

4 Diskussion

„Das, was man sieht, sagt einen nichts, wenn man nicht schon vorher weiß wonach man Ausschau halten soll.“ (Peter B. Medawar, Nobelpreisträger der Medizin 1960)

4.1 Qualitative und quantitative Darstellung der gesunden menschlichen Haut

4.1.1 Praktische Umsetzung der kLSM

Die *in vivo* Darstellung der Haut mit der fluoreszierenden konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie bringt im Vergleich zur Lichtmikroskopie viele Vorteile mit sich, zeigt aber auch einige Nachteile auf. Die Eckpfeiler beider Untersuchungsmethoden sind in der Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Tab. 4.1: Gegenüberstellung der konventionellen Lichtmikroskopie und der kLSM

	Lichtmikroskopie	kLSM
Invasivität	Probepbiopsie erforderlich	Farbinjektion zur Tiefendarstellung
Färbungen	Mannigfache Färbeprotokolle	Begrenzte Auswahl von Farbstoffen
Darstellung	Meist farbig; in der Regel vertikale Schnittdarstellung	Grauskaliert; horizontale Schnittebene
Schnittdicke	Standartdicke: ~5 µm	≤4 µm
Vergrößerung	Je nach Objektiv bis zu 1000-fach	Ungefähr 1000-fach
Tiefe	Tiefenbegrenzung je nach Biopsie	Maximale Tiefe um die 150 µm

Im Vergleich zur Routinehistologie besteht der große Vorteil der kLSM darin, lebendes Gewebe darzustellen, ohne auf eine invasive Biopsie zurückgreifen zu müssen. Die Aufnahmen sind ohne jene Artefakte, welche sich aus der Biopsieentnahme und Bereitung der Hautprobe ergeben [31, 32]. Während Präparate bei der Nachbearbeitung für die lichtmikroskopische Betrachtung gestaucht und verformt werden (Abb. 4.1), zeigt die konfokale Lasermikroskopie lebendes Gewebe in seiner natürlichen Umgebung. Ungewohnt ist zunächst die horizontale Draufsicht (*en face*) auf die histologischen Strukturen. Auch die Grauskalierung der Bilder ist für den ungeübten Betrachter zunächst ein fremder Anblick, an den man sich aber rasch gewöhnt.

Im Vergleich zur Lichtmikroskopie besteht die größte Einschränkung in der limitierten Tiefendarstellung. Einige dermale Strukturen und Hautpathologien können nur oberflächlich betrachtet werden, ein Rückschluss auf die Tiefenausdehnung ist in vielen Fällen nicht möglich. Des Weiteren ist die Auswahl an Färbeprotokollen und Farbstoffen *in vivo* bisher sehr begrenzt, so dass viele zusätzliche Informationen und Aussagen über die Proben vorenthalten werden. Hinsichtlich Auflösung und Schnittdicke steht die fluoreszierende Methode der kLSM der Routinehistologie nicht nach. Die Schnittdicke ist geringer als ein Zelldurchmesser, Kerne sind durch die Methode gut beurteilbar. Andere Zellorganellen stellen sich leider gar nicht bzw. ungenügend dar.

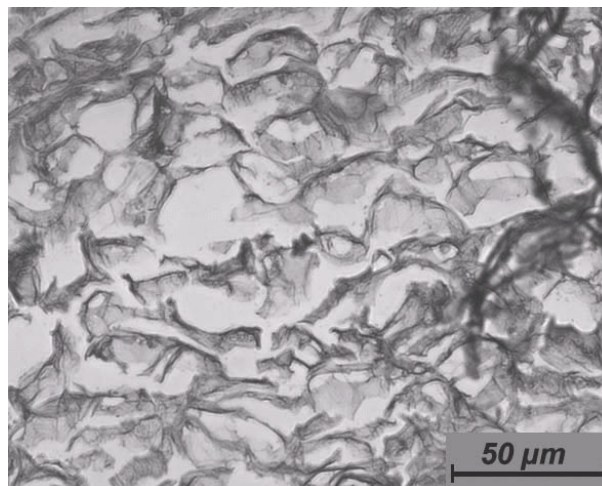


Abb. 4.1: Horizontaler Histoschnitt (Gefrierschnitt) des Stratum corneum in einer lichtmikroskopischen Betrachtung. Im Vergleich zur LSM (Abbildung 3.2.a) fällt eine deutliche Verformung der Korneozyten auf. Durch die Präparation sind nur noch Zelltrümmer und -überreste auszumachen. Zellform und -größe sowie der Zustand der Hautoberfläche, sind nicht beurteilbar.

4.1.1.1 Vorbereitungen zur Untersuchung

Das Handling des faseroptischen Lasermikroskops ist ungewohnt und benötigt Training. Um eine hohe Ausbeute während einer Untersuchung zu erzielen, bedarf es eines erfahrenen Untersuchers. Neben manuellem Geschick und Erfahrung beim Umgang mit dem Handscanner und dem gesamten Instrument, muss der Untersucher Hintergrundwissen zur Fluoreszenzmikroskopie, normalen und krankhaften Hautstruktur und -funktion besitzen [10, 31, 32]. Eine gute Vorbereitung schafft für den Untersucher ebenso für den Patienten eine ruhige, professionelle Atmosphäre. Neben Farbstoff und Injektionsbesteck müssen Reinigungsmittel (wie Wattestäbchen und Glasreiniger) zur Säuberung des optischen Fensters bereit stehen. Der Patient sollte bequem auf eine Weise gelagert werden, die das Zielgewebe leicht zugänglich macht. Durch eine gemütliche Lagerung auf einer Liege oder einem Stuhl können Verwacklungsartefakte minimalisiert werden, denn dann ist die Körperbewegung geringer.

Bevor die konfokale Untersuchung beginnt, sollte eine sinnvolle Fragenstellung geklärt werden: Welche Hautstellen möchte ich untersuchen? Wie lagere ich den Patienten? Die Zielstruktur sollte einfach zugänglich sein, damit die Untersuchung ohne Unterbrechungen und Umlagerungen stattfinden kann. Sollen bei dem Patient Vergleichsuntersuchungen eines anderen Bereiches durchgeführt werden? Was für Strukturen in dem Scanareal möchte ich darstellen? Soll die gesamte Epidermis dargestellt werden, lediglich die Hautoberfläche oder sogar nur die tieferen Hautschichten? Das würde bedeuten, den Farbstoff nur oberflächlich zu applizieren und/oder intradermal zu injizieren. Dies hätte erhebliche Auswirkungen auf die Färbetechnik und Bildschärfe. Wie sieht die Haut des Betroffenen aus? Ist sie trocken und geschuppt? Ist eine offene Läsion oder Wunde erkennbar? Ist sie mit Salben, Cremes, etc. vorbehandelt? Lohnt es sich überhaupt die Haut zu untersuchen, wie z.B. bei stark verhornter Schuppenflechte, wo man keine Ergebnisse erwarten kann? Erst bei Klärung dieser Fragen sollten die Untersuchungsprozedur fortgesetzt werden.

4.1.1.2 Farbstoffgebrauch

Ohne die Verwendung eines exogenen Farbstoffes kann in der Fluoreszenzmikroskopie kein verwertbarer Kontrast erzielt werden. Die primären Überlegungen für den geeigneten Farbstoff müssen die Erregungs- und Emissionseigenschaften bei der Wahl von Laserwellenlänge und Detektionsbandweite des Lasermikroskops einschließen. Der Farbstoff sollte eine hohe

Signalintensität erzielen, damit sich ein hoher Kontrast zu den umgebenden Bereichen ergibt. Allgemein soll er keine Toxizität besitzen, die pharmakologischen Eigenschaften sollten bekannt sein. Diese Grundvoraussetzungen machen viele *ex vivo* Farbstoffe unbrauchbar für die *in vivo* Verwendung [62].

In unseren Untersuchungen verwendeten wir Na-Fluoreszein, welches routinemäßig in der Ophthalmologie bei vaskulären Darstellungen der Netzhaut verwendet wird [27, 28, 29]. Auch andere Farbstoffe könnten für *in vivo* Studien am Menschen potentiell in Betracht gezogen werden [59, 60, 69]. Der Lebensmittelfarbstoff Curcumin ist z.B. ein Fluoreszenzmittel, welches auch mit dem dermatologischen Lasermikroskop „Stratum“ signalstark detektiert werden kann, und mit dem unser Labor Erfahrungen gesammelt hat [64]. Der Einsatz anderer Farbstoffe benötigt für den Gebrauch am lebenden Menschen allgemein weitere Validität hinsichtlich ihrer Sicherheit und Verwendbarkeit, da in diesem Bereich nur eine geringe Studienlage existiert.

Na-Fluoreszein besitzt mehrere Vorteile zur Verwendung bei der kLSM [105, 106]. Neben seinem geringen Nebenwirkungsspektrum (bei topischer Verwendung ist in der Fachliteratur bisher noch keine Nebenwirkung beschrieben), besitzt es eine hohe Absorptionskraft mit Absorptionsspeak im Bereich der Wellenlängen von dem verwendeten Argonlaser. Um tiefere Hautstrukturen darstellen zu können, muss die Penetrationsbarriere des Stratum corneum mittels intradermaler Injektion des Farbstoffes umgangen werden. Hierbei liegen die Nachteile gegenüber dem reflektierenden Verfahren der kLSM. Es hat nicht mehr eine vollkommene Nicht-Invasivität. So muss die Darstellung maligner Prozesse, wie z.B. malignes Melanom, mit Vorsicht und Überlegung angegangen werden, da es theoretisch zur Verschleppung von Tumorzellen kommen kann. Um verschiedene Hautregionen zu scannen, muss die Injektion zum Leid des Probanden an jedem Untersuchungsareal wiederholt werden, so dass in einigen Fällen eine mehrfache Unterspritzung der Haut notwendig ist.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, unterliegt Na-Fluoreszein einer zeitlichen Umverteilung. Der Penetrationsprozess, die Diffusion und Akkumulation variieren von Person zu Person und machen eine rasche Untersuchung ohne Zeitverzögerung notwendig. Ansonsten besteht die Gefahr, den Zeitpunkt zu verpassen, an dem sich eine Zellstruktur am Besten darstellt, wie z.B. in der Anfangsphase die Zellgrenzen.

Na-Fluoreszein diffundiert in wenigen Minuten von extra- nach intrazellulär und färbt dabei unterschiedliche Strukturen an. Die wechselnden optischen Bedingungen reflektieren somit die

Pharmakodynamik des Arzneimittels. Dieses macht die Interpretation der Bilder insgesamt schwieriger, stellt aber eine Möglichkeit dar, neben der Beurteilung der Morphologie Rückschlüsse auf die funktionellen Eigenschaften zu ziehen [10]. So konnten wir z.B. Barriereigenschaften der Zellen und Gefäße beobachten und evaluieren. Bei einigen Erkrankungen der Haut, wie der Psoriasis oder bei den Exanthenen, zeigte sich teilweise eine rasche intrazelluläre Anflutung des Farbstoffes, was auf eine Barriestörung der Zellmembranen schließen lässt. Bei der Psoriasis und dem BCC färbten sich die Gefäße hell an. Sie waren somit permeabler als bei gesunder Haut. Insgesamt erfolgte ein rascher Abtransport des Farbstoffes, demnach muss ein erhöhter Flüssigkeitswechsel in diesen Regionen stattfinden.

Durch Veränderung der Lösungseigenschaften und die Kopplung von Na-Fluoreszein an Trägermoleküle besteht die Möglichkeit, andere Zellstrukturen spezifisch darzustellen [10]. Dieses war nicht Thema und Gegenstand dieser Arbeit, sollte aber in folgenden Studien analysiert werden, um den Einsatzbereich der kLSM in der Dermatologie zu fördern. Wir verwendeten eine kommerziell erwerbliche, wässrige Na-Fluoreszeinlösung im sauren pH-Bereich. Die Änderung des pH-Wertes bzw. die Verwendung einer lipophilen Lösung würde wahrscheinlich andere Zellstrukturen hervorheben. Verschiedene Forschungsgruppen, die mit ähnlicher Methode gearbeitet haben, konnten z.B. keine Anfärbung der Zellkerne entdecken. Von unserem Versuchsaufbau unterschied sich im Großen und Ganzen nur das verwendete Na-Fluoreszein, welches sie in wässriger Lösung eigenständig fabrizierten [10, 60]. Des Weiteren können spezielle Trägermikropartikel eingesetzt werden, um bestimmte Komponenten der Haut zu betonen [65, 66, 67, 68, 69]. Ein interessanter Ansatz sind immunologische Verfahren mit Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip färben sie nur zu ihnen passende Antigene. So konnten am Mäusemodell *in vivo* erste diagnostische Erfolge erzielt werden [63]. Dieser Einsatz von Farbstoffen ermöglicht eine Aussagekraft mit hoher Spezifität und Sensitivität zur Erkennung von Krankheiten. Dadurch würden die Bedeutung und Wichtigkeit der dermalen kLSM um ein Vielfaches gesteigert. Leider stehen *in vivo* Studien am Menschen bisher noch aus.

4.1.2 Qualitative Darstellung der gesunden Epidermis

Insgesamt konnte jedes Hautareal mit dem flexiblen Scannerkopf des LSM „Stratum“ erreicht und exploriert werden. Ohne das Erfordernis einer Biopsie wurden die zellulären Strukturen der Epidermis und Anteile der oberen Dermis sichtbar. Wir haben im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt, dass die verschiedenen epidermalen Schichten als auch Hautanhangsgebilde morphologisch voneinander zu unterscheiden sind und sich *in vivo* analysieren lassen. So konnten neben Haare, Schweißdrüsen und Nägel, Leberflecke, Hautfurchen bis hin zu Mitosen untersucht werden. Die Ergebnisse waren konstant und reproduzierbar. Die konfokalen Bilder stimmen mit denen der Lichtmikroskopie weitestgehend überein [10, 31, 32].

Die epidermalen Schichten charakterisierten sich im Wesentlichen hinsichtlich ihrer Zellform, in ihrer Position zu anderen Strukturen (wie der dermalen Papillen) und in ihrer Tiefenlage. In Abhängigkeit von der Körperregion konnten Tiefen weit über die Epidermis hinaus bis einschließlich der papillären Dermis erreicht werden. Diese war durch ihre faserreiche Zellarmut und die starke Farbstoffeinlagerung ohne Kontrastgrenzen nur spärlich zu evaluieren. Interessant war das Erscheinungsbild der gesunden, oberflächlichen Hautgefäße, insbesondere beim Vergleich zu Erkrankungen wie der Schuppenflechte. Melaninhaltige Zellen absorbierten das Laserlicht, so dass sich Pigmentläsionen überwiegend dunkel, ohne jeglichen Kontrast darstellten. Besonders dunklere Hauttypen zeigten an dem epidermalen-dermalen Übergang eine dunkle Basalzellschicht. Eine weitere Beobachtung war die natürliche Hefenbesiedlung der Haut. Die verschiedenen *Malassezia*-Arten ließen sich wunderbar mit dem Fluoreszenzfarbstoff darstellen. Es zeigte sich eine wechselnde Dichte, die je nach individueller Körperpflege und Haarwachstum variierte.

Neben der reinen anatomischen Analyse ließen sich morphologische Rückschlüsse auf den Zustand der Haut ziehen. Trockenheit, Faltenreichtum und Schuppung der Epidermis waren, wie im Ergebnisteil gezeigt, deutlich zu erkennen. Bei der Auswertung dieser Zustände als auch bei der Darstellung größerer Hautstrukturen zeigten sich mit dem „Stratum“-LSM einige Schwierigkeiten. Durch den geringen Bildausschnitt von 250x250 µm und der fehlenden Gesamtübersicht war es schwierig, Ereignisse in großem Maßstab zu evaluieren, insbesondere wenn es darum ging, qualitativen Beobachtungen zu quantifizieren. Ein wichtiges Beispiel wäre bei Penetrationsstudien, wie viele Haare sich auf einer abgesteckten Fläche Haut befänden [65]? Oder Hautparameter wie Papillendichte und Faltenreichtum. Teilweise stellen sich in dieser

hohen Vergrößerung nur Anschnitte einer Struktur da, wie z.B. ein großer Haarfollikel oder ein Leberfleck. Diese sprengen den kleinen Bildausschnitt durch ihren Umfang. Zusätzlich kann dem ungeübten Beobachter der Scannerkopf zur Hautoberfläche leicht verrutschen. Dann ergibt sich die Schwierigkeit, Strukturen wieder einzustellen, ja gar wieder zu finden, welche zuvor untersucht wurden. Eine Lösung für dieses Problem geht nur mit Einbuße der Bewegungsfreiheit des Scannerkopfes einher. So verwendet z.B. das dermatologische LSM Vivascope 1500 (Lucid Inc, Henrietta, NY, USA) ein auf die Haut fixierbares Kontakt-Interface. Dieses wird auf das zu untersuchende Hautareal aufgeklebt und in Verbindung mit der starren optischen Apparatur des Lasermikroskops gebracht. Ein Motor bewegt das Interface um das optische System, das bedeutet, die Haut wird gegen das Objektiv verschoben und nicht, wie beim „Stratum“, der Scanner gegen die Haut. So kann durch Raster-scannen eine grobauflösende 4x4 mm Übersichtsaufnahme eines Hautareals erschaffen werden (Abb. 4.2). Zur Detailansicht wählt man digital eine Struktur an, der Motor verschiebt die Haut und positioniert diese so, dass die gewählte Form zentriert und in höherer Vergrößerung betrachtet werden kann. Ein sinnvoller Technisierungsschritt zur Auswertung im größeren Maßstab. Der Nachteil ist, dass das Interface nur auf ebener Haut angebracht und befestigt werden kann; so entziehen sich einige Körperregionen der Untersuchung [110].

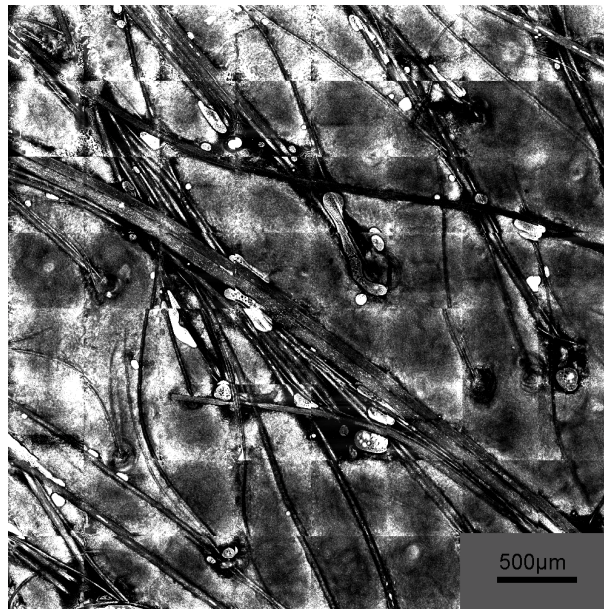


Abb. 4.2: Rasterübersichtsaufnahme der Kopfhaut, aufgenommen vom Vivascope 1500, einem dermatologischen LSM, mit dem reflektierenden Verfahren arbeitend. Gut sind bei dieser Aufnahme die einzelnen Haare der Kopfhaut zu erkennen, welche im Haarfollikel verschwinden. Einfach können die einzelnen Strukturen mit dem Justierungsmotor direkt angesteuert werden.

Eine weitere Besonderheit ist der dynamische Aspekt der Untersuchung durch die Farbstoffumverteilung. Aus einer rein starren, morphologischen Methode wird eine fließende, lebendige Betrachtung. Abhängig von der Verwendung des Farbstoffes, konnten so verschiedene Hautstrukturen zu unterschiedlicher Zeit hervorgehoben werden. Die Diffusion des verwendeten Na-Fluoreszeins konnte in allen Schichten der Epidermis, außer bei den toten Zellen des Stratum corneum beobachtet werden. Zunächst zeigte sich der Extrazellulärraum kontrastiert und später wanderte der Farbstoff zunehmend nach intrazellulär. So waren zunächst die Zellgrenzen und im Verlauf die Zellkerne beurteilbar. Schließlich färbte sich das gesamte Zytoplasma hell, wodurch die Differenzierung der einzelnen Histokomponenten verloren ging. Die Clearance des Kontrastmittels erfolgte weitestgehend durch die Gefäße in den Körperkreislauf als auch durch die Schweißdrüsen nach außen hin. Diese Umverteilung bedeutet für den Untersucher weiterhin, dass die konfokale *in vivo* Analyse in ihrem zeitlichen Rahmen begrenzt ist. Nach einmaliger Injektion des Farbstoffes muss die Untersuchung innerhalb kürzester Zeit erfolgen, um einen maximalen Kontrast zu erzielen. Ein kontinuierliches Scannen ohne Pausen, zur Echtzeitbeobachtung der Farbstoffpenetration, sowie das Ausleuchten eines Hautareals in verschiedener Tiefe ermöglicht ein gutes Verständnis über den Aufbau der Haut. Leider können solche Scannsequenzen in dieser Arbeit nur durch Bildauszüge angedeutet werden. Die Farbstoffkinetik war bei gesunder Haut zeitlich annähernd konstant; Änderungen im Verteilungsverhalten fielen bei Erkrankungen ins Auge und erlaubten zusätzliche Aussagen über den Zustand der Haut.

Wiederholt anzumerken ist, dass die größte Restriktion bei der fluoreszierenden Methode der kLSM in der Tiefenbegrenzung besteht. Zwar ist die Methode suffizient, die Epidermis an jeder Stelle der menschlichen Haut erfolgreich darzustellen, aber Strukturen tieferer Hautschichten wie der Subcutis bleiben dem Betrachter verborgen. Auch können andere Zellorganellen, außer dem Kern, mit diesem Färbeprotokoll nicht gezeigt werden. Hautanhangsgebilde wie Haare und Schweißdrüsen können nur an der Hautoberfläche bis ca. 150 µm in die Tiefe verfolgt werden; ihre tieferen Strukturen liegen außerhalb des Scanbereiches – aber genau diese Regionen wären für viele dermatologischen Fragestellungen interessant.

4.1.3 Quantitative Vermessung der gesunden Haut

Durch die digitale Speicherung konnte das Bildmaterial einfach aufgearbeitet und analysiert werden. Computerunterstützte Vermessung- und Analyseprogramme ermöglichen ein genaues Bestimmen einzelner Hautparameter in kurzer Zeit, so dass aussagekräftige Daten in hoher Fallzahl erhoben werden können [82].

Wir haben die Epidermis bei insgesamt 12 gesunden Probanden an verschiedenen Hautlokalisationen mit der Fluoreszenzmethode der kLSM *in vivo* vermessen. Ohne die Notwendigkeit einer invasiven Probeentnahme konnten so unterschiedliche Parameter der Haut im Mikrometerbereich quantitativ bestimmt werden. Trotz der geringen Probandenzahlen filterten sich einige signifikante Unterschiede heraus, die aber hinsichtlich ihrer Validität in weiteren Arbeiten noch gesichert und bestätigt werden müssen.

Eine große Einschränkung des LSM „Stratum“ besteht darin, dass die Tiefenskala nicht in absolute Einheiten kalibriert ist. Die angezeigte Skala gibt nur relative Einheiten (rE) des Analog-Digital-Konverters von dem Linsen-Position-Sensor wieder. Der Sensor arbeitet in dem Messintervall nahezu linear und eine relative Einheit entspricht nach Vergleichswerten ungefähr 0,7 bis 0,8 μm . Trotzdem kann so keine genaue Mikrometerangabe bezüglich der Tiefenparameter erzielt werden. Die Gegenüberstellung mit anderen Messmethoden kann hier also nicht absolut, sondern nur relativ gezogen werden.

Allgemein lässt sich festhalten, dass topographische Unterschiede im Aufbau der Hautmorphologie existieren. Die wichtigsten Funde waren:

1. Am Stamm zeigten sich sowohl geringer Hornzellendurchmesser als auch eine dünnere Hornzellschicht und Epidermis im Vergleich zu den Extremitäten. Ausnahmen bildeten Hand und Finger.
2. Geschlechtsspezifische Unterschiede scheinen in der Ausprägung der Haare und Haarfollikel zu bestehen, weniger in den Zellgrößen und Tiefenparameter.

Diese Ergebnisse überraschen nicht und bestätigen im Großen und Ganzen die Erwartungen, die in der Literatur gefunden werden können. Epidermistiefe und insbesondere das Stratum corneum (Hornzellausmaße, Tiefenausdehnung und Anzahl der Schichtlagen) sind essentielle Größen in der dermatologischen Forschung. Viele Arbeiten beschäftigen sich mit diesen Themen, zeigen

Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht als auch von der Sonneneinstrahlung und der Bekleidung [33, 111, 112, 113]. Einige *ex vivo* Studien mit Biopsie als auch *in vivo* Arbeiten mit unterschiedlichen Verfahrensweisen kartografieren die Epidermis mit wechselndem Erfolg [25, 33, 111, 114, 115, 116]. Jede Methode zeigte dabei Vor- und Nachteile auf. Festzuhalten bleibt, dass nur die kLSM *in vivo* Bilder in mikroskopischer Auflösung wiederzugeben vermag. Andere Methoden mit einer gröberen Auflösung eignen sich im Vergleich aufgrund ihrer höheren Eindringtiefe besser zur Tiefenvermessung.

Ein besonderes Interesse in der dermatologischen Forschung stellt die äußerste Schicht der Haut, das Stratum corneum, dar. Sie ist eine effektive Barriere gegen die Außenwelt und somit ein großes Hindernis für topisch aufgetragene pharmakologische Substanzen. Viele Studien konzentrieren sich auf die Penetrationseigenschaften und –wege durch diese Schicht [67, 68, 69]. Die Kenntnis der genauen morphologischen Verhältnisse ist für eine exakte Beurteilung nicht zu entbehren. So analysierte auch Schwindt et al. in einer Arbeit von 1998 die Stratum corneum-Dicke an verschiedenen Körperregionen mittels der Messung des transepithelialen Wasserverlustes (TEWL) und Tapestripping [117]. Sie zeigten, dass ihre kalkulierten Werte denen der elektronenmikroskopischen Ultrastrukturanalyse von Holbrook und Odland (1974) annähernd glichen [114]: Signifikante Unterschiede bestanden zwischen Extremitäten und Stamm (abdomineller Bereich), mit einem breiten Stratum corneum bei Arm und Bein (Tab. 4.2). Eine bedeutsame Abweichung zum Rücken wurde nicht gezeigt; ungeachtet dessen ist hier eine Tendenz zu einer dünneren Hornschicht zu erkennen. Ähnliche Ergebnisse konnten in dieser Arbeit mit dem Fluoreszenzmikroskop „Stratum“ demonstriert werden. So bestand nicht nur zwischen den Extremitäten und Rücken ein Tiefenunterschied, sondern auch zwischen dem Kopf und dem Stammbereich. Der zweite Befund wird auch durch eine ausführliche morphometrische Arbeit von Huzaira et al. (2001) bestätigt [33]. Um Unterschiede zwischen sonnenexponierten und -geschützten Regionen der Haut zu zeigen, vermaßen sie mit der reflektierenden Methode der kLSM verschiedene Körperareale. Kein Unterschied bestand in ihrer Publikation zwischen Rücken, Arm und Bein, wobei, im Widerspruch zu den bisher aufgezeigten Studien, der Rücken sogar das breiteste Stratum corneum besaß. Insgesamt zeigten sich sehr kleine Tiefenparameter. Eine Studie von Gambichler et al. (2004) durchgeführt mit dem gleichen dermatologischen Lasermikroskop, mit Messungen am Unterarm, entgegnete Huzaira et al. mit wesentlich größeren Werten für das Stratum corneum ($12,8 \pm 3 \mu\text{m}$ vs. $9,58 \pm 0,8 \mu\text{m}$) [113]. Diese scheinen hinsichtlich eigener Ergebnisse und den Erfahrungen der anderen genannten Arbeiten stimmiger zu sein.

Ein Mangel bei all den oben genannten Arbeiten für die Tiefenmessungen der Hornschicht sind die geringen Fallzahlen. Bei den *in vivo* Methoden übersteigen diese nur selten eine Anzahl von 10 Probanden. Weitere Erklärungsversuche für die Abweichungen in den Ergebnissen sind die ungenaue Definition der Messlokalisationen; z.B. gibt Huzaira et al. als Ort der Messung am Bein keinen differenzierten Messpunkt. Doch wie eigens gezeigt, bestehen alleine zwischen der Vorder- und Rückseite des Unterarmes signifikante Unterschiede. Solche werden auch an anderen Körperregionen zu erwarten sein. Messungen am gleichen Körperteil (z.B. dem Bein) an unterschiedlichen Arealen (Ober- vs. Unterschenkel) können auf diese Weise zu großen Abweichungen führen. Weitere Fehlerquellen liegen, neben dem individuellen Ablesefehler des Untersuchenden, bei Kalibrierungsfehlern am Messgerät selber. Auch eine optische Schichtdicke von ungefähr 4 µm führt zu Messabweichungen. Werden Schichten von nur wenigen Mikrometer Ausmaß bestimmt, so können bei der Ermittlung der oberen und unteren Abgrenzung erhebliche Schwankungen auftreten. Eine generelle Kritik der Fluoreszenzmethode der kLSM besteht in der Verwendung des Farbstoffes: In Abhängigkeit vom Wassergehalt des Stratum corneum konnte Idson (1971) erhebliche Unterschiede zwischen dem Status „trocken“ (15 µm Tiefe) und „hydriert“ (bis zu 48 µm Tiefe) zeigen [118]. Der Einfluss des Farbstoffes auf die Hydratation wurde in dieser Arbeit nicht näher betrachtet, sollte aber in zukünftigen Arbeiten genauer unter die Lupe genommen werden. Die Anzahl der Zellschichten konnte leider nicht bestimmt werden, da sich durch die Barriereigenschaften die mittleren Schichten nicht anfärben ließen. Die oben angeführten Messfehlerquellen sind auch für die anderen epidermalen Tiefenvermessungen zu berücksichtigen.

Tab. 4.2: Topografische Studien über die Dicke des St. corneum menschlicher Haut.

Studie \ St.corneum	Kopf	Unter-arm	Bein	Rücken	Bauch
Schwindt (1998), TEWL (in µm)		12,3 ±3,6	13,1 ±4,7	11,2 ±2,06	7,7 ±1,7
Holbrooke (1974), LM (in µm)		12,9 ±3,8	10,9 ±3,1	9,4 ±2,2	8,2 ±1,9
Huzaira (2001), kLSM (in µm)	13,66 ±2,9	9,58 ±0,8	8,08 ±1,08	10,41 ±0,8	
Eigene Ergebnisse (in rE)	22,18 ±2,15	17,82 ±0,68	22,96 ±1,95	12,22 ±1,62	

Beim Vergleich der weiteren Tiefenergebnisse (minimale Epidermisdicke (E_{\min}), maximale Epidermisdicke (E_{\max}) und Papillenhöhe (Pa)) mit anderen publizierten Studien, zeigen sich analoge Bewandnisse wie für das Stratum corneum [11, 33, 111, 113]. Whitten und Everall (1973) determinierten die epidermale Dicke an 22 verschiedenen Körperregionen mittels Biopsie und Lichtmikroskopie. Inklusive Stratum corneum erhielten sie eine mittlere epidermale Dicke ($(E_{\max} - E_{\min}) : 2$) von 60,9 μm , 43,4 μm und 54,3 μm für Arm, Rücken und Bein [111]. Vergleichbare Werte offenbarten auch andere Studien, die sich lichtmikroskopisch mit der Vermessung der Epidermis auseinandersetzten [11]. Wir erhielten für die gleichen Regionen Werte von gerundet 61,3, 59,7 und 66,5 in rE. Ähnlichkeiten zu unseren Daten sind nicht zu verleugnen, wobei sich die größte Abweichung zur Arm-Epidermis zeigte.

Für *in vivo* Vermessung der Epidermisdicke wurden nahezu alle auf dem Markt befindlichen Gerätschaften verwendet. So präsentierte z.B. Nouveau-Richard et al. (2004) in einer interessanten Vergleichsstudie, dass das Reflexionsverfahren der kLSM als auch die HUS zur Vermessung von E_{\min} und E_{\max} geeignet sind [113]. Dabei ergaben sich Werte für den Unterarm E_{\min} um die 40-50 μm und E_{\max} um die 80-90 μm bei der kLSM. Obwohl die Ergebnisse beider Methoden korreliert werden konnten, bestand die Einschränkung der kLSM in der geringen Tiefenpenetration. Auch in der bereits oben genannten Studie von Huzaira et al. (2001) mit dem Reflexionsverfahren wurden die Dicken der Epidermis vermessen. Es ergaben sich E_{\min}/E_{\max} für den Kopf 63,71/130,25 μm , Arm 50,83/130,36 μm , Rücken 62,05/101,58 μm und Bein 65,44/110,58 μm . All diese Werte sind wesentlich höher als in der vorliegenden Arbeit und im Literaturvergleich. Gründe für diese abweichenden Resultate sind in systematischen Fehlerquellen zu suchen, wie z.B. falscher Kalibrierung.

Wesentlich einfacher als die Vermessung der Tiefenparameter gestaltet sich die Bestimmung der Zelldurchmesser und -flächen; also all jene Werte von Strukturen, die eine laterale Ausdehnung horizontal zur Hautoberfläche besitzen. Hier arbeitet das LSM „Stratum“ in einer metrischen Skala. Die seitliche Auflösung ist so differenziert, dass eine quantitative Bestimmung zuverlässig und genau machbar ist. Ein Vergleich mit anderen Studien ist gut möglich.

Wir haben beim Probandenkollektiv A Zellen der Kopfhaut in den verschiedenen Epidermisschichten vermessen. Dabei zeigte sich, dass je nach Lokalisation in der jeweiligen Schicht hohe Differenzen zu erwarten waren. Verallgemeinern ließ sich, dass, je tiefer der Laserfokus in der lebenden Haut, desto kleiner die Ausmaße der Keratinozyten sind. So schwankten die Zelldurchmesser im Stratum granulosum zwischen 30 μm in den oberen

Schichten bis hin zu 18 μm in den unteren. Das Gleiche war auch für die Zellen des Stratum spinosum zu beobachten, wo Werte zwischen 20 μm bis zu 10 μm ausgemessen werden konnten. Die Zellen des Stratum basale waren zwischen 12-8 μm im Durchmesser. Gleiche Resultate beschrieben anderen *in vivo* Studien, wie z. B. Swindle et al. (2003), Corcuff et al. (1993) und Veiro und Cummins (1994) [10, 24, 62], um nur wenige zu nennen. Eine weitere Beobachtung war der fließende Übergang zwischen den einzelnen epidermalen Schichten. Es bestand demnach keine starre Abgrenzung der Epidermiszellschichten und dieses erschwert die genaue Angabe, in welcher Höhe sich die Vermessung in der jeweiligen Schicht vollzog. Aus diesen beiden eben genannten Gründen sind Zelldichtevergleiche bzw. Zellvermessungen aus den Epidermisschichten in der Literatur mit großer Vorsicht zu genießen. Sie werden uns in einigen Arbeiten präsentiert, um z.B. Effekte des Alterns und den Einfluss der UV-Strahlung auf die Haut zu studieren [33, 111, 112]. Aber bereits geringe Tiefenunterschiede können signifikant Differenzen offenbaren und zu großen Wertunterschieden führen.

Aus diesem Grund haben wir beim Probandenkollektiv B nur die Zelldurchmesser der Korneozyten der äußersten Hornzellschicht bestimmt, um einen Vergleich zwischen den Hautarealen zu ziehen. Wie in anderen Publikationen bereits angeführt, lag der Korneozytenlängsdurchmesser um die 30-40 μm [10]. Dass morphologische Unterschiede in Abhängigkeit von der Körperregion existieren, war in der Literatur bereits bekannt. Vermessungen bezogen sich meist auf die Stratum corneum Tiefe, Anzahl der Zelllagen und Dicke einer Zelllage, weniger auf den Längsdurchmesser der Korneozyten. Wir konnten trotz geringer Fallzahl einen signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen Hautarealen zeigen. Besonders auffällig war der geringe Korneozytendurchmesser an Rücken und Finger im Gegensatz zu Arm, Bein und Kopf. Diese Kenntnisse könnten für weitere Penetrationsstudien von Interesse sein und sollten an größerer Fallzahl validiert werden. Leider konnten aufgrund der starken Barriereigenschaften nur die äußersten Schichten des Stratum corneum beobachtet werden. Lipophile Farbstofflösungen mit einer höheren Penetrationstiefe könnten für diese Thematik vom großen Nutzen sein.

In einem abschließenden Statement lässt sich zusammenfassen, dass die fluoreszierende kLSM eine gute Methode zur *in vivo* Vermessung der oberen Epidermis ist. Im Vergleich zu anderen Geräten ergeben sich Vorteile aufgrund der mikroskopischen Auflösung, Schwierigkeiten aber in der Tiefenvermessung. Eine genaue metrische Kalibrierung muss gefordert werden.

4.2 *In vivo* Darstellung erkrankter Haut

Eines der Ziele war, zu zeigen, dass die Kombination von kLSM und Farbstoffgebrauch eine sinnvolle Variante darstellt, erkranktes Hautgewebe zu erkunden. Die Tür für die *in vivo* Erforschung von Hautläsionen und für einen möglichen Einsatz in der dermatologischen Diagnostik sollte mit dieser Arbeit einen Spalt geöffnet werden. So wurden eine Vielzahl von unterschiedlichen Hautkrankheiten untersucht, um zu sehen, ob der pathologische Aspekt deutlich zu erkennen ist und wo die Vorteile zu anderen Methoden liegen. Kein Schwerpunkt dieser Arbeit war die genaue Analyse von Hauterkrankungen bzw. das Herausarbeiten von spezifischen Merkmalen einzelner Hautveränderungen.

4.2.1 Möglichkeiten und Beschränkungen

Wie im Ergebniskapitel gezeigt, lassen sich Hautpathologien hervorragend von gesunder Haut unterscheiden. Typische lichtmikroskopische Histomerkmale bilden sich meist mit der kLSM gut ab. Der Vorteile der Methode zur Lichtmikroskopie liegen in der Möglichkeit der zellulären Betrachtung ohne die Notwendigkeit einer verletzenden Biopsie. Dadurch kann ein und dasselbe Areal zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt gescannt werden. Therapiefortschritte können mit der konfokalen Mikroskopie zeitlich einfach verfolgen, Follow-up Studien ohne größeren Aufwand durchgeführt werden [31, 32]. Dem Untersucher und Erforscher dermalen Erkrankungen ergeben sich rasch Informationen über die Zellarchitektur der lebenden Haut.

Pathologische Phänomene können dabei nicht nur an der Oberfläche, sondern auch in der tieferen Epidermis beobachtet werden. An der äußeren Hornschicht werden Erscheinungen wie Parakeratose, Hyperkeratose, Schuppung als auch Pilzstrukturen und Milben sichtbar; die lebende Epidermis zeigt im Wesentlichen morphologische Veränderungen in der Form und Anordnung der Keratinozyten als auch Veränderungen der Papille und der Gefäße. Insbesondere bei entzündlichen Erkrankungen offenbarten sich vergrößerte Papillen mit dilatierten Gefäßen. Zusätzlich zu diesen Erscheinungen wurden Entzündungsinfiltrate gut dargestellt. Eingewanderte Leukozyten konnten anhand ihrer Form und der Gestaltung des Nukleus voneinander und von dem epidermalen Gewebe unterschieden werden. Ein großer Vorteil der Fluoreszenzmethode der kLSM gegenüber der bislang klinisch bevorzugten Reflexionsmethode ergab sich durch die veränderte Pharmakokinetik des Farbstoffes in dem erkrankten Hautgewebe. Phänomene wie

gestörte Zell-Zellkontakte, verminderte Barrierefunktionen der Zellmembran ebenso ein gesteigerter Flüssigkeitsumsatz konnten so bei den verschiedenen Hautkrankheiten beobachtet werden. Dies ist bei der rein morphologischen Methode der beiden anderen mikroskopischen Darstellungsverfahren (reflektierende kLSM, konventionelle Lichtmikroskopie) nicht möglich. Die Notwendigkeit einer Farbstoffinjektion zur Darstellung der tieferen epidermalen Schichten bringen aber auch einige Nachteile mit sich: Bei malignen Prozessen, wie z.B. einem Melanom, ist ein Nadelstich direkt in die Neoplasie aufgrund der Verschleppungsgefahr von Tumorzellen unerwünscht. Das Gleiche gilt grundsätzlich auch für infektiöse Prozesse. Hierbei liegt die Restriktion der Technik der intradermalen Injektion; an dieser Stelle ist das reflektierende Verfahren dem fluoreszierenden weit überlegen. Des Weiteren ist durch die rasche Umverteilung und der zügigen Clearance des Farbstoffes aus dem erkrankten Gewebe der zeitlich Rahmen der Untersuchung sehr eng gesteckt; bei der reflektierenden Lasermikroskopie besteht in dieser Hinsicht keine Einschränkung [31, 32].

Die größte Beschränkung besteht in der geringen Eindringtiefe des Laserlichtes. Dadurch können pathologische Prozesse teilweise nur partiell betrachtet werden. Tiefenabgrenzungen sind so nicht zu bewerkstelligen. Essentielle Fragen mit prognostischer Bedeutung, wie z.B. Tumorausdehnung oder Durchbrechung der Basalmembran, können mit der Methode häufig nicht beantwortet werden.

4.2.2 Aussichten, Visionen und weitere Projekte

Beim direkten Vergleich mit anderen *in vivo* Methoden, welche in näherer Zukunft zum diagnostischen Einsatz kommen könnten, ist das Potential der kLSM im oberen Bereich einzustufen. Die geringe Eindringtiefe des Laserlichtes wird durch die hohe Auflösungskraft und die mikroskopische Darstellung relativiert. Allgemein zeigt ein jedes Gerät in Abhängigkeit der verwendeten Modalität Vor- und Nachteile auf [80, 82]. Sinnvoll ist die Überlegung, wo die Stärken und Schwächen des Einzelnen liegen, um so das richtige Instrument für die jeweilige Untersuchung zu finden. Wie gezeigt, ist die fluoreszierende kLSM ein sehr geeignetes Werkzeug zur morphologischen Darstellung der lebenden Hautoberfläche und der oberen Epidermis. In diesem Bereich steht es lediglich in direkter Konkurrenz mit dem Reflexionsverfahren der kLSM. Andere Geräte (z.B. HUS oder OCT) sind hingegen zweckmäßiger bei der Darstellung tieferer Hautstrukturen; im optimalen Fall der gesamten Kutis als auch der Subkutis. So können sie z.B. für die Analyse von Tumortiefenausdehnungen

verwendet werden. Verschiedene Arbeitsgruppen, so auch unseres Labor, versuchen eine intelligente Kombination von mehreren Methoden zu erreichen. Durch eine geschickte Verknüpfung ist es möglich, Nachteile des Jeweiligen auszugleichen. So haben wir gefordert, dass eine Kopplung vom Fluoreszenz- und Reflexionsverfahren der kLSM in einem Werkzeug erstrebenswert wäre [110]. Allein durch die andersartige Kontrastgebung könnten so mehr Informationen aus dem Gewebe gezogen werden. Ähnliche Ansätze bestehen auch für die Raman-Spektroskopie in Verbindung mit der kLSM. Caspers et al. (2003) konnte zeigen, dass eine Zusammenfügung beider Geräte in einem Instrument möglich ist [84]. Neben der morphologischen Analyse konnten so Aussagen über die chemische Beschaffenheit des Hautareals getroffen werden, in diesem Fall über die Hydratation. Diese Beispiele verdeutlichen die Möglichkeiten, die sich in näherer Zukunft in der dermatologischen *in vivo* Diagnostik ergeben werden. Auch eine ergänzende Untersuchung von Hautkrankheit mit unterschiedlichen *in vivo* Geräten, z.B. der HUS zur Messung der Tiefenausdehnung und anschließend der kLSM zur Beurteilung der Histostruktur, scheint eine sinnvolle Erweiterung zum bisherigen Standart.

Um die Stellung der kLSM künftig in der dermatologischen Diagnostik zu festigen und weiter zu etablieren, folgen in unserem Labor zur Zeit Anschlussarbeiten mit dem LSM „Stratum“ mit Schwerpunkt auf Psoriasis und neoplastischen Hautveränderungen. Patienten mit diesen Erkrankungen werden in hoher Fallzahl untersucht, der Aspekt dieser Hautveränderungen soll analysiert werden. Die Herausforderung ist, archetypische Merkmale zur Abgrenzung zu anderen Hautpathologien zu finden. Zusätzlich werden Möglichkeiten der *online* Verlaufsbeobachtung unter topischer Therapie studiert. Auf diese Weise sollen frühzeitig Rückschlüsse über Erfolg oder Progression der Krankheit erhalten werden.

Weitere lasermikroskopische Untersuchungen von menschlicher, gesunder Haut müssen nach dieser Arbeit folgen. Die gefundenen Daten und konfokalen Bilder der normalen Haut müssen erfolgreich und in hoher Fallzahl bestätigt werden, um eine hohe Aussagekraft zu erreichen. Ein detaillierter Atlas mit konfokalen Bildern unter Berücksichtigung der topografischen Unterschiede wäre für die Dermatologie wünschenswert. Denn nur wer das Normale und seine Varianten kennt, kann Anzeichen für Pathologisches deuten.

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erweiterung des Einsatzgebietes der fluoreszierenden Methode der kLSM im Bereich der klinischen Dermatologie. Es handelt sich dabei um ein *in vivo* Verfahren, welches sich in den letzten Jahren in der Erforschung der Hautphysiologie etablieren konnte. Keine Arbeiten existierten aber bisher über die Verwendungsmöglichkeiten als potentiell Werkzeug zur Untersuchung von Hautkrankheiten und im Gebiet der klinischen Diagnostik.

Als Farbstoff wurde topisch und/oder intradermal Na-Fluoreszein appliziert. Mittels eines dermatologischen LSM konnte ein Bildkontrast erzeugt werden. Die konfokalen Bilder zeigten allesamt die Histoarchitektur der oberflächlichen Haut in horizontalen Schnittebenen. Ohne das Erfordernis einer invasiven Biopsie konnten Tiefen bis zu 150 μm *in vivo* exploriert werden.

Zunächst wurde die Methode bei 12 gesunden Probanden verwendet. So konnte der Aspekt der normalen Haut mit konfokalen Bildern erfasst und studiert werden. Die Untersuchungen gingen, unter der detaillierten Einbeziehung verschiedener Hautanhangsgebilde und gutartiger Hautveränderungen, über die bisherigen Publikationen weit hinaus. Neben der Morphologie der gesunden Haut konnte ein zeitliches Verteilungsmuster des Farbstoffes beobachtet werden. Zunächst lagerte dieser extrazellulär, färbte aber innerhalb von Minuten erst Zellkern und danach Zytoplasma an. Dieses Färbemuster zeigte sich bei Hauterkrankungen verändert.

Im nächsten Schritt wurden unterschiedliche Hautparameter, z.B. Tiefengrößen für die Epidermis und Durchmesser der epidermalen Zellen, der gesunden Haut quantitativ bestimmt. Eine Gegenüberstellung verschiedener Hautareale wurde durchgeführt. Es offenbarten sich signifikant topografische Differenzen, insbesondere zwischen den Extremitäten und Stamm. Einschränkungen der Vermessungen ergaben sich an Arealen mit starker Hornschicht wie Hand und Finger sowie allgemein bei Tiefenmessungen durch die geringe Eindringtiefe des Lasers als auch durch die fehlende Kalibrierung des Gerätes. Stärken zeigten sich in der Vermessung zellulärer Strukturen durch das mikroskopische Auflösungsvermögen. Ein Vergleich zu Werten aus der Fachliteratur konnte vollzogen werden.

Zum Schluss wurden verschiedenartige Hautkrankheiten bei insgesamt 25 Patienten mit der kLSM untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass sich Pathologien klar und deutlich *in*

in vivo von gesunder Haut unterscheiden lassen. Neben der veränderten Hautmorphologie mit typisch „krankhaften“ Histomerkmalen wie Parakeratose oder Papillomatose, werden eingewanderte Entzündungszellen sichtbar und grenzen sich deutlich vom umliegenden Gewebe ab. Hefepilze der gesunden Hautflora lassen sich leicht von Mykosen differenzieren. Ein weiteres Pathophänomen besteht in dem abweichenden Verlauf der Farbstoffverteilung. Durch eine gestörte Permeabilität der Zellmembran und einem erhöhten Flüssigkeitsumsatz zeigen sich Kinetikauffälligkeiten im direkten Vergleich zur gesunden Haut. Eine Einschränkung der Methode ergibt sich bei malignen Prozessen, da die Notwendigkeit einer Farbstoffinjektion besteht. Auch zur Tiefenabgrenzung von Hautkrankheiten ist die kLSM meist nicht geeignet.

Nichtsdestotrotz stellt die fluoreszierende kLSM eine sehr aussichtsreiche Methode für die Erkundung von Hautveränderungen im oberen Epidermisbereich dar. Diese können studiert und im zeitlichen Verlauf wiederholt untersucht werden, um z.B. Therapiemaßnahmen zu verfolgen. Weiterführende Studien zur *in vivo* Erkundung einzelner Hautkrankheiten in hoher Fallzahl sind in unserer Forschungsgruppe aufgrund der Vorergebnisse dieser Arbeit längst angelaufen. Auf den viel versprechenden Einsatz der kLSM im Bereich der klinischen Diagnostik muss nicht mehr lange gewartet werden.