

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

**DISSERTATION**

**Qualitativer und quantitativer  
Vergleich zwischen  
dem kLSM „Stratum“ und dem Vivascope® 1500**

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

**Vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charite-Universitätsmedizin Berlin**

**von**

**Julia Krutz  
aus Berlin**

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. Dr.-Ing. J. Lademann**
- 2. Prof. rer. nat. J. Beuthan**
- 3. Prof. Dr. B. Röder**

**Datum der Promotion: 14. 06. 2009**

*Für meine Eltern,  
Dres. Kristina und Reinhard Krutz  
sowie meine Liebsten  
Frank und Lukas*

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Geschichte der Mikroskopie</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Geschichte der Psoriasis</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Aufbau der Haut</b>	<b>13</b>
1.3.1 Epidermis	14
1.3.2 Dermis	15
1.3.3 Subcutis	16
1.3.4 Hautanhangsgebilde	16
1.3.4.1 Haare	16
1.3.4.2 Talgdrüsen	17
1.3.4.3 Schweißdrüsen	17
<b>1.4 Durchblutung der Haut</b>	<b>18</b>
<b>1.5 Benigne Hautveränderungen</b>	<b>20</b>
1.5.1 Narben	20
1.5.2 Melanozytäre Naevi	20
<b>1.6 Malignes Melanom</b>	<b>21</b>
<b>1.7 Psoriasis</b>	<b>22</b>
1.7.1 Einteilung der Psoriasis	23
1.7.2 Epidemiologie der Psoriasis	24
1.7.3 Pathogenese/Histologie der Psoriasis	24
1.7.4 Klinik und Diagnostik der Psoriasis	25
1.7.5 PASI	26
<b>1.8 Untersuchungsmethoden zur Diagnostik von Hauterkrankungen</b>	<b>27</b>
1.8.1 Invasive Methoden	27
1.8.2 Nicht-Invasive Methoden	28
1.8.2.1 Korneometrie	28
1.8.2.2 OCT	29
1.8.2.3 Laser-Doppler-Fluxmetrie	29
1.8.2.4 kLSM	29

---

<b>1.9 Ziel der Arbeit</b>	<b>30</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Substanzen</b>	<b>31</b>
2.1.1 Natriumfluoreszein	31
<b>2.2. Studiendesign für den Vergleich gesunder Hautstrukturen</b>	<b>32</b>
2.2.1 Probandenkollektiv	32
2.2.2 Versuchsdurchführung	33
2.2.2.1 kLSM „Stratum“	33
2.2.2.2 Vivascope®1500	34
<b>2.3 Studiendesign für die Untersuchung der Psoriasis-Patienten</b>	<b>34</b>
2.3.1 Probandenkollektiv	34
2.3.2 Versuchsdurchführung	36
2.3.2.1 kLSM „Stratum“	36
2.3.2.2 Vivascope®1500	37
<b>2.4 Untersuchungsmethoden</b>	<b>37</b>
2.4.1 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie	37
2.4.1.1 Funktionsweise eines konventionellen Mikroskops	38
2.4.1.2 Grundprinzip der konfokalen Mikroskopie	39
2.4.2 kLSM „Stratum“	41
2.4.2.1 Durchführung der Messungen	42
2.4.3 Vivascope®1500	43
2.4.3.1 Durchführung der Messungen	46
<b>2.5 Statistische Auswertung</b>	<b>47</b>
2.5.1 Quantitative Auswertung	48
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Qualitative Auswertung</b>	<b>49</b>
3.1.1 Darstellung der einzelnen gesunden Hautschichten mittels kLSM „Stratum“ und Vivascope®1500	50

3.1.1.1	Stratum corneum	50
3.1.1.2	Stratum granulosum	52
3.1.1.3	Stratum spinosum	53
3.1.1.4	Stratum basale/papillare	54
3.1.1.5	Stratum reticulare	57
3.1.2	Hautanhangsgebilde	58
3.1.2.1	Haare	58
3.1.2.2	Talgdrüsen	59
3.1.2.3	Schweißdrüsen	59
3.1.2.4	Narben	60
3.1.3	Benigne Hautveränderungen	60
3.1.3.1	Melanozytäre Naevi	60
3.1.4	Maligne Hautveränderungen	62
3.1.4.1	Malignes Melanom	62
3.1.5	Untersuchung der Psoriasis vulgaris mittels kLSM „Stratum“ und Vivascope®1500	63
3.1.5.1	Psoriasis vulgaris	63
3.1.5.2	Histologische Besonderheiten	66
<b>3.2</b>	<b>Quantitative Auswertung</b>	<b>68</b>
3.2.1	Auswertung der Daten der gesunden Probanden	68
3.2.1.1	kLSM „Stratum“	68
3.2.1.2	Vivascope®1500	70
3.2.2	Auswertung der Daten der Psoriasis-Patienten	71
3.2.2.1	kLSM „Stratum“	71
3.2.2.2	Vivascope®1500	73

## **4. Diskussion** **80**

<b>4.1</b>	<b>Allgemein</b>	<b>80</b>
<b>4.2</b>	<b>Qualitative Auswertung</b>	<b>81</b>
4.2.1	kLSM „Stratum“	81
4.2.1.1	Hautanhangsgebilde	83
4.2.1.2	NaF	84
4.2.1.3	Untersuchung der Psoriasis-Patienten	85
4.2.1.4	Vergleich kLSM „Stratum“ mit anderen Methoden	86

4.2.2	Vivascope®1500	87
4.2.2.1	Auswertung der Bilder der Psoriasis-Patienten	87
4.2.2.2	Untersuchung der Psoriasis-Patienten	89
4.2.2.3	Vergleich Vivascope®1500 mit anderen Methoden	89
4.2.3	Melanozytäre Naevi und maligne Melanome mittels kLSM „Stratum“ und Vivascope®1500	90
4.2.4	Auswertung der Untersuchungen der Psoriasis-Patienten mittels kLSM „Stratum“ und Vivascope®1500	91
4.2.5	Zusammenfassender Vergleich zwischen dem kLSM „Stratum“ und dem Vivascope®1500	92
<b>4.3</b>	<b>Quantitative Auswertung der Untersuchungen</b>	<b>93</b>
4.3.1	Probanden	93
4.3.2	kLSM „Stratum“	94
4.3.2.1	Auswertung der Daten der gesunden Probanden	94
4.3.2.2	Auswertung der Daten der Psoriasis-Patienten	95
4.3.3	Vivascope®1500	97
4.3.3.1	Auswertung der Daten der gesunden Probanden	97
4.3.3.2	Auswertung der Daten der Psoriasis-Patienten	98
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>104</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>111</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>112</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>113</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
DSC	Dicke des stratum corneums
Emin	minimale Epidermisdicke
Emax.	Maximale Epidermisdicke
kLSM	konfokale Laser-Scan-Mikroskopie
kLSM „Stratum“	konfokales Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“
M, m	männlich
MW	Mittelwert
NaF	Natriumfluoreszein
OCT	Optische Kohärenztomografie
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
W, w	weiblich

# 1. Einleitung

Das Instrumentarium eines römischen Chirurgen aus dem 2. Jahrhundert nach Christus lässt erkennen, dass römische Ärzte zahlreiche Instrumente verwendeten die wir heute in gleicher Form, nur aus anderem Material gebrauchen. Dazu gehören Skalpellle mit auswechselbaren Stahlklingen, chirurgische und anatomische Pinzetten, Haken, Sonden etc. Der römische Enzyklopädist A.C. Celsus beschreibt genau, wie Chirurgen damit unfallchirurgische als auch septische medizinische Eingriffe vornahmen.

Die im Laufe der Zeit zunehmende Technisierung führte zu neuen Untersuchungsmethoden und -Geräten. Diagnostische Hilfsmittel wie das Dermatoskop, Mikroskope oder histologische Untersuchungen sind im klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken. Sie stellen für den Untersuchenden eine sinnvolle Ergänzung bei der Erhebung von Status und Diagnose dar.

Des Weiteren dienen derartige Geräte und Untersuchungen nicht nur der Untersuchung und Sicherung einer Diagnose, sondern können in der Forschung und Entwicklung richtungsweisend für neue Untersuchungsmöglichkeiten und Therapiekonzepte sein.

Das konfokale Laser-Scan-Mikroskop zählt zu den technisch neuartigen Geräten. Seit ca. einem Jahrzehnt wird die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie (kLSM) in der Forschung und Diagnostik angewandt. Mit Hilfe der kLSM eröffnen sich neue Möglichkeiten der histologischen Untersuchung. Sie ermöglicht in vivo Aufnahmen in Echtzeit und eröffnet neue Möglichkeiten u.a. in der Melanomfrüherkennung [1, 2], der histologischen Untersuchung von unklaren klinischen Befunden, der Basaliom- und Spinaliomdiagnostik sowie deren Nachsorge [3,4,5].

Durch die Möglichkeit in vivo Aufnahmen vom Patienten in Echtzeit machen zu können eröffnet sich ein breites Einsatzspektrum. Erste Untersuchungen und Studien über die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie lieferte die Arbeitsgruppe um Rajadhyaksha und Gonzales aus Harvard/Boston bereits 1995 [6]. Den in den Anfangsjahren durchgeführten Untersuchungen über die normale Haut [7,8,9,10] folgte bald der Vergleich der Strukturen zwischen gesunder und kranker Haut mit herkömmlichen Schnitten [11,12]. Es zeigte sich, dass mittels der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie charakteristische histologische Befunde im Vergleich zur kon-

ventionellen histologischen Untersuchung ebenso zu erkennen und diagnostizieren waren [12, 13]. Dies wurde als Grundlage für Untersuchungen und Dokumentationen über verschiedenste Krankheitsbilder, z.B. Psoriasis [12], akute Kontaktdermitis [13], aktinische Keratosen [14], Basaliome [11] und maligne Melanome [15] genutzt.

Es werden zwei Typen von konfokalen Laser-Scan-Mikroskopen unterschieden. Zum einen das auf Reflektanz beruhende konfokale Laser-Scan-Mikroskop, zum anderen das Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop.

Während die Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie in der Medizin vorwiegend für dynamische Verlaufsprozesse und biologische Fragestellungen eingesetzt wird, findet sich die reflektierende Laser-Scan-Mikroskopie vielfach in der Medizin für klinische sowie in der Industrie für materialkundliche Fragestellungen wieder.

Die vorliegende Arbeit soll die Einsatzmöglichkeiten der jeweiligen Mikroskoptypen in Bezug auf den klinischen Alltag und die medizinischen Forschungsmöglichkeiten prüfen und miteinander vergleichen.

Voraussetzung für die Überprüfung der klinischen Einsatzfähigkeit der jeweiligen konfokalen Laser-Scan-Geräte ist die Untersuchung eines ausgewählten Krankheitsbildes. In dieser Arbeit wurde die Psoriasis vulgaris intensiv untersucht und beobachtet. Als chronisch entzündliche Hauterkrankung bietet dieses Krankheitsbild typische histologische Merkmale, welche sich mit den Laser-Scan-Mikroskopen untersuchen und vergleichen lassen.

## 1.1 Geschichte der Mikroskopie

Schon im Altertum wurden dermatologische Beobachtungen und Erfahrungen gesammelt [16].

Erste Grundlagen der Mikroskopie wurden bereits vor 1000 Jahren gelegt. Die Araber sammelten damals bereits Erkenntnisse über den Einsatz von Linsen. Die praktische Verwendung von Linsen als Sehhilfen wurde im 13. Jahrhundert von Roger Bacon (1214-1294) erstmals beschrieben. Die Entwicklung des ersten Mikroskops geschah mit großer Wahrscheinlichkeit um 1590. Hans Jansen und sein Sohn Zacharias Jansen (1580-1638) bauten Mikroskope mit drei- bis sechsfacher Vergröße-

rung. Weitere Grundlagen der Mikroskopie wurden von Galileo Galilei (1564-1642) der sein Fernrohr als Mikroskop benutzte, Cornelius Drebbel (1572-1634) und Rene Descartes (1596-1650) gelegt. Robert Hooke (1635-1703) konnte 1665 erste wissenschaftliche Beobachtungen machen und veröffentlichen. Er prägte den heute üblichen Begriff der Zelle.

Der Holländer van Leeuwenhoek (1632-1723) baute erstmalig ein Mikroskop mit 266 facher Vergrößerung. 1858 gelang Rudolph Virchow die Entdeckung der „Zellular Pathologie“. Sein Vortrag an der Charité mit dem Titel „Die Zellulärpathologie in ihrer Begründung und in ihrer Auswirkung auf physiologische und pathologische Gewebelehre“ sollte zum Meilenstein in der medizinischen Geschichte werden [17]. 1880 gelang es Paul Ehrlich in seinem veröffentlichtem Beitrag „Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Leukozyten“ sich dem Blutzellsystem auf neuartige Weise zu nähern und wegweisende Entdeckungen zu machen [18].

Die Erfindung des ersten Elektronenmikroskops 1933 von Ernst Ruska, wurde 1986 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Ebenso erhielten die Forscher Binning und Rohrer in Zürich für die Konstruktion des Raster-Tunnel-Mikroskops 1986 den Nobelpreis. Das Mikroskop dient auch heute noch als wichtiges diagnostisches Untersuchungsinstrument bei der Erkennung, Beurteilung und Differenzierung von Krankheiten und Symptomen.

## 1.2 Geschichte der Psoriasis

Die Haut ist mit einer Fläche von 1,5-1,8 m<sup>2</sup> und einem Gewicht von ca. 7 kg das größte Organ des Menschen. Als äußere Körperoberfläche ist sie die unmittelbare Verbindung zwischen dem Menschen und seiner Umwelt. Die Haut ist somit den direkten Umwelteinflüssen ausgesetzt [19]. Pathologische Hautveränderungen sind in der Regel mit dem bloßem Auge erkennbar. Die typischen Veränderungen der Psoriasis vulgaris sind zum Beispiel als rötlich schuppige Plaques auf der Hautoberfläche offensichtlich zu erkennen. Dies kann für die Patienten nicht nur eine physische sondern auch eine psychische Belastung bedeuten.

Mit dem aus der Psoriasis resultierendem Leidensdruck der Patienten sehen sich Dermatologen täglich konfrontiert. Dauerhafte Therapieerfolge sind gerade bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen kaum zu erzielen. Es gibt bis heute ge-

gen Krankheiten wie Psoriasis und Neurodermitis keine Behandlungsmöglichkeiten, die eine endgültige und somit kurative Heilung der Krankheit herbeiführen. Dennoch gibt es viele Möglichkeiten der Erzielung einer lokalen Abheilung. Häufig verordnete Therapeutika sind Teerpräparate. Schon seit der Antike bekannt [16], ist es für viele Kinder und Erwachsene dank der wenigen Nebenwirkungen eine sinnvolle Option. In der Psoriasisbehandlung oft eingesetzt und bis heute das effizienteste Antipsoriatikum ist Cignolin, auch als Dithranol bekannt. Besonders bei schweren Ausprägungen der Psoriasis findet es seit ca. 90 Jahren Anwendung. 1916 durch Unna und Galewski eingeführt, ist es bis heute Standardtherapie [20]. Ebenso sind seit mehreren Jahrzehnten Folsäureantagonisten in der Psoriasisbehandlung auf dem Markt erhältlich. Die Einführung des Vitamin D mit ersten Anfängen in den dreißiger Jahren, sowie der Einsatz von Fumarsäure seit 1959 als auch die Entwicklung des Ciclosporins und der Retinoide in den siebziger Jahren gelten als Meilensteine in der Psoriasisbehandlung [21].

Nach Jahrzehnten relativen Stillstands in der Erforschung und Entwicklung innovativer Psoriasisprodukte, ergaben sich in den letzten Jahren neue Therapieansätze. Aktuelle Erkenntnisse zur Pathogenese der Psoriasis führten zur Einführung pathogeneseorientierter Therapeutika. So genannte „Biologicals“ (großmolekulare Proteine, Fusionsproteine und Antikörper) [22,23] aber auch niedermolekulare Substanzen, wie Makrolide und nichthyperkalzämische Calcitriole [24] werden inzwischen in der Dermatologie vielfach als Therapeutika eingesetzt. Die genauen Ursachen der Psoriasis sind bis heute ungeklärt. Dennoch kann mit Hilfe der auf immunologischen Erkenntnissen basierenden Medikamente, Patienten geholfen werden.

Schwierigkeiten in der Anwendung einiger Medikamente, z.B. Glukokortikoide, ergeben sich oft aus der notwendigen Risiko-Nutzen Abschätzung. So geht der längerfristige Einsatz von Steroiden bekanntermaßen mit einer erheblichen Glukokortikoid assoziierten Hautatrophie einher [25]. Aufgrund der hohen Effektivität und dem schnellen Wirkungseintritt überwiegt die topische Anwendung von Steroidpräparaten weltweit im Vergleich mit anderen Antipsoriatika.

Der Einschätzung der Ausmaße von Hautdefekten kommt im Zuge der Entscheidung für oder gegen eine bestimmte Therapie eine große Bedeutung zu.

Konfokale Laser-Scan-Mikroskope stellen eine Möglichkeit der Untersuchungen

dar, welche die Ausmaße von Hautdefekten und von histologischen Merkmalen objektiv und zeitnah erfassen.

Die konfokale Laser-Scan-Therapie bietet die Möglichkeit, angewandte Therapiekonzepte im Verlauf zu beobachten. Daraus können Rückschlüsse für die weitere Therapieplanung und -dauer erfolgen.

### 1.3 Aufbau der Haut (Integumentum commune)

Voraussetzung für das Verständnis der Hautmikroskopie und der sich daraus ergebenden klinischen Interpretation ist eine genaue Kenntnis der Strukturen und der Anatomie der Haut.

Die Haut lässt sich in drei Hauptschichten untergliedern: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhautfettgewebe).

Die genannten Hauptschichten untergliedern sich in mehrere Unterschichten. Die Epidermis besteht aus dem stratum corneum, dem stratum granulosum, stratum spinosum und stratum basale. Die Dermis (Lederhaut) unterteilt sich in das stratum papillare und das stratum reticulare.

Weiterhin sind der Haut Hautanhangsorgane zuzuordnen, z.B. Haarfollikel, Talgdrüsen und Schweißdrüsen.

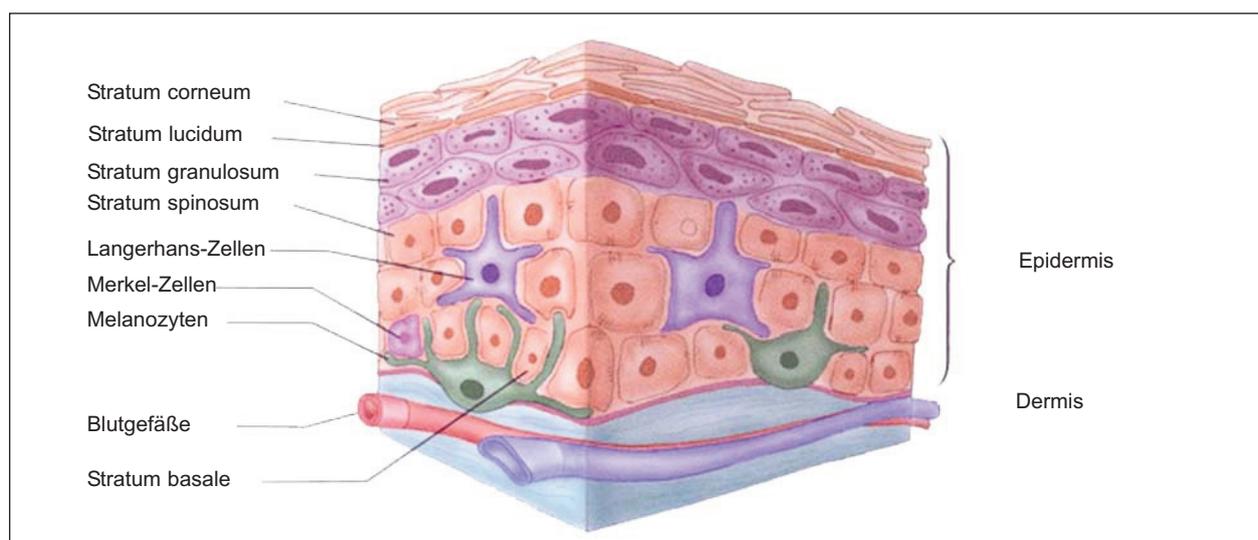


Abb.1: Aufbau der Haut

### 1.3.1 Epidermis

Die oberste und äußerste Hautschicht ist die Epidermis. Sie dient als Schutzschicht und der Verbindung zur Außenwelt [19].

Die Epidermis wird von Epithelzellen, den Keratinozyten, gebildet. Sie besteht aus einem mehrschichtig verhorntem Plattenepithel. Die Dicke variiert je nach Region zwischen 50  $\mu\text{m}$ - 100  $\mu\text{m}$ . Die Epidermis besteht von apikal nach basal aus folgenden Schichten: dem stratum corneum, dem stratum granulosum, dem stratum spinosum und dem stratum basale.

Die Neubildung von Epithelzellen erfolgt in den zwei untersten Schichten der Epidermis, dem stratum basale und stratum spinosum. Die sich anschließende Verhornung der Keratinozyten nimmt nach apikal immer mehr zu, so dass im stratum corneum, der oberflächlich gelegenen Schicht, die Keratinozyten absterben und sich somit als Schuppen darstellen [19].

Das oberflächlich liegende stratum corneum besteht aus platten kernlosen Korneozyten. Die ca. 10-20  $\mu\text{m}$  dicke Hornhautschicht besteht aus einer Vielzahl von Schichten, wobei die Dicke je nach Körperregion variiert. So ist das Stratum corneum an den Handinnenflächen als auch an den Fußsohlen erheblich dicker als am Augenlid [19].

Ausgelöst durch lysosomale Enzyme gehen die Zellorganellen der Keratinozyten zugrunde. Die Korneozyten, welche als Schuppen von der Haut abgelöst werden, bilden abgestorbenes Gewebe.

Das sich anschließende stratum granulosum zeigt stark abgeflachte Keratinozyten mit degenerativen Kernveränderungen und Verminderung der Organellen. Das relativ dünne stratum granulosum besteht aus 3-5 Schichten. Innerhalb der Zellen befinden sich viele stark verdichtete Tonofibrillen, die Keratohyalin und membranumschlossene Granula enthalten. Das Keratohyalin ist ein histidinreiches Protein, welches an den Ribosomen gebildet wird und die Zellen ganz ausfüllen kann. Diese Granula besitzen keine Membran.

Das sich auf dem stratum basale befindliche stratum spinosum (Stachelzellschicht) besteht aus mehreren Schichten und nimmt einen großen Teil der Epidermis ein. Die aus meist polygonal kubisch geformten Keratinozyten bestehende Schicht ent-

hält an der Oberfläche eine große Anzahl von Zytoplasmaausläufern. An deren Spitze befinden sich Desmosomen. Die Desmosomen haben ein stachelartiges Aussehen und verbinden Nachbarzellen miteinander.

Die Basalmembran verbindet die Epidermis mit der Dermis. Das stratum basale ist einschichtig und besteht aus hochprismatischen Epithelzellen. Deren Längsachse steht senkrecht zur Hautoberfläche. Das Hautpigment Melanin wird in der Basalschicht von Melanozyten gebildet und durch Endozytose von den umgebenden Basalzellen aufgenommen. Weiterhin finden sich hier Langerhans-Zellen (Makrophagen) und Merkel-Zellen (Tastzellen). Bei den Langerhans-Zellen handelt es sich um antigenpräsentierende Immunzellen. Diese können in der Haut wandern, können sie aber ebenso wieder verlassen. Die als Merkel-Zellen bekannten Mechanorezeptoren findet man vorwiegend in mechanisch stark beanspruchten Arealen der Haut, vorwiegend in Handflächen und an Fußsohlen [19].

Die Grenzzone zwischen Epidermis und Dermis wird als dermoepidermale Junctionszone bezeichnet. Hier finden hohe mechanische Beanspruchungen statt, denen die anatomisch histologischen Gegebenheiten angepasst sind. Ein mehrgliedriges Haltesystem sichert dieses sensible Gebilde.

Das Haltesystem besteht aus der Zellmembran der basalen Keratinozyten mit der lamina lucida (hier sind Adhäsionsmoleküle und Oberflächenmoleküle enthalten), der Basallamina, auch lamina densa genannt und dem sogenannten sublaminärem Raum unterhalb der lamina densa, der Ankerfibrillen enthält.

Die mechanische Verankerung der Epidermis mit der Dermis erfolgt über die Hemidesmosomen, den Ankerfilamente und den Ankerfibrillen.

### **1.3.2 Dermis**

Die ca. 1-2 mm dicke Dermis [19] schließt sich direkt der Epidermis an. In der Dermis verlaufen die hautversorgenden Gefäße und Nerven. Sie ist ein fibroelastisches Gewebe. Es besteht aus lose ineinander vernetzten Kollagenfaserbündeln. Dadurch besitzt die Dermis eine hohe Reißfestigkeit und Elastizität. In der gesamten Dermis finden sich ca. 10 Arten von Kollagenen, besonders Typ I und III [19].

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte und Anordnung der Fasern läßt sich die Un-

terhaut in zwei Schichten unterteilen. Zum einen in ein weiches stratum papillare, das der Basalschicht direkt anliegt, die Papillen entstehen lässt und die Versorgung der Epidermis sichert, sowie zum anderen in die faserreiche Schicht, dem stratum reticulare, in dem Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenäste enthalten sind.

### 1.3.3 Subcutis

Die Dicke der Subcutis wird mit 1-2 mm angegeben [19]. Sie ist zum größten Teil aus Fettgewebe aufgebaut. Die hauptsächliche Funktion der subcutanen Hautschicht besteht in der Wärmeisolierung. Des Weiteren dient sie als mechanisches Schutzpolster und Energiespeicher. Bindegewebige Septen des Fettgewebes, in denen Nerven und Gefäße verlaufen, kommunizieren mit der Dermis.

### 1.3.4 Hautanhangsgebilde

Als Hautanhangsgebilde werden alle Strukturen bezeichnet, die aus der Dermis und Epidermis entstehen. Zu ihnen zählen die Haare mit Haarfollikeln, Talg- und Schweißdrüsen sowie die Finger- und Zehnnägel. Funktionell dienen diese vorwiegend der Thermoregulation und dem Schutz der Haut.

#### 1.3.4.1 Haare

Die Behaarung des Menschen besteht aus sog. Terminalhaar (Kopfhaare und Barthaare) sowie den sog. Vellushaaren (Haare die den restlichen Körper bedecken, mit Ausnahme der Hand und der Fußsohlen, die gänzlich ohne Haare ausgestattet sind) [26].

Das Haar besteht aus dem Haarschaft (Scapus pili), der Haarwurzel (Radix pili), der epithelialen Haarzwiebel (Bulbus pili) und der bindegewebigen Haarpapille (Papilla pili). Zusammen bilden Bulbus, Papille und das umgebende Bindegewebe den Haarfollikel [26].

Der oberste Teil des Follikels ist erweitert und wird aufgrund dieser trichterförmigen Erweiterung als Infundibulum bezeichnet. In diesen münden die Talg- bzw. apokri-

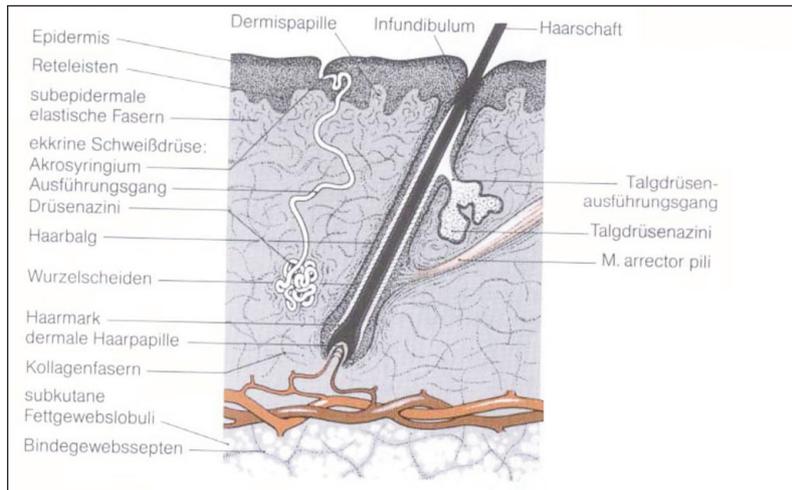


Abb. 2: Aufbau eines Haarfollikels (nach Jung, 1991)

nen Drüsen (siehe Abb. 2) [27]. Der Haarmuskel, *M. arrector pili*, entspringt unterhalb der Einmündung der Talgdrüse in die Wurzelscheide.

#### 1.3.4.2 Talgdrüsen (*Glandulae sebaceae*)

Talgdrüsen kommen am gesamten Integument vor. Sie befinden sich ca. 0,5 mm unterhalb der Hautoberfläche und münden in das Infundibulum des Haarfollikels. Als Schutz vor Austrocknung der Haare und der Haut geben sie Talg (Sebum), ein Gemisch aus Triglyceriden, Fettsäuren und Wachsestern, an den Haarfollikel. Sezernierung erfolgt holokrin, d.h. die gesamte Zelle samt dem Sekret wird ausgeschieden [27].

#### 1.3.4.3 Schweißdrüsen (*Glandulae sudoriferae merocrinae*)

Es wird zwischen den zu einem Drittel vorkommenden ekkrinen und den zu zwei Dritteln vorkommenden apokrinen Schweißdrüsen unterschieden. Die apokrinen Drüsen kommen vorwiegend in der Achsel- und Perigenitalgegend vor. Sie münden in Haarfollikel und sind adrenerg innerviert. Apokrine Drüsen werden auch als Duftdrüsen bezeichnet, da sie bei Tieren Duftstoffe mit pheromonartiger Wirkung produzieren [28].

Ekkrine Schweißdrüsen finden sich am gesamten Körper, sind von Haarfollikeln unabhängig und werden cholinerg innerviert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des Wärme Gleichgewichts durch die Verdunstung des sezernierten Schweißes, dienen durch Abgabe von Schweiß und seinen Bestandteilen aus Protei-

nen, Aminosäuren, Immunglobulinen und harnpflichtigen Substanzen als Ausscheidungsorgan und erfüllen somit eine exkretorische Funktion. Zusätzlich wird die Hornschicht durch konstante Hydrierung geschmeidig gehalten [28].

Anatomisch lassen sich die Schweißdrüsen, in der Grenzschicht zwischen Dermis und Epidermis liegend, in einen aus zwei Schichten bestehenden Ausführungsgang und ein sekretorisches Endstück unterteilen. Sie sind zweischichtige tubuläre Drüsen. Die innere Schicht besteht aus sezernierenden Zellen und wird von einer äußeren Schicht mit kontraktiven Myoepithelzellen umgeben [28].

## 1.4 Durchblutung der Haut

Für die alleinige Blutversorgung der Haut ist die Dichte der Gefäße überproportional groß. Notwendig ist dies jedoch für die Anpassung an innere und äußere Bedingungen. Bei Bedarf (z.B. Fieber) kann die Durchblutung auf das 10 bis 20fache gesteigert werden.

Die relativ komplizierte Gefäßversorgung der Haut besteht aus verschiedenen Gefäßanteilen. Zu diesen gehören Arterien, Arteriolen und Kapillaren, als auch Venolen und Venen.

Das Blutgefäßsystem der Haut besteht aus einem Zu- und Ableitungssystem und dem mikrovaskulären Gefäßnetz. Letzteres ist in zwei horizontale Plexus, einen oberflächlichen, den *Rete arteriosum subpapillare* und einen tiefen weitmaschigen Plexus, den *Plexus arteriosum dermidis profundus* gegliedert. Vom an der Grenzfläche zwischen papillärer und retikulärer Dermis befindlichen oberflächlichen Plexus, dem *Rete arteriosum subpapillare*, laufen vertikale Kapillarschlingen und Arteriolen in die Papillenspitzen [29].

Der *Plexus arteriosum dermidis profundus* befindet sich an der Grenze zwischen Dermis und Subkutis. Er versorgt v.a. die Hautanhangsorgane. Zwischen oberflächlichem und tiefem Plexus verlaufen kandelaberartig kleine Arterien, die als vertikale Verbindungsgefäße zwischen beiden Plexus fungieren.

Ähnlich verhält es sich bei der anatomischen Beschaffenheit der Venen. Unterhalb der Papillen befindet sich der *Plexus venosus subpapillaris* und an der Grenze zwischen Subcutis und Dermis, der *Plexus venosus dermidis profundus* [29].

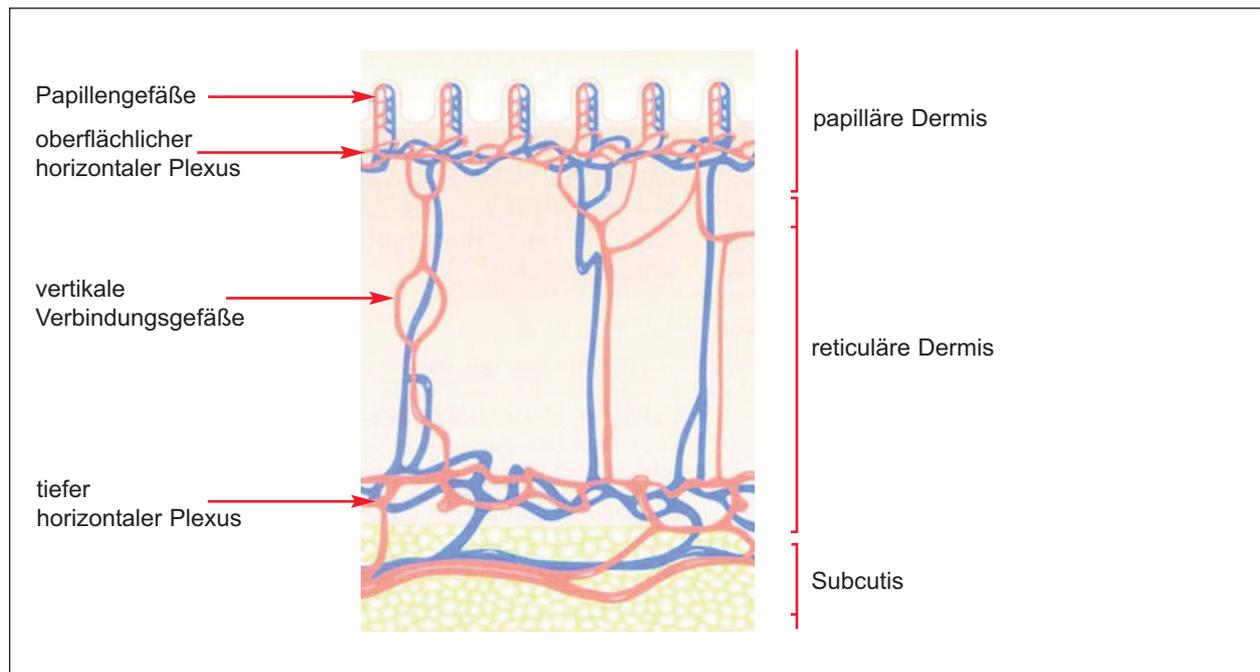


Abb.3: Gefäßsystem der Haut (nach Ackermann, 1997)

Die arteriellen und venösen Strukturen im oberen und im tieferen Plexus stehen über arteriovenöse Anastomosen in Verbindung.

Chronisch krankhafte Veränderungen der Haut, wie z.B. bei der Psoriasis vulgaris, bedingen oft Veränderungen der einzelnen Gefäßkomponenten als auch im Gefäßsystem.

1992 untersuchten Barton et al. insgesamt 30 Patienten. 20 Probanden litten an Psoriasis vulgaris. 10 gesunde Probanden wurden als Kontrollgruppe untersucht. Es erfolgten Biopsieentnahmen bei allen 30 Probanden. Die Arbeitsgruppe konnte signifikante Unterschiede in der Durchblutung zwischen den gesunden Hautarealen und den entzündlich veränderten Arealen feststellen [30].

Auch Auer und Bacharach beschäftigten sich mit dieser Problematik und untersuchten im Jahre 1994 zwanzig Psoriasis Patienten. Sie verglichen u.a. betroffene psoriatisch veränderte Areale am Unterschenkel mit gesunder Haut mit Hilfe der Laser-Doppler- Imaging Methode. Sie stellten fest, dass die papillären Gefäße in den psoriatisch veränderten Arealen fast doppelt so groß waren, wie in den gesunden Hautarealen. Sie konnten eine höhere Durchblutung in den erkrankten Arealen nachweisen. Ebenso konnten sie einen erhöhten Blutfluss als auch eine Gefäßdilatation als Ursache für die erhöhte Durchblutung nachweisen [31].

## 1.5 Benigne Hautveränderungen

### 1.5.1 Narben (Cicatrix)

Narben entstehen durch Zerstörung des kollagenen Netzwerkes der retikulären Dermis. Narbengewebe kann hypertroph, atroph oder nur als unregelmäßige Verhärtung tastbar sein. Atrophe Narben können einzelne Schichten oder die gesamte Dicke der Haut betreffen. Eine atrophierte Epidermis zeigt sich durch zigarettenpapierartige Fältelung. Eine atrophierte Dermis ist durch Hervortreten der Hautgefäße gekennzeichnet. Ein muldenartiges Einsinken der Haut charakterisiert eine Atrophie der Subkutis [19].

### 1.5.2 Melanozytäre Naevi

Schon in den ersten Lebensjahren entwickeln sich melanozytäre Naevi, deren Anzahl kontinuierlich bis zum Erwachsenenalter ansteigt [32]. Es werden kongenitale sowie erworbene melanozytäre Naevi unterschieden. Die Erworbenen lassen sich noch in gewöhnliche und atypische melanozytäre Naevi untergliedern.

Melanozytäre Naevi sind gutartige Tumoren, die durch Anhäufung von Melanin in den Melanozyten und/oder Naevuszellen charakterisiert sind. Sie sind die häufigsten gutartigen Neubildungen der Haut [33].

Atypische oder auch als dysplastische Naevi bezeichnete melanozytäre Naevi werden nach bestimmten Kriterien eingeteilt. Tabelle 1 zeigt in Gegenüberstellung die klinischen Kriterien für die Einteilung eines atypischen melanozytären Naevus und die ABCD-Regeln für die Einteilung eines malignen Melanoms.

	Nävus	Dysplastischer Nävus	Melanom
<b>Farbe</b>	rosa, braun, schwarz homogen	braun, schwarz unterschiedl. Felder	braun, blau, schwarz inhomogen
<b>Kontur</b>	rund-oval	bizarr	unregelmäßig
<b>Blutung</b>	keine	keine	leicht
<b>Wachstum</b>	Pubertät	Pubertät und später	nach der Pubertät rasch
<b>Ärztliches Vorgehen</b>	Beratung	Beratung und regel- mäßige Beobachtung Exzisionsbiopsie	Exzision mit Sicherheitsabstand

Tabelle 1

Die Anzahl der melanozytären Naevi gilt als der wichtigste Risikofaktor für die Melanomentwicklung. Ab einer Anzahl von 50 Naevi erhöht sich das Melanomrisiko um den Faktor 4 bis 5, ab 100 Naevi steigt der Faktor auf das 8- bis 10fache. Im Vergleich mit Kontrollpersonen weisen Melanompatienten fast doppelt so viele melanozytäre Naevi auf [34].

Die frühzeitige Erkennung eines dysplastischen Naevus bzw. eines malignen Melanoms ist eines der größten Herausforderungen der Dermatologie [35]. Bereits Miller und Ackermann zeigten 1992 eine Sensitivität für die klinische Erkennung von dysplastischen Naevi von 65 % bis 80 % [36]. Die frühzeitige klinische Differenzierung von benignen und malignen Hautveränderungen ist Grundvoraussetzung für eine optimale Therapie.

Melanozytäre Naevi können verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen. Anfangs ist die Lentigo simplex zu erkennen – eine mittel-bis dunkelbraune rundovale Makula von wenigen Millimetern Durchmesser. Histologisch zeigt sich eine basale Melanozytenhyperplasie.

Im weiteren Verlauf entsteht der melanozytäre Naevus vom Junktionstyp, der durch eine regelmäßige runde oder ovale Makula mit mittel- bis dunkelbrauner Pigmentierung gekennzeichnet ist. Histologisch finden sich an der dermoepidermalen Grenzzone (Junktionszone) Naevuszellnester.

Der sich anschließend entwickelnde melanozytäre Naevus vom Compound-Typ ist eine runde bis ovale flache Papel, die hellbraun bis dunkelbraun pigmentiert ist. Neben den oben bereits genannten junctionalen Naevuszellnestern finden sich hier zusätzlich nestförmig angeordnete Naevuszellformationen in der Dermis [37].

## 1.6 Malignes Melanom

Das maligne Melanom geht von den Melaninzellen aus und ist ein hochgradig maligner Tumor. Die frühzeitige Metastasierung erfolgt auf lymphogenem und hämatogenem Weg.

Die Morbidität hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Waren es in den 30er Jahren noch 1-2/100.000 Einwohner, so waren es in den 80er Jahren schon

7-8/100.000 Einwohner in Mitteleuropa, die erkrankten [38]. Die genauen Ursachen für diese Entwicklung sind noch ungeklärt.

Europäer entwickeln Melanome vorwiegend am Stamm und den Extremitäten, während sie bei den Afrikanern und Asiaten eher an den unpigmentierten Arealen (Fußsohlen, Handinnenfläche) auftreten. Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer [38].

Es werden verschiedene Melanomtypen unterschieden. Das primär noduläre maligne Melanom entsteht auf gesunder Haut oder aus einem pigmentierten Naevuszellnaevus. Es macht ca. 16% der malignen Melanome aus. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Das noduläre Melanom vergrößert sich innerhalb kurzer Zeit. Aufgrund des schnellen Wachstums hat das noduläre Melanom die schlechteste Prognose aller Melanomtypen.

Mit ca. 70% hat das superfiziell spreitende Melanom den größten Anteil an den malignen Melanomen in Europa. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr. Aufgrund des langsamen Wachstums hat es eine gute Prognose.

Etwa 5% der malignen Melanome sind Lentigo-Maligna-Melanome. Sie entwickeln sich auf dem Boden einer Lentigo maligna und können Jahre bis Jahrzehnte als Präkanzerosen bestehen. Bevorzugte Lokalisationen sind sonnenexponierte Regionen (Gesicht, Hals, Hände). Der Altersgipfel liegt über dem 60. Lebensjahr.

Der verbleibende prozentuale Anteil der malignen Melanome entsteht im Bereich der Phalangen, der Handinnenflächen und Fußsohlen oder im Bereich der Schleimhäute. Diese Melanome fallen unter die akrolentiginösen malignen Melanome. Histologisch dem Lentigo-Maligna-Melanom ähnlich, ist es jedoch um ein vielfaches aggressiver [38].

## 1.7 Psoriasis

Die Psoriasis, auch Schuppenflechte genannt, ist eine genetisch bedingte, schubweise verlaufende, chronisch rezidivierende Erkrankung, die die Haut und Gelenke betreffen kann. Die genauen Ursachen sind bis heute nicht geklärt.

Schon in Schriften vor Christi Geburt werden schuppenbildende Erkrankungen, welche die Haut röten können, beschrieben.

Die Bezeichnung Psoriasis kommt von dem griechischen Wort „psora“, was Krätze oder Aussatz bedeutet. Bis ins 19. Jahrhundert wurde die Schuppenflechte mit der Lepra gleichgesetzt. 1809 verfassten die Engländer Robert Willan (1715-1812) und Thomas Bateman (1778-1821) eine präzise Beschreibung über das klinische Erscheinungsbild der Schuppenflechte, klassifizierten sie jedoch als *Psora leprosa* und *Lepra graecorum*. Erst der österreichische Dermatologe Ferdinand von Hebra (1816-1880) beschrieb in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts erstmals den Unterschied zwischen Psoriasis und Lepra. Seitdem werden die beiden Dermatosen klinisch klar voneinander getrennt [39].

Etwa 2-5% der Bevölkerung haben die Disposition, auf bestimmte Reize mit Psoriasis herden zu reagieren. Auslösende Faktoren können z.B. Infekte, Medikamente, Streß, Alkohol oder eine Schwangerschaft sein. Bemerkenswerte Unterschiede gibt es zwischen den geografischen Regionen und ethnischen Bevölkerungsgruppen. In Europa und den USA geht man von einer Prävalenz von ca. 2% und ca. 5 Millionen Erkrankten aus, wobei die Variationsbreite zwischen den einzelnen europäischen Ländern gering ist (Großbritannien 1,6%, Norwegen 1,4%, Kroatien 1,55 %). Südliche Länder zeigen eine niedrigere Prävalenz als nördlichere [40].

### 1.7.1 Einteilung der Psoriasis

Die Psoriasis lässt sich in 3 verschiedene Gruppen einteilen. Die Psoriasis vulgaris, die Psoriasis pustulosa und die Psoriasis arthropathica.

Diese Arbeit beschäftigt sich verstärkt mit der Psoriasis vulgaris.

Klinisch lässt sich die Psoriasis vulgaris in mehrere Untertypen gliedern:

- Plaque-Typ-Psoriasis, typisch für die chronisch stabile Psoriasis (die am häufigsten auftretende Form der Psoriasis),
- Psoriasis guttata (eruptive Psoriasis), mit vorwiegender Ausprägung an Rumpf und proximalen Extremitäten,
- Psoriasis vom seborrhoischen Typ auch „oberflächliche Psoriasis“ genannt,
- Psoriasis inversa, mit Befall der sonst freien Intertrigostellen, Genitoanalregion, Hand- und Fußflächen,

- Psoriasis der Kopfhaut,
- chronisch-invertierte Psoriasis und
- die erythrodermische Psoriasis.

### 1.7.2 Epidemiologie der Psoriasis

Das Auftreten der Erkrankung erstreckt sich vom frühen Säuglingsalter bis zum hohen Erwachsenenalter. Etwa  $\frac{3}{4}$  aller Psoriasis-Patienten zeigen erste psoriatische Herde vor dem 40. Lebensjahr. Später Erkrankte weisen einen Häufigkeitsgipfel um die 6. Lebensdekade auf. Entscheidend für den Beginn und die Ausprägung ist die genetische Disposition. Umso häufiger Familienmitglieder erkrankt sind, desto früher beginnt das psoriatische Erscheinungsbild beim Betroffenen.

Die Psoriasis lässt sich je nach Erkrankungsalter in einen Früh- und Spättyp unterteilen. Der Frühtyp (Typ I) zeigt einen schwerwiegenden Verlauf der Psoriasis mit ausgedehnten Körperherden und häufigem Wiederauftreten nach Therapie. Im Gegensatz dazu ist die Psoriasis vom Spättyp (Typ II) plaqueförmig konstant und ohne große Rezidivneigung. Tabelle 2 zeigt eine Gegenüberstellung der beiden Typen.

	Typ I	Typ II
<b>Alter</b>	Beginn vor dem 40. Lebensjahr	Beginn nach dem 40. Lebensjahr
<b>Familienanamnese</b>	positiv	negativ
<b>Assoziierte genetische Erkrankungen</b>	besonders HLA-Cw 6	keine
<b>Klinischer Verlauf der Psoriasis</b>	eher schwerwiegend	eher stabil

*Tabelle 2: Typen der Psoriasis (nach Christopheres, 2003)*

### 1.7.3 Pathogenese / Histologie der Psoriasis

Im Vordergrund der Hauterkrankung steht die Entzündung, die mit einer Rötung der Haut einhergeht. Aktivierte Lymphozyten finden sich in der Epidermis und oberen Dermis. Typisch für die Psoriasis ist die vermehrte Anzahl von Mastzellen und Makrophagen sowie der Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Epidermis [41].

Die ausgeprägte Entzündungsreaktion führt zu einer Verdickung der Epidermis. Histologisch finden sich lang ausgezogene Reteleisten, die den hyperplastisch veränderten Papillarkörpern aufsitzen (Abb. 4). Weiterhin kommt es zur Ausbildung einer Para- und Hyperkeratose mit Verlust des stratum granulosum. Die Keratinozyten unterliegen einer hohen mitotischen Aktivität. Die Zellneubildungsrate erhöht sich um das 10fache. Die Folge ist eine Hyperkeratose und eine verstärkte Schuppung an der Oberfläche.

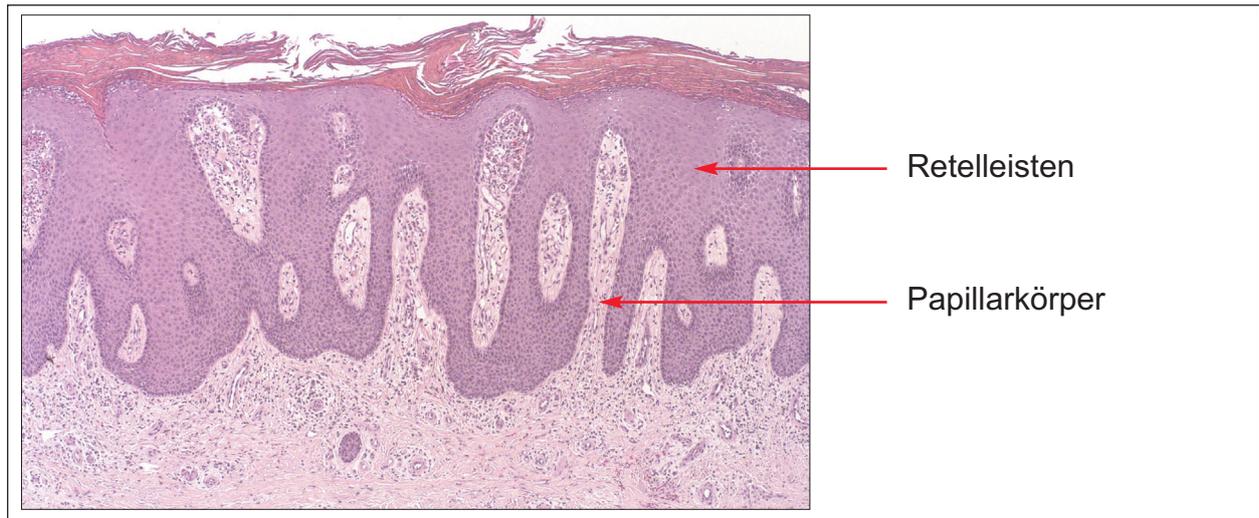


Abb.4: Histologie Psoriasis (HE-Färbung)

Der genaue pathogenetische Mechanismus für die Entstehung der Psoriasis ist bislang unklar.

Bisherige Erkenntnisse zeigen, dass dysregulierte T-Lymphozyten [42] sowie andere Zellen des Immunsystems, wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen [43] sowie Wechselwirkungen zwischen löslichen und gebundenen Zytokinen und Chemokinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Psoriasis spielen [44]. Trotz der Umsetzung neuester immunologischer Erkenntnisse in neue und selektive Therapieverfahren bleibt offen, ob es sich um primär immunologisch vermittelte oder eher primäre kutane Veränderungen handelt, die die Erkrankung hervorrufen [45].

### 1.7.4 Klinik und Diagnostik der Psoriasis

Klinisch zeigen sich drei wesentliche Merkmale: Erythembildung, Schuppung und

Verdickung der Haut. Diagnostische Hilfen bieten kleine „Hauttests“. Exemplarisch sind die drei wichtigsten Hauttests hier angeführt:

Das Auspitz-Phänomen wird als positiv bewertet, wenn es nach Abheben von mehreren Schuppenlagen zu punktförmigen Blutungen kommt. Diese auch als Phänomen des letzten Häutchens bekannte Erscheinungsform, gibt Auskunft über die sehr oberflächlich gelegenen papillären Gefäße.

Das Köbner-Phänomen wird als positiv bezeichnet bei Auftreten von Plaques aufgrund exogener Reize.

Auch die Betrachtung der Fingernägel kann dem Untersucher richtungsweisende Informationen geben. Multiple kleine Eindellungen in der Nagelplatte (Tüpfelnägel), gelblich-bräunliche Flecken (Ölfleck) sowie eine subunguale Hyperkeratose weisen ebenfalls auf eine Psoriasis-Erkrankung hin.



*Abb.5: Klinisches Bild der Schuppenflechte*

### **1.7.5 PASI-Psoriasis Area und Severity Index**

Der PASI wurde 1978 von Frederiksson und Petterson 1978 [21] im Rahmen der Studien über synthetische Retinoide eingeführt. Mit dessen Hilfe lassen sich der Schweregrad der Erkrankung und Veränderungen während der Therapie feststellen. Obwohl mehrfach diskutiert [46, 47, 48], ist der PASI der am häufigsten angewandte Index für die klinische Beurteilung der Psoriasis.

Zur Berechnung der betroffenen Hautfläche werden Kopf und Stamm sowie obere und untere Extremitäten herangezogen. Diese Körperareale entsprechen jeweils 10, 20, 30 bzw. 40% der Gesamtkörperoberfläche. Je nach Hautveränderung wird jedem Hautareal ein numerischer Wert zwischen 0 und 9 zugeordnet. Um den Schweregrad der Psoriasis zu erfassen, werden drei Zielsymptome beurteilt. Erythem, Infiltration und Desquamation. Entsprechend einer Skala von 0-4 werden diese bewertet. 0 bedeutet komplettes Fehlen von Hauterscheinungen, 4 schwere Beteiligung. Mit Hilfe der oben beschriebenen Werte wird der PASI-Score ermittelt werden. Er kann sich zwischen einem Wert von 0,0 (keine Läsionen) bis 72,0 (komplette Erythrodermie schwerster Ausprägung) bewegen.

## **1.8 Untersuchungsmethoden zur Diagnostik von Hauterkrankungen**

### **1.8.1 Invasive Methoden**

Die am häufigsten genutzte invasive Methode in der Dermatologie ist die histologische Untersuchung. Grundvoraussetzung für histologische Untersuchungen ist die Entnahme von Gewebeproben. Diese kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Je nach Größe und Lokalisation der Läsion kann dies als Hautstanzung bei kleiner Läsion oder als ovaläre Exzision bei großen Läsionen erfolgen. Die oben angeführten Biopsieentnahmen finden unter sterilen Kautelen statt. Bei der Hautstanzung wird mittels einer runden Stanze ein Hautzylinder durch sämtliche Hautschichten bis in die Subcutis ausgeschnitten. Der Vorteil liegt in der schnellen Durchführung und einem kosmetisch guten Ergebnis. Ovaläre Exzisionen werden mit dem Skalpell durchgeführt. Sie sind in der Durchführung aufwendiger, jedoch besser histologisch zu beurteilen.

Wichtige histologische Untersuchungsmethoden sind die Anfärbungen des Biopsats mit Routine- und Spezialfärbungen, Immunfluoreszenz (direkt und indirekt) sowie enzym- und immunhistochemische Methoden.

Zu den Routineanfärbungen gehören u.a. die HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin Färbung) sowie die van Gieson-Färbung. Zellkerne werden mittels der HE-Färbung blauschwarz bis violett angefärbt und zytoplasmatische Bestandteile rosa bis rot.

Die van Gieson-Färbung zur Darstellung von Bindegewebe und Muskulatur lässt Zellkerne schwarzbraun, das Zytoplasma hellbraun, Muskelgewebe gelb und Kollagenfasern rot erscheinen.

Der histologische Nachweis einer Psoriasis erfolgt grundsätzlich über die HE-Färbung. Abb. 4 zeigt das typische histologische Bild einer Psoriasis nach HE-Färbung.

## 1.8.2 Nichtinvasive Methoden

An erster und wichtigster Stelle zur Beurteilung von Hautzuständen steht die sensorische Wahrnehmung des Untersuchers. Das Anschauen und Betasten von Hautveränderungen ist in der Dermatologie richtungsweisend. So können entzündliche Hauterkrankungen wie Psoriasis und Neurodermitis oft durch gezielte Anamnese, Beobachtung des Krankheitsverlauf und eine klinische Beurteilung diagnostiziert werden. Die Qualität der Untersuchung hängt dabei entscheidend von der Erfahrung des Untersuchers ab. Quantitative und objektive Beschreibungen und Untersuchungsmethoden gewinnen im dermatologischen Alltag sowie in der experimentellen Forschung zunehmend an Bedeutung. Hier soll eine kurze Übersicht über neueste technische Untersuchungsmöglichkeiten gegeben werden.

### 1.8.2.1 Korneometrie

Die Messung des Feuchtigkeitsgehalts der Hornschicht kann mittels Korneometrie erfasst werden. Die Korneometrie basiert auf dem Prinzip des Kondensatorprinzips. Ein Plattenkondensator wird mit konstantem Druck auf die Haut aufgebracht. Zwischen Haut und Kondensator befindet sich eine dünne Folie. Das in der Hornhautschicht befindliche Wasser beeinflusst die Kapazität des Kondensators. Mit zunehmender Hydratation der Epidermis zeigt das Korneometer eine proportionale Veränderung. Die Messtiefe des Korneometers beträgt ca. 20-40  $\mu\text{m}$ . Die Sensitivität ist bei trockener Haut höher als bei feuchter Haut [49]. Besonderen Einsatz findet die Korneometrie in der Testung von topisch aufgetragenen Substanzen.

### **1.8.2.2 Optische Kohärenztomografie (OCT)**

Die Optische Kohärenztomografie ermöglicht das Erfassen von morphologischen Veränderungen und basiert auf der Michelson-Interferometrie. Es wird die phasengerechte Interaktion von kohärenten Lichtwellen in einem streuendem Medium gemessen. Die Eindringtiefe beträgt ca. 1mm und es können Strukturen dargestellt werden, die kleiner als 10  $\mu\text{m}$  sind [50].

### **1.8.2.3 Laser-Doppler-Fluxmetrie**

Die Laser-Doppler-Fluxmetrie ermöglicht das Erfassen und Messen von vaskulären Veränderungen in der Haut. Das Gewebe wird mit monochromatischem Laserlicht bestrahlt und die reemittierte Strahlung durch einen Photodetektor erfasst. Das Laserlicht wird von den in den Gefäßen sich bewegenden Erythrozyten mit einer geschwindigkeitsabhängigen Frequenzänderung reflektiert. Dieses sogenannte „Flux-Signal“ wird durch die Erythrozytengeschwindigkeit und die Anzahl der Erythrozyten beeinflusst. Es können relative Veränderungen des Blutflusses im Zeitverlauf gemessen werden [51].

### **1.8.2.4 Konfokale-Laser-Scan-Mikroskopie (kLSM)**

Eine weitere nichtinvasive Untersuchungsmöglichkeit bietet wie eingangs schon beschrieben seit einigen Jahren die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie. Seit Einführung der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie eröffnen sich neue diagnostische wie auch experimentelle Möglichkeiten. Es entwickelten sich zwei verschiedene Module der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie. Zum einen die Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie beruhend auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals welches von einem Fluoreszenzfarbstoff abgegeben wird, zum anderen die auf Reflexion beruhende Laser-Scan-Mikroskopie.

## 1.9 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der hier dargestellten Untersuchungen sollte das konfokale Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ mit dem auf Reflektanz beruhenden Laser-Scan-Mikroskop „Vivascope<sup>®</sup> 1500“ verglichen werden. Als Vergleichskriterium wird die jeweilige Funktionsweise, die Anwenderfreundlichkeit, sowie die daraus resultierende Darstellungsmöglichkeit der Geräte zugrunde gelegt.

Die Funktionsweise des konfokalen Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopes „Stratum“ unterscheidet sich gegenüber dem auf Reflektanz beruhende Laser-Scan-Mikroskop „Vivascope<sup>®</sup> 1500“ u.a. dadurch, dass dem Patienten für die optimale Untersuchung ein Fluoreszenzfarbstoff injiziert werden muss. Bei dem auf Reflektanz beruhenden Laser-Scan-Mikroskop „Vivascope<sup>®</sup> 1500“ ist die Injizierung eines Fluoreszenzfarbstoffes nicht notwendig.

Die Anwendungsmethode des auf Reflektion beruhenden Laser-Scan-Mikroskops „Vivascope<sup>®</sup> 1500“ unterscheidet sich grundsätzlich gegenüber dem konfokalen Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“. Mit Hilfe eines Halteringes wird der Mikroskopkopf auf dem Hautareal fixiert. Durch die Fixierung des Mikroskopkopfes wird eine optimale, punktuelle Untersuchung auf dem Hautareal sichergestellt. Eine Fixierung bei dem konfokalen Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ ist nicht möglich, so dass minimale Verschiebungen des Handstückes auf dem Hautareal zu Untersuchungswiederholungen führen kann.

Beide Geräte verfügen über einen Laser in Kombination mit einer EDV-Einheit. Die über den Laser ermittelten Daten werden direkt an die Computereinheit weitergeleitet und in Bilddaten umgewandelt. Auf den jeweiligen Monitor erscheint die Darstellung der jeweiligen Hautareale in Bildform im schwarz-weiß Modus. Die unterschiedlichen Darstellungsweisen der Laser bedingen unterschiedliche Bildgrößen, Unterschiede in der Tiefenschärfe als auch in der Qualität der Bilder.

Ziel der Arbeit ist ein Vergleich beider Geräte nach oben bereits genannten Kriterien herbeizuführen. Die Vor- und Nachteile beider Geräte sollen im klinischen Alltag, in der Aussagekraft der Bilder sowie in der Bediener- sowie Probandenfreundlichkeit anhand von gesunden Probanden als auch anhand benigner und maligner Hautveränderungen sowie Psoriasis-Patienten dargestellt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Substanzen

#### 2.1.1 Natriumfluoreszein

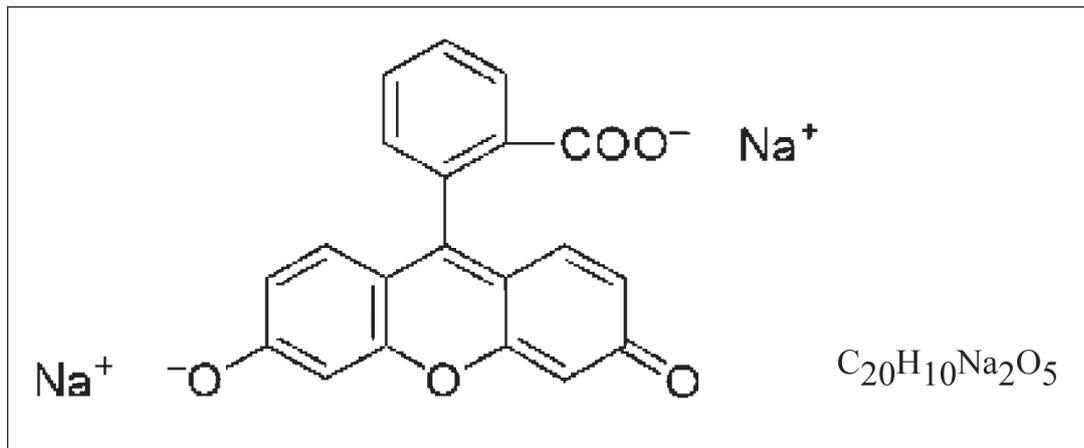


Abb. 6: Strukturformel Natriumfluoreszein

Das wasserlösliche Natriumsalz des Fluoreszeins (siehe Abb. 6) wird als Uranin bezeichnet. Es ist ein gelber Farbstoff, der unter UV- und Tageslicht gelblich grün fluoresziert.

In der Medizin wird der relativ unbedenkliche Lebensmittelfarbstoff Natriumfluoreszein schon seit langem als Farbstoff-Diagnostikum eingesetzt. Wichtigstes Einsatzgebiet ist die Hornhautdiagnostik [52].

Natriumfluoreszein gehört zur Gruppe der Xanthenfarbstoffe. Bei großer Verdünnung mit Wasser findet eine Dissoziation in Natrium-Kationen und Fluoreszein-Anionen statt. Letztere besitzen die stärksten fluoreszierenden Eigenschaften aller bekannten Stoffe (z.B. Rhodamin, Chinin-Hydrogensulfat, Cumarine) [53].

Natriumfluoreszein hat ein Molekulargewicht von 376,27 g/mol. Das Absorptionsmaximum liegt nach Anregung mit Licht bei einer Wellenlänge von 490 nm.

Für die Untersuchungen der Haut wurde in diesen Studien eine 0,2%ige Natriumfluoreszeinlösung benutzt (Natriumfluoreszein SE<sup>®</sup>, Alcon, Frankreich). Bisher sind mit Ausnahme seltener allergischer Reaktionen keine Neben- und Wechselwirkungen von Natriumfluoreszein bekannt [54, 55].

## 2.2 Studiendesign für den Vergleich gesunder Hautstrukturen

Die Studie wurde im Zeitraum von Januar 2006 bis August 2006 in dem Bereich für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Medizinischen Fakultät Charité, Berlin durchgeführt.

Für die Teilnahme an der Studie galten folgende Ein- bzw. Ausschlußkriterien. Zu den Einschlusskriterien zählten u.a. Alter über 18 Jahre, teilnehmende Personen sind über Inhalt und Wesen der Studie informiert und eine schriftliche Einwilligungserklärung liegt vor. Ausschlusskriterien waren u. a. Schwangerschaft, Stillzeit, Kinder, nicht eigenverantwortlich handeln könnende Personen und Patienten, deren Genesung durch die Untersuchung beeinträchtigt werden könnte.

Das Studiendesign und die Versuchsdurchführung wurden von der Ethikkommission der Universitätsklinik Charité genehmigt.

### 2.2.1 Probandenkollektiv

Das Probandenkollektiv umfasste zwölf gesunde Probanden kaukasischer Abstammung mit einem Durchschnittsalter von 33 Jahren (range 27 bis 54 Jahren). Davon waren fünf männlichen und sieben weiblichen Geschlechts. Alle Personen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung sowohl klinisch gesund als auch subjektiv beschwerdefrei. Es bestanden keine Hauterkrankungen und die zu untersuchenden Areale waren nicht mit Pflegeprodukten vorbehandelt.

Es herrschten für alle Untersuchungen konstante Bedingungen. Sie wurden von der Untersucherin immer am gleichen Ort mit identischen Geräten und unter gleichen Raumtemperaturen (21°C) durchgeführt.

Die Einteilung der Probanden in die entsprechenden Hauttypen erfolgte nach Fitzpatrick [56].

Hauttyp	Sonnenbrand	Bräunung
I	immer	nie
II	immer	selten
III	selten	immer
IV	nie	immer(Süd-Europa)
V	mäßig pigmentiert	(Südamerika)
V	stark pigmentiert	(Afrika)

*Tabelle 3:  
Definition der Hauttypen  
(nach Fitzpatrick, 1988)*

Es wurden 12 gesunde Probanden an verschiedenen Körperstellen mit dem Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ als auch mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 untersucht.

	Hauttyp	Geschlecht	Rechter Unterarm	Narbe	Pigmental
Proband 1	II	w	x	x	x
Proband 2	II	w	x		x
Proband 3	III	w	x		
Proband 4	II	w	x	x	x
Proband 5	II	w	x		
Proband 6	I	m	x	x	
Proband 7	I	m	x		x
Proband 8	II	m	x		
Proband 9	II	w	x		
Proband 10	II	w	x		x
Proband 11	II	m	x		x
Proband 12	II	m	x		x

*Tabelle 4:  
Übersicht über die  
untersuchten gesunden  
Probanden*

## 2.2.2 Versuchsdurchführung

### 2.2.2.1 kLSM „Stratum“

Der Versuchsablauf gestaltete sich bei allen Untersuchungsarealen (rechter Unterarm, Pigmentmal und/oder Narbe) in der gleichen Art und Weise.

Vor der Untersuchung wurde das zu untersuchende Areal mit Softasept N (Hersteller B. Braun, Melsungen AG) desinfiziert. Anschließend wurden ca. 0,1 ml Natriumfluoreszein mit einer Sterican<sup>®</sup> Kanüle (Stärke 20, Firma B. Braun, Melsungen

AG) intradermal injiziert. Nach zusätzlicher topischer Natriumfluoreszein-Applikation auf das Untersuchungsareal und einer Einwirkzeit von ca. 30 Sekunden, erfolgte das Aufsetzen des Laserstabs. Die Einstellung des Tiefenscan geschieht über ein Rädchen am distalen Ende des Handstücks.

Mikroskopische Aufnahmen am rechten Unterarm sind vom stratum corneum bis zum stratum papillare möglich. Es wurden alle Hautschichten des Untersuchungsareals am rechten Unterarm bei jedem Probanden untersucht und dokumentiert.

### 2.2.2.2 Vivascope<sup>®</sup> 1500

Das Vivascope<sup>®</sup> 1500 (Firma Lucid, Rochester, USA) ist ein auf Reflektanz beruhendes Infrarot A Laser-Scan-Mikroskop. Eine spezielle Vorbereitung der Patienten und der Untersuchungsareale ist nicht nötig.

Es erfolgte zuerst das Auftragen einer ca. daumennagelgroßen Menge Ultraschallgel auf das zu untersuchende Areal. Anschließend wurde mittels doppelseitigem Klebepflaster (3M, Neuss, Deutschland GmbH) der Haltering fixiert. Auf die Innenfläche des Halterings wurde erneut Ultraschallgel aufgetragen. Das Vivascope<sup>®</sup> 1500 wurde dann in den Haltering eingerastet, und per Rechner der Laser gestartet. Es wurde der Nullpunkt definiert. Anschließend wurde auf Höhe des stratum corneums mittels *Vivablock*<sup>®</sup>-Funktion eine Region ausgewählt und diese dann per *Vivastack*<sup>®</sup> automatisch in die Tiefe verfolgt. Der Abstand zwischen den einzelnen „Scans“ betrug während der gesamten Untersuchungsphase im *Vivastack*<sup>®</sup>-Modus 3,17 µm.

## 2.3. Studiendesign für die Untersuchung der Psoriasis-Probanden

### 2.3.1 Probandenkollektiv

Es wurden 15 Patienten mit einer Psoriasis vulgaris untersucht. Die Gruppe umfasste drei Frauen und zwölf Männer mit einem Durchschnittsalter von 48 Jahren (range 34 bis 66 Jahre).

Für die Teilnahme an der Studie galten folgende Ein- bzw. Ausschlußkriterien. Zu

den Einschlusskriterien zählten u.a. Alter über 18 Jahre, teilnehmende Personen sind über Inhalt und Wesen der Studie informiert und eine schriftliche Einwilligungserklärung liegt vor. Ausschlusskriterien waren u. a. Schwangerschaft, Stillzeit, Kinder, nicht eigenverantwortlich handeln könnende Personen und Patienten, deren Genesung durch die Untersuchung beeinträchtigt werden könnte.

Alle Probanden wurden mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 untersucht. Das Einverständnis zur Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop „Stratum“ gaben sechs von den Probanden.

Die Ethikkommission der Universitätsklinik Charité genehmigte das Studiendesign und die Versuchsdurchführung.

Unten angeführte Tabellen 5 und 6 geben einen Überblick über die untersuchten Patienten mit Psoriasis vulgaris und deren untersuchten Areale mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 und dem Fluoreszenzmikroskop „Stratum“.

	Hauttyp	Geschlecht	Alter in Jahren	PASI	Betroffene Areale	Untersuchte Areale
Patient 1	II	M	55	18,5	Stamm, Kopf, Arme	re. UA
Patient 2	II	M	65	21,5	Beine, Stamm, Kopf Arme	li. UA
Patient 3	I	W	34	15,2	Unterarme	li. UA
Patient 4	III	M	47	23,1	Beine, Stamm, Kopf beide Arme	li. UA
Patient 5	II	M	45	25,6	Arme	li. Ellenbogen li. UA
Patient 6	II	M	46	16,7	Beine, Arme	li. UA
Patient 7	I	W	35	23,5	Arme, Bein	li. UA
Patient 8	II	M	48	12,4	Beine, Arme, Kopf	li. UA
Patient 9	II	M	45	13,6	Arme, Beine, Stamm, Kopf	li. UA/ Ellenbogen
Patient 10	II	M	49	25,2	Beine, Arme, Kopf Kopf	re. UA
Patient 11	II	M	44	22,0	Arme, Beine, Stamm	re. UA
Patient 12	I	M	34	14,6	Arme, Beine, Stamm Kopf	li. UA
Patient 13	I	W	52	16,4	Arme, Kopf	li. UA
Patient 14	II	M	56	35,3	Arme, Beine, Stamm Kopf	re. UA
Patient 15	II	M	62	18,5	Arme, Kopf	re. UA

Tabelle 5: Psoriasis-Patienten, Vivascope<sup>®</sup> 1500

	Hauttyp	Geschlecht	Alter in Jahren	PASI	Untersuchte Areale
Patient 1	II	M	55	18,5	re. UA
Patient 2	II	W	34	21,5	li. UA
Patient 3	II	M	65	15,2	li. UA
Patient 4	III	M	47	23,1	li. UA
Patient 5	II	M	45	25,6	li. UA
Patient 6	II	W	52	16,4	li. UA

*Tabelle 6:  
Psoriasis-Patienten,  
kLSM „Stratum“*

## 2.3.2 Versuchsdurchführung

Wichtigste Voraussetzung für mikroskopische Untersuchungen sind schuppenfreie Hautoberflächen. Abgestorbene Korneozyten bilden eine undurchdringbare Barriere, die Laser-Scan-mikroskopisch nicht durchdrungen werden kann.

Alle 15 an Psoriasis erkrankten Probanden wurden bereits ambulant vorbehandelt und kamen mit fast schuppenfreien Psorias-Plaques zur Aufnahme in die Tagesklinik. Eine exzplizite Ablösung der Schuppen wurde somit nicht mehr notwendig. Die Erkrankung war bei allen Probanden mindestens seit 4 Jahren bekannt. Die erste Untersuchung fand am Aufnahmetag in der Tagesklinik statt. Weitere Untersuchungen fanden in wöchentlichen Abständen statt. Es wurden alle 15 Probanden über einen Zeitraum von drei Wochen beobachtet und mittels Vivascope® 1500 untersucht. Untersuchungen mit dem kLSM „Stratum“ erfolgten über einen Zeitraum von zwei Wochen.

Bei der Psoriasis handelt es sich um eine chronische Entzündung der Haut mit spezifischen Charakteristiken. Dazu gehören u.a. Hyperkeratosen, Parakeratosen, eine verbreiterte Epidermis und dilatierte Gefäße. Ziel der Untersuchungen war die Beurteilung beider konfokaler Laser-Scan-Methoden im Hinblick auf die qualitative und quantitative Darstellbarkeit der genannten spezifischen Merkmale der Psoriasis.

### 2.3.2.1 kLSM „Stratum“

Untersuchungen mit dem kLSM „Stratum“ konnten an sechs Probanden durchgeführt werden. Der Ablauf ähnelte dem der gesunden Probanden. Es wurden mikroskopische Aufnahmen nach topischer und intradermaler Injektion von NaF digital

aufgezeichnet. Zunächst erfolgte die intradermale Injektion, anschließend erfolgte die Applikation von Natriumfluoreszein auf die zu untersuchende erkrankte Hautläsion. Nach einer Einwirkzeit von ca. 30 Sekunden und dem Abtupfen des Kontrastmittel-Tropfens wurde der Laserstab des Fluoreszenzmikroskops „Stratum“ auf dem Areal manuell fixiert. Über das distal am Handstück befindliche Rädchen konnte die Eindringtiefe des Lasers verändert werden.

Die Injektion wurde von den Probanden gut toleriert.

### 2.3.2.2 Vivascope<sup>®</sup> 1500

Das Vivascope<sup>®</sup> 1500 ermöglicht Untersuchungen ohne Vorbereitungen des Patienten und ohne zeitlichen Vorbereitungsaufwand.

Im Untersuchungsablauf gab es keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu den gesunden Probanden. Nach Inbetriebnahme des Gerätes wurde nach Auftragen von Ultraschallgel auf das betroffene Areal, der Haltering per doppelseitigem Klebepflaster auf der Haut fixiert, das Vivascope<sup>®</sup> 1500 in diesen eingerastet und per Rechner der Laser gestartet. Es wurde ebenso wie bei gesunden Probanden der Nullpunkt definiert, per *Vivablock*<sup>®</sup> eine gezielte Region ausgewählt und diese per *Vivastack*<sup>®</sup> Funktion in der Z-Ebene verfolgt. Die manuell und individuell festlegbaren Abstände des Scannens im *Vivablock*<sup>®</sup> und *Vivastack*<sup>®</sup>-Modus entsprachen denen der bei den Gesunden angewendeten Abstände (*Vivablock*<sup>®</sup> 2 mm x 2 mm, *Vivastack*<sup>®</sup> 3,17 µm).

## 2.4. Untersuchungsmethoden

### 2.4.1 Konfokale-Laser-Scan-Mikroskopie in vivo

Das Prinzip der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie entwickelte Marvin Minsky bereits 1955 und meldete es 1957 als Patent an [57]. Jedoch erst mit dem Einsatz leistungsfähiger Computer und der Entwicklung der digitalen Bildverarbeitung war diese Technologie, ca. 30 Jahre später, in sämtlichen Bereichen der Wissenschaft, Forschung und Industrie nutzbar. Erste Aufnahmen konfokaler Bilder wurden 1979 veröffentlicht [58].

Die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie ermöglicht nicht invasive Untersuchungen der Haut bis in die Dermis. Auf diese Weise können zelluläre und nukleäre Mikrostrukturen in dünnen Schichten *in vivo* abgebildet und eine sogenannte optische Biopsie durchgeführt werden. Aufgrund der in Echtzeit ablaufenden Untersuchung sind Beurteilungen dynamischer Prozesse, z.B. des Blutflusses, möglich.

### 2.4.1.1 Funktionsweise eines konventionellen Mikroskops

Zum besseren Verständnis sei hier zunächst das Grundprinzip der konventionellen Mikroskopie erklärt.

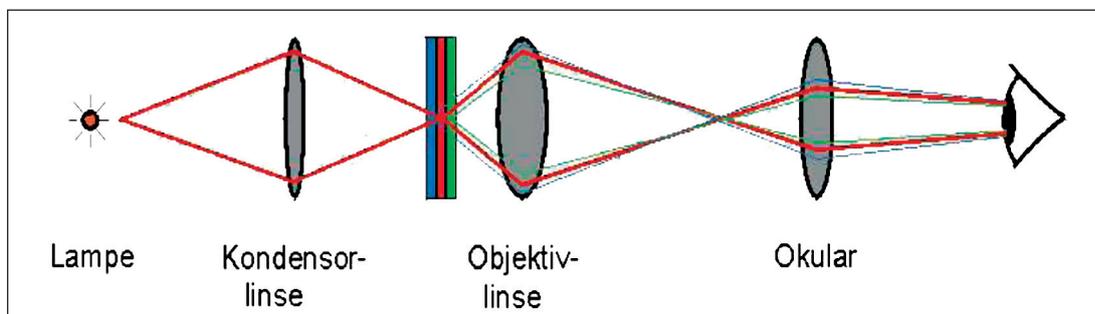


Abb. 7: Aufbau eines konventionellen Mikroskops

Beim konventionellen Lichtmikroskop wird Licht durch eine Kondensorlinse auf das Objekt fokussiert. Das vom Objekt ausgehende Licht wird über eine Objektivlinse in eine Zwischenebene fokussiert und anschließend über die Okularlinse betrachtet. Dabei wird nicht nur Licht aus der Brennebene des Objektivs sondern auch Licht aus Bereichen außerhalb der Brennebene sichtbar (blaue und grüne Linien). Ist bei der konventionellen Mikroskopie die z-Ausdehnung (Tiefenausdehnung) größer als die wellenoptische Tiefenschärfe angibt, kommt es zur Überlagerung von fokussiertem und unfokussiertem Licht und durch den dadurch erhöhten Streulichtanteil zu einer Kontrastabnahme. Es entstehen Unschärfen und eine räumliche Auflösung ist daher nur eingeschränkt möglich. Des Weiteren kommt es bei simultaner Beobachtung von Mehrfachfärbungen zur farblichen Vermischung der Bildinformation aus den beteiligten Kanälen. So können mit der konventionellen Mikroskopie nur dünne Schichten von Präparaten beurteilt werden.

### 2.4.1.2 Grundprinzip der konfokalen Mikroskopie

Im Gegensatz zur herkömmlichen Lichtmikroskopie wird bei der konfokalen Mikroskopie das Licht, das nicht in der Brennebene fokussiert wurde, ausgeblendet. Die Ausleuchtung des Objekts wird durch eine Lochblende (A) beschränkt (siehe Abb. 8). Eine zweite Lochblende (C) beschränkt das Sichtfeld auf einen Punkt. Durch diese Lochblende trifft das Licht auf einen Detektor. Dabei handelt es sich meist um eine Photo-Multiplier-Röhre (PMT) oder Avalanche-Photo-Diode (APD). Beide Blenden und der Punkt des Objektes liegen in der Brennebene konfokal. Die Durchmesser der Blenden werden so klein gewählt, dass Licht, welches aus dem Bereich des Objektes kommt, aber nicht in der Brennebene liegt, durch Lochblende (C) ausgeblendet wird.

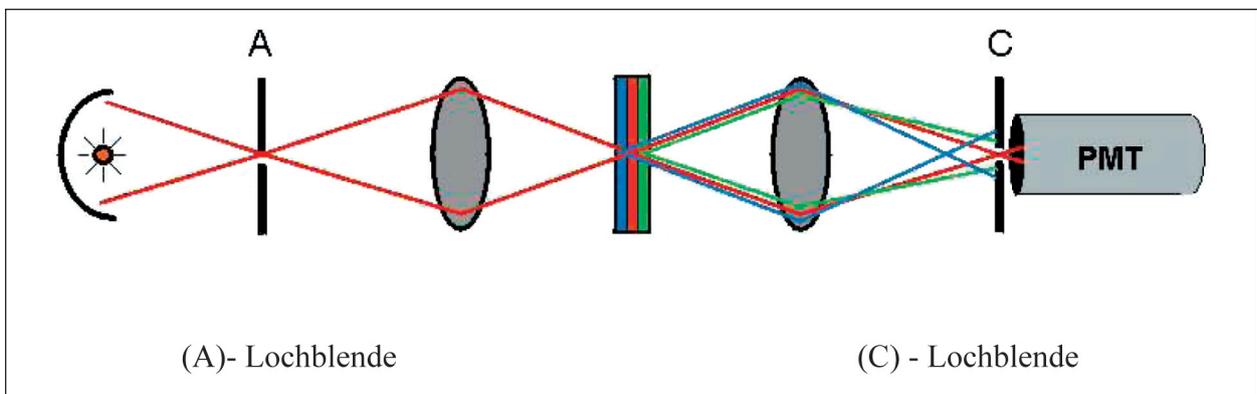


Abb. 8: Aufbau eines konfokales Mikroskop

Aufgrund der Lochblende (C) kann mit dieser Methode nur ein Bildpunkt erfasst werden. Um das gesamte Objekt zu untersuchen, muss es daher gerastert werden (stage scanning). Je nach Art des konfokalen Mikroskops kann dieses Abtasten auf zwei unterschiedlichen Wegen geschehen. Zum einen durch Strahlabtasten (beam scanning). Das Objekt bleibt fixiert und das Beleuchtungslicht wird auf den zu scannenden Punkt gelenkt. Wichtig ist, dass sich der Detektionsweg parallel zum Beleuchtungsweg ändert. Zum anderen kann der Strahlengang fixiert und das Objekt verschoben werden (sample scanning). Es entstehen durch beiden Methoden optische Schnitte, die aus verschiedenen Ebenen (Schichtdicken) des Präparates aufgenommen werden können.

Aus dicken Proben können so dünne Schichten abgebildet werden. Die bei der konventionellen Mikroskopie durch dicke Präparate (Objekte) entstehenden Nachteile

bleiben hier unberücksichtigt. Die bei der konfokalen Mikroskopie erhaltenen und gescannten Daten werden vom Rechner dann zu einem vollständigem Bild zusammengesetzt. Es entstehen Informationen die eine dreidimensionale Rekonstruktion möglich machen.

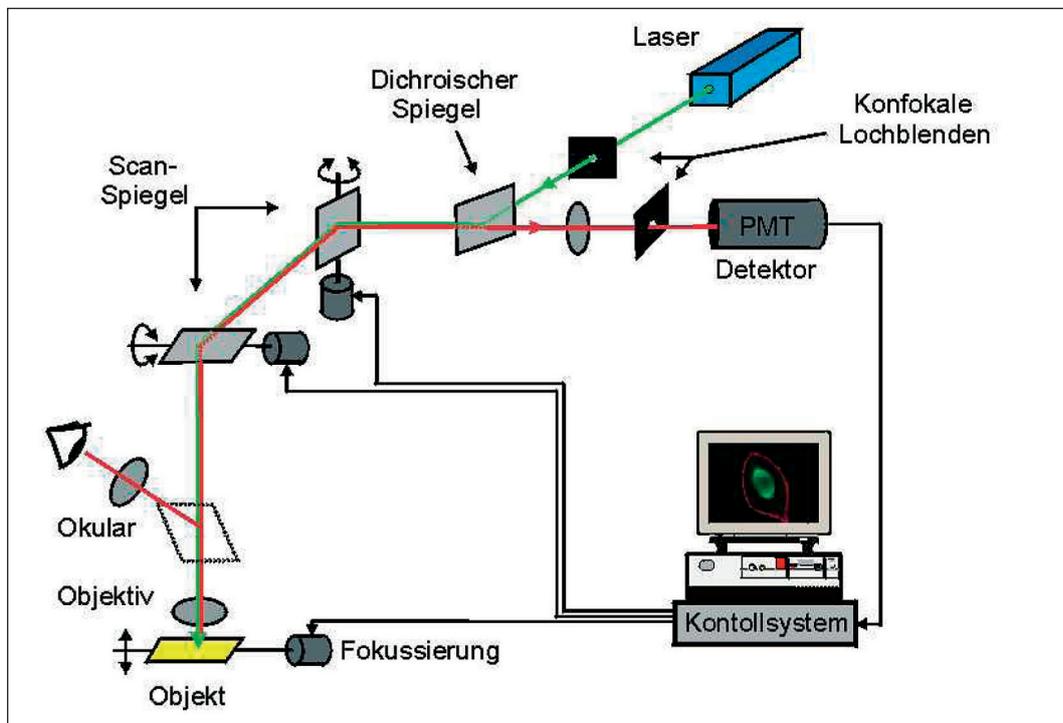


Abb. 9: Aufbau eines konfokalen Laser-Scan-Mikroskops

Wie bereits aufgeführt, basiert das Prinzip der konfokalen Mikroskopie auf der Anordnung von zwei Lochblenden in einer Ebene, wodurch optische Informationen, die nicht aus der Fokalebene kommen, zweifach unterdrückt und somit nicht detektiert werden. Dies führt zu einem Bild mit nur noch minimalen Unschärfen. Abbildung 9 stellt schematisch den Aufbau eines Laser-Scan-Mikroskops dar. Der in der Abbildung vom Laser ausgehende grüne Strahl muß auf verschiedene Punkte des Untersuchungsmaterials gerichtet werden können. Zwei Scan-Spiegel sind für dieses Abrasten notwendig, einer für die Punkte innerhalb der X-Achse (Punkte in einer Zeile) und einer für die Y-Richtung (Zeilen des Bildes). Über zwei Stellmotoren im Rechner können die Positionen der Scan-Spiegel via Monitor gesteuert werden. Vom untersuchten Objekt wird nun je nach Laser-Scan-Mikroskop die Emission des fluoreszierenden Kontrastmittels oder die Reflektanz der untersuchenden Fläche mittels Detektor gemessen und von der EDV-Station verarbeitet (rote Linie).

Aus der gemessenen Fluoreszenz bzw. Reflektanz jedes Punktes errechnet der Computer anschließend ein Bild.

Es werden zwei verschiedene Systeme der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie unterschieden, zum einen die fluoreszierende und zum anderen die reflektierende Methode. Reflektierende Laser-Scan-Mikroskope (z.B. Vivascope<sup>®</sup> 1500) nutzen die vorhandenen unterschiedlichen Mikrostrukturen und deren unterschiedlichen Brechungsindex.

Der Brechungsindex kennzeichnet die Brechung des Lichts beim Übergang in ein transparentes Medium und ist das Verhältnis zwischen Phasengeschwindigkeit des Lichtes  $c_0$  im Vakuum und seiner Phasengeschwindigkeit  $c$  im Medium. Diese physikalische Größe hat keine Einheit und ist somit dimensionslos [59].

Alle Substanzen besitzen einen eigenen Brechungsindex. Durch die Schwankungen im Brechungsindex kommt es zu einer Kontrastierung.

Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskope basieren im Gegensatz zu Reflektanz-Mikroskopen auf Messung eines Fluoreszenzsignals, welches durch externe Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes produziert wird. Natriumfluoreszein als Kontrastmittel mit einem Absorptionsmaximum bei 490 nm Wellenlänge wird durch den im Fluoreszenz-Laser-Scan eingebauten Argon-Laser optimal angeregt und die dabei entstehende Emission kann gemessen werden.

Je nach Untersuchungsziel und ausgewähltem konfokalem Laser-Scan-Mikroskop sind unterschiedliche Strukturen in unterschiedlichen Qualitäten und Quantitäten beurteilbar (siehe auch unter Kapitel Ergebnisse).

### **2.4.2 kLSM „Stratum“**

Das konfokale Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ (Optiscan Ltd., Melbourne, Australien) kann für beide oben genannten Modi verwendet werden. Zur Darstellung der Hautschichten ist jedoch nur der Fluoreszenzmodus einsetzbar.

Für die Entstehung von aussagekräftigen Bildern mit dem kLSM „Stratum“ ist die Applizierung eines Fluoreszenzfarbstoffes unerlässlich. Der mit einer Wellenlänge von 488 nm strahlende eingebaute Argonlaser im Handstab regt den Fluoreszenz-

farbstoff Natriumfluoreszein, der sein Absorptionsmaximum bei 490 nm hat, an. Das dadurch entstehende Fluoreszenzsignal kann erfasst und in Bildsignale umgewandelt werden.



Abb.10: kLSM „Stratum“

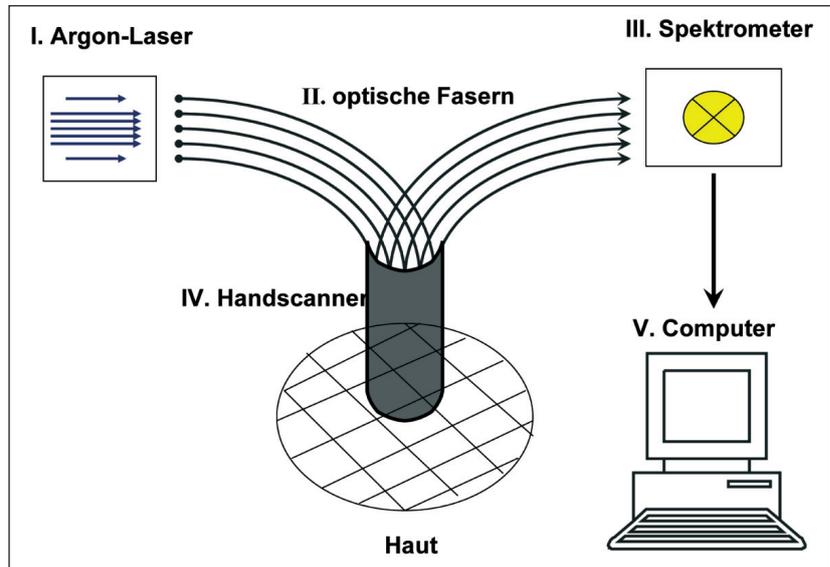


Abb.11: Funktionsschema des kLSM „Stratum“

Technische Daten	Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“
Bildfeld:	250 $\mu\text{m}$ x 250 $\mu\text{m}$ (1024x1024 Pixel)
Wellenlänge des Argon-Lasers	488 nm
Laserleistung	3 mW
Auflösung	lateral: 2,5 $\mu\text{m}$ , axial: 4 $\mu\text{m}$
Eindringtiefe	100-150 $\mu\text{m}$

Tabelle 7: Technische Daten des kLSM „Stratum“

### 2.4.2.1 Durchführung der Messungen

Die Messungen zur Untersuchung der gesunden Hautschichten mit dem Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop wurden standardmäßig am rechten Unterarm an der Beugeseite in der Mitte zwischen Ellenbogen und Handgelenk durchgeführt. Nach Inbetriebnahme des Argonlasers des Laser-Scan-Mikroskops braucht dieser ca. 5 min. bis die Arbeitstemperatur erreicht und der Laser einsatzbereit ist. Der Beginn der Untersuchung erfolgte ca. 30 Sekunden nach der intradermalen Injektion von Natriumfluoreszein. Das Scannen in die Tiefe geschah über das am Laserstab distal angebrachte Rädchen. Ein gezieltes Scannen der Haut in Richtung X und Y Achse ausgehend von einem auf dem Monitor sichtbaren Punkt gestaltete sich schwierig,

da das Handstück nur durch manuelle Führung fixiert oder verschoben werden kann. Manuelle Verschiebungen auf der Haut im  $\mu\text{m}$ -Bereich sind nicht immer durchführbar und bedürfen daher einiger Übung.

### 2.4.3 Vivascope<sup>®</sup> 1500

Für die Untersuchungen wurde das konfokale Laser-Scan-Mikroskop Vivascope<sup>®</sup> 1500 (Firma Lucid, Rochester, USA) eingesetzt.



Abb.12: Vivascope<sup>®</sup>1500



Abb. 13: Fixierung des Halteringes auf der Haut



Abb. 14: Anwendung des Vivascope<sup>®</sup> 1500

Die Abbildungen 12 bis 14 zeigen einen visuellen Überblick über Aussehen und Anwendung des Vivascope<sup>®</sup> 1500.

Das Vivascope<sup>®</sup> 1500 ist mit einem im Infrarot-Bereich strahlenden Laser ausgestattet. Der Laser arbeitet mit einer Wellenlänge im nahen Infrarotbereich von 830 nm. Beruhend auf den unterschiedlichen Reflexindizes werden unterschiedliche Strukturen verschieden stark kontrastiert. Wasser besitzt einen Brechungsindex von  $\sim 1,3$  und Zytoplasma von  $\sim 1,4$ . Zytoplasma wird also mit wenig Kontrast dargestellt. Melanin mit einem signifikant höherem Brechungsindex von  $\sim 1,7$  wird mit viel Kontrast dargestellt. Melanin und Keratin sind aufgrund ihrer Brechungsindize stark reflektierende Strukturen und bilden während der mikroskopischen Untersuchung einen starken Kontrast [6].

Das Vivascope<sup>®</sup> 1500 arbeitet nach dem sample scanning-Prinzip. Der Laserstrahl bleibt fixiert und die Haut wird innerhalb des Halterings verschoben. Um ein vollständiges Bild vom untersuchten Objekt zu erhalten, muß es in drei Ebenen abgerastert werden, in vertikaler und horizontaler Ausrichtung sowie in Richtung der Z-Achse. Die horizontale und vertikale Abtastung des Bildfeldes wird durch das Abrastern des Lasers in der jeweiligen Ausrichtung erzielt.

Für eine komfortableres Handling des Gerätes steht dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 eine Navigierungseinheit per Computer zur Verfügung. Per Mausklick sind verschiedene Funktionen wählbar. So kann das sichtbare Bild auf dem Monitor manuell in alle vier Richtungen verschoben werden. Es stehen mit *Vivablock*<sup>®</sup> und *Vivastack*<sup>®</sup> geeignete Funktionen zur praktischen Umsetzung der Messungen in X, Y und Z-Achse zur Verfügung.

### ***Vivablock*<sup>®</sup>-Modus**

Mit der *Vivablock*<sup>®</sup>-Funktion ist es möglich das zu untersuchende Areal innerhalb der vertikalen Ebene abzurastern, und somit ein geeignetes Areal für die Untersuchung zu ermitteln. Das insgesamt 4 mm x 4 mm große Untersuchungsareal kann über eine Fläche von 2 mm x 2 mm, 3 mm x 3 mm oder 4 mm x 4 mm per *Vivablock*<sup>®</sup>-Funktion abgerastert werden. Es entstehen 64 kleinere Bilder. Je nach Untersuchungsziel kann ein geeignetes Areal ausgesucht, per PC-Maus angesteuert und ausgewählt werden. Dies erleichtert u.a. das Auffinden bestimmter anatomischer Strukturen, wie z.B. Haarfollikel oder Drüsen.

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen Aufnahmen mit der *Vivablock*<sup>®</sup>-Funktion.

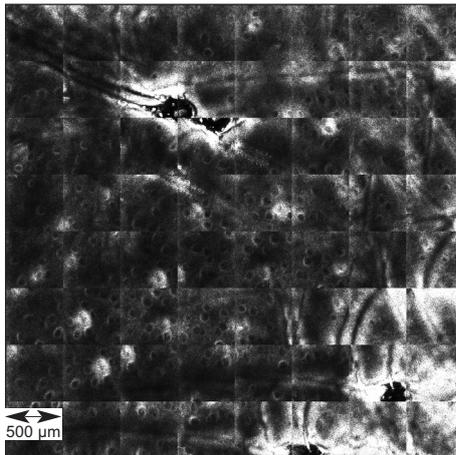


Abb. 15: *Vivablock*-Modus

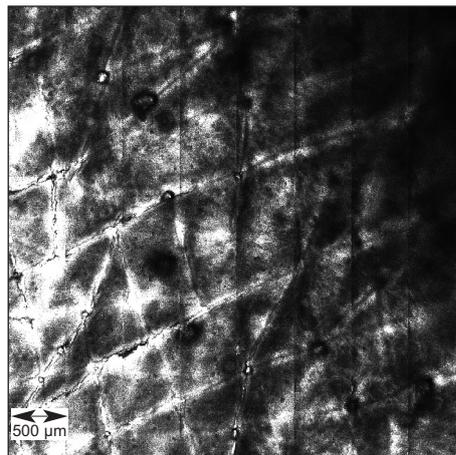


Abb. 16: *Vivablock*-Modus

### *Vivastack*<sup>®</sup>-Modus

*Vivastack*<sup>®</sup> ermöglicht ein nicht-manuelles Untersuchen eines Areals in verschiedenen Hauttiefen. Es können für die Abrasterung in die Tiefe verschiedene Abstände von 1,585 µm bis 3,17 µm gewählt werden. Es entstehen automatisch 16 aufeinanderfolgende Bilder. Diese werden gespeichert und können ebenso einzeln abgerufen werden.

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen die Abfolge eines Areals mit der *Vivastack*<sup>®</sup>-Funktion.

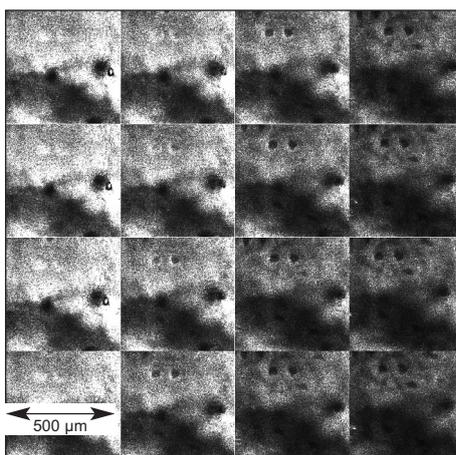


Abb. 17: *Vivastack*-Modus

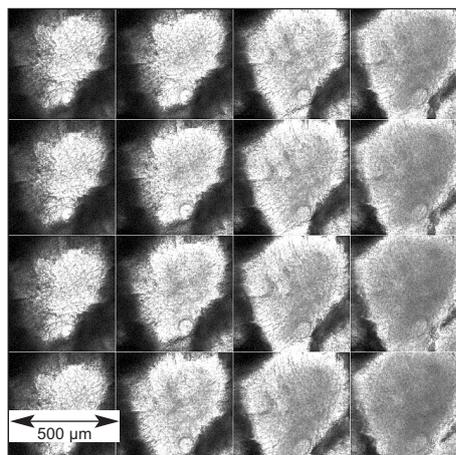


Abb. 18: *Vivastack*-Modus

## Technische Daten des Vivascope®1500

Einen zusammenfassenden Überblick über die technischen Daten des Vivascope®1500 zeigt Tab. 8.

Technische Daten	Vivascope® 1500
Bildfeld:	500 µm x 500 µm (1000 x1000 Pixel)
Z-Achse	16 Bilder
Makroskopische Untersuchungsareale	4 mm x 4 mm
Wellenlänge des Lasers	830 nm
Laserleistung	16 mW
Auflösung	horizontal: 2,0 µm, vertikal: 5,0 µm
Bildfolge	10 Bilder/Sekunde
Eindringtiefe	200 µm-300 µm
Software	Vivascope Ver. 3.0, (1000 x1000 Pixel)

Tabelle 8

### 2.4.3.1 Durchführung der Messungen

Die Durchführung der Messungen erfolgte am rechten Unterarm Beugeseite, mittig zwischen Ellenbogen und rechtem Handgelenk, entsprechend der Region beim Fluoreszenzmikroskop. Nach Einstellung des Mikroskops und Vorbereitung der EDV-Einheit, konnte mit den Messungen begonnen werden.

Zunächst wurde der Haltering als hell leuchtendes ovales Objekt mit dunklem Rand manuell eingestellt. Von dieser Position aus konnte mit der auf dem Rechner befindlichen Navigierungseinheit bis zum Erscheinen der hell leuchtenden Korneozyten manuell gerastert werden. Dieser Punkt wurde als Ausgangspunkt/Nullpunkt eingestellt. Die auf dem Rechner nun angegebenen Tiefeneinheiten in µm können vom Untersucher übernommen werden. Für einen standardisierten Ablauf der Untersuchungen wurde folgende Vorgehensweise stets in der gleichen Weise wiederholt. Zunächst wurde der Haltering manuell eingestellt. Davon ausgehend wurde in die Tiefe gerastert bis zum Erscheinen der obersten Hautschicht, den hell leuchtenden Korneozytenverbänden. Mittels *Vivablock*® erfolgt ein Scannen des gesamten Areals in der gleichen Ebene. Nach Auswahl eines Areals konnten mit der *Viva-*

*stack*<sup>®</sup>-Funktion weitere Tiefenscans erfolgen. Mit einem in dieser Studie standardmäßig durchgeführten Abstand von 3,17µm im *Vivastack*<sup>®</sup>-Modus wurden die Schichten vom stratum corneum bis zum stratum papillare dokumentiert.

## 2.5 Statistische Auswertung

Es wurde bei allen untersuchten Probanden folgende Meßwerte erhoben, minimale Epidermisdicke (Emin), maximale Epidermisdicke (Emax) und die Dicke des Stratum corneum (DSC). Mit dem *Vivascope*<sup>®</sup> 1500 konnten zusätzlich noch die Anzahl der Papillen und der Durchmesser der einzelnen Gefäße erfaßt werden.

Die Dicke des stratum corneums wurde definiert als der Abstand zwischen den ersten sichtbaren oberflächlichen Korneozyten und dem Auftreten der ersten Zellkerne als Beginn des stratum granulosums. Als visuelle Fixpunkte für die Messungen der minimalen Epidermisdicke wurde der Beginn der Epidermis als das Auftreten des stratum corneum mit seinen hell weiß leuchtenden Korneozyten definiert und das Ende als das Auftreten der ersten Papillen.

Die maximale Epidermisdicke (Emax) gibt den Abstand zwischen Hautoberfläche und dem Übergang zur Dermis wieder. Es wird somit das Ende der tiefen Reteleisten ermittelt.

Die Anzahl der Papillen wurde mit dem *Vivascope*<sup>®</sup> 1500 pro Bildausschnitt erfaßt, d.h alle aufgeführten Daten bezüglich der Papillendichte beziehen sich auf einen Bildausschnitt von 500 µm x 500 µm.

Die Anzahl der Papillen konnte mit dem Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ nicht ermittelt werden. Der relativ kleine Bildausschnitt von 250 µm x 250 µm ermöglicht keinen Überblick und somit können keine Aussagen bezüglich eines Areals getroffen werden.

In der Probandengruppe der Psoriasis-Patienten wurden die Daten zur Ermittlung der minimalen und maximalen Epidermisdicke, der Dicke des stratum corneums sowie der Papillendichte als auch der Gefäßdurchmesser im stratum papillare, an drei im wöchentlichen Abstand stattfindenden Untersuchungsterminen erhoben.

Es wurden je Untersuchung mehrere Bilder zur Auswertung herangezogen.

## 2.5.1 Quantitative Auswertung

Die Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte über das Bildverarbeitungsprogramm Photoshop sowie das Statistikprogramm SPSS 15.0. Die ermittelten Daten wurden zunächst in Excel-Tabellen archiviert und für die weiteren statistischen Auswertungen in das SPSS-Programm übernommen. Es wurden pro ermittelten Parameter mehrere Meßwerte für einen Probanden erfasst.

Aus diesen wurde ein arithmetischer Mittelwert, ein Medianwert sowie die Standardabweichung errechnet.

Der arithmetische Mittelwert ist definiert als

$$MW = \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i .$$

Die Standardabweichung errechnet sich aus

$$SA = s = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS ließen sich aus diesen Daten statistische Signifikanzen und Grafiken erstellen.

Die Auswahl von Boxplots als grafische Darstellungsform ermöglicht das Aufzeigen mehrerer numerisch ermittelter Daten. Es können der Mittelwert, der Medianwert als auch die Quantilen innerhalb einer grafischen Abbildung dokumentiert werden. Innerhalb der Box liegen 50% der Daten. Die Länge der Box gibt einen Anhalt über die Streuung der Daten. Ebenso wichtig für die Interpretation der Daten in der Box ist der Median-Wert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Qualitative Auswertung

Der Einsatz von konfokalen Laser-Scan-Mikroskopen ermöglicht das nicht invasive objektive Erfassen von morphologischen und funktionellen Parametern der Haut.

Bisherige histologische Untersuchungen der menschlichen Haut werden anhand von Biopsien und/oder chirurgisch entnommenen Hautarealen vorgenommen. Die so entnommenen Präparaten werden vertikal geschnitten und lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 19). Konfokale Laser-Scan-Mikroskope bieten die Möglichkeit ohne chirurgische Eingriffe die menschliche Haut und deren dynamische Vorgänge in vivo und in Echtzeit zu betrachten. Im Gegensatz zur konventionellen Histologie erfolgt die Aufsicht nicht vertikal sondern horizontal zur Oberfläche (Abb. 20-23). So können mit konfokalen Laser-Scan-Mikroskopen einzelne horizontale Schichten per Video und digital aufgenommen werden. Aufgrund der horizontalen Schichtung kann es bei Untersuchungen mit konfokalen Laser-Scan-Mikroskopen zu Überlagerungen der einzelnen Schichten kommen.

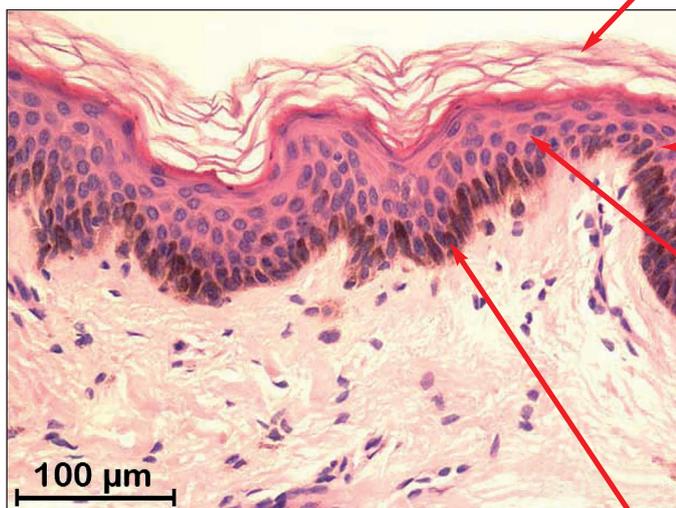


Abb. 19:  
Längsschnitt einer normalen Haut in  
HE-Färbung

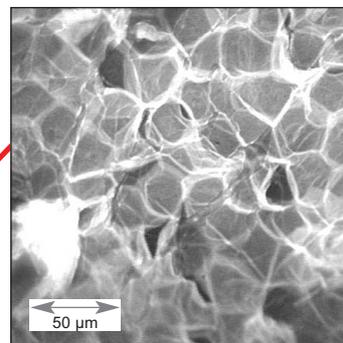


Abb. 20:  
Stratum corneum

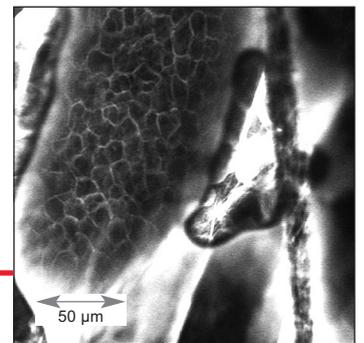


Abb. 21:  
Stratum granulosum

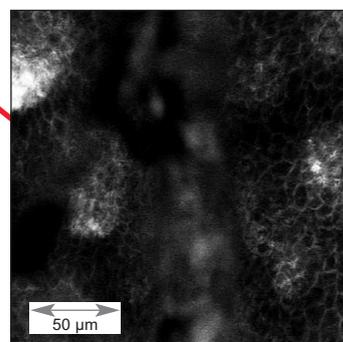


Abb. 22:  
Stratum spinosum

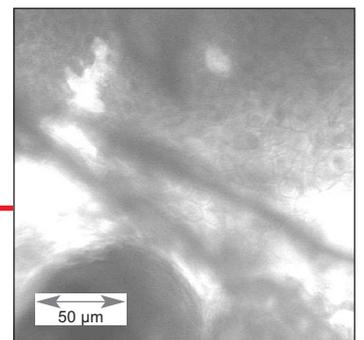


Abb. 23:  
Stratum basale/  
pappilare

Für die Beurteilung der Bilder mittels Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop dürfen Kenntnisse bezüglich der Verteilung bzw. Umverteilung des Natriumfluoreszeins in der menschlichen Haut nicht unberücksichtigt bleiben. Die Arbeitsgruppe um Prof. Lademann konnte spezifische Verteilungsmuster des Natriumfluoreszeins im zeitlichen Verlauf nachweisen [60].

Zunächst sammelt sich der Farbstoff NaF im extrazellulären Bereich. Die Morphologie der einzelnen Zellen ist zu diesem Zeitpunkt besonders gut erkennbar. Anschließend dringt das NaF durch die Zellmembran in das innere der Zelle und färbt zunächst den Zellkern. Dieser kann nun als weißer Punkt betrachtet werden. Nach Anfärbung des Zellkerns wird das gesamte Zytoplasma der Keratinozyten vom NaF durchdrungen. Mikroskopisch sind während dieser Phase kaum noch morphologische Strukturen erkennbar. Abschließend wird der Farbstoff besonders durch die papillären Kapillaren eliminiert [60].

### **3.1.1 Darstellung der gesunden Hautschichten mittels kLSM „Stratum“ und Vivascope® 1500**

#### **3.1.1.1 Stratum corneum**

Das stratum corneum besteht aus ca. 10- 20 Schichten kernloser hexagonal angeordneter Keratinozyten und besitzt eine Dicke von ca. 10-20  $\mu\text{m}$  [19].

Unter dem Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ sind durch Anfärbung mit Natriumfluoreszein die einzelnen Keratinozyten klar erkennbar und Zellgrenzen deutlich voneinander abgrenzbar (Abb. 24). Die Zellgrenzen sind weißlich umrandet. Das hell weiß leuchtende Areal (Abb. 24, roter Pfeil) entsteht durch Ansammlung von Natriumfluoreszein in den Hautfurchen. Mit den Aufnahmen des kLSM „Stratums“ sind Aussagen bezüglich des oberflächlichen Hautzustandes möglich. Es kann z.B. trockene Haut (Abb. 25) mit zerklüfteten inhomogen erscheinende Keratinozyten von normaler Haut (Abb. 24) mit geordneten Hornhautzellen differenziert werden.

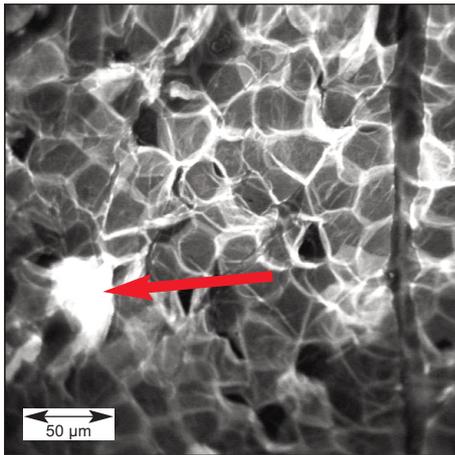


Abb. 24:  
stratum corneum, normale Haut,  
kLSM „Stratum“

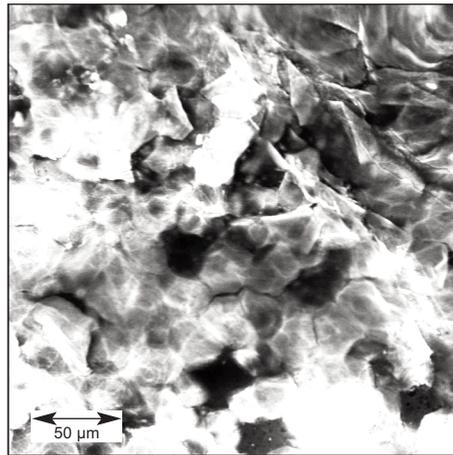


Abb. 25:  
stratum corneum, trockene Haut,  
kLSM „Stratum“

Darstellungen des stratum corneums mit dem Vivascope® 1500 sind weniger detailgenau und zeigen eine homogene weiß leuchtende Oberfläche. Einzelne Korneozyten und detaillierte Strukturen sind nicht erkennbar. Die Zellverbände sind blütenförmig angeordnet (Abb. 26 u. 27, gelbe Pfeile). Die sich zwischen den Zellverbänden befindlichen schwarzen Regionen sind Hautfurchen (Abb. 26 u. 27, roter Pfeil), die sich - je weiter der Blick in die Tiefe kommt - verjüngen, bis sie im Bereich des stratum papillare „verschwinden“. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen das stratum corneum gesunder Haut mit dem Vivascope® 1500.

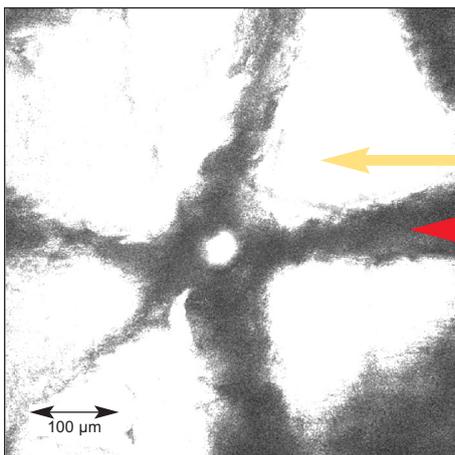


Abb. 26:  
stratum corneum,  
Vivascope®1500

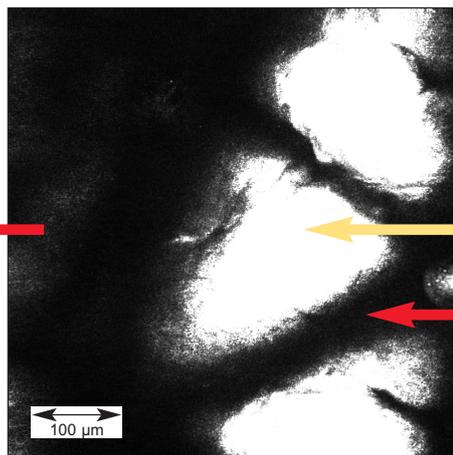


Abb. 27:  
stratum corneum,  
Vivascope®1500

### 3.1.1.2 Stratum granulosum

Das sich unterhalb des stratum corneums befindliche stratum granulosum wird im Fluoreszenzmikroskop durch das pflastersteinartige Aussehen der abgeflachten Keratinozyten geprägt (Abb. 28, 29 rote Pfeile). Die hell markierten Zellgrenzen sind erkennbar. Die aus ca. 2-5 Lagen bestehende Körnerzellschicht ist dünn und nicht bei jedem Probanden mit dem „Stratum“-Mikroskop erfassbar. Die mit dem gelben Pfeil markierten Areale sind Hautfurchen (Abb. 29), die auch für die schattengebenden Veränderungen (rote Kreise) verantwortlich sind. Die bereits im stratum corneum vorhandenen Hautfurchen werden durch das topisch aufgetragene Natriumfluoreszein „erhellt“. Diese Ansammlung von Natriumfluoreszein in den Hautfurchen sorgt für die Schattenbildung in den darunterliegenden Schichten und Arealen.

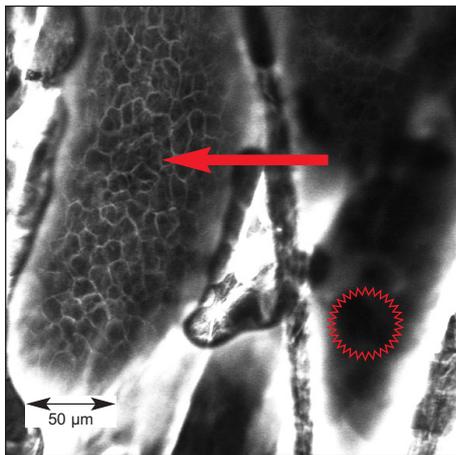


Abb. 28:  
stratum granulosum,  
kLSM „Stratum“

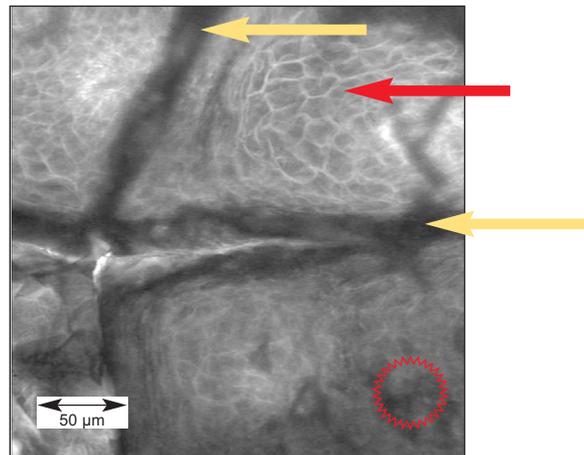


Abb. 29:  
stratum granulosum,  
kLSM „Stratum“

Das Vivascope<sup>®</sup> 1500 lässt kaum detaillierte Informationen über diese Zellschicht zu (Abb. 30, 31). Eine definitive Zuordnung der Zellschicht fällt aufgrund der geringen Schichtdicke und eher mäßigen Auflösung schwer. Abgrenzungen zu den unteren und oberen Zellschichten sind kaum nachvollziehbar. In Abbildung 30 und 31 sind bei genauer Betrachtung Zellgrenzen erkennbar (roter Pfeil).

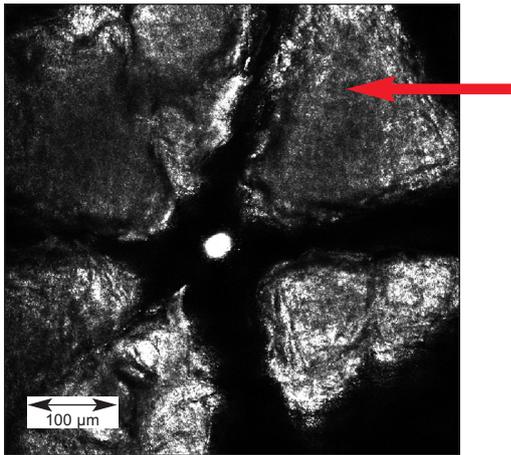


Abb. 30:  
stratum granulosum,  
Vivascope®1500

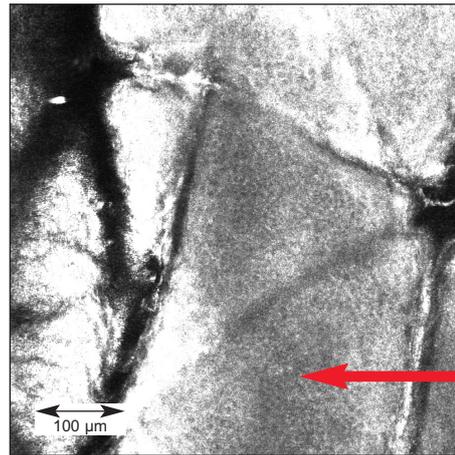


Abb. 31:  
stratum granulosum,  
Vivascope®1500

### 3.1.1.3 Stratum spinosum

Das stratum spinosum ist gekennzeichnet durch polygonal kubisch angeordnete Keratinozyten und das Vorhandensein von Basalzellen und Melanozyten. In Abb. 32 sind im Fluoreszenzmikroskop die aufeinanderfolgenden Schichten voneinander zu unterscheiden. Im unteren linken Drittel sind Zellen des stratum granulosums erkenntlich (Abb. 32, roter Pfeil), während sich darüber die Keratinozyten des stratum spinosums etwas kleiner und z.T. mit Zellkernen darstellen (Abb. 32, gelber Pfeil). Wie bereits schon Gonzales et al. beschrieben, haben die Stachelzellen ein bienenwabenförmiges Aussehen [68]. Die hell markierten Zellkerne der Keratinozyten sind in Abbildung 33 sichtbar (Abb. 33, roter Pfeil).

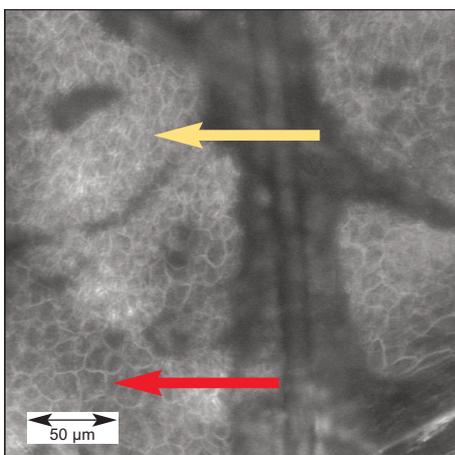


Abb. 32: stratum spinosum,  
kLSM „Stratum”

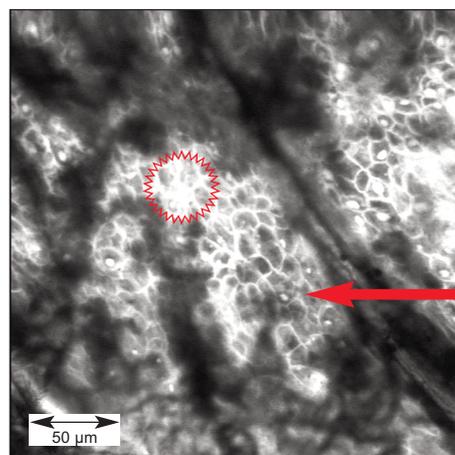


Abb. 33: stratum spinosum,  
kLSM „Stratum”

Aufnahmen mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 (Abb. 34, 35) lassen nur schwer eine genaue Zuordnung der einzelnen Zellschichten zu. Der Übergang vom stratum spinosum zum stratum basale und zur Dermis ist fließend und nicht klar voneinander abgrenzbar. Stratum spinosum und stratum basale bilden die Regenerationsschicht. Abb. 33 zeigt das stratum spinosum mit dem stratum basale und beginnenden Papillen (roter Kreis).

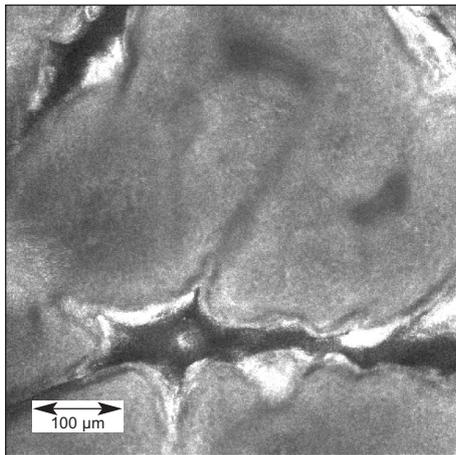


Abb. 34:  
*stratum spinosum/stratum basale,*  
Vivascope<sup>®</sup> 1500

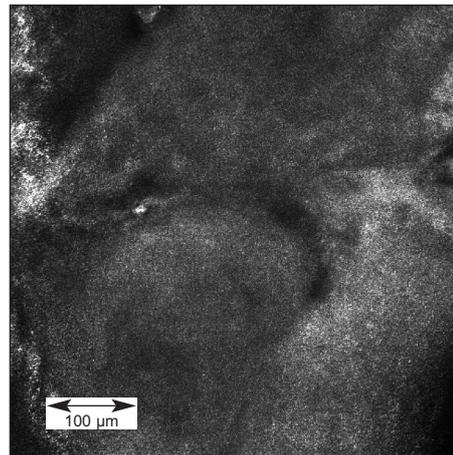


Abb. 35:  
*stratum spinosum/stratum basale,*  
Vivascope<sup>®</sup> 1500

#### 3.1.1.4 Stratum basale / stratum papillare

Zwischen Epidermis und Dermis kommt es zu überlappenden Übergängen zwischen den einzelnen Hautschichten (stratum basale / stratum papillare) Diese Übergangszone ist in beiden Modi geprägt von Papillen, Basalzellen und Melanozyten.

Ausgehend vom stratum basale in die Tiefe werden zunehmend hellweiß leuchtende runde Areale sichtbar. Dabei handelt es sich um Papillarkörper, die vom stratum papillare bis in die Epidermis in das stratum basale hineinreichen.

Die um die Papillen gelagerten Basalzellen und Melanozyten erscheinen im Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop als dunkler Saum um die Papillen. (Abb. 39, gelber Pfeil). Das vom Laser ausgestrahlte Licht wird von den Basalzellen und den mit Melanin angereicherten Basalzellen absorbiert und somit erscheint die Zelle dunkel.

Je weiter mit dem Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ von oben in die Tiefe geschaut wurde, umso mehr nahm die Papille an Umfang zu (Abb. 36-39, rote Pfeile). Ausgehend vom stratum spinosum, in dem schon erste weißlich veränderte Regionen erkennbar sind, d.h. schon die Spitzen der Papillen sind hier zu erkennen (Abb. 36), bis hin zum stratum papillare, ist deren Ausprägung aufgrund des hell leuchtenden Fluoreszenzsignals des Natriumfluoreszeins gut zu verfolgen und zu beobachten (Abb. 36-39).

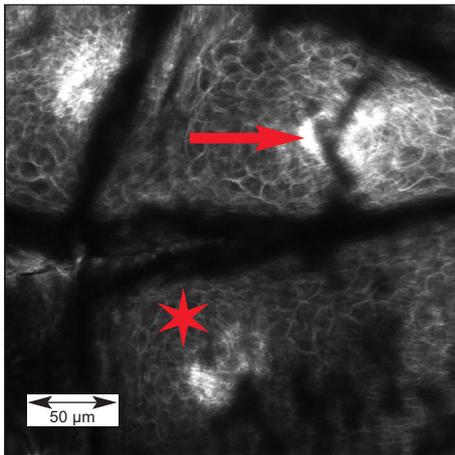


Abb. 36: stratum basale/stratum papillare, kLSM „Stratum“

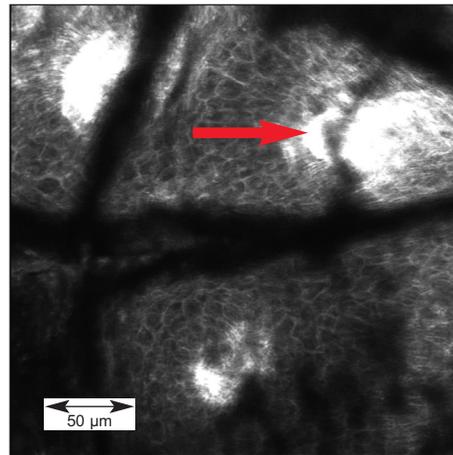


Abb. 37: stratum basale/stratum papillare, kLSM „Stratum“

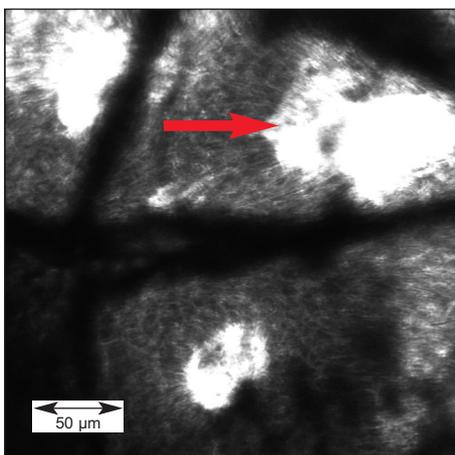


Abb. 38: stratum basale/stratum spinosum, Papillen, kLSM „Stratum“

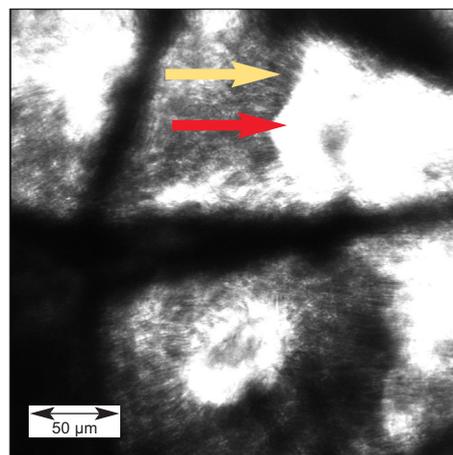


Abb. 39: stratum basale/stratum spinosum, Papillen, kLSM „Stratum“

Die in Abb. 36 erkennbaren Strukturen zeigen das bienenwabenförmige Aussehen des stratum spinosum (rotes Sternchen).

In einigen Fällen konnten in den Papillen Gefäße mit Blutfluß gesehen werden (Abb. 40, 41). In gesunder Haut sind diese kapillaren Gefäße sehr klein und Gefäße mit Blutfluß sind daher selten zu beobachten. Die Gefäße in den Papillen sind in beiden Aufnahmen als kleine schwarze Löcher innerhalb der Papillen zu erkennen (Abb 40, 41, rote Pfeile).

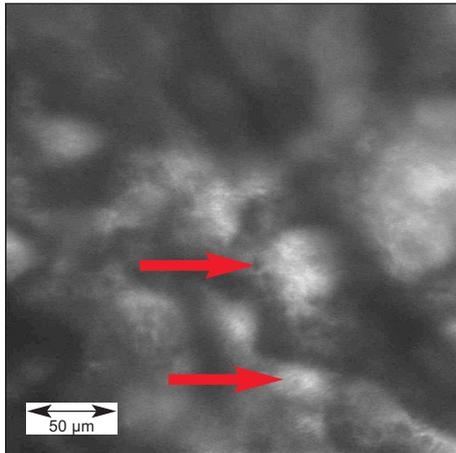


Abb. 40: Papillen mit Blutgefäßen, kLSM „Stratum“

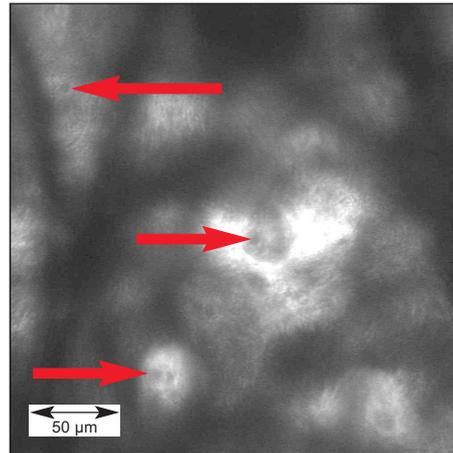


Abb. 41: Papillen mit Blutgefäßen, kLSM „Stratum“

Im Vivascope® 1500 sind Melanozyten und Basalzellen ähnlich den Keratinozyten als hellweiß leuchtende Zellen zu erkennen, da sie einen hohen Brechungsindex aufweisen (Abb. 42, 43, rote Pfeile).

In Abbildung 42 und Abbildung 43 sind bei genauer Betrachtung Blutströme die sich „schlangenförmig“ durch die Gefäße winden zu erkennen (Abb. 42, 43, rote Pfeile).

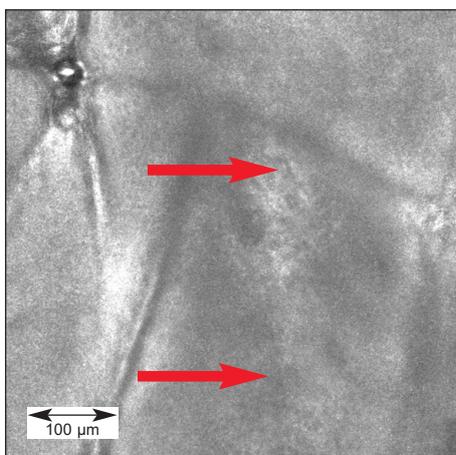


Abb. 42: stratum basale/stratum spinosum, Vivascope®1500

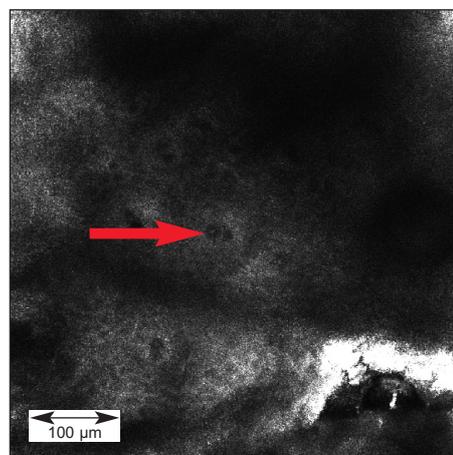


Abb. 43: stratum basale/stratum spinosum, Vivascope®1500

### 3.1.1.5 Stratum reticulare

Eine visuelle Darstellung des stratum reticulare mittels des „Stratum“-Mikroskops ist nicht bei jedem Probanden möglich. In Abhängigkeit von der Lokalisation und der Hautdicke waren gute Aufnahmen bis gar keine Aufnahmen möglich. Je dünner die Epidermis ist, umso besser war das mikroskopische Eindringen in die Dermis. Verfolgt man die in der Epidermis beginnenden Papillen bis in die tiefe Dermis, so kann man ein ineinanderübergehen der Papillen in die Dermis beobachten. Mikroskopisch zeigte sich ein faseriges, inhomogenes Bild. Klare Strukturen sind nicht erkennbar. In Abbildung 45 kann man die zunehmende Tiefe anhand der sich vermehrenden dunklen Areale erkennen. Diese stellen das nicht mehr zu erkennende stratum reticulare dar. Das stratum reticulare kann nicht bis zum Ende verfolgt werden. Abbildung 45 (roter Pfeil) zeigt noch vorhandene papilläre Strukturen, jedoch eine zunehmender „Zerfaserung“ des gesamten Bildes.

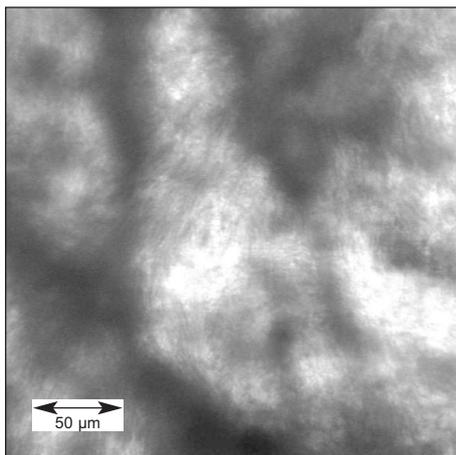


Abb. 44: stratum reticulare, kLSM „Stratum“

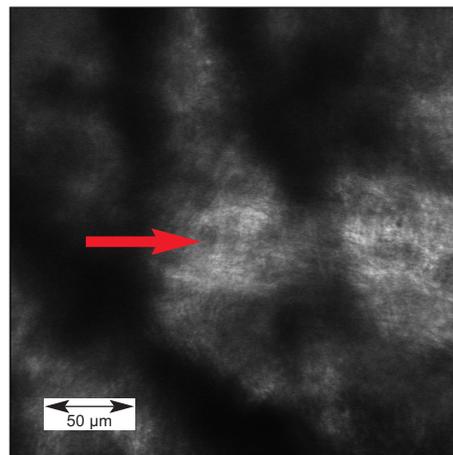


Abb. 45: stratum reticulare, kLSM „Stratum“

Ähnlich verhält es sich mit den Aufnahmen vom Vivascope<sup>®</sup> 1500. Wie die Abbildungen 46 und 47 sichtbar werden lassen, nehmen die Strukturen des stratum papillare und stratum basale zunehmend unklare Umrisse an und ein „unscharfes“ Bild typisch für das stratum reticulare entsteht.

Die sich an das stratum papillare anschließende Hautschicht begrenzt die Dermis. Das sich schon mit dem kLSM „Stratum“-Mikroskop gezeigte inhomogene zerfaserte Bild dieser untersten Epidermisschicht spiegelt sich auch im Vivascope<sup>®</sup> 1500 wider.

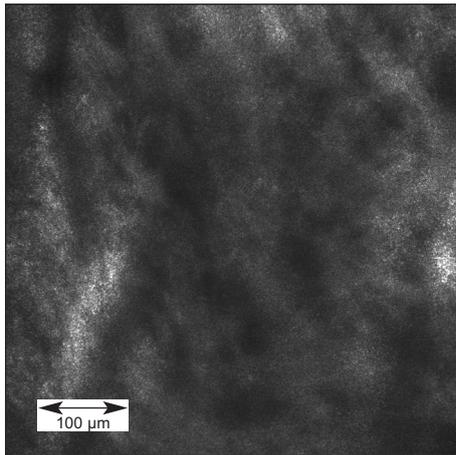


Abb. 46: *stratum reticulare*,  
*Vivascope*<sup>®</sup> 1500

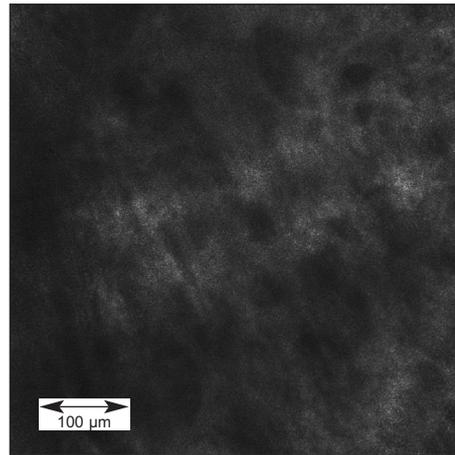


Abb. 47: *stratum reticulare*,  
*Vivascope*<sup>®</sup> 1500

## 3.1.2 Hautanhangsgebilde

### 3.1.2.1 Haare

Für die Untersuchungen wurde der rechte Unterarm mit Vellushaaren mikroskopisch betrachtet.

Haare bestehen aus einem Haarschaft und einem Haarfollikel. In Abbildung 48 und Abbildung 49 sind beide Strukturen zu erkennen (Abb. 48 u. 49, gelbe und rote Pfeile). Im Gegensatz zum *Vivascope*<sup>®</sup> 1500 (Abb.49) sind in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme das trichterförmige Aussehen des Haarfollikels sowie die lamellenartige Struktur des Haarschaftes detailliert zu erkennen. Auftretende strukturelle Haarveränderungen sind somit mittels Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop visualisierbar. Das gezielte Auffinden eines solchen Haarfollikels ist mit dem Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ jedoch schwierig und mit viel Zeit und Geduld verbunden. Während dieser Untersuchung wurde der Haarfollikel zufällig gesehen. Die Aufnahme mit dem *Vivascope*<sup>®</sup> 1500 lässt einen Haarschaft und Follikel erkennen, weitere Aussagen sind jedoch aufgrund der schlechten mikroskopischen Auflösung schwierig (Abb. 49). Gegensätzlich verhält es sich mit dem *Vivascope* 1500<sup>®</sup> beim Auffinden eines solchen Haarfollikels. Auch hier Bedarf es einiger Zeit für das Auffinden von Haarfollikeln, jedoch ist das gezielte Aufsuchen möglich. Mit den Funktionen *Vivablock*<sup>®</sup> und *Vivastack*<sup>®</sup> stehen erleichternde technische Mittel zur Verfügung.

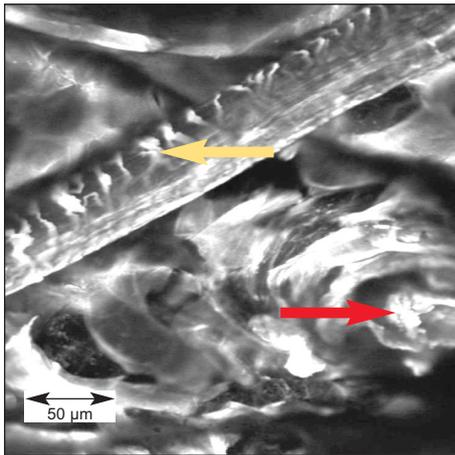


Abb. 48: Haar/ Haarfollikel, kLSM „Stratum“

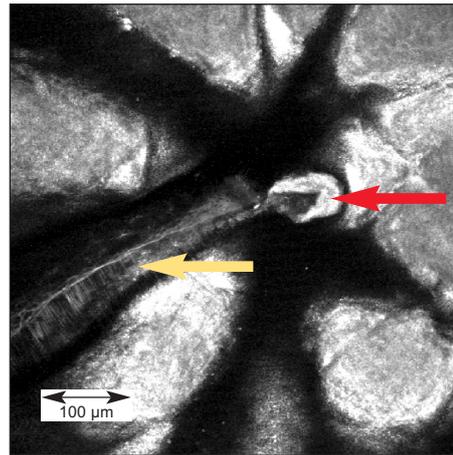


Abb. 49: Haarfollikel, Vivascope® 1500

### 3.1.2.2 Talgdrüsen (Glandulae sebaceae)

Die zum größten Teil aus dem Haarbalg hervorgehenden holokrinen Drüsen finden sich an allen Körperstellen an denen Haare wachsen. Da diese Drüsen in das Infundibulum des Haares münden, sind diese weder mit dem kLSM „Stratum“ noch mit dem Vivascope® 1500 erkennbar.

### 3.1.2.3 Schweißdrüsen (Glandulae sudoriferae merocrinae)

Schweißdrüsen besitzen ein enges Lumen. Ihr Endstück ist stark geknäuel. Der Ausführungsgang der Knäueldrüse verläuft durch die Epidermis sehr geschlängelt. Das geknäuelte Endstück ist mit dem Vivascope® 1500 als auch mit dem „Stratum“ Mikroskop sichtbar (Abb.50 u. 51, rote Pfeile).

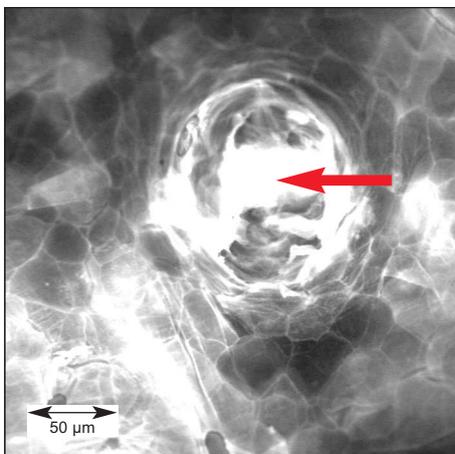


Abb. 50: Schweißdrüse, kLSM „Stratum“

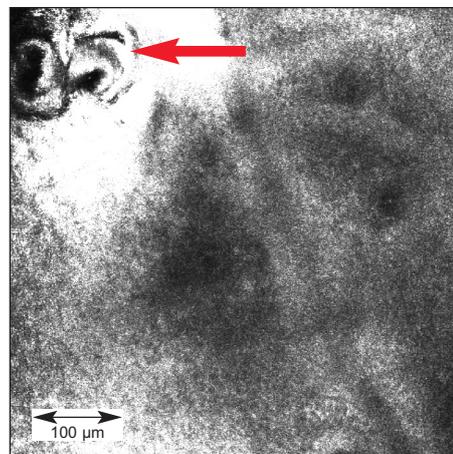


Abb. 51: Schweißdrüse, Vivascope® 1500

### 3.1.2.4 Narben (Cicatrix)

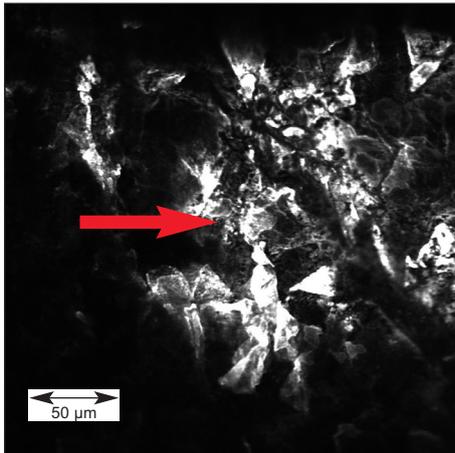


Abb. 52: Narbe,  
kLSM „Stratum“

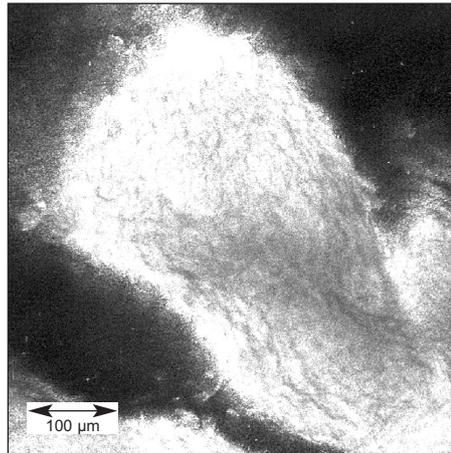


Abb. 53: Narbe,  
Vivascope® 1500

Die oben angeführten Abbildungen 52 und 53 zeigen jeweils mit dem kLSM „Stratum“, als auch mit dem Vivascope® 1500 narbiges Gewebe. Typischerweise können keine weiteren Zellstrukturen als Bindegewebszellen beobachtet werden. Auch bei näher gehender Betrachtung sind keine weiteren Zellstrukturen sichtbar. Es wachsen weder Haare, noch bilden sich Talg- oder Schweißdrüsen. Ebenso sind keine Melanozyten vorhanden. Der Versuch mikroskopisch in die Tiefe schauen zu wollen, misslingt. Die Zerstörung des kollagenen Gewebes in der Dermis führt zu einer Neubildung von minderwertigem Ersatzgewebe. Narbengewebe sieht makroskopisch aufgrund der fehlenden Melanozyten heller aus als die Umgebung. In Abbildung 52 sind die typischerweise auf der Haut vorkommenden Hefepilze zu erkennen (Abb. 52, roter Pfeil). Des Weiteren ist die für atrophe Narben charakteristische zigarettenpapierartige Fältelung sichtbar. Die mit dem Vivascope® 1500 aufgenommene Abbildung lässt kaum Aussagen zu.

## 3.1.3 Benigne Hautveränderungen

### 3.1.3.1 Melanozytäre Naevi

Melanozytäre Naevi werden je nach Ihrer Lage als Junctionsnaevus, als dermale Naevi oder Compound-Naevi bezeichnet.

Der häufig auftretende melanozytäre Naevus vom Compound-Typ liegt histologisch betrachtet in der Übergangszone zwischen der Epidermis und der Dermis (sogenannte Junktionszone) und vermehrt im dermalen Bindegewebe. Es wurde für beide Aufnahmen ein Naevus vom Compound-Typ am rechten Unterarm, mit einem leicht erhabenen, dunkelbräunlichem Aussehen und scharfer Begrenzung ausgewählt. Abbildung 54 zeigt das klinische Bild des untersuchten Pigmentmals. Typischerweise besteht ein melanozytärer Naevi aus einer Anhäufung von Naevuszellnestern. Mit dem Vivascope® 1500 sind die aneinander gelagerten Naevuszellnester deutlich zu erkennen (Abb. 56, rote Pfeile). Die Ränder der Nester bestehen zum größten Teil aus Melanozyten, die als hell leuchtende Ränder den Naevuszellnestern das typische Aussehen verleihen [6].



Abb. 54: Klinisches Bild eines Naevus vom Compound-Typ

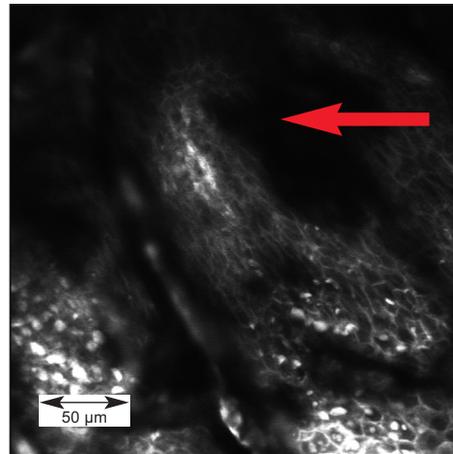


Abb. 55: Naevus kLSM „Stratum“

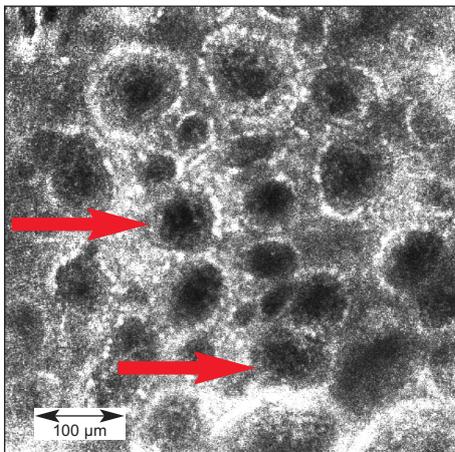
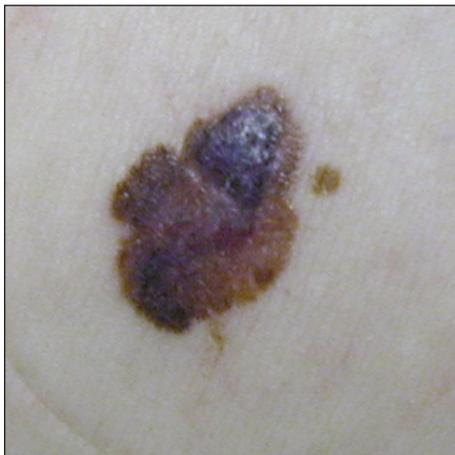


Abb. 56: Naevus, Vivascope® 1500

Im Gegensatz zu Aufnahmen mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 sind beim Scannen in die Tiefe mit dem Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ nur vereinzelte Naevuszellnester als dunkle rundliche Gebilde (Abb. 55, roter Pfeil).

### 3.1.4 Maligne Hautveränderungen

#### 3.1.4.1 Malignes Melanom



*Abb. 57: klinisches Bild eines malignen Melanoms*

Aus medizinischen ethischen Gründen konnten vom malignen Melanom nur Aufnahmen mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 aufgezeichnet werden. Aufnahmen mit dem „Stratum“ Mikroskop hätten eine NaF Injektion vorausgesetzt. Bei dem Verdacht einer malignen Erkrankung wäre das Risiko der Zellverschleppung zu groß gewesen.

Bei der zunächst klinisch durchgeführten Untersuchung fällt das äußere Bild dieser Hautveränderung auf. Es zeigt deutliche Merkmale der ABCD-Regel. Die Hautveränderung zeigt insgesamt ein asymmetrisches Bild. Der Rand ist unregelmäßig begrenzt. Verschiedenste Farbtöne dominieren das Aussehen dieser Hautveränderung und sie ist sehr erhaben über der Hautoberfläche.

Die mikroskopischen Abbildungen zeigen ähnlich einem „normalem“ Naevus eine Anhäufung von Naevuszellnestern. Bei genauer Betrachtungsweise sind jedoch Unterschiede deutlich zu erkennen. Zum einen sind die am Rand befindlichen hell leuchtenden Melaninzellen in ihrer Anordnung unterbrochen (Abb. 58, roter Pfeil). Zum anderen sind die Nester sehr ungeordnet. Abgrenzungen der einzelnen Naevuszellnester sind z.T. nicht möglich (Abb. 58, rote Sternchen). In einigen Naevi

finden sich weißlich geschlängelte Gebilde, die als Gefäße interpretiert werden können. Das Vorhandensein von Gefäßen innerhalb eines Naevi ist untypisch und am ehesten als Kriterium eines malignen Melanoms zu werten.

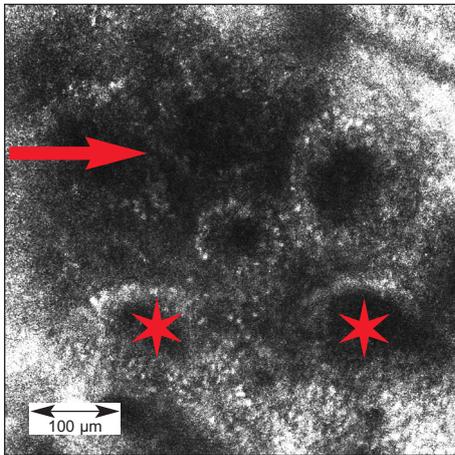


Abb. 58: malignes Melanom, Vivascope® 1500

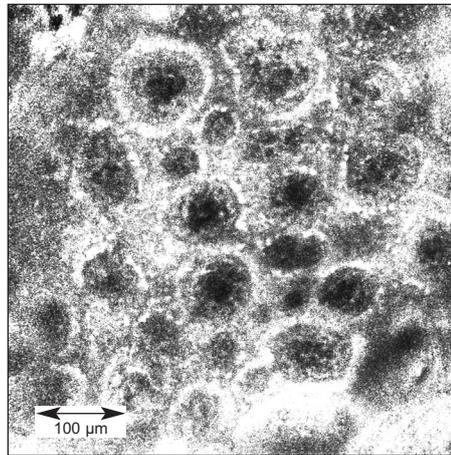


Abb. 59: benigner Naevus, Vivascope® 1500

### 3.1.5 Untersuchung der Psoriasis vulgaris mittels kLSM „Stratum“ und dem Vivascope® 1500

#### 3.1.5.1 Psoriasis vulgaris (Schuppenflechte)

Die Schuppenflechte wird durch mehrere Veränderungen der histologischen Architektur der Haut gekennzeichnet. Besonders Veränderungen in der Epidermis stehen im Vordergrund. Typischerweise kommt es zur Verdickung der Epidermis mit Verbreiterung des stratum spinosum (Akanthose). Ebenfalls typisch für die Psoriasis ist die überstürzte Differenzierung der Keratinozyten mit mangelhafter Verhornung und Persistenz von Kernresten (Parakeratose) sowie eine extreme Verdickung des stratum corneum (Hyperkeratose). Weitere Veränderungen geschehen in der kutanen Gefäßversorgung. Es kommt zu einer Vermehrung des oberflächlichen Gefäßplexus und einer Papillomatose [61]. Bereits die Arbeitsgruppe um Salvador Gonzalez konnte 1999 mittels eines auf Reflektanz beruhenden Laser-Scan-Mikroskops mehrere psoriatische Veränderungen in der Histologie der Haut beobachten [12].

Im folgenden sollen qualitative Aussagen über die Erkennung und das Vorhandensein einer von der Norm abweichenden Histologie bei Psoriasis Patienten mittels Vivascope 1500<sup>®</sup> und dem Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ gemacht werden.

Zunächst geben die Abbildungen 60 bis 62 den histologischen Aufbau visualisiert mit dem Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ wieder, sowie die Abbildungen 63-65 das identische Areal untersucht mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500. Die Abbildungen zeigen die typischen histologischen Veränderungen der Haut bei der Psoriasis-Erkrankung.

Die Abbildung 60 zeigt die oberflächlich zerklüfteten Keratinozyten (gelber Pfeil). Es ist keine einheitliche Struktur erkennbar. Vereinzelt sind Zellkerne sichtbar (Abb. 60, roter Pfeil).

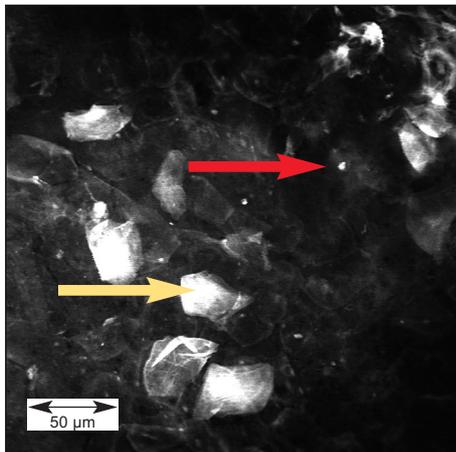


Abb. 60: stratum corneum, kLSM „Stratum“

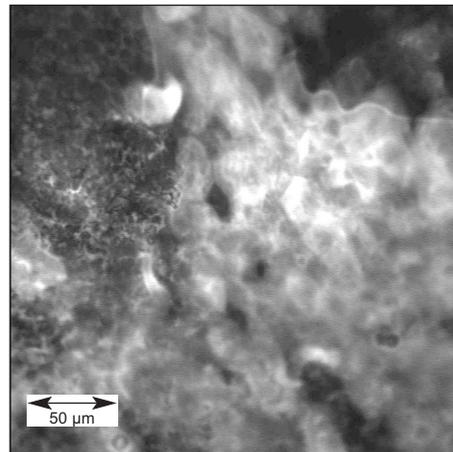


Abb. 61: stratum spinosum, kLSM „Stratum“

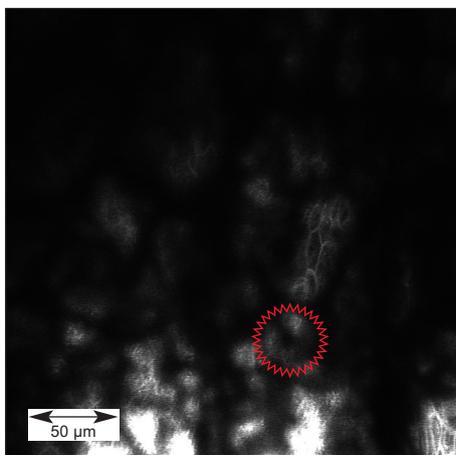


Abb. 62: stratum spinosum/stratum basale, kLSM „Stratum“

Das anatomisch unter dem stratum corneum liegende stratum granulosum ist bei der Psoriasis Erkrankung nicht erkennbar. Die Abbildungen 62 und 65 zeigen das stratum spinosum.

In die Tiefe weitergehend zeigen die Abbildungen 62 und 65 die untersten Schichten der Epidermis mit dem Stratum basale und den Beginn der Dermis mit dem stratum papillare. Sichtbar mit beiden Geräten sind die erweiterten Papillen und z.T die dilatierten Gefäße (Abb. 62 u. 65, rote Kreise).

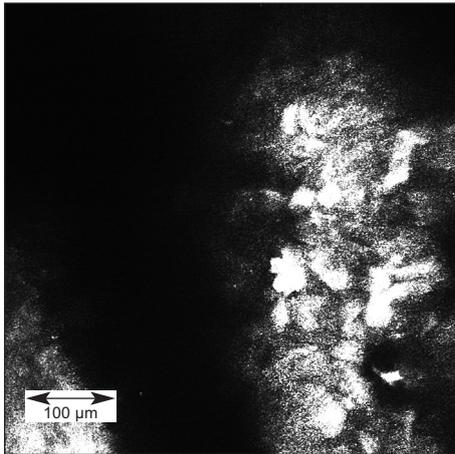


Abb. 63: stratum corneum, Psoriasis, Vivascope® 1500

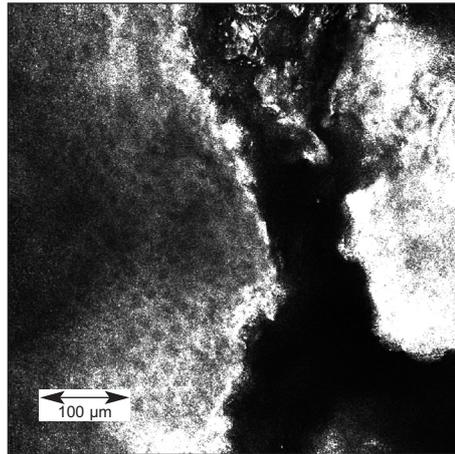


Abb. 64: stratum corneum/stratum granulosum, Psoriasis, Vivascope® 1500

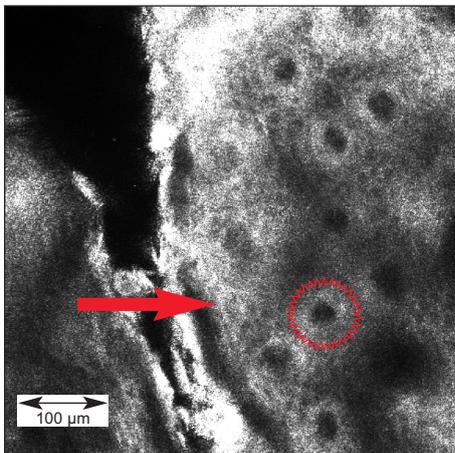


Abb. 65: stratum spinosum/stratum basale, Psoriasis, Vivascope® 1500

### 3.1.5.2 Histologische Besonderheiten

#### Akanthose

Als Akanthose wird die Verbreiterung der Epidermis bezeichnet. Sie ist mit beiden Geräten subjektiv erfassbar. Um dies exakt und objektiv nachzuweisen, wurde von allen Probanden die minimale und maximale Epidermisdicke vermessen.

#### Parakeratose

Als Parakeratose wird die überstürzte Differenzierung der Keratinozyten bezeichnet. Es sind abgestorbene Zellen sowie Zellen mit Zellkernen sichtbar.

Die Abbildungen 66 und 67 zeigen das nebeneinander Auftreten beider Entwicklungsstufen. Die Aufnahme mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 (Abb. 67) zeigt nur ungenau und schwer zu differenzierende Zellverbände. Die mit dem kLSM „Stratum“ erfolgte Aufnahme (Abb. 66), zeigt sehr detailliert die verschiedenen Zellen.

In den Abbildungen 66 und 67 sind bei genauer Betrachtung Zellkerne ersichtlich (Abb. 66 u. 67, roter Pfeil). Wie schon erwähnt ist die Detailgenauigkeit mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 (Abb. 67) nicht gegeben. Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 66, aufgenommen mit dem kLSM „Stratum“, Zellen mit Zellkernen und Zellen ohne Zellkern eindeutig und klar.

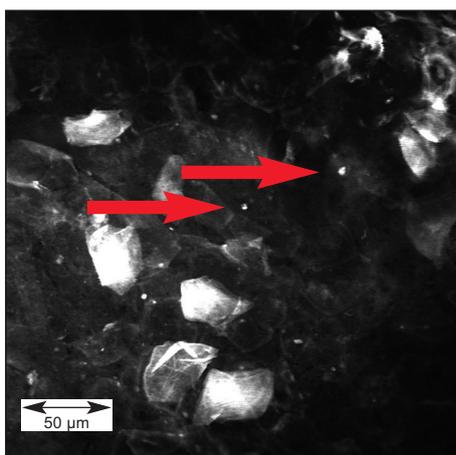


Abb. 66: stratum corneum, Psoriasis, kLSM „Stratum“

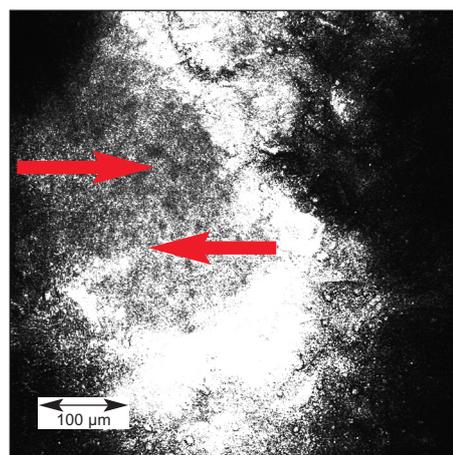


Abb. 67: stratum corneum/stratum granulosum, Psoriasis, Vivascope<sup>®</sup> 1500

Allen Abbildungen gemeinsam ist das Vorhandensein verschiedener Entwicklungsstufen der Keratinozyten sowie ein relativ ungeordnetes Erscheinungsbild.

### Hyperkeratose

Die für die Psoriasis typische Verdickung des stratum corneums ist während der Untersuchungen mit beiden Laser-Scan-Modi sichtbar. Für eine statistische Auswertung wurde die Entfernung zwischen der obersten Hautschicht und dem ersten Auftreten der lebenden Zellen gemessen.

### Gefäßveränderungen

Die normale Gefäßversorgung der Haut geschieht über zwei Gefäßplexi. Einem oberflächlich in der papillären Dermis gelegenen und einem tiefen in der reticulären Dermis und Subcutis gelegenen. Die hier dargestellten Gefäße befinden sich in der oberen Dermis. Beobachtungen des tiefen Gefäßplexus sind aufgrund der limitierten Auflösung der Mikroskope nicht möglich.

Wie in Abb. 69 deutlich zu erkennen ist, sind die dilatierten Gefäße und zirkulierende Blutströme mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 gut zu erkennen (Abb. 69, rote Pfeile).

Je nach Anschnitt der oberen Papillen können die Gefäßlumen beobachtet werden. In Abbildung 69 sind diese als kleine dunkle Punkte innerhalb der Papille sichtbar. Da die kapillären Gefäße gerade bei Psoriasis einen gewundenen und geschlängel-

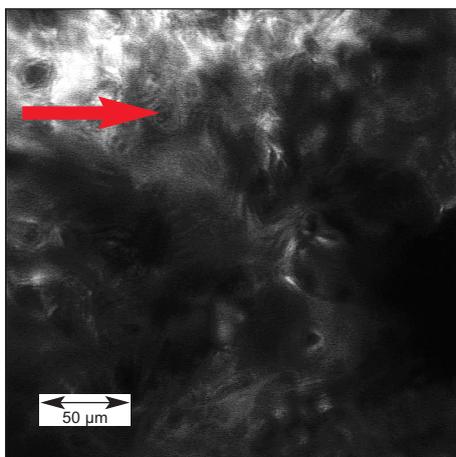


Abb. 68: stratum spinosum/stratum basale, Psoriasis, kLSM „Stratum“

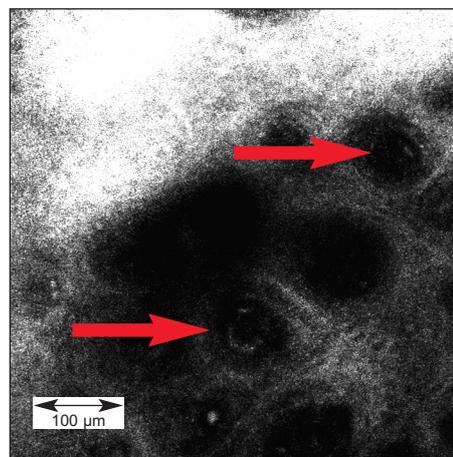


Abb. 69: stratum spinosum/stratum basale, Psoriasis, Vivascope<sup>®</sup> 1500

ten Verlauf nehmen, können je nach Anschnitt ein oder mehrere Gefäßlumen beobachtet werden.

Abbildung 68 zeigt die Darstellung der Gefäßveränderungen bei Psoriasis mittels des kLSM „Stratum“. Die Aufnahme zeigt ebenfalls die Papille mit den Gefäßlumen und auch sichtbaren Gefäßen.

## **Therapieverlauf**

Innerhalb der dreiwöchigen Untersuchungsphase konnte unter den verschiedensten Therapieformen auf den ersten Blick eine klinische Besserung des stratum corneums bei allen Patienten festgestellt werden.

Man darf nicht davon ausgehen, dass es sich hierbei grundsätzlich um einen optimalen Therapieerfolg handelt. Es wurde festgestellt, dass in der mikroskopischen Untersuchung mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 in diesen Untersuchungsarealen weiterhin ausgeprägte histologische Veränderungen, wie z.B. Epidermisverdickungen und Papillomatosen, ab dem stratum granulosum sichtbar sind.

## **3.2 Quantitative Auswertung**

### **3.2.1 Auswertung der Daten der gesunden Probanden**

#### **3.2.1.1 kLSM „Stratum“**

Es konnten mittels des „Stratum“-Mikroskops der Beginn der Epidermis, das erste Erscheinen von Zellkernen und Papillen mit Gefäßen sowie der Beginn des stratum reticulare optisch dargestellt werden. Das Ermitteln der Papillenanzahl war aufgrund des kleinen Bildausschnittes von 250 µm x 250 µm nicht möglich.

Somit konnten mit dem kLSM „Stratum“ folgende Parameter statistisch erfasst und bearbeitet werden: die minimale und maximale Epidermisdicke, die Dicke des stratum corneums sowie der Durchmesser der Gefäßlumen in der papillären Dermis.

Die Daten wurden an gesunden Probanden an einem Untersuchungstag erhoben. Eine Verlaufsbeobachtung wurde nicht durchgeführt.

Es konnten die oben angeführten Meßwerte an zwölf gesunden Probanden erhoben werden: minimale Epidermisdicke, maximale Epidermisdicke und Dicke des stratum corneums. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Anzahl der untersuchten Probanden und deren erhobenen und errechneten statistischen Werte bezüglich Emin, Emax und der Dicke des stratum corneums.

Proband	MW Emin in rE ± SD	MW Emax in rE ± SD	MW DSC in rE ± SD
1	37,66 ± 12,50	75,00 ± 9,74	14,50 ± 3,57
2	30,33 ± 10,57	82,30 ± 9,81	8,60 ± 1,85
3	46,00 ± 15,71	89,00 ± 10,62	15,00 ± 2,90
4	44,00 ± 14,92	81,00 ± 8,51	14,60 ± 2,76
5	37,60 ± 18,12	78,60 ± 7,65	21,00 ± 5,84
6	44,60 ± 12,56	85,30 ± 10,53	18,00 ± 3,89

Proband	MW Emin in rE ± SD	MW Emax in rE ± SD	MW DSC in rE ± SD
7	37,33 ± 14,37	92,33 ± 8,61	13,60 ± 2,86
8	44,33 ± 12,19	106,66 ± 8,52	17,60 ± 3,47
9	51,66 ± 13,75	78,30 ± 9,15	16,60 ± 2,57
10	80,00 ± 10,90	85,66 ± 7,86	17,00 ± 3,19
11	66,00 ± 12,30	82,30 ± 10,51	15,50 ± 4,42
12	51,66 ± 13,80	92,00 ± 8,70	17,80 ± 2,15

Tabelle 9: gesunde Probanden, kLSM „Stratum“

Desweiteren konnten mit dem kLSM „Stratum“ die Gefäßlumen im stratum papillare erfaßt werden. Abbildung 40 zeigt mehrere Papillen mit Gefäßlumen (Abb.40, rote Pfeile).

Alle gesunden Probanden konnten bezüglich der Gefäßlumina optisch dargestellt und numerisch erfasst werden.

Tabelle 10 gibt einen Überblick über die untersuchten Probanden und erfassten Werte bezüglich der Gefäßlumen-Durchmesser.

Proband	Gefäßlumen- Durchmesser in rE
1	5,1 ± 2,4
2	7,9 ± 1,7
3	4,5 ± 2,3
4	6,3 ± 3,0
5	10,8 ± 5,6
6	3,5 ± 2,7

Proband	Gefäßlumen- Durchmesser in rE
7	8,1 ± 3,10
8	10,5 ± 5,8
9	8,3 ± 4,4
10	5,2 ± 3,5
11	8,2 ± 5,5
12	5,8 ± 1,6

Tabelle 10 : gesunde Probanden, kLSM „Stratum“

### 3.2.1.2 Vivascope<sup>®</sup>1500

Die mit dem kLSM erhobenen Parameter Emin, Emax, DSC sowie die Durchmesser der Gefäßlumina wurden ebenso mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 untersucht. Zusätzlich konnte mit dieser Methode die Anzahl der Papillen pro Bildausschnitt ermittelt werden.

Tabelle 11 zeigt im Überblick die erfassten und errechneten Daten der gesunden Probanden hinsichtlich der minimalen und maximalen Epidermisdicke sowie der Größe des stratum corneums.

Proband	MW Emin in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	MW Emax in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	MW DSC in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$
1	40,46 $\pm 4,38$	95,35 $\pm 12,73$	15,45 $\pm 1,85$
2	41,21 $\pm 3,72$	79,25 $\pm 20,51$	8,45 $\pm 2,73$
3	43,40 $\pm 2,9$	81,44 $\pm 10,83$	12,56 $\pm 1,57$
4	37,06 $\pm 7,83$	86,31 $\pm 15,78$	16,76 $\pm 3,48$
5	30,72 $\pm 2,61$	120,56 $\pm 12,82$	12,00 $\pm 2,51$
6	36,57 $\pm 5,2$	94,79 $\pm 9,64$	10,46 $\pm 2,81$

Proband	MW Emin in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	MW Emax in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	MW DSC in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$
7	41,21 $\pm 7,62$	67,56 $\pm 13,3$	11,35 $\pm 2,71$
8	47,55 $\pm 3,12$	87,98 $\pm 14,57$	10,45 $\pm 1,73$
9	50,23 $\pm 3,44$	100,24 $\pm 10,35$	12,00 $\pm 2,81$
10	43,89 $\pm 7,8$	78,45 $\pm 15,41$	10,81 $\pm 1,91$
11	44,38 $\pm 8,19$	95,10 $\pm 18,67$	8,00 $\pm 2,27$
12	39,25 $\pm 5,7$	110,95 $\pm 20,36$	13,56 $\pm 5,6$

Tabelle 11: gesunde Probanden, Vivascope<sup>®</sup> 1500

Die mittels des Vivascope<sup>®</sup> 1500 erfassten Daten bezüglich der Durchmesser der Gefäßlumina sowie der Papillenzahl sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

Proband	Papillen- anzahl	Durchmesser der Gefäßlumina in $\mu\text{m}$
1	5	6,97 $\pm 1,67$
2	6	7,47 $\pm 1,41$
3	4	10,25 $\pm 1,56$
4	4	7,02 $\pm 1,02$
5	8	8,57 $\pm 1,44$
6	7	6,76 $\pm 1,11$

Proband	Papillen- anzahl	Durchmesser der Gefäßlumina in $\mu\text{m}$
7	6	9,10 $\pm 1,30$
8	5	7,74 $\pm 1,43$
9	4	10,06 $\pm 1,12$
10	6	6,70 $\pm 1,25$
11	7	6,99 $\pm 1,21$
12	8	6,70 $\pm 1,30$

Tabelle 12: gesunde Probanden, Vivascope<sup>®</sup> 1500

## 3.2.2 Auswertung der Daten der Psoriasis-Patienten

### 3.2.2.1 kLSM „Stratum“

In der Probandengruppe der Psoriasis-patienten wurden die Daten zur Ermittlung der einzelnen Parameter an zwei im wöchentlich Abstand stattfindenden Untersuchungsterminen ermittelt. Es konnten wie bei den gesunden Probanden, die minimale und maximale Epidermisdicke, die Dicke des stratum corneums sowie die Durchmesser der Gefäßlumina ermittelt werden.

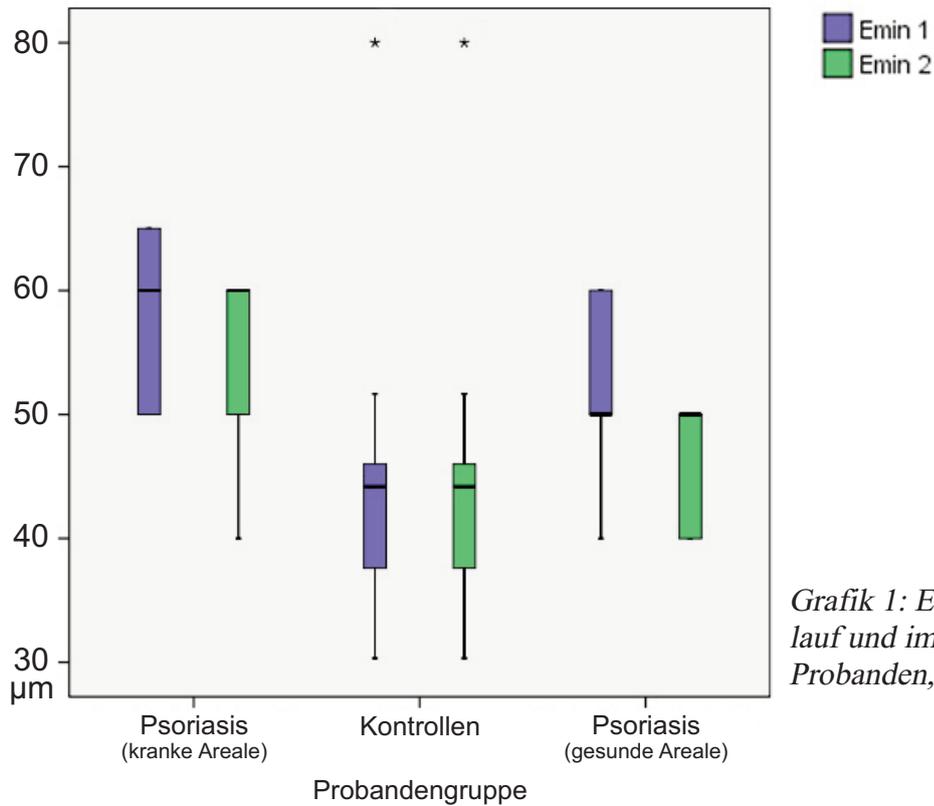
Tabelle 13 zeigt einen Überblick über die ermittelte minimale und maximale Epidermisdicke sowie die Dicke des stratum corneums im Verlauf von zwei Wochen.

Proband	E min 1 in rE ± SD	E max 1 in rE ± SD	DSC 1 in rE ± SD	E min 2 in rE ± SD	E max 2 in rE ± SD	DSC 2 in rE ± SD
1	60 ± 8,51	100 ± 10,85	20 ± 5,4	60 ± 5,41	100 ± 10,89	10 ± 5,29
2	50 ± 10,37	80 ± 7,71	30 ± 3,12	40 ± 8,13	70 ± 14,41	20 ± 5,81
3	65 ± 5,85	90 ± 14,13	20 ± 7,95	60 ± 11,35	85 ± 10,73	10 ± 3,51
4	65 ± 7,23	110 ± 16,25	13 ± 8,53	60 ± 12,48	100 ± 19,32	10 ± 4,32
5	50 ± 5,87	100 ± 6,8	21 ± 6,51	50 ± 10,27	90 ± 9,85	15 ± 4,12
6	55 ± 7,61	85 ± 12,49	20 ± 4,51	50 ± 5,81	85 ± 10,12	20 ± 3,43

Tabelle 13: Psoriasis-Patienten, kLSM „Stratum“

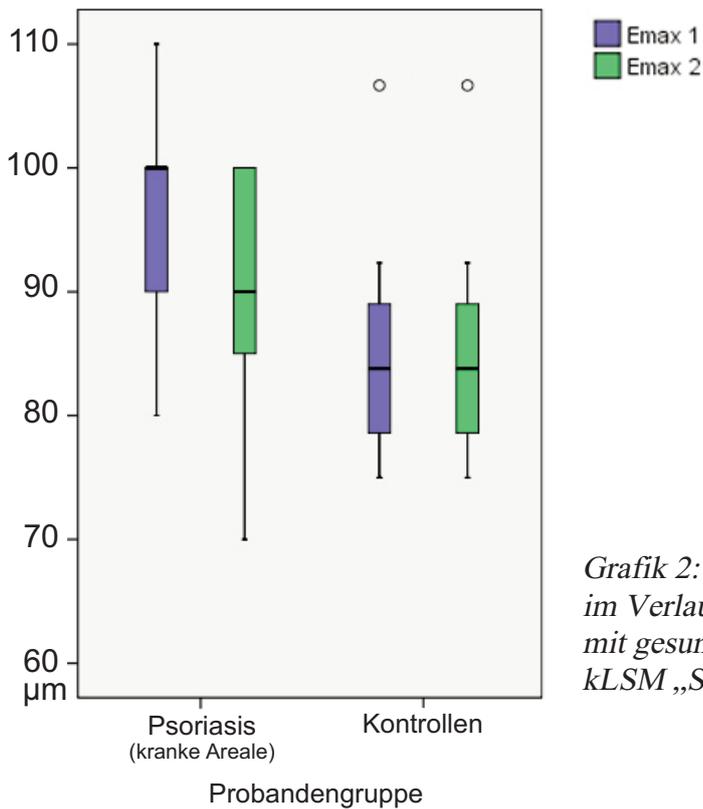
In den Grafiken 1 bis 3 ist der zeitliche Verlauf der minimalen und maximalen Epidermisdicke sowie die Dicke des stratum corneums im Verlauf dargestellt sowie der Vergleich mit der gesunden Probandengruppe sichtbar.

### Minimale Epidermisdicke



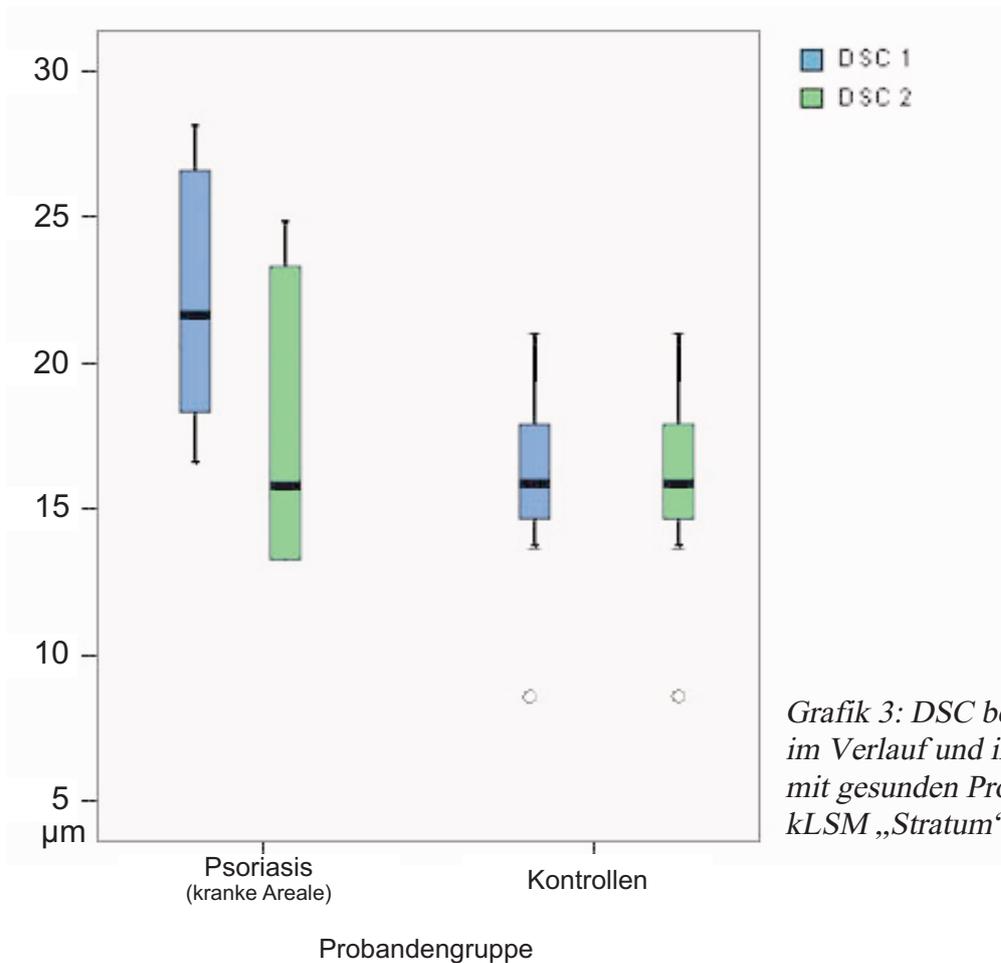
Grafik 1: E min bei Psoriasis im Verlauf und im Vergleich mit gesunden Probanden, kLSM „Stratum“

### Maximale Epidermisdicke



Grafik 2: Emax bei Psoriasis, im Verlauf und im Vergleich mit gesunden Probanden, kLSM „Stratum“

### Dicke des stratum corneums



#### 3.2.2.2 Vivascope® 1500

Die Untersuchungen der 15 Psoriasis-Patienten fanden an drei im wöchentlichen Rhythmus stattfindenden Untersuchungsterminen statt. Die mit dem kLSM „Stratum“ erhobenen Daten für gesunde Probanden und Psoriasis-Patienten konnten ebenso mit dem Vivascope® 1500 ermittelt werden. Dies sind DSC, Emin, Emax, und der Durchmesser der Gefäßlumina. Zusätzlich konnte die Anzahl der Papillen erfaßt werden.

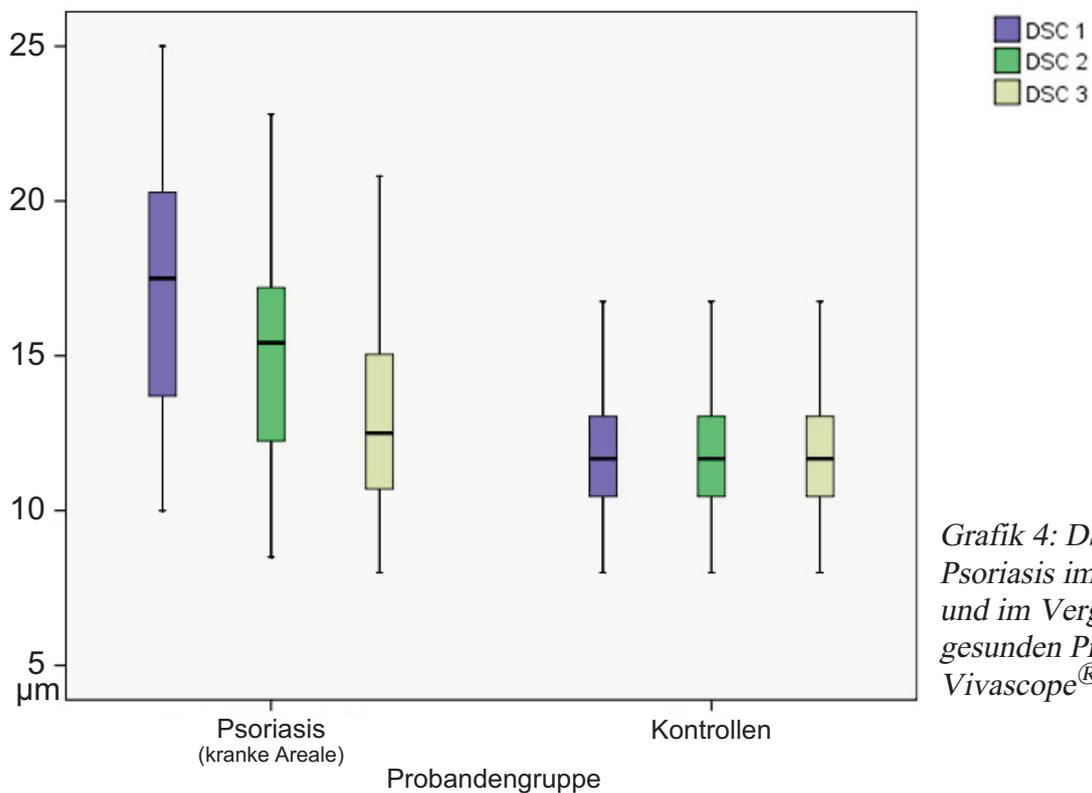
## Dicke des stratum corneums (DSC)

Die Dicke des stratum corneums im Verlauf spiegelt Tabelle 14 wider.

Proband	DSC 1 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	DSC 2 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	DSC 3 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$
1	17,56 $\pm 5,6$	15,50 $\pm 4,02$	15,00 $\pm 5,14$
2	12,00 $\pm 3,8$	12,00 $\pm 5,71$	12,00 $\pm 2,78$
3	20,00 $\pm 4,51$	20,00 $\pm 4,01$	20,00 $\pm 5,56$
4	22,50 $\pm 6,82$	20,50 $\pm 4,56$	15,00 $\pm 3,71$
5	17,50 $\pm 4,34$	15,42 $\pm 4,12$	13,5 $\pm 3,62$
6	15,00 $\pm 3,61$	15,00 $\pm 3,47$	10,90 $\pm 4,79$
7	15,00 $\pm 2,6$	12,50 $\pm 2,19$	10,5 $\pm 2,31$
8	25,00 $\pm 4,17$	22,8 $\pm 4,02$	20,8 $\pm 5,68$

Proband	DSC 1 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	DSC 2 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	DSC 3 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$
9	10,5 $\pm 3,24$	9,70 $\pm 3,89$	9,50 $\pm 1,72$
10	10,00 $\pm 2,7$	8,50 $\pm 3,56$	8,00 $\pm 3,91$
11	12,60 $\pm 4,45$	11,40 $\pm 2,71$	8,50 $\pm 3,43$
12	14,80 $\pm 3,8$	14,00 $\pm 2,51$	15,00 $\pm 4,36$
13	20,57 $\pm 5,17$	15,5 $\pm 3,91$	12,5 $\pm 4,71$
14	20,56 $\pm 7,61$	18,40 $\pm 4,11$	15,10 $\pm 4,78$
15	18,84 $\pm 4,32$	16,00 $\pm 4,31$	18,00 $\pm 3,45$

Tabelle 14: Psoriasis-Patienten, Vivascope<sup>®</sup> 1500



Grafik 4: DSC bei Psoriasis im Verlauf und im Vergleich mit gesunden Probanden, Vivascope<sup>®</sup> 1500

### Minimale und maximale Epidermisdicke (Emin und Emax)

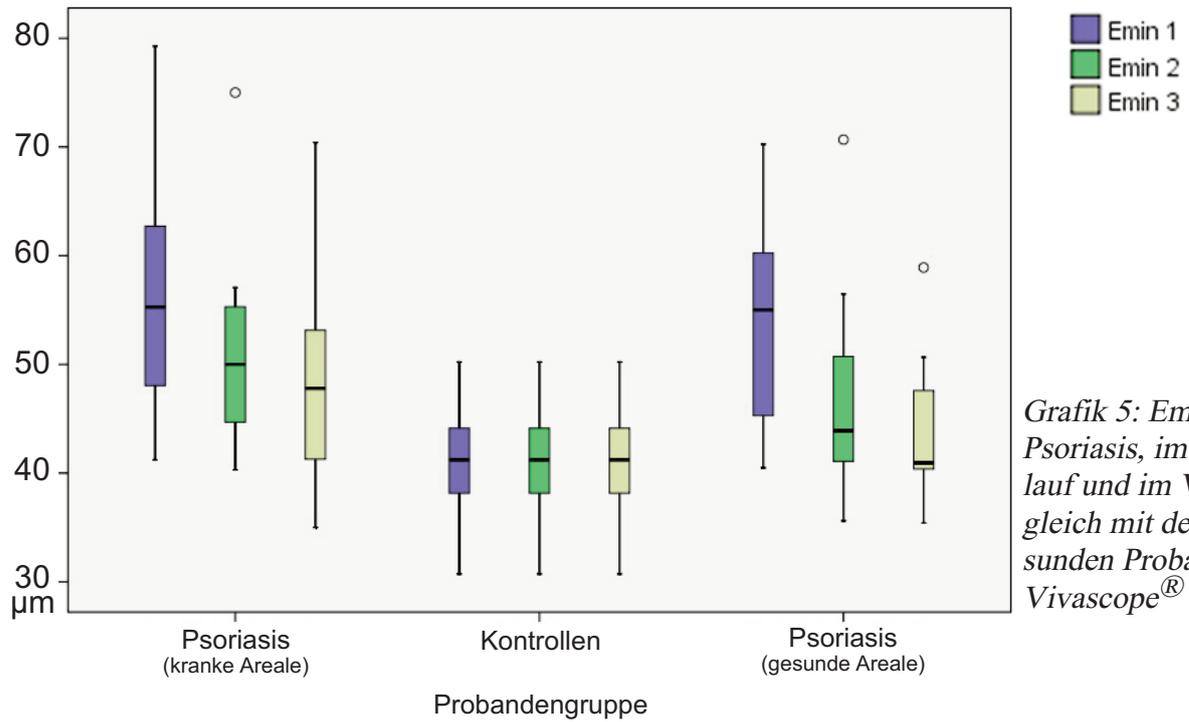
Auch Emin und Emax konnten im Verlauf von drei Wochen in der Psoriasis-Gruppe ermittelt werden.

Tabelle 15 zeigt die im Verlauf erhaltenen Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der Probanden.

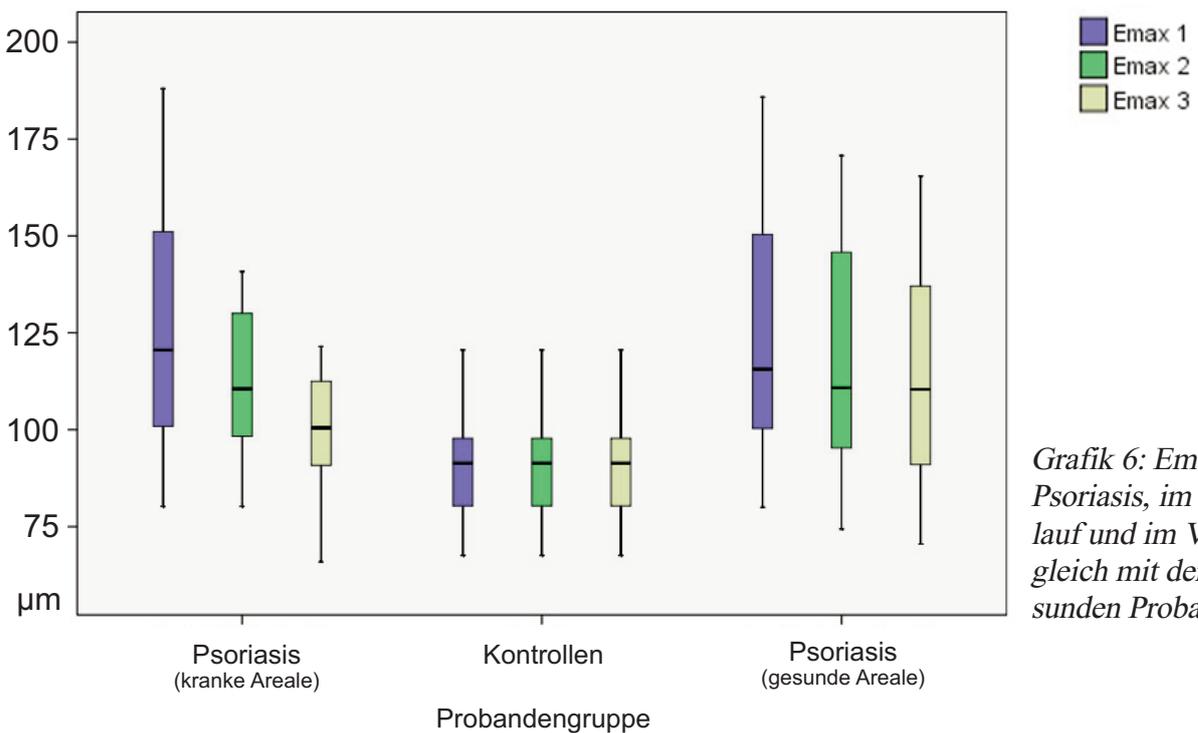
Proband	Emin 1 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	Emin 2 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	Emin 3 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	Emax 1 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	Emax 2 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$	Emax 3 in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$
1	63,46 $\pm 10,52$	57,06 $\pm 10,71$	50 $\pm 8,17$	100,36 $\pm 20,89$	95,36 $\pm 13,8$	90,8 $\pm 10,17$
2	41,21 $\pm 8,71$	41,21 $\pm 5,85$	35,00 $\pm 13,28$	80,23 $\pm 35,67$	80,23 $\pm 18,15$	70,74 $\pm 15,73$
3	63,4 $\pm 15,45$	55,5 $\pm 10,13$	52,8 $\pm 10,69$	101,44 $\pm 49,38$	100,80 $\pm 25,73$	91,9 $\pm 16,51$
4	62,03 $\pm 12,78$	50,72 $\pm 5,87$	47,8 $\pm 8,26$	136,31 $\pm 25,71$	130,23 $\pm 16,27$	110 $\pm 15,82$
5	50,72 $\pm 9,42$	50,1 $\pm 6,94$	45 $\pm 12,13$	120,56 $\pm 26,83$	110,56 $\pm 15,31$	90,4 $\pm 15,79$
6	66,57 $\pm 11,28$	44,38 $\pm 10,28$	40,90 $\pm 11,31$	134,79 $\pm 20,72$	120,78 $\pm 13,61$	100,56 $\pm 18,94$
7	47,55 $\pm 10,35$	40,3 $\pm 6,31$	35,4 $\pm 8,23$	167,56 $\pm 28,19$	120,5 $\pm 15,43$	110,6 $\pm 15,41$
8	47,55 $\pm 8,32$	45 $\pm 10,42$	43,74 $\pm 5,87$	187,98 $\pm 39,43$	129,8 $\pm 20,72$	121,47 $\pm 17,81$
9	60,23 $\pm 5,91$	57 $\pm 9,71$	55,56 $\pm 10,33$	100,24 $\pm 42,91$	95,8 $\pm 25,13$	90,86 $\pm 20,16$
10	57,06 $\pm 10,13$	55,1 $\pm 6,10$	53,48 $\pm 10,72$	178,45 $\pm 30,14$	130,7 $\pm 18,01$	115,78 $\pm 15,71$
11	48,56 $\pm 8,57$	44,38 $\pm 12,49$	41,67 $\pm 7,51$	95,1 $\pm 20,57$	90,5 $\pm 17,95$	65,89 $\pm 16,82$
12	79,25 $\pm 10,08$	75 $\pm 12,27$	70,4 $\pm 12,38$	114,12 $\pm 31,57$	110 $\pm 18,31$	100,12 $\pm 18,58$
13	46,23 $\pm 6,52$	45,47 $\pm 6,83$	40,6 $\pm 4,97$	161,67 $\pm 45,72$	140,8 $\pm 18,12$	120,7 $\pm 16,97$
14	55,27 $\pm 11,92$	50 $\pm 4,36$	60,37 $\pm 7,62$	140,59 $\pm 42,86$	110,26 $\pm 20,12$	100,51 $\pm 18,78$
15	50,64 $\pm 8,47$	45,29 $\pm 13,79$	50,83 $\pm 11,54$	115,38 $\pm 33,81$	135,24 $\pm 15,38$	114,42 $\pm 17,49$

Tabelle 15: Psoriasis-Patienten, Vivascope<sup>®</sup> 1500

Die Grafiken 5 und 6 (Seite 76) zeigen den zeitlichen Verlauf der minimalen und maximalen Epidermisdicke innerhalb der drei Untersuchungswochen sowie den Vergleich mit der Kontrollgruppe als auch mit den gesunden Arealen der Psoriasispatienten.



Grafik 5: Emin, Psoriasis, im Verlauf und im Vergleich mit den gesunden Probanden, Vivascope® 1500



Grafik 6: Emax, Psoriasis, im Verlauf und im Vergleich mit den gesunden Probanden

## Papillenanzahl, Gefäßdurchmesser

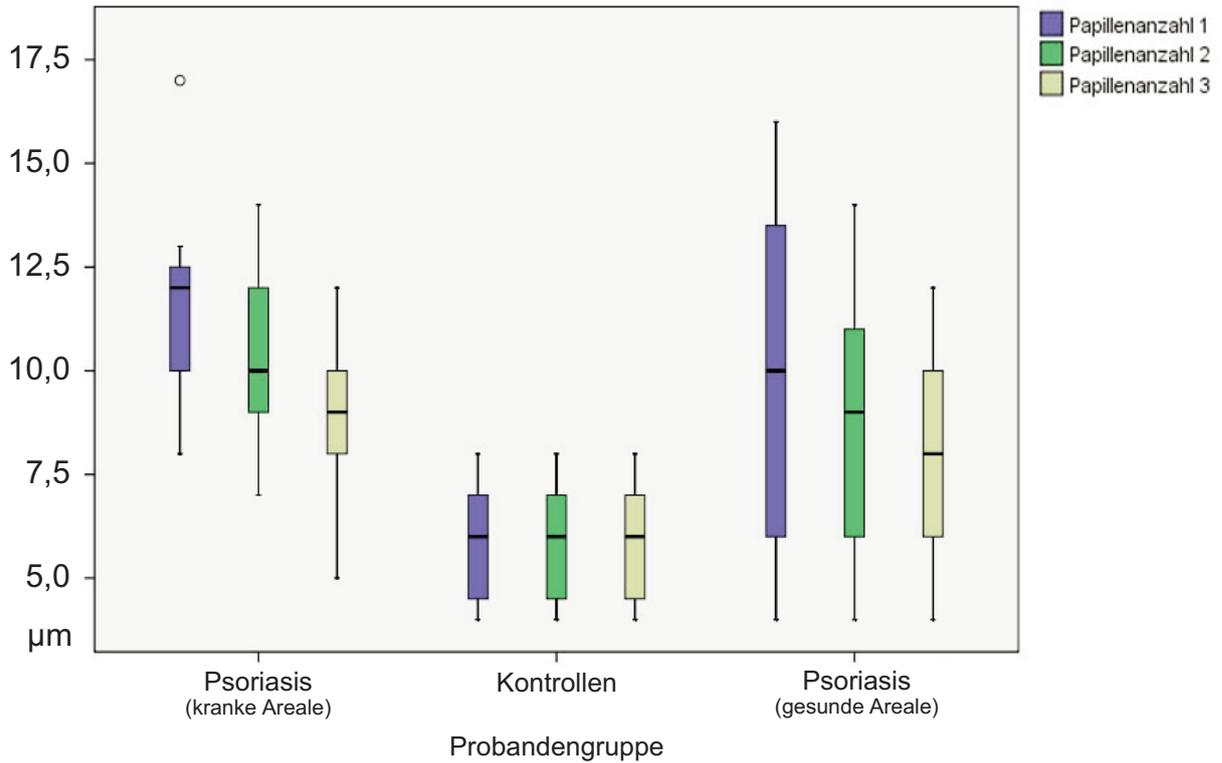
Für alle Psoriasis-Patienten konnte die Anzahl der Papillen und der Durchmesser der Gefäße mit dem Vivascope® 1500 im Verlauf erhoben werden.

Tabelle 16 zeigt die erhobenen Daten der Anzahl der Papillen sowie der Gefäßdurchmesser (Gefäßlumina).

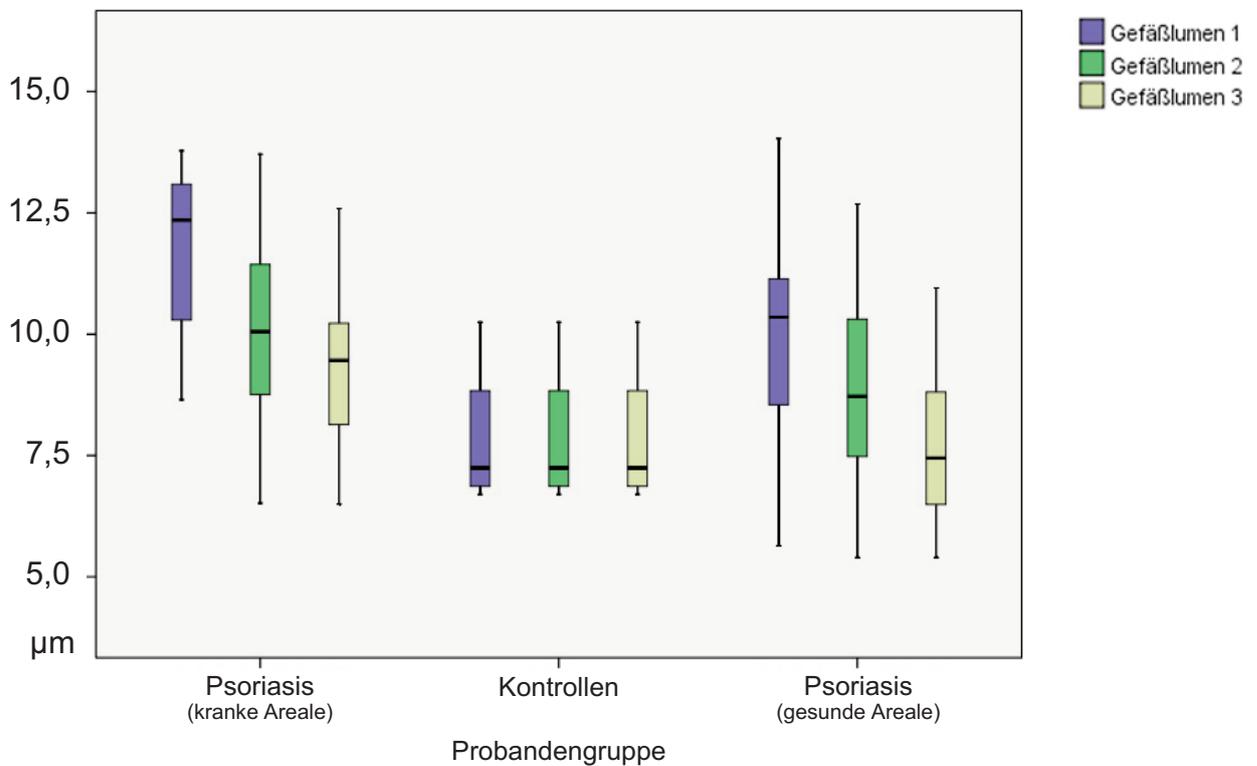
Proband	Papillen-Anzahl 2,01	Papillen-Anzahl 2,22	Papillen-Anzahl 3,10	Durchmesser 3,10 $\mu\text{m}$	Durchmesser 2,28 $\mu\text{m}$	Durchmesser 3,01 $\mu\text{m}$
1	8 $\pm 1,71$	7 $\pm 1,71$	5 $\pm 1,91$	8,65 $\pm 1,51$	8 $\pm 1,72$	7 $\pm 2,21$
2	10 $\pm 2,83$	10 $\pm 1,91$	9 $\pm 1,51$	12,38 $\pm 2,38$	9,01 $\pm 2,51$	8,54 $\pm 1,63$
3	13 $\pm 1,91$	13 $\pm 1,51$	12 $\pm 3,14$	11,25 $\pm 1,73$	11 $\pm 1,91$	10 $\pm 1,17$
4	17 $\pm 1,87$	14 $\pm 2,91$	12 $\pm 2,91$	9,03 $\pm 2,89$	8 $\pm 2,12$	8 $\pm 1,51$
5	10,5 $\pm 2,49$	8,6 $\pm 2,1$	8 $\pm 1,47$	10,7 $\pm 1,17$	8,5 $\pm 1,57$	8 $\pm 1,38$
6	12,5 $\pm 2,57$	10 $\pm 1,21$	10 $\pm 2,64$	10,25 $\pm 1,23$	10 $\pm 1,11$	10 $\pm 1,41$
7	13 $\pm 2,91$	12 $\pm 1,53$	9 $\pm 1,91$	13,44 $\pm 1,58$	10,05 $\pm 1,31$	9,46 $\pm 1,32$
8	12 $\pm 2,18$	9,5 $\pm 2,64$	7 $\pm 1,87$	12,99 $\pm 1,57$	11,6 $\pm 2,93$	10,45 $\pm 1,27$
9	10 $\pm 1,47$	10 $\pm 1,47$	8 $\pm 2,49$	10,33 $\pm 1,87$	9,42 $\pm 1,78$	8,27 $\pm 1,61$
10	10 $\pm 1,51$	10 $\pm 1,64$	9 $\pm 1,72$	12,81 $\pm 2,15$	12 $\pm 2,28$	10 $\pm 1,71$
11	12 $\pm 1,47$	12 $\pm 1,91$	11 $\pm 2,14$	13,78 $\pm 1,36$	13,71 $\pm 1,87$	12,59 $\pm 2,81$
12						
13	12 $\pm 2,91$	9 $\pm 1,37$	8 $\pm 1,95$	13,31 $\pm 1,53$	10,75 $\pm 1,36$	9 $\pm 1,81$
14	10,5 $\pm 3,14$	9 $\pm 1,47$	8 $\pm 1,83$	12,35 $\pm 1,46$	11,79 $\pm 2,18$	10,5 $\pm 1,16$
15	8 $\pm 2,37$	9 $\pm 2,49$	7 $\pm 1,57$	10,25 $\pm 1,26$	6,25 $\pm 1,89$	6,5 $\pm 1,77$

Tabelle 16: Psoriasis-Patienten, Vivascope® 1500

Die Grafiken 7 und 8 geben einen optischen Überblick über den Verlauf der Papillenanzahl sowie der Gefäßdurchmesser im Vergleich mit der Kontrollgruppe (gesunde Probanden) sowie mit den gesunden Arealen der Psoriasis-Probanden.



Grafik 7: Papillenzahl, Psoriasis, im Verlauf und im Vergleich mit der Kontrollgruppe, Vivascope® 1500



Grafik 8: Gefäßlumina, Psoriasis, im Verlauf und im Vergleich mit der Kontrollgruppe, Vivascope® 1500

## Gesunde Areale der Psoriasis-Patienten

Ebenso wie in den vorangegangenen Untersuchungen konnten für die subjektiv äußerlich gesund erscheinenden Areale der Psoriasis-Patienten folgende Parameter erhoben werden, DSC, Emin, Emax und sowie die Papillenanzahl als auch der Durchmesser der Gefäßlumen. Es konnten Daten von 15 Patienten erhoben werden.

Tabelle 17 gibt einen Überblick über die erhaltenen Daten.

Patient	Emin in $\mu\text{m}$	Emax in $\mu\text{m}$	Papillen- Anzahl	Gefäßlumen in $\mu\text{m}$	DSC in $\mu\text{m}$
1	62,4 $\pm 10,14$	100,2 $\pm 30,81$	15,5 $\pm 5,81$	6,37 $\pm 2,38$	10,01 $\pm 1,87$
2	40,5 $\pm 6,81$	80 $\pm 24,37$	11 $\pm 1,3$	9,91 $\pm 2,17$	18,73 $\pm 3,19$
3	60 $\pm 12,73$	100,4 $\pm 35,47$	7 $\pm 2,3$	17,32 $\pm 1,93$	12,67 $\pm 5,67$
4	60,48 $\pm 8,27$	130,45 $\pm 40,25$	10 $\pm 1,1$	15,02 $\pm 2,18$	13,49 $\pm 3,61$
5	50,7 $\pm 5,19$	115,61 $\pm 34,63$	13 $\pm 2,2$	8,79 $\pm 1,59$	19,71 $\pm 5,78$
6	65,5 $\pm 10,34$	134,51 $\pm 50,71$	6 $\pm 1,7$	10,26 $\pm 2,08$	10,85 $\pm 2,34$
7	40,5 $\pm 8,25$	165,28 $\pm 26,48$	12 $\pm 3,7$	15,43 $\pm 1,49$	16,74 $\pm 2,82$
8	45,31 $\pm 5,49$	185,82 $\pm 40,27$	9 $\pm 2,3$	10,97 $\pm 5,85$	12,12 $\pm 3,18$
9	58,49 $\pm 17,23$	90,57 $\pm 38,12$	7 $\pm 1,8$	8,16 $\pm 6,13$	15,69 $\pm 1,79$
10	55,62 $\pm 6,98$	170,21 $\pm 32,84$	18 $\pm 1,31$	7,53 $\pm 2,10$	11,76 $\pm 2,19$
11	45,27 $\pm 5,43$	95 $\pm 20,31$	6 $\pm 1,2$	8,28 $\pm 1,82$	9,86 $\pm 5,36$
12	70,24 $\pm 9,71$	110,83 $\pm 28,69$	9 $\pm 5,8$	8,36 $\pm 1,41$	18,78 $\pm 3,12$
13	45,18 $\pm 7,65$	160,43 $\pm 21,43$	6 $\pm 4,4$	5,1 $\pm 2,78$	16,32 $\pm 3,83$
14	55 $\pm 8,31$	140,3 $\pm 41,57$	8 $\pm 2,9$	8,82 $\pm 1,33$	17,25 $\pm 1,59$
15	45,5 $\pm 5,73$	110,28 $\pm 19,81$	5 $\pm 1,8$	6,64 $\pm 2,49$	20,13 $\pm 2,86$

Tabelle 17: Psoriasis-Patienten, gesunde Areale, Vivascope<sup>®</sup> 1500

## 4. Diskussion

### 4.1 Allgemein

Die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie (kLSM) ist eine Methode zur histologischen Untersuchung von Hautschichten. Unter Ablauf dynamischer Prozesse können in vivo Aufnahmen der einzelnen Hautschichten in Echtzeit gemacht werden.

Bisherige histologische Untersuchungen basieren auf der Entnahme von Gewebe. Dieses wird seiner ursprünglichen Umgebung entnommen und z.T. durch Färbungen und verschiedensten Formen der histologischen Untersuchung verändert. Es unterliegt als totes Gewebe steten Umformungen und Veränderungen. Die bei der histologischen Untersuchung entstehenden Ergebnisse spiegeln den Zustand des toten Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder.

Durch die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie lassen sich morphologische Veränderungen auf zellulärer Ebene objektiv erfassen. Diese Methode der Mikroskopie basiert auf der optischen Darstellung der Hautareale in dünnen horizontalen Schnitten. Diese werden dem Betrachter auf dem Monitor sichtbar gemacht. Die technischen Gegebenheiten der Geräte ermöglichen die digitale Speicherung der Bilder auf einem externen Datenträger. Ferner können nachträgliche Wiederholungs- oder Kontrolluntersuchungen mit den ursprünglich ausgewerteten Original-/Voruntersuchungsdaten verglichen werden.

Die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie bietet gegenüber der klassischen Histologie in bestimmten Fragestellungen einen entscheidenden Vorteil. Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie wird bei der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie lebendes Gewebe in seiner natürlichen Umgebung erfaßt. Die Untersuchungsqualität sowie der dadurch entstandene Zeitgewinn bis zur Diagnosestellung sind wesentliche Vorteile der kLSM.

Entscheidender limitierender Faktor der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie ist die durch die horizontale Schnittdarstellung limitierte Tiefendarstellung. Das von „oben daraufsehen“ ist in die Tiefe begrenzt und macht nur Aussagen über oberflächlich gelegene Strukturen möglich. Aussagen über tiefer liegende Schichten wie die retikuläre Dermis und die Subcutis sind kaum möglich.

Des Weiteren sind Zellen und Zellkerne mit beiden Methoden darstellbar, jedoch bleiben alle weiteren Zellbestandteile unerkant (Abb. 26-29).

In dieser Arbeit blieb die Auswahl der einzelnen Therapiekonzepte der einzelnen Psoriasis- Patienten unberücksichtigt. Für klinische Aussagen bezüglich Effektivität, Nutzen und Nebenwirkungen einzelner Therapieschematas wird derzeit eine weiterführende Studie mit dem Vivascope® 1500 in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

## 4.2 Qualitative Auswertung

Für die kLSM existieren zur Zeit zwei verschiedene Mikroskoptypen. Zum einen das Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskop und zum anderen das auf Reflektanz beruhende konfokale Laser-Scan-Mikroskop. Beiden gemeinsam ist die in vivo Untersuchung am Patienten in Echtzeit. Unterschiede gibt es jedoch bezüglich der Funktionsweise, der Tiefenschärfe sowie der Anwendungsmodalitäten.

Im weiteren Verlauf soll auf die Gemeinsamkeiten und Unterschiede näher eingegangen und im Zusammenhang mit den Ergebnissen diskutiert werden.

### 4.2.1 kLSM „Stratum“

Mit dem Einsatz der Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie lassen sich morphologische Veränderungen der Haut feststellen. In unserer Studie mit gesunden Probanden konnten zum Beispiel Unterschiede zwischen trockener und normaler Haut visuell festgehalten werden (Abb. 24, 25). Des Weiteren lassen sich dynamischen Veränderungen des Natriumfluoreszeins in allen Stadien beobachten.

In unserer Forschungsgruppe konnten aufgrund der dynamischen Untersuchungsmethode Studien über die Reservoirfunktion des stratum corneums sowie dessen Beeinflussbarkeit mittels topisch applizierter Substanzen durchgeführt werden [62].

Das Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ beruht auf dem Fluoreszenzprinzip. Unerlässlich ist daher der Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes.

Der in diesem Gerät eingebaute Argon-Laser regt mit seiner Wellenlänge von 488 nm das während dieser Untersuchungen eingesetzte Natriumfluoreszein an. Das

entstehende Signal wird vom Laser gemessen und anschließend in Bilddaten umgewandelt.

Der entscheidende Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit dynamische Prozesse und Verteilungsmuster des injizierten Natriumfluoreszeins sichtbar zu machen. Gerade für Untersuchungen von physiologischen Fragestellungen wie Penetrationswegen und Verteilungsmustern von z.B. epikutan aufgetragenen Substanzen (die dann mit Natriumfluoreszein angereichert sind) ist diese Methode optimal geeignet. Es konnten bisher verschiedenste Penetrationseigenschaften topisch aufgetragener Substanzen *in vivo* auf der menschlichen Haut untersucht werden [63]. Die Diffusionswege des Natriumfluoreszeins sind im zeitlichen Verlauf sehr gut sichtbar. Der zunächst stattfindenden Penetration in das Gewebe und der damit verbundenen Färbung der extrazellulären Strukturen folgt die Diffusion mit Anfärbung intrazellulärer Strukturen, wie zum Beispiel dem Zellkern um dann „grenzenlos“ in alle anatomischen Strukturen zu wandern. Wichtig zum Verständnis und für die Beurteilung der Bilder ist das Wissen um diesen zeitlichen Umverteilungsprozeß des Natriumfluoreszeins während der Untersuchung. Dieser zeitliche Wandel von Penetration, Diffusion und Akkumulation erfordert eine schnelle und sichere Untersuchung sowie manuelles Geschick [60].

Was im oberen Abschnitt dieses Kapitels als enormer Vorteil dargestellt wird, kann auch erhebliche Nachteile aufweisen. So können sich aus der notwendigen Injektion des NaF sowie dem spezifischen Verteilungsmuster Einschränkungen bezüglich der Untersuchungsfähigkeit der Patienten bzw. im zeitlichen Ablauf der Untersuchung ergeben.

Der Vorgang der intradermalen Injektion muß für jedes zu untersuchende Areal neu durchgeführt werden, so dass oft mehrere Injektionen für eine Untersuchung notwendig sind. Die Option der epikutanen Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes lässt nur die obersten Schichten des stratum corneums sichtbar erfassen. Bereits die untersten Schichten des stratum corneums und auch des beginnenden stratum granulosums sind nicht darstellbar. Gerade um die stratum corneum Barriere zu durchbrechen, ist die Qualität der Untersuchung sehr von dem Einsatz eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffes abhängig.

Das in den Studien eingesetzte Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ besitzt keine ge-

eichte Meßskala. Zu Fragestellungen bezüglich bestimmter Hautschichtendicken und direkt zum Vergleich mit anderen Studien, z.B. mit anderen Meßmethoden, ist die vorhandene Einteilung in relative Einheiten keine günstige Alternative.

Die ungefähre Eindringtiefe von ca 140 µm lässt nicht alle Hautstrukturen bis in die Tiefe verfolgen. Hautanhangsgebilde können nicht bis zum Entstehungsort visualisiert werden.

Tiefere Hautschichten wie die retikuläre Dermis und die Subcutis sind trotz des Einsatzes eines Fluoreszenzfarbstoffes nicht gut erkennbar (Abb. 44, 45).

Das mobile Handstück ermöglicht ein abschnappen an jedem beliebigen Hautareal des Körpers, verhindert dadurch jedoch das erneute Wiederauffinden des zuvor untersuchten identischen Areals. Der Versuch, einen Gesamtüberblick mittels manueller Verschiebung des Handstücks auf der Haut zu erhalten, ist meist mit einem frustrierenden Ergebnis verbunden.

Durch den Einsatz des relativ kleinen Handstücks, ist die Einhaltung von Fixpunkten bei Nachfolgeuntersuchungen mit Schwierigkeiten verbunden.

Dies resultiert unter anderem aus dem kleinen Bildausschnitt von 250 x 250 µm.

Die auf dem Monitor abgebildeten histologischen Strukturen erscheinen im schwarz-weiß Modus. Es entstehen verschiedenste Graustufen, jedoch wird das Fluoreszenzmittel als starkes weißes Signal abgebildet, so dass starke Kontraste entstehen. Diese Kontraste lassen relativ sichere anatomische Aussagen zu.

Aufgrund der notwendigen intradermalen Injektion ist diese Untersuchungsmethode nicht für alle Patienten geeignet. Patienten an denen keine invasiven Eingriffe durchgeführt werden sollten, müssen von dieser Untersuchungsmethode ausgeschlossen werden. Für Patienten mit z.B. malignem Melanom ist diese Methode ungeeignet, da das Risiko der Verschleppung von malignen Zellen zu hoch wäre.

#### **4.2.1.1 Hautanhangsgebilde**

Nachteilig wirkt sich der kleine Bildausschnitt von 250 x 250 µm auf die Beurteilung von Haarfollikeln, Haaren und Drüsen aus. Sobald eine gewisse Größe der anatomischen Struktur überschritten wird, sind nur Ausschnitte zu beurteilen (Abb. 48). So ist es nicht möglich, ein Haar im gesamten Verlauf vom Follikel bis zum In-

fundibulum zu betrachten. Das Ermitteln der Anzahl der Haare wird ebenso unmöglich. Meist gelingt ein Anschnitt eines Follikels, jedoch sind keine Aussagen über die Follikeldichte möglich. Gleiches gilt für die Betrachtung von Leberflecken. Die Betrachtung der Anhäufung der im Ergebnissteil beschriebenen Naevuszellnester (Abb. 55) ist nur in Ausschnitten möglich. Für die klinische Beurteilung wäre die Abbildung eines gesamten Pigmentmals unbedingt wünschenswert.

Die quantitative Auswertung der einzelnen Hautschichten ist möglich, jedoch ist das Abgrenzen der jeweiligen Schicht aufgrund der horizontalen Blickweise schwierig. Die horizontale Betrachtungsweise führt zu Überlagerungen. Gerade dünne Schichten, wie das stratum granulosum, sind zwar gut erkennbar aber relativ schlecht in der horizontalen Ausdehnung messbar, d.h. die Abgrenzung zur darüber bzw darunter liegenden Schicht ist oft schwierig. Ebenso ist die Erfassung der Anzahl der Lagen einer Hautschicht schwierig, da eine Zellige oft von anderen Zellen überlagert wird.

#### **4.2.1.2 Fluoreszenzfarbstoff „Natriumfluoreszein“ (NaF)**

Wie zuvor bereits erwähnt, kann die Fluoreszenzmikroskopie ohne intradermale Injektion eines Fluoreszenzfarbstoffes keine qualitativ hochwertigen Aufnahmen hervorbringen.

Die Auswahl eines passenden Farbstoffes richtet sich nach der Wellenlänge des Lasers, den Erregungs- und Emissionseigenschaften des Farbstoffes und den pharmakologischen Eigenschaften der Substanz. Letztere sollten bekannt und durch Studien fundiert sein.

Das in dieser Studie benutzte Natriumfluoreszein wird in der Augenheilkunde routinemäßig zur Netzhautspiegelung verwendet. Bisher sind kaum Allergien oder andere Nebenwirkungen durch Natriumfluoreszein beim Menschen beschrieben worden [52].

Physikalisch passt es mit seinem Absorptionsmaximum von 490 nm ideal zur Wellenlänge des Argon-Lasers. Es ist eine wässrige Lösung im sauren pH-Bereich. Eine lipophile Lösung hebt bei der Untersuchung andere Zellstrukturen hervor. Ergebnisse von verschiedenen Untersuchungen belegen dieses [64, 65, 66].

Auch der Lebensmittelfarbstoff Curcumin ist als Fluoreszenzfarbstoff einsetzbar. Dieser kann ebenso wie Natriumfluoreszein vom „Stratum“ Mikroskop sehr gut detektiert werden [66].

Für das Verständnis und für die Beurteilung der Bilder ist das Wissen um den zeitlichen Umverteilungsprozeß des Natriumfluoreszeins sowie Grundlagen der anatomischen und physiologischen Gegebenheiten der Haut wichtig [60, 66].

Die Untersuchung mit dem Laser-Scan-Mikroskop erfordert eine schnelle und sichere Untersuchung sowie manuelles Geschick.

#### 4.2.1.3 Untersuchung der Psoriasis-Patienten

Vor Beginn der Untersuchung der Psoriasis-Patienten stellten sich zwei wichtige Fragen: Ist das Injizieren des Natriumfluoreszeins bei schon geschädigtem stratum corneum und somit auch gestörter stratum corneum Barriere tatsächlich notwendig? Und wie verhält sich das NaF in entzündlich veränderten Hautarealen?

Versuche mit epikutaner Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes auf das entzündlich veränderte Areal zeigten, dass je nach Beschaffenheit der obersten Zellschichten einzelne oberflächliche Zellen beurteilbar waren. Befinden sich noch starke Plaques auf der Hautoberfläche, kann der Laser diese nicht durchdringen. Der eingebaute Argon-Laser ist nicht in der Lage diese Barriere aus abgestorbenen Korneozyten zu durchdringen. Das injizierte NaF sammelt sich in den Plaques und Hautfurchen (Abb. 66, 67). Es kann sich dadurch jedoch nicht in den tieferen Hautschichten verteilen. Bei vorhandenen massiven abgestorbenen Korneozyten ist keine sinnvolle Untersuchung möglich. Bei vollständig gereinigter Hautoberfläche sind die veränderten Korneozyten mit teilweise vorhandenem Zellkern gut darstellbar. Das NaF diffundiert jedoch sehr schnell in den intrazellulären Raum und füllt schnell die gesamte Zelle aus. Dies führt zu einer Kontrastabnahme zwischen den einzelnen Strukturen. Das gesamte Bild, einschließlich Zelle und intrazellulärer Raum erscheinen in einem weißen Schleier.

Eine mögliche Ursache kann in der Veränderung der Permeabilität der Wandstrukturen der Zellen liegen. Wie schon erwähnt, durchläuft das Natriumfluoreszein bei gesunder Haut verschiedene Stadien der Verteilung. Bei entzündlichen Veränderungen wie der Psoriasis ist der zeitliche physiologische Ablauf gestört. Aufgrund der

Entzündung gelangt das Natriumfluoreszein um ein vielfaches schneller in den intrazellulären Bereich.

So können mit epikutaner Vorgehensweise Ergebnisse bezüglich der Zerstörung des stratum corneums erfasst werden. Das Ausmaß der Erkrankung in tieferen Hautschichten kann jedoch nicht beurteilt werden.

Mit Hilfe der intradermalen Injektion konnte der Mechanismus des schnellen intrazellulären Durchdringens des Farbstoffes nicht verhindert werden, jedoch wurde ein Blick auf das stratum spinosum, das stratum basale und die papilläre Dermis möglich (Abb. 60-62).

Des Weiteren konnten die Psoriasis-typischen Veränderungen der Para- und Hyperkeratose mikroskopisch dargestellt werden. Neben Zellen mit Zellkernen sind gleichzeitig abgestorbene Zellen und Zellreste sichtbar (Abb. 66, 67).

Das Vorhandensein von zerklüfteten Korneozyten, Schuppen sowie das gelegentliche Vorhandensein von Zellkernen bei Psoriasis-Erkrankten sind Zeichen eines wesentlich schneller ablaufenden Zellzyklusses der Keratinozyten als bei gesunden Menschen. Im Normalfall beträgt die Phase von Bildung der Zelle bis zur Apoptose ca. 3-4 Wochen. Bei der Psoriasis läuft dieser Zyklus in 3 bis 4 Tagen ab [67].

#### **4.2.1.4 Vergleich kLSM „Stratum“ mit anderen Methoden**

Die konfokale Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie kann mit der konventionellen Histologie verglichen werden. Mit einer Tiefenausdehnung bis zur papillären Dermis ist diese Methode für Untersuchungen des stratum corneums und der Epidermis zu bestimmten Fragestellungen sinnvoll.

Untersuchungen in denen die Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie mit der optischen Kohärenztomografie (OCT) verglichen wurden, ergaben, dass sich das kLSM „Stratum“ wegen seiner Eindringtiefe von ca. 140 µm besonders für die Betrachtung der oberen Hautschichten eignet, sowie zur Untersuchung von kinetischen Veränderungen bei Einsatz verschiedener topisch applizierter oder intradermal injizierter Substanzen. Die OCT Methode schafft es bis zu 2 mm tief in die Haut zu blicken. Sie kann jedoch keine Aussagen zum kinetischen Ablauf aufzeigen und besitzt eine schwächere Auflösung als das kLSM „Stratum“ [68].

## 4.2.2 Vivascope<sup>®</sup> 1500

### 4.2.2.1 Auswertung der Bilder der Psoriasis-Patienten

Das Laser-Scan-Mikroskop Vivascope<sup>®</sup> 1500 funktioniert im Gegensatz zum Laser-Scan-Mikroskop „Stratum“ nicht mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, sondern über die vom Laser gemessene Reflektanz. Der Laser rastert das gezielte Areal ab und leitet die Signale an die EDV-Anlage weiter. Diese wandelt die Signale in digitale Bilder um, die vom Untersucher auf dem Monitor betrachtet werden können.

Die Untersuchung der Probanden mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 erfolgte relativ unproblematisch. Die wesentlichsten Vorteile des Vivascope<sup>®</sup> 1500 gegenüber dem kLSM „Stratum“ bestehen zum einen in der Fixierung des Lasers auf der Haut mittels Haltering, zum anderen in der Möglichkeit der nicht-invasiven Diagnostik.

Das komfortable Handling dieses Gerätes wird durch eine leicht zu bedienende Software am Monitor unterstützt. Mit Hilfe der in die Software eingebauten Funktionen *Vivastack*<sup>®</sup> und *Vivablock*<sup>®</sup> ist das Auffinden eines geeigneten Hautausschnitts sowie eines identischen Areals mit wenigen Schwierigkeiten verbunden.

Nachdem der Patient bequem gelagert wurde, der Haltering auf der Haut und der Laser in dem Haltering fixiert wurden, kann sich der Untersucher dem Beobachten des Hautareals via Monitor widmen. Der Patient sollte während der Untersuchung jedoch nicht aus den Augen gelassen werden.

Trotz Haltering kann es zu Verwacklungen, Verrutschungen oder gar Ablösungen des Halterings von der Haut kommen. Das doppelseitige Klebepflaster zum Befestigen des Halterings auf der Haut, klebt auf planen Flächen sehr gut, sobald jedoch anatomische Wölbungen oder Rundungen untersucht werden, lässt die Stärke der Fixierung nach. So gestaltet sich die Untersuchung im Gelenkbereich schwierig.

Weiterhin muß die sehr hohe Sensibilität des Lasers in Bezug auf die Tiefeneinstellung berücksichtigt werden. Schon kleine Druckveränderungen auf das Lasergehäuse können die Tiefeneinstellung verändern. Schnell ist ein Verrutschen vom stratum corneum ins stratum basale möglich.

Auch bei dieser Untersuchungsmethode muß der Patient eine ruhige Stellung be-

wahren, da qualitative wie auch quantitative Aussagen, sehr von einem ruhigem Untersuchungsambiente abhängen.

Im Gegensatz zum Fluoreszenzmikroskop enthält das Vivascope<sup>®</sup> 1500 eine geeichte Meßskala, so dass Messungen verschiedener Hautschichten, wie z.B der Epidermisdicke und der Dicke des stratum corneums, mikrometrisch abzulesen sind.

Ein großer Nachteil des Vivascope<sup>®</sup> 1500 ist die schlechte Auflösung. Hervorzuheben ist darüber hinaus die Auflösung des stratum corneums. Der hohe Brechungsindex der Korneozyten lässt keine detaillierte Betrachtung des stratum corneums zu.

Die histologischen Abbildungen des stratum corneum ermöglichen keine qualitativen Aussagen über die Zellgröße, des Zellkernes sowie der Zellgrenzen.

Ab dem stratum granulosum bis zum stratum papillare sind Zellkerne und Zellgrenzen sichtbar.

Die optische Darstellung tiefer gelegener Hautschichten wie der papillären Dermis und den Gefäßen ist positiv hervorzuheben.

Die größere Schnitttiefe des Vivascope<sup>®</sup> 1500 bis ca 160 µm lässt die papilläre Dermis mit Papillen und Gefäße qualitativ, wie auch quantitativ, bewerten und messen. Auch ist das Erkennen von pathologischen Veränderungen im Bereich des stratum spinosum / basale und der papillären Dermis mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 möglich.

Die digitale Speicherung der Daten und die Möglichkeit des Wiederauffindens des fast identischen Hautareals sowie die guten quantitativen und qualitativen Auswertungsmöglichkeiten prädestinieren diese Methode für Verlaufsbeobachtungen, z. B. von Psoriasis-Patienten, Patienten nach Basaliom-Operationen oder von Patienten mit Zustand nach Exzisionen von malignen Melanomen.

Da die Diagnostik ohne invasive Einwirkungen sowie ohne Einbeziehung externer Substanzen möglich ist, kann eine Vielzahl von Patienten einbezogen werden.

Der Einsatz der Laser-Scan-Mikroskopie ohne Zusatz externer Substanzen, wie z.B. Natriumfluoreszein, bietet kaum Möglichkeiten weitere Zellstrukturen bzw. -organellen zu untersuchen. Es gibt keine Möglichkeit, spezifische anatomische Strukturen gezielt zu untersuchen.

Die abgebildeten Ausschnitte auf dem Monitor werden im schwarz-weiß Modus ab-

gebildet. Die Bilder werden in Graustufen abgebildet. Der Untersuchende hat die Schwierigkeit, die feinen Nuancen der Graustufen auf den Bildern korrekt zu interpretieren.

#### **4.2.2.2 Untersuchung der Psoriasis-Patienten**

Die Durchführung der Untersuchung gestaltete sich bei den erkrankten Probanden ebenso reibungslos wie bei den Gesunden. Die mittels Vivascope<sup>®</sup> 1500 erhaltenen Bilder ermöglichen eine qualitativ gute Auswertung. Die Abbildungen 63 bis 66 zeigen die von der Hautoberfläche bis in die Tiefe gehenden Hautschichten eines psoriatisch entzündlich veränderten Hautareals. Deutlich sichtbar sind hier die Hyper- und Parakeratose (Abb. 63-66, rote Pfeile) sowie die Papillomatose und Gefäßdilatation (Abb.69).

#### **4.2.2.3 Vergleich Vivascope<sup>®</sup> 1500 mit anderen Methoden**

Im Vergleich mit der herkömmlichen Dermatoskopie bietet die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie mittels Vivascope eine deutlich höhere Vergrößerung der Haut als auch eine wesentlich bessere Betrachtung der Haut in die Tiefe. Die normale Lichtmikroskopie als auch die konventionellen Histologie zeigen Gemeinsamkeiten in der histologischen Auswertung, jedoch deutliche Unterschiede in der Anwendung. In einer Untersuchungsreihe bezüglich der Spitz Naevi konnte die Arbeitsgruppe um Pellacani deutliche Übereinstimmungen in Bezug auf die Aussagekraft zu Zellgrößen, Zellveränderungen und Hautschichten feststellen [69]. Vergleicht man die nichtinvasive Methode der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie jedoch mit der ebenso nicht invasiven OCT-Methode zeigen sich deutliche Unterschiede bezüglich der Anwendung als auch der Aussagekraft. Die OCT-Methode kann Hautschichten bis in die Dermis beobachten, bietet jedoch eine schlechte Auflösung der einzelnen Zelle. Für bestimmte Fragestellungen bezüglich der dermoepidermalen Übergangszone als auch des vaskulären Systems ist diese Methode jedoch gut geeignet [70].

### 4.2.3 Melanozytäre Naevi und maligne Melanome mittels kLSM „Stratum“ und Vivascope® 1500

Wie im Ergebnisteil schon beschrieben, bestehen die melanozytären Naevi aus einer Anhäufung von sogenannten Naevuszellnestern. Die mit beiden Mikroskopen untersuchten Areale zeigten je nach Untersuchungsmethode ein unterschiedliches Ergebnis. So erschien das einzelne Naevuszellnest mit dem kLSM als „schwarzes Loch“ mit unauffälligen Zellgrenzen, während die Bilder vom Vivascope® 1500 Naevuszellnester mit einem hellweiß leuchtendem Rand zeigten. Die Ursache für die Schwarzfärbung der Naevuszellnester im kLSM „Stratum“ liegt in der hohen Absorption des Lichtes durch die Melanozyten (Abb. 55). Während im Vivascope® 1500 das Licht des Infrarotlasers von den Melanozyten in entsprechender Weise zurückreflektiert wird und somit die Melanozyten hell weiß leuchten (Abb. 56) wird das Licht des Argonlasers des kLSM von den Melanozyten „verschluckt“ und es erscheinen dunkle Löcher.

Rajadhyaksha et al. untersuchten 1995 gesunde Probanden um die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie mit der konventionellen Histologie zu vergleichen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden auch Naevi untersucht. Es konnte für die auf Reflektanz beruhende konfokale Laser-Scan-Mikroskopie ein starker Kontrast der Melaninzellen nachgewiesen werden. Bereits 1995 stellte diese Arbeitsgruppe die starke Weißfärbung der Melaninzellen fest. Sie stellten fest, dass stark pigmentierte Hautareale einen umso größeren Kontrast in den Melaninzellen erzeugen als weniger stark pigmentierte Hautareale [6].

Eine weitere Studie der gleichen Autoren untersuchte 2001 zur Einschätzung der Qualität der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie in Bezug auf maligne und benigne Hautveränderungen vierzig verschiedene Hautläsionen. Ähnlich der konventionellen Histologie konnten die gleichen histologischen Merkmale verifiziert werden. Melanozytäre Naevi sind geprägt von einem hohen Kontrast der Melaninzellen, die bei Untersuchungen mit dem Vivascope hellweiß leuchten (Abb. 56). Ebenso konnte die nestförmige Anordnung bildlich wiedergegeben werden.

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei malignen Melanomen eine polymorphe zytologische Struktur. Atypische pleomorphe Zellen, irreguläre dendritische Zellen sowie unterbrochen erscheinenden Zellgrenzen und uneinheitlich angeordneten Zellen

waren hier die typischen histologischen Merkmale [2].

Die auf Reflektanz beruhende kLSM zeigte somit ähnliche histologische Merkmale wie die konventionelle Histologie und kann demzufolge als diagnostisches Mittel zur Ermittlung der Malignität einer Hautläsion eingesetzt werden.

#### **4.2.4 Auswertung der Untersuchungen der Psoriasis-Patienten mittels kLSM „Stratum“ und dem Vivascope® 1500**

Die Untersuchung der Psoriasis-Patienten zeigte auffällige histologische Merkmale. Es konnten mit beiden Untersuchungsmethoden typische psoriatische Veränderungen wie Epidermisdickenvergrößerung, verdicktes stratum corneum und Gefäßdilatation sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte bei qualitativer Betrachtung der Papillen mit beiden Untersuchungsmethoden ein Randsaum beobachtet werden. Die Ursache des Saumes ist nicht eindeutig zu klären. Zum einen spricht eine chronische Entzündung der Haut für eine ödematöse oder infiltrative Vergrößerung der Papillen, jedoch können auch Verdickungen der Gefäßwand als Entzündungsreaktion nicht ausgeschlossen werden (Abb. 66).

Wichtige Erkenntnis und Feststellung war das Vorhandensein typischer psoriatisch histologischer Veränderungen in der Haut, trotz optisch äußerlich sichtbar gesunder Hautareale. Die bisherige klinische Annahme bei deutlich verbesserten Hautarealen auch die eigentlichen psoriatischen Veränderungen in den tiefen Schichten der Haut verbessert zu haben, kann hier nicht bestätigt werden. In Folgestudien wird der Therapieerfolg spezifisch festgelegter Therapiekonzepte mittels der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie anhand des Vivascope® 1500 untersucht. Inwieweit das Ausmaß der histologischen Veränderungen und demzufolge auch der Verbesserungen unter Therapie eine Rolle beim Wiederauftreten von Plaques und Hautveränderungen spielt, kann nach Auswertung dieser Untersuchungen evtl. ermittelt werden.

### 4.2.5 Zusammenfassender Vergleich zwischen dem kLSM „Stratum“ und dem Vivascope<sup>®</sup> 1500

Bei den beschriebenen Geräten handelt es sich um lasergestützte Mikroskope. Die konfokale Darstellung, in Verbindung mit der Laser-Mikroskopie, lässt die Betrachtung eines beliebigen Fixpunktes auf der Hautschicht zu.

Die Hautschichten werden mit Hilfe spezieller Software in Bildform auf einem Monitor in Graustufen dargestellt.

Beide Geräte sind zur Diagnostik an Patienten ausgelegt. Die patientennahe Untersuchung in Echtzeit, ermöglicht die diagnostische Absicherung einer histologischen Diagnose zu jedem beliebigen Zeitpunkt. Mit beiden Geräten kann die Diagnostik ohne bioptisches Material erfolgen. Operative Eingriffe werden somit unnötig.

Die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie erfordert Erfahrung, Übung und manuelles Geschick im Umgang des Handlings beider Geräte. Die Qualität der Untersuchung und die daraus resultierende Auswertung der Bilder nimmt mit Erfahrung des Untersuchers zu.

Die Vorteile des „Stratum“ Mikroskops liegen u.a in der klaren Darstellung vom stratum corneum und stratum granulosum. Neben den Zellgrenzen und Zellkerne sind ferner die Hautanhangsgebilde (Haare, Drüsen) sehr detailliert zu erkennen.

Des Weiteren sind Verteilungsprozesse des Natriumfluoreszeins zu beobachten. Für pharmakologische Fragestellungen bezüglich der epikutanen Wirkung von Substanzen kann dieser Nebeneffekt genutzt werden.

Die visuelle Darstellung tieferer Epidermisschichten, des stratum papillare sowie der Gefäße ist mit dem Gerät möglich. Die Auswertung der vom Gerät übermittelten Bildfolge ist stark von der Erfahrungen des Auszuwertenden abhängig.

Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode liegt in der Anwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes der intradermal injiziert werden muss. Für Patienten mit z.B. malignem Melanom ist diese Methode ungeeignet, da das Risiko der Verschleppung von malignen Zellen zu hoch wäre.

Das Vivascope<sup>®</sup> 1500 ist vom Untersuchungsablauf komfortabler. Eine Injektion wie beim Fluoreszenzmikroskop „Stratum“ ist nicht nötig, operative Biopsieent-

nahmen entfallen ebenso. Dies macht diese Methode für fast alle Patientengruppen zugänglich. Aufgrund der nicht-invasiven Untersuchungsmethode, gibt es grundsätzlich keine Patienten die ausgeschlossen werden können.

Aufgrund des hohen Brechungsindex der Korneozyten, die bei Betrachtung mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 hellweiß erscheinen, sind detaillierte Aussagen bezüglich des stratum corneums und des stratum granulosums kaum möglich. Tiefere Hautschichten sind deutlich zu erkennen. Mit einer Untersuchungstiefe von ca 160 µm sind Gefäße im stratum papillare und ansatzweise auch das stratum reticulare zu sehen. Die Subcutis ist jedoch auch mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 nicht visualisierbar.

## 4.3 Quantitative Auswertung der Untersuchungen

### 4.3.1 Probanden

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden zunächst gesunde Probanden untersucht. Es wurden 12 Personen eingeschlossen, die physisch wie psychisch nicht auffällig waren. Die für die zweite Phase der Untersuchung benötigten Psoriasis-Patienten wurden zum größten Teil aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie sowie aus der wöchentlich stattfindenden Psoriasis-Sprechstunde rekrutiert. Entscheidend für die Auswahl der Patienten war das Vorhandensein von psoriatischen Plaques und die eindeutige Diagnose einer Psoriasis vulgaris.

Etwas schwierig gestaltete sich das Aquirieren der Patienten für die Untersuchung mit dem kLSM „Stratum“. Die Tatsache eine, wenn auch kleine und dünne Kanüle in genau das Areal injiziert zu bekommen, welches zum Zeitpunkt der Untersuchung stark entzündlich verändert war, sorgte zunächst für Zurückhaltung.

Allgemein: In allen Untersuchungsreihen wurden die gleichen quantitativen Parameter ermittelt. Es wurde die minimale und maximale Epidermisdicke, die Dicke des stratum corneums, die Papillenanzahl sowie der Durchmesser der Gefäßlumen im stratum papillare als Standardmerkmale festgelegt.

### 4.3.2 kLSM „Stratum“

#### 4.3.2.1 Auswertung der Daten der gesunden Probanden

##### Epidermis

Die zu Beginn der Untersuchungen festgelegten quantitativen Parameter minimale und maximale Epidermisdicke konnten mit dieser Methode nur relativ bestimmt werden. Das in unserer Studie eingesetzte „Stratum“ Mikroskop besitzt keine geeichte Meßskale, sondern eine Skala in relativen Einheiten (rE).

Obwohl ein direkter Vergleich aufgrund der fehlenden Maßeinteilung des kLSM „Stratum“ nicht möglich ist, können doch relative Betrachtungen zwischen den bereits durchgeführten Untersuchungen und diesen Studien gemacht werden.

Die mit gesunden Probanden ermittelten Werte für die minimale Epidermisdicke von 45,38 rE und für die maximale Epidermisdicke von 85,7 rE liegen im Normbereich im Vergleich zu anderen Studien (Tab. 9). So wurde bereits 1973 von Whitten und Everall mittels Biopsie und konventioneller Histologie ein Mittelwert der Epidermisdicke von 60,9  $\mu\text{m}$  festgestellt [71]. Auch im Vergleich mit dem Lehrbuch für Anatomie von Schiebler et al, der einen Mittelwert von 50  $\mu\text{m}$  angibt, sind diese Werte wenn auch nur aus relativer Betrachtungsweise im Rahmen des Toleranzbereiches [72].

Die Dicke des stratum corneums (DSC) mit einem Mittelwert von 15,65 rE entspricht den bereits in mehreren Studien erhobenen Daten. Die Arbeitsgruppe von Swindt et al. ermittelte einen Wert von 12,3  $\mu\text{m}$   $\pm$  3,6  $\mu\text{m}$  [75]. Des Weiteren ermittelte Huzaira 2001 für das stratum corneum einen Wert von 9,58  $\mu\text{m}$   $\pm$  0,8  $\mu\text{m}$  [8].

##### Stratum corneum

Der Diagnostik der obersten Hautschicht als äußere Begrenzung zur Umwelt widmeten sich bisher mehrere Arbeitsgruppen [73, 74, 75]. Mit seiner natürlichen Barriere gegen äußere Einflüsse stellt das stratum corneum ein interessantes und vielseitiges Forschungsgebiet dar.

Bereits 1974 untersuchten Holbrook und Odland das stratum corneum mittels Elektronenmikroskopie [74] 1998 widmeten sich Swindt et al. der Untersuchung des stratum corneums und ermittelten per Tapestripping einen Mittelwert von  $12,3 \mu\text{m} \pm 3,6$  [75]. Der in unseren Untersuchungen vermessene Mittelwert von  $15,84 \mu\text{m} \pm$  weicht nur gering von diesem Wert ab, was sicherlich auf die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zurückzuführen ist. 2004 wurde von Gambichler et al. die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie zur Messung des stratum corneums eingesetzt [76]. Die Ergebnisse zeigten bereits, dass das quantitative Vermessen des stratum corneums sehr gut möglich ist.

Mit dem Einsatz der Fluoreszenz-Laser-Scan-Mikroskopie lassen sich morphologische Veränderungen der Haut feststellen. In unserer Studie mit gesunden Probanden konnten zum Beispiel Unterschiede zwischen trockener und normaler Haut visuell festgehalten werden (Abb. 24, 25). Des Weiteren waren die dynamischen Veränderungen des Natriumfluoreszeins in allen Stadien zu sehen.

In unserer Forschungsgruppe konnten aufgrund der dynamischen Untersuchungsmethode eine Studie über die Reservoirfunktion des stratum corneums sowie dessen Beeinflussbarkeit mittels topisch applizierten Substanzen durchgeführt werden [77].

### **Stratum papillare**

Der zu Beginn der Untersuchungen festgelegte Messwert der Papillenanzahl konnte mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop nicht erfasst werden. Zum einen ist auch hier der kleine Bildausschnitt von  $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$  des Hautareals ein entscheidender Nachteil, so dass ein Überblick über eine bestimmte Arealgröße nicht beobachtet werden kann, zum anderen Bedarf es bei der Darstellung des stratum papillare mit dem kLSM „Stratum“ eines geeigneten Patienten und eines guten Zeitgefühls aufgrund der Verteilung des NaF in den einzelnen Hautschichten. Der relative Mittelwert für den Gefäßdurchmesser der kapillären Gefäße wurden mit 6,5 rE errechnet.

#### **4.3.2.2 Auswertung der Daten der Psoriasis-Patienten**

Da die Psoriasis-Erkrankung typische histologische Merkmale aufweist, sollten auch diese in dieser Untersuchungsreihe mit einbezogen werden. Das Vorhandensein von folgenden histologischen Kriterien konnte mit dem kLSM „Stratum“ fest-

gestellt werden, eine ausgeprägte Akanthose, der Verlust des stratum granulosum, eine ausgeprägte Parakeratose sowie eine Dilatation der Kapillargefäße.

Die am Anfang der Studien festgelegten quantitativen Parameter wie minimale Epidermisdicke, maximale Epidermisdicke, Dicke des stratum corneum sowie die Anzahl der Papillen und der Durchmesser der kapillären Gefäße sollten auch hier erfasst werden. Ebenso sollte das Vorhandensein von Parakeratosen und Hyperkeratosen untersucht werden.

Die Ermittlung der Epidermisdicken mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 ergab einen Mittelwert für Emin von 58,0 µm und für Emax von 96,0 µm am Unterarm. Für die Dicke des stratum corneum ergab sich ein Mittelwert von 20,8 µm.

Die Größe der kapillären Gefäße wurde mit 11,69 µm (Durchmesser des Gefäßlumens) ermittelt.

Gelegentlich konnte auch eine weiße Verfärbung der Gefäße beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Gefäßwände ebenso wie die Zellwände für den Farbstoff durchlässig waren.

Aufgrund des schnellen dynamischen Prozesses des Fluoreszenzfarbstoffes muß die durchgeführte Untersuchung schnell und effektiv durchgeführt werden. Ein mehrmaliges Unterspritzen zur Betrachtung mehrerer Hautareale sollte bei entzündlichen Hautveränderungen auf ein Minimum reduziert werden, da die Toleranzgrenze bei Erkrankten etwas niedriger liegt als bei Gesunden.

Trotz der o.a. Schwierigkeiten fühlten sich die untersuchten Patienten vor, während und nach der Untersuchung gut.

Die quantitativen relativen Zahlen unterstützen die Diagnose einer Psoriasis. Die weiteren quantitative Auswertungen der ermittelten Parameter bei Psoriasis-Patienten bestätigen die bisherigen histologischen Kriterien.

Auch das deskriptiv ermittelte Vorhandensein der typischen Parakeratose und Hyperkeratose (Abb. 63-65) untermauern die klinische Diagnose der Psoriasis.

Die histologischen Merkmale einer Psoriasis können mit dem kLSM „Stratum“ ebenso dargestellt werden, wie mit herkömmlicher Lichtmikroskopie. Die charakteristischen Merkmale wie Parakeratose, Hyperkeratose, Dilatation der Gefäße und Epidermisveränderungen sind mittels der in vivo Technik qualitativ gut darstellbar.

### 4.3.3 Vivascope<sup>®</sup> 1500

#### 4.3.3.1 Auswertung der Daten der gesunden Probanden

##### Epidermis

Die mit dem Vivascope erhobenen histologischen Befunde beim gesunden Menschen, entsprechen denen in der Literatur und Lehrbüchern. Die mittlere Epidermisdicke wird beim Gesunden von Schiebler und Schmidt mit 50  $\mu\text{m}$  angegeben [72]. Der Mittelwert in dieser Studie beträgt  $\sim 90 \mu\text{m}$ . Emin konnte mit 41,32  $\mu\text{m}$  berechnet werden, sowie Emax mit 91,49  $\mu\text{m}$ . Bereits 2002 wurden von Sauer mann et al 26 gesunde Probanden mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 untersucht [78]. Es wurden ähnlich unserer Studie mehrere Parameter vermessen. Dazu gehörte u.a. auch die minimale Epidermisdicke. Die von der Arbeitsgruppe um Sauer mann ermittelten Ergebnisse von ca 40,0  $\mu\text{m}$  für die minimale Epidermisdicke weicht nur geringfügig von den von uns ermittelten 41,0  $\mu\text{m}$  ab.

##### Stratum corneum

Die in unseren Untersuchungen erhobene Dicke des stratum corneums konnte mit 11,81  $\mu\text{m}$  im Durchschnitt gemessen werden. Verglichen mit der Studie von Sauer mann et al 2002, in der ebenfalls mit dem Vivascope die Dicke des stratum corneums erfasst wurde, ergaben sich fast ähnliche Durchschnittswerte, (11,2  $\mu\text{m}$ . vs. 11,8  $\mu\text{m}$ ) [78].

##### Stratum papillare

Es konnte für die durchschnittliche Papillenzahl pro Bildausschnitt ein Wert von 5,8 ermittelt werden.

Um die von uns ermittelte durchschnittliche Anzahl der Papillen direkt mit der oben erwähnte Studie von Sauer mann vergleichen zu können, mußte der ermittelte Wert in  $\text{mm}^2$  umgerechnet werden. Es ergibt sich somit eine Papillenzahl von 23,2/ $\text{mm}^2$ .

In der von Sauermaun et al publizierte Studie wurden zwei Probandengruppen unterschieden. Zum einen gab es die Gruppe der 18-25jährigen sowie die Probanden ab dem 65. Lebensjahr. In der Untersuchung stellten sich signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen bezüglich der Papillenanzahl heraus. Für die Gruppe der jüngeren Probanden wurde ein Wert von 40,56/mm<sup>2</sup> errechnet, für die Gruppe der älteren Probanden ein Wert von 13,82/mm<sup>2</sup>. Das Durchschnittsalter in unserer Studie mit gesunden Probanden betrug 33,0 Jahre. Somit liegt das Durchschnittsalter der hier durchgeführten Studie genau zwischen den zwei oben genannten Altersklassen. Der daraus ermittelte Durchschnittswert von 23,2/mm<sup>2</sup> liegt ebenso in dem Bereich zwischen 13,82 und 40,56/mm<sup>2</sup>.

Das stratum papillare zeigt sich bei gesunden Probanden relativ unveränderbar. Einzelne Papillen sind weitaus schwieriger vom umliegenden Gewebe zu differenzieren als bei erkrankten Psoriasis-Patienten. Das Erkennen von einzelnen kapillären Gefäßen ist möglich, die Zell- und Papillengrenzen verlaufen optisch jedoch sehr verschwommen. Es ist wesentlich schwieriger diese Grenzen zu erfassen und somit genaue quantitative Größen wie Gefäßdurchmesser und Papillengröße zu quantifizieren.

Auch die Arbeitsgruppe von Gambichler beschäftigt sich in vielfältiger Form mit der Laser-Scan-Mikroskopie. In einem 2004 veröffentlichtem Paper wurden 8 Probanden hinsichtlich der Hautveränderungen unter UVA-Bestrahlung histologisch mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 vermessen [74]. Auch diese Untersuchungen bestätigen die gute Durchführbarkeit der histologischen Untersuchung und Vermessung der Haut mittels des konfokalen Laser-Scan-Mikroskop Vivascope<sup>®</sup> 1500.

#### 4.3.3.2 Auswertung der Daten der Psoriasis-Patienten

Um eine genaue Aussage darüber treffen zu können, inwieweit das Vivascope<sup>®</sup> 1500 als Alternative zur konventionellen Histologie betrachtet werden kann und um einen direkten Vergleich zwischen dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 und dem kLSM „Stratum“ herstellen zu können, wurden in dieser Untersuchungsreihe 20 Psoriasis-Patienten im Abstand von drei Wochen mikroskopisch untersucht. Um eine genaue Statistik zu ermöglichen wurden fünf untersuchte Patienten aus den Berechnungen

genommen. Sie hatten die typischen Plaques am Oberschenkel, dem Unterschenkel sowie im Bauchbereich. Da unterschiedliche Hautregionen unterschiedliche Epidermisdicken aufweisen, sollte keine statistische „Verfälschung“ der Daten auftreten. Die 15 einbezogenen Patienten konnten am linken oder rechten Unterarm vermessen werden.

Ziel war es, zu beurteilen, wo Möglichkeiten und Beschränkungen des Vivascope<sup>®</sup> 1500 bestehen, ob die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie mittels Vivascope<sup>®</sup> 1500 ähnliche histologische Befunde aufzeigen kann, wie die konventionelle Histologie. Und inwieweit Vor- und Nachteile bezüglich des kLSM „Stratum“ bestehen.

Um einen direkten Vergleich anstellen zu können, wurden auch bei dieser Untersuchung die klassischen histologischen Kriterien der Psoriasis erfasst. Es wurden die Dicke des stratum corneums, die minimale Epidermisdicke, die maximale Epidermisdicke, die Papillendichte und die Gefäßlumendurchmesser der kapillären Gefäße optisch dargestellt und anschließend vermessen. Des Weiteren wurde die Ausprägung einer Hyper- und Parakeratose deskriptiv ermittelt. Um eine Veränderung der histologischen Parameter im Verlauf zu ermitteln, wurden die Probanden in wöchentlichen Abständen innerhalb von drei Wochen untersucht.

## Epidermis

Die minimale Epidermisdicke von 55,98  $\mu\text{m}$  und die maximale Epidermisdicke von 128,98  $\mu\text{m}$  sind im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht. Es konnte eine Zunahme der Epidermisdicken um 14,66  $\mu\text{m}$  bzw. 37,49  $\mu\text{m}$  im Vergleich mit dem gesunden Probanden festgestellt werden. Im Verlauf unter verschiedenen Therapieformen sanken die Werte auf 48,23  $\mu\text{m}$  bzw. 99,65  $\mu\text{m}$ . In den Grafiken 1 und 2 ist die zunehmende „Normalisierung“ der Werte zu beobachten. Der blaue Balken steht in der jeweiligen Grafik für die erste Untersuchung, der grüne Balken für die zweite Untersuchung und der gelbe Balken für die 3. Untersuchung.

Die Dicke des stratum corneums ist mit 16,8  $\mu\text{m}$  ebenfalls um 4,9  $\mu\text{m}$  größer als bei Nicht-Psoriatikern. Auch hier kann die unter Therapie einsetzende Verbesserung in Grafik 4 abgelesen werden.

Das Vorhandensein von Hyper- und Parakeratosen konnte trotz relativ schlechter Auflösung des Mikroskops erkannt werden. Die Abbildungen 63 und 64 zeigen sichtbare Schuppen sowie parallel dazu existierende Zellen mit Zellkernen.

### **Stratum papillare**

Die typische Papillomatose konnte sehr gut mit dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 betrachtet werden. Die einzelnen, sehr ausgedehnten Papillen konnten mit den darin verlaufenden Kapillaren gut dargestellt und vermessen werden (Abb. 69). Die durchschnittliche Papillenzahl pro Bild mit 500 x 500 µm beim Gesunden beträgt ca. 6,0. Mit 12 Papillen pro Bildausschnitt bei den Psoriasis-Patienten ist dieser Wert signifikant erhöht. Die Feststellung der Papillomatose untermauert die Diagnose der Psoriasis. Die Dilatation der Gefäße konnte ebenso quantitativ festgehalten werden. Mit ca. 12,0 µm bei den Erkrankten, ist die Ausdehnung der Kapillaren um 4 µm größer als bei den gesunden Probanden.

Schon 1977 beschäftigten sich Braverman und Yen mit der erhöhten Durchblutung bei Patienten mit Psoriasis vulgaris und Patienten mit der Psoriasis pustulosa. Sie untersuchten die kapillären Gefäße und deren schlingenförmigen Verlauf [79]. Im Jahre 1994 widmeten sich Auer et al der vermehrten Durchblutung bei Psoriasis Erkrankten. Sie untersuchten 20 Psoriasis Patienten am Oberschenkel mit Hilfe eines Laser-Doppler-Perfusions-Gerätes. Unter mehrwöchiger Therapie mit Dithranol wurden Parameter wie Anzahl der papillären Gefäße und deren Durchmesser sowie die Anzahl der Papillen in wöchentlichen Abständen gemessen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die erhöhte Durchblutung bei Psoriasis geschädigter Haut durch eine Dilatation der Gefäße und einen erhöhten Blutfluß durch die Gefäße initiiert wird [80].

Diese bereits in den 70er und 90er Jahren erhobenen Feststellungen können in dieser Studie bestätigt werden. Die Arbeitsgruppe von Gonzalez und Rjadhaksha aus Boston, untersuchte im Jahre 1999 fünf Psoriasispatienten mit einem Laser-Scan-Mikroskop. Sie verglichen die kLSM mit der konventionellen Histologie und stellten schon damals fest, dass die kLSM eine geeignete Methode zur Untersuchung der Psoriasis ist. Es wurden die betroffenen Areale, sowie nicht betroffenen Areale

untersucht. Es wurden alle untersuchten Areale bezüglich Epidermisdicke, Papillendichte und Dicke des stratum corneums vermessen sowie Biopsien entnommen und mit der konventionellen Histologie verglichen [12]

Zusätzlich zu den erkrankten Hautarealen wurden auch in unseren Untersuchungen sichtbar gesunde Hautareale in unmittelbarer Nähe zum erkrankten Areal untersucht.

Dies führte zu einem relativ unerwartetem Ergebnis. Auch in diesen Arealen fanden sich histologische Veränderungen. Mit einer minimalen Epidermisdicke von 53,37  $\mu\text{m}$  und einer maximalen Epidermisdicke von 125,99  $\mu\text{m}$  liegen diese Werte über denen der gesunden Kontrollgruppe. Desweiteren konnten auch in diesen Arealen eine Papillomatose sowie eine Gefäßdilataion nachgewiesen werden. Mit 10,0 Papillen pro Bildausschnitt und einem Durchmesser von 9,93  $\mu\text{m}$  liegen diese Werte unter denen der Psoriasis-Probanden, aber deutlich über denen der gesunden Probanden. Im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten, stellte sich in den Untersuchungen von Gonzalez et al. kein signifikanter Unterschied bezüglich der minimalen und maximalen Epidermisdicke von Gesunden und von gesunden Arealen bei Psoriatikern da. Die in unserer Studie erhobenen Daten können dies nicht bestätigen.

In den Grafiken 1 bis 4 ist ein unmittelbarer Vergleich zwischen der gesunden Kontrollgruppe, den Psoriasis-Patienten sowie den gesunden Arealen bei den Psoriasis-Patienten möglich.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich zwischen einem Laser-Scan-Mikroskop, welches mittels Fluoreszenzfarbstoff sichtbare Bilder erzeugt und einem auf Reflektanz beruhendem Laser-Scan-Mikroskop. Im Hinblick auf Diagnostik und Therapie im dermatologischen Alltag, als auch zur Untersuchung der Hautphysiologie sollten beide Untersuchungsmöglichkeiten untersucht und bewertet werden.

Wissenschaftliche Arbeiten bezüglich des kLSM „Stratum“ und des Vivasopes liegen in zahlreicher Form vor. Eine vergleichende Arbeit existierte jedoch nicht.

Im letzten Jahrzehnt konnten sich das kLSM „Stratum“ als auch das Vivascope<sup>®</sup> 1500 in der klinischen Forschung als auch im stationären und ambulanten Alltag der Dermatologie etablieren.

Beiden Untersuchungsmethoden gemeinsam ist die Darstellung der gesunden und erkrankten Haut in vivo und in Echtzeit. Ebenso wird eine invasive Hautentnahme durch beide Laser-Scan-Modi unnötig.

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei verschiedene Studiendesigns zur Anwendung gebracht. Zunächst wurden zwölf gesunde Probanden untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Es wurden die einzelnen Hautschichten, Hautanhangsgebilde und gutartige Hautveränderungen mittels kLSM „Stratum“ und dem Vivascope<sup>®</sup> 1500 untersucht. Anschließend wurden in Studie zwei 20 Psoriasis-Patienten untersucht. Es wurden in Studie eins quantitative gemeinsame Parameter wie die Dicke der Hautschichten bei gesunden Probanden dokumentiert, sowie die Sichttiefe (Eindringtiefe) der Mikroskope gemessen und die Qualität der entstandenen digitalen Bilder beurteilt.

Im zweiten Studiendesign wurden bei den an Psoriasis erkrankten Patienten ebenso die Hautschichten und Tiefen gemessen, sowie zusätzlich die typisch psoriatischen Veränderungen wie Plaquebildung, Verdickung der Epidermis, Papillomatose und Dilatation der Gefäße unter quantitativen und qualitativen Gesichtspunkten untersucht und ausgewertet.

### **kLSM „Stratum“**

Das konfokale Fluoreszenzmikroskop „Stratum“ bietet Vorteile bei der Untersuchung des stratum corneum und der Beurteilung dynamischer Prozesse (z.B. Untersuchung von Verteilungsmuster bei topischer Applikation von Salben, Gelen, Cremes, intradermalen Injektionen). Mit einer Eindringtiefe von ca. 120-140 µm ist das „Stratum“-Mikroskop für Untersuchungen des stratum basale und der Dermis nicht optimal geeignet. Einschränkungen der Anwendung ergeben sich auch durch das Vorhandensein des Fluoreszenzfarbstoffes, der via intradermaler Injektion appliziert wird. So sollte bei Verdacht eines malignen Prozesses aufgrund der potentiellen Gefahr der Verschleppung von malignen Zellen, diese Methode nicht angewendet werden. Das Auffinden und Wiederauffinden von anatomischen Strukturen durch das Handstück ist schwierig und bedarf vorheriger Übung.

### **Vivascope® 1500**

Das Vivascope® 1500 bietet klare Vorteile bezüglich der Eindringtiefe, der Reproduzierbarkeit des untersuchten Areals sowie in Bezug auf quantitative Aussagen. Mit einer Eindringtiefe von 150-160µm ist eine Untersuchung des stratum basale, stratum spinosum und der beginnenden Dermis sehr gut möglich.

Untersuchungen von kranken und gesunden Probanden sind gleichermaßen möglich, da keine Injektionen und Fluoreszenzfarbstoffe nötig sind.

Das Auffinden und Wiederauffinden von anatomischen Strukturen wird durch die Funktionen *Vivastack*® und *Vivablock*® maßgeblich erleichtert.

Nachteile des Vivascope® 1500 liegen in der eher schlechten Auflösung, insbesondere der oberen Epidermisschichten, da klare Zellgrenzen nicht optimal erkennbar sind.

### **Fazit**

Beide Systeme haben in der medizinischen Diagnostik ihre Berechtigung. Für die Auswahl eines konfokalen Laser-Scan-Mikroskopes muß vorher geklärt werden *wer* und *was* genau untersucht werden soll und ob eher qualitative oder eher quantitative Aussagen getroffen werden soll.

1. Tannous ZS; Mihm MC; Flotte TJ; Gonzalez S: In vivo examination of lentigo maligna type by near infrared reflectance confocal microscopy: comparison of in vivo confocal images with histologic sections. *J Am Acad Dermatol* 2002, 46, S. 260-263
2. Langley RG; Rajadhyaksha M; Dwyer PJ; Sober AJ; Flotte T; Anderson RR: Confocal scanning laser microscopy of benign and malignant melanocytic skin lesions in vivo. *J Am Acad Dermatol*. 2001, 45, S. 365-376
3. Sauermann K; Gambichler T; Wilmert M; Rotterdam S; Stucker M; Altmeyer P; Hoffmann K: Investigation of basal cell carcinoma (correlation of carcinoma) by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res Technol* 2002, 8, S. 141-147
4. Nori S; Rius-Diaz F; Cuevas J; Goldgeier M; Jean P; Torres A; Gonzalez S: Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma: A multicenter study. *J Am Acad Dermatol*, 2004, 51, S. 923-930
5. Rajadhyaksha M; Menaker G; Flotte T: Confocal examination of nonmelanoma cancers in thick skin excisions of potentially guide Mohs micrographic surgery without frozen histopathology. *J Invest Dermatol*, 2001, 117; S:1137-1143
6. Rajadhyaksha M; Grossmann M; Esterowitz D; Webb RH; Anderson RR: In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: Melanoma provides strong contrast. *J Invest Dermatol*, 1995, 104, S. 946-952
7. Gonzalez S; Swindells K; Rajadhyaksha M; Torres A: Changing paradigms in Dermatology: confocal microscopy in clinical and surgical dermatology. *Clin Dermatol*, 2003, 21; S. 359-369
8. Huzaira M; Rius F; Rajadhyaksha M; Anderson RR; Gonzalez S: Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol*, 2001, 116, S. 846-852
9. Busam KJ; Charles C; Lee G; Halpern AC: Morphologic features of melanocytes, pigmented keratinocytes and melanophages by in vivo confocal scanning laser microscopy. *Mod Pathol*, 2001, 14, S: 862-868

10. Rajadhyaksha M; Gonzalez S; Zavislav JM; Anderson RR; Web RH: In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol*, 1999, 113, S. 293-303
11. Charles CA; Marghoob AA; Busam KJ; Clark-Loeser L; Halpern AC: Melanoma or pigmented basal cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation with dermoscopy, in vivo confocal laser scanning microscopy and routine histology. *Skin Res Technol*, 2002, 8, S. 282-287
12. Gonzalez S; Rajadhyaksha M; Rubinstein G; Anderson RR: characterization of psoriasis in vivo by reflectance confocal microscopy. *J Med*, 1999, 30, S. 337-356
13. Gonzalez S; Gonzalez E; White WM; Rajadhyaksha M; Anderson RR: Allergic contact dermatitis: correlation of in vivo confocal imaging to routine histology. *J Am Acad Dermatol*, 1999, 40, S. 708-713
14. Aghassi D; Anderson RR; Gonzalez S: Confocal laser microscopy imaging of actinic keratoses in vivo: A preliminary report. *J Am Acad Dermatol*, 2000, 43, S. 42-48
15. Curiel-Lewandrowski C; Williams CM; Swindells KJ; Tahan SR; Astner S; Frankenthaler RA; Gonzalez S: Use of in vivo confocal microscopy in malignant melanoma: an aid in diagnosis and assessment of surgical and non-surgical therapeutic approaches: *Arch Dermatol*, 2004, 140, S:1127-1132
16. Toellner R: *Illustrierte Geschichte der Medizin*. Verlag Andreas & Andreas 1992, Band 3, S. 1513-1540
17. Virchow R: *Die Cellularpathologie in Ihrer Begründung und in Ihrer Auswirkung auf die physiologische und pathologische Gewebelehre*. A. Hirschwaldt Verlag, 1858
18. Ehrlich P: *Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Leukozyten*. *Zeitschrift für klinische Medizin*, 1880, S. 553-560
19. Rassner G: *Dermatologie. Lehrbuch und Atlas*. Urban & Fischer Verlag, 2006, 8. Auflage, S. 5 ff
20. Unna PG: Cignolin als Heilmittel der Psoriasis. *Derm Wschr*, 1916, 62, S. 116-137

21. Frederiksson T; Peterson U: Severe psoriasis-oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica*, 1978, 157, S. 238-244
22. Krueger JG; Miyazawa M; Gilleaudeau P; Hakimi J; Light S, Sherr A; Gottlieb AB: Successful in vivo blockade of CD 25 on T cells by administration of humanized anti-Tac antibody to patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 2000, 43, S. 448-458
23. Owen CM; Harrison PV: Successful treatment of severe psoriasis with basiliximab, an interleukin-2-rezeptor monoclonal antibody. *Clin Exp Dermatol*, 2000, 25, S. 195-197
24. Bornhovd EC; Schuller E; Bieber T; Wollenberg A: Immunsuppressive macrolides and their use in dermatology. *Hautarzt*, 2000, 51, S. 646-654
25. Hengge UR; Ruzicka T; Schwartz RA; Cork MJ: Adverse effects of tropical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol*, 2006, 54, S. 16-17
26. Fritsch P: *Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas*. Springer Verlag, 1998, S. 23-36
27. Schaefer H; Redelmeier TE: *Skin Barrier. Principles of Percutaneous Absorption*. Karger Verlag, Basel, 1996, 1. Auflage, S. 1-20
28. Schaefer H, Redelmeier TE: *Skin Barrier. Principles of Percutaneous Absorption*. Karger Verlag, Basel, 1996, 1. Auflage, S. 42-150
29. Altmeyer P; Hoffmann K; Stücker M: *Kutane Mikrozirkulation*. Springer Verlag, Berlin, 1997, 1. Auflage
30. Barton SP et al: Quantification of microvascular changes in the skin in patients with psoriasis. *Br J Dermatol*, 1992, 126, S. 569-574
31. Auer T, Bacharach-Buhles M; el Gammal S; Stücker M; Panz B; Popp C; Hoffmann K; Hoppe M; Altmeyer P: The hyperperfusion of the psoriatic plaque correlates histologically with dilatation of vessels. *Acta Derm Venerol*, 1994, 186, S. 30-32
32. English DR; Armstrong BK: Melanocytic nevi in children. I Anatomic sites and demographic and host factors. *Am J Epidemiol*, 1994, 139, S. 390-401
33. Green A; Siskind V; Hansen ME; Hanson L; Leech P: Melanocytic nevi in schoolchildren in Queensland. *J Am Acad Dermatol*, 1989, 20, S. 1054-1060

34. Garbe et al: Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol*, 1994, 102, S. 695-699
35. Bauer J; Garbe C: Risk Estimation for Malignant Transformation of Melanocytic Nevi. *Arch Dermatol*, 2004, 140, S. 127
36. Miller M; Ackermann AB: How accurate are dermatologists in the diagnosis of melanoma? Degree of accuracy and implications. *Arch Dermatol*, 1992, 128, S. 559-560
37. Fritsch P: *Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas.* Springer Verlag, Berlin, 1998, S. 576-577
38. Jung EG: *Dermatologie.* Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1991, 2. Auflage, S. 228-233
39. Meffert H; Rowe E: *Kleine Kulturgeschichte der Haut.* Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2007
40. Christopheres E; Mrowietz U; Sterry W (Hrsg): *Psoriasis.* Blackwell- Verlag, 2003, 2. Auflage, S. 2-5
41. Christopheres E: The immunopathology of psoriasis. *Int Arch Allergy Immunol*, 1996, 110, S. 199-206
42. Bos JD, de Rie MA; Teunissen MB; Piskin G: Psoriasis: Dysregulation of innate immunity. *Br J Dermatol*, 2005, S. 1098-1107
43. Nickoloff BJ: The cytokine network of psoriasis. *Arch Dermatol*, 1991, 127, S. 871-884
44. Schön MP; Ruzicka T: Psoriasis: The plot thickens. *Nat Immunol*, 2001, 2, S.91
45. Gottlieb AB: Psoriasis: emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4, S. 19-34
46. Schön MP: Advances in psoriatic therapy. *Lancet*, 2005, 366, S. 1333-1335
47. Bahmer FA; Smolle J: Morphometry in clinical dermatology. *Acta Derm Venerol*, 1992, 72, S. 52-55

48. Marks R; Barton SP; Shuttleworth D; Finlay AY: Assesment of disease progress in psoriasis. *Arch Dermatol*, 1989, 125, S. 235-240
49. Girad P; Beraud A; Sirvent A: Study of three complemantary techniques for measuring cutaneous hydration in vivo in human subjects: NMR spectroscopy, transient thermal transfer and corneometry- application to xerotic skin and cosmetics. *Skin Res Technol*, 2000, 6, S. 205-213
50. Liu B; Brezenski ME: Theoretical and practical considerations on detection performance of time domain. Fourier domain, and swept source optical coherence tomography. *J Biomed Opt*, 2007, 12, S. 044007
51. Murray AK; Herrick AL; Moore TL; King TA; Griffiths CEM: Dual wavelength (532 and 633 nm) laser Doppler imaging of plaque psoriasis. *Brit J Dermatol*, 2005, 152, S. 1182-1186
52. Fluorescein Alcon 10% Injektionslösung, Fluorescein SE Thilo, Augentropfen in Einmaldosis, Rote Liste, Frankfurt/M, 2004, Rote Liste Service GmbH, ECV-EditoCantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH
53. Fluorescein sodium salt, US Pharmascope, Bd 19, S. 203
54. Falbe J, Regitz M: *Römpp Chemie Lexikon*, Georg Thieme Verlag, 1995, 9. Auflage, S. 1403
55. Lipson BK: Complications of intravenous fluorescein injections. *Int Ophtalmol Clin*, 1989, 29, S.200-205
56. Fitzpatrick TB: The validity and practicalitiy of sunreactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*, 1988, 124, S. 869-871
57. Minsky M: microscopy apparatus. US patent 3013467, 1961
58. Brakenhoff GJ: Imaging modes in confocal scanning light microscopy. *J Microscop*, 1979, 117, S. 233
59. Vogel H: *Gerthsen Physik*, Springer Verlag, Berlin, 2002, 18. Auflage
60. Meyer LE; Otberg N; Sterry W; Lademann J: In vivo confocal scanning laser microscopy: comparison of the reflectance and fluorescence mode by imaging human skin. *J Biomed Opt*, 2006, 11, S. 0044012

61. Bravermann IM; Sibley J: Role of the microcirculation in the treatment and pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*, 1982, 78, S. 12-17
62. Teichmann A; Jacobi U; Weigmann HJ; Sterry W; Lademann J: Reservoir function of the stratum corneum: development of an in vivo method to quantitatively determine the stratum corneum reservoir for topically applied substances. *Skin Pharmacol Physiol*, 2005, 18, S. 75-80
63. van Kuijk-Meuwissen J; Junginger HE; Bouwstra JA: Interaction between liposomes and human skin in vitro, a confocal laser scanning microscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1998, 1371, S. 31-39
64. Rieger T; Teichmann A; Richer H; Sterry W; Lademann J: Application of in vivo laser scanning microscopy for evaluation of barrier creams. *Laser Physics Letters*, 2007, 4, S. 72-76
65. Teichmann A; Henschel S; Jacobi U; Presse G; Neubert RH; Sterry W; Lademann J: Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 67, S. 699-706
66. Jacobi U; Tassopoulos T; Surber C ; Lademann J: Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch Dermatol Res*, 2006, 297, S. 303-310
67. Reuter P: Springer Lexikon: Diagnose & Therapie, Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, 2006, S. 1317-1326
68. Lademann J; Otberg N; Richter H; Meyer LE; Audring A; Teichmann A; Thomas S; Knüttel A; Sterry W: Application of optical non-invasive methods in skin physiology: a comparison of laser scanning microscopy and optical coherent tomography with histological analysis. *Skin Res Technol*, 2007, 13, S. 119-132
69. Pellacani G et al: In vivo confocal laser scanning microscopy of pigmented spitz nevi: comparison of in vivo confocal images with dermoscopy and routine histopathology. *J Am Acad Dermatol*, 2004, 51, S. 371-376
70. Salvini C et al: Application of optical coherence tomography in non-invasive characterization of skin vascular lesion. *Skin Res Technol*, 2008, 14, S. 89-92

71. Whitten JT; Overall JD: The thickness of epidermis. *Br J Dermatol*, 1973, 89, S. 467-476
72. Schiebler TH; Schmidt W; Zilles K: *Anatomie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 6. Auflage, S. 206-208
73. Suihko C; Swindle LD; Thomas SG; Serup J: Fluorescence fibre-optic confocal microscopy of skin in vivo microscope and fluorophores. *Skin Res Technol*, 2005, 11, S. 254-267
74. Holbrook KA; Odland GF: Regional differences in thickness (cell layers) of the human stratum corneum: an ultrastructural analysis. *J Invest Dermatol*, 1974, 62, S. 415-422
75. Swindt DA; Wilhelm KP; Maibach HI: Water diffusion characteristics of human stratum corneum at different anatomical sites in vivo. *J Invest Dermatol*, 1998, 111, S. 385-389
76. Gambichler T; Sauermann K; Altintas MA; Paech V; Kreuter A; Altmeyer K; Hoffmann K: Effects of repeated sunbed exposures on the human skin. In vivo measurements with confocal microscopy. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 2004, 20, S. 27-32
77. Jacobi U; Waibler E; Sterry W; Lademann J: In vivo determination of the Long-Term-Reservoir of the Horny layer using Laser Scanning Microscopy. *Laser Physics*, 2005, 15, S. 565-569
78. Sauermann K; Clemann S; Jaspers S; Gambichler T; Altmeyer P; Hoffmann K; Ennen J: Age related changes of human skin investigated with histometric measurements by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res Technol*, 2002, 68, S. 53-60
79. Bravermann IM, Yen A: Ultrastructure of the capillary loops in the dermal papillae of psoriasis. *J Invest Dermatol*, 1977, 68, S. 53-60
80. Auer T; Bacharach-Buhles M; el Gammal S; Stücker M; Panz B; Popp C; Hoffmann K; Happe M; Altmeyer P: The hyperperfusion of the psoriatic plaque correlates histologically with dilatation of vessels. *Acta Derm Venerol*, 1994, 186, S. 30-32

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

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Julia Krutz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Qualitativer und quantitativer Vergleich zwischen dem kLSM „Stratum“ und dem Vivascope<sup>®</sup> 1500“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 01.12.2008

## **Danksagung**

*Ohne die freundliche und tatkräftige Unterstützung anderer Menschen wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.*

*Zunächst möchte ich Herrn Prof. Wolfram Sterry für die Möglichkeit an der dermatologischen Klinik der Charite zu promovieren, danken.*

*Herzlichst bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann, der mir die Bearbeitung dieses Themas in seiner Arbeitsgruppe möglich machte. Durch viele aufschlussreiche Diskussionen und Anregungen gab er mir stets hilfreiche Unterstützung.*

*Großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Bereichs für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut für die sehr nette und konstruktive Zusammenarbeit.*

*Einen speziellen Dank möchte ich Heike Richter aussprechen. Mit ihrer Geduld, ihrer steten Hilfsbereitschaft und ihren Anregungen war sie mir stets eine große Hilfe.*

*Desweiteren möchte ich mich bei allen Probanden und Patienten, die sich im Rahmen der Wissenschaft für diese Arbeit zur Verfügung stellten, danken.*

*Meinem Bruder David möchte ich für die Unterstützung in mathematischen und statistischen Fragen, danken.*

*Meinen Eltern, deren großzügige Unterstützung es mir erst ermöglichte, Medizin zu studieren und deren kreativen Anmerkungen bei der redaktionellen Bearbeitung dieser Arbeit mir sehr hilfreich waren, gilt mein besonderer Dank.*

*Zuletzt möchte ich mich noch ganz herzlich bei Frank bedanken. Durch seine Liebe und seine tägliche Unterstützung gab er mir stets den privaten Rückhalt, um diese Arbeit fertigzustellen.*