

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

DISSERTATION

In-vivo Reflektanz konfokale Mikroskopie zur non-invasiven Diagnostik des
akuten Kontaktekzems

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Astner

aus Graz

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. E. Stockfleth
2. Prof. Dr. med. M. Volkenandt
3. Prof. Dr. med. H. Merk

Datum der Promotion: 21.11.2008

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	2
Einleitung	3
Zielstellung	4
Methodik	5
Studienteilnehmer und Studienprotokoll	5
Durchführung des Epikutantests	5
Untersuchung des kinetischen Verlaufs des Kontaktekzems	5
Untersuchung ethnischer Einflüsse auf die Entstehung des toxisch-irritativen Kontaktekzems	5
Analyse der Sensitivität und Spezifität ausgesuchter RCM Parameter des AKE	6
Reflektanz konfokale Mikroskopie (RCM)	6
RCM Untersuchungsparameter	7
TEWL, FES Spektroskopie	7
Statistische Analyse	7
Ergebnisse	8
I. Kinetischer Verlauf des Kontaktekzems	8
II. Einfluss ethnischer Faktoren auf das IKE	8
III. Sensitivitäts-/Spezifitätsanalyse	9
RCM und klinische Evaluation	9
Statistische Analyse	9
Diskussion	9
Anteilsklärung	12
Publikationen	13
Non-invasive Evaluation of the Kinetics of Allergic and Irritant Contact Dermatitis	13
Irritant contact dermatitis induced by a common household irritant: a non-invasive evaluation of ethnic variability in skin response	13
Pilot study on the sensitivity and specificity of in vivo reflectance confocal microscopy in the diagnosis of allergic contact dermatitis	13
Noninvasive evaluation of Allergic and Irritant Contact Dermatitis by In-Vivo Reflectance Confocal Microscopy	13
Lebenslauf	14
Publikationsliste	15
Eidesstattliche Erklärung	18
Danksagung	19

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Die Unterscheidung eines allergischen (AKE) von einem toxisch-irritativen (IKE) Kontaktekzem ist für die weitere einzuleitende Diagnostik und Therapie von essentieller Bedeutung für den Patienten und den behandelnden Arzt. Neben der klinischen Beurteilung stellt sich die klare Abgrenzung dieser Erkrankungen voneinander sowohl histologisch als auch immunologisch äußerst schwierig dar. Eine Abgrenzung dieser epidemiologisch und arbeitsmedizinisch hochrelevanten Erkrankungen ist jedoch nicht zuletzt für den Patienten von fundamentaler Konsequenz. Die Reflektanz-konfokale Mikroskopie (RCM) erlaubt die optische Untersuchung von entzündlichen und proliferativen Hautveränderungen in-vivo und in Echtzeit, wobei oberflächlich dermale und epidermale Strukturen in-vivo und in hoher Auflösung zur Darstellung kommen.

Ziel: Die systematische Untersuchung des allergischen und toxisch-irritativen Kontaktekzems mit dem RCM zur Untersuchung 1) des kinetischen Verlaufs 2) ethnischer Einflüsse auf die Entstehung des irritativen Kontaktekzems sowie 3) die Beurteilung der Sensitivität und Spezifität einzelner RCM-Parameter.

Methodik: 44 Patienten mit der Voranamnese eines Kontaktekzems nahmen an der klinischen Studie teil. Analog zur Routinehistologie wurden die folgenden Parameter definiert und dokumentiert: Spongiose, Exozytose, Vesikelbildung und Nekrose der Epidermis; Kohäsionsverlust und Strukturdefekte des Stratum corneum; Blutgefäßerweiterung und das Vorhandensein und Ausmaß eines superfiziellen, perivaskulären Infiltrats.

Ergebnisse: Das akute AKE ist durch die Ausbildung von Mikrovesikeln, Spongiose und Exozytose definiert. Beim akuten IKE hingegen stehen exogen induzierte Strukturdefekte des Stratum corneums, ausgedehnte intraepidermale Nekrosen sowie eine regenerative Hyperproliferation im Vordergrund. Die Untersuchung des kinetischen Verlaufs zeigte eine raschere Regeneration des IKE im Vergleich zum AKE. Das Ergebnis dieser Studie ergab Hinweise für eine erhöhte Empfindlichkeit von Patienten mit Fitzpatrick Lichttyp I-III im Vergleich zu Lichttyp V-VI für die Entstehung eines IKE. Die statistische Analyse ergab eine Sensitivität von über 95% und eine Spezifität von 90 % für ausgesuchte RCM Parameter.

Zusammenfassung: Das RCM erlaubt die non-invasive Differenzierung des akuten Kontaktekzems und stellt damit eine viel versprechende, ergänzende Methode zur Diagnostik des akuten Kontaktekzems dar. Im Gegensatz zur Routinehistologie ist mit Hilfe der RCM auch die Darstellung dynamischer entzündlicher Prozesse möglich. Die klinische Anwendbarkeit und der Routineeinsatz in der allergologischen Diagnostik bleiben derzeit jedoch noch Zustand klinischer Studien.

EINLEITUNG

Dermatologische Erkrankungen gehören zu den häufigsten berufsbedingten Erkrankungen. Das Kontaktekzem ist die am häufigste gestellte berufsdermatologische Diagnose. Die hieraus resultierende Morbidität, und die damit verbundenen personellen und finanziellen Belastungen haben weitreichende psychosoziale und versicherungsrechtliche Konsequenzen. Durch die genaue Definition des auslösenden Agens können kausale Therapieansätze zu einer Verbesserung der Lebensqualität und Reduktion der Krankheitshäufigkeit führen, und die Fortsetzung der Arbeit im gewählten Berufsfeld erfolgen.

Es werden zwei Formen des Kontaktekzems unterschieden: das allergische Kontaktekzem (AKE) und das toxisch-irritative Kontaktekzem (IKE). Das AKE beruht auf einer initialen Sensibilisierung gegenüber spezifischen Antigenen in dafür prädisponierten Individuen. Nach Re-exposition kommt es zu einer Typ-IV Hyperimmunreaktion, bei der es meist *dosisunabhängig* zu einer Reaktivierung des hauteigenen Immunsystems kommt. Die häufigsten Kontaktallergene sind Nickel, Neomycin, Duftstoffmix, Perubalsam und Kobaltsulfat. Das IKE stellt eine unspezifische, *dosis-, und konzentrationsabhängige*, kumulativ-toxische Reaktion dar, die sich durch die exogene Zerstörung der Hautbarriere entwickelt und ohne das hierfür notwendigerweise spezifische Ko-Faktoren vorliegen. Häufig implizierte toxisch-irritative Substanzen sind Seifen, Detergenzien (Waschlösungen), Säuren, Laugen, Metallsalze und Pflanzen. In beiden Fällen führt die entstehende Entzündungskaskade zur Entwicklung rötlicher, scharf oder unscharf begrenzter Makeln, Papeln und infiltrierter Plaques, die in unterschiedlicher Ausprägung und Ausdehnung auftreten und in wechselnder Dynamik über Tage und Wochen unter Ausbildung von Hyperkeratosen oder Schuppen schließlich zur Abheilung kommen.

Der Goldstandard der Diagnose des allergischen (AKE) und toxisch-irritativen (IKE) Kontaktekzems ist der Patch-Test (Epikutantest, ECT). Hierbei wird eine definierte, international standardisierte Menge des vermuteten Antigens unter Okklusion auf die Haut aufgebracht, und nach 48 Stunden Expositionszeit entfernt. Da es sich um eine Typ-IV Hyperimmunreaktion (delayed-type of hypersensitivity) handelt, erfolgt die Ablesung 72 Stunden nach Exposition. Die klinische Beurteilung beinhaltet das Vorhandensein eines Erythems, Ödems, Bläschen oder Blasen, bzw. einer umschriebenen Nekrose,. Im Falle einer ausgedehnten Entzündungsreaktionen, oder des Vorliegens eines Mischbildes zwischen AKE und IKE ist jedoch die Unterscheidung aufgrund rein klinischer Merkmale nicht immer sicher möglich. Auch unter Zuhilfenahme histologischer Untersuchungen und aufgrund immunologischer Charakteristika kann eine genaue Differenzierung nicht immer erfolgen. Zudem haben diese invasiven Verfahren den Nachteil der damit verbundenen Schmerzen und Narbenbildung und die nachfolgende Färbung und Fixierung des entnommenen Gewebepräparates kann zur Entstehung von Artefakten führen.

In den letzten Jahren kam es zur Entwicklung einer Vielzahl nicht-invasiver Untersuchungsmethoden in der Dermatologie. Bereits etablierte Verfahren sind z.B. die Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes („transepidermal water loss“ TEWL).zur Beurteilung der Integrität des Stratum corneums. Dieses stellt ein indirektes Verfahren zum Nachweis von Strukturdefekten im Stratum corneum dar: Eine Analyse des entzündlichen Infiltrates sowie der epidermalen Veränderungen ist hierdurch jedoch nicht möglich. Bislang experimentell eingesetzte Verfahren wie die hochfrequente Ultraschall (HFUS) Diagnostik erlauben ähnlich der histologischen Diagnostik die vertikale Beurteilung der Hautanatomie, wobei auch hier mangels hinreichender Auflösung (unter 100 µm) zelluläre Elemente nicht darstellbar sind.

Rajadhyaksha et al entwickelten 1995 den ersten Prototyp eines Reflektanz-konfokalen Mikroskops (RCM) an der Harvard Medical School, mit dem Ziel die klinisch-dermatologische Evaluation durch optisch-hochauflösende, in-vivo Mikroskopie zu ergänzen. RCM erlaubt die Untersuchung von entzündlichen und proliferativen Hautveränderungen non-invasiv und in Echtzeit, wobei oberflächlich dermale und epidermale Strukturen in-vivo und in zellulärer Auflösung zur Darstellung kommen. Das allergische und toxisch-irritative Kontaktekzem wurde bereit in mehreren Einzelstudien mit dem RCM untersucht, wobei die spezifischen RCM Kriterien des allergischen und irritativen Kontaktekzems definiert wurden und die Basis unserer Untersuchungen darstellen.

ZIELSTELLUNG

Ziel dieser über drei Jahre anberaumten und durch das National Institute of Health (NIH) finanzierten Studie war die Untersuchung und Differenzierung des akuten Kontaktekzems mit Hilfe non-invasiver Verfahren in seriellen Einzelstudien. In einer Pilotstudie erfolgte die Optimierung der Untersuchungsbedingung und die Korrelation der RCM Parameter mit der Routinehistologie wobei auch die Durchführbarkeit der Studie geprüft wurde.

Zielsetzungen:

- I. Untersuchung der dynamischen pathophysiologischen Vorgänge und kinetischen Evolution des allergischen und irritativen Kontaktekzems in longitudinalen Untersuchungsschritten
- II. Untersuchung möglicher ethnischer Einflüsse auf die Entstehung des toxisch-irritativen Kontaktekzems
- III. Analyse der Sensitivität und Spezifität ausgesuchter RCM-Parameter in der Diagnose des allergischen Kontaktekzems

METHODIK

Studienteilnehmer und Studienprotokoll

Eine Gesamtzahl von 44 Studienteilnehmern im Alter zwischen 29 und 69 Jahren (Durchschnittsalter 49 Jahre) wurde in die klinische Studie eingeschlossen. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte aus der Abteilung für Dermatologie und Allergologie am Massachusetts General Hospital, Boston MA, USA. Alle untersuchten Patienten entsprachen dem Lichttyp I-III nach Fitzpatrick (Kaukasier). Zur Untersuchung ethnischer Einflüsse wurden zusätzlich Patienten mit den Lichttypen V und VI nach Fitzpatrick (Afroamerikaner) untersucht.

Durchführung des Epikutantests (ECT)

Das Aufbringen der Testsubstanzen erfolgte in standardisierter Form und entsprechend den Empfehlungen der North American Contact Dermatitis Research Group NACDG an den ventralen Unterarmen bzw. den anterioren Oberschenkeln. Die Testsubstanzen wurden mit 10 mm Testkammern (Finn Chambers, Allerderm Laboratories, Inc., Petaluma, CA) und Filterpapierscheiben für die wässrigen Lösungen (Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland; Vertrieb durch Allerderm) aufgebracht.

Die Zuteilung der Patienten in die einzelnen Studiengruppen wurde wie folgt durchgeführt:

I. Untersuchung des kinetischen Verlaufs des Kontaktekzems (n=18)

Bei allen Studienteilnehmern der Gruppe I war die Diagnose eines allergischen Kontaktekzems bekannt und im ECT gesichert. Das spezifische Testallergen (Trolab, Hermal Kurt Herrmann, Reinbeck, Deutschland) sowie jeweils 3,5 ml 4 Sodium Lauryl Sulfate (SLS) als toxisches Irritant wurden in 2 Testfeldern aufgebracht. Als Kontrolle dienten jeweils eine Kammer mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) sowie eine leere Testkammer. Als Testallergene gelangten Nickelsulfat (n=4), Duftstoffmix (n=3), Perubalsam (n=3), Quaternium-15 (n=1), Wollalkohole (n=1), Thiomersal (n=1), 4-para-tert-butylphenol Formaldehydesin (=1) und Imidazolidinurea (n=1) zur Anwendung. Die einzelnen Testsubstanzen wurden für 48 Stunden unter Okklusion belassen und anschließend entfernt. Die Studienteilnehmer erschienen zu drei konsekutiven Zeitpunkten (72 Stunden, bzw. 3, 4, 7, 9, 14 oder 21 Tage nach Applikation der Testsubstanz) zur Re-Evaluation (klinische Evaluation, Photodokumentation, RCM Untersuchung).

II. Untersuchung ethnischer Einflüsse auf die Entstehung des toxisch-irritativen Kontaktekzems (n=10)

In Gruppe II erfolgte bei 10 Studienteilnehmern (5 Afroamerikaner, 5 Kaukasier) mit einer negativen Voranamnese für eine signifikante Hauterkrankung die Applikation von „Ivory Soap“, einem gängigen Haushaltsspülmittel (Procter & Gamble Inc., Cincinnati OH) in ansteigenden wässrigen Konzentrationslösungen von 5-35%, in 5%igen Dosisinkrementen. Die Testsubstanzen wurden nach 24-stündiger Applikationszeit entfernt, und die Studienteilnehmer

an 2 konsekutiven Tagen (24/48 Stunden) zur Re-evaluation (klinische Evaluation, Photodokumentation, RCM Untersuchung) wiedereinbestellt.

III. Analyse der Sensitivität und Spezifität ausgesuchter RCM-Parameter des AKE (n=16)

Bei allen Studienteilnehmern der Gruppe III war die Diagnose eines allergischen Kontaktekzems bekannt und im ECT gesichert. Das ausgesuchte Testallergen wurde jeweils auf mindestens 2 Testfeldern aufgebracht; als Testallergene dienten Nickelsulfat (n=6), Duftstoffmix (n=2), Perubalsam (n=2), Quaternium-15 (n=1), Wollalkohole (n=1), Thiomersal (n=2), Mercaptomix (n=2). phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) diente als Kontrollsubstanz und wurde in zweifacher Ausfertigung aufgebracht. Die einzelnen Testsubstanzen wurden für 48 Stunden unter Okklusion belassen, danach wurden die Testkammern entfernt und die Studienteilnehmer erschienen nach 72 Stunden zur Endablesung. Bei jedem Studienbesuch erfolgte die klinische Evaluation, Photodokumentation und RCM Untersuchung.

Die digitalen Bilder wurden zu einem späteren Zeitpunkt drei unabhängigen Dermatologen verblindet anhand der folgenden klinischen Kriterien beurteilt: Erythem, Randschärfe, Ödem, Bläschenbildung, Nekrosen. Die RCM Bilder wurden nach einer Unterweisung zur Bildinterpretation verblindet anhand der RCM Kriterien zur Diagnose eines Kontaktekzems beurteilt.

Reflektanz konfokale Mikroskopie (RCM)

Zur Untersuchung des Kontaktekzems sowie der Kontroll-behandelten Haut wurde ein kommerziell erhältliches RCM System (Vivascope 1000, Lucid-Tech Inc, Henrietta, NY) verwendet. Die Terminologie „konfokal“ ist aus dem Englischen „conjugated focal planes“ abgeleitet, und bezieht sich auf das optische Grundprinzip der RCM Technologie. Als Lichtquelle dient ein 830nm Dioden Laser, dessen Strahl das Gewebe in horizontalen optischen Schnittebenen abtastet. Der Laserstrahl wird auf die einzelnen Gewebsebenen fokussiert und endogene Chromophore wie z.B. Hämoglobin, Melanin, Wasser und zelluläre Mikrostrukturen reflektieren, streuen oder absorbieren das auf die Gewebsstruktur auftreffende Licht in Abhängigkeit vom jeweiligen Brechungsindex. Das reflektierte Licht wird dann über einen Detektor aufgenommen, wodurch ‚virtuelle‘ Schnittbilder entstehen, die auf einem hochauflösenden Bildschirm optisch zur Darstellung kommen. Die Bildgröße liegt bei 250x200µm, neuere Geräte (Vivascope 1500, Lucid-Tech Inc, Henrietta, NY und MAVIG GmbH, München Deutschland) haben bereits eine Bildgröße von 500x500µm. Mit Hilfe der integrierten Software kann ein Mapping der einzelnen Schnittebenen erfolgen, wobei hier 16 Einzelbilder seriell aufgenommen werden und zu einer Bilddimension von 1000x800µm ähnlich einem Mosaik zusammengefügt werden. Die Eindringtiefe des optischen Systems liegt bei etwa 300µm. Die laterale (Punkt-für-Punkt) Auflösung der Einzelbilder liegt bei 0.5-1µm, die axiale Auflösung (optische Schicht,- oder Schnittdicke) bei etwa 3-5µm. Die Darstellung zellulärer Bestandteile erlaubt eine Analyse der Gewebeproben analog zur Routinehistologie. Der größte

Unterschied zur Routinehistologie ist die Schnittrichtung: mit der RCM erfolgt optische Gewebsanalyse in der horizontalen Ebene, in der Routinehistologie ist die vertikale Schnittführung etabliert. Die Analyse beginnt mit der obersten Hautschicht, dem Stratum corneum. In der weiteren axialen Schnittführung kommt darunter das Stratum granulosum, das Stratum spinosum und die dermoepidermale Junktionszone zur Darstellung. Direkt darunter liegt die oberflächliche Dermis, wo Gefäße und Kollagenfaserbündel innerhalb der Papillen sichtbar werden.

RCM Untersuchungsparameter

Entsprechend den Voruntersuchungen von Swindells et al (2003) wurden die Schnittebenen aller Testareale auf die RCM-Parameter des Kontaktekzems untersucht: Stratum corneum: Parakeratose, Hyperkeratose sowie Demarkation von Keratinozyten. Stratum spinosum/granulosum: Exozytose, Spongiose, Vesikelbildung und/oder Nekrose. In der papillären Dermis wurden die Dilatation der Blutgefäße und das Vorhandensein/Ausmaß eines superfiziellen perivaskulären Entzündungsinfiltrates beurteilt.

TEWL, FES Spektroskopie

Die Studienteilnehmer der Gruppe I und III wurden zusätzlich mit zwei weiteren nicht-invasiven Testverfahren untersucht. TEWL Messungen (DermaLab, Cotrex Technologies, Cyber Derm, Media Pennsylvania, USA) erfolgten zur Untersuchung des Strukturverlustes des Stratum corneum. Die Ergebnisse wurden in $[g/m^2]$ ausgedrückt. Spektroskopische Messungen erfolgten mit einem faseroptischen Fluorimeter (Skin Scan, Jobin-Yvon Spex, Edison, New Jersey, USA) zur Untersuchung der mit der Hyperproliferation und dermalen und epidermalen Entzündung verbundenen spektroskopischen Signale. Die jeweils erhobenen Wellenlängen der Anregung/Emission wurden in $[nm]$ ausgedrückt.

Statistische Analyse

Semi-quantitative, nicht-parametrische RCM Daten sowie die Ergebnisse des klinischen Scorings wurden mit dem Mann-Whitney Test analysiert. Die Ergebnisse der seriellen quantitativen TEWL Messungen sowie FES Spektroskopie wurden mit Hilfe einer MANOVA Analyse untersucht und als Mittelwert +/- der Standardabweichung angegeben. Die Sensitivitäts/Spezifitätsanalyse für alle RCM Parameter wurden in Referenz zum Goldstandard (=klinische Evaluation/Scoring der ECT) erhoben, die respektiven p -Werte wurden mit dem Chi-²-Test berechnet. Danach erfolgte eine logistische Regressionsanalyse aller RCM Parameter zur Definition der für die Diagnose des Kontaktekzems am relevantesten Kriterien. Mit Hilfe von Kreuztabellen erfolgte schließlich eine Analyse der Beziehung der einzelnen RCM Parameter zu- und untereinander. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson wurde zur Bestimmung der Korrelation zwischen der klinischen Beurteilung und RCM Scoring durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der SPSS Software durchgeführt (SPSS Inc., Chicago IL). Ein p -Wert < 0.5 wurde als statistisch signifikant definiert.

ERGEBNISSE

I. Kinetischer Verlauf von AKE/IKE

- 1) Die Dauer der Regeneration für das AKE war signifikant länger im Vergleich zum IKE ($p < 0.05$)
- 2) AKE und IKE sind durch das Auftreten von Bläschen, Spongiose und Exozytose charakterisiert, wohingegen das IKE signifikant häufiger mit dem Auftreten von intraepidermaler und oberflächlicher Nekrosen assoziiert ist.
- 3) Das IKE ist in allen Fällen durch das Auftreten oberflächlicher Strukturdefekte im Stratum corneum gekennzeichnet. In Abhängigkeit von dem klinischen Schweregrad der Reaktion zeigten sich Parakeratose, Hyperkeratose und eine Demarkation der Korneozyten als häufigste RCM Parameter des IKE.
- 4) Die durch oberflächliche Strukturdefekte ausgelöste, regenerative Hyperproliferation kennzeichnete in der frühen Phase (Tag 1-9) insbesondere das IKE. In den späteren, subakuten Phasen des AKE waren an einzelnen Testarealen auch hier eine Parakeratose und oberflächliche Demarkation der Korneozyten zu beobachten.
- 5) Die durch exogene Irritantien verursachten Strukturdefekte führen zu einem gesteigerten transepidermalen Wasserverlust, wobei die TEWL Werte an allen Testarealen mit dem Schweregrad der Strukturdefekte in der RCM Untersuchung korrelierten.

II. Einfluss ethnischer Faktoren auf IKE

- 1) Die Schwellenkonzentration zur Induktion des IKE lag signifikant höher für die Patienten der Studiengruppe mit einem Lichttyp V-VI (25%) im Vergleich zu Patienten mit einem Lichttyp I-III (10%).
- 2) Bei vergleichbaren Irritanz-Konzentrationen zeigten beide Studiengruppen die charakteristischen Parameter des IKE (Parakeratose, Demarkation von Korneozyten, oberflächliche Nekrosen) sowie eine ausgeprägte regenerative Hyperproliferation der Epidermis. Die RCM Scores für die einzelnen Parameter lagen jedoch an allen Testarealen mit vergleichbarer Irritanz-Konzentration signifikant über denen der Studiengruppe mit Lichttyp I-III.
- 3) In den unterhalb der Schwellenkonzentration behandelten Testarealen (unterhalb derer keine klinischen Zeichen eines IKE beobachtet werden konnte), gelang es mit Hilfe des RCM, Hinweise für das Vorliegen einer IKE zu erfassen: Es zeigte sich Parakeratose, Demarkation von Korneozyten, Exozytose und Spongiose. Eine Vesikelbildung oder Nekrose war jedoch bei diesen niedrigen Konzentrationen nicht ausgebildet.
- 4) Die erhobenen TEWL Werte korrelierten mit den erhobenen Strukturdefekten im Stratum corneum.

III. Sensitivitäts-/Spezifitätsanalyse

1) RCM und klinische Evaluation:

13 von 16 Patienten waren klinisch negativ in Bezug auf AKE an den Kontrollarealen. Drei von 16 Patienten hatten eine fraglich positive Testreaktion (\pm) im Kontrollareal, in der korrelierenden RCM Untersuchung konnten jedoch keine Zeichen eines AKE erhoben werden (falsch positives Testergebnis). Elf von 16 Patienten zeigten eine positive klinische Testreaktion auf die Allergenexposition, die sich in der RCM Untersuchung durch die charakteristischen RCM Parameter des AKE bestätigen lies. Vier von 16 Patienten zeigten eine negative klinische Testreaktion auf die Allergenexposition, die sich in der RCM Untersuchung durch das Fehlen der charakteristischen RCM Parameter des AKE bestätigte. Einer von 16 Patienten zeigte klinisch eine negative Testreaktion gegenüber den getesteten Allergenen; die RCM Untersuchung zeigte jedoch charakteristische Merkmale einer AKE (Spongiose, Bläschenbildung, Exozytose) (falsch negatives Testergebnis).

2) Statistische Analyse:

Die Analyse der Parameter hinsichtlich Ihrer Spezifität und Sensitivität ergab die höchste Signifikanz für eine Spongiose des Stratum spinosum (100% Sensitivität/92,6% Spezifität , $p < 0,05$), Spongiose des Stratum granulosum (95,8% Sensitivität, 96,3 % Spezifität , $p < 0,05$), und Exozytose (100% Sensitivität/74,1% Spezifität , $p < 0,05$) . Nach Durchführung der logistischen Regressionsanalyse zeigte sich für die Spongiose des Stratum spinosum die höchste Sensitivität eines Einzelparameters zum Aufzeigen eines AKE. Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten ergab, dass die Spongiose des Stratum spongiosum mit dem Vorhandensein einer Spongiose und einer Exozytose des Stratum granulosum korrelierte.

DISKUSSION

Die erschwerte Differenzierung eines allergischen und irritativen Kontaktekzems in der klinischen oder histologischen Untersuchung stellt eine fortwährende Herausforderung in der Dermatologie und Allergologie dar. Das Kontaktekzem gilt weiterhin als Ursache substantieller Morbidität in der Berufsdermatologie, mit weitreichenden finanziellen und psychosozialen Folgen. Auch von Seiten der expandierenden kosmetischen Industrie besteht seit vielen Jahren großes Interesse an der Untersuchung des Kontaktekzems, insbesondere zur Definition der Pathogenese, Dynamik und frühen Diagnose möglicher subklinischer Verlaufsformen.

In diesem Zusammenhang ist die Durchführung der Epikutantests (ECT) ein wichtiges allergologisches Vorgehen mit diagnostischer, therapeutischer und präventiver Dimension. Der ECT ist der derzeitige Goldstandard in der Diagnose des Kontaktekzems und zahlreiche Analysen mit Sensitivitäts-, und Spezifitätswerten von etwa 85 % zeigten die hohe Genauigkeit,

Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit dieses klinischen Tests. 10% bis 15% aller Kontaktekzeme werden jedoch immer noch als falsch negativ beurteilt, und häufig ist insbesondere die fehlende praktische Relevanz ein wichtiger Faktor in der Sinnhaftigkeit und Verwertbarkeit der Untersuchung. Während stark positive Reaktionen (+++) selten Schwierigkeiten bei der Interpretation machen, wird die patientenspezifische Relevanz schwach positiver (+/-) bis positiver (+) Reaktionen von verschiedenen Gruppen kontrovers diskutiert. Gleichzeitig gilt dieser „Bio-Essay“ lediglich als Momentaufnahme eines dynamischen immunologischen Ereignisses. Gleiches gilt für die Entnahme einer Hautprobe zur histologischen Analyse: die Probeentnahme erfolgt unter Lokalanästhesie, die Fixierung und Färbung des Gewebes erlaubt dann eine mikroskopische Untersuchung. Hierbei kommt es jedoch zu einer irreversiblen Gewebsschädigung mit Narbenbildung, wodurch eine wiederholte Probeentnahme z.B. zur Darstellung dynamischer Ereignisse meist praktisch nicht durchführbar ist.

Unter diesen Gesichtspunkten zielen neue Untersuchungsmethoden vor allem auf die Optimierung und/oder Ergänzung der bereits etablierten diagnostischen Möglichkeiten ab. RCM erlaubt die Untersuchung epidermaler und oberflächlich dermaler Strukturen bis zu einer Eindringtiefe von etwa 300 µm. Die Methode ist non-invasiv, d.h. wiederholte Untersuchungen desselben Haut-, oder Testareals ist möglich, ohne dass sie eine Gewebsschädigung nach sich zieht. Gleichzeitig kommt es zur Darstellung der entzündlichen Vorgänge unter intravitalen Bedingungen, wodurch sich wertvolle Einblicke in die Immunohistopathologie der Haut ergeben. Eine Fixierung oder Färbung des untersuchten Gewebes ist nicht notwendig, da die RCM Mikroskopie auf der Reflektanz endogener Chromophore beruht. Basierend auf den für die einzelnen zellulären und subzellulären Bestandteile der Haut definierten Brechungsindices können diese sichtbar gemacht und analysiert werden.

In einem ersten Schritt wurden im Rahmen dieser Studie die kinetischen Abläufe des Kontaktekzems untersucht. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erscheint eine Differenzierung dieser beiden ätiopathogenetisch heterogenen Ekzemreaktionen mit Hilfe des RCM möglich. Während das allergische Kontaktekzem vorwiegend durch Bläschenbildung, Spongiose und Exozytose gekennzeichnet ist, stehen beim IKE die oberflächlichen Strukturdefekte im Stratum corneum, die Ausbildung epidermaler Nekrosen sowie eine prominente epidermale Hyperproliferation im Vordergrund. Das Ausmaß der Spongiose in beiden Reaktionstypen ist vergleichbar, so dass wie in vorangegangenen histologischen Studien beschrieben, dies nicht zur weiteren Differenzierung herangezogen werden kann.

Bei der Untersuchung der ethnischen Einflüsse auf die Entstehung des IKE ergab sich in unserer Studie eine höhere Empfindlichkeit von Studienteilnehmern mit Lichttyp I-III. Die Schwellenkonzentrationen zur Induktion vergleichbarer IKE Reaktionen für Lichttyp V-VI waren ungleich höher, woraus sich indirekt eine verbesserte Schutzfunktion ableiten lässt. Auch hier

korrelierten die RCM Daten der oberflächlichen Strukturdefekte mit den Ergebnissen des TEWL Verfahrens. Unsere Ergebnisse bestätigen ähnliche Hinweise aus Vorstudien. Die Beurteilung des Erythems ist kritischer Bestandteil des Epikutantestes. Dieser Parameter ist jedoch gerade bei dunkler Hautfarbe schwierig zu erheben. Die Darstellbarkeit von zellulär-morphologischen Details mit Hilfe des RCM erschließt somit neue diagnostische Möglichkeiten in ethnisch heterogenen Patientengruppen.

In der Sensitivität/Spezifitätsanalyse konnte durch den Einsatz von RCM eine Sensitivität von über 95% für ausgesuchte RCM Parameter erreicht werden (z.B. Spongiose des Stratum spinosum). Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass die RCM insbesondere in Fällen mit unklaren Testergebnissen zur Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit des ECT beitragen könnte. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen ergaben erste Hinweise für die Anwendbarkeit von RCM bei klinisch unklaren Testergebnissen. Mit der Darstellung charakteristischer Parameter erlaubt die RCM die Differenzierung von negativen, fraglich positiven, subklinischen oder möglicherweise auch irritativen Testreaktionen.

Insgesamt sind die Ergebnisse dieser Studien von vorläufigem Charakter, und umfangreichere klinische Studien sollten den Einsatz des RCM im täglichen Gebrauch weiter untersuchen. Seit Jahren erfolgt der versuchsweise Einsatz des RCM in der kosmetischen Industrie, als Routinediagnostik hat es die bisher angewandten in-vitro Tests jedoch bislang nicht abgelöst. Hier liegt die Schlüsselposition an den dermatologischen und allergologischen Kliniken um die Standardisierung der Testverfahren in umfangreichen klinischen Untersuchungen zu etablieren.

Schlussfolgerung

Die Daten dieser Studie zeigen den möglichen Einsatz von RCM als ergänzende Methodik zur Evaluation von Kontaktekzemen. Der Vorteil gegenüber der rein klinischen Evaluation ist die hohe Auflösung des Mikroskops, durch die sich neuartige, morphologische Einblicke in die Abläufe, Dynamik und Unterschiede des allergischen und irritativen Kontaktekzems ergeben. Aus der Möglichkeit zur nicht-invasiven Dokumentation des klinischen Verlaufs und des therapeutische Ansprechens leiten sich eine Vielzahl potentieller Anwendungsmöglichkeiten in der experimentellen und klinischen Dermatologie, der dermatologischen Therapie sowie der kosmetischen Industrie ab.

ANTEILSERKLÄRUNG

Susanne Astner hat an den unten angeführten Publikationen ihre Funktion in der Studienkonzeption, dem Studiendesign, der Patientenrekrutierung, der Studiendurchführung und Datenakquisition sowie der kritischen Analyse ausgeübt, wodurch sich im Weiteren auch ihre Rolle als Erstautorin der angegebenen Manuskripte erklärt.

Susanne Astner
Antragssteller

In the original articles listed below Susanne Astner exerted her principal role in the conception and design of the study, patient recruitment, study conduct and data acquisition as well as the critical data analysis, hence her position as first author of the indicated manuscripts.

Salvador González MD, PhD
Studienbetreuer

Susanne Astner hat an den unten angeführten Publikationen ihre Funktion in der Studienkonzeption, dem Studiendesign, der Patientenrekrutierung, der Studiendurchführung und Datenakquisition sowie der kritischen Analyse ausgeübt, wodurch sich im Weiteren auch ihre Rolle als Erstautorin der angegebenen Manuskripte erklärt

Univ. Prof. Dr. med. Eggert Stockfleth
Promotionsbetreuer

- * Astner S, González S, Gonzalez E. Non-Invasive evaluation of Allergic and Irritant Contact Dermatitis by in-vivo reflectance confocal microscopy. *Dermatitis* 2006;17(4):182-91
- * Astner S, Burnett N, Cheung AC, Rius- Díaz F, Doukas AG, González S and González E. The impact of skin color on the susceptibility to irritant contact dermatitis: a non-invasive evaluation. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54:458-65
- * Astner S, Gonzalez E, Cheung AC, Rius-Diaz F, González S. Pilot Study on the Sensitivity and Specificity of in-vivo Reflectance Confocal Microscopy in the diagnosis of Allergic Contact Dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005;53(6):986-92
- * Astner S, Gonzalez E, Cheung AC, Rius-Diaz F, Mihm, MC, Doukas, A, González S. The kinetics of allergic and irritant contact dermatitis in vivo – a non-invasive evaluation. *J Invest Dermatol* 2005; 124:351-359

PUBLIKATIONEN

- * Astner S, González S, Gonzalez E. Non-Invasive evaluation of Allergic and Irritant Contact Dermatitis by in-vivo reflectance confocal microscopy. *Dermatitis* 2006;17(4):182-91
- * Astner S, Burnett N, Cheung AC, Rius- Díaz F, Doukas AG, González S and González E. The impact of skin color on the susceptibility to irritant contact dermatitis: a non-invasive evaluation. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54:458-65
- * Astner S, Gonzalez E, Cheung AC, Rius-Diaz F, González S. Pilot Study on the Sensitivity and Specificity of in-vivo Reflectance Confocal Microscopy in the diagnosis of Allergic Contact Dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005;53(6):986-92
- * Astner S, Gonzalez E, Cheung AC, Rius-Diaz F, Mihm, MC, Doukas, A, González S. The kinetics of allergic and irritant contact dermatitis in vivo – a non-invasive evaluation. *J Invest Dermatol* 2005; 124:351-359

CURRICULUM VITAE

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

PUBLIKATIONSLISTE

Originalarbeiten

- Astner S, Dietterle S, Otberg N, Rówert-Huber HJ, Stockfleth E, Lademann J. Clinical applicability of in-vivo fluorescence confocal microscopy for non-invasive diagnosis and therapeutic monitoring of non-melanoma skin cancer. J Biomedical Optics, 2008
- Lademann J, Richter H, Astner S, Patzelt A, Knorr F, Sterry W and Antoniou Ch. Determination of the thickness and structure of the skin barrier by in vivo laser scanning microscopy. Laser Phys Lett. 2008; 5 (4):311–315
- Stieler K, Astner S, Bohner G, Garcia Bartels N, Proquitté H, Sterry W, Haas N, Blume-Peytavi. Encephalocraniocutaneous Lipomatosis with Didymosis aplasticopsilolipara. Arch Dermatol 2008; 144:266-268
- Ulrich M, Maltusch A, Rius-Diaz F, Rówert J, González S, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Optimization of evaluation parameters for the diagnosis of actinic keratoses by in vivo reflectance Confocal Microscopy. J Dermatol Surg 2008 (Epub ahead of print)
- Holzmann R, Astner S, Forschner T, Sterry G. Scar sarcoidosis in a child. Case report of successful treatment with the pulsed dye laser. J Dermatol Surg 2008; 34(3):393-6
- Ulrich M, Stockfleth E, Roewert J and Astner S. Noninvasive diagnostic tools for nonmelanoma skin cancer. Br J Dermatol 2007, 157 S2:56-8
- Yamashita T, Akita H, Astner S, Lerner EA, González S. The evaluation of the melanin and blood flow changes in UVA irradiated skin by reflectance-mode confocal microscopy. Exp Dermatol. 2007; 16:905-911
- Astner S, Wu A, Chen J, Neena Philips, Rius-Diaz F, Parrado C, Mihm MC, Goukassian DA, Pathak MA, González, S. Dietary lutein/zeaxanthin partially reduces photoaging and photocarcinogenesis in chronically UVB irradiated SKH-1 hairless mice. Skin Pharmacol Physiol 2007;20:283-291
- Ulrich M, Maltusch A, Rówert J, González S, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Actinic keratoses: non- invasive diagnosis for field cancerisation. Br J Dermatol 2007; 156(3):13-17

- Ulrich M, Forschner T, Röwert J, González S, Stockfleth E, Sterry W, Astner S. Differentiation between actinic keratoses and disseminated superficial actinic porokeratoses with reflectance confocal microscopy. *Br J Dermatol* 2007; 156(3):47-52
- Astner S, González S, Gonzalez E. Non-Invasive evaluation of Allergic and Irritant Contact Dermatitis by in-vivo reflectance confocal microscopy. *Dermatitis* 2006;17(4):182-91
- Astner S, Burnett N, Cheung AC, Rius- Díaz F, Doukas AG, González S and González E. The impact of skin color on the susceptibility to irritant contact dermatitis: a non-invasive evaluation. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54:458-65
- Vila-Echague A, Astner S, Ahchean AC, Flotte, TJ, Anderson RR. Multiple Apocrine hidrocystoma of the face treated with Smoothbeam laser. *Arch Dermatol* 2005;141(11):1365-7
- Astner S, Gonzalez E, Cheung AC, Rius-Diaz F, González S. Pilot Study on the Sensitivity and Specificity of in-vivo Reflectance Confocal Microscopy in the diagnosis of Allergic Contact Dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005;53(6):986-92
- Astner S, Anderson RR. Laser treatment of vascular lesions. *Dermatologic Therapy* 2005;(18): 267-281
- Tannous ZS and Astner S. Utilizing fractional resurfacing in the treatment of therapy-resistant melasma. *J Cosmet Laser Ther* 2005;7(1):39-43
- Astner S, Gonzalez E, Cheung AC, Rius-Diaz F, Mihm, MC, Doukas, A, González S. The kinetics of allergic and irritant contact dermatitis *in vivo* – a non-invasive evaluation. *J Invest Dermatol* 2005; 124:351-359
- Curiel-Lewandrowski C, Williams CM, Swindells KJ, Tahan SR, Astner S, Frankenthaler RA, González S. Use of in vivo Confocal Microscopy in Malignant Melanoma. An Aid in Diagnosis and Assessment of surgical and non-surgical therapeutic approaches. *Arch Dermatol* 2004;140(9):1127-32
- González S, Astner S, Wu A, Gaukassian D, Pathak M. Dietary lutein/ zeaxanthin decreases UVB induced epidermal hyperproliferation and acute inflammation in hairless mice. *J Invest Dermatol* 2003;121(2):399-405

- Astner S. and R. Rox Anderson. Skin Phototypes 2003. Artikel als Teil der 'Festschrift', in memoriam Dr. Thomas B. Fitzpatrick. J Invest Derm 2004;122(2): XXX-XXXI

Buchbeiträge

- 2005 Strasswimmer J, Astner S., González S. Technical advances in diagnosis in the 21st Century: The non-invasive biopsy. In: Dermatología Práctica Iberoamericana. Atlas. enfermedades sistémicas asociadas y terapéutica. Cali, Mexico. eds. Torres V, Mihm MC, Carracho F, Sober AJ, Carpintero-Sanchez, I. First Edition
- 2006 Benvenuto Andrade C, Agero ALC, Patel Y, Rajadhyasksha M, Halpern A, González S, Astner S. Applications of reflectance confocal microscopy in clinical dermatology. In: Bioengineering of the skin. Skin Imaging and Analysis. Eds Klaus-P. Wilhelm, Peter Elsner, Enzo Berardesca E, Howard I. Maibach. Informa Healthcare, New York - London. Second Edition. Kapitel 26, pp 339-352.
- 2006 Astner S. Hautkrebs – ein Leitfaden für die Praxis. UNIMED Verlag Ag, Bremen-London-Boston. Diagnostik von Hauttumoren. ed. Stockfleth E. Kapitel 3. pp 26-29.
- 2007 Astner S., Ulrich M, Cuevas J, González S. Porokeratosis. Reflectance Confocal of Cutaneous Tumors. Salvador González, Allan C. Halpern and Melissa Gill (eds), 2007 Informa Healthcare, London, UK.
- 2007 Astner S., Ulrich M, Cuevas J, González S. Actinic Keratosis. Reflectance Confocal Microscopy of Cutaneous Tumors. Salvador González, Allan C. Halpern and Melissa Gill (eds), 2007 Informa Healthcare, London, UK.

ERKLÄRUNG

„Ich, [Susanne Astner], erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: [In-vivo Reflektanz konfokale Mikroskopie zur non-invasiven Diagnostik des akuten Kontaktekzems] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe. „

Datum, 25.03.2008

Unterschrift: Susanne Astner (Antragssteller)

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mit dieser Arbeit meinen Eltern und meiner Familie für die rücksichtsvolle, uneingeschränkt großzügige und geduldige Unterstützung danken. Durch ihr Vorbild, ihre Bescheidenheit und ihre anspruchsvolle Zuversicht waren alle Herausforderungen leichter zu bewältigen. Besonderer Dank gilt auch meinen Freundinnen, die mir in diesen arbeitsreichen Jahren immer treu zur Seite standen.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Forschungsbetreuer, Mentor und väterlichen Freund Prof. Dr. Salvador González, der mir in meinen Jahren in Boston mit seiner Zeit und Aufmerksamkeit uneingeschränkt zur Seite stand. Seine konstruktive Kritik und unendlicher Arbeitseinsatz trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Lehrern, Professoren und ärztlichen Vorbildern, allen vorab Prof. TB Fitzpatrick, Apostolos Doukas, Ernesto Gonzalez, Rox R. Anderson und Martin C. Mihm. Ihre Inspiration hat mich in all den Jahren vorangetrieben und wird mich ein Leben lang begleiten.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen an der Harvard Medical School danken: Martine Sifakis (Tsingos); Kirsty Swindells, Maritza Middelkamp-Hup, Agustina Vila-Echague, Clemens Alt und all die anderen ‚Wellman Rats‘. Es war eine Freude mit ihnen zu arbeiten und jeder Tag ein gemeinsames neues Abenteuer. Mein Dank gilt auch Beverly Dammin die sich in ihrer Selbstlosigkeit jeden Tag übertraf und deren mütterliche und freundschaftliche Aufmerksamkeit meinen gesamten Amerikaaufenthalt überstrahlten.

Bei meinem Betreuer Prof. Stockfleth und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die umfassende Betreuung und Anleitung beim Verfassen dieser Arbeit bedanken. Des Weiteren möchte ich Prof. Stockfleth danken, dass er sich so für meine Rückkehr nach Europa einsetzte, und dafür dass ich seither für alle Fragen ein offenes Ohr bei ihm finde. Sein unermüdlicher Einsatz ermöglichte bereits die Verwirklichung vieler innovativer Projekte an der Charité, und trägt die konfokale Mikroskopie aus der wissenschaftlichen Entwicklung in die klinische Zukunft.

Schlussendlich sei diese Arbeit all denen gewidmet, die an der Verwirklichung dieses Projektes mitgearbeitet haben, und die Danksagung schließt insbesondere die vielen Patienten ein, die so bereitwillig an den Studien mitgearbeitet haben, und dadurch einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung der konfokalen Mikroskopie geliefert haben.