

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

DISSERTATION

Laser-Scan-Mikroskopische Untersuchung
epithelialer Hauttumoren

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Dietterle

aus Eberswalde

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr.-Ing. J. Lademann

2. Prof. Dr. med. H. Merk

3. Prof. Dr. rer. nat. J. Beuthan

Datum der Promotion: 21.11.2008

Ich widme meine Dissertation allen Patienten, die an epithelialen Hauttumoren leiden und all denen, die an ihrer Heilung mitarbeiten. Ich hoffe, mit der Studie einen Beitrag leisten zu können, ihre Arbeit zu erleichtern und den Patienten die belastende invasive Diagnostik möglichst zu ersparen.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Die Haut	2
1.1.1	Aufbau der Haut	2
1.1.2	Funktionen der Haut.....	5
1.1.3	Penetration von Substanzen in die Haut	7
1.2	Risikofaktoren zur Entstehung epithelialer Hauttumoren	8
1.3	Vorsorge / Nachsorge	9
1.4	Diagnostik	9
1.5	Therapie	10
1.6	Basalzellkarzinom (BCC)	10
1.6.1	Klinisches Bild	11
1.6.2	Histologie.....	11
1.7	Aktinische Keratose (AK)	11
1.7.1	Klinisches Bild	12
1.7.2	Histologie.....	12
1.8	Spinalzellkarzinom (SCC)	13
1.8.1	Klinisches Bild	13
1.8.2	Histologie.....	13
1.9	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	14
2.1	Probanden	14
2.2	Histologie	15
2.3	Konfokales Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop (KFLSM)	16
2.4	Einsatz des KFLSM am Probanden	19
2.5	Substanzen	20
2.5.1	Fluorescein.....	20
2.5.2	Imiquimod.....	21
2.6	Datenanalyse und statistische Auswertung	22

3	Ergebnisse	23
3.1	Makroskopische Aufnahmen	23
3.2	KFLSM-Aufnahmen gesunder Haut.....	24
3.3	KFLSM- und histologische Aufnahmen des BCC	26
3.4	KFLSM- und histologische Aufnahmen der AK.....	29
3.5	KFLSM- und histologische Aufnahmen des SCC.....	32
3.6	BCC-Verlaufsbilder mit dem KFLSM unter Imiquimod-Therapie	35
3.7	Morphometrische Analyse der KFLSM-Aufnahmen.....	39
3.7.1	Messprinzip	40
3.7.2	Statistische Auswertung.....	41
4	Diskussion.....	47
4.1	Zusammenfassung	51
4.2	Probleme und deren mögliche Lösung.....	51
4.3	Ausblick.....	52
5	Anhang	54
6	Literaturverzeichnis.....	74
7	Abbildungsverzeichnis.....	81
8	Lebenslauf	85
9	Eidesstattliche Erklärung	86
10	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AK	Aktinische Keratose
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BCC	Basalzellkarzinom
bzw.	beziehungsweise
CCD	Charge-coupled device
cm	Zentimeter
df	Anzahl der Freiheitsgrade
d. h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EMA	European Medicines Agency
et al.	et alteri (und andere)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	Human-Papilloma-Virus
IL	Interleukin
KFLSM	Konfokales Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop
LSM	Laser-Scan-Mikroskop
M.	Musculus
max.	maximal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
N	Anzahl, Umfang der Stichprobe
nm	Nanometer
NMSC	Non-melanoma skin cancer
o. g.	oben genannte
Pat.-Nr.	Patientennummer
PUVA	Psoralen plus UVA
RCM	Konfokales Reflektions-Laser-Scan-Mikroskop
S.	Stratum
SCC	Spinalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom
TNM	Staging, Klassifikation der Ausdehnung des Primärtumors, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen
u. a.	und andere
UV	ultraviolett
UVA	Ultraviolett-A, niedrigenergetische UV-Strahlung ($\lambda = 320 - 400 \text{ nm}$)
v. d.	von der
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation der UNO)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung epithelialer Hauttumoren. Zu diesen gehören Melanome und „Nicht-Melanome“, der sog. helle Hautkrebs. Letzterer wird im englischsprachigen Raum auch „Non-melanoma skin cancer“ (NMSC) genannt und stellt die häufigste maligne Neubildung der Haut dar. Dazu gehört u. a. das Basalzellkarzinom (BCC) mit einem Anteil von 65 Prozent und das Spinalzellkarzinom (SCC) mit einem Anteil von 20 Prozent an allen NMSC [1]. In diesen Zusammenhang stellt die Aktinische Keratose (AK) die häufigste präkanzeröse Hautveränderung mit einer Prävalenz von bis zu 80 Prozent bei älteren Menschen mit Hauttyp I oder II dar [2, 3]. Diese Zahlen erklären die große Bedeutung der Forschung auf dem Gebiet der frühen Diagnose dieser Erkrankungen. Gegenwärtig erfolgt die Diagnosestellung in der klinischen Untersuchung sowie histologisch durch eine Probeexzision. Diese Verfahren haben jedoch Nachteile. So ist die klinische Beurteilung wegen der großen Zahl an Differenzialdiagnosen unsicher, während die Probeexzision körperliche Belastungen für den Patienten mit sich bringt, schmerzhaft, zeitaufwändig sowie mit obligater Narbenbildung verbunden ist. Es wäre somit wünschenswert, ein Verfahren zur Hand zu haben, das eine morphologische Analyse ähnlich einer histologischen Untersuchung erlaubt, jedoch weniger invasiv und zeitaufwändig ist. Analog zur konventionellen Mikroskopie wurde ein hochauflösendes lasergestütztes Verfahren entwickelt, welches die Haut in horizontalen Schnitten optimal darstellen kann. Mit der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie (LSM) gibt es einen derartigen nicht-invasiven Ansatz zur Realisierung dieser Aufgabenstellung. Von diesem Verfahren existieren zwei technische Varianten, die Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie (KFLSM) und die Reflektions-Laser-Scan-Mikroskopie (RCM). Hieraus ergibt sich die Möglichkeit zur Untersuchung der Haut in vivo mit Darstellung der einzelnen Schichten der jeweiligen Probe in zellulärer Auflösung. Es erlaubt die Darstellung der Architektur der Haut vom Stratum corneum bis zu den Papillen der Dermis mit einer Eindringtiefe von maximal 250 µm. Dabei wird jeweils nur die in der Fokalebene des Mikroskops liegende Zellschicht mit hoher Resolution abgebildet, wodurch die charakteristischen Merkmale der Zellen dieser Schicht sichtbar werden. Deutlich erkennbar sind Zellkerne, Zytoplasma, Kapillaren der Dermis, Haarfollikel und andere Adnexstrukturen. Das LSM wurde bereits erfolgreich in der Dermatologie zur Darstellung der Hautoberfläche [4] und von Hautpilzen eingesetzt [5]. Gonzalez, Sackstein et al beschreiben

die Echtzeit-Beobachtung der Leukozytenmigration aus den Gefäßen in BCC mit Hilfe eines RCM [6]. Tannous, Mihm et al. untersuchten mit dem gleichen Gerät auch Lentigo maligna [7] und Melanome, während Gerger, Koller et al. die Spezifität und Sensitivität des RCM bei der Diagnose von Melanomen und Nicht-Melanomen analysieren [8]. Ebenfalls mit dem RCM versuchen Agero, Busam et al. pigmentierte BCC zu charakterisieren [9].

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des KFLSM besteht in der Kontrolle des Heilungsverlaufes nach einer Therapie mit topischer Chemotherapie oder Immuntherapie [10, 11], zweier nicht-invasiver Verfahren zur Behandlung des hellen Hautkrebses.

Diese Methoden könnten sehr Erfolg versprechend sein. So könnte im Gegensatz zur Histologie eine Diagnose oder der Verlauf der Erkrankung bereits während der Untersuchung festgestellt werden.

Ziel dieser Studie ist es, die Möglichkeiten des KFLSM für die Diagnose der o. g. Hauttumoren sowie deren Therapieverlauf zu evaluieren.

1.1 Die Haut

Die Haut stellt das größte Organ des Menschen dar. Beim Erwachsenen nimmt sie eine Fläche von ca. 1,6 – 2 m² [1] ein. Ihre Dicke beträgt, abhängig von der anatomischen Lokalisation, 1,5 – 4 mm. Sie umschließt den menschlichen Körper und ist Abgrenzung und Bindeglied zur Umwelt in einem.

1.1.1 Aufbau der Haut

Im Folgenden wird die Schichtung der Haut anhand der Routinehistologie im Vertikalschnitt dargestellt.

Die Haut weist drei Schichten auf: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut).

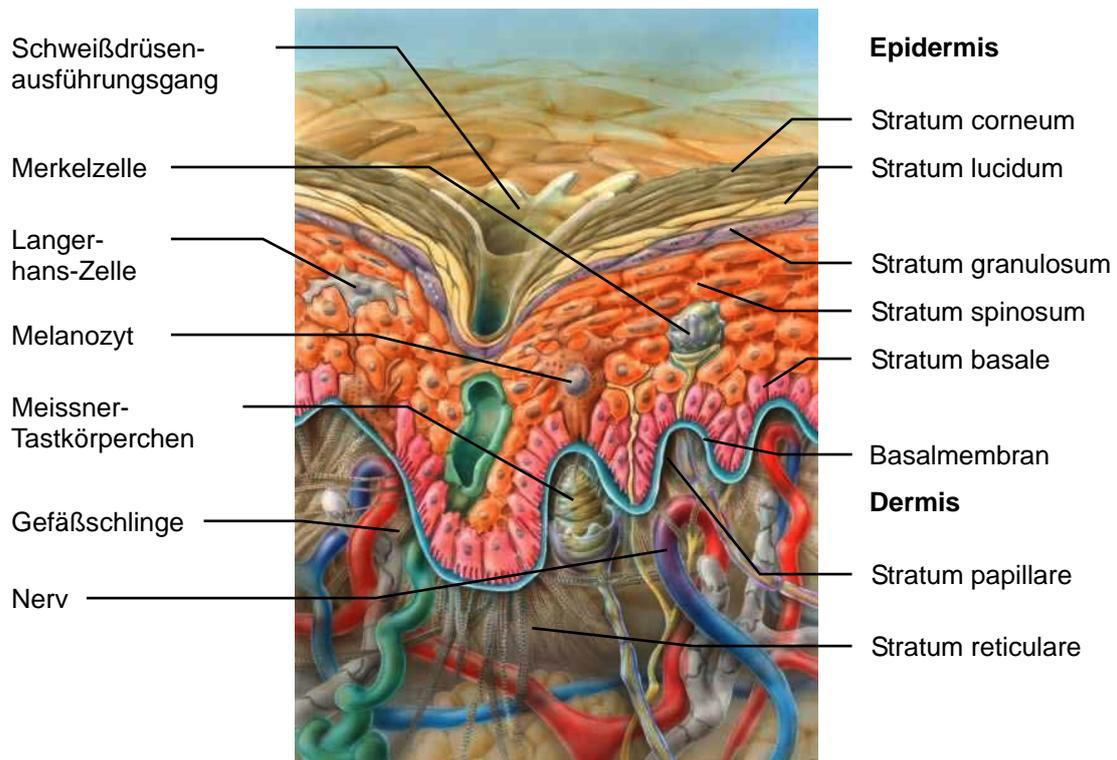


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Kutis

(Quelle: www.scf-online.com, Ausgabe 29, Cognis Deutschland GmbH & Co KG.)

Die **Epidermis** ist die äußere Hautschicht. Sie ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel [2] und besteht im Wesentlichen aus Keratinozyten, die in der Keimschicht (Stratum basale) ständig neu gebildet werden und in Richtung der Hautoberfläche wandern. Dabei verändern sie ihre Form, verlieren ihren Kern und werden so zu Korneozyten (Hornzellen) umgewandelt. Diese werden dann an der Oberfläche abgeschilfert. Durch diesen Reifungsprozess, der etwa 4 Wochen dauert, kommt es zur typischen Schichtung der Epidermis [12].

Im **Stratum basale** befinden sich die Basalzellen. Sie sind klein und zylindrisch. Ihre Längsachsen weisen in Richtung der Hautoberfläche. Die Basalzellen besitzen einen runden Zellkern mit feiner Chromatinstruktur [2]. Neben den Basalzellen befinden sich hier auch Zellen des peripheren Nervensystems (Merkelzellen) [12]. Diese sind mit afferenten Nervenfasern verbunden und leiten Druck- und Tastempfindungen an das zentrale Nervensystem (ZNS). Eine weitere Zellart des Stratum basale sind die Melanozyten. Diese produzieren das Melanin, welches sie mittels dendritischer Ausläufer an die Keratinozyten weitergeben [12]. Das Melanin absorbiert UV-Strahlung und schützt somit die Keratinozyten vor DNS-Schäden.



Abb. 2: Melanozyt, schematische Darstellung

(Quelle: www.scf-online.com, Ausgabe 22, Cognis Deutschland GmbH & Co KG.)

Aus den basalen Keratinozyten werden durch Differenzierung Zellen der Stachelzellschicht (**Stratum spinosum**). Ihr Zellkern wird bläschenförmig. Der Nukleolus ist deutlich sichtbar, und die Syntheseaktivität der Zellen nimmt zu. Ihren Namen erhält diese Zellschicht von Zell-Zell-Kontakten (Desmosomen), die den Zellen ein stacheliges Aussehen geben [12]. Im Stratum spinosum befinden sich die dendritischen Zellen des Immunsystems – die Langerhans-Zellen [12].

Im **Stratum granulosum** (Körnerzellschicht) finden das Absterben der Keratinozyten und die Bildung toter, kernloser Korneozyten statt. Hier sind die Zellen abgeflacht und weisen in ihrem Innern Granula mit dicht gepackten Zytokeratinfilamenten und Filagrin auf [12]. Letzteres ist Voraussetzung für die Verhornung der Oberhaut. Dazu setzen die Zellen lipidhaltige Granula für die Bildung der interzellulären Lipidkomponenten der Hornschicht frei [13].

Das **Stratum lucidum** stellt eine dünne Grenzschicht zwischen dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum dar, welches nur bei dicker Epidermis (Handflächen, Fußsohle) als dünnes, blasses Band im histologischen Schnitt sichtbar ist [13].

Die äußerste Schicht der Epidermis ist das **Stratum corneum** oder Hornschicht. Sie besteht aus den dickwandigen, kernlosen Korneozyten, die durch mehrlagige Lipidschichten miteinander verbunden sind [13, 2].

Die Epidermis ist mit der darunterliegenden **Dermis** durch eine **Basalmembran** verbunden [14]. Diese Schicht beginnt mit den Hemidesmosomen in den Basalzellen der Epidermis, von denen Filamente in die Lamina densa der Basalmembran ragen. Die Lamina densa ihrerseits besteht aus einem Kollagengeflecht und ist mit der Dermis über Ankerfilamente verbunden [13].

Die Dermis ist im Wesentlichen aus kollagenen Fasern aufgebaut, die ein scherengitterförmiges Geflecht bilden. Weitere Bestandteile sind elastische Fasern, verschiedenen Bindegewebszellen, neuronale Leitungsbahnen und Entzündungszellen. Alle diese Fasern und Zellen sind in eine Grundsubstanz aus neutralen und sauren Mukopolysacchariden eingebettet. Die Dermis gliedert sich in zwei Schichten, die sich auch im vorherrschenden Kollagentyp unterscheiden.

Das **Stratum papillare** enthält hauptsächlich Typ-III-Kollagen. Die Fasern sind dünn und locker gewebt. Das Stratum papillare ist fingerförmig in die Epidermis vorgestülpt. Es enthält Fibroblasten, Blutgefäße, Nerven und Entzündungszellen (Mastzellen, Lymphozyten und dendritische Zellen) [12]. Die Blutgefäße bilden subepidermal einen horizontalen Gefäßplexus, welcher durch vertikal verlaufende Arteriolen und Venolen mit dem tiefen Gefäßplexus des Stratum reticulare verbunden ist. Aus dem subepidermalen Gefäßplexus ragen vertikale Gefäßschlingen in die fingerförmigen Ausziehungen der Papillen. Durch diese Blutgefäße wird die Epidermis versorgt [13].

Im **Stratum reticulare** finden sich hauptsächlich breite Fasern vom Kollagentyp I, die ein Geflecht bilden. Hier befinden sich der tiefe Gefäßplexus sowie die Nervenbahnen und Lymphgefäße. Im Stratum reticulare sind die Hautanhangsgebilde (Haarfollikel, Talgdrüsen, Schweißdrüsen und Nägel) in ein Bindegewebsgeflecht eingebettet.

Die **Subkutis** besteht aus einem grobmaschigen Bindegewebsgeflecht, das die Fettgewebsläppchen umschließt. Einzelne Fettzellen enthalten jeweils einen großen Fetttropfen. Das subkutane Bindegewebe ist nach oben in der Dermis, nach unten mit den Faszien verankert. In der Subkutis treten nah beieinander liegend größere Blutgefäße und Nerven sowie in die Tiefe führende Lymphabflussbahnen auf.

1.1.2 Funktionen der Haut

Die Haut erfüllt eine Vielzahl verschiedener Funktionen [1]. Diese gliedern sich im Wesentlichen in folgender Weise:

Schutzfunktion: Mit ihrem Säureschutzmantel, der einen pH-Wert von 5,5 aufweist, wirkt sie antimikrobiell, die Hornschicht stellt zusätzlich eine mechanische Barriere

gegenüber Mikroorganismen dar. Sollten dennoch Keime z. B. durch Verletzungen der Haut ins Innere gelangen, tritt eine lokale Entzündung als Abwehrreaktion auf.

Die fest-flexible Hornschicht und das Bindegewebe mit seinen Fetteinlagerungen bewirken eine hohe mechanische Stabilität und Flexibilität der Haut und schützen so den Organismus vor mechanischen Einwirkungen (Druck-, Zug- und Scherkräften).

Das subkutane Fettgewebe wirkt thermisch isolierend, insbesondere gegen Auskühlung. Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur dient die reaktive Temperaturregulation, die im Wesentlichen in einer Regulation der Durchblutung und der Schweißdrüsensekretion besteht. 90 Prozent des Blutstroms durch die Haut dienen dem Transport von Wärme und nur 10 Prozent der Ernährung [1]. So transportiert das Blut Wärme aus dem Innern des Körpers an die Oberfläche, wo sie beim Verdunsten des Schweißes abgeführt wird („Verdunstungskälte“).

Durch Reflexion von Licht am Hautoberflächenfilm und der Hornschicht wird die Haut teilweise vor Strahlennoxen geschützt. Das Melanin, welches die Zellkerne der Basalzellschicht umgibt, absorbiert einen weiteren Teil der einfallenden UV-Strahlung und schützt damit die in Mitose befindlichen und deshalb besonders gefährdeten Zellen vor Mutationen. Kommt es dennoch zu Schädigungen der DNA oder der Strukturproteine, verfügt die Haut über enzymatische Reparaturmechanismen.

Zum Schutz vor chemischen Noxen dient die Pufferkapazität des Hautoberflächenfilms. Das durch die zahlreichen Talgdrüsen sekretierte Sebum, ein Gemisch aus Triglyceriden, Fettsäuren, Wachsesteren und Vitamin-E-ähnlichen Squalen schützen die Haut vor der Schädigung durch freie Radikale. Die Hornschuppen des Stratum corneum hemmen die Einwirkungen von Säuren und Basen.

Die interzelluläre Lipidschicht bildet eine Penetrationsbarriere gegenüber Makromolekülen. Kleinere Moleküle, die entlang der interzellulären Lücken in die Haut penetrieren, werden durch Enzyme metabolisiert.

Abwehrfunktion: Die Haut reagiert auf das Eindringen von Mikroorganismen zum Beispiel durch eine Aktivierung von Makrophagen, einem Teil des angeborenen unspezifischen Abwehrmechanismus. Darüber hinaus bedient sich die Haut einer adaptiven spezifischen Abwehrreaktion, z. B. in Form der Aktivierung von T-Lymphozyten.

Grenzfunktion: Die Haut kontrolliert den Stoffaustausch mit der Umwelt. Ein Hautverlust von mehr als 20 Prozent kann bereits letal verlaufen, da der Organismus den Verlust an Flüssigkeit, Elektrolyten und Eiweißen nicht ausgleichen kann.

Sinnesfunktion: Freie Nervenendigungen und Rezeptororgane vermitteln ein Berührungs-, Druck-, Temperatur- und Schmerzempfinden. Zu ihnen gehören die Vater-Pacini-Lamellenkörperchen, die der Wahrnehmung von Vibrationen dienen. Sie befinden sich hauptsächlich in der Subkutis. Die Meissner-Tastkörperchen liegen in den Bindegewebspapillen der Dermis und sind Berührungsrezeptoren. Freie Nervenendigungen durchziehen die Dermis bis zur Epidermis. Sie nehmen mechanische, thermische und Schmerzreize auf. Im Stratum reticulare befinden sich die Ruffini-Körperchen, die Dehnungsrezeptoren darstellen. Eine weitere Gruppe von Mechanorezeptoren sind die Krause-Körperchen [15, 16].

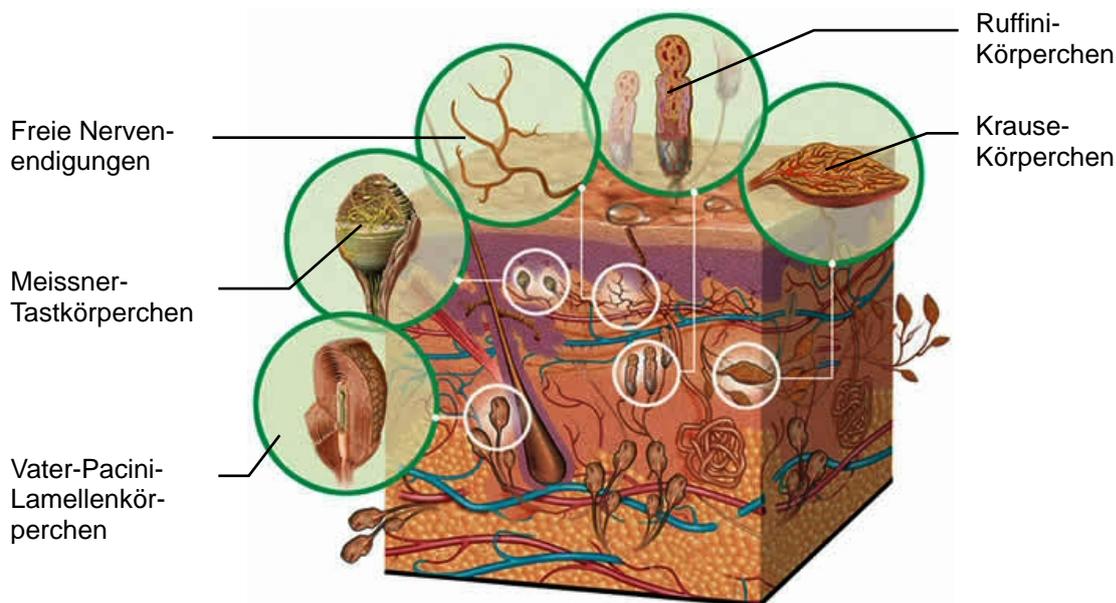


Abb. 3: Rezeptoren der Haut, schematische Darstellung

(Quelle: www.scf-online.com, Ausgabe 30, Cognis Deutschland GmbH & Co KG.)

Speicher- und Stoffwechselfunktion: Die Haut ist in der Lage, auf Defizite bzw. Überangebote an Wasser und Fett durch Einlagerung und Abgabe regulatorisch zu reagieren. Der normale durchschnittliche Wasserverlust über die Haut beträgt pro Tag etwa 500 ml. Bei schwerer körperlicher Arbeit und hohen Lufttemperaturen kann dieser Wert jedoch auf 10 Liter pro Tag ansteigen [17]. Auf photochemischem Wege gelingt der Haut eine Vitamin-D-Synthese. Chronischer Lichtmangel führt deshalb zu Rachitis.

1.1.3 Penetration von Substanzen in die Haut

Zum besseren Verständnis sollen im folgenden die Mechanismen der Penetration von Substanzen in die Haut erörtert werden, um damit das Eindringen und die Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes und des Wirkstoffes Imiquimod zu erklären. Die Penetration von Substanzen durch das Stratum corneum hängt von dessen

1 Einleitung

Permeabilität ab. Diese wiederum wird von der Dicke der Hornschicht, der Dichtigkeit seiner Zellpackung und der intrazellulären Struktur bestimmt, weiterhin vom Lipidgehalt und der molaren Zusammensetzung des Stratums. Auch die Hydratation, das Lebensalter, eventuell vorhandene Verletzungen und pathologische Hautveränderungen (z. B. Ekzeme) [18] beeinflussen seine Permeabilität.

Prinzipiell existieren drei Möglichkeiten der Penetration von Substanzen in die Haut [19]:

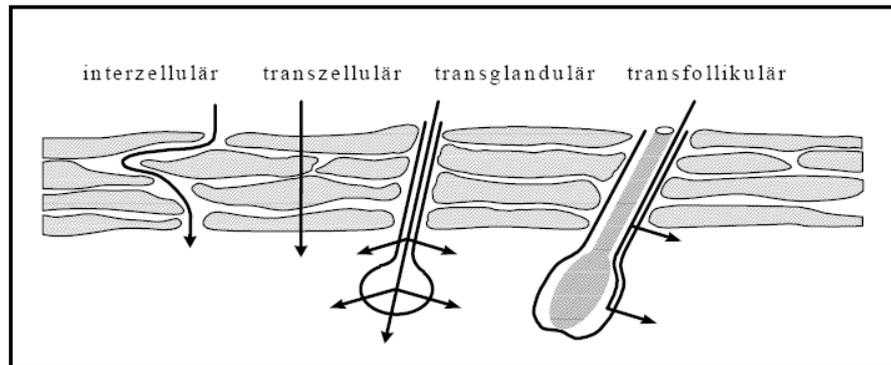


Abb. 4: Penetrationswege durch das Stratum corneum (nach Neubert et al., 2001)

Interzelluläre Penetration: Die Substanzen gelangen durch die Zellzwischenräume durch das Stratum corneum.

Transzelluläre Penetration: Die Substanzen passieren die Zellen.

Penetration entlang von Hautanhangsgebilden: Die Substanzen dringen entlang von Schweißdrüsen, Talgdrüsen [19] und Haarfollikeln zur Dermis vor. Studien zeigten, dass aktive Haarfollikel, die also aktuell Haarwachstum und Talgproduktion betreiben, einen erheblichen Beitrag zum Transport von Stoffen in die Dermis leisten [20, 21, 22, 23]. Das Fluoreszein verteilt sich zunächst entlang der Zellzwischenräume. Dabei gelangt es auch teilweise in das Zytoplasma und danach bis zum Zellkern, wo der Farbstoff akkumuliert wird [24].

1.2 Risikofaktoren zur Entstehung epithelialer Hauttumoren

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Ausbildung von epithelialen Hauttumoren gehören: chronische, freizeit- und berufsbedingte UV-Exposition (künstliche und natürliche), besonders im Kindesalter. In diesem Zusammenhang besitzt UVB-Exposition (280 – 320 nm) das höchste karzinogene Potential durch Induktion von genetischen Mutationen in den betroffenen Keratinozyten, aber auch UVA (320 -400 nm) und UVA in Verbindung mit Psoralen (PUVA) sowie Röntgen-Strahlung und Immunsuppression sind Risikofaktoren für die Entstehung von BCC, AK oder SCC.

Personen in fortgeschrittenem Lebensalter sowie männlichen Geschlechts weisen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auf. So haben in Europa Männer über 70 Jahre ein 34%iges, Frauen über 70 Jahre ein 18% Risiko, an AK zu erkranken. Weitere Risikofaktoren für BCC, AK und SCC sind bestimmte konstitutionelle Hautmerkmale, wie z. B. ein heller Hauttyp nach Fitzpatrick [3] oder blaue Augenfarbe [25]. Eine Neigung zu Sommersprossen am Körper, blondes oder rötliches Haar sowie die Neigung zu Sonnenbrand stellen zudem eine Erhöhung des Risikos für AK und SCC dar [26]. Arsen-Exposition sowie Gendefekte, z. B. Xeroderma pigmentosum sind ebenfalls mit der Entstehung von epithelialen Hauttumoren assoziiert [27] [28]. Der wichtigste Risikofaktor für die Ausbildung von SCC ist das Vorliegen einer AK-Erkrankung. Alle Risikofaktoren von AK gelten somit auch für SCC [29]. Weitere spezifische Risikofaktoren für SCC sind: Chronische Entzündungen [30] und HPV-16, 18-Infektion [31]. Für die Entstehung von BCC kann eine genetisch bedingte Mutation des „patched“ Genes (sonic hedgehog pathway) verantwortlich sein.

1.3 Vorsorge / Nachsorge

Da UV-Licht der stärkste ursächliche Faktor für die Entstehung von epithelialen Hauttumoren ist, besteht die wichtigste Vorsorgemaßnahme in einem wirksamen Schutz vor lange andauernder, intensiver Sonneneinstrahlung, besonders im Kindesalter. Deshalb ist es besonders wichtig, die Bevölkerung über die Risiken der UV-Bestrahlung aufzuklären. Insbesondere sollte jeder Sonnenbrand durch Anwendung geeigneter Sonnenschutzmittel bzw. durch Expositionsprophylaxe vermieden werden. Darüber hinaus wäre es notwendig, mindestens die Risikopatienten zu schulen, auf Frühstadien der epithelialen Hauttumoren am eigenen Körper zu achten und sie als solche zu erkennen und den Hautarzt präventiv jährlich zu konsultieren. Nach der Behandlung eines BCC, AK oder SCC ist eine halbjährlich bis jährliche Nachkontrolle für mindestens 5 Jahre empfehlenswert, da es besonders in diesem Zeitraum zu Bildung von Rezidiven oder neuen Tumoren kommen kann. [32, 33]

1.4 Diagnostik

Wie bei anderen Krebserkrankungen wird die Verdachtsdiagnose zunächst klinisch gestellt, gegebenenfalls erfolgt die nähere Eingrenzung unter Anwendung eines Auflichtmikroskops. Der Goldstandard der Diagnose ist die histologische Untersuchung einer Probeexzision.

Das entnommene Gewebe wird mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Das Hämatoxylin färbt anionische Biopolymere, z. B. DNS im Zellkern, während Eosin kationische Proteine, z. B. Zytoplasma, färbt. Dadurch können der zelluläre Aufbau der Haut und die Struktur der Zellen sichtbar gemacht werden. Diese so genannte HE-Färbung ist die Standard-Färbemethode für die Histopathologie [13]. Spezialfärbungen mit Antikörpern und Membranantigenen können für die immunhistologische Diagnose eingesetzt werden.

1.5 Therapie

Für die Therapie der in dieser Studie betrachteten epithelialen Hauttumoren kann in der Regel aufgrund vielfältiger Einflussfaktoren, wie Ausdehnung, Lokalisation, Alter des Patienten, Komorbidität oder Compliance des Patienten keine feste Behandlungsstrategie angegeben werden. Folgende Verfahren kommen in Frage: Operative Therapie (Exzision mit Schnittrandkontrolle), Destruktive Verfahren ohne histologische Kontrolle: Kryotherapie im Kontakt- oder Sprayverfahren, Kürettage, Strahlentherapie [35]: Lasertherapie, Röntgenweichstrahltherapie, photodynamische Therapie und lokale Chemo- und Immuntherapie mit Diclofenac-Hyaluronsäure, 5-Fluorouracil, Imiquimod oder Retinoiden [36, 37, 38]. Bei allen Therapiemöglichkeiten muss die Erkrankung im Verlauf beobachtet werden. Die Biopsie gilt als Goldstandard zur Beurteilung der Effektivität, hat jedoch den Nachteil, dass das zu untersuchende Gewebe irreversibel verändert wird, eine zusätzliche Belastung für den Patienten durch diesen Eingriff darstellt sowie mit einer oberflächlichen Narbenbildung verbunden ist. Während die meisten in Frage kommenden Verfahren bei allen drei Tumorarten eingesetzt werden [34], kann beim SCC im Falle einer Metastasierung eine systemische Chemotherapie (Mono- oder Polychemotherapie) notwendig sein.

1.6 Basalzellkarzinom (BCC)

Das Basalzellkarzinom ist ein epithelialer Hauttumor, der von den Zellen der Basalschicht ausgeht. Sehr häufig sind dabei die Zellen der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel Ausgangspunkt der Erkrankung. Das BCC ist der häufigste semimaligne Hauttumor [39] und metastasiert in der Regel nicht (< 0,1%). Besonders häufig tritt er bei der wenig pigmentierten Bevölkerung in Europa, Nord-Amerika und Australien auf [40], die Inzidenzrate verdoppelt sich alle 14 Jahre [41]. In Deutschland beträgt die

jährliche Neuerkrankungsrate 140 je 100.000 Einwohner [42]. Es tritt vor allem im höheren Lebensalter auf (Durchschnittsalter bei Neuerkrankung liegt bei 60 Jahren).

1.6.1 Klinisches Bild

Klinisch zeigt sich das Basalzellkarzinom als halbkugelig erhabener, breitbasig aufsitzender rötlicher Knoten mit perlschnurartig aufgeworfenem Randsaum und Teleangiektasien. Dieser Tumor tritt häufig an mehreren Stellen gleichzeitig auf, zu 80% ist er im Kopf-Hals-Bereich lokalisiert. Die Entwicklung des BCC erstreckt sich oft über mehrere Monate oder gar Jahre. In fortgeschrittenen Stadien treten Ulzerationen und Erosionen auf. Jedoch kann er auch lokal destruierend wachsen und umliegendes Gewebe, wie Knochen oder Organe zerstören und somit einen letalen Ausgang nehmen [43]. Deshalb ist dieses Karzinom dringend therapiebedürftig.

1.6.2 Histologie

Das histologische Bild (siehe Abb. 5) zeigt palisadenförmig angeordnete atypische Basalzellen, deren Achsen aus dem Tumornest heraus weisen. Typisch für BCC ist die Ausbildung von Teleangiektasien. In der näheren Umgebung des Tumors löst sich die typische Zellarchitektur der Haut auf. Innerhalb des Tumors befinden sich wenige Zellen in Mitosen und apoptotische Zellen. Das Karzinom ist von Stroma mit lymphoider Infiltration umgeben.

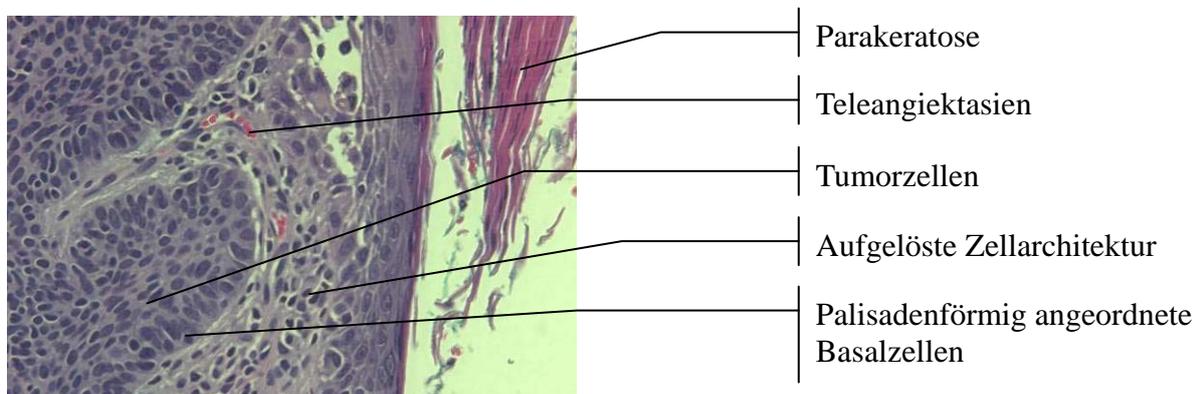


Abb. 5: Histologischer Schnitt durch ein BCC (HE), M 200:1

1.7 Aktinische Keratose (AK)

Die Aktinische Keratose ist die klonale Proliferation atypischer Keratinozyten und stellt histopathologisch ein Spinalzellkarzinom (SCC) in situ dar. Charakteristisch sowohl für AK als auch für SCC ist die Mutation des Tumorsuppressor-Gens p53 sowie weiterer Gene der Apoptose-Regulation. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass sich 10 Prozent aller AK's zu einem SCC entwickeln können [44]. Die Aktini-

sche Keratose ist eine häufige Erkrankung. Für Deutschland wird eine Zahl von 4 Millionen Erkrankter geschätzt [45].

1.7.1 Klinisches Bild

Das klinische Bild der AK's ist sehr vielfältig. Sie beginnt häufig mit einer fleckförmigen Rauigkeit, deren Farbe von weißlich bis rötlich-braun variieren kann [34]. Sie kann sich aber auch als schuppige, makulöse oder plaqueförmige Hautveränderung manifestieren. Die Größe kann von einem Millimeter bis 2 cm Durchmesser betragen. Die AK tritt fast ausschließlich an Hautarealen mit chronischer oder intensiver UV-Exposition auf, also auf den Handrücken und Armen, am Lippenrot, Gesicht, Kopfhaut, Hals, Dekolleté. An besonders UV-exponierten Hautpartien („Sonnenterrassen“) können große Areale geschädigter Keratinozyten in verschiedenen Graduierungen auftreten („Feldkanzerisierung“). [46]

1.7.2 Histologie

Zunächst kann ein Auftreten atypischer Keratinozyten in der Basalschicht beobachtet werden, später stellt man deren graduelle Ausbreitung in die gesamte Epidermis fest, jedoch kein Durchbrechen der Basalmembran. AK's sind weiterhin durch das Vorhandensein einzelner Mitosen sowie von Para- und Hyperkeratose gekennzeichnet. Die Parakeratose ist der Ausdruck einer Verhornungsstörung mit dem Auftreten von pyknotisch veränderten Zellkernen im Stratum corneum. Hyperkeratose ist eine Verdickung der Hornschicht, deren Ursache in einer Hyperproliferation in der Epidermis besteht. Als Folge davon tritt ein zunehmender Verlust der normalen Zellarchitektur auf [47].

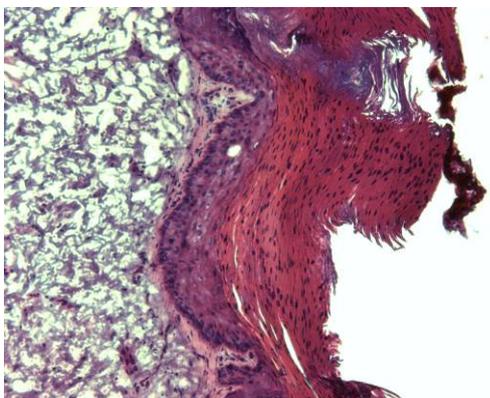


Abb. 6: Para- und Hyperkeratose bei AK, M 100:1

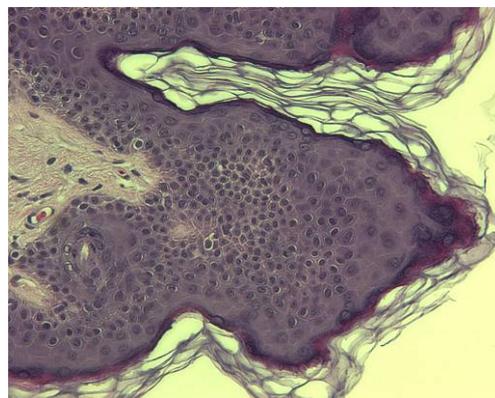


Abb. 7: AK im HE-Schnitt, M 200:1

1.8 Spinalzellkarzinom (SCC)

Das invasive Spinalzellkarzinom ist ein maligner Tumor, er wächst lokal destruierend und infiltrierend. Die Metastasierung erfolgt primär lymphogen lokoregionär bei einer Metastasierungsrate von ca. 5% (AWMF-Leitlinien). Das SCC stellt nach dem BCC den zweithäufigsten Hauttumor dar, AK ausgenommen (20 – 30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr für Mitteleuropa) [48].

1.8.1 Klinisches Bild

Jedes frühinvasive SCC kann am Anfang einer AK gleichen. Es wächst jedoch innerhalb von Monaten exophytisch und erreicht Größen von wenigen Millimetern bis zu einigen Zentimetern. Es bildet häufig Krusten und Erytheme als Folge der tumorösen Entzündung und neigt leicht zu Blutungen [49]. Das SCC tritt besonders am Kopf auf [50].

1.8.2 Histologie

Beim SCC tritt wie bei der AK eine Zerstörung der normalen Zellarchitektur auf, d. h. die typische Schichtung der Epidermis ist aufgehoben [51]. Zum Teil treten erhebliche Kernpleomorphien und häufig auch atypische Mitosen in allen Zellschichten der Epidermis auf [52]. Typisch ist auch eine eosinophile Tumorzellproliferation mit fingerförmiger oder breiter Infiltration in das umgebende Gewebe. Die Invasivität zeigt sich durch die Penetration der Basalmembran. Der Tumor ist von einem lymphoidzelligen Infiltrat umgeben. Charakteristisch für das SCC ist das Auftreten von Hornperlen im Innern des Tumorgewebes.

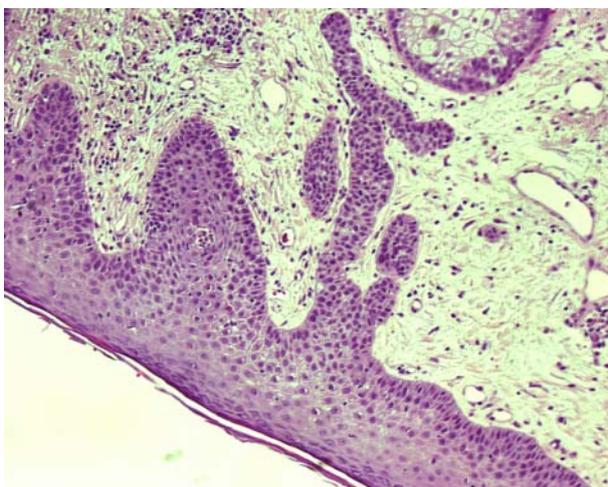


Abb. 8: SCC im HE-Schnitt, M 100:1

Eine Klassifizierungsmöglichkeit besteht in der Einteilung nach dem Metastasierungsrisiko [31, 53]. Darüber hinaus wird das Plattenepithelkarzinom nach dem TNM-

System in Stadien klassifiziert sowie histopathologisch nach dem Entdifferenzierungsgrad (G1 – G4) eingeteilt [51].

1.9 Zielsetzung

Wie bereits im einleitenden Kapitel erläutert, sollen die mit der Routinehistologie verbundenen Limitierungen bei der Diagnose epithelialer Hauttumoren durch den Einsatz der konfokalen Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie vermindert oder möglicherweise sogar behoben werden können.

Ziel der Studie ist es deshalb, die Eignung des KFLSM für die Diagnose der NMSC und der AK zu untersuchen. Dazu ist es nötig, morphologische Charakteristika der respektiven Hauttumoren (BCC, AK und SCC) zu finden, die mit dem KFLSM beobachtet werden können. Ein weiteres Ziel besteht darin, festzustellen, ob es möglich ist, anhand der KFLS-Mikroskopie AK und SCC zu unterscheiden. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, weil beide Erkrankungen verschiedene Prognosen nach sich ziehen und unterschiedliche Therapieansätze erfordern. Darüber hinaus soll anhand von Fallstudien nachgewiesen werden, dass sich die konfokale Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie als nicht-invasives Diagnoseverfahren zur Beurteilung des Therapieverlaufs bei topischer Imiquimod-Behandlung von BCC eignet.

2 Material und Methoden

2.1 Probanden

Alle untersuchten Probanden wurden von anerkannten Dermatologen aus der Poliklinik oder der Tumorsprechstunde der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité ausgewählt. Alle Probanden gehören zum Hauttyp I – III nach Fitzpatrick. Bei 8 Probanden wurden klinisch insgesamt 12 Basalzellkarzinome diagnostiziert und histologisch bestätigt. Die Probanden waren im Alter von 55 bis 79 Jahren. Bei 3 weiteren Probanden im Alter zwischen 43 und 73 Jahren mit Basalzellkarzinom wurde der Therapieverlauf vor und nach einer Imiquimod-Behandlung beobachtet. An diesen drei Probanden wurde keine Probeexzision zur Bestätigung der klinischen Diagnose durchgeführt. Für die Beobachtung des Therapieverlaufs wurden diese Probanden in Abständen von jeweils etwa 4 Wochen erneut untersucht.

Bei 12 Probanden wurde klinisch eine AK festgestellt und feingeweblich bestätigt. Sie waren 53 bis 75 Jahre alt. Weitere 7 Probanden im Alter zwischen 63 und 87 Jahren mit einem klinischen und histologischen SCC-Befund nahmen an der Studie teil, von denen ein Patient 2 Läsionen hatte.

2 Material und Methoden

Die untersuchten Hautläsionen befanden sich am Kopf, am Hals, am Arm, an der Hand, am Rücken und an der Brust. Die Probanden gaben ihr Einverständnis zu den Untersuchungen wie auch die Ethikkommission der Charité. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte ungeblendet durch den Autor der Studie, der die Aufnahmen auch anfertigte.

Tabelle 1: Übersicht über die Probanden

		BCC	BCC, Imiquimod	AK	SCC
Geschlecht	männlich	7	3	9	7
	weiblich	1		3	
Lokalisation	Kopf	4	2	9	7
	Arm				1
	Hand	1		3	
	Brust/Rücken	5	1		
	Hals/Nacken	2			
Alter	Minimum	55	43	53	63
	Maximum	79	73	75	87

Zur Ermittlung von Vergleichsdaten von gesunder Haut (Messung von Zelldurchmessern, Zellkerndurchmessern und Größe des Interzellularraumes) wurden bei allen Probanden an kontralateralen Hautpartien Aufnahmen angefertigt. Darüber hinaus wurden an drei gesunden Freiwilligen Messungen am Arm und am Kopf durchgeführt. An gesunden Hautpartien wurden keine feingeweblichen Untersuchungen ausgeführt.

2.2 Histologie

Für die routinemäßige histologische Untersuchung wurden nach Desinfektion der Haut und lokaler Anästhesie 4 mm große Stanzbiopsien aus dem für BCC, AK und SCC verdächtigen Hautareal entnommen. Die verbleibende Wunde wurde mit einer Einzelknopfnahnt verschlossen. Das entnommene Gewebe wurde anschließend in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus diesem Block wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 4 µm dicke Vertikalschnitte angefertigt. Um die typischen Merkmale des Gewebes sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mittels Hämatoxylin-Eosin eingefärbt und einem dafür speziell ausgebildeten Dermatohistologen zur Beurteilung zugeführt.

2.3 Konfokales Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop (KFLSM)

In der Mikroskopie unterscheidet man zwischen der Durchlicht- und der Auflichtmikroskopie. Die Durchlichtmikroskopie erfordert prinzipiell das Herstellen dünner Präparate, die während der Untersuchung vom Licht durchdrungen werden. Auflichtmikroskope eignen sich dagegen zur Abbildung der Oberfläche der zu untersuchenden Probe, bestenfalls noch einer dünnen Schicht darunter, wenn das Licht in die Probe eindringen und von ihr wieder in nennenswertem Umfang zurück gestreut oder reflektiert werden kann.

In der Laser-Scan-Mikroskopie wird die zu untersuchende Probe mit einem Laserstrahl, der eine ausreichend hohe Beleuchtungsstärke ermöglicht, im Auflichtverfahren beleuchtet. Dieses Licht kann dann von der Oberfläche der Probe oder den Strukturen ihrer obersten Schichten reflektiert, absorbiert oder gestreut und mittels der Mikroskop-Optik zu einem vergrößerten Bild der Probe verarbeitet werden. In diesem Fall spricht man von der Reflektions-Laser-Scan-Mikroskopie.

Neben diesem Verfahren existiert die Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie. Sie bedient sich des physikalischen Prozesses der Fluoreszenz, um dasjenige Licht aus der Probe zu gewinnen, durch welches die Probe abgebildet wird.

Fluoreszenz ist die Eigenschaft chemischer Verbindungen (Fluorophore), sich bei Bestrahlung mit energiereichem Licht (z. B. UVA) durch Absorption eines Photons oder mehrerer in eine andere, energetisch höhere Konfiguration umzuwandeln (Anregung). Diese neue Konfiguration ist jedoch nicht stabil, weshalb nach sehr kurzer Zeit die ursprüngliche, energieärmere Konfiguration angenommen wird, wobei gleichzeitig ein Photon emittiert wird, welches die dabei wieder freigesetzte Anregungsenergie enthält. Da diese Energieportion charakteristisch für die Umwandlung zwischen den beiden Konfigurationen und somit sehr konstant ist, besitzt das emittierte Licht eine für den fluoreszierenden Farbstoff spezifische Wellenlänge (Farbe).

Bei der Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie wird zunächst ein fluoreszierender Farbstoff auf oder in die Probe appliziert. Dieser Farbstoff verteilt sich nun in einer für das Gewebe charakteristischen Weise. Das im Mikroskop entstehende Bild zeigt die Struktur der Probe nur mittelbar, denn es bildet nur die Verteilung des Farbstoffs in der Probe ab [54]. Bei der Laser-Scan-Mikroskopie wird das Laserlicht mit Hilfe eines so genannten dichroitischen Spiegels in den Strahlengang des Mikroskops gebracht und auf die Probe projiziert.

2 Material und Methoden

Der dichroitische Spiegel reflektiert nur Licht, dessen Wellenlänge kürzer als eine bestimmte Grenzwellenlänge ist, längerwelliges Licht durchdringt ihn nahezu ungeschwächt und ungebrochen [55]. Das Laserlicht hat eine kürzere Wellenlänge als die Grenzwellenlänge und wird deshalb vollständig reflektiert.

Beim herkömmlichen LSM wird das Laserlicht nicht auf die Probe fokussiert, sondern beleuchtet einen ausgedehnten Bereich der Probe. Im Folgenden soll nur das Fluoreszenz-Verfahren betrachtet werden.

Das Laserlicht dringt in die Probe ein und erzeugt dort die Fluoreszenz. Das fluoreszierte Licht wird dabei isotrop in alle Richtungen ausgesendet. Ein Teil fällt dabei ins Objektiv und wird nun so gebrochen, dass ein vergrößertes Bild der Probe entsteht. Dieses Bild wird üblicherweise mit einem CCD-Sensor aufgenommen, der gleichzeitig das gesamte Bild auswerten kann, aber dafür eine entsprechend hohe Pixel-Auflösung und Empfindlichkeit benötigt. Das Bild zeigt nun das Verteilungsmuster des Fluoreszenzfarbstoffes im gesamten beleuchteten Teil der untersuchten Probe.

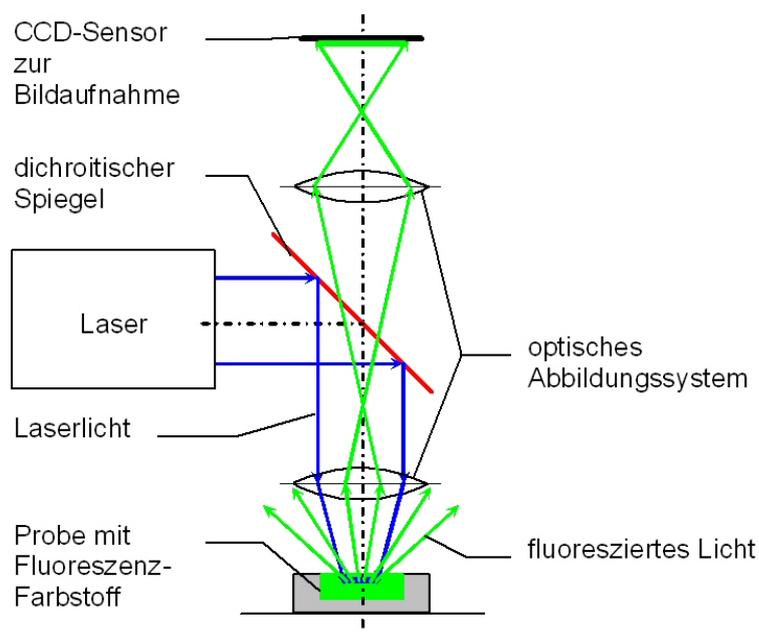


Abb. 9: Prinzip eines herkömmlichen Fluoreszenz-LSM

Dieses Arbeitsprinzip hat einen gewissen Nachteil. Das Laserlicht dringt erheblich tief in das Gewebe ein und erzeugt in der gesamten Tiefe Fluoreszenzlicht. Da aber die Optik nur einen sehr eingeschränkten Tiefenschärfe-Bereich besitzt, kann nur eine sehr dünne Schicht in einer ganz bestimmten Tiefe scharf abgebildet werden. Alle Bereiche oberhalb und unterhalb dieser Schicht werden dagegen unscharf abgebil-

2 Material und Methoden

det und überlagern so das gewünschte Bild und verschlechtern es. Diesen Nachteil versucht man mit dem Prinzip des konfokalen Mikroskops auszugleichen.

Das Prinzip des konfokalen LSM besteht in Folgendem:

Zunächst wird, anders als beim herkömmlichen LSM, das Laserlicht auf einen möglichst kleinen Fokus (F_1) in der Probe konzentriert. Dadurch entsteht hier eine wesentlich höhere Beleuchtungsstärke, was auch zu einer entsprechend stärkeren Fluoreszenz an dieser Stelle im Vergleich zu den Schichten ober- und unterhalb des Fokus führt.

Das Fluoreszenzlicht gelangt in das Objektiv, wo es nach den Gesetzen der Strahlenoptik gebrochen wird. Dabei sammelt sich das gesamte Licht, welches genau aus dem Fokus kommt, in einem kleinen Punkt, dem Fokus F_2 , der in einem ganz bestimmten Abstand auf der entgegen gesetzten Seite des Objektivs liegt. Licht aus Schichten ober- bzw. unterhalb von F_1 erzeugt in diesem Abstand einen ausgedehnten Fleck. Um dieses störende Licht zu eliminieren, kann eine Blende geringen Durchmessers an der Position F_2 angeordnet werden. Alles Licht, welches diese Blende passiert, stammt aus einem Punkt, nämlich dem Fokus F_1 . Es wird mit einem Sensor aufgefangen, der nur aus einer einzigen lichtempfindlichen Zelle bestehen muss.

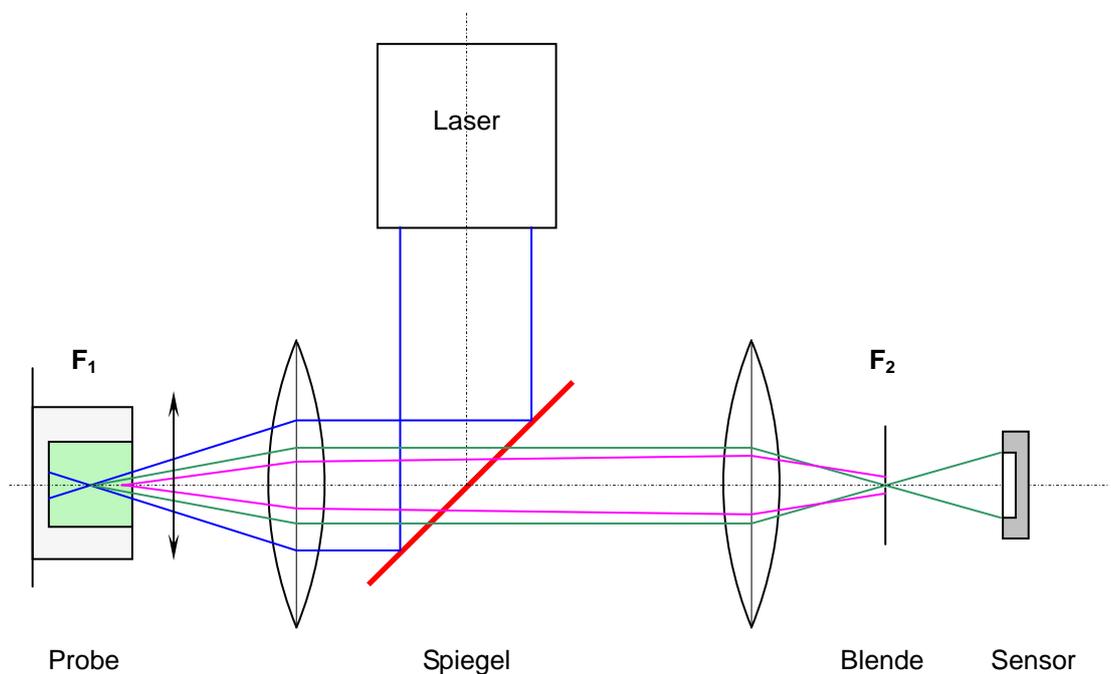


Abb. 10: Prinzip des konfokalen Laser-Scan-Mikroskops

Da nun das aufgefangene Fluoreszenzlicht nur noch von einem Punkt F_1 stammt, müssen mechanische Maßnahmen getroffen werden, um diesen Punkt über die

Probe wandern zu lassen und so die Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abzutasten. So kann beim eingesetzten Mikroskop bei höchster Auflösung maximal 1 Bild je Sekunde aufgenommen werden. Dafür verringert sich die Belastung des untersuchten Gewebes durch die Laserstrahlung wegen der Verkürzung der Expositionszeit. Die Auflösung des Mikroskops steigt in dem Maße, je genauer das Laserlicht im Punkt F1 fokussiert werden kann. Das mit dem konfokalen Fluoreszenz-LSM gewonnene Bild zeigt in jedem Falle eine horizontale Schicht, also eine Schicht parallel zur Hautoberfläche und keinen Querschnitt durch das Gewebe, wie er bei histologischen Schnitten üblich ist.

2.4 Einsatz des KFLSM am Probanden

Die Experimente wurden unter Verwendung des dermatologischen KFLSM „Stratum“ der Firma OptiScan Ltd., Melbourne (Vertrieb: Medizinelektronik Fred Lawrenz Vertriebs GmbH, Bad Soden, Deutschland) ausgeführt.

Zunächst wurde zum Zwecke der Dokumentation eine standardisierte makroskopische Photographie der Hautläsion angefertigt. Anschließend erfolgte eine Reinigung und Entfettung der Haut mittels Desinfektionsspray. Dabei wurden eventuell auf der Haut befindliche Medikamente oder kosmetische und Sonnenschutzcremes entfernt. Jetzt konnte der Farbstoff (0,5% Natriumfluoreszein in wässriger Lösung) auf ein kleines Areal des Hauttumors und mittels intradermaler Injektion in den Rand des Tumors appliziert werden. Nach einer Wartezeit von 5 – 10 Minuten begann die Untersuchung mit dem KFLSM. Dieser Zeitraum war nötig, um eine optimale Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes in der Haut zu gewährleisten.

Nach dem Applizieren des Farbstoffes wurde die zu untersuchende Hautpartie mit UV-Licht beleuchtet und erneut photographisch festgehalten. Dieses UV-Bild dokumentierte die Verteilung des Farbstoffes in der Haut.

Während der gesamten Untersuchung trugen die Probanden eine Brille zum Schutz der Augen vor dem Laserlicht.

Die Strahlung eines Argon-Lasers von 488 nm Wellenlänge dient zum Anregen des Fluoreszeins. Dabei wird die Strahlung über eine Glasfaser (Lichtleiter) zur Sonde mit dem Scan-System übertragen. Das Beobachtungsfeld hat eine Größe von 200 x 200 µm. Die Sonde scannt in Echtzeit, d. h. das Bild ist sofort auf dem Monitor des Mikroskops sichtbar. Die Scan-Frequenz hängt dabei von der Auflösung ab und beträgt bei maximaler Auflösung 1 Bild pro Sekunde. Bei der Untersuchung wurde das Handstück mit leichtem Druck direkt auf die Haut aufgesetzt.



Abb. 11: Monitor des KFLSM "Stratum"



Abb. 12: Handstück des KFLSM im Einsatz

Das fluoreszierte Licht gelangt über ein Objektiv in den Detektor und wird von einem Computer sofort in ein Bild umgewandelt. Dieses Bild hat eine Größe von etwa 20 x 20 cm, was eine 1000fache Vergrößerung bedeutet. Die Scan-Tiefe kann durch manuelles Einstellen der Brennweite am Handstück geändert werden und beträgt maximal 250 μm [24].

2.5 Substanzen

2.5.1 Fluorescein

Als Fluoreszenzfarbe zum Anfärben der Haut dient 0,5% Natriumfluorescein: Fluorescein SE Thilo® Augentropfen der Firma Alcon Pharma GmbH, Freiburg.

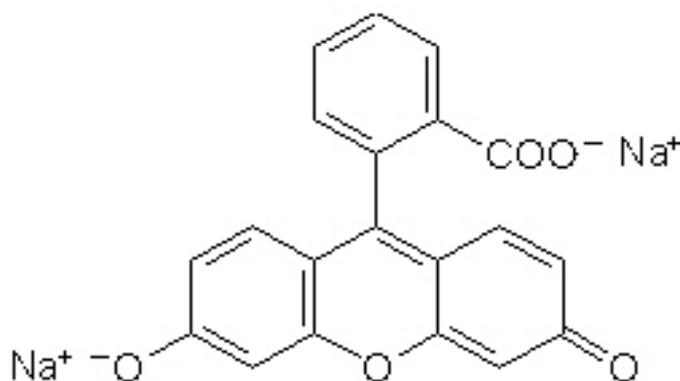


Abb. 13: Strukturformel Natriumfluorescein

Der Farbstoff ist das Natriumsalz der Säure Fluorescein und gehört zu den Xanthen-Farbstoffen. Fluorescein selbst ist schwer wasserlöslich, in Natronlauge jedoch gut löslich. Dabei dissoziiert die Säure und es entsteht die Natriumfluorescein-Lösung. Diese stellt den stärksten bekannten Fluoreszenzfarbstoff dar. Selbst in einer

2 Material und Methoden

Verdünnung von 1: 100.000.000 ist die Fluoreszenz noch nachweisbar. Träger der Fluoreszenz ist das Anion. Deshalb verschwindet die Fluoreszenz im sauren Milieu ($\text{pH} < 5,5$) reversibel, wenn das Anion mit Protonen rekombiniert.

Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 490 nm. Damit eignet es sich sehr gut für den Einsatz beim KFLSM, welches mit einer Laser-Wellenlänge von 488 nm arbeitet. Die Emission findet bei 520 nm statt.

Natriumfluoreszein gilt als physiologisch unbedenklich. Es wird beispielsweise zur Feststellung von Hornhautschäden am Auge verwendet sowie zum Färben kosmetischer Seifen und Badezusätze eingesetzt.

2.5.2 Imiquimod

Der Wirkstoff Imiquimod ist ein Imidazo-Chinolin-Derivat. Er ist kommerziell in der Aldara® 5%-Creme (3M Pharmaceuticals, St. Paul, Minn.) erhältlich.

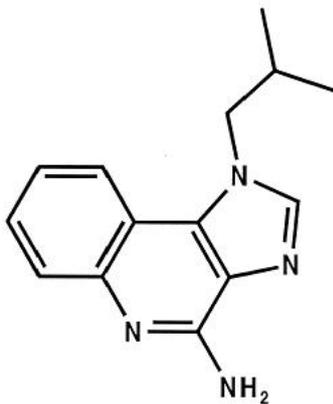


Abb. 14: vereinfachte Strukturformel von Imiquimod

Seine Wirksamkeit als immunmodulierende Substanz besteht in der Bindung an den „Toll-like“-Rezeptor-7 der Monozyten und Makrophagen [56]. Dadurch werden diese zur Produktion und Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Cytokine (IL-1, -6, -8, -10, -12), Interferon- α und des Tumor-Nekrose-Faktors α induziert, wodurch das Immunsystem stimuliert wird. Es aktiviert die natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten sowie die Langerhans-Zellen der Epidermis. Letztere werden zu ihrer Migration zu den lokalen Lymphknoten stimuliert. Durch das IL-12 werden die T-Helferzellen Typ 1 zur Produktion von Interferon- γ angeregt, welches die zytotoxischen T-Lymphozyten aktiviert [57, 58, 45]. Dadurch induziert Imiquimod eine antivirale und antitumorale Wirkung [59]. Eine nähere Beschreibung der Wirkungsweise von Chemokinen beschreibt Luster in [60].

Imiquimod wurde zunächst zur Behandlung von Condylomata acuminata, die durch Papilloma-Viren hervorgerufen werden und sich zu einem Plattenepithelkarzinom

entwickeln können, eingesetzt. Außerdem zeigt es seine Wirksamkeit bei der Behandlung von BCC [61, 62] (in Deutschland zugelassen bei superfiziellen BCC und AK). In den USA ist Imiquimod für die AK ebenfalls zugelassen [63, 45, 64]. Für den Einsatz bei der Behandlung von SCC und Morbus Bowen existieren bereits erfolgreiche Studien [65], eine Zulassung steht jedoch aus.

Für die Applikation von Imiquimod liegen verschiedene Anwendungsprotokolle vor. Laut EMEA soll Imiquimod 3 bis 5mal wöchentlich für 6 Wochen topisch appliziert werden [51]. In neueren Studien besteht die Therapie aus einer 4wöchigen Imiquimod-Applikation mit anschließender 4wöchiger Pause und erneuter 4wöchiger Anwendung. Imiquimod löst eine lokale Entzündungsreaktion aus und kann mit Rötung, Juckreiz, Schmerzen, Erosion und Krustenbildung einhergehen. Imiquimod wird aber in der Regel von den Probanden gut vertragen.

Im Rahmen unserer Studie erfolgte bei drei BCC-Probanden eine Behandlung mit Imiquimod 5%. Dabei applizierten die Probanden das Imiquimod an fünf aufeinander folgenden Tagen topisch auf das gekennzeichnete Behandlungsareal, wobei für sechs bis acht Stunden jeder Kontakt mit Textilien und Waschkontakt vermieden wurde. Die Behandlung wurde zunächst drei Wochen lang fortgesetzt mit einer anschließenden dreiwöchigen Behandlungspause. Diesen Rhythmus wiederholten die Probanden. Vier Wochen nach dem Beginn der Behandlung und danach monatlich wurden die Probanden zur Untersuchung einbestellt. Dieses Protokoll wurde zum Zeitpunkt der Studie zur Therapie mit Imiquimod an der Dermatologischen Universitätsklinik der Charité angewendet. Um den Erfolg der Therapie nicht invasiv analysieren zu können, wurde bei keinem der drei Probanden eine Biopsie durchgeführt.

2.6 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die mit dem KFLSM gewonnenen Bilder von Tumoren und gesunder Haut wurden mit dem Computerprogramm analySIS© 3.1 der Firma Soft Imaging System® GmbH, Münster vermessen. Die ermittelten Messwerte wurden mit Hilfe der Computerprogramme Microsoft® Office Excel© 2003 und SPSS® 13.0 für Windows ausgewertet. Im Einzelnen wurden die Größen der Zellen und der Zellkerne sowie die Abstände zwischen den Zellen von Tumoren bestimmt und mit den entsprechenden Werten gesunder Haut verglichen. Dazu wurden bei jedem Probanden an 30 Zellen die Durchmesser der Zellkerne, die Durchmesser der Zellen und die Abstände zwischen den Zellen ermittelt und in einem Box-Whisker-Plot dargestellt. Jeder Plot fasst also 30 Messwerte zusammen. Er zeigt in der Box den Zentralwert. Die Enden der Box

3 Ergebnisse

stellen das erste und das dritte Quartil dar. Die Länge der Whisker beträgt maximal 1,5 Boxlängen. Werte, die zwischen 1,5 und 3 Boxlängen von der Box entfernt sind, werden als Kreis dargestellt, noch weiter entfernte Werte sind Sternchen.

Darüber hinaus wurden die gewonnenen Bilder auf das Auftreten pathologischer Merkmale hin analysiert. Dazu diente das Bildbearbeitungsprogramm Adobe ® Photoshop ® CS 8.0.1.

Im Rahmen der Untersuchung wurden folgende Informationen gewonnen:

- Makroskopische Aufnahmen der Läsion ohne Fluoreszenzfarbstoff und ohne UV-Beleuchtung sowie mit Fluoreszenzfarbstoff und mit UV-Beleuchtung
- KFLSM-Aufnahmen der untersuchten Läsionen und von gesunder Haut in verschiedenen Tiefen in Korrelation mit den histologischen HE-Aufnahmen dieser Läsionen
- KFLSM-Aufnahmen vom Heilungsverlauf des BCC bei Therapie mit Imiquimod
- Morphometrische Analyse (Messungen von Zelldurchmessern, Zellkerndurchmessern und Zellabständen an den KFLSM-Aufnahmen)

3 Ergebnisse

3.1 Makroskopische Aufnahmen

Bei der Applikation von Natriumfluoreszein in gesunde Haut entsteht eine Quaddel von etwa 2 - 3 mm Größe [Abb. 15]. In einer AK hingegen, wie sie in der Abb. 16 dargestellt wird, entsteht keine Quaddel, sondern der Farbstoff verteilt sich unmittelbar nach der Applikation nahezu in der gesamten Läsion [Abb. 17].

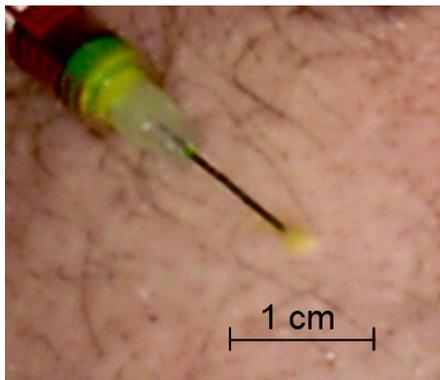


Abb. 15: Quaddelbildung nach Applikation von Natriumfluoreszein in gesunder Haut

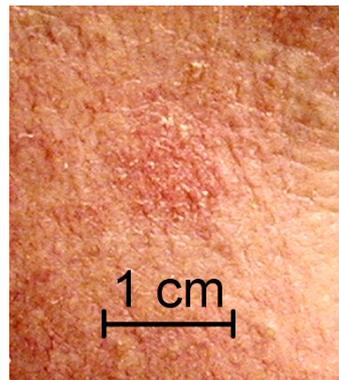


Abb. 16: Makroskopische Aufnahme einer AK

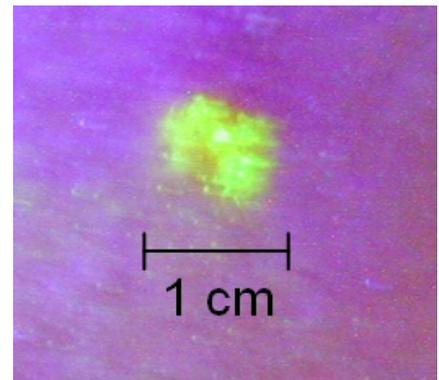


Abb. 17: Makroskopische Aufnahme derselben AK nach Applikation von Natriumfluoreszein bei UV-Beleuchtung

In Abb. 18 und Abb. 20 konnte für BCC und SCC ein ähnliches Verhalten beobachtet werden.

3 Ergebnisse

In Abb. 19 findet sich an der Einstichstelle im Zentrum des eingefärbten Gewebes ein Blutropfen, der sich als dunkler Fleck darstellt.

Abb. 21 zeigt, wie sich beim SCC der Farbstoff ebenfalls im Tumor verteilt, die aufgelagerte Hyperkeratose jedoch farblos bleibt.



Abb. 18: Makroskopische Aufnahme eines BCC

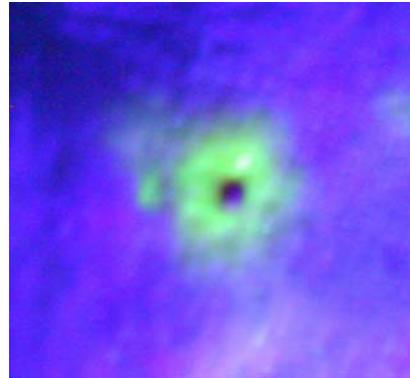


Abb. 19: Makroskopische Aufnahme des selben BCC nach Applikation von Natriumfluoreszein bei UV-Beleuchtung



Abb. 20: Makroskopische Aufnahme eines SCC

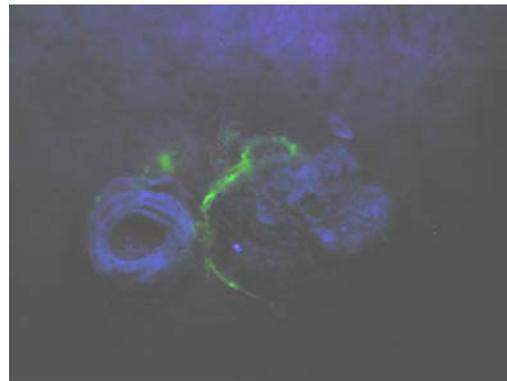


Abb. 21: Makroskopische Aufnahme des selben SCC nach Applikation von Natriumfluoreszein bei UV-Beleuchtung

3.2 KLFSM-Aufnahmen gesunder Haut

Mit dem zur Verfügung stehenden Gerät ist keine direkte Angabe der absoluten Tiefe der Fokalschicht möglich. Die Tiefe wird in relativen Einheiten angegeben, kann aber in absolute Werte umgerechnet werden.

3 Ergebnisse

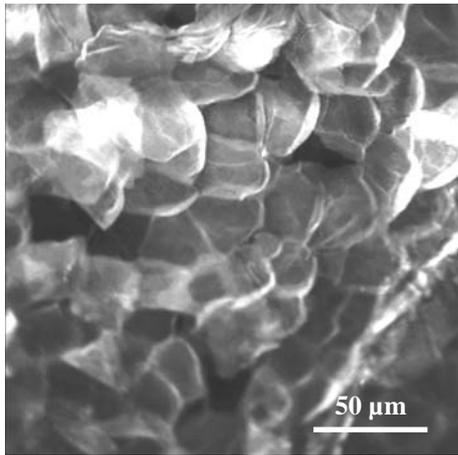


Abb. 22: Stratum corneum, gesunde Haut

Dieses Bild zeigt die Oberfläche der Haut. Sichtbar sind die äußersten Zellen des Stratum corneum. Sie sind verhältnismäßig groß und erscheinen schollenförmig. Es sind keine Zellkerne vorhanden. In die leblosen Hornzellen ist kaum Farbstoff eingedrungen.

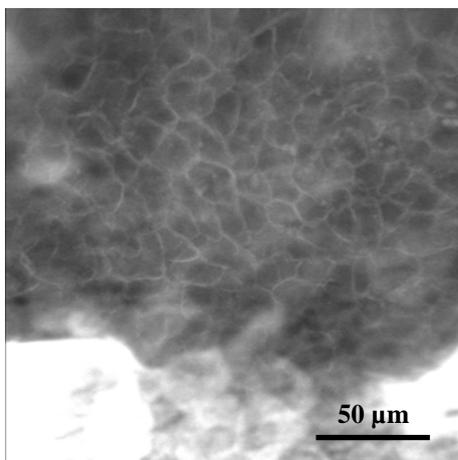


Abb. 23: Stratum granulosum, gesunde Haut

Auf diesem Bild ist das Stratum granulosum sichtbar. Die Zellen sind polygonal und deutlich kleiner als im Stratum corneum, aber größer als im folgenden Bild des Stratum spinosum. Die in den Zellen enthaltenen Zellkerne sind noch nicht angefärbt und erscheinen deshalb dunkel. Vereinzelt sind helle Granula in den Zellen sichtbar. Im unteren Bildbereich befindet sich eine Kontrastmittelanreicherung.

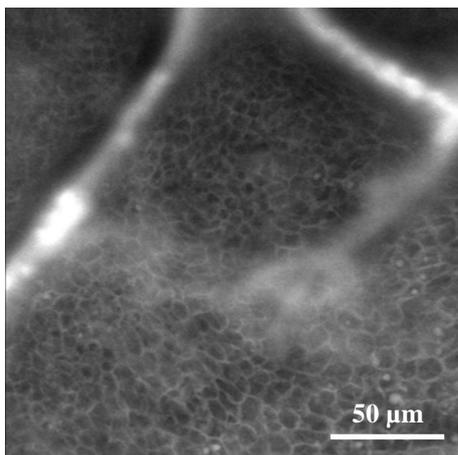
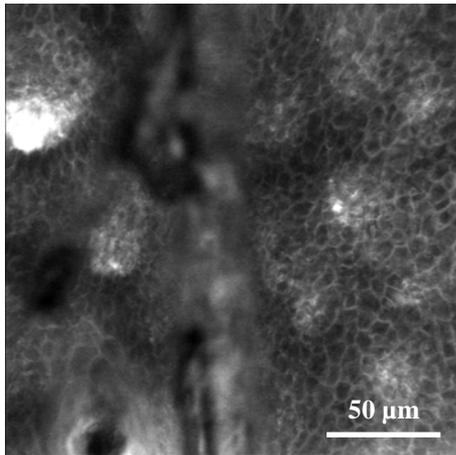


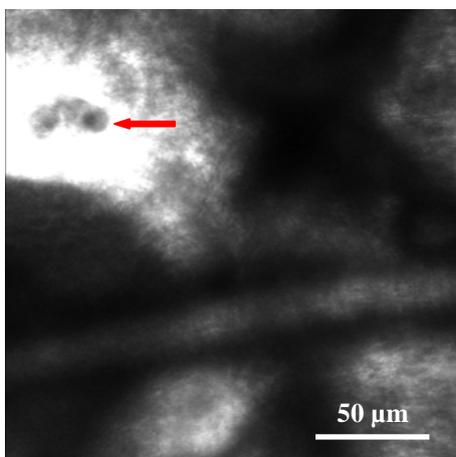
Abb. 24: Stratum spinosum, gesunde Haut

Die hier abgebildete Zellschicht besteht aus kleineren, polygonalen, relativ gleichförmigen Zellen, die einen regelmäßigen Zellrasen („honigwabenartig“) bilden. Zum Zeitpunkt der Aufnahme war das Fluoreszein noch nicht in die Zellen eingedrungen. Der Farbstoff befindet sich größtenteils in den Zellzwischenräumen. Die Zellkerne sind erst vereinzelt angefärbt und erscheinen deshalb hell. Die meisten heben sich dunkel vom Zytoplasma ab. In einzelnen Hautfurchen hat sich Fluoreszenzfarbstoff gesammelt, diese erscheinen hell und rautenförmig.



Die Zellen des Stratum basale sind noch einmal kleiner als die Stachelzellen. Sie erscheinen eher gleichmäßig rund. Der große Zellkern hebt sich dunkel vom Zytoplasma ab. Durch die Basalschicht hindurch wird das stark angefärbte Bindegewebe der Papillen hell dargestellt.

Abb. 25: Stratum basale, gesunde Haut



Dieses Bild zeigt keine Zellstruktur, sondern das Bindegewebe innerhalb der Papillen der Dermis. Innerhalb der Papille ist eine Gefäßschlinge angeschnitten. Die beiden Gefäßlumen sind als dunkle Punkte sichtbar (←→). Quer über das Bild läuft ein Haar.

Abb. 26: Stratum papillare, gesunde Haut

3.3 KFLSM- und histologische Aufnahmen des BCC

Auf den von unseren acht an BCC erkrankten Probanden gewonnenen KFLSM-Bildern ist häufig eine Parakeratose im Stratum corneum zu beobachten. Diese Zellkerne heben sich oft als helle nahezu runde Gebilde mit dunklerem Rand in der Zelle ab.

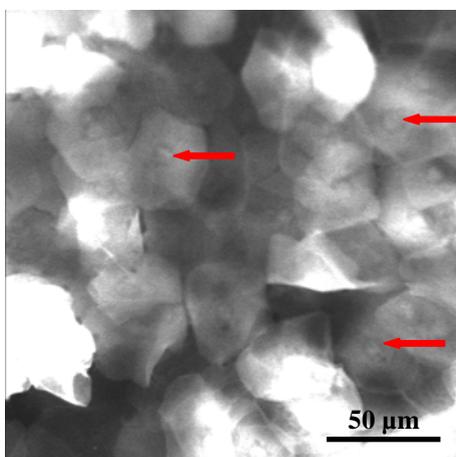


Abb. 27: Parakeratosen im Stratum corneum in BCC (←→ pyknische Zellkerne)

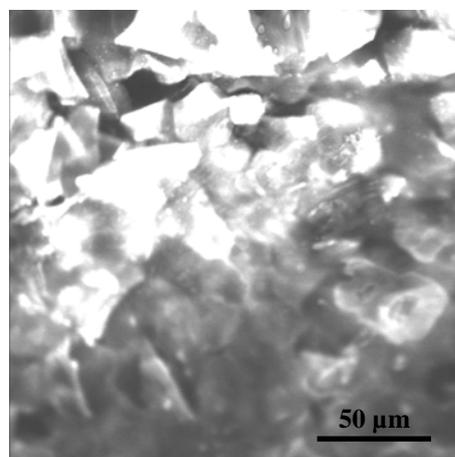


Abb. 28: Hyperkeratose im BCC

3 Ergebnisse

In den darunter liegenden Zellschichten ist eine weitgehende Auflösung der Zellarchitektur zu sehen, d. h. die charakteristische Schichtung des Epithels ist aufgehoben. Im Stratum basale treten Tumornester in Erscheinung mit palisadenförmig elongierten äußeren Basalzellagen. Die Tumorzellen selbst erscheinen vergrößert und weisen vergrößerte und zum Teil elongierte Zellkerne auf. Da sie bereits Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen haben, erscheinen sie hell.

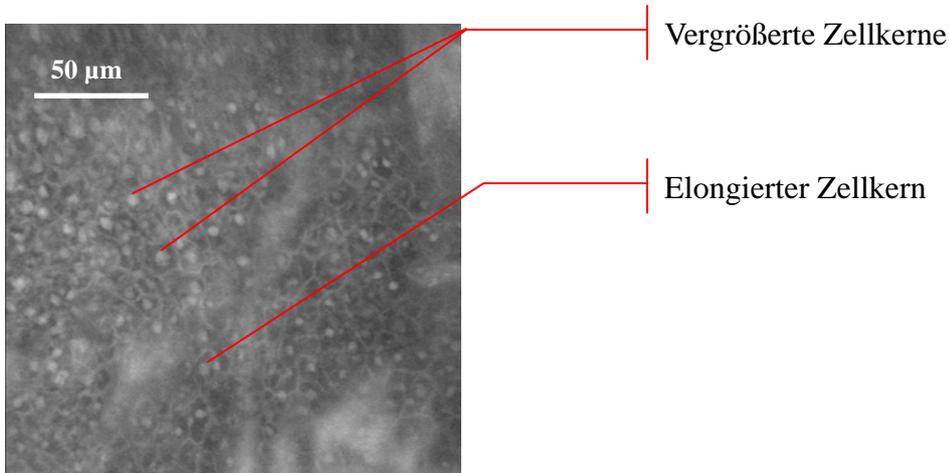


Abb. 29: Vergrößerte Zellkerne eines BCC

Der Abstand zwischen den Tumorzellen ist ebenfalls vergrößert, was an einer großen Intensität der Lichtemission im Interzellularspalt zu erkennen ist. In manchen Bereichen des Tumors lassen sich wegen der diffusen Verteilung des Farbstoffes keine Zellgrenzen mehr ausmachen. Neben den Strukturen der untersuchten Haut sind auf vielen Aufnahmen Artefakte sichtbar, die durch Schweiß, Talg, Hornschuppen und andere Einflüsse entstehen können.

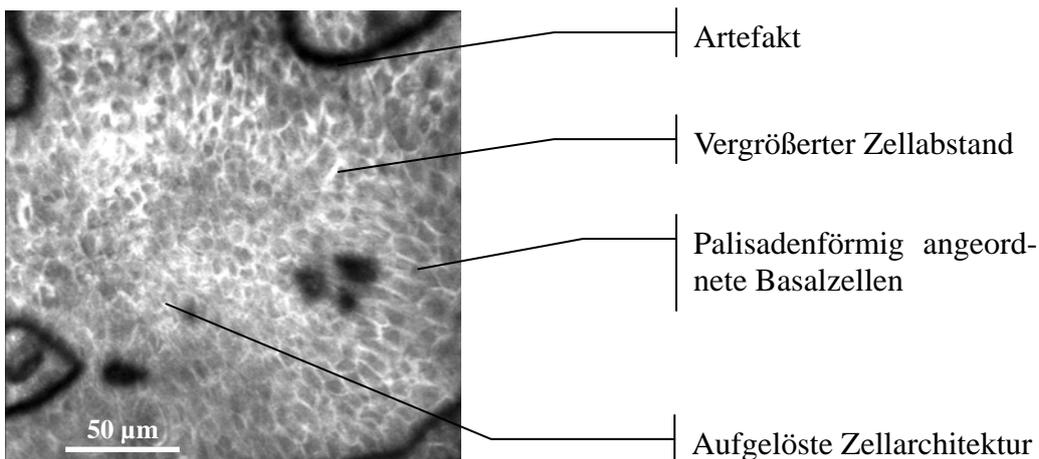


Abb. 30: KFLSM-Bild des Stratum basale

3 Ergebnisse

Im lichtmikroskopischen Bild sind die vergrößerten Interzellularräume und Zellkerne sowie schwer erkennbare Zellgrenzen zu beobachten.

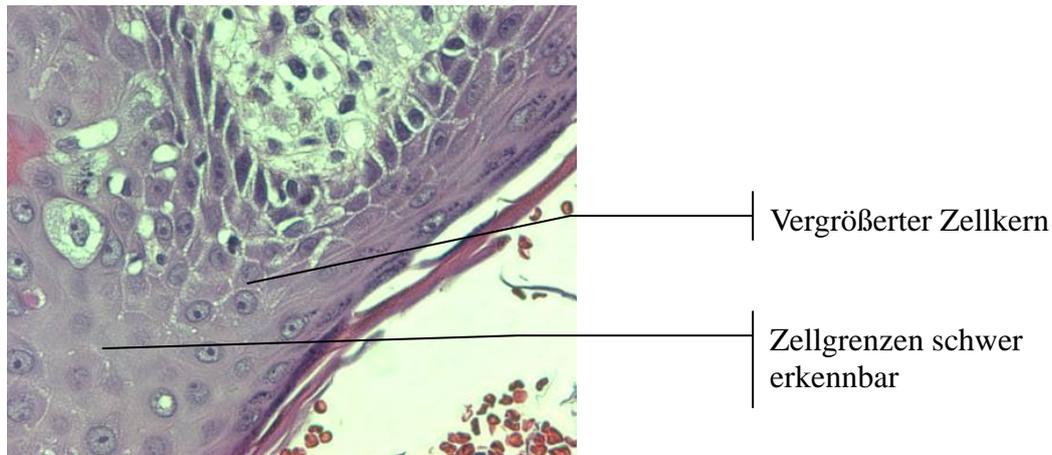


Abb. 31: Histologischer Schnitt (HE) durch ein BCC, M 400:1

In der folgenden lichtmikroskopischen Aufnahme sind die vergrößerten und elongierten Zellkerne eines BCC sowie die Palisadenstellung der Tumorzellen am Rand des Tumors deutlich zu erkennen. Der hier dargestellte Tumor ist bereits in die Dermis eingedrungen und hat dabei offenbar die Basalmembran durchbrochen. Im Innern des BCC erscheint die normale Zellarchitektur aufgehoben.

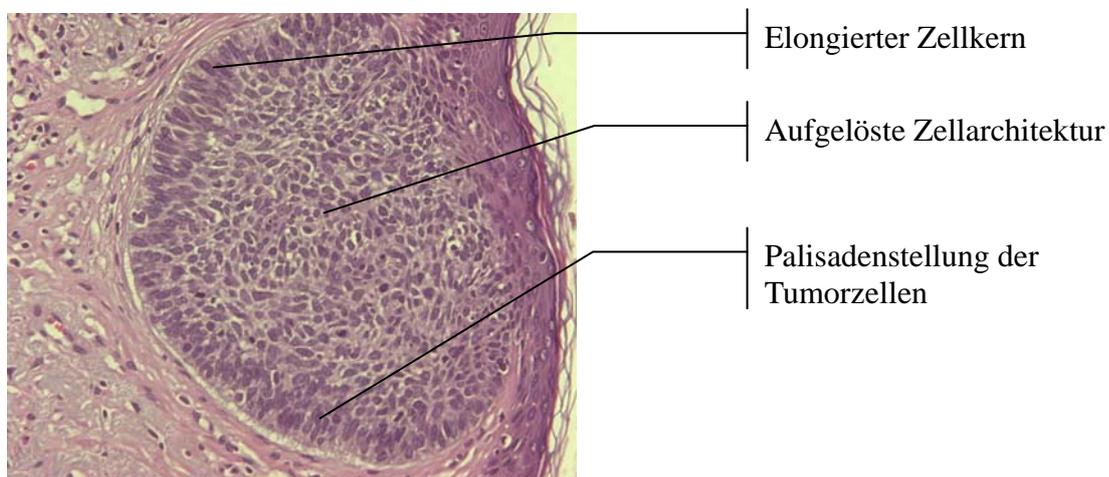


Abb. 32: Elongierte Zellkerne des BCC im HE-Schnitt, M 200:1

Im Tumorgewebe (Abb. 33) befinden sich horizontal verlaufende Gefäßschlingen (Teleangiektasien). Innerhalb einer optimal angefärbten Probe werden die Blutzellen als dunkle, perlschnurartige Kette relativ kleiner Zellen abgebildet, da diese Blutzellen noch nicht angefärbt sind. Durch die in vivo-Visualisierung lässt sich die Bewegung der Zellen in den Teleangiektasien verfolgen. Das sie umgebende Plasma hingegen erscheint heller.

3 Ergebnisse

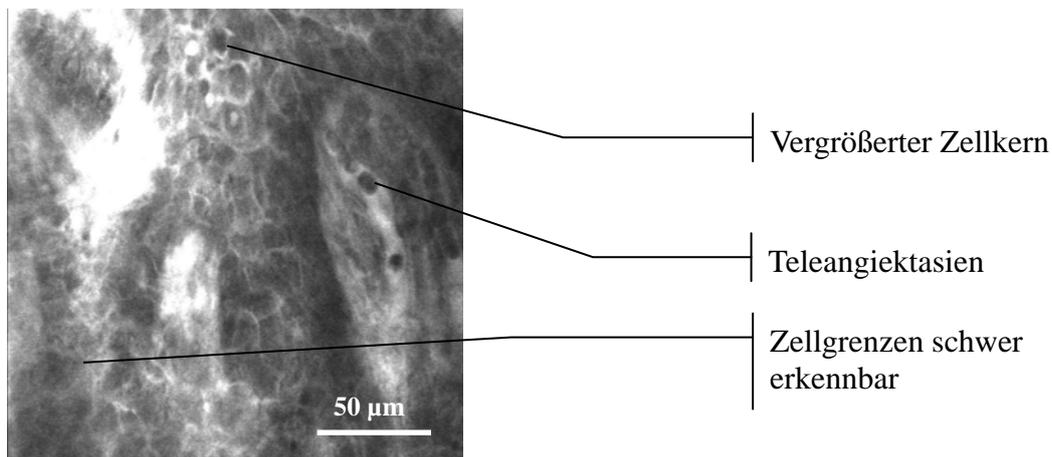


Abb. 33 KFLSM-Bild des Stratum spinosum

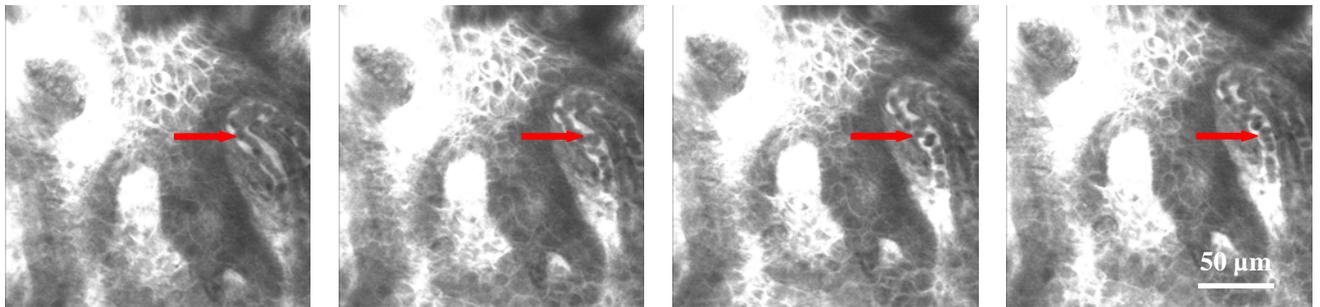
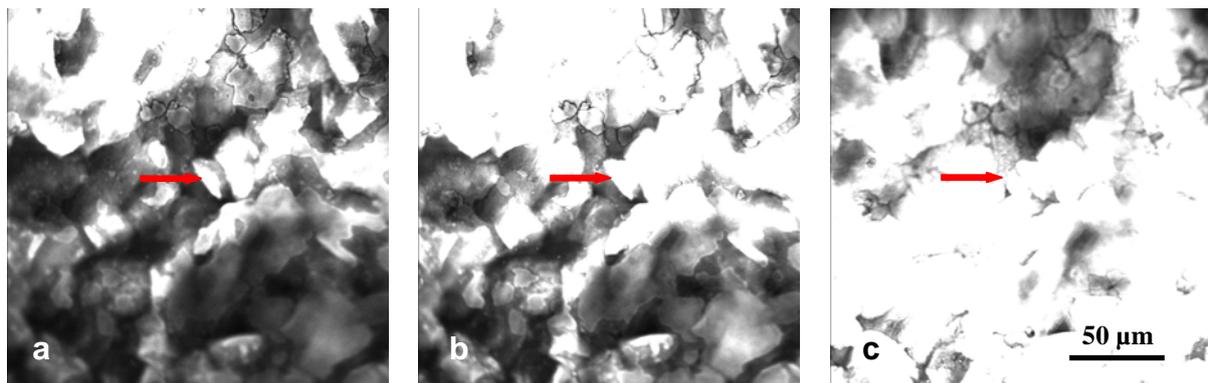


Abb. 34: Blutfluss in einer Teleangiektasie (BCC)

3.4 KFLSM- und histologische Aufnahmen der AK

Typisch für eine AK ist die Ausbildung einer Hyperkeratose. Dadurch kann die Darstellung der unteren Schichten der Epidermis erschwert werden. In der Abb. 36 ist eine derartig ausgeprägte Hyperkeratose im HE-Schnitt dargestellt.



3 Ergebnisse

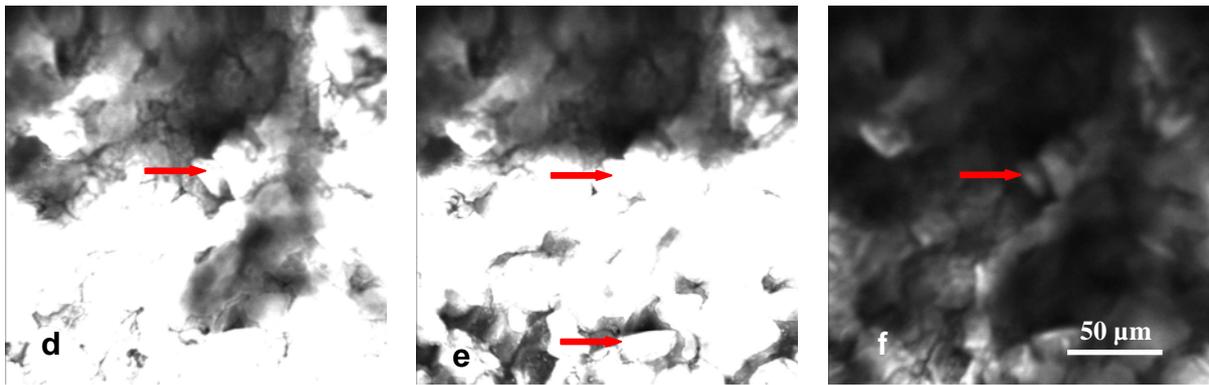


Abb. 35 a - f: Hyperkeratose in sequentiellen Schnitten in AK (→ Keratinozyt)

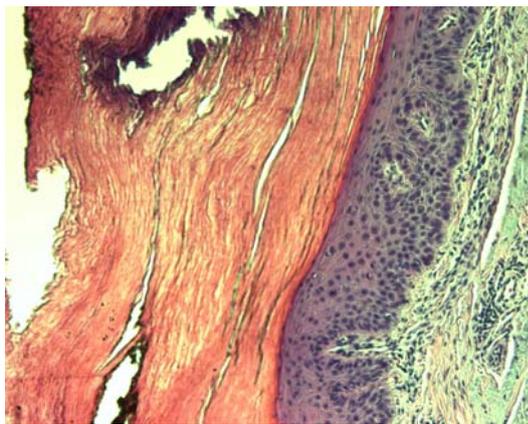


Abb. 36: Hyperkeratose im HE-Schnitt einer AK, M 100:1

In diesem Fall kann eine Untersuchung des Tumorrandes eine Abbildung unterhalb des Stratum corneum ermöglichen. Die folgende Abbildung (Abb. 37) einer Hyperkeratose zeigt, dass hier keine verhornten Zellhüllen mehr erkennbar sind, sondern nur noch unstrukturiertes Hornmaterial. Ein weiteres Merkmal der AK, das man aus der Histologie kennt, ist die Ausbildung einer Parakeratose (Abb. 38). Auch hier erscheinen die Zellkernreste ähnlich wie bei BCC mehr oder weniger stark angefärbt mit oft deutlich sichtbarem Rand.

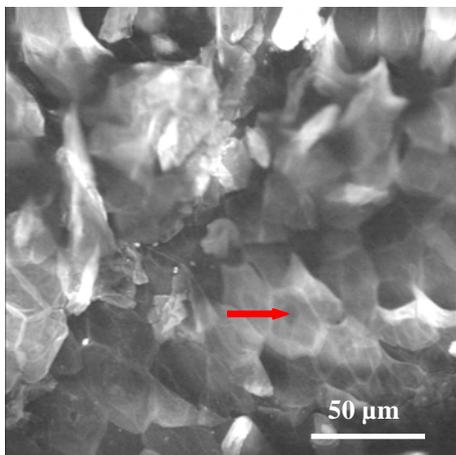


Abb. 37: Hyperkeratose mit parakeratotischen Zellkernen in einer AK

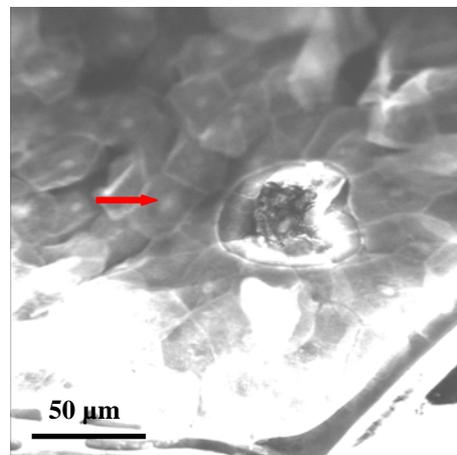


Abb. 38: Parakeratosen in einer AK (mit Artefakt in der Bildmitte)

3 Ergebnisse

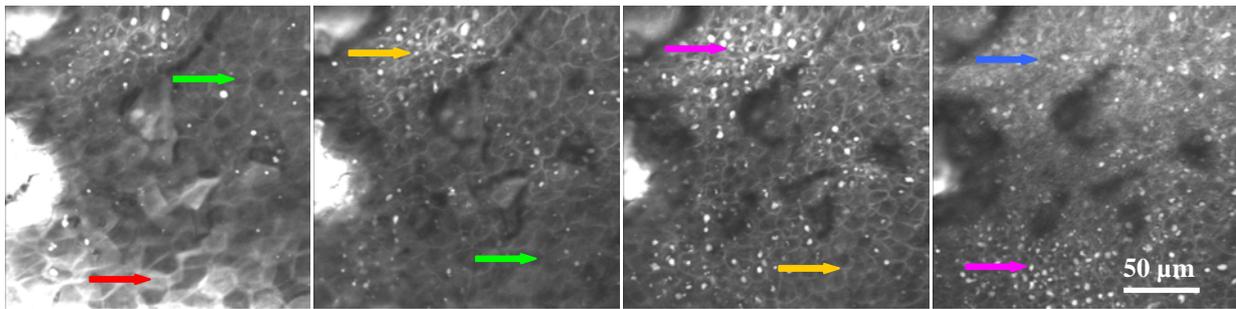


Abb. 39: AK 1

Abb. 40: AK 2

Abb. 41: AK 3

Abb. 42: AK 4

In der Bildfolge Abb. 39 bis Abb. 42 verläuft die Haut schräg in die Tiefe. Aus diesem Grund werden jeweils mehrere epidermale Schichten von der Fokalebene geschnitten. Diese Bilder zeigen im oberen Teil eine tiefer liegende Schicht als im unteren.

Das Bild AK 1 (Abb. 39) stellt das Stratum corneum (→) sowie das Stratum granulosum (→) dar. Hier treten noch keine pathologischen Besonderheiten in Erscheinung.

Im Bild AK 2 (Abb. 40) werden das Stratum granulosum (→) und das Stratum spinosum (→) abgebildet. Im oberen Teil dieser Abbildung treten pleomorph vergrößerte Zellkerne zufälliger Orientierung auf. Sie erscheinen durch das eingedrungene Fluoreszein so hell, dass sie nicht eindeutig einer Schicht zugeordnet werden können. So sind mehrere dieser Zellkerne auch auf der folgenden Abbildung AK 3 (Abb. 41) sichtbar.

Die Abbildung AK 3 (Abb. 41) zeigt oben das Stratum basale (→), während der untere Teil noch zum Stratum spinosum (→) gehört. Diese Unterscheidung kann anhand der Zellgrößen vorgenommen werden. In der Abbildung AK 4 (Abb. 42) erscheint oben bereits das Bindegewebe der Dermis (→), die untere Hälfte ist Teil des Stratum basale (→). In beiden Bildern erscheint die regelmäßige Zellarchitektur im Vergleich zur gesunden Haut erheblich gestört.

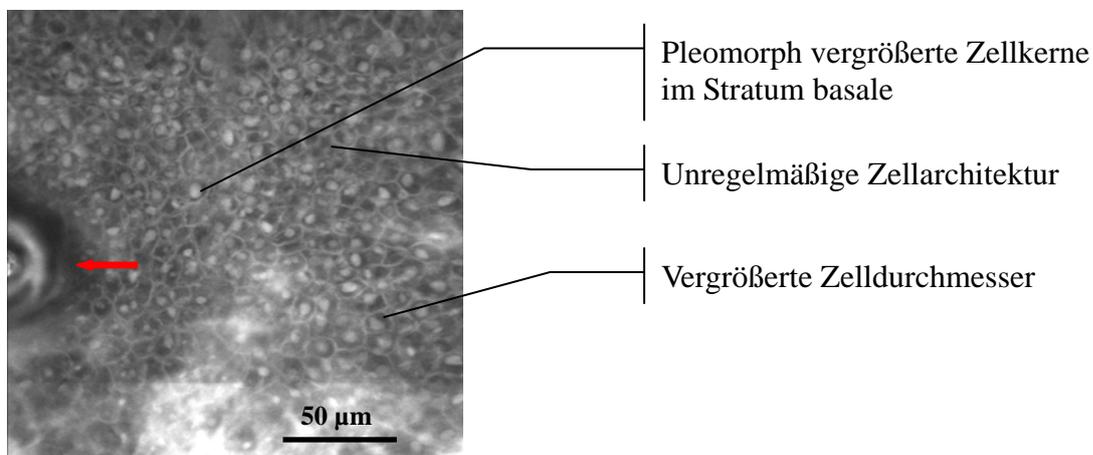


Abb. 43: Stratum basale mit Haarfollikel
(←) in AK

3 Ergebnisse

In der Abb. 43 wird nochmals das Stratum basale einer AK dargestellt. Deutlich erkennbar sind hier die erheblich vergrößerten Zellkerne sowie deren unregelmäßige Form. Im unteren Bildbereich fallen vergrößerte Zelldurchmesser auf, während gerade in der oberen Bildhälfte die Zellarchitektur gestört ist. Am linken Rand dieses Bildes ist ein Haarfollikel erkennbar.

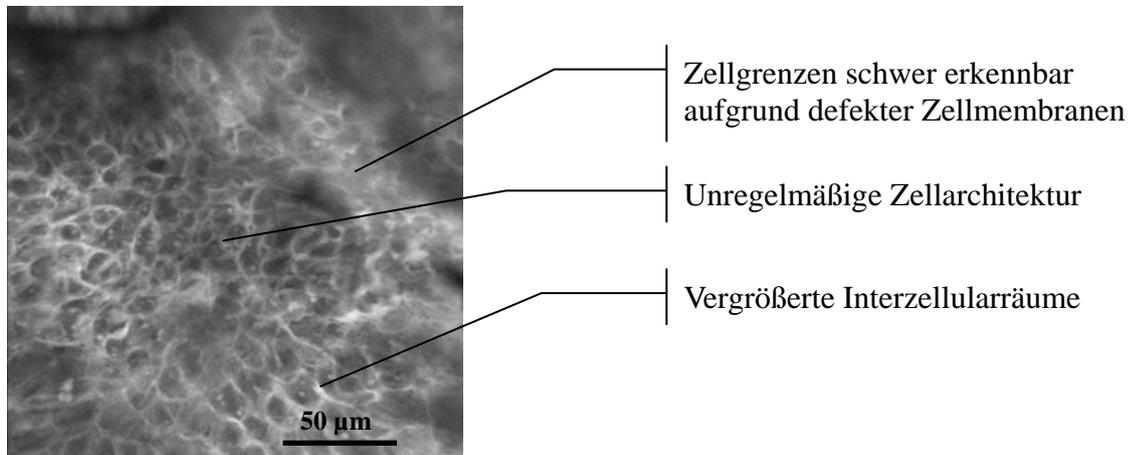


Abb. 44: Stratum spinosum in AK

Das Stratum spinosum in der Abb. 44 weist deutlich vergrößerte Interzellularräume auf. Oben rechts ist ein Bereich mit geschädigten Zellmembranen sichtbar. Hier sind die Grenzen zwischen den Zellen nur noch schwach zu erkennen. Besonders im Zentrum des Bildes fällt eine sehr unregelmäßige Anordnung der Zellen auf.

3.5 KFLSM- und histologische Aufnahmen des SCC

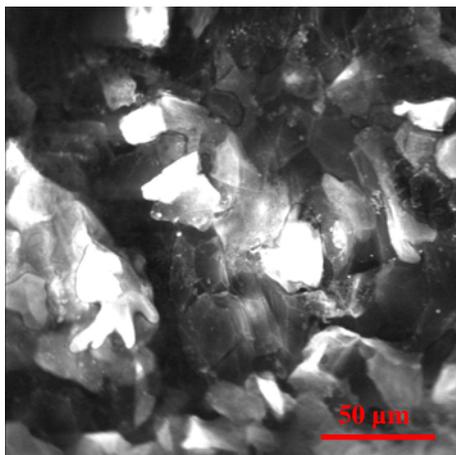


Abb. 45: Hyperkeratose im SCC

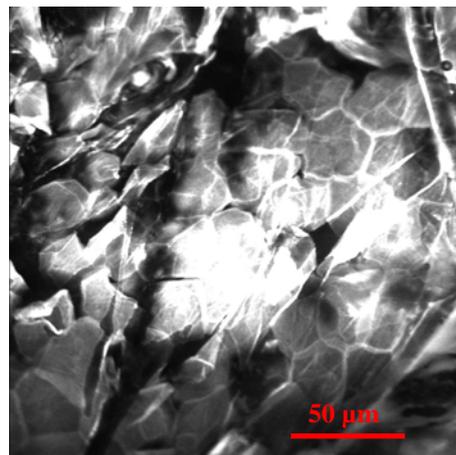


Abb. 46: Hyperkeratose im SCC

SCC bildet ähnlich wie AK eine starke Hyperkeratose aus. Dies führt auch bei SCC zu Schwierigkeiten, tiefere Schichten der Epidermis mit dem KFLSM zu untersuchen. In diesem Fall kann ähnlich wie bei AK wieder der Randbereich des Tumors untersucht werden. In der folgenden Bildserie werden verschiedene Schichten eines SCC dargestellt:

3 Ergebnisse

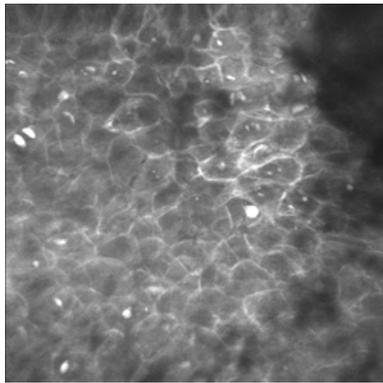


Abb. 47: Stratum granulosum in SCC

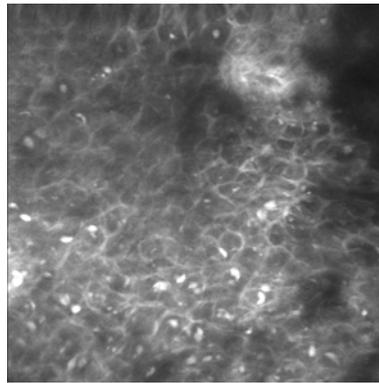


Abb. 48: Stratum spinosum in SCC

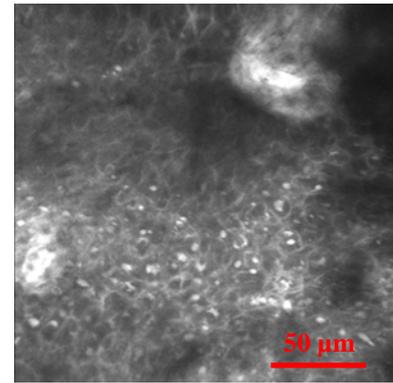


Abb. 49: Stratum basale in SCC

Abb. 47 stellt pathologisch veränderte Zellen im Stratum granulosum, erkennbar an der Zellkernpleomorphie, vergrößerten Interzellularräume und Verlust der regelmäßigen Zellarchitektur. Dieses Bild erstreckt sich bis in das Stratum basale (Abb. 49). Die Abbildungen wirken diffus, jedoch fehlt die Ähnlichkeit mit Stroma, da eine Epithelstruktur vorliegt. Offenbar ist die Verteilung des Farbstoffes im Vergleich zu gesunder Haut, aber auch zu BCC verändert. Außerdem ist es hier nicht möglich, bis in die Dermis vorzudringen. Dadurch kann nicht beurteilt werden, ob der Tumor die Basalmembran durchbrochen hat.

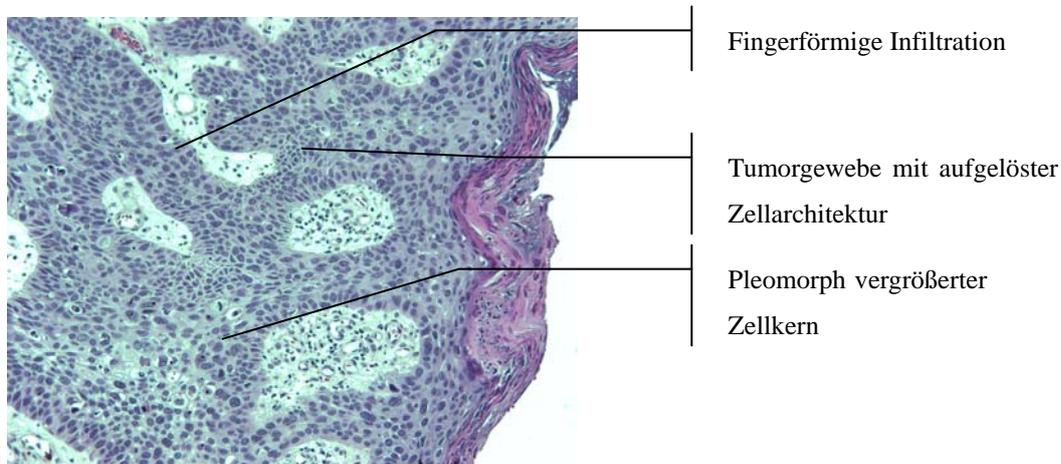


Abb. 50: SCC im HE-Schnitt, M 100:1

Im HE-Schnitt durch ein SCC sind die Tiefenausdehnung des Tumors und der Durchbruch durch die Basalmembran eindeutig sichtbar. Außerdem zeigt dieser Schnitt die vergrößerten pleomorphen Zellkerne, den Verlust der Zellarchitektur und die Schädigung des Stratum granulosum.

3 Ergebnisse

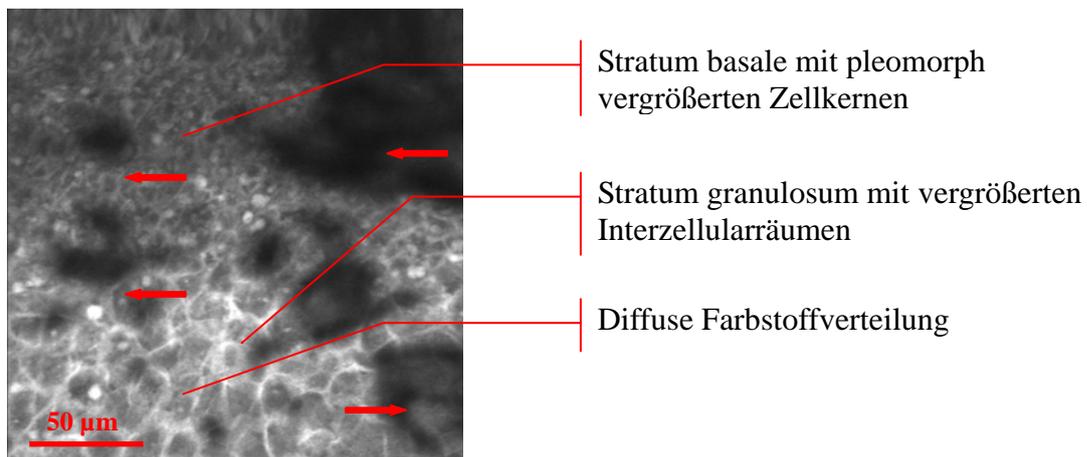


Abb. 51: Stratum granulosum (unten) und Stratum basale im SCC

Die Abb. 51 weist mehrere dunkle Artefakte auf (→).

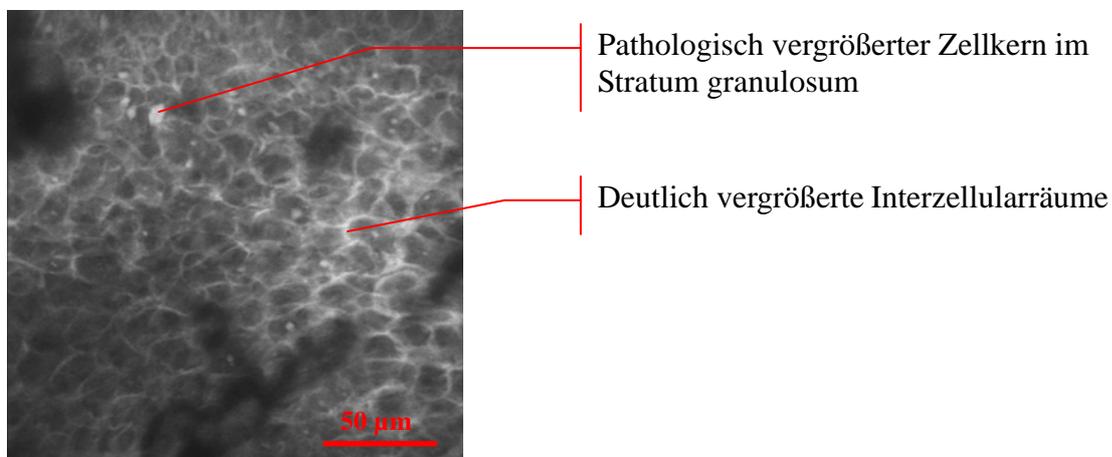


Abb. 52: Stratum granulosum im SCC

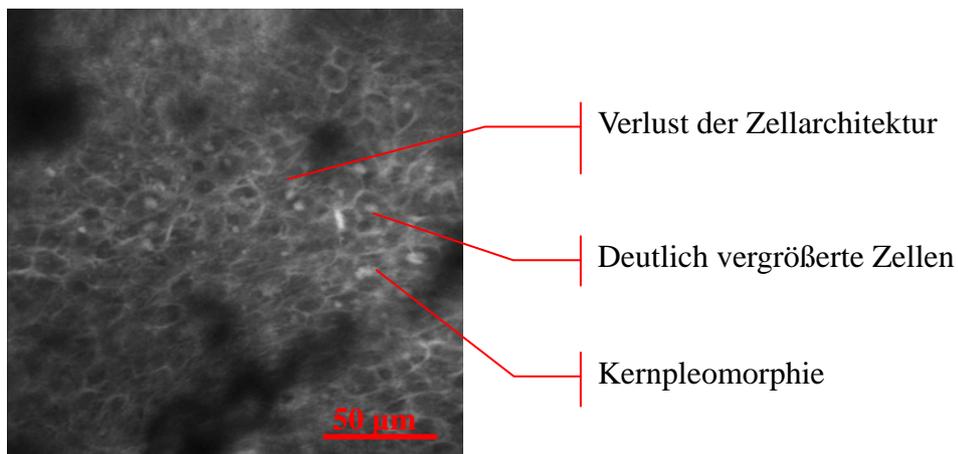


Abb. 53: Vergrößerte Zellen und Zellkerne im Stratum basale eines SCC

3.6 BCC-Verlaufsbilder mit dem KFLSM unter Imiquimod-Therapie

Das Ergebnis der im Kapitel 2.5.2 beschriebenen Behandlung von BCC-Probanden mit Imiquimod 5% soll am Beispiel eines 49jährigen Probanden dargestellt werden. Der Patient wies eine Läsion an der Brust auf, bei der klinisch die Verdachtsdiagnose BCC gestellt wurde:



Abb. 54: BCC vor der Imiquimod-Behandlung, 23.3.2005

Die von der Läsion vor der Behandlung angefertigten LMS-Aufnahmen zeigen die bereits im Kapitel 1.6.1 beschriebenen Merkmale von BCC, nämlich Hyperkeratose (Abb. 55), Tumorzellen mit vergrößertem Zelldurchmesser und elongierten oder runden vergrößerten Zellkernen (Abb. 56).

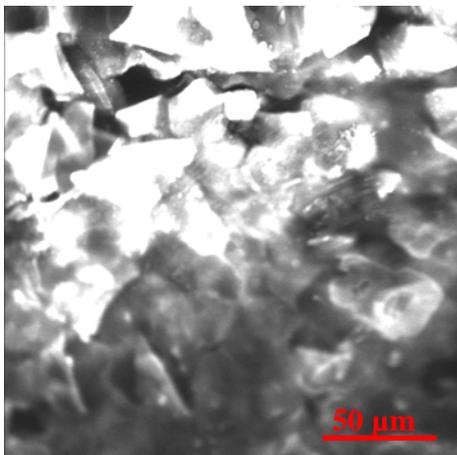


Abb. 55: Hyperkeratose im BCC vor Imiquimod-Behandlung

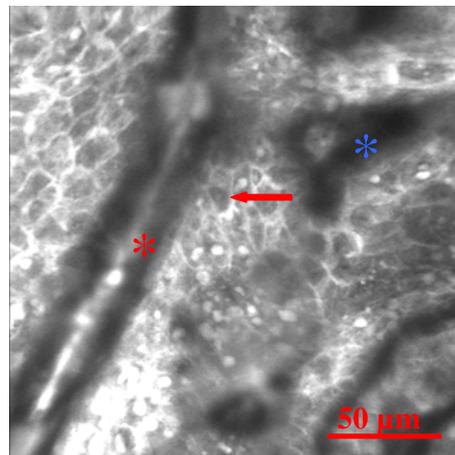


Abb. 56: Tumorzellen im BCC (←), Hautfurche mit Fluoreszeinsammlung (*) und Artefakt (*)

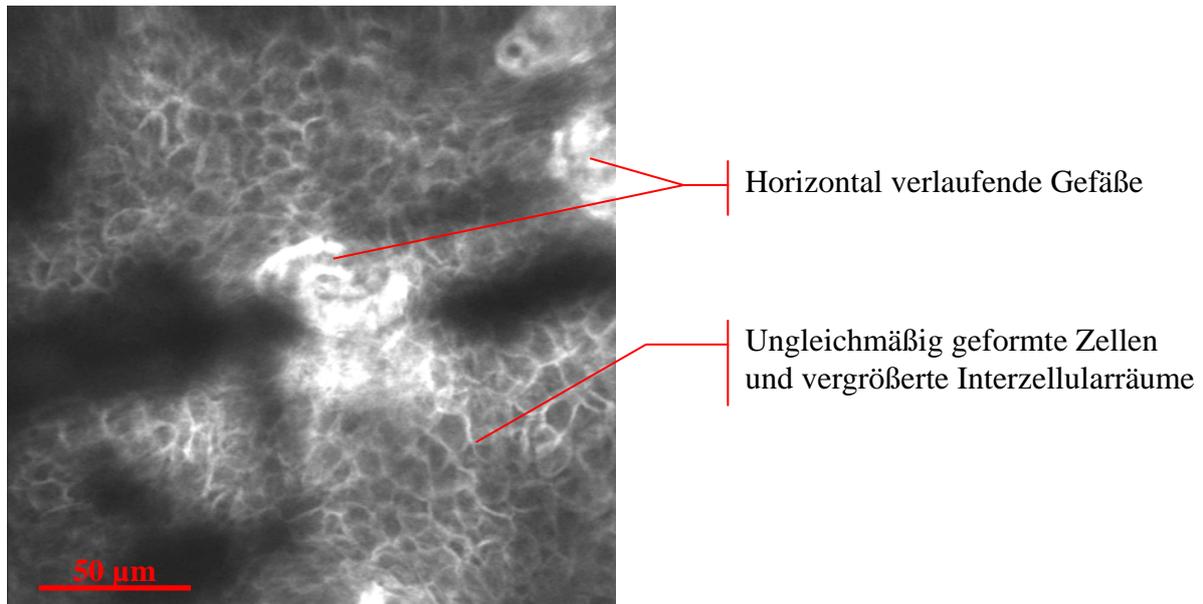


Abb. 57: Tumorzellen im Stratum basale mit Gefäßanschnitten

Die Abb. 57 zeigt zwei angeschnittene horizontal verlaufende Gefäßschlingen mit hell angefärbtem Gefäßlumen und dunklen Blutzellen. Darüber hinaus sind wieder unregelmäßig geformte Zellen mit vergrößerten Interzellularräumen erkennbar.

Nach dem ersten dreiwöchigen Behandlungszyklus ist klinisch eine Entzündungsreaktion mit intensiver Rötung und leichter Krustenbildung sichtbar (Abb. 58):



Abb. 58: Entzündungsreaktion nach 3 Wochen Imiquimod-Therapie, 13.4.2005

3 Ergebnisse

Die KFLSM-Abbildung des Stratum corneum zeigt weiterhin eine Hyperkeratose mit einzelnen Parakeratosen im unteren Bildteil (Abb. 59):

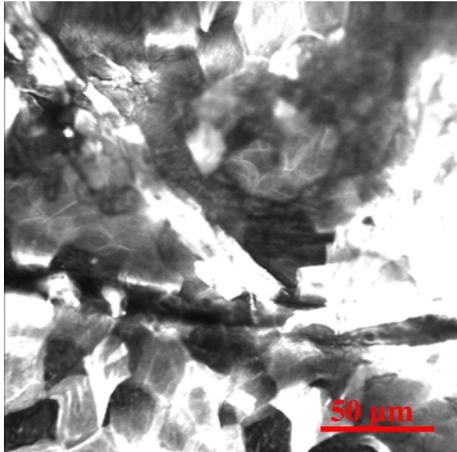


Abb. 59: Hyperkeratose in BCC nach dreiwöchiger Imiquimod-Therapie

Auch die darunter liegenden Schichten weisen noch Merkmale der Erkrankung, wie Palisadenstellung der äußeren Tumorzellen und vergrößerte Zellkerne auf (Abb. 60).

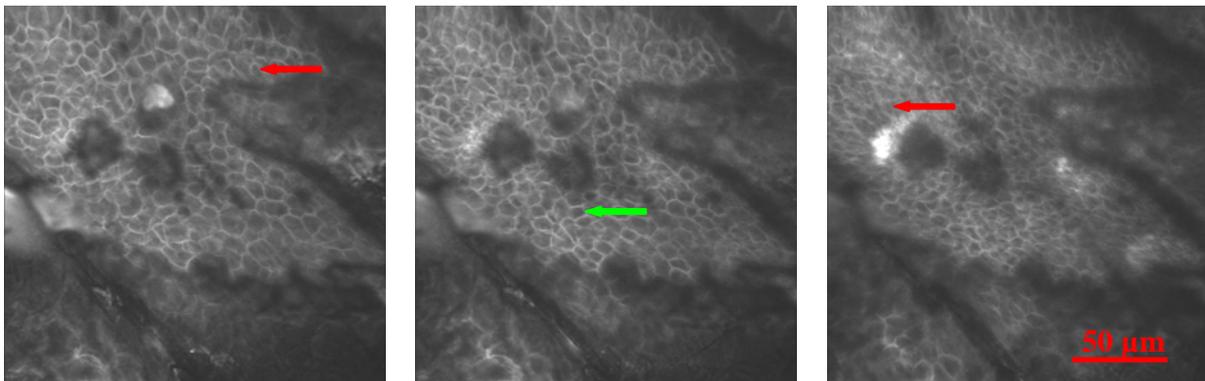


Abb. 60: Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale in BCC nach dreiwöchiger Imiquimod-Therapie

Nach dreiwöchiger Behandlungspause ist die Läsion im klinischen Bild noch deutlich erkennbar, jedoch hat die Entzündungsreaktion abgenommen, was man an der verminderten Rötung sehen kann (Abb. 61):



Abb. 61: Tumor nach dreiwöchiger Behandlungspause, 19.5.2005

3 Ergebnisse

In der Abb. 62a erscheint das Stratum corneum bereits weniger dick. In allen Abbildungen ist eine vertikal verlaufende Furche in der Bildmitte zu erkennen. Die unregelmäßige Zellanordnung und immer noch deutlich vergrößerten Interzellularräumen sowie ein möglicher Gefäßanschnitt im Bild e deuten auf ein Fortbestehen der Erkrankung hin. Die Behandlung wurde fortgesetzt.

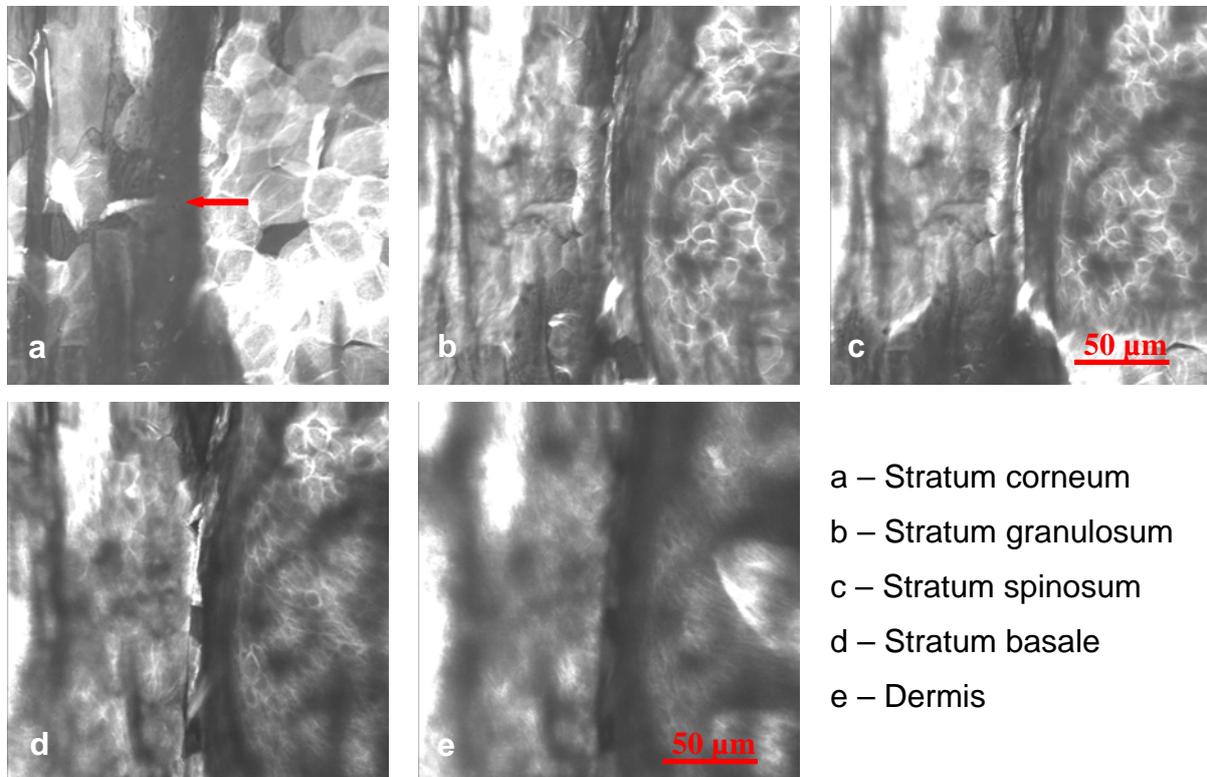


Abb. 62 a - e: Verschiedene Schichten des BCC nach dreiwöchiger Behandlungspause

Nach dem zweiten Behandlungszyklus und einer dreimonatigen Heilungsphase ist die Läsion auf der makroskopischen Aufnahme nur noch schwach zu erkennen (Abb. 63).



Abb. 63: Klinisches Bild der Läsion nach 2 Behandlungszyklen und dreimonatiger Behandlungspause, 6.9.2005

3 Ergebnisse

Das KFLSM-Bild verschiedener Schichten (Abb. 64) der Epidermis zeigt ebenfalls kaum noch Auffälligkeiten im Vergleich mit gesunder Haut.

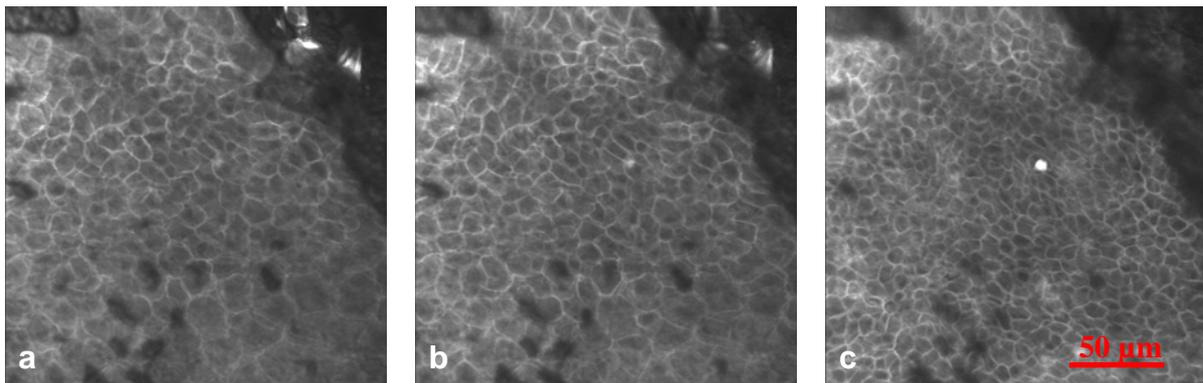


Abb. 64: Stratum spinosum (a, b) und Stratum basale (c) der Läsion nach 2 Behandlungszyklen und 3monatiger Behandlungspause

Im direkten Vergleich des Stratum basale der behandelten Läsion (Abb. 65b) mit der Basalzellschicht eines BCC (Abb. 65a) und gesunder Haut (Abb. 65c) fällt auf, dass insbesondere die Interzellularräume und Zellformen wieder mehr denen gesunder Haut ähneln. Es ist ein eher gleichmäßiger Zellrasen sichtbar, palisadenförmig angeordnete Zellen sind nicht mehr sichtbar.

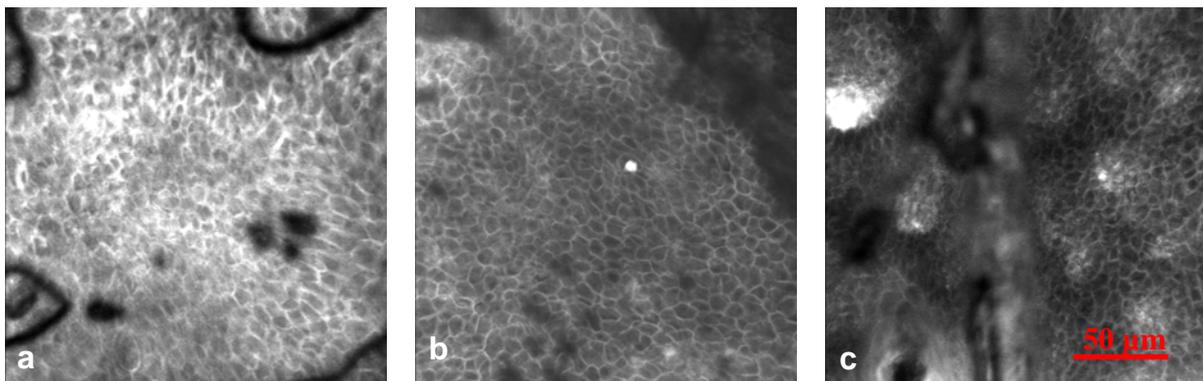


Abb. 65: Direkter Vergleich des Stratum basale aus Abb. 64 c (Bild b) mit einem Stratum basale eines BCC (Bild a) und dem Stratum basale gesunder Haut (Bild c)

3.7 Morphometrische Analyse der KFLSM-Aufnahmen

In den bisherigen Betrachtungen wurden die pathologischen Veränderungen der Epidermis stets qualitativ untersucht. So konnten auf den KFLSM-Aufnahmen Teleangiektasien, der Verlust der Zellarchitektur, Kernpleomorphien oder Palisadenstellung der Tumorzellen und Verhornungsstörungen beobachtet werden. Darüber hinaus waren häufig aber auch quantitative Merkmale der Epidermis auffällig, wie der Durchmesser der Zellen, der Zellkerndurchmesser und sehr oft auch die Größe der Interzellularräume, allerdings wurden sie bisher nur qualitativ im Sinne von „vergrößert“ oder „nicht vergrößert“ betrachtet. Diese wurden einer quantitativen Analyse zugeführt.

3 Ergebnisse

3.7.1 Messprinzip

Die Messung der Zelldurchmesser, der Zellkerndurchmesser und der Größe der Interzellularräume erfolgte bei gesunder Haut nur an Zellen des Stratum basale. Bei erkrankter Haut wurden aufgrund des Verlustes der normalen Zellarchitektur stets Tumorzellen tieferer Schichten, die am ehesten dem Stratum basale entsprechen konnten, ausgewählt, um eine Vergleichbarkeit der Messungen zu ermöglichen.

Für die Messung wurden von jeder Läsion bzw. gesunder Hautpartie drei verschiedene Aufnahmen ausgewählt. Die Messungen erfolgten dann unabhängig voneinander, wenn dies möglich war, an 10 Zellen, 10 Zellkernen und 10 Zellzwischenräumen eines vorher festgelegten Messbereiches . Durch diesen Bereich wurde eine Diagonale von der unteren linken zur oberen rechten Ecke gelegt. Längs dieser Linie wurden dann die zu vermessenden Objekte von links unten nach rechts oben gewählt. Der Messbereich wurde so festgelegt, dass er entweder nur erkranktes Gewebe oder bei gesunder Haut nur Zellen des Stratum basale enthielt.

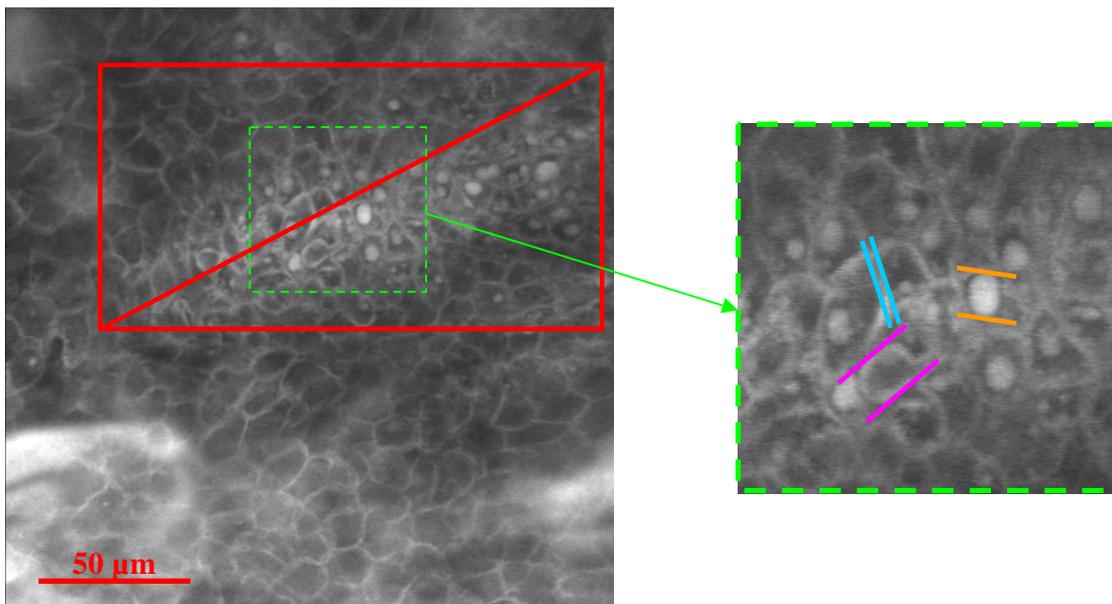


Abb. 66: Darstellung der Messung eines Zelldurchmessers, eines Zellkerndurchmessers und eines Zellzwischenraumes am Beispiel einer AK

Die Abb. 66 zeigt am Beispiel einer AK das Messprinzip. Mittels paralleler Linien kann der Bediener die Ausdehnung des zu messenden Objektes bestimmen. Das Programm analySIS© ermittelt dann den Abstand der Parallelen.

Im Bild symbolisiert  den Messbereich mit der Auswahllinie,  steht für den Zelldurchmesser,  symbolisiert die Größe des Zellkerns, während  den Zellzwischenraum darstellt. Als Messbereich wurde im Bild derjenige Bereich festgelegt, der eindeutig erkennbar das Stratum basale oder nach anderen Kriterien

3 Ergebnisse

(Verlust der Zellarchitektur, Zellkernpleomorphien) einen erkrankten Bereich abbildet. Würden Zellen außerhalb dieses Bereichs (z. B. anderes Stratum) in die Messung einbezogen, dann würde dies die Ergebnisse verfälschen. Oft umfasste der Messbereich die gesamte Aufnahme.

3.7.2 Statistische Auswertung

Im Verlaufe der Studie wurden Hautpartien gesunder und kranker Probanden laserscanmikroskopisch untersucht, einige davon mehrmals. Von jeder Hautpartie wurden drei KFLSM-Aufnahmen gewählt, auf denen pro Aufnahme 10 Messungen des Zelldurchmessers, des Zellkerndurchmessers und des Zellzwischenraums vorgenommen und ausgewertet werden konnten. Ein derartiger Satz von Messungen aus drei Aufnahmen einer Hautpartie wird im Folgenden als ein Fall im Sinne dieser Studie bezeichnet. Wurde eine Probe mehrmals nacheinander untersucht, so entstanden mehrere Fälle. Insgesamt konnten 73 verschiedene Fälle ausgewertet werden, darunter 22 Fälle, bei denen nicht an allen drei Aufnahmen jedes der drei Merkmale je 10mal gemessen werden konnte. Insbesondere war die Messung des Zellkerndurchmessers oder der Zellzwischenräume auf diesen Aufnahmen nicht möglich.

Die gemessenen Werte wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Messwerte für den Zellkerndurchmesser, den Zelldurchmesser und den Zellzwischenraum bei AK, BCC, SCC und gesunder Haut im Allgemeinen nicht normalverteilt sind. Deshalb ist eine weitergehende Untersuchung mittels T-Test oder F-Test nicht zulässig.

Eine anschließende Untersuchung der Messgruppen (30 Messungen je Hautpartie) mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests ergab, dass die Messgruppen, die zu einer Krankheit gehören, nicht homogen sind. Fasst man sie dennoch zusammen und vergleicht die Messwerte verschiedener Krankheiten mit denen gesunder Haut (Mann-Whitney-Test mit 2 Stichproben), so ergibt sich bei allen drei Merkmalen ein signifikanter Unterschied, d. h. sowohl die Zellkerne, als auch die Zelldurchmesser und Interzellularräume erkrankter Zellen sind gegenüber gesunder Haut signifikant vergrößert (Anhang Seite 70 - 72).

In den folgenden Boxplots sollen die Messungen zusammenfassend graphisch dargestellt werden.

Der Boxplot (Abb. 67) zeigt, wie sich die Durchmesser der Zellkerne in gesunden Hautpartien (grün) von denen mit BCC erkrankter (blau) unterscheiden. Ähnliches

3 Ergebnisse

sehen wir auch für die Zellgrößen und die Zellabstände in den Boxplots (Abb. 68, Abb. 69). Die Boxplots Abb. 70 bis Abb. 75 stellen die Verhältnisse zwischen gesunder Haut und AK bzw. SCC dar, Abb. 76 bis Abb. 78 veranschaulichen die Messwerte im Vergleich zwischen AK und SCC.

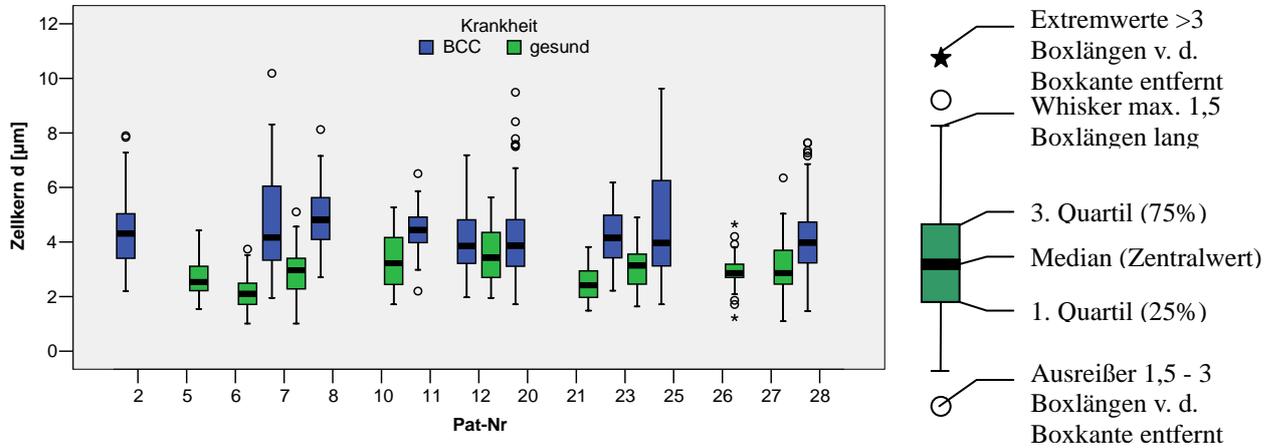


Abb. 67: Boxplot Vergleich Zellkerndurchmesser gesund - BCC

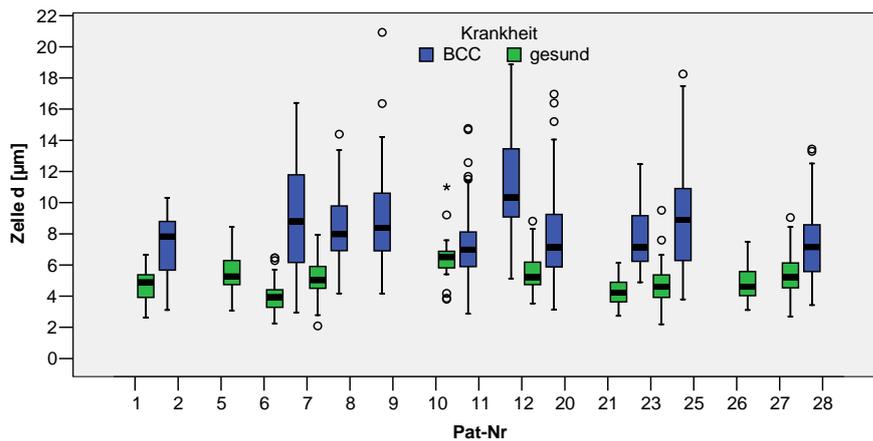


Abb. 68: Boxplot Vergleich Zelldurchmesser gesund - BCC

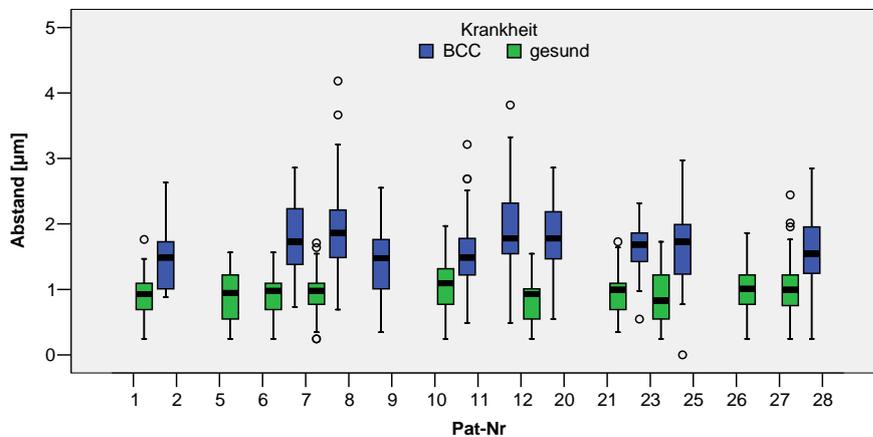


Abb. 69: Boxplot Vergleich Zellabstände gesund - BCC

3 Ergebnisse

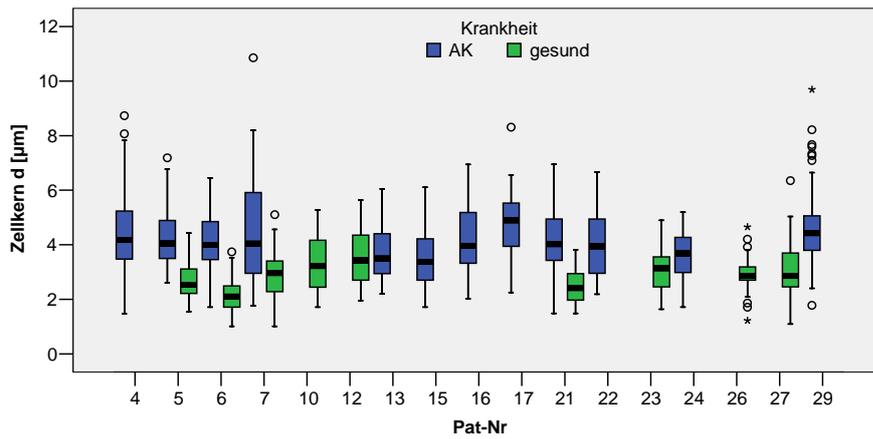


Abb. 70: Boxplot Vergleich Zellkerndurchmesser gesund - AK

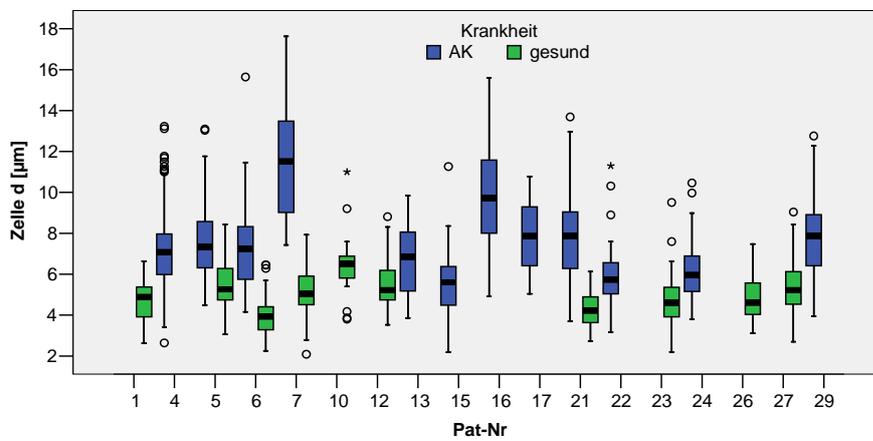


Abb. 71: Boxplot Vergleich Zelldurchmesser gesund - AK

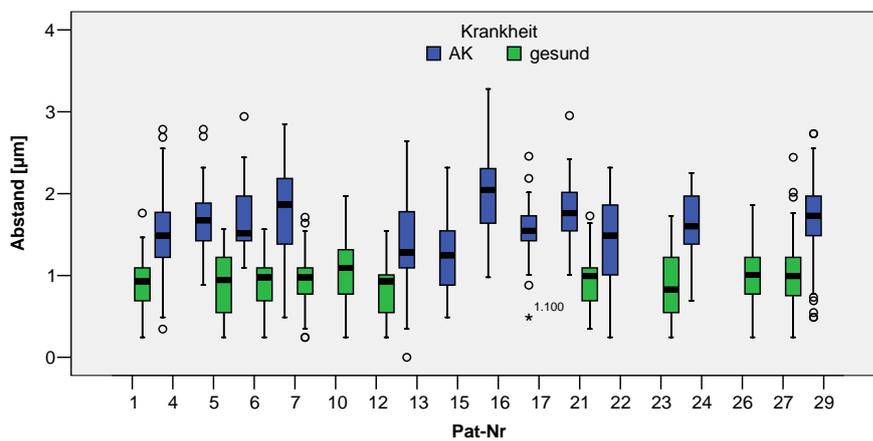


Abb. 72: Boxplot Vergleich Zellabstände gesund – AK

3 Ergebnisse

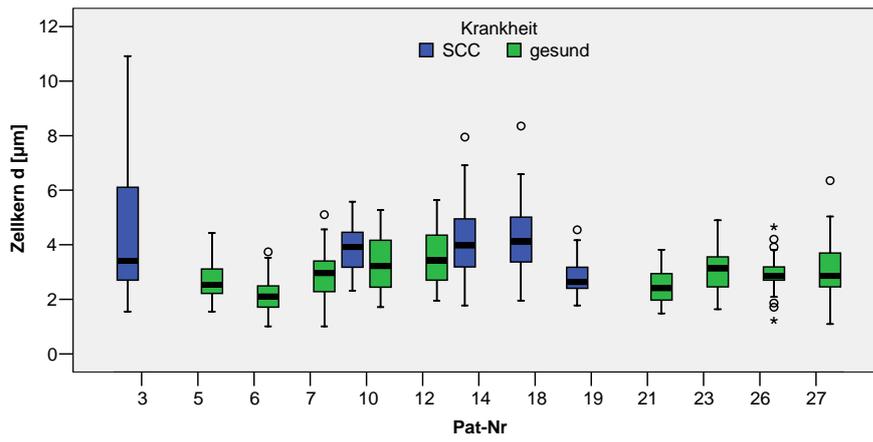


Abb. 73: Boxplot Vergleich Zellkerndurchmesser gesund - SCC

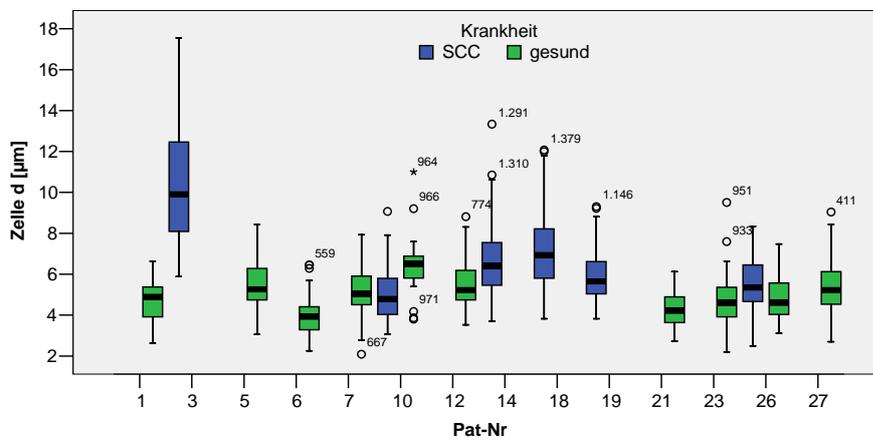


Abb. 74: Boxplot Vergleich Zelldurchmesser gesund - SCC

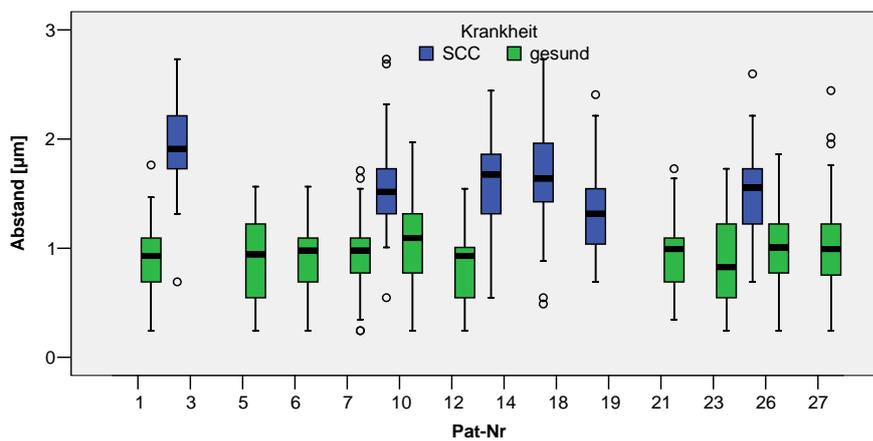


Abb. 75: Boxplot Vergleich Zellabstände gesund – SCC

3 Ergebnisse

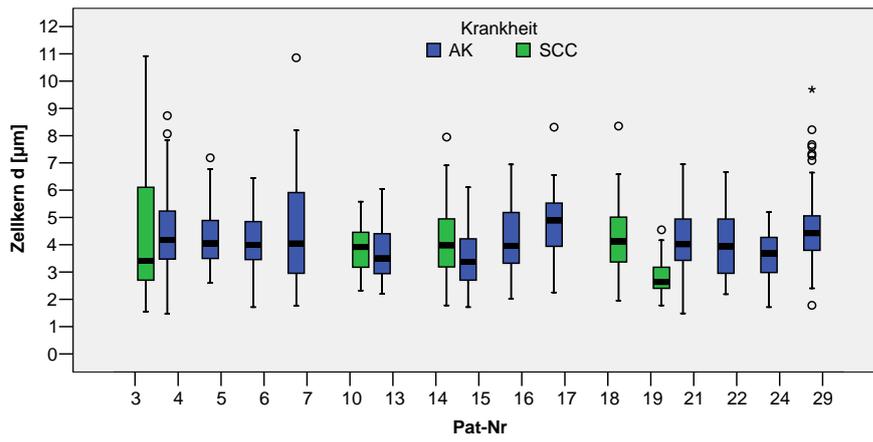


Abb. 76: Boxplot Vergleich Zellkerndurchmesser AK - SCC

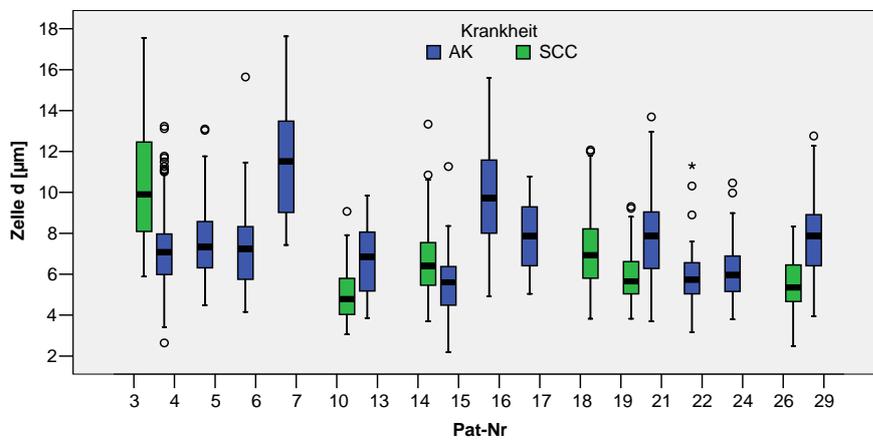


Abb. 77: Boxplot Vergleich Zelldurchmesser AK – SCC

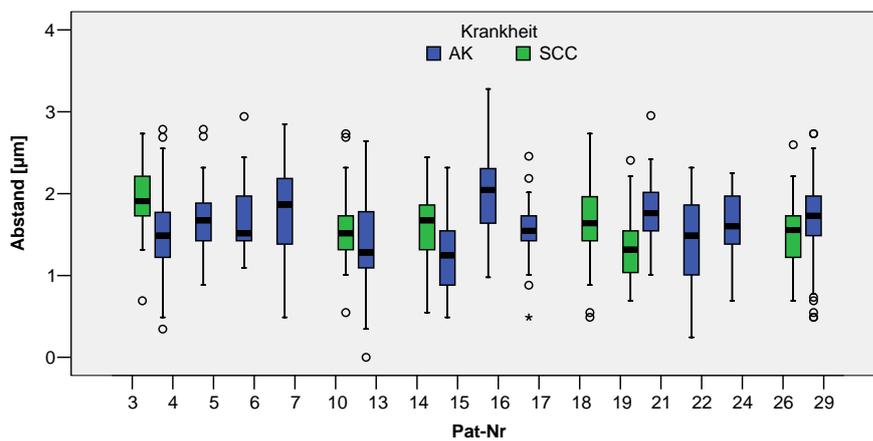


Abb. 78: Boxplot Vergleich Zellabstände AK – SCC

3 Ergebnisse

Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse konstatieren:

Tabelle 2: In KFLSM-Aufnahmen sichtbare Hauptmerkmale von BCC, AK und SCC
(x - vorhanden, + - schwache, ++ - mittlere, +++ - starke Ausprägung)

Merkmal	BCC	AK	SCC
Verstärkte Ausbreitung des Fluoreszeins in der Läsion (makroskopisch)	x	x	x
Hyperkeratose	+	+++	+++
Parakeratose	x	x	x
Schädigung des Stratum granulosum	x		x
Verlust der Zellarchitektur	++	++	+++
Tumorzellnester	x		
Palisadenstellung der äußeren Tumorzellen	x		
Horizontal verlaufende Gefäßschlingen	x		
Diffuse Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs in den Zellen	+	++	+++
Kernpleomorphien		x	x
Elongierte Zellkerne	x		
Vergrößerte Zellkerne	x	x	x
Vergrößerte Zellen	x	x	x
Vergrößerte Interzellulärabstände	x	x	x

4 Diskussion

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, stellen die bisher angewendeten Diagnoseverfahren für epitheliale Hauttumoren eine große Belastung für die Patienten dar und lassen wegen der Invasivität keine Beobachtung des Krankheits- und Therapieverlaufs zu. Mit der Entwicklung der konfokalen Laserscanmikroskopie steht eine neue Technologie zur Verfügung, welche die Haut in Echtzeit abbilden kann, so dass auch dynamische, physiologische und pathologische Prozesse beobachtbar werden, ohne Verletzungen der Haut zu verursachen. Frühere Studien zeigten, dass mit Hilfe des KFLSM die Zellarchitektur in vergleichbarer Weise abgebildet werden kann wie mit der Routine-Histologie [66]. Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie auf ihre Eignung für die Erkennung von charakteristischen Merkmalen der epithelialen Hauttumoren (AK, SCC und BCC) zu untersuchen, und dabei möglicherweise auch zwischen BCC, AK und SCC unterscheiden zu können. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob sich dieses Verfahren für eine Verlaufskontrolle einer Imiquimod-Therapie bei BCC eignet. Damit sollte eine Möglichkeit für eine nicht-invasive Diagnose und Therapiekontrolle aufgezeigt werden.

Die laser-scan-mikroskopischen Abbildungen entstehen als Fluoreszenzbilder des charakteristischen Verteilungsmusters des Farbstoffes im Gewebe. Die aus diesen Abbildungen gefundenen morphologischen Charakteristika wurden zusammen mit den makroskopischen Aufnahmen für die Diagnose herangezogen.

Um nun zwischen BCC, AK und SCC unterscheiden zu können, wurden bestimmte qualitative Merkmale dieser drei Erkrankungen gefunden, die zum Teil auch in der Routine-Histologie herangezogen werden und sich auch mit dem KFLSM beobachten lassen. Zusätzlich wurden Merkmale gefunden, die sich nur mit Hilfe des KFLSM beobachten lassen, da sie auf der Art und Weise der Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes im Gewebe beruhen (z. B. Barrierschaden der Zellmembranen).

Die Studie untersuchte verschiedene quantitative Merkmale, wie die Größe der Zellen und Zellkerne sowie die Breite des Interzellulärspaltes. Dabei ergab sich, dass die Werte von allen drei Merkmalen sowohl bei BCC als auch bei AK und SCC gegenüber gesunder Haut signifikant vergrößert sind. Allerdings unterscheiden sich diese Werte zwischen den drei Krankheiten nicht signifikant, sodass eine Entscheidung, welche der Erkrankungen vorliegt, anhand dieser quantitativen Werte nicht möglich ist. Jedoch können diese Messwerte genutzt werden, um nach einer Therapie den Verlauf und eine mögliche Genesung festzustellen.

Besonders betont werden muss jedoch, dass ein einzelnes beobachtetes Merkmal allein nicht für die Diagnose der o. g. Erkrankungen genügt, sondern erst die Kombination verschiedener Merkmale. Die Studie zeigt, dass mit Hilfe des KFLSM sowohl qualitative als auch quantitative Kriterien für die Diagnose und die Beurteilung eines Therapiefortschritts beobachtet werden können.

Die beim BCC häufig vorkommenden Teleangiektasie konnten mit dem KFLSM nachgewiesen werden. Pathologisch veränderte Gefäße wurden bereits von Sauer-
mann et al. mit Hilfe des Reflektions-LSM beobachtet [67]. Durch die in vivo-
Beobachtung ist es sogar möglich, die Bewegung von Blutzellen zu erkennen. Die
durch den Tumor induzierte Bildung von Teleangiektasien im Randbereich des
Tumors [68] hat eine verstärkte Durchblutung und damit Versorgung des Tumors zur
Folge [69]. Enejder et al. beschreiben, wie mit Hilfe des Laser-Doppler-Verfahrens
die Abnahme der Durchblutung nach Kryotherapie und Photodynamischer Therapie
innerhalb der Läsion gezeigt werden konnte [76]. Mit der Möglichkeit des KFLSM,
Teleangiektasien darzustellen, eröffnet es auch hier einen Weg, den Therapieerfolg
zu beurteilen, insbesondere dann, wenn Teleangiektasien nicht mehr nachweisbar
sind und auch die übrigen Merkmale des BCC fehlen.

Deutlich sichtbar sind auch Tumornester im Stratum basale mit palisadenförmig
angeordneten Basalzellen im äußeren Bereich des Tumors. Derartig angeordnete
Strukturen werden auch bei Gonzalez et al. [70] und Greger et al. [71] beschrieben.
Auch im Innern des Tumors zeigt das KFLSM, dass die sonst regelmäßige Anord-
nung der Zellen im Stratum basale und den darüber liegenden Zellschichten inner-
halb des Tumors zerstört ist. Weitere Merkmale eines BCC, welche mit dem KFLSM
beobachtet werden können, sind Verhornungsstörungen wie Parakeratose und
leichte Hyperkeratose sowie elongierte Zellkerne.

Diese Kriterien können für die Diagnose des BCC genutzt werden, da sie für das
BCC charakteristisch sind, d.h. beim Nachweis aller dieser Merkmale kann vom
Vorliegen eines BCC ausgegangen werden. Wie oben gezeigt, kann das KFLSM
also prinzipiell diejenigen Kriterien darstellen, die standardmäßig mittels Histologie zu
erkennen sind. Nori et. al. fanden ähnliche Kriterien für die Diagnose von BCC mit
dem Reflektions-LSM und untersuchten sie auf Sensitivität und Spezifität [72].

Darüber hinaus können mit dem KFLSM weitere, quantitativ erfassbare Merkmale
des BCC bestimmt werden. Solche Merkmale sind der Zellkerndurchmesser, der
Zelldurchmesser und der Zellabstand. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass alle
drei Merkmale mit großer Genauigkeit und reproduzierbar gemessen werden kön-

nen. Ein statistischer Test (Mann-Whitney-Test) ergibt einen hoch signifikanten Unterschied zwischen gesundem und erkranktem Gewebe.

Die Betrachtung der Ergebnisse von AK und SCC soll gemeinsam erfolgen, da AK die Präkanzerose des SCC ist. Das wesentliche histologische Unterscheidungskriterium zwischen AK und SCC besteht darin, dass beim SCC der Tumor die Basalmembran durchbrochen hat, weshalb eine Metastasierung möglich ist. Hieraus ergibt sich ein unterschiedliches therapeutisches Vorgehen und die Notwendigkeit, sie diagnostisch zu unterscheiden. Mit dem KFLSM ist eine Abbildung der Haut nur bis zu einer Tiefe von maximal 250 µm möglich. Damit ist die Basalmembran einer Beobachtung mit dem KFLSM weitgehend unzugänglich. Deshalb wäre es sehr hilfreich, wenn es Kriterien gäbe, die mit dem KFLSM zu beobachten wären, die eine Unterscheidung von AK und SCC ermöglichen.

AK und SCC sind durch eine ausgeprägte Hyperkeratose sowie häufigen Parakeratosen gekennzeichnet. Dies bereitet große Schwierigkeiten beim Einsatz des KFLSM, da die Hyperkeratose ein Eindringen des Laserstrahls in die tieferen Schichten der Epidermis stark behindert. Hierin liegt die wesentliche Ursache, weshalb bei AK und SCC das Stratum spinale und das Stratum basale oft nicht zu beobachten sind. Deshalb wurde die Untersuchung in solchen Fällen am Rand der Läsion ausgeführt. Andere Möglichkeiten bestehen im Abtragen der Hyperkeratose. Dazu eignet sich prinzipiell Salizylsäure. Allerdings können dabei auch die Zellen des Stratum spinale oder des Stratum basale beschädigt werden. Möglich wäre auch ein mechanisches Abtragen der Hornschicht bei fortgesetzter Erfolgskontrolle.

Die Beurteilung des Stratum granulosum ergab, dass bei einer Erkrankung an SCC pathologische Veränderungen bis in die obersten Schichten der Epidermis auftraten, während sie bei AK primär im Stratum spinosum auffielen. Eine solche Veränderung ist das Vorhandensein von zahlreichen Kernpleomorphismen und Vergrößerungen des Zellkerns. Häufig sind atypische Formen des Zellkerns. Im Vergleich mit den entsprechenden Schichten gesunder Haut erscheinen gehäuft auch Zellen mit deutlich vergrößertem Durchmesser und einer unregelmäßigen Zellanordnung (Verlust der Zellarchitektur).

Sehr auffällig insbesondere beim SCC ist die Verteilung des Farbstoffes. Bereits das Stratum granulosum zeigt ein diffuses, ausgesprochen helles Bild. In einigen Bereichen sind die Zellzwischenräume vergrößert bei kaum angefärbtem Zytoplasma. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit einer Schädigung der Desmosomen, die die Zellen verbinden. Eventuell besteht hier ein Zusammenhang zur

makroskopischen Beobachtung der schnellen und großflächigen Farbstoffausbreitung nach der Injektion bei allen drei untersuchten Erkrankungen. In anderen Bereichen dagegen sind die Zellen kaum noch unterscheidbar. Das Zytoplasma erscheint stärker angefärbt, was auf eine Schädigung der Barrierefunktion der Zellmembran mit einer Änderung der Farbstoffkinetik hindeutet. Dieses Merkmal ist in der Routine-Histologie nicht sichtbar. Offenbar gelangt der Farbstoff hier schneller und in größerem Umfang ins Zellinnere. Bei der AK ist diese Farbstoffverteilung ebenfalls ab dem Stratum basale bis zum Stratum spinosum erkennbar, allerdings nicht im gleichen Ausmaß. Offenbar liegt beim SCC eine stärkere Schädigung der Zellen vor, die vom Stratum basale bis ins Stratum granulosum reicht. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Aghassi, Anderson und Gonzalez in [77] und Selkin und Rajadhyaksha in [78] unter Verwendung des Reflektions-LSM.

Ähnlich wie beim BCC ergibt die Studie auch bei AK und SCC, dass typische krankhafte Veränderungen der Haut mit dem KFLSM zu erkennen sind, aber auch hier reichen insbesondere die Messungen an den Zellen nicht für eine klare differentialdiagnostische Abgrenzung. Zwar sind die Zellen, Zellkerne und Interzellularräume im Vergleich zu gesunder Haut signifikant vergrößert, beim Vergleich von AK und SCC ist eine sichere Unterscheidung jedoch nicht möglich. Für die Beurteilung eines Erfolges unterschiedlicher Therapieformen (Kryotherapie, Photodynamische u. a.) sowohl bei AK als auch bei SCC sind die Beobachtungen jedoch möglicherweise ausreichend. So sind zusammenfassend die Merkmale, die zu einer Unterscheidung zwischen AK und SCC heran gezogen werden können, die Farbstoffverteilung und das Vorkommen pathologischer Veränderungen im Stratum granulosum.

Im Rahmen dieser Studie wurde an drei mit Imiquimod behandelte BCC-Probanden der Heilungsverlauf über einen längeren Zeitraum beobachtet und an einem Fall exemplarisch dargestellt.

Im beschriebenen Fall wurde zunächst klinisch die Verdachtsdiagnose BCC gestellt, dann auch anhand von KFLSM-Aufnahmen diagnostiziert. Die Aufnahmen zeigten alle für BCC typischen Merkmale, wie Verhornungsstörungen, elongierte und vergrößerte Zellkerne in den Tumorzellen, Palisadenstellung der Zellen am Rand des Tumors und Teleangiektasien.

An die nicht-invasive Untersuchung schloss sich die ebenfalls nicht-invasive Therapie mit Imiquimod 5% an. Im Verlauf der Therapie kam es zu einer inflammatorischen Reaktion mit Rötung und leichter Krustenbildung. Die KFLSM-Aufnahmen zeigten weiterhin die Merkmale eines BCC.

Nach einer sich anschließende dreiwöchigen Behandlungspause konnte ein Rückgang der Entzündung festgestellt werden. Der Tumor war jedoch noch nachweisbar, weshalb die Therapie für weitere drei Wochen fortgesetzt werden musste. Hieran schloss sich eine dreimonatige Behandlungspause an, nach der kein Tumor mehr nachweisbar war. Insbesondere der direkte Vergleich des Stratum basale der zu beurteilenden Läsion mit Aufnahmen eines BCC und gesunder Haut demonstriert den Heilungserfolg nachdrücklich. Während des Therapieverlaufs konnte klinisch eine sukzessive Verbesserung des Zustands der Hautoberfläche festgestellt werden, bis kein Unterschied zu gesunder Haut mehr sichtbar war. Mit dem KFLSM konnte nun kontrolliert werden, ob in den darunter liegenden Zellschichten noch pathologische Veränderungen auftraten.

Während dieser mehrwöchigen Beobachtung des Behandlungsfortschritts konnte festgestellt werden, dass sich das KFLSM bei der Untersuchung von BCC besonders bewährt hat, was auf die meist wenig ausgeprägte Hyperkeratose zurückzuführen ist.

4.1 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ziele der Studie, mit dem konfokalen Fluoreszenz-LSM wesentliche Merkmale von BCC, AK und SCC zu erkennen und für die Diagnose von BCC zu nutzen, erreicht worden sind. In eingeschränkter Weise konnte dies auch für eine Differenzierung von AK und SCC festgestellt werden. So kann das KFLSM helfen, die Ausdehnung des jeweiligen Krankheitsherdes abzugrenzen.

Ein wesentlicher Effekt, der mit dem KFLSM erzielt werden kann, ist die Möglichkeit, Heilungsprozesse in ihrem zeitlichen Verlauf intravital darzustellen, ohne sie dabei durch das Diagnoseverfahren zu beeinflussen, wie dies bei der Biopsie der Fall ist. Mit dem KFLSM ist eine nicht-invasive Behandlung von BCC-Probanden über Diagnose Therapie und Therapiekontrolle möglich geworden, wie sie auch mit dem konfokalen Reflektions-LSM erreicht wurde [40]. Insgesamt lässt sich feststellen, dass mit dem KFLSM sowohl qualitative Merkmale gefunden werden können, als auch messtechnisch erfassbare Veränderungen der Haut nachweisbar sind.

4.2 Probleme und deren mögliche Lösung

Ein wesentliches Problem, welches vor einem Praxiseinsatz dieses Verfahrens gelöst werden müsste, ist die Art der Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes. Eine Injektion des Farbstoffes ist schmerzhaft und birgt das Risiko der Metastasierung, falls eine

andere Krebsart vorliegt (malignes Melanom). Durch eine geeignete Aufbereitung des Farbstoffes müsste dieser nach oberflächlicher Applikation selbst in die Haut diffundieren.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass es schwierig oder unmöglich ist, eine früher untersuchte Hautstelle wieder zu finden, da die Größe des Untersuchungsgebietes nur 200 µm beträgt. Mögliche Ansätze dafür wären ein Verfahren zur Mustererkennung, verschiedene Stufen des Abbildungsmaßstabs oder eine dauerhafte Markierung der untersuchten Hautstelle oder Kombinationen davon. Denkbar wäre auch die Anfertigung von Transparenzfolien der Läsion mit Rasterzeichnung und prädefinierter anatomischer Leitstrukturen. Ein weiterer Lösungsansatz besteht in einer mechanischen Fixierung der Sonde (vgl. Reflektions-LSM „Vivascope 1000“, [80]) für die Dauer einer Sitzung, was die Flexibilität während der Untersuchung jedoch einschränkt.

4.3 Ausblick

In weiteren Studien muss untersucht werden, wie hoch die Spezifität und Sensitivität verschiedener Merkmalskombinationen für die Diagnose des BCC ist, wobei auf höhere Fallzahlen, Randomisierung und Verblindung der Studie zu achten ist.

Das Verfahren könnte angewendet werden, um die Vollständigkeit einer Exzision zu überprüfen. Bei unvollständiger Exzision tritt in ca. 30% der Fälle ein Rezidiv auf [73]. Gerade die häufig fingerförmigen Ausläufer von BCC sind oft klinisch schwer zu erfassen und führen so zu einer unvollständigen Entfernung des Tumors mit anschließender Rezidivbildung [74]. Mit der Frage des Auftretens von Rezidiven bzw. der Spontanheilung bei unvollständiger Exzision befassen sich Breuninger et al. in [75]. Tritt beispielsweise nach einer Biopsie ein Erythem in der Umgebung der Narbe auf, so kann mittels des KFLSM bereits in vivo und nicht-invasiv abgeklärt werden, ob ein Rezidiv vorliegt, wodurch sich die Therapieoptionen im Vergleich zur Primärerkrankung verändern können [34].

Weitere Untersuchungen müssen klären, ob und unter welchen Umständen die gefundenen Merkmale für eine sichere Abgrenzung zwischen AK und SCC genügen. Häufig finden sich ausgedehnte AK, die sich klinisch schwer von chronisch UV-geschädigter Haut unterscheiden lassen, wodurch auch die Feststellung der gesamten Größe der AK schwierig wird [79]. Solche Feldkanzerisierungen weisen oft nur geringe Hyperkeratosen auf, was hier den Einsatz des KFLSM zulässt. Hier bietet das KFLSM die Möglichkeit einer einfachen und schonenden Feststellung der

4 Diskussion

Ausdehnung. Bei solchen großflächigen Erkrankungen ist die Exzision nicht die Therapie der Wahl. Hier eröffnet das KFLSM eine Chance für eine nicht-invasive Therapiekontrolle an diesen ausgedehnten Erkrankungen, um eine raschere Bildanalyse zu ermöglichen. Der Einsatz von automatisierten Bildauswertungs- und -vermessungsverfahren sollte in weiteren Studien untersucht werden.

5 Anhang

Morphometrische Analyse (SPSS)

Nichtparametrische Tests BCC auf Normalverteilung

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zellkern	520	4,4215	1,4903	1,4663	10,1851	3,3239	4,1938	5,1841

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		Zellkern
N		520
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert	4,4215
	Standardabweichung	1,4903
Extremste Differenzen	Absolut	,083
	Positiv	,083
	Negativ	-,042
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,895
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,002

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zelle	720	8,0273	2,7265	2,8604	20,9226	6,0653	7,4766	9,4212

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		Zelle
N		720
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert	8,0273
	Standardabweichung	2,7265
Extremste Differenzen	Absolut	,095
	Positiv	,095
	Negativ	-,054
Kolmogorov-Smirnov-Z		2,546
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,000

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Abstand	720	1,6665	,5359	,0000	4,1831	1,3160	1,6393	1,9702

5 Anhang

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		Abstand
N		720
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert	1,6665
	Standardabweichung	,5359
Extremste Differenzen	Absolut	,074
	Positiv	,074
	Negativ	-,046
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,978
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,001

- a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.
b Aus den Daten berechnet.

Nichtparametrische Tests AK auf Normalverteilung

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zellkern	660	4,3067	1,3139	1,4663	10,8550	3,4213	4,1616	5,0380

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		Zellkern
N		660
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert	4,3067
	Standardabweichung	1,3139
Extremste Differenzen	Absolut	,064
	Positiv	,064
	Negativ	-,037
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,642
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,009

- a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.
b Aus den Daten berechnet.

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zelle	730	7,5200	2,2301	2,1858	17,6292	5,9848	7,3334	8,6090

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		Zelle
N		730
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert	7,5200
	Standardabweichung	2,2301
Extremste Differenzen	Absolut	,083
	Positiv	,083
	Negativ	-,041
Kolmogorov-Smirnov-Z		2,231
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,000

- a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.
b Aus den Daten berechnet.

Deskriptive Statistiken

5 Anhang

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Abstand	707	1,5958	,4831	,0000	3,2787	1,2461	1,5648	1,9550

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

			Abstand
N			707
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert		1,5958
	Standardabweichung		,4831
Extremste Differenzen	Absolut		,066
	Positiv		,059
	Negativ		-,066
Kolmogorov-Smirnov-Z			1,759
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)			,004

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

Nichtparametrische Tests SCC auf Normalverteilung

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zellkern	140	4,1202	1,5669	1,5456	10,9208	2,9755	3,9291	4,9423

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

			Zellkern
N			140
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert		4,1202
	Standardabweichung		1,5669
Extremste Differenzen	Absolut		,103
	Positiv		,103
	Negativ		-,073
Kolmogorov-Smirnov-Z			1,215
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)			,104

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zelle	210	6,8690	2,5760	2,4922	17,5579	5,0380	6,3773	8,1235

5 Anhang

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		Zelle
N		210
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert	6,8690
	Standardabweichung	2,5760
Extremste Differenzen	Absolut	,115
	Positiv	,115
	Negativ	-,078
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,670
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,008

- a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.
b Aus den Daten berechnet.

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Abstand	210	1,6197	,4626	,4888	2,7322	1,3160	1,6393	1,9087

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		Abstand
N		210
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert	1,6197
	Standardabweichung	,4626
Extremste Differenzen	Absolut	,080
	Positiv	,080
	Negativ	-,047
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,152
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,141

- a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.
b Aus den Daten berechnet.

Nichtparametrische Tests gesunde Haut auf Normalverteilung

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zellkern	320	2,9376	,9364	1,0076	6,3539	2,2531	2,8499	3,4733

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		Zellkern
N		320
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert	2,9376
	Standardabweichung	,9364
Extremste Differenzen	Absolut	,068
	Positiv	,068
	Negativ	-,042
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,219
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,102

- a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.
b Aus den Daten berechnet.

5 Anhang

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zelle	480	4,9658	1,3018	2,0880	10,9998	4,0304	4,8168	5,7260

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

			Zelle
N			480
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert		4,9658
	Standardabweichung		1,3018
Extremste Differenzen	Absolut		,063
	Positiv		,063
	Negativ		-,024
Kolmogorov-Smirnov-Z			1,371
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)			,047

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Abstand	480	,9302	,3679	,2444	2,4438	,6912	,9775	1,2219

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

			Abstand
N			480
Parameter der Normalverteilung(a,b)	Mittelwert		,9302
	Standardabweichung		,3679
Extremste Differenzen	Absolut		,085
	Positiv		,085
	Negativ		-,074
Kolmogorov-Smirnov-Z			1,859
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)			,002

a Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b Aus den Daten berechnet.

Nichtparametrische Tests auf Homogenität bei gesunder Haut

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zellkern	320	2,9376	,9364	1,0076	6,3539	2,2531	2,8499	3,4733
Gruppe	480	25,25	5,098	14	33	21,25	25,50	29,75

Kruskal-Wallis-Test

Ränge				
	Gruppe	N	Mittlerer Rang	
Zellkern	14	30	191,20	
	19	30	89,20	
	21	30	110,65	
	22	30	156,00	
	24	30	169,48	
	26	30	221,08	
	27	20	137,93	
	28	30	132,72	
	29	30	165,57	
	32	30	188,13	
	33	30	196,02	
	Gesamt		320	

Statistik für Test(a,b)	
	Zellkern
Chi-Quadrat	54,150
df	10
Asymptotische Signifikanz	,000

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zelle	480	4,9658	1,3018	2,0880	10,9998	4,0304	4,8168	5,7260
Gruppe	480	25,25	5,098	14	33	21,25	25,50	29,75

Kruskal-Wallis-Test

Ränge			
	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Zelle	14	30	340,77
	19	30	129,15
	20	30	115,40
	21	30	162,60
	22	30	326,28
	23	30	246,77
	24	30	244,68
	25	30	225,32
	26	30	298,63
	27	30	224,25
	28	30	303,30
	29	30	224,67
	30	30	161,45
	31	30	190,05
	32	30	267,57
	33	30	387,12
Gesamt		480	

5 Anhang

Statistik für Test(a,b)

	Zelle
Chi-Quadrat	141,400
df	15
Asymptotische Signifikanz	,000

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Abstand	480	,9302	,3679	,2444	2,4438	,6912	,9775	1,2219
Gruppe	480	25,25	5,098	14	33	21,25	25,50	29,75

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Abstand	14	30	312,28
	19	30	218,07
	20	30	253,03
	21	30	250,62
	22	30	229,98
	23	30	271,30
	24	30	238,90
	25	30	224,97
	26	30	213,42
	27	30	221,17
	28	30	234,63
	29	30	258,27
	30	30	198,12
	31	30	223,12
	32	30	213,97
	33	30	286,17
	Gesamt	480	

Statistik für Test(a,b)

	Abstand
Chi-Quadrat	21,268
df	15
Asymptotische Signifikanz	,128

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

Nichtparametrische Tests AK auf Homogenität

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zellkern	660	4,3067	1,3139	1,4663	10,8550	3,4213	4,1616	5,0380
Gruppe	730	47,58	15,972	3	67	38,00	50,00	60,00

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Zellkern	3	30	334,72
	11	30	327,98
	34	30	299,08
	35	30	231,38
	36	30	220,82
	37	30	413,10
	38	30	236,70
	40	30	305,18
	43	30	326,22
	47	30	406,85
	48	30	352,87
	49	30	380,43
	50	30	364,83
	54	30	325,45
	58	30	493,30
	59	30	393,28
	60	30	329,50
	61	30	305,12
	63	20	364,63
	64	30	270,58
	65	10	253,95
	66	30	391,37
	67	30	234,50
	Gesamt	660	

Statistik für Test(a,b)

	Zellkern
Chi-Quadrat	82,121
df	22
Asymptotische Signifikanz	,000

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

5 Anhang

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zelle	730	7,5200	2,2301	2,1858	17,6292	5,9848	7,3334	8,6090
Gruppe	730	47,58	15,972	3	67	38,00	50,00	60,00

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Zelle	3	30	647,12
	11	30	551,53
	34	30	350,38
	35	30	220,92
	36	30	173,78
	37	30	427,37
	38	30	306,20
	40	30	203,20
	43	30	415,83
	47	30	438,93
	48	30	428,17
	49	30	431,35
	50	30	365,67
	54	30	403,98
	55	20	370,60
	56	30	385,22
	58	30	412,05
	59	30	155,00
	60	30	392,62
	61	30	298,02
	62	20	423,03
	63	20	361,30
	64	30	310,98
	65	10	403,35
	66	30	345,10
	67	30	326,02
	Gesamt	730	

Statistik für Test(a,b)

	Zelle
Chi-Quadrat	190,905
df	25
Asymptotische Signifikanz	,000

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

5 Anhang

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Abstand	707	1,5958	,4831	,0000	3,2787	1,2461	1,5648	1,9550
Gruppe	730	47,58	15,972	3	67	38,00	50,00	60,00

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Abstand	3	30	438,65
	11	30	516,48
	34	30	377,65
	35	30	370,27
	36	30	226,22
	37	30	334,95
	38	30	270,10
	40	30	284,45
	43	30	452,28
	47	30	361,38
	48	30	378,87
	49	30	408,08
	50	27	481,56
	54	30	378,53
	56	30	369,65
	58	30	273,23
	59	30	331,63
	60	30	306,13
	61	30	220,18
	62	20	420,85
	63	20	389,45
	64	30	362,82
	65	10	331,50
	66	30	228,75
	67	30	368,18
	Gesamt	707	

Statistik für Test(a,b)

	Abstand
Chi-Quadrat	100,045
df	24
Asymptotische Signifikanz	,000

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

Nichtparametrische Tests auf Homogenität bei BCC

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zellkern	520	4,4215	1,4903	1,4663	10,1851	3,3239	4,1938	5,1841
Gruppe	720	31,96	27,654	1	73	7,25	16,50	65,25

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Zellkern	1	30	267,58
	2	30	289,02
	4	30	223,75
	5	30	252,43
	6	30	261,08
	7	30	260,65
	8	10	213,25
	9	30	219,65
	10	30	255,80
	15	30	184,98
	16	30	209,73
	17	30	227,88
	18	30	298,62
	51	30	338,77
	52	30	275,08
	53	30	342,77
	57	30	253,30
	68	30	283,15
	Gesamt	520	

Statistik für Test(a,b)

	Zellkern
Chi-Quadrat	38,781
df	17
Asymptotische Signifikanz	,002

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zelle	720	8,0273	2,7265	2,8604	20,9226	6,0653	7,4766	9,4212
Gruppe	720	31,96	27,654	1	73	7,25	16,50	65,25

Kruskal-Wallis-Test

Ränge			
	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Zelle	1	30	286,97
	2	30	574,75
	4	30	571,32
	5	30	440,38
	6	30	386,98
	7	30	332,82
	8	30	318,85
	9	30	353,87
	10	30	332,93
	13	30	431,15
	15	30	276,13
	16	30	163,00
	17	30	440,23
	18	30	366,17
	51	30	433,18
	52	30	453,27
	53	30	378,18
	57	30	332,60
	68	30	352,62
	69	30	254,63
	70	30	403,17
	71	30	343,70
	72	30	234,98
	73	30	190,12
	Gesamt	720	

Statistik für Test(a,b)

	Zelle
Chi-Quadrat	164,208
df	23
Asymptotische Signifikanz	,000

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardab- weichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Abstand	720	1,6665	,5359	,0000	4,1831	1,3160	1,6393	1,9702
Gruppe	720	31,96	27,654	1	73	7,25	16,50	65,25

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Abstand	1	30	335,45
	2	30	475,88
	4	30	465,57
	5	30	412,67
	6	30	340,22
	7	30	276,10
	8	30	330,15
	9	30	473,93
	10	30	431,77
	13	30	279,87
	15	30	284,08
	16	30	293,48
	17	30	385,97
	18	30	367,33
	51	30	585,67
	52	30	435,42
	53	30	291,15
	57	30	343,62
	68	30	459,62
	69	30	289,33
	70	30	331,28
	71	30	322,57
	72	30	302,87
73	30	138,02	
	Gesamt	720	

Statistik für Test(a,b)

	Abstand
Chi-Quadrat	140,998
df	23
Asymptotische Signifikanz	,000

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

Nichtparametrische Tests auf Homogenität bei SCC

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardab- weichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zellkern	140	4,1202	1,5669	1,5456	10,9208	2,9755	3,9291	4,9423
Gruppe	210	38,43	11,044	12	46	39,00	42,00	45,00

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Zellkern	12	30	70,87
	39	10	33,05
	41	30	67,68
	44	30	75,02
	45	10	55,20
	46	30	86,02
	Gesamt	140	

Statistik für Test(a,b)

	Zellkern
Chi-Quadrat	14,862
df	5
Asymptotische Signifikanz	,011

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Zelle	210	6,8690	2,5760	2,4922	17,5579	5,0380	6,3773	8,1235
Gruppe	210	38,43	11,044	12	46	39,00	42,00	45,00

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Zelle	12	30	176,00
	39	30	86,43
	41	30	54,02
	42	30	74,95
	44	30	106,98
	45	30	86,62
	46	30	153,50
Gesamt	210		

Statistik für Test(a,b)

	Zelle
Chi-Quadrat	94,093
df	6
Asymptotische Signifikanz	,000

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Abstand	210	1,6197	,4626	,4888	2,7322	1,3160	1,6393	1,9087
Gruppe	210	38,43	11,044	12	46	39,00	42,00	45,00

Kruskal-Wallis-Test

Ränge			
	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Abstand	12	30	151,50
	39	30	68,63
	41	30	94,55
	42	30	92,07
	44	30	108,02
	45	30	76,27
	46	30	147,47
	Gesamt	210	

Statistik für Test(a,b)	
	Abstand
Chi-Quadrat	52,078
df	6
Asymptotische Signifikanz	,000

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: Gruppe

Nichtparametrische Tests auf Homogenität von AK und BCC

Mann-Whitney-Test

Ränge				
	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Zellkern	1	660	584,09	385501,00
	2	520	598,63	311289,00
	Gesamt	1180		

Statistik für Test(a)	
	Zellkern
Mann-Whitney-U	167371,00
	0
Wilcoxon-W	385501,00
	0
Z	-,728
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,467

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Mann-Whitney-Test

Ränge				
	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Zelle	1	730	692,92	505834,50
	2	720	758,53	546140,50
	Gesamt	1450		

5 Anhang

Statistik für Test(a)

	Zelle
Mann-Whitney-U	239019,50 0
Wilcoxon-W	505834,50 0
Z	-2,983
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,003

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Abstand	1	707	693,20	490095,00
	2	720	734,42	528783,00
Gesamt		1427		

Statistik für Test(a)

	Abstand
Mann-Whitney-U	239817,00 0
Wilcoxon-W	490095,00 0
Z	-1,890
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,059

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Nichtparametrische Tests auf Homogenität von AK und SCC

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Zellkern	1	660	409,29	270129,50
	4	140	359,08	50270,50
Gesamt		800		

Statistik für Test(a)

	Zellkern
Mann-Whitney-U	40400,500
Wilcoxon-W	50270,500
Z	-2,335
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,020

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Zelle	1	730	493,28	360092,50
	4	210	391,32	82177,50
Gesamt		940		

5 Anhang

Statistik für Test(a)

	Zelle
Mann-Whitney-U	60022,500
Wilcoxon-W	82177,500
Z	-4,796
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Abstand	1	707	457,09	323164,00
	4	210	465,42	97739,00
	Gesamt	917		

Statistik für Test(a)

	Abstand
Mann-Whitney-U	72886,000
Wilcoxon-W	323164,000
Z	-,401
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,689

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Nichtparametrische Tests auf Homogenität bei AK und gesunder Haut

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Zellkern	1	660	588,88	388659,50
	3	320	287,60	92030,50
	Gesamt	980		

Statistik für Test(a)

	Zellkern
Mann-Whitney-U	40670,500
Wilcoxon-W	92030,500
Z	-15,627
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Zelle	1	730	775,22	565910,00
	3	480	347,39	166745,00
	Gesamt	1210		

5 Anhang

Statistik für Test(a)

	Zelle
Mann-Whitney-U	51305,000
Wilcoxon-W	166745,00 0
Z	-20,835
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Abstand	1	707	768,87	543592,50
	3	480	336,43	161485,50
	Gesamt	1187		

Statistik für Test(a)

	Abstand
Mann-Whitney-U	46045,500
Wilcoxon-W	161485,50 0
Z	-21,348
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Nichtparametrische Tests auf Homogenität bei BCC und gesunder Haut

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Zelle	2	720	777,94	560120,00
	3	480	334,33	160480,00
	Gesamt	1200		

Statistik für Test(a)

	Zelle
Mann-Whitney-U	45040,000
Wilcoxon-W	160480,00 0
Z	-21,724
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Abstand	2	720	782,42	563341,50
	3	480	327,62	157258,50
	Gesamt	1200		

5 Anhang

Statistik für Test(a)

	Abstand
Mann-Whitney-U	41818,500
Wilcoxon-W	157258,50
Z	-22,288
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Zellkern	2	520	518,32	269526,00
	3	320	261,54	83694,00
	Gesamt	840		

Statistik für Test(a)

	Zellkern
Mann-Whitney-U	32334,000
Wilcoxon-W	83694,000
Z	-14,896
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Nichtparametrische Tests auf Homogenität bei SCC und gesunder Haut

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Zellkern	3	320	196,48	62873,00
	4	140	308,26	43157,00
	Gesamt	460		

Statistik für Test(a)

	Zellkern
Mann-Whitney-U	11513,000
Wilcoxon-W	62873,000
Z	-8,300
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Zelle	3	480	293,99	141117,50
	4	210	463,23	97277,50
	Gesamt	690		

5 Anhang

Statistik für Test(a)

	Zelle
Mann-Whitney-U	25677,500
Wilcoxon-W	141117,50 0
Z	-10,262
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Krankheits-Nr	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Abstand	3	480	265,54	127457,00
	4	210	528,28	110938,00
	Gesamt	690		

Statistik für Test(a)

	Abstand
Mann-Whitney-U	12017,000
Wilcoxon-W	127457,00 0
Z	-15,955
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a Gruppenvariable: Krankheits-Nr

6 Literaturverzeichnis

1. Rassner: Dermatologie Lehrbuch und Atlas. 7 Urban und Fischer, 2002 S. 5 - 9,
2. Junqueira LC, Carneiro J: Histologie. 6 Springer, 2005 S. 305 -317,
3. Pathak M. A., Kimbow, J., Szabo, G., Fitzpatrick, T. B.: Sunlight and melanin pigmentation, Photochemical and Photobiological reviews, 1976, S. 211 - 239.
4. Swindle L D, Thomas S G, Freeman M, Delaney P. M.: View of Normal Human Skin In Vivo as Observed Using Fluorescent Fiber-Optic Confocal Microscopic Imaging. *J Invest Dermatol.* 2003, *121*, S. 706 - 712,
5. Meyer L E, Otberg N, Tietz H-J, Sterry W, Lademann J: In vivo imaging of *Malassezia* yeasts on human skin using confocal laser scanning microscopy. *Laser Physics Letters.* 2004, S. 1-5,
6. Gonzalez, S., Sackstein, R., Anderson, R. R., Rajadhyaksha, M: Real- Time Evidence of In Vivo Leukocyte Trafficking in Human Skin by Reflectance Confocal Microscopy. *The Journal of Investigative Dermatology.* 2001, *Vol 117, No 2*, S. 384-386,
7. Tannous, Z. S., Mihm, M. C., Flotte, T. J., Gonzalez, S.: In vivo examination of lentigo maligna and malignant melanoma in situ, lentigo maligna type by near-infrared reflectance confocal microscopy: Comparison of in vivo confocal images with histologic sections. *J. Am. Acad. Dermatol..* 2002, *Vol. 46 No. 2*, S. 260 - 263,
8. Gerger, A., Koller, S., Weger, W., Richtig, E., Kerl, H., Samonigg, H., Krippel, P., Smolle, J.: Sensitivity and Specificity of Confocal Laser-Scanning Microscopy for In Vivo Diagnosis of Malignant Skin Tumors. *Cancer.* 2006, *107*, S. 193 - 200,
9. Agero, A. L. C., Busam, K.-J., Benvenuto-Andrade, C., Scope, A., Gill, M., Marghoob, A. A., Gonzalez, S., Halpern, A. C.: Reflectance confocal microscopy of pigmented basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol .* 2006, *54*, S. 638 - 643,
10. Marks R, Gebauer K, Shumack S, Amies M, Bryden J, Fox T L, Owens M L: Imiquimod 5% cream in the treatment of superficial basal cell carcinoma: Results of a multicenter 6-week dose-response trial. *J Am Acad Dermatol .* 2001, *44*, S. 807 - 813,
11. Sterry W, Ruzicka T, Herrera E, Takwale A, Bichel J, Andres K, Ding L, Thissen M R T M.: Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial and nodular basal cell carcinoma.

6 Literaturverzeichnis

- noma: randomized studies comparing low-frequency dosing with and without occlusion. *British Journal of Dermatology*. 2002, *147*, S. 1227 - 1236,
12. Schiebler, Schmidt, Zilles: *Anatomie*. 8 Springer, 1999 S. 206 - 218,
13. Kerl, H., Garbe, C., Cerroni, L., Wolff, H. H.: *Histologische Strukturen der normalen Haut*. Hrsg.: Wolff, H. H.: *Histopathologie der Haut*. Springer, 7, S. 73 - 84,
14. Bahmer, F., Bojanovski, A., Boonen, H., Froesewitte, U., Girbig, P., Grimmel, M., Herz, E., Hoffmann, H., Miller, X., Moll, I., Rauterberg, A., Voigtländer, V., Weiß, J. : Hrsg.: Jung, E. G.: *Dermatologie*. 2 Hippokrates, S. 27 - 28, S. 219 - 224,
15. Leonhardt, H.: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Band 3. Thieme , 1990
16. Hrsg.: Urban & Schwarzenberg: *Roche Lexikon Medizin*. 3 1993
17. Ham, A.A.: *Histology*. Philadelphia/Toronto, J.B. Lippincott Company, 1974
18. Loth H.: *Skin permeability*. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1989, *11(3)*, S. 155-64,
19. Trommer, H., Neubert, R. H. H.: *Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration*. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006, *19*, S. 106-121,
20. Lademann, J., Otberg, N., Richter, H., Lindemann, U., Schaefer, H., Sterry, W.: *Wie gelangen Substanzen in und durch unsere Haut?* HUMBOLDT-SPEKTRUM. 2001, *3 - 4*, S. 32 - 35,
21. Schaefer, H., Lademann, J.: *The Role of Follicular penetration*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001, *14*, S. 23 - 27,
22. Lademann, J., Otberg, N., Richter, H., Weigmann, H.-J., Lindemann, U., Schaefer, H., Sterry, W.: *Investigation of Follicular Penetration Topically Applied Substances* . *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001, *14*, S. 17 - 22,
23. Lademann, J., Weigmann, H.-J., Rickmeyer, C., Barthelmes, H., Schäfer, H., Müller, G., Sterry, W.: *Penetration of Titanium Dioxide Microparticles in a Sunscreen Formulation into the Horny Layer and the Follicular Orifice*. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 1999, *12*, S. 247 - 256,
24. Suihko, C., Swindle, L. D., Thomas, S. G., Serup, J.: *Fluorescence fibre-optic confocal microscopy of skin in vivo: microscope and fluorophores*. *Skin Research and Technology*. 2005, *11*, S. 254 - 267,

25. Zanetti R, Rosso S, Martinez C, Nieto A, Miranda A, Mercier M, DI Loria, Österlind A, Greinert R, Navarro C, Fabbrocini G, Barbera C, Sancho-Garnier H, Gafa L, Chiarugi A, Mossotti R.: Comparison of risk patterns in carcinoma and melanoma of the skin in men: a multi-centre case-case-control study. *British Journal of Cancer*. 2006, 94, S. 743 - 751,
26. Salasche, S. J.: Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J. Am Acad Dermatol*. 2000, 42, S. 4 - 7,
27. ZAK-PRELICH, M., NARBUTT, J., SYSA-JEDRZEJOWSKA, A.: Environmental Risk Factors Predisposing to the Development of Basal Cell Carcinoma. *Dermatol Surg*. 2004, 30, S. 248 - 252,
28. Yu, H., Liao, W., Chai, C.-Y.: Arsenic Carcinogenesis in the Skin. *Journal of Biomedical Science*. 2006,
29. Armstrong, B. K., Krickler, A.: The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001, 63, S. 8 - 18,
30. Fisher, J., Masson, J., Rosen, R.: Squamous cell carcinoma of the hand masquerading as a cutaneous infection . *Australasian Journal of Dermatology*. 2006, 47, S. 53- 56,
31. Cassarino, D. S., DeRienzo, D. P., Barr, R. J.: Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification (Part One). *J Cutan Pathol*. 2006, 33, S. 191- 206,
32. EDF Guideline for the management of basal cell carcinoma, 2004/05
33. EDF Guidelines for the Management of Actinic Keratoses, 2004/05
34. Goldberg, L. H.: Basal cell carcinoma. *Lancet*. 1996, 347, S. 663 -667,
35. Pipitone, M. A., Gloster Jr., H. M.: Superficial Squamous Cell Carcinomas and Extensive Actinic Keratoses of the Scalp Treated with Radiation Therapy. *DERMATOLOGIC SURGERY*. 2006, 32, S. 756 - 759,
36. Stockfleth E, Sterry W: New Treatment Modalities for Basal Cell Carcinoma. *Recent Results in Cancer Research*. 2002, 160, S. 259 - 268,
37. Bath-Hextall F, Bong J, Perkins W, Williams H.: Interventions for basal cell carcinoma of the skin: systematic review. *British Medical Journal*. 2004, 329, S. 705 - 710,

38. Telfer N R, Colver G B, Bowers P W: Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*. 1999, *141*, S. 415 - 423,
39. Crowson, A N: Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern Pathology*. 2006, *19*, S. 127 - 147,
40. Lear, J. T., Harvey, I., de Berker D, Strange R C, Fryer, A. A.: Basal cell carcinoma. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1998, *91*, S. 585 - 588,
41. Urbach, F.: Incidence of Nonmelanoma Skin Cancer. *Dermatologic Clinics*. 1991, *4*, S. 751 - 755,
42. Eberhardt C, Percy S R, Branzan A L, Baumler W, Szeimies R M, Calzavara-Pinton P, Venturini M, Sala R: Early detection of skin cancer (EDISCIM) through the use of non-invasive confocal image. *Stud Health Technol Inform*. 2004, *103*, S. 279 - 286,
43. Lo J S, Snow S N, Reizner G T, Mohs F E, Larson P O: Metastatic basal cell carcinoma: report of twelve cases with a review of the literature. *J Am Dermatol*. 1991, *24*, S. 715 - 719,
44. Glogau, R. G.: The risk of progression to invasive disease. *J. Am. Acad. Dermatol.*. 2000, *42*, S. 23 - 24,
45. Hauschild, A., Kähler, K. C., Egberts, F.: Moderne Behandlungsoptionen bei aktinischen Keratosen der Haut. *Dtsch Med Wochenschr*. 2006, *131*, S. 447-452,
46. Braakhuis, B. J., Tabor, M. P., Kummer, J. A., Leemans, C. R., Brakenhoff, R. H.: A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*. 2003, *63*, S. 1727-1730,
47. Bühling, K. J., Lepenies, J., Witt, K.: Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. 1 Urban und Schwarzenberg, 1995 S. 208,
48. Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W: Epidemiologie des Hautkrebses. *Dermatologische Onkologie*. 1997, S.40-56,
49. Marks, R.: Squamous cell carcinoma . *THE LANCET* . 1996, *347*, S. 735 -738,
50. Franceschi S, Levi F, Randimbison L, La Vecchia C.: Site distribution of different types of skin cancer: new aetiological clues. *Int J Cancer*. 1996, *67(1)*, S. 24 - 28,
51. AWMF: Plattenepithelkarzinom der Haut, der Lippen und der Augenlider . AWMF Interdisziplinäre Leitlinien. 2005, *032/022*,

52. Smoller, B. R.: Squamous cell carcinoma: form precursor lesions to high-risk variants. *Modern Pathology*. 2006, *19*, S. 88 - 92,
53. Cassarino, D. S., DeRienzo, D. P., Barr, R. J.: Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification (Part Two). *Journal of Cutaneous Pathology*. 2006, *33*, S. 261 - 279,
54. Stephens, D. J., Allan, V. J.: *Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging*. SCIENCE. 2003, *300*, S. 82 - 86,
55. Semwogerere, D., Weeks, E. R.: *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. Taylor & Francis, 2005
56. Vidal, D., Matías-Guiu, X., Alomar, A.: Open study of the efficacy and mechanism of action of topical imiquimod in basal cell carcinoma. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2004, *29*, S. 518 - 525,
57. Ooi, T., Barnetson, R., Zhuang, L., McKane, S., Lee, J. H., Slade, H. B., Halliday, G. M.: Imiquimod-induced regression of actinic keratosis is associated with Infiltration by T lymphocytes and dendritic cells: a randomized controlled trial. *British Journal of Dermatology*. 2006, *154*, S. 72 - 78,
58. Sapijaszko, M. J. A.: Imiquimod 5% Cream (Aldara®) in the Treatment of Basal Cell Carcinoma. Yww.skintherapyletter.com/2005/10.6/1.html. 2005 (14.2.2006), S. 1 - 6,
59. Hengge, U.R., Benninghoff, B., Ruzicka, T., Goos, M.: Topical immunomodulators-progress towards treating inflammation, infection, and cancer. *THE LANCET*. 2001, *Vol. 1*, S. 189 - 198,
60. LUSTER, A. D.: Chemokines-chemotactic Cytokines that mediate inflammation. *The New England Journal of Medicine*. 1998, *Vol. 338 No. 7*, S. 436 - 445,
61. Geisse, J. K., Rich, P., Pandya, A., Gross, K., Andres, K., Ginkel, A., Owens, M.: Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: A double-blind, randomized, vehicle-controlled study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2002, *Vol. 47*, S. 390 - 398,
62. Beutner, K. R., Geisse, J. K., Helman, D., Fox, T. L., Ginkel, A., Owens, M. L.: Therapeutic response of basal cell carcinoma to the immune response modifier imiquimod 5% cream. *J Am Acad Dermatol*. 1999, *41*, S. 1002 - 1007,
63. AWMF: Aktinische Keratose. AWMF-Leitlinien. 2004, *013/041*,

64. Hadley, G., Derry, S., Moore, R. A.: Imiquimod for Actinic Keratosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006, *126*, S. 1251 - 1255,
65. Peris, K., Micantonio, T., Fargnoli, M. C., Lozzi, G. P., Chimenti, S.: Imiquimod 5% cream in the treatment of Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2006, *55*, S. 324 - 327,
66. Rajadhyaksha, M., Gonzalez, S., Zavislan, J. M., Anderson, R. R., Webb, R. H.: In vivo Confocal Scanning Laser Microscopy of Human Skin II: Advances in In-strumentation and Comparison With Histology. *J Invest Dermatol*. 1999, *113*, S. 293 - 303,
67. Sauermann, K., Gambichler, T., Wilmert, M., Rotterdam, S., Stücker, M., Altmeyer, P., Hoffmann, K.: Investigation of basal cell carcinoma by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res Technol*. 2002, *8(3)*, S. 141 - 147,
68. Stücker, M., Horstmann, I., Nüchel, C., Röchling, A., Hoffmann, K., Altmeyer, P.: Blood flow compared in benign melanocytic naevi, malignant melanomas and basal cell carcinomas. *Clinical and Experimental Dermatotomy*. 1999, *24*, S. 107-111,
69. Stanton, A. W. B., Drysdale, S. B., Patel, R., Mellor, R. H., Duff, M. J. B., Levick, J. R., . Mortimer, P. S.: Expansion of Microvascular Bed and Increased Solute Flux in Human Basal Cell Carcinoma in Vivo, Measured by Fluorescein Video Angiography. *Cancer Research*. 2003, *63*, S. 3969 - 3979,
70. Gonzalez, S., Tannous, Z.: Real-time, in vivo confocal reflectance microscopy of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2002, *47(6)*, S. 869 - 874,
71. Gerger, A., Horn, M., Koller, S., Weger, W., Massone, C., Leinweber, B., Kerl, H., Smolle, J.: Confocal Examination of Untreated Fresh Specimens From Basal Cell Carcinoma. *Arch Dermatol*. 2005, *141*, S. 1269 - 1274,
72. Nori, S., Rius-Diaz, F., Cuevas, J., Goldgeier, M., Jaen, P., Torres, A., Gonzalez, S.: Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma: A multicenter study. *J Am Acad Dermatol*. 2004, *51*, S. 923 - 930,
73. Richmond, J. D., Davie, R. M.: The significance of incomplete excision in patients with basal cell carcinoma. *British Journal of Plastic Surgery*. 1987, *40*, S. 63 - 67,
74. BREUNINGER, H., DIETZ, K.: Prediction of Subclinical Tumor Infiltration in Basal Cell Carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* . 1991, *17*, S. 574 - 578,

6 Literaturverzeichnis

75. Breuninger, H., Pesch, M., Dietz, K., Rassner, G.: Quantitative Analyse der Rezidivierung bzw. Spontanregression von in situ belassenen Basaliomanteilen . *Der Hautarzt*. 1992, *43*, S. 561-565 ,
76. Enejder, A. M., af Klinteberg, C., Wang, I., Andersson-Engels, S., Bendsoe, N., Svanberg, S., Svanberg, K.: Blood perfusion studies on basal cell carcinomas in conjunction with photodynamic therapy and cryotherapy employing laser-Doppler perfusion imaging. . *Acta Derm Venereol.* . 2000, *80(1)*, S. 19 - 23,
77. Aghassi, D., Anderson, R. R., González, S.: Confocal laser microscopic imaging of actinic keratosis in vivo: A preliminary report. *J Am Acad Dermatol*. 2000, *43*, S. 42 - 48,
78. Selkin, B., Rajadhyaksha, M., Gonzalez, S., Langley, R. G.: IN VIVO CONFOCAL MICROSCOPY IN DERMATOLOGY. *Dermatologic Clinics*. 2001, *Vol. 19 No. 2*,
79. Cerburkovas, O., Krause, M., Ulrich, J., Bonnekoh, B., Gollnick, H.: Ausgedehnte aktinische Keratosen. *Der Hautarzt*. 2001, *52*, S. 942 - 946,
80. GONZALEZ, S., SWINDELLS, K., RAJADHYAKSHA, M., TORRES, A.: Changing Paradigms in Dermatology: Confocal Microscopy in Clinical and Surgical Dermatology. *Clinics in Dermatology*. 2003, *21*, S. 359 -369,

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Kutis	3
Abb. 2: Melanozyt, schematische Darstellung	4
Abb. 3: Rezeptoren der Haut, schematische Darstellung	7
Abb. 4: Penetrationswege durch das Stratum corneum (nach Neubert et al., 2001) ..	8
Abb. 5: Histologischer Schnitt durch ein BCC (HE), M 200:1	11
Abb. 6: Para- und Hyperkeratose bei AK, M 100:1	12
Abb. 7: AK im HE-Schnitt, M 200:1	12
Abb. 8: SCC im HE-Schnitt, M 100:1	13
Abb. 9: Prinzip eines herkömmlichen Fluoreszenz-LSM	17
Abb. 10: Prinzip des konfokalen Laser-Scan-Mikroskops.....	18
Abb. 11: Monitor des KFLSM "Stratum"	20
Abb. 12: Handstück des KFLSM im Einsatz	20
Abb. 13: Strukturformel Natriumfluoreszein	20
Abb. 14: vereinfachte Strukturformel von Imiqimod	21
Abb. 15: Quaddelbildung nach Applikation von Natriumfluoreszein in gesunder Haut	23
Abb. 16: Makroskopische Aufnahme einer AK.....	23
Abb. 17: Makroskopische Aufnahme derselben AK nach Applikation von Natriumfluoreszein bei UV-Beleuchtung	23
Abb. 18: Makroskopische Aufnahme eines BCC	24
Abb. 19: Makroskopische Aufnahme des selben BCC nach Applikation von Natriumfluoreszein bei UV-Beleuchtung	24
Abb. 20: Makroskopische Aufnahme eines SCC	24
Abb. 21: Makroskopische Aufnahme des selben SCC nach Applikation von Natriumfluoreszein bei UV-Beleuchtung	24

Abb. 22: Stratum corneum, gesunde Haut.....	25
Abb. 23: Stratum granulosum, gesunde Haut.....	25
Abb. 24: Stratum spinosum, gesunde Haut	25
Abb. 25: Stratum basale, gesunde Haut	26
Abb. 26: Stratum papillare, gesunde Haut.....	26
Abb. 27: Parakeratosen im Stratum corneum in BCC (pyknische Zellkerne).....	26
Abb. 28: Hyperkeratose im BCC.....	26
Abb. 29: Vergrößerte Zellkerne eines BCC.....	27
Abb. 30: KFLSM-Bild des Stratum basale	27
Abb. 31: Histologischer Schnitt (HE) durch ein BCC, M 400:1	28
Abb. 32: Elongierte Zellkerne des BCC im HE-Schnitt, M 200:1	28
Abb. 33 KFLSM-Bild des Stratum spinosum.....	29
Abb. 34: Blutfluss in einer Teleangiektasie (BCC).....	29
Abb. 35 a - f: Hyperkeratose in sequentiellen Schnitten in AK (Keratinozyt)	30
Abb. 36: Hyperkeratose im HE-Schnitt einer AK, M 100:1.....	30
Abb. 37: Hyperkeratose mit parakeratotischen Zellkernen in einer AK	30
Abb. 38: Parakeratosen in einer AK (mit Artefakt in der Bildmitte)	30
Abb. 39: AK 1.....	31
Abb. 40: AK 2.....	31
Abb. 41: AK 3.....	31
Abb. 42: AK 4.....	31
Abb. 43: Stratum basale mit Haarfollikel in AK.....	31
Abb. 44: Stratum spinosum in AK	32
Abb. 45: Hyperkeratose im SCC.....	32
Abb. 46: Hyperkeratose im SCC.....	32

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 47: Stratum granulosum in SCC	33
Abb. 48: Stratum spinosum in SCC	33
Abb. 49: Stratum basale in SCC	33
Abb. 50: SCC im HE-Schnitt, M 100:1	33
Abb. 51: Stratum granulosum (unten) und Stratum basale im SCC	34
Abb. 52: Stratum granulosum im SCC	34
Abb. 53: Vergrößerte Zellen und Zellkerne im Stratum basale eines SCC	34
Abb. 54: BCC vor der Imiquimod-Behandlung, 23.3.2005	35
Abb. 55: Hyperkeratose im BCC vor Imiquimod-Behandlung	35
Abb. 56: Tumorzellen im BCC, Hautfurche mit Fluoreszeinsammlung und Artefakt	35
Abb. 57: Tumorzellen im Stratum basale mit Gefäßanschnitten	36
Abb. 58: Entzündungsreaktion nach 3 Wochen Imiquimod-Therapie, 13.4.2005	36
Abb. 59: Hyperkeratose in BCC nach dreiwöchiger Imiquimod-Therapie	37
Abb. 60: Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale in BCC nach dreiwöchiger Imiquimod-Therapie	37
Abb. 61: Tumor nach dreiwöchiger Behandlungspause, 19.5.2005.....	37
Abb. 62 a - e: Verschiedene Schichten des BCC nach dreiwöchiger Behandlungspause	38
Abb. 63: Klinisches Bild der Läsion nach 2 Behandlungszyklen und dreimonatiger Behandlungspause, 6.9.2005	38
Abb. 64: Stratum spinosum (a, b) und Stratum basale (c) der Läsion nach 2 Behandlungszyklen und 3monatiger Behandlungspause	39
Abb. 65: Direkter Vergleich des Stratum basale aus Abb. 64 c (Bild b) mit einem Stratum basale eines BCC (Bild a) und dem Stratum basale gesunder Haut (Bild c)	39
Abb. 66: Darstellung der Messung eines Zelldurchmessers, eines Zellkerndurchmessers und eines Zellzwischenraumes am Beispiel einer AK.....	40

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 67: Boxplot Vergleich Zellkerndurchmesser gesund - BCC.....	42
Abb. 68: Boxplot Vergleich Zelldurchmesser gesund - BCC.....	42
Abb. 69: Boxplot Vergleich Zellabstände gesund – BCC.....	42
Abb. 70: Boxplot Vergleich Zellkerndurchmesser gesund - AK.....	43
Abb. 71: Boxplot Vergleich Zelldurchmesser gesund - AK.....	43
Abb. 72: Boxplot Vergleich Zellabstände gesund – AK.....	43
Abb. 73: Boxplot Vergleich Zellkerndurchmesser gesund - SCC.....	44
Abb. 74: Boxplot Vergleich Zelldurchmesser gesund - SCC.....	44
Abb. 75: Boxplot Vergleich Zellabstände gesund – SCC.....	44
Abb. 76: Boxplot Vergleich Zellkerndurchmesser AK - SCC.....	45
Abb. 77: Boxplot Vergleich Zelldurchmesser AK – SCC.....	45
Abb. 78: Boxplot Vergleich Zellabstände AK – SCC.....	45

8 Lebenslauf

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

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Susanne Dietterle, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Laser-Scan-Mikroskopische Untersuchung epithelialer Hauttumoren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Eberswalde,

10 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung meiner Kollegen und meiner Familie nicht zustande gekommen. Deshalb möchte ich mich bei ihnen allen ganz herzlich bedanken. Insbesondere bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des CCP für die gute Zusammenarbeit.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Wolfram Sterry für die Möglichkeit danken, an der dermatologischen Klinik der Charité zu promovieren.

Mein herzlicher Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann der mir die Möglichkeit gab, an dem vorliegenden Thema zu forschen, seine umfassende Unterstützung und sein Engagement während der Entstehung dieser Arbeit und dem Leiter des Haut Tumor Centrums der Charité, Herrn Prof. Dr. med. Eggert Stockfleth für die Zusammenarbeit und die Rekrutierung der Probanden.

Eine wesentliche Hilfe lies mir Herr OA. Dr. med. Joachim Röwert-Huber zuteil werden, der mich in allen Fragen der Dermatohistologie unterstützte.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. med. Nina Otberg und Herrn Cand. med. Lars Meyer, die mich geduldig in die Nutzung des konfokalen Laser-Scan-Mikroskops eingearbeitet haben und mir jederzeit für die fachlich kompetente Lösung auftretender Problemen zur Seite standen.

Bei Frau Heike Richter und Frau Sabine Schanzer möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung zur Lösung technischer Fragestellungen bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Probanden bedanken, die sich im Dienste der Wissenschaft bereit erklärt haben, für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung zu stehen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinem Freund Janek bedanken, der mich motivierte und mir immer zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die es mir durch ihre Unterstützung ermöglicht haben, Medizin zu studieren und damit auch die vorliegende Dissertation zu erstellen.