

# 1 Einleitung

In unserer Zeit, in der sich Technologie rasch entwickelt, finden immer mehr neuartige Untersuchungsgeräte ihren Einsatz in der Medizin. Sie sind die Werkzeuge der modernen klinischen Forschung, sie zeigen neue diagnostische Wege und eröffnen alternative Therapien. Dank diesen Geräten und ihren Erkenntnissen konnte die Medizin nie so viel Gutes leisten wie heute. Gegenwärtig existiert eine Fülle von neuen Verfahrensmöglichkeiten über die auch der Experte leicht den Überblick verliert. Welches Gerät kann wie, wann und zu welchem Zweck zum Einsatz gebracht werden? Welches Potential birgt es und ist dieses noch ausbaufähig?

In der folgenden Arbeit stelle ich eines dieser modernen Verfahren vor: die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie (kLSM). Eine Verfeinerung der optischen Apparatur als auch die Optimierung der digitalen Umsetzung erschließt der kLSM den Weg vom Labor in die Klinik. Inzwischen sind Geräte von verschiedenen Herstellern kommerziell zu erwerben.

In meinen Forschungen kombinierte ich ein modernes Laser-Scan-Mikroskop (LSM) mit dem Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes Na-Fluoreszein. Dieses Verfahren der sogenannten fluoreszierenden kLSM wendete ich hinsichtlich dermatologischer Fragestellungen an: Ist es möglich, den *in vivo* Aspekt gesunder als auch erkrankter Haut bildlich zu erfassen und zu evaluieren? Die Ergebnisse waren erstaunlich: Ohne die Notwendigkeit längerer Präparationsprotokolle und ohne verletzende Biopsie konnte die Haut auf zellulärer Ebene am lebenden Menschen betrachtet werden. Ein und dasselbe Areal konnte zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt vermessen werden, um z. B. Therapiefortschritte zu studieren. Erstmals wurden mit dieser Methode Hautpathologien untersucht, welche leicht von gesunder Haut abgegrenzt werden konnten.

Die folgende Arbeit besteht über weite Teile aus einer deskriptiven Exploration von menschlicher Haut anhand konfokaler Bilder. Parameter gesunder Haut wurden quantitativ vermessen. Es erfolgte ein Vergleich mit anderen *in vivo* Techniken. Im Ergebnis werden neue diagnostische Perspektiven aufgezeigt und das immense Potential dieser Methode für die Klinik verdeutlicht. Schwierigkeiten bei der Anwendung werden systematisch erörtert und diskutiert. Demgemäß stellt diese Arbeit eine Grundlage für weitere Forschung und Untersuchung mit der fluoreszierenden konfokalen Technik am lebenden Probanden dar.

## 1.1 Allgemeines

### 1.1.1 Haut

Die Haut bildet als Hautdecke (Integumentum commune) die äußere Körperoberfläche [1]. Sie ist das Grenzorgan, welches den Menschen von seiner Umwelt trennt. Mit einem Gewicht von ungefähr 16% des Körpergewichtes und einer Oberfläche beim Erwachsenen von etwa 1,5-1,8 m<sup>2</sup> ist sie das schwerste und größte Einzelorgan des menschlichen Körpers [2]. Anhand ihres Aufbaus kann man sie in drei Schichten unterteilen: in die Subkutis, die Dermis und die apikal liegende Epidermis. In die Haut eingebunden sind verschiedene Hautanhangsgebilde wie z.B. die Nägel und die Haare sowie die Schweiß- und Talgdrüsen. Die einzelnen Schichten der Haut erfüllen verschiedene Aufgaben. Allgemein dient sie zum Schutz des Körperinneren, steht im Dienst von Regulationssystemen zur Aufrechterhaltung der Homöostase, beherbergt Sinnesorgane und spielt eine wesentliche Rolle bei zahlreichen immunologischen Prozessen [3, 4]. An den Körperöffnungen geht die Haut kontinuierlich in Schleimhaut über, welche die innere Körperoberfläche auskleidet.

Pathologische Prozesse und Veränderungen der Haut führen zur Einschränkung ihrer Integrität. Die natürlichen Schutz- und Regulationsfunktionen sind beeinflusst, zusätzlich leiden die Betroffenen einer Hauterkrankung meist stark unter einem psychosozialen Druck, da das veränderte Erscheinungsbild der Öffentlichkeit häufig nicht verborgen werden kann.

### 1.1.2 Dermatologie

Die Dermatologie ist das Fachgebiet der Medizin, welche sich mit den Veränderungen und Erkrankungen der Haut, der Hautanhangsgebilde und der angrenzenden Schleimhäute beschäftigt [5]. Die Kenntnisse der normalen Ausbildung, der Strukturen und des gesunden Aspektes der Haut sind wichtig in der Dermatologie, da sich die Krankheiten in aller Regel durch Abweichungen davon äußern. Dabei treten sichtbare und spürbare Veränderungen und Erscheinungen auf. Obwohl es eine große Vielzahl von Krankheiten an der Haut gibt, ist die Zahl der krankhaften Veränderungen begrenzt. Die Hautveränderungen, die „Blüten der Haut“ (Effloreszenzen), müssen für diagnostische Zwecke erkannt und eingeordnet werden. Eine korrekte Bezeichnung und Einordnung ermöglicht eine Verständigung zwischen den

Dermatologen untereinander, lässt Rückschlüsse auf die zu Grunde liegenden Ursachen zu und ist somit Grundlage für die Auswahl des Therapieverfahrens [6].

Dem Dermatologen stehen zur Untersuchung eines Hautkranken eine große Anzahl von diagnostischen Methoden zur Verfügung. Oft genügt allein die Erhebung der Vorgeschichte des Patienten (Anamnese) sowie die Inspektion und Palpation der Effloreszenzen, um aus ihrer Beschaffenheit, Beschreibung und Gliederung eine Verdachtsdiagnose zu erheben. Davon hängen das weitere Behandlungsvorgehen und eine adäquaten Therapieintervention ab. Kann mit einer „Blickdiagnose“ keine Einordnung erzielt werden, so können diagnostische Hilfsmittel zur Untersuchung hinzugezogen werden. Mannigfache Geräte stehen dabei zur Auswahl. Besonders hervorzuheben im optischen Bereich sind dabei die Lupe und das Mikroskop. Beide Verfahren bedienen sich optischer Linsensysteme und haben gemeinsam, dass sie das Blickfeld vergrößert wiedergeben und eine Detailansicht des Hautgewebes ermöglichen. Während die Lupe eine äußerliche *in vivo* Betrachtung von lebendem Hautgewebe ausführbar macht, liegt der Vorteil der Lichtmikroskopie in der immensen Vergrößerungsstärke. Zelluläre Strukturen sind durch diese optische Technik explorierbar. Abweichungen erkrankten Gewebes vom gesunden sind gut zu beurteilen.

### 1.1.3 Mikroskopie

Zur gleichen Zeit, da Galilei mit seinem Fernrohr die Himmelskörper erforschte, begann man, auch die winzigen, mit bloßem Auge nicht sichtbaren Gebilde des Mikrokosmos mit Hilfe optischer Gläser zu betrachten. Ursprünglich hatte diese mikroskopische Betrachtung zwei Wurzeln: zum einen die Freude und das tiefe Staunen über den wunderbaren Feinbau von Mineralien, Pflanzen und Tieren. Zum anderen die wissenschaftliche Auswertung des Instruments: die Erforschung des Bauplans kleiner Lebewesen, die Untersuchung winziger Organstrukturen und die Beobachtung physiologischer sowie pathologischer Prozesse. An den medizinischen Fakultäten der gesamten Welt wurde die wissenschaftliche Arbeit von der Mikroskopie wesentlich beeinflusst [7, 8].

Über Jahre der Weiterentwicklung konnte das Lichtmikroskop seine Stellung in der medizinischen Diagnostik und der Forschung festigen. Es half bei der Kenntnisbildung, insbesondere bei der Ursache (Ätiologie) sowie bei der Entstehung und Entwicklung (Pathogenese) von Krankheiten. Viele Pathologien konnten ferner systematisch eingeordnet und

beschrieben werden (Nosologie) [9]. Das Mikroskop wird heutzutage zur Erkennung, Beurteilung und Differenzierung von vielen Krankheitssymptomen hinzugezogen. Deshalb ist es möglich, Pathologien zielgerichteter und adäquater anzugehen. Die Wirksamkeit von pharmakologischen Substanzen kann auf zellulärer Ebene betrachtet und analysiert werden. Gegenwärtig ist die Lichtmikroskopie als wichtiges optisches Darstellungsinstrument im medizinischen sowie im wissenschaftlichen Alltag nicht mehr zu entbehren.

Für die lichtmikroskopische Betrachtung der Zellen und Zellstrukturen ist in der Regel eine Gewebentnahme, eine Biopsie, erforderlich. Diese Probe muss üblicherweise weiterverarbeitet werden: Sie wird je nach Fragestellung und Präparationsprotokoll unterschiedlich geschnitten, gefärbt und fixiert. Erst dann ist eine histologische Darstellung möglich. Die Nachteile, welche aus diesem Verfahren resultieren, liegen offensichtlich auf der Hand. Aufgrund der Invasivität werden die Zellen aus ihrem nativen Gewebe herausgerissen. Neben Schrumpfung, Deformierung, Verzerrung und weiteren sich aus der Präparation ergebenden Artefakten wird uns durch die Biopsie nur tote Gewebemorphologie zu einem Zeitpunkt präsentiert [10, 11]. Eine *in vivo* Betrachtung des zu explorierenden Gewebes in seiner ursprünglichen Form ist aufgrund der Destruktivität dieser Technik nicht möglich.

## **1.2 Die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie (kLSM)**

Gegenwärtig steht uns mit der kLSM ein Verfahren zur Verfügung, welches einen Ausgleich der lichtmikroskopischen Nachteile erlaubt. Das konfokale Prinzip wird in der schematischen Abbildung 1.1 angedeutet. Obwohl im klinischen *in vivo* Gebrauch nur eine Objektivlinse eingesetzt wird, um ausgestrahltes und eingefangenes Licht zu brechen, zeigt dieses Schema zur besseren Verständlichkeit zwei Objektive:

Die optische Schnittbildung in unterschiedlicher Tiefe erfolgt durch die Auswerfung eines Laserlichtes. Das Laserlicht wird durch das Objektiv L1 gebrochen, so dass nur ein kleines Volumen im Zielgewebe (P1) ausgeleuchtet wird. Die zweite Linse (L2) bündelt die von der Fokusebene eingefangenen Lichtsignale gerade so, dass sie durch die kleine Öffnung der Lochblende (Blende 2) zum Lichtdetektor gelangen können. Der Fokus beider Apparaturen, die der Lichtausstrahlung und die der Lichtdetektion, haben eine gemeinsame Ebene, sie sind „co-fokussiert“ („konfokal“). Lichtstrahlungen (P2) von außerhalb der Fokusebene werden

diskriminiert, indem sie von der Lochblende L2 dem Detektor vorenthalten werden. Dieses Prinzip verspricht eine verbesserte Seit- und Tiefenauflösung und eine verminderte Bildunschärfe. Es ermöglicht einen Blick unter die Oberfläche von einer organischen Probe *in vivo* mit einer Detailansicht im mikroskopischen Bereich. Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie benötigt die konfokale Mikroskopie dabei nur eine geringe bzw. gar keine Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes. Ein umfangreiches Präparationsprotokoll ist nicht erforderlich. Durch diese Darstellungsmethode bleibt die Integrität des Gewebes erhalten. Die Zellmorphologie kann in ursprünglicher Form studiert und ein dynamischer Prozess der Zellen kann an der gleichen Stelle wiederholt über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Durch dieses große Potential hat sich diese moderne optische Darstellungstechnik in vielen Gebieten der Forschung etabliert. Aber das Potential der konfokalen Mikroskopie ist noch lange nicht ausgereizt und birgt weitere starke, bisher unerschlossene Kapazitäten.

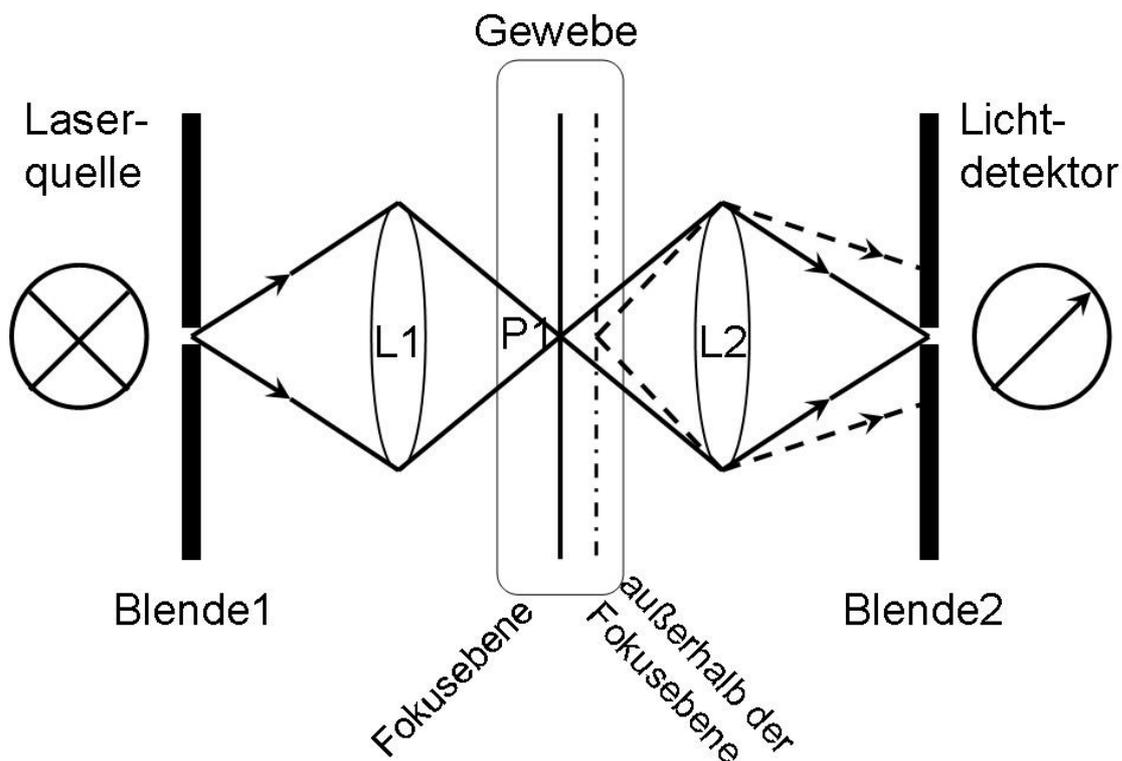


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops (zum besseren Verständnis mit einem Zwei-Linsen-Blenden-System).

### 1.2.1 Historischer Hintergrund

Ein neu aufgelegtes Buch zur Geschichte der konfokalen Mikroskopie dokumentiert die wichtigsten Entwicklungsschritte und Patente vom Jahre 1884 bis zur Gegenwart [12].

Das allgemeine optische Design der konfokalen Mikroskopie basiert auf den Grundlagen von Lukosz [13]. Der Terminus „konfokal“ besagt, wie eingangs schon erwähnt, dass der Kondensor und die optische Linse eines Mikroskops den gleichen Brennpunkt innehaben. Dieser physikalische Kniff verspricht eine höhere Bildauflösung auf Kosten des Blickfeldes. Auf diesem Prinzip entwickelte und patentierte im Jahre 1955 Minsky das erste funktionstüchtige konfokale Mikroskop zur Untersuchung von neuronalen Netzwerken im lebendigen Gehirn [14]. Doch von den ersten Ansätzen bis zur heutigen modernen *in vivo* Anwendung waren einige Verbesserungen des optischen Systems und der Datenverarbeitung nötig [15].

Erst der Einsatz einer punktuellen Lichtquelle schuf die Voraussetzung für eine hochauflösende, mikroskopische konfokale Betrachtung von lebenden Zellen im intakten Gewebe [16]. Ein kleines Volumen konnte innerhalb des Gewebes durch den dünnen Lichtstrahl fokussiert werden. Die sich aus dem Lichtfokus ergebenden Signale wurden wiederum durch einen punktuellen Detektor eingesammelt. Auf dieser Basis wurde die konfokale Echtzeitmikroskopie das erste Mal im Jahre 1968 von Petran et al. demonstriert [17].

Als weiterer Schritt muss das verbesserte optische Blendensystem genannt werden, welche die Auflösung der konfokalen Visualisierung enorm verbesserte [15]. Außerhalb der Fokusebene liegende Lichtstrahlungen wurden vom Detektor abgeschirmt mit dem Resultat einer immensen Bildschärfe. Gewebe mit geringem Kontrast konnten nun ohne großen Aufwand ausgeleuchtet und exploriert werden.

Obwohl die konfokale Mikroskopie ursprünglich dafür entworfen wurde *in vivo* darzustellen, sind zunächst lediglich Ergebnisse von *ex vivo* Darstellungen publiziert [18, 19]. Mehrere Gründe gab es damals für die Schwierigkeiten mit der Anwendung am Lebenden. Neben der hohen Lichtenergie, welche phototoxische Schäden im Gewebe hervorrufen konnte, verursachte die langsame visuell-digitale Umsetzung verwackelte und unscharfe Bilder.

Erst 1986 war es wiederum der Pionierarbeit von Petran et al. [20] zu verdanken, *in vivo* Darstellungen von der Retina zu erhalten. Durch eine höhere digitale Rechenleistung und einer besseren Illuminationsausbeute war dieses jetzt machbar. Jester et al. [21, 22] präsentierte in den darauf folgenden Jahren Arbeiten, in denen er verschiedene Organe inklusive der menschlichen

Haut mit der konfokalen Mikroskopie *in vivo* untersuchte. Bis zum Jahre 1994 machten sich mehrere histometrische Analysestudien diese flexible Untersuchungsmethode zu Nutze. Größe, Form und Morphologie der gesunden humanen Haut wurden *in vivo* erfasst [23, 24, 25, 26].

Neben dem Einsatz im dermatologischen Fachbereich bot sich das nicht-invasive, schmerzfreie Verfahren, ohne Ödem- und Narbenbildung, vor allem auf dem Gebiet der Ophthalmologie an [27]. Dort wurde das große diagnostische Potential früh erkannt. Schnell folgten die ersten Studien über das Monitoring des erkrankten Auges. U.a. wurden Effizienzprüfungen medizinischer Interventionsbehandlung nach Augeninfektionen [28], sowie Studien über die endotheliale Zellheilung durchgeführt [29]. Rasch integrierte sich die konfokale Mikroskopie als praktisches Diagnose-Tool in der Ophthalmologie.

### 1.2.2 Einsatz in der dermatologischen Forschung und Klinik

In der dermatologischen und kosmetischen Forschung wurde bis 1995 mit der konfokalen Mikroskopie vor allem durch Corcuff et al. verschiedene Hautparameter bestimmt und kutane Strukturen vermessen [23, 24, 25, 26]. Erst nach einem weiteren Ausbau der Lichttechnik konnte sich das Verfahren aber auch in der Darstellung von dermatologischen Erkrankungen etablieren. Die Quecksilberlampen wurden in den neueren Geräten durch Lasersysteme ersetzt, mit den Vorteilen einer präzisen Selektivität der Wellenlänge sowie einer höheren Lichtstärke [30].

Besonders dem Forschungsteam um Rajadhyaksha und González aus der Harvard Universität gelang es, viele *in vivo* Einsatzmöglichkeiten der kLSM zu demonstrieren. Sie nutzten für ihre Untersuchungen die unterschiedlichen zellulären Reflex- und Absorptionseigenschaften des Gewebes auf Licht aus. Stetig wurden die technischen Fähigkeiten ihres konfokalen Mikroskops verbessert, mit Steigerungen in Flexibilität des Scanners, Auflösung, Kontrast, Darstellungstiefe und Blickfeld [31]. Zu Beginn ihrer Studien machten sie sich zunächst mit der gesunden menschlichen Haut *in vivo* vertraut, wobei Rücksicht auf topografische Unterschiede genommen wurde [30, 32, 33]. Diese Ergebnisse wurden später zur Interpretation von verschiedenen Hautkrankheiten eingesetzt.

Untersucht wurde eine Anzahl von klinisch relevanten, proliferativen und entzündlichen Hautpathologien, wie Psoriasis [34, 35], akute Kontaktdermatitis [36, 37, 38] und Infektionen mit Schwerpunkt Mykose [39, 40] und Follikulitis [41]. Als nicht-invasives Diagnosewerkzeug wurden weiter neoplastische Läsionen charakterisiert. In Aussicht standen eine rasche und

akkurate Identifikation von Tumorsubtypen und eine Darstellung der Tumorränder. So kam es als zusätzliches Hilfsmittel zur chirurgischen Standardtherapie in Betracht, wie z.B. bei Tumoroperationen zur Kontrolle der *in sano* Schnittränder auf Tumorfreiheit nach Resektion [42].

Basalzellkarzinome, welche die häufigsten Hauttumore der Menschheit darstellen, wurden durch die konfokale Mikroskopie neu *in vivo* erkundet [43, 44]. Unterschiede zur gesunden Haut wurden festgehalten und Erkennungsmerkmale herausgearbeitet. In einer erst kürzlich veröffentlichten großen Multi-Center-Studie zeigte sich die hohe Sensitivität und Spezifität der konfokalen *in vivo* Technik bei der Feststellung und Differenzierung von Basalzellkarzinom [45].

Doch nicht nur zur Diagnostik, sondern auch zur Überwachung beim konservativen Behandlungsvorgehen wurde die kLSM nun mehrfach eingesetzt. Neuartige Therapieschemen mit topisch aufgetragenen, immunmodulatorischen Substanzen konnten jetzt ohne Biopsie verfolgt und bewertet werden [46]. Neben der Untersuchung anderer neoplastischer Veränderungen der Haut, wie der Aktinischen Keratose [47], wurde der Schwerpunkt vieler Studien auf das Forschungsthema Pigmentläsionen gelegt. Das typische Erscheinungsbild eines melanozytären Nävus wurde studiert [42, 48, 49], um es von einem dysplastischen Nävus und sogar von einem malignen Melanom abgrenzen zu können. Es wurden feste zellmorphologische Kriterien zur Unterscheidung von benignen und malignen Pigmentläsionen gesucht. Obwohl die Erkennung und Unterscheidung zwischen gutartigen Nävi und atypischen, malignen Pigmentläsionen mit diesem optischen Verfahren einfach erscheint, benötigen die bisher festgelegten Kriterien gegenwärtig noch weitere Konsolidierung. Sie müssen in großen verblindeten Studien validiert werden, um eine starke Aussagekraft zu erhalten. Vorteile, als unterstützendes Verfahren gegenüber den routinemäßigen Gefrierschnitten bei der operativen Entfernung von malignen Melanomen, wurden diskutiert. Die Genauigkeit der Bildgebung der kLSM wurde im Vergleich zu histologischen Bildern klar und deutlich gezeigt. [50, 51, 52].

Immer mehr Forschungsgruppen sprangen mit der Zeit auf den erfolgreichen Zug der nicht-invasiven, optischen Darstellungstechnik auf. Eiligst entstanden viele nützliche aber auch belanglose Publikationen. [53, 54, 55].

### 1.2.3 Nachteile der reflektierenden konfokalen Mikroskopie

Bisher wurde mit sehr viel Lob über das schonende *in vivo* Verfahren der konfokalen Mikroskopie berichtet. Doch es müssen auch die Einschränkungen, welche es birgt, aufgezeigt werden. So ist abhängig von der Wellenlänge und Stärke des Lasers die maximale Eindringtiefe in das Gewebe sehr beschränkt. In der Regel können von der menschlichen Haut nur die Oberfläche, die Epidermis und der obere Teil der Dermis betrachtet werden. Geräte mit einer Wellenlänge im infraroten Bereich gelangen ungefähr 250-300 µm in die Haut [38]. Pathologien, welche in der Tiefe liegen oder sich in diese erstrecken, können deswegen nur teilweise und unvollständig dargestellt werden.

Ein weiteres Problem der konfokalen Mikroskopie ohne Farbstoff ist das limitierte Potential, zusätzliche Informationen aus den Bildern des zu untersuchenden Gewebes zu gewinnen. Alle bisher angeführten Publikationen beruhen auf dem so genannten Verfahren der reflektierenden Methode. Dabei werden die Reflexionseigenschaften des Gewebes zur Visualisierung ausgenutzt. Ein punktuell Laserlicht wird ausgesandt, um von den verschiedenen natürlich vorkommenden Gewebekomponenten verschieden reflektiert zu werden. Zurückgestreutes Licht wird durch einen Scanner aufgefangen und erzeugt einen Bildkontrast. Diese Technik erlaubt eine Darstellung der nativen Gewebemorphologie, gewährt aber keinen Zugang, verschiedene Strukturen durch den Einsatz multipler Färbungen und unterschiedlicher Präparationsprotokolle, wie sie in der konventionellen Histologie eingesetzt werden, hervorzuheben [10].

Unlängst wurden Studien zur Bewältigung dieser Limitation ohne relevanten Erfolg durchgeführt [30, 51, 56]. Kontrast- und Färbemittel für den *in vivo* Einsatz der Reflektionsdarstellung der kLSM sind rar, besonders durch die Toxizität vieler Färbungen ist ihr Einsatz beschränkt. Andere Wege zum Einsatz von Farbstoffen mussten gefunden werden.

### 1.2.4 Die Fluoreszenzmethode der kLSM

Die Methode der fluoreszierenden Mikroskopie versucht durch die Verwendung exogener Farbstoffe diese Einschränkung auszugleichen. Vor der Untersuchung mit der konfokalen Lasertechnik wird dabei ein organismusverträglicher Fluoreszenzfarbstoff auf das Zielgewebe aufgebracht. Das verwendete Laserlicht regt bei einer spezifischen Wellenlänge diesen Farbstoff an, ein Fluoreszenzlicht wird emittiert. Das Emissionssignal wird aufgefangen und produziert in der Bildgestaltung einen Kontrast. Folglich benötigt das zu untersuchende Gewebe im Gegensatz

zur reflektierenden Methode eine minimale Vorbereitung. Gezeigt wird nicht die Histostruktur direkt, sondern indirekt durch die Farbstoffverteilung. Dabei wird das Bild nicht nur von der Zellmorphologie beeinflusst, sondern auch von den Eigenschaften des Fluoreszenzmittels. Lokale physiologische Faktoren, wie Farbstoff-Clearance, pH-Wert, Löslichkeit, zelluläre Diffusion und die chemische Zusammensetzungen des Umgebungsmilieus, zeigen einen Einfluss auf das Verteilungsmuster der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe [57, 58].

Interessanterweise machen diese Faktoren aus der starren optischen Methode gar eine funktionelle, an welcher die Interaktionen der sich beeinflussenden Faktoren studiert und schließlich miteinander bewertet werden können. Dieser dynamische Prozess verspricht, funktionale Aspekte der lebenden Haut durch die angemessene Wahl eines entsprechenden Kontrastmittels und Färbeprotokolls darstellen zu können. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe stehen gegenwärtig für die konfokale Mikroskopie zur Verfügung, wobei Fluorescein und Curcumin am häufigsten verwendet werden [59, 60].

Doch obwohl diese neue Methode viele neue Anwendungsmöglichkeiten offenbarte, wurden in der Dermatologie bisher nur wenige *in vivo* Studien am lebenden Probanden durchgeführt. Lediglich Swindle et al. [10, 60] und Thorn Leeson et al. [61] präsentierten im Jahre 2002 und 2003, dass eine *in vivo* Darstellung der Epidermis auf zellulärer Ebene machbar ist. Durch eine intradermale Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes umging die Forschergruppe um Swindle die Barriereigenschaften des Stratum corneum. Sie konnten durch diesen Kniff die Keratinozyten der verschiedenen Epidermisschichten der gesunden menschlichen Haut anfärben. Ihre Methode spiegelt aber nur ein mögliches Färbeprotokoll in der kLSM wieder. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind zu dieser Thematik nur wenige Publikationen erschienen.

*Ex vivo* und *in vitro* Vorversuche preisen das große Potential der Kombination aus Fluoreszenzfarbstoff und konfokaler Laser-Mikroskopie. Sie gaben die Marschrichtung für nachfolgende Arbeiten vor. Veiro und Cummins markierten so in Vorversuchen mit verschiedenen Kontrastmitteln spezielle subzelluläre Strukturen [62]. Es war ihnen möglich, vornehmlich die Zellkerne oder das Lipid in den Zellzwischenräumen durch unterschiedliche Färbungen hervorzurufen. Leider offenbarten sich diese Farbstoffe als keine Kandidaten für zukünftige *in vivo* Studien. In den kommenden Jahren demonstrierten weitere Arbeiten am Tiermodell die Anwendung *in vivo*. Besonders hervorzuheben ist dabei die zukunftssträchtige Arbeit von Anikijenko et al. im Jahre 2001. Am Mäusemodell färbte er neoplastische Zellen eines menschlichen Melanoms mit spezifischen Fluoreszenzantikörpern an [63]. Ein viel

versprechender Ansatz für die diagnostische Zukunft dieser Apparatur.

Neben dem morphologischen Einsatz und der diagnostischen Fragestellung offenbarte die Fluoreszenzmethode neue Perspektiven in der kosmetischen und pharmakologischen Forschung. So konnten Penetrations- und Distributionseigenschaften verschiedener topisch aufgetragener Substanzen *ex vivo* und *in vivo* auf der menschlichen Haut getestet werden [64, 65, 66, 67, 68]. Der Review-Artikel von R. Alvarez-Román et al. gibt einen guten Überblick über die stattgefundenen Penetrationsstudien, bei denen die konfokale lasermikroskopische Technik zum Einsatz kam [69]. Die Handhabung von Fluoreszenzfarbstoffen in der konfokalen Mikroskopie ergab auf diese Weise neue Aufschlüsse über die menschliche und tierische Hautphysiologie.

Obwohl die Haut wegen der leichten Zugänglichkeit sehr geeignet für diese Methode ist, feierte sie nicht in der Dermatologie sondern in der Ophthalmologie und Gastroenterologie die ersten diagnostischen *in vivo* Erfolge am Menschen. Nach Vorversuchen an Ratten mit entzündlichen Darmerkrankungen [70, 71] wurden kolorektale Neoplasien erfolgreich mit einem endoskopisch modifizierten LSM beim lebenden Menschen in Bescheinigung genommen [72]. Die Kontrastmittel wurden i.v. verabreicht und fluteten im erkrankten Darmgewebe an. Im Bereich der diagnostischen Dermatologie besteht bis heute ein starker Rückstand an Untersuchungen von Hautläsionen und –erkrankungen mit der Fluoreszenzmethode der kLSM.

#### 1.2.5 Stand der Technik

Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Skizze des Gerätes mit einer optischen Linse, so wie es in der Klinik in Gebrauch ist. Dabei wird ein Laserlicht über optische Leiter zu einer bikonvexen Linse zugeführt. Durch diese wird der Strahl fokussiert und punktuell auf das zu untersuchende Gewebe projiziert. Das von der Fokusebene stammende Licht wird von dem Instrument detektiert und zur Bildverarbeitung verwendet. Das optische System ist dabei so konstruiert, dass durch eine Lochblende vorwiegend das direkte Licht aus der Fokusebene erfasst, aber das streuende sowie außerhalb der Fokusebene liegende Licht durch Abschirmung vom Detektor ausgeschlossen wird. Dadurch ergibt sich eine optische Schnittdarstellung der ausgeleuchteten Ebene mit einer minimalisierten Bildunschärfe [16]. Zusätzlich kann, durch Tiefenänderung und Positionierung des Laserfokus unter die Oberfläche, ein Blick auf die verschiedenen Schichten der Haut geworfen werden. Dabei liefert die konfokale Mikroskopie Echtzeitbilder in einer hohen Detailauflösung. Die Ansicht ist im Gegensatz zur konventionellen Histologie nicht

gewohnt vertikal, sondern horizontal zur Gewebsoberfläche (*en face*) [10, 31, 32]. Bei der fluoreszierenden Methode wird ein exogener Farbstoff als Kontrastmittel eingebracht [10]. Ein Laserlicht mit einer angemessenen Wellenlänge wird verwendet, um diesen Farbstoff anzuregen. Simultan kann das emittierte, aus der Fokusebene stammende Fluoreszenzsignal erfasst und zur Bilddarstellung verwendet werden. Dargestellt wird somit die Verteilung des exogenen Farbstoffes.

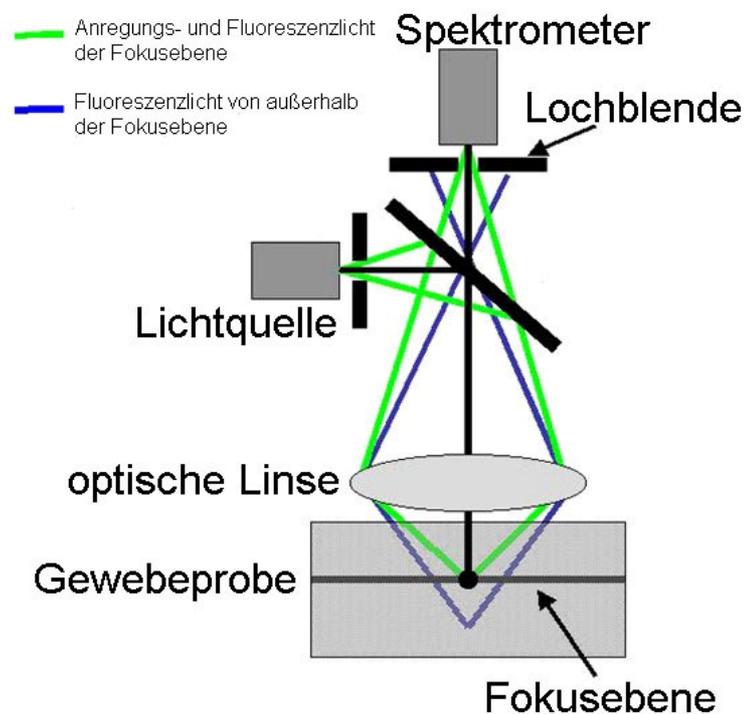


Abb. 1.2: Prinzip der Fluoreszenzmethode der kLSM.

### 1.3 Aufbau der Haut

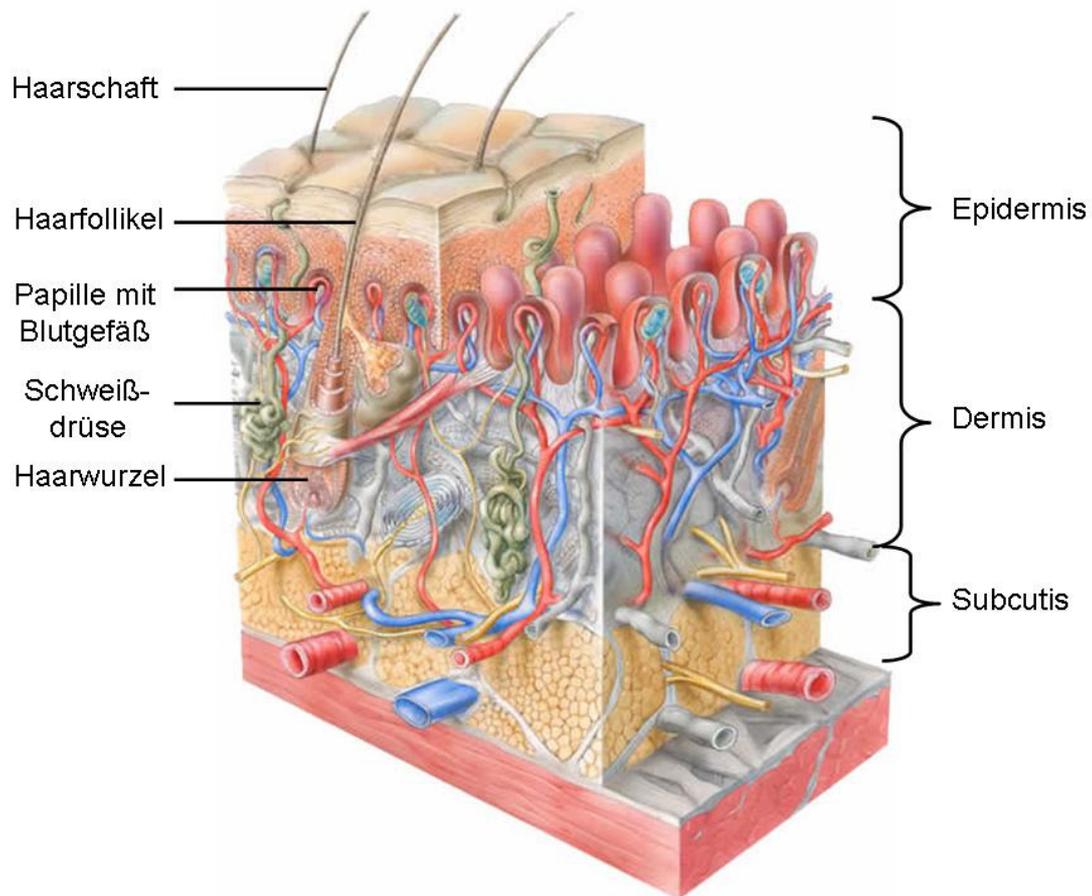


Abb. 1.3: Querschnitt der Haut [Skin Care Forum Ausgabe 27, [www.scf-online.com](http://www.scf-online.com), Cognis Deutschland GmbH & Co. KG].

Um die konfokalen Abbildungen der Haut zu verstehen und interpretieren zu können, muss man mit der Hautmorphologie und –physiologie vertraut sein. An dieser Stelle folgt nun eine Erläuterung über den architektonischen Aufbau der menschlichen Haut. Ein Hauptaugenmerk fällt hierbei auf die Strukturen der Epidermis und Dermis; jene Schichten, welche mit der kLSM optisch einsehbar und somit evaluierbar sind.

Die Haut gliedert sich wie in der obigen Abbildung 1.3 dargestellt in drei Teile [2]:

1. die **Kutis**, die Haut im engeren Sinne,
2. die **Tela subcutanea**, auch Subkutis oder Unterhaut,
3. und die **Hautanhangsgebilde**, zu denen Haare, Nägel und Drüsen gehören.

Die Kutis besteht dabei aus mehreren gut voneinander abgesetzten Schichten, nämlich aus:

1. **Epidermis**, auch Oberhaut, ektodermale Herkunft, ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel,
2. und der **Dermis**, auch Lederhaut, oder Corium, mesodermale Herkunft, ein straffes, faserreiches Bindegewebe.

### 1.3.1 Die Epidermis

Die Epidermis besteht aus mehrschichtigem, verhorntem Plattenepithel, welches je nach Lokalisation zwischen 30 µm und 300 µm dick ist. Die Epidermis kann in drei Zonen gegliedert werden, von basal nach apikal: in die Keimschicht, verhornende Schicht und Hornschicht. An der oberflächlichen Hornschicht gehen ständig Zellen durch Abrieb verloren. Sie werden durch Hautzellen aus der Tiefe ersetzt (Abb. 1.4) [1]. Dabei unterlaufen die Zellen von der Keimschicht zur Oberfläche eine Umwandlung, die epithelialen Zellen der Epidermis werden im Laufe der Zeit zunehmend keratinisiert. Sie werden deshalb auch als Keratinozyten bezeichnet [1, 3]. Sie machen den Großteil der in der Epidermis vorkommenden Zellen aus.

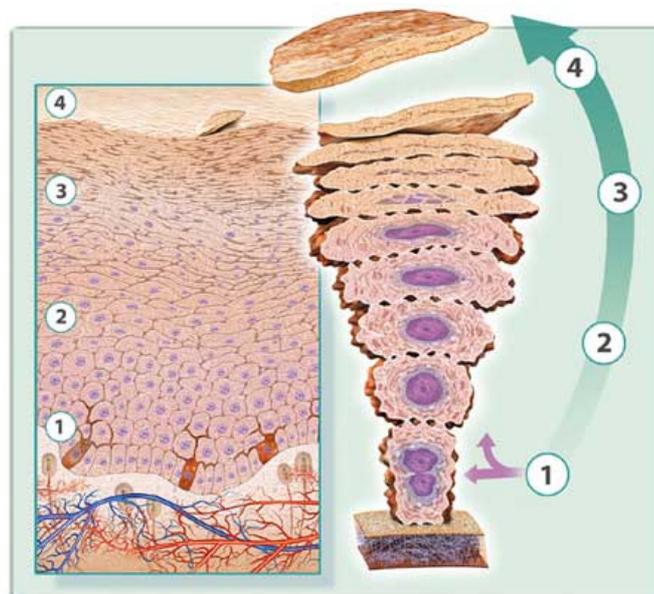


Abb. 1.4: Querschnitt der Epidermis mit Schichten und Zyklus: 1) Stratum basale, 2) Stratum spinosum, 3) Stratum granulosum und 4) Stratum corneum [Skin Care Forum Ausgabe 35, [www.scf-online.com](http://www.scf-online.com), Cognis Deutschland GmbH & Co. KG].

Ansonsten findet man neben den Keratinozyten auch Merkelzellen (Tastzellen), Melanozyten (Pigmentzellen), Langerhanszellen (Makrophagozyten) und Lymphozyten. Da sich die Keratinozyten in einer Höhenschicht im gleichen Stadium der Umgestaltung befinden, lassen sich in der Epidermis histologisch fünf differente Zellschichten voneinander unterscheiden. Sie werden von basal nach apikal gegliedert:

#### *1.3.1.1 Stratum basale*

Die Basalzellschicht gehört zur germinativen Schicht der Epidermis. Sie besteht aus einer Reihe kubischer bis hochprismatischer Zellen mit zahlreichen Zellteilungen. Dazwischen eingelagert sind die pigmentbildenden Melanozyten, Merkelzellen und Zellen des Immunsystems. Basal ruhen die Zellen auf der Basalmembran, welche die Epidermis und Dermis fest miteinander verbindet. Die Befestigung der Epithelzellen auf dieser dreischichtigen Membran erfolgt durch Hemidesmosomen und Zelladhäsionsmoleküle, welche ihrerseits über Mikrofibrillen (Fibrillin) und Verankerungsfibrillen (Typ VII Kollagen) mit der darunter liegenden Dermis verbunden ist. Lateral und apikal weisen die Basalzellen zahlreiche Desmosomen und Verknüpfungen mit den Nachbarkeratinozyten auf. Die Grenzzone zwischen Dermis und Epidermis wird auch Junktionszone genannt [2].

#### *1.3.1.2 Stratum spinosum*

Die Stachelzellschicht ist nach dem stacheligen Aussehen ihrer Zellen benannt. Es kommt zu einer räumlichen-strukturellen Umordnung der Keratinozyten, die Zellen flachen ab und werden polygonal. Kennzeichnend sind viele Zytoplasmaausläufer. An deren Spitzen tragen sie zahlreiche, stachelartige Zellbrücken, die Desmosomen. Diese verknüpfen die Nachbarzellen entsprechend miteinander. Verstärkt wird dieses Aussehen dadurch, dass die Interzellulärräume zwischen den Stachelzellen leicht erweitert werden können. Bündel intermediärer Filamente, so genannte Tonofibrillen, ziehen in die Fortsätze der Keratinozyten und stabilisieren dieses System. Dadurch verhelfen sie der Haut Scherwirkungen entgegenzuwirken [2].

#### *1.3.1.3 Stratum granulosum*

Die Zellen der Körnerzellschicht sind stark abgeflacht und bilden in der Regel nur 1-5 Zelllagen. Als Zeichen der beginnenden Verhornung sind lichtmikroskopisch zahlreiche basophile Körnchen, die Keratinhyalgranula in den Zellen auszumachen. Weiter kennzeichnend sind stark verdichtete Tonofibrillen und membranumschlossene Granula. Letztere zeigen einen

lamellären Feinbau und enthalten Acyleramide, Glucoceramide, Phospholipide, freie Fettsäuren, Cholesterin, und sind reich an katabolischen Enzymen wie Sphingomyelinase und Phospholipase A<sub>2</sub> beladen. Sie geben ihren Inhalt in den Interzellularraum ab, der wesentlich zur Abdichtung parazellulärer Transportwege beiträgt [73].

#### *1.3.1.4 Stratum lucidum*

Das Stratum lucidum ist eine helle, flüchtige und homogene Zone zwischen Körner- und Hornschicht. Sie ist nur in dicker Epidermis zu finden. In ihr werden die Zellkerne pyknotisch und verschwinden dann vollständig. Die Zellorganellen werden lysosomal abgebaut und das Zytoplasma besteht hauptsächlich aus dicht gepackten Filamenten. Nach Abschluss der Syntheseleistung wandeln sich die Keratinozyten in die toten Hornschuppen des Stratum corneum um [2].

#### *1.3.1.5 Stratum corneum*

Je nach Körperregion schwanken die Dicke der Hornschicht und die Anzahl ihrer Zelllagen extrem. Ist das Stratum corneum der Bauchhaut ungefähr 10 µm und 15-20 Zelllagen stark, so kann es an der Fußsohle über 100 µm dick sein und mehrere Hundert Schichten erfassen [1, 73]. Die Zellen des Stratum corneum (Korneozyten) sind polygonal geformte, abgeflachte, kernlose Zellen ohne zytoplasmatische Organellen. Sie sind über die gesamte Breite der Hornschicht inhomogen angelegt. Es findet eine vollständige Verhornungsumwandlung (Keratinisierung) statt, wobei die Zellorganellen während dieses Prozesses kontinuierlich lysiert werden. Insgesamt wird der Inhalt der Hornzellen umso homogener, je mehr sie sich der Oberfläche nähern. Chemisch sind die Hornzellen terminal aus helikalen Zytokeratin-Polypeptiden aufgebaut. Eine Aufhebung der üblichen Dreierschichtung der Zellmembran wird beobachtet. An die Innenseite legt sich eine Hülle an, welche aus der Vernetzung des Proteins Involucerin hervorgeht. Es ist der chemisch widerstandsfähigste Teil und wird als „Cornified envelope“ bezeichnet [73]. Die Zellen des Stratum corneum sind in eine Lipid-Doppelschicht eingebettet, die sich aus Ceramid, Cholesterol, freien Fettsäuren und Cholesterolestern zusammensetzt. [74, 75, 76, 77]. Diese Lipidschicht stellt eine gute Barriere gegen das Eindringen von wasserlöslichen Substanzen dar [1, 77, 78]. Voraussetzung für die Funktionstüchtigkeit ist die regelmäßige Erneuerung dieser äußersten Hautschicht. Der Prozess umfasst eine Abschilferung der obersten 2-3 Zelllagen, während von unten her Keratinozyten zu Hornzellen transformiert werden. Man spricht auch von der terminalen epidermalen Differenzierung.

### 1.3.2 Die Dermis

Die Dermis gliedert sich in zwei Schichten, dem Stratum papillare und dem Stratum reticulare. Beide Schichten bestehen aus Bindegewebe, unterscheiden sich aber an Dichte und Anordnung. Wasserbindende Glykosaminoglykane sind in die Dermis eingelagert. Die Dermis stabilisiert aufgrund ihrer großen Zerreißfestigkeit die Haut, spielt aber gleichzeitig eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Hauttugors und der immunologischen Abwehr. Sie wirkt außerdem bei der Kreislauf- und Thermoregulation mit. Als Sinnesorgan beherbergt die Lederhaut zahlreiche Nerven und nervöse Rezeptoren. Die Dicke variiert topografisch stark, maximal beträgt sie 3mm an den beanspruchten Fußsohlen [1, 2].

#### 1.3.2.1 *Stratum papillare*

Das Stratum papillare liegt unmittelbar unter der Epidermis. Der Name dieser Schicht geht auf das Vorkommen von Bindegewebszapfen, den Papillen zurück, die in die Epidermis ragen. Dadurch vergrößert sich die Kontaktfläche zwischen Dermis und Epidermis und ermöglicht eine verbesserte Ernährung. Die Papillarschicht zeigt eine große Anzahl von Zellen der Immunabwehr, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen auf. Ferner kommen viele Nervenendkrperchen, Nerven und Blutkapillaren in ihr vor. Die dermoepidermale Verbindung erfolgt über die Basalmembran einerseits von der Epidermis (siehe oben), andererseits inserieren von unten her senkrecht aufsteigende Kollagenfasern vom Typ III (Ankerfasern). Die Verzapfung zwischen Dermis und Epidermis wechselt regional stark, wodurch an der Hautoberfläche typische Erscheinungsmuster von Einsenkungen und Auswerfungen zu beobachten sind. Unterschieden werden allgemein die Felder- und Leistenhaut: Die Felderhaut besteht aus polygonalen Inseln, die von schmalen Furchen begrenzt sind. Sie nimmt den größten Teil der Körperfläche ein. Schweiß- und Duftdrsen münden auf Höhe der Felder ein, Haare und Talkdrsen treten in den Furchen hervor. Die Leistenhaut kommt an der Innenseite der Finger und Zehen sowie an Handflächen und Fußsohlen vor. Jeweils zwei Reihen hoher Bindegewebspapillen ragen in die Epidermisleiste hinein. Auf jeder zweiten Auswerfung münden Schweißdrüsen. Haare, Talk- und Duftdrsen fehlen völlig. Die Leisten bilden genetisch festgelegte Schleifen-, Bögen- und/oder Wirbelmuster, welche als Dermatoglyphen bezeichnet werden [2].

### 1.3.2.2 *Stratum reticulare*

Der Übergang zum Stratum reticulare ist fließend, feste Grenzen sind nicht auszumachen. Kollagenfaserbündel vom Typ I überschneiden sich in bestimmten Winkeln. Diese Anordnung erlaubt eine gewisse Dehnung der Haut, ohne die Zerreißfestigkeit zu mindern. Elastische Fasern sorgen für eine geschmeidige Rückstellung. Das Stratum reticulare besitzt zahlreiche Nerven, Blut- und Lymphgefäße. Kleine Arterien kommen aus dem subkutanen Venen- und Aterienplexus, welcher sich zwischen Tela subcutis und Dermis bildet, in die Dermis. Sie formen zwischen Stratum reticulare und Stratum papillare einen subpapillären Plexus, von dem Arteriolen und Kapillarschlingen in die Papillen einziehen. Papilläre Venolen im gegenläufigen Verlauf münden in ihnen. Bei den Nerven der Haut handelt es sich um einerseits afferent und andererseits efferente Nervenfasern. Die Afferenten stehen mit zahlreichen Nervenendkrperchen, Haarfollikeln und den epidermal gelegenen Merkelzellen in Verbindung. Die Efferenten innervieren Hautanhangsorgane, wie Drüsen und Mm. arrectores pilorum, sowie die Blutgefäße [2].

### 1.3.3 Die Subkutis

Die Tela subcutanea verbindet die Haut mit den darunter gelegenen Strukturen. Sie besteht aus lockeren Bindegewebe und Fettgewebe, welches durch Bindegewebszüge steppkissenartig unterteilt wird. Bei dem Fettgewebe handelt es sich teils um Baufett, teils um Depotfett. Funktionell wirkt die Fettschicht als Druckpolster und Wärmeisolator. Die Ansammlung unterliegt einem hormonellen Einfluss und zeigt extreme regionale und geschlechtsspezifische Schwankungen. Schließlich besitzt die Subkutis stellenweise glatte Muskelzellen, Drüsen und Haarwurzeln sowie Vater-Pacini-Körperchen. Nerven und Gefäße verlaufen durch die Tela subcutanea zur Haut [2].

### 1.3.4 Hautanhangsgebilde

Zum Epidermalorgankomplex gehören die Hautanhangsgebilde. Sie umfassen die Haare, die Talkdrsen, die Nägel, die ekkrinen Schweißdrüsen und apokrinen Duftdrsen, einschließlich ihrer Ausführungsgänge. In der konfokalen Darstellungsmethode lassen sich die verschiedenen Gebilde mit unterschiedlicher Aussagekraft (durch die begrenzte Eindringtiefe häufig nur

teilweise) sichtbar machen. In unseren Studien haben wir u.a. Haare, Nägel als auch Schweißdrüsen inspiziert. Auf deren Anatomie wird im Folgenden genauer eingegangen:

#### *1.3.4.1 Das Haar*

Haare gehen aus der Epidermis hervor. Sie sind dünne keratinsierte Strukturen, welche in so genannten Haartrichtern, Einstülpungen der Haut, lagern. Ihre Verteilung ist regional und individuell sehr unterschiedlich. Abhängig von vielen Einflüssen, wie Geschlecht, Rasse, Alter, zeigen Haare starke Variationen und Fluktuationen in Länge, Durchmesser, Wachstum und Farbe. In der Fetalzeit bilden sich anfangs kurze, dünne nicht-pigmentierte Flaum- oder Lanugohaare, welche im Laufe der Zeit durch das so genannte Terminalhaar ersetzt werden.

Allgemein gliedern sich Haare anatomisch in Haarwurzel und Haarschaft. Die Haarwurzel liegen unter der Oberfläche der Haut, der Haarschaft umschreibt den Teil des Haares, welcher über die Epidermis herauslugt. Das Haar selbst ordnet sich in Mark (Medulla), Rinde (Kortex) und Cuticula.

Den unteren Teil der Haarwurzel bilden die Haarzwiebeln (Bulbus pili), in die jeweils eine Papille der Dermis eingestülpt ist. An dieser Stelle sorgen zahlreiche Kapillaren für die lebensnotwendige Blutzufuhr und Ernährung des Haares. Die Papillen sind von Epithelzellen umgeben, die sich je nach Lage zu Mark, Rinde oder Cuticula differenzieren. Die zentral gelegenen Zellen, groß, vakuolisiert und mäßig keratinisiert, bilden das Mark. Seitlich davon differenzieren sich Epithelzellen zu stark keratinisierten, dicht liegenden Zellen. Sie fassen Melanozyten zwischen sich, welche ihr Pigment an diese wiederum abgeben und so die Haarfarbe bestimmen. Weiter nach oben geschoben, verlieren diese Zellen ihre Struktur und bilden die Rinde des Haares. Weiter peripher liegen Bulbuszellen, die die Cuticula des Haares bilden. Diese eine Zellschicht flacht nach außen hin immer mehr ab, bis aus den kubischen Zellen dachziegelartig gewordene Hornschuppen werden. Diese drei Schichten bilden das eigentliche Haar. In der Haarzwiebel sind sie von weiteren Epithelzellen umgeben, die sich zur inneren und äußeren Wurzelscheide entwickeln. Die Innere umfasst unmittelbar den Haarschaft und besteht aus mehreren Schichten, von denen die dem Haar anliegende Schicht Cuticula vaginalis bezeichnet wird. Sie endet dort, wo der Haartrichter beginnt und die dazugehörige Talgdrüse mündet (siehe unten). Die äußere Wurzelscheide besteht aus nach unten gewachsenen Epidermiszellen. Nahe der Hautoberfläche verfügt sie über die typische Schichteinteilung der Epidermis, nahe der Haarpapille besteht sie nur aus Zellen, die dem Stratum basale entsprechen.

Der epitheliale Anteil der Haarwurzel ist vom dermalen durch eine kräftige Basalmembran getrennt (Glashaut). Diese zusammen mit Bulbus und Haarpapille wird als die Einheit Haarfollikel bezeichnet. Anhangsorgane des Haares sind der Haaraufrichtermuskel (*M. arrector pili*) sowie Haarbalgdrüse (Talgdrüse). Auf deren anatomischen Aufbau, wie Innervation des Haares, Haarwachstum und -wechsel, wird in diesem Text nicht genauer eingegangen.

Aufgaben der Haare sind neben Wärmeisolierung, Wärmeabgabe, Reibungsminderung und Signalwirkung, eine Verstärkung des Berührungsempfindens.

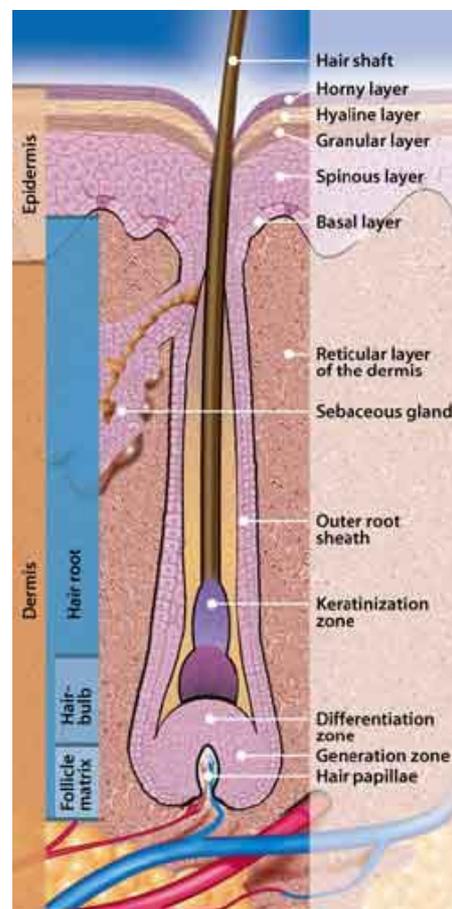


Abb. 1.5: Querschnitt eines Haares [Skin Care Forum Ausgabe 35, [www.scf-online.com](http://www.scf-online.com), Cognis Deutschland GmbH & Co. KG].

### 1.3.4.2 Der Nagel

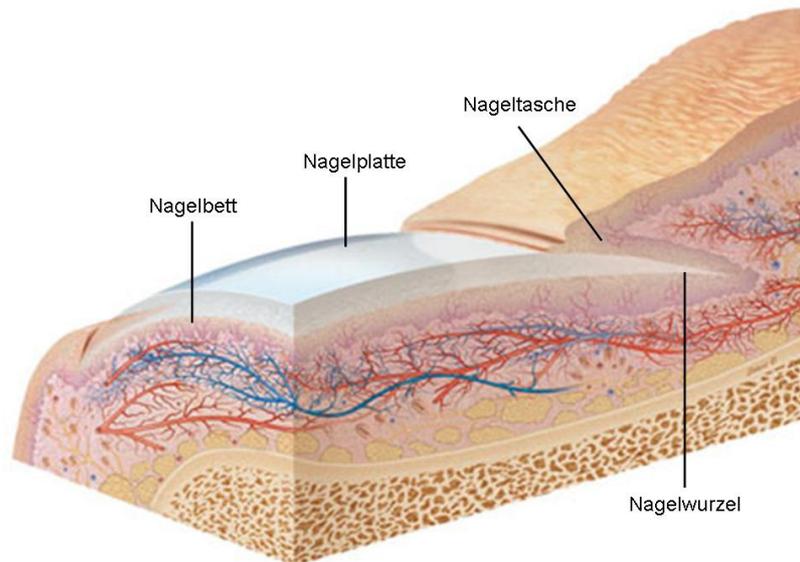


Abb. 1.6: Aufbau eines Nagels [Skin Care Forum Ausgabe 28, [www.scf-online.com](http://www.scf-online.com), Cognis Deutschland GmbH & Co. KG].

Nägel sind Hornplatten aus einer kompakten Schicht aneinander haftender Hornschuppen. Sie befinden sich an der dorsalen Oberfläche von Finger und Zehen. Gegliedert ist der Nagel in Körper und Wurzel. Der Nagelkörper ist der freiliegende Teil der Nagelplatte. Der hintere Teil der Nagelplatte wird von der Nageltasche aufgenommen und als Nagelwurzel bezeichnet. Als Nagelbett (Lectulus) wird das epitheliale Gewebe unter der Wurzel bezeichnet. Sie umfasst das weißliche Feld am Hinterrand des sichtbaren Nagels (Lunula).

### 1.3.4.3 Die Schweißdrüse

Die Haut beherbergt verschiedene Drüsen. In unseren Untersuchungen sind wir lediglich auf die Schweißdrüse eingegangen. Sie kommen bis auf dem Lippenrot und der Glans penis überall in der Haut, besonders an Handteller und Fußsohle, vor. Schweißdrüsen sind unverzweigte gewundene tubuläre Drüsen. Die Endstücke liegen zwischen Kutis und Subkutis und haben einen Durchmesser von ca. 0,4 mm. Umgeben ist die Drüse von einer starken Basalmembran. Zahlreiche Myoepithelzellen tragen zur Abgabe des Schweißsekretes der merokrinen

Drüsenzellen bei. Der Ausführungsgang der Schweißdrüse verläuft bis zur Epidermis gestreckt und besteht aus zweischichtigem, kubischem Epithel. Der intraepidermale Teil, welcher auch durch die konfokale Mikroskopie *in vivo* betrachtet werden kann, verläuft geschlängelt. In diesem Bereich existiert keine Epithelauskleidung. Die Sekretausleitung erfolgt über Interzellulärspalten zwischen den Keratinozyten. Die Ausmündungen liegen auf Kuppen von Leisten und Feldern der Haut. Das Schweißsekret ist dünnflüssig und sauer, enthält wenig Protein und ist immer hypoton. Bestandteile sind Wasser, Natriumchlorid, Harnstoff, Ammoniak und Harnsäure, es kann aber auch noch weitere Kataboliten enthalten. Schweißdrüsen besitzen eine exkretorische Funktion. Weitere Aufgaben sind neben der Ausbildung eines Säuremantels die Abkühlung der Oberfläche und des Organismus.



Abb. 1.7: Abbildung einer Schweißdrüse mit Ausführungsgang [Skin Care Forum Ausgabe 28, [www.scf-online.com](http://www.scf-online.com), Cognis Deutschland GmbH & Co. KG].

## 1.4 Funktion der Haut

Die verschiedenen Schichten der Haut erfüllen unterschiedliche Aufgaben [1, 2, 5, 79]. Betrachtet man die Haut als funktionelle Einheit, lassen sich im Wesentlichen vier physiologische Aufgabenbereiche trennen:

- 1. Schutzfunktion:** Die Haut schützt den Organismus vor unkontrollierten Wärme- und Wasserverlusten, bietet mechanischen Schutz, verhindert das Eindringen von Krankheitserregern und schädigenden Stoffen und schirmt Strahlung zu einem gewissen Grad ab. Eine wichtige Rolle bei diesen ganzen Abwehrprozessen spielt die Epidermis mit ihrem Oberflächenfilm. Dieser setzt sich aus Talk- und Schweißdrüsensekret zusammen und bildet eine fettige Schicht im sauren pH-Bereich (pH 4-6). Er formt eine Barriere gegen wässrige Lösungen und Bakterien. Auch das Stratum corneum bewirkt einen guten Schutz gegen Substanztransport. Die Hornzellen sind weder zu aktiven noch zu passiven Transport fähig, der Interzellularraum ist durch zementartige Substanzen ausgekleistert. So werden die trans- und parazellulären Beförderungswege stark blockiert. Transportprozesse sind dabei nicht nur von der Oberfläche her, sondern auch zur Oberfläche hin eingeschränkt. Ein extremer Wasserverlust wird auf diese Weise unterbunden. Die tieferen epidermalen Schichten, insbesondere das Stratum spinosum und basale, schützen den Organismus gegen Strahlen. Die Melanozyten produzierenden Melanin für die umliegenden Keratinozyten, ein hervorragendes Strahlenschutzmittel. Bei chronischer UV-Bestrahlung kommt es zusätzlich zur Verdickung der Haut (Lichtschwienen), wodurch der Strahlenschutz intensiviert wird. Mechanischer Schutz wird durch die Zusammenwirkung aller Hautschichten gewährt. So kann in gewissen Grenzen Druck- und Zugspannungen entgegen gewirkt werden. Wirkt das Stratum corneum als Schild, so arbeiten in den darunter liegenden epidermalen Schichten die Tonofibrillen durch ihre trajektorielle Anordnung Spannungen entgegen. Die Dermis ermöglicht mit der scherengitterartigen Gliederung ihrer Kollagenfasern eine Verschiebung der Haut, das subkutane Fettgewebe puffert als elastisches Polster Drücke und Stöße ab.
- 2. Thermoregulation und Regulation des Wasserhaushaltes:** Beide Aufgaben sind miteinander eng verknüpft und werden vor allem durch die Hautdurchblutung reguliert. D.h. der Gefäßplexus der Haut, ihre Endäste sowie Anastomosen (Kurzschlüsse) tragen

einen wesentlichen Einfluss bei. Die Durchblutung kann durch örtliche und überörtliche Maßnahmen beeinflusst werden. Gefäßnerven und gefäßwirksame Substanzen spielen eine entscheidende Rolle. Generell verändert sich das Erscheinungsbild der Haut in Abhängigkeit ihrer Durchblutung über kalt und blass zu warm und rot. Die Thermoregulation steht im engen Kontakt mit der Hautdurchblutung. Bei Kältebelastung kommt es zur Kontraktion der Hautgefäße und zum Verschluss der Gefäßanastomosen, die Wärme wird im Körperinneren festgehalten. Bei einer Hitzebelastung des Kernes kommt es dagegen zu einer Dilatation und Eröffnung der arteriovenösen Kurzschlüsse der Hautgefäße. Durch die Mehrdurchblutung kann vermehrt Wärme nach Außen abgegeben werden. Ein weiterer wichtiger Vorgang für die Wärmeabgabe, aber auch für den Wasser- und Mineralhaushalt, ist die Wasserverdampfung auf der Hautoberfläche. Ständig wird an der Hautoberfläche Schweiß verdunstet (Perspiratio insensibilis). Bei Muskelarbeit in heißer Umgebung kann die Schweißsekretion von 50ml/h auf bis zu 1,6 l/h gesteigert werden. Dem Organismus wird Verdampfungswärme entzogen, die Oberflächentemperatur wird gesenkt: ein wichtiger Mechanismus zum Überleben in hohen Umgebungstemperaturen.

3. **Sinnesorgan:** Im Hautgewebe kommen zahlreiche Rezeptoren vor, welche unterschiedliche Sinnesqualitäten verarbeiten. So reagieren sie auf Berührung, thermische Reize, Kälte, Schmerz u.a.
4. **Immunologische Prozesse:** Die Haut grenzt den Organismus von der Umwelt ab. Deshalb ist eine große Anzahl von allen Zellpopulationen des Abwehrsystems vertreten. Dazu gehören Lymphozyten sowie Makrophagen, Histozyten und Mastzellen. Eindringende schädigende Stoffe, Bakterien und Viren werden durch dieses System abgewehrt. Die Haut reagiert aber auch auf viele auf dem Blutwege zugeführte Anreize – zahlreiche Erkrankungen spiegeln sich durch die Aktivierung des Abwehrsystems an der Hautoberfläche wieder, wie es zum Beispiel bei Allergien der Fall sein kann.

## 1.5 Weitere Methoden der *in vivo* Darstellung der Haut

Verschiedene Geräte kommen in der dermatologischen Klinik und Forschung zum *in vivo* Einsatz. Einige davon konnten sich über Jahre hinweg in weiten Bereichen etablieren, während sich andere bislang nur an wenigen universitären Forschungszentren durchzusetzen vermochten. Gemeinsam ist allen, dass sie für einen nicht-invasiven Gebrauch am lebenden Organismus konzipiert wurden. Sie unterscheiden sich im Ergebnis vor allem durch die maximale Messtiefe und die Auflösung. Nur ein kleiner Auszug von Verfahren wird hier an dieser Stelle angeführt. Eingegangen wird auf Messgeräte, welche in der Klinik zur Forschung als auch Diagnostik häufig zum Einsatz kommen bzw. ein zukunftssträchtiges Potential aufweisen. Dieser Überblick erlaubt einen späteren Vergleich mit der kLSM.

Allgemein wird zwischen den Methoden unterschieden, welche die Hautoberfläche abbilden oder auch einen Tiefenscan ermöglichen. Im Folgenden ausgenommen wird die reflektierende Methode der kLSM, da sie bereits an anderer Stelle erwähnt wurde [80, 81, 82].

### 1.5.1 Darstellung der Hautoberfläche: die Hautfotografie

Schon lange wird die Fotografie zur Dokumentation des Hautzustandes verwendet. Es ist ein relativ kostengünstiges und einfach durchzuführendes Verfahren. Mit Hilfe von entsprechenden Objektiven und Dank der neuartigen digitalen Verarbeitungstechnik ist es möglich, Bilder der Haut mit einer hohen Auflösung zu erzielen, mit entsprechenden Programmen nach zu bereiten und übersichtlich zu speichern. Serienaufnahmen von Läsionen über die Zeit erlauben Aussagen über ihre Veränderung. Eine frühzeitige Intervention ist möglich, überflüssige Hautbiopsien können vermieden werden. Unterschieden wird zwischen Tages-, Ultraviolett-, Fluoreszenz- und Polarisationslichtfotografie. Während die Bilder der Tageslichtfotografie den Vorteil besitzen, Aufnahmen der Haut festzuhalten wie das normale Auge sie sieht, liegt der Schwerpunkt der UV-Fotografie in der Darstellung von pigmentierten Hautveränderungen, da das UV-Licht verstärkt von dem Melanin absorbiert wird. Bei der Polarisationsfotografie werden die verschiedenen Lichtstreuungseigenschaften des Gewebes ausgenutzt. Verschiedene Polarisationsfilter werden verwendet, um die Hautoberfläche oder tiefere dermale Strukturen zu akzentuieren. Der Einsatz umfasst u.a. vaskuläre, entzündliche und Pigmentdefekte. Abhängig von der Linse wird eine Auflösung von 0,1 bis 0,5 mm und eine Eindringtiefe von ungefähr 0,1 mm erzielt.

## 1.5.2 Darstellung tiefer Hautstrukturen

### 1.5.2.1 Dermatoskopie

Das von der Hautoberfläche reflektierte Licht verhindert einen Blick in die Tiefe der Dermis. Durch die Verbindung einer Lichtquelle und einer Flüssigkeits-Glas-Schnittstelle mit der Haut kann die Reflexion am Stratum corneum herabgesetzt werden. Vermehrt dringt das Licht in die Haut ein und stellt in der Tiefe liegende Strukturen dar. Nach diesem Prinzip funktioniert die Dermatoskopie. Sie erlaubt eine direkte Darstellung der Epidermis und der papillären Dermis. Nach kurzer Einarbeitung ist es möglich, die Haut in einer bis zu 80fachen Vergrößerung und bis zu 2 mm Tiefe zu betrachten. Besonders Pigmentläsionen können so vom Dermatologen rasch untersucht und beurteilt werden. Die Vorhersagen besitzen je nach Erfahrung des Untersuchers eine hohe Sensitivität und Sensibilität. Seit wenigen Jahren sind Dermatoskope auch mit polarisierenden Filtern im Handel zu erwerben.

### 1.5.2.2 Spektrofotometrie

Spektrofotometrische Analyse der Haut beruht auf den verschiedenen Absorptionseigenschaften von Hautkomponenten auf einfallendes Licht. Diese so genannten Chromophore absorbieren, reflektieren oder emittieren Strahlung nach einem kurzen Intervall. Ein Spektrometer separiert diese zurückgeworfenen Strahlenmuster, ordnet jedem Chromophor eine individuelle Farbe zu und entwirft ein digitales Bild. Diese „Karte“ gibt also die Konzentration und die Lage eines Chromophores an. So ergeben sich Aussagen über die molekulare und chemische Zusammensetzung der Haut. Strukturelle Defekte können so hervorgehoben werden. Die axiale Auflösung beträgt je nach Verfahren um die 10-100  $\mu\text{m}$ .

In der Forschung kommen verschiedene Geräte zum Einsatz, die mit unterschiedlichen Wellenlängen und Detektionsbreiten arbeiten. Allgemein wird zwischen dem reflektierenden, fluoreszierenden Verfahren und der Raman Spektroskopie unterschieden. Verschiedene Chromophore können durch diese betont dargestellt werden, mit der Hoffnung benigne und maligne Prozesse unterschieden zu können [83, 84]. Die Tiefendarstellung in Abhängigkeit vom Modus ist 0,1-1 mm. Auch die kLSM beruht auf der spektroskopischen Grundlage. Erst durch die Umsetzung mit dem optischen Prinzip der konfokalen Mikroskopie konnte sich diese Methode im Klinikbereich verbreiten.

### *1.5.2.3 Hochauflösende Ultrasonographie (HUS)*

Seitdem 1979 die Ultrasonographie das erste Mal an der Haut für Dickemessungen verwendet wurde, stieg das Interesse an dieser Methode in der Dermatologie stark an. Der Vorteil besteht, neben der Schmerzlosigkeit, hohen Patiententoleranz und Sicherheit, in den niedrigen Kosten, welche diese Methode verursacht [85].

Die HUS funktioniert durch die verschiedene akustische Impedanz des Hautgewebes. Ultraschallwellen werden an Gewebegrenzen teilweise reflektiert. Das Echosignal wird in Abhängigkeit zur Amplitude und Zeit gesetzt, die Echogenität korreliert dabei mit verschiedenen histologischen Regionen in der Haut [86]. Darstellungen können im eindimensionalen A-Modus (zur Dickenmessung geeignet), zweidimensionalen B-Modus (vertikales Schnittbild), C-Modus (horizontales Schnittbild) oder dreidimensionalen Bildern wiedergegeben werden [87, 88]. Generell gilt beim Ultraschall: je höher die Frequenz, desto höher ist die Auflösung und desto niedriger ist die Eindringtiefe. In der Dermatologie haben sich Frequenzen im Bereich von 13,5 MHz bis 100 MHz je nach Fragestellung durchgesetzt. Die Auflösung liegt dabei bei ca. 60-120 µm, Tiefen bis 7mm werden erreicht. Viele Studien wurden mit der HUS durchgeführt, so u. a. Untersuchung von Hauttumoren [89] und bei der Analyse der Psoriasis [90].

### *1.5.2.4 Magnet Resonanz Darstellung (MRI)*

MRI ist ein Werkzeug zur Darstellung verschiedener Körpergewebe. Starke Magnetfelder und Pulse von Radiowellen werden genutzt, um Wasserstoffkerne anzuregen und deren Ablenkung zu messen. Dichteunterschiede von Wasserstoff und Variationen in der magnetischen Relaxationzeit (T1 und T2) sind verantwortlich für die Kontrastgebung zwischen unterschiedlichen Geweben [91].

Lange Zeit war die Auflösung der Geräte zu gering, um die Epidermis gesondert darzustellen. Erst nach der Einführung spezieller Zusatzkomponenten konnte eine hohe Auflösung unter 100 µm axial erfolgen. Heute sind Auflösungen zwischen 70-19 µm der Standard. Eine Unterteilung von Stratum corneum, Epidermis und Dermis war mit diesen Geräten möglich [92]. Die Eindringtiefe beträgt bis zu 7 mm. Gemessen werden die Wasserkonzentrationen in den epidermalen Schichten. Eine Trennung von „gesund“ zu „krank“ und zu Tumoren der Haut wurde untersucht [93, 94]. Es fehlt aber bisher an Erfahrung, diese Methode von der Forschung in der Klinik zu etablieren.

### 1.5.2.5 Optische Kohärenz Tomographie (OCT)

Die Optische Kohärenz Tomographie wurde anfangs für die Untersuchung des menschlichen Augengewebes benutzt [95]. Erst Jahre danach erfolgte eine Anpassung der Geräte an die menschliche Haut [96].

Bei der OCT wird eine Gewebeprobe durch ein Licht im Infrarotbereich gescannt. An den verschiedenen Komponenten wird es unterschiedlich gebrochen, reflektiertes Licht wird aufgefangen und zur Bildverarbeitung verwendet. So wird ein Interferenzmuster korrespondierend zu den Schichten der Gewebeprobe erzeugt.

Das Bild zeigt einen vertikalen Durchschnitt, ähnlich einem nicht gefärbten Histoschnitt. Die axiale Auflösung liegt bei 10-15  $\mu\text{m}$ , somit besser als bei der HUS, aber niedriger als bei der kLSM. Tiefen von bis zu 1,5-2 mm werden erreicht. Diese Auflösung und Tiefenbereich sind viel versprechend für die Analyse des menschlichen Hautgewebes. Veränderungen in der epidermalen Hydratation, Steroidatrophie, ethnische Unterschiede und Akneläsionen wurden mit der OCT untersucht [96]. Leider hat dieses Verfahren bisher nur einen experimentellen Charakter, eine Einführung in die Klinik steht bisher aus [97].

Tab. 1: Häufig verwendete *in vivo* Methoden zur Darstellung von dermalen Tiefenstrukturen.

Methoden	Signalquelle	Auflösung	Tiefe	Verwendung
<b>kLSM</b>	Laser 488-2500 nm	1-2 $\mu\text{m}$	200-300 $\mu\text{m}$	Mikroskopie von Hautmorphologie, Penetrationsstudien
<b>Dermatopskopspektrofotometrie</b>	Licht 450-700 nm	Vergrößerung Bis zu 80x	2 mm	Diagnostik bei Pigmentläsionen
<b>HUS</b>	Schallwellen 13-100 MHz	60-120 $\mu\text{m}$	Bis zu 7 mm	Diagnostik bei Hauttumoren, entzündlichen Prozessen etc.
<b>MRI</b>	1,5 Tesla	17-70 $\mu\text{m}$	Bis zu 7 mm	Gewebeerkundung, Wassergehalt
<b>OCT</b>	Kohärenzlasers 700-2500nm	5-20 $\mu\text{m}$	0,5-2 mm	Analyse der Hautmorphologie

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Sowohl für die dermatologische Forschung als auch für den klinischen *in vivo* Einsatz stehen immer mehr optische Darstellungsmethoden zur Verfügung. Alle erfüllen die Auflagen für den Einsatz am lebenden Probanden. Unter den gesamten Instrumenten erlaubt aber lediglich die kLSM eine Darstellung des Gewebes *in vivo* im lichtmikroskopischen Auflösungsbereich. Dieses Verfahren wurde in der folgenden Arbeit für mehrere Ziele genutzt:

Zunächst wurde gesunde menschliche Haut mit der fluoreszierenden Methode der konfokalen Mikroskopie untersucht. Neben der normalen Haut sollen Hautanhangsgebilde (Haare, Nägel, etc.) mit der kLSM dargestellt werden. Das konfokale Erscheinungsbild der menschlichen Haut soll im Detail diskutiert werden. Farbstoffverteilung und -effekte werden erforscht. Um die Messgenauigkeit des Lasermikroskops zu quantifizieren, sollen Hautparameter, wie epidermale Dicke, Stratum corneum sowie Zelldurchmesser aus unterschiedlicher Tiefe und Lokalisation, vermessen und mit den Angaben in der Forschungsliteratur verglichen werden.

Darüberhinaus sollen verschiedene Hautkrankheiten und -läsionen mit dem Fluoreszenzmodus *in vivo* betrachtet werden. Eine Anzahl von klinisch relevanten entzündlicher, proliferativer und neoplastischer Läsionen wird in kleiner Fallzahl untersucht. Die Machbarkeit der Darstellung des „Krankhaften“ mit der Fluoreszenzmethode der kLSM soll *in vivo* gezeigt werden. Ist dieses möglich, werden Anschlussarbeiten in großer Fallzahl folgen. Insgesamt soll ein Bilderatlas als Basis für weitere Untersuchungen und Diagnostik an der menschlichen Haut mittels der kLSM entstehen.