

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

DISSERTATION

Die Anwendung optoakustischer Verfahren und der
konfokalen Laserscan-Mikroskopie für das Monitoring des
Therapieverlaufs in psoriatischer Haut

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Ossadnik

aus Dresden

Datum der Promotion: 13.12.2019

Vorwort

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Ossadnik K., Philipp S, Bost W., Fournelle M., Richter H, Lademann J. Application of Photoacoustics Methods and Confocal Microscopy for Monitoring of Therapeutic Response in Plaque Psoriasis. Skin Pharmacol Physiol 2018;31:308-315.

Ebenso wird darauf hingewiesen, dass die Abbildungen 9 und 14 und einige Textpassagen aus der bereits veröffentlichten Publikation übernommen wurden.

Es wird auf Kapitel 7 „Anteilerklärung an erfolgter Publikation“ auf Seite 59 hingewiesen.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Zusammenfassung	3
1. Einleitung	5
1.1. Überblick.....	5
1.2. Theoretische Grundlagen.....	7
1.2.1. Aufbau und Durchblutung der Haut.....	7
1.2.2. Psoriasis.....	9
1.2.3. Ätiologie und Pathogenese der Psoriasis.....	10
1.2.4. Gefäßveränderungen und Dermatopathologie bei Psoriasis.....	12
1.2.5. Therapie der Psoriasis.....	13
1.3. Zielstellung.....	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Optoakustisches Bildgebungssystem „SKINSPECTION“.....	17
2.1.1. Probandenkollektiv.....	17
2.1.2. Grundprinzip der Optoakustik.....	17
2.1.3. Aufbau des optoakustischen Bildgebungssystems.....	20
2.1.4. Studiendesign für die vergleichende Untersuchung von Psoriasis- Patienten und gesunden Probanden mit einem optoakustischen Bildgebungssystem.....	21
2.1.5. Untersuchungsprotokoll für die optoakustischen Messungen.....	22
2.1.6. Auswertung der Daten.....	23
2.1.7. Statistik.....	24
2.2. Konfokales Laserscan-Mikroskop.....	25
2.2.1. Probandenkollektiv.....	25
2.2.2. Grundprinzip der konfokalen Laserscan-Mikroskopie.....	26
2.2.3. Aufbau eines konfokalen Laserscan-Mikroskops.....	28
2.2.4. Studiendesign für die vergleichende Untersuchung von Psoriasis- Patienten und gesunden Probanden mit einem konfokalen Laserscan- Mikroskop.....	29

2.2.5. Untersuchungsprotokoll für die Messungen mit dem Laserscan-Mikroskop.....	30
2.2.6. Auswertung der Daten.....	31
2.2.7. Statistik.....	31
3. Ergebnisse.....	33
3.1. Optoakustisches Bildgebungssystem „SKINSPECTION“.....	33
3.1.1. Allgemeine Beobachtungen.....	33
3.1.2. Daten der gesunden Probanden.....	34
3.1.3. Daten der Psoriasis-Patienten.....	37
3.1.4. Vergleich der Ergebnisse von gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten.....	39
3.2. Konfokale Laserscan-Mikroskopie.....	41
3.2.1. Allgemeine Beobachtungen.....	41
3.2.2. Daten der gesunden Probanden.....	42
3.2.3. Daten der Psoriasis-Patienten.....	43
3.2.4. Vergleich der Ergebnisse von gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten	44
4. Diskussion.....	46
4.1. Optoakustisches Bildgebungssystem „SKINSPECTION“.....	46
4.2. Konfokale Laserscan-Mikroskopie.....	47
5. Referenzen.....	50
6. Eidesstattliche Erklärung.....	58
7. Anteilserklärung an erfolgter Publikation.....	59
8. Lebenslauf.....	60
9. Publikation.....	61
10. Danksagung.....	62

Abstract

Psoriasis is one of the most common chronic inflammatory skin diseases and often means a substantial burden for those affected. Psoriasis is not curable and a peculiarity of this disease is its proneness to recurrence. Long-term therapy is associated with adverse side effects. The timely recognition of recurrence and a reliable follow-up during therapy would be desirable. Transformation in the architecture of dermal blood vessels play a special role in this disease. Typical capillary changes can be detected early and before the onset of clinical presentation. After completion of therapy and healing of superficial skin lesions, persistent capillary changes may favor relapse. Alteration and enlargement of the capillaries is associated with a significant broadening of the dermal papilla diameters.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) is an established non-invasive method in dermatology and has been studied for its use in monitoring psoriasis. Optoacoustics is an innovative and non-invasive procedure with promising potential for clinical applications. The purpose of this study was to investigate the vascular structures of eleven psoriatic patients and six healthy volunteers with an optoacoustic device. For the measurements, the Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik IBMT (St. Ingbert, Germany) provided a system that had been developed in collaboration with the company kiberio (kiberio GmbH, Saarbrücken, Germany) within the European research project „SKINSPECTION“. Additionally, the diameter of the dermal papillae of six patients and six healthy volunteers was determined using Confocal laser scanning microscopy.

The optoacoustic examinations revealed no differences in average vessel diameter and vasculature per unit volume in healthy volunteers versus non-lesional and lesional areas of psoriasis patients. At the deeper skin level, no pathological vascular changes could be detected. Using the CLSM system, a significant difference (Wilcoxon test, $p = 0.028$) between the diameters of the dermal papillae of lesional skin areas (0.114 ± 0.012 mm) compared to non-lesional skin areas (0.079 ± 0.005 mm) was found. There was no significant difference in the diameter of the papillae in the skin of healthy volunteers (0.074 ± 0.006 mm) compared to non-lesional skin areas of psoriasis patients (0.079 ± 0.005 mm).

The prototype of an optoacoustic measuring system used in this study was unsuitable to detect capillary structures. This result can be explained by an insufficient resolution due to the applied ultrasound frequency.

CLSM, on the other hand, is a complex technology that allows a distinction between healthy and pathological skin.

Zusammenfassung

Psoriasis ist eine der häufigsten chronisch entzündlichen Hauterkrankungen und bedeutet für die Betroffenen oftmals einen erheblichen Leidensdruck. Psoriasis ist nicht heilbar und eine Besonderheit dieser Erkrankung besteht darin, dass sie stark zu Rezidiven neigt. Eine Langzeittherapie ist mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. Das rechtzeitige Erkennen von Rezidiven und eine verlässliche Verlaufskontrolle des Therapieverlaufs wären wünschenswert. Veränderungen der Architektur der Hautgefäße spielen bei dieser Erkrankung eine besondere Rolle. Die typischen Kapillarveränderungen können bereits früh und vor dem Auftreten des klinischen Erscheinungsbildes nachgewiesen werden. Nach Abschluss der Therapie und Abheilung der oberflächlichen Hautläsionen wird persistierenden Kapillarveränderungen die Begünstigung eines Rezidivs zugeschrieben. Eine Veränderung und Erweiterung der Kapillargefäße geht mit einer deutlichen Verbreiterung der dermalen Papillendurchmesser einher.

Die konfokale Laserscan-Mikroskopie ist eine etablierte, nichtinvasive Methode in der Dermatologie und wurde bereits in Studien für die Überwachung des Therapieverlaufs bei Psoriasis untersucht. Die Optoakustik ist ein innovatives und nichtinvasives Verfahren mit vielversprechendem Potential für den klinischen Einsatz. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung dermalen Gefäßstrukturen von elf Psoriasis-Patienten und sechs gesunden Probanden mit einem optoakustischen System. Das verwendete Gerät wurde vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik IBMT in St. Ingbert in Zusammenarbeit mit der Firma kiberio (kiberio GmbH, Saarbrücken) im Rahmen des europäischen Forschungsprojektes „SKINSPECTION“ entwickelt. Zusätzlich wurden die dermalen Papillendurchmesser unter Verwendung eines konfokalen Laserscan-Mikroskops an sechs gesunden und sechs Psoriasis-Patienten bestimmt.

In den optoakustischen Untersuchungen zeigten sich keine Unterschiede im mittleren Gefäßdurchmesser und der Volumeneinnahme der Gefäße im Gewebe zwischen gesunden Probanden und nichtläsionalen und läsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten. An den tiefer gelegenen Blutgefäßen der Haut konnten keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden. Die Untersuchungen an Psoriasis-Patienten mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie zeigten einen signifikanten Unterschied (Wilcoxon-

Test, $p= 0,028$) zwischen den Durchmessern der dermalen Papillen der läsionalen Hautareale ($0,114 \pm 0,012$ mm) im Vergleich zu den nichtläsionalen Hautarealen ($0,079 \pm 0,005$ mm) . Es konnte kein signifikanter Unterschied der Papillendurchmesser in der Haut von gesunden Probanden ($0,074 \pm 0,006$ mm) im Vergleich zu nichtläsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten ($0,079 \pm 0,005$ mm) festgestellt werden.

Der für diese Untersuchungen verwendete Prototyp eines optoakustischen Messsystems ermöglichte keine Darstellung von kapillären Strukturen. Die Auflösung war aufgrund der angewandten Ultraschallfrequenz nicht ausreichend, um Veränderungen an den Kapillarschlingen zu erfassen.

Die Laserscan-Mikroskopie hingegen ist eine aufwändige Technologie, die jedoch eine Unterscheidung zwischen gesunder und pathologischer Haut erlaubt.

1. Einleitung

1.1. Überblick

Psoriasis ist eine der häufigsten entzündlichen Erkrankungen der Haut. Der Verlauf ist chronisch-rezidivierend und umfasst neben einer möglichen Gelenkbeteiligung typische Komorbiditäten. Für betroffene Patienten bedeutet die Erkrankung oftmals eine deutliche Stigmatisierung und eine Einschränkung der Lebensqualität.

Die vollständige Genese der Erkrankung ist noch nicht geklärt. Zum aktuellen Zeitpunkt wird Psoriasis als eine T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion betrachtet (1, 2). Die Aktivierung der T-Zellen fördert die Bildung von Mediatoren, die ihrerseits zu den typischen strukturellen vaskulären und epidermalen Veränderungen der Psoriasis führen (siehe Kapitel 1.2.4.).

Frühere Untersuchungen zeigten die Bedeutung der Veränderung der Gefäßarchitektur für die Pathogenese der Psoriasis. So konnten Hern et al. mittels Laser-Doppler-Blutflussmessungen an der Haut einen 9 bis 13-mal größeren Blutfluss in psoriatischen Läsionen im Vergleich zur gesunden Haut nachweisen (3). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten vor allem Veränderungen der Kapillarschlingen innerhalb der dermalen Papillen. Diese sind im Gegensatz zu den Kapillarschlingen gesunder Haut gewunden, erweitert und elongiert und verlieren ihre typische Haarnadelform (4, 5).

Im klinischen Alltag stehen derzeit keine Biomarker für das standardisierte Monitoring der Psoriasis zur Verfügung (6). Für die Beurteilung der Schwere der Psoriasis und des Therapieerfolgs werden verschiedene Scoring-Systeme verwendet. Diese Scores beziehen sich vor allem auf objektivierbare klinische Symptome. Dabei haben sich besonders der PASI (Psoriasis Area Severity Index) und BSA (Body Surface Area) etabliert. Zur Einschätzung der krankheitsbezogenen Lebensqualität wird häufig der Dermatology Life Quality Index (DLQI) eingesetzt (6).

Eine Besonderheit der Erkrankung besteht darin, dass sie stark zu Rezidiven neigt. Das Ziel einer effizienten Psoriasis-Therapie ist neben der Reduktion der Hautsymptome und Kontrolle des Krankheitsverlaufs eine Minimierung der Nebenwirkungen und das

Erreichen einer Langzeitremission (7). Aufgrund der Nebenwirkungen und Höhe der Therapiekosten erfolgt die Therapie häufig nur bis zum Abheilen der oberflächlichen Hautläsionen. Subklinische Veränderungen bleiben oftmals bestehen und können das Auftreten eines Rezidivs begünstigen. Untersuchungen von Archid et al. mittels Laserscan-Mikroskopie zeigten eine Erweiterung der Kapillardurchmesser und Papillendurchmesser in psoriatischer Haut im Vergleich zur gesunden Haut und einen Zusammenhang zwischen klinischer Besserung und Normalisierung der Hautstruktur (8). Wolberink et al. demonstrierten eine hohe Übereinstimmung im Nachweis der strukturellen Veränderungen zwischen konfokaler Laserscan-Mikroskopie und histologischen Untersuchungen mittels Lichtmikroskopie und einen deutlichen Zusammenhang zwischen klinischer Besserung der Psoriasis und Nachweis der Normalisierung der strukturellen Veränderungen mittels Laserscan-Mikroskopie und Lichtmikroskopie (9).

Die Laserscan-Mikroskopie ist ein bereits etabliertes, nichtinvasives In-vivo-Verfahren und stellt damit eine mögliche Methode dar, um den Therapieerfolg zu beurteilen und gegebenenfalls eine Therapie bis zur Normalisierung der strukturellen Hautveränderungen fortzuführen. Jedoch erfordern Untersuchungen mittels Laserscan-Mikroskopie hochspezialisierte Fachkräfte und die entsprechende mikroskopische Technik. Weiterhin erfordern diese Untersuchungen eine langwierige Auswertung, da eine Vielzahl von Kapillaren untersucht werden muss, um eine statistisch gesicherte Auswertung zu erhalten.

Eine mögliche Alternative zum Einsatz der Laserscan-Mikroskopie ist die Verwendung optoakustischer Systeme. Die Optoakustik ist ein innovatives und nichtinvasives Verfahren, dessen Entwicklung in den letzten Jahren einen deutlichen Aufschwung erlebt. Mit dieser Technik werden die laserinduzierte Schallerzeugung und herkömmliche Ultraschall-Empfangsmechanismen kombiniert. Der Vorteil der Optoakustik gegenüber den rein optischen bzw. akustischen Verfahren ist die hochauflösende Bildgebung und höhere Eindringtiefe in das Gewebe. Es gibt zahlreiche Publikationen, die den Wert der Optoakustik dokumentieren, so zeigten erste Untersuchungen die potentielle Anwendbarkeit dieser innovativen Technik in der Diagnostik des Brustkrebses (10, 11). Präklinische Untersuchungen der Haut stellten die mögliche Bedeutung für die Dermatologie dar, besonders im Rahmen des Staging

von Melanomen z.B. vor chirurgischen Eingriffen (12) oder zur Bestimmung der Tiefe von Hautverbrennungen (13). Favazza et al. zeigten mit ihren Untersuchungen, dass die Optoakustik besonders auch zur Darstellung der Vaskularisierung der Haut geeignet ist (14, 15).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Methoden der optoakustischen Bildgebung und der konfokalen Laserscan-Mikroskopie bezüglich der Anwendung zur Verlaufskontrolle der Psoriasis.

1.2. Theoretische Grundlagen

1.2.1. Aufbau und Durchblutung der Haut

Die Haut wird in die zwei Schichten Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut) unterteilt. Unter der Dermis liegt die Subkutis (Unterhaut), welche die Haut locker mit dem darunter liegenden Gewebe verbindet. Die Dicke der Haut variiert je nach Lage zwischen 1,5 mm und 4 mm und wird wesentlich von der Dermis bestimmt (16).

Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel und wird funktionell in fünf Schichten unterteilt. Dabei bildet das Stratum basale die Grenze zur Dermis, nach apikal schließen sich Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum und Stratum corneum an. Keratinozyten bilden den größten Zellanteil, aber auch Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen sind in geringerer Anzahl vorhanden. Die Wachstumsphase der Keratinozyten beträgt 14 Tage und die Ausreifung zu verhornten Korneozyten etwa weitere 14 Tage. Bei bestimmten Hauterkrankungen, wie zum Beispiel auch bei Psoriasis vulgaris ist dieser Prozess der Zellneubildung und Zelldifferenzierung deutlich verkürzt. Die gesteigerte Verhornung zeigt sich im Fehlen des Stratum granulosum und durch das Auftreten von Zellkernen im Stratum corneum (Hyperparakeratose). Dies führt zu dem typischen klinischen Erscheinungsbild mit erythematösen Plaques mit Schuppung (16, 17).

Die Epidermis ist frei von Gefäßen. Die Versorgung wird über Kapillarfiltration und Venolenpermeabilität und besonders über die Diffusion durch interendotheliale Spalten durch die darunter liegende Dermis gewährleistet (18).

Epidermis und Dermis sind durch eine Basalmembran voneinander abgegrenzt. Diese dermoepidermale Junctionszone unterliegt einer hohen mechanischen Beanspruchung. Der Befestigung und Verbindung dienen vor allem von den basalen Epithelzellen ausgehende knöpfchenartige Fortsätze, die in die Dermis ragen, Hemidesmosomen, Desmosomen und Ankerfasern, welche mit dem Stratum papillare verbunden sind (19).

Die Dermis besteht aus Bindegewebe und ist vor allem für die mechanische Festigkeit und Elastizität der Haut verantwortlich. Sie lässt sich in das direkt an die Epidermis angrenzende Stratum papillare mit dermalen Papillen und das darunter liegende Stratum reticulare unterteilen. Dermale Papillen sind Bindegewebezapfen, die in die Epidermis hinein ragen und die Kontaktfläche zwischen Epidermis und Dermis vergrößern und damit für eine Verbesserung der Versorgung der Epidermis sorgen (19).

Die Dermis enthält Lymphgefäße, Nerven und ein ausgedehntes System von Blutgefäßen. Dieses System ist ein dreidimensionales Netzwerk aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen und wird von Gefäßen gebildet, welche den tiefen Muskellogen und subkutanen Fettgewebe entspringen und sich an der Grenze zwischen Kutis und Subkutis zu einem horizontal zur Hautoberfläche verlaufenden tiefen dermalen Gefäßplexus verzweigen. Aus diesem tiefen Gefäßplexus ziehen senkrecht verlaufende Gefäße und enden im oberen dermalen Gefäßplexus im Bereich der papillären Dermis. Zwischen den aufsteigenden Arteriolen und absteigenden Venolen gibt es verbindende Gefäßäste. Haarbulbi und Schweißdrüsen werden aus lateralen Ästen der aufsteigenden Arteriolen versorgt (20). Der Großteil der Mikrozirkulation der Haut befindet sich in der papillären Dermis etwa 1 bis 2mm unter der Hautoberfläche (21). Den terminalen Arteriolen des oberen dermalen Plexus entspringen die aufsteigenden Schenkel der haarnadelförmigen Kapillarschlingen innerhalb der dermalen Papillen und enden über die absteigenden Schenkel in den postkapillären Venolen. Dabei wird jede dermale Papille von einer einzelnen Kapillarschlinge versorgt (22). Es wird zwischen einem intrapapillären und extrapapillären Anteil der Kapillarschlingen unterschieden. Die dermalen Kapillarschlingen haben in ihrem extra- und intrapapillären Verlauf des afferenten Schenkels und intrapapillären Verlauf des efferenten Schenkels die Struktur eines arteriellen Kapillargefäßes. Erst im extrapapillären Verlauf des efferenten

Schenkels verändert sich die Ultrastruktur mit den Eigenschaften eines venösen Kapillargefäßes (22).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen ermöglichen eine Differenzierung der einzelnen Gefäßarten. Ein wichtiges Unterscheidungskriterium zwischen den Gefäßarten findet sich neben dem Gefäßdurchmesser und Aufbau der Gefäßwand in der Struktur der Basalmembran. In arteriellen Gefäßen ist die Basalmembran homogen und in venösen Gefäßen durch einen inhomogenen multilamellären Aufbau gekennzeichnet (20, 22, 23). Arteriolen lassen sich elektronenmikroskopisch durch die Anwesenheit der Membrana elastica externa von Kapillaren unterscheiden (24). Im kapillären Strombett sind das Fehlen von glatter Muskulatur und das Vorhandensein von Endothel umgebenden Perizyten und einer Basalmembran charakteristisch. Postkapilläre Venolen nehmen den größten Teil der Gefäße innerhalb der papillären Dermis ein. Sie nehmen das Blut aus den Kapillargefäßen auf und zeichnen sich durch 2 bis 3 Schichten glatter Muskulatur aus. Bei entzündlichen Vorgängen zeigen sie zuerst morphologische Alterationen (20, 23).

1.2.2. Psoriasis

Psoriasis ist eine der häufigsten chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen. Die weltweite Prävalenz wird mit 0,09% bis 5,1% geschätzt und variiert je nach Bevölkerungsgruppe bei Erwachsenen zwischen 0,51% und 11,43% und bei Kindern zwischen 0% und 1,37%. In Deutschland sind 2,1% der Menschen betroffen (25). Für die Patienten bedeutet die Erkrankung eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität. In einer klinischen Studie konnte dargestellt werden, dass die individuelle körperliche und psychische Belastung mit der von Krebserkrankungen, Diabetes, Herzerkrankungen, Arthritis und Depression vergleichbar ist (26).

Es wird zwischen Psoriasis-Typ I und Psoriasis-Typ II unterschieden. Der Psoriasis-Typ I stellt die frühe Form der Erkrankung mit einem Manifestationsalter zwischen 10 und 30 Jahren dar und ist durch eine familiäre Häufung und meist schwerem Verlauf gekennzeichnet. Die späte Form, der Psoriasis-Typ II, tritt zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr auf, zeigt häufig einen mildereren Verlauf und selten eine familiäre Häufung.

Klinisch wird Psoriasis in folgende Gruppen unterteilt:

- Psoriasis vulgaris
- Psoriasis guttata
- Psoriasis intertriginosa, Psoriasis inversa
- Psoriasis erythrodermatica
- Psoriasis pustulosa
- Psoriatische Osteoarthropathie

Die Psoriasis vulgaris ist die häufigste Erscheinungsform und wird auch als Psoriasis vom Plaque-Typ bezeichnet. Das klinische Erscheinungsbild ist geprägt von scharf begrenzten erythematösen Plaques mit groblamellärer und weißsilbriger Schuppung. Charakteristische Prädilektionsstellen sind Stamm, die Streckseiten der Extremitäten, Hautareale mit hoher mechanischer Beanspruchung, besonders über den Knie- und Ellenbogengelenken, das Gesäß und Kapillitium. Typische Symptome sind Juckreiz, Brennen oder Stechen, schmerzhafte Hautrisse und Nagelveränderungen (Tüpfnägel, Ölfleck, Krümelnägel).

Psoriasis ist häufig mit Komorbiditäten assoziiert. Die Prävalenz von Psoriasis-Arthritis variiert je nach Studie und Bevölkerungsgruppe zwischen 6% und 42%. Bei etwa 15 % aller Patienten mit Psoriasis wird Psoriasis Arthritis nicht erkannt. Die Inzidenz und Prävalenz von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist mit Psoriasis assoziiert, aber auch metabolische Veränderungen wie Hypertonus, Diabetes mellitus, Adipositas und Fettstoffwechselstörungen treten bei Psoriasis-Patienten gehäuft auf. Eine schwer verlaufende Psoriasis scheint ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen zu sein (27).

1.2.3. Ätiologie und Pathogenese der Psoriasis

Die vollständige Pathogenese der Erkrankung ist trotz zahlreicher Untersuchungen noch nicht vollständig bekannt. Lange Zeit wurde diskutiert, ob eine pathologisch gesteigerte Keratinozytenproliferation mit sekundärer Aktivierung des Immunsystems primärer Ausgangspunkt der Erkrankung ist oder ob sie eine primäre Erkrankung des Immunsystems ist.

Heute wird Psoriasis als eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung betrachtet (17). Sie ist eine multifaktorielle Erkrankung und unterliegt zahlreichen Einflüssen. Neben Triggerfaktoren, die eine Psoriasis auslösen können, spielt die genetische Veranlagung eine entscheidende Rolle. Der Einfluss der genetischen Disposition konnte bereits in Zwillingsstudien nachgewiesen werden. So liegt die Konkordanzrate für monozygotische Zwillinge zwischen 62 und 70 % und bei dizygotischen Zwillingen zwischen 21 und 23 % (28). Die Tatsache, dass die Konkordanzrate in Zwillingsstudien niemals bei 100 % liegt, lässt darauf schließen, dass bestimmten Triggerfaktoren ebenfalls eine wichtige Bedeutung zukommt. So können Medikamente, insbesondere Beta-Rezeptorenblocker, Lithium, Malaria-Therapeutika und Interferon- α , eine Psoriasis induzieren oder verstärken. Ein ebenfalls wichtiger Provokationsfaktor ist die Infektion mit Streptokokken (29). Weitere auslösende Faktoren können Stress und regelmäßiger Alkohol- und Nikotinkonsum sein. Bei etwa 70 % aller Patienten bis zum 15. Lebensjahr liegt eine positive Familienanamnese vor (30). In Kopplungsstudien konnten verschiedene Suszeptibilitätsloci (PSORS, psoriasis susceptibility) erfasst werden. Als der bedeutendste Psoriasis-assoziierte Locus konnte dabei PSORS1 (psoriasis susceptibility gene 1) auf Chromosom 6p21 identifiziert werden (31). Besonders bei Patienten mit Typ-1-Psoriasis weist das in dieser Region gelegene HLA-CW*0602-Allel eine starke Assoziation mit der Erkrankung auf (32). In anderen Studien konnten Assoziationen mit genetischen Variationen von Zytokinen dargestellt werden. Dabei spielen vor allem die Zytokine Interleukin (IL)-12 und IL-23 eine wichtige Rolle im Entzündungsprozess (33).

Die psoriatische Gewebereaktion wird durch ein komplexes Zusammenspiel von stromalen und konventionellen Immunzellen verursacht. Über eine Aktivierung von dendritischen Zellen werden pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL-) 1, IL-6, IL-12, IL-23 und Tumornekrosefaktor (TNF) sezerniert (34, 35). In Anwesenheit dieser Zytokine werden T-Zellen, vor allem CD4+T-Helfer (Th-) Zellen aktiviert und zu Th17-Zellen und anderen Th-Zell-Subpopulationen (Th1-Zellen, Th22-Zellen) differenziert (34, 35). Lange Zeit wurde den Th1-Zellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese zugeschrieben. Neuere Modelle konnten jedoch zeigen, dass vor allem IL-23 und Th17-Zellen einen wesentlichen Stellenwert für die Entstehung der psoriatischen Plaques einnehmen. Die besondere Bedeutung der Th17-Zellen für die Immunpathogenese der

Psoriasis wurde durch die erfolgreiche Anwendung zielgerichteter Therapien bereits nachgewiesen (36).

T-Zellen sezernieren wiederum pro-entzündliche Mediatoren, die zu den typischen vaskulären und epidermalen Veränderungen der Psoriasis führen (37). So induzieren die Botenstoffe der T-Zellen eine Hyperproliferation der Epidermis. Der Zellzyklus der Keratinozyten ist um das etwa 8-fache beschleunigt. Üblicherweise erneuert sich die Epidermis innerhalb von 26 bis 27 Tagen. In psoriatischer Haut benötigen die Zellen der Basalschicht nur noch 4 Tage, um das Stratum corneum zu erreichen (17). In dieser kurzen Zeit verhornen die Zellen nicht richtig und lösen sich als Konglomerate in Form von Schuppen ab. Ein weiterer Teil des Entzündungsgeschehens ist die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, deren Akkumulation zu den sogenannten Munro-Mikroabszessen führt. Die epidermalen Veränderungen in psoriatischer Haut gehen mit einer ausgeprägten Gefäßproliferation einher. Dabei scheinen Endothelzellen eine wichtige Rolle zu spielen. Diese werden unter anderem durch Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Endothelial cell stimulating angiogenesis factor (ESAF) stimuliert. Dabei wird ESAF hauptsächlich von Keratinozyten und Fibroblasten und VEGF von Keratinozyten gebildet (17). Die Serumkonzentrationen dieser proangiogenetischen Faktoren korrelieren mit dem klinischen Schweregrad der Psoriasis (38).

1.2.4. Gefäßveränderungen und Dermatopathologie bei Psoriasis

Untersuchungen haben gezeigt, dass Veränderungen der Architektur der Hautgefäße für Psoriasis charakteristisch sind. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den Kapillarschlingen zu. Veränderungen der Kapillarschlingen können bereits sehr früh histologisch nachgewiesen werden (39-41). Entsprechend der gesunden Haut, enthält eine dermale Papille der psoriatischen Haut einen aufsteigenden und absteigenden Schenkel einer Kapillarschlinge aus dem oberen dermalen Gefäßplexus. In psoriatischen Hautläsionen verlaufen die Kapillarschlingen jedoch nicht vertikal zueinander, sondern zeigen sich geschlängelt, erweitert und verlängert. Die typische Haarnadelform der Kapillarschlingen ist zu einem Konvolut gewunden (5, 24). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Kapillaren in psoriatischer Haut sich strukturell verändern. Die dermalen Kapillarschlingen in gesunder Haut haben in ihrem extra- und intrapapillären Verlauf des afferenten Schenkels und intrapapillären

Verlauf des efferenten Schenkels die Struktur eines arteriellen Kapillargefäßes. In psoriatischer Haut nehmen die Kapillarschlingen je nach Ausmaß bereits im afferenten Schenkel oder intrapapillären Verlauf einen venösen Charakter mit mehrschichtiger Basalmembran und Fenestrierung des Endothels an (5, 42). Diese Veränderungen führen zu einer erhöhten Permeabilität für Albumin und Plasmaproteine, unterstützen die Migration von inflammatorischen Zellen und spielen eine wesentliche Rolle für die Pathogenese der Psoriasis (42).

Eine Abheilung der oberflächlichen Läsionen unter Therapie geht mit einer Normalisierung der Kapillarveränderungen einher (5). Darüber hinaus wurde in histologischen Untersuchungen gezeigt, dass persistierende Gefäßveränderungen nach Abheilung der Epithelveränderungen ein Rezidiv begünstigen können (43).

Zahlreiche Studien belegen, dass eine Erweiterung und Veränderung der Kapillargefäße mit einer deutlichen Verbreiterung der dermalen Papillendurchmesser einhergeht (8, 44, 45). Im Vergleich zur gesunden Haut kann der Durchmesser der Papillen in psoriatischer Haut um etwa 50 Prozent vergrößert sein (45, 46). Diese Veränderung stellt ein wichtiges histologisches Kriterium der Psoriasis dar.

Zu den weiteren histologischen Charakteristika bei Psoriasis vulgaris gehören neben den oben beschriebenen Veränderungen die Ansammlung neutrophiler Granulozyten im Stratum spinosum (Kogoj-Pusteln) und im Stratum corneum (Munro-Mikroabszesse), eine gesteigerte Verhornung und Verbreiterung des Stratum corneum mit vorhandenen Zellkernresten (Hyperparakeratose), das Fehlen des Stratum granulosum und Akanthose mit lang ausgezogenen Reteleisten, die den verbreiterten und hochgezogenen Papillarkörpern aufsitzen.

1.2.5. Therapie der Psoriasis

Psoriasis ist eine nicht heilbare Erkrankung. Es gibt jedoch zahlreiche therapeutische Möglichkeiten, die zu einer Abheilung der Hautveränderungen führen. Die vier Säulen der Behandlung bilden Lokalthherapie, UV-Therapie, klassische Systemtherapien und systemische Therapien mit Biologika. Die Behandlung sollte an jeden Patienten individuell angepasst werden und richtet sich nach dem Schweregrad der Erkrankung. Ein wichtiges Prinzip ist dabei die Kombination von lokaler und systemischer

Behandlung, um die Wirksamkeit, bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen einer Monotherapie, zu steigern.

Um die Schwere der Erkrankung und den therapeutischen Effekt objektivierbar zu bewerten, stehen klinische Scores zur Verfügung. In einem systematischen Review konnten 53 verschiedene klinische Scores identifiziert werden (46). Besonders etabliert haben sich der PASI (Psoriasis Area Severity Index) und BSA (Body Surface Area). Zur Einschätzung der krankheitsbezogenen Lebensqualität wird häufig der Dermatology Life Quality Index (DLQI) verwendet (6). Der PASI wurde 1978 von Fredriksson und Pettersson entwickelt (47). Für die Berechnung werden Kopf, Stamm, obere und untere Extremitäten gesondert nach dem prozentualen Anteil der befallenen Körperoberfläche und nach dem Schweregrad der Symptome Erythem, Infiltration und Schuppung bewertet. Der PASI-Score kann Werte von 0 bis 72 einnehmen und ist besonders in klinischen Studien und als dynamischer Parameter zur Bewertung des klinischen Verlaufs weitverbreitet. Vor allem die Validität, seine mangelnde Sensitivität und der fehlende lineare Zusammenhang mit dem klinischen Schweregrad werden zunehmend kritisch bewertet (48).

Die Grundlage der Behandlung, vor allem bei mildereren Verlaufsformen, bildet die topische Therapie mit Vitamin-D3-Analoga, lokalen Kortikosteroiden, Teerpäparaten, Dithranol, Retinoiden und Salicylsäurepräparaten (49). Calcineurin-Inhibitoren zeigen in der topischen Anwendung ebenfalls eine gute Wirksamkeit besonders in intertriginösen Arealen (50), sind aber für die Behandlung der Psoriasis nicht zugelassen. Das Ziel einer topischen Therapie ist die Reduktion der Keratinozytenproliferation und Hyperkeratose und richtet sich gegen die Entzündungsreaktion der Haut. Speziell topische Kortikosteroide besitzen eine vasokonstriktive, antiproliferative, entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung und können in der Langzeitanwendung neben lokalen Hautreaktionen auch zu einer Atrophie der Haut und Unterdrückung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse führen (51). Ein neuer Ansatz in der topischen Therapie ist die Verwendung von wirkstoffbeladenen Nanopartikeln. Die herkömmlichen Zubereitungen topischer Therapeutika zeichnen sich durch eine eingeschränkte perkutane Penetration aus. Folgen können eine reduzierte Wirksamkeit, wiederholtes Auftragen des Präparates und Hautirritationen sein. In den letzten Jahren gab es bereits zahlreiche Studien zur Untersuchung des Potentials von

Nanoträgern in lokalen Therapeutika (51). Diese Studien zeigten, dass der Zusatz von Nanoträgern, wie zum Beispiel festen Lipid-Nanopartikeln, nanostrukturierten Lipidträgern, Liposomen oder Niosomen zu einer gesteigerten Permeabilität, erhöhten Wirkstoffkonzentrationen in der Haut und damit zu geringeren Dosisanwendungen mit weniger Nebenwirkungen führen kann. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich (52).

Die Phototherapie spielt eine wichtige Rolle in der Therapie der mittelschweren bis schweren Psoriasis. Hierfür sind UVB-Strahlen im 311 nm-Bereich oder UVA-Strahlen (340-400 nm) in Kombination mit dem Photosensibilisator Psoralen (PUVA) geeignet (53).

Patienten mit einer schweren Verlaufsform oder nicht ausreichendem Behandlungserfolg unter topischer Therapie und Phototherapie benötigen eine systemische Therapie. Für die klassische Systemtherapie können Fumarsäureester, Methotrexat (MTX), Acitretin (Retinoid) und Ciclosporin A verwendet werden. Besonders auch bei begleitender Psoriasis-Arthritis stellt MTX eine wichtige Säule der Behandlung dar. Wegen möglicher schwerwiegender Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Hepatotoxizität und Myelosuppression, ist besonders in der Anfangsphase eine gute Überwachung der Patienten mit regelmäßigen klinischen Kontrollen und Laboruntersuchungen erforderlich. MTX ist ein Folsäure-Antagonist und besitzt eine entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung, der vollständige Wirkmechanismus ist noch nicht aufgeklärt (54).

Die wachsende Erkenntnis über die Pathogenese der Psoriasis führte in den letzten Jahren zu neuen Therapieansätzen. So stehen neben den klassischen systemischen Therapien verschiedene Biologika zur Verfügung. Diese molekularbiologisch synthetisierten, rekombinanten Proteine greifen direkt in die pathogenetischen Abläufe mit dem Ziel der Neutralisierung spezifischer Zytokine ein. Hierfür stehen Substanzen wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Inhibitoren (Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Golimumab, Certolizumab Pegol), Anti-Interleukin (IL)-12/23-Antikörper (Ustekinumab), Anti-IL-17-Antikörper (Secukinumab, Ixekizumab, Brodalumab) und Anti-IL-23-Antikörper (Guselkumab) zur Verfügung. Mit den Phosphodiesterase-4 (PDE4)-Inhibitoren (Apremilast) steht, vor allem bei Therapieversagen oder wenn andere

Therapieformen nicht in Frage kommen, eine weitere und relativ neue Wirkstoffgruppe zur systemischen Therapie zur Verfügung (55). Auch wenn Biologika generell eine gute Wirksamkeit und Verträglichkeit zeigen, bedeutet eine Langzeittherapie hohe Therapiekosten und eine Beeinträchtigung des Immunsystems mit erhöhtem Infektionsrisiko, Begünstigung von Neoplasien und Aktivierung von Grunderkrankungen (56, 57).

1.3. Zielstellung

Ausgehend vom aktuellen Wissensstand war die Untersuchung der Methoden der optoakustischen Bildgebung und der konfokalen Laserscan-Mikroskopie bezüglich der Verwendung zur Verlaufskontrolle der Psoriasis das Ziel dieser Arbeit. Mit Hilfe eines optoakustischen Bildgebungssystems sollten Gefäßstrukturen in der läsionalen und nichtläsionalen Haut von Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurde vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik IBMT St. Ingbert der Prototyp eines optoakustischen Messsystems zur Verfügung gestellt. Dieses Messsystem wurde im Rahmen des europäischen Forschungsprojektes „SKINSPECTION“ entwickelt.

Im zweiten Teil der Untersuchungen sollten mit Hilfe der konfokalen Laserscan-Mikroskopie die Papillendurchmesser in der Haut von gesunden Probanden und den läsionalen und nichtläsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Optoakustisches Bildgebungssystem „SKINSPECTION“

2.1.1. Probandenkollektiv

Die Studie wurde im Bereich Hautphysiologie an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Das Studiendesign und die Durchführung der Messungen wurden von der Ethikkommission des Universitätsklinikums der Charité, Campus Mitte, genehmigt. Für die Teilnahme an der Studie galten folgende Einschlusskriterien: Alter der Probanden zwischen 18 und 75 Jahre, Aufklärung über Ziele und Wesen der Untersuchung, schriftliche Einverständniserklärung. Ausschlusskriterien waren: Kinder, Schwangere und stillende Frauen und Personen, die nicht eigenverantwortlich Entscheidungen treffen können.

Das Probandenkollektiv umfasste als Referenzgruppe sechs gesunde Probanden mit einem Durchschnittsalter von 36,2 Jahren, die zum Zeitpunkt der Untersuchung klinisch gesund waren und in der Anamnese keine chronischen Hauterkrankungen angaben. Dabei handelte es sich um drei weibliche und drei männliche Probanden. Alle Probanden der Referenzgruppe wiesen den Hauttyp I bis III nach Fitzpatrick (58) auf.

Für die vergleichende Untersuchung wurden elf Patienten mit bekannter Psoriasis vulgaris und einem aktuellen Krankheitsschub aus der Tagesstation der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Campus Charité Mitte, rekrutiert. Davon waren vier weiblichen und sieben männlichen Geschlechts mit einem Durchschnittsalter von 49,1 Jahren. Alle Probanden der Psoriasisgruppe wiesen den Hauttyp I bis III nach Fitzpatrick auf.

2.1.2. Grundprinzip der Optoakustik

Der optoakustische Effekt wurde erstmals von Alexander Graham Bell im Jahre 1880 beschrieben (59). Bell führte Experimente durch, bei denen er einen Spiegel mit Sonnenlicht bestrahlte. Der durch Schallwellen zu Schwingungen angeregte Spiegel

konnte die Intensität des einfallenden Sonnenlichts modulieren. Dieses modulierte Sonnenlicht wurde auf eine Selenzelle fokussiert, deren elektrisches Leistungsvermögen mit der Intensität der Beleuchtung schwankt. Die Widerstandsänderung erzeugt ein elektrisches Signal, welches durch Lautsprecher wieder in Schall umgewandelt werden kann. Lange Zeit waren kaum Forschungen und technische Entwicklungen in diesem Bereich zu verzeichnen und erst mit Entwicklung der Lasertechnologie zur Erzeugung energiereicher Nanosekundenpulse in den 1960-Jahren erreichte die Optoakustik einen Aufschwung (60).

Die unter dem Namen der Optoakustik eingeführte Bildgebungsmodalität liefert durch die Kombination zweier Technologien entscheidende Vorteile gegenüber den rein akustischen und rein optischen Bildgebungsverfahren und zeichnet sich durch eine kontrastreiche Bildgebung und im Vergleich zu rein optischen Verfahren höhere Eindringtiefe in das Gewebe aus. Sie unterscheidet sich von der reinen Ultraschallbildgebung primär durch den Erzeugungsmechanismus der Ultraschallwellen. Während beim konventionellem Ultraschall eine akustische Welle in das zu untersuchende Gewebe gesendet und der reflektierte Signalanteil gemessen wird, ist die Quelle der Schallwellen bei der optoakustischen Bildgebung das Gewebe selbst. Die Entstehung der optoakustischen Signale basiert auf dem thermoelastischen Effekt (61, 62). Dieser beschreibt die Absorption elektromagnetischer Strahlung an Gewebestrukturen mit hohem Absorptionskoeffizienten und die Umwandlung in Wärme. Findet dies auf einer sehr kurzen Zeitskala statt, so führt diese Temperaturerhöhung zur lokalen Volumenausdehnung des Gewebes. Der dabei entstehende Überdruck breitet sich als Schallwelle aus und kann mittels entsprechender Sensoren aufgenommen und in ein elektrisches Signal umgewandelt werden (Abbildung 1). Dieses elektrische Signal wird verstärkt, digitalisiert und an einen Computer übermittelt (63). Um akustische Signale im hochfrequenten Bereich zu produzieren muss elektromagnetische Strahlung in gepulster Form verwendet werden (64).

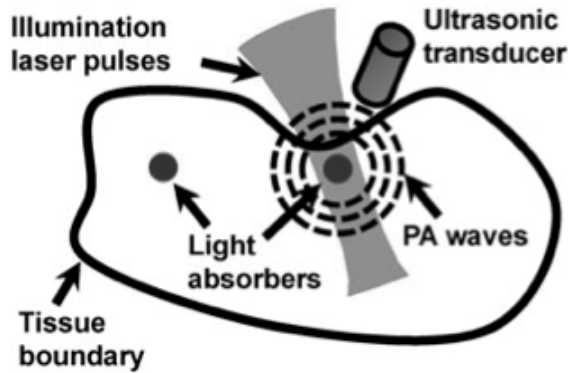


Abbildung 1: Darstellung des optoakustischen Effekts, als PA (photoacoustic waves) werden die entstehenden Ultraschallwellen bezeichnet (nach Yao J. und Wang L.V. (65))

Die optischen Eigenschaften des zu untersuchenden Gewebes und die für die Bildgebung gewählte Wellenlänge beeinflussen im Wesentlichen die Eindringtiefe des Lichtes in das Gewebe und den Kontrast der optoakustischen Bildgebung. Die Absorptionsspektren verschiedener in biologischem Gewebe vorkommender Chromophore sind in Abbildung 2 dargestellt. Der Absorptionskoeffizient von Melanin, Oxy- (HbO_2) und Desoxyhämoglobin (HHb) nimmt im nahen infraroten Spektralbereich (NIR) mit zunehmender Wellenlänge ab, wohingegen die Absorption des Wassers und des Fettes zunimmt (60, 64, 66, 67). Als „optisches Fenster“ wird der Wellenlängenbereich von 600 nm bis 1100 nm bezeichnet, der sich für die Untersuchung von Strukturen in größeren Tiefen eignet, da in diesem Bereich der Absorptionskoeffizient des Gewebes ein Minimum annimmt (Abbildung 2) (64, 68). Im Gegensatz dazu wird Licht im Bereich von 500 nm aufgrund der sehr hohen Absorption des Hämoglobins bereits in den oberen Hautschichten absorbiert, wobei jedoch aufgrund der Absorptionsmaxima der beprobten Gewebeschromophore optoakustische Signale mit hoher Amplitude entstehen. Für die Darstellung von oberflächennahen Gefäßen eignen sich daher vor allem Laserquellen in diesem Spektralbereich.

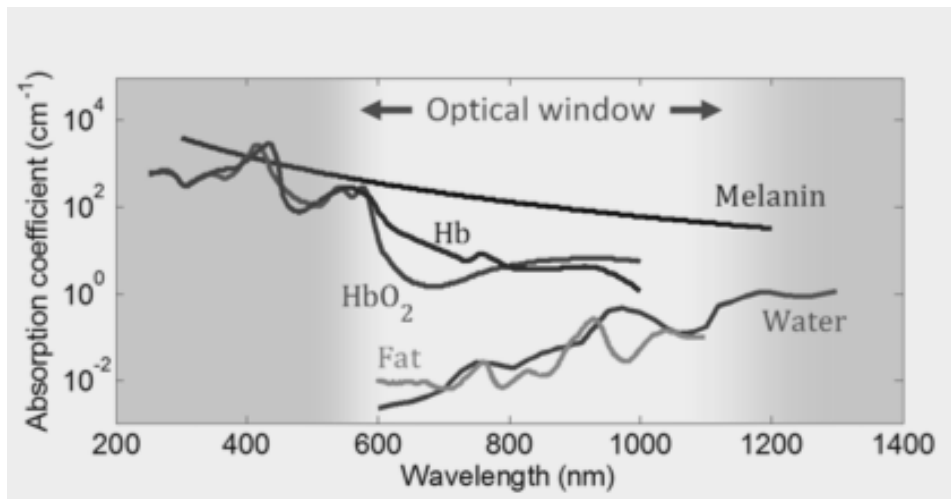


Abbildung 2: Absorptionsspektren verschiedener endogener Chromophore in Abhängigkeit von der Wellenlänge (nach S. Mallidi (64))

2.1.3. Aufbau des optoakustischen Messsystems

Für die Durchführung der optoakustischen Messungen wurde vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik IBMT in St. Ingbert ein System zur Verfügung gestellt, welches in Zusammenarbeit mit der Firma kibera (kibera GmbH, Saarbrücken) im Rahmen des europäischen Forschungsprojektes „SKINSPECTION“ entwickelt wurde.

Dieses hochauflösende System zur optoakustischen In-vivo-Bildgebung (Abbildung 3) besteht im Wesentlichen aus einem einelementigen, fokussierten Ultraschallwandler mit einer Mittenfrequenz von 35 MHz zur Erzeugung und Detektion akustischer Wellen, einer einkanaligen Ultraschallelektronik zur Digitalisierung der Ultraschallsignale und Kontrolle der Linearachsen, welche zur mechanischen Bewegung des Ultraschallwandlers in einem zweidimensionalen Raster notwendig sind, sowie einem Laser zur Erzeugung des optischen Lichtimpulses (532 nm). Des Weiteren gehören zu dem System ein Computer, ein handgehaltener Messkopf (Abbildung 4), in den sowohl der Wandler als auch die mechanische Verfahrereinheit integriert wurden, und eine speziell entwickelte Software zur Visualisierung der aufgenommenen Daten. Zur Gewährleistung der akustischen Kopplung ist der Wandler in ein mit Wasser gefülltes Becken integriert. Das Licht und der Schall werden durch eine dünne Polymerfolie übertragen, welche gleichermaßen das Wasserbecken verschließt. Die optischen Komponenten des Systems wurden gemäß der Norm EN 60825-1 untersucht und als Klasse 1 Laserprodukt klassifiziert. Die austretende Laserstrahlung ist

dementsprechend ungefährlich für Auge und Haut und es sind keine besonderen Sicherheitsmaßnahmen zu treffen. Das System ermöglicht eine Eindringtiefe in die Haut im Millimeterbereich bei einer lateralen Auflösung von weniger als 100 μm .



Abbildung 3: Hochauflösendes System zur optoakustischen In-vivo-Bildgebung (Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT)

2.1.4. Studiendesign für die vergleichende Untersuchung von Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden mit einem optoakustischen Bildgebungssystem

Für den Vergleich der Struktur der Gefäße wurden elf Psoriasis-Patienten und sechs gesunde Probanden mit dem optoakustischen Messsystem „SKINSPECTION“ untersucht. Die Messungen fanden auf der Tagesstation der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin statt. Die optoakustischen Untersuchungen der zwei Probandengruppen erfolgten unter standardisierten Bedingungen nach einer körperlichen Ruhezeit von mindestens 5 Minuten in liegender Position und bei einer Raumtemperatur von 20°C bis 24 °C.

Ziel des ersten Teils der Untersuchungen war die Bestimmung der Genauigkeit und der Reproduzierbarkeit der optoakustischen Messungen. Dabei wurden die Messungen zu Beginn in der Referenzgruppe mit sechs gesunden Probanden durchgeführt. Hierzu wurde nach Markierung eines definierten Hautareals am Unterarm (Messpunkt 5) der

Messkopf des optoakustischen Systems 6-mal aufgesetzt, die Messung durchgeführt, und wieder abgenommen. Nach jeder Messung wurde das benutzte Ultraschallgel entfernt, der Messkopf gereinigt und für die nächste Messung Ultraschallgel neu aufgetragen.

Des Weiteren wurden insgesamt sechs verschiedene Hautareale (Messpunkt 1 bis 6) am Unterarm untersucht (Tabelle 1).

Unterarm Beugeseite (proximal→distal)	Unterarm Streckseite (proximal→distal)
Messpunkt 1	Messpunkt 4
Messpunkt 2	Messpunkt 5
Messpunkt 3	Messpunkt 6

Tabelle 1: Messpunkte der Referenzgruppe (gesunde Probanden)

In der Probandengruppe mit elf Psoriasis-Patienten wurden mindestens zwei bis drei erkrankte Hautareale im Bereich der oberen oder unteren Extremitäten und jeweils ein benachbartes Areal der nicht erkrankten Haut untersucht.

Die Durchführung der Messungen erfolgte entsprechend des nachfolgend beschriebenen Untersuchungsprotokolls.

2.1.5. Untersuchungsprotokoll für die optoakustischen Messungen

Für die Durchführung der Messungen wurde zunächst eine etwa daumennagelgroße Menge Ultraschallgel auf das zu untersuchende Hautareal aufgetragen.

Nach Aufsetzen des Messkopfes auf die Haut wurde das Ultraschallgel leicht verstrichen, um eine möglichst gleichmäßig dicke Gelschicht zu erreichen. Mit dem Messkopf konnte eine maximale Hautoberfläche von 9,6 mm x 9,6 mm aufgenommen werden (Abbildung 4). Durch den Einsatz des fokussierenden Ultraschallwandlers und des damit verbundenen, limitierten axialen Fokusbereichs war die Einhaltung eines konstanten Abstandes zwischen dem Ultraschallwandler und der Hautoberfläche besonders wichtig. Für die Messung sollte daher der Messkopf möglichst waagrecht zur Hautoberfläche aufgesetzt werden. Für die Dauer der Messung von ca. 90 Sekunden sollten Bewegungsartefakte seitens des Probanden und des Untersuchers möglichst gering gehalten werden, da dies die Bildqualität entscheidend beeinflusst. Nach Abschluss der Messung erfolgte die Desinfektion des Messkopfes.



Abbildung 4: Messung eines Hautareals am Unterarm mit dem handgehaltenen Messkopf des optoakustischen Messsystems

2.1.6. Auswertung der Daten

Die Daten wurden an den im System integrierten Computer übermittelt und mittels einer speziell entwickelten Software visualisiert und analysiert. Dabei zeigte die Benutzeroberfläche (Abbildung 5) im linken Bild das Querschnittsbild in Empfangsrichtung (B-Scan) und in der rechten Programmoberfläche das Projektionsbild senkrecht zur Empfangsrichtung (C-Scan). Bedingt durch das freihändige Positionieren des Scankopfes und die Anatomie der Extremität war der Abstand der Hautoberfläche zum Ultraschallwandler über den Scanbereich hinweg oftmals nicht konstant, sondern variierte im Submillimeter-Bereich. Zur Darstellung der Gefäße war jedoch ein zur Hautoberfläche ausgerichtetes Projektionsbild notwendig. Daher wurde im ersten Schritt die Hautoberfläche automatisiert detektiert. Danach konnten parallel zur Hautoberfläche Projektionsbilder in unterschiedlichen Tiefen erstellt und hinsichtlich der sich dort befindlichen Gefäße ausgewertet werden. Es erfolgte die automatisierte Auswertung der Gefäßgröße und des durch die Gefäße eingenommen Rauminhalts im untersuchten Volumen. Für die quantitative Auswertung der aufgenommenen Daten wurden der mittlere Gefäßdurchmesser in Millimeter (mm) und die Volumeneinnahme

der Gefäße in Prozent (%) bestimmt und in einer Ergebnisdatei zur weiteren statistischen Auswertung gespeichert.

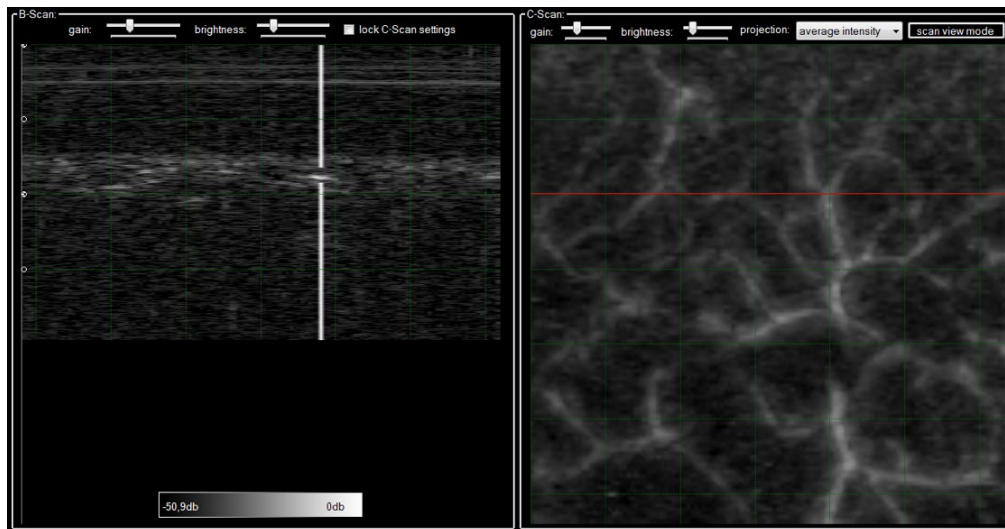


Abbildung 5: Offline Tool der speziell entwickelten Software zur Auswertung der Daten

2.1.7. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie - Charité Universitätsmedizin Berlin und mit Hilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 21.

In der Referenzgruppe, bestehend aus sechs gesunden Probanden, wurden an einem markierten Hautareal insgesamt sechs Messungen durchgeführt, um die Genauigkeit der Messungen zu überprüfen. Daraus wurden ein arithmetischer Mittelwert und die Standardabweichung der Werte berechnet. Aus den Einzelmesswerten der sechs verschiedenen Hautareale wurden ebenfalls Gesamtmittelwert, Standardabweichung und Medianwert berechnet.

In der Gruppe der elf Psoriasis-Patienten wurden zwei bis maximal drei läasionale Hautareale und jeweils ein benachbartes nichtläsionales Hautareal untersucht. Es wurden für die läsionalen und nichtläsionalen Hautareale jeweils der arithmetische Mittelwert, Standardabweichung und Medianwert berechnet.

Für die statistische Auswertung wurden nichtparametrische Testverfahren verwendet. Der Vergleich der Ergebnisse der Referenzgruppe mit den nichtläsionalen Hautarealen der Psoriasis-Patienten erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.

Für den Vergleich der Ergebnisse der läsionalen und nichtläsionalen Hautareale der Psoriasis-Patienten wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Boxplot-Diagrammen.

2.2. Konfokales Laserscan-Mikroskop

2.2.1. Probandenkollektiv

Die Untersuchung von Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden mit einem Laserscan-Mikroskop wurde ebenfalls im Bereich Hautphysiologie an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die Laserscan-Mikroskopie ist ein etabliertes, nichtinvasives und nebenwirkungsfreies Verfahren, für das ein bereits genehmigter Ethikantrag (EA/1/138/07) der Ethikkommission des Universitätsklinikums der Charité, Campus Mitte vorlag. Für die Teilnahme an der Studie galten folgende Einschlusskriterien: Alter der Probanden zwischen 18 und 75 Jahre, Aufklärung über Ziele und Wesen der Untersuchung, schriftliche Einverständniserklärung. Ausschlusskriterien waren: Kinder, Schwangere und stillende Frauen und Personen, die nicht eigenverantwortlich Entscheidungen treffen können.

Das Probandenkollektiv umfasste als Referenzgruppe sechs gesunde Probanden, die zum Zeitpunkt der Untersuchung gesund waren und in der Anamnese keine chronischen Hauterkrankungen angaben. Das Durchschnittsalter der gesunden Probanden lag bei 37,7 Jahren. Dabei handelte es sich um fünf weibliche Probanden und einen männlichen Probanden. Fünf Probanden der Referenzgruppe wiesen den Hauttyp I bis III nach Fitzpatrick (58) auf, ein Proband den Hauttyp V.

Das Kollektiv der Psoriasis-Patienten umfasste sechs Probanden, die sich in teilstationärer Behandlung der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Campus Charité befanden. Für die Messungen wurden Patienten mit Psoriasis vulgaris rekrutiert, deren Plaques bereits in Abheilung waren und kaum noch eine Schuppung aufwiesen. Dabei handelte es sich um drei weibliche und drei männliche Patienten. Das

Durchschnittsalter lag bei 47,8 Jahren. Fünf Psoriasis-Patienten wiesen den Hauttyp II bis III nach Fitzpatrick auf, ein Proband den Hauttyp V.

2.2.2. Grundprinzip der konfokalen Laserscan-Mikroskopie

Die konfokale Laserscan-Mikroskopie ist ein bereits etabliertes, nicht-invasives Untersuchungsverfahren für die Beurteilung von Gewebe. Mit der konfokalen Laserscan-Mikroskopie können mikroskopische Untersuchungen oberflächlicher Hautschichten in vivo und Echtzeit durchgeführt werden (69). Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie wird mit einer Auflichttechnik gearbeitet. Das bedeutet, dass die Haut von oben mit einem Laser beleuchtet wird und dünne optische Schnitte parallel zur Hautoberfläche erzeugt werden.

Das Grundprinzip der konfokalen Laserscan-Mikroskopie wurde erstmals 1955 von Marvin Minsky beschrieben und 1957 als Patent angemeldet. Ziel war die Untersuchung von neuronalen Verbänden im nicht fixierten Hirngewebe (70). Seine Bemühungen blieben mangels notwendiger intensiver Lichtquellen und leistungsstarker Computer zunächst lange Zeit unbeachtet. Mit der technischen Weiterentwicklung waren die ersten kommerziell verfügbaren Laserscan-Mikroskope etwa 30 Jahre später erhältlich.

Das technische Grundprinzip der konfokalen Laserscan-Mikroskopie basiert auf der Benutzung eines Lasers als Punktlichtquelle, der durch eine zwischengeschaltete Linse auf einen spezifischen Punkt innerhalb des Gewebes fokussiert wird. Von den Hautstrukturen reflektiertes Licht wird durch eine Lochblende geleitet und von einem Detektor erfasst. Die Punktlichtquelle, das zu untersuchende Gewebe und die Öffnung der Lochblende stehen konfokal zueinander, so dass nur das reflektierte Licht des innerhalb der konfokalen Ebene gelegenen Bereiches des Gewebes auf dem Detektor abgebildet wird (Abbildung 6).

Reflektiertes Licht außerhalb dieser Ebene wird herausgefiltert und dadurch eine hohe Auflösung erreicht. Durch den Einsatz der Lochblende kann dementsprechend nur ein bestimmter Bildpunkt dargestellt werden. Um das ganze Gewebe zu erfassen, muss die zu untersuchende Ebene abgerastert werden. Die einzelnen Punkte der zu

untersuchenden Ebene werden durch den Computer zu einem kompletten Bild zusammengefügt (71, 72).

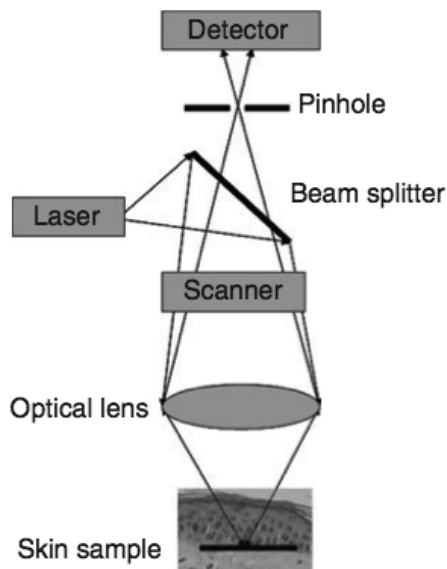


Abbildung 6: Grundprinzip der konfokalen Laserscan-Mikroskopie (nach Kang et al.(73)). Die reflektierten Lichtstrahlen treffen durch die Lochblende (engl. pinhole) auf den Detektor.

Die Bildgebung basiert auf der Reflexion und Streuung der einzelnen Hautschichten und Zellstrukturen und ist abhängig von den Brechungsindices. Der Brechungsindex beschreibt eine optische Materialeigenschaft. Beim Übergang zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices wird Licht gebrochen und reflektiert. Je höher der Unterschied der Brechungsindices der einzelnen Hautstrukturen, desto stärker ist der Kontrast in der Bildgebung. So haben zum Beispiel Melanin und Keratin einen hohen Brechungsindex und erzeugen einen hellen Kontrast (74, 75).

Die hohe laterale Auflösung der konfokalen Laserscan-Mikroskopie von $0,5 \mu\text{m}$ bis $1 \mu\text{m}$ ermöglicht eine Darstellung bis in den zellulären Bereich, geht aber mit einer limitierten Eindringtiefe von $250 \mu\text{m}$ bis $300 \mu\text{m}$ in die Haut einher. Die axiale Auflösung, also die Schichtdicke, liegt bei $3 \mu\text{m}$ bis $5 \mu\text{m}$ (76, 77). Mit zunehmender Wellenlänge des Lasers nimmt die Eindringtiefe, bei abnehmender Auflösung, zu. Die Eindringtiefe in die Haut ist des Weiteren abhängig von der Laserleistung, den Reflektionseigenschaften der oberen Hautschichten und den Streuungseigenschaften der Dermis (78).

Im Gegensatz zur konfokalen Reflektanz-Laserscan-Mikroskopie werden bei der konfokalen Fluoreszenz-Laserscan-Mikroskopie Fluoreszenzsignale durch externe Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe gebildet und gemessen.

Für die Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffe wie zum Beispiel Natriumfluoreszin, Indocyangrün oder Methylenblau ist die Verwendung einer Laserquelle mit einer definierten Wellenlänge erforderlich (79, 80).

2.2.3. Aufbau eines konfokalen Laserscan-Mikroskops

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde das VivaScope® 1500 Multilaser (Caliber I.D., Andover, Massachusetts, USA) verwendet (siehe Abbildung 7). Mit diesem Gerät werden reflektierende und fluoreszierende konfokale Laserscan-Mikroskopie miteinander kombiniert. Durch die Multilaser-Funktion steht Licht der Wellenlänge 785 nm, 658 nm und 488 nm zur Verfügung und es können verschiedene Gewebeaspekte in vivo untersucht werden (81).

Ein konfokales Laserscan-Mikroskop besteht aus einem mobilen Gerätewagen mit der Laser-Einheit, die an einem schwenkbaren Arm montiert ist. Des Weiteren gehören zu dem System ein PC und Monitor. Für makroskopische Betrachtungen ist eine Kamera (VivaCam®) an das System angeschlossen. Diese ermöglicht die Aufnahme von digitalen Bildern der Hautoberfläche. Mit der Software VivaScan® können die Daten der Patienten verwaltet und archiviert werden. Mit den entsprechenden Funktionen können Hautareale in der x-y-Ebene (VivaBlock®) und entlang der z-Achse (VivaStack®) abgetastet werden.

Mittels der VivaBlock® Funktion kann innerhalb einer Ebene eine Hautschicht von maximal 8 mm x 8 mm gescannt werden. Die dabei entstehenden Einzelaufnahmen haben eine Größe von 500 µm x 500 µm. Die VivaStack® Funktion ist wie eine optische Stanzbiopsie zu verstehen. In einem bestimmten Hautareal können verschiedene Hauttiefen untersucht werden. Die Dicke der Hautschichten kann über die Software eingegeben werden.



Abbildung 7: VivaScope® 1500 Wavelength: 488 / 658/ 785 nm (Caliber I.D., Andover, Massachusetts, USA)

2.2.4. Studiendesign für die vergleichende Untersuchung von Psoriasis-Patienten und gesunden Probanden mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop

Zunächst wurden sechs gesunde Probanden als Referenzgruppe untersucht. Dazu wurde je Proband ein Hautareal am Unterarm ausgewählt und fünf verschiedene Bereiche in diesem Hautareal entlang der z-Achse bis in die Ebene des Stratum papillare gescannt.

In der Gruppe der Psoriasis-Patienten wurden jeweils ein nicht befallenes Hautareal und ein erkranktes Hautareal ohne wesentliche Schuppung am Unterarm untersucht. Entsprechend der Messungen an gesunden Probanden wurden auch bei den Psoriasis-Patienten fünf verschiedene Bereiche entlang der z-Achse bis in die Ebene des Stratum papillare in diesem Hautareal gescannt.

2.2.5. Untersuchungsprotokoll für die Messungen mit dem Laserscan-Mikroskop

Für die Durchführung der Messungen wurde ein wiederverwendbarer Haltering aus Edelstahl mit einem durchsichtigen, doppelseitigen Klebeplastikfenster auf das zu untersuchende Hautareal fixiert. Dazu wurde auf das Klebeplastikfenster ein Tropfen Öl (Crodamol-Öl) aufgetragen und der Haltering kurz angepresst. Es erfolgte zunächst eine makroskopische Aufnahme des Hautareals. Hierzu wurde die VivaCam®, welche an das Vivascope® gekoppelt ist auf den Haltering aufgesetzt. Damit konnte eine Bildfläche von 10 mm betrachtet werden und für die folgenden Untersuchungen spezifische Hautabschnitte zur mikroskopischen Betrachtung ausgewählt werden. Anschließend wurde auf die Innenseite des Halterings Ultraschallgel aufgetragen und das Objektiv auf dem Metallring eingerastet (Abbildung 8). Vor Beginn der Untersuchungen wurde der Filter am Vivascope® auf Reflektion eingestellt und die Wellenlänge des Lasers zu 785 nm gewählt. Der Laser wurde über den Rechner gestartet. Zunächst wurde eine Oberfläche definiert, von der ausgehend in vertikaler Richtung unterschiedliche Ebenen untersucht wurden. Dazu wurde die Oberfläche des Stratum corneum als Nullpunkt festgelegt. In dieser Ebene konnte ein Hautbereich ausgewählt und mittels der VivaBlock®-Funktion durch Verschiebung des Lasers in der x-y-Ebene ein Areal von 4 mm x 4 mm gescannt werden. Aus den dabei entstandenen 64 Einzelaufnahmen mit einer Größe von jeweils 500 µm x 500 µm konnte mittels der VivaStack®-Funktion entlang der z-Achse in auswählbaren Tiefenabständen (z.B. 1,5 µm oder 3,0 µm) bis in das Stratum papillare gescannt werden. Nach Abschluss der Untersuchung erfolgten die Entfernung des Halteringes und die Desinfektion von Haut und Haltering.

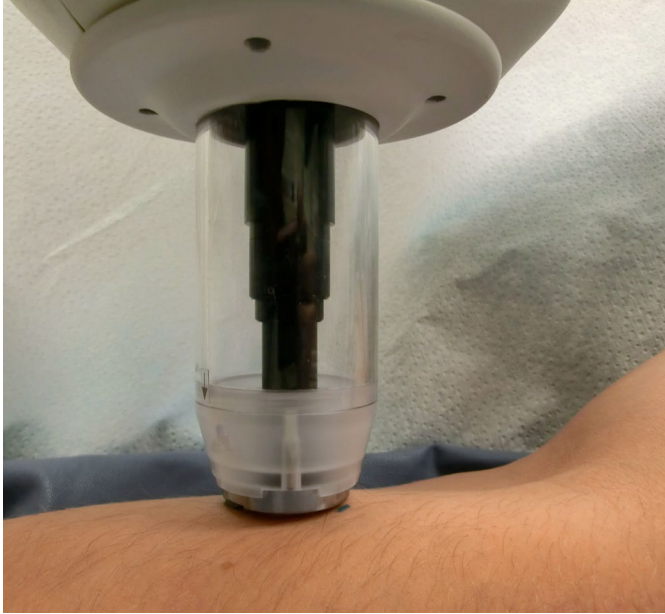


Abbildung 8: Messung eines Hautareals mit dem Laserscan-Mikroskop

2.2.6. Auswertung der Daten

Es wurden bei allen Probanden in einem ausgewählten Hautareal durch Scannen in der x-y-Ebene fünf Einzelbilder auf Höhe des Stratum corneum aufgenommen. Von diesen fünf verschiedenen Bereichen eines Hautareals wurde mittels der oben beschriebenen VivaStack®-Funktion entlang der z-Achse bis in das Stratum papillare gescannt.

In den entsprechenden Aufnahmen auf Höhe des Stratum papillare wurden alle Papillen bezogen auf einen Bildausschnitt von 500 μm x 500 μm gezählt und in ihrem Maximaldurchmesser gemessen. Dazu wurde ein aus Basalzellen und Melanozyten bestehender Randsaum einbezogen. Die Messung der Durchmesser erfolgte mit der speziell entwickelten Software VivaScan®. In diesem Programm konnte direkt an dem aufgenommenen Bild der Durchmesser bestimmt und dokumentiert werden.

2.2.7. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie - Charité Universitätsmedizin Berlin und mit Hilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 21.

Es wurde zunächst für jeden gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung aller gemessenen

Papillendurchmesser der fünf verschiedenen Bildausschnitte von jeweils 500 μm x 500 μm pro Hautareal erfasst.

Die statistische Auswertung erfolgte mit nichtparametrischen Testverfahren. Für den Vergleich der Papillendurchmesser von gesunden Probanden mit nichtläsionalen Hautarealen der Psoriasis-Patienten wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet.

Für den Vergleich der Papillendurchmesser in läsionaler Haut und nichtläsionaler Haut der Psoriasis-Patienten wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Für die grafische Darstellung wurden Boxplot-Diagramme ausgewählt.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Methoden der optoakustischen Bildgebung und der konfokalen Laserscan-Mikroskopie bezüglich der Verwendung zur Verlaufskontrolle der Psoriasis.

Die Optoakustik ist ein innovatives, nichtinvasives und hochauflösendes bildgebendes Verfahren und ist besonders zur Darstellung der Vaskularisierung der Haut geeignet. Es ermöglicht die Bestimmung des mittleren Gefäßdurchmessers in Millimetern (mm) und der Volumeneinnahme der Gefäße in Prozent (%) in einem Hautareal. Ziel der ersten Untersuchungen war die Bestimmung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen. Hierzu wurden an gesunden Probanden sechs wiederholte Messungen an einem markierten Hautareal durchgeführt, wobei vor jeder Messung der Messkopf neu positioniert wurde. Des Weiteren wurden insgesamt sechs verschiedene Hautareale am Unterarm gemessen.

Anschließend erfolgten die Messungen an Psoriasis-Patienten. Dazu wurden läsionale und nichtläsionale Hautareale untersucht.

Die konfokale Laserscan-Mikroskopie ist ein bereits etabliertes Verfahren und ermöglicht die nichtinvasive Untersuchung der Haut in Echtzeit. Im Gegensatz zur herkömmlichen Histologie erfolgt die Betrachtung der einzelnen Hautschichten horizontal zur Hautoberfläche. Für die Untersuchungen wurden die Durchmesser der dermalen Papillen von gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten bestimmt.

3.1. Optoakustisches Bildgebungssystem „SKINSPECTION“

3.1.1. Allgemeine Beobachtungen

Die Untersuchungen mit dem optoakustischen Bildgebungssystem zeigten Gefäßnetzwerke der entsprechenden Hautareale parallel zur Hautoberfläche. Die rein visuelle Auswertung, ohne quantitative Messungen, zeigte keinen wesentlichen Unterschied zwischen den gesunden Probanden (Abbildung 9a) und den nichtläsionalen (Abbildung 9b) und läsionalen Arealen (Abbildung 9c) der Psoriasis-Patienten.

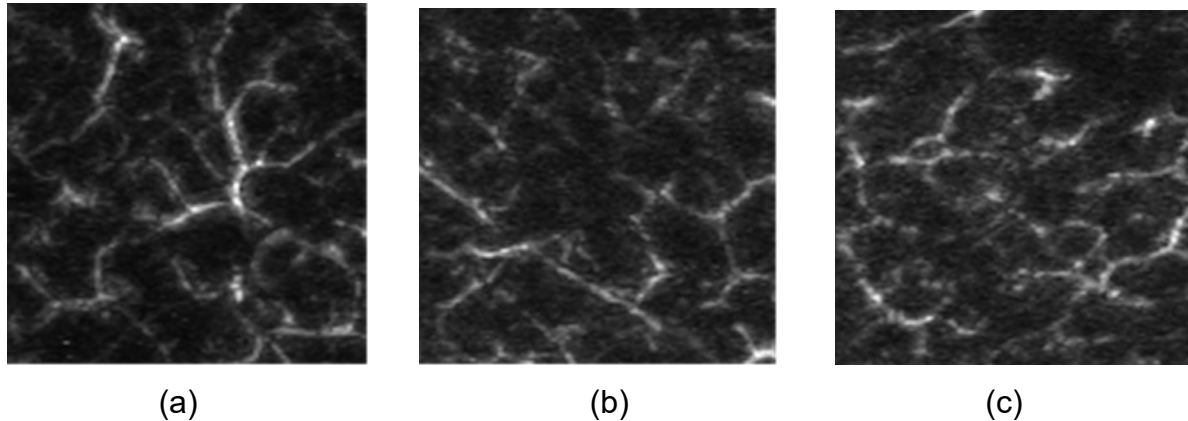


Abbildung 9 (a-c): jeweils 9,6 mm x 9,6 mm Hautareal eines gesunden Probanden **(a)**, nichtläsionales Areal eines Psoriasis-Patienten **(b)**, läsionales Hautareal eines Psoriasis-Patienten **(c)**, optoakustisches Bildgebungssystem

3.1.2. Daten der gesunden Probanden

In den Tabellen 2 bis 7 sind die Ergebnisse der sechs wiederholten Messungen an einem markierten Hautareal am Unterarm der gesunden Probanden (Proband 1-6) dargestellt (Messpunkt 5, Messung 1 bis 6, siehe auch Tabelle 1). Für jeden Probanden wurde als Maß für die Streuung um den Mittelwert die Standardabweichung berechnet.

Proband 1 (Tabelle 2) und Proband 4 (Tabelle 5) zeigten eine geringe Schwankung der Werte um den arithmetischen Mittelwert. Bei Proband 2 (Tabelle 3) und Proband 3 (Tabelle 4) ergab sich eine relative hohe Streuung der Messwerte des mittleren Gefäßdurchmessers. Proband 5 (Tabelle 6) zeigte eine erhöhte Streuung der Volumeneinnahme der Gefäße und Proband 6 (Tabelle 7) eine erhöhte Streuung der Werte des mittleren Gefäßdurchmessers.

Messpunkt/ Messung	Mittlerer Gefäßdurchmesser in mm	Volumeneinnahme der Gefäße in %
5/ 1	0,178	17,969
5/ 2	0,166	20,447
5/ 3	0,165	19,696
5/ 4	0,160	18,353
5/ 5	0,158	19,458
5/ 6	0,163	21,6
MW	0,165	19,587
SD	0,006	1,222

Tabelle 2: Messwerte Proband 1, optoakustisches System

Messpunkt/ Messung	Mittlerer Gefäßdurchmesser in mm	Volumeneinnahme der Gefäße in %
5/ 1	0,161	17,236
5/ 2	0,235	17,517
5/ 3	0,132	19,561
5/ 4	0,195	21,564
5/ 5	0,251	17,773
5/ 6	0,132	17,328
MW	0,184	18,497
SD	0,047	1,580

Tabelle 3: Messwerte Proband 2, optoakustisches System

Messpunkt/ Messung	Mittlerer Gefäßdurchmesser in mm	Volumeneinnahme der Gefäße in %
5/ 1	0,163	14,02
5/ 2	0,167	15,65
5/ 3	0,159	13,861
5/ 4	0,131	11,145
5/ 5	0,241	11,066
5/ 6	0,23	15,186
MW	0,182	13,488
SD	0,04	1,795

Tabelle 4: Messwerte Proband 3, optoakustisches System

Messpunkt/ Messung	Mittlerer Gefäßdurchmesser in mm	Volumeneinnahme der Gefäße in %
5/ 1	0,175	15,277
5/ 2	0,177	19,482
5/ 3	0,207	19,531
5/ 4	0,196	20,145
5/ 5	0,176	20,416
5/ 6	0,178	18,622
MW	0,185	18,912
SD	0,012	1,722

Tabelle 5: Messwerte Proband 4, optoakustisches System

Messpunkt/ Messung	Mittlerer Gefäßdurchmesser in mm	Volumeneinnahme der Gefäße in %
5/ 1	0,175	19,269
5/ 2	0,158	16,968
5/ 3	0,158	20,96
5/ 4	0,178	15,057
5/ 5	0,165	23,48
5/ 6	0,135	19,861
MW	0,162	19,266
SD	0,014	2,707

Tabelle 6: Messwerte Proband 5, optoakustisches System

Messpunkt/ Messung	Mittlerer Gefäßdurchmesser in mm	Volumeneinnahme der Gefäße in %
5/ 1	0,132	20,697
5/ 2	0,133	23,029
5/ 3	0,191	24,155
5/ 4	0,132	19,983
5/ 5	0,133	23,224
5/ 6	0,131	24,512
MW	0,142	22,6
SD	0,022	1,689

Tabelle 7: Messwerte Proband 6, optoakustisches System

Neben den oben dargestellten wiederholten Messungen, wurde pro gesundem Proband an sechs verschiedenen Hautarealen am Unterarm der mittlere Gefäßdurchmesser in Millimetern (mm) und die Volumeneinnahme in Prozent (%) bestimmt. In den Tabellen 8 und 9 sind die Mittelwerte aus diesen Messungen dargestellt.

Proband	MW mittlerer Gefäßdurchmesser (mm)
1	0,227
2	0,258
3	0,241
4	0,243
5	0,200
6	0,203

Tabelle 8: Mittelwerte (MW) der mittleren Gefäßdurchmesser aus den Messungen von 6 verschiedenen Hautarealen am Unterarm gesunder Probanden, optoakustische Bildgebung

Proband	MW Volumeneinnahme der Gefäße (%)
1	23,492
2	23,012
3	20,290
4	23,497
5	23,414
6	20,662

Tabelle 9: Mittelwerte (MW) der Volumeneinnahme der Gefäße aus den Messungen von 6 verschiedenen Hautarealen am Unterarm gesunder Probanden, optoakustische Bildgebung

Der Gesamtmittelwert der mittleren Gefäßdurchmesser (Tabelle 8) der Probanden 1-6 lag bei $0,229 \pm 0,023$ mm (Median 0,234 mm) und die Volumeneinnahme der Gefäße (Tabelle 9) bei $22,395 \pm 1,501$ % (Median 23,213 %).

3.1.3. Daten der Psoriasis-Patienten

Die Messungen an Psoriasis-Patienten wurden an mindestens zwei bis maximal drei läSIONALen Hautarealen und jeweils einem benachbarten nichtläSIONALen Areal durchgeführt. Die Mittelwerte des Gefäßdurchmessers und der Volumeneinnahme der Gefäße der einzelnen Psoriasis-Patienten sind in den Tabellen 10 und 11 aufgeführt.

Proband	MW mittlerer Gefäßdurchmesser in mm	
	nichtläsionales Areal	läsionales Areal
7	0,287	0,178
8	0,163	0,131
9	0,262	0,146
10	0,178	0,178
11	0,206	0,176
12	0,171	0,155
13	0,208	0,268
14	0,244	0,224
15	0,262	0,239
16	0,254	0,261
17	0,242	0,250

Tabelle 10: Mittelwerte (MW) des mittleren Gefäßdurchmessers in nichtläsionalen und läsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten, optoakustische Bildgebung

Proband	MW Volumeneinnahme der Gefäße in %	
	nichtläsionales Areal	läsionales Areal
7	34,924	11,871
8	20,289	14,960
9	22,193	21,609
10	17,847	19,257
11	22,186	13,196
12	23,294	31,720
13	24,683	24,986
14	30,967	27,134
15	23,078	32,828
16	25,285	25,281
17	22,748	27,448

Tabelle 11: Mittelwert (MW) der Volumeneinnahme der Gefäße in nichtläsionalen und läsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten, optoakustische Bildgebung

Der Gesamtmittelwert des mittleren Gefäßdurchmessers aller 11 Psoriasis-Patienten in den nichtläsionalen Hautarealen lag bei $0,225 \pm 0,042$ mm (Median 0,242 mm), in den läsionalen Hautarealen bei $0,201 \pm 0,049$ mm (Median 0,178 mm).

Die Messungen ergaben in den nichtläsionalen Hautarealen einen Gesamtmittelwert der Volumeneinnahme der Gefäße von $24,318 \pm 4,796$ % (Median 23,078%) und in den läsionalen Arealen einen Gesamtmittelwert von $22,754 \pm 7,201$ % (Median 24,986 %).

3.1.4. Vergleich der Ergebnisse von gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten

Der Vergleich der mittleren Gefäßdurchmesser in der Haut gesunder Probanden (Median 0,234 mm) mit nichtläsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten (Median 0,242 mm) ergab keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 10). Die Volumeneinnahme der Gefäße gesunder Probanden (Median 23,213 %) im Vergleich zu den nichtläsionalen Arealen der Psoriasis-Patienten (Median 23,078 %) zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 11).

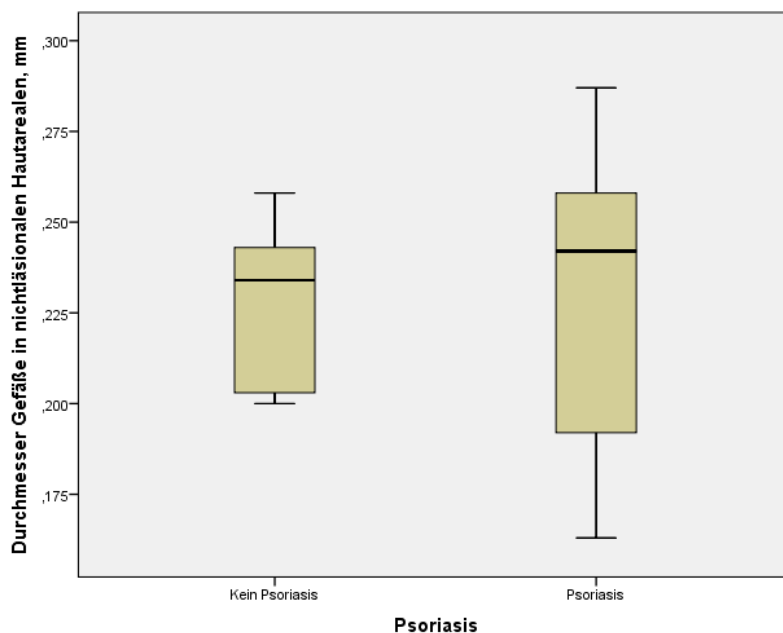


Abbildung 10: Durchmesser der Gefäße in mm in nichtläsionalen Hautarealen bei gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten

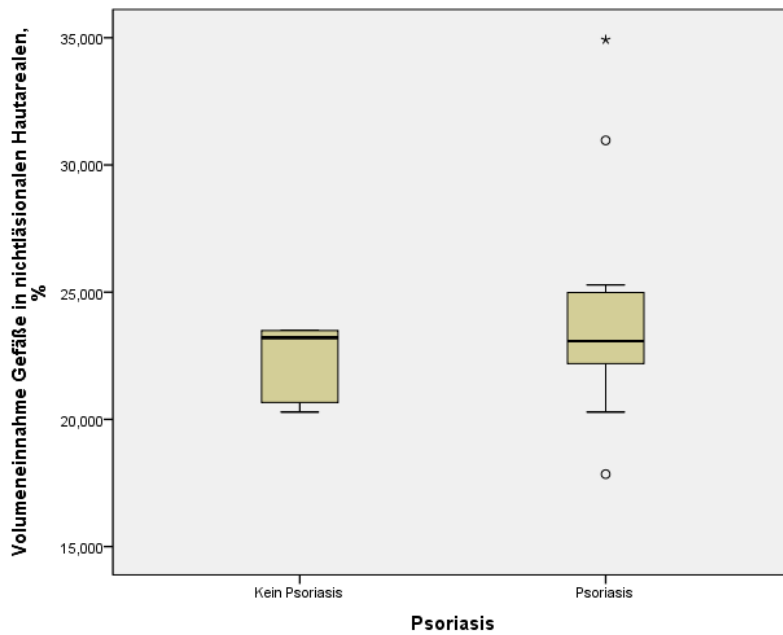


Abbildung 11: Volumeneinnahme der Gefäße in % in nichtläsionalen Hautarealen bei gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten

Der Vergleich der mittleren Gefäßdurchmesser der läsionalen (Median 0,178 mm) mit nichtläsionalen Hautarealen (Median 0,242 mm) von Psoriasis-Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 12). Ebenso verhielt es sich mit der Volumeneinnahme der Gefäße. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den läsionalen (Median 24,986 %) und nichtläsionalen Hautarealen (Median 23,078 %) der Psoriasis-Patienten (Abbildung 13).

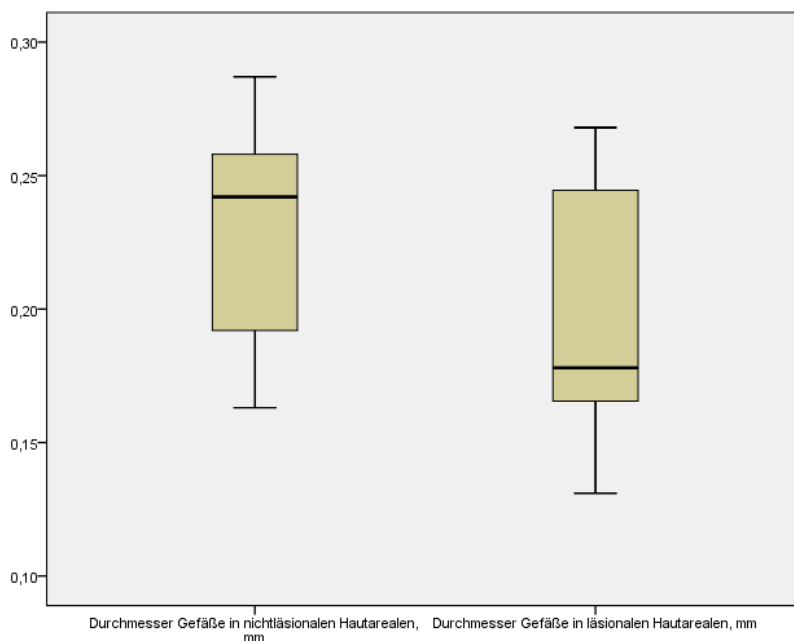


Abbildung 12: Durchmesser der Gefäße in mm bei Psoriasis-Patienten

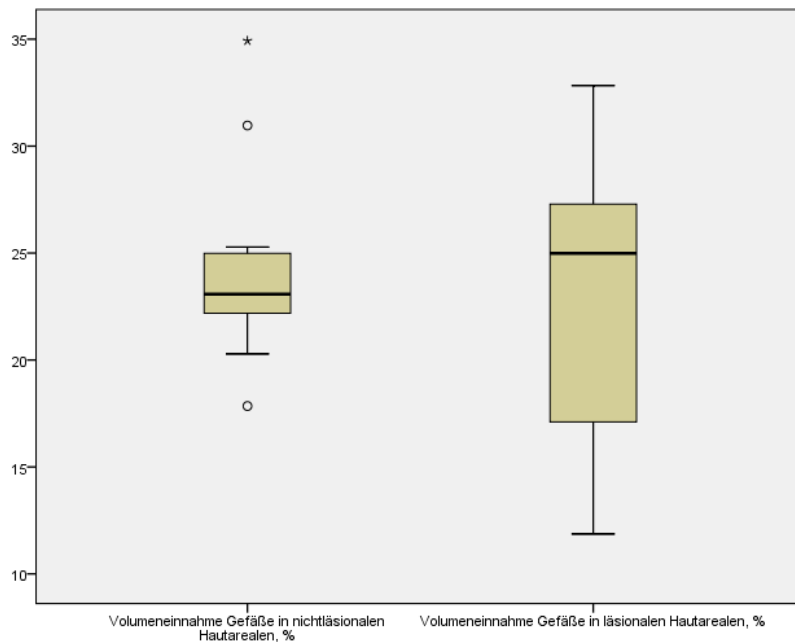


Abbildung 13: Volumeneinnahme der Gefäße in % bei Psoriasis-Patienten

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass mit dem verwendeten optoakustischen Bildgebungssystem „SKINSPECTION“ weder zwischen gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten, noch zwischen läsionalen und nichtläsionalen Hautarealen der Psoriasis-Patienten signifikante Unterschiede des Gefäßsystems der Haut dargestellt werden konnten.

3.2. Konfokale Laserscan-Mikroskopie

3.2.1. Allgemeine Beobachtungen

Die Untersuchung der gesunden Haut mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop begann in der obersten Hautschicht mit dem Stratum corneum. Die aus Korneozyten bestehenden Zellverbände erschienen durch den Brechungsindex von Keratin weiß und waren durch schwarz erscheinende Furchen unterbrochen, die den Begrenzungen der Felderhaut entsprachen. Die polygonalen, kernlosen Korneozyten haben eine Größe von etwa 20 μm bis 30 μm . Die nächste Schicht ist das aus wenigen Zelllagen bestehende Stratum granulosum mit zellkernhaltigen Zellen mit einer Größe von 20 μm bis 30 μm . Das Stratum spinosum besteht aus kleineren, polygonalen Zellen und erschien durch deren Anordnung wabenartig. Das folgende Stratum basale und Stratum

papillare zeigten überlappende Übergänge zwischen Epidermis und Dermis. Je weiter die Betrachtung in die Tiefe ging, um so mehr erschienen die dermalen Papillen als dunkle Areale, die von einem hellen Ring aus Basalzellen (Melanozyten und pigmentierten Keratinozyten) umgeben sind (Abbildung 14a). In den Papillenspitzen waren oberflächliche Kapillargefäße zu sehen, vereinzelt mit fließenden Erythrozyten oder Leukozyten.

Die Untersuchung der läSIONalen Areale der Psoriasis-Patienten wies eine starke Verdickung des Stratum corneum (Hyperkeratose) nach. Insgesamt wirkte die Epidermis als Ausdruck der Akanthose verdickt. Die dermalen Papillen erschienen deutlich erweitert (Papillomatose) und die Kapillarschlingen innerhalb der Papillen zeigten ein vergrößertes Gefäßlumen mit meist sichtbarem Blutfluss. Am mehrfachen Anschnitt der Gefäße war eine verstärkte Windung der Kapillaren zu erkennen (Abbildung 14c).

Die nichtläSIONalen Areale der Psoriasis-Patienten zeigten in der visuellen Beurteilung keine wesentliche Verbreiterung der dermalen Papillen (Abbildung 14b).

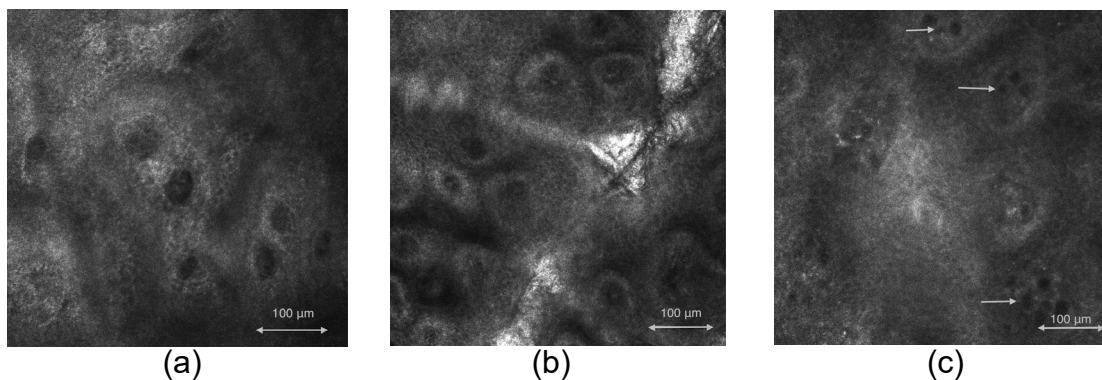


Abbildung 14 (a-c): Konfokales Bild der dermalen Papillen bei einem gesunden Probanden (a), einem nichtläSIONalem Hautareal (b) und einem läSIONalen Areal eines Patienten mit Psoriasis vulgaris (c) mit verstärkt gewundenen Kapillaren (Pfeile)

3.2.2. Daten der gesunden Probanden

Die Messungen wurden an insgesamt sechs Probanden durchgeführt. An jeweils fünf Hautarealen mit einer Größe von 500 µm x 500 µm wurden auf Höhe des Stratum papillare alle eindeutig abgrenzbaren dermalen Papillen detektiert und der maximale Außendurchmesser bestimmt. In Tabelle 12 werden für die einzelnen Probanden die

Anzahl der Papillen, der arithmetische Mittelwert (MW) der Papillendurchmesser und die Standardabweichung (SD) dargestellt.

Proband	Papillenzahl	MW Papillen (mm)	SD (mm)
18	18	0,070	0,019
19	17	0,069	0,006
20	18	0,074	0,013
21	15	0,084	0,014
22	34	0,070	0,021
23	20	0,079	0,021

Tabelle 12: Messwerte der gesunden Probanden, konfokale Laserscan-Mikroskopie

3.2.3. Daten der Psoriasis-Patienten

Die für die gesunden Probanden erhobenen Parameter wurden ebenfalls für die Psoriasis-Patienten bestimmt. Entsprechend sind in Tabelle 13 Papillenzahl, Mittelwert (MW) der Papillendurchmesser und Standardabweichung (SD) der nichtläsionalen Hautareale dokumentiert. Tabelle 14 gibt die Ergebnisse für die läsionalen Hautareale wieder.

Proband	Papillenzahl	MW Papillen (mm)	SD (mm)
24	13	0,077	0,023
25	41	0,080	0,013
26	20	0,076	0,012
27	19	0,075	0,013
28	36	0,087	0,016
29	19	0,082	0,012

Tabelle 13: Messwerte der Psoriasis-Patienten, nichtläsionale Hautareale, konfokale Laserscan-Mikroskopie

Proband	Papillenzahl	MW Papillen (mm)	SD (mm)
24	18	0,122	0,023
25	21	0,094	0,012
26	15	0,109	0,014
27	22	0,127	0,025
28	21	0,121	0,018
29	21	0,112	0,024

Tabelle 14: Messwerte der Psoriasis-Patienten, läsionale Hautareale, konfokale Laserscan-Mikroskopie

3.2.4. Vergleich der Ergebnisse von gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten

Die maximalen Außendurchmesser aller eindeutig identifizierbaren dermalen Papillen in der Haut gesunder Probanden und läsionalen und nichtläsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten wurden gemessen.

Der Gesamtmittelwert aller Papillendurchmesser in der Haut gesunder Probanden betrug $0,074 \pm 0,006$ mm. In den nichtläsionalen Hautarealen der Psoriasis-Patienten betrug der Gesamtmittelwert der Papillendurchmesser $0,079 \pm 0,005$ mm und in den läsionalen Hautarealen $0,114 \pm 0,012$ mm.

Wie in Abbildung 15 erkennbar, zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Papillendurchmesser in der Haut von gesunden Probanden (Median 0,072 mm) im Vergleich zu nichtläsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten (Median 0,079 mm).

Die Ergebnisse der Messungen an Psoriasis-Patienten sind in Abbildung 16 dargestellt. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p= 0,028$) zwischen den Durchmessern der dermalen Papillen der nichtläsionalen Hautareale (Median 0,079 mm) im Vergleich zu den läsionalen Hautarealen (Median 0,116 mm).

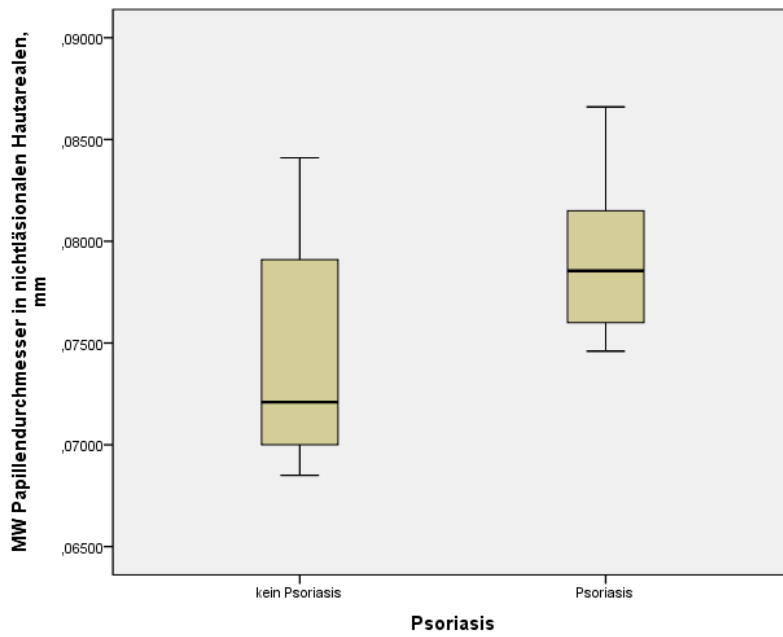


Abbildung 15: Papillendurchmesser in mm bei gesunden Probanden und in nichtläsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten

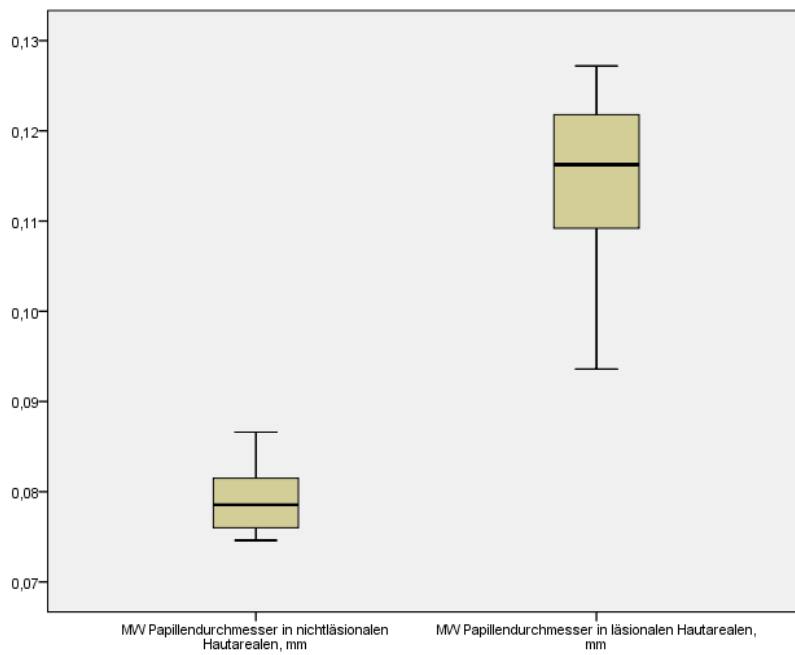


Abbildung 16: Papillendurchmesser in mm in nichtläsionalen und läsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten

4. Diskussion

4.1. Optoakustisches Bildgebungssystem „SKINSPECTION“

Bereits frühere Untersuchungen zeigten die Bedeutung der Gefäßveränderungen für die Pathogenese und den Verlauf der Psoriasis (5). Diese sind im Gegensatz zu Kapillarschlingen gesunder Haut gewunden, erweitert und elongiert und verlieren ihre typische Haarnadelform (4, 5). Persistierende Kapillarveränderungen begünstigen vermutlich trotz oberflächlicher Abheilung der Hautläsionen das Auftreten eines Rezidivs (82, 83). In dieser Studie sollten mit dem Prototyp eines optoakustischen Systems der mittlere Gefäßdurchmesser in Millimeter und die Volumeneinnahme der Gefäße in Prozent in einem maximalen Hautareal von 9,6 mm x 9,6 mm dargestellt werden. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass optoakustische Systeme besonders zur In-vivo-Darstellung von Hautgefäßen geeignet sind (14, 15). Überraschenderweise zeigten sich in den Untersuchungen mit dem optoakustischen System keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Messsignalen. Das ist umso verwunderlicher, da zu Beginn der Untersuchung eine hohe Reproduzierbarkeit der Messmethode demonstriert wurde.

Die Tatsache, dass der mittlere Gefäßdurchmesser als auch das Blutgefäßvolumen bei der gesunden und pathologischen Haut der Patienten ähnlich waren, lässt darauf schließen, dass die pathologischen Veränderungen der Gefäßstruktur nicht im gesamten untersuchten Volumen vorliegen, sondern lediglich an den Kapillarschlingen direkt unterhalb der Haut. Dieses relevante Volumenelement ist sehr klein im Verhältnis zum gesamten gemessenen Hautvolumen, welches sich bis in den Millimeterbereich in die Tiefe erstreckt. Daher waren selbst größere Veränderungen in diesem kleinen Volumenelement nicht nachweisbar. Mit einer lateralen Auflösung von weniger als 100 µm war das hier verwendete optoakustische Messsystem nicht ausreichend, um kapilläre Veränderungen darzustellen.

Aguirre et al. konnten in einer Studie an Psoriasis Patienten zeigen, dass die Ultra-Breitband Rasterscan-optoakustische Mesoskopie (UB-RSOM) geeignet ist, Kapillarveränderungen in psoriatischer Haut nachzuweisen. Wenn der dabei verwendete Wandler einen Frequenzbereich zwischen 10 und 180 MHz abdeckt,

können Strukturen unterhalb 15 μm dargestellt und damit gewundene und dilatierte Kapillaren in psoriatischer Haut detektiert werden (84).

Eine Limitation der Optoakustik bleibt jedoch, dass der Ausgleich von variierenden Lichtfluenzen im Gewebe noch nicht ausreichend gelöst ist. Die optoakustische Signalstärke ist proportional zur Absorption im Gewebe und der Fluenz. Variierende Fluenzen können Signale von tiefer liegendem Gewebe abschwächen und damit tiefer liegende Strukturen verdecken (85). Zudem stellen die sehr hohen Materialkosten einen Nachteil dar.

4.2. Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Eine Dilatation der Kapillaren in psoriatischer Haut geht meist mit einer Verbreiterung dermalen Papillen einher. Bisher gibt es jedoch nur wenige Untersuchungen über den Zusammenhang von Papillendurchmesser und Krankheitsverlauf. Die Untersuchungen, welche im zweiten Teil dieser Studie mithilfe der Laserscan-Mikroskopie durchgeführt wurden, zeigten signifikante Unterschiede der Papillendurchmesser zwischen läsionalen ($0,114 \pm 0,012 \text{ mm}$) und nichtläsionalen ($0,079 \pm 0,005 \text{ mm}$) Hautarealen von Psoriasis-Patienten sehr eindrucksvoll. Dagegen konnte kein Unterschied der Papillendurchmesser zwischen der Haut von gesunden Probanden und nichtläsionalen Hautarealen von Psoriasis-Patienten festgestellt werden. In einer Studie von Suihko und Serup wurden an 12 Psoriasis-Patienten ähnliche papilläre Durchmesser in nichtläsionalen Arealen ($62 \pm 10,64 \mu\text{m}$) und läsionalen Arealen ($97 \pm 30,00 \mu\text{m}$) ermittelt (45). In einer Untersuchung von Ardigò et al. wurde der Einsatz der konfokalen Lichtmikroskopie für das therapeutische Monitoring der Psoriasis überprüft. Eine Erweiterung der dermalen Papillen wurde hier mit einem Durchmesser von größer als $100 \mu\text{m}$ definiert. Es konnte ein signifikanter Rückgang der Papillendurchmesser und der erweiterten Gefäße innerhalb der Papillen nach 8 Wochen Therapie mit einem $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper gezeigt werden (86). In einer Studie von Archid et al. wurde ebenfalls eine deutliche Erweiterung der Papillendurchmesser ($146,46 \pm 28,52 \mu\text{m}$) in psoriatischer Haut und ein signifikanter Unterschied zur gesunden Haut ($69,48 \pm 17,16 \mu\text{m}$) dargestellt (8). Interessanterweise zeigt sich hier eine Diskrepanz der Papillendurchmesser in psoriatischer Haut im Vergleich zu unseren Ergebnissen ($0,114 \pm 0,012 \text{ mm}$). Dieser Diskrepanz könnte zugrunde liegen, dass unsere Psoriasis-

Patienten nach bereits begonnener Therapie untersucht wurden. Archid et al. schlossen in ihre Studie jedoch nur Patienten ein, die in den letzten zwei Monaten keine psoriatische Therapie erhalten hatten. In einer weiteren Untersuchung von Ardigò et al. ergaben sich bemerkenswert unterschiedliche Tendenzen der mikroskopischen Veränderungen während der Therapie mit zwei verschiedenen wirksamen lokalen Therapeutika (87). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Laserscan-Mikroskopie eine geeignete Methode für die Überwachung der Psoriasis sein kann. Es gibt jedoch auch deutliche Einschränkungen in der Untersuchung von psoriatischer Haut mittels Laserscan-Mikroskopie. So fanden Ardigò et al. in einer weiteren Studie zwar eine hohe Übereinstimmung zwischen konfokaler Laserscan-Mikroskopie und Histologie in der Beurteilung der Psoriasis, jedoch können stark ausgeprägte Hyperkeratose, Parakeratose, Akanthose oder Spongiose zu einer verminderten Eindringtiefe des Lichts in das Gewebe führen und damit die Beurteilung der dermalen Papillen und der dermoepidermalen Junktionszone erschweren (44). Eine deutliche Erweiterung der Papillendurchmesser in psoriatischer Haut (Median 151 μm) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median $< 80 \mu\text{m}$) konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Diskrepanz der Papillendurchmesser in psoriatischer Haut im Vergleich zu unseren Ergebnissen ($0,114 \pm 0,012 \text{ mm}$) lässt sich auch hier dadurch erklären, dass Ardigò et al. nur Psoriasis-Patienten in die Studie einschlossen, die in den letzten 4 Wochen keine systemische oder topische Therapie erhalten hatten (44). Die Beurteilung der dermalen Papillen kann ebenso bei niedrigen Melaninkonzentrationen und dementsprechend niedrigem Kontrast in der Laserscan-mikroskopischen Bildgebung erschwert sein (75, 88). Lagarrigue et al. zeigten in einer Studie mit 111 Probanden, dass der papilläre Kontrast, gemessen in der dermoepithelialen Junktionszone, ein verlässlicher Marker für die Hautpigmentierung zu sein scheint und gut mit den Hauttypen nach Fitzpatrick korreliert (89). Dementsprechend ist eine Beurteilung der dermalen Papillen bei Patienten mit dem Hauttyp I und II nach Fitzpatrick erschwert (88, 89). Eine weitere mögliche Einschränkung der Beurteilbarkeit der dermalen Papillen kann das Fehlen des papillären Rings in psoriatischer Haut darstellen. So wiesen Ardigò et al. in ihrer Studie mit 36 Psoriasis-Patienten nach, dass in 86 % der psoriatischen Läsionen die dermalen Papillen nicht von einem hellen Randsaum, bestehend aus basalen Keratinozyten und Melanozyten, umrandet waren. Dieser Randsaum ließ sich nur noch als schattenartige Struktur erkennen (44). Eine

mögliche Erklärung könnte die Hemmung der Melanin-Synthese bzw. die steigende Apoptose von Melanozyten ausgelöst durch Tumornekrosefaktor- α sein (44, 90). Weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Veränderung in psoriatischer Haut sind jedoch erforderlich.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass sich die pathologischen Veränderungen in den Gefäßstrukturen bei Patienten mit Psoriasisläsionen nur an den Kapillarschlingen manifestieren, jedoch nicht an tiefer gelegenen Blutgefäßen. Die Auflösung des für diese Untersuchungen verwendeten optoakustischen Messsystems ermöglichte keine Darstellung von kapillären Strukturen. Dazu müsste die Frequenz des Ultraschallwandlers entsprechend erhöht und angepasst werden. Unter diesen Voraussetzungen ist die Optoakustik eine vielversprechende Methode mit Potential für den klinischen Einsatz. Zum derzeitigen Zeitpunkt stehen noch keine kommerziell erhältlichen optoakustischen Systeme zur Verfügung (85). Die Laserscan-Mikroskopie ist ein bereits etabliertes Verfahren in der Dermatologie und der Papillendurchmesser ist ein relativ einfach zu messender Parameter. Die schnelle Entwicklung der Laser- und Detektionstechnik wird es künftig ermöglichen, dass relativ einfache und kostengünstige in-vivo-Laserscan-Mikroskope für derartige Untersuchungen zur Verfügung stehen. Darüber hinaus gab es eine rasante Entwicklung bei den Softwareprogrammen zu verzeichnen, welche es ermöglichen, eine automatische Gewebestrukturanalyse anhand der laserscan-mikroskopischen Aufnahmen durchzuführen. Inwiefern die Bestimmung des Papillendurchmessers für die Überwachung des Krankheitsverlaufes der Psoriasis im klinischen Alltag geeignet ist, müssen weitere Untersuchungen in verschiedenen Phasen der Therapie mit größerer Probandenzahl zeigen.

5. Referenzen

1. Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A. Pathophysiology of Psoriasis: Recent Advances on Il-23 and Th17 Cytokines. *Current Rheumatology Reports*. 2007;9(6):461-7.
2. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 Cytokine, Mediates Il-23-Induced Dermal Inflammation and Acanthosis. *Nature*. 2007;445(7128):648-51.
3. Hern S, Stanton AW, Mellor R, Levick JR, Mortimer PS. Control of Cutaneous Blood Vessels in Psoriatic Plaques. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1999;113(1):127-32.
4. Braverman IM, Sibley J. Role of the Microcirculation in the Treatment and Pathogenesis of Psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1982;78(1):12-7.
5. Braverman IM, Yen A. Ultrastructure of the Capillary Loops in the Dermal Papillae of Psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1977;68(1):53-60.
6. Mrowietz U, Kragballe K, Reich K, Spuls P, Griffiths CE, Nast A, Franke J, Antoniou C, Arenberger P, Balieva F, Bylaite M, Correia O, Dauden E, Gisondi P, Iversen L, Kemeny L, Lahfa M, Nijsten T, Rantanen T, Reich A, Rosenbach T, Segaert S, Smith C, Talme T, Volc-Platzer B, Yawalkar N. Definition of Treatment Goals for Moderate to Severe Psoriasis: A European Consensus. *Archives of Dermatological Research*. 2011;303(1):1-10.
7. Lebwohl M. A Clinician's Paradigm in the Treatment of Psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005;53(1 Suppl 1):S59-69.
8. Archid R, Patzelt A, Lange-Asschenfeldt B, Ahmad SS, Ulrich M, Stockfleth E, Philipp S, Sterry W, Lademann J. Confocal Laser-Scanning Microscopy of Capillaries in Normal and Psoriatic Skin. *Journal of Biomedical Optics*. 2012;17(10):101511.
9. Wolberink EA, van Erp PE, de Boer-van Huizen RT, van de Kerkhof PC, Gerritsen MJ. Reflectance Confocal Microscopy: An Effective Tool for Monitoring Ultraviolet B Phototherapy in Psoriasis. *The British Journal of Dermatology*. 2012;167(2):396-403.
10. Kruger RA, Lam RB, Reinecke DR, Del Rio SP, Doyle RP. Photoacoustic Angiography of the Breast. *Medical Physics*. 2010;37(11):6096-100.

- 11.** Manohar S, Vaartjes SE, van Hespden JC, Klaase JM, van den Engh FM, Steenbergen W, van Leeuwen TG. Initial Results of in Vivo Non-Invasive Cancer Imaging in the Human Breast Using near-Infrared Photoacoustics. *Optics Express*. 2007;15(19):12277-85.
- 12.** Oh JT, Li ML, Zhang HF, Maslov K, Stoica G, Wang LV. Three-Dimensional Imaging of Skin Melanoma in Vivo by Dual-Wavelength Photoacoustic Microscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2006;11(3):34032.
- 13.** Zhang HF, Maslov K, Stoica G, Wang LV. Imaging Acute Thermal Burns by Photoacoustic Microscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2006;11(5):054033.
- 14.** Favazza CP, Cornelius LA, Wang LV. In Vivo Functional Photoacoustic Microscopy of Cutaneous Microvasculature in Human Skin. *Journal of Biomedical Optics*. 2011;16(2):026004.
- 15.** Favazza CP, Jassim O, Cornelius LA, Wang LV. In Vivo Photoacoustic Microscopy of Human Cutaneous Microvasculature and a Nevus. *Journal of Biomedical Optics*. 2011;16(1):016015.
- 16.** Junqueira LC CJ, Gratzl M. *Histologie*: Springer Verlag; 2004.
- 17.** Ghoreschi K, Röcken M. Immunpathogenese der Psoriasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2003;1(7):524-32.
- 18.** Macher E, Vogell W. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Hautkapillaren. *Dermatologica*. 1962;124:110-28.
- 19.** Junqueira LC CJ, Schiebler TH. *Histologie*: Springer Verlag; 1996.
- 20.** Altmeyer P HK, Stücker M *Kutane Mikrozirkulation*: Springer Verlag; 1997.
- 21.** Braverman IM. The Cutaneous Microcirculation. *The Journal of Investigative Dermatology Symposium proceedings*. 2000;5(1):3-9.
- 22.** Braverman IM, Yen A. Ultrastructure of the Human Dermal Microcirculation. II. The Capillary Loops of the Dermal Papillae. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1977;68(1):44-52.
- 23.** Yen A, Braverman IM. Ultrastructure of the Human Dermal Microcirculation: The Horizontal Plexus of the Papillary Dermis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1976;66(3):131-42.
- 24.** Braverman IM. Ultrastructure and Organization of the Cutaneous Microvasculature in Normal and Pathologic States. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1989;93(2 Suppl):2s-9s.

- 25.** Michalek IM, Loring B, John SM. A Systematic Review of Worldwide Epidemiology of Psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2017;31(2):205-12.
- 26.** Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer AB, Jr., Reboussin DM. Psoriasis Causes as Much Disability as Other Major Medical Diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999;41(3 Pt 1):401-7.
- 27.** Takeshita J, Grewal S, Langan SM, Mehta NN, Ogdie A, Van Voorhees AS, Gelfand JM. Psoriasis and Comorbid Diseases: Epidemiology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2017;76(3):377-90.
- 28.** Elder JT, Nair RP, Guo SW, Henseler T, Christophers E, Voorhees JJ. The Genetics of Psoriasis. *Archives of Dermatology*. 1994;130(2):216-24.
- 29.** Weisenseel P, Laumbacher B, Besgen P, Ludolph-Hauser D, Herzinger T, Roecken M, Wank R, Prinz JC. Streptococcal Infection Distinguishes Different Types of Psoriasis. *Journal of Medical Genetics*. 2002;39(10):767-8.
- 30.** Morris A, Rogers M, Fischer G, Williams K. Childhood Psoriasis: A Clinical Review of 1262 Cases. *Pediatric Dermatology*. 2001;18(3):188-98.
- 31.** Chandran V. The Genetics of Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2013;44(2):149-56.
- 32.** Gudjonsson JE, Karason A, Runarsdottir EH, Antonsdottir AA, Hauksson VB, Jonsson HH, Gulcher J, Stefansson K, Valdimarsson H. Distinct Clinical Differences between Hla-Cw*0602 Positive and Negative Psoriasis Patients--an Analysis of 1019 Hla-C- and Hla-B-Typed Patients. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126(4):740-5.
- 33.** Nair RP, Ruether A, Stuart PE, Jenisch S, Tejasvi T, Hiremagalore R, Schreiber S, Kabelitz D, Lim HW, Voorhees JJ, Christophers E, Elder JT, Weichenthal M. Polymorphisms of the Il12b and Il23r Genes Are Associated with Psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128(7):1653-61.
- 34.** Ghoreschi K, Weigert C, Rocken M. Immunopathogenesis and Role of T Cells in Psoriasis. *Clinics in Dermatology*. 2007;25(6):574-80.
- 35.** Lowes MA, Suarez-Farinas M, Krueger JG. Immunology of Psoriasis. *Annual Review of Immunology*. 2014;32:227-55.
- 36.** Campa M, Mansouri B, Warren R, Menter A. A Review of Biologic Therapies Targeting Il-23 and Il-17 for Use in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *Dermatology and Therapy*. 2016;6(1):1-12.

37. Mrowietz U, Reich K. Psoriasis - neue Erkenntnisse zur Pathogenese und Therapie. *Deutsches Arzteblatt International*. 2009;106(1-2):11-8.
38. Bhushan M, McLaughlin B, Weiss JB, Griffiths CE. Levels of Endothelial Cell Stimulating Angiogenesis Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Are Elevated in Psoriasis. *The British Journal of Dermatology*. 1999;141(6):1054-60.
39. Goodfield M, Hull SM, Holland D, Roberts G, Wood E, Reid S, Cunliffe W. Investigations of the 'Active' Edge of Plaque Psoriasis: Vascular Proliferation Precedes Changes in Epidermal Keratin. *The British Journal of Dermatology*. 1994;131(6):808-13.
40. Pinkus H, Mehregan AH. The Primary Histologic Lesion of Seborrheic Dermatitis and Psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1966;46(1):109-16.
41. Telner P, Fekete Z. The Capillary Responses in Psoriatic Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1961;36:225-30.
42. Micali G, Lacarrubba F, Musumeci ML, Massimino D, Nasca MR. Cutaneous Vascular Patterns in Psoriasis. *International Journal of Dermatology*. 2010;49(3):249-56.
43. Gordon M, Johnson WC, Burgoon CF, Jr. Histopathology and Histochemistry of Psoriasis. II. Dynamics of Lesions During Treatment. *Archives of Pathology*. 1967;84(5):443-50.
44. Ardigo M, Cota C, Berardesca E, Gonzalez S. Concordance between in Vivo Reflectance Confocal Microscopy and Histology in the Evaluation of Plaque Psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2009;23(6):660-7.
45. Suihko C, Serup J. Fluorescent Fibre-Optic Confocal Imaging of Lesional and Non-Lesional Psoriatic Skin Compared with Normal Skin in Vivo. *Skin Research and Technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*. 2012;18(4):397-404.
46. Spuls PI, Lecluse LL, Poulsen ML, Bos JD, Stern RS, Nijsten T. How Good Are Clinical Severity and Outcome Measures for Psoriasis?: Quantitative Evaluation in a Systematic Review. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2010;130(4):933-43.
47. Fredriksson T, Pettersson U. Oral Treatment of Pustulosis Palmo-Plantaris with a New Retinoid, Ro 10-9359. *Dermatologica*. 1979;158(1):60-4.

- 48.** Bozek A, Reich A. The Reliability of Three Psoriasis Assessment Tools: Psoriasis Area and Severity Index, Body Surface Area and Physician Global Assessment. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2017;26(5):851-6.
- 49.** Mason AR, Mason J, Cork M, Dooley G, Edwards G. Topical Treatments for Chronic Plaque Psoriasis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2009(2):Cd005028.
- 50.** Lin AN. Innovative Use of Topical Calcineurin Inhibitors. *Dermatologic Clinics*. 2010;28(3):535-45.
- 51.** Rapalli VK, Singhvi G, Dubey SK, Gupta G, Chellappan DK, Dua K. Emerging Landscape in Psoriasis Management: From Topical Application to Targeting Biomolecules. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;106:707-13.
- 52.** Gungor S, Rezigue M. Nanocarriers Mediated Topical Drug Delivery for Psoriasis Treatment. *Current Drug Metabolism*. 2017;18(5):454-68.
- 53.** Racz E, Prens EP. Phototherapy and Photochemotherapy for Psoriasis. *Dermatologic Clinics*. 2015;33(1):79-89.
- 54.** Kuhn A, Ruland V, Patsinakidis N, Luger TA. Use of Methotrexate in Patients with Psoriasis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2010;28(5 Suppl 61):S138-44.
- 55.** Costa L, Del Puente A, Peluso R, Tasso M, Caso P, Chimenti MS, Sabbatino V, Girolimetto N, Benigno C, Bertolini N, Del Puente A, Perricone R, Scarpa R, Caso F. Small Molecule Therapy for Managing Moderate to Severe Psoriatic Arthritis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2017;18(15):1557-67.
- 56.** Altenburg A, Augustin M, Zouboulis CC. Biologikanebenwirkungen bei Psoriasis. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2018;69(4):290-7.
- 57.** Ronholt K, Iversen L. Old and New Biological Therapies for Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(11).
- 58.** Fitzpatrick TB. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I through VI. *Archives of Dermatology*. 1988;124(6):869-71.
- 59.** Bell AG. On the Production and Reproduction of Sound by Light. *American Journal of Science*. 1880;Series 3 Vol. 20(118):305-24.
- 60.** Beard P. Biomedical Photoacoustic Imaging. *Interface Focus*. 2011;1(4):602-31.
- 61.** IBMT F-IfBT. Hochauflösende Optoakustik.
<http://www.ibmt.fraunhofer.de/content/dam/ibmt/de/Dokumente/PDFs/ibmt->

produktblaetter/ibmt-ultraschall/US_bmuf-Hochaufloesende-Optoakustik-Bildgebung-Kleintier.pdf.

- 62.** Paltauf G, Schmidt-Kloiber H. [Optoacoustic Spectroscopy and Imaging]. Zeitschrift für medizinische Physik. 2002;12(1):35-42.
- 63.** Wang LV. Tutorial on Photoacoustic Microscopy and Computed Tomography. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. 2008;14(1):171-9.
- 64.** Mallidi S, Luke GP, Emelianov S. Photoacoustic Imaging in Cancer Detection, Diagnosis, and Treatment Guidance. Trends in Biotechnology. 2011;29(5):213-21.
- 65.** Yao J, Wang LV. Photoacoustic Tomography: Fundamentals, Advances and Prospects. Contrast Media & Molecular Imaging. 2011;6(5):332-45.
- 66.** Center OML. Available from: <http://omlc.ogi.edu/spectra/>.
- 67.** Valluru KS, Chinni BK, Rao NA. Photoacoustic Imaging: Opening New Frontiers in Medical Imaging. Journal of Clinical Imaging Science. 2011;1:24.
- 68.** Jose J, Manohar S, Kolkman RG, Steenbergen W, van Leeuwen TG. Imaging of Tumor Vasculature Using Twente Photoacoustic Systems. Journal of Biophotonics. 2009;2(12):701-17.
- 69.** Welzel J UM, Lange-Asschenfeldt, Stolz W, Sattler E. Leitlinie: Konfokale Lasermikroskopie in der Dermatologie 2017. <https://www.awmf.org/en/clinical-practice-guidelines/detail/II/013-076.html>.
- 70.** Minsky M. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. Scanning. 1988;10(4):128-38.
- 71.** Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC. Introduction to Confocal Microscopy. The Journal of Investigative Dermatology. 2012;132(12):e3.
- 72.** Ulrich M, Lange-Asschenfeldt S. In Vivo Confocal Microscopy in Dermatology: From Research to Clinical Application. Journal of Biomedical Optics. 2013;18(6):061212.
- 73.** Kang HY, Bahadoran P, Ortonne JP. Reflectance Confocal Microscopy for Pigmentary Disorders. Experimental Dermatology. 2010;19(3):233-9.
- 74.** Meyer LE, Lademann J. Application of Laser Spectroscopic Methods for in Vivo Diagnostics in Dermatology. Laser Physics Letters. 2007;4(10):754.
- 75.** Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. In Vivo Confocal Scanning Laser Microscopy of Human Skin: Melanin Provides Strong Contrast. The Journal of Investigative Dermatology. 1995;104(6):946-52.

- 76.** Astner S, Ulrich M. Konfokale Laserscan-Mikroskopie. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete.* 2010;61(5):421-8.
- 77.** Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH. In Vivo Confocal Scanning Laser Microscopy of Human Skin II: Advances in Instrumentation and Comparison with Histology. *The Journal of Investigative Dermatology.* 1999;113(3):293-303.
- 78.** Nehal KS, Gareau D, Rajadhyaksha M. Skin Imaging with Reflectance Confocal Microscopy. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery.* 2008;27(1):37-43.
- 79.** Skvara H, Plut U, Schmid JA, Jonak C. Combining in Vivo Reflectance with Fluorescence Confocal Microscopy Provides Additive Information on Skin Morphology. *Dermatology Practical & Conceptual.* 2012;2(1):3-12.
- 80.** Swindle LD, Thomas SG, Freeman M, Delaney PM. View of Normal Human Skin in Vivo as Observed Using Fluorescent Fiber-Optic Confocal Microscopic Imaging. *The Journal of Investigative Dermatology.* 2003;121(4):706-12.
- 81.** Mavig GmbH: <http://www.vivascope.de/produkte/geraete/in-vivo-geraete.html>.
- 82.** Braverman IM, Sibley J. The Response of Psoriatic Epidermis and Microvessels to Treatment with Topical Steroids and Oral Methotrexate. *The Journal of Investigative Dermatology.* 1985;85(6):584-6.
- 83.** Musumeci ML, Lacarrubba F, Fusto CM, Micali G. Combined Clinical, Capillaroscopic and Ultrasound Evaluation During Treatment of Plaque Psoriasis with Oral Cyclosporine. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology.* 2013;26(4):1027-33.
- 84.** Aguirre J, Schwarz M, Garzorz N, Omar M, Buehler A, Eyerich K, Ntziachristos V. Precision Assessment of Label-Free Psoriasis Biomarkers with Ultra-Broadband Optoacoustic Mesoscopy. *Nature Biomedical Engineering.* 2017;1:0068.
- 85.** Schellenberg MW, Hunt HK. Hand-Held Optoacoustic Imaging: A Review. *Photoacoustics.* 2018;11:14-27.
- 86.** Ardigo M, Agozzino M, Longo C, Lallas A, Di Lernia V, Fabiano A, Conti A, Sperduti I, Argenziano G, Berardesca E, Pellacani G. Reflectance Confocal Microscopy for Plaque Psoriasis Therapeutic Follow-up During an Anti-Tnf-Alpha Monoclonal Antibody: An Observational Multicenter Study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV.* 2015;29(12):2363-8.
- 87.** Ardigo M, Agozzino M, Longo C, Conti A, Di Lernia V, Berardesca E, Pellacani G. Psoriasis Plaque Test with Confocal Microscopy: Evaluation of Different Microscopic

Response Pathways in Nsaid and Steroid Treated Lesions. *Skin Research and Technology* : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI). 2013;19(4):417-23.

88. Robertson K, Rees JL. Variation in Epidermal Morphology in Human Skin at Different Body Sites as Measured by Reflectance Confocal Microscopy. *Acta DermatoVenereologica*. 2010;90(4):368-73.

89. Lagarrigue SG, George J, Questel E, Lauze C, Meyer N, Lagarde JM, Simon M, Schmitt AM, Serre G, Paul C. In Vivo Quantification of Epidermis Pigmentation and Dermis Papilla Density with Reflectance Confocal Microscopy: Variations with Age and Skin Phototype. *Experimental Dermatology*. 2012;21(4):281-6.

90. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Mechanisms of Melanogenesis Inhibition by Tumor Necrosis Factor-Alpha in B16/F10 Mouse Melanoma Cells. *European Journal of Biochemistry*. 1998;255(1):139-46.

6. Eidesstaatliche Versicherung

„Ich, Katharina Ossadnik, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Die Anwendung optoakustischer Verfahren und der konfokalen Laserscan-Mikroskopie für das Monitoring des Therapieverlaufs in psoriatischer Haut“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen dieser Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Unterschrift

7. Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Katharina Ossadnik hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: Ossadnik K., Philipp S, Bost W., Fournelle M., Richter H, Lademann J.
Application of Photoacoustics Methods and Confocal Microscopy for Monitoring of
Therapeutic Response in Plaque Psoriasis. Skin Pharmacol Physiol 2018;31:308-315.

Beitrag im Einzelnen:

Untersuchung der Patienten: Katharina Ossadnik

Auswertung der Daten: Katharina Ossadnik, Wolfgang Bost, Marc Fournelle

Statistische Auswertung: Katharina Ossadnik, Beratung durch das Institut für Biometrie
und Klinische Epidemiologie - Charité Universitätsmedizin Berlin (Olga Jakob)

Arbeit an der Fertigung des Manuskripts: Katharina Ossadnik, Sandra Philipp, Wolfgang
Bost, Marc Fournelle, Heike Richter, Jürgen Ladenmann

Berlin, 12.04.2019, Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann

Katharina Ossadnik

8. Lebenslauf

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

9. Publikation

1. Ossadnik K., Philipp S, Bost W., Fournelle M., Richter H, Lademann J. Application of Photoacoustics Methods and Confocal Microscopy for Monitoring of Therapeutic Response in Plaque Psoriasis. *Skin Pharmacol Physiol* 2018;31:308-315

10. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann für die hervorragende Betreuung und Unterstützung in jeder Phase während der Erstellung dieser Dissertation.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hautphysiologie der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin danken.

Ich danke Herrn Dr. Wolfgang Bost für seine unermüdliche Unterstützung und Geduld bei der Einarbeitung in die Optoakustik.

Ich danke dem Pflegepersonal und ärztlichen Personal der Tagesklinik der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, die mir eine große Hilfe bei der Planung und Durchführung der Untersuchungen waren.

Mein besonderer Dank gilt den Patienten und Probanden, die viel Geduld und Verständnis zeigten und erst eine Erstellung dieser Arbeit ermöglichten.

Der letzte Satz ist nur für Dich: Fabian, ich danke Dir!