

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

DISSERTATION

Multiphotonentomographische Untersuchung epithelialer
Hauttumoren im Vergleich zu Laser-Scan-mikroskopischen
Untersuchungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marisa Anita Klemp

aus München

Datum der Promotion: 10. März 2017

Inhalt

0. Abstrakt	1
1. Einleitung	3
1.1 Die Haut	4
1.1.1 Aufbau der Haut	4
1.1.2 Funktionen der Haut	5
1.2 Epitheliale Hauttumore	6
1.2.1 Vorsorge	6
1.2.2 Basalzellkarzinom	7
1.2.2.1 Klinisches Bild	7
1.2.2.2 Histologie	8
1.2.2.3 Diagnostik und Therapie	8
1.2.3 Aktinische Keratose	8
1.2.3.1 Klinisches Bild	9
1.2.3.2 Histologie	9
1.2.3.3 Diagnostik und Therapie	9
1.2.4 Spinalzellkarzinom	10
1.2.4.1 Klinisches Bild	10
1.2.4.2 Histologie	10
1.2.4.3 Diagnostik und Therapie	10
1.3 Malignes Melanom	11
1.3.1 Klinisches Bild	11
1.3.2 Histologie	12
1.3.3 Diagnostik und Therapie	12
1.4 Psoriasis	13
1.4.1 Klinisches Bild	13
1.4.2 Histologie	14
1.4.3 Diagnostik und Therapie	14
1.5 Optische diagnostische Verfahren	14
1.5.1 Optische Kohärenztomographie	14
1.5.2 Laser-Scan-Mikroskopie im Reflexionsmodus	15
1.5.3 Laser-Scan-Mikroskopie im Fluoreszenzmodus	16
1.5.4 Multiphotonentomographie	17
1.5.5 Kohärente Anti-Stokes-Raman Streuung	18
1.6 Zielsetzung	18
2. Materialien und Methoden	19
2.1 Probanden	19
2.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie	20
2.3 Multiphotonentomographie	21

2.4 Histologie	21
2.5 Experimentelles Vorgehen	22
2.5.1 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie	22
2.5.2 Multiphotonentomographie	22
2.6 Datenanalyse und statistische Auswertung	23
3. Ergebnisse	23
3.1 Aufnahmen gesunder Haut	23
3.1.1 Histologie gesunder Haut	23
3.1.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie gesunder Haut	24
3.1.3 Multiphotonentomographie gesunder Haut	26
3.2 Aufnahmen des Basalzellkarzinoms	28
3.2.1 Histologie des Basalzellkarzinoms	28
3.2.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie des Basalzellkarzinoms	28
3.2.3 Multiphotonentomographie des Basalzellkarzinoms	29
3.3 Aufnahmen der aktinischen Keratose	33
3.3.1 Histologie der aktinischen Keratose	33
3.3.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie der aktinischen Keratose	33
3.3.3 Multiphotonentomographie der aktinischen Keratose	34
3.4 Aufnahmen des spinozellulären Karzinoms	39
3.4.1 Histologie des spinozellulären Karzinoms	39
3.4.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie des spinozellulären Karzinoms	39
3.4.3 Multiphotonentomographie des spinozellulären Karzinoms	40
3.5 Vergleich von aktinischer Keratose und spinozellulärem Karzinom in der Multiphotonentomographie	44
3.6 Aufnahmen des malignen Melanoms	46
3.6.1 Histologie des malignen Melanoms	46
3.6.2 Multiphotonentomographie des malignen Melanoms	47
3.7 Kohärente Anti-Stokes-Raman Streuung	50
3.7.1 Kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung gesunder Haut	50
3.7.2 Kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung von Psoriasis	51
4. Diskussion	52
4.1 Zusammenfassung	61
5. Literaturverzeichnis	63
6. Abbildungsverzeichnis	70
7. Lebenslauf	72
8. Eidesstattliche Versicherung	73
9. Anteilserklärung	74
10. Danksagung	75

0. Abstrakt

Hintergrund: Nichtmelanome Hauttumoren (NMSC) stellen die häufigsten malignen Neoplasien der Haut dar und nehmen in ihrer Inzidenz zu. Zu den NMSC gehören das Basalzellkarzinom (BCC) und das Plattenepithelkarzinom (SCC). Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines SCC ist die aktinische Keratose (AK), die als Präkanzerose gilt und deren klinische Unterscheidung zum SCC schwierig sein kann.

Das bisherige Standardverfahren zur Diagnosesicherung ist die invasive Biopsieentnahme mit anschließender histologischer Untersuchung. Ziel dieser Arbeit ist es, die Möglichkeiten der Multiphotonentomographie (MPT) zur Diagnostik von NMSC im Vergleich zur Laser-Scan-Mikroskopie (LSM) als nichtinvasive optische Verfahren darzustellen.

Methoden: 23 Probanden mit BCC, AK oder SCC wurden mittels MPT und LSM jeweils an der erkrankten und an einer gesunden Vergleichsstelle untersucht. Außerdem wurden die mittels MPT gewonnenen Bilder anhand der zellulären, morphologischen Parameter Zellkerndurchmesser, Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis und Zelldichte systematisch analysiert.

Ergebnisse: Mittels MPT und LSM konnten horizontale Schnittbilder der verschiedenen NMSC gewonnen werden. Beide Verfahren ermöglichten die Darstellung charakteristischer Merkmale der einzelnen Tumoren, wie elongierte Zellen, Palisadenstrukturen oder Hyper- und Parakeratosen. In der Analyse der mittels MPT aufgenommenen Bilder konnte gezeigt werden, dass die untersuchten morphologischen Parameter geeignet sind, um die einzelnen NMSC voneinander zu unterscheiden.

Zusammenfassung: Die MPT ist ein geeignetes nichtinvasives optisches Verfahren zur Unterscheidung der NMSC untereinander. Aufgrund der im Vergleich zur LSM höheren Auflösung ist es außerdem möglich, zelluläre, morphologische Parameter in die Diagnostik mit einzubeziehen.

Background: Nonmelanoma skin cancers (NMSC) are the most common skin cancers with an increasing incidence. Basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC) belong to the group of NMSC. The most important risk factor for the development of SCC is Actinic Keratosis (AK), which is considered as a precursor lesion. The clinical discrimination between AK and SCC is not possible in every case.

The standard diagnostic procedure is invasive tissue biopsy followed by histological examination. The aim of this thesis was to demonstrate the applicability of multiphoton tomography (MPT) in diagnostics of NMSC by comparing it to laser scanning microscopy (LSM), which are both noninvasive optical methods.

Methods: 23 Patients with BCC, AK or SCC were examined using MPT and LSM. The examination was performed in the affected area and in a healthy area for comparison. Furthermore, the images obtained by MPT were systematically analyzed on the basis of cellular morphologic parameters, such as nucleus diameter, nucleus-cytoplasm-ratio and cell density.

Results: Horizontal cross sections of the different NMSC were obtained by MPT and LSM. Both systems enable the visualization of characteristics of the tumors, such as elongated cells, palisading structures or hyper- and parakeratosis. The analysis of the images obtained by MPT demonstrated that the examined morphological parameters were suitable for the differentiation of NMSC.

Conclusion: MPT as a noninvasive optical system is appropriate for differentiation of NMSC. Furthermore it is possible to include cellular morphologic parameters because of the higher resolution compared to LSM.

1. Einleitung

Diese Arbeit vergleicht die Untersuchungen von epithelialen Tumoren mittels Multiphotonentomographie (MPT) und Laser-Scan-Mikroskopie (LSM). Die epithelialen Tumore werden in Melanome und Nichtmelanome Hauttumore (NMSC) unterteilt. Zu letzteren gehören das Basalzellkarzinom (BCC) und das Plattenepithelkarzinom (SCC), welche die häufigsten malignen Hautveränderungen darstellen. Die aktinische Keratose (AK) ist die wichtigste Präkanzerose des SCC und tritt mit einer Prävalenz von 15% [1] auf. Aus 6-16% der AKs [1, 2] entwickelt sich ein SCC. Daher ist eine möglichst frühe Diagnostik von AK und anderen Hauttumoren wichtig. Zur Zeit erfolgt dies durch die klinische Untersuchung und einer anschließenden Probeexzision, die histologisch begutachtet wird. Dieses Verfahren birgt in sich allerdings einige Nachteile. Die klinische Untersuchung ist stark von der Erfahrung des jeweiligen Arztes abhängig, da es eine Vielzahl an Differenzialdiagnosen gibt. Die Probeexzision zur histologischen Sicherung verursacht in jedem Fall Schmerzen und führt obligat zur Narbenbildung. Daher wurden in den letzten Jahren einige nichtinvasive optische Verfahren entwickelt, die wie die Histologie eine morphologische Analyse der Haut erlauben. Dazu gehören die Optische Kohärenztomographie (OCT) und die Laser-Scan-Mikroskopie mit der Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie (FLSM) und der Reflektions-Laser-Scan-Mikroskopie (RLSM). Die RLSM erlaubt eine Darstellung von horizontalen Schnittbildern der Haut in zellulärer Auflösung mit einer Eindringtiefe bis zu 250 μm . Somit können alle Hautschichten bis zur oberflächlichen Dermis dargestellt werden. In spezialisierten Kliniken findet die LSM bereits Anwendung zur Darstellung der Hautoberfläche und krankhafter Veränderungen wie epitheliale Hauttumore, Psoriasis oder Ekzeme [3]. Eine weitere Neuentwicklung ist die Multiphotonentomographie (MPT). Sie erlaubt wie die LSM eine Darstellung von horizontalen Schnittbildern der Haut, jedoch mit einer höheren Auflösung. Wie in der LSM sind Echtzeitaufnahmen der einzelnen Läsionen möglich. Bisher findet die Untersuchung mittels MPT nur im Rahmen von klinischen Studien statt. Zusätzlich ist es mit diesem System möglich, eine kohärente Anti-Stokes-Raman-Spektroskopie (CARS) zur Messung von Lipidsignalen durchzuführen.

Ziel dieser Arbeit ist es, Einsatzmöglichkeiten der MPT als neues Verfahren zur Diagnostik von epithelialen Hauttumoren im Vergleich zur RLSM darzustellen. Außerdem werden erste Untersuchungen der Haut mittels CARS vorgestellt.

1.1 Die Haut

Die Haut ist die äußere Barriere des Menschen zur Umwelt. Mit einer Fläche von 1,5 bis 2 m² und einer Dicke von 1,5 bis 4 mm ist sie eines der größten Organe [4, 5].

Makroskopisch unterscheidet man die Felderhaut und die Leistenhaut. Letztere findet sich an Handinnenflächen und Fußsohlen. Die restlichen Körperpartien bestehen aus Felderhaut, deren Bezeichnung auf die feinen Furchen, in deren Schnittpunkten die Haarfollikel liegen, zurückgeht.

1.1.1 Aufbau der Haut

Mikroskopisch gliedert sich die Haut in 3 Schichten: Epidermis, Dermis und Subcutis. In Abb. 1 ist der Aufbau der Haut dargestellt.

Die Epidermis hat eine Dicke von etwa 0,1 mm und ist in verschiedenen Schichten aufgebaut. Sie besteht von unten nach oben aus dem Stratum basale mit den basalen Stammzellen, dem Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum und Stratum corneum. Das Stratum spinosum besteht aus 2-5 Zelllagen. Die Zellen nehmen an Volumen zu und orientieren sich entlang der horizontalen Achse. Im Stratum granulosum treten die sogenannten Keratohyalinkörper auf, welche als Vorläufer der Keratinmatrix im Stratum corneum gelten.

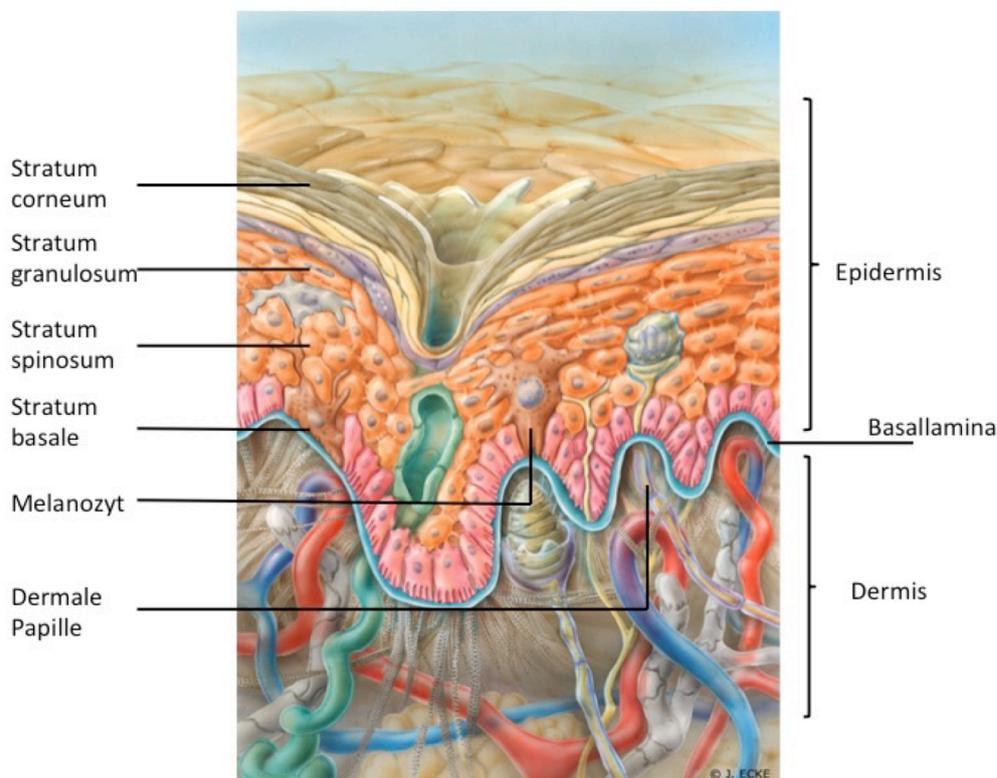


Abb. 1 Aufbau der Haut

Quelle: <http://www.skin-care-forum.basf.com>

Im oberen Stratum granulosum finden diverse Differenzierungsvorgänge statt: Die Zellen platten ab, dehydrieren, die Zellkerne und -organellen verschwinden und die zementartige Lipidsubstanz des Interzellularraums wird gebildet. Das abrupt beginnende Stratum corneum bildet mit 10-20 Zellschichten eine feste, kohärente Schicht mit hexagonalen Korneozyten, welche aus Keratinfilamenten, die in einer amorphen Proteinmatrix eingebettet sind, bestehen.

Den Übergang zwischen Epidermis und Dermis bildet die dermoepidermale Junctionszone.

Sie besteht aus 3 Anteilen: der Zellmembran der Basalzellen, die sogenannte Lamina lucida; der Basallamina, auch Lamina densa genannt, welche aus Kollagen Typ IV und anderen Proteinen besteht; sowie dem sublaminären Raum unterhalb der Lamina densa, in dem sich Ankerfilamente befinden.

Die Dermis bildet das bindegewebige Gerüst der Haut. Sie sorgt für die Straffheit der Haut und für die vaskuläre und nervale Versorgung der Epidermis.

Die Subcutis ist eine bindegewebige Verschiebeschicht, in dessen Septen Fettgewebe eingelagert ist.

1.1.2 Funktionen der Haut

Die Haut ist ein Repräsentationsorgan. Sie spiegelt die gesundheitliche Verfassung des Menschen wider. Viele Erkrankungen äußern sich in Hautveränderungen, z.B. Lebererkrankungen durch eine ikterische Färbung und andere sogenannte Leberhautzeichen [6] oder hypoxische Zustände durch ein zyanotisch verändertes Lippenkolorit [7].

Mit Hilfe von Rezeptoren für Schmerz-, Wärme- und Tastreize erfüllt die Haut verschiedene Sinnesfunktionen. Auf diese Art schützt sie beispielsweise vor Verbrennungen oder Stichverletzungen. Zudem können Tastreize im Gehirn auch mit Emotionen verknüpft werden [8].

Des Weiteren übernimmt die Haut eine wichtige Rolle zum Schutz des Organismus. Sie bildet eine Barriere gegenüber der Umwelt und verhindert so das Austrocknen des Körpers und das Eindringen körperfremder Substanzen [9-11]. Diese Funktion wird vor allem durch die Hornschicht gewährleistet.

Außerdem bietet die Haut einen Schutz in Bezug auf mechanische Noxen [9]. Die Dermis besteht aus einem straffen, elastischen und reißfesten Kollagengeflecht. Sie schützt somit vor schlagenden und scherenen Kräften: die Hornschicht wirkt Friktionstraumata entgegen und das subkutane Fettgewebe kann stumpfe Gewalteinwirkung durch Verteilung der einwirkenden Kraft abmildern.

Die in der Basalzellschicht gelegenen Melanozyten produzieren Melanin, um die Haut vor der schädlichen Wirkung des UV-Lichts zu bewahren [12, 13].

Die Haut spielt auch eine wichtige Rolle in der Thermoregulation des Körpers [14]. Das subkutane Fettgewebe dient als innere Isolationsschicht zwischen Körper und Umwelt. Die Behaarung stellt die äußere Isolationsschicht dar. Außerdem verfügt die Haut über einen Gefäßplexus, der mittels Weit- oder Engstellung zu einer unterschiedlichen Perfusion des Gewebes führt. Bei Weitstellung kann die entstandene Wärme abtransportiert werden.

Des Weiteren ist die Haut eine Barriere für Mikroorganismen [9]. Durch die Hornschicht wird ein mechanischer Schutz gewährleistet. Das trockene und saure Milieu der Haut ist keimfeindlich gegenüber Anflugkeimen. Die Besiedelung mit Normalflora stellt ebenfalls einen Abwehrmechanismus gegen pathogene Keime dar.

Die Haut übernimmt auch eine immunologische Funktion [15]. Sie enthält die Langerhans-Zellen, welche hautspezifische, antigenpräsentierende Zellen sind. Außerdem wird über Drüsen ein IgA-Oberflächenfilm sezerniert.

1.2 Epitheliale Hauttumore

Zu den epithelialen Tumoren gehören benigne und maligne Tumore der Epidermis und der Adnexe der Haut [5]. Dazu zählt man gutartige Altersveränderungen wie die seborrhoische Keratose, verschiedene Präkanzerosen des Plattenepithelkarzinoms (SCC) wie aktinische Keratose (AK) oder Morbus Bowen (M. Bowen) und das Plattenepithelkarzinom selbst. Zudem gehören noch Pseudokanzerosen – Hautveränderungen, die makroskopisch und mikroskopisch das SCC imitieren – in die Gruppe der epithelialen Tumore. Außerdem fallen in diese Kategorie: Keratoakanthome als benigne Tumore des Haarfollikels, Basalzellkarzinome und Adnextumore, die von allen Adnexen der Haut ausgehen können.

1.2.1 Vorsorge

Die Prävention von Hauttumoren nimmt eine wichtige Stellung im Management dieser Erkrankungen ein. Die Aufklärung des Patienten über UV-Schutz ist dabei besonders wichtig [16-18]. Dazu zählen das Vermeiden von starker und chronischer Sonnenlichtexposition und Maßnahmen zum Sonnenschutz wie das Tragen entsprechender Kleidung oder die Verwendung eines Sonnenschutzmittels. Für Patienten mit erhöhtem Risiko für Hauttumore, beispielsweise immunsupprimierte Patienten, besteht die Notwendigkeit einer Schulung zur Selbsterkennung

von Hautveränderungen, die sich als Frühstadium eines Hauttumors erweisen können. Darüber hinaus sollten Risikopatienten einmal jährlich ihren Hautarzt konsultieren.

1.2.2 Basalzellkarzinom

Das Basalzellkarzinom (BCC) ist der häufigste nichtbenigne Tumor der Haut [5]. Oft wird er auch als semimaligne bezeichnet, da er zwar durch invasives Wachstum eine lokale Destruktion hervorruft, aber sehr selten Metastasen bildet (0,0028-0,55% in Lymphknoten, Knochen, Lunge) [19].

Die Inzidenz beträgt in Deutschland ca. 50-80 pro 100.000 pro Jahr, in Australien liegt sie bei mehr als 1000 pro 100.000 pro Jahr [20]. Mit dem Lebensalter nimmt die Inzidenz linear zu [21]. Basalzellkarzinome entstehen durch somatische Mutationen des PTCH-1 oder -2-Gens [19], die vor allem durch UV-Licht verursacht werden. Ein weiterer Risikofaktor ist der genetisch festgelegte Hauttyp, wobei vor allem eine geringe Hautpigmentierung das Risiko, ein BCC zu entwickeln, erhöht [17]. Weiterhin spielen Arsenkontakt und Immunsuppression eine Rolle in der Entstehung von BCCs. Außerdem können BCCs im Rahmen von assoziierten Syndromen wie Xeroderma pigmentosum, Baszellnävussyndrom und Albinismus entstehen.

1.2.2.1 Klinisches Bild

Basalzellkarzinome können an allen follikeltragenden Regionen des Körpers sowie auf Mund- und Genitalschleimhaut auftreten. Mit ca. 80% findet sich das BCC bevorzugt im Kopfbereich [17], da dieser am meisten dem UV-Licht exponiert ist. Das Verteilungsmuster korreliert jedoch nicht absolut mit der UV-Belastung. Man findet das Basalzellkarzinom auch an nicht sonnenexponierten Stellen, beispielsweise retroaurikulär oder am Rumpf [5]. In der Regel finden sich keine Metastasen, jedoch kann das BCC durch sein infiltrierendes Wachstum lebenswichtige Strukturen zerstören und zum Tod führen [17].

Als Primäreffloreszenz treten sogenannte Basaliomknötchen auf, welche halbkugelig, derb, fahl und von perlmuttartigem Glanz sind [5]. Häufig sind diese Knötchen überzogen von Teleangiektasien. Sie haben eine glatte Oberfläche und können Pigmentpunkte tragen.

Es werden oberflächliche, pigmentierte und sklerodermiforme Basalzellkarzinome, sowie Ulcus rodens und Ulcus terebrans unterschieden, wobei vor allem für letztere das infiltrierende Wachstum charakteristisch ist.

1.2.2.2 Histologie

Histologisch entsteht der Tumor aus dem epidermalen Gewebe oder aus Haarfollikel­epithel. Es finden sich basaloide Zellverbände mit chromatindichten Kernen, die von einem dermalen Stroma umgeben sind. Die Zellverbände sind scharf vom restlichen Gewebe abgegrenzt und haben eine lappige, strang- oder fingerförmige Struktur [20]. Periphere Zelllagen sind meist palisadenartig angeordnet [22]. Oft findet sich eine peritumorale Spaltbildung zwischen Tumorepithel und -stroma [23]. Teilweise finden sich auch lymphozytäre Infiltrate um die Tumorzellverbände. Es wird zwischen verschiedenen Subtypen differenziert, z. B. nodulär, fibroepithelial, pigmentiert, basosquamös, sklerosierend, superfiziell oder infiltrierend [24].

1.2.2.3 Diagnostik und Therapie

Die Diagnose eines Basalzellkarzinoms wird in der Regel klinisch gestellt [17]. Um weitere Differenzialdiagnosen auszuschließen, wird die Auflichtmikroskopie verwendet. Anschließend sollte die Diagnose histologisch anhand einer Biopsie verifiziert werden.

Standardtherapie ist die operative Entfernung des Tumors mit anschließender histologischer Sicherung. Bei inkompletter Resektion muss, soweit das möglich ist, eine Nachexzision erfolgen. Neben der Operation existieren weitere Therapieoptionen, z.B. Strahlentherapie, Kürettage, Kryotherapie, Lasertherapie und Phototherapie als lokal destruierende Verfahren sowie topische medikamentöse Behandlungen mit Imiquimod und 5-Fluorouracil [17, 25]. Bei den nichtoperativen Verfahren ist eine histologische Sicherung jedoch nicht möglich. Sie bergen auch ein höheres Rezidivrisiko im Vergleich zur chirurgischen Entfernung des Tumors.

Bei inoperablen Basalzellkarzinomen erfolgt eine Chemotherapie mit Cisplatin plus Doxorubicin [17].

Zur Nachsorge des BCC werden jährliche Kontrollen bis zu 3 Jahren nach Therapie [17] empfohlen, da Rezidive häufig in diesem Zeitraum auftreten.

1.2.3 Aktinische Keratose

Aktinische Keratosen stellen ein Carcinoma in situ der Epidermis dar [26]. Dort proliferieren transformierte Keratinozyten, in denen eine hohe Mutationsrate des Tumorsuppressorgens p53 und des Telomerasegens vorliegen [1, 2]. Aktinische Keratosen gelten als Risikofaktor und Vorstufe des invasiven Plattenepithelkarzinoms. Bei 6-16 % aller Patienten mit aktinischer Keratose kommt es im späteren Verlauf zur Entwicklung eines invasiv wachsenden Plattenepithelkarzinoms [27, 28].

In der europäischen Bevölkerung wird die Prävalenz der aktinischen Keratose mit 6-15% angegeben [29]. Risikofaktoren für die Entstehung sind neben einem hellen Hauttyp (Fitzpatrick I-III) [30, 31] lange Sonnenexposition, PUVA(Psoralen + UVA) - Therapie, Arsenexposition, chronische Hautentzündungen und nicht heilende Ulcera [21]. Daher treten aktinische Keratosen fast ausschließlich an sonnenlichtexponierten Körperarealen wie Kopf, Hals, Dekolleté, Arm und Handrücken auf.

1.2.3.1 Klinisches Bild

Die Hautläsionen stellen sich als erythematöse, hyperkeratotische Makulae, Papeln und Plaques mit einem Durchmesser von einem Millimeter bis circa zwei Zentimeter dar [21]. Mit Fortschreiten des Krankheitsbildes vergrößern sich die Keratosen und es kommt zur Hyperkeratose [16].

1.2.3.2 Histologie

Histologisch finden sich eine vermehrte Anzahl und atypische Formen von basalen Keratinozyten [32]. Außerdem treten dyskeratotische Zellen und Mitosen auf [22]. Ein weiteres histologisches Merkmal der aktinischen Keratose ist das sogenannte Flaggenzeichen, welches eine alternierende Para- und Orthokeratose bezeichnet [22]. Charakteristisch ist auch eine Hyperplasie der Epidermis. In der Dermis finden sich häufig eine solare Elastose und entzündliche Infiltrate.

1.2.3.3 Diagnostik und Therapie

Die Diagnose der aktinischen Keratose erfolgt klinisch. Zur Abgrenzung zu anderen Hautveränderungen wird die Dermatoskopie (Auflichtmikroskopie) angewandt. Eine histologische Aufarbeitung erfolgt in der Regel nur bei unklarer Klinik, beispielsweise bei Verdacht auf Plattenepithelkarzinom [2].

Therapeutisch gibt es diverse Möglichkeiten: Zum einen gibt es physikalische Methoden wie die Kryotherapie mit flüssigem Stickstoff. Dadurch werden epitheliale Zellen durch Separation der Epidermis von der Dermis zerstört. Zum anderen gibt es die topische Pharmakotherapie. Dafür stehen verschiedene Arzneimittel wie Imiquimod, 5-Fluorouracil oder Diclofenac-Hyaluronsäure zur Verfügung [18]. Zum Ausschluss eines invasiven Wachstums kann die Läsion auch mittels Kürettage exzidiert werden. Auf diese Art ist eine histologische Aufarbeitung möglich.

1.2.4 Spinalzellkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom (SCC) der Haut ist ein invasiv wachsender, maligner Tumor. Er wächst lokal destruierend, metastasiert aber selten [33].

In Deutschland beträgt die Inzidenz circa 15-20 pro 100.000 Einwohner pro Jahr, in Australien dagegen liegt eine 10-fach höhere Inzidenz vor [20, 34]. Damit ist das SCC ein häufiger Tumor. Wichtigster Risikofaktor für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Haut ist UV-Strahlung [35]. Aktinische Keratosen gelten sowohl als Vorstufe als auch als Risikofaktor für das SCC.[24] Weitere Faktoren wie chronische Wunden und Entzündungen, lang bestehende Narben, Arsenexposition, Röntgenstrahlung und Immunsuppression sind ebenfalls als Gründe zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen zu nennen.

1.2.4.1 Klinisches Bild

Aktinische Keratosen, Morbus Bowen und Porokeratosen gelten als in situ Vorstufen des SCC [24].

Klinisch imponiert das Plattenepithelkarzinom als rote, unscharf begrenzte, zentral schuppene Plaques oder Tumore mit oder ohne Ulzerationen [36].

1.2.4.2 Histologie

Histologisch finden sich atypische epitheliale Tumorzellformationen, die bis in die Dermis reichen [20, 22]. Alle Zellen neigen zur Verhornung, sodass sich intraepitheliale Hornperlen bilden. Zur Unterscheidung von anderen invasiv wachsenden Hauttumoren können immunhistologische Marker verwendet werden [18].

1.2.4.3 Diagnostik und Therapie

Therapie der ersten Wahl ist die chirurgische Exzision mit histopathologischer Kontrolle der Schnittländer [18]. Sollte dies nicht möglich sein, so kann eine Strahlentherapie erfolgen [37]. Diese kann in manchen Fällen auch in Kombination mit einer Chemo- oder Immuntherapie durchgeführt werden [38]. Lymphadenektomien erfolgen bei Tumoren mit höherem Metastasierungsrisiko zur Ausbreitungsdiagnostik. Sollten Fernmetastasen vorliegen, so können Chemo- oder Immuntherapie als lebensverlängernde Maßnahmen angewandt werden [18]. Die gleiche Wirkung wird durch Verringerung der Tumormasse mittels operativer Eingriffe oder Strahlentherapie erzielt.

Es werden halbjährliche Kontrollen für 5 Jahre nach Therapie eines Plattenepithelkarzinoms empfohlen [18], da Rezidive häufig in den ersten 2 Jahren nach Therapie auftreten. Bei immunsupprimierten Patienten wird beim SCC bis zum dritten Jahr die Sonographie der Lymphknoten empfohlen [18].

1.3 Malignes Melanom

Das maligne Melanom der Haut (MM) ist, ohne Berücksichtigung des nichtmelanomen Hautkrebs, der achthäufigste Tumor bei Männern und sogar der fünfhäufigste Tumor bei Frauen [39, 40]. Seit den 1980er Jahren verdreifachte sich die Zahl der Neuerkrankungen, wobei die Sterberate seit der Jahrtausendwende unverändert blieb [21]. Dies ist vor allem auf die Detektion des Melanoms in einem frühen Tumorstadium zurückzuführen.

UV-Strahlung gilt als wichtigster ätiologischer Faktor für die Entstehung des MM, weil sie Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen induziert. Daher zählen Menschen mit Hauttyp I oder II nach Fitzpatrick [30, 31] und Menschen mit großer Anzahl von Nävi (erworben, kongenital oder dysplastisch) zu den Hauptrisikogruppen. Daneben sind Hochrisikogene wie CDKN2A [41], ein Tumorsuppressor-Gen und CDK4 [42], dessen Genprodukt ein Protein mit regulatorischer Funktion im Zellzyklus darstellt, in Familien mit gehäuftem Vorkommen von MM von Bedeutung.

Im Gegensatz zum nichtmelanomen Hautkrebs kommt es beim MM häufig zur Metastasierung. Bei einer Tumoreindringtiefe größer als 1mm, liegt schon in 15,6% eine Metastasierung in den Wächterlymphknoten vor [43].

1.3.1 Klinisches Bild

Es werden vier klinisch-histologische Subtypen unterschieden: das superfiziell spreitende Melanom, das noduläre Melanom, das Lentigo-maligna-Melanom und das akral-lentiginöse Melanom [44, 45].

Das superfiziell spreitende Melanom ist mit 60% aller malignen Melanome der häufigste Typ [45]. Es imponiert als unregelmäßig pigmentierte, unscharf begrenzte und große Macula oder als Plaque.

Das noduläre Melanom erscheint meist als dunkelbrauner Knoten ohne Randsaum. Nach einer kurzen intraepidermalen Wachstumsphase kommt es zum Wachstum in das Korium hinein [44].

Lentigo-maligna-Melanome sind große, unregelmäßig pigmentierte, unscharf begrenzte Maculae und treten vor allem an Stellen chronischer Lichtexposition bei älteren Menschen auf. Sie haben eine günstigere Prognose.

Das akral-lentiginöse Melanom tritt an Hautarealen ohne Haarfollikel auf. Es ähnelt klinisch dem superfiziell spreitendem oder nodulärem Melanom [45].

1.3.2 Histologie

Histologisch finden sich vermehrt einzelne Melanozyten in der epidermalen Junktionszone, atypische Melanozyten sind in Epidermis und Korium lokalisiert. [20, 22] Daneben findet keine Reifung der Melanozyten in der Tiefe statt. Außerdem treten zum Teil atypische Mitosen in allen Schichten des Tumors auf. Die Keratinozyten erscheinen asymmetrisch und unterscheiden sich in Größe, Form, Farbe und ihrer Kernkonfiguration. Zusätzlich gibt es im Präparat tumorreaktive Infiltratzellen sowie Melanophagen.

1.3.3 Diagnostik und Therapie

Das MM wird klinisch nach der sogenannten ABCDE-Regel (A=Asymmetrie, B=Begrenzung, C=Colorit, D=Durchmesser > 6mm, E=Erhabenheit) diagnostiziert [45]. Daneben sollten zur Metastasenabklärung auch Laboruntersuchungen und ein Röntgen des Thorax durchgeführt werden. Ab einer Invasion des Tumors > 1mm muss auch eine Ausbreitungsdiagnostik durchgeführt werden. Die Eindringtiefe des Tumors ist prognostisch entscheidend. Dabei werden fünf Level nach Clark unterschieden: I=intraepidermal, II=Einbruch in das Stratum papillare, III=Stratum papillare vollständig ausfüllend, IV=Invasion in das Stratum reticulare, V=Eindringen in die Subkutis [46].

Therapie der Wahl ist die Exzision des Tumors im Gesunden mit einem Sicherheitsabstand von 1 cm bei Tumoren bis 1mm Tumordicke, bis zu 3 cm Sicherheitsabstand bei größeren Tumoren [45]. Bei letzteren sollte auch die Extirpation der Wächterlymphknoten erfolgen [43]. Fernmetastasen werden, je nach Lokalisation, chirurgisch oder durch Bestrahlung therapiert. Je nach Tumordicke und -stadium sind Kontrolluntersuchungen in drei- bis sechsmonatigen Intervallen über zehn Jahre empfohlen.

1.4 Psoriasis

Die Psoriasis ist eine multifaktorielle, chronische, durch T-Zellen vermittelte entzündliche Hauterkrankung, die durch epidermale Hyperproliferation und gestörte Differenzierung der Keratinozyten gekennzeichnet ist. In Europa liegt die Prävalenz zwischen 0,73% in Schottland und 2,9% in Italien [47].

Ursächlich für die Entstehung von Psoriasis sind sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse wie Infekte, Rauchen oder die Einnahme bestimmter Medikamente.

Über die Antwort des angeborenen Immunsystems werden spezifische T-Zellen aktiviert, wobei es zur verstärkten Proliferation von bestimmten T-Zell-Populationen kommt, welche proinflammatorische Zytokine produzieren [48]. Dadurch kommt es zur lokalen Entzündungsreaktion mit Einwanderung neutrophiler Granulozyten und einer gesteigerten proliferativen Aktivität der Keratinozyten.

Die Psoriasis ist mit verschiedenen Komorbiditäten vergesellschaftet. Dazu zählen Psoriasis-Arthritis, rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und metabolische Veränderungen wie Fettstoffwechselstörungen, Diabetesneigung, Adipositas und arterielle Hypertonie [49]. Ebenso wurde ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen nachgewiesen [50]. Aufgrund des stigmatisierenden Krankheitsbildes kommt es bei Psoriatikern doppelt so häufig zu psychischen Begleiterkrankungen wie beispielsweise Angst- und Schlafstörungen oder Depressionen [51].

1.4.1 Klinisches Bild

Bei der häufigsten Manifestationsform, der Psoriasis vulgaris, kommt es zu einzelnen, meist konfluenten erythemat-squamösen Plaques von 3-20 cm Durchmesser an den Prädilektionsstellen [52]. Dazu zählen das Kapillitium, der äußere Gehörgang, die streckseitige Knie- und Ellenbogenregion, die Sakralregion und Nägel.

Weitere Manifestationsformen sind die Psoriasis guttata mit kleinen Plaques am gesamten Integument, die Psoriasis intertriginosa, welche an den großen Körperfalten auftritt, die Psoriasis inversa an den Beugeseiten der großen Gelenke und die pustulöse Psoriasis, bei der es zu einzelnen, später konfluierenden Pusteln mit Fieber und starkem Krankheitsgefühl kommt [52].

1.4.2 Histologie

Eine histologische Sicherung der Diagnose wird nur in Ausnahmefällen durchgeführt. Dabei findet sich die, für die Psoriasis charakteristische, Hyperkeratose [22]. Außerdem kommt es zu Ansammlungen neutrophiler Granulozyten, die im Stratum spinosum als Kogoj'sche Pustel und im Bereich der hyperparakeratotischen Verhornung als Munro'sche Mikroabszesse bezeichnet werden. Es finden sich auch eine gleichförmige Akanthose mit langen Reteleisten und verlängerte Papillarkörper [22].

1.4.3 Diagnostik und Therapie

Die Diagnostik erfolgt in der Regel klinisch durch den Nachweis der für Psoriasis typischen Phänomene. Dazu gehört das „Kerzenwachsphänomen“, welches die abgelösten, typischerweise silbrig glänzenden Schuppen bezeichnet [52]. Nach Entfernung der Schuppen kommt es zum „Phänomen des letzten Häutchens“. Dabei wird die letzte, die Papillenspitzen überziehende Epidermisschicht sichtbar. Diese kann abgezogen werden. Die während dieses Vorgangs auftretenden punktuellen Blutungen, hervorgerufen durch die erweiterten Gefäßschlingen der Papillen, werden als „blutiger Tau“ oder als „Auspitz-Phänomen“ bezeichnet [52].

Je nach Schweregrad der Psoriasis kommt es neben der Basistherapie, welche vor allem fettende Cremes beinhaltet, zur Anwendung von topischen und/oder systemischen, immunmodulierenden Therapien. Bei unzureichender Behandlung oder anderen auslösenden Faktoren können die Effloreszenzen wieder zum Vorschein kommen [52].

1.5 Optische diagnostische Verfahren

1.5.1 Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ist ein nichtinvasives optisches Verfahren, das auf Interferenz von Infrarotstrahlen, also Licht mit geringer Kohärenzlänge, beruht [53]. Die Technologie erlaubt die Darstellung von Schnittbildern von Geweben in Echtzeit. Die Eindringtiefe beträgt in Haut bis zu 2 mm mit einer Auflösung zwischen 1 und 10 µm [54].

Neben der Augenheilkunde wird dieses Verfahren seit 1997 auch in der Dermatologie angewandt [55], mit dessen Hilfe die Epidermis und Dermis klar erkennbar ist. Ebenso können Hautanhangsgebilde und Blutgefäße dargestellt werden.

Das Prinzip der Bildgewinnung ist mit der Sonographie vergleichbar [53, 56]. OCT misst die Verzögerung und Intensität von reflektiertem Infrarotlicht von streuenden Materialien im Vergleich zu einem Referenzstrahl. Kontraste entstehen mit Änderung des Brechungsindex.

Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie ist die transversale von der longitudinalen Auflösung entkoppelt. Die transversale Auflösung ist abhängig von der numerischen Apertur der verwendeten Optik, wohingegen die longitudinale Auflösung von der spektralen Breite des Lichts abhängig ist [56].

Gesunde Haut stellt sich im OCT wie folgt dar: Das Stratum corneum ist nur an den Handinnenflächen und Fußsohlen sichtbar. Dort erscheint es als dichtes, homogenes und wenig streuendes Band, gelegentlich sind auch stark streuende Schweißdrüsen sichtbar. Die Epidermis zeigt ein weniger intensives Signal als die Dermis. Vom oberen Korium unterscheidbar ist es durch eine flache und wenig gefurchte Grenze. Die Dermis zeigt wieder ein stärkeres Signal mit einigen signalarmen Höhlen, die Blutgefäßen entsprechen [55].

Klinische Anwendung findet die OCT in der Diagnostik von Hauterkrankungen wie Psoriasis, Kontaktdermatitis, Lupus erythematosus, blasenartige Hautveränderungen, Gefäßerkrankungen, infektiöse Hauterkrankungen und Hauttumoren [53, 54, 57-60]. Da die OCT ein nichtinvasives, reproduzierbares und gut verträgliches Verfahren ist, kann sie auch zum Monitoring von Krankheiten und zur Auswertung von Behandlungseffekten verwendet werden.

1.5.2 Laser-Scan-Mikroskopie im Reflexionsmodus

Die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie (KLSM) ist ein nichtinvasives Verfahren zur Darstellung der Haut *in vivo* [61]. Dabei wird eine Punktlichtquelle verwendet, um Hautstrukturen in virtuellen, horizontalen Schichtaufnahmen darzustellen [33]. Dazu werden die Reflexion und Streuung von Licht aus dem untersuchten Gewebsabschnitt gemessen. Die verschiedenen Zellstrukturen haben unterschiedliche Refraktionsindizes und führen zu diversen Reflexionsmustern, die in mehreren Graustufen dargestellt werden. Starke Kontraste werden unter anderem durch Melanin, Hämoglobin, zelluläre Mikrostrukturen und Kollagen hervorgerufen [62, 63].

Durch eine kleine Apertur kann Licht, das nicht in der Fokalebene liegt, herausgefiltert werden. Auf diese Art wird eine hohe Resolution ermöglicht.

Die laterale Auflösung liegt im Bereich von 0,5-1 μm und entspricht dabei dem zellulären Bereich. Die axiale Auflösung beträgt 3-5 μm und entspricht der Schichtdicke normaler

histologischer Untersuchungen. Die Eindringtiefe liegt bei 250-300 μm . Somit kann die Haut bis zur oberflächlichen Dermis dargestellt werden [3].

Die generierten Bilder können in Echtzeit betrachtet und ausgewertet werden. Aufgrund der Noninvasivität des Verfahrens eignet es sich zur Früherkennung von Hauterkrankungen wie beispielsweise nichtmelanome Hauttumoren [64-66]. Gerade in diesem Bereich spielt die Früherkennung eine wichtige Rolle, da dadurch auf weniger invasive Therapieverfahren zurückgegriffen werden kann. Zudem ist es möglich, die KLSM auch zur Diagnostik und Verlaufskontrolle entzündlicher Dermatosen, zur Darstellung der Hautalterung und bei vielfältigen Fragestellungen in der Forschung anzuwenden [67].

1.5.3 Laser-Scan-Mikroskopie im Fluoreszenzmodus

Das Prinzip der konfokalen Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie (KFLSM) basiert auf Anregung und Erkennung von Fluorophoren [68-70]. Ihre unterschiedliche Verteilung im Gewebe erzeugt einen Kontrast.

Fluorophore werden bei Bestrahlung mit energiereichem Licht durch Absorption eines oder mehrerer Photonen in eine höher energetische Konfiguration umgewandelt [69]. Wenn diese instabile Konfiguration wieder in ihren Grundzustand zurückfällt, wird Energie in Form eines emittierten Photons frei. Diese Energie kann in Form von Licht, einer für jedes Fluorophor spezifischen Wellenlänge, mittels eines Photodetektors in ein digitales Farbsignal umgewandelt und dargestellt werden. Die laterale Auflösung beträgt dabei 0,5 bis 1 μm [65].

Zur Untersuchung mit KFLSM ist ein endogener fluoreszierender Farbstoff nötig, der zuvor in die Probe appliziert wird. Dadurch kann ein größerer Kontrast erzeugt werden [65].

Durch die Bestrahlung der Probe mit einem Laserstrahl wird die Fluoreszenz erzeugt. Die so entstandene Fluoreszenz wird mit einem Objektiv aufgefangen und mittels eines Sensors als Bild dargestellt. Dieses Bild zeigt die Verteilung der Fluoreszenz von allen Schichten der beleuchteten Probe. Aufgrund der geringen Tiefenschärfe kann die Optik allerdings nur eine sehr dünne Schicht scharf darstellen. Alle anderen Schichten, die über oder unter der scharf dargestellten Tiefe liegen, können lediglich unscharf abgebildet werden, sodass das gewünschte Bild durch diese Fluoreszenzsignale überlagert wird. Zur Gewinnung eines scharfen Bildes wird neben dem Fluoreszenzverfahren auch die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie angewandt. Dabei wird nur das Fluoreszenzsignal eines einzelnen Punktes detektiert. Um dennoch ein Abbild einer Fläche zu erhalten, wird die Probe Punkt für Punkt abgetastet.

Die so entstandenen Bilder sind horizontale Schnitte parallel zur Hautoberfläche, im Gegensatz zur Routinehistologie, bei der Querschnitte der Haut untersucht werden. Bisher wurde die KFLSM in Studien zur Diagnostik und zum Monitoring therapeutischer Verläufe mit neuen Behandlungsmodalitäten verwendet.

1.5.4 Multiphotontomographie

Die Multiphotontomographie (MPT) ist ein neues Verfahren der Bildgebung von Haut mit subzellulärer Auflösung [71-77]. Sie erkennt sowohl endogene Fluorophore als auch Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) wie Kollagen [71, 72]. Letzteres wird über das Phänomen der Frequenzverdopplung (SHG) messbar. SHG meint das physikalische Prinzip der Verdopplung der Lichtfrequenz bei Bestrahlung von Materialien mit einem Laserstrahl hoher Intensität. Die Autofluoreszenz und das SHG-Signal können über Einzelphotonenzählung (SPC) detektiert werden. Zur Darstellung ist keine spezielle Färbung notwendig.

Fluorophore sind Stoffe, die nach Anregung spontan Licht emittieren. Als solche gelten insbesondere die reduzierten Nicotinsäurederivate NAD(P)H in freier oder in proteingebundener Form. Diese emittieren, im Gegensatz zur oxidierten Form NAD(P), im sichtbaren Bereich. Die höchste Konzentration von NADH und NADPH tritt in den Mitochondrien auf. Dort und im Zytoplasma sind sie an diversen Redoxreaktionen beteiligt und stellen wichtige Indikatoren für den Zellstoffwechsel dar [72]. Weitere Fluorophore sind Flavine, Elastin, Kollagen, Melanin oder Porphyrine. Letztere finden sich als organische Farbstoffe im Hämoglobin. Teilweise werden sie auch durch die Normalflora der Haut synthetisiert. Das Keratin als Bestandteil des Stratum corneum, der Haare und Nägel gilt ebenfalls als Fluorophor.

In der MPT sind nahe Infrarot (NIR) -Lasertechnologien hoher Lichtintensität erforderlich, um den Prozess der Zwei-Photonen-Absorption zu realisieren [71]. Dabei werden zwei NIR-Photonen simultan absorbiert, wobei jedes Photon die Hälfte der Energie besitzt, die normalerweise benötigt wird, um das Fluorophore anzuregen in den fluoreszierenden elektronischen „Singulettzustand S_1 “ zu gelangen. Dabei erreichen die Elektronen des angeregten Stoffes ein unbesetztes Orbital höherer Energie. Nach kurzer Zeit verlassen die Elektronen dieses Orbital wieder und gehen in den Grundzustand des Moleküls S_0 zurück. Dabei kommt es zur Lichtemission.

Die Fluoreszenzemission der angeregten Moleküle kann durch einen Photoelektronenvervielfacher detektiert werden. Anschließend folgt die Signalumwandlung in Graustufen und ein zweidimensionales Bild wird erzeugt [73].

Für die Zwei-Photonen-Absorption, die zu einer hohen Auflösung führt, ist ein sehr kleiner Laserfokus notwendig, da nur im fokussierten Bereich eine Zwei-Photonen-Absorption stattfinden kann.

Durch die Verwendung von NIR Lasertechnologien werden sowohl thermale Erwärmung und Bleichen des Gewebes als auch Anregungen der Moleküle außerhalb des Fokus vermieden [71]. In einer Studie von Fischer et al. [78] konnte gezeigt werden, dass keine Erytheme oder sonstige Hauteffloreszenzen entstehen. Ebenso wenig besteht Gefahr für Augenverletzungen aufgrund der kurzen Distanz der fokussierenden Optik. Nach den europäischen Sicherheitsbestimmungen wurde das System als Klasse 1 M Gerät zertifiziert.

Die MPT findet in der Dermatologie bereits in klinischen Studien zur Untersuchung von Hauterkrankungen Anwendung [73]. Dazu gehören beispielsweise seborrhoische Keratosen, Angiome, Psoriasis, atopische Dermatitis, Narben, Pemphigus vulgaris, melanozytische Nävi, maligne Melanome und epitheliale Hauttumore.

1.5.5 Kohärente Anti-Stokes-Raman Streuung

Neben der Autofluoreszenz kann auch die kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung (CARS) gemessen werden. Im Gegensatz zur MPT können hiermit Substanzen untersucht werden, die nicht autofluoreszieren oder ein SHG-Signal produzieren. Dazu zählen unter anderem Lipide [79-82] und Wasser [83]. Diese können durch Anregung der für sie charakteristischen Schwingungsmodi sichtbar gemacht werden. Lipide stellen einen wesentlichen Bestandteil menschlicher Haut dar. Sie kommen vor allem in den Zellmembranen der Keratinozyten vor und spielen eine wichtige Rolle in der Barrierefunktion der Haut [11].

Um ein CARS-Signal zu erhalten, müssen drei Laserstrahlen unterschiedlicher Frequenz, ein Pump-Laser (ω_{pump}), ein Stokes-Laser (ω_{Stokes}) und ein Proben-Laser (ω_{probe}), verwendet werden [84]. Durch Überlagerung der Photonen und Wechselwirkung der Photonen mit dem zu untersuchenden Material entsteht ein einzelner Laserstrahl.

1.6 Zielsetzung

Mit der bisherigen invasiven Diagnostik von epithelialen Hauttumoren mittels histologischer Untersuchungen sind Limitationen verbunden. Diese Methode könnte durch den Einsatz von optischen Untersuchungssystemen unterstützt oder sogar ersetzt werden.

Daher ist es Ziel dieser Studie, die Eignung der MPT und KSLM im Vergleich zum bisherigen Goldstandard, der Histologie, zur Diagnosestellung von NMSC und AK zu untersuchen und

dabei morphologische Charakteristika der jeweiligen Tumore (BCC, AK, SCC) zu erarbeiten und zu analysieren. Außerdem soll untersucht werden, inwiefern die AK mittels MPT vom SCC zu unterscheiden ist. Dies ist von Bedeutung, da die jeweilige Diagnose ein eigenes Therapieschema erfordert. Des Weiteren soll anhand eines Prinzipversuchs die Untersuchung des malignen Melanoms dargestellt werden. Es werden zusätzlich auch erste Untersuchungen mit CARS durchgeführt, die Lipidstrukturen von gesunder Haut und Psoriasis zeigen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Probanden

23 Probanden (7 weiblich, 14 männlich) im Alter von 17 bis 88 Jahren nahmen an der Studie teil. Sie wurden als Patienten der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin ausgewählt. In Tab. 1 sind die Probanden dargestellt.

Bei 9 Probanden wurde histologisch ein Basalzellkarzinom, bei 6 Probanden ein Plattenepithelkarzinom und bei weiteren 6 Probanden eine aktinische Keratose nachgewiesen. Des Weiteren wurden als Prinzipversuch noch jeweils 1 Proband mit malignem Melanom und 1 Proband mit Psoriasis gemessen. Die untersuchten Stellen befanden sich an den Extremitäten (n=14) und am Kopf (n=7). Als Vergleichsdaten wurden gesunde Hautstellen der jeweiligen Probanden herangezogen.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Deutschland (EA1/046/11), genehmigt. Ebenso gaben die Studienteilnehmer ihr schriftliches Einverständnis zu den Untersuchungen.

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte unverblindet.

Tab. 1 Patientenliste

Proband	Geschlecht	Alter	Tumor	Lokalisation
1	M	72	AK	Unterarm
2	W	76	AK	Handrücken
3	M	75	AK	Handrücken
4	W	71	AK	Kopf
5	M	74	AK	Unterarm
6	M	83	AK	Schläfe
7	M	67	BCC	Unterschenkel
8	M	58	BCC	Unterschenkel
9	M	71	BCC	Unterschenkel
10	M	80	BCC	Stirn
11	W	30	BCC	Oberschenkel
12	W	47	BCC	Stirn
13	M	72	BCC	Unterschenkel
14	W	80	BCC	Schläfe
15	M	69	BCC	Unterschenkel
16	M	88	SCC	Oberschenkel
17	W	76	SCC	Schläfe
18	M	58	SCC	Stirn
19	M	74	SCC	Unterschenkel
20	W	78	SCC	Unterschenkel
21	M	77	SCC	Unterschenkel
22	W	52	MM	Unterschenkel
23	W	17	Psoriasis	generalisiert

2.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Zur Untersuchung der Patienten wurde ein kommerziell zu erwerbendes *in vivo* KLSM (Vivascope 1500, MAVIG GmbH, München, Lucid-Tech Inc., Henrietta, N.Y., USA) verwendet.

Das System enthält eine Laserdiode geringer Leistung (maximal 15 mW, Laserklasse 1M) und eine Linse mit einer numerischen Apertur von 0,9. Das Gerät hat eine laterale Auflösung von 0,5 bis 1 μm und eine axiale Auflösung von 3 bis 5 μm mit einer maximalen Eindringtiefe von 200 bis 250 μm .

2.3 Multiphotonentomographie

Die Untersuchungen wurden mit einem Multiphotonentomographen (JenLab GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt. Dieser ist mit einem femtosecond titanium sapphire laser (Mai Tai XF, Spectra Physics, USA) ausgestattet. Der Laser hat ein Spektrum von 710 nm bis 920 nm und



Abb. 2a
Multi-Photonen-Tomograph



Abb. 2b
Messung am Unterarm

generiert 100 fs Pulse bei einer Frequenz von 80 MHz. In Abb.2 a/b ist das Gerät gezeigt. Für die Messungen wurde eine Wellenlänge von 760 nm genutzt. Auf diese Art erhält man Längs- und Tiefenaufösungen von 0,5 μm und 2 μm . Für die Messung des CARS-Signals wurde eine Wellenlänge von 800 nm verwendet. Dies erlaubt ein schärferes CARS-Bild, allerdings auf Kosten eines etwas weniger scharfen Autofluoreszenz-Bildes.

2.4 Histologie

Die Histologie ist nach wie vor das Goldstandard-Verfahren zur Diagnostik von Hauterkrankungen. Für die histologische Untersuchung wurden entweder im Rahmen einer geplanten Operation oder nach Desinfektion und lokaler Anästhesie Stanzbiopsien aus den

Läsionen von BCC, SCC und AK entnommen. Die verbleibende Wunde wurde entsprechend ihrer Größe verschlossen. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Probe in Formalin sowie die Einbettung in Paraffin. Daraus wurden mittels eines Mikrotoms 4 µm dicke Vertikalschnitte angefertigt. Die charakteristischen Merkmale der einzelnen Erkrankungen wurden mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung sichtbar gemacht. Die Beurteilung des Präparates erfolgte durch Dermatohistologen der Charité.

2.5 Experimentelles Vorgehen

2.5.1 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Nach Reinigung der Haut mit Alkohol wurde ein Tropfen Immersionsöl auf die Haut aufgetragen, um die sphärische Aberration zu minimieren. Anschließend wurde ein Stahlring mit einem anhaftenden Plastikring auf die Haut aufgebracht. Mit Hilfe der integrierten Kamera wurde ein dermatoskopisches Bild aufgenommen. Nach Applikation von Ultraschallgel zwischen Stahl- und Plastikring konnten diese mit dem KLSM System verbunden werden und die Bildgebung wurde gestartet. Die Bildfrequenz betrug 9 Bilder pro Sekunde. In den drei Ebenen Stratum corneum, Stratum spinosum und der oberflächlichen Dermis erfolgten Übersichtsaufnahmen horizontaler Schnittbilder von 4x4 mm² in Form konfokaler Mosaikbilder. Stellen mit auffälligen Strukturen konnten außerdem mit einzelnen horizontalen Schnittbildern von 500x500 µm² in verschiedenen Tiefen von Stratum corneum bis zur oberflächlichen Dermis dargestellt werden.

2.5.2 Multiphotonentomographie

Das zu untersuchende Hautareal wurde mit Alkohol entfettet. Danach wurde ein Metallring mit Glaseinsatz, der auf der Unterseite mit einem Tropfen Wasser versehen wurde, auf die Hautstelle aufgebracht. Auf der Oberseite des Glaseinsatzes wurde ein Tropfen Immersionsöl (Immersionol TM 518F, Zeiss) aufgetragen. Der Metallring wurde anschließend magnetisch mit dem Multiphotonentomographen verbunden.

Zur Messung wurde zunächst das Stratum corneum identifiziert und dort der Nullpunkt festgelegt. Anschließend wurden tieferliegende Hautschichten in 5-10 µm Schritten untersucht. Die maximale Messtiefe betrug aufgrund der Eindringtiefe des Laserstrahls 200 µm. Während der Messung wurde das zu messende Körperteil durch ein Vakuumkissen stabilisiert, um Artefakte zu vermeiden.

2.6 Datenanalyse und statistische Auswertung

Folgende Daten wurden im Rahmen der Untersuchung gewonnen: Es wurden makroskopische Aufnahmen der Läsionen gemacht. Die gewonnenen Aufnahmen mittels KLSM und MPT der Läsion (BCC, AK, SCC, malignes Melanom) und gesunder Haut konnten in Korrelation mit der histologischen Aufnahme der Läsion gesetzt werden. Außerdem wurden Messungen mit CARS durchgeführt. Es erfolgte eine morphometrische Analyse (Kern-Zytoplasma-Verhältnis, Zellkerndurchmesser und Zelldichte) anhand der MPT-Aufnahmen der Läsionen und der jeweilig korrespondierenden gesunden Haut der Patienten. Zudem erfolgte ein Vergleich der Daten der Läsionen von aktinischer Keratose und Plattenepithelkarzinom.

Die Zellen auf den mittels MPT gewonnenen Bildern wurden mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ 1.46r für Mac vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft® Office Excel© (Version 12.2.0, 2008) für Mac und SPSS® (Version 19, Inc. Chicago, Illinois) für Windows. Die erhaltenen Daten wurden mit Origin® (2015) in Boxplots dargestellt.

Für die statistische Analyse wurden bei den jeweiligen Hauttumoren in 10 µm-Schichten und bei der gesunden Haut in Stratum granulosum, spinosum und basale je 6 Zellen ausgewählt und entsprechend der Kriterien vermessen. Die Vergleiche der Hauttumore zur jeweiligen Schicht der gesunden Haut erfolgten am selben Patienten. Aufgrund der Nichtnormalverteilung der Daten bei verbundenen Stichproben wurde daher der Wilcoxon-Test durchgeführt. Wegen der geringen Fallzahl pro Hauttumor (n=6) und aufgrund des Pilotstudien-Charakters der Arbeit wurde auf eine Bonferroni-Korrektur bei multiplem Testen verzichtet. Zur Gegenüberstellung von AK und SCC wurde der Mann-Whitney-U-Test für zwei unverbundene Stichproben verwendet. Werte von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Aufnahmen gesunder Haut

3.1.1 Histologie gesunder Haut

In Abb. 3 ist eine histologische Aufnahme gesunder Haut dargestellt. Der geordnete Schichtaufbau ist gut zu erkennen. Zwischen Dermis und Epidermis findet sich die dermoepitheliale Junctionszone, die eine klare Grenze zwischen den beiden Hautschichten bildet. Die Keratinozyten der Epidermis sind regelmäßig angeordnet und vom Stratum corneum bedeckt.

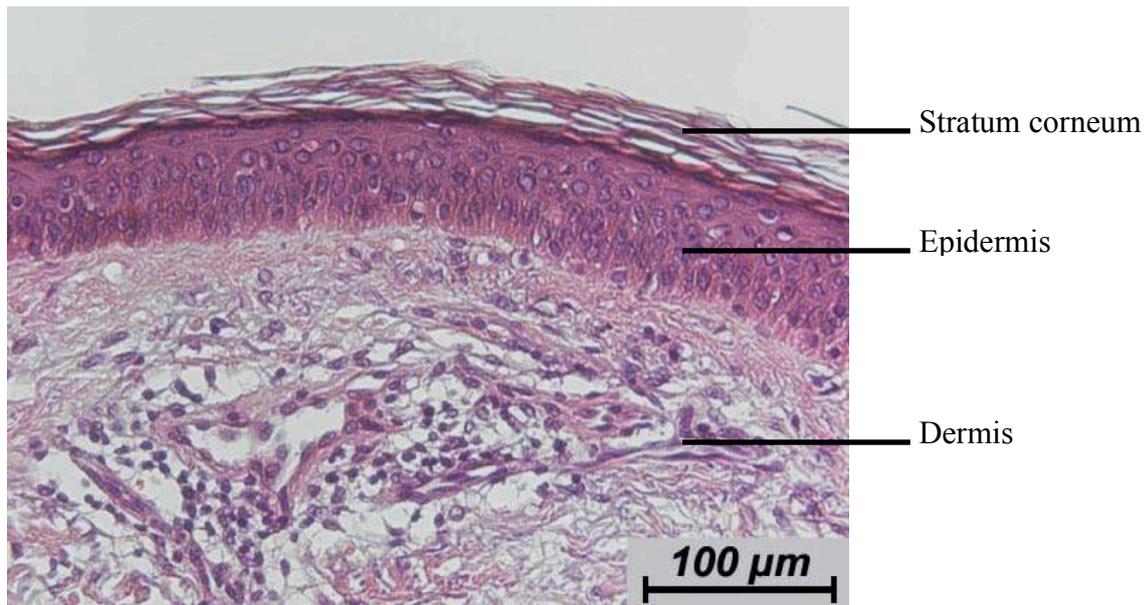


Abb. 3 Histologie gesunder Haut

3.1.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie gesunder Haut

Mittels KLSM können die Zellen je nach Schichttiefe aufgrund ihrer Größe in Granular-, Spinal- und Basalzellen unterschieden werden. Der Zellkern imponiert dunkel mit einer hellen Umgebung. Der Zelldurchmesser nimmt mit zunehmender Tiefe ab. Die Zellen sind in einem regelmäßigen Muster („Honigwaben“) angeordnet. In der Basalzellschicht sind pigmentierte Zellen sichtbar. Das beruht auf dem hohen Kontrast durch Melanin. Ebenfalls einen hohen Kontrast produzieren die bindegewebigen Strukturen der dermoepithelialen Junctionszone. Abb. 4 zeigt KLSM-Aufnahmen der gesunden Haut in verschiedenen Tiefen.

Im Stratum corneum in 0 μm Tiefe finden sich polygonale, kernlose Korneozyten (grüner Pfeil), die sich in einem stark refraktilen Zellverband befinden. Die typische Felderung und Furchung (gelber Pfeil) der Zellverbände ist ebenfalls erkennbar. Ein einzelner Korneozyt hat eine Größe von 20 bis 30 μm.

In 10 μm Tiefe befindet sich das Stratum granulosum mit zwei bis vier Zelllagen, wobei der Durchmesser der einzelnen Zellen zwischen 20 und 25 μm liegt. Die Zellkerne imponieren dunkel mit einer runden bis ovalen Form. Sie sind von einem schmalen, hellen Zytoplasmasaum mit granulärem Erscheinungsbild umgeben.

Die Zellen des Stratum spinosum in 20 μm Tiefe sind polygonal und mit 15 bis 20 μm Durchmesser etwas kleiner als die des Stratum granulosum. Sie ordnen sich im typischen Honigwabenmuster an.

Im Stratum basale befinden sich mehr oder weniger refraktile Zellen (blauer Pfeil) mit einem vom Hauttyp abhängigem Melaningehalt. Die Größe der Basalzellen beträgt 10 bis 12 μm . Die stark refraktilen Zellen sind Melanozyten (roter Pfeil).

In der dermoepithelialen Junctionszone in 70 μm Tiefe bilden die Basalzellen einen hellen Ring um die dunklen Papillen der Dermis (roter Kreis), die teilweise mit Kapillaren versehen sind.

In den Bildern der oberflächliche Dermis bei 80 μm sind retikuläre Bündel von Bindegewebe erkennbar.

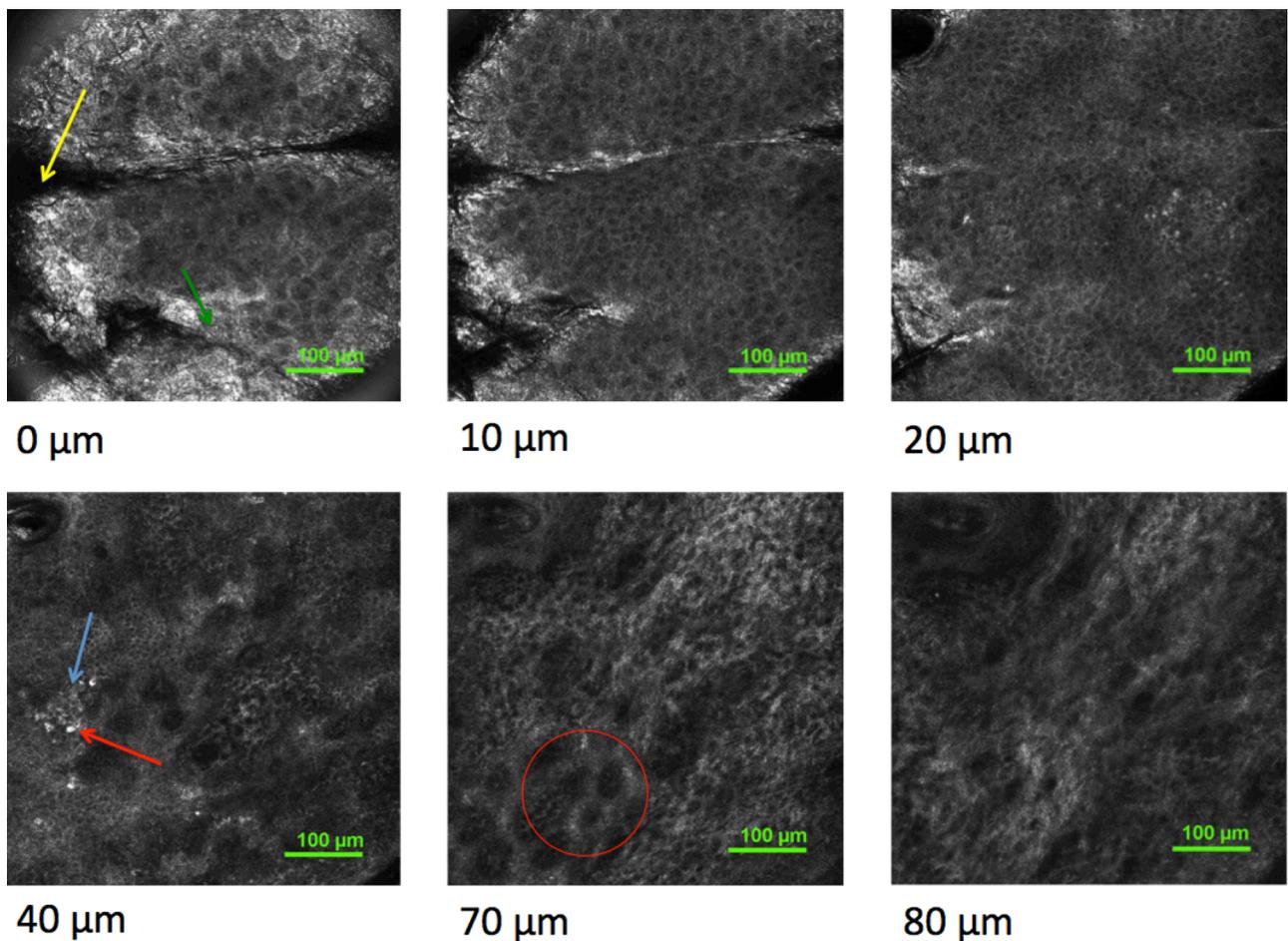


Abb. 4 LSM gesunder Haut in 0 μm bis 80 μm Tiefe

3.1.3 Multiphotonentomographie gesunder Haut

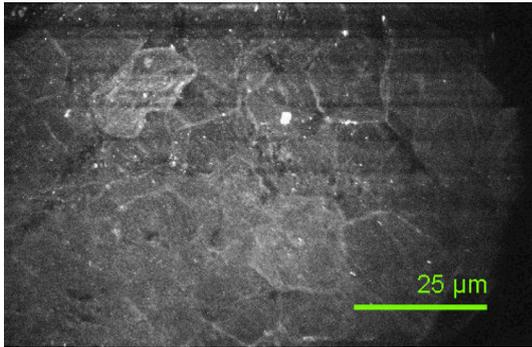


Abb. 5 Stratum corneum in 0 µm Tiefe

Abb. 5 zeigt die Hautoberfläche mit den äußeren Zellen des Stratum corneum und kleine punktförmige Artefakte, vermutlich durch Creme-Rückstände hervorgerufen. Die Korneozyten erscheinen groß und besitzen keinen Zellkern.

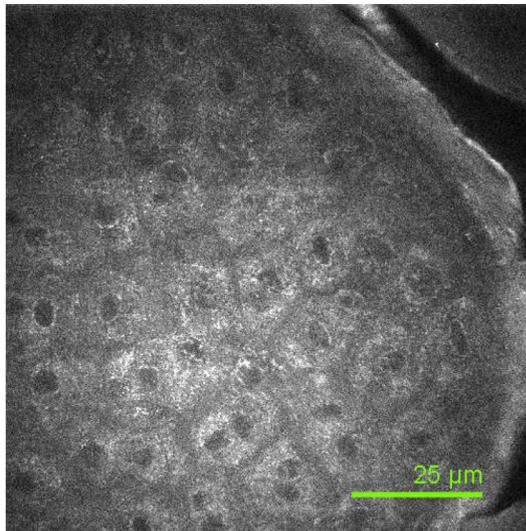


Abb. 6 Stratum granulosum in 20 µm Tiefe

In Abb. 6 sind Zellen des Stratum granulosum in einer Tiefe von 20 µm dargestellt. Die Zellen sind kleiner als im Stratum corneum, aber größer als im tiefer gelegenen Stratum spinosum. Die Zellkerne imponieren dunkel, wohingegen das Zytoplasma hell erscheint. Die Interzellularräume erscheinen dunkler als das Zytoplasma, aber heller als die Zellkerne. Am rechten Bildrand befindet sich eine Hautfurche.

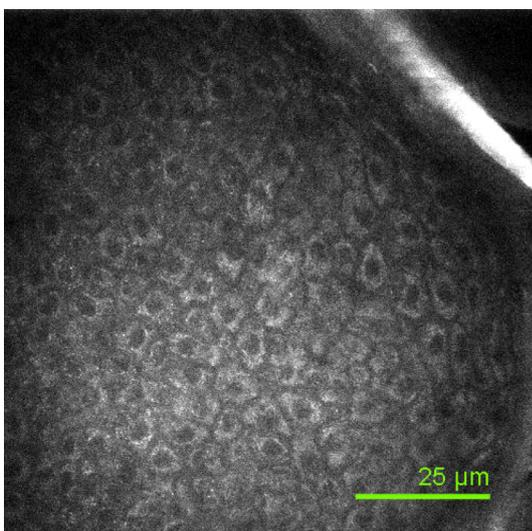


Abb. 7 Stratum spinosum in 40 µm Tiefe

Abb. 7 bildet das Stratum spinosum in 40 µm Tiefe ab. Die polygonalen Zellen sind regelmäßig angeordnet und bilden einen gleichmäßigen Zellrasen. Sie sind kleiner als die Zellen des Stratum granulosum, jedoch etwas größer als die des Stratum basale. In der Hautfurche am rechten oberen Bildrand ist ein helles Signal erkennbar, welches durch in der Hautfurche befindliche Creme zustande kommen kann.

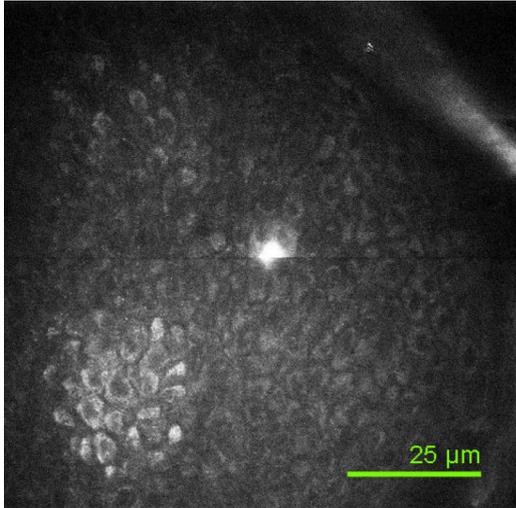


Abb. 8 Stratum basale in 50 μm Tiefe

Abb. 8 zeigt das Stratum basale in 50 μm Tiefe. Die Zellen sind klein und dicht gedrängt. Neben den polygonalen Basalzellen sind auch Melanozyten dargestellt. Sie haben aufgrund des Melaningehalts ein sehr starkes Signal. In der Bildmitte ist ein Artefakt zu erkennen.

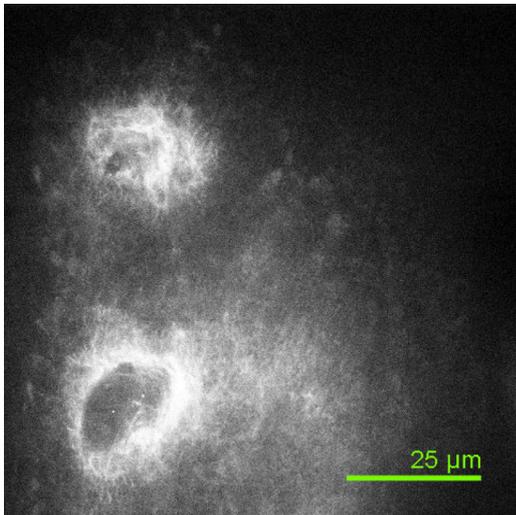


Abb. 9 Dermoepitheliale Junctionszone in 70 μm Tiefe

In Abb. 9 ist die dermoepitheliale Junctionszone in 70 μm Tiefe dargestellt. In der linken Bildhälfte sind zwei dermale Papillen aus Bindegewebe, die in die Epidermis hineinragen, erkennbar. Um die Papillen herum befinden sich Basalzellen.

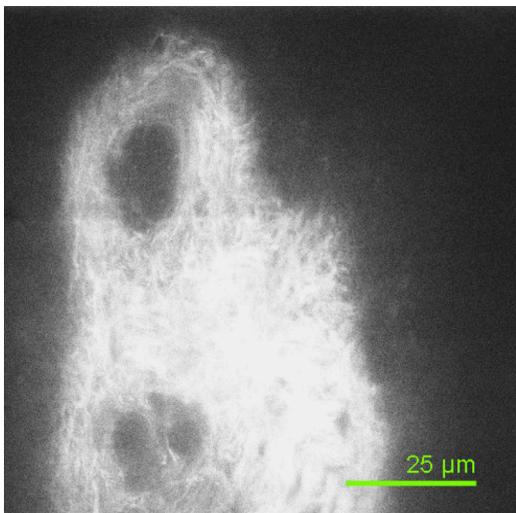


Abb. 10 Dermis in 90 μm Tiefe

Abb. 10 bildet das Stratum papillare der Dermis in einer Tiefe von 90 μm ab. Kollagene und Elastine haben ein starkes Signal. Zelluläre Strukturen sind nicht mehr erkennbar. In der unteren Papille ist ein Gefäß angeschnitten.

3.2 Aufnahmen des Basalzellkarzinoms

3.2.1 Histologie des Basalzellkarzinoms

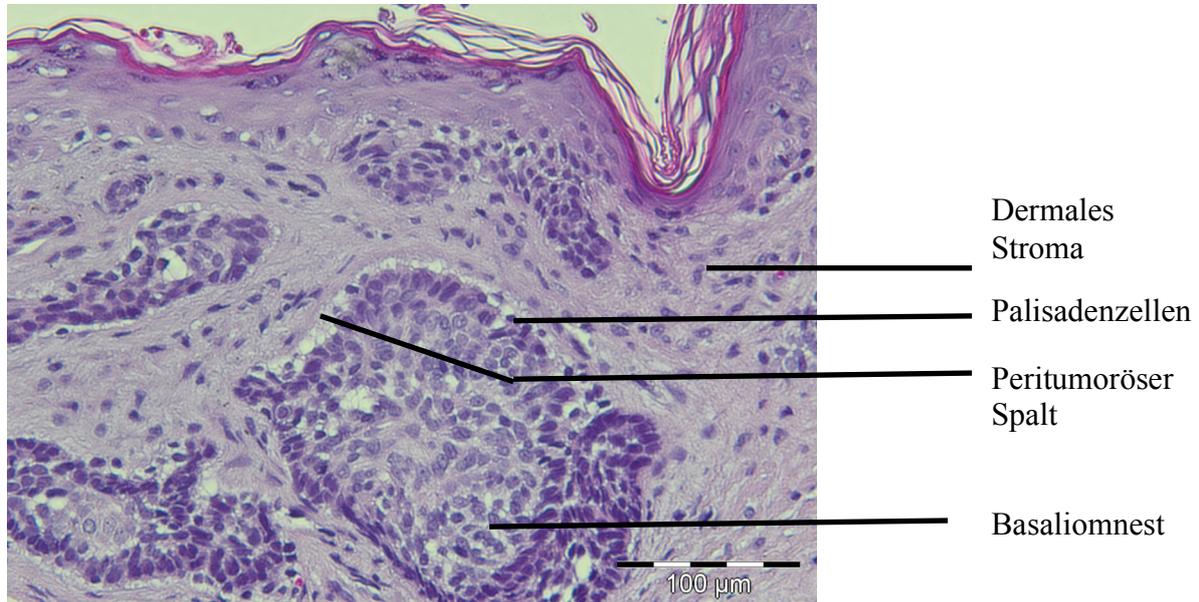


Abb. 11 Histologie des Basalzellkarzinoms

Das histologische Bild eines Basalzellkarzinoms ist in Abb. 11 dargestellt. Charakteristisch sind basaloide Zellverbände mit chromatindichten Kernen, die in Nestern angeordnet und von palisadenartig formierten Zellen umgeben sind. Um die Basaliomnester herum befindet sich ein dermales Stroma. Zwischen Stroma und Tumornest findet sich ein peritumorales Spalt.

3.2.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie des Basalzellkarzinoms

In der Untersuchung des BCC mit KLSM ergeben sich einige charakteristische Merkmale. Zuerst zu nennen ist das Vorkommen von elongierten Zellen, welche derselben Orientierungsachse folgen. Neben diesen charakteristischen Zellen finden sich auch Entzündungszellinfiltrate in den Läsionen. Wie auch schon im klinischen Bild durch Teleangiektasien zeigt sich eine erhöhte Vaskularisierung in der Aufnahme mit KLSM in Form von dilatierten und gewundenen Gefäßen. In den Gefäßen kann eine verstärkte Leukozytenmigration beobachtet werden. Im Stratum corneum zeigen sich oftmals eine Parakeratose und Varianzen in der Kerngröße der Keratinozyten.

Außerdem kann mittels KLSM die typische Anordnung der BCC-Zellen in Nestern beobachtet werden. Abb. 12 zeigt Aufnahmen eines BCC, das mittels KLSM untersucht wurde.

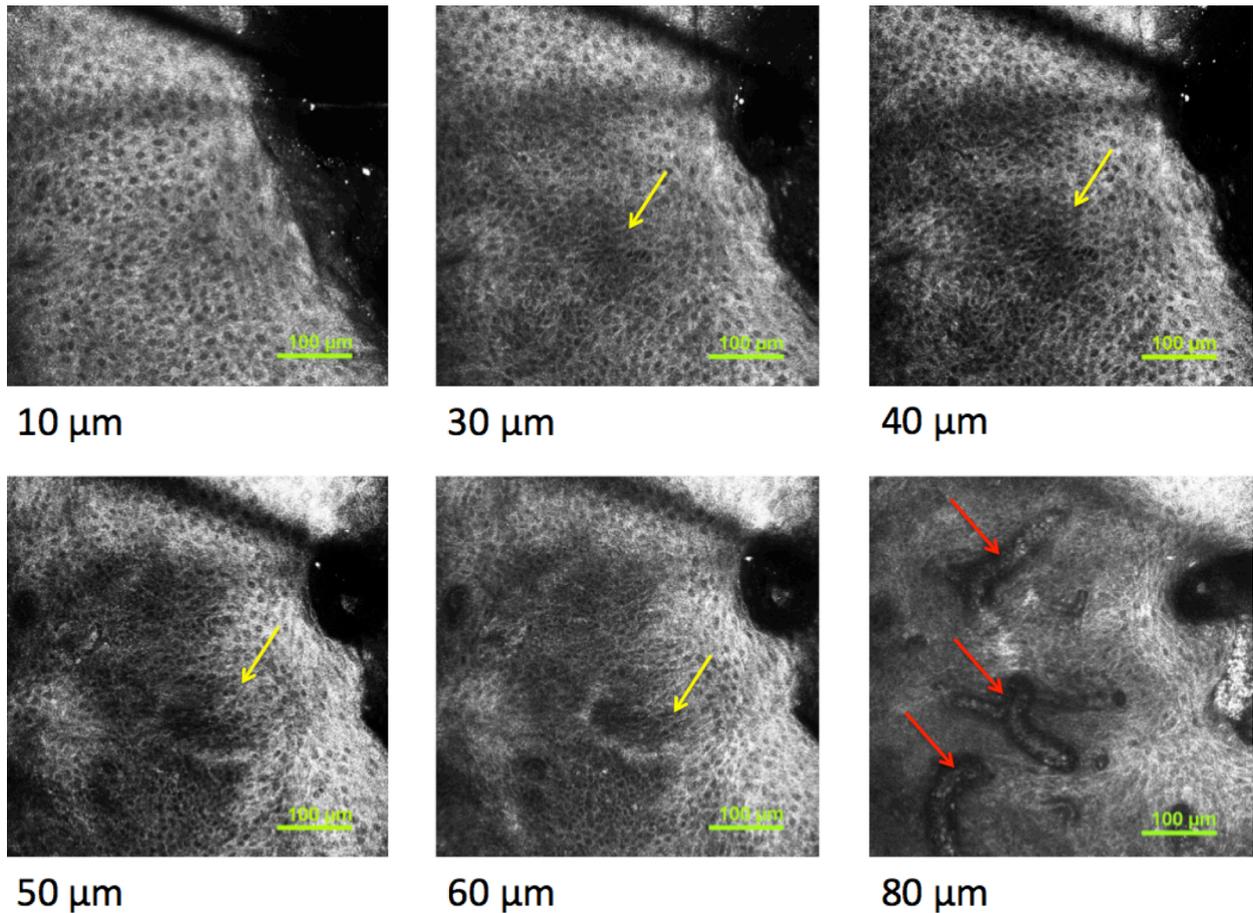


Abb. 12 LSM des Basalzellkarzinoms

In 10 μm Tiefe sind elongierte Zellen sichtbar. Die Basaliomnester zeigen sich in der KLSM-Aufnahme durch hyporefraktile Areale (gelbe Pfeile). Um die Nester herum befindet sich das tumoröse Stroma. In 80 μm Tiefe werden Teleangiektasien sichtbar (rote Pfeile).

3.2.3 Multiphotonentomographie des Basalzellkarzinoms

Abb. 13 zeigt horizontale Schnitte des BCC mittels MPT.

In Abb. 13.A ist gesunde Haut in verschiedenen Tiefen dargestellt. In 30 μm und 40 μm Tiefe erkennt man die Zellen des Stratum granulosum. Sie besitzen einen großen Zytoplasmasaum, der aufgrund seiner biochemischen Zusammensetzung hell imponiert, im Gegensatz zum jeweiligen Nucleus der Zelle, welcher dunkel abgebildet wird.

Im Stratum spinosum bei 50 μm ist das typische Muster der gesunden Haut zu erkennen: Die polygonalen und regelmäßig geformten Zellen bilden eine gleichmäßige Schicht. Sie erscheinen kleiner als im höher gelegenen Stratum granulosum.

In einer Tiefe von 60 μm befinden sich die Zellen des Stratum basale. Diese sind nochmals kleiner und dichter gedrängt als die Zellen des Stratum spinosum.

Die Aufnahme in 80 μm Tiefe zeigt die bindegewebigen Strukturen der Dermis, die aus Kollagen und Elastin (\leftarrow) bestehen.

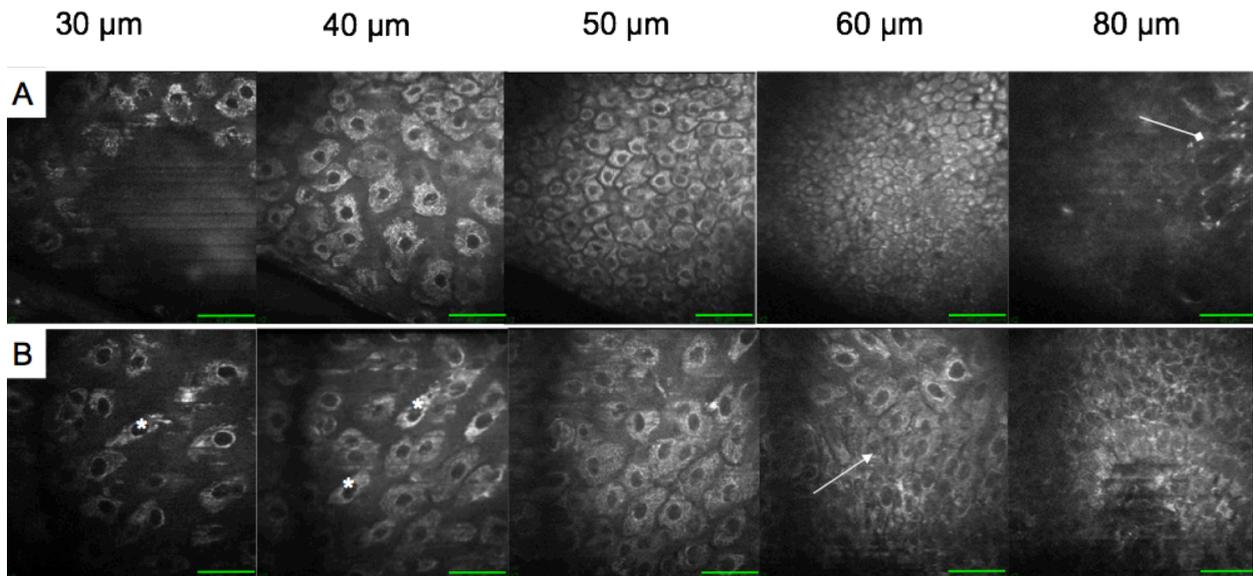


Abb. 13 MPT-Aufnahmen von (a) gesunder Haut und (b) des BCC
grüner Balken = 40 μm

Abb. 13.B zeigt die entsprechenden Bilder des Basalzellkarzinoms. Die regelmäßige Struktur ist aufgelöst. Einzelne Schichten der Epidermis sind nicht mehr voneinander abgrenzbar. Die Dicke der Haut ist stark verbreitert. Bei 80 μm befinden sich immer noch epidermale Hautzellen, wobei deren Zellkerne undeutlich und defekt erscheinen. Zudem fallen in allen Ebenen der Bildgebung elongierte Zellen (*) auf, deren Zytoplasma in eine Richtung verlängert und in die andere Richtung verschmälert ist. Im Vergleich mit normaler Haut erscheint der Zellkern vergrößert und die Zellabstände verbreitert. Teilweise ordnen sich die Zellen palisadenartig an (\leftarrow).

In Abb. 14 sind Boxplots des Zellkerndurchmessers von BCC und von gesunder Haut im Stratum granulosum, spinosum und basale dargestellt.

In gesunder Haut sind die Zellkerne des Stratum granulosum signifikant größer als die der beiden tiefer gelegenen Schichten. Die Zellkerne von Basalzellen sind am kleinsten.

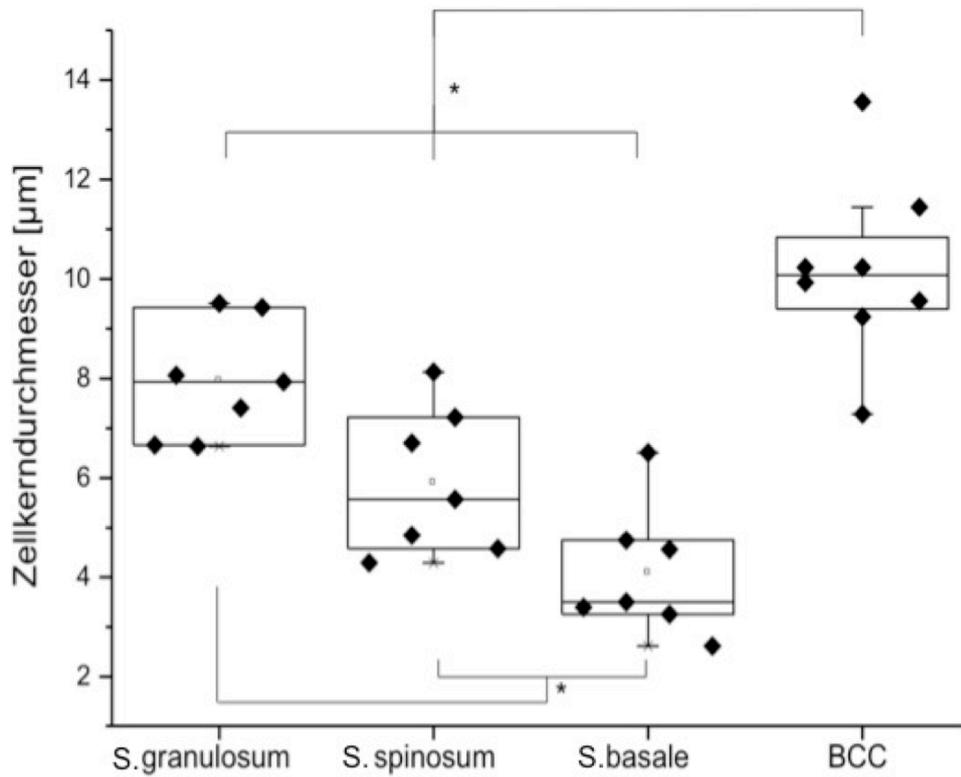


Abb.14
 Boxplots des Zellkerndurchmessers von gesunder Haut im Stratum granulosum, spinosum und basale, sowie des BCC
 * $p < 0,05$

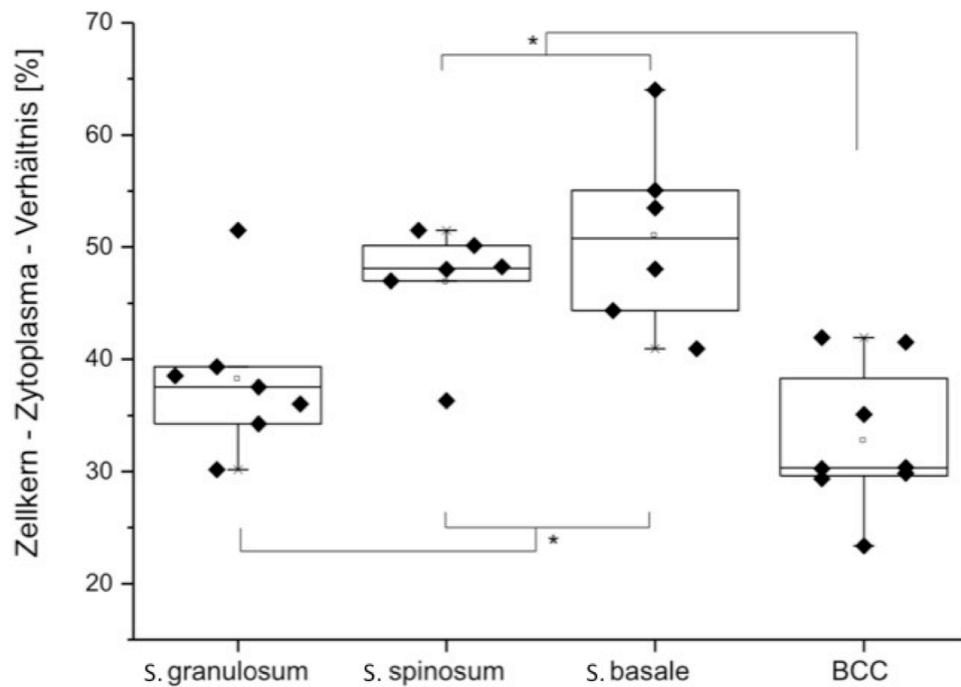


Abb. 15 Boxplots des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses des Stratum granulosum, spinosum und basale gesunder Haut, sowie des BCC.
 * $p < 0,05$

Abb. 15 zeigt die Daten des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses als Boxplots für gesunde Haut und BCC. Die Unterschiede zwischen den Hautschichten gesunder Haut sind signifikant. Das Verhältnis ist bei BCC-Zellen signifikant niedriger als bei Zellen des Stratum spinosum und basale. Das Verhältnis für BCC-Zellen wurde in Tiefen zwischen 20 und 220 μm bestimmt ($63 \pm 50 \mu\text{m}$).

Die Zelldichte für gesunde Haut und BCC ist als Boxplots in Abb. 16 dargestellt. In gesunder Haut nimmt die Zelldichte vom Stratum granulosum bis zum Stratum basale signifikant zu. Der Faktor der Zunahme beträgt zum Stratum spinosum 4. Zum Stratum basale nimmt die Dichte um den Faktor 10 zu.

Die Zelldichte von BCC ist etwas höher als die des Stratum granulosum. Die Dichte wurde in Tiefen zwischen 10 und 200 μm bestimmt, wohingegen die Dichte der gesunden Haut in den jeweiligen Schichten (Stratum granulosum: $21 \pm 7 \mu\text{m}$, Stratum spinosum: $39 \pm 6 \mu\text{m}$, Stratum basale: $56 \pm 6 \mu\text{m}$) bestimmt wurde.

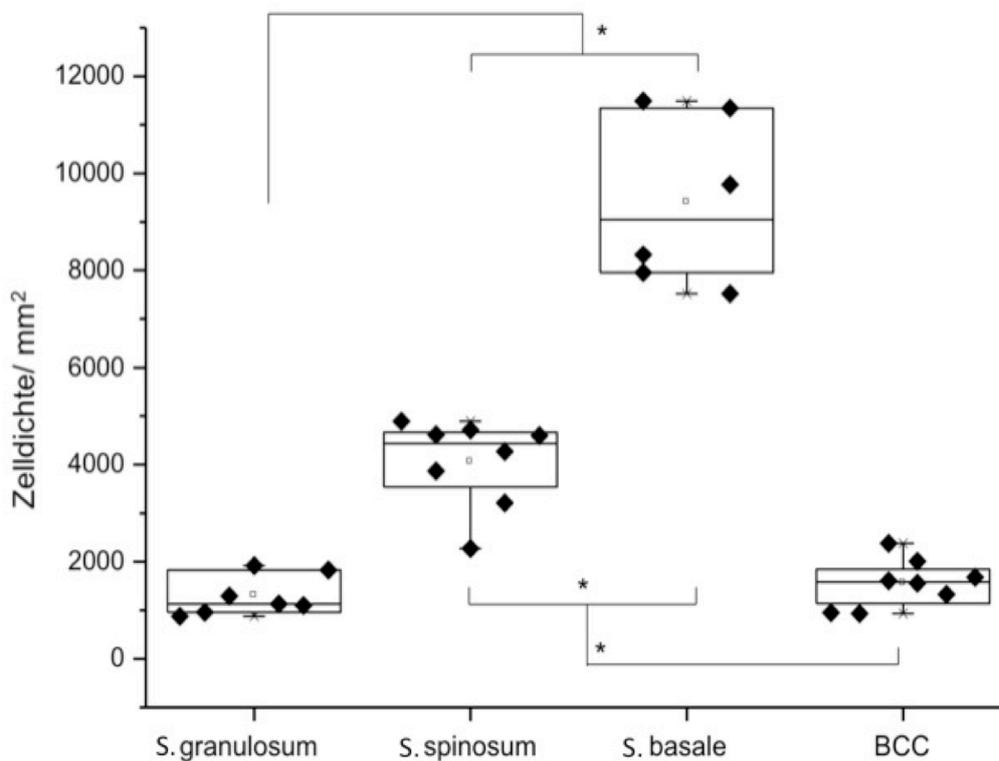


Abb. 16 Boxplots der Zelldichte für gesunde Haut in den drei Schichten Stratum granulosum, spinosum und basale und für BCC.

* $p < 0,05$

3.3 Aufnahmen der aktinischen Keratose

3.3.1 Histologie der aktinischen Keratose

Ein typisches histologisches Merkmal für die AK ist die Hyperkeratose. Des Weiteren kommt es zu Störungen im Schichtaufbau der basalen Anteile der Epidermis. Häufig treten auch Kernpleomorphien auf. Abb. 17 zeigt eine histologische Aufnahme der AK.

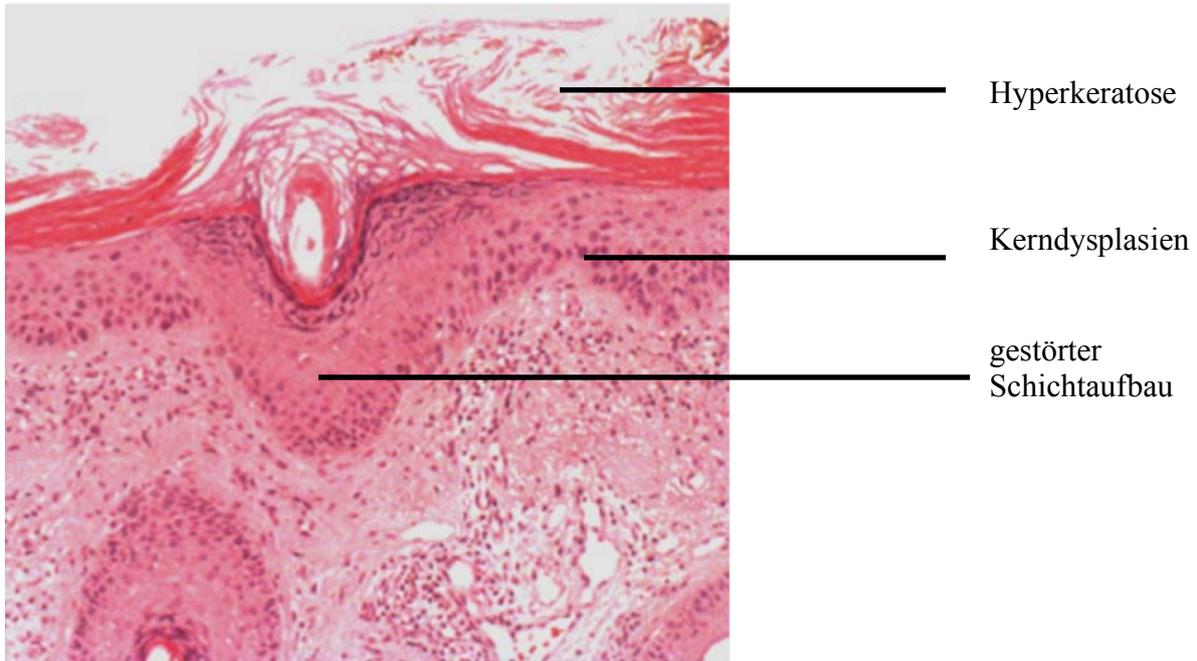


Abb. 17 Histologische Aufnahme der aktinischen Keratose

3.3.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie der aktinischen Keratose

In der Untersuchung der AK mit KLSM finden sich, wie in der Histologie auch, allgemeine Zellveränderungen wie Inhomogenität der Zellstrukturen und der Schichtenbildung. Die Dyskeratose zeigt sich als höher refraktilen Areal inmitten der epidermalen Schichten. Auch Veränderungen der einzelnen Zellen lassen sich mit der LSM darstellen, ebenso unterschiedliche Größen und Formen der Kerne und Zellränder. Außerdem sind die Abstände zwischen den Keratinozyten unterschiedlich groß. LSM-Aufnahmen der aktinischen Keratose sind in Abb.18 dargestellt. Dabei zeigen sich in den verschiedenen Tiefen ein Verlust der Honigwabenstruktur, sowie unterschiedlich große Zellen. Außerdem sind kleine, helle Strukturen erkennbar, die inflammatorischen Zellen entsprechen (roter Pfeil). Im Stratum corneum finden sich einzelne, vom Zellverband losgelöste Keratinozyten (gelber Pfeil). Außerdem zeigt sich eine Verbreiterung der Epidermis. Die Basalmembran ist noch intakt und nicht durchbrochen.

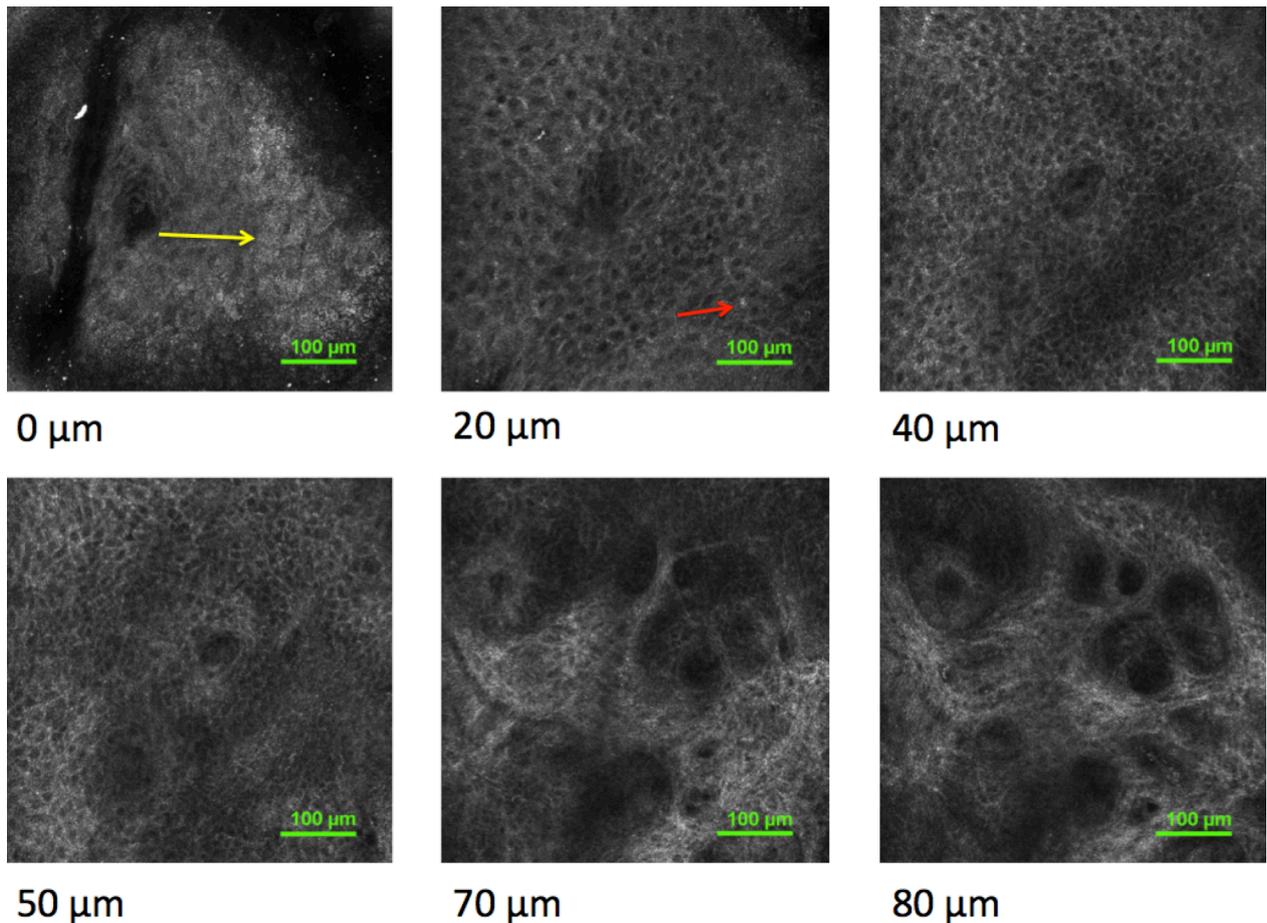


Abb. 18 KLSM-Aufnahmen der aktinischen Keratose

3.3.3 Multiphotontomographie der aktinischen Keratose

Bei der AK findet sich im Stratum corneum eine Akantholyse in Form von einzelnen, losgelösten Korneozyten. Daneben zeigen sich helle, refraktile Zellen mit zentralen dunklen Arealen, welche Zellkerne darstellen. Dies entspricht einer Parakeratose. Außerdem finden sich Entzündungszellen im Stratum corneum. Im Stratum granulosum findet sich eine veränderte Zellarchitektur. Die Zellkerne variieren in Größe und Form, sodass die Keratinozyten atypische Veränderungen aufweisen. Die Zellabstände sind ebenfalls erweitert. Im Stratum spinosum ist die Zellarchitektur aufgelöst, die „Kopfsteinpflasterstruktur“ [74] ist nicht mehr sichtbar. Die Zellabstände sind erweitert, die Zellkerne variieren stark in Form und Größe. Entzündungszellen sind als kleine, runde und helle Zellen ebenfalls vorhanden. In Abb. 19 sind MPT-Bilder von gesunder Haut und AK dargestellt. Die Bilder entsprechen horizontalen Schnittbildern der Haut. Die Keratinozyten sind klar erkennbar und der dunkle Zellkern unterscheidet sich wesentlich vom hellen Zytoplasma. Dieses helle Signal kommt vor allem durch die endogenen Fluorophore NADH und NADPH zustande, die sich in den Mitochondrien der Zelle befinden.

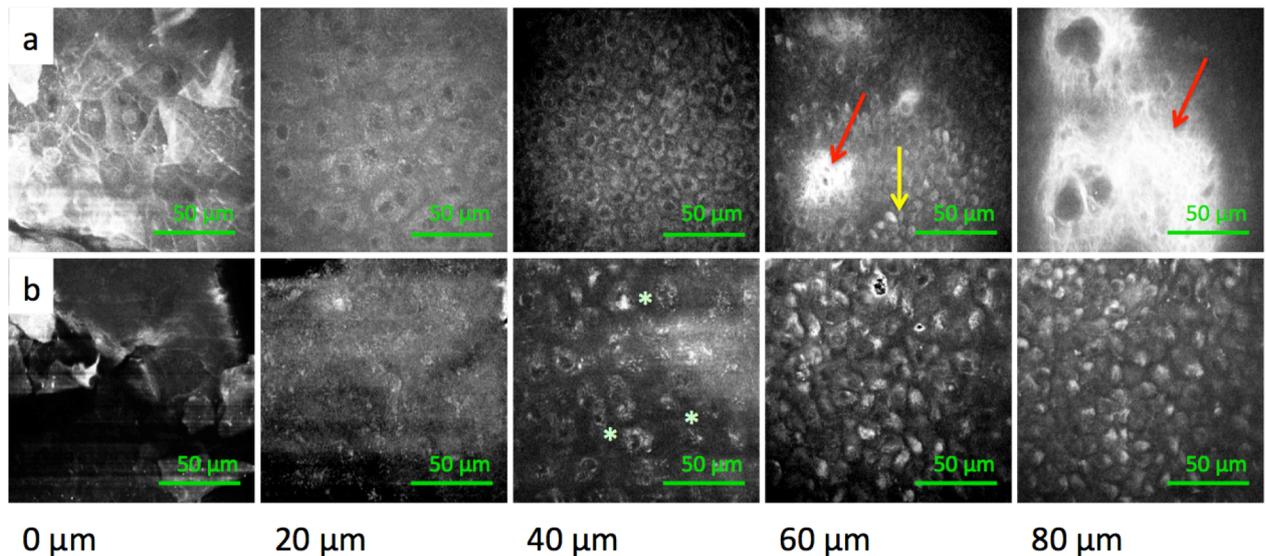


Abb. 19 MPT in verschiedenen Tiefen von (a) gesunder Haut und (b) AK

Bei der gesunden Haut lassen sich die unterschiedlichen Schichten der Epidermis klar abgrenzen. Die Zellen sind regelmäßig angeordnet. Bei 0 μm ist das Stratum corneum abgebildet, gefolgt vom Stratum granulosum bei 20 μm , dem Stratum spinosum bei 40 μm und dem Stratum basale bei 60 μm . Im Stratum basale erkennt man stark refraktile Zellen, die Melanozyten (gelbe Pfeile). In 80 μm Tiefe ist die oberflächliche Dermis mit elastinen Fasern (roter Pfeil) abgebildet.

In der AK zeigen die Aufnahmen eine verbreiterte Epidermis. Auch noch bei 80 μm sind Keratinozyten erkennbar, wohingegen sich dort bei gesunder Haut schon Strukturen der Dermis, also kollagene und elastine Fasern finden. Die Verbreiterung der Epidermis ist in der Hyperkeratose des Stratum corneum begründet. Neben der Hyperkeratose findet sich auch eine Parakeratose im Stratum corneum. Die Zellkernreste erscheinen verkleinert und unregelmäßig geformt. Außerdem erscheinen die Interzellularräume bei der AK vergrößert (*).

Die ersten Zellen des Stratum granulosum erscheinen in einer Tiefe von $32 \mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$. Diese haben heterogene Form und Größe. Außerdem sind die interzellulären Abstände verbreitert. Die Anordnung der Zellen erfolgt nicht mehr im geordneten Kopfsteinpflastermuster, sondern unregelmäßig. Im Stratum spinosum erscheinen die Zellkerne deutlich vergrößert und die Zellabstände sind erweitert (grüne Pfeile). Das Stratum basale findet sich erst bei 80 μm und ist noch intakt.

Die Zellen wurden außerdem nach den Kriterien Zellkerndurchmesser, Kern-Zytoplasma-Verhältnis und Zelldichte untersucht. Die Zellen der AK wurden in einer Tiefe von 20 bis 110 μm gemessen, wohingegen die gesunden Zellen des Stratum granulosum

bei $25 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$, des Stratum spinosum bei $37 \mu\text{m} \pm 12 \mu\text{m}$ und die Zellen des Stratum basale bei $47 \mu\text{m} \pm 12 \mu\text{m}$ gemessen wurden.

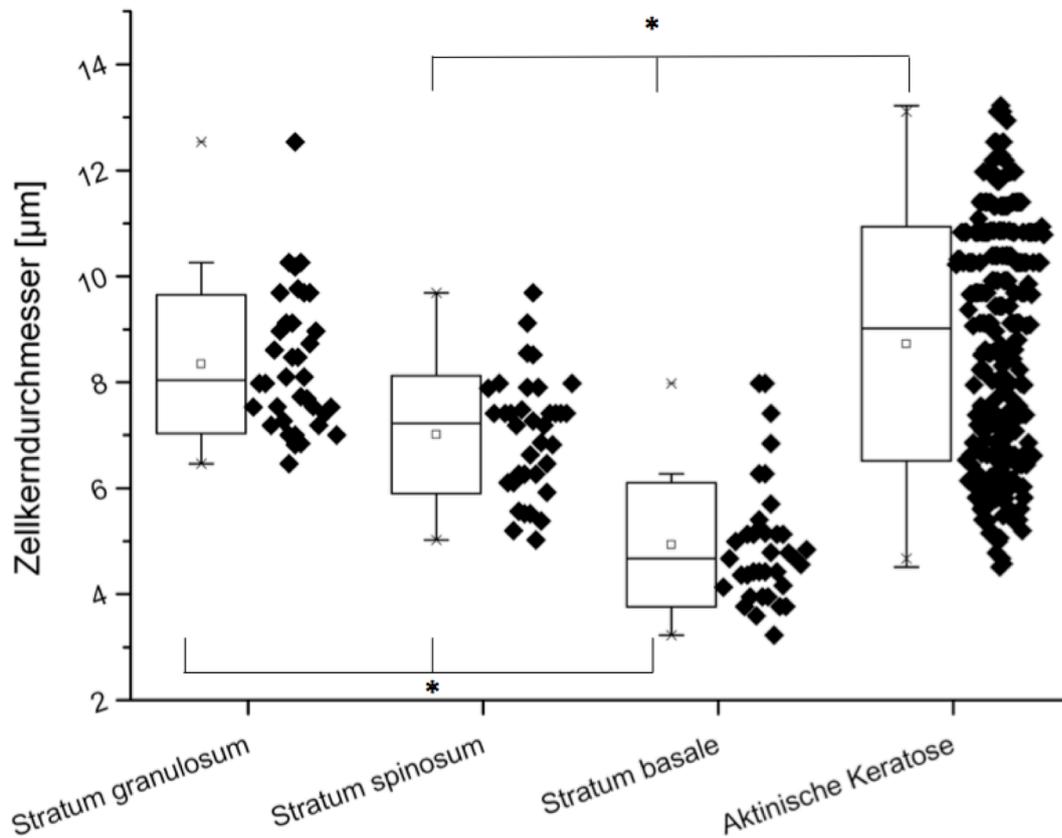


Abb. 20 Boxplots des Zellkerndurchmessers von AK und gesunder Haut in Stratum granulosum, spinosum und basale.
* $p < 0,05$

Abb. 20 zeigt Boxplots des Zellkerndurchmessers. Bei gesunder Haut nimmt der Durchmesser mit Zunahme der Tiefe der einzelnen Hautschichten ab. Stratum granulosum und basale unterscheiden sich um den Faktor 1,69. Bei der AK findet sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den höher und tiefer gelegenen Schichten.

Die Zellkerne der AK mit einem durchschnittlichem Durchmesser von $8,73 \mu\text{m} \pm 2,21 \mu\text{m}$ sind signifikant größer als die Zellkerne aus dem Stratum spinosum und Stratum basale mit einem jeweiligen Zellkerndurchmesser von $7,01 \mu\text{m} \pm 1,14 \mu\text{m}$ bzw. $4,93 \mu\text{m} \pm 1,17 \mu\text{m}$. Verglichen mit den Zellkernen des Stratum granulosum mit Werten von $8,35 \mu\text{m} \pm 1,31 \mu\text{m}$ konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,2$).

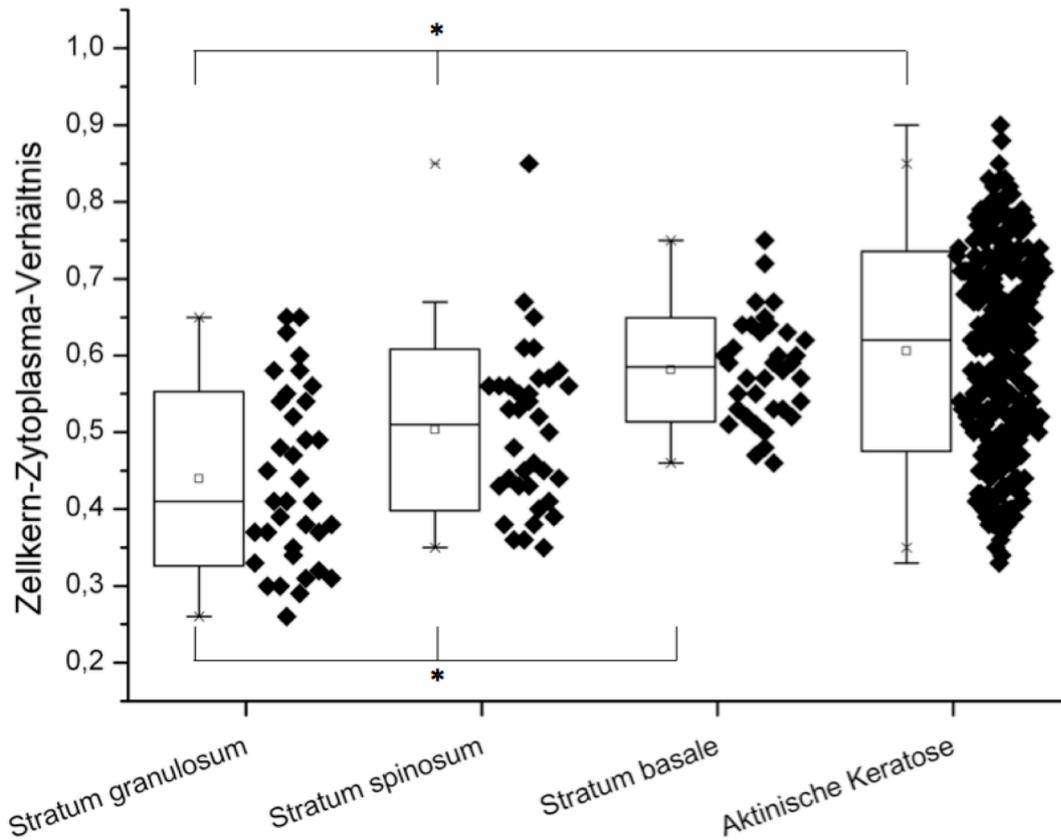


Abb. 21 Boxplots des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses von AK und gesunder Haut in Stratum granulosum, spinosum und basale.
 * $p < 0,05$

In Abb. 21 werden Boxplots des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses von gesunder Haut und AK dargestellt. In gesunder Haut nimmt das Verhältnis mit zunehmender Tiefe um den Faktor 1,32 zu. Diese Zunahme ist zwischen den einzelnen Schichten signifikant. Bei AK ist das Verhältnis mit $0,61 \pm 0,13$ signifikant höher als im Stratum granulosum und Stratum spinosum mit jeweiligen Werten von $0,44 \pm 0,11$ und $0,5 \pm 0,11$. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis von AK-Zellen ist ebenfalls höher als das der Zellen im Stratum basale mit $0,58 \pm 0,06$, jedoch ist dieser Unterschied noch nicht als signifikant zu werten.

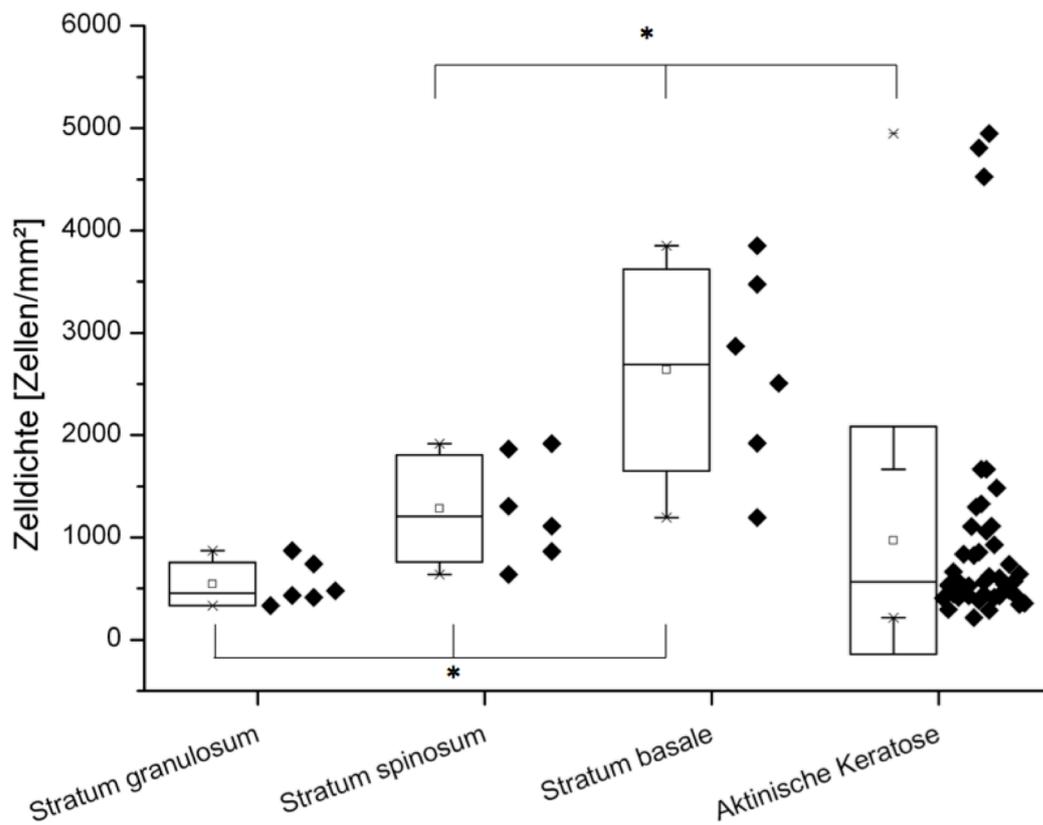


Abb. 22 Boxplots der Zelldichte von AK und gesunder Haut im Stratum granulosum, spinosum und basale.

* $p < 0,05$

Die Zelldichte von gesunder Haut im Stratum granulosum, spinosum und basale sowie von AK ist in Abb. 22 dargestellt. Die Dichte nimmt mit zunehmender Tiefe zu. Zwischen Stratum granulosum und Stratum basale liegt der Faktor bei 4,84. Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Schichten in gesunder Haut sind signifikant. Im Stratum granulosum liegt der Wert bei 545 ± 211 Zellen/mm², im Stratum spinosum beträgt die Dichte 1283 ± 522 Zellen/mm² und im Stratum basale 2637 ± 985 Zellen/mm². Für AK beträgt die mittlere Dichte 971 ± 1112 Zellen/mm². Diese Werte sind signifikant niedriger als im Stratum basale und spinosum ($p < 0,05$).

3.4 Aufnahmen des spinozellulären Karzinoms

3.4.1 Histologie des spinozellulären Karzinoms

Abb. 23 zeigt eine histologische Aufnahme des spinozellulären Karzinoms. Charakteristisch ist das invasive Wachstum des Tumors mit squamös differenzierten atypischen Keratinozyten. Innerhalb des Tumors finden sich oft Hornperlen oder Verhornungszentren. Außerdem gibt es atypische Mitosen. Die Zellkerne sind pleiomorph und hyperchrom.

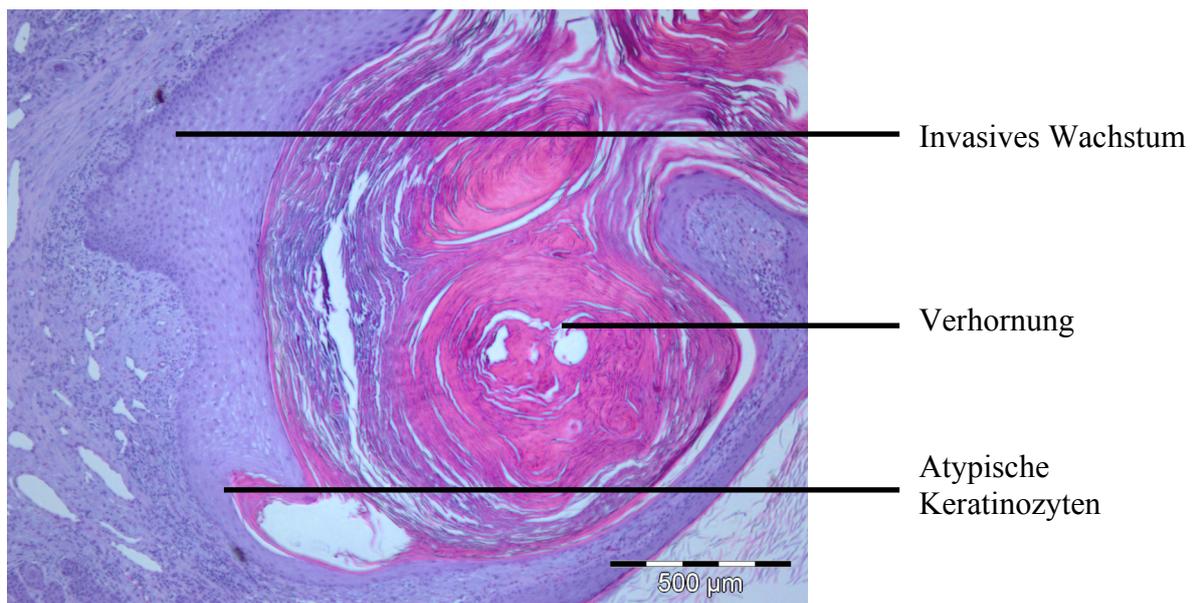


Abb. 23 Histologische Aufnahme des spinozellulären Karzinoms

3.4.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie des spinozellulären Karzinoms

Bei der Untersuchung des SCC mittels KLSM imponieren meistens ähnliche Charakteristika wie bei der AK, jedoch sind sie deutlicher zu erkennen. Die Zellarchitektur ist in ihrem Aufbau gestört, die einzelnen Zellschichten der gesunden Haut sind nicht mehr voneinander abgrenzbar. An der Oberfläche finden sich Spalten und Risse und im Stratum corneum kommt es zur Parakeratose. In den tieferen horizontalen Schichten finden sich lose Zellverbände von unregelmäßig geformten, pleomorphen Zellen. Teilweise können auch infiltrierende Entzündungszellen gezeigt werden.

Die Bilder von 20 µm bis 80 µm sind in Abb. 24 dargestellt. Es finden sich parakeratotische Veränderungen, wobei die Zellkerne verschiedene Formen annehmen. Daneben finden sich in der gesamten Epidermis atypische Veränderungen der Keratinozyten, sodass die Zellarchitektur zerstört und das Honigwabenmuster in allen Schichten nicht mehr erkennbar ist (vgl. Abb. 24,

20-40 μm). Aufgrund des invasiven Wachstums ist die Basallamina durchbrochen, sodass sich neben den kollagenen Fasern auch atypische Keratinozyten in der Dermis befinden (vgl. Abb. 24, 80 μm).

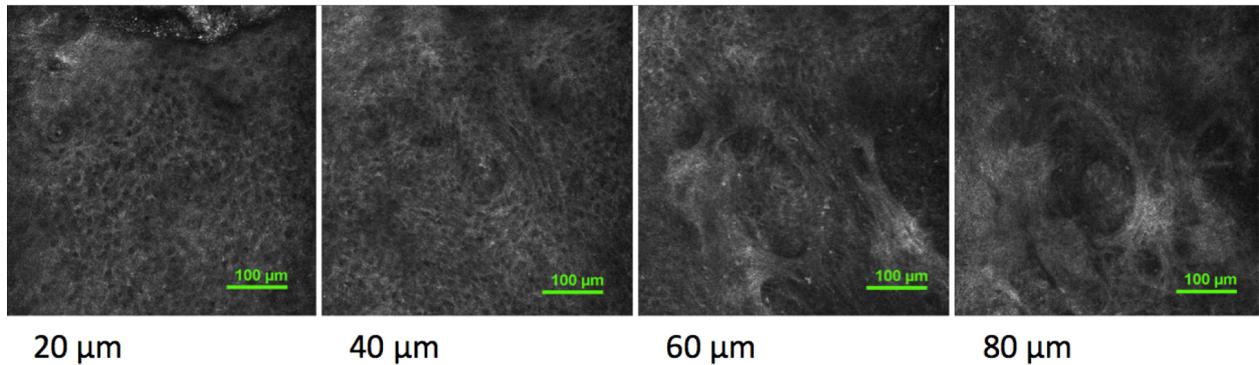


Abb. 24 KLSM-Aufnahmen des SCC

3.4.3 Multiphotonentomographie des spinozellulären Karzinoms

Beim SCC ist die Hautstruktur oft schon sehr stark verändert. Das „Kopfsteinpflastermuster“ ist gänzlich aufgelöst. Stattdessen finden sich vergrößerte Zellen mit weiten interzellulären Abständen. Außerdem sind die Zellkerne vergrößert und unregelmäßig. Sie sind von einem hellen Zytoplasmasaum umrandet. In manchen Schichttiefen sind zudem keine Zellen zu finden. Stattdessen sind nur Verschattungen, die durch Verhornungsmaterial entstehen, erkennbar. Zudem war es nicht möglich, die dermoepitheliale Junctionszone darzustellen, da die Tumordicke an den untersuchten Stellen größer als die Eindringtiefe des Laserstrahls war.

Abb. 25 zeigt MPT-Aufnahmen des SCC. In einer Tiefe von 20 μm des SCC sind hyperkeratotische Veränderungen erkennbar. Bei 40 μm zeigen sich erste Keratinozyten. Diese sind nicht als Zellverband angeordnet, sondern von diesem losgelöst. Die Abstände zwischen den einzelnen Zellen sind ebenfalls stark erweitert. Außerdem erscheinen die Zellkerne stark vergrößert und das Zytoplasma stellt sich sehr hell dar. Bei 60 μm ist eine Verschattung erkennbar, welche histologisch einer Hornperle entspricht. In einer Tiefe von 80 μm stellen sich wieder atypisch veränderte Keratinozyten dar, die stark in Größe und Form variieren.

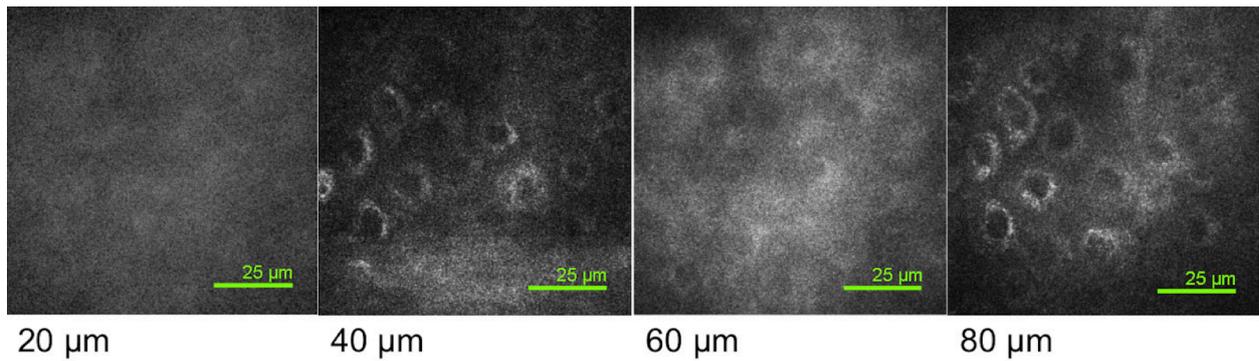


Abb. 25 MPT-Aufnahmen des SCC in 20, 40, 60 und 80 μm Tiefe

Zur objektiven Beurteilung der Untersuchung des SCC mittels MPT wurden auch hier die morphologischen Kriterien Kern-Zytoplasma-Verhältnis, Zellkerndurchmesser und Zelldichte in den einzelnen Schichten untersucht. Dabei wurden die Daten des Tumors mit den Daten der gesunden Haut des jeweiligen Patienten verglichen. Die Zellen des SCC wurden in einer Tiefe von 40 bis 220 μm gemessen, wohingegen die Zellen des Stratum granulosum bei $26 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$, des Stratum spinosum bei $38 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$ und die Zellen des Stratum basale bei $50 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$ gemessen wurden.

Abb. 26 zeigt Boxplots des Zellkerndurchmessers. Bei gesunder Haut nimmt der Durchmesser mit Zunahme der Tiefe der einzelnen Hautschichten ab. Beim SCC findet sich kein Unterschied zwischen den höher und tiefer gelegenen Schichten.

Die Zellkerne des SCC mit einem durchschnittlichem Durchmesser von $9,81 \mu\text{m} \pm 1,9 \mu\text{m}$ sind signifikant größer als die Zellkerne aus dem Stratum spinosum und Stratum basale. Diese besitzen einen jeweiligen Zellkerndurchmesser von $6,5 \mu\text{m} \pm 1,67 \mu\text{m}$ bzw. $5,2 \mu\text{m} \pm 0,72 \mu\text{m}$. Auch im Vergleich mit den Zellkernen des Stratum granulosum mit Werten von $7,27 \mu\text{m} \pm 1,37 \mu\text{m}$ konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

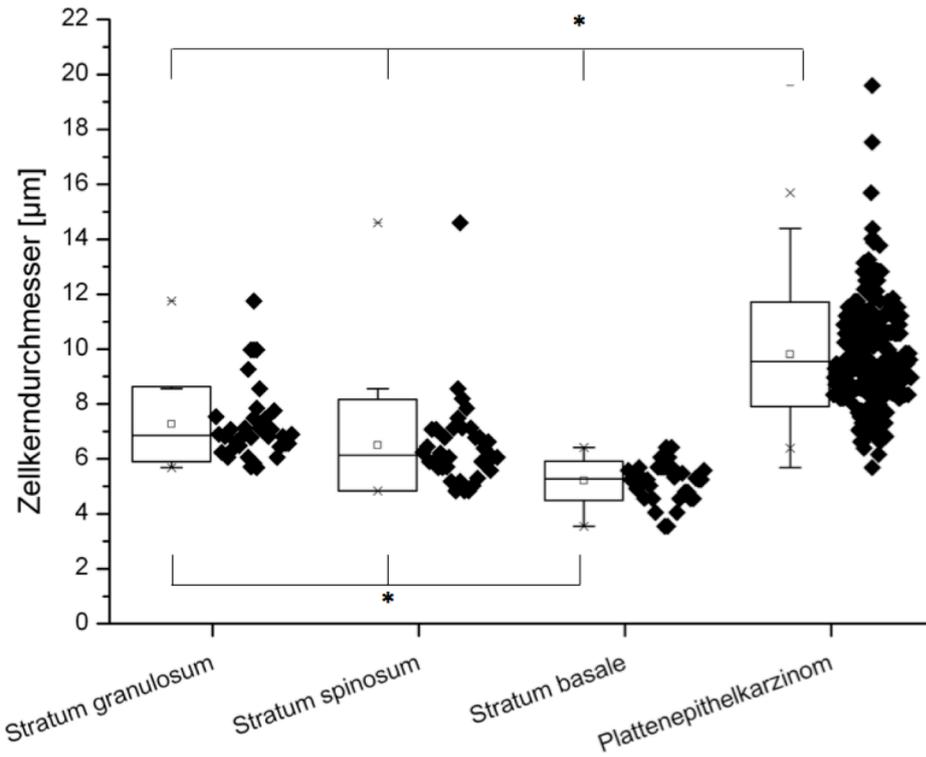


Abb. 26 Boxplots des Zellkerndurchmessers von gesunder Haut und SCC
* $p < 0,05$

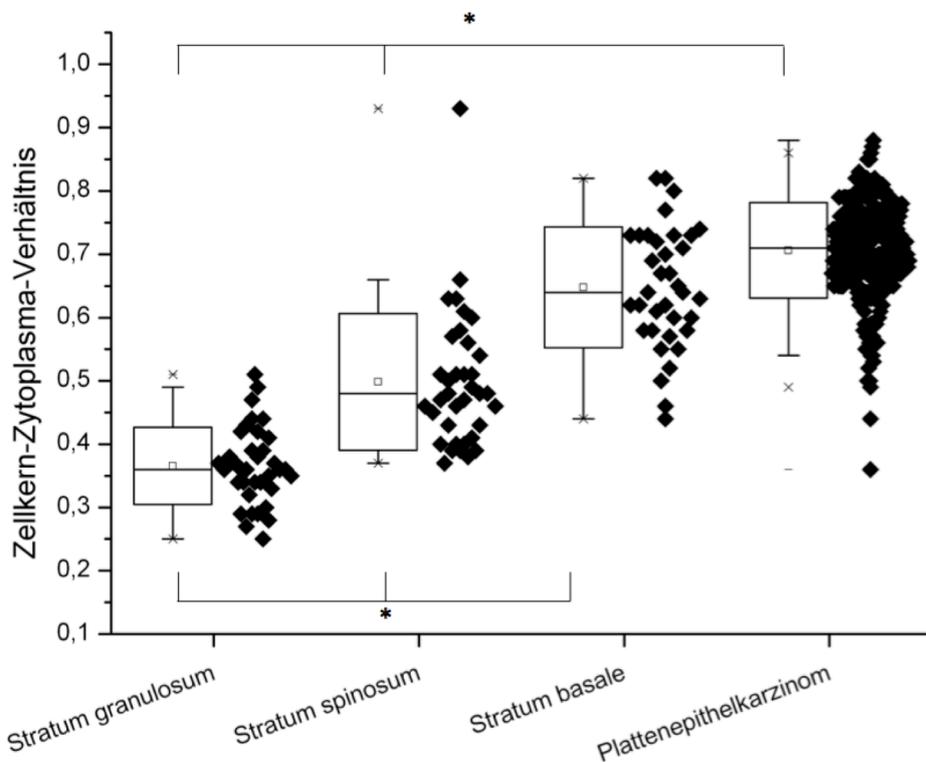


Abb. 27 Boxplots des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses von gesunder Haut und SCC
* $p < 0,05$

In Abb. 27 werden Boxplots des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses von gesunder Haut und vom SCC dargestellt. In gesunder Haut nimmt das Verhältnis mit zunehmender Tiefe zu. Diese Zunahme ist zwischen den einzelnen Schichten signifikant.

Beim SCC ist das Verhältnis mit durchschnittlich $0,71 \pm 0,08$ signifikant höher als im Stratum granulosum und Stratum spinosum mit jeweiligen Werten von $0,37 \pm 0,06$ und $0,5 \pm 0,11$. Das Verhältnis zwischen Kern und Zytoplasma von SCC-Zellen ist ebenfalls höher als das der Zellen im Stratum basale mit $0,65 \pm 0,1$, jedoch ist dieser Unterschied bei $p = 0,155$ nicht als signifikant zu werten.

Die Zelldichte von gesunder Haut im Stratum granulosum, spinosum und basale sowie des SCC ist in Abb. 28 dargestellt. Für das SCC beträgt die mittlere Dichte 656 ± 505 Zellen/mm². Diese ist signifikant niedriger als im Stratum basale und Stratum spinosum. Im Vergleich mit der Dichte des Stratum granulosum konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,753$).

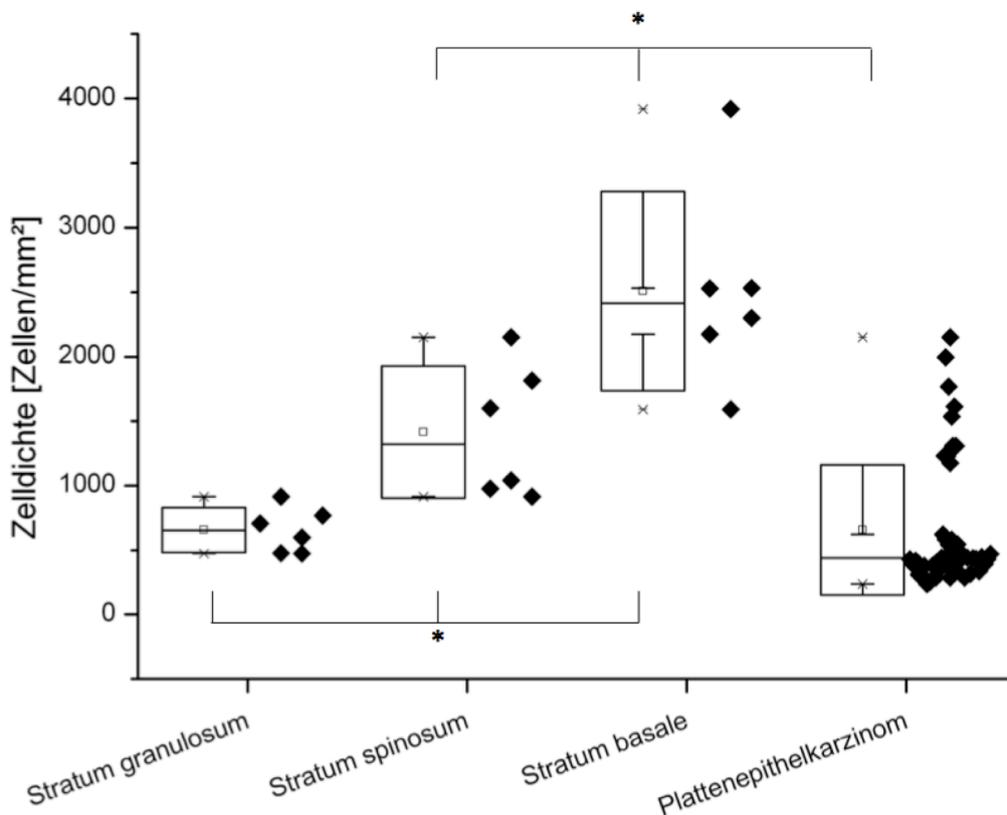


Abb. 28 Boxplots der Zelldichte von gesunder Haut und SCC
* $p < 0,05$

3.5 Vergleich zwischen aktinischer Keratose und spinözellulärem Karzinom in der Multiphotonentomographie

Bildmorphologisch ließen sich einige Unterschiede zwischen AK und SCC feststellen. So war es bei der AK in einigen Fällen möglich, die noch intakte dermoepitheliale Junktionszone darzustellen. Im Gegensatz dazu konnte diese, aufgrund der hohen Tumordicke, beim SCC nicht dargestellt werden.

Bei beiden Tumoren war die sogenannte „Kopfsteinpflasterstruktur“ aufgelöst, jedoch waren die Zellabstände beim SCC weiter als bei der AK. Die beim SCC im Sinne von intraepidermalen Verhornungen auftretenden Verschattungen konnten bei den Untersuchungen der AK nicht nachgewiesen werden.

Es ließ sich zudem feststellen, dass die Hyperkeratose beim SCC in stärkerer Ausprägung auftrat als bei der AK. Bei letzterer traten die ersten Zellen in einer Tiefe von $31,6 \mu\text{m} \pm 9,8 \mu\text{m}$ auf, beim SCC hingegen erste in einer Tiefe von $65 \mu\text{m} \pm 32,1 \mu\text{m}$.

Auch bezüglich der objektiv gemessenen Parameter Zellkerndurchmesser, Kern-Zytoplasma-Verhältnis und Zelldichte ließen sich Unterschiede zwischen AK und SCC zeigen. Die Daten werden in Abb. 29-31 dargestellt.

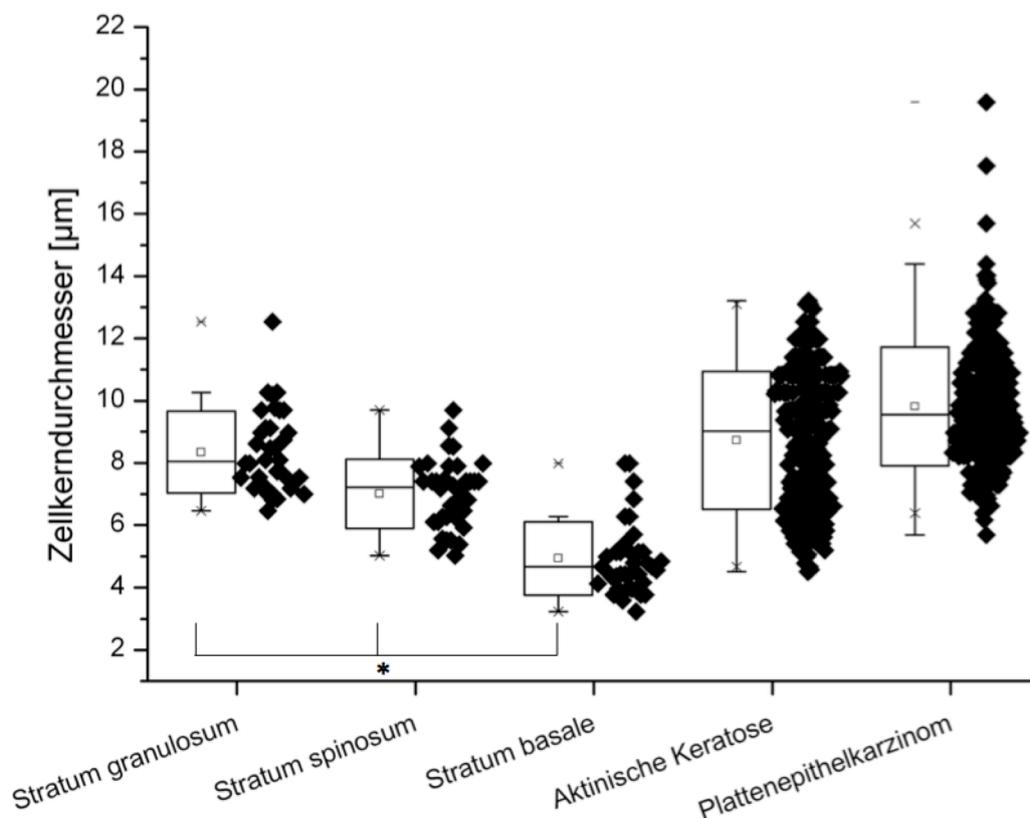


Abb. 29 Boxplots des Zellkerndurchmessers von gesunder Haut, AK und SCC, * $p < 0,05$

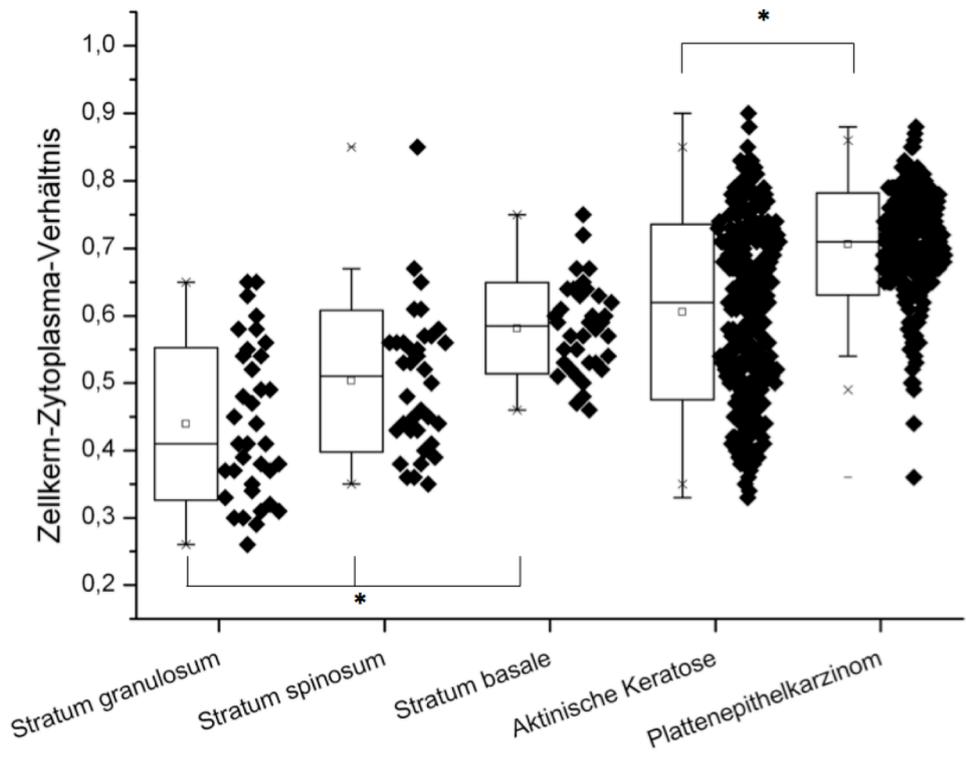


Abb. 30 Boxplots des Zellkern-Zytoplasma-Verhältnisses von gesunder Haut, AK und SCC
 * $p < 0,05$

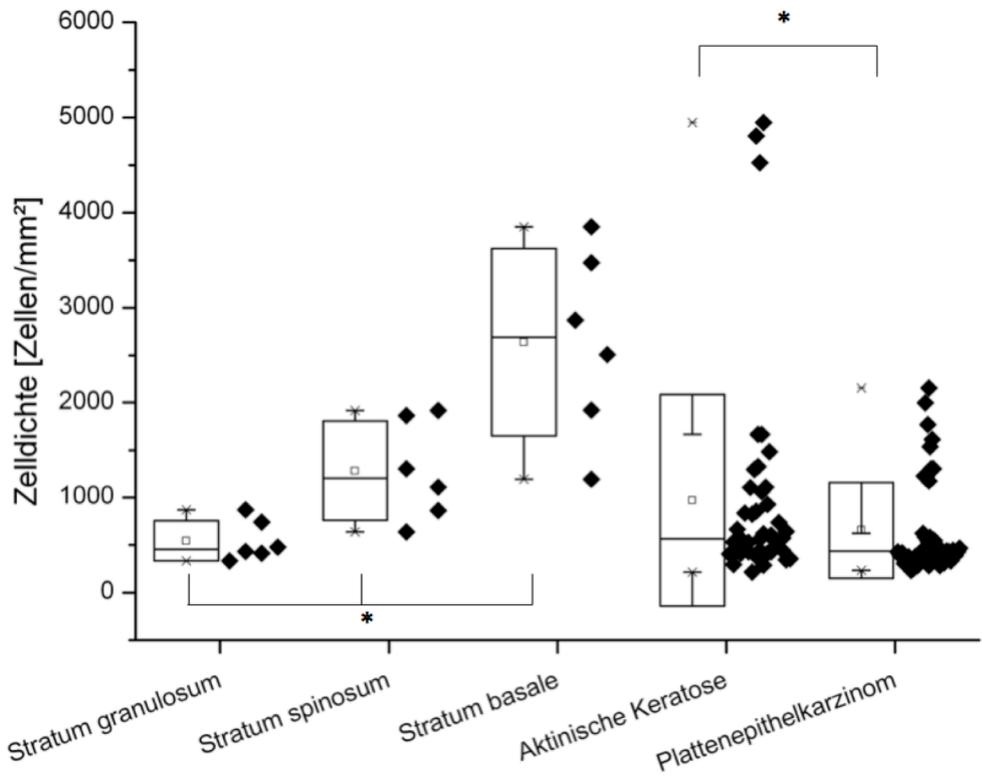


Abb. 31 Boxplots der Zelldichte von gesunder Haut, AK und SCC
 * $p < 0,05$

Die Zellkerne der AK sind mit einem durchschnittlichem Durchmesser von $8,73 \mu\text{m} \pm 2,21 \mu\text{m}$ kleiner als die des SCC mit $9,81 \mu\text{m} \pm 1,9 \mu\text{m}$. Der Unterschied ist mit $p=0,688$ als nicht signifikant zu werten.

Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis der Tumorzellen der AK mit $0,61 \pm 0,13$ ist signifikant kleiner als das des SCC mit $0,71 \pm 0,08$.

Ebenso signifikant waren die Unterschiede in der Dichte der AK und des SCC mit jeweils $971 \pm 1113 \text{ Zellen/mm}^2$ und $655 \pm 505 \text{ Zellen/mm}^2$.

3.6 Aufnahmen des malignen Melanoms

3.6.1 Histologie des malignen Melanoms

Histologisch finden sich beim malignen Melanom oft in Nestern gelegene atypische Melanozyten mit pleomorphen Zellkernen. Daneben treten auch Melanozyten in der gesamten Epidermis verteilt auf, statt wie bei gesunder Haut nur im Stratum basale. Die Melanozyten besitzen dabei einen ungewöhnlich großen Zytoplasma-Anteil. In Abb. 32 ist eine histologische Aufnahme des malignen Melanoms dargestellt.

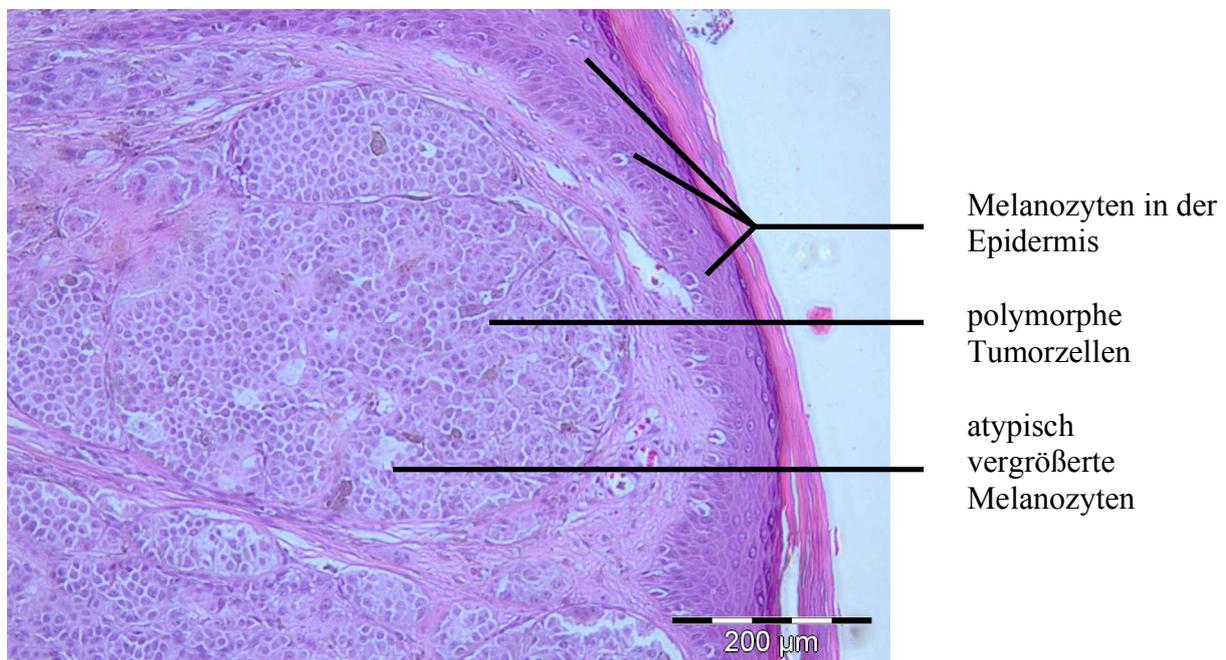


Abb. 32 Histologische Aufnahme eines malignen Melanoms

3.6.2 Multiphotonentomographie des malignen Melanoms

Im Stratum corneum finden sich irreguläre Korneozyten mit teilweise hyperrefraktilen Anteilen. Zudem sind auch parakeratotische Veränderungen erkennbar. Die Zellen des MM im Stratum basale bis granulosum weisen oftmals hyperrefraktilen Granula in ihrem Zytoplasma auf, was durch einen erhöhten Melaningehalt, beziehungsweise durch erhöhte Stoffwechselaktivität erklärt werden kann. Die Form der Zellen ist oval und ihr Zellkern erscheint vergrößert im Vergleich zu gesunden Keratinozyten. Zusätzlich finden sich dendritische Zellen mit langen Zytoplasma-Ausläufern.

Darüber hinaus weisen die Zellen eine erhöhte Mitoserate auf.

Ein Patient mit nodulärem Melanom wurde ebenfalls mit MPT untersucht. Die Bilder der Messung sind in Abb. 33 – 37 dargestellt.

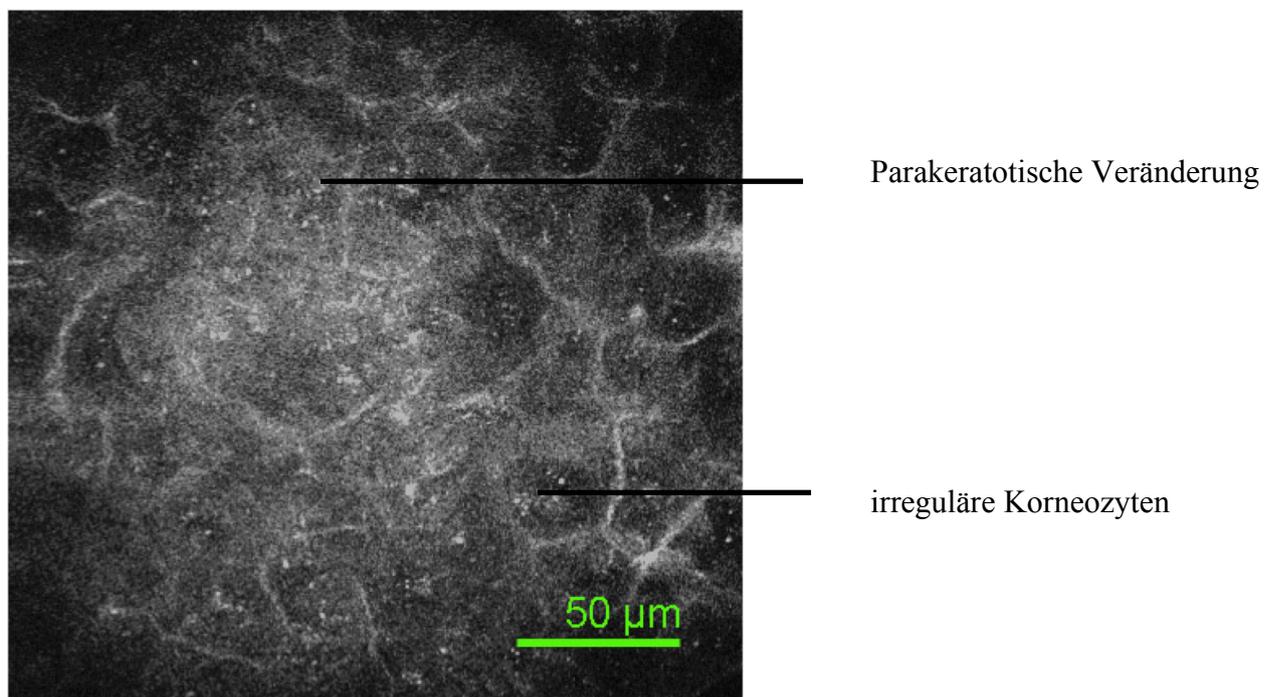
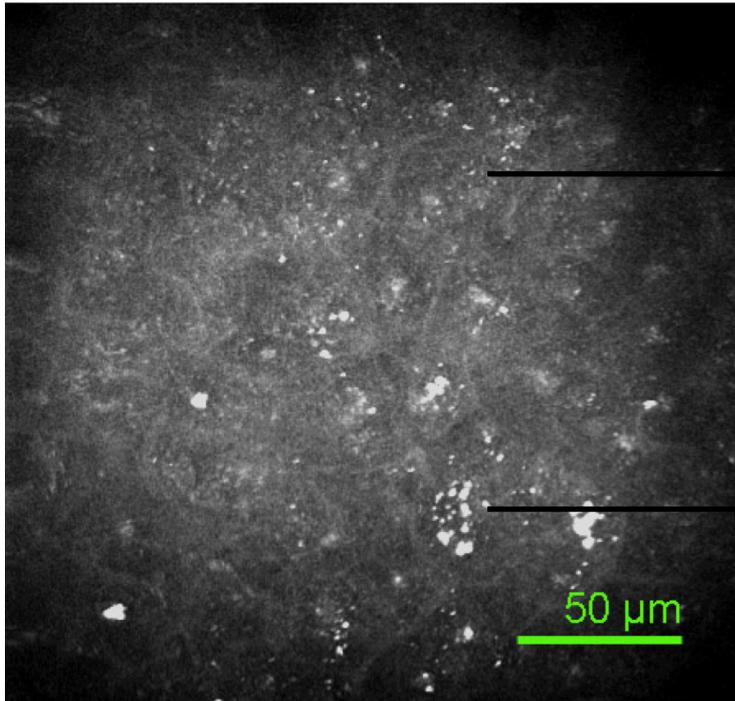


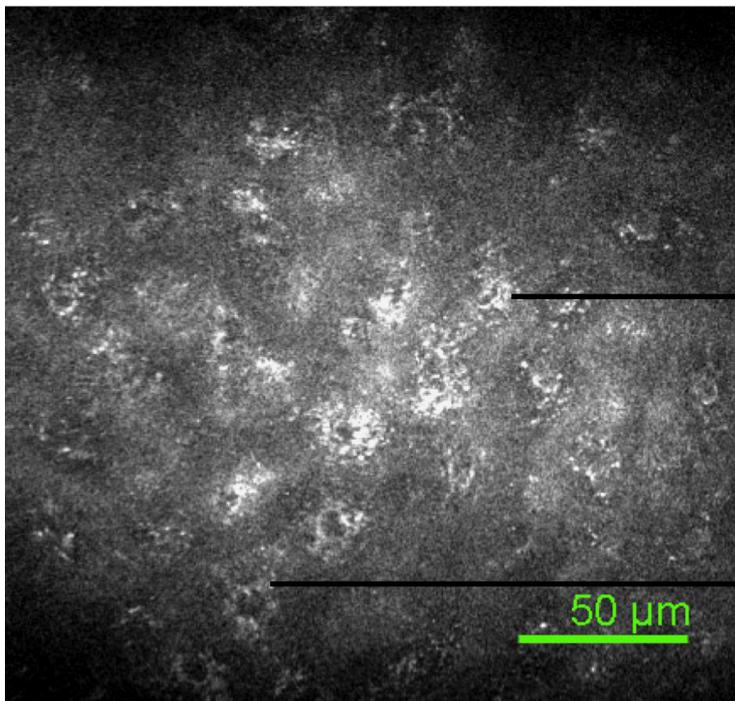
Abb. 33 Malignes Melanom in 10 μm Tiefe



Hyperrefraktile Anteile

Zytoplasma mit hyperrefraktiler Granula

Abb. 34 Malignes Melanom in 30 μm Tiefe



Hyperrefraktile Granula

Mitose

Abb. 35 Malignes Melanom in 60 μm Tiefe

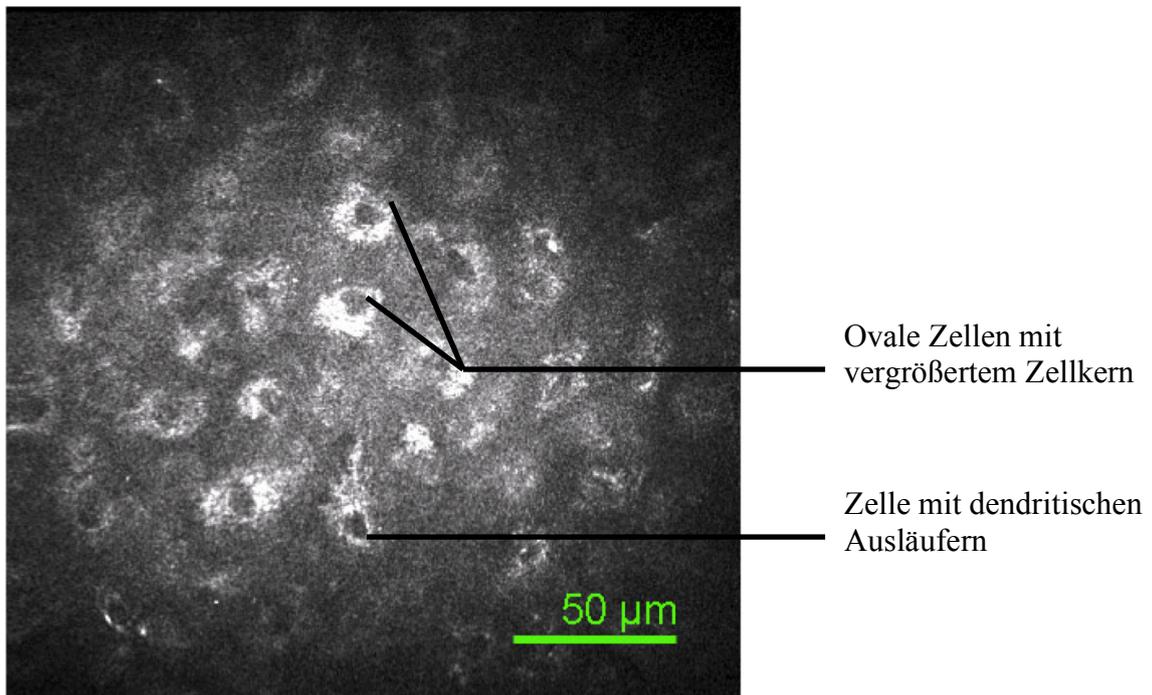


Abb. 36 Malignes Melanom in 80 μm Tiefe

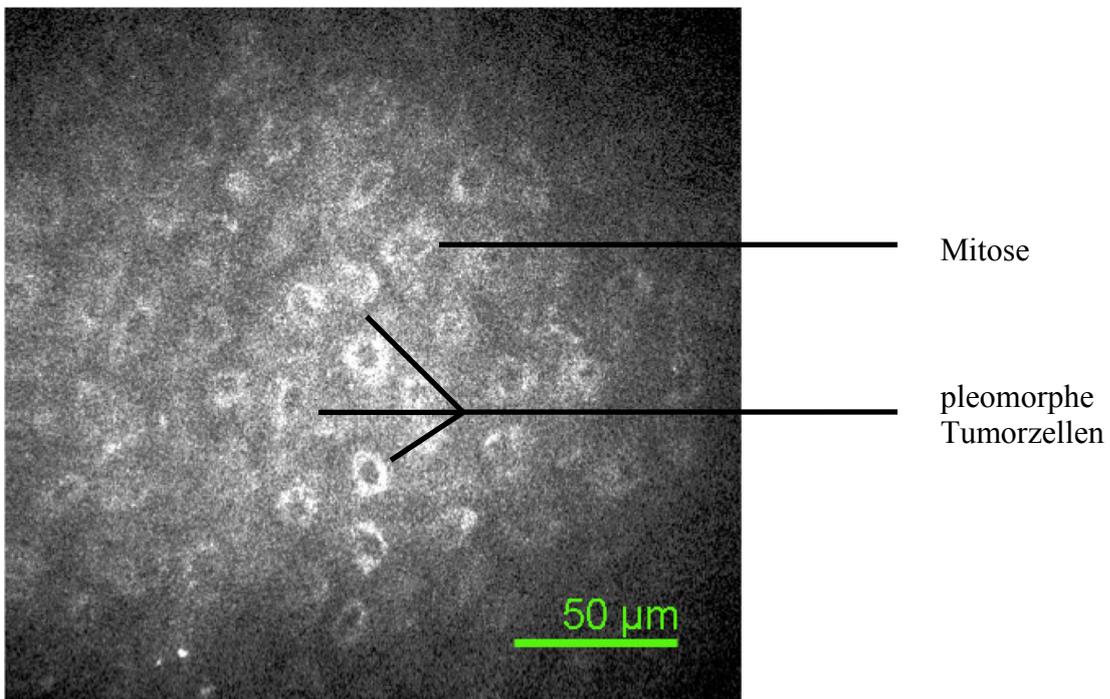


Abb. 37 Malignes Melanom in 110 μm Tiefe

3.7 Kohärente Anti-Stokes-Raman Streuung

3.7.1 Kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung gesunder Haut

Abb. 38 zeigt eine MPT-Aufnahme gesunder Haut im Autofluoreszenzmodus und im gemischten Autofluoreszenz-/CARS-Modus.

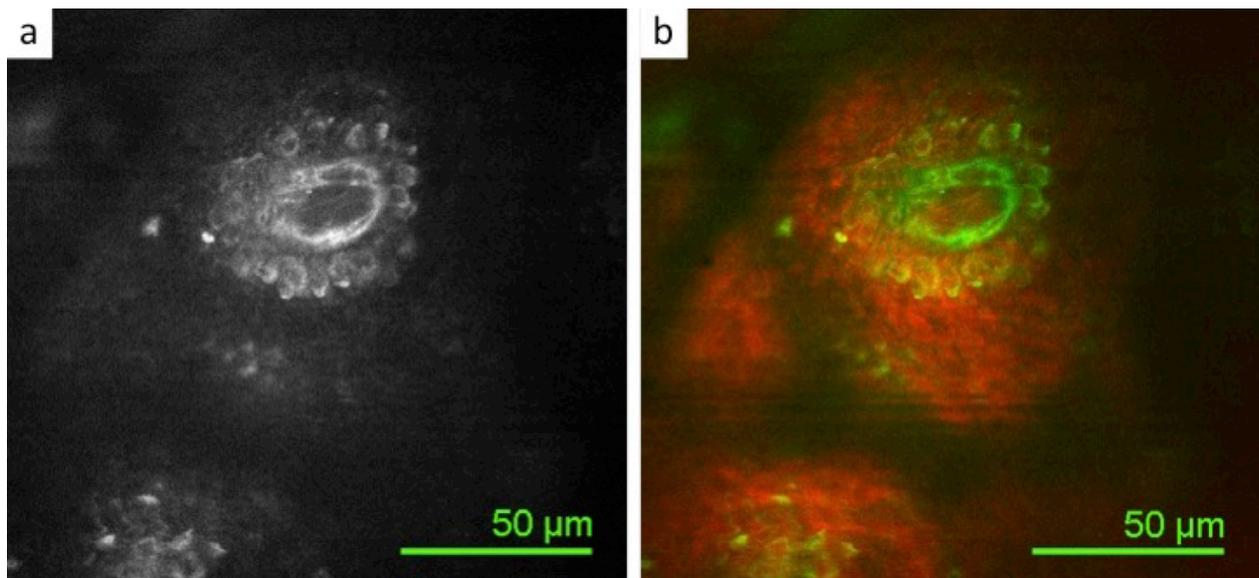


Abb. 38

- a) Autofluoreszenz in der dermoepidermalen Junktionszone gesunder Haut
- b) CARS (rot) und Autofluoreszenz (grün) derselben Stelle

Die in Abb. 38a dargestellte Aufnahme in 50 µm Tiefe zeigt eine dermale Papille in der dermoepithelialen Junktionszone, welche von refraktilen Zellen umgeben ist. Innerhalb der Papille und um die refraktilen Zellen herum ist nur ein schwaches Signal der Autofluoreszenz erkennbar. Abb. 38b stellt dieselbe Stelle in Autofluoreszenz (grün) und CARS (rot) dar. Dabei wird deutlich, dass das CARS-Signal vor allem an Stellen auftritt, an welchen zuvor nur ein schwaches Autofluoreszenzsignal auftrat. Auch innerhalb der dermalen Papille ist das CARS-Signal vorhanden.

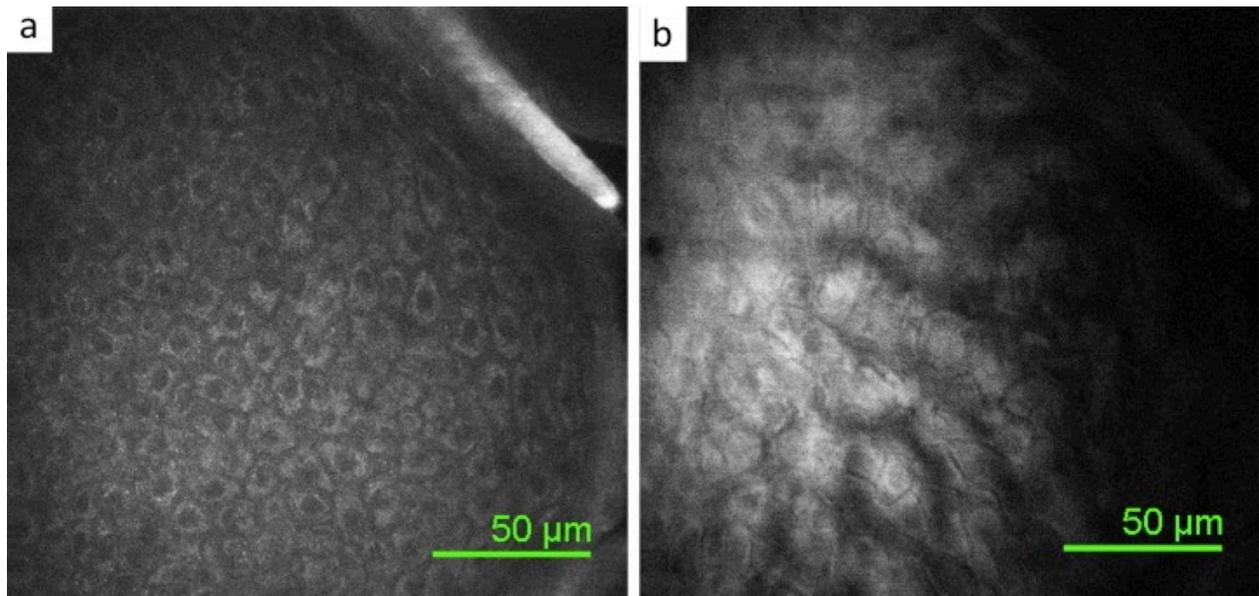


Abb. 39

- a) Autofluoreszenz gesunder Haut im Stratum spinosum in 30 µm Tiefe
- b) CARS gesunder Haut im Stratum spinosum in 30 µm Tiefe

In Abb. 39 ist gesunde Haut des Stratum spinosum in einer Tiefe von 30 µm dargestellt, wobei Abb. 39a die Stelle in Autofluoreszenz und Abb. 39b in CARS zeigen. In der Autofluoreszenz ist die typische Anordnung der Zellen im „Kopfsteinpflastermuster“ erkennbar. Das CARS-Signal zeigt ebenfalls eine regelmäßige und klare Verteilung über die gesamte Fläche. Hier ist jedoch nicht mehr jede einzelne Zelle von der anderen abgrenzbar. Vielmehr scheinen sie in Gruppen von mehreren Zellen angeordnet zu sein. Das CARS-Signal könnte ein Artefaktsignal als Schattenbild der höhergelegenen Kerneozyten sein.

3.7.2 Kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung von Psoriasis

Abb. 40 zeigt eine psoriatische Läsion in Autofluoreszenz und CARS in einer Tiefe von 30 µm. Die Autofluoreszenz in Abb. 40a zeigt Zellen mit vermehrter Granula im Zytoplasma. Die Zellen und deren Kerne weisen Pleomorphien auf. Um die Zellen herum sind die Interzellularräume nicht klar abgegrenzt, sondern mit leicht refraktilem Material gefüllt. Dies entspricht einer histologischen Keratose. Auch das CARS-Signal in Abb. 40b weist Veränderungen auf. So sind die einzelnen Zellgruppen nur noch verschwommen erkennbar.

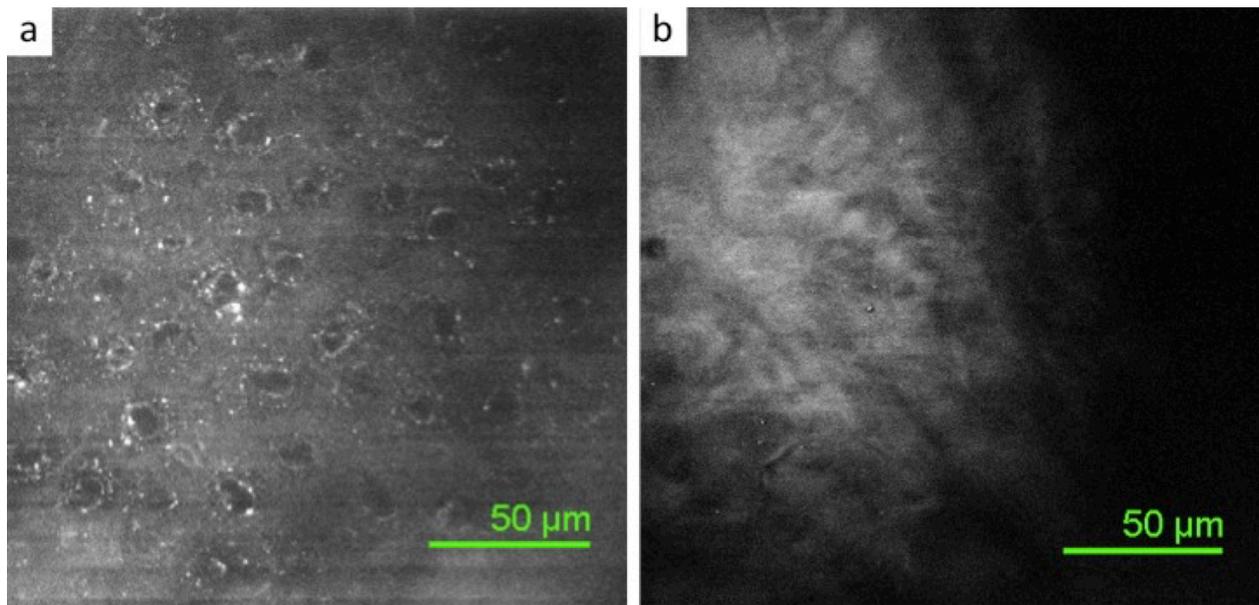


Abb. 40

- a) Autofluoreszenz von Psoriasis in 30 μm Tiefe
- b) CARS von Psoriasis in 30 μm Tiefe

4. Diskussion

Das bisherige Standardverfahren zur Diagnostik von epithelialen Hauttumoren ist die Histologie. Diese stellt aufgrund ihrer Invasivität eine große Belastung für den Patienten dar.

Außerdem erlaubt die Histologie nur eine Momentaufnahme und keine Beobachtung von Krankheits- oder Therapieverläufen.

Mittels KLSM und MPT ist es möglich, ein Hautabbild in Echtzeit ohne Hautverletzung zu erzeugen. Dynamische Prozesse wie Krankheits- oder Therapieverläufe können ebenfalls nachvollzogen werden. Die Zellarchitektur kann genau wie nach der histologischen Präparation dargestellt werden, jedoch erfolgt sie hier in horizontalen Schnitten [61]. Durch Verringerung des Abstandes zwischen den Schnitten bis auf 1 μm ist eine dreidimensionale Rekonstruktion der Haut möglich.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Eignung der MPT zur Diagnostik von epithelialen Hauttumoren wie BCC, AK, SCC im Vergleich zur Histologie und zur KLSM darzustellen und charakteristische Merkmale der Hauttumore im MPT herauszuarbeiten. Daneben sollte untersucht werden, inwiefern sich die betrachteten Hauttumore voneinander mittels MPT abgrenzen lassen. Zusätzlich zu den epithelialen Hauttumoren wurden als Prinzipversuch auch ein Patient mit

malignem Melanom und ein Patient mit Psoriasis untersucht. Erste Untersuchungen mit CARS wurden ebenfalls durchgeführt.

In den Aufnahmen mittels MPT konnten Merkmale wie in der Histologie, beispielsweise Hyper- und Parakeratose festgestellt werden. Da die Messungen mit MPT *in vivo* durchgeführt wurden, erhält man auf den Bildern keine Artefakte, die auf der Gewebeparbeitung wie Biopsieentnahme, Fixierung und Färbung der Probe, beruhen. Weitere Artefakte in der Histologie sind das Schrumpfen der Zellen, sodass vermehrt leere Räume zwischen den Zellen auftreten, die *in vivo* in der MPT nicht vorhanden sind. In der Histologie kommt es auch oft zu Rissbildungen im Stratum corneum, was vor allem durch das Auswaschen von Lipiden bedingt ist. Somit wird der Verbund zwischen den Korneozyten aufgehoben. Darüber hinaus können zusätzliche Kriterien wie Zellkerndurchmesser und das Verhältnis zwischen Zellkern und Zytoplasma - ähnlich wie in der KLSM - bestimmt werden, wobei sich dies in der MPT durch die höhere Auflösung einfacher darstellt als in der KLSM.

Die MPT und die KLSM eignen sich beide sehr gut zur Bestimmung der horizontalen Tumorausdehnung, da ihre Bilder ebenfalls in der horizontalen Ebene liegen. Die Darstellung der vertikalen Ausdehnung der Tumore kann jedoch aufgrund der noch limitierten Eindringtiefe der Laserstrahlung nicht in jedem Fall sicher bestimmt werden.

Die KLSM und die MPT sind zur Darstellung von gesunder Haut und epithelialer Hauttumore geeignet [74]. Allerdings bestehen technische Unterschiede. Bei der, in dieser Studie verwendeten KLSM ist es möglich, ein dermatoskopisches Bild als Navigation zu nutzen und Übersichtsaufnahmen von 8mm x 8mm durchzuführen, um dann im Anschluss die Pathologien besser darzustellen. Bei dem verwendeten MPT war dies nicht möglich. In neueren Geräten besteht diese Möglichkeit allerdings schon. Eine weitere Schwierigkeit in der Untersuchung mittels MPT stellen manche Läsionsorte wie Nase oder Kinn dar, da die Optik nicht auf diese Stellen aufgesetzt werden konnte. Die Schulter- und Thoraxpartien waren nur erschwert messbar, da die Atembewegung erhebliche Artefakte in der Messung erzeugte.

Die MPT hat mit 0,5 μm eine deutlich höhere Auflösung als die KLSM, sodass Zellkerne scharf und eindeutig vom Zytoplasma abgegrenzt werden können. Das liegt vor allem an der hohen Konzentration von NAD(P)H und anderen Fluorophoren in Zytoplasma, die zu einem hohen Kontrast führen. Dadurch konnten Zellkerndurchmesser und Zellgröße bestimmt und deren Verhältnis berechnet werden.

Bei gesunder Haut wurde mit beiden optischen Verfahren die Abnahme der Zellgröße sowie die Zunahme der Zelldichte mit zunehmender Tiefe beobachtet. Mittels LSM war die Bestimmung des Verhältnisses zwischen Kern und Zytoplasma nicht möglich. Im Vergleich zu den in

Rajadhyaksha et al. [61] bestimmten Zellkerndurchmessern in der Histologie waren die mit MPT gefundenen Werte etwas höher. Das lässt sich durch die Schrumpfung der Zellen nach der histologischen Präparation erklären.

Die LSM wurde bereits in mehreren Studien zur Detektion von Hauttumoren verwendet und findet schon in spezialisierten dermatologischen Zentren Anwendung zur Diagnostik. Longo et al. [66] konnten zeigen, dass die LSM ein effektives Instrument zur Diagnosestellung von nodulären Läsionen ist. Allerdings stellten auch hier Ulzeration und Hyperkeratose eine Limitierung dar, sodass hierfür eine histologische Untersuchung vorgeschlagen wurde.

Bei allen NMSC stellt die oftmals vorhandene starke Hyperkeratose eine Limitation in der Anwendung der MPT und der LSM dar. Diese behindert das Eindringen des Laserstrahls in die tieferen Schichten, in welchen sich die veränderten Keratinozyten befinden. Dieser Umstand ließe sich durch Abtragen der Hyperkeratose auf mechanische Art oder mit Salicylsäure beheben, jedoch können dadurch auch die Zellen der tiefer gelegenen Schichten verletzt werden. Des Weiteren kann die Untersuchung am Rand der Läsion durchgeführt werden, wo die Hyperkeratose meist nicht so stark ausgeprägt ist.

Typisch für das BCC in der histologischen Aufarbeitung sind palisadenartig angeordnete Zellen um die Tumornester herum. Solche Strukturen lassen sich auch mittels LSM darstellen [85-87]. In den Untersuchungen mit MPT in dieser Studie konnten die palisadenartig angeordneten Zellen nicht gefunden werden, jedoch konnten Seidenari et al. [88] Basalzellnester mit umgebenden Palisadenzellen darstellen. Letztere wurden auch von Manfredini et al. [89] gezeigt. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich durch das relativ kleine Gesichtsfeld in der MPT bedingt, sodass der Tumor hier nicht in seiner gesamten Ausdehnung abgebildet werden kann.

Teleangiektasien sind ebenfalls ein charakteristisches Merkmal für das BCC. Die Gefäße sind aufgrund ihres schnellen Wachstums meist pathologisch verändert. Sie können sowohl in der Histologie als auch in der LSM nachgewiesen werden [89, 90]. In dieser Studie konnten die Teleangiektasien allerdings nicht mit der MPT dargestellt werden, da sie, aufgrund des bereits erwähnten kleinen Gesichtsfeldes, nicht in den untersuchten Arealen nachzuweisen waren. Außerdem kann der Laserstrahl bei einer, wie beim BCC auftretenden, stark verbreiterten Epidermis nicht bis zur dermoepithelialen Junktionszone vordringen, sodass die Darstellung von Gefäßen und Teleangiektasien im Tumor nicht möglich waren.

Im Inneren des Tumors zeigte sich, dass der sonst regelmäßige Aufbau in den verschiedenen Schichten der Epidermis zerstört war. Stattdessen fand sich ein unregelmäßiger Aufbau mit elongierten Zellen. Diese konnten sowohl mittels LSM und MPT nachgewiesen werden.

Die hohe Auflösung der MPT ermöglichte die Bestimmung von Zellkern- und Zytoplasmadurchmesser sowie der Zelldichte.

Der Zellkerndurchmesser kann als Unterscheidungskriterium zwischen gesunder Haut und BCC genutzt werden. Die Werte für BCC-Zellen waren signifikant höher als für die Zellen der jeweiligen Schichten der gesunden Haut. Außerdem nahm der Zellkerndurchmesser bei BCC, im Gegensatz zur gesunden Haut, nicht mit zunehmender Tiefe ab, sondern blieb weitgehend konstant. Diese beiden Kriterien können zur Unterscheidung zwischen BCC und gesunder Haut beitragen. In Rosa et al. [91] wurde der Zellkerndurchmesser des BCCs in der Histologie bestimmt. Diese Werte sind mit $7,29 \mu\text{m} \pm 1,12 \mu\text{m}$ und $8,54 \mu\text{m} \pm 1,51 \mu\text{m}$ etwas niedriger als die in der MPT. Der größere Durchmesser korrespondierte dabei mit den aggressiveren Formen des BCC. Die unterschiedlichen Werte können über Messungsbedingte Fehler bzw. Schrumpfung der Zellen in der histologischen Aufarbeitung erklärt werden.

Wie auch in der histologischen Aufbereitung mit Hämatoxylin und Eosin und in der KLSM nimmt das Kern-Zytoplasma-Verhältnis vom Stratum granulosum bis zum Stratum basale gesunder Haut zu [61]. Das Verhältnis beim BCC ist am kleinsten von allen gebildeten Verhältnissen. Beim BCC wurde dieses an der langen Seite der charakteristischen, elongierten Zellen bestimmt. Im Vergleich zum Stratum spinosum und basale ist der Unterschied signifikant. Das Verhältnis ergab im Durchschnitt auch kleinere Werte als für das Stratum granulosum, allerdings ohne signifikanten Unterschied.

Die ermittelte Zelldichte des BCCs in Tiefen von 10 bis 200 μm entspricht in etwa der des Stratum granulosum, jedoch nimmt diese im Vergleich zur gesunden Haut nicht mit zunehmender Tiefe zu, sondern bleibt weitgehend konstant.

Da vor allem signifikante Unterschiede bei allen drei untersuchten Kriterien im Stratum spinosum und Stratum basale aufgetreten sind, ist es ausreichend, die gesunde Haut nur in diesen beiden Schichten zu messen.

Bei der AK ist ihre frühe Detektion und Therapie von großer Bedeutung. Mittels Histologie kann lediglich nach der klinischen Verdachtsdiagnose eine Abgrenzung zu einem invasiv wachsenden Plattenepithelkarzinom durchgeführt werden. Ebenso ist es nur möglich, ein punktuell Bild von der AK an der biopsierten Stelle zu bekommen. Meistens sind aber größer flächige Areale von AK betroffen. Diese können nur mit KLSM oder MPT dargestellt werden. Außerdem ist es mit den beiden nichtinvasiven Methoden realisierbar, Entwicklungsverläufe und dynamische Prozesse in den verschiedenen Läsionen zu beobachten, was mit der invasiven Methode der Histologie nicht möglich ist.

Die Hyper- und Parakeratose, die bei der AK auftreten, stellen eine Limitation in der Anwendung des MPT dar. Aufgrund der, je nach Läsion, unterschiedlichen Eindringtiefe von ca. 200 µm, konnte die dermoepitheliale Junktionszone nicht immer dargestellt werden. Somit kann nicht sichergestellt werden, ob diese, wie für die AK charakteristisch, noch intakt ist, oder ob sie, wie im Falle des SCC, schon durchbrochen ist. Um dennoch so tief wie möglich in die Läsion einzusehen, wurde in der Regel der Rand der Läsion untersucht. Zur Verminderung der Hyperkeratose kann diese auch mittels Salicylsäure oder mechanisch abgetragen werden. Darauf wurde in dieser Studie allerdings verzichtet.

Die Hyper- und Parakeratose ist histologisch ein wichtiges Merkmal der aktinischen Keratose. Sie kann auch in der LSM und in der MPT nachgewiesen werden. Ebenso ist es möglich, den Verlust des Aufbaus einzelner Zellschichten als Verlust der sogenannten Honigwabenstruktur in der LSM und der „Kopfsteinpflasterstruktur“ in der MPT zu zeigen. In der aufgelösten Struktur befinden sich pleomorphe Zellen. Diese sind mit der LSM darstellbar, allerdings eignet sich dafür die MPT besser, da sie eine höhere Auflösung besitzt und der Pleomorphismus der Zellen deutlicher wird.

Mittels MPT ist es zudem möglich, subzelluläre Strukturen darzustellen. Auffallend war zudem, dass das Zytoplasma von AK-Zellen stärkere Signale erzeugte als das von gesunden Hautzellen. Dies könnte durch eine erhöhte metabolische Aktivität der Zellen und einem darin begründeten und erhöhten NAD(P)H-Umsatz, verursacht sein.

Außerdem konnten in der MPT weitere, objektive Kriterien ermittelt werden. Der Zellkerndurchmesser für AK ist signifikant größer als für die Spinal- und Basalzellen gesunder Haut. Im Vergleich zu den Zellen des Stratum granulosum konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Das lässt sich dadurch erklären, dass sich die Tumor-veränderten Zellen vor allem in den tiefer gelegenen Schichten finden. Außerdem bleiben die Durchschnittswerte des Zellkerndurchmessers von AK-Zellen über alle gemessenen Tiefen weitgehend konstant, wobei die Standardabweichung sehr hoch ist. Das ist in der Pleomorphie der Tumorzellen begründet. Aufgrund der hohen Stoffwechselaktivität dieser Zellen und der veränderten genetischen Programmierung sind die Zellkerne im Vergleich zu denen gesunder Haut vergrößert. In Koehler et al. [74] wurden ebenfalls die Zellkerndurchmesser von gesunder Haut und AK bestimmt. Auch dort konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen gesunden Hautschichten gefunden werden. Der Unterschied zwischen aktinischer Keratose und gesunder Haut stellte sich jedoch als nicht signifikant heraus, auch wenn die Durchschnittswerte der AK in den jeweiligen Schichten etwas größer waren als bei gesunder Haut.

Neben dem Zellkerndurchmesser ist auch das Kern-Zytoplasma-Verhältnis der AK-Zellen verändert. Im Vergleich mit gesunder Haut ist es etwas höher. Wie bei gesunder Haut nimmt es mit zunehmender Tiefe zu. Vergleicht man die Durchschnittswerte der AK mit denen der einzelnen Schichten der gesunden Haut, erhält man signifikante Unterschiede zum Stratum granulosum und spinosum. Die Werte sind ebenfalls höher im Vergleich zum Stratum basale, allerdings nicht signifikant. Da der Zellkern in diesen Tiefen bei der AK jedoch schon vergrößert ist, muss auch das Zytoplasma dieser Zellen vergrößert sein. Somit ergeben sich annähernd gleiche Werte für das Verhältnis zwischen Zellkern und Zytoplasma der AK-Zellen und der gesunden Zellen in der Basalzellschicht. In Koehler et al. [74] konnten im Vergleich des Verhältnisses von Zellkern und Zytoplasma für alle Schichten signifikante Unterschiede berechnet werden. Darüber hinaus wurden noch die Flächen von Zellkern und Zytoplasma, sowie deren Verhältnis bestimmt. Auch dabei erreichte das Verhältnis von AK-Zellen signifikant höhere Werte als von gesunder Haut.

Für die Zelldichte der AK wurden signifikante niedrigere Werte im Vergleich zum Stratum basale und spinosum gefunden. Bei gesunder Haut nimmt die Zelldichte mit zunehmender Tiefe zu. Dieses Phänomen ist bei der AK ebenfalls zu beobachten, allerdings nicht in der gleichen Ausprägung wie bei gesunder Haut. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Koehler et al. [74]. Dort wird ebenfalls eine geringere Zelldichte der AK als in den jeweiligen gesunden Hautschichten beschrieben.

Zur Detektion des SCC sind sowohl die LSM als auch die MPT in der Lage. Schwierigkeiten in der Darstellung traten vor allem bei bestehender Hyperkeratose auf. Aufgrund der dadurch resultierenden hohen Lichtstreuung, war es daher in manchen Fällen nicht mehr möglich, die darunter liegenden Zellschichten zu beurteilen. Darüber hinaus konnte die dermoepitheliale Junktionszone bei keiner der sechs untersuchten Läsionen dargestellt werden. Dies wäre von Bedeutung in einer möglichen notwendigen Unterscheidung zwischen SCC und AK, da beim SCC die Basalmembran bereits durchbrochen ist.

Zur Abgrenzung des SCC gegenüber gesunder Haut genügen bildmorphologische Charakteristika, wie der vollständige Verlust der „Kopfsteinpflasterstruktur“, ihre veränderte und unregelmäßige Form, die Zunahme ihrer Größe und die starke Refraktilität des Zytoplasmas. Die mittels statistischer Verfahren untersuchten Kriterien des Zellkerndurchmessers, des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses und der Zelldichte können ebenfalls zur Unterscheidung zwischen gesunder Haut und SCC herangezogen werden. Der Zellkerndurchmesser war im Vergleich zu allen Hautschichten signifikant vergrößert. Im Gegensatz zu normalen Keratinozyten verändert

sich der Durchmesser über die gesamte gemessene Tiefe nicht. Für das Verhältnis Zellkern-Zytoplasma wurden ebenfalls signifikant höhere Werte im Vergleich zum Stratum spinosum und granulosum gefunden. Der nichtsignifikante Unterschied zum Stratum basale ist insofern nicht von großer Bedeutung, da der Zellkerndurchmesser und damit die gesamte Zelle wesentlich größer ist als ein einzelner Keratinozyt gesunder Haut. Die Zelldichte ist, wie auch schon histologisch gezeigt, aufgrund der erweiterten interzellulären Abstände, verringert im Vergleich zum Stratum spinosum und basale.

Ein wesentlicher histologischer Unterschied zwischen AK und SCC ist, dass beim SCC die Basalmembran schon durchbrochen ist und somit eine Metastasierung auf hämatogenem oder lymphogenem Weg möglich ist. Im Gegensatz dazu ist die Basalmembran bei der AK noch intakt und nicht durchbrochen. Dieses Kriterium kann jedoch zum Vergleich der AK mit SCC in der Untersuchung mittels MPT nicht zuverlässig angewandt werden, da die dermoepidermale Junktionszone aufgrund der relativ geringen Eindringtiefe des Lasers von 200 µm nicht bei jeder Untersuchung dargestellt werden kann. Andere Kriterien lassen aber eine Unterscheidung zwischen AK und SCC zu. Dazu zählen einerseits bildmorphologische Kriterien als auch objektiv ausgemessene Kriterien. Zu ersteren gehören morphologische Veränderungen der Zellen in deren Form und Anordnung im Zellverband. Diese sind beim SCC wesentlich stärker ausgeprägt als bei der AK. Während sich beim SCC sehr starke Veränderungen in Form und Anordnung der Zellen zeigten, konnte bei der AK ein nur leicht verändertes Kopfsteinpflastermuster in den oberen Hautschichten nachgewiesen werden. Zudem finden sich beim SCC oftmals intraepidermale Verhornungen in einzelnen Schichten, die bei der AK nicht auftreten.

Als objektive Kriterien sind der Zellkerndurchmesser, das Verhältnis zwischen Zellkern und Zytoplasma, sowie die Zelldichte zu sehen. Die Zellkerne des SCC waren in ihrem Durchschnitt größer als die der AK, jedoch war der Unterschied noch nicht als signifikant zu werten. Daher sind bezüglich dieses Kriteriums noch weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen notwendig. Beim Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis, welches beim SCC größer ist als bei der AK, konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Genauso bei der Zelldichte des SCC, welche niedriger ist als die der AK. Dies ist einerseits in den größeren Zellen und andererseits durch die erweiterten interzellulären Abstände beim SCC begründet.

Rishpon et al. [36] beobachteten in ihrer Untersuchung von AK und SCC mittels LSM einen Unterschied in der Vaskularisierung. Beim SCC fanden sich in der oberflächlichen Dermis vermehrt neoplastische Blutgefäße, die bei der AK nur spärlich auftraten. Dies konnte mit der

MPT nicht gezeigt werden, da die Eindringtiefe des Lasers nicht ausreichend war, um die oberflächliche Dermis bei AK und SCC darzustellen.

Insgesamt tragen die genannten Kriterien zur Unterscheidung zwischen AK als Präkanzerose und SCC bei. Es sollten jedoch mehrere der oben aufgeführten Kriterien zur Differenzierung in Betracht gezogen werden, um eine sichere Diagnosestellung zu gewährleisten.

Auch maligne Melanome zeigen in der MPT charakteristische Merkmale. Hierzu wurde ein Prinzipversuch durchgeführt. Jedoch ist ein untersuchter Patient nicht ausreichend, um allgemeine Aussagen treffen zu können. Die von Dimitrow et al. [92] gefundenen Charakteristika von malignen Melanomen in der MPT konnten bestätigt werden. Die Untersuchung mit MPT zeigte im Vergleich mit gesunder Haut wesentliche Unterschiede in der Zellmorphologie. Die meisten Zellen haben vergrößerte Zellkerne mit ovaler Form sowie vergrößerte Zellkerne. Daneben treten auch Zellen mit dendritischen Ausläufern auf. Die Zellabstände sind, wie bei den anderen Tumoren auch, vergrößert und die Mitoserate ist erhöht. Außerdem finden sich Melanozyten in höher gelegenen Hautschichten. Diese Kriterien können auch mit der KLSM untersucht werden, jedoch lassen sich mittels MPT genauere Aussagen über die Zellmorphologie treffen. Darüber hinaus befanden sich im Stratum granulosum auch Zellen, die in ihrem Zytoplasma hyperrefraktilen Granula aufwiesen. Dies konnte mit der KLSM aufgrund der Auflösung noch nicht beobachtet werden.

In Tab. 2 erfolgt eine Gegenüberstellung der in dieser Arbeit untersuchten Tumoren bezüglich ihrer Merkmale in der MPT. Diese unterscheiden sich im Vergleich mit gesunder Haut vor allem durch einen Verlust ihrer Struktur, welche sich im Verlust des „Kopfsteinpflastermusters“, einer Hyper- und Parakeratose und in der Zunahme der Dicke der Epidermis zeigt. Zudem treten weitere Malignitätsmerkmale wie erhöhte Mitoserate und Zellkernpleomorphie auf.

Auch innerhalb der einzelnen Tumoren lassen sich morphologische Unterschiede in der MPT darstellen. Besonders wichtig erscheint die Differenzierung zwischen den einzelnen NMSC, da diese sich klinisch oft ähneln. Das BCC unterscheidet sich von den anderen Hauttumoren vor allem durch die elongierte Form der Zellen, welche spezifisch für das BCC ist. Das wichtigste Unterscheidungskriterium zwischen der Präkanzerose AK und SCC ist die noch intakte Basallamina bei der AK. Außerdem sind die einzelnen Parameter beim SCC wesentlich stärker ausgeprägt als bei der AK.

Das MM unterscheidet sich von den NMSC durch die ovaläre Zellform und die hyperrefraktilen Granula im Zytoplasma.

Tab. 2 Gegenüberstellung der Tumoren bezüglich ihrer Merkmale in der MPT

Parameter/ Tumor	gesund	BCC	AK	SCC	MM
Kopfsteinpflastermuster	++	--	-	--	--
Refraktilität des Zytoplasmas	0	+	+	++	++*
Basallamina	+	-	+	--	--
Zellmorphologie	homogen	elongierte, pleomorph	vergrößert, pleomorph	stark vergrößert und stark pleomorph	ovalär, pleomorph
Hyperkeratose	0	+	+	++	0
Parakeratose	0	+	+	++	
Dicke der Epidermis	0	+	+	++	+
Intraepitheliale Keratose	0	0	0	++	0
Mitoserate	0	+	+	++	++
Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis	0	+	++	+++	
Zellkerndurchmesser	0	+	+	++	
Zelldichte	0**	-	-	--	

* hyperrefraktile Granula

** Zunahme der Zelldichte mit zunehmender Schichttiefe nur bei gesunder Haut

Außerdem liegt meistens keine Hyperkeratose vor. Durch eine Kombination der vorhandenen Parameter ist es möglich, eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Tumoren mittels MPT durchzuführen.

Die Messung mit CARS bietet einen weiteren Informationsgewinn über die in der Epidermis und Dermis vorhandenen Lipidstrukturen, welche nicht mit der Autofluoreszenz erfasst werden können. Die Morphologie des CARS-Signals beruht wahrscheinlich auf einer Artefaktbildung durch die Kerneozyten des Stratum corneum.

Das diffuse Signal bei Psoriasis kann mit einer Barrierestörung der Lipidstruktur erklärt werden. Durch die erhöhte Proliferationsrate der Psoriasiszellen ist es ihnen nicht möglich, eine geordnete Differenzierung zu durchlaufen. Die Unschärfe des CARS-Signals könnte darauf

beruhen, dass die Abstände zwischen den Zellen bei Psoriasis vergrößert sind und eine Keratose vorliegt. In diesem Bereich gibt es also kein Zytoplasma, in dem die Lipide vorkommen und synthetisiert werden.

4.1 Zusammenfassung

Die Histologie gilt bis heute noch als Goldstandard zur Diagnosesicherung von diversen Hauterkrankungen. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die LSM als auch die MPT zur Diagnosestellung bei den hier untersuchten Hauterkrankungen eignen.

Vorteile der Histologie sind, dass sie ein bewährtes Verfahren darstellt und viele Erfahrungen vorliegen. Allerdings ist zur histologischen Auswertung immer eine Biopsieentnahme mit folgender Narbenbildung an dieser Stelle erforderlich. Außerdem benötigt die histologische Aufbereitung Zeit, sodass eine endgültige Diagnosestellung unter Umständen erst nach mehreren Tagen erfolgen kann.

Im Gegensatz dazu ermöglichen die LSM und die MPT eine Darstellung der betroffenen Region *in vivo* und in Echtzeit, das heißt es liegt ein nichtinvasiver Eingriff vor und die Diagnosestellung kann sofort erfolgen. Bisher durchgeführte Studien haben hohe Sensitivität und Spezifität in der Untersuchung mit LSM gezeigt, für die MPT liegen, aufgrund der Neuheit der Technik, bisher noch keine Daten vor.

In der Histologie ist die Beurteilung der dermoepidermalen Junktionszone und darunterliegenden Strukturen immer möglich. So ist dies auch bei stark hyperkeratotischen Läsionen, welche eine große Limitation sowohl für die LSM als auch für die MPT darstellen, gewährleistet. Somit ist die Beurteilung der dermoepidermalen Junktionszone aufgrund der geringen Eindringtiefe des Lasers nicht immer möglich. Damit fällt ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung zwischen AK und SCC weg. Dieses Problem ließe sich einerseits dadurch beheben, dass die Hyperkeratose vor der Untersuchung mechanisch oder chemisch mit Salicylsäure abgetragen wird. Dieses Verfahren birgt allerdings das Risiko, dass die tiefer gelegenen Keratinozyten verletzt werden. Andererseits könnten auch technische Verbesserungen zur Beurteilbarkeit der Läsionen in der Tiefe beitragen, beispielsweise durch Erhöhung der Eindringtiefe des Lasers.

Ein weiterer Vorteil der MPT gegenüber der LSM ist die subzelluläre Auflösung. So können die einzelnen Zellstrukturen genau vermessen und Änderungen frühzeitig erkannt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Ziel dieser Arbeit, wesentliche Merkmale von BCC, AK und SCC in der Untersuchung mit MPT zu erkennen, erreicht wurde. Des Weiteren war auch eine Unterscheidung zwischen AK und SCC möglich. Die MPT kann daher

als diagnostisches Verfahren zur sicheren Differenzierung zwischen Präkanzerose und dem invasiv wachsenden Tumor genutzt werden. Auch die Untersuchung von malignen Melanomen zeigt charakteristische Veränderungen.

Die Untersuchungen mit CARS zeigten Lipidstrukturen gesunder Haut und Veränderungen dieser Strukturen bei Krankheiten, die mit Hautbarriereveränderungen einhergehen, wie beispielsweise der Psoriasis.

Ein Nachteil des hier verwendeten MPT-Gerätes war dessen Starrheit, sodass Läsionen an manchen Körperstellen wie an der Nase, am Ohrläppchen oder auf dem Kopf nicht oder nur schwer messbar waren. Das ist insofern von Bedeutung, als dass diese Stellen Prädilektionsstellen für NMSC sind. Eine mögliche Lösung stellen flexible Objektiv-Arm-Systeme dar, die einen größeren Bewegungsspielraum bieten. Außerdem sollte der Objektivkopf verkleinert werden, damit auch die unebenen Körperstellen gut erreichbar werden.

In weiteren Studien mit größeren Fallzahlen muss untersucht werden, wie hoch die Spezifität und die Sensibilität der Kriterien für die jeweiligen Tumore einzeln und in Kombination sind. Anschließend könnte das Verfahren zur klinischen Diagnostik der einzelnen Hauttumore angewandt werden. Darüber hinaus bestünde die Möglichkeit, während der operativen Exzision des Tumors die Schnittländer sofort zu kontrollieren, um eine vollständige Entnahme zu garantieren. Dadurch könnte das bisher angewandte zweizeitige Verfahren zur Exzision von SCC durch ein einzeitiges Verfahren mit sofortigem Wundverschluss ersetzt werden.

Auch die Messung mit CARS könnte neue Erkenntnisse für Hautbarrierestörungen wie bei Psoriasis oder atopischer Dermatitis bringen. Dafür ist es erforderlich, dass eindeutige Kriterien für die Untersuchung mit CARS festgelegt werden.

Die beiden zu vergleichenden optischen Verfahren (MPT und LSM) bieten die Möglichkeit der Zeit sparenden und nichtinvasiven Diagnostik von Hauterkrankungen. Besonderen Nutzen haben sie bei klinisch nicht eindeutig unterscheidbaren Dermatosen, wie zwischen AK und SCC, aber auch als Abgrenzung zu anderen NMSC. Ebenfalls gut geeignet sind beide Verfahren zur schonenden Untersuchung von großflächig auftretenden Erkrankungen wie Psoriasis oder von Feldkanzerisierungen, wie sie bei der AK häufig auftreten. Aufgrund der Nichtinvasivität der Methoden ist außerdem die Verwendung als Erfolgskontrolle bei medikamentösen und nichtoperativen Therapieverfahren möglich. Bei der operativen Entfernung von Tumoren ist der Einsatz zur Schnitttrandkontrolle vorstellbar. Durch die höhere Auflösung im Vergleich zur LSM ermöglicht die MPT zusätzlich eine noch genauere Beurteilung der einzelnen Zellen und ihres Zytoplasmas und Zellkerns, sodass mögliche Veränderungen dadurch noch einfacher und frühzeitiger erkannt werden können.

5. Literaturverzeichnis

1. Fu W, Cockerell CJ, *The Actinic (Solar) Keratosis: A 21st-Century Perspective* Arch Dermatol., 2003. **139**(1): p. 66-70.
2. Cockerell CJ, *Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis)*. J Am Acad Dermatol, 2000. **42**(1): p. S11-7.
3. Astner S, Ulrich M, *Confocal laser scanning microscopy*. Hautarzt, 2010. **61**(5): p. 421-8.
4. Moll I, *Duale Reihe Dermatologie, 6. Aufl.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.
5. Fritsch P, *Dermatologie/Venerologie, 2. Aufl.* Springer Verlag Berlin/Heidelberg/New York, 2004.
6. Sato T, *Cutaneous manifestations of liver cirrhosis*. Nihon Rinsho, 1994. **52**(1): p. 170-3.
7. Klepzig H, *Lip cyanosis*. Dtsch Med Wochenschr., 1978. **103**(13): p. 544.
8. McGlone F, Wessberg J, Olausson H, *Discriminative and affective touch: sensing and feeling*. Neuron, 2014. **82**(4): p. 737-55.
9. Madison KC, *Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(12): p. 231-41.
10. Ramos-e-Silva M, Jaques CD, *Epidermal barrier function and systemic diseases*. Clin Dermatol, 2012. **30**(3): p. 277-9.
11. Wertz PW, *Lipids and barrier function of the skin*. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh), 2000. **208**: p. 7-11.
12. Ortonne JP, *Normal and abnormal skin color*. Ann Dermatol Venereol, 2012. **139**(Suppl 3): p. S73-7.
13. Fisher DE, Lin JY, *Melanocyte biology and skin pigmentation*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 843-850.
14. Romanovsky A, *Skin temperature: its role in thermoregulation*. Acta Physiol (Oxf), 2014. **210**(3): p. 498-507.
15. Braff MH, Bardan A, Nizet V et al., *Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(1): p. 9-13.
16. Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie, Berufsverband Deutscher Dermatologen, Gesellschaft für Dermatopharmazie, *Leitlinie zur Behandlung der aktinischen Keratose C44.X*. 2011.
17. Hauschild A, Breuniger H, Kaufmann R et al., *S2k Kurzleitlinie Basalzellkarzinom der Haut*. 2012.

18. Breuninger H, Sebastian G, Kortmann RD et al., *Deutsche Leitlinie: Plattenepithelkarzinom der Haut, der Lippen und der Augenlider*. 2005.
19. Rubin AI, Chen EH, Ratner D, *Basal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2005. **353**(21): p. 2262-9.
20. Heenan PJ, Elder D, Sobin LH, *Histological typing of skin tumours*. 26. *WHO International Histological Classification of Tumours*. Springer Verlag Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo, 1996.
21. Garbe C, *Epidemiologie des Hautkrebses*. In: Garbe C, Dummer R, Kaufmann R et al. (Hrsg) *Dermatologische Onkologie*. Springer Verlag Berlin/ Heidelberg/New York, 1997.
22. Kempf, Hantschke, Kutzner, *Dermatopathologie*. Steinkopff Verlag Darmstadt, 2007.
23. Ulrich M, Klemp M, Darvin ME, *In vivo detection of basal cell carcinoma : comparison of a reflectance confocal microscope and a multiphoton tomograph*. J Biomed Opt, 2013. **18**(6): p. 061229.
24. Glogau R, *The risk of progression to invasive disease*. J Am Acad Dermatol, 2000. **42**(1): p. 23-4.
25. Arits AH, Mosterd K, Essers BA et al., *Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: a single blind, non-inferiority, randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2013. **14**(7): p. 647-54.
26. Heaphy MR Jr, Ackerman AB, *The nature of solar keratosis: A critical review in historical perspective*. J Am Acad Dermatol, 2000. **43**(1): p. 138-150.
27. Memon AA, Tomeson JA, Bothwell J et al., *Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population*. . Br J Dermatol, 2000. **142**: p. 1154-9.
28. Rigel DS, Stein GLF, *The importance of early diagnosis and treatment of actinic keratosis*. J Am Acad Dermatol, 2013. **68**(1): p. S20-7.
29. Ulrich M, Maltusch A, Rius-Diaz F, *Clinical applicability of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnosis of actinic keratoses*. Dermatol Surg 2008. **34**(5): p. 610-9.
30. Fitzpatrick T, *Soleil et peau*. J de Medecine Esthetique, 1975. **2**: p. 33-4.
31. Gogia R, Binstock M, Hirose R et al., *Fitzpatrick skin phototype is an independent predictor of squamous cell carcinoma risk after solid organ transplantation*. J Am Acad Dermatol, 2013. **68**(4): p. 585-91.
32. Stockfleth E, *Actinic Keratoses*. Cancer Treat Res, 2009. **146**: p. 227-39.
33. Weinberg AS, Ogle CA, Shim EK, *Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: an update*. Dermatol Surg, 2007. **33**(8): p. 885-99.

34. Weinstock MA, *The Epidemic of Squamous Cell Carcinoma*. JAMA, 1989. **262**(15): p. 2138-40.
35. Kolm I, Hofbauer G, Braun RP, *Early diagnosis of skin cancer*. Ther Umsch, 2010. **67**(9): p. 439-446.
36. Rishpon A, Kim N, Scope A et al., *Reflectance Confocal Microscopy Criteria for Squamous Cell Carcinomas and Actinic Keratoses*. Arch Dermatol., 2009. **145**(7): p. 766-72.
37. Mendenhall WM, Amdur RJ, Hinerman RW et al., *Radiotherapy for cutaneous squamous and basal cell carcinomas of the head and neck*. Laryngoscope, 2009. **119**(10): p. 1994-9.
38. DeConti RC, *Chemotherapy of squamous cell carcinoma of the skin*. Semin Oncol., 2012. **39**(2): p. 145-9.
39. Geller AC, Clapp RW, Sober AJ et al., *Melanoma epidemic: an analysis of six decades of data from the Connecticut Tumor Registry*. J Clin Oncol, 2013. **31**(33): p. 4172-8.
40. Baras N, Barnes B, Bertz J et al., *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2007/2008*. Robert Koch-Institut. 2012.
41. Tsao H, Chin L, Garraway LA et al., *Melanoma: from mutations to medicine*. Genes Dev, 2012. **26**(11): p. 1131-55.
42. Soufir N, Ollivaud L, Bertrand G, et al., *A French CDK4-positive melanoma family with a co-inherited EDNRB mutation*. J Dermatol Sci, 2006. **46**(1): p. 61-4.
43. Bedrosian I, Faries MB, Guerry D et al., *Incidence of sentinel node metastasis in patients with thin primary melanoma (< or = 1 mm) with vertical growth phase*. Ann Surg Oncol, 2000. **7**(4): p. 262-7.
44. Sterry W, Paus R, *Checkliste Dermatologie, 5. Aufl.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2004.
45. Deutsche Dermatologische Gesellschaft, Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie, *S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms“*. 2013.
46. Bartlett EK, Gimothy PA, Sinnamon AJ et al., *Clark level risk stratifies patients with mitogenic thin melanomas for sentinel lymph node biopsy*. Ann Surg Oncol., 2014. **21**(2): p. 643-9.
47. Parisi R, Symmons D, Griffiths CE et al., *Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(2): p. 377-85.
48. Ammar M, Souissi-Bouchlaka C, Gati A et al., *Psoriasis: physiopathology and immunogenetics*. Pathol Biol (Paris), 2014. **62**(1): p. 10-23.

49. Mrowietz U, Elder JT, Barker J, *The importance of disease associations and concomitant therapy for the long-term management of psoriasis patients.* Arch Dermatol Res, 2006. **298**(7): p. 309-19.
50. Mallbris L, Akre O, Granath F et al., *Increased risk for cardiovascular mortality in psoriasis inpatients but not in outpatients.* Eur J Epidemiol, 2004. **19**(3): p. 225-30.
51. Dominguez PL, Han J, Li T et al., *Depression and the risk of psoriasis in US women.* J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013. **27**(9): p. 1163-7.
52. Deutsche Dermatologische Gesellschaft, Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie, *S3-Leitlinie Therapie der Psoriasis vulgaris.* 2011.
53. Sattler E, Kästle R, Welzel J, *Optical coherence tomography in dermatology.* J Biomed Opt, 2013. **18**(6): p. 061224.
54. Gambichler T, Jaedicke V, Terras S, *Optical coherence tomography in dermatology: technical and clinical aspects.* Arch Dermatol Res, 2011. **303**(7): p. 457-73.
55. Welzel J, Lankenau E, Birngruber R et al., *Optical coherence tomography of the human skin.* J Am Acad Dermatol, 1997. **37**(6): p. 958-63.
56. Schmitt, JM, *Optical coherence tomography (OCT): a review.* IEEE J Sel Top Quantum Electron, 1999. **5**(4): p. 1205-15.
57. Forsea AM, Carstea EM, Ghervase L et al., *Clinical application of optical coherence tomography for the imaging of non-melanocytic cutaneous tumors: a pilot multi-modal study.* J Med Life, 2010. **3**(4): p. 381-9.
58. Maier T, Braun-Falco M, Hinz T et al., *Morphology of basal cell carcinoma in high definition optical coherence tomography: en-face and slice imaging mode, and comparison with histology.* J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013. **27**(1): p. e97-104.
59. Pelosini L, Smith HB, Schofield JB et al., *In vivo optical coherence tomography (OCT) in periocular basal cell carcinoma: correlations between in vivo OCT images and postoperative histology.* Br J Ophthalmol, 2013. **97**(7): p. 890-4.
60. Smith LE, Hearnden V, Lu Z et al., *Evaluating the use of optical coherence tomography for the detection of epithelial cancers in vitro.* J Biomed Opt, 2011. **16**(11): p. 116015.
61. Rajadhyaksha M, Gonzáles S, Zavislan JM et al., *In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology.* J Invest Dermatol, 1999. **113**(3): p. 293-303.
62. Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M et al., *Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging.* Photochem Photobiol, 2008. **84**(6): p. 1421-30.

63. González S, Swindells K, Rajadhyaksha M et al., *Changing paradigms in dermatology: confocal microscopy in clinical and surgical dermatology*. Clin Dermatol, 2003. **21**(5): p. 359-69.
64. Al-Arashi MY, Salomatina E, Yaroslavsky AN, *Multimodal Confocal Microscopy For Diagnosing Nonmelanoma Skin Cancers*. Lasers Surg Med., 2007. **39**(9): p. 696-705.
65. Astner S, Dietterle S, Otberg N et al., *Clinical applicability of in vivo fluorescence confocal microscopy for noninvasive diagnosis and therapeutic monitoring of nonmelanoma skin cancer*. J Biomed Opt., 2009. **13**(1): p. 014003.
66. Longo C, Farnetani F, Ciardo S et al., *Is confocal microscopy a valuable tool in diagnosing nodular lesions? A study of 140 cases*. Br J Dermatol, 2013. **169**(1): p. 58-67.
67. Ulrich M, Lange-Asschenfeldt S, *In vivo confocal microscopy in dermatology: from research to clinical application*. J Biomed Opt, 2013. **18**(6): p. 061212.
68. Swindle LD, Thomas SG, Freeman M et al., *View of Normal Human Skin In Vivo as Observed Using Fluorescent Fiber-Optic Confocal Microscopic Imaging*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(4): p. 706-12.
69. Suihko C, Swindle LD, Thomas SG et al., *Fluorescence fibre-optic confocal microscopy of skin in vivo: microscope and fluorophores*. Skin Res Technol, 2005. **11**(4): p. 254-67.
70. Bennàssar A, Carrera C, Puig S et al., *Fast evaluation of 69 basal cell carcinomas with ex vivo fluorescence confocal microscopy: criteria description, histopathological correlation, and interobserver agreement*. JAMA Dermatol, 2013. **149**(8): p. 839-47.
71. König K, *Clinical multiphoton tomography*. J Biophotonics, 2008. **1**(1): p. 13-23.
72. Kaatz M, König K, *Multiphoton microscopy and in vivo tomography in dermatologic imaging*. Hautarzt, 2010. **61**(5): p. 397-409.
73. Koehler MJ, Speicher M, Lange-Asschenfeldt S et al., *Clinical application of multiphoton tomography in combination with confocal laser scanning microscopy for in vivo evaluation of skin diseases*. Exp Dermatol, 2011. **20**(7): p. 589-94.
74. Koehler MJ, Zimmermann S, Springer S et al., *Keratinocyte morphology of human skin evaluated by in vivo multiphoton laser tomography*. Skin Res Technol, 2011. **17**(4): p. 479-86.
75. König K, Speicher M, Köhler MJ et al., *Clinical application of multiphoton tomography in combination with high-frequency ultrasound for evaluation of skin diseases*. J Biophotonics, 2010. **3**(12): p. 759-73.

76. Paoli J, Smedh M, Ericson MB, *Multiphoton laser scanning microscopy - a novel diagnostic method for superficial skin cancers*. *Semin Cutan Med Surg*, 2009. **28**(3): p. 190-5.
77. Paoli J, Smedh M, Wennberg AM et al., *Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: morphologic features for future non-invasive diagnostics*. *J Invest Dermatol*, 2008. **128**(5): p. 1248-55.
78. Fischer F, Volkmer B, Puschmann S et al., *Skin imaged by femtosecond laser irradiation: a risk assessment for in vivo applications*. *SPIE: Biophotonics and New Therapy Frontiers*, 2006. **6191**(5).
79. Nan X, Cheng JX, Xie XS, *Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(11): p. 2203-8.
80. Potma EO, Xie XS, *Detection of single lipid bilayers with coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy*. *J Raman Spectrosc*, 2003. **34**(9): p. 642-650.
81. Zumbusch A, Holtom GR, Xie XS, *Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*. *Phys Rev Lett*, 1999. **82**: p. 4142.
82. Holtom GR, Thrall BD, Chin BY et al., *Achieving molecular selectivity in imaging using multiphoton Raman spectroscopy techniques*. *Traffic*, 2001. **2**(11): p. 781-8.
83. Min W, Freudinger CW, Lu S et al., *Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy*. *Annu Rev Phys Chem*, 2011. **62**: p. 507-30.
84. Bloembergen, N, *A Quarter century of stimulated Raman scattering*. *Pure Appl Chem*, 1987. **59**(10): p. 1229-36.
85. González S, Tannous Z, *Real-time, in vivo confocal reflectance microscopy of basal cell carcinoma*. *J Am Acad Dermatol*, 2002. **47**(6): p. 869-74.
86. Gerger A, Horn M, Koller S et al., *Confocal examination of untreated fresh specimens from basal cell carcinoma: implications for microscopically guided surgery*. *Arch Dermatol*, 2005. **141**(10): p. 1269-74.
87. Gerger A, Koller S, Weger W et al., *Sensitivity and specificity of confocal laser-scanning microscopy for in vivo diagnosis of malignant skin tumors*. *Cancer*, 2006. **107**(1): p. 193-200.
88. Seidenari S, Arginelli F, Bassoli S et al., *Diagnosis of BCC by multiphoton laser tomography*. *Skin Res Technol*, 2013. **19**(1): p. e297-304.
89. Manfredini M, Arginelli F, Dunsby C et al., *High-resolution imaging of basal cell carcinoma: a comparison between multiphoton microscopy with fluorescence lifetime*

- imaging and reflectance confocal microscopy*. *Skin Res Technol*, 2013. **19**(1): p. e433-43.
90. Sauermann K, Gambichler T, Wilmert M et al., *Investigation of basal cell carcinoma [correction of carcionoma] by confocal laser scanning microscopy in vivo*. *Skin Res Technol*, 2002. **8**(3): p. 141-7.
91. de Rosa G, Vetrani A, Zeppa P et al., *Comparative morphometric analysis of aggressive and ordinary basal cell carcinoma of the skin*. *Cancer*, 1990. **65**(3): p. 544-9.
92. Dimitrow E, Ziemer M, Koehler MJ et al., *Sensitivity and Specificity of Multiphoton Laser Tomography for In Vivo and Ex Vivo Diagnosis of Malignant Melanoma*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(7): p. 1752-8.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Aufbau der Haut	4
Abb. 2a Multi-Photonen-Tomograph	21
Abb. 2b Messung am Unterarm	21
Abb. 3 Histologie gesunder Haut	24
Abb. 4 LSM gesunder Haut in 0 μm bis 80 μm Tiefe	25
Abb. 5 Stratum corneum in 0 μm Tiefe	26
Abb. 6 Stratum granulosum in 20 μm Tiefe	26
Abb. 7 Stratum spinosum in 40 μm Tiefe	26
Abb. 8 Stratum basale in 50 μm Tiefe	27
Abb. 9 Dermoepitheliale Junctionszone in 70 μm Tiefe	27
Abb. 10 Dermis in 90 μm Tiefe	27
Abb. 11 Histologie des Basalzellkarzinoms	28
Abb. 12 LSM des Basalzellkarzinoms	29
Abb. 13 MPT-Aufnahmen von (a) gesunder Haut und (b) des BCC	30
Abb.14 Boxplots des Zellkerndurchmessers von gesunder Haut im Stratum granulosum, spinosum und basale, sowie des BCC	31
Abb. 15 Boxplots des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses des Stratum granulosum, spinosum und basale gesunder Haut, sowie des BCC	31
Abb. 16 Boxplots der Zelldichte für gesunde Haut in den drei Schichten Stratum granulosum, spinosum und basale und für BCC	32
Abb. 17 Histologische Aufnahme der aktinischen Keratose	33
Abb. 18 KLSM-Aufnahmen der aktinischen Keratose	34
Abb. 19 MPT in verschiedenen Tiefen von (a) gesunder Haut und (b) AK	35
Abb. 20 Boxplots des Zellkerndurchmessers von AK und gesunder Haut in Stratum granulosum, spinosum und basale	36
Abb. 21 Boxplots des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses von AK und gesunder Haut in Stratum granulosum, spinosum und basale	37
Abb. 22 Boxplots der Zelldichte von AK und gesunder Haut im Stratum granulosum, spinosum und basale	38
Abb. 23 Histologische Aufnahme des spinozellulären Karzinoms	39
Abb. 24 KLSM-Aufnahmen des SCC	40

Abb. 25 MPT-Aufnahmen des SCC in 20, 40, 60 und 80 μm Tiefe	41
Abb. 26 Boxplots des Zellkerndurchmessers von gesunder Haut und SCC	42
Abb. 27 Boxplots des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses von gesunder Haut und SCC ...	42
Abb. 28 Boxplots der Zelldichte von gesunder Haut und SCC	43
Abb. 29 Boxplots des Zellkerndurchmessers von gesunder Haut, AK und SCC	44
Abb. 30 Boxplots des Zellkern-Zytoplasma-Verhältnisses von gesunder Haut, AK und SCC	45
Abb. 31 Boxplots der Zelldichte von gesunder Haut, AK und SCC	45
Abb. 32 Histologische Aufnahme eines malignen Melanoms	46
Abb. 33 Malignes Melanom in 10 μm Tiefe	47
Abb. 34 Malignes Melanom in 30 μm Tiefe	48
Abb. 35 Malignes Melanom in 60 μm Tiefe	48
Abb. 36 Malignes Melanom in 80 μm Tiefe	49
Abb. 37 Malignes Melanom in 110 μm Tiefe	49
Abb. 38 a) Autofluoreszenz in der dermoepidermalen Junktionszone gesunder Haut ..	50
Abb. 38 b) CARS (rot) und Autofluoreszenz (grün) derselben Stelle	50
Abb. 39 a) Autofluoreszenz gesunder Haut im Stratum spinosum in 30 μm Tiefe	51
Abb. 39 b) CARS gesunder Haut im Stratum spinosum in 30 μm Tiefe	51
Abb. 40 a) Autofluoreszenz von Psoriasis in 30 μm Tiefe	52
Abb. 40 b) CARS von Psoriasis in 30 μm Tiefe	52

7. Lebenslauf

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

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marisa Anita Klemp, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Multiphotonentomographische Untersuchung epithelialer Hauttumoren im Vergleich zu Laser-Scan-mikroskopischen Untersuchungen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Berlin, den 9. Februar 2015

Marisa Klemp

9. Anteilserklärung

Ulrich M, Klemp M, Darvin ME, König K, Lademann J, Meinke MC, *In vivo detection of basal cell carcinoma: comparison of a reflectance confocal microscope and a multiphoton tomograph*. J Biomed Opt. 2013. 18(6):61229

Beitrag im Einzelnen: Mitplanung des Studiendesigns, Patientenrekrutierung, Durchführung der Untersuchung mittels Multiphotonentomographie, Durchführung der Bildanalyse bei den mittels Multiphotonentomographie erhaltenen Bilder, Statistische Auswertung der untersuchten Parameter (Zelldichte, Zellkerndurchmesser, Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis), teilweise Anfertigung des Manuskripts

Weinigel M, Breunig HG, Kellner-Höfer M, Bückle R, Darvin ME, Klemp M, Lademann J, König K, *In vivo histology: optical biopsies with chemical contrast using clinical multiphoton/coherent anti-Stokes Raman scattering tomography*. Laser Phys. Lett. 2014. **11** 055601

Beitrag im Einzelnen: Patientenrekrutierung, Mithilfe an den Untersuchungen mittels Multiphotonentomographie und kohärenter Anti-Stokes-Raman-Spektroskopie

submitted: Weinigel, M, Breunig H, Darvin ME, Klemp M, Roewert-Huber J, Lademann J, Koenig K, *Impact of refractive index mismatches on coherent anti-Stokes Raman scattering and multiphoton autofluorescence tomography of human skin in vivo*. Phys Medicine Biol. 2015

Beitrag im Einzelnen: Patientenrekrutierung, Mithilfe an den Untersuchungen mittels Multiphotonentomographie und kohärenter Anti-Stokes-Raman-Spektroskopie

Berlin, den 9. Februar 2015

Marisa Klemp

10. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Lademann, der mir dieses spannende Thema überlassen hat, der mich während meiner gesamten Promotionszeit unterstützte und dessen Tür mir jederzeit für Fragen und Rat offen stand. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung!

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology für ihre Unterstützung bedanken. Hervorheben möchte ich dabei Dr. Maxim Darwin, der mich in die Multiphotonentomographie eingearbeitet hat und auf dessen Hilfe ich mich immer verlassen konnte.

Dann gilt mein Dank Frau Dr. Martina Meinke für ihren Rat vor allem in statistischen und methodischen Fragen.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Martina Ulrich für die Zusammenarbeit und die Unterstützung mit der Laser-Scan-Mikroskopie bedanken.

Ein Dankeschön geht auch an Martin Weinigel für die Beratung und Lösungen bei technischen Problemen des MPT.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Patienten, die sich zu den Untersuchungen mittels MPT und LSM bereit erklärt haben.

Als letztes möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt und gefördert haben und auf die ich mich in jeder Lebenslage verlassen konnte.