopf und Bein unterschieden sich nicht signifikant. Es waren keine geschlechtsspezifischen Differenzen bei den analysierten epidermalen Parametern auszumachen.

Tab. 3.4: Stratum corneum Tiefe (in μm) verschiedener Körperareale. (\emptyset = nicht möglich)

Proband	Region	Kopf	Rücken	Arm	Hand	Finger	Bein
	$\pm\text{SA}$						
1		20,25 $\pm 2,22$	12,75 $\pm 2,63$	17,67 $\pm 1,53$	68,00 $\pm 8,49$	51,00 $\pm 2,83$	23,33 $\pm 2,31$
2		21,80 $\pm 1,64$	12,50 $\pm 3,70$	16,83 $\pm 3,19$	72,50 $\pm 10,3$	34,75 $\pm 2,50$	25,33 $\pm 5,03$
3		24,50 $\pm 2,65$	9,50 $\pm 2,08$	18,67 $\pm 3,33$	\emptyset	\emptyset	23,50 $\pm 4,43$
4			11,75 $\pm 2,87$	17,80 $\pm 2,17$	\emptyset	\emptyset	19,50 $\pm 3,11$
5			14,50 $\pm 2,38$	18,50 $\pm 1,29$	\emptyset	\emptyset	22,33 $\pm 3,72$
6			12,33 $\pm 2,52$	17,43 $\pm 2,08$	\emptyset	\emptyset	23,75 $\pm 3,40$
Mittelwert		22,18 $\pm 2,15$	12,22 $\pm 1,62$	17,82 $\pm 0,68$	70,25 $\pm 3,18$	42,88 $\pm 11,5$	22,96 $\pm 1,95$

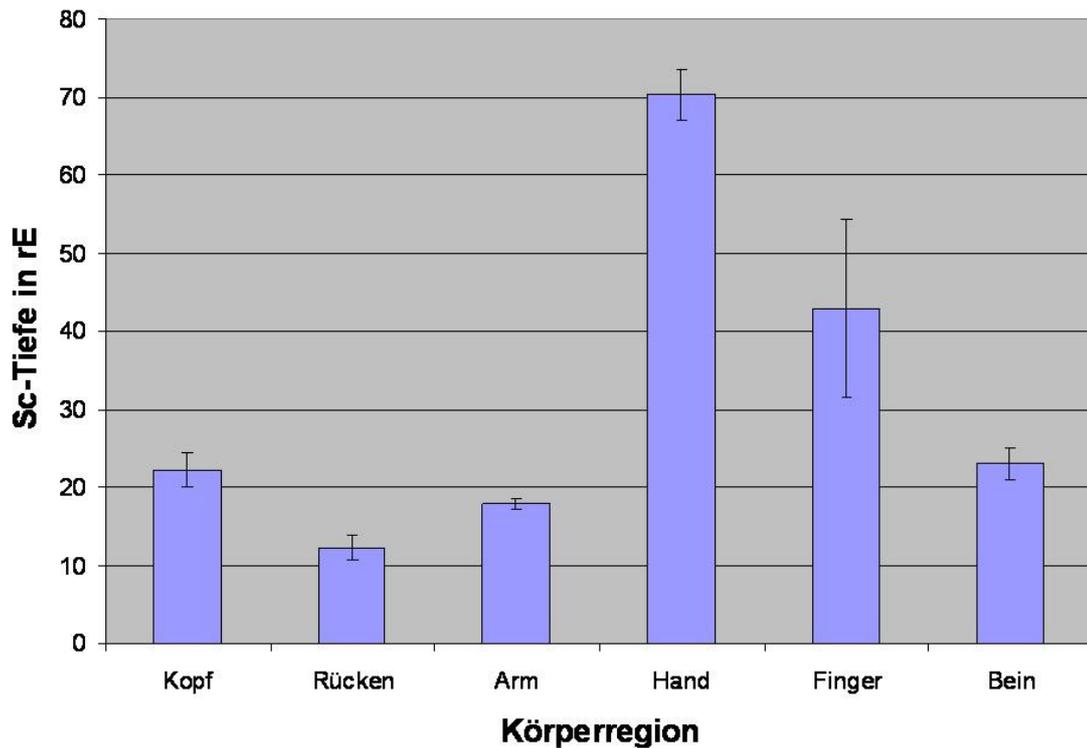


Abb. 3.22: Balkendiagramm zur Darstellung der Hornschichtbreite an verschiedenen Körperregionen bei dem Probandenkollektiv B.

3.1.4.2.2 Topografische Unterschiede der Epidermisdicke und der Papillenhöhe

Weitere Epidermisparameter wurden bei dem Probandenkollektiv B bestimmt. Neben der Hornschicht wurden minimale und maximale Epidermisdicke (E_{\min} und E_{\max}) und die sich daraus ergebenden Papillenhöhe (Pa) an den Regionen Kopf, Rücken und Bein evaluiert. Hand und Finger wurden von der Bewertung ausgenommen, da, wie oben beschrieben, die Hornschicht eine weitere Tiefenmessung der lebenden Epidermis verhinderte. Die Eindringtiefe des Laserlichtes stieß hierbei an seine Grenzen. Die Tabelle 3.5 gibt eine Einzelaufstellung der Probanden und die Mittelwerte der epidermalen Tiefenverhältnisse wieder; Abbildung 3.23 fasst den Sachverhalt der Tabelle 3.5 grafisch zusammen.

Tab. 3.5: Probandenkollektiv B. Tiefenparameter der einzelnen Probanden an verschiedenen Körperregionen. Die Regionen Hand und Finger wurden aus der Auswertung herausgenommen.

Probanden	Region in rE	Kopf	Rücken	Arm	Bein
	\pm SD				
1	Sc	20,25(\pm 2,22)	12,75(\pm 2,63)	17,67(\pm 1,53)	23,33(\pm 2,31)
	E _{min}	59,75(\pm 9,32)	31,75(\pm 4,43)	42,25(\pm 3,95)	50,33(\pm 5,03)
	E _{max}	103,00(\pm 11,3)	81,50(\pm 5,97)	88,00(\pm 10,80)	89,33(\pm 8,5)
	Pa	43,25(\pm 2,36)	49,75(\pm 7,63)	45,75(\pm 7,46)	39,00(\pm 7,00)
2	Sc	21,80(\pm 1,64)	12,50(\pm 3,70)	16,83(\pm 3,19)	25,33(\pm 5,03)
	E _{min}	62,00(\pm 5,29)	36,25(\pm 5,56)	30,50(\pm 3,67)	43,33(\pm 4,14)
	E _{max}	109,33(\pm 6,66)	86,25(\pm 4,79)	79,50(\pm 7,77)	92,00(\pm 8,54)
	Pa	47,33(\pm 5,51)	50,00(\pm 9,90)	49,00(\pm 9,19)	48,67(\pm 4,51)
3	Sc	24,50(\pm 2,65)	9,50(\pm 2,08)	18,67(\pm 3,33)	23,50(\pm 4,43)
	E _{min}	52,50(\pm 10,34)	21,75(\pm 2,63)	38,00(\pm 6,51)	40,75(\pm 2,22)
	E _{max}	115,00(\pm 10,86)	66,75(\pm 5,68)	79,33(\pm 11,55)	86,75(\pm 6,99)
	Pa	62,50(\pm 9,33)	45,00(\pm 4,32)	41,33(\pm 6,09)	46,00(\pm 6,93)
4	Sc		11,75(\pm 2,89)	17,80(\pm 2,17)	19,5(\pm 3,11)
	E _{min}		49,00(\pm 4,97)	43,80(\pm 4,87)	36,00(\pm 5,72)
	E _{max}		89,00(\pm 7,26)	86,00(\pm 4,47)	96,75(\pm 6,85)
	Pa		40,00(\pm 7,35)	42,20(\pm 7,66)	60,75(\pm 7,41)
5	Sc		14,50(\pm 2,38)	18,50(\pm 1,29)	22,33(\pm 3,72)
	E _{min}		49,00(\pm 4,08)	42,00(\pm 3,92)	44,17(\pm 5,85)
	E _{max}		90,75(\pm 4,57)	85,50(\pm 9,85)	82,50(\pm 6,77)
	Pa		41,75(\pm 8,54)	43,50(\pm 8,10)	38,33(\pm 8,78)
6	Sc		12,33(\pm 2,52)	17,43(\pm 2,08)	23,75(\pm 3,40)
	E _{min}		36,00(\pm 4,63)	36,50(\pm 6,03)	43,25(\pm 6,13)
	E _{max}		78,33(\pm 8,5)	84,33(\pm 7,02)	92,50(\pm 6,45)
	Pa		42,33(\pm 10,12)	48,67(\pm 6,66)	49,25(\pm 8,81)
Mittelwert	Sc	22,18(\pm 2,15)	12,22(\pm 1,62)	17,82(\pm 0,68)	22,96(\pm 1,95)
	E _{min}	58,08(\pm 4,96)	37,29(\pm 10,48)	38,84(\pm 4,94)	42,97(\pm 4,68)
	E _{max}	109,11(\pm 6,00)	82,10(\pm 8,83)	83,78(\pm 3,58)	89,97(\pm 4,96)
	Pa	51,03(\pm 10,14)	44,81(\pm 4,24)	45,08(\pm 3,27)	47,00(\pm 8,21)

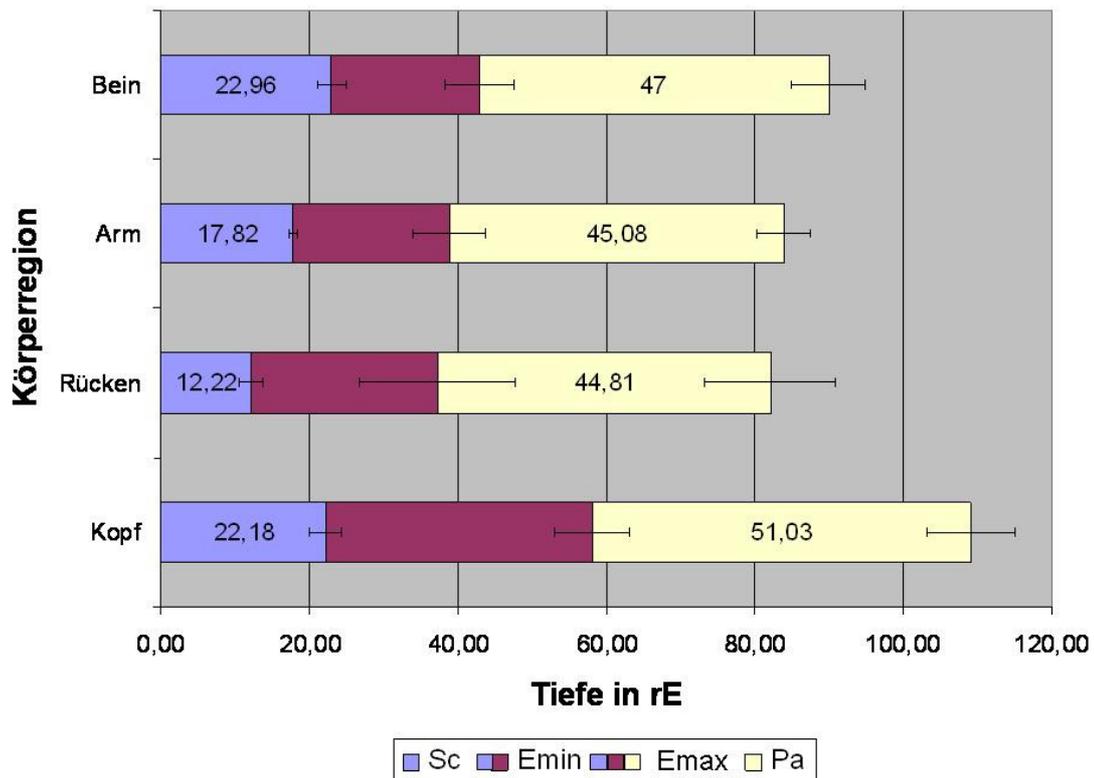


Abb. 3.23: Balkendiagramm zur Darstellung der Epidermisdicke an den Körperregionen Bein, Arm, Rücken und Kopf der Gruppe B. Dargestellt sind die durchschnittlichen Werte der maximale Epidermistiefe von Oberfläche bis Reteleiste (E_{max} , gesamter Balken), der minimale Epidermistiefe von Oberfläche bis Papillenspitze (E_{min} , blau-lila Anteil des Balkens), der Stratum corneum-Tiefe (blauer Anteil des Balkens mit Wertangabe) sowie der Papillenhöhe (heller Anteil des Balkens mit Wertangabe).

Einige interessante Beobachten lassen sich aus der Tabelle und der Graphik ablesen und folgern: Zunächst gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht hinsichtlich der unterschiedlichen Epidermisparameter, wobei die geringe Fallzahl den Sachverhalt relativiert. Die zweite interessante und offensichtliche Beobachtung war, dass an den verschiedenen Körperregionen die Epidermis unterschiedlich dick war. Am breitesten war sie dabei am Kopf mit einer Distanz von ungefähr 109 rE von Oberfläche bis zur Reteleiste. Gefolgt wurde sie in absteigender Reihenfolge von Bein, Arm und Rücken mit rund 89-82 rE. Ein signifikanter Messunterschied konnte dabei zwischen der Kopfhaut und den anderen Regionen aufgezeigt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den anderen

Körperregionen konnte in dieser Arbeit durch die geringe Fallzahl nicht gezeigt werden.

Allgemein lässt sich aus der obigen Tatsache folgern, dass die Umwandlung der epithelialen Zellen vom Stratum basale zum Stratum corneum an den unterschiedlichen Körperregionen zeitlich anders verlaufen muss. Ein Keratinozyt muss in der Epidermis der Kopfhaut einen viel weiteren Weg zur Hornschicht zurücklegen als z.B. am Rücken.

Insgesamt korreliert die maximale Epidermisdicke E_{\max} mit der minimalen Epidermisdicke E_{\min} und der Papillenhöhe Pa . Je breiter die Epidermis, desto größer ist auch der geringste Abstand zwischen Hautoberfläche und Dermis, und desto größer ist die Papille. Bei der Verzahnung zwischen Epidermis und der Dermis mittels der Papillen ergibt sich der Sachverhalt, dass, je breiter die Epidermis ist, desto geringer ragen die papillären Zapfen im Verhältnis in die Epidermis hinein. Nimmt man das Verhältnis von Papillenhöhe zur maximalen Epidermisdicke (Pa/E_{\max}), so ergibt sich beim Rücken ein Hineinragen der Papille von bis zu 55% in die Epidermis. Beim Arm beträgt dieses rund 54%, beim Bein 52% und beim Kopf gar nur 47%.

Interessanterweise ist die Korrelation zwischen Epidermisdicke und Dicke des Stratum corneum unproportional. So macht diese Schicht nur ca. 20% der Epidermis der Kopfhaut aus, ca. 15% beim Rücken, um die 21% beim Arm und sogar bis zu 25% bei der Beinhaut.

3.2 *In vivo* Darstellung der erkrankten Haut

Anschließend erfolgte eine Betrachtung von verschiedenen relevanten, entzündlichen und proliferativen Hauterkrankungen und epidermalen Läsionen. Diese Resultate konnten mit den bis dahin gesammelten Bildern der gesunden Haut optisch verglichen werden. Aufgrund der kleinen Fallzahl der einzelnen Erkrankungen, werden hier lediglich morphologische Aspekte deskriptiv aufgezeigt. Darstellungsmöglichkeiten und Machbarkeiten werden erörtert und bilden die Grundlage für weitere Studien der einzelnen Hautpathologien im größeren Maßstab.

3.2.1 Akute UV-Schädigung der Haut

Trotz des schmerzhaften Sonnenbrandes, wurde die intradermale Injektion des Na-Fluoreszeins von den Probanden nicht wesentlich beklagt. Rasch färbten sich die Epidermis und die obere Dermis durch den Farbstoff an. Im Vergleich zur gesunden Haut ergab sich in der mikroskopisch konfokalen *in vivo* Darstellung der UV-geschädigten Haut ein stark verändertes Bild. Neben der relativen Weitstellung der Gefäße und der Schwellung der epidermalen Zellen zeigte sich augenscheinlich ein massives, gemischtzelliges Entzündungsinfiltrat (Abb. 3.24, Pfeile). Es handelte sich bei diesen Zellen um aus dem Blut in die Epidermis diapedetisch emigrierten Leukozyten. Diese werden angezogen von molekularen Signalen und adhäsiven Verbindungen des entzündlichen Gewebes. Die Entzündungszellen stachen gegenüber dem umgebenden Verbindungsgewebe klar und deutlich hervor. In der *en face* Gegenüberstellung mit den Keratinozyten unterscheiden sie sich aufgrund ihrer Zellgröße ($21,68 \pm 1,53 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $14,20 \pm 1,44 \mu\text{m}$) und ihren stereotypen Zellkernen. In allen Höhen und Schichten der Epidermis, außer in der Hornschicht, waren sie zu entdecken. In den Kontrollaufnahmen der ungeschädigten Haut fehlte ihre Erscheinung völlig. Neben den segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (Abb. 3.24.a, Pfeil) konnten Monozyten (Abb. 3.24.b, Pfeil) und Lymphozyten eindeutig voneinander differenziert werden. Hinzuzufügen bleibt, dass die eingewanderten Leukozyten einer zeitlich verschobenen Farbstoffverteilung unterlagen. Wie in Abbildung 3.24 links gezeigt, demarkierten sich ihre Zellkerne im Gegensatz zu den Keratinozyten von Beginn an hell. Bereits ab der 10 Minute wurde diese Färbung aufgrund der starken zytoplasmatischen Fluoreszenz überlagert. Die Farbstoffkinetik der Keratinozyten dagegen oblag ohne signifikanten Unterschied

der gesunden Haut. So stellten sich ihre Zellkerne zusehends von der dritten Minute an vermehrt dar (Abb. 3.24.b, Sternchen). Dieser zeitliche Versatz intensivierte zusätzlich den Kontrast zwischen Entzündungszellen und Keratinozyten. Kein ausschlaggebender Unterschied wurde hinsichtlich der Hornzellen des Stratum corneum, Furchung und Fältelung sowie den restlichen Tiefenaspekten zwischen gesunder und erkrankter Haut bemerkt.

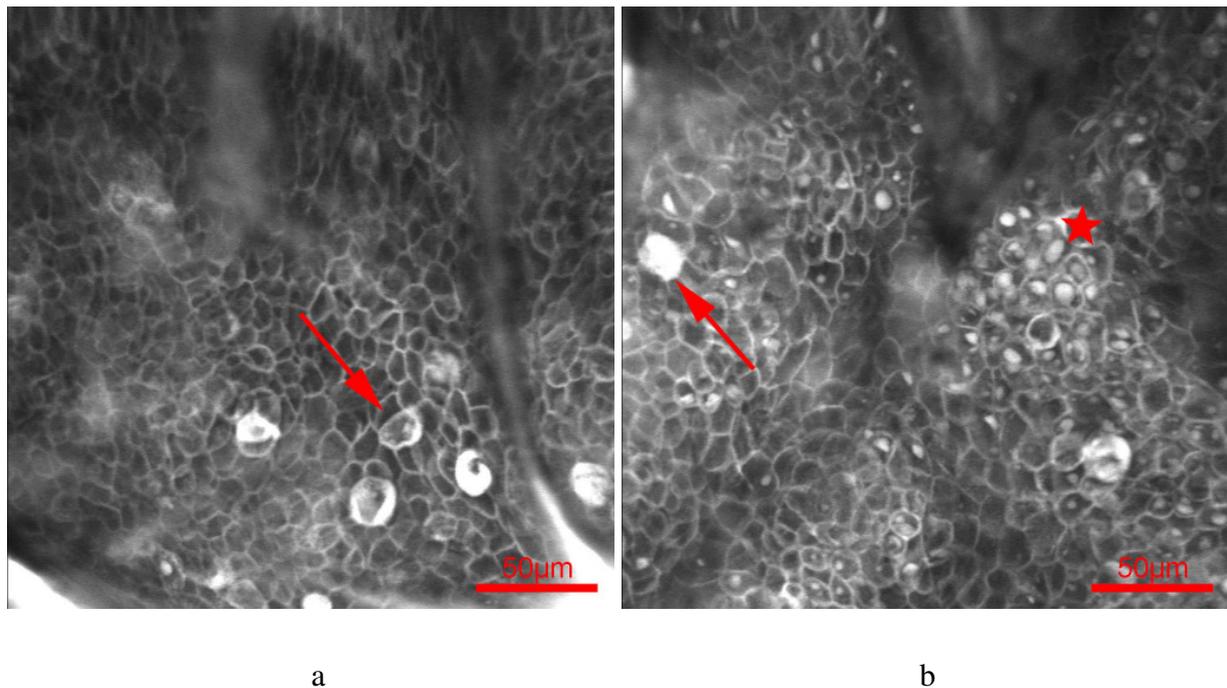


Abb. 3.24: Entzündungsinfiltrate lassen sich im geschädigten Gewebe nachweisen. Neben der Zellmorphologie (Pfeil, a: segmentkerniger Granulozyt, b: Monozyt) spielt die rasche Färbung der Abwehrzellen eine Rolle. Während sie von Anfang an hell gefärbt waren (a), kamen die Nuklei der Keratinozyten erst ab der dritten Minute zum Vorschein (b, Sternchen).

3.2.2 Pilzkolonisation der Haut

3.2.2.1 Hefen als Besiedler der gesunden Haut

Die *in vivo* kLSM zeigte neben der Mikroarchitektur der lebenden menschlichen Haut auch die Strukturen besiedelnder Pilze. Bei den 12 gesunden Probanden der Gruppe A und B war es durch den topisch aufgetragenen Fluoreszenzfarbstoff möglich, auf der Hautoberfläche Hefen

verschiedener Spezies des Geschlechtes der *Malassezia* zu identifizieren. Stark vergrößert gibt die Detailaufnahme 3.25 die typische Morphologie dieser Hefen wieder. Sie zeigt kleine schwarze Flecken mit einem Durchmesser von 6-8 μm , angeordnet in einer weintraubenartigen Formation. Neben der ovalen bis runden Form dieser eukaryonten Zellen sind die Nuklei einsehbar (Abb. 3.25, Pfeile). Sie sind schwarz und zentral gelegen, im Kontrast zum hellen Zytoplasma. Dadurch, dass der Farbstoff besonders in Falten, Furchen sowie in Haarfollikeln akkumulierte, bot er einen guten Hintergrundkontrast zu den kleinen Hefepilzen. Furchen und Falten dienten ihnen anscheinend als beschützende Protektoren und sicherten ihnen ein gutes Siedlungsgebiet auf der menschlichen Hautoberfläche – dort waren die Hefen meist zu finden.

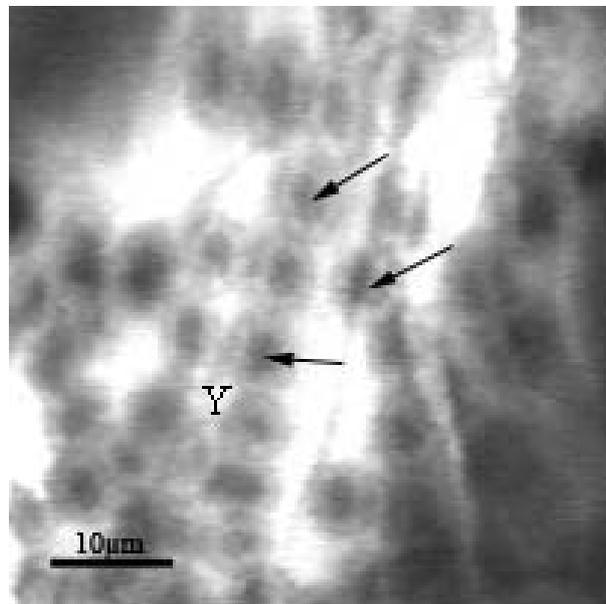


Abb. 3.25: Detailaufnahme der Hefen auf gesunder Haut.

Aufgrund der obligaten Lipiddependenz dieser Pilze, korrelierte die Dichte der Kolonisation mit der Aktivität der Talgdrüsen [101, 108]. Eine Anhäufung war hauptsächlich im Bereich talgdrüsenreicher Regionen auszumachen. Besonders auf dem Kopf und dem Rücken, aber auch auf dem Unterarm kamen die Hefen in großer Anzahl vor. Der Skalp des Kopfes bot ihnen aus den oben erörterten Gründen und dem Feuchtigkeitsniveau durch das Haupthaar ein exzellentes Siedlungsmilieu. Bei 7 von 9 Probanden der Gruppen A und B konnten die Pilze hier als Teil der natürlichen Mikroflora identifiziert werden. Bei Probanden mit langem, fettigem Haar wurden sie in einer sehr hohen Dichte detektiert. Abbildung 3.26.a demonstriert die Hefezellen auf der

okzipitalen Kopfhaut, ein Haar umlagernd. In 4 von 6 Fällen waren Hefepilzkolonisationen auf dem Rücken auszumachen, in 2 von 6 auf dem Unterarm. Hand und Finger zeigten keine Besiedlung, während am Bein immerhin noch bei 1 von 6 Probanden Hefen entdeckt wurden. Diese sah man am Bein jedoch nur vereinzelt und in einer signifikant geringeren Populationsdichte (Abb. 3.26.b, Pfeil). Unterschiedliche Spezies konnten aufgefunden werden. Aufgrund ihrer kennzeichnenden Morphologie erfolgte eine taxonomische Zuordnung: Meist waren die Hefen rund bis oval und besaßen eine Durchmesser von 6-8 μm , selten waren sie kleiner und zylindrisch geformt. Es handelte sich also überwiegend um Hefen der Spezies *M. globosa* und *M. furfur* [101, 102].

Gleichzeitig war es durch die Illumination der tieferen epidermalen Schichten mit dem Ar^+ -Laser praktikabel, die Hautzellen unter der Oberfläche zu inspizieren. In allen 12 Fällen der gesunden Haut zeigten sich weder pathologische Veränderungen der Struktur noch ein eingestreutes entzündliches Infiltrat.

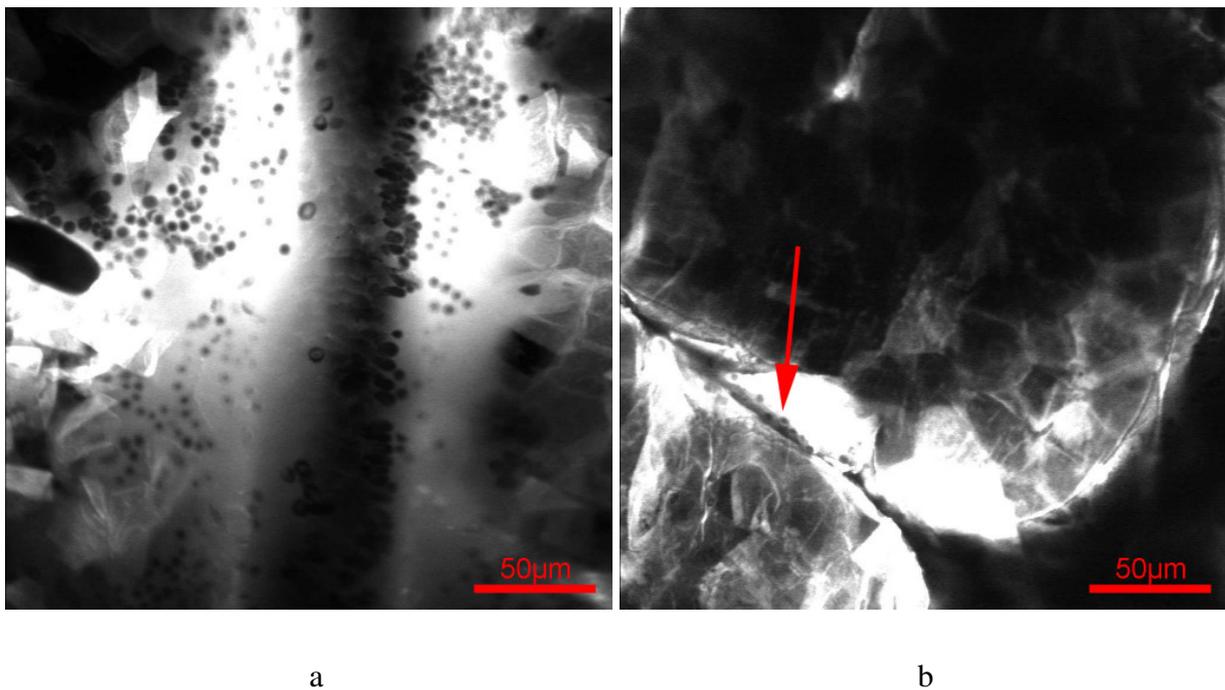


Abb. 3.26: Während sich auf der Kopfhaut bei fast allen Probanden eine dichte Besiedlung mit Hefen nachweisen ließ (a), konnte nur bei einem Probanden Pilzstrukturen am Bein gezeigt werden (b, Pfeil).

3.2.2.2 *Malassezia als Pathogene*

In der weiteren konfokalen Darstellung der Pilzbesiedlung auf der lebenden menschlichen Haut wurden jeweils zwei Probanden mit einer aktiven bzw. nach einer abgelaufenen *Malassezia* assoziierten Pilzkrankung zur Untersuchung rekrutiert. Unterschiede zu den natürlich vorkommenden Hefen sollten aufgezeigt werden. Beginnen wir mit der Auswertung bei den beiden männlichen Probanden P3 und P4 mit halbjährigen Z.n. Mykose:

Ein halbes Jahr vor der Vorstellung zum Scannen der Haut litt P3 an einer ausgeprägten Pityriasis versicolor am Rücken und Nackenbereich und P4 an einer *Malassezia* Follikulitis auf der Brust und beiden Ober- und Unterschenkeln. Mit Unterstützung lokal angewendeter Antimykotika kam es zur vollständigen Remission. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war ihre Haut klinisch unauffällig und beschwerdefrei.

Während beim Probanden P3 im oberen Rumpfbereich lediglich eine dezente Hefebesiedlung durch die kLSM aufgedeckt wurde, zeigten die Aufnahmen der Unterschenkel des Probanden P4 beidseits eine massive Vermehrung der Pilzhefen zur Kontrollgruppe A und B (Abb. 3.27, Pfeile). Keine Besiedlung der Haarfollikel war auszumachen, wie es bei einer *Malassezia* Follikulitis zu erwarten wäre [102, 103, 109]. Bei beiden Probanden fanden sich keine pathogenen Myzelenformen der Pilze. Die *in vivo* Tiefenevaluation der lebenden Haut zeigte keinen Hinweis auf Veränderung oder Entzündung der Haut.

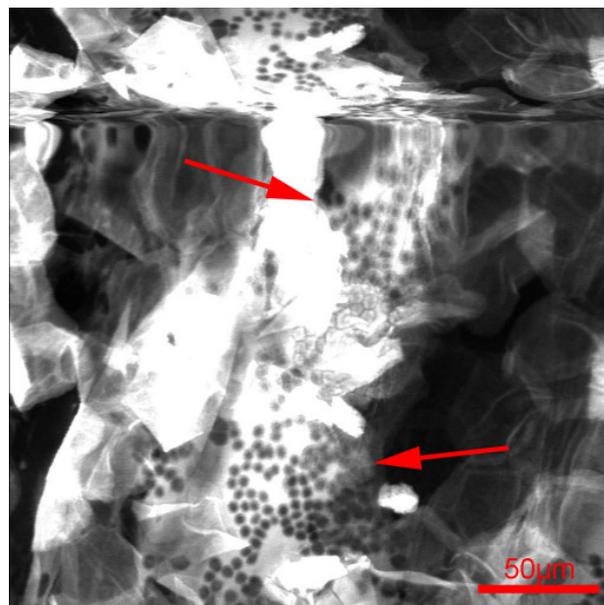


Abb. 3.27: *Malassezia*besiedlung ohne pathologische Myzelenform.

Anders sahen die konfokalen Bilder der Probanden 1 und 2 der Gruppe P aus:

Beide litten zum Zeitpunkt der Untersuchung an aktiven Pilzkrankungen der Haut, welche von Hefen des *Malassezia*-geschlechts verursacht wurden. Bereits beim ersten Oberflächenscan der befallenen Areale ergab sich ein befremdliches Bild. Obwohl die Probanden unterschiedliche Hauterkrankungen mit ungleichen Effloreszenzen besaßen (Seborrhoische Dermatitis gegen Pityriasis versicolor), ähnelte sich das Bild in der konfokalen Mikroskopie. Neben den Hefen prägten 2-5 µm dünne Hyphen girlandenartig die Aufnahmen. Sie spannten sich im Kontrast zu den dunklen Korneozyten helleuchtend über die gesamte Oberfläche der Haut (Abb. 3.28, Pfeile) und offenbarten auf diese Weise die Umwandlung der *Malassezia*-Hefen in ihre pathogene Myzelenform. Neben diesem Phänomen ermöglichte der Tiefenscan, die darunter liegenden epidermalen Zellschichten zu betrachten. Das Gewebe zeigte sich irritiert mit teilweise entzündlichem Infiltrat. Ein weiterer Punkt zur Differenzierung der aktiven Mykose zur natürlichen Dauerbesiedlung der Haut mit Pilzen.

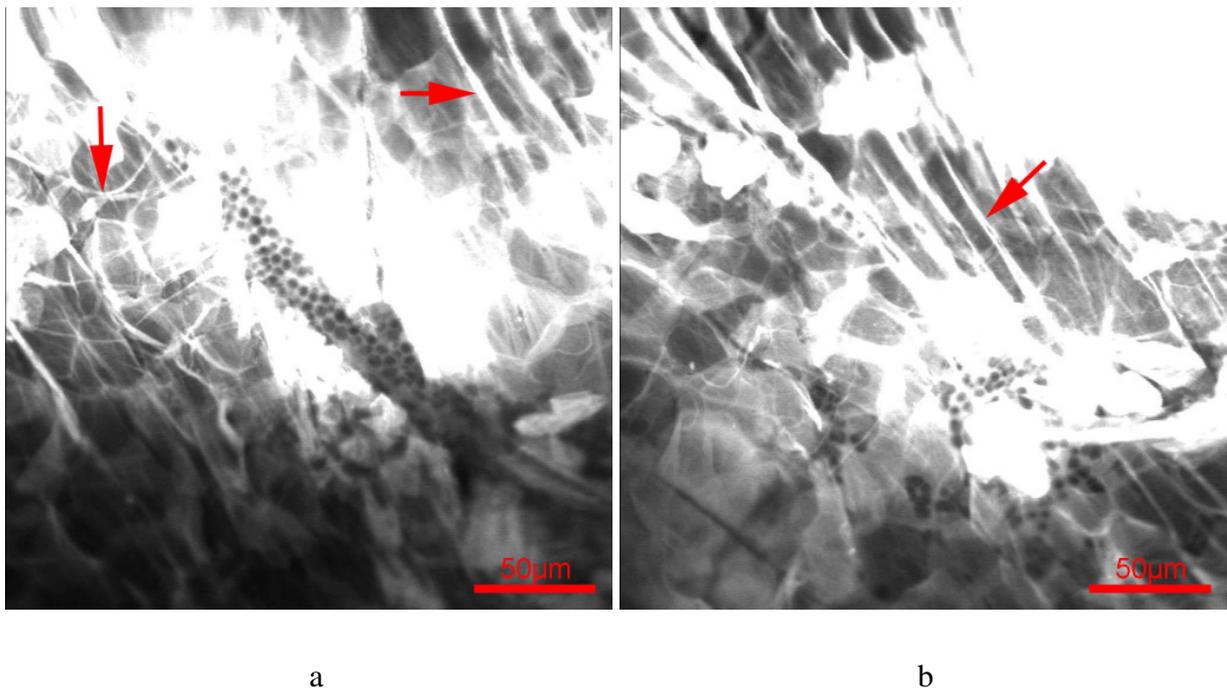


Abb. 3.28: „Spaghetti with Meatballs“: Auf beiden Bildern (a, Seborrhoische Dermatitis, b, Pityriasis versicolor) sind fadenförmigen Hyphen (Pfeile) neben runden Hefen zu erkennen. Das typische Bild einer durch *Malassezia* verursachenden Mykose.

3.2.2.3 Dermatophyten

Neben den *in vivo* Untersuchungen der menschlichen Haut wurden Schweineohren mit dem Dermatophyt *Trichophyton mentagrophytes* beimpft. Obligat pathogene Fadenpilze sollten, zum Beweis der Machbarkeit, mit Hilfe der konfokalen Methode dargestellt werden.

Die Bilder, die sich ergaben, waren beeindruckend: Abbildung 3.29 präsentiert eine typische Erscheinungsform des Fadenpilzes *T. mentagrophytes*. Neben vereinzelt hellleuchtenden Hyphen waren deutlich zylindrische, bis zu 40 µm breite Makrokonidien zu entdecken, welche sich sporenbesezt zeigten. Lose Pilzsporen bedeckten die beimpfte Hautoberfläche. An anderer Stelle traten Mikrokonidien und spiralförmig verlaufenden Hyphen in den Vordergrund. Ein typisches Erscheinungsbild für *T. mentagrophytes*. Ein entzündliches Infiltrat wurde in der toten Schweinehaut nicht beobachtet.

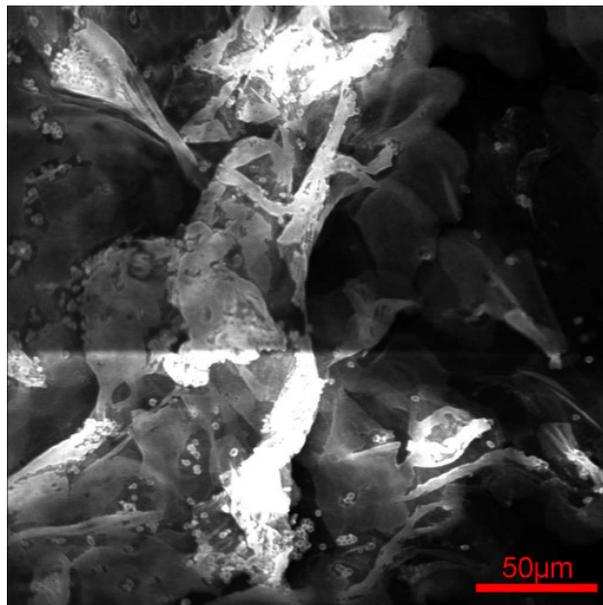


Abb. 3.29: Der obligat Fadenpilz *Trichophyton mentagrophytes* lässt sich mit der kLSM gut zeigen.

3.2.3 Psoriasis (Schuppenflechte)

Deutlich verändert zeigte sich die Haut an den Herden der Schuppenflechte. Bei den unbehandelten, nummulären Prozessen aller Probanden war es kaum möglich, die massiven Hornmassen der Oberfläche mit dem Laserlicht des Mikroskops zu durchdringen. Zu stark ist die Streuung, zu wenig nimmt das tote Gewebe den Fluoreszenzfarbstoff auf, zu groß ist die Distanz zu den tieferen lebenden Zellschichten. Es lässt sich lediglich die kraterhafte Oberfläche darstellen. Einzelne Zellen ließen sich hier nicht mehr abgrenzen (Abb. 3.30.a). Mit etwas Geduld und Geschick war es möglich, durch spröde Risse der stark verhornten Oberfläche einen Blick auf die angefärbten, tieferen Zellschichten zu erhaschen, wie in Abbildung 3.30.b (Pfeile) gezeigt. Eine systematische Beurteilung und Auswertung in größerem Umfang konnte aber nicht durchgeführt werden.

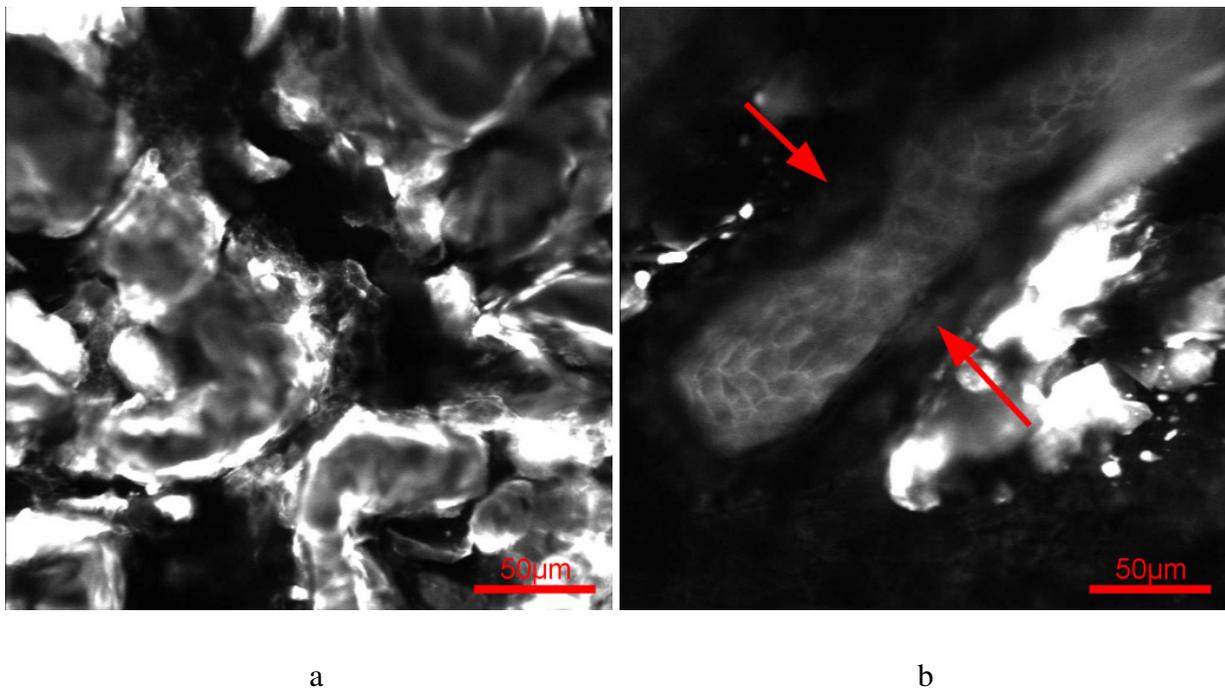


Abb. 3.30: Die massive Verhornung verhindert einen Blick in die Tiefe der Epidermis. Nur mit Glück war ein Blick durch einen Spalt machbar (Pfeile).

Erst an der mit Salizylsäure behandelten und abgeschuppten Haut war ein *in vivo* Blick unter die Oberfläche der Psoriasis möglich. Es eröffnete sich einem ein faszinierender Anblick. Eine Abgrenzung zur gesunden Haut war leicht möglich. Die Epidermisveränderungen korrelierten in der kLSM im Wesentlichen mit den Ergebnissen, wie sie in der Lichtmikroskopie beschrieben

sind. Das Stratum corneum zeigte in allen Abbildungen eine erhebliche Verhornungsstörung. Neben der unregelmäßigen Anordnung der oberflächlichen Korneozyten, dem trockenen Aspekt der Haut mit Schuppen und Zellüberresten fiel besonders die hohe Dichte kernhaltiger Zellen auf (Abb.3.31). Dabei bildeten sich die verbliebenen Kerne bzw. Kernüberreste als runde, dunkle Strukturen in den hellen Keratinozyten ab. Dieses Phänomen der Parakeratose wurde in gesunder menschlicher Haut nur vereinzelt beobachtet, während es nahezu bei allen psoriatischen Läsionen vorkam.

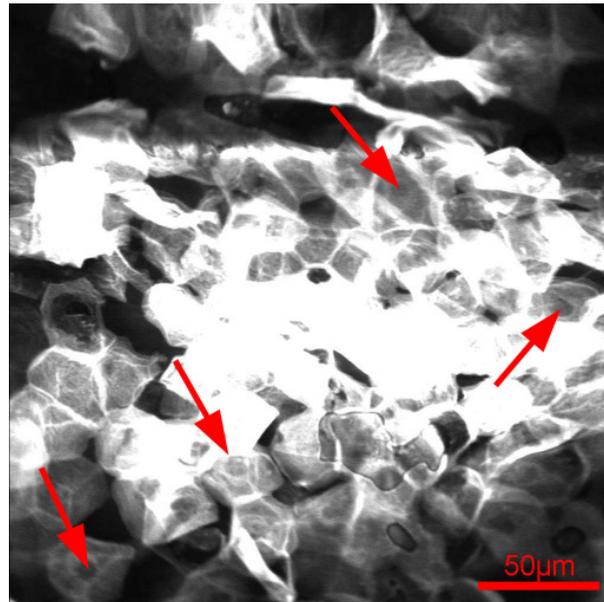


Abb. 3.31: Parakeratose bei Psoriatikern. Dunkle Zellkerne sind in den oberflächlichen Hornzellen vermehrt auszumachen (Pfeile).

Die typische Schichtung der gesunden Haut in verschiedene Epidermisschichten war aufgehoben. Eine Abgrenzung des Stratum granulosum von Stratum spinosum oder Stratum basale war nicht erkennbar. Die lebendigen Keratinozyten der Psoriasis herde stellten sich vergrößert, ödematös aufgequollen dar. Die Morphologie war über die gesamte Tiefe uniform, ohne dass sich ein Reifungsprozess den epidermalen Zellen zuordnen ließ. Eingewanderte Leukozyten wurden in vier von den sechs Patienten gezeigt. Dabei wurden prominente, mononukleäre Entzündungsinfiltrate insbesondere parapapillär vorgefunden (Abb. 3.32, Stern). Durch ihre frühe Anfärbung und herdförmiges Auftreten konnten sie leicht entdeckt werden.

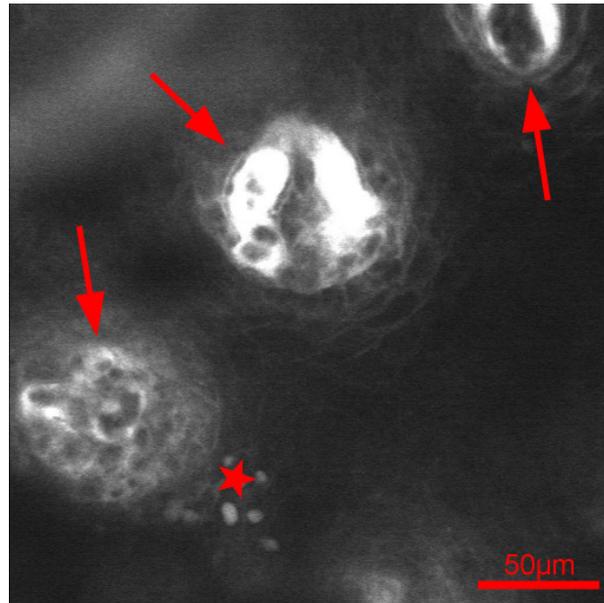
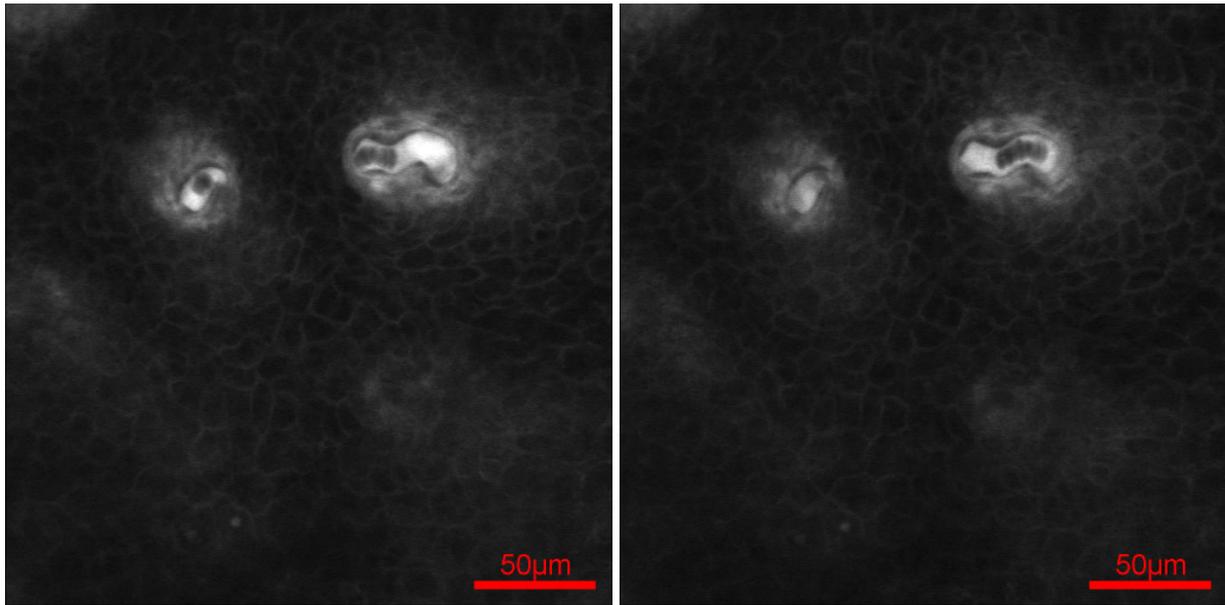


Abb. 3.32: Bei den konfokalen Aufnahmen der Psoriasis fielen parapapilläre Entzündungsinfiltrate (Stern) als auch vergrößerte Papillen mit massiv dilatierten und geschlängelten Gefäßen (Pfeile) auf. Sie kontrastierten sich hell und enthielten dunkle Erythrozyten.

Am auffälligsten zeigte sich insgesamt die Erscheinung der dermalen Papillen: Allgemein war ihre Anzahl bei allen Probanden stark erhöht und ihr Durchmesser als auch ihre Länge stark vergrößert (Papillomatosis). Die Papillenspitze lag bei allen Patienten sehr dicht unter der Oberfläche, der Übergang in die Reteleiste konnte durch die geringe Scantiefe des Lasers in keinem Fall dargestellt werden. Durch die *en face*-Ansicht waren die Papillen leicht zu quantifizieren. In diesen selber zeigten sich signifikant vergrößerte, bis auf 15 µm dilatierte, gewundene und geschlängelte kapilläre Gefäße. Das Lumen der Gefäße trat im Vergleich zur gesunden Haut immer stark leuchtend hervor, was für eine höhere Kontrastmittelpermeabilität sprach (Abb.3.32, Pfeil). Dunkle, diskusförmige rote Blutzellen (Erythrozyten) huschten vorbei, häufig perlenschnurrartig aneinandergereiht (Abb. 3.33). Ein Phänomen, welches nicht in der gesunden Menschenhaut zu entdecken war.



a

b

Abb. 3.33: In den hellen Kapillaren wanderten dunkle, 7µm breite Erythrozyten. Sie waren meist als „Gruppe“ aneinandergereiht, selten war ein einzelner Erythrozyt zu entdecken. In dieser Abbildung ist das Bild a eine Sekunde vor dem Bild b aufgenommen. Die Erythrozyten treiben hier also mit der Blutströmung von links nach rechts im Gefäß.

Neben der Morphologie der Psoriasisherde ließen sich mit dem Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie auch funktionelle Rückschlüsse anhand der Farbstoffverteilung ziehen. Bei vier der sechs Patienten konnten Diffusionsänderungen des Na-Fluoreszeins beobachtet werden. Von Beginn an färbte sich das Zytoplasma hell an, während Zellkerne als auch Zellgrenzen sich dunkel kontrastierten (Abb. 3.34). Im Vergleich zur gesunden Haut, kam es also zu einer Kontrastumkehr der ersten Färbephase. Im Verlauf stellten sich dann auch Nuklei und Zellgrenzen hell dar, es war keine Abgrenzung der einzelnen Zellstrukturen mehr möglich. Ein Ereignis, welches für eine gestörte Barrierefunktion der Zellgrenzen spricht, mit einer höheren Permeabilität und schneller Anreicherung des Färbemittels in den epidermalen Zellen bei Psoriatikern. Alles in allem war auch eine schnellere Farbstoffabflutung zu beobachten. Nach 15 Minuten war das Kontrastmittel aus der Region über die Gefäße abtransportiert worden.

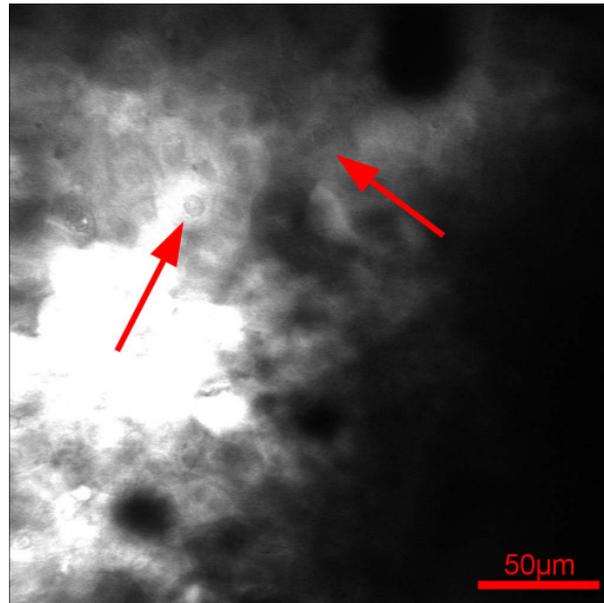


Abb. 3.34: Kontrastumkehr lässt auf eine gestörte Barrierefunktion der Zellen schließen. Zellplasma färbt sich hell, Zellkerne und -grenzen werden im Vergleich dunkel kontrastiert (Pfeile). So lässt die Farbstoffverteilung eine Aussage über den veränderten Zustand der Haut zu.

Bei der lasermikroskopischen Analyse der makroskopisch gesunden Haut in der näheren Umgebung (Distanz bis zu 1 cm) der Läsionen fiel auf, dass bei allen Patienten auch in der Region eine Papillomatose mit elongierten Kapillaren bestand. Das bedeutet, intradermal lassen sich mit der konfokalen LSM *in vivo* Veränderungen der Epidermisstruktur nachweisen, auch wenn die Haut mit bloßem Auge gesund erschien. Diese Ergebnisse müssen mit größeren Patientenkohorten validiert werden.

3.2.4 Weitere entzündliche Hauterkrankungen/-veränderungen

3.2.4.1 Zoster

Der Zoster zeigte bei allen Probanden der Gruppe H immer das gleiche Histobild. Zunächst war eine starke Schwellung der epidermalen Zellen vorhanden. Zelldurchmesser von 25-40 μm waren zu sehen (Abb. 3.35.a), in Tiefen, wo bei gesunder Haut der Durchmesser der Zellen normalerweise nicht 20 μm überstieg. Weiter zu beobachten war die so genannte balonierte Degeneration: Die virusbefallenen Zellen platzten und gingen zu Grunde. Teilweise bildeten sich multinucleäre Riesenzellen (Abb. 3.35.b, Stern). Es kam zur Auflösung der Gewebestruktur, im

weiteren Verlauf zur intraepidermalen Bläschenbildung, der Akantholyse (Abb. 3.35.b, Pfeil). Gesamte Vesikel ließen sich aufgrund des kleinen Bildausschnittes nicht darstellen. Weitere pathologische Erscheinungen waren das Vorkommen von Entzündungsinfiltraten als auch in seltenen Fällen eine Kontrastumkehr bei der Färbung, was für einen Barrieredefekt der Epidermiszellen sprach.

Die Verabreichung des Na-Fluoreszeins wurde allgemein gut toleriert, auch wenn kurz nach der Injektion ein schwach brennendes Stechen beklagt wurde, was sich innerhalb einer Minute legte. Der Patient 1 der Gruppe H wurde zu Beginn der Behandlung als auch nach 14 Tagen erneut untersucht. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich klinisch sowie mit der kLSM lediglich eine verstärkte Krustung und Schuppung der Haut. Es waren weder ballonierte Riesenzellen noch eine Akantholyse auszumachen. Das Gewebe zeigte eine gute Heilungstendenz.

Die Histologie dürfte sich bei Zoster, Herpes simplex und bei den Windpocken nicht wesentlich unterscheiden.

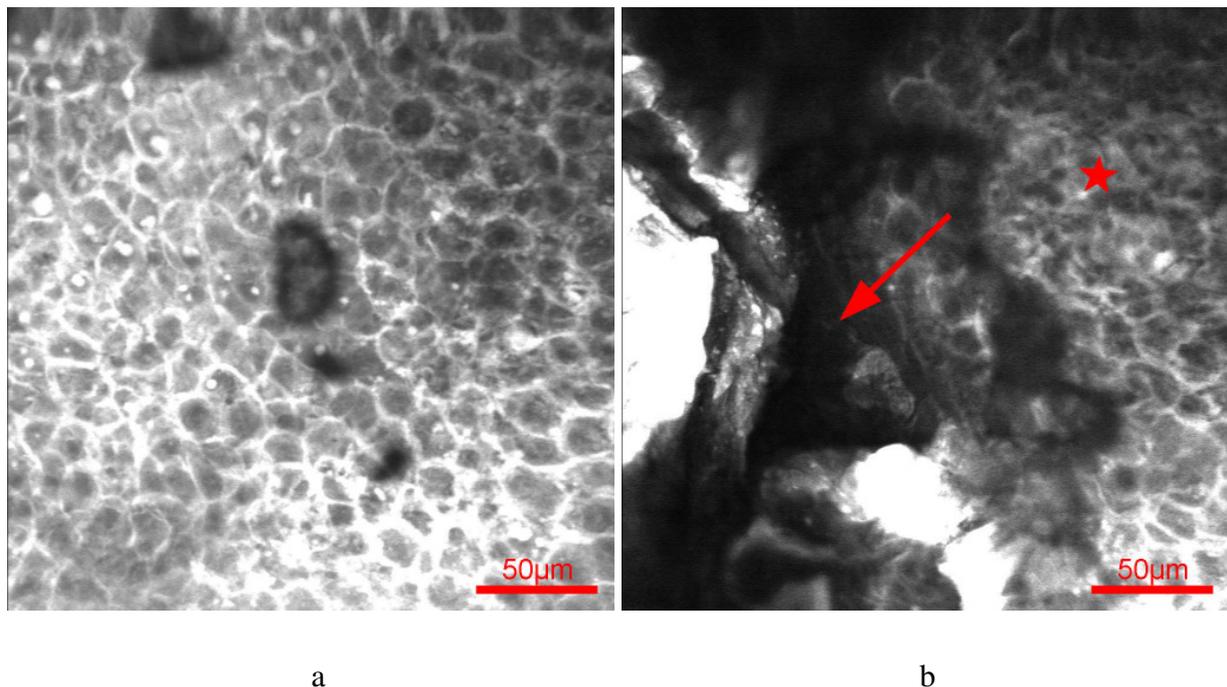


Abb. 3.35: Typische Histopathologie des Zosters: Schwellung der Epidermiszellen (a) bis hin zur so genannten ballonierten Degeneration der virusbefallenen Keratinozyten mit Bildung multinucleärer Riesenzellen (b, Stern). Die Akantholyse ist durch intraepidermale Spaltbildung sichtbar (b, Pfeil).

3.2.4.2 Exanthem

Allgemein wurde sowohl die oberflächliche Applikation als auch die intradermale Injektion des Na-Fluoreszeins gut von den Patienten toleriert.

Obwohl es bei dem Probandenkollektiv E der Exanthemgruppe verschiedene Auslöser des Hautauschlages gab, teils medikamentös, teils infektiös, so unterschieden sich die konfokalen Bilder histologisch nicht wesentlich.

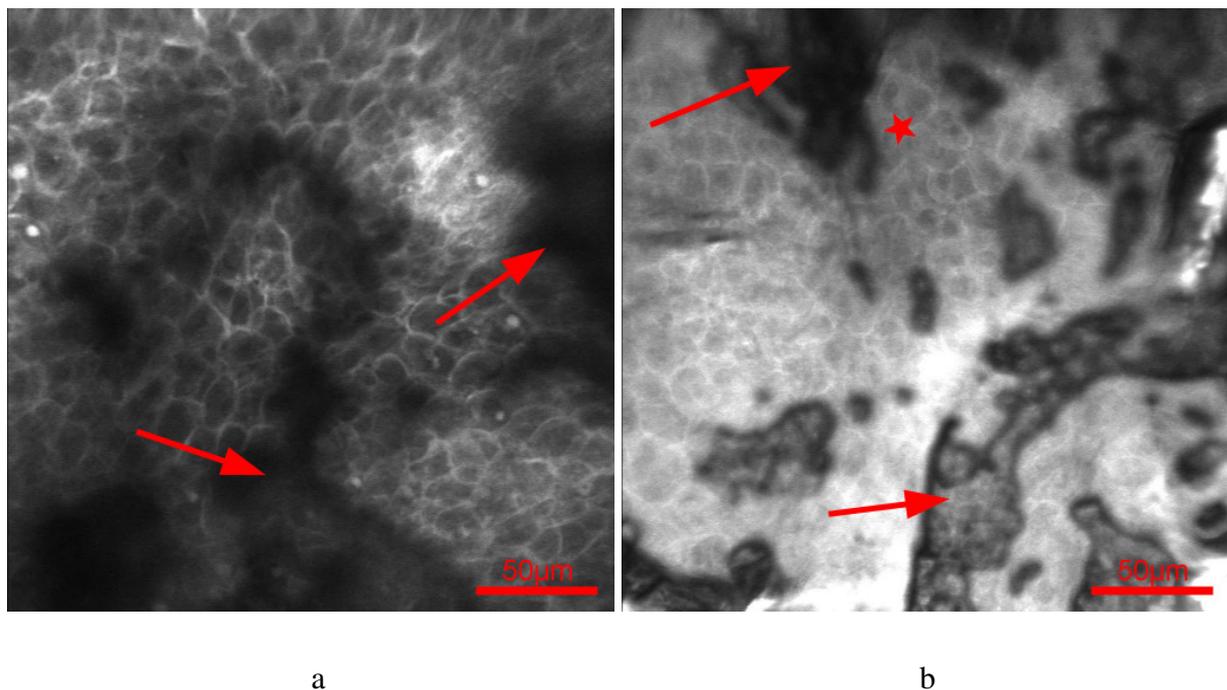


Abb. 3.36: Dunkle, schleierhafte Überlagerung zeichnen das konfokale Bild beim Exanthem (Pfeile). Hervorgerufen werden sie von Unregelmäßigkeiten in der Hornschicht. In einigen Arealen war eine Kontrastumkehr des Farbstoffes evaluierbar (b, Stern), was eine Abnormalität darstellte.

Das Stratum corneum war bei vielen Arealen sehr unregelmäßig und brüchig. Teilweise waren die Korneozyten zu Schuppen verklumpt, an andern Stellen lösten sie sich vom Untergrund. Dies hat zur Folge, dass durch die Unregelmäßigkeit der Oberfläche tiefere Schichten der Epidermis nur begrenzt observierbar waren. So zeigt Abbildung 3.36 (Pfeil) die dunklen, schleierhaften Überlagerungen in der Tiefe, wo sich darüber in der Hornschicht Schuppen und Spalten gezeigt

hatten. Die lebenden Zellen der Epidermis wirkten in der Regel ödematös gequollen, ihre Anordnung leicht ungeordnet (Abb. 3.36.a). Das unmisslichste Zeichen für eine Abnormalität war die Kontrastumkehr des Farbstoffes, wie auch bei der Schuppenflechte beobachtet. An einigen Stellen war zu Beginn der Untersuchung das Zytoplasma hell und die Nuklei dunkel markiert, was wiederum auf eine Barrierestörung der Keratinozyten schließen ließ (Abb. 3.36.b, Stern).

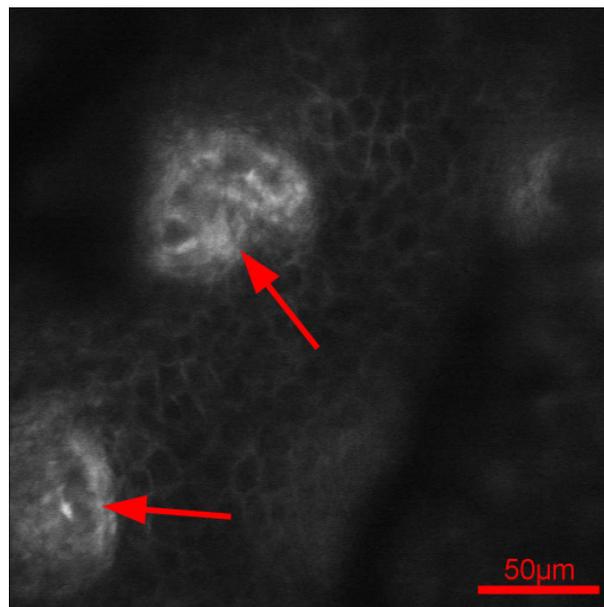
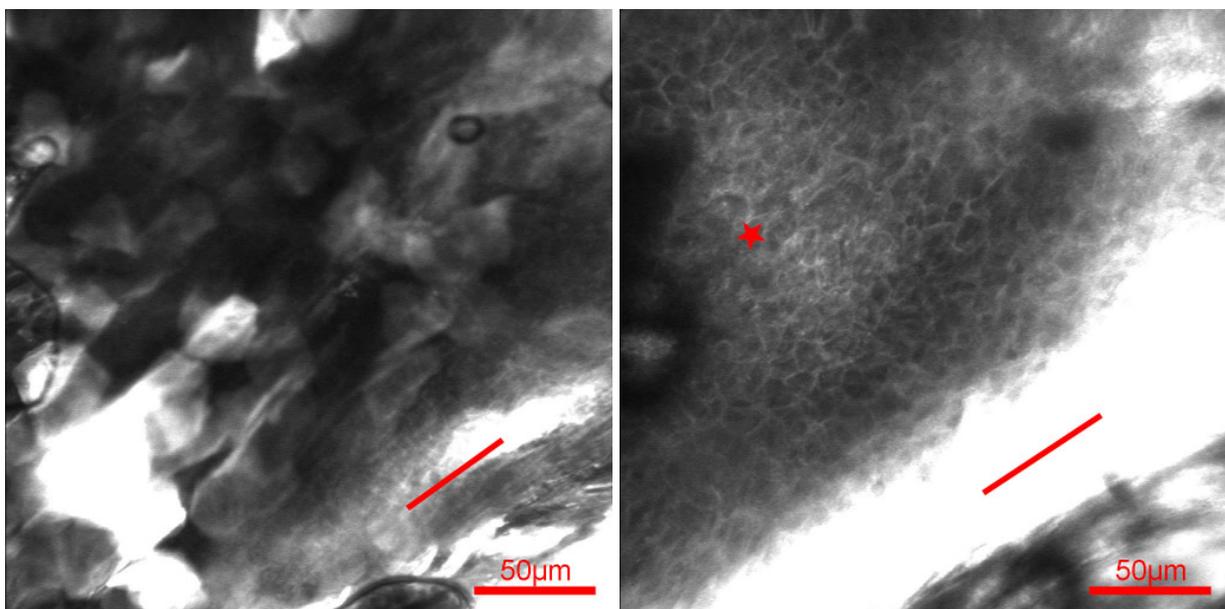


Abb. 3.37: Tiefliegende, vergrößerte Papillen mit elongierten Kapillaren sind ein weiteres Zeichen für einen pathologischen Prozess.

Weiterhin fiel an einigen Stellen eine Vergrößerung der Papillen auf (Abb. 3.37, Pfeile). Im Gegensatz zur Schuppenflechte waren sie nicht überall im betroffenen Gebiet vorhanden und nicht oberflächlich gelegen. Sie befanden sich in den tieferen Zonen der Epidermis. Nichtsdestotrotz enthielten sie erweiterte Blutgefäße mit sichtbaren dunklen Erythrozyten. Diese Kapillaren stellen den Mittelsmann des Erythems dar – ohne sie entsteht keine Rötung und Schwellung. Entzündungszellen konnten im Vergleich zur Psoriasis kaum entdeckt werden.

3.2.4.3 *Lichen ruber*

Bei der Untersuchung des Lichen ruber fiel eine charakteristische Histologie auf, welche sich deutlich von den bisher analysierten Hautbefunden unterschied. Während sich die Hautoberfläche noch mit einem normalen, trockenen Aufbau präsentierte, vielleicht mit einer geringfügigen Hyperkeratose, begann direkt beim Übergang zum Stratum granulosum die papilläre Dermis (Abb. 3.38, Linie). Sie wurde regelrecht gegen die Hornschicht von unten angepresst. Die Papillen haben ihre typische runde Form aus der *en face* Perspektive verloren. Sie ziehen sich linienartig durch das gesamte Bild. Durch die starke Kontrastmittelanreicherung sind in ihnen keine zellulären Strukturen zu erkennen. Mononukleäre Entzündungszellen waren intraepidermal nur vereinzelt auszumachen. Die Erscheinung der übrigen Epidermis wird von dem pflastersteinartigen Aussehen des verbreiterten Stratum granulosum bestimmt. Teilweise schien das Stratum spinosum an einigen Stellen nicht ausgeprägt zu sein. Direkt an den Zellen des Stratum granulosum saß dann die gut vaskularisierte papilläre Dermis auf (Abb. 3.38.b, Stern). Ein nahezu charakteristischer Befund, wie auch in der Lichtmikroskopie vorbeschrieben.



a

b

Abb. 3.38: Linienartige, direkt unter der Oberfläche liegende papilläre Dermis (Linien) sind das histologische Zeichen eines Lichen ruber („Wickham-Phänomen“). Zusätzlich ist die Granulosum-Schicht verbreitert und grenzt an einer gut durchbluteten Dermis (b, Stern).

3.2.4.4 *Demodex folliculorum* u. *brevis* (Haarbalgmilbe)

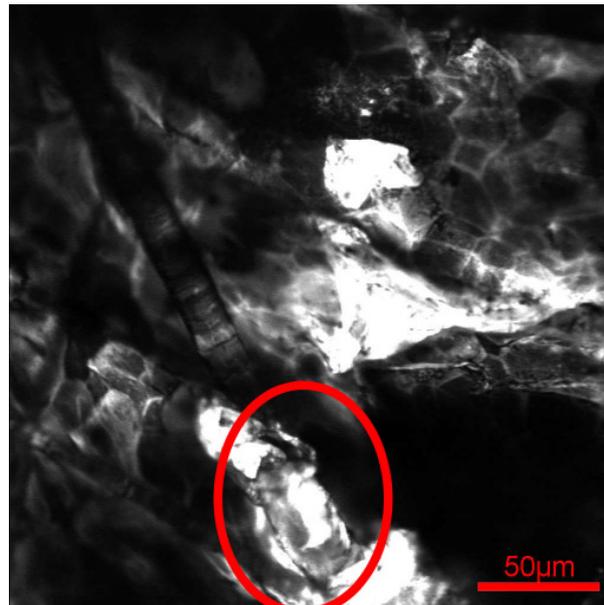


Abb. 3.39: Haarbalgmilben in der Lasermikroskopie.

Bei einer Patientin mit einer Follikulitis zeigte sich eine massive Besiedlung der Haarfollikel mit Haarbalgmilben. Innerhalb des roten Kreises auf der Abbildung 3.39 ist der außerhalb des Follikels gelegene Anteil der Milbe deutlich zu erkennen. Hell tritt ihre zigarrenartige Form zur dunkleren Oberfläche der Haut hervor. Zwei Beine umklammern den dunklen Haarschaft. Der Durchmesser der Milben schwankte zwischen 40-50 µm, die gesamte Länge konnte in keinem Fall bestimmt werden, da der Anteil im Follikel selber durch Fluoreszenzüberlagerung nicht gemessen werden konnte. So ließ sich mit einer nicht-invasiven Oberflächenfärbung dieser Follikulitis einem Erreger zuordnen und anschließend adäquat behandeln.

3.2.5 Neoplastische Hauttumore/Basalzellkarzinom

Auffällig nach der intradermalen Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes war die weite, flächige Spreitung in den neoplastischen Läsionen. Dieses ging weit über die bisherigen Erfahrungen bei gesunder Haut hinaus und würde sich im Sinne einer Gefügestörung zwischen den epidermalen Zellen erklären lassen.

Widmet man sich dem konfokalen Histobild, so ist eine Differenzierung Gesund/Krank im ersten Moment möglich. Während die Oberfläche der Basalzellkarzinome je nach Scanlokalisierung stark unterschiedliche, unspezifische Bilder aufzeigte, von einer schuppigen Hyperkeratose bis hin zu einer völligen Auflösung der Zellstrukturen (Ulzeration), so war der Tiefenscan bezeichnend: deutlich sind die elongierten, monomorphen, basaloiden Tumorzellen in der frühen Färbephase zu erkennen (Abb. 3.40.a). Sie besaßen in der Regel eine Größe um die 40 μm , Abweichungen bildeten leider eher die Regel als die Ausnahme. Unregelmäßige Zellbegrenzungen mit Abbrüchen und zackiger Zeichnung bestätigen wiederum eine Störung des Zellzusammenhaltes (Abb. 3.40.b, Pfeil).

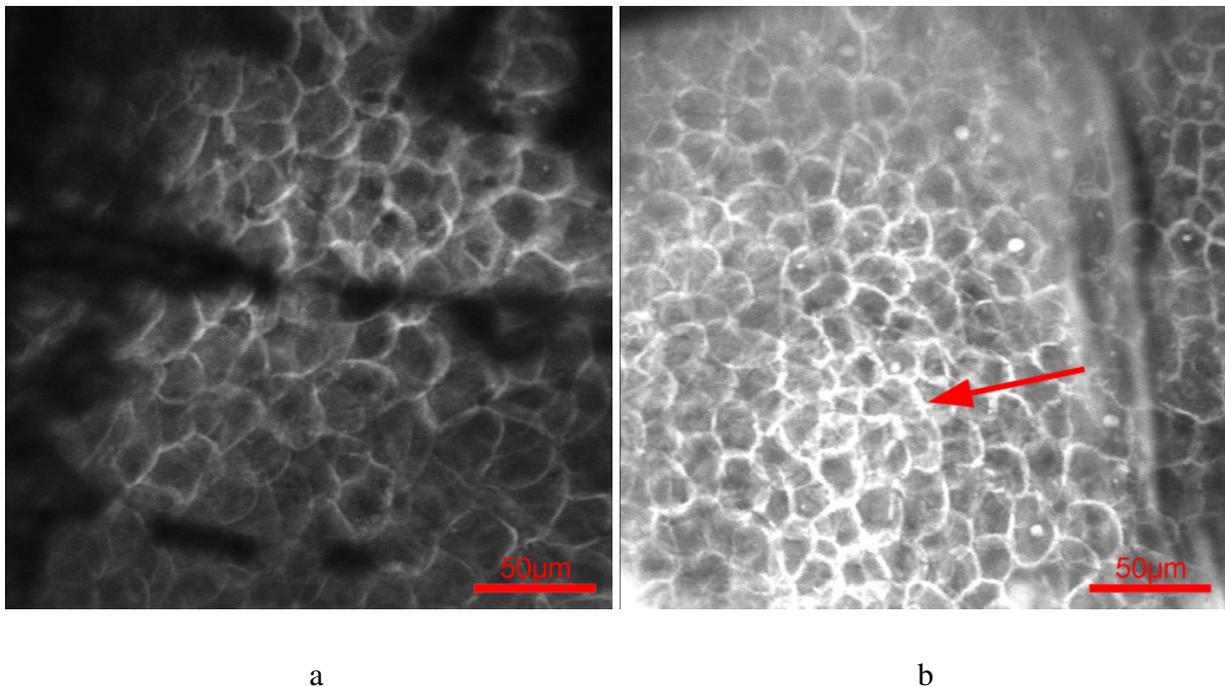


Abb.3.40: Die Erscheinung eines Basalzellkarzinoms kann stark variieren. Links (a) sind die großen, monomorphen Tumorzellen zu erkennen, während rechts (b) die unregelmäßige Kontrastverteilung an den Zellgrenzen (Pfeil) für eine Gefügestörung spricht.

Im Verlauf färbten sich die Zellkerne an und weitere Neoplasiekriterien wurden sichtbar. Neben keratinozytischen Atypien der Nuklei mit verschiedener Form und Größe (starke Schwankung der Zellkerngröße zwischen 10-30 μm) zeigte das Gewebe ein inhomogenes, polymorphes Muster (Abb. 3.41.a). Elongierte, vergrößerte Gefäße (Teleangiektasien) präsentierten ihr helles

Lumen in unregelmäßig aufgequollenen und dicht unter der Oberfläche liegenden Papillen (Abb. 3.41.b, Pfeil). Der Blutfluss ließ sich wie bei der Schuppenflechte anhand der sich bewegenden, dunklen Erythrozyten verfolgen. Entzündliches Infiltrat, meist mononukleäre Zellen, zeigten sich immer in der Umgebung der Papillen und lagen in der Regel gruppiert vor (Abb. 3.41.b, Stern). So stellt die fluoreszierende kLSM eine rasche Methode dar, zum Einen, um Basalzellkarzinome zu diagnostizieren, zum Anderen, um die Effizienz bei konservativen Therapien zu beurteilen.

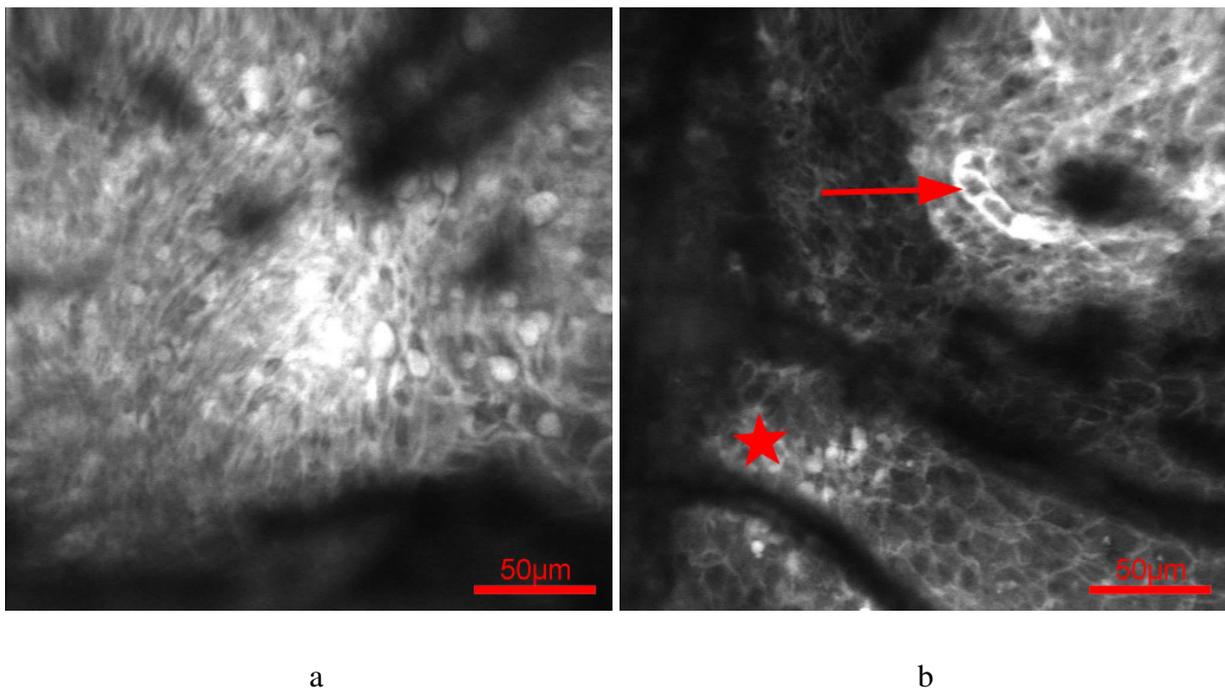


Abb. 3.41: Das Gewebe kann sich sehr unregelmäßig mit atypischen Zellkernen darstellen (a). Entzündungsinfiltrate (b, Stern) und massiv veränderte Papillen mit riesigen Gefäßen (b, Pfeil) sind zu erkennen.